

بررسی تثبیت متالوپروتئین سیتوکروم C در بستر اصلاح شده طلا و گرافیت به روش الکتروشیمیایی

مهناز مرادی^۱، حمید رضا زارع زاده مهریزی^۲، علی نادری نژاد^۳، بی بی فاطمه حقیرالسادات^{۴*}، محمد کاظم حضرتی گوهری^۱، فاطمه دانشمند^۵، فاطمه حکیمیان^۶، عظیم اکبرزاده^۷

۱. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، یزد، ایران.
۲. گروه مهندسی مکانیک، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران.
۳. گروه مهندسی برق، دانشکده مهندسی برق، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران.
۴. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۵. گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، یزد، ایران.
۶. انستیتو بیوفیزیک و بیوشیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۷. مدیر گروه پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران.

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم‌ها و پروتئین‌های تثبیت شده به‌طور معمول در زمینه‌های پزشکی برای تشخیص و درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به کاربرد روز افزون استفاده از آنزیم‌ها و پروتئین‌های تثبیت شده در تشخیص، در این مطالعه پروتئین سیتوکروم C به‌عنوان یک متالوپروتئین پر کاربرد در مطالعه‌های پایه‌ای زیست‌حسگر و بیوالکتروشیمی استفاده شد.

مواد و روش‌ها: پروتئین سیتوکروم C در دو بستر متفاوت طلا و گرافیت مدادی به روش کووالانسی با استفاده از EDC و NHS به‌عنوان عوامل جفت کننده تثبیت شد. این دو الکتروود با نانوذرات طلا اصلاح شدند و از لایه‌های خود تشکیل شونده مرکاپتوپروپیلونیک اسید به‌عنوان رابط بین سطح نانوذره طلا و پروتئین استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج ولتامتری چرخه‌ای تثبیت موفقیت‌آمیز این متالوپروتئین را در هر دو سطح نشان داد. پروتئین تثبیت شده در سطح الکتروود طلا نسبت به الکتروود گرافیت مدادی پایداری بیش‌تری داشت.

بحث: در این مطالعه هر دو الکتروود طلا و گرافیت با توجه به رسانایی بالا می‌توانند در تثبیت گونه‌های زیستی به‌کار روند و انتخاب هر یک از آن‌ها بستگی به انتظار کاربر از الکتروود و زیست‌حسگر مورد نظر دارد.

نتیجه‌گیری: با در نظر گرفتن سیتوکروم C به‌عنوان یک گونه زیستی نمونه، هر دو بستر می‌توانند برای تثبیت گونه‌های زیستی مختلف مناسب باشند و انتخاب هر یک از آن‌ها بستگی به نوع کاربردها در زمینه‌های مختلف دارد.

واژه‌های کلیدی: تثبیت، سیتوکروم C، نانوذره طلا، ولتامتری چرخه‌ای.

مقدمه

نمونه‌های محیطی دارند و به میزان بالایی در تولید آنتی‌بادی-ها، متابولیسم دارو، صنعت غذا، تولید سوخت زیستی و پاک-سازی زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند. ویژگی‌های بستر تثبیت و روش تثبیت از موارد مهم در تثبیت آنزیم و پروتئین به شمار می‌روند. بستر تثبیت نقش مهمی را در کاربردی بودن آنزیم تثبیت شده با توجه به مقرون به صرفه بودن و فراهم کردن سطح کافی برای تثبیت مناسب به عهده دارد (۱۰).

بیوسنسورها ابزار الکتریکی، نوری، شیمیایی یا مکانیکی با قابلیت شناسایی انتخابی ساختارهای زیستی هستند. این ابزار اغلب با اصلاح شدن توسط ساختارهای زیستی، انتخابی‌تر

آنزیم‌ها و پروتئین‌های تثبیت شده به‌طور گسترده‌ای در بسیاری از زمینه‌ها مورد استفاده قرار گرفته و دارای کاربردهای پزشکی و صنعتی هستند. آنزیم‌ها و پروتئین‌های تثبیت شده پتانسیل زیادی در آنالیزهای کلینیکی، صنعتی و

نویسنده مسئول: گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران.

پست الکترونیکی: Fhaghirosadat@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۱۷

عمل می نمایند. برای مثال بیوسنسورها می توانند مولکول هایی مانند آنزیم ها، آنتی بادی ها و الیگونوکلوئوتیدها را شناسایی کنند. یک بیوسنسور ایده آل نه تنها باید به غلظت های پایین آنالیت پاسخ دهد بلکه باید در میان ساختارهای زیستی مختلف ساختار مورد نظر را به طور ویژه تشخیص دهد. بیوسنسورها کاربردهای زیادی از جمله تشخیص بیومارکرها برای تشخیص های پزشکی، پاتوژن ها و تشخیص مواد سمی در آب و غذا دارند. در حال حاضر آنزیم و پروتئین تثبیت شده به طور معمول در زمینه های پزشکی برای تشخیص و درمان بیماری های مختلف مورد استفاده قرار می گیرند. پروتئین های مختلف مانند آنتی بادی ها، آنزیم ها، گیرنده ها در زمینه های پزشکی تحول های اساسی در مدت زمان تشخیص، نیروی انسانی، دقت و تکرارپذیری ایجاد کرده اند. این کاربردها شامل استفاده از آنتی بادی ها یا آنتی ژن های تثبیت شده در کروماتوگرافی میل ترکیبی، گیرنده یا لیگاند های تثبیت شده برای مطالعه میان کنش های آن ها و سلول های تثبیت شده در بیوسنسورها می باشد. الکترودهای بر پایه آنزیم کاربرد اصلی آنزیم های تثبیت شده را در پزشکی ارائه می دهند. بیوسنسورهای مورد استفاده در کاربردهای کلینیکی دارای مزایایی مانند تکرارپذیری، حساسیت، دقت، حمل آسان و هزینه پایین تر در مقایسه با روش های تشخیص متداول هستند (۳).

در طی سال های گذشته، بیوالکتروشیمی سهم زیادی را در درک بهتر ساختار و عملکرد پروتئین های ردوکس داشته است، هم چنین این روش برای ایجاد عملکردهای ردوکس جدید، هم با اصلاح پروتئین های موجود و هم با ساخت از نو^۱ عناصر اولیه به کار گرفته شده است. متالوپروتئین های مهندسی شده سیستم های جالب توجهی را برای مطالعه های الکتروشیمیایی ساختار یا عملکرد پروتئین و کاربرد آن ها در نانو بیوتکنولوژی ارائه می دهند. میکروسکوپ های اسکن پروبی^۲ و ولتامتری چرخه ای مربوط به متالوپروتئین های مهندسی شده و الکترودها، ترکیبی قدرتمند از ابزار مورد استفاده در زمینه بیوالکتروشیمی هستند. در طول ۲۰ سال گذشته الکتروشیمی ثابت کرده است که تثبیت پروتئین های اکسیدوردوکتاز بر روی سطوح و بررسی فرآیند انتقال بار یکی از روش های مهم برای توسعه زیست حسگرهای جدید و ابزار بیوالکترونیک حساس تر و انتخابی تر است (۱۱، ۱۸)، که از کاربردهای مهم تثبیت آنزیم ها و پروتئین ها به شمار می رود.

به ویژه توسعه الکترودهای اصلاح شده با پروتئین هایی از سیستم های انتقال الکترون زیستی، در فعالیت های تحقیقاتی، در حال افزایش است. یکی از چالش های مهم در الکتروشیمی پروتئین، ایجاد مسیرهای انتقال الکترون کارا میان الکترودها و پروتئین تثبیت شده می باشد (۲۰).

الکتروشیمی مستقیم در اواخر سال ۱۹۷۰ به عنوان وسیله ای برای مطالعه پروتئین های ردوکس با استفاده از تکنیک های الکتروشیمیایی توسعه یافت. آزمایش های اولیه بر روی سیتوکروم سی (C) با استفاده از طلا یا الکترودهای گرافیت مدادی مختلف انجام شد. در طی دو دهه گذشته الکتروشیمی مستقیم تبدیل به روشی برای آنالیز پروتئین های ردوکس محلول در آب و آنزیم ها شده است. استفاده از سطوح اصلاح شده (فعال شده) الکترودها، امکان مطالعه و بررسی الکتروشیمی مستقیم و پایدار را فراهم می سازد. بنابراین متالوپروتئین هایی مانند آنزیم سیتوکروم C اکسیداز، پروتئین سیتوکروم C، آسکوربات اکسیداز و بسیاری از متالوپروتئین های دیگر که قادرند انتقال مستقیم الکترونی در سطح الکترودها اصلاح شده داشته باشند می توانند به عنوان گونه زیستی تشخیص دهنده در زیست حسگرها به کار روند (۱۳).

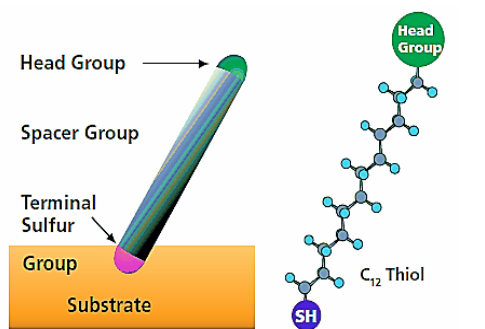
سیتوکروم ها به ویژه سیتوکروم C پروتئین های کوچک حاوی گروه هم و محلول در فضای بین غشایی هستند که می توانند به عنوان واسطه انتقال الکترون بین آنزیم های ردوکس عمل کنند. تبادل الکترون بین سیتوکروم C و آنزیم های ردوکس به صورت اختصاصی صورت می گیرد. تحقیقات الکتروشیمیایی متعددی در مورد این پروتئین با توجه به ساختار الکترودها و روش های مختلف تثبیت انجام شده است (۷، ۲۱).

در دو تحقیق پاسخ های اکسیدوردوکتازی مناسب برای سیتوکروم C تثبیت شده بر روی سطح طلا اصلاح شده با زنجیره های کوتاه تیوالکانوئیک اسید و سیسته آمین و EDC به دست آمده است (۴).

فرآیند تبادل مستقیم الکترون به ساختار الکترودها در مقیاس نانو نیز بستگی دارد. نشان داده شده است که با اصلاح سطح الکترودها توسط نانوذرات، می توان آنزیم و الکترودها را در نزدیک ترین فاصله و مناسب ترین حالت نسبت به هم برای انتقال الکترون قرار داد. به عنوان مثال نانوذرات طلا می توانند به شکل مؤثری سطح پایداری را برای تثبیت بیومولکول ها فراهم کنند، طوری که مولکول ها فعالیت زیستی خود را حفظ کنند. هم چنین نانوذرات طلا می توانند الکترودهای رسانایی را تشکیل دهند به طوری که وقتی به سطح سوپسترا متصل می شوند، محل انتقال الکترون هستند و بدون نیاز به واسطه باعث

¹ De novo

² Scanning Probe Microscopy



ب

شکل (۱). الف. شمای کلی از لایه‌های خود تشکیل شونده که شامل سه قسمت اصلی گروه سر، دم و گروه عملکردی است. ب. لایه‌های خود تشکیل شونده آلکان تیول که در یک انتها دارای گروه عاملی -SH متصل شونده به بستر فلزی و در انتهای دیگر دارای گروه سر است (۱۹).

تثبیت کنترل شده و جهت دار متالوپروتئین‌ها بر روی سطح الکتروود هدف در تحقیقات بیوالکتروشیمی مورد توجه است. هدف اصلی دستیابی به سرعت و میزان انتقال کارآمد الکترون‌های سطحی میان متالوپروتئین و سطح الکتروود است. تثبیت پروتئین‌ها به روش تشکیل پیوندهای کووالانسی بیش‌ترین کاربرد را دارد. از مزایای این روش، پایداری طبیعی پیوندهای تشکیل شده بین آنزیم و ماتریس است و آنزیم در محلول رها نمی‌شود. برای ایجاد پیوند کووالانسی نیاز به اصلاح سطح الکتروود می‌باشد، چنین پیشنهاد شده است که ماده اصلاح کننده گروه‌های عاملی را روی سطح الکتروود ایجاد می‌کند که پروتئین به‌طور اختصاصی و برگشت‌پذیر با آن‌ها برهم‌کنش کرده و بنابراین انتقال الکترون به‌طور مستقیم و سریع انجام می‌شود. از این ویژگی پروتئین‌های ردوکس می‌توان برای شناسایی موادی که این انتقال الکترون را مختل می‌کنند استفاده کرد (۱۵).

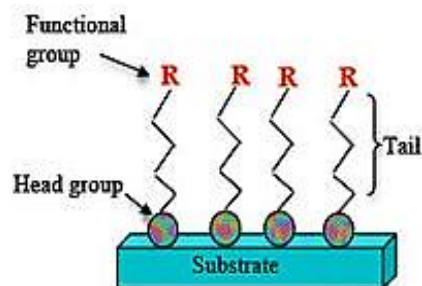
طلا و گرافیت مدادی به دلیل رسانایی الکتریکی بالا و واکنش پذیری اندک از مواد پر کاربرد در ساخت الکتروودها و مطالعه‌های الکتروشیمیایی می‌باشند. طلا از جمله بسترهایی است که به میزان زیادی در مطالعه‌های الکتروشیمیایی مورد بررسی قرار می‌گیرد. این مطالعه یک تحقیق پایه‌ای برای امکان‌سنجی تثبیت یک متالوپروتئین در سطح اصلاح شده گرافیت مدادی است که در صورت تثبیت موفقیت آمیز سیتوکروم C در این بستر به احتمال زیاد می‌توان گونه‌های زیستی دیگر را نیز در این بستر تثبیت نمود. در این مطالعه متالوپروتئین سیتوکروم C قلب گاو بر روی سطح الکتروودهای طلا و گرافیت مدادی تثبیت شد و عملکرد الکتروود گرافیت مدادی با الکتروود طلا مقایسه شد. علت انتخاب الکتروود گرافیتی قیمت پایین و

انتقال مستقیم الکترون بین پروتئین‌های ردوکس و سطوح الکتروود می‌شوند. مشخصات گوناگون کلویید طلا، از جمله نسبت سطح به حجم بالا، سطح انرژی بالا و توانایی کاهش فاصله بین پروتئین‌ها و ذرات فلزی ممکن است انتقال الکترون بین محل‌های اکسید و احیای پروتئین‌ها و سطح الکتروود را تسهیل کند (۲، ۱۲). برای اصلاح سطح الکتروود ابتدا باید سطح الکتروود از نظر فیزیکی فعال شود که شامل پولیش دادن، فعال سازی حرارتی، فعال سازی با لیزر، فعال سازی با امواج صوتی- رادیویی و فعال سازی با حلال می‌باشد. سپس باید سطح الکتروود از نظر شیمیایی اصلاح شود که شامل نانوساختارها، تک لایه‌های خود تشکیل شونده، در پوشش قرار دادن سل-زل گونه‌های واکنش پذیر و پلیمرها می‌باشد (۱). تک لایه‌هایی از -n-تیول‌ها $(X(CH_2)_n SH)$ با $n > 10$ که به طور خود به‌خودی روی سطح طلا جذب می‌شوند، مبتنی بر برهم‌کنش قوی بین طلا و گوگرد، به‌ویژه برای کنترل واکنش پذیری در سطح مشترک الکتروود و محلول بسیار مناسب است. این‌گونه تک لایه‌ها به‌طور معمول از شناورسازی الکتروود طلا به مدت یک شب در محلول‌های اتانولی دارای غلظت‌های میلی‌مولار از آلکان تیول‌ها به‌وجود می‌آیند.

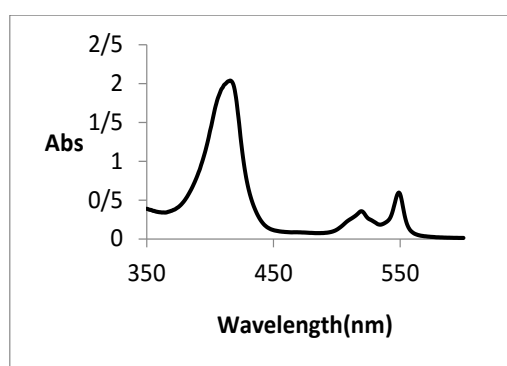
در تشکیل تک لایه، شکستن پیوند S-H، نقش کلیدی را دارد:



نیروهای واندروالسی بین گروه‌های متیل، به تک لایه جهت می‌بخشند. بنابراین، چنین فرآیند خود-انباشتگی، نتیجه تک لایه‌های پایدار و خوب سازمان یافته است که در جریان آن، دنباله‌های هیدروکربنی به موازات یکدیگر در کنار هم بسته بندی می‌شوند (شکل ۱). تشکیل تک لایه‌های ارگانوسولفور خود تشکیل شونده، به دلیل کاربردهای بالقوه علمی و با ارزش از لحاظ فناوری، توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۱۹). شکل (۱) شمای کلی از SAM را نشان می‌دهد.



الف



نمودار (۱) UV - طیف مربوط به ۳ پیک جذب سیتوکروم C در حالت احیاء

تهیه نانو ذره طلا

نانو ذره طلا با استفاده از روش احیاء نمک طلا با ۳- سدیم سیترات تهیه شد (۶). ۵۰ میلی لیتر HAuCl_4 ۰/۳ میلی-مولار ۳ آبه در بشر به دمای جوش رسید. ۵ میلی لیتر تری سدیم سیترات ۵ میلی مولار به محلول بالایی افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. در این مدت رنگ محلول به صورت قرمز آلبالویی درآمد. محلول در دمای اتاق و در شرایط همزده سرد شد، این محلول برای استفاده های بعدی در یخچال نگهداری شد.

آماده سازی و اصلاح سطح الکتروود طلا

الکتروود طلای مورد استفاده در این آزمایش با اکسید آلومینیوم صیقل داده شد و در محلول پیرانا به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس با آب دیونیزه شسته شد. به منظور افزایش سطح، نانو ذرات طلا به روش الکتروشیمیایی روی الکتروود طلا نشانده شد (۸).

۳- مرکاپتو پروپیونیک اسید ترکیبی اسیدی است که در ساختار خود دارای گروه تیول می باشد و تمایل بالایی برای اتصال به طلا دارد و می تواند با جذب شیمیایی روی الکتروود طلا یک سطح غیر باردار آب دوست ایجاد نماید. ابتدا الکتروود طلا در محلول ۳- مرکاپتو پروپیونیک اسید ۰/۱ مولار به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. سپس با اتانول و آب مقطر شسته و با گاز نیتروژن خشک شد. الکتروود مذکور درون محلول نانو ذره طلا به عنوان الکتروود قرار گرفت، محدوده پتانسیل از ۰/۲- تا ۱/۴+ انتخاب شد و روبش ۹۰ دور انجام شد (۱۷).

آماده سازی و اصلاح سطح الکتروود گرافیتی (GPE)

جهت تهیه الکتروودهای گرافیت مدادی پس از بررسی مغز مدادهای موجود در بازار، نرم ترین مغز مداد که دارای بالاترین میزان گرافیت می باشد یعنی B8 با قطر ۲ میلی متر انتخاب شد. از سرسمپلهای ۱۰۰ میکرولیتری به عنوان نگه دارنده

در دسترس بودن آن است. سطح هر دو الکتروود با استفاده از نانو ذرات طلا به منظور افزایش سطح اصلاح شد. این تثبیت از طریق لایه های خود تشکیل شونده (SAM) مرکاپتوپروپیونیک اسید و ایجاد گروه های عاملی کربوکسیلی به منظور ایجاد پیوند آمیدی با گروه های آمینی پروتئین تثبیت شده انجام شد. EDC و NHS به عنوان عوامل جفت کننده در ایجاد پیوند کووالانسی به کار برده شدند. با روش ولتامتری چرخه ای به بررسی انتقال مستقیم الکترون در سطح این دو نوع الکتروود اصلاح شده با نانوذرات طلا پرداخته شد.

روش کار

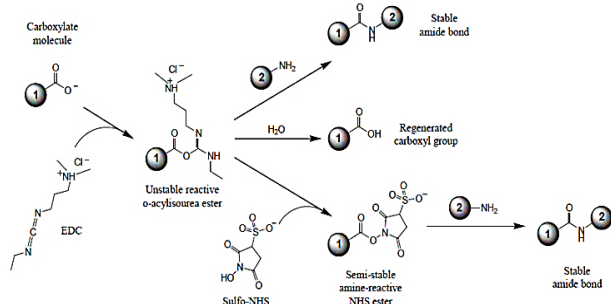
مواد

سیتوکروم C قلب گاو محصول شرکت سیگما آلدریچ، نمک طلا (HAuCl_4) و ۳- سدیم سیترات محصول شرکت مرک آلمان برای تهیه نانو ذره طلا استفاده شدند، ۳- مرکاپتوپروپیونیک اسید محصول شرکت مرک آلمان، EDC و NHS محصول شرکت سیگما آلدریچ و اتانول خالص محصول شرکت مرک آلمان جهت تثبیت آنزیم سیتوکروم C مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه محلول پروتئینی و تعیین میزان جذب سیتوکروم C

پودر سیتوکروم C به صورت اکسید بود. برای تهیه ۱۰ میلی-لیتر محلول احیاء شده با استفاده از پروتکل شرکت سیگما آلدریچ ۱۰۰ میلی گرم از سیتوکروم C در ۸ میلی لیتر از محلول بافر فسفات ۱۰ میلی مولار حل شد. با افزودن ۳ تا ۵ میلی گرم از آل اسکوربیک اسید سدیم، سیتوکروم C احیاء شد (محلول قرمز روشن). نمک اسید اسکوربیک اضافی از طریق دیالیز خارج شد. سپس محلول از کیسه دیالیز خارج و توسط بافر فسفات ۱۰ میلی مولار به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. پس از افزودن اسید اسکوربیک سدیم میزان جذب سیتوکروم C احیاء شده اندازه گیری شد. جذب در ۵۵۰ نانومتر حالت-های احیاء را در گروه هم سیتوکروم C نشان می دهد. نمودار (۱) UV- طیف مربوط به ۳ پیک جذب سیتوکروم C در حالت احیاء (Fe^{2+}) در طول موج های ۵۲۱ ، ۵۵۰ و ۴۱۴ نانومتر را نشان می دهد (۹).

یک عامل اتصال دهنده است که گروه کربوکسیل مربوط به EDC را به گروه‌های آمین پروتئین متصل می‌کند. ابتدا خود به گروه کربوکسیل متصل می‌شود و یک استر ناپایدار را تشکیل می‌دهد NHS و Sulfo-NHS می‌توانند جایگزین EDC شده و ترکیبی نیمه پایدار را ایجاد کنند که در حضور آنزیم یا پروتئین که دارای گروه آمین هستند از گروه کربوکسیل رها شده و اجازه می‌دهد تا اتصال آمیدی (که یک پیوند کووالانسی است) رخ دهد. پس از ۲۴ ساعت الکتروکود با آب شسته شد تا پروتئین‌هایی که به‌طور ضعیف متصل شده اند شسته شوند. شکل (۳) به‌طور شماتیک نحوه عملکرد EDC و NHS را در ایجاد پیوند آمیدی نشان می‌دهد.



شکل (۳) فرآیند تشکیل پیوند آمیدی با استفاده از EDC و NHS (۱۴).

روش ولتامتری چرخه‌ای

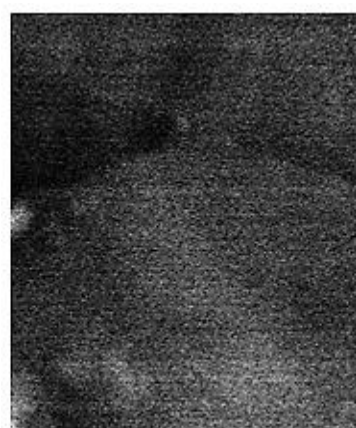
رفتار اکسیدوردوکننازی سیتوکروم C تثبیت شده با استفاده از روش ولتامتری چرخه‌ای بررسی شد، تمام آزمایش‌های ولتامتری با استفاده از سامانه سه الکترودی انجام شدند که الکتروکود نقره- کلرید نقره به‌عنوان الکتروکود مرجع و الکتروکود میله‌ای پلاتین به‌عنوان الکتروکود کمکی و الکتروکود طلا و گرافیت مدادی به‌عنوان الکتروکود کار مورد استفاده قرار گرفتند. بافر فسفات ۵ میلی‌مولار و pH برابر ۶/۵ به‌عنوان الکترولیت و محیط عمل سیتوکروم C مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

نانوذرات طلا

به‌منظور پیش‌بینی اندازه نانو ذرات از دستگاه اسپکتروفوتومتری استفاده شد و پیک جذب در محدوده ۴۰۰ تا ۷۰۰ خوانده شد. نمودار (۲) جذب در ۵۲۵ نانومتر را نشان داد. این طول موج و رنگ محلول تهیه شده نشانگر نانو ذرات ۱۴ تا ۳۰ نانومتر می‌باشد.

برای این مغزمدادها استفاده شد. برای به‌دست آوردن GPE اصلاح شده با نانوذرات طلا، GPE به مدت ۴۰ دقیقه، درون بشر حاوی محلول کلونیدی نانوذره طلا با دمای ۸۵ °C قرار گرفت. سپس الکترودها دو بار با آب دیونیزه شسته شده و در دمای ۶۰ °C به مدت ۵ دقیقه خشک شدند. شکل (۲) تصویر SEM مربوط به قرارگیری نانوذرات طلای ۸۵-۲۰ نانومتری بر روی سطح GPE را نشان می‌دهد.



200 nm (الف)



200 nm (ب)

شکل (۲). تصویر SEM از سطح الکتروکود گرافیت مدادی. الف. سطح الکتروکود اصلاح نشده. ب. سطح الکتروکود اصلاح شده با نانوذرات طلا

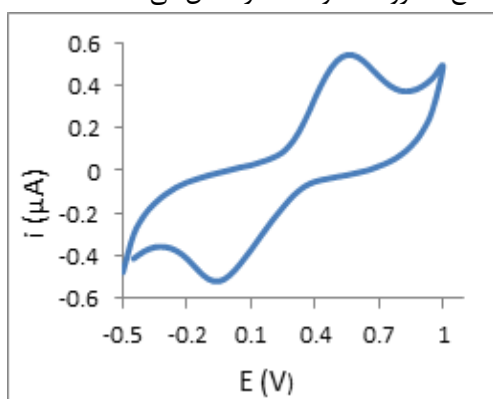
فرآیند اتصال پروتئین سیتوکروم C بر روی نانوذرات طلا

در این تحقیق هر دو الکتروکود اصلاح شده با نانو ذره طلا به مدت ۴ ساعت در محلول ۳-مرکاپتوپروپیلونیک اسید (MPA) حل شده در اتانول در دمای اتاق غوطه ور شدند. MPA به دلیل داشتن گروه تیول تمایل بالایی برای اتصال به ذرات طلا دارد. سپس با آب دیونیزه شسته شدند تا MPA اضافی که به‌طور فیزیکی جذب شده‌اند از سطح الکتروکود شسته شود. پس از خشک شدن، الکتروکود در محلول سیتوکروم C در حضور EDC و NHS به مدت ۲۴ ساعت در ۴ °C انکوبه شد.

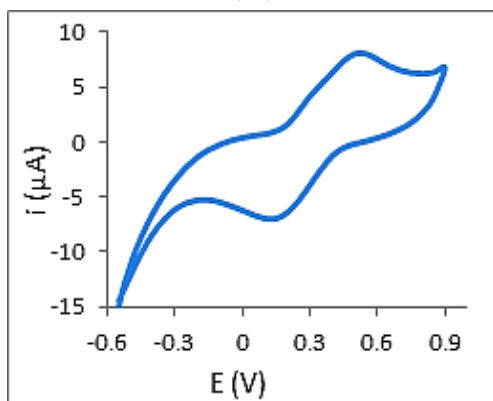
طلای اصلاح شده با نانو ذرات طلا. ب. (a) سطح الکتروود گرافیت مدادی اصلاح نشده، (b) سطح الکتروود گرافیت مدادی اصلاح شده با نانو ذرات طلا. (بافر فسفات ۵ میلی مولار، pH ۶/۵، سرعت روبش ۰/۱ ولت بر ثانیه محدوده پتانسیل -۰/۵ تا +۰/۵ الکتروود طلا و گرافیت به عنوان الکتروود کار و نقره-کلرید نقره به عنوان الکتروود مرجع استفاده شده است)

تثبیت پروتئین سیتوکروم C بر روی الکتروود طلا و گرافیت مدادی

پس از اصلاح سطح الکتروود طلا با نانو ذرات طلا و اصلاح سطح با MPA به عنوان عامل اتصال دهنده، الکتروود در محلول پروتئینی به همراه EDC و NHS قرار گرفت. نمودار (۴) ولتاموگرام مربوط به تثبیت موفقیت آمیز سیتوکروم C را در سطح الکتروود طلا و GPE را نشان می دهد.



(الف)

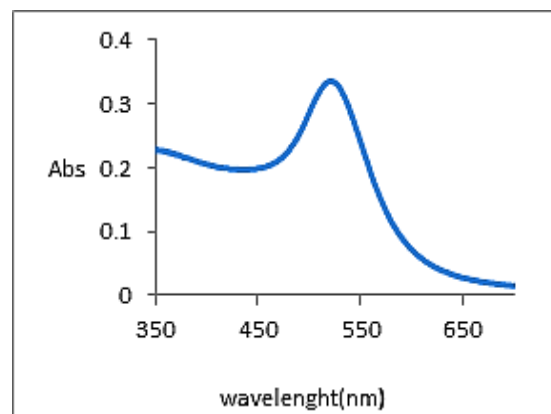


(ب)

نمودار (۴). ولتاموگرام چرخه ای مربوط به سیتوکروم C تثبیت شده (الف) در سطح الکتروود طلا (ب) در سطح الکتروود گرافیت مدادی (بافر فسفات ۵ میلی مولار، pH ۶/۵، سرعت روبش ۰/۱ ولت بر ثانیه محدوده پتانسیل -۰/۵ تا +۱ الکتروود طلا و گرافیت به عنوان الکتروود کار و نقره-کلرید نقره به عنوان الکتروود مرجع استفاده شده است)

بررسی پایداری پروتئین تثبیت شده

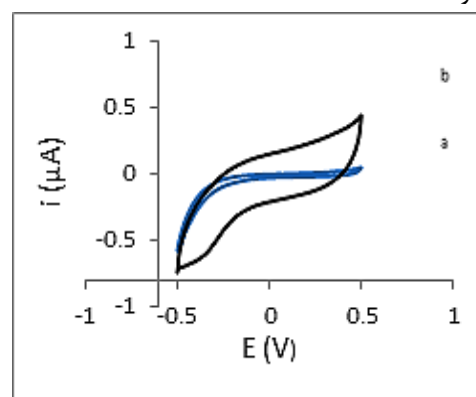
به منظور به دست آوردن میزان پایداری سیتوکروم C تثبیت شده در سطح الکتروودهای مذکور، در بازه زمانی ۲۰ روز، هر ۴ روز یکبار CV گرفته شد. تا زمانی که سیگنال مشاهده شده با سیگنال دریافتی در بار اول تفاوت زیادی نداشته باشد، الکتروود پایدار است. این میزان تفاوت در سنسورهای الکتروشیمیایی تا



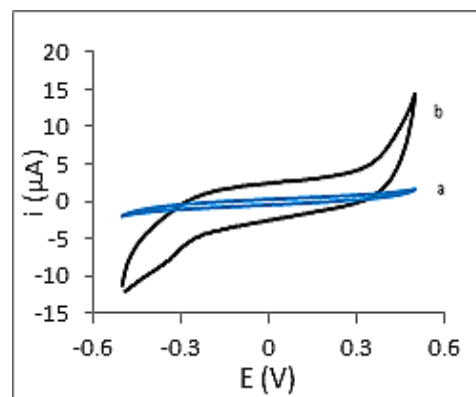
نمودار (۲). پیک جذب نانو ذره طلا.

اصلاح سطح و بررسی افزایش جریان

به منظور افزایش سطح الکتروود طلا و گرافیت مدادی، الکتروود طلا ابتدا در محلول مرکاپتوپروپیلونیک اسید قرار گرفت. سپس به روش الکتروشیمیایی نانوذرات طلا روی آن‌ها نشانده شد و با استفاده از روش ولتامتری چرخه ای حالت‌های اصلاح نشده و اصلاح شده با نانو ذره طلا مورد بررسی قرار گرفت. نمودار (۳) نتایج ولتاموگرام را نشان می دهد. در این نمودار می توان تأثیر نانوذرات طلا بر افزایش جریان عبوری از الکتروود را مشاهده نمود (۱۷).



(الف)



(ب)

نمودار (۳). مقایسه سطوح الکتروودهای طلا و گرافیت به روش ولتامتری چرخه ای. الف. (a) سطح الکتروود طلا اصلاح نشده، (b) سطح الکتروود

الکتروود طلا مورد آزمایش تا روز پانزدهم ۹۰ درصد جریان اولیه را دارا بود و از روز پانزدهم ۷۶ درصد جریان اولیه را نشان داد. در حالی که الکتروود گرافیتی فقط تا روز چهارم ۹۰ درصد از جریان اولیه را نشان داد و پس از آن جریان اولیه بسیار کاهش یافت.

بحث

افزایش روز افزون تحقیقات در حوزه تثبیت گونه‌های زیستی و طراحی حسگرهای زیستی در زمینه‌های پزشکی و صنعتی منجر به بررسی راه کارهای جدید و آسان برای تثبیت آنزیم‌ها و پروتئین‌ها در بستریهای مختلف شده است. به منظور تثبیت موفقیت آمیز یک پروتئین روی سطح الکتروود باید گروه‌های لازم برای برقراری ارتباط فعال با این پروتئین را فراهم آورد. این گروه‌ها از لحاظ ایجاد پیوند هیدروژنی، کووالانسی یا پل-های نمکی، مکمل ماکرومولکول‌ها هستند. استفاده از سطوح اصلاح شده (فعال شده) الکتروودها، امکان مطالعه و بررسی الکتروشیمی مستقیم و پایدار را فراهم ساخته است. چنین پیشنهاد شده است که ماده اصلاح کننده، گروه‌های عاملی را روی سطح الکتروود ایجاد می‌کند که پروتئین به طور اختصاصی و برگشت پذیر با آن‌ها برهم کنش کرده و بنابراین انتقال الکترون به طور مستقیم و سریع انجام می‌شود. از این ویژگی پروتئین‌های ردوکس می‌توان برای شناسایی موادی که این انتقال الکترون را مختل می‌کنند استفاده کرد. این تحقیق نشان داد که استفاده از نانو ذرات طلا برای اصلاح سطح الکتروودهای طلا و گرافیت مدادی موجب افزایش سطح این الکتروودها شده و اتصال گونه‌های زیستی به سطح و انتقال الکترون بین گونه ردوکس و الکتروود را تسهیل می‌کند. استفاده از عوامل اتصال دهنده بین نانوذرات طلا یا سطوح طلا شرایط مناسبی را برای ایجاد پیوند کووالانسی فراهم می‌کند. اتصال دهنده‌های مختلفی به این منظور وجود دارند، مرکاپتوپروپیلونیک اسید به دلیل داشتن زنجیره کوتاه تر نسبت به سایر اتصال دهنده‌ها گونه‌های زیستی را در کمترین فاصله از سطح الکتروود نگه می‌دارد. این عامل اتصال دهنده با داشتن گروه SH- در یک سمت و گروه COOH- در سمت دیگر می‌تواند به راحتی توسط گروه سولفید به سطح طلا متصل شود و گروه کربوکسیل در حضور عامل EDC گروه مستعدی برای اتصال به گروه‌های آمین موجود در گونه‌های زیستی است.

تمام آزمایش‌های ولتامتری با استفاده از سامانه سه الکتروودی در بافر فسفات ۵ میلی‌مولار، pH ۶/۵ و سرعت روبش ۰/۱

عنوان الکتروود مرجع، الکتروود میله‌ای پلاتین به عنوان الکتروود کمکی و الکتروود طلا یا گرافیت مدادی به عنوان الکتروود کار مورد استفاده قرار گرفتند. پروتئین تثبیت شده در سطح الکتروود طلا نسبت به الکتروود گرافیت مدادی پایداری بیش-تری داشت. الکتروود طلا تا دوازده روز ۹۰ درصد جریان اولیه را دارا بود و از روز شانزدهم ۷۶ درصد جریان اولیه را نشان داد. در حالی که الکتروود گرافیتی فقط تا چهار روز ۹۰ درصد از جریان اولیه را نشان داد و پس از آن جریان اولیه بسیار کاهش یافت. در رابطه با پروتئین سیتوکروم C که با روش اتصال عرضی بر روی الکتروود طلا تثبیت شد، به مدت ۴ روز پایدار بود. در روز هشتم فقط ۳۰ درصد جریان اولیه را نشان داد. در الکتروود گرافیتی روز چهارم کمابیش ۴۰ درصد جریان اولیه را نشان داد و این نشان دهنده پایداری کم در سطح الکتروود گرافیتی است.

بنابراین هر دو الکتروود با توجه به رسانایی بالا می‌توانند در تثبیت گونه‌های زیستی به کار روند و انتخاب هر یک از آن‌ها بستگی به انتظار کاربر از الکتروود و زیست حسگر مورد نظر دارد. اگر پایداری گونه زیستی تثبیت شده حائز اهمیت باشد استفاده از الکتروود طلا و پیوند کووالانسی پیشنهاد می‌شود اما اگر فقط تشخیص حضور و عدم حضور ماده‌ای مدنظر باشد و هم چنین مقرون به صرفه بودن و استفاده از تعداد بالای حسگر مورد توجه باشد استفاده از الکتروود گرافیت مدادی با توجه به ساخت آسان و ارزان آن می‌تواند مناسب باشد. هر دو نوع روش تثبیت استفاده شده یعنی پیوند کووالانسی و اتصال عرضی را می‌توان برای تثبیت گونه‌های زیستی به کار برد و همان گونه که نتایج نشان می‌دهد پیوند کووالانسی پایداری بیش تری دارد.

اسکرور و همکاران (۲۰۱۲) الکتروشیمی مستقیم تثبیت تگ- میل ترکیبی سیتوکروم C قلب اسب را انجام دادند، در این آزمایش استراتژی‌های اتصال، تگ - میل ترکیبی زیستی و الکترواستاتیک را برای تثبیت مستقیم سیتوکروم C قلب اسب بر روی سطح الکتروودهای طلا مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۶).

دویل و همکاران (۲۰۰۸) به طور مشابه، سیتوکروم C را روی الکتروودهای طلا با EDC به عنوان عامل جفت کننده تثبیت کردند (۴).

ملین و همکاران انتقال مستقیم الکترون را بین الکتروود و آنزیم تثبیت شده سیتوکروم bo₃ اکسیداز نشان دادند. در این تحقیق سطح الکتروود با نانو ذرات طلا اصلاح شده بود. عملکرد

آنزیم تثبیت شده در حضور اکسیژن بررسی شد و نتایج نشان داد که سایز ذرات طلا در انتقال الکترون مؤثر بوده و ذرات ریزتر انتقال بیش تری را موجب می‌شوند (۱۲).

فنگ و همکاران سه پروتئین دارای هم میوگلوبین، هموگلوبین و سیتوکروم C را بر روی الکتروود طلای اصلاح شده با نانو ذرات طلا از طریق چیتوسان با موفقیت تثبیت کردند. نتایج الکتروشیمی افزایش انتقال الکترون میان مولکول‌های پروتئین و سطح الکتروود را به دلیل اصلاح آن با نانو ذرات طلا و چیتوسان نشان داد که نتایج مشابهی را با تحقیق حاضر نشان داده است (۵).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق از گرافیت مدادی که بسیار ارزان و در دسترس است به‌عنوان بستر تثبیت استفاده شد و عملکرد آن با بستر طلا مقایسه شد. نتایج نشان داد که استفاده از نانو ذرات طلا باعث اصلاح سطح گرافیت شده و کارایی آن را در انتقال الکترون افزایش می‌دهند. بنابراین از این بستر می‌توان در طراحی زیست حسگرهای الکتروشیمیایی استفاده نمود. این تحقیق پایه‌ای نشان داد که می‌توان از متالوپروتئین سیتوکروم C برای شناسایی ترکیب‌های احیاء کننده استفاده نمود و با توجه به ارزان و در دسترس بودن گرافیت مدادی، این بستر از نظر اقتصادی مقرون به صرفه بوده و زمینه مناسبی برای تحقیقات پیشرفته‌تر محسوب می‌شود. نتیجه‌گیری می‌شود که اگر پایداری گونه زیستی تثبیت شده حائز اهمیت باشد استفاده از الکتروود طلا پیشنهاد می‌شود اما اگر فقط تشخیص حضور و عدم حضور ماده‌ای مد نظر باشد و همچنین استفاده از تعداد بالای حسگر مورد توجه باشد؛ استفاده از الکتروود گرافیت مدادی با توجه به ساخت آسان و ارزان آن می‌تواند پیشنهاد مناسبی باشد.

منابع

1. Bhambhani, A., Kumar, C. V., 2008. Enzyme-inorganic nanoporous materials: Differential scanning calorimetric studies and protein stability. *Microporous Mesoporous Mater.* 109, 223-232.
2. Cao, X., Ye, Y., Liu, S., 2011. Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing. *Anal. Biochem.* 417, 1-16.
3. D'Orazio, P., 2003. Biosensors in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* 334, 41-69.
4. De Wael, K., Buschop, H., De Smet, L., Adriaens, A., 2008. Immobilization of cytochrome c on cysteamine-modified gold electrodes with EDC as coupling agent. *Talanta* 76, 309-313.
5. Feng, J.-J., Zhao, G., Xu, J.-J., Chen, H.-Y., 2005. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins immobilized on gold nanoparticles stabilized by chitosan. *Anal. Biochem.* 342, 280-286.
6. Fujiwara, K., Kasaya, H., Ogawa, N., 2009. Gold nanoparticle monolayer formation on a chemically modified glass surface. *Anal. Sci.* 25, 241-248.
7. Hong, J., Ghourchian, H., Moosavi-Movahedi, A.A., 2006. Direct electron transfer of redox proteins on a Nafion-cysteine modified gold electrode. *Electrochem. commun.* 8, 1572-1576.
8. Huang, C.-C., Chang, H.-T., 2007. Parameters for selective colorimetric sensing of mercury (II) in aqueous solutions using mercaptopropionic acid-modified gold nanoparticles. *Chem. Commun.* 1215-1217.
9. Hulko, M., Hospach, I., Krasteva, N., Nelles, G., 2011. Cytochrome C biosensor—A model for gas sensing. *Sensors* 11, 5968-5980.
10. Krajewska, B., 2004. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Technol.* 35, 126-139.
11. Liu, Y., Offenhäusser, A., Mayer, D., 2010. Rectified tunneling current response of bio-functionalized metal-bridge-metal junctions. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1173-1178.
12. Melin, F., Meyer, T., Lankiang, S., Choi, S.K., Gennis, R.B., Blanck, C., Schmutz, M., Hellwig, P., 2013. Direct electrochemistry of cytochrome bo 3 oxidase at a series of gold nanoparticles-modified electrodes. *Electrochem. commun.* 26, 105-108.
13. Murgida, D.H., Hildebrandt, P., 2008. Disentangling interfacial redox processes of proteins by SERR spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* 37, 937-945.
14. Pedone, E., Li, X., Koseva, N., Alpar, O., Brocchini, S., 2003. An information rich biomedical polymer library. *J. Mater. Chem.* 13, 2825-2837.
15. Sassolas, A., Blum, L.J., Leca-Bouvier, B.D., 2012. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* 30, 489-511.
16. Schröper, F., Baumann, A., Offenhäusser, A., Mayer, D., 2012. Direct electrochemistry of novel affinity-tag immobilized recombinant horse heart cytochrome c. *Biosens. Bioelectron.* 34, 171-177.
17. Surucu, O., Bolat, G., Abaci, S., 2013. Electropolymerization of thiophene on gold nanoparticle modified electrode in aqueous media. *J. Electroanal. Chem.* 701, 20-24.
18. Wang, F., Hu, S., 2009. Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles. *Microchim. Acta* 165, 1-22.
19. Wang, J., 2006. *Analytical electrochemistry.* John Wiley & Sons.
20. Yagati, A.K., Lee, T., Min, J., Choi, J.-W., 2011. Amperometric sensor for hydrogen peroxide based on direct electron transfer of spinach ferredoxin on Au electrode. *Bioelectrochemistry* 80, 169-174.
21. Zhang, W., Li, G., 2004. Third-generation biosensors based on the direct electron transfer of proteins. *Anal. Sci.* 20, 603-609.