

Cảm biến sinh học galactose trên nền vật liệu nano ZnO

- La Phan Phương Hạ
- Nguyễn Thị Thu Hiền
- Trần Quang Trung

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 22 tháng 12 năm 2016, nhận đăng ngày 30 tháng 10 năm 2017)

TÓM TẮT

Vật liệu nano ZnO có thể tồn tại ở nhiều dạng hình thái học khác nhau như: thanh nano, ống nano, sợi nano... với những tính chất quang điện đặc trưng nên được ứng dụng trong chế tạo diod phát quang, tấm dẫn sóng quang học, laser, cảm biến... Bên cạnh đó, ZnO còn có tính tương thích sinh học cao, không độc hại, độ ổn định hóa học cao, điểm đẳng điện cao... nên đã và đang được nghiên cứu rộng rãi trong lĩnh vực

cảm biến sinh học. Trong báo cáo này, chúng tôi chế tạo điện cực hoạt động ứng dụng trong cảm biến sinh học galactose dựa trên nền thanh nano ZnO được cố định enzyme galactose oxidase. Kết quả CV (Cyclic Voltammetry) thu được cho thấy hệ điện cực này hoạt động tốt trong dung dịch galactose oxidase nồng độ thay đổi từ 40 mM đến 230 mM với thời gian cố định enzyme là 3 giờ 30 phút.

Từ khóa: nano ZnO, cảm biến sinh học, galactose oxidase, CV (Cyclic Voltammetry)

MỞ ĐẦU

Vật liệu ZnO rất đa dạng về mặt hình thái học, từ cấu trúc 2 chiều (dạng màng), 1 chiều (dạng sợi) đến cấu trúc 0 chiều (hạt nano), trong đó cấu trúc nano 1 chiều của ZnO rất đa dạng từ dạng wire (sợi) đến rod (thanh), pencil (chóp nhọn), tetra-pod (tứ cạnh)... với tính chất quang, điện đặc trưng đã và đang được các nhà khoa học tập trung nghiên cứu nhằm ứng dụng trong chế tạo các cảm biến hay thiết bị quang điện... Bên cạnh đó, ZnO còn có một số tính chất như không độc hại, an toàn sinh học, tính tương thích sinh học cao, có khả năng kết hợp với một số enzymes, có điểm đẳng điện cao, có liên kết ion cao nên phân hủy rất chậm trong môi trường pH sinh học bình thường... nên ZnO còn là vật liệu được ưu tiên lựa chọn trong lĩnh vực cảm biến sinh học (CBSH) [1, 2].

Với hệ CBSH sử dụng vật liệu ZnO, ZnO đóng vai trò chất mang được phủ trực tiếp lên một điện cực (đóng vai trò là điện cực hoạt động

cho hệ CBSH, bên cạnh điện cực chuẩn Ag/AgCl), sau đó, các loại enzyme khác nhau sẽ được cố định lên bề mặt điện cực đã có phủ lớp nano ZnO (tùy vào từng loại cảm biến sinh học dùng để xác định các cơ chất khác nhau mà lựa chọn loại enzyme cho phù hợp – cụ thể là CBSH galactose thì điện cực có phủ ZnO sẽ được cố định enzyme galactose oxidase đặc trưng). Enzyme sau khi được cố định lên ZnO sẽ cho một số ưu điểm vượt trội hơn so với enzyme ban đầu như không bị hòa tan mà vẫn giữ được hoạt độ xúc tác, bền với các yếu tố hóa, lý... Các nhà khoa học cũng sử dụng một số kỹ thuật để cố định enzyme lên ZnO như: cố định bằng hấp thụ vật lý hay cố định bằng chất tạo liên kết ngang (cross-linking immobilization); trong đó việc cố định bằng chất tạo liên kết ngang glutaraldehyde là phương pháp được sử dụng phổ biến nhất [3]. Với phương pháp này, glutaraldehyde và enzyme sẽ được hòa tan trong dung dịch đệm phosphate (PBS); sau đó điện cực ZnO được ngâm vào dung

dịch trên để cố định enzyme lên ZnO. Điện cực sau khi đã được cố định enzyme, nếu chưa sử dụng, sẽ được bảo quản ở 4 °C để đảm bảo vẫn giữ được hoạt tính của enzyme.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Tạo thanh nano ZnO

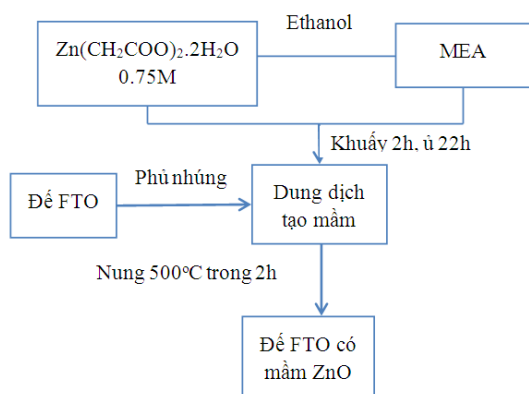
Trong báo cáo này, thanh nano ZnO được tổng hợp trên đế Fluorine-doped tin oxide (FTO) bằng phương pháp dung dịch do phương pháp này có thể tổng hợp được với số lượng lớn. Bên cạnh đó, thanh nano tổng hợp từ phương pháp dung dịch có ưu điểm là thiết bị thực nghiệm đơn giản, được thực hiện trong môi trường không khí và ở nhiệt độ thấp (từ 50–150 °C). Một số hóa chất được sử dụng trong quá trình tổng hợp thanh nano ZnO: $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, monoethanolamine (MEA), ethanol, hexamethylenetetramine (HMTA) (Merck). Quy trình thực nghiệm tạo thanh nano ZnO được tóm tắt thông qua sơ đồ trên Hình 1.

Cố định enzyme galactose oxidase lên thanh nano ZnO

Enzyme galactose oxidase được cố định lên thanh nano ZnO thông qua chất tạo liên kết

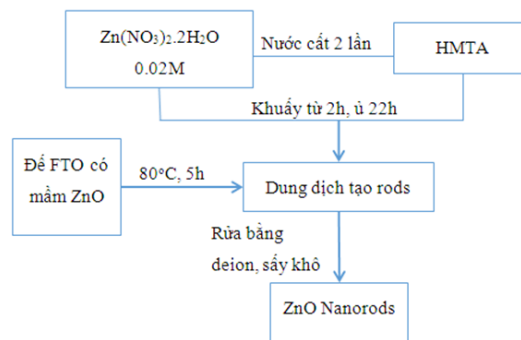
ngang glutaraldehyde (GA). Vì enzyme cần môi trường pH trung tính (môi trường pH sinh học) để không bị mất hoạt tính, do đó cần sử dụng đệm phosphate để giúp ổn định pH cho dung dịch enzyme. Dung dịch sử dụng trong thực nghiệm cố định enzyme có độ pH khoảng 7,4. Một số hóa chất sử dụng trong quá trình cố định enzyme gồm: nước cất 2 lần, enzyme galactose oxidase (Sigma, US) $\geq 3,000$ units/g solid, galactose (Merck), đệm phosphate 1X (Án Độ), glutaraldehyde solution (Merck).

Galactose oxidase được cố định lên thanh nano ZnO bằng phương pháp trộn. Đầu tiên, GA được hòa tan trong dung dịch PBS 0,1 mM tạo thành dung dịch GA/PBS và enzyme galactose oxidase được hòa tan trong dung dịch PBS 0,1 mM tạo dung dịch enzyme/PBS. Sau đó, dung dịch GA/PBS và dung dịch enzyme/PBS được trộn đều theo tỷ lệ 2:1 về thể tích để tạo dung dịch enzyme/GA/PBS. Cuối cùng mẫu ZnO được ngâm vào dung dịch enzyme/GA/PBS ở nhiệt độ phòng. Toàn bộ quá trình cố định enzyme được tóm tắt trong sơ đồ Hình 2.



Quy trình tạo màng trên đế FTO

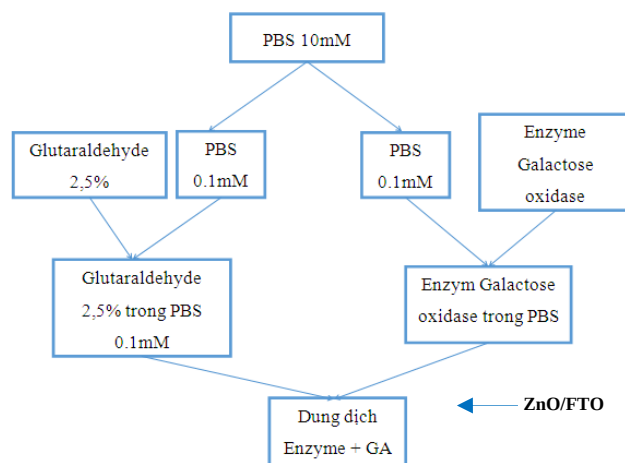
(A)



Quy trình tạo thanh nano ZnO

(B)

Hình 1. Sơ đồ thực nghiệm tạo thanh nano ZnO: (A) tạo màng ZnO trên đế FTO, (B) : tạo thanh nano ZnO trên đế FTO đã phủ màng ZnO

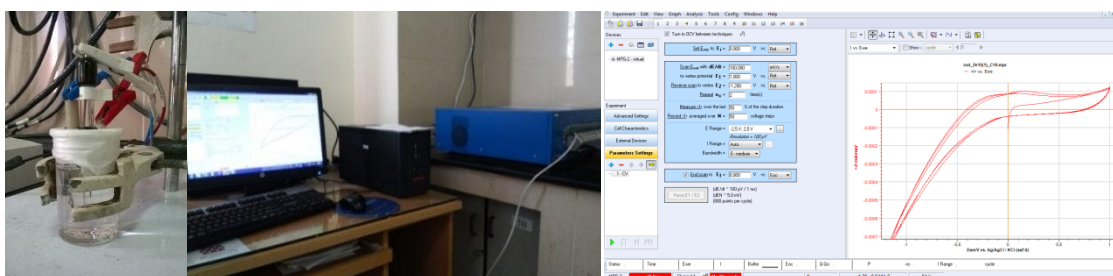


Hình 2. Sơ đồ qui trình cố định enzyme galactose oxidase lên ZnO

Phương pháp quét thế vòng tuần hoàn (CV) khảo sát khả năng hoạt động của ZnO trong dung dịch galactose

Mẫu ZnO sau khi được cố định enzym galactose oxidase sẽ dùng để làm điện cực hoạt động trong hệ điện hóa gồm điện cực chuẩn Ag/AgCl, điện cực đối Pt và điện cực hoạt động

là thanh nano ZnO trên đế FTO đã được cố định enzyme galactose oxidase (ký hiệu: $GO_x|ZnO|FTO$). Dung dịch khảo sát là dung dịch galactose, tốc độ quét thế 100 mV/s, khoảng quét thế từ -1,2 V đến 1 V. Hệ đo CV sử dụng là hệ MPG-2 với phần mềm EC-Lab (Hình 3).



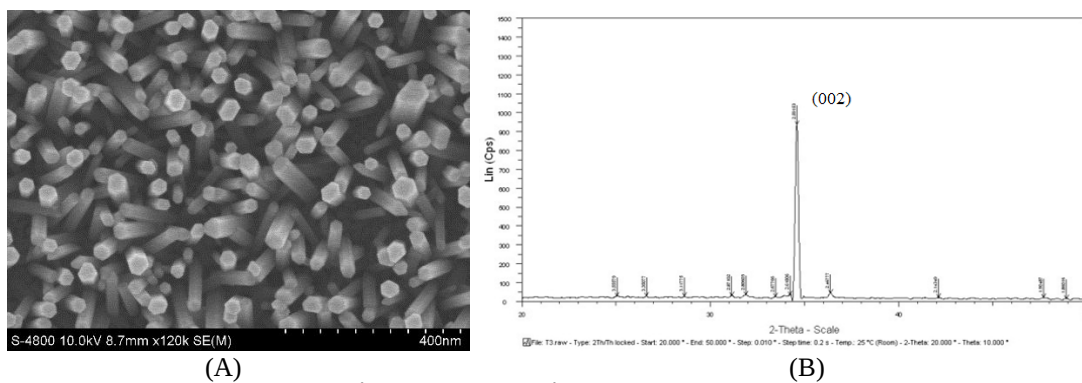
Hình 3. Hệ điện hóa MPG-2 và giao diện phần mềm EC-Lab

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát cấu trúc thanh nano ZnO

Thanh nano ZnO được chế tạo bằng phương pháp dung dịch ở điều kiện 80 °C trong 5 giờ. Hình thái bề mặt cũng như định hướng tinh thể của thanh nano ZnO được phân tích thông qua ảnh SEM và phổ nhiễu xạ tia X. Kết quả SEM

cho thấy thanh nano ZnO tạo ra có đường kính trung bình khoảng 40 nm, các thanh nano có xu hướng phát triển theo hướng trục giao với đế nền, bề mặt cắt ngang của các thanh có hình lục giác tương đối đồng đều (Hình 4A), phổ XRD quan sát được định hướng tinh thể ZnO phát triển ưu tiên mặt (002) (Hình 4B).

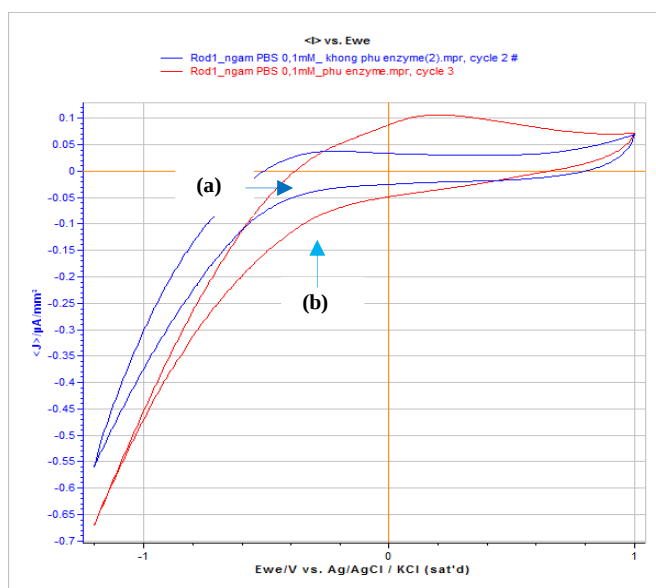


Hình 4. Ảnh SEM (A) và phổ XRD của thanh nano ZnO (B)

Kết hợp gián đồ XRD và ảnh SEM, nhóm tác giả nhận thấy thanh nano ZnO tạo được có một số tính chất phù hợp cho ứng dụng trong CBSH như: diện tích bề mặt tiếp xúc lớn, có định hướng tinh thể tốt cho quá trình truyền dẫn điện tử. Kết hợp với một số tính chất của vật liệu ZnO như: độ tương thích sinh học cao, không độc hại, liên kết ion cao nên bền với môi trường sinh học nên chúng tôi hoàn toàn có thể sử dụng thanh nano ZnO đã tạo được để cố định enzyme galactose oxidase, làm tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về CBSH dựa trên nền vật liệu ZnO cấu trúc nano

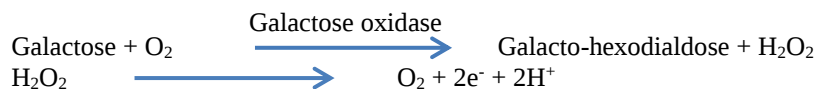
Khảo sát khả năng hoạt động của GOx| ZnO | FTO trong dung dịch galactose

Khả năng hoạt động của GOx| ZnO | FTO trong dung dịch galactose được khảo sát bằng phương pháp quét thế vòng tuần hoàn (CV) tại tốc độ quét thế 100 mV/s, khoảng quét thế từ -1,2 V đến 1 V với điện cực làm việc là GOx| ZnO | FTO (thời gian cố định enzyme GOx là 3,5 giờ) và dung dịch điện giải là galactose 200 mM. Hình 5 thể hiện khả năng hoạt động của thanh nano ZnO có cố định enzyme và không có cố định enzyme trong dung dịch galactose 200 mM.



Hình 5. Đường cong CV khảo sát khả năng hoạt động của ZnO|FTO (đường a) và GOx|rod ZnO|FTO (đường b) trong dung dịch galactose 200 mM

Trên Hình 5, đường cong a là đường cong CV của thanh nano không cố định enzyme galactose oxidase trong dung dịch galactose 200 mM, khoảng thế từ -0,1 V đến 1 V tín hiệu dòng thu được rất thấp. Đường cong b là đường CV của thanh nano có cố định enzyme galactose oxidase trong dung dịch galactose 200 mM, tín hiệu dòng điện cực đại thu được là 0,106759 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$, cao gấp nhiều lần so với tín hiệu dòng thu được khi mẫu không được cố định enzyme.



Khảo sát khả năng hoạt động của GOx| ZnO | FTO theo thời gian cố định enzyme

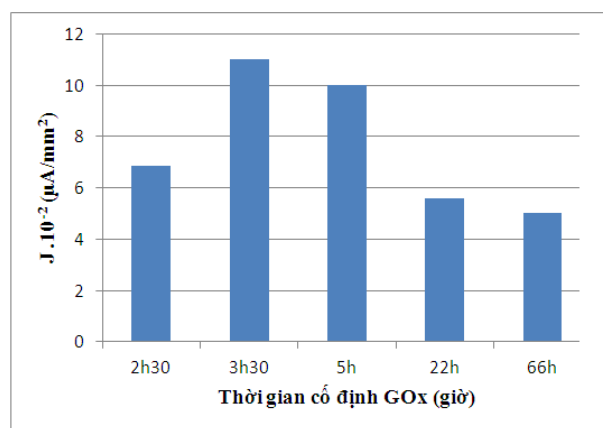
Trên cơ sở xác định sự khác nhau về tín hiệu dòng điện thu được giữa các mẫu ZnO có cố định và không cố định enzyme, nhóm tác giả tiến hành khảo sát khả năng hoạt động của điện cực GOx| ZnO | FTO theo thời gian cố định enzyme để xác định được thời gian cố định enzyme tối ưu. Thời gian cố định enzyme được thay đổi trong 2 giờ 30 phút, 3 giờ 30 phút, 5 giờ, 22 giờ, 66 giờ. Tiến hành đo CV trong dung dịch galactose 200 mM với các mẫu điện cực có thời gian cố định enzyme khác nhau, thu được giá trị tín hiệu dòng như trong Bảng 1. Đồ thị thể hiện sự ảnh hưởng của thời gian cố định GOx đến khả năng hoạt động của GOx| ZnO | FTO được thể hiện trên Hình 6 cho thấy khi thay đổi thời gian cố định enzyme sẽ ảnh hưởng đến tín hiệu dòng điện. Tín hiệu đạt cao nhất ứng với mẫu có thời gian cố định 3 giờ 30 phút ($11,01 \cdot 10^{-2} \mu\text{A}/\text{mm}^2$) và giảm dần khi tăng thời gian cố định lên. Điều này chứng tỏ khi thời gian cố định enzyme thay đổi có ảnh hưởng đến khả năng hoạt động của enzyme. Hiện tại, với quá trình thực nghiệm của nhóm, kết quả tín hiệu ổn định và tốt ứng với khoảng thời gian cố định enzyme từ 3 giờ đến 4 giờ. Theo tài liệu tham khảo và kết quả thực nghiệm của nhóm nghiên cứu, khi thời gian cố định kéo dài hoạt tính enzyme có thể bị giảm do

Kết quả này cho thấy mẫu ZnO được cố định enzyme khi đặt trong dung dịch galactose (200 mM) có tương tác với dung dịch galactose, trong khi mẫu ZnO không cố định enzyme hầu như không tương tác. Kết quả này có thể được giải thích là do khi có mặt enzyme galactose oxidase, dưới tác dụng của enzyme này trong dung dịch galactose xảy ra phản ứng tạo galacto-hexodialdose và H_2O_2 , giải phóng electron, đóng góp cho tín hiệu dòng thu được [4].

những biến đổi về cấu trúc của enzyme trong quá trình cố định [5]. Do đó, nhóm tác giả chọn thời gian cố định enzyme là 3 giờ 30 phút cho khảo sát tiếp theo.

Bảng 1. Tín hiệu dòng điện theo thời gian ngâm

Thời gian cố định enzyme (giờ)	Mật độ dòng trung bình (J) ($10^{-2} \mu\text{A}/\text{mm}^2$)
2h30ph	6,84
3h30ph	11,01
5h	10,02
22h	5,57
66h	5,01



Hình 6. Đồ thị thể hiện sự ảnh hưởng của thời gian cố định GOx đến khả năng hoạt động của GOx| ZnO | FTO trong dung dịch galactose 200 mM

Khảo sát khả năng hoạt động của GOx| ZnO | FTO theo nồng độ galactose

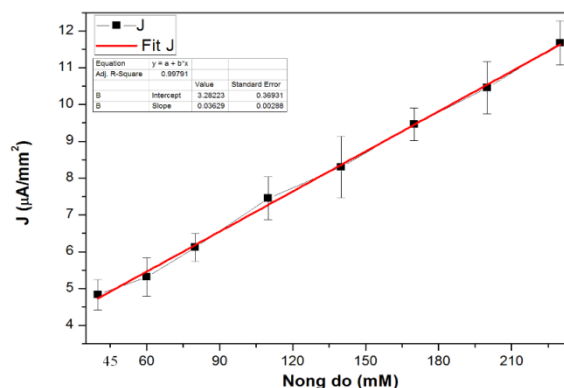
Tiến hành khảo sát khả năng hoạt động của GOx| ZnO | FTO theo nồng độ galactose thay đổi từ 40 đến 230 mM bằng phương pháp CV, kết quả tín hiệu dòng được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Tín hiệu dòng điện theo nồng độ galactose

Nồng độ (mM)	Mật độ dòng trung bình (J) ($10^{-2} \mu\text{A}/\text{mm}^2$)	Sai số ($10^{-2} \mu\text{A}/\text{mm}^2$)
40	4,83	0,41
60	5,32	0,52
80	6,12	0,38
110	7,45	0,58
140	8,30	0,83
170	9,46	0,44
200	10,45	0,70
230	11,68	0,60

Từ kết quả thu được ở Bảng 2, vẽ đồ thị thể hiện mối tương quan giữa tín hiệu dòng điện thu được và nồng độ dung dịch galactose. Đồ thị được biểu diễn trên Hình 7 cho thấy khi nồng độ dung dịch galactose tăng từ 40 đến 230 mM thì tín hiệu dòng điện thu được tăng tuyến tính theo phương trình $y = 0,03629x + 3,28223$ với hệ số tương quan cao ($R^2 = 0,99791$). Điều này chứng tỏ khi nồng độ dung dịch galactose thay đổi thì lượng enzyme phản ứng hoạt hóa sẽ thay đổi, tác động tới lượng điện tử trao đổi trong dung dịch và từ đó ảnh hưởng tới tín hiệu dòng điện. Kết quả này giúp cho chúng tôi có cơ sở ban đầu tin

rằng hệ điện cực GOx| ZnO | FTO có khả năng hoạt động tốt trong dung dịch galactose với khoảng nồng độ nhất định.



Hình 7. Đồ thị thể hiện sự thay đổi dòng tuyến tính theo nồng độ galactose

KẾT LUẬN

Bài báo trình bày quá trình chế tạo thanh nano ZnO bằng phương pháp dung dịch ở nhiệt độ phòng và ứng dụng của thanh nano ZnO trong hệ điện cực của CBSH galactose. Kết quả bài báo cho thấy thanh nano ZnO tạo được có đường kính trung bình 40 nm, định hướng tinh thể (002), phát triển tương đối trực giao với đế nền FTO. Thanh nano ZnO sau khi cố định enzyme galactose oxidase trong 3 giờ 30 phút ở nhiệt độ phòng cho khả năng hoạt động tốt trong dung dịch galactose có nồng độ thay đổi từ 40 đến 230 mM.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn đến PTN Bộ môn Vật lý Chất rắn – Khoa Vật lý-Vật lý Kỹ thuật, PTN Hóa Lý – Khoa Hóa, Khoa Khoa học Vật liệu thuộc Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM đã hỗ trợ nhóm tác giả trong công tác thực nghiệm.

Galactose biosensor based on ZnO nano material

- La Phan Phuong Ha
- Nguyen Thi Thu Hien
- Tran Quang Trung

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

ABSTRACT

ZnO nanomaterial is a n-type semiconductor material and exists in a variety of one-dimensional nanostructures such as: nanorods, nanotubes, nanowalls, nanowires, ect... [3]. They have potential applications in making devices such as: light emitting diodes, optical waveguides, nanolaser, gas sensor, biosensor. Due to the high surface area to volume ratios, nontoxicity, chemical stability, biocompatibility, the high

isoelectric point (IEP: 9.5), ect...; ZnO nanorods were largely used for biosensor. In this work, we developed enzyme electrode biosensor based on ZnO nanorods to test galactose solution by immobilizing galactose oxidase on ZnO nanorods grown on FTO substrate. The result showed that the proposed biosensor had the linear detection range from 40 to 230 mM galactose solution.

Key words: nano ZnO, biosensor, galactose oxidase, CV (Cyclic Voltammetry)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. M. Ahmad, et al., A single ZnO nanofiber-based highly sensitive amperometric glucose biosensor. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114, 20, 9308–9313 (2010)
- [2]. Willander, et al., ZnO based potentiometric and amperometric nanosensors, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14, 9, 6497–6508 (2014).
- [3]. N.Đ. Lượng, et al., Công nghệ enzyme. NXB Đại học quốc gia Tp Hồ Chí Minh, 73–100 (2004).
- [4]. K. Khun, et al., Development of galactose biosensor based on functionalized ZnO nanorods with galactose oxidase. *Journal of Sensors* ID 696247, 7 pages, (2012).
- [5]. W. Aehle, Enzymes in industry: products and applications. Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 17, (2004).