

Наноструктуриран биосензор за анализ на глюкоза

Руска Ненкова, Недялка Димова, Нина Димчева, Цонка Годжевъргова

Nanostructured biosensor for analysis of glucose. Nanozeolite (NZ) particles were used as enzyme carrier for immobilization of glucose oxidase (GOD). The composition and the functional groups of pure nanozeolite particles and nanozeolites with adsorbed GOD were demonstrated by the FT-IR spectra. Pt/NZ and Pt/NZ-GOD electrodes were constructed and cyclic voltammetric studies have been carried out on these two electrodes. The presence of the oxido-reductase (GOD) in the biosensor is the reason for the shifting in the peak potential and the corresponding current. It was estimated that the peak potential of cathodic peak of Pt/NZ-GOD electrode shifted to negative values with the increase in pH. The sensitivity of this electrode was 1.8019 $\mu\text{A}/\text{mmol}$, the concentration limit was determined to be 0.8 mmol/l glucose and the linear correlation between glucose concentration and the current was in the concentration range from 2 to 18 mmol/l .

Keywords: biosensor, glucose oxidase, nanozeolite, glucose

ВЪВЕДЕНИЕ

Глюкозооксидазата (ГОД) е най-използвания ензим като аналитичен реагент, дължащо се на нейното приложение за определяне на глюкоза, ниската ѝ цена и добра стабилност. На базата на имобилизирана ГОД са конструирани редица биосензори за количествено определяне на β -D-глюкоза в проби от биологични течности, храни, напитки и ферментационни продукти [4, 6, 8, 9]. Ефективността на конструираните биосензори до голяма степен се определя от избрания метод за имобилизация на ГОД върху повърхността на електрода. ГОД може да се имобилизира чрез физична адсорбция [1], омрежване [3], включване във въглеродна паста [5], полимери [7] и хидрогелове [2]. Не на последно място, ключов елемент при конструирането на биосензор е носителят, използван за имобилизацията на ензима. След откриването на нанопорестите материали настъпи голям скок в развитието на имобилизационните методи за получаване на биосензори, тъй като последните значително подобряват ефективността им [10]. Зеолитните наночастици (нанозеолити) притежават голяма повърхност, лесно модифициращи се повърхностни участъци и висока дисперсия, както във водни така и в органични разтвори. Тези характеристики им позволяват да притежават високи адсорбционни възможности, като ги правят обещаващи носители за имобилизация на ензими и за конструирането на ензимни електроди.

Целта на настоящата работа е да се конструира глюкозооксидазен биосензор с носител нанозеолитните частици за анализ на глюкоза.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали:

ГОД (ЕК 1.1.3.4), със специфична активност 119.3 U/mg, е изолирана от *Aspergillus niger* и е доставена от Fluka (Buchs, Switzerland). Иmobилизацията на ензима се осъществява чрез омрежване с глутаров алдехид (ГА), Fluka (Buchs, Switzerland). Зеолитните наночастици са предоставени от Фудан Университета, Шанхай, Китай. Съставени са изцяло от Si и са с размер 90 nm. Имат пореста структура, дзета потенциал -18.4 mV, ъгълът на омокряне - 34.2°.

2. Апарати:

Стандартна, триелектродна стъклена клетка с работен обем 10–20 ml, сравнителен електрод – Ag/AgCl, спомагателен електрод – платинов проводник и работен платинов електрод, беше използвана при всички електрохимични изследвания. Измерванията бяха проведени с електрохимична работна станция

Palm Sens с компютърен контрол и софтуер PS Trace 2.13 (Palm InstrumentsBV, Холандия).

Електронномикроскопските снимки са направени на Philips XL 30 микроскоп. Използван е FTIR спектрофотометър (Tensor 27) за характеризирание на зеолитните наночастици и взаимодействието им с ензима (ГОД).

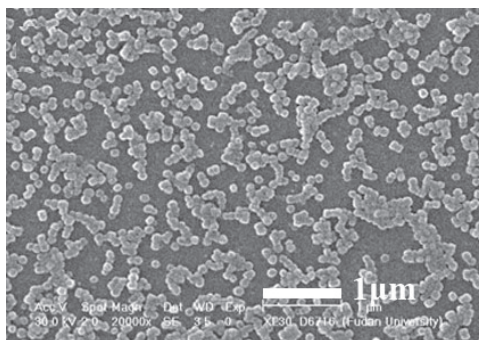
3.Методи:

Получаване на Платинов/НЗ електрод и Платинов/НЗ-ГОД електрод

Повърхността на платиновия електрод се почиства с етанол и последваща циклична волтаперометрия (потенциал от -0.2 до 1.45 V в 0.1 M разтвор на H₂SO₄ при скорост на сканиране 0.075 V/s за 10 min). Зеолитните наночастици (0.0025 g) се потапят в 0.1% разтвор на албумин във фосфатен буфер за два часа при 4°C (за Платинов/НЗ електрод). Зеолитните наночастици (0.0025 g) се потапят в 0.4% разтвор на глюкозооксидаза в 0.05 M фосфатен буфер за два часа при 4°C (за Платинов/НЗ-ГОД електрод). След това сместа се центрофугира при 10000 x g за 10 min. Супернатантата се отстранява и към нанозеолита се прибавя 50 µl 0.05 M фосфатен буфер. Смес от 0.7% ГА и буфер съдържащ зеолитни наночастици се нанасят върху повърхността на почишения платинов електрод и се оставят при 4°C за 12 часа. Модифицираните Платинов/НЗ и Платинов/НЗ-ГОД електроди се характеризират чрез циклична волтаперометрия в 0.05 M фосфатен буфер при потенциал от -0.3 до 1 V.

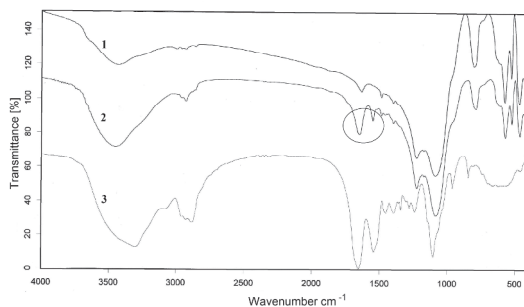
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Като носител за имобилизация на ензима глюкозооксидаза са използвани зеолитни наночастици със сферична форма и еднакъв размер - 90 nm (морфологията на наночастиците е представена на Фиг. 1). Нанозеолитните частици имат пореста структура, като обема на порите е 0.044 cm³/g.



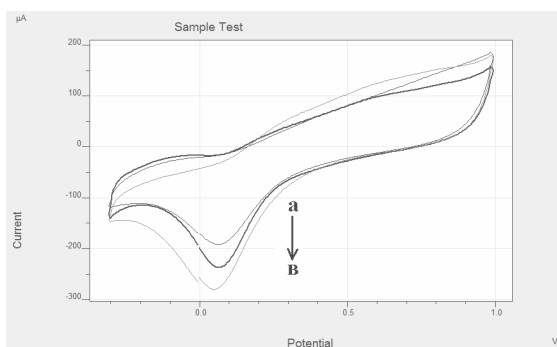
Фиг.1. SEM на зеолитни наночастици

Съставът и функционалните групи на изходните нанозеолитни частици и на нанозеолитни частици с имобилизирана ГОД са доказани с ИЧ спектри (Фиг.2). Характерните ивици на ИЧ спектър на изходните НЗ частици са представени на спектър 1. След имобилизацията на ензима ГОД върху НЗ частици отново са направени ИЧ спектри, за да се докаже присъствието на ензима на повърхността на наночастиците (спектър 2). Забелязва се появата на нови пикове, доказващи наличието на адсорбиран ензим, най-важните от които са ивиците 1652, 1536 cm⁻¹ отговарящи за наличие на amidни и карбоксилни групи. За сравнение е посочен и спектърта само на ГОД (спектър 3).



Фиг.2. FTIR спектър на НЗ частици (спектър 1), НЗ-ГОД (спектър 2) и ГОД (спектър 3)

Изследвани са Платинов/НЗ и Платинов/НЗ-ГОД електрод чрез циклична волтаперометрия. Получените волтаперни криви са представени на Фиг. 3 и са сравнени с волтаперната крива на чист платинов електрод.



Фиг. 3. Циклични волтаперни криви на Платинов/НЗ електрод (а), чист платинов електрод (б) и Платинов/НЗ-ГОД електрод (в)

Вижда се, че височината на катодния пик на Платинов/НЗ-ГОД електрода е по-голяма в сравнение със същата на Платинов/НЗ електрод (табл.1).

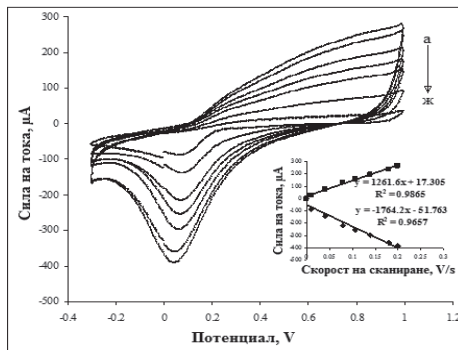
Таблица 1

Потенциал на катодния пик и съответстваща сила на тока		
Електрод	E, V	ΔI , μA
Чист платинов електрод	0.064	95.3
Платинов/НЗ електрод	0.064	71.72
Платинов/НЗ-ГОД електрод	0.049	131.55

По-добрата електроактивност на този електрод вероятно се дължи на присъствието на оксидоредуктазата (ГОД).

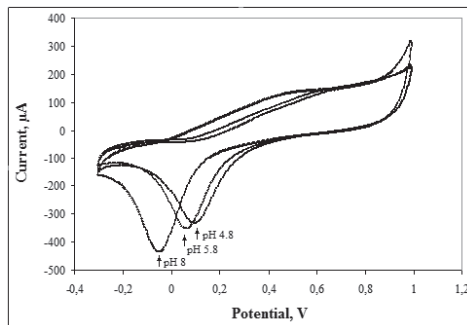
Проведени са кинетични изследвания на получения Платинов/НЗ-ГОД електрод чрез циклични волтаперни криви, като се варира скоростта на сканиране от 0.01 до 0.2 V/s. Построени са и линейните зависимости между скоростта на сканиране и силата на тока отговарящи на катодния пик (при 0.05V) и на анодното изместване при 0.8 V. Изведени са линейните уравнения на тези зависимости (Фиг.

4). Наклона на линейната зависимост на потенциала на катодния пик показва висока електроактивност на получения ензимен електрод (уравнение $y = -1764x - 51,763$; $R^2 = 0,9657$).



Фиг. 4 Циклични волтамперни криви на Платинов/НЗ-ГОД електрод при нарастваща скорост на сканиране от 0.01 до 0.2 V/s (а→ж) във фосфатен буфер (0.05 M, pH 5.8).

Изследвано е и влиянието на pH върху цикличните волтамперни криви на Платинов/НЗ-ГОД електрод. За изследването са използвани буферни разтвори с три различни стойности на pH (4.8; 5.8 и 8).



Фиг. 5. Влияние на pH върху циклични волтамперни криви на Платинов/НЗ-ГОД електрод

Резултатите са представени графично на Фиг. 5. Наблюдава се изместване на потенциала на катодния пик към отрицателните стойности при нарастване на стойността на pH. Това се дължи на промяна на заряда на ензимните молекули, вследствие различното pH на трите разтвора.

Изследвано е и влиянието на концентрацията на глюкозата върху височината на катодния пик. Установена е линейната зависимост между концентрацията на глюкозата и силата на тока. Изведено е уравнението на тази зависимост: $y = -1,8019x + 135,84$, откъдето се вижда че чувствителността на получения ензимен електрод е 1.8019 $\mu\text{A}/\text{mmol}$. Линейният интервал на биосензора е от 2 до 18 mmol/l . Лимитната концентрация е 0.8 mmol/l глюкоза. Възпроизводимостта на получения биосензор също е определена. Относителното стандартно отклонение е 4 % за шест последователни измервания на един и същ ензимен електрод. Електрода показва добра стабилност на съхранение за период от 40 дни (80 % остатъчна активност).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От представените резултати се вижда, че е конструиран ензимен биосензор за анализ на глюкоза с висока чувствителност и добра стабилност на съхранение. Постигната е ниска лимитна концентрация - 0.8 mmol/l глюкоза.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Battaglini F., N. Bartlett, J. H. Wang (2002) *Analytical Chemistry* 72 (3) 502–509
- [2] Binyamin G., A. Heller (1999) *J. Electrochem. Soc.* 146, 2965-2967.
- [3] Burmeister J. J., G. A. Gerhardt (2001) *Analytical Chemistry* 73 (5) 1037–1042
- [4] Kang X, Z. Mai, X. Zou, P. Cai, J. Mo (2007) *Anal. Biochem.* 369 (1) 71-79.
- [5] Kulys J., L. Tetianec, P. Schneider (2001) *Biosensors and Bioelectronics* 16 (4-5) 319-324
- [6] Lukacheva L. V., A. A. Zakemovskaya, E. E. Karyakina, I. N. Zorov, A. P. Sinityn, M. V. Sukhacheva, A. I. Netrusov, and A. A. Karyakin (2007) *Journal of Analytical Chemistry* 62 (4) 388–393.
- [7] Palmisano F., R. Rizzi, D. Centonze, P. G. Zambonin (2000) *Biosens. Bioelectron.* 15, 531-539.
- [8] Wu B. Y., S. H. Hou, F. Yin, Z. X. Zhao, Y. Y. Wang, X. S. Wang, Q. Chen (2007) *Biosens. Bioelectron.*, 22 (12) 2854-60.
- [9] Zhang J., M. Feng, H. Tachikawa (2007) *Biosens. Bioelectron.*, 22 (12) 3036-41.
- [10] Zhang Xueqing, Qin Guo (2009) *Sensors*, 9, 1033.

Благодарност: Това изследване е осъществено с финансова помощ по договор DNTS-01/09 от Фонд “Научни изследвания” и договор НИХ-261 от Университет „Проф. д-р Асен Златаров”.

За контакти:

Ас. д-р Руска Ненкова –Университет “Проф. д-р Асен Златаров”, катедра Биотехнология, тел. 056/858471, e-mail: rdenkova@abv.bg

Доц. д-р Недялка Димова - Университет “Проф. д-р Асен Златаров”, катедра Биотехнология, тел. 056/858334, e-mail: nelidbg@abv.bg

Доц. д-р Нина Димчева – Пловдивски университет „Паисий Хилендарски”, катедра Физикохимия, тел. 032/261 336, e-mail: ninadd@uni-plovdiv.bg

Проф. д-р Цонка Годжевъргова –, Университет “Проф. д-р Асен Златаров”, катедра Биотехнология, тел. 056/858353, e-mail: godjevargova@yahoo.com

Докладът е рецензиран.