

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

*عبدالرحمان حسینی فرا

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 اندازه‌گیری 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 شنایابی گردند. در این میان سنسورهای گلوکز به عنوان پیش رو در این راه موفقیت‌های چشمگیری در پاسخ‌گویی سریع و حد تشخیص مناسب از خود نشان داده‌اند. در این میان گرافن نشان داد که از جهات مختلفی چون زیست سازگاری، هزینه، پاسخ‌گویی 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 واکنش‌گر 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

می‌توان به سلولوز، نشاسته، آگاروز، کیتوسان و یا پروتئین‌هایی مانند آلبومین 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 وینیل 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 تثبیت 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

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

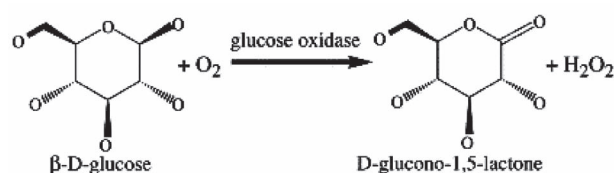
در این روش آنزیم مورد نظر با استفاده از اتصالات فیزیکی یا شیمیایی به سطح ثانویه متصل می‌گردد. قدرت پیوند ایجاد شده شدیداً تابعی است از نوع شیمیایی یا فیزیکی بودن این اتصال. طبیعی است که در این میان پیوندهای کووالان اتصالات قوی‌تر و پیوندهای واندروالسی اتصالات ضعیف‌تری را ایجاد نموده. آزاد شدن تدریجی آنزیم از روی سطح مورد نظر را که به اصطلاح لیچینگ گویند، شدیداً تابعی از این قدرت پیوند می‌باشد. پیوندهای برقرار شده بین سطح و آنزیم 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، ژئولیت‌ها و یا ساختارهای نانوی کربنی مانند نانولوله‌های کربنی، فولرن‌ها و گرافن‌ها (۳) باشد.

از میان پلیمرهای زیستی مورد استفاده در تثبیت آنزیم‌ها به این روش

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 الکترو، 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 دینچر شدن و از کار افتادگی بخش‌های فعال آنزیم، فعالیت سنسور تا حد چشمگیری کاهش می‌یابد.



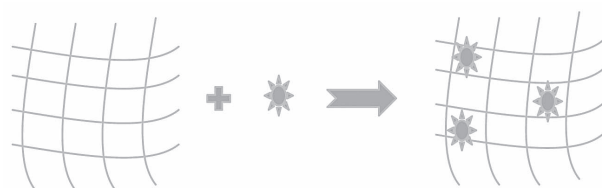
شکل ۴- شماییت واکنش شناسایی گلوکز توسط آنزیم گلوکز اکسیداز

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 پیرستین (تک لایه خالص از کربن هیبریدی sp^2 و عاری از هر گونه نقص ناشی از حضور اتم‌های 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 لایه کربن و دارای اتم‌های غیر همسان و نیز نقایص هندسی) در ابتدا از ترکیبات میان افزوده گرافیتی

در نهایت همچون پل‌های کوچکی ما بین ملکول‌های آنزیم ایجاد پیوند نموده و در نهایت ماکرو ملکول 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)

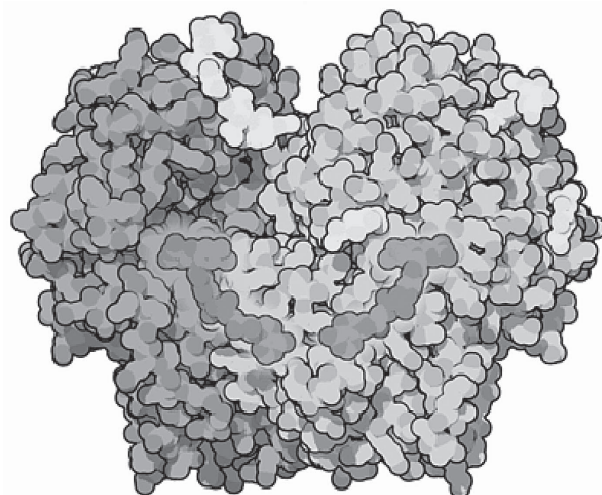


شکل ۱- شمایی از فرآیند اتصال به سطح. اشکال خورشید مانند پروتئین‌ها و صفحه مشبک سوبسترا می‌باشد



شکل ۲- شمایی از فرآیند اتصالات متقاطع جهت تثبیت آنزیم‌ها. 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 اکسولاکتون 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- شمایی از ساختار دیمری آنزیم گلوکز اکسیداز

است منجر به اکسید شدن صفحات مذکور شود ولی میزان این اکسیداسیون در مقایسه با حدی که در GO ایجاد می شود، بسیار ناچیز است (۶).

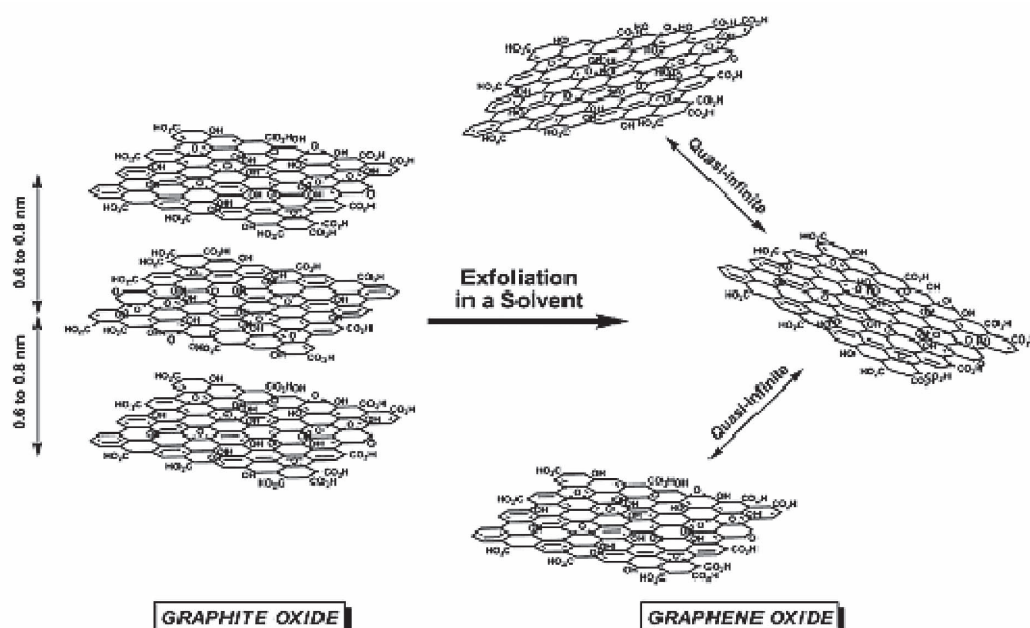
سونیکیت کردن فلس های گرافیتی در آب منجر به تولید صفحات چند لایه و تک لایه گرافنی می شود که عمدتاً عاری از نقایص هستند ولی این فرآیند مستلزم استفاده از سورفکتانت هایی است که بر خواص هدایت الکتریکی تاثیر منفی دارند.

GO عمدتاً از طریق واکنش گرافیت با اسیدهای معدنی قوی و عوامل اکسند نظیر KMnO_4 و H_2SO_4 سولفوریک و یا در فرآیندهای مشابه بهینه شده با استفاده از HNO_3 و KClO_3 (NaClO_3) تولید می شود (۷). این واکنش ها در جات اکسیداسیون مشابهی را فراهم می کنند (نسبت کربن به اکسیژن عمدتاً ۲ به ۱ است) و کاملاً ساختار الکترونی گرافیت را دچار از هم گسیختگی می کند. در اثر واکنش های مذکور گروه های عاملی شیمیایی متعددی با پایه اکسیژن بر سطح گرافیت تشکیل می شود. هر چند ساختار دقیق GO تا زمان فعلی همچنان محل بحث و اختلاف نظر است، ولی به نظر می رسد گروه های اپوکسی و هیدروکسیل با حداکثر غلظت ممکن روی صفحه بنیادی تشکیل می شوند و گروه های کربوکسیلیک اسید جوانب صفحات را احاطه می کنند (۸) (شکل ۵).

به جز تعداد معدودی استثنا، تولید بیوسنسورهای حاوی GO با

GICs و اکسید گرافیت GO به عنوان پیش ماده استفاده می کردند. روش های متعددی برای ورقه ورقه کردن GIC ها توسعه پیدا کرد ولی اغلب این روش به تشکیل ورقه های تک لایه ای منجر نمی شود، صفحات تولید شده تقریباً ضخامتی در حد ۵ نانومتر دارند.

بیشتر فیلرهای گرافیتی ورقه ورقه شده از GIC ها مشتق می شوند که در واقع ترکیباتی از گرافیت هستند که یکسری اتم و ملکول (نظیر فلزات قلیایی و اسیدهای معدنی) لایه لایه های کربنی آن وارد شده است. وارد شدن این اتم ها و ملکول ها فاصله میان صفحات گرافیت را افزایش می دهد و افزایش فاصله میان صفحات بر همکنش میان آنها را ضعیفتر می کند و این امر ورقه ورقه شدن GIC را در اثر فرآیندهای مکانیکی و حرارتی تسهیل می کند (۵). میان افزایشی گرافیت با ترکیبی از اسید سولفوریک و اسید نیتریک منجر به تولید GIC ای با کیفیت بالاتر (حاوی ۲ تا ۵ لایه گرافن بین هر دو لایه ماده میان افزوده) می گردد، این GIC ها را می توان از طریق حرارت دهی سریع یا انجام عملیات حرارتی تحت مایکروویو ورقه ورقه کرد، ماده بدست آمده از این مرحله را گرافیت باز شده EG می گویند. EG ساختمانی لایه ای دارد ولی نسبت به گرافیت دارای فاصله بین لایه ای زیادتری است و در واقع متشکل از صفحات کوچک نازکی در حد ۳۰ تا ۸۰ نانومتر است که خیلی شل کنار هم چیده شده اند. شایان ذکر است که فرآوری تحت اسید ممکن



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

کوالانسی صفحات RG-O مثلاً بر همکنش های π - π می تواند 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 سیگنال های حاصل از ای فرآیند به نگاهی تاریخی به مقالات منتشر شده در این حوزه می پردازیم. با توجه به نوین بودن روش استفاده از صفحات گرافن در کاربردهای کاتالستی و بیوسنسور اکثر این مقالات به پنج سال اخیر باز می گردد که در ادامه به ترتیب خلاصه ای 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 الکتروود 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)

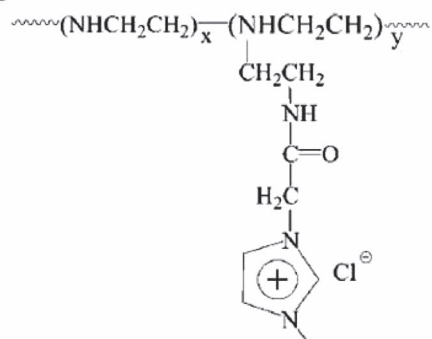
دامنه خطی سنسور به دست آمده از روش لی نیو بین ۲ تا ۱۴ میلی مولار از گلوکز بود که در مقایسه با سایر روش های قبل از خود شامل نانو لوله های کربنی دامنه وسیع تری را شامل می شد که این امر به علت خواص الکتریکی بهتر گرافن نسبت به سایر ساختارهای کربنی نانو بود.

بیوهاژو و همکارانش با ابتکاری جالب تر جهت جلوگیری از تجمع مجدد صفحات گرافن جدا شده از هم، آنها را با $-\text{SO}_3^-$ عامل دار نمودند تا بارهای مخالف روی این صفحات باعث دفع آنها گردد. ژو نیز مانند لی نیو جهت پخش گرافن در ماتریس سنسور

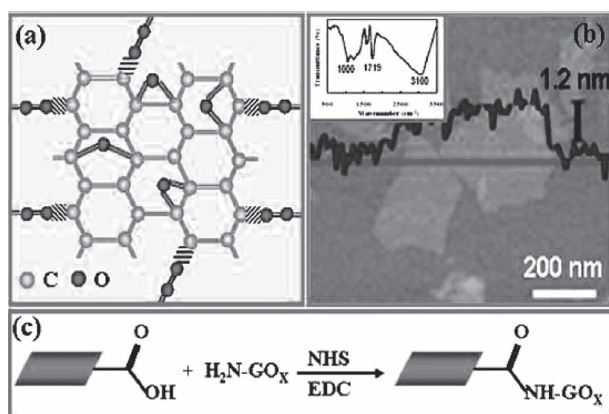
توزیع بسیار خوب تا حد زیادی به کیفیت ورقه ورقه شدن GO قبل از وارد کردن به زمینه پلیمری بستگی دارد. روش های ورقه ورقه کردن مبتنی بر استفاده از حلال و نیز فرآیندهای ورقه ورقه کردن حرارتی نسبت به سایر فرآیندها ارجحیت بیشتری دارند. در روش های مبتنی بر حلال خاصیت آبدوستی و فواصل بین لایه ای زیاد در GO (در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

خواص فیزیکی صفحات G-O به نحو چشمگیری از گرافن متفاوت است. ولی این صفحات را می توان از طریق احیای شیمیایی با کمک یکسری عوامل کاهنده نظیر هیدرازین مونوهیدرات و یا سدیم بوروهیدرات احیا کرد و به ماده ای دست یافت که تا حد زیادی به گرافن پیربستین شباهت دارد. در صفحات G-O احیا شده به شیوه شیمیایی علیرغم نسبت کربن به اکسیژن بیش از ۱۰ به ۱ بسیاری از کارایی های ذاتی صفحات G-O همچنان محفوظ باقی می ماند. بیشتر واکنش های مطرح در مورد G-O با احیای G-O منجر به تشکیل صفحات اکسید گرافن احیا شده یا RG-O می شود که دارای رسانایی الکتریکی هستند، البته تعداد زیادی از تبدیلات شیمیایی نیز هستند که بر گروه های عاملی اکسیژن دار G-O عمل می کنند. فرآیندهای عامل دار کردن کوالانسی و غیر کوالانسی هر دو در مورد صفحات G-O با هدف ایجاد توزیع های پایدار از صفحات گرافنی اصلاح شیمیایی شده (CMG) در محلول های آلی و نیز بهبود هم خوانی آنها با ماتریس های پلیمری مختلف گزارش شده اند. در این میان، واکنش هایی که از آمین ها و ایزوسیانات ها برای عامل دار کردن صفحات G-O با کوچک ملکول ها، به دلیل سادگی واکنش ها و قابلیت انجام واکنش ها از مسیرهای چندگانه (به عنوان مثال: آمیداسیون، حلقه گشایی هسته دوستی اپوکساید، تشکیل کربامات و...) بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند. البته ایجاد عوامل دارای اتصال کوالانسی بر روی صفحات G-O می تواند روی خواص هدایت الکتریکی صفحات تاثیر منفی بگذارد. شبکه هیبریدی شده SP^2 برای مکانیزم هدایتی الکترون/حفره لازم است، ایجاد اتصالات کوالانسی این شبکه هیبریدی را در گرافن بین می برد. اما عامل دار کردن غیر

Polyethylenimine-Functionalized Ionic Liquid



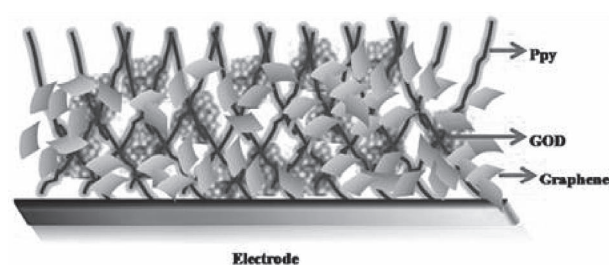
شکل ۶- نمونه ای از مایع یونی بکار رفته در سنسور لی نیو (۱۰)



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 می توان 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 می یابد. (۱۳)

چن ژانگ لی و همکارانش موفق شدند تا با تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز بر روی گرافن اکساید و نشان دادن 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 می شود. در واقع این روش را ترکیبی از دو روش اتصال به سطح و محبوس سازی است. وی معتقد است که با انجام پیوند کوالانی

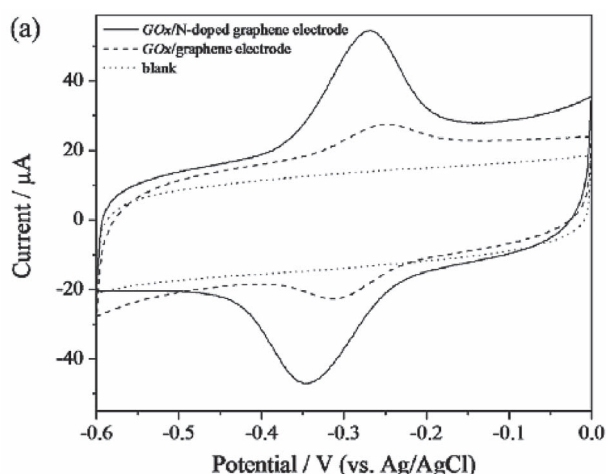


شکل ۸- نمایش ساختار محبوس شده ترکیب گلوکز اکسیداز-گرافن اکسید در شبکه پلیمری متخلخل پلی پیرول

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 می گردد به طوری که دامنه حساسیت او از ۱۵ میکرو مولار تا ۵/۸ میلی مولار و با تکرار پذیری بالاتر، افزایش می دهد که علت آن را در اثر سینرژیک بین طلا و گرافن می دانست. اثر سینرژیک به اثر مضاعف حاصل از بر هم کنش بین دو ماده گویند که از مجموع دو ماده بیشتر باشد به طور مثال اگر ماده ای 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 لوله های 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 آنزیم ها بر روی بستر ثانویه تا حدی از فعالیت آنها می کاهد 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 می باشد و آنزیم آزادانه تر می تواند واکنش دهد. اما از طرفی تکرار پذیری سنسورها نیز مبحث بسیار مهمی است که در سنسور سیلیکا ژل به علت آزاد شدن تدریجی آنزیم کمتر دیده می شود. (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 باهم همچنین باعث افزایش فعالیت الکترومی گردند 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 می کند (شکل ۷) بلکه ترکیب حاصل سازگار با محیط های زیستی است و برای اثبات این موضوع سنسور ساخته شده بر روی رده سلولی PRE آزمایش گردید و نشان داده

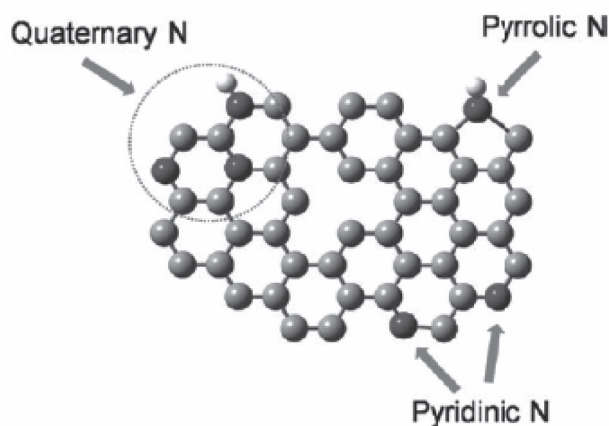


شکل ۱۰- ولتاموگرام چرخه‌ای مقایسه‌ای بین گرافن-گلوکز اکسید و گرافن دوپ شده-گلوکز اکسید

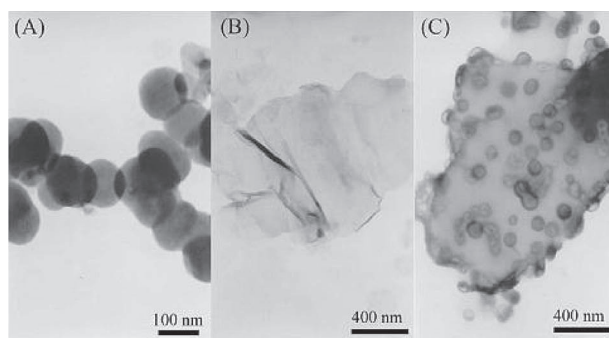
شکل ۱۰ منحنی مقایسه ولتاموگرام چرخه‌ای گلوکز اسیداز متصل به گرافن و گرافن دوپ شده و را نشان می‌دهد. همان طور که در شکل نشان داده شده است شدت سیگنال جریان آندی و کاتدی گرافن دوپ شده نسبت به گرافن معمولی بسیار بیشتر است که باعث افزایش حساسیت و کاهش حد تشخیص سنسور حاصله می‌گردد. البته حد تشخیص این سنسور 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 و همکارانش 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

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 پلاسمای نیتروژن استفاده نمود و با کنترل فشار پلاسمای 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 پلاسمای 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



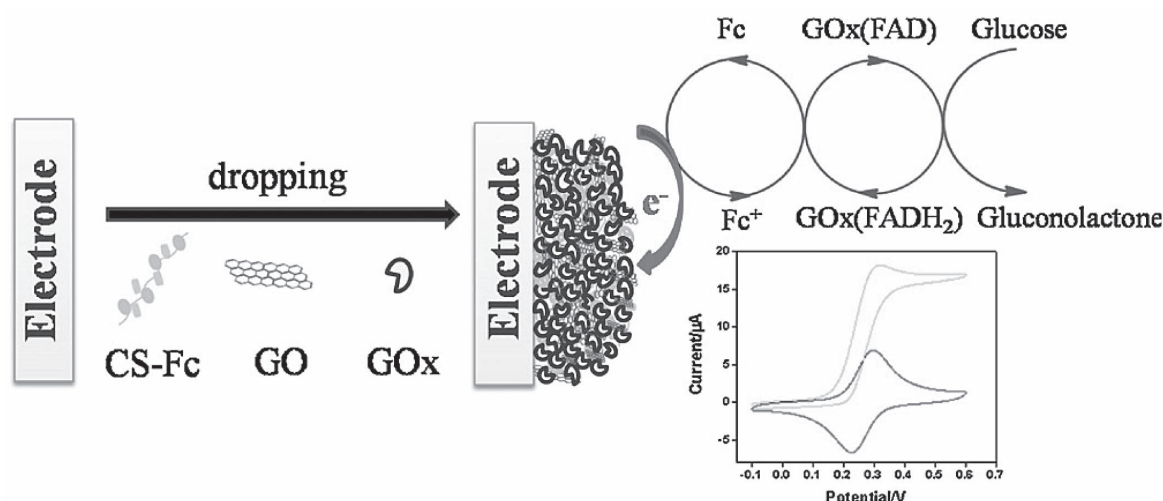
شکل ۱۱- تصویر TEM از (a) نانوکره‌های کربنی (b) CNS صفحات گرافن GNS-CNS (c) GNS

در ادامه بررسی اثر سینرجیک مواد رسانا و نیمه رسانا بر 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 ۰/۲ تا ۶/۸۷ میلی مولار گزارش شد.

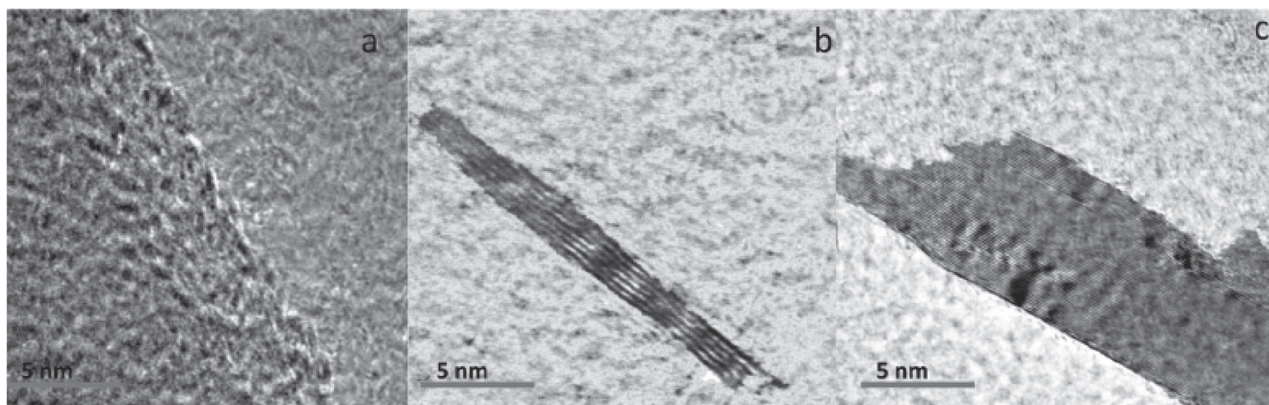
موهپاترا و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نیز اعلام نمودند چند لایه بودن و تک لایه بودن نوع گرافن بکار رفته در ساخت سنسور تاثیر چندانی در کارایی سنسور نخواهد داشت. او که گرافن تک لایه SLG، کم لایه (بین ۳ تا ۱۰ لایه FLG) و چند لایه (بین ۱۰ تا ۵۰ لایه MLG) (شکل ۱۳) را مورد آزمایش قرار داد به این نتیجه رسید که در تعداد لایه‌های گرافن در راندمان سنسور و تکرار پذیری آن تقریباً بی‌تاثیر است. او علت این 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 برای اثبات یکسان بودن مساحت‌ها ارائه 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

نوع استری است و جهت تثبیت گلوکز اکسیداز بر روی کیتوسان مانند آنچه در قبل نیز اشاره شد. از گلوکز 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 کووالانی 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 ۵/۰- ولت کمتر دیده می‌شود. (۱۶) با توجه به اهمیت حذف واکنش گره‌های سمی و آلوده کننده محیط زیست در شیمی سبز شیوان‌آی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ با استفاده از فرآیند الکترولیز موفق به حذف واکنش گره‌های اکسند 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 اکسند 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 جزئی احیا می‌کنند. شیوان‌آی به جای تمام این فرآیندها از فرآیند الکترولیز گرافیت به طور مستقیم استفاده کرد و در اثر فرایند اکسیداسیون الکتریکی الکتروگرافیتی 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 نیز 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 TEM ترکیب 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 ۱۲- مراحل ساخت و آزمایش سنسور ونگ



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

منحصر به فرد آنهاست. در این میان گرافن با توجه به خواص ویژه الکتریکی و هم چنین تسهیل در روش های ساخت و عامل دار کردن، از توجه ویژه ای برخوردار هستند. از سوی دیگر آزمایشات نشان داد که گرافن ترکیبی زیست سازگار است. ایجاد اتصال کووالان بین گروه های عاملی گرافن و آمین در آنزیم ها به سادگی امکان پذیر است. از سال ۲۰۰۹ تا کنون تلاش های زیادی برای بهبود حد تشخیص سنسور گلوکز ساخته شده از گرافن انجام شده است. گروهی با استفاده از افزودن نانوذرات طلا، پلاتین و یانیمه های هایی مانند کادمیوم سولفید و بررسی اثر سینرجیک این ترکیبات بر روی 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

کولانی. در صورتی که تمام گزارش های 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 کولانی بین آنزیم و گرافن در لبه های گرافن باشد که تجمع گروه هیدروکسیل بیشتر است و از آنجا که تعداد لبه ها در گرافن تک لایه و چند لایه یکسان است در نتیجه مقدار آنزیم جذب شده نیز در هر سه مورد تقریباً یکسان باشد.

نتیجه گیری

در سالهای اخیر دسته زیادی از ترکیبات کربنی نانو مانند نانولوله های کربنی تک جداره و چند جداره، نانو فیبرهای کربنی (۱۹) و گرافن (۲۰) مورد استفاده ساخت سنسورها قرار گرفته اند. اهمیت این مواد به خاطر نسبت سطح به حجم بالا و همچنین خواص الکتریکی

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 ابرخازن‌ها 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.

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 بر روی سایر ساختارهای کربنی نانو است. به طوری که اندک زمانی پس

References

- Sheldon RA. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* 2007; 349(8-9): 1289-307.
- 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.
- Liu LH, Yan M. Simple method for the covalent immobilization of graphene. *Nano Lett* 2009; 9(9): 3375-8.
- 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.
- Jang BZ, Zhamu A. Processing of nanographene platelets (NGPs) and NGP nanocomposites: a review. *Journal of Materials Science* 2008; 43(15): 5092-101.
- 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.
- Hummers Jr WS, Offeman RE. Preparation of graphitic oxide. *J Am Chem Soc* 1958; 80(6): 1339-.
- Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev* 2010; 39(1): 228-40.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Liu Y, Yu D, Zeng C, Miao Z, Dai L. Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors. *Langmuir* 2010; 26(9): 6158-6160.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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

*Abdu Rahman Hosseini far¹

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. Novelty leads 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 nanotechnology 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 structures.

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

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