

# اندازه‌گیری گلوتامات با استفاده از حسگر زیستی بر پایه نانولوله‌های کربنی عمودی

اعظم قلی‌زاده، سعید شاهرخیان\*<sup>+</sup>، اعظم ایرجی‌زاد  
تهران، دانشگاه صنعتی شریف، پژوهشکده علوم و فناوری نانو

شمس‌الدین مهاجرزاده

تهران، دانشگاه تهران، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشکده برق و کامپیوتر، آزمایشگاه نانوالکترونیک و لایه نازک

منوچهر وثوقی

تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت

**چکیده:** حسگر زیستی حساس گلوتامات با استفاده از گلوتامات دهیدروژناز/نانولوله‌های کربنی عمودی ساخته شد. نانولوله‌های کربنی بر روی ویفر سیلیکن با استفاده از روش نشست بخار در پلاسما رشد داده شد. گلوتامات دهیدروژناز به روش کووالانسی روی نوک نانولوله‌ها تثبیت شد. کارایی حسگر زیستی با استفاده از روش‌های ولتامتری چرخه‌ای و ولتامتری پالسی تفاضلی بررسی شد. منحنی واسنجی در بازه‌ی وسیع ۰/۱-۵۰ میکرومولار رسم شد. حسگر زیستی بدون استفاده از واسطه حد تشخیص ۵۷ نانومولار دارد و حساسیت آن در بازه‌ی ۰/۱-۲۰ میکرومولار،  $۰/۹۷۶ \text{ mAm/Mcm}^2$  و در بازه‌ی ۲۰-۳۰۰ میکرومولار،  $۰/۱۸۲ \text{ mAm/Mcm}$  است. اثر بقیه مواد زیستی بر روی رفتار ولتامتر حسگر زیستی و همچنین پایداری پاسخ‌ها بررسی شد. نتیجه‌ها نشان داد که این حسگر زیستی حتی بدون استفاده از واسطه با حساسیت بالا می‌تواند گلوتامات را اندازه‌گیری کند.

**واژه‌های کلیدی:** نانولوله‌های کربنی عمودی، حسگر زیستی الکتروشیمیایی، ولتامتری پالسی تفاضلی، گلوتامات.

**KEY WORDS:** Vertically aligned carbon nanotubes, Electrochemical biosensor, Differential pulse voltammetry, Glutamate.

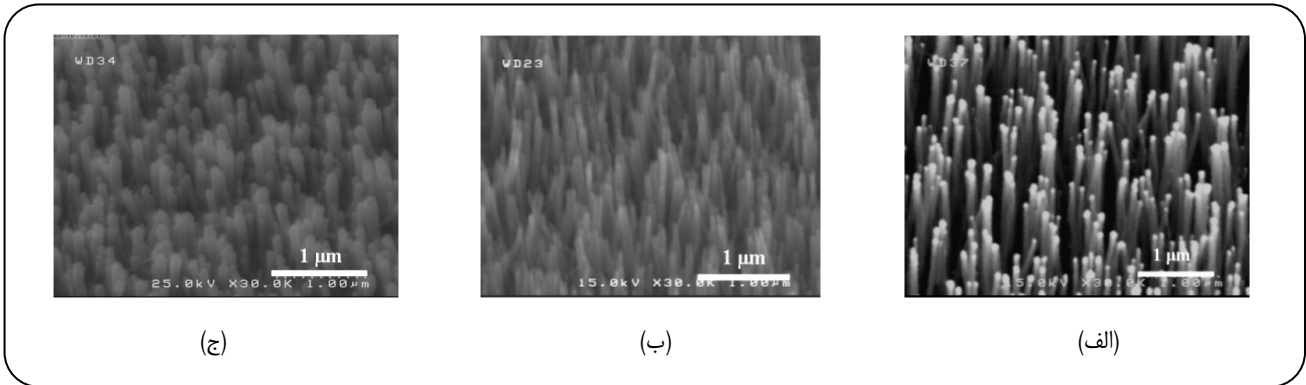
## مقدمه

حسگرهای زیستی گلوتامات به طور معمول با استفاده از دو آنزیم گلوتامات اکسیداز و گلوتامات دهیدروژناز ساخته می‌شوند. حسگر زیستی الکتروشیمیایی بر پایه آنزیم گلوتامات دهیدروژناز، بر اساس اکسایش NADH استوار است. اندازه‌گیری انتخاب‌پذیر

مقدار گلوتامات در بیماری‌هایی مثل پارکینسون و آلزایمر در بدن تغییر می‌کند [۱-۳]. بنابراین اندازه‌گیری این آمینو اسید در تشخیص این بیماری‌ها نقش مهمی بازی می‌کند. غلظت گلوتامات در فضای خارج سلولی در بازه‌ی ۴ تا ۳۵۰ میکرومولار است [۴، ۵].

\*عهده دار مکاتبات

+E-mail: shahrokhian@sharif.edu



شکل ۱- عکس SEM (الف) نانولوله های کربنی عمودی رشد داده شده (ب) نانولوله های کربنی عمودی بعد از حذف نیکل (ج) نانولوله های کربنی بعد از تثبیت آنزیم

موجود در نوک نانولوله‌ها آماده تثبیت کووالانسی آنزیم گلوتامات دهیدروژناز شد. برای ایجاد گروه‌های کربوکسیل بر روی نانولوله کربنی، الکتروود به مدت ۳۰ ثانیه با اعمال ۱/۵ ولت در محلول ۱ مولار سود قرار داده شد [۱۰]. سپس تثبیت آنزیم با استفاده از قرار دادن الکتروود به مدت ۲ ساعت در محلول EDC<sup>(۳)</sup> و sulfo-NHS<sup>(۴)</sup> و ۲ ساعت در محلول بافر شامل ۴ میلی گرم در میلی لیتر از آنزیم انجام شد. آزمایش‌های الکتروشیمیایی در یک سل تفلونی با استفاده از سامانه سه الکترودی الکتروود کار نانولوله‌های کربنی، الکتروود مرجع Ag/AgCl و الکتروود کمکی پلاتین در گاز نیتروژن انجام گرفت.

### نتیجه‌ها و بحث

شکل ۱- الف عکس SEM<sup>(۵)</sup> نانولوله‌های کربنی عمودی نشان می‌دهد. قطر میانگین نانولوله‌های کربنی بین ۷۰ تا ۱۰۰ نانومتر و طول میانگین آنها ۱ میکرومتر است. شکل ۱، SEM نانولوله‌های کربنی بعد از حذف نیکل روی سر نانولوله‌ها را نشان می‌دهد. شکل ۱- ج نانولوله‌های کربنی بعد از تثبیت آنزیم را نشان می‌دهد. همان‌گونه که دیده می‌شود، نانولوله‌ها همچنان حالت عمودی خود را حفظ کرده‌اند.

فعالیت حسگرهای زیستی آنزیمی به pH، دما و غلظت کوفکتور بستگی دارد. قبل از اندازه‌گیری غلظت‌های گوناگون گلوتامات باید ابتدا این شرایط بهینه شود. مقدارهای بهینه با استفاده از ولتامتری چرخه ای به صورت pH ۷، دمای ۴۲°C و غلظت ۲ میلی مولار کوفکتور NAD<sup>+</sup> به دست آمد.

گلوتامات زمانی می‌تواند انجام شود که حسگر زیستی بتواند NADH در ولتاژهای پایین اندازه‌گیری کند. روش‌های گوناگونی برای آسان‌تری انتقال الکترون در اکسایش NADH به کار برده شده است [۶]. یکی از اصلی‌ترین آنها استفاده از نانولوله‌های کربنی است. بیشتر آنها به صورت نامنظم و کامپوزیتی بر روی الکتروود قرار داده می‌شوند و نشان داده شده است که استفاده از آنها به تنهایی نمی‌تواند به اندازه کافی باعث کاهش اضافه ولتاژ اکسایش NADH شود [۷، ۸]. با این حال در این پژوهش با استفاده از آرایه نانولوله‌های کربنی عمودی، NADH در ولتاژهای پایین اندازه‌گیری شد و با استفاده از آن، غلظت‌های گوناگون گلوتامات اندازه‌گیری شد. نتیجه‌های به دست آمده بسیار بهتر از نتیجه‌های به دست آمده از میکرواحسگر زیستی بر پایه گلوتامات اکسیداز [۹] و الکتروود اصلاح شده توسط کامپوزیت نانولوله‌های کربنی تک دیواره/ تیونین [۳] بود.

### بخش تجربی

قبل از رشد نانولوله‌های کربنی عمودی، ویفر سیلیکن (۱۰۰) با استفاده از فسفر آلابیده<sup>(۱)</sup> شد. نانولوله‌های کربنی با استفاده از لایه کاتالیستی نیکل در دستگاه نشست بخار در پلاسما با استفاده از مخلوط گازی استیلن/هیدروژن در فشار ۳/۵ تور، دمای ۶۵۰°C و توان ۴ W/cm<sup>۲</sup> رشد داده شد. نیکل سر نانولوله‌ها با قرار دادن نمونه در محلول زداینده نیکل (۵:۱:۱ آب: سولفوریک اسید: نیتریک اسید) به مدت ۲۰ دقیقه از بین رفت و صفحات لبه<sup>(۲)</sup>

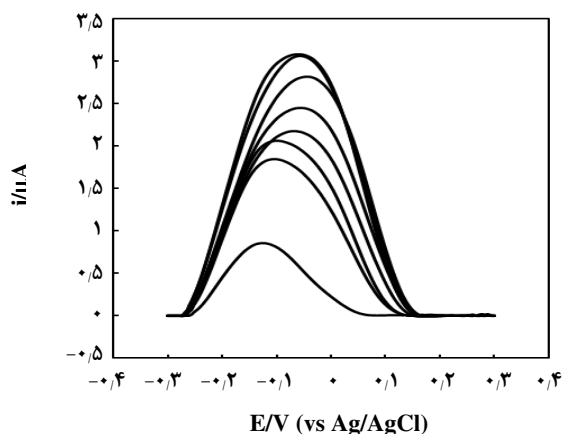
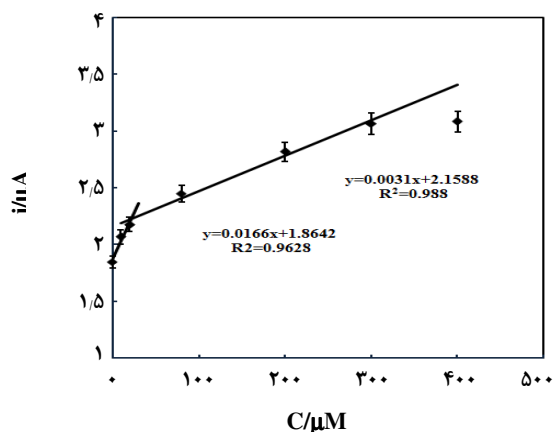
(۱) Dope

(۲) Edge

(۳) (1-(3-(dimethylamino)propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride

(۴) (N-hydroxysulfosuccinimide s-NHS)

(۵) Scanning electron microscope

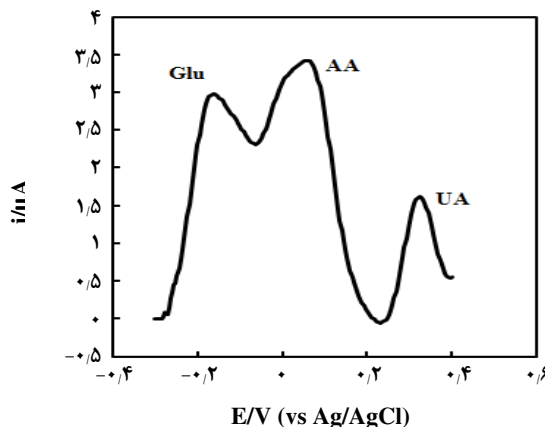


شکل ۲- ولتاموگرام پالسی تفاضلی (الف) بدون حضور واسطه در محلول ۰/۱ مولار بافر فسفات شامل ۲ میلی مولار  $\text{NAD}^+$  و ۰،۰۱، ۰،۱، ۰،۲، ۰،۴، ۰،۸، ۱،۰، ۲،۰، ۳،۰، ۴،۰، ۵،۰ میلی مولار گلوتامات. (ب) منحنی کالیبراسیون بدون حضور واسطه. اندازه پالس ۵۰ mV، پهنای پالس ۱۰ ms است.

شکل ۲- ب منحنی واسنجی نسبت به غلظت‌های گوناگون گلوتامات را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل مشخص است منحنی دارای دو ناحیه خطی است. برای محاسبه حساسیت حسگر زیستی باید اول سطح مؤثر الکتروود تخمین زده شود. برای این منظور از معادله رندلس - سویک<sup>(۱)</sup> استفاده می‌شود. برای استفاده از این معادله آزمایش‌های ولتامتری چرخه ای برای سرعت روبش‌های گوناگون در محلول ۵ میلی مولار  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  انجام شد و شیب جریان نسبت به سرعت روبش محاسبه شد. با استفاده از این معادله سطح مؤثر الکتروود  $0.173 \text{ cm}^2$  به دست آمد. با توجه به شیب منحنی واسنجی، حساسیت حسگر زیستی در در بازه‌ی ۰/۱-۲۰ میکرومولار  $0.976 \text{ mAm/Mcm}^2$  و در بازه‌ی ۲۰-۳۰۰ میکرومولار  $0.182 \text{ mAm/Mcm}^2$  با حد تشخیص ۵۷ نانومولار است.

اندازه‌گیری انتخاب پذیر گلوتامات یکی از چالش‌های مهم در ساخت حسگرهای زیستی گلوتامات است. برای بررسی انتخاب پذیری حسگر زیستی گلوتامات بر پایه نانولوله‌های کربنی عمودی، ولتاموگرام پالسی تفاضلی در محلول شامل ۲ میلی مولار  $\text{NAD}^+$  و غلظت ۰/۲ میلی مولار از هر کدام از مواد گلوتامات، آسکوربیک اسید و اوریک اسید به دست آمد (شکل ۳).

همان‌گونه که در شکل ۳ قابل دیدن است، سه پیک مجزا برای گلوتامات، آسکوربیک اسید و اوریک اسید در ولتاموگرام پالسی تفاضلی به ترتیب در  $-0.168$ ،  $0.068$  و  $0.324$  ولت به دست آمده است. چون پیک‌های ولتامتری به دست آمده



شکل ۳- ولتاموگرام پالسی تفاضلی در محلول ۰/۱ مولار بافر فسفات شامل ۲ میلی مولار  $\text{NAD}^+$  و ۰/۲ میلی مولار گلوتامات، آسکوربیک اسید و اوریک اسید.

سپس در این شرایط بهینه کارایی حسگر زیستی با استفاده از روش ولتامتری پالسی تفاضلی بررسی شد. اندازه‌گیری‌های DPV در بازه‌ی ولتاژی ۰/۳- تا ۰/۳+ در محلول بافر فسفات (pH=7) شامل ۲ میلی مولار  $\text{NAD}^+$  و غلظت‌های گوناگون ۱۰، ۲۰، ۸۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۰/۱ میکرومولار از گلوتامات انجام شد. شکل ۲ الف ولتاموگرام‌های DPV به ازای غلظت‌های گوناگون گلوتامات را نشان می‌دهد. همان‌گونه که دیده می‌شود پیک موجود در  $-0.068$  به غلظت گلوتامات وابسته است.

(۱) Rendles-sevcik

گلوتامات را اندازه‌گیری کند. استفاده نکردن از واسطه، مرحله‌های ساخت حسگر زیستی را ساده تر کرده همچنین از احتمال جدایش واسطه در حین استفاده از حسگر زیستی جلوگیری می‌شود که باعث می‌شود جواب‌های به دست آمده از تکرار پذیری بالایی برخوردار باشند.

به اندازه کافی از هم فاصله دارند، اندازه‌گیری انتخاب پذیر و هم زمان این مواد با حسگر زیستی بر پایه نانولوله‌های کربنی عمودی امکان‌پذیر است.

### نتیجه‌گیری

نتیجه‌های به دست آمده نشان داد که این حسگر زیستی بدون نیاز به واسطه می‌تواند با حساسیت بالا و انتخاب پذیر

### مراجع

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۶/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۱

- [1] Martin S.J., Grimwood P.D., Morris R.G.M., Synaptic Plasticity and Memory: An Evaluation of the Hypothesis, *Annu. Rev. Neurosci.*, **23**, p. 649 (2000).
- [2] Nedergaard M., Takano T., Hansen A., Beyond the Role of Glutamate as a Neurotransmitter, *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, p. 748 (2002).
- [3] Meng L., Wu P., Chen G., Cai C., Sun T., Yuan Z., Low Potential Detection of Glutamate Based on the Electrocatalytic Oxidation of NADH at Thionine/ Single-Walled Carbon Nanotubes Composite Modified Electrode, *Biosens. Bioelectron.*, **24**, p. 1751 (2009).
- [4] Benveniste H., Huttemeier P.C., Microdialysis: Theory and Application, *Prog. Neurobiol.*, **35**, p. 195 (1990).
- [5] Hu Y., Mitchell K.M., Albahadily F.N., Michaelis E.K., Wilson G.S., Direct Measurement of Glutamate Release in the Brain Using a Dual Enzyme-Based Electrochemical Sensor, *Brain Res.*, **659**, p. 117 (1994).
- [6] Gorton L., Dominguez E., Electrochemistry of NAD(P)+/NAD(P)H, in: G.S. Wilson (Ed.), "Encyclopedia of Electrochemistry (Bioelectrochemistry)", vol. 9, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 67–143 (2002).
- [7] Musameh M., Wang J., Merkoci A., Lin Y., Low-Potential Stable NADH Detection at Carbon-Nanotube-Modified Glassy Carbon Electrodes, *Electrochem. Commun.*, **4**, p. 743 (2002).
- [8] Wang J., Deo R.P., Poulin P., Mangey M., Carbon Nanotube Fiber Microelectrodes, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, p. 14706 (2003).
- [9] Schuvailo O.M., Soldatkin O.O., Lefebvre A., Cespuaglio R., Soldatkin A.P., Highly Selective Microbiosensors for in Vivo Measurement of Glucose, Lactate and Glutamate, *Anal. Chim. Acta.*, **573**, p. 110 (2006).
- [10] Arumugam P.U., Chen H., Siddiqui S., Weinrich J.A.P., Jejelowo A., Li J., Meyyappan M., Wafer-Scale Fabrication of Patterned Carbon Nanofibernanoelectrode Array: A route for Development of Multiplexed, Ultrasensitive Disposable Biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, **24**, p. 2818 (2009).