

مروری بر اصول علمی طراحی و ساخت نانو حسگر های زیستی اندازه گیری گلوکوز خون و کنترل دیابت

ابوالفضل میرزاپور ارمکی*

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

چکیده

طراحی و ساخت نانوحسگر های زیستی با قابلیت تشخیص سریع به یکی از زمینه های تحقیقاتی جذاب در نانوفناوری تبدیل شده است؛ نانوحسگر های زیستی ابزار های تشخیصی هستند که در ساخت آنها از یک جزء زیستی و یک جزء نانومتری استفاده می شود؛ نانو حسگر های زیستی در زمینه های مختلفی همچون پزشکی، صنایع غذایی، پایش و ارزیابی محیط زیست و دفاع و امنیت کاربرد دارند؛ نظر به اهمیت و ضرورت اندازه گیری و پایش مستمر گلوکز در تشخیص و کنترل بیماری دیابت نانوحسگر های زیستی تشخیص گلوکز خون کاربرد گسترده ای در پزشکی دارند. نانوحسگر های زیستی اندازه گیری گلوکز خون به شکل حسگر های بیرون بدنی و درون بدنی می توانند میزان گلوکز خون را از طریق واکنش های کاتالیزتی آنزیمی اندازه گیری کنند؛ آنچه در این مقاله مورد نظر قرار گرفته بررسی مروری روش های مختلف طراحی و ساخت یک حسگر زیستی تشخیص گلوکز خون است. همچنین بر روش های مختلف تثبیت آنزیم بر سطح الکتروود نیز تاکید شده است.

واژه های کلیدی: طراحی و ساخت، نانوحسگر های زیستی، اندازه گیری، گلوکز خون.

ایمیل نویسنده مسئول: a.mirzapour@modares.ac.ir

۱- مقدمه

حسگر های زیستی ابزارهای آنالیزی هستند که از یک گیرنده حسی زیستی تشکیل شده اند. حسگر های زیستی این قابلیت را دارند که در گستره وسیعی از کاربرد ها شامل تشخیص های پزشکی، سلامت غذایی، کنترل فرآیند ها، پایش و ارزیابی محیطی و کاربرد های دفاعی و امنیتی مورد استفاده قرار گیرند. مفهوم پایه ای حسگر های زیستی اولین بار در سال ۱۹۶۲ و توسط لی لاند سی کلارک^۱ مطرح شد. رایجترین نمونه الکتروود های آنزیمی، از طریق تثبیت آنزیم گلوکوز اکسیداز (GO_x) بر روی سطح الکتروود پلاتین به دست می آید که این الکتروود آنزیمی را به ابزاری قدرتمند برای تشخیص و اندازه گیری گلوکز در نمونه های خونی انسانی مبتلا به دیابت تبدیل کرده است. الکتروود های آنزیمی و حسگر های تمایل زیستی بواسطه ترکیب با روش های الکتروشیمیایی کاربرد گسترده ای در مصارف خانگی پیدا کردند که گردش مالی در حدود ۱۳ میلیارد دلار را برای این دسته از حسگر های زیستی به دنبال داشته و توجه شرکت های بزرگ ساخت ابزار های تشخیصی و حسگر ها را به خود جلب کرده است. لازم به توجه است که در کنار روش الکتروشیمیایی روش های نوری جایگاه خود را در تحقیقات و پژوهش های کاربردی حفظ کردند.

از سوی دیگر تکامل ابزار ها و تجهیزات رزونانس صوتی موجب شده تا این نوع از مبدل های نشانه در طراحی و ساخت حسگر های زیستی بیش از پیش مورد استفاده قرار گیرد. این در حالی است که استفاده از روش های گرماسنجی و مبدل های مغناطیسی در ساخت حسگر های زیستی آنچنان مورد توجه قرار ندارد. حسگر های اندازه گیری گلوکز خون که برای پایش و کنترل بیماری دیابت مورد استفاده قرار می گیرند ۸۵ درصد از بازار جهانی حسگرهای زیستی را به خود اختصاص می دهند [۱]. حسگرهای زیستی آمپرومتری تشخیص گلوکز خون که در بیماران دیابتی مورد استفاده قرار می گیرد اولین نمونه از حسگر های زیستی تشخیص گلوکز است که به صورت گسترده در بازار های تجاری توسعه یافت. اولین نمونه از این حسگر های زیستی از طریق یک استارت آپ کوچک به نام مدیسنس^۲ که در بوستون آمریکا مستقر بود به بازار ها معرفی شد. اولین نمونه حسگر های زیستی گلوکز بر پایه آنزیم گلوکوز اکسیداز و فروسین طراحی شد که به روش الکتروشیمیایی عمل می کرد. این نوع از حسگر های زیستی گلوکز در سال ۱۹۸۷ وارد بازار شدند. نسل بعدی از این حسگر های زیستی بر پایه آنزیم گلوکوز اکسیداز و فری

² MediSense

¹ Leyland C. Clark

سیانید که به وسیله شرکت تال اکس^۴ آمریکا به بازار عرضه شد. شرکت کیوتو دایچی کاگاکو^۵ (آرکرای^۶) حسگر های گلوکوزی را به بازار عرضه کرد که بر پایه آنزیم گلوکوز اکسیداز و حد واسط فری سیانید عمل می کردند، اما این محصول دارای یک باریکه موئین بود که خون را از محل ایجاد سوراخ در سطح پوست به بخش اصلی دستگاه هدایت می کرد. لازم به توجه است که به منظور رفع آثار نامطلوب در مرحله خونگیری تلاش های گسترده ای انجام شد. محصولی که از سوی شرکت فناوری پلیکان^۶ ارائه شد از سامانه نمونه گیری الکترومغناطیسی بهره می برد. همچنین به منظور رفاه بیشتر و همچنین پایش مستمر تلاش شد تا سامانه حسگر گلوکوز با سیستم تلفن همراه آی فون^۷ ترکیب شود. به صورت اجمالی باید گفت که حسگر های الکتروشیمیایی گلوکوز به عنوان اولین حسگر های زیستی که قابلیت تجاری سازی یافتند و تا کنون پیشرفت های چشمگیری داشتند. در ادامه به صورت تخصصی به تبیین این دسته از نانوحسگر ها می پردازیم.

اصول کلی طراحی و ساخت

ملاحظات اساسی که در فرآیند طراحی، ساخت و توسعه حسگر های زیستی تشخیص دهنده یک آنالیت خاص باید مورد توجه ویژه قرار گیرند عبارتند از:

انتخاب گیرنده زیستی و یا عنصر تشخیصی متناسب با حس شونده

انتخاب روشی مناسب جهت تثبیت و نشانش سامانه های تشخیصی

انتخاب روش و تعیین مبدل نشانه ای متناسب که برهمکنش های مولکولی میان حس شونده و گیرنده های زیستی و یا شیمیایی را به نشانه های قابل اندازه گیری تبدیل می کند.

طراحی حسگر زیستی با توجه به محدوده سنجش، محدوده خطی، کمینه سازی تداخل ها و بهینه سازی حساسیت حسگر زیستی.

مونتاژ حسگر زیستی به صورت ابزاری کامل و کارآمد. نکته قابل توجه این است که هر یک از موارد فوق نیازمند دانش های اختصاصی در این حوزه ها است به گونه ای که طراحی و ساخت حسگر های زیستی یکی از مصادیق حوزه های بین رشته ای تلقی می شود [۲].

^۴ TallOaks

^۵ Kyoto Daiichi Kagaku

^۶ Arkray

^۷ Pelikan Technologies

^۸ iPhonet

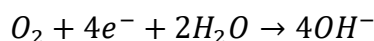
انتخاب مبدل نشانه مناسب نانوحسگر زیستی الکتروشیمیایی گلوکوز

لازم به توجه است که در طراحی و ساخت حسگر های زیستی گلوکوز دامنه گسترده ای از مبدل های نشانه مورد استفاده قرار گرفته است اما مبدل های نشانه الکتروشیمیایی بیشترین کاربرد را در ساخت حسگر های زیستی گلوکوز داشتند. حساسیت، تکرار پذیری مناسب و امکان تولید انبوه با هزینه پایین دلیل استفاده از مبدل های نشانه الکتروشیمیایی است [۳]. همانگونه که بیان شد در انتخاب مبدل نشانه مناسب باید توجه داشت که قابلیت تبدیل فرآیند ها برهمکنش های تشخیصی به نشانه های قابل اندازه گیری را داشته باشد. عموماً این کار از طریق اندازه گیری تغییراتی که در پذیرنده زیستی در اثر برهمکنش با نمونه حس شونده ایجاد می شود صورت می گیرد. در حسگر های زیستی گلوکوز که بر پایه آنزیم گلوکوز اکسیداز ساخته می شود، آنزیم به عنوان گیرنده زیستی عمل می کند واکنش زیر از طریق آنزیم کاتالیز می شود:



برای اندازه گیری گلوکوز در محلول آبی سه الگوی مختلف مبدل نشانه قابل طراحی است.

۱- حسگر زیستی حساس به اکسیژن که میزان غلظت اکسیژن مصرفی برای واکنش با گلوکوز را اندازه گیری می کند. اندازه گیری میزان اکسیژن مصرف شده در سطح نمونه را می توان از طریق الکتروده های اکسیژن کلارک اندازه گیری کرد. (الکتروده کلارک میزان اکسیژن موجود بر روی سطح الکتروده های پلاتین را بر اساس واکنش زیر اندازه گیری می کند.)



۲- حسگر قدرت اسیدی (pH) که میزان گلوکونیک اسید تولید شده طی فرآیند واکنش را اندازه گیری می کند.

۳- حسگر پراکسیداز که میزان غلظت هیدروژن پراکسید تولید شده طی واکنش آنزیمی را اندازه گیری می کند. (میزان هیدروژن پراکسیداز تولید شده طی واکنش آنزیمی به صورت مستقیم با میزان گلوکوز ارتباط دارد.

میزان هیدروژن پراکسید را می توان به روش آمپرومتری بر روی سطح الکتروده پلاتین و در پتانسیل مثبت ۷۰۰ میلی ولت نسبت به الکتروده مرجع/نقره/کلرید نقره اندازه گیری کرد. این روش در بسیاری از حسگر های

اسپکتروسکوپی امپدانس به عنوان یکی از اصلی ترین مبدل های نشانه الکتروشیمیایی در فرآیند طراحی و ساخت حسگر های زیستی الکتروشیمیایی مورد استفاده قرار می گیرد. این مبدل نشانه تغییرات الکتروشیمیایی سطح حسگر زیستی را به شکل تغییرات امپدانس (Z) و یا مولفه های سازنده آن یعنی مقاومت انتقال بار (R) و ظرفیت خازنی (C) را نشان می دهد. با توجه به اینکه معکوس مقاومت الکتریکی بیانگر میزان هدایت الکتریکی است این روش را هدایت سنجی می نامند. این روش در مقایسه با دو روش قبل تکرار پذیری پائینتری دارد اما دقت و حساسیت این روش مناسبتر است [۴].

$$Z^2 = R^2 + \frac{1}{(2fc)^2}$$

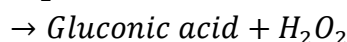
رایج ترین گیرنده های زیستی حسگر های گلوکوز

در میان انواع گیرنده های زیستی برخی از انواع آن به منظور ساخت حسگر های زیستی رواج بیشتری دارد. در بخش زیر مهمترین و پرکاربردترین گیرنده های زیستی که در طراحی و ساخت حسگر های زیستی الکتروشیمیایی گلوکوز ارائه می شود.

آنزیم

آنزیم های رایجی که در طراحی و ساخت حسگر های زیستی مورد استفاده قرار می گیرند شامل یک بخش احیاء کننده هستند که در فرآیند زیست شیمیایی تغییر می کنند. آنزیم های گلوکوز اکسیداز (GOX) و گلوکوز دهیدروژناز (GDH) دو نمونه از این آنزیم ها هستند. آنزیم های اکسیدازی از طریق اکسیداسیون سوبسترا و پذیرش الکترون به حالت احیاء شده و غیر فعال تغییر پیدا می کند. این آنزیم ها الکترون های خود را به مولکول های اکسیژن منتقل می کنند و حالت اولیه خود بر می گردند. در نتیجه این واکنش هیدروژن پراکسید تولید می شود.

(1) $Glucose + O_2$



آنزیم دیگری که در طراحی و ساخت حسگر های زیستی مورد استفاده قرار می گیرد گلوکوز دهیدروژناز (GDH) است. واکنش این آنزیم با گلوکوز از طریق دو مکانیسم انجام می شود. در این مکانیسم آنزیم به همراه NAD^+ فعالیت می کند و طی فرآیند واکنش NADH تولید می شود.

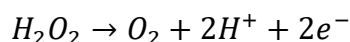
زیستی تجاری تا هم اکنون مورد استفاده قرار می گیرد)

انواع مبدل های نشانه الکتروشیمیایی

در میان مبدل های نشانه الکتروشیمیایی که به منظور ساخت حسگر های زیستی مورد استفاده قرار می گیرند مبدل الکتروشیمیایی آمپرومتری بیشترین کاربرد را در طراحی و ساخت حسگر های زیستی گلوکوز داشته است. در ادامه به صورت مختصر مبدل های نشانه ای مورد استفاده در ساخت حسگر های زیستی بررسی می شود.

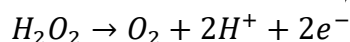
حسگر زیستی پتانسیومتری گلوکوز

در حسگر های زیستی که از مبدل نشانه پتانسیومتری استفاده می شود، در واقع میزان یون های تولیدی در سطح حسگر که به واسطه واکنش آنزیمی تولید می شود بررسی می شود. اندازه گیری فعالیت آنزیمی گلوکوز اکسیداز به روش پتانسیومتری بر پایه تغییر قدرت اسیدی (pH) در سطح مشترک و تماس آنزیم و بستر حسگر زیستی استوار است. تغییر قدرت اسیدی در سطح تماس آنزیمی را می توان به اکسید شدن هیدروژن پراکسید که در اثر فعالیت آنزیمی تولید شده است نسبت داد. در واقع حساسی حسگر پتانسیومتری معادل حساسیت مبدل نشانه ای قدرت اسیدی (pH) است. الکتروده های شیشه ای و ترانزیستور های اثر میدان حساس به قدرت اسیدی از مبدل های نشانه ای عمومی قدرت اسیدی هستند.



حسگر زیستی آمپرومتری گلوکوز

مبدل نشانه آمپرومتری در مقایسه با نمونه پتانسیومتری آن بسیار حساستر و مناسب تر تلقی می شود. در حسگر های زیستی آمپرومتری گلوکوز، میزان هیدروژن پراکسید تولید شده در سطح حسگر زیستی از طریق اندازه گیری جریان الکتریکی عبوری در سطح بستر حسگر زیستی که در نتیجه واکنش اکسیداسیون ایجاد می شود مورد بررسی قرار می گیرد. با توجه به اینکه اکسیداسیون هیدروژن پراکسید در پتانسیل ۶۰۰ میلی ولت انجام می شود اندازه گیری جریان عبوری در این پتانسی باید مورد بررسی قرار گیرد. روش آمپرومتری در سیستم های دو و یا سه الکترودی استفاده می شود.



حسگر زیستی ایمپدومتری گلوکوز

گلوکوز اکسیداز است و به منظور ساخت حسگر زیستی گلوکوز الکتروشیمیایی مورد استفاده قرار می گیرد [۵].

سایر پذیرنده های زیستی

نظر به عملکرد مطلوب گیرنده های زیستی آنزیمی به منظور شناسایی گلوکوز در خون استفاده از سایر گیرنده های زیستی همچون آنتی بادی ها، آپتامر ها و ساختار های پروتئینی دیگر به دلیل گرانیقیمت بودن مورد توجه قرار نگرفته است.

انتخاب ماتریکس مناسب (انواع بستر و زیرلایه ها)

یکی از مهمترین اجزاء سازنده حسگر های زیستی که نقش بسیار مهمی در عملکرد حسگر های زیستی دارد و در کارایی یک حسگر زیستی تاثیر قابل توجه ای دارد بستر و زیر لایه مناسب است. بستر هایی که بر پایه نانوذرات طراحی و ساخته می شوند از نظر ابعاد به مولکول زیستی شباهت دارند و از این جهت آنزیم ها بهتر با بستر حسگر در تماس قرار می گیرند و فاصله میان مرکز آنزیم و سطح حسگر کاهش یافته و الکترون ها با سرعت بیشتری به سطح حسگر می رسد [۶]. از این رو در این بخش مهمترین انواع بستر ها و زیرلایه هایی که به منظور ساخت حسگر زیستی الکتروشیمیایی گلوکوز قابل استفاده است ذکر می شود:

نانولوله های کربنی

نانولوله های کربنی می توانند به وسیله آریل دای آزونیم اصلاح می شود تا گروه های کربوکسیلیک اسید و یا گروه های آمینو بر روی سطح نانولوله های کربنی مستقر شوند که در شرایط اسیدی محلول به ترتیب بار منفی و یا بار مثبت در سطح نانولوله های کربنی ایجاد می نمایند، بر این اساس آنزیم ها می توانند از طریق پیوند های الکتروستاتیک بر روی بستر مستقر شوند. مقالات متعددی در حوزه ساخت حسگر زیستی گلوکوز براساس آنزیم گلوکوز اکسیداز تثبیت شده بر روی نانولوله های کربنی به چاپ رسیده است؛ به طور کلی دو مکانیسم برای انتقال الکترون از مرکز آنزیم به سطح الکتروارائه شده است.

- در الگوی اول نانولوله های کربنی به درونی ترین بخش از ساختار مولکولی آنزیم نفوذ می کنند و بیشترین بهره وری انتقال الکترون را سبب می شوند.
- در نظریه دوم ساختار سوم پروتئین ها در اثر تماس با نانولوله های کربنی به میزان جزئی واسرشته می شوند و بیشترین تماس میان پروتئین و نانولوله های کربنی ایجاد می شود [۷].

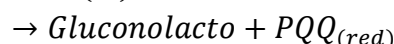
نانوذرات فلزی و نانوساختار های اکسید فلزی

(2) $Glucose + NAD^+$



در مکانیسم سوم از کوئینوپروتئین گلوکوز دهیدروژناز^۸ استفاده می شود که به اکسیژن و NAD^+ نیاز ندارد. کوئینو پروتئین ها دسته ای از آنزیم ها هستند که به ارتوکوئینون نیاز دارند. ارتوکوئینون دامنه گسترده ای از الکل ها و آمین ها را به آلدئید ها و کتون های مرتبط تبدیل می کند. کوئینوپروتئین گلوکوز دهیدروژناز به کوفاکتور پیرولوکوئینولین کوئینون^۹ نیاز دارد.

(3) $Glucose + PQQ_{(ox)}$



هر یک از مکانیسم های آنزیمی فوق می تواند برای طراحی و ساخت حسگر های زیستی الکتروشیمیایی گلوکوز مورد استفاده قرار گیرد، اما توجه به نکات زیر دارای اهمیت است:

آنزیم های اکسیدازی گران قیمت نیستند اما به اکسیژن به عنوان همسوبستزا نیاز دارند. با توجه به اینکه اکسیژن در نمونه حس شونده کاهش می یابد، کارایی حسگر های زیستی کاهش می یابد، کارایی حسگر های زیستی بر پایه آنزیم های اکسیدازی را می توان از طریق میزان کاهش اکسیژن و میزان تولید هیدروژن پراکسید بررسی کرد.

آنزیم گلوکوز دهیدروژناز به اکسیژن نیاز ندارد اما به حضور NAD^+ وابسته است، به همین جهت گزینه مطلوبی برای رصد واکنش های بیوشیمیایی قلمداد می شود. اما کوفاکتور های مورد نیاز برای این واکنش ناپایدار و گران قیمت هستند.

کوئینوپروتئین گلوکوز دهیدروژناز آنزیم های کار آمدی هستند. همچنین سرعت انتقال الکترون در واکنش های آنزیمی در این مکانیسم بسیار بالا است اما در مقایسه با دو آنزیم قبلی گرانتر هستند.

سلول

استفاده از باکتری های که در ساختار خود به مقدار قابل توجهی آنزیم گلوکوز اکسیداز دارند به عنوان پذیرنده زیستی در طراحی و ساخت حسگر زیستی الکتروشیمیایی گلوکوز قدمت طولانی دارد. باکتری آسپرژیلوس نایجر^{۱۰} که در فرآیند تخمیر صنعتی مورد استفاده قرار می گیرد از جمله باکتری هایی است که حاوی آنزیم

⁸ quinoprotein glucose dehydrogenase

⁹ pyrroloquinoline quinone (PQQ)

¹⁰ *Aspergillus niger* strain CCM 8004

– نانوذرات طلا در الگوهای مختلف (نانوذرات کروی، نانوذرات میله ای) به همراه تک لایه خودآرایی شونده دو بعدی از جنس ۳ مرکاپتو پروپیل تری متوکسی سیلان^{۱۱}

– نانوذرات طلا در ساختار شبکه پلیمری پلی پایرول
– نانوذرات طلا با بار منفی پوشیده شده بوسیله نانوسیم های پلی آنیلین که بستر مناسبی را جهت استقرار آنزیم با بار منفی فراهم می کند

✓ نانوذرات آلایژی بر پایه نانوذرات طلا

– نانوذره آلایژی طلا/نقره: در حالی که نانوذرات طلا پایداری مناسب و سازگاری زیستی قابل قبولی از خود نشان می دهند در مقایسه با پلاتین فعالیت کاتالیتی پائینتری از خود نشان می دهند. از این رو استفاده از نانوذرات آلایژی طلا/پلاتین عملکرد حسگر گلوکوز را تقویت می کند [۸].

سایر نانوذرات فلزی

– نانوذره نقره: استفاده از نانوذرات نقره در ساخت بستر حسگر موجب افزایش حساسیت حسگرها می شود. در اثر واکنش آنزیمی گلوکوزاکسیداز و گلوکوز، هیدروژن پراکسید تولید شده نقره موجود در بستر را اکسید نموده و غلظت یون نقره افزایش می یابد.

– نانوذرات مس و پالادیوم دو گروه از نانو ذرات فلزی هستند که در کنار کایتوزان و نانولوله های کربنی و همچنین و شبکه پلیمری پلی اورتو آمینوفنول^{۱۲} و شبکه فایبری پلی ۳ و ۴ اتیلدای اکسی تیوفن^{۱۳} به منظور ساخت حسگرهای گلوکوز استفاده می شوند. همچنین نانوذرات پالادیوم در کنار لیگاند هایی چون ان آلکان آمین (دودسیل آمین و اکتادسیل آمین)^{۱۴} استفاده قرار می گیرد.

نانوذرات اکسید فلزی

– ساختارهای شبکه اسفنجی اکسید روی^{۱۵} در ابعاد ۵۰۰ نانومتر – ۱ میکرومتر در ساختار کامپوزیتی با نانولوله های کربنی ساختار شاخه ای گسترده ای را برای استقرار آنزیم ها فراهم می کند. نانوذرات اکسید نقره سازگاری زیستی مناسب و فعالیت الکتروشیمیایی (سرعت بالای انتقال الکترون) دارند و ترکیبات غیر سمی هستند. با توجه به اینکه نقطه ایزو الکتریک

نانوذرات فلزی از طریق افزایش سطح قابل دسترس برای استقرار آنزیم ها و همچنین تسریع در روند انتقال الکترون از مرکز آنزیم ها به سطح الکتروود موجب تقویت پیام های حسگر زیستی می شود. همچنین نانوذرات فلزی نسبت سطح به حجم بالایی دارند و به همین دلیل درصد تثبیت آنزیم بر روی آنها به صورت قابل توجهی افزایش می یابد. نانوذرات فلزی مختلف مانند نانوذرات طلا، پلاتین، نقره، آهن، روی، مس، سرب، آهن و آلیاژهای فلزیدر فرایند ساخت بستر مناسب آنزیمی عمل می کنند. همچنین نانوذرات فلزی مانع از تخریب آنزیم ها شده و از نشت آن در محلول جلوگیری می کند. لازم به توجه است که در طراحی و ساخت بسترهایی از جنس نانوذرات فلزی می توان از ساختارهای پلیمری مانند کایتوزان و مزوپورهای سیلیکا به عنوان عامل افزایش پایداری حسگر زیستی استفاده کرد.

✓ نانوذرات پلاتین

نانوذرات پلاتینی فعالیت های کاتالیتی قابل وجهی از خود نشان می دهند و در کنار نانولوله های کربنی، نانوصفحات گرافنی، نانوذرات طلا، نانوذرات اکسید آهن، ساختارهای پلیمری شاخه دارمانند پلی پایرول و پلی ساکاریدهای طبیعی مانند کایتوزان بستر مناسبی را به منظور استقرار آنزیم فراهم می کند. نانوحسگرهای زیستی ساخته شده در این الگو پایداری بسیار بالا و تکرار پذیری قابل توجهی را از خود نشان می دهند.

✓ نانوذره طلا

نانوذره طلا دارای پایداری مناسب بوده و انواع پذیرنده های زیستی به خوبی به آن متصل می شوند. لازم به توجه است که هرچه اندازه نانوذرات طلا کوچکتر باشد حسگر زیستی پاسخ مناسبتری ارائه می دهد. نانوذره طلا در الگوهای زیر می توانند در ساخت بسترهای مناسب مورد استفاده قرار گیرند:

✓ نانوکامپوزیت بر پایه نانوذره طلا

– نانوذره طلا/نانولوله های کربنی به صورت ترکیبی در هم می آمیزند و بستر مناسبی به منظور استقرار آنزیم فراهم می کنند. در این راستا ابتدا سطح الکتروود به وسیله یک لایه از سیستمین به صورت لایه خودآرایی شده اصلاح می شود. و سپس نانولوله های کربنی کربوکسیله به گروه های آمین روی الکتروود طلا متصل می شود و در ادامه نانوذرات طلا و پلاتین برای افزایش بهره وری بر روی نانولوله مستقر می شود.

¹¹ 3-mercaptopropyl-trimethoxysilane

¹² poly(o-aminophenol) film

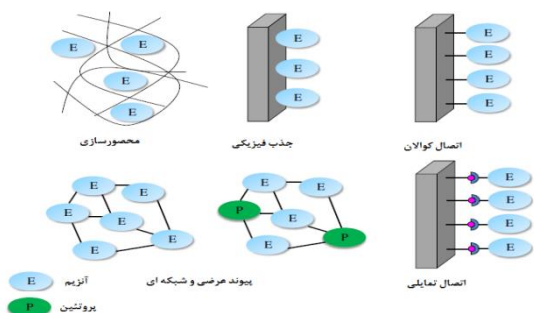
¹³ Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)

¹⁴ N-alkylamines (dodecylamine and octadecylamine)

¹⁵ ZnO sponges

پیوند های کووالان به سطح متصل می شود. استفاده از اتصال دهنده های بلند و انعطاف پذیر مانند پلی اتیلن گلیکول مانع از ایجاد ممانعت فضایی در سطح آنزیم ها می شود. بی نظمی در لایه پذیرنده های زیستی موجب کاهش فعالیت آنزیم ها و همچنین قفل شدن جایگاه های فعال آنزیمی می شود. از این رو تکنیک هایی که بر مبنای اتصال تمایلی آنزیمی به اتصال دهنده هایی همچون مولکول های استرپت آویدین و لستین می تواند لایه منظم از آنزیم ها را بر روی سطح حسگر ایجاد نماید [۱۰]. لازم به توجه است که قبل از انتخاب روش تثبیت باید به ساختار پروتئین و همچنین نوع و جنس ماتریکس و بستر استقرار توجه کرد. تا کنون بیش از هزار روش به منظور تثبیت انواع مختلف پذیرنده های زیستی به کار رفته است که می توان این روش ها را در الگو های زیر دسته بندی نمود [۱۱]:

- ✓ محصور سازی پذیرنده های زیستی در غشاء یا ماتریس پلیمری^{۱۶}
- ✓ جذب فیزیکی بر روی سطح الکترو^{۱۷}
- ✓ پیوند عرضی و شبکه ای پذیرنده های زیستی^{۱۸}
- ✓ اتصال کووالان به سطح الکترو^{۱۹}
- ✓ جذب و اتصال تمایلی^{۲۰}
- ✓ ریزپوشینه سازی^{۲۱}



شکل ۴- الگو های مختلف تثبیت آنزیم بر روی بستر حسگر زیستی

در ادامه در خصوص هر یک از روش های تثبیت آنزیم بر روی سطح الکترو به صورت مختصر مطالبی ارائه خواهد شد:

الف- محصور سازی پذیرنده های زیستی در غشاء یا ماتریس پلیمری

اکسید نقره ۹،۵ و نقطه ایزو الکتریک آنزیم گلوکوز اکسیداز ۴،۲ است، سطح بستر مناسبی را جهت استقرار آنزیم فراهم می آورد. همچنین نانوذرات اکسید نقره سطح قابل دسترس مناسب جهت استقرار آنزیم را فراهم می آورد.

➤ نانو ساختار های گرافنی: هدایت الکتریکی قابل توجه نانو ساختار های صفحه ای گرافنی موجب شده تا از این نانو ساختار های صفحه ای در الگوی کامپوزیتی برای ساخت حسگر های زیستی به صورت گسترده استفاده شود. این ساختار های کامپوزیتی عبارتند از:

- ۱- نانوپوسته های کامپوزیتی گرافن/کابتوزان
- ۲- نانوکامپوزیت گرافن/نانوذره طلا: در این ساختار صفحات گرافنی از طریق گروه های آمینی اصلاح شده و سپس با نانوذرات طلا به صورت کامپوزیت در می آید.

➤ بستر های پلیمری فوق هادی ساختار های پلیمری دندریمری مانند پلی پائیرول و پلی آمیدوآمین ها قابلیت بالایی در هدایت الکتریکی دارند. همچنین به دلیل ساختار های شاخه دار می توانند سطح قابل دسترس گسترده ای را جهت اتصال آنزیم ها فراهم کنند.

➤ نانوذرات مغناطیسی استفاده از نانوذرات مغناطیسی مانند اکسید آهن امکان خودآرایی ساختار های آنزیمی بر روی سطح الکترو به صورت منظم را فراهم می آورد [۹].

روش های تثبیت گیرنده های زیستی به منظور ساخت حسگر زیستی پایدار چه به روش انتقال الکترون مستقیم پذیرنده های زیستی و چه به روش انتقال الکترون غیر مستقیم پذیرنده های زیستی به همراه حواسط ها، باید گیرنده زیستی به صورت پایدار و به گونه ای که عملکرد آن حفظ شود بر روی بستر و زیر لایه متصل شود، چنین فرآیندی را تثبیت می گویند. البته لازم به توجه است که به منظور انتخاب روش مناسب تثبیت باید ضمن توجه به حفظ حساسیت پذیرنده زیستی و کارایی آن به تکرارپذیری ساخت، هزینه و دشواری روش تثبیت را نیز باید مورد توجه قرار داد. باید توجه داشت که فرآیند تثبیت آنزیم بر روی سطح ممکن است به تغییر ماهیت پذیرنده زیستی و یا تغییرات پیکربندی در آن ها به ویژه در بخش فعال آنزیم ها منجر شود و به دنبال آن حساسی حسگر زیستی کاهش می یابد. زمانی حساسیت بهینه در حسگر های زیستی آنزیمی گلوکوز ایجاد می شود که آنزیم ها یا به روش منظم شده بر روی سطح مبدل نشانه تثبیت شوند و یا از طریق بازو های اتصال دهنده و

¹⁶ Entrapment of the biocatalyst in membranes or polymeric matrixes
¹⁷ physical adsorption on the electrode surface
¹⁸ Cross-linking of the biocatalyst
¹⁹ Covalent bonding to the electrode
²⁰ Affinity based connvection
²¹ Nanoscaterring

مانند از طریق واحد های واحد های هیدروکسیله می باشد. نمونه ای رایج از حسگر زیستی الکتروشیمیایی بر پایه سل-ژل بر پایه تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز بر روی ژل سیلیکا که بر روی سطح الکتود کربن شیشه ای ایجاد می شود ساخته شده است و در دامنه ۶۰ میکرومولار تا ۴,۴ میلی مولار گلوکز را شناسایی می کند [۱۴].

۵- سازه های ژلاتینی بر پایه پلی ساکارید ها پذیرنده های زیستی از جمله گلوکز اکسیداز می توانند از طریق محصورسازی در ساختار های ژلاتینی که بر پایه پلی ساکارید ها ساخته می شوند مانند آلژینات^{۲۶}، کایتوزان^{۲۷} و یا آگارز^{۲۸} بر روی سطح الکتود ها مستقر شوند. محصور سازی آنزیم گلوکز اکسیداز در ساختار شبکه ژلاتینی بر پایه آلژینات به منظور ساخت حسگر زیستی گلوکز استفاده شد. برای این منظور سدیم آلژینات و آنزیم گلوکز اکسیداز با یکدیگر مخلوط می شوند و ۲۵ میکرولیتر از آن بر روی سطح الکتود پلاتین مستقر می شود، در مرحله بعد به منظور شبکه سازی ژلاتینی الکتود به مدت ۳۰ دقیقه در محلول کلرید کلسیم قرار می گیرد [۱۵].

۶- محصور سازی در خمیر کربنی
خمیر کربنی مخلوطی از پودر گرافیت کربنی و مایع خمیری است که آنزیم گلوکز اکسیداز به همراه حدواسط ها می تواند بر روی آن مستقر شود. در این راستا آنزیم به همراه حدواسطی مانند فروسین با پودر گرافیت مخلوط شده و سپس به وسیله روغن های معدنی مانند پارافین مخلوط می شود.

۷- الکتود های محصور شده به وسیله ذرات رس
نانوساختار های معدنی مانند نانوذرات رس و سیلیکا به منظور اصلاح سطح الکتود و محصورسازی آنزیم ها مورد استفاده قرار می گیرد.

ب- جذب فیزیکی سطحی

جذب فیزیکی سطحی آنزیم ها بر روی سطح جامد یکی از آسانترین روش های تثبیت آنزیمی قلمداد می شود. پس از انحلال آنزیم در محلول، بستر جامد مورد نظر به منظور استقرار آنزیم در تماس با محلول حاوی آنزیم قرار می گیرد تا از طریق برهمکنش های واندروالس، الکتروستاتیک و

آنزیم ها می توانند در ماتریکس های سه بعدی از جنس پلیمر که به روش الکتروپلیمرایزسیون تهیه شده اند بر روی سطح الکتود مستقر شوند. شبکه های پلیمری آب دوست تشکیل شده از پلی دی متیل سیلوکسان، فتوپلیمر ها، ژل سیلیکا، پلی ساکارید و یا خمیر کربنی می توانند به عنوان شبکه های ماتریکسی محصورسازی آنزیم ها مورد استفاده قرار گیرند. این روش تثبیت روشی آسان است. آنزیم ه، حدواسط ها بر روی لایه حس شونده تثبیت می شود. در این روش نیاز به اصلاح شیمیایی آنزیم ها ندارد و پذیرنده های زیستی در فرآیند تثبیت خواص خود را به صورت کامل حفظ می کنند. شسته شدن پذیرنده های زیستی محصور شده در ماتریس و همچنین ایجاد موانع غیر قابل نفوذ از جمله محدودیت های این روش است.

۱- روش الکترو پلیمرایزسیون

در این روش مونومر های اکسید شده در محدوده پتانسیل مشخص در کنار کاتیون های رادیکالی منجر به تشکیل شبکه پلیمری بر روی سطح الکتود می شود و مولکول های آنزیمی به روش فیزیکی در شبکه پلیمری در حال رشد بر روی سطح الکتود به دام می افتد. پلی پایرول^{۲۲}، پلی تیوفن^{۲۳} و پلی آنیلین^{۲۴} از پلیمر های هادی برای استقرار آنزیم ها بر روی سطح الکتود ها می باشند. در یکی از اولین حسگر های زیستی آنزیمی گلوکز که به این روش طراحی و ساخته شده بود آنزیم گلوکز اکسیداز در شبکه ای پلیمری از جنس پلی پایرول محبوس شد [۱۲].

۲- محصورسازی در شبکه پلیمری آمفی فیل
این شبکه پلیمری دارای یک فاز آب دوست شامل پلی دو هیدروکسی اتیل آکریلات^{۲۵} و یک فاز آب گریز از جنس پی دی ام اس می باشد.

۳- فوتوپلیمرایزسیون

پلی اورتان دارای آکریلات به عنوان غشاء فوتو پلیمری جهت محصورسازی گلوکز اکسیداز و به منظور طراحی و ساخت حسگر زیستی آمپرومتری تشخیص گلوکز استفاده شده است [۱۳].

۴- ساختار سل-ژل

طراحی و ساخت سل-ژل شامل هیدرولیز پیش ساز های آلکوکسیدی در شرایط اسیدی و یا بازی و به دنبال آن متراکم سازی این پیش سازه ها به شکل ساختار های شبکه ای ژل

²⁶ Alginate
²⁷ Chitosan
²⁸ Agarose

²² polypyrrole
²³ polythiophene
²⁴ polyaniline
²⁵ poly(2-hydroxyethyl acrylate)

حسگر حد تشخیصی برابر یک میکرومولار از خود نشان می دهد[۱۷].

د- اتصال کوالان آنزیم بر روی سطح الکترو

اتصال کوالان آنزیم به بستر پلیمری یکی از روش های معمول تثبیت شیمیایی آنزیم ها بر روی بستر حسگر های زیستی است. به این منظور کاتالیست های زیستی از طریق گروه های عاملی به گونه ای که فعالیت آنزیم دچار تغییر نشود بر روی سطح تثبیت می شوند. بستر های استقرار آنزیمی می بایست از طریق فعال کننده های سطح مانند گلوآرالدهید و کربودای آمید فعال شوند و سپس آنزیم ها بر روی سطح مستقر شوند. استقرار کوالان می تواند به صورت مستقیم روی سطح مبدل نشانه انجام شود و یا بر روی لایه نازک مستقر بر روی مبدل تثبیت شود. مهمترین روش های اتصال کوالان عبارتند از:

- ۱- فعال سازی گروه های کربوکسیلیک
- ۲- فعال سازی گروه های آمین
- ۳- اتصال شیمیایی
- ۵- اتصال تمایلی و جذبی

در این روش تثبیت، پذیرنده های زیستی و به ویژه آنزیم ها به صورت کاملاً منظم و با انتخاب پذیری موقعیتی بر روی بستر حسگر تثبیت می شوند. راهبرد اصلی در این فرآیند بر ایجاد تمایلی جذبی زیستی میان گروه های فعال مانند لستین، آویدین و کی لیت های فلزی و گروه اختصاصی که شامل یک بخش اختصاصی از توالی پروتئینی مانند رزیدو های کربوهیدرات، بیوتین و هیستیدین استوار است. مهمترین الگو ها در این روش عبارتند از:

- ۱- بیوتین/استرپت آویدین^{۲۹}
- ۲- کیلیت یون های فلزی
- ۳- لستین/کربوهیدرات
- ۵- اسپری مخلوط آنزیم و حدواسط بر روی سطح الکترو

در این روش لایه کاتالیستی و حسگر به صورت یکنواخت و به صورت مخروطی از حدواسط و آنزیم گلوکوز اکسیداز بر روی سطح الکترو اسپری می شود. لایه کاتالیستی که به این روش بر روی الکترو لایه نشانی می شود ضمن یکنواختی و راندمان بال حساسیت بیشتری نسبت به اسپری آنزیم تنها بر روی سطح الکترو نشان می دهد. این روش به صورت گسترده ای به منظور اسپری لایه کاتالیستی بر روی الکترو های سوزنی دستگاه های اندازه گیری گلوکوز استفاده می شود[۱۸].

هیدروفوبیک آنزیم بر روی سطح تثبیت شود. به منظور جداسازی آنزیم های متصل نشده سطح به وسیله بافر شستشو می شود. در این روش نیازی به عامل دار نمودن پذیرنده زیستی نیست. همچنین آنزیم فعالیت خود را حفظ می کند اما چالش هایی نیز دارد که عبارتند از: با افزایش دما، تغییر قدرت اسیدی و قدرت یونی آنزیم ها از سطح جدا می شوند و به همین دلیل پایداری این حسگر های زیستی در مقایسه با روش های دیگر کمتر است. مهمترین انواع جذ سطحی عبارتند از:

۱- جذب سطحی فیزیکی

در نمونه ای از ساخت حسگر های زیستی گلوکوز آنزیم گلوکوز اکسیداز بر روی سطح نانوسیم هایی از جنس پلی پایرول قرار می گیرند. نانوحسگر زیستی مذکور در محدوده غلظتی ۰.۵ میلی مولار تا ۱۳ میلی مولار به صورت خطی غلظت گلوکوز را اندازه گیری می کند. زمان لازم برای پاسخدهی حسگر تنها ۳ ثانیه است [۱۶].

۲- جذب بر پایه برهمکنش های الکتروستاتیک

آنزیم ها می توانند از طریق پیوند های الکتروستاتیکی بر روی سطح حامل بار تثبیت شوند. در صورتی که نقطه ایزوالکتریک آنزیم پائینتر از قدرت اسیدی محلول باشد، آنزیم دارای بار سطحی منفی شده و می تواند بر روی سطح مثبت تثبیت شود. دو روش اصلی که بر این اساس عمل می کنند عبارتند از:

جذب لایه به لایه

تغلیظ الکتروشیمیایی

تثبیت اولیه آنزیمی بر روی بید های تعویض یونی

ج- پیوند عرضی و شبکه ای پذیرنده های زیستی

تثبیت آنزیم ها از طریق ایجاد پیوند های عرضی و شبکه ای آنها با گلوآرالدهید^{۲۹} یا گلی اکسال^{۳۰} و یا هگزا متیلن دای آمین^{۳۱} بر روی سطح الکترو اتفاق می افتد. در فرآیند اتصال می توان از ساختار های پروتئینی بی اثر مانند آلبومین سرم انسانی می توان استفاده کرد. مشکل اصلی ددر این روش احتمال تغییر ساختار سه بعدی جایگاه های فعال آنزیمی و کاهش فعالیت آنزیمی است. در حسگر زیستی آمپرومتری گلوکوز، آنزیم گلوکوز اکسیداز به روش اتصال عرضی و شبکه ای بر روی نانولوله های اکسید روی که بر روی سطح الکترو رشد کرده اند تثبیت می شود. این

²⁹ glutaraldehyde

³⁰ glyoxal

³¹ hexamethylenediamine

³² Biotin-(strept) avidin

نتیجه گیری:

در این مطالعه بررسی طراحی و ساخت نانوحسگر های زیستی تشخیص و اندازه گیری گلوکز خون به عنوان موضوع اصلی این مقاله مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت؛ نانوحسگر های زیستی اندازه گیری گلوکز از سه جزء اصلی مبدل نشانه، پذیرنده زیستی و لایه بیوکاتالیستی ساخته شده اند؛ بر اساس مطالعات مروری انجام شده در این مقاله نانوحسگر های زیستی موجود بیشتر بر اساس روش های سنجش جریان (آمپرومتری) یا سنجش امپدانس (ایمپدومتری) واکنش اکسیداسیون گلوکز طراحی و ساخته شده اند؛ آنزیم های گلوکز اکسیداز و گلوکز دهیدروژناز به عنوان اصلی ترین ساختار های پذیرنده زیستی در ساخت نانوحسگر های زیستی گلوکز استفاده می شوند. نانوذرات پلاتینی یا نانولوله های کربنی نیز از مهمترین نانوذرات مورد بهره برداری در ساخت این حسگر ها هستند. در میان روش های ساخت لایه بیوکاتالیستی نیز روش محصورسازی به ویژه روش محصور سازی در خمیر کربنی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است.

تشکر و قدردانی:

از ستاد توسعه نانو فناوری جهت حمایت از تکمیل این تحقیق تقدیر و تشکر بعمل می آید.

منابع:

- [13] C, Puig-Lleixa, C, Jimenez, J. Bartroli, *Sens Actuators B Chem*, 72, 56–62,(2001).
- [14] S, Liu, Y. Sun, *Biosens Bioelectron.* 22, 905–11,(2007).
- [15] S, Cosnier, C, Mousty, C, Gondran, A, Lepellec, *Mat Sci Eng C*, 26, 442–7,(2006).
- [16] E, Ekanayake, D, M, G, Preethichandra, K, Kaneto, *Biosens Bioelectron*;23,107–13,(2007).
- [17] T, Kong, Y, Chen, Y, Ye, K, Zhang, Z, Wang, X, Wang, *Sens Actuators B Chem*, 138, 344–50,(2009).
- [18] S.Samavat, J, Lloyd, L, Dea, W, Zhang, E, Preedy, S, Luzio, K, Seng Teng, *Biosensors and Bioelectronics*, Available online 27 July (2018).

- [1] A. P. F. Turner, *Chem. Soc. Rev.*, 42, 3184,(2013).
- [2] J. Wilson, *sensor technology handbook*, (2008).
- [3] J.D. Newman, A.P.F. Turner, *Biosensors and Bioelectronics* 20, 2435–2453,(2005).
- [4] M. Pohanka¹, P. Skládal, *J. Appl. Biomed*, 6, 57–64, (2008).
- [5] J. Katrlík, J. vorc, M. Rosenberg, S. Miertus, *Analytica Chimica Acta* 33, 1, 225–232,(1996).
- [6] Y. Liu, Y. Du, C.M. Li, *Electroanalysis*, 25, 4, 815–831,(2013).
- [7] M. Wooten, S. Karra, M. Zhang, W. Gorski, , *Anal. Chem.* 86, 1, 752–757, (2014).
- [8] A, Saei, P, Najafi-Marandi, A, Abhari, M, Guardia, J, Ezzati Nazhad Dolatabadi, *Trends in Analytical Chemistry*. 42, (2013).
- [9] J, Li, X, Wei, Y, Yuan, *Sens. Actuators, B* 139, 400,(2009).
- [10] M, Campas, B, Bucur, S, Andreescu, J-L. Marty, *Curr Top Biotechnol*;1,95-107,(2004).
- [11] A, Sassolas, L, J. Blum, B, D. Leca-Bouvier, *Biotechnology Advances*, 30, 489–511,(2012).
- [12] P, N, Bartlett, R, Whitaker, *J ElectroanalChem.* 224, 27–35,(1987).