مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره بیست و نهم - زمستان ۱۳۹۶

Research Article
مقاله تحقیقی

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 الکترود با نانوذرات طلا اصلاح شدند و از لایه‌های خود تشکیل شونده مرکاپتوپروپیونیک 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 الکترود طلا نسبت به الکترود گرافیت مدادی پایداری بیش‌تری داشت.

بحث: در این مطالعه هر دو الکترود 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 الکترود 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 کاربردشان در زمینه‌های مختلف دارد.

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

مقدمه

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 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

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.12.1]

عمل می‌نمایند. برای مثال بیوسنسورها می‌توانند مولکول‌هایی مانند آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها و الیگونوکلئوتیدها را شناسایی کنند. یک بیوسنسور ایده‌آل نه تنها باید به غلظت‌های پایین آنالیت پاسخ دهد بلکه باید در میان ساختارهای زیستی مختلف ساختار مورد نظر را به‌طور ویژه تشخیص دهد. بیوسنسورها کاربردهای زیادی از جمله تشخیص بیومارکرها برای تشخیص‌های پزشکی، پاتوژن‌ها و تشخیص مواد سمی در آب و غذا دارند. در حال حاضر آنزیم و پروتئین تثبیت شده به‌طور معمول در زمینه‌های پزشکی برای تشخیص و درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. پروتئین‌های مختلف مانند آنتی‌بادی‌ها، آنزیم‌ها، گیرنده‌ها در زمینه‌های پزشکی تحول‌های اساسی در مدت زمان تشخیص، نیروی انسانی، دقت و تکرارپذیری ایجاد کرده‌اند. این کاربردها شامل استفاده از آنتی‌بادی‌ها یا آنتی‌ژن‌های تثبیت شده در کروماتوگرافی میل ترکیبی، گیرنده یا لیگاندهای تثبیت شده برای مطالعه میان‌کنش‌های آن‌ها و سلول‌های تثبیت شده در بیوسنسورها می‌باشد. الکترودهای بر پایه آنزیم کاربرد اصلی آنزیم‌های تثبیت شده را در پزشکی ارائه می‌دهند. بیوسنسورهای مورد استفاده در کاربردهای کلینیکی دارای مزایایی مانند تکرارپذیری، حساسیت، دقت، حمل آسان و هزینه پایین‌تر در مقایسه با روش‌های تشخیص متداول هستند (۳).

در طی سال‌های گذشته، بیوالکتروشیمی سهم زیادی را در درک بهتر ساختار و عملکرد پروتئین‌های ردوکس داشته است، هم‌چنین این روش برای ایجاد عملکردهای ردوکس جدید، هم با اصلاح پروتئین‌های موجود و هم با ساخت از نو[1] عناصر اولیه به‌کار گرفته شده است. متالوپروتئین‌های مهندسی شده سیستم‌های جالب توجهی را برای مطالعه‌های الکتروشیمیایی ساختار یا عملکرد پروتئین و کاربرد آن‌ها در نانو بیوتکنولوژی ارائه می‌دهند. میکروسکوپ‌های اسکن پروبی[2] و ولتامتری چرخه‌ای مربوط به متالوپروتئین‌های 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 پروتئین‌های اکسیدوردوکتاز بر روی سطوح و بررسی فرآیند انتقال بار یکی از روش‌های مهم برای توسعه زیست‌حسگرهای جدید و ابزار بیوالکترونیک حساس‌تر و انتخابی‌تر است (۱۱، ۱۸)، که از کاربردهای مهم تثبیت آنزیم‌ها و پروتئین‌ها به شمار می‌رود.

به‌ویژه توسعه الکترودهای اصلاح شده با پروتئین‌هایی از سیستم‌های انتقال الکترون زیستی، در فعالیت‌های تحقیقاتی، در حال افزایش است. یکی از چالش‌های مهم در الکتروشیمی پروتئین، ایجاد مسیرهای انتقال الکترون کارا میان الکترود و پروتئین تثبیت شده می‌باشد (۲۰).

الکتروشیمی مستقیم در اواخر سال ۱۹۷۰ به‌عنوان وسیله‌ای برای مطالعه پروتئین‌های ردوکس با استفاده از تکنیک‌های الکتروشیمیایی توسعه یافت. آزمایش‌های 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 پروتئین‌های ردوکس محلول در آب و آنزیم‌ها شده است. استفاده از سطوح اصلاح شده (فعال شده) الکترودها، امکان مطالعه و بررسی الکتروشیمی مستقیم و پایدار را فراهم می‌سازد. بنابراین متالوپروتئین‌هایی مانند آنزیم سیتوکروم C اکسیداز، پروتئین سیتوکروم C، آسکوربات اکسیداز و بسیاری از متالوپروتئین-های دیگر که قادرند انتقال مستقیم الکترونی در سطح الکترود اصلاح شده داشته باشند می‌توانند به‌عنوان گونه زیستی تشخیص دهنده در زیست‌حسگرها به‌کار روند (۱۳).

سیتوکروم‌ها به‌ویژه سیتوکروم C پروتئین‌های کوچک حاوی گروه هِم و محلول در فضای بین غشایی هستند که می‌توانند به‌عنوان واسطه انتقال الکترون بین آنزیم‌های ردوکس عمل کنند. تبادل الکترون بین سیتوکروم C و آنزیم‌های ردوکس به صورت اختصاصی صورت می‌گیرد. تحقیقات الکتروشیمیایی متعددی در مورد این پروتئین با توجه به ساختار الکترود و روش‌های مختلف تثبیت انجام شده است (۷، ۲۱).

در دو تحقیق پاسخ‌های اکسیدوردوکتازی مناسب برای سیتوکروم C تثبیت شده بر روی سطح طلا اصلاح شده با زنجیره‌های کوتاه تیوآلکانوئیک اسید و سیسته آمین و EDC به‌دست آمده است (۴).

فرآیند تبادل مستقیم الکترون به ساختار الکترود در مقیاس نانو نیز بستگی دارد. نشان داده شده است که با اصلاح سطح الکترود توسط نانوذرات، می‌توان آنزیم و الکترود را در نزدیک-ترین فاصله و مناسب‌ترین حالت نسبت به‌هم برای انتقال الکترون قرار داد. به‌عنوان مثال نانوذرات طلا می‌توانند به شکل مؤثری سطح پایداری را برای تثبیت بیومولکول‌ها فراهم کنند، طوری که مولکول‌ها فعالیت زیستی خود را حفظ کنند. هم‌چنین نانوذرات طلا می‌توانند الکترودهای رسانایی را تشکیل دهند به‌طوری که وقتی به سطح سوبسترا متصل می-شوند، محل انتقال الکترون هستند و بدون نیاز به‌واسطه باعث

[1] De novo

[2] Scanning Probe Microscopy

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.12.1]

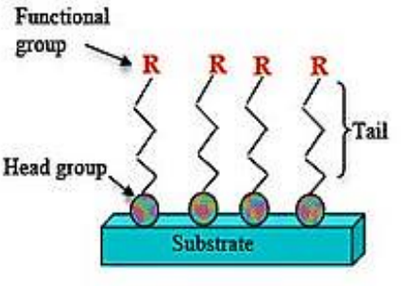
انتقال مستقیم الکترون بین پروتئین‌های ردوکس و سطوح الکترود می‌شوند. مشخصات گوناگون کلویید طلا، از جمله نسبت سطح به حجم بالا، سطح انرژی بالا و توانایی کاهش فاصله بین پروتئین‌ها و ذرات فلزی ممکن است انتقال الکترون بین محل‌های اکسید و احیای پروتئین‌ها و سطح الکترود را تسهیل کند (۲، ۱۲). برای اصلاح سطح الکترود ابتدا باید سطح الکترود 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 الکترود از نظر شیمیایی اصلاح شود که شامل نانوساختارها، تک لایه‌های خود تشکیل شونده، در پوشش قرار دادن سل-ژل 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 وگوگرد، به‌ویژه برای کنترل واکنش پذیری در سطح مشترک الکترود و محلول بسیار مناسب است. این‌گونه تک لایه‌ها به‌طور معمول از شناورسازی الکترود طلا به‌مدت یک شب در محلول‌های اتانولی دارای غلظت‌های میلی‌مولار از آلکان تیول‌ها به‌وجود می‌آیند.

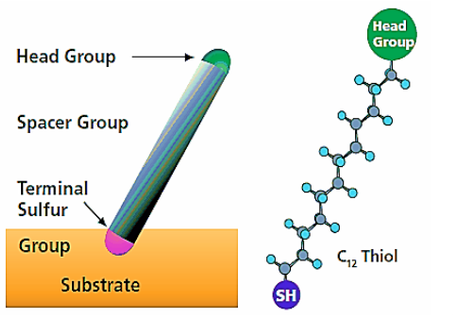
در تشکیل تک لایه، شکستن پیوند S-H، نقش کلیدی را دارد:

$$RSH + Au \leftrightarrow RS\text{-}Au + e + H^+$$

نیروهای واندروالسی بین گروه‌های متیل، به تک لایه جهت می‌بخشند. بنابراین، چنین فرآیند خود- انباشتگی، نتیجهٔ 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 ارگانوسولفوری 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



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 الکترود هدف در تحقیقات بیوالکتروشیمی مورد توجه است. هدف اصلی دست‌یابی به سرعت و میزان انتقال کارآمد الکترون‌های سطحی میان متالوپروتئین و سطح الکترود 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 الکترود می‌باشد، چنین پیشنهاد شده است که ماده اصلاح کننده گروه‌های عاملی را روی سطح الکترود 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 الکترودها و مطالعه-های الکتروشیمیایی می‌باشند. طلا از جمله بسترهایی است که به میزان زیادی در مطالعه‌های الکتروشیمیایی مورد بررسی قرار می‌گیرد. این مطالعه یک تحقیق پایه‌ای برای امکان سنجی 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 الکترودهای طلا و گرافیت مدادی تثبیت شد و عملکرد الکترود گرافیت مدادی با الکترود طلا مقایسه شد. علت انتخاب الکترود گرافیتی قیمت پایین و

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.12.1]

در دسترس بودن آن است. سطح هر دو الکترود با استفاده از نانو ذارت طلا به منظور افزایش سطح اصلاح شد. این تثبیت از طریق لایه‌های خود تشکیل شونده (SAM) مرکاپتوپروپیونیک اسید و ایجاد گروه‌های عاملی کربوکسیلی به‌منظور ایجاد پیوند آمیدی با گروه‌های آمینی پروتئین تثبیت شده انجام شد. EDC و NHS به‌عنوان عوامل جفت کننده در ایجاد پیوند کووالانسی به‌کار برده شدند. با روش ولتامتری چرخه‌ای به بررسی انتقال مستقیم الکترون در سطح این دو نوع الکترود اصلاح شده با نانوذرات طلا پرداخته شد.

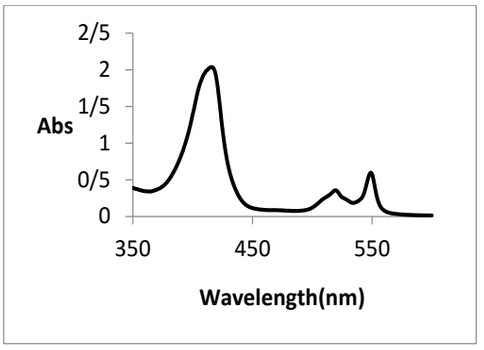
روش کار

مواد

سیتوکروم C قلب گاو محصول شرکت سیگما آلدریچ، نمک طلا ($HAuCL_4$) و ۳- سدیم سیترات محصول شرکت مرک آلمان برای تهیه نانوذره طلا استفاده شدند. ۳- مرکاپتوپروپیونیک اسید محصول شرکت مرک آلمان، EDC وNHS 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 به‌صورت اکسید بود. برای تهیه ۱۰ میلی-لیتر محلول احیاء شده با استفاده از پروتکل شرکت سیگما آلدریچ ۱۰۰ میلی‌گرم از سیتوکروم C در ۸ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار حل شد. با افزودن ۳ تا ۵ میلی‌گرم از ال آسکوربیک اسید سدیم، سیتوکروم C احیاء شد (محلول قرمز روشن). نمک اسید آسکوربیک اضافی از طریق دیالیز خارج شد. سپس محلول از کیسه دیالیز خارج و توسط بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از افزودن اسیدآسکوربیک سدیم میزان جذب سیتوکروم C احیاء شده اندازه‌گیری شد. جذب در ۵۵۰ نانومتر حالت-های احیاء را در گروه هم سیتوکروم C نشان می‌دهد. نمودار (۱) UV- طیف مربوط به ۳ پیک جذب سیتوکروم C در حالت احیاء (Fe^{2+}) در طول موج‌های ۵۵۰ ، ۵۲۱ و۴۱۴ نانومتر را نشان می‌دهد (۹).



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 میلی‌لیتر $HAuCL_4$ ۰/۳ میلی-مولار ۳ آبه در بشر به دمای جوش رسید. ۵ میلی‌لیتر تری سدیم سیترات ۵ میلی‌مولار به محلول بالایی افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. در این مدت رنگ محلول به صورت قرمز آلبالوئی درآمد. محلول در دمای اتاق و در شرایط همزده سرد شد، این محلول برای استفاده‌های بعدی در یخچال نگهداری شد.

آماده سازی و اصلاح سطح الکترود طلا

الکترود 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. به‌منظور افزایش سطح، نانو ذرات طلا به روش الکتروشیمیایی روی الکترود طلا نشانده شد (۸).

۳- مرکاپتو پروپیونیک اسید ترکیبی اسیدی است که در ساختار خود دارای گروه تیول می‌باشد و تمایل بالایی برای اتصال به طلا دارد و می‌تواند با جذب شیمیایی روی الکترود طلا یک سطح غیر باردار آب‌دوست ایجاد نماید. ابتدا الکترود 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. الکترود مذکور درون محلول نانوذره طلا به عنوان الکترولیت قرار گرفت، محدوده پتانسیل از ۰/۲- تا ۱/۴+ انتخاب شد و روبش ۹۰ دور انجام شد (۱۷).

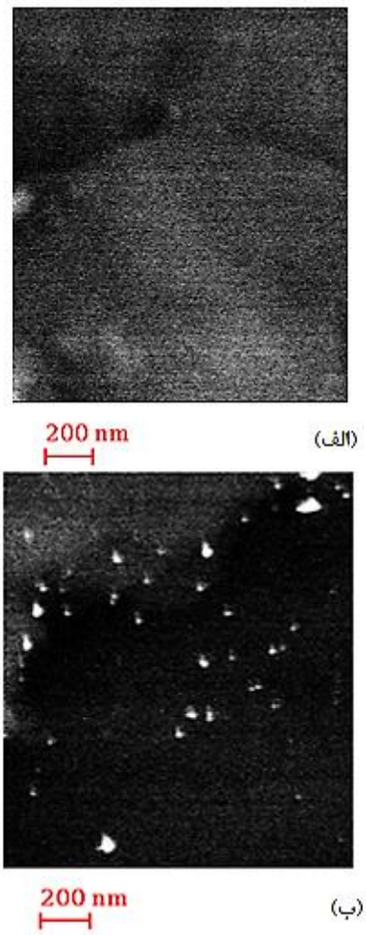
آماده سازی و اصلاح سطح الکترود گرافیتی (GPE)

جهت تهیه الکترودهای گرافیت مدادی پس از بررسی مغز مدادهای موجود در بازار، نرم‌ترین مغز مداد که دارای بالاترین میزان گرافیت می‌باشد یعنی B8 با قطر ۲ میلی‌متر انتخاب شد. از سرسمپلرهای ۱۰۰ میکرولیتری به‌عنوان نگه دارنده

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.12.1]

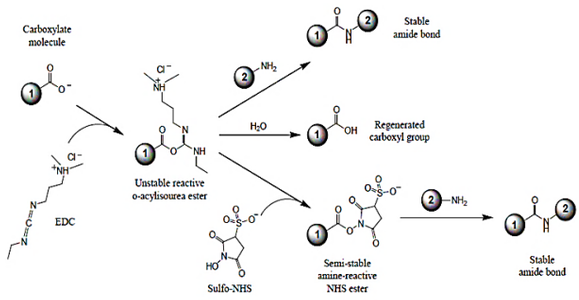
برای این مغزمدادها استفاده شد. برای به‌دست آوردن GPE اصلاح شده با نانوذرات طلا، GPE به مدت۴۰ دقیقه، درون بشر حاوی محلول کلوئیدی نانوذره طلا با دمای ۸۵ °C قرار گرفت. سپس الکترودها دو بار با آب دیونیزه شسته شده و در دمای ۶۰ °C به مدت ۵ دقیقه خشک شدند. شکل (۲) تصویر SEM مربوط به قرارگیری نانوذارت طلای ۸۵-۲۰ نانومتری بر روی سطح GPE را نشان می‌دهد.



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

فرآیند اتصال پروتئین سیتوکروم C بر روی نانوذرات طلا

در این تحقیق هر دو الکترود اصلاح شده با نانو ذره طلا به مدت ۴ ساعت در محلول ۳-مرکاپتوپروپیونیک 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 الکترود شسته شود. پس از خشک شدن، الکترود در محلول سیتوکروم C در حضور EDC و NHS به‌مدت ۲۴ ساعت در ۴ °C انکوبه شد. EDC یک عامل اتصال دهنده است که گروه کربوکسیل مربوط به MPA را به گروه‌های آمین پروتئین متصل می‌کند. EDC 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 الکترود 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 اکسیدوردوکتازی سیتوکروم C تثبیت شده با استفاده از روش ولتامتری چرخه‌ای بررسی شد، تمام آزمایش‌های ولتامتری با استفاده از سامانه سه الکترودی انجام شدند که الکترود نقره- کلرید نقره به‌عنوان الکترود مرجع و الکترود میله‌ای پلاتین به‌عنوان الکترود کمکی و الکترود طلا و گرافیت مدادی به‌عنوان الکترود کار مورد استفاده قرار گرفتند. بافر فسفات ۵ میلی‌مولار و pH برابر ۶/۵ به عنوان الکترولیت و محیط عمل سیتوکروم C مورد استفاده قرار گرفت.

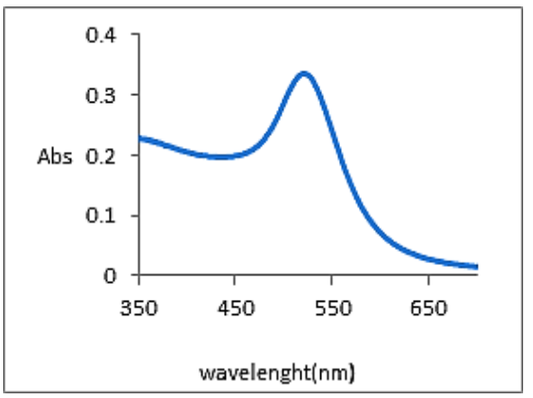
نتایج

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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

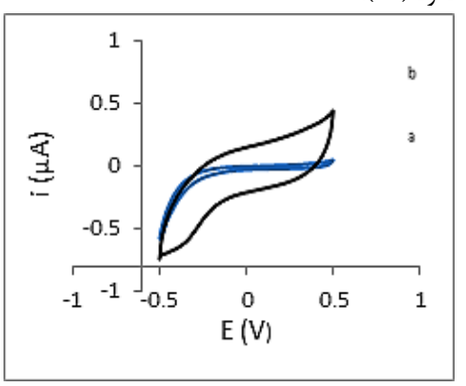
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.12.1]



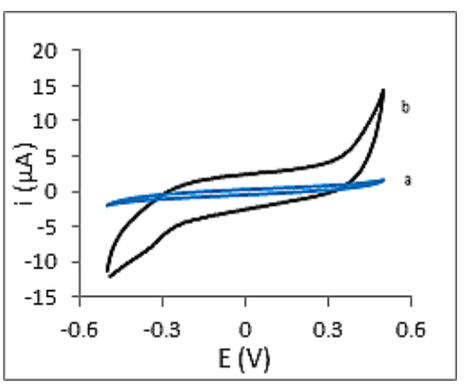
نمودار (۲). پیک جذب نانو ذره طلا.

اصلاح سطح و بررسی افزایش جریان

به‌منظور افزایش سطح الکترود طلا وگرافیت مدادی، الکترود طلا ابتدا در محلول مرکاپتوپروپیونیک اسید قرار گرفت. سپس به‌روش الکتروشیمیایی نانوذرات طلا روی آن‌ها نشانده شد و با استفاده از روش ولتامتری چرخه‌ای حالت‌های اصلاح نشده و اصلاح شده با نانو ذره طلا مورد بررسی قرار گرفت. نمودار (۳) نتایج ولتاموگرام را نشان می‌دهد. در این نمودار می‌توان تأثیر نانوذرات طلا بر افزایش جریان عبوری از الکترود را مشاهده نمود (۱۷).



(الف)

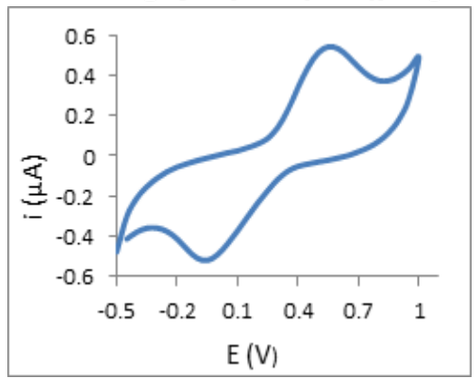


(ب)

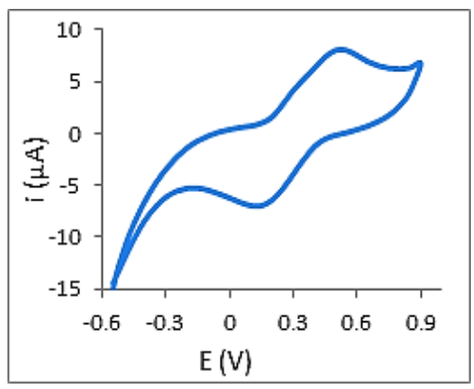
نمودار (۳). مقایسه سطوح الکترودهای طلا و گرافیت به روش ولتامتری چرخه ای. الف. (a) سطح الکترود طلای اصلاح نشده، (b) سطح الکترود طلای اصلاح شده با نانو ذرات طلا. ب. (a) سطح الکترود گرافیت مدادی اصلاح نشده، (b) سطح الکترود گرافیت مدادی اصلاح شده با نانو ذرات طلا. (بافر فسفات ۵ میلی مولار، pH ۶/۵، سرعت روبش ۰/۱ ولت بر ثانیه محدوده پتانسیل ۰/۵- تا ۰/۵+ الکترود طلا و گرافیت به عنوان الکترود کار و نقره-کلرید نقره به عنوان الکترود مرجع استفاده شده است)

تثبیت پروتئین سیتوکروم C بر روی الکترود طلا و گرافیت مدادی

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



(الف)



(ب)

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

بررسی پایداری پروتئین تثبیت شده

به‌منظور به‌دست آوردن میزان پایداری سیتوکروم C تثبیت شده در سطح الکترودهای 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، الکترود پایدار است. این میزان تفاوت در سنسورهای الکتروشیمیایی تا

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.12.1]

الکترود 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 حالی‌که الکترود 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 بسترهای مختلف شده است. به‌منظور تثبیت موفقیت آمیز یک پروتئین روی سطح الکترود 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) الکترودها، 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 الکترود 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. این تحقیق نشان داد که استفاده از نانو ذرات طلا برای اصلاح سطح الکترودهای طلا و گرافیت مدادی موجب افزایش سطح این الکترودها شده و اتصال گونه‌های زیستی به سطح و انتقال الکترون بین گونه ردوکس و الکترود را تسهیل می‌کند. استفاده از عوامل اتصال دهنده بین نانوذرات طلا یا سطوح طلا شرایط مناسبی را برای ایجاد پیوند کووالانسی فراهم می‌کند. اتصال‌دهنده‌های مختلفی به این منظور وجود دارند، مرکاپتوپروپیونیک اسید به‌دلیل داشتن زنجیره کوتاه‌تر نسبت به سایر اتصال‌دهنده‌ها گونه‌های زیستی را در کم‌ترین فاصله از سطح الکترود نگه می‌دارد. این عامل اتصال‌دهنده با داشتن گروه SH– در یک سمت و گروه COOH- در سمت دیگر می‌تواند به‌راحتی 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 الکترودی در بافر فسفات ۵ میلی‌مولار، pH ۶/۵ و سرعت روبش ۰/۱ عنوان الکترود مرجع، الکترود میله‌ای پلاتین به‌عنوان الکترود کمکی و الکترود طلا یا گرافیت مدادی به‌عنوان الکترود کار مورد استفاده قرار گرفتند. پروتئین تثبیت شده در سطح الکترود طلا نسبت به الکترود گرافیت مدادی پایداری بیش-تری داشت. الکترود طلا تا دوازده روز ۹۰ درصد جریان اولیه را دارا بود و از روز شانزدهم ۷۶ درصد جریان اولیه را نشان داد. در حالی‌که الکترود 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 الکترود طلا تثبیت شد، به مدت ۴ روز پایدار بود. در روز هشتم فقط ۳۰ درصد جریان اولیه را نشان داد. در الکترود گرافیتی روز چهارم کمابیش ۴۰ درصد جریان اولیه را نشان داد و این نشان دهنده پایداری کم در سطح الکترود گرافیتی است.

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

اسکروپر 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 الکترودهای طلا مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۶).

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

ملین و همکاران انتقال مستقیم الکترون را بین الکترود و آنزیم تثبیت شده سیتوکروم bo_3 اکسیداز نشان دادند. در این تحقیق سطح الکترود با نانو ذرات طلا اصلاح شده بود. عملکرد

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.12.1]

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 بیش‌تری را موجب می‌شوند (۱۲).

فنگ و همکاران سه پروتئین دارای هم میوگلوبین، هموگلوبین و سیتوکروم C را بر روی الکترود طلای اصلاح شده با نانو ذرات طلا از طریق چیتوسان با موفقیت تثبیت کردند. نتایج الکتروشیمی افزایش انتقال الکترون میان مولکول‌های پروتئین و سطح الکترود 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 الکترود 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 الکترود گرافیت مدادی با توجه به ساخت آسان و ارزان آن می‌تواند پیشنهاد مناسبی باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.12.1]

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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.12.1]