دانشگاه صنعتی امیرکبیر(پلی تکنیک ایران)
دانشکده مهندسی پزشکی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد
گرایش بیومواد

عنوان پایان نامه:

بررسی ساخت استریپ الکتروشیمیایی قند خون

نگارش:
سید مرتضی حائری حسینی

استاد راهنما:
دکتر فتح الله مضطرزاده

استاد مشاور:
دکتر محمد ربیعی

اسفند ۱۳۸۵

بسمه تعالی

شماره:

تاریخ :

معاونت پژوهشی
فرم پروژه تحصیلات تکمیلی 7

فرم اطلاعات پایان نامه
کارشناسی ارشد و دکترا

1-مشخصات دانشجو

نام و نام خانوادگی: سید مرتضی حائری حسینی دانشجوی شاد ☐ بورسیه ☐ معدل ☐

شماره دانشجویی : 83133104 دانشکده : مهندسی پزشکی رشته تحصیلی : بیومتریال

نام و نام خانوادگی استاد راهنما : دکتر فتح الله مضطرزاده

عنوان به فارسی : بررسی ساخت استریپ الکتروشیمیایی گلوکز

عنوان به انگلیسی : A study into fabrication of an electrochemical glucose test strip

نوع پروژه : کاربردی ☐ بنیادی ☐ توسعه ای ☐ نظری ☐

تاریخ شروع : مهرماه 1384 تاریخ خاتمه : اسفند 1385 تعداد واحد : 9

سازمان تأمین کننده اعتبار :

واژه های کلیدی به فارسی : بیوسنسور گلوکز، فری سیانید پتاسیم، الکترود لایه نازک، بیوسنسور الکتروشیمیایی

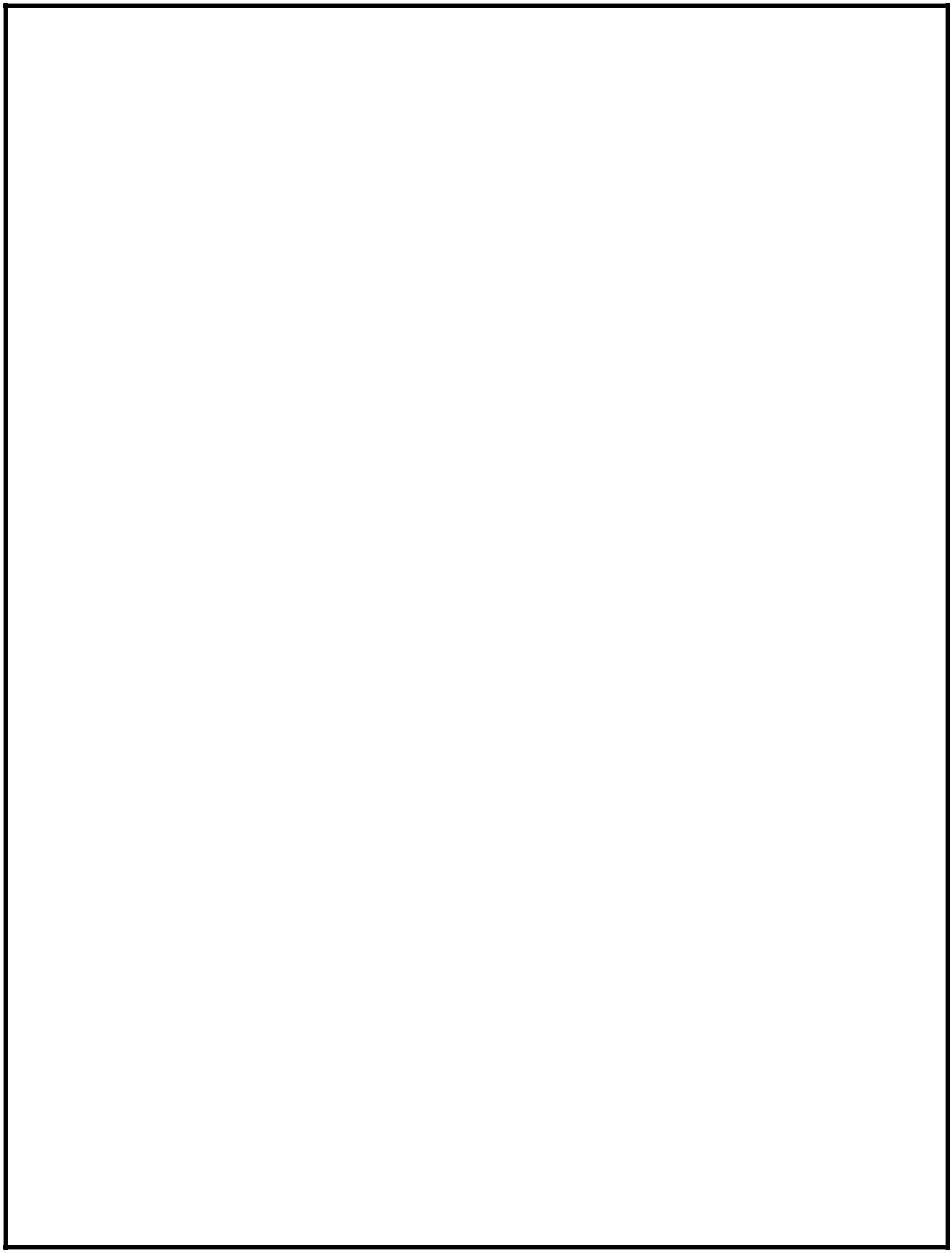
واژه های کلیدی به انگلیسی : glucose biosensor, potassium ferrycyanide, thin-film electrode, electrochemical biosensor

نظرها و پیشنهادها به منظور بهبود فعالیت های پژوهشی دانشگاه :

استاد راهنما : دکتر فتح الله مضطرزاده

دانشجو : سید مرتضی حائری حسینی

امضاء استاد راهنما : تاریخ :



به نام خدا

شماره: ۸۴/د/۱۰۵۰

تاریخ: ۸۵/۱۲/۲۰

برگ ارزیابی پایان‌نامه کارشناسی ارشد (اپکا۲)

نام و نام خانوادگی: سید مرتضی حائری حسینی — شماره دانشجویی: ۸۳۱۳۳۱۰۴

رشته و گرایش تحصیلی: مهندسی پزشکی– بیومواد — دانشکده: مهندسی پزشکی

عنوان پایان‌نامه: بررسی ساخت استریپ الکتروشیمیایی گلوکز

تاریخ تصویب: ۸۴/۸/۱۷ — تاریخ دفاع: ۸۵/۱۱/۱۷

هیات داوران	نام و نام خانوادگی	کد انفورماتیک	رتبه علمی	امتیاز	امضاء
استاد راهنمای اول	دکتر فتح الله مضطر زاده	۱۰۱۶۳	استاد		
استاد مشاور اول	دکتر محمد ربیعی	۱۰۲۷۸	استادیار		
داور داخلی	دکتر سید محمدعترتی خسروشاهی	۱۰۷۷۴	دانشیار		
داور خارجی	دکتر امیرکامران نیکو سخن	----	استادیار		
	میانگین نمرات هیئت داوران				

این قسمت توسط تحصیلات تکمیلی دانشکده تنظیم خواهد شد.

	شرح	نمره به عدد	نمره به حروف
A	میانگین نمرات هیئت داوران (بر مبنای ۲۰)	۱۹٫۵	نوزده و پنج
B	کسر نمره دیرکرد		—
C	تشویق بابت ارائه مقاله		—
D	نمره نهایی (D=A-B+C)	۱۹٫۵	نوزده و پنج

مدیر تحصیلات تکمیلی دانشکده:

امضاء و مهر دانشکده:

تأئید کارشناس:

مدیر کل تحصیلات تکمیلی:

امضاء و مهر:

فهرست جداول

جدول (۱-۱): سیستمهای اصلی مبدلهای مورد استفاده در زیست حسگرها
جدول (۲-۱) : اثرات آنزیمهای مختلف بر تغییر هدایت الکتریکی
جدول(۳-۱) : پارامترهای اپتیکی که مبنای عمل زیست حسگرهای نوری می باشند
جدول(۴-۱) : گرمای حاصل از واکنش آنزیم با سابستریت آن
جدول(۱-۲) : آمار مبتلایان به دیابت در جهان
جدول ۲-۲ : انواع حسگرغیرتهاجمی گلوکز و آدرس اینترنتی شرکتهای تولید کننده آنها
جدول(۱-۳) مواد اولیه جهت ساخت استریپ گلوکز
جدول(۲-۳) صورت تجهیزات مورد استفاده
جدول (۳-۳): مقادیر وزنی لازم برای ساخت محلول بافر فسفات
جدول(۴-۳) آماده سازی نمونه ها برای سنجش گلوکز به روش رنگ سنجی
جدول(۱-۴): مقایسه نتایج سنجش گلوکز به دو روش الکتروشیمیایی و رنگ سنجی

فهرست اشکال

ارتباط علوم مختلف در توسعه زیست حسگرها:شکل (۱-۱)
شکل(۲-۱) : اسیدهای آمینه استاندارد
شکل(۳-۱) : سطوح مختلف ساختاری پروتئینها
شکل (۴-۱) نمای شماتیک یک آنتی بادی
شکل(۵-۱) : نمایی از عملکرد یک پروب DNA
شکل(۶-۱) : منحنی Lineweaver-Burk برای حالتهای مختلف با حضور و بدون حضور بازدارنده
شکل(۷-۱) : شماتیک تکنیکهای اصلی تثبیت
شکل (۸-۱): ساختار کلی یک بیوحسگر
شکل(۹-۱) : الکترود کلارک
شکل(۱۰-۱) : نمایی از یک ISFETو MOSFET
شکل(۱۱-۱): منحنی پتانسیل لایه مضاعف مجاور سطح الکترود
شکل(۱۲-۱) : منحنی پتانسیل اعمالی و جریان اندازه گیری شده در ولتامتری چرخه ای
شکل (۱۳-۱): طرحی از یک زیست حسگر حرارتی
شکل(۱-۲) : طرح کلی یک زیست حسگر نسل اول
شکل(۲-۲): ترتیب اتفاقاتی که در یک زیست حسگر نسل دوم (با حضور واسطه) رخ می دهد
شکل (۳-۲): نمونه ای از یک استریپ الکتروشیمیایی (راست) و بخش الکترونیک آن
شکل(۴-۲): لنست
شکل (۵-۲): الکترود گلوکز که داخل بافت زیر پوستی گردیده است
شکل(۶-۲): Glucowatch
شکل(۷-۲) : نحوه عمل Glucowatch
: ایجاد سوراخهای میکرونی درون اپیدرم توسط پالس کوتاه لیزر)۸-۲(شکل
شکل(۹-۲) : حسگر گلوکز قابل کاشت در بدن MiniMed^{TM}
شکل(۱۰-۲): شماتیک مکانیزم عمل روش میکرودیالیز
شکل(۱-۳): طرح شماتیک استریپ ساخته شده

شکل (۲-۳): دستگاه پوشش دهی به روش تبخیر فیزیکی (راست) و شکل بوته و نحوه قرار گرفتن آن (چپ)
شکل (۳-۳): دستگاه تابش دهی فرا بنفش در لیتوگرافی نوری
شکل(۴-۳): نمونه ساخته شده الکترود لایه نازک
شکل (۵-۳): شماتیک پروسه لیتوگرافی نوری
شکل(۶-۳): طرح شماتیک استریپ ساخته شده با فضای کاپیلاری
شکل(۷-۳): مدار ساده یک پتانسیو استات
شکل(۸-۳): دستگاه پتانسیو استاتAutolab
شکل(۱-۴): مدل پیشنهادی برای الکترود آنزیم دار
شکل(۲-۴): استریپ الکتروشیمیایی با دو الکترود روبروی هم

فهرست نمودارها

نمودار(۱-۴) مقایسه شکل منحنی ولتامتری چرخه ای فری سیانید پتاسیم بر روی a) الکترود بالک طلا و b) الکترود لایه نازک طلا
نمودار(۲-۴) اثر سرعت بر شکل منحنی ولتامتری چرخه ای فری سیانید پتاسیم
نمودار(۳-۴) اثر افزودن آنزیم بر شکل منحنی ولتامتری چرخه ای فری سیانید پتاسیم
نمودار(۴-۴) شیفت پیک جریان منحنی ولتامتری چرخه ای فری سیانید پتاسیم در سیستم دو و سه الکترودی
نمودار(۵-۴) غلظت بهینه فری سیانید پتاسیم در ترکیب شیمیایی تشخیص گلوکز
نمودار(۶-۴) مقایسه جریانهای ناشی از نمونه حاوی a) گلوکز ۵ میلی مولار و b) گلوکز ۵ میلی مولار به علاوه اسید آسکوربیک ۱ میلی مولار
نمودار(۷-۴) منحنی کالیبراسیون بدون فضای کاپیلاری
نمودار(۸-۴) منحنی کالیبراسیون پس از ایجاد فضای کاپیلاری
نمودار(۹-۴) منحنی کرونوآمپرومتری نمونه سرم شماره ۱
نمودار(۱۰-۴) میزان تطابق منحنی جریان-زمان داده های نظری وعملی
نمودار(۱۱-۴) تکرار پذیری داده ها و مقدار خطا
نمودار(۱۲-۴) زمان پاسخ حسگر (محلول گلوکز ۶ میلی مولار)

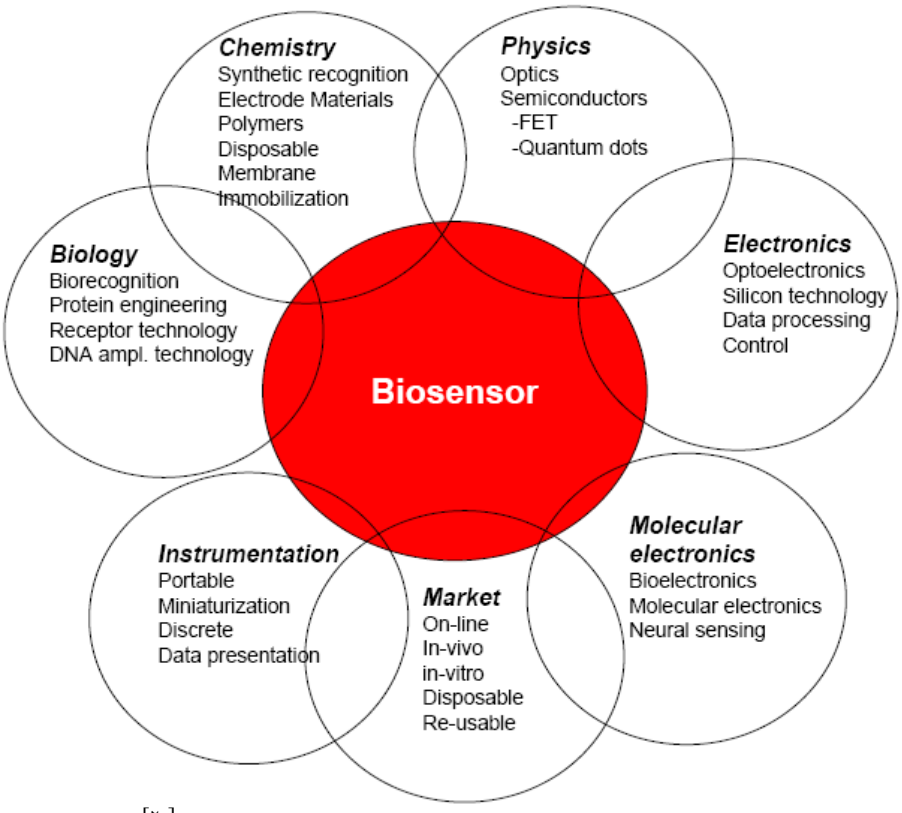
چکیده:

دیابت از مهمترین عوامل تهدیدکننده سلامتی ، معلولیت و مرگ در جهان می‌باشد. کنترل منظم قند خون نقش بسزایی در کاهش عوارض ناشی از این بیماری در میان مبتلایان به دیابت دارد. دستگاه‌های خانگی موجود تست قند خون، به علت سهولت استفاده، قیمت مناسب و سرعت کافی گزینه مناسب و عملی جهت کنترل مداوم قند خون برای بیماران دیابتی به شمار می‌آید. یک کیت تشخیص گلوکز از یک بخش الکترونیک و تعدادی استریپ یکبار مصرف تشکیل شده است. جهت انجام هر تست مقدار بسیار کمی خون برروی استریپ قرار داده می‌شود و با اتصال استریپ به قسمت الکترونیک، میزان قند خون برروی صفحه نمایش دستگاه پس از مدت کوتاهی نشان داده می‌شود. در این تحقیق، ساخت استریپ الکتروشیمیایی آمپرومتریک گلوکز با دو الکترود لایه نازک طلا بررسی شده است. حسگر از مزیت معرفی نمونه از طریق نیروی مویینگی، برخوردار می‌باشد. الکترودها به طریق تبخیر فیزیکی و سپس با انجام فرآیند لیتوگرافی نوری بر روی زیرپایه ای از جنس پلی اتیلن ترفتالات ایجاد گردیدند. معرف حسگر حاوی گلوگز اکسیداز، فری سیانید پتاسیم هیدروکسی اتیل سلولز بوده که برروی قسمتی از دو الکترود قرار می‌گیرد. فضای میکرولیتری با چسباندن فاصله انداز و قرار دادن یک روکش پلیمری ایجاد گردید. یک قطره از نمونه حاوی گلوکز به دلیل وجود نیروی مکش مویینگی به درون فضای مذکور راه یافته و معرف را به صورت محلول در می‌آورد. با اعمال ولتاژ ۳۰۰ میلی ولت به دو سر الکترودها جریان الکتریکی متناسب با غلظت گلوکز در محلول ایجاد می‌گردد. بررسی کارایی واسطه فری سیانید پتاسیم برروی الکترود لایه نازک طلا و تاثیر سرعت اسکن و افزودن آنزیم بر شکل منحنی مربوطه با روش ولتامتری چرخه‌ای انجام گردید. همچنین پارامترهای دیگری چون محدوده خطی اندازه گیری، زمان پاسخ، غلظت بهینه واسطه، آنالیز سرم، تکرار پذیری و پایداری حسگر ساخته شده با استفاده از روش کرونو آمپرومتری بررسی گردید. محدوده خطی اندازه گیری گلوکز بین ۳۰ و ۳۵۰ میلی گرم بر دسی لیتر بوده و غلظت ۱ میلی مولار اسید آسکوربیک اثر تداخلی در عملکرد حسگر ندارد. حسگر از دقت مناسبی در سنجش گلوکز در مقایسه با روش رنگ سنجی برخوردار می باشد. غلظت بهینه واسطه حدود ۵ میلی گرم بر میلی لیتر برآورد شده و زمان پاسخ و میزان تکرارپذیری و پایداری در حد قابل قبولی می‌باشد.

۱-۱) مقدمه

زیست حسگرها در واقع گروهی از حسگرهای شیمیایی هستند که برای کاربردهای بسیار متنوع در زمینه های مختلف از جمله پزشکی ، دامپزشکی، کشاورزی، صنایع غذایی، اندازه گیری آلودگی محیط زیست، شناسایی گازهای سمی، تشخیص میکروبها، قارچها و حتی برای کاربردهای نظامی طراحی و ساخته می شوند.[۱]

با توجه به گستردگی دامنهٔ کاربرد زیست حسگرها به تبع آن علوم مختلفی که در تکنولوژی ساخت آنها نقش دارند وسیع و گسترده است. شکل ش‌ماره (۱-۱) بطور شماتیک علوم مختلفی را که می توانند در تهیه و ساخت زیست حسگرها نقش داشته باشند نشان می دهد.



شکل (۱-۱) ارتباط علوم مختلف در توسعه زیست حسگرها[۲]

یک زیست حسگر از سه قسمت اصلی تشکیل شده است که عبارتند از:

۱- تشخیص دهنده بیولوژیک
۲- مبدل
۳- پردازنده سیگنال

آنچه که زیست حسگرها را از دیگر حسگرها متمایز می نماید وجود یک جزء تشخیص دهنده بیولوژیک در ساختار آنهاست. این جزء بیولوژیک عمدتا از بیومولکولهایی مانند آنزیمها، آنتی بادی ها، نکلوئید اسیدها و حتی میکروارگانیزمها می باشد. اهمیت جزء بیولوژیک در عملکرد اختصاصی آن نسبت به سابستریت خاص است که به صورت گزینشی و انتخابی واکنش می دهد. بدینوسیله از اثر تداخلی مواد دیگرکه موجب عدم کارایی بسیاری از روشهای اندازه گیری است جلوگیری می شود. نظر به اهمیت بیومولکولها در ساختار زیست حسگرها در این فصل ابتدا به معرفی انواع بیومولکولها (به طور ویژه آنزیمها) و روش تثبیت آنها و سپس انواع مبدلهای معمول با تاکید بیشتر بر مبدلهای الکتروشیمیایی پرداخته می شود.

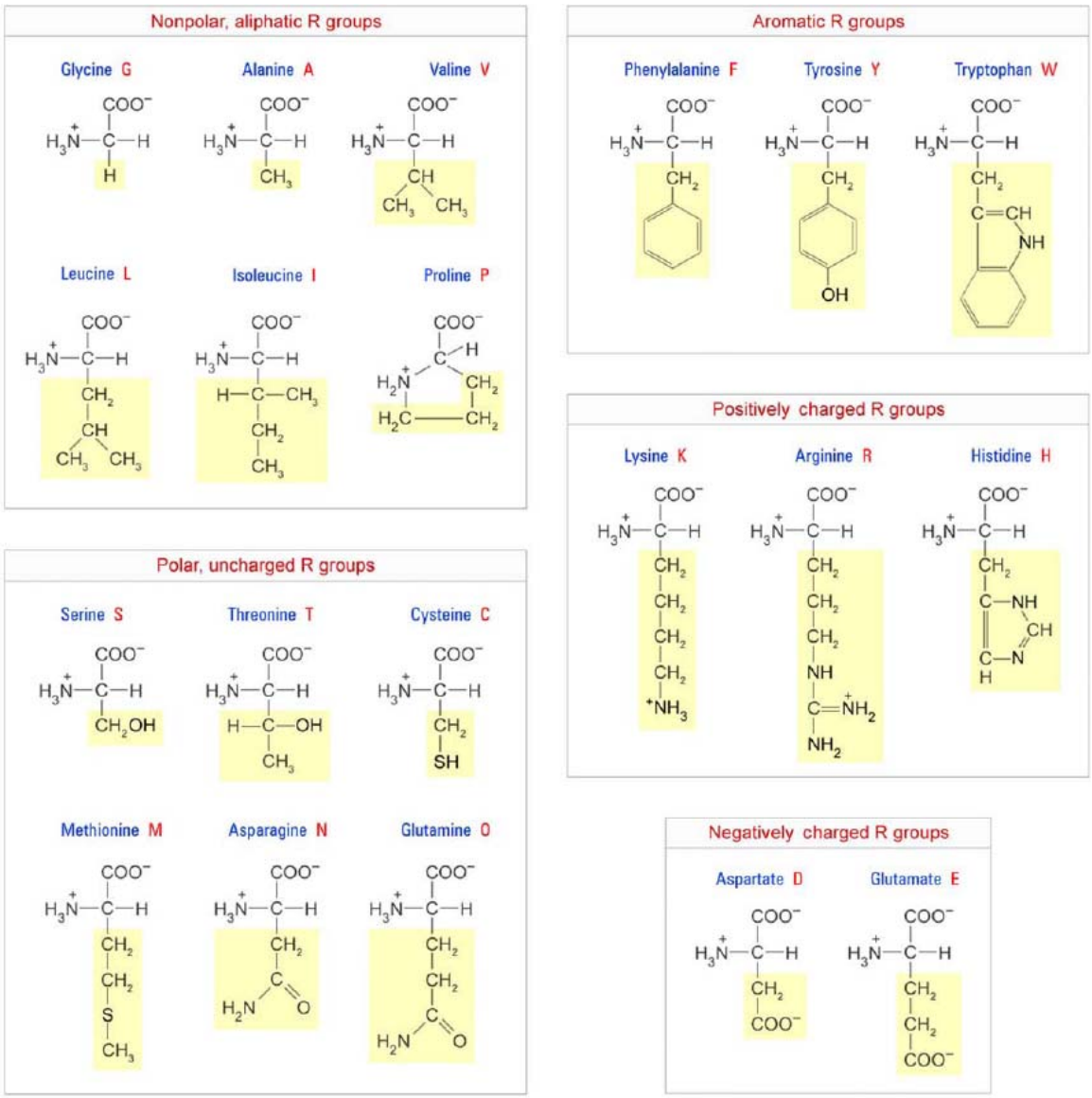
۲-۱) بیومولکولها[۳]

اغلب اجزاء تشکیل دهنده ارگانیزمهای زنده، ترکیبات آلی کربن دار می باشند که بسیاری از آنها حاوی نیتروژن نیز هستند. هرچند که هر گونه زنده، شامل ترکیبی منحصر به فرد از این بیومولکولهاست می توان تعداد محدودی واحد سازنده با ساختار مشترک را در همه آنها شناسایی کرد.

۲-۲-۱) پروتئینها و آنزیمها

پروتئینها زنجیره های اسیدهای آمینه هستند که توسط باندهای پپتیدی در یک ترتیب خطی که توسط DNA مشخص می شود به هم متصل شده اند. تمامی ارگانیزمها حداکثر از ۲۰ نوع اسید آمینه برای ساخت پروتئین استفاده می کنند. به این ۲۰ نوع اسید آمینه اغلب اسیدهای آمینه استاندارد گفته می شود (شکل ۲-۱). علیرغم تعداد محدود انواع اسیدهای آمینه ، گوناگونی در ترتیب قرار گیری آنها در کنار یکدیگر و نیز تعداد اسیدهای آمینه موجود در هر پروتئین امکان ساخت تعداد بی شماری از پروتئینها را فراهم می سازد. به طور کلی آنزیمها در چهار سطح ساختاری بررسی می شوند.
(شکل۳-۱)

تمامی اسید های آمینه دارای دو گروه فعال می باشند؛ گروه α آمینوبا مقدار pK_a حدود ۱۰ و گروه α کربوکسیل با pK_a بین ۲ تا ۳ . تفاوت اسید های آمینه در نوع زنجیره های جانبی آنهاست.

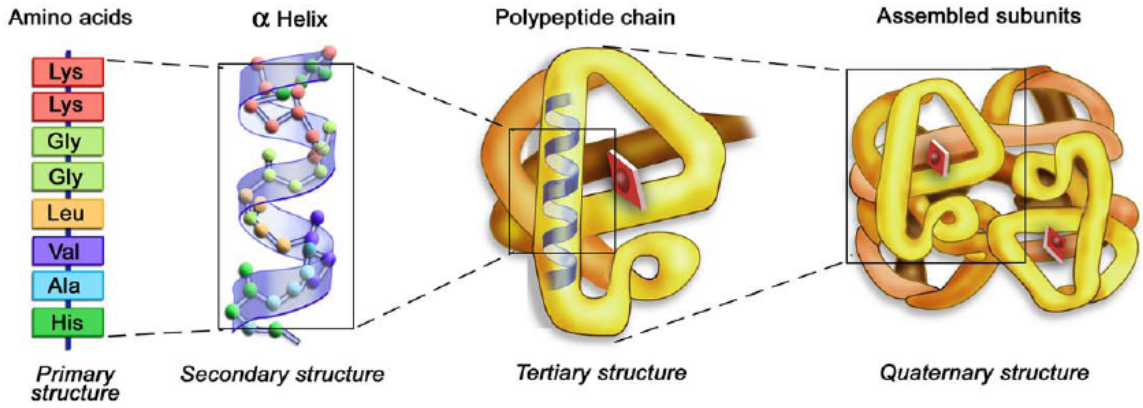


شکل(۲-۱) : اسیدهای آمینه استاندارد[۳]

یکی از مهمترین عملکرد پروتئینها، عمل کاتالیز کردن واکنشهای شیمیایی یا به عبارتی دیگر نقش آنزیمی آنهاست. این آنزیمها که به ویژه در ساخت زیست حسگرها مهم می باشند سرعت انجام واکنشهای بیولوژیک را افزایش داده و زمان رسیدن به تعادل شیمیایی را به شدت کاهش می دهند. اثرآنزیمها در مواردی به حدی است که بدون حضور آنها سرعت انجام یک واکنش تقریبا صفر است.

وجود سابستریت خاص برای هر آنزیم یا به عبارت دیگر اتصال انتخابی هر آنزیم به سابستریت مخصوص به آن در ساخت زیست حسگرهای مبتنی بر آنزیمها به کار گرفته می شود. پیوند غیر کووالانت آنزیم–سابستریت در حالت گذر، مقدار انرژی فعالسازی واکنش را پایین آورده و آنرا کاتالیز می کند. گاهی اوقات محل اتصال آنزیم به سابستریت مادامیکه توسط مولکول ثانویه ای اصلاح نگردد فاقد عملکرد کاتالیستی است. این مولکولهای اصلاح کننده که کوآنزیم(coenzyme) نام دارند غیر پپتیدی هستند.

خود آنزیم نیز می تواند جزء غیر آمینواسیدی داشته باشد که بستگی به عملکرد آنزیم دارد. به عنوان مثال یون آهن در هموگلوبین خون را می توان نام برد که نقش اکسیژن رسانی دارد. از اینرو می توان هرآنزیم را به دو بخش پروتئینی و غیر پروتئینی تقسیم نمود.



شکل(۳-۱) : سطوح مختلف ساختاری پروتئینها[۳]

آنزیمهابر اساس عملکردشان دسته بندی می شوند. به بیان دیگر، بسته به ماهیت واکنش شیمیایی که کاتالیز می کنند. آنزیمها یی که در زیست حسگرها به کار می روند بسته به عملکردشان به ۶ گروه زیر

تقسیم می گردند:

Oxide-reductases که نقش انتقال دهنده الکترون برای اکسیداسیون یا احیاء گروههایی مانند: CH-OH ، C=O ، $CH=NH_2$ ، $CH-NH_2$ ، -CH-NH به همراه کوآنزیمهایی مانند NADH و NADPH را دارند.

Transferases که گروههایی مانند آلدئید و کتون، گلایکوسیل ، فسفاتها و گروههای سولفور دار را منتقل می کنند.

Hydrolases که استرها، آنیدریدها، فسفاتها و گروههای سولفور دار را هیدرولیز می کنند.

Lyases که تعداد پیوندهای دو گانه زیر را افزایش می دهند:

C=N، C=O، C=C

Isomerases که ایزومرهای نوری زیر را ایزومره می کنند:

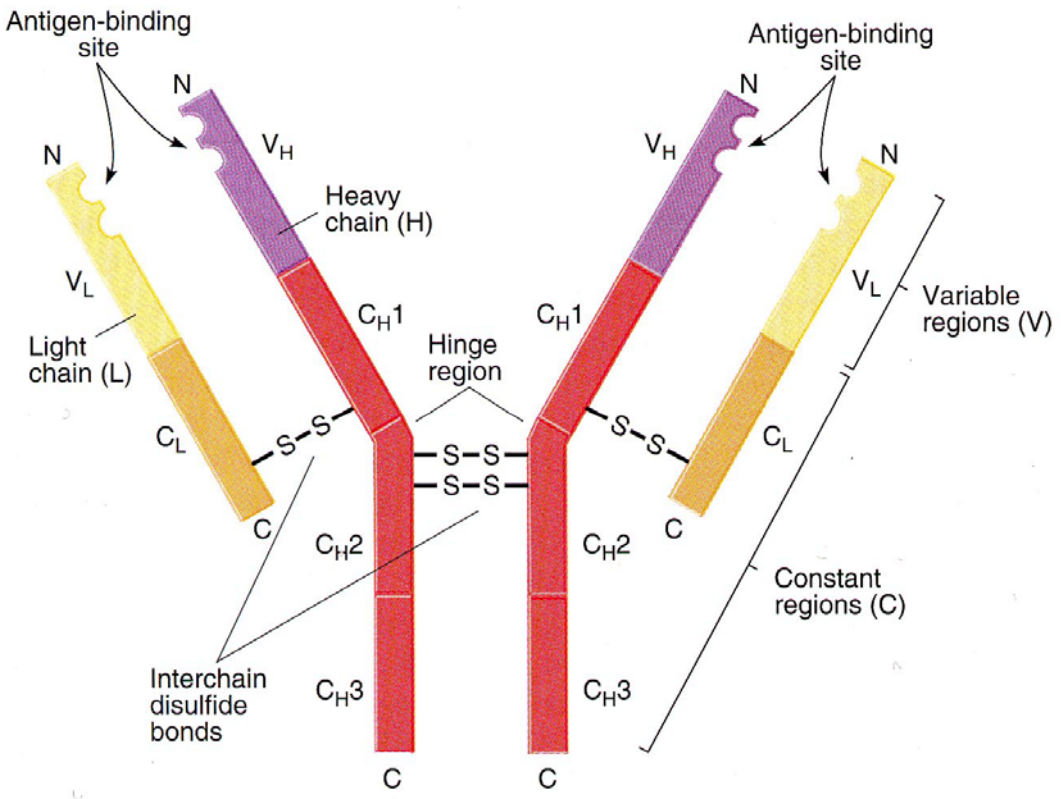
C-C، C-N، C-S ، C-O

۳-۲-۱) آنتی بادی

آنتی بادیها، پروتئینهای محلول با وزن مولکولی زیاد هستند که توسط ارگانیزمها در پاسخ به مواد خارجی مانند آنتی ژن تولید می گردند و با ترکیب با آنها تشکیل کمپلکس آنتی بادی- آنتی ژن می دهند. هر آنتی بادی از دو زنجیره پپتیدی سبک و دو زنجیره پپتیدی سنگین تشکیل شده که با پیوندهای دی سولفید به هم متصل شده اند. مولکول آنتی بادی به شکل Y می باشد که در قسمت بالای آن دو محل برای اتصال به آنتی ژن وجود دارد. (شکل ۴-۱)

مدل پیشنهادی اتصال آنتی بادی و آنتی ژن، قفل و کلید می باشد . اتصال، از نوع نیروهای غیر کووالانت نسبتا ضعیف مانند پیوند هیدروژنی، نیروهای واندر والس یا آب گریز و برهمکنشهای یونی می باشد. ثابت بیان کننده قدرت پیوند، k ، برابر است با معکوس غلظت آنتی ژن آزاد لازم جهت پر کردن نیمی از محلهای اتصال آنتی ژن در یک مولکول آنتی بادی.

هرچند که اتصال آنتی بادی و آنتی ژن تا حد زیادی گزینشی است به این معنا که هر آنتی ژن توسط نوع خاصی ازآنتی بادی جذب می گردد اندازه گیری مستقیم این برهمکنش به سختی امکان پذیر می باشد. از اینروست که وقتی جزء بیولوژیک حسگر، آنتی بادی و مولکول آنالیت، آنتی ژن می باشد از آنزیم استفاده می شود. بدین ترتیب که مقداری مشخص از آنتی ژنی که با آنزیم لیبل گذاری شده به غلظت نامعلومی از آنتی ژن اضافه می گردد. هنگامی که این مخلوط با آنتی ژن واکنش می کند آنتی ژنهای علامت گذاری شده با آنتی ژنهای بدون علامت برای اتصال به آنتی بادی با هم رقابت می کنند. هر قدر که نمونه نامعلوم حاوی غلظت بیشتری از آنتی ژن باشد درصد کمپلکسهای تشکیل شده از آنتی بادی و آنتی ژن آنزیم دار کمتر خواهد بود. پس از حذف آنتی ژن غیر متصل یا آزاد در نمونه، مقدار آنتی ژن علامتگذاری شده با آنزیم از طریق یک واکنش آنزیمی تعیین می گردد. آنزیمهای متداول جهت علامتگذاری، horseradish peroxidase و فسفاتاز قلیایی می باشند. همچنین از اوره و دی آمینها نیز استفاده شده است.



شکل (۴-۱) نمای شماتیک یک آنتی بادی

بر خلاف آنزیمها، آنتی بادی ها اغلب به عنوان کاتالیست عمل نمی کنند. کار آنها چسبیدن به آنتی ژن و حذف آن از سیستم است. اگر آنتی ژن دارای چند جایگاه اتصال باشد در این صورت زنجیره ای از کمپلکسهای آنتی بادی- آنتی ژن تشکیل می شود که به سرعت رسوب می دهند.

۴-۲-۱) گیرنده ها (Receptors)

گیرنده های بیولوژیک مولکولهایی هستند که میل ترکیبی خاص با هورمونها، آنتی بادیها، آنزیمها و ترکیبات فعال بیولوژیک دیگر دارند. اغلب این گیرنده ها متصل به غشاء سلول می باشند. برهمکنش بین لیگاند و گیرنده، مولکولهای داخل سلولی را تحت تاثیر قرار می دهد و موجب وقوع واکنشهای متعددی می گردد. شناخته شده ترین گیرنده ها، گیرنده های هورمونی هستند. بسیاری از هورمونهایی که در خون رها می شوند مثلا انسولین، آدرنالین و .. به درون غشاء نفوذ نمی کنند بلکه با گیرنده های مخصوص خود که بر روی سطح سلول قرار دارند واکنش می دهند. تعداد این گیرنده ها بر روی غشاء سلول بسیار زیاد می باشد. خود گیرنده ها معمولا در غشاء نفوذ کرده و در داخل سلول با یک سیستم

آنزیمی مرتبطند. اتصال هورمون به گیرنده و تغییر ساختار فضایی آن می تواند موجب فعال شدن آنزیمی در داخل سلول گردد.
علاوه بر گیرنده های هورمونی، گیرنده های چشایی و بویایی از نمونه های فرایند تشخیص بیولوژیک هستند.حدود ۲۰ تا ۳۰ بوی اصلی وجود دارد. پس از اینکه یک ماده بو دار به گیرنده خاص خود متصل شد تغییراتی در شکل فضایی گیرنده به وجود می آورد که منجر به دپلاریزاسیون بخشی از عصب غشاء سلولی گشته و ایجاد پتانسیل عمل می نماید.

۵-۲-۱) نوکلئیک اسیدها

بیماریهای ژنتیک معضلی بین المللی به شمار می روند. نزدیک به یک سوم کودکانی که در بخش اطفال بستری می شوند دچار نوعی بیماری ژنتیک می باشند. اگر جهشهای ژنی که سبب بروز یک بیماری خاص می گردند شناخته شده باشند، وجود نقص ژنتیکی با به بکار گیری الیگونوکلئوتید مربوطه به عنوان پروب DNA [۴] قابل شناسایی و تشخیص می باشد (شکل ۵-۱). پروبهای DNA هم به صورت کوتاه و هم بلند مورد استفاده قرار می گیرند. در صورتیکه از پروب بلند استفاده شود، پروب DNA با وارد کردن ترتیب هدف به درون یک وکتور مناسب مانند پلاسمید (plasmid) و کلونینگ (cloning) ایجاد می شود. بدین ترتیب قطعه مورد نظر تکثیر می گردد و پروب را ایجاد می کند و پس از آن با یک گروه گیرنده مانند لیبل رادیواکتیو یا آنزیم علامتگذاری می شود.

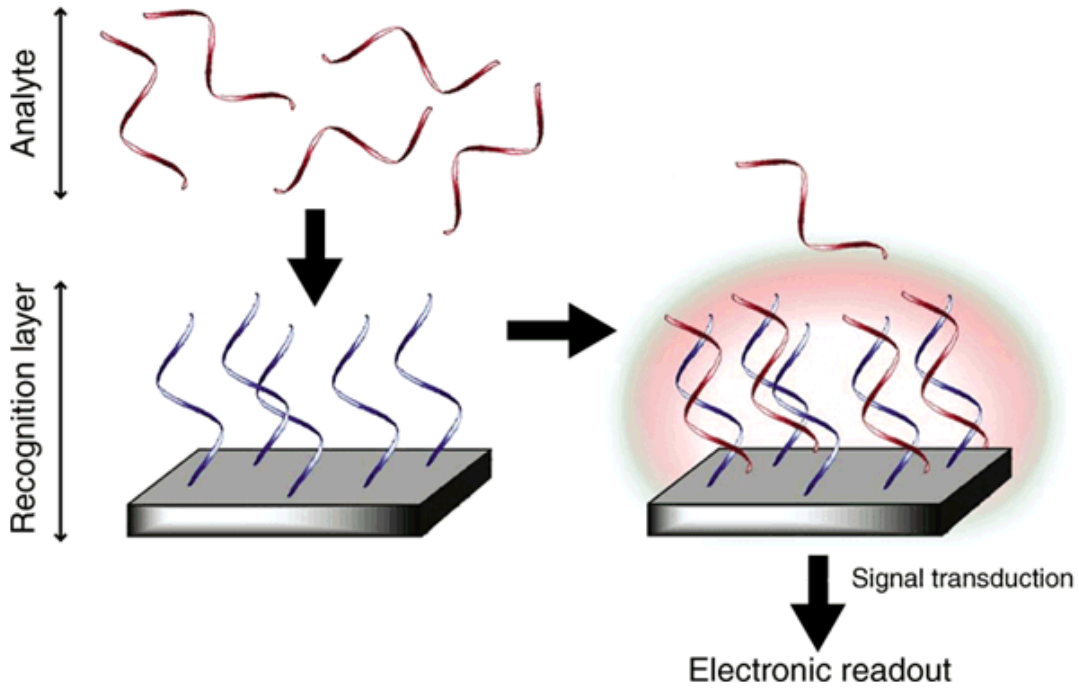
۳-۱) کینتیک آنزیمها

مدلی که اغلب برای بررسی کینتیک آنزیمها استفاده می گردد موسوم به مدل Michaleis- Menten می باشد.

$$E + S \leftrightarrow ES \xrightarrow{k_3} E + P \qquad (۱-۱)$$

طبق این مدل آنزیم (E) با سابستریت (S)ترکیب شده و تشکیل کمپلکس(ES) می دهد. کمپلکس حاصل یا مجددا به E+S تجزیه گشته و یا اینکه تبدیل به محصول (P) و آنزیم می گردد. ثوابت سرعت k_3,k_2,k_1 بیانگر سرعت مربوط به هر مرحله از فرایند می باشد. فرض بر این است که سرعت واکنش برگشت یعنی تبدیل E+P به کمپلکسEP قابل صرفنظر کردن است. مطالعه و بررسی خواص بسیاری از آنزیمها نشان می دهد که سرعت اولیه واکنش در غلظتهای کم سابستریت متناسب با [S] می

باشد در حالیکه هنگامی که غلظت سابستریت بالاست سرعت به مقدار ماکزیمم نزدیک می گردد و مستقل از [S] می شود. به این سرعت ماکزیمم V_{max} گفته می شود و واحد آن $\mu molmin^{-1}$ است.



شکل(۶-۱) : نمایی از عملکرد یک پروب DNA

Michaleis و Menten معادله زیر را برای توصیف ریاضی مشاهدات فوق پیشنهاد کردند:

$$V_0 = \frac{V_{max}.[S]}{k_m + [S]} \qquad (۱-۲)$$

این معادله منحنی سهمی برای V_0 نسبت به [S] ترسیم می نماید.

در این معادله ثابت جدید k_m که ثابت Michaleis نام دارد به صورت $k_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$ تعریف شده است.

k_m معیاری از میزان پایداری کمپلکس ES ارائه می کند. زیرا همین طور که مشاهده می شود برابر با نسبت جمع سرعتهای تجزیه ES به سرعت تشکیل آن می باشد.برای بسیاری از آنزیمها k_2 بسیار

بزرگتر از k_3 می باشد و به این دلیل، k_m تبدیل به معیاری از میزان تمایل آنزیم به سابستریت آن می گردد.

اگر k_m بزرگ باشد، نشان دهنده پیوند ضعیف سابستریت با آنزیم است. بر عکس، اگر k_m کوچک باشد پیوند بین سابستریت و آنزیم قوی می باشد. مقدار k_m را می توان به طور تجربی حساب کرد. با توجه به رابطه مشاهده می شود که k_m برابر با غلظتی از سابستریت است که به ازای آن سرعت، نصف V_{max} باشد.

به عبارت دیگر با اندازه گیری غلظت سابستریت وقتی سرعت واکنش نصف V_{max} گردیده مقدارk_m به دست می آید.

۲-۳-۱) منحنی Lineweaver-Burk

از آنجاییکه به V_{max} تنها در غلظت بی نهایت سابستریت می رسیم، نمی توان از منحنی جهت تخمین V_{max} و نتیجتا k_m استفاده نمود. با اینحال می توان V_{max} و k_m را به شکل آزمایشی با اندازه گیری V_0 در غلظتهای مختلف سابستریت تعیین نمود. سپس یک منحنی که هر دو محور آن نسبتهای عکس هستند ($\frac{1}{V_0}$ و $\frac{1}{[S]}$) را رسم نمود. شکل این منحنی از معادله Michaleis- Menten به دست می آید:

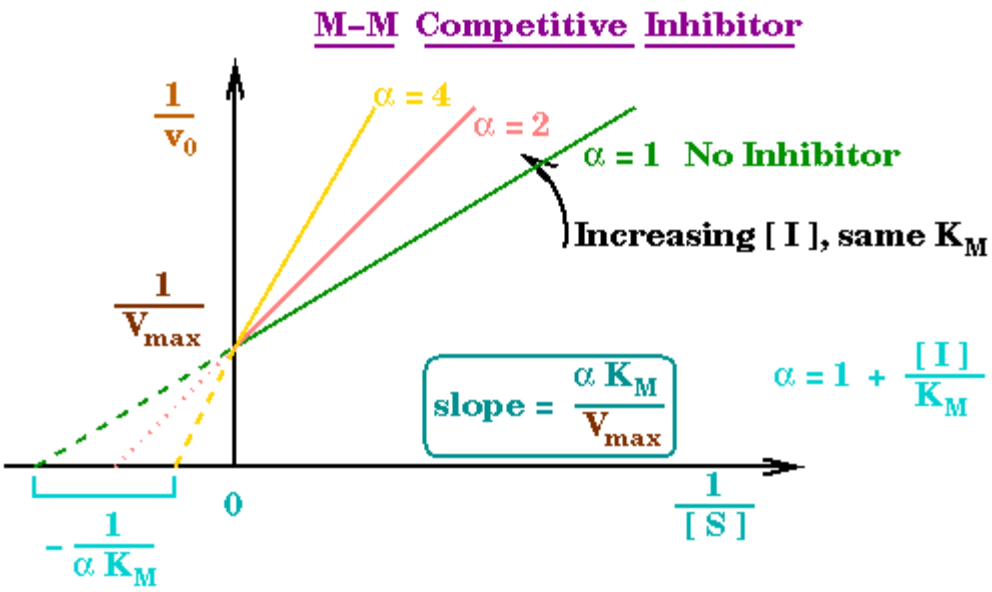
$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{k_m}{V_{\max}} . \frac{1}{[S]} \qquad (۱-۳)$$

که خطی راست می باشد و محل تقاطع آن با محورy ها، برابر $\frac{1}{V_{\max}}$ و با محور x ها، برابر $\frac{-1}{k_m}$ می باشد (شکل ۶-۱). این منحنی همچنین روش مناسبی جهت تعیین چگونگی چسبیدن یک بازدارنده (inhibitor) به آنزیم فراهم می کند. هر چند مدل Michaleis- Menten رفتار بسیاری از آنزیمها را به درستی توصیف می نماید، برخی آنزیمها با آن تطبیق نمی کنند. این آنزیمها مانند آسپارات ترنسکاربامولاز (ATCase) به آنزیمهای آلوستریک معروفند.

۳-۳-۱) بازدارندگی آنزیم (Enzyme inhibition)

انواع مختلفی از مولکولها هستند که در فعالیت یک آنزیم مداخله می کنند. هر مولکولی که به طور مستقیم بر فعالیت یک آنزیم اثر گذاشته و سرعت کاتالیزگری آنرا کاهش دهد بازدارنده خوانده می

شود. برخی بازدارنده ها ی آنزیمی، متابولیتهای سلولی معمول می باشند که از فعالیت یک آنزیم خاص در نتیجه کنترل متابولیک یک فرایند می کاهند. انواع دیگر بازدارنده ها می توانند مواد خارجی مانند داروها یا سموم باشند که به ترتیب اثر بازدارندگی درمانی یا مرگبار دارند.



شکل(۶-۱) : منحنی Lineweaver-Burk برای حالتهای مختلف با حضور و بدون حضور بازدارنده[۳]

۴-۱) روشهای تثبیت بیوکاتالیست

روشهای تثبیت در یک تقسیم بندی کلی به پنج دسته زیر تقسیم می گردند[۵-۱۳] (شکل ۷-۱) :

۱- جذب سطحی بر روی سطح جامد
۲- کپسوله کردن
۳- ایجاد اتصالات عرضی
۴- به دام انداختن
۵- ایجاد پیوند کووالانت به سطح فعال شده

۲-۴-۱) جذب سطحی بر روی جامد (Physical adsorption)

جذب سطحی آنزیمها در ساخت انواع زیست حسگرها انجام گرفته است. آنزیمها به طور کلی بر روی سطح فلزات، اکسیدهای فلزی، کربن و شیشه جذب می شوند. مزیت این روش، سادگی پروسه تثبیت و هزینه کم، کمترین آسیب به آنزیم و عدم تغییر ساختار آن می باشد.[۵] تنها برهمکنشهای ضعیف بین سطح جامد و بیو مولکول که از نوع وان در والس، پیوند هیدروژنی، برهمکنشهای دو قطبی–دو قطبی می باشند وجود دارند. به همین دلیل امکان جدایش آنزیم از سطح به دلیل تغییر دما، pH وغیره وجود دارد. در بعضی موارد پس از جذب سطحی، پروسه ایجاد اتصال عرضی نیز انجام می گیرد.[۶] این روش مناسب جهت ساخت زیست حسگرهای یکبار مصرف می باشد.

۳-۴-۱)کپسوله کردن (Encapsulation)

در روش کپسوله کردن، اجزاء بیولوژیک با استفاده از غشاهای نیمه تراوا مختلف محبوس می گردند.[۷] در این روش، آنزیم می تواند آزادانه در محلول درون ناحیه ای کوچک که توسط غشاء احاطه شده حرکت کند. ماکرومولکولها امکان عبور از غشاء را ندارند زیرا غشاء تنها نسبت به مولکولهای کوچک (سابستریت و محصولات واکنش آنزیمی) نفوذ پذیر است. نایلون و نیترات سلولز پرکاربرد ترین مواد برای ساخت میکروکپسولهای با قطر بین ۱۰ تا ۱۰۰ میکرون می باشند.

۴-۴-۱) ایجاد اتصال عرضی (Cross linking)

در این روش با استفاده از مولکولی که دارای دو سر فعال (Bifunctional) می باشد اتصال عرضی از پروتئین به پروتئین (آنزیم به آنزیم) و دربرخی موارد از پرو تئین به سطح جامد ایجاد می گردد.
گلوتار آلدئید و دی ایزو سیانات تولوئن از مواد ایجاد کننده اتصالات عرضی هستند که به طور گسترده ای از آنها استفاده می شود. این مواد با گروه لایزین آنزیم واکنش می کنند.[۸و۹] بایستی توجه داشت که غلظت زیاد آنزیم در محل هر چند که اصولا سبب افزایش اکتیویته می گردد اما به دلیل ایجاد ازدحام و محدود کردن دسترسی و اثرات بازدارنده دیگر، غلظت بیش از حد موجب کاهش اکتیویته خواهد گردید. لایه آنزیم تثبیت شده بر سطح دارای خواص فیزیکی(ضخامت، تخلخل و ...) می باشد که بستگی به شرایط انجام تثبیت دارد.