

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Bioszenzorok reakciórétegének vizsgálata
pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás
méréstechnikával**

Csóka Balázs

Doktori Iskola vezető: Dr. Kilár Ferenc
Témavezető: Dr. Nagy Géza

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Kémia Doktori Iskola

Pécs, 2004

Bevezetés

A pásztázó elektrokémiai mikroszkópia (PEKM, Scanning Electrochemical Microscopy - SECM) a mérőszonda-mikroszkópiás módszerek közé tartozik, annak elektrokémikusok által kidolgozott változata. A módszerről szóló első, 1989-ben megjelent közleményt Bard és munkatársai írták. A PEKM működése során egy precíziós pozicionálóval mozgatott mikroméretű elektrokémiai érzékelővel (elektróddal) végigpásztázza a vizsgálandó területet és a mérőcsúcs pillanatnyi környezetére jellemző kémiai adatokat gyűjt. A térkoordináták és az adott helyen gyűjtött mérési adatok alapján történik az értékelés, a lokális kémiai jellemzők képi megjelenítése. A módszer bevezetése óta sokat fejlődött, alkalmazási területe szélesedett. Általánosságban elmondható, hogy a pásztázó elektrokémiai mikroszkóp egy kitűnő eszköz, amelynek segítségével nagy térbeli felbontással lehet koncentrációeloszlásokról, határfelületek sajátságairól információt nyerni.

Az elektrokémiai módszerek sokféleségéből következően a PEKM-iában is változatos elektrokémiai mérési elrendezések alakultak ki. Ezek egy részénél a mérőcsúcs passzívan érzékeli környezetének koncentrációviszonyait (pl. potenciometriás mikroelektrodok), más esetekben azonban az elektród aktívan részt vesz a környezetében zajló elektrokémiai folyamatokban. Ez utóbbiak az amperometriás mikroszenzorok. Jól ismert az amperometriás mikroelektrodok viselkedése redoxi rendszert tartalmazó elektrokémia cellában. Egy ilyen elektródon alkalmas elektródpotenciál mellett stacioner viszonyok között az oldat belsejében elhelyezett sík korong alakú mikroelektrodon mérhető amperometriás áram erősségét az

$$i_{T,\infty} = 4nFDCa$$

egyenlet írja le, ahol n a redoxi reakcióban résztvevő elektronok száma, F a Faraday állandó, D a diffúziós együttható, C az elektródon átalakuló elektroaktív anyag koncentrációja és a az elektród sugara.

A mikroelektrodok elektrokémiai viselkedése eltér a hagyományos elektrodok esetében észlelt sajátságoktól. Ennek oka, hogy a hagyományos méretű elektrodok esetén az elektródfolyamatok során az elektródfelület környezetében lineáris síkdifúzió jellegű anyagtranszport dominál. A mikroelektrodoknál azonban a hemiszférikus diffúziós jelleg érvényesül potenciostatikai viszonyok, azaz amperometriás mérések esetén. A hemiszférikus diffúzió következtében létrejött stacioner áramintenzitás mikroelektrodok esetében néhány tized másodperc alatt kialakul és ezt csak kis mértékben befolyásolja a cellában fellépő

konvekció. Mindezek miatt a mikroelektrodok jól alkalmazhatók PEKM vizsgálatoknál, ahol folyamatos pásztázással történik az elektrokémiai információ gyűjtése.

Elektrokémiailag reverzibilis elektroaktív komponens jelenlétében, ha az elektródot egy szigetelő felülethez közelítjük, az alkalmasan megválasztott elektródpotenciál mellett észlelhető áram csökkenni kezd, mivel az elektroaktív reagensnek az elektród felületére történő diffúzióját a felület közelsége gátolja, ezt „negatív visszacsatolásnak” hívjuk. Egy vezető felülethez közelítve a mikroelektrodot, az annak felületén keletkező anyag eljut a vezető felületre. Ott az ellentétes változás zajlik le, amelynek terméke ismét az elektród felületére juthat. Így növekszik az elektródon átalakulni képes anyag lokális koncentrációja. Kis elektród – céltárgy távolság esetén tehát az áramintenzitás nő, azaz „pozitív visszacsatolást” tapasztalunk.

A PEKM gyakorlatában különböző mérési módok használatára kínálkozik lehetőség:

- állandó koncentrációjú reverzibilis elektroaktív anyagot (mediátort) adunk a mérőcellába és állandó mérőcsúcs-potenciál mellett mérjük az áramot. Ez a fent említett visszacsatolós módszereknél használatos üzemmód, szigetelő és vezető felületek azonosítását teszi lehetővé
- szubsztrátum generáló - mérőcsúcs detektáló üzemmód (SG/TC): a céltárgy (szubsztrát) által termelt anyagféleség koncentrációját jelzi a mérőcsúcs
- penetrációs üzemmód: ilyenkor a mérőcsúcs egy mikrostruktúrába hatol be (polimer film, immobilizált enzimiréteg) és ott méri az elektrokémiailag érzékelhető anyagok eloszlását, transzportfolyamatokat vizsgál
- felület megmunkálás: az elektród felületén lokálisan termelt reaktánsok segítségével nagy pontosságú felület módosítás lehetséges

A bioszenzorok jól ismert analitikai eszközök, melyek eredményesen felhasználhatók bonyolult mátrixokban lévő komponensek szelektív mérésére, azok pillanatnyi koncentrációjának jelzésére. Szelektivitásukat a működésük alapját képező biokémiai reakció biztosítja. A biokatalitikus érzékelők fontos szerkezeti egysége a biokatalizátort tartalmazó reakcióréteg. Ebben játszódik le a kémiai reakció. A reakciórétegben kialakuló folyamatok alapvetően meghatározzák az érzékelő működésének analitikai paramétereit. Jól működő bioszenzor készítéséhez megfelelő méretű, szerkezetű, kialakítású reakcióréteg szükséges. A

reakcióréteg különböző helyein, különböző időpillanatokban kialakuló koncentrációértékeket a működési paraméterek rendkívül összetett módon befolyásolják.

A PEKM-ia kezdetei óta számos próbálkozás történt arra, hogy folyadék- ill. gélfázisban diffúziós profilokat határozzanak meg. Sok esetben a gélfázisban lejátszódó enzimatis reakcióban keletkező termék oldatfázisban kialakuló lokális koncentrációját sikerült megmérni (SG/TC), amint az az immobilizált biokatalizátort tartalmazó felületről az oldat belsejébe diffundál. A reaktánsok koncentrációjának lokális csökkenése, sőt a pH változása is tanulmányozható a határfázisban. Az ultramikro méretű mérőcsúcs képes behatolni vékony elasztikus filmek belsejébe, így lehetséges a film fázisában történő PEKM mérés.

A bioszenzorok szerkezetének kutatása során számos próbálkozás történt a biokatalitikus rétegben kialakuló koncentrációviszonyok, koncentrációprofilok, koncentráció-tranziensek leírására. A bioszenzor-válaszokat mérhető változókat tartalmazó egyenletekkel leírni nehéz feladat, mivel a folyamatok bonyolultak és rendszerint a változások csak nem lineáris parciális differenciálegyenletekkel adhatók meg. A vonatkozó egyenletek analitikus megoldása gyakran csak speciális esetekre lehetséges.

A működési modellek alapján felállított parciális differenciálegyenletek analitikus megoldásának nehézségeit áthidalandó gyakran numerikus megoldást alkalmaznak. A jól ismert 'véges változások' módszere jól használható a katalitikus reakcióréteg belüli koncentrációprofilok szimulálására is. A szimuláció használhatósága a reakcióréteg optimális fizikai és kémia paramétereinek meghatározására (pl. vastagság, viszkozitás, permeabilitás, katalitikus aktivitás) azonban korlátozott, csak tendenciák leírására, egyes jelenségek értelmezésére alkalmas. Ezért a digitális szimulációval nyert eredményeket célszerű kísérletileg is ellenőrizni.

A diffúziós együttható „repülési idő” szerinti mérésekor a vizsgálandó anyag igen kicsiny térfogatú dózist pillanatszerűen a detektortól adott távolságban elhelyezkedő forrásból a vizsgálandó közegbe juttatjuk. A bejuttatott mintaanyag szférikus diffúziója következtében a detektor felületen egy maximum jellegű koncentráció – idő transziens halad át. A maximum megjelenéséhez tartozó „repülési időből” és a „repülési távolságból” a diffúziós koefficiens meghatározható.

A módszer pontosságát a távolság meghatározásának bizonytalansága determinálja. A mikroszkóp sajátosságából adódóan több, egymástól pontosan ismert mértékben különböző

„repülési távolság” állítható be. Így, a különben technikailag rendkívül egyszerű módszer pontossága nagymértékben növelhető.

Célkitűzések

Vizsgálataim célja a Pásztázó Elektrokémiai Mikroszkópiás mérés technika lehetőségeit kihasználva bioszenzorok reakciórétegének tanulmányozása volt. A munka célkitűzései az alábbi pontokban foglalhatók össze:

1. A PEKM technikákkal napjainkban egyre szélesebb körben végeznek vizsgálatokat különböző biológiai mintákon. Kereskedelmi forgalomba azonban csak három éve került ilyen készülék, melynek ára rendkívül magas. Kutatómunkám kiindulásaként egy megbízhatóan működő Pásztázó Elektrokémiai Mikroszkópot szándékoztam megépíteni. A készüléket működtető szoftverek kidolgozásán kívül a mérésekhez használt mikroelektódok elkészítése is fontos feladatomból volt.

2. A PEKM készülék működéséből következően lehetségesnek látszott működő bioszenzorok reakciórétegében koncentráció-eloszlási méréseket elvégezni, az ott kialakuló viszonyokat tükröző kémiai mikroszkópiás felvételt készíteni. Azt reméltem, hogy a biokatalitikus folyamatok reaktánsainak és termékeinek koncentrációprofiljait megismerve az illető bioszenzorok továbbfejlesztéséhez értékes információkhoz jutok.

3. Ismert az oxigén fontos szerepe számos biokatalitikus érzékelő működése szempontjából. A PEKM-iás mérés technikai lehetővé teszi az oxigén mennyiségi eloszlásának vizsgálatát működő bioszenzorok reakciórétegében is.

4. A bioszenzorok működése számítógépes szimuláción keresztül is értelmezhető. A jól működő szimulációs eljárás kialakításához a bioszenzor szerkezetét és anyagtranszport viszonyait pontosan leíró modellt rendszert kell felépíteni.

5. A szimulációs eljárások megkívánják egy adott rendszerre érvényes diffúziós koefficiens ismeretét a számítások során figyelembe vett összes komponensre. Ezért

szükséges volt egy olyan mérési módszert kialakítani, mely lehetővé teszi a modellezett rendszernek megfelelő kísérleti elrendezés mellett diffúziós együtthatók meghatározását különféle közegekben is.

Alkalmazott eszközök és módszerek

A PEKM készülék leírása

A munkám során összeállított PEKM készülék mechanikus pozicionáló motorok felhasználásával készült. Három léptetőmotor alapú precíziós modul egymásra merőleges összeépítésével lehetővé vált a háromdimenziós mozgás. A motorok sajátosságiból adódóan a pozicionáló legkisebb egyirányú lépéshossza 75 nm. Különböző elektródbefogók, cellák, cellatartó asztalok, a potenciometriás mérésekhez szükséges impedanciáttranszformátor, a motorok meghajtását végző teljesítmény-áramkörök házilag készültek. A mikroszkópot PCLab-812PG (Advantech, USA) mérő és vezérlő kártyán keresztül kapcsoltam a számítógéphez. Az elektrokémiai mérésekhez EF437 (Elektroflex, Szeged) típusú bipotenciosztátot használtam, melyet a gyártók mikroelektródos mérésekhez szükséges 100x erősítő egységgel látták el.

A potenciometriás mérések során a korábban elkészített AD 515 IC-n alapuló feszültségkövető impedanciáttranszformátort csatlakoztattam a mérőkörbe.

A motorokat és a potenciosztátot vezérlő, mérő, adatgyűjtő valamint egyszerű grafikus megjelenítést lehetővé tevő szoftvert Microsoft Visual Basic 6.0-ban készítettem el, a be- és kimeneti portok kezelésére egy szabadon hozzáférhető rutint építettem be a vezérlő szoftverbe. A mérési eredmények feldolgozása, kiértékelése Microcal Origin 6.0 szoftver segítségével történt.

Elektródkészítés

A PEKM mérésekhez használt platina mikroelektródok 5 ill. 25 μm átmérőjű Pt-szálak felhasználásával készültek az alábbiak szerint. Egy üveggapilláris egyik végét beolvasztottam, majd egy kb. 20 mm hosszú Pt-szálat helyeztem és az üveget a fémzárra olvasztottam egy kb. 15 mm hosszú szakaszon. Az elektromos kontaktust biztosító réz drótot a kapilláris belsejében lévő Pt-véghez rögzítettem ezüst-epoxi segítségével. Ezután a kapilláris végét nedves csiszolóvászonnal addig csiszoltam, amíg a véglapon a beforrasztott fémzáral

koncentrikus korongként meg nem jelent. A mérőcsúcsot alumínium-oxid-por felhasználásával políroztam. A munkát befejezve kapott mérőcsúcs véglapjának szigetelő(üveg):vezető(Pt) arányát a vizsgálatok céljának megfelelően alakítottam ki: gélekben végzett mérésekhez túszerű mérőcsúcs alakot hoztam létre (szigetelő:vezető arány 4:1), amely képessé vált könnyedén áthatolni a hidrofíl gélen. Más mérések esetén a robosztusabb 10:1 arányú elektródcúcsot alakítottam ki. Közvetlenül a mérések előtt a Pt-cúcsot óvatosan újrapolíroztam.

A potenciometriás mérésekhez antimon-mikroelektródot készítettem. Ennek preparálása során vastag falú kapillárisba megolvasztott fém antimont szívtam fel, majd lángban manuálisan, illetve elektromos fűtésű kapilláris hűző segítségével tovább alakítottam, azaz üveg kapillárisban lévő vékony szállá húztam. Így a végleges, többnyire 20-30 μm közötti átmérőjű, üveglapon megjelenő korong alakú antimon mérőcsúcsot kaptam. Ezt a csúcsot ezüst-epoxi segítségével egy üveggapillárisba rögzítettem és elektromos kontaktust alakítottam ki réz drót alkalmazásával

Elektrokémiai módszerek

Potenciometriás vizsgálatok során viszonyító elektródként Ag/AgCl/1M KCl elektródot használtam. Voltametriás módszerek (ciklikus voltammetria, kronoamperometria) alkalmazása esetén Pt lemez ellenelektródot, Ag/AgCl vonatkoztatási elektródot használtam, melynek oldatfázisát a kloridion tartalmú közeg (mintaoldat) képezte. A PEKM méréseket kis térfogatú (2-5 cm^3) cellákban EF437 bipotenciosztáttal hajtottam végre, más esetekben, Autolab PGSTAT 12 vagy EG&G PAR 273 készüléket használtam.

Bioszenzor reakcióréteg készítés

A vizsgálatok során felhasznált enzimek kereskedelmi forgalomban beszerezhetőek voltak. Aktivitásukat standard spektrofotometriai eljárással illetve elektrokémiai módszerekkel ellenőriztem.

Bioszenzorok reakciórétegeként agaróz gélben immobilizált enzimeket alkalmaztam. Rendszerint 3-5 mg/ml agaróz tartalmú gélt készítettem, úgy, hogy agaróz port oldottam fel 0.05 M-os pH 7.0-as foszfát pufferben forralással. A már kihűlt, kb. 40 °C-os oldathoz hozzáadtam a 20 μl pufferben oldott enzimeket, majd azt egy 1 cm átmérőjű, diffúziós membránnal lezárt üvegcső belsejébe töltöttem. Az oldatból ilyen körülmények között dialízis membránnal elzárt enzim tartalmú gél keletkezett. Bizonyos esetekben a géltre 2-3 mm

vastagságú paraffinolajat is rétegeztem. Ezzel kialakítottam a reakcióréteget a cső belsejében. A csövet függőlegesen a mérőcellában lévő mintaoldatba merítettem.

A különféle összetételű reakciórétegekben mértem a H_2O_2 , O_2 és H^+ koncentráció térbeli eloszlását. A reakciórétegben 800-2000 μm vastag térrészben végeztem vizsgálatokat. Ehhez a mérőcsúcsot a gélrétegben egyenletes sebességgel közelítettem a diffúziós membránhoz, miközben mértem a mérőcsúcs által lokálisan jelzett áramot illetve elektród potenciált.

Modellszámítások

Az enzimetartalmú reakcióréteg működésének modellezéséhez 'véges változások' módszeren alapuló számításokat alkalmaztam. A modell diszkrét térfogatelemekből épül fel, melyekben csak a diffúzió ill. a kémiai reakció változtathatja meg a koncentrációkat, köztük csak lineáris diffúzió engedélyezett. A modellezés során egy-egy ciklusban az anyagtranszportból és a kémiai reakciókból származó koncentrációváltozás számítását térfogatelemenként végeztem el. A ciklusok „időtartamának” a valóságos idővel történő egyeztetéséhez normált (vagy az irodalomban elterjedten használt dimenziómentes) időt használtam.

Diffúziós koefficiensek meghatározása

A diffúziós együttható meghatározásához az elektrokémiai cellába egymással szemben, függőlegesen helyeztem el a generáló elektródot (ami jelen esetben 200 μm átmérőjű Pt elektród) és a munkaelektrodot (25 μm , Pt elektród). A PEKM SG/TC üzemmódjában megfelelően megválasztott potenciál impulzus hatására elektrokémiai folyamat során a cellában lévő elektrokémiailag aktív anyag a generátor elektródon átalakul, majd a diffúzióval a cellában szétáramlik. A munkaelektrod megfelelően beállított potenciálja esetén az oda eljutó anyagféleség pillanatnyi lokális koncentrációja mérhető, a kapott áramintenzitás értékeket az idő függvényében ábrázolva egy maximum/minimum értéket mutató görbét kapunk. A kezdeti potenciál impulzustól ezen csúcstartás érték megjelenéséig eltelt időből – a pontos elektród távolság ismeretében – kiszámítható az adott anyag diffúzió állandója az alábbi képlet szerint:

$$t = \frac{d^2}{6D}$$

ahol t a csúcstartás megjelenésének ideje, d a két elektród távolsága, D a diffúziós együttható.

Mivel a két elektród távolságának pontos megállapítása sok esetben nehéz, ezért célszerűnek tűnt a mérést úgy elvégezni, hogy az elektródokat különböző, de pontosan ismert távolságra állítottam egymástól. Az így nyert adatokból a csúcstartás érték megjelenésének ideje és a céltárgy - munkaelektrod távolságok különbsége alapján a diffúziós állandó kiszámítható volt.

Ugyanilyen módszer szerint végeztem el ionfolyadékban oldott ferrocén és ferrocén-származékok diffúziós együtthatójának meghatározását is.

A munka új tudományos eredményei

Tézispontok

1. Jól működő Pásztázó Elektrokémiai Mikroszkópiás készüléket állítottam össze. Megírtam a készülék működtetéséhez szükséges szoftvereket. Elkészítettem a mérésekhez használt elektródokat. Ellenőrző vizsgálatokkal bizonyítottam a készülék működésének megbízhatóságát. A motorok mozgása során mért relatív hiba 0.6‰ volt. A visszacsatolásos üzemmód lehetőségeit felhasználva elvégzett mérésekből két különböző módon meghatározott távolságok 4 μm illetve 3.98 μm -nek adódtak.

2. Működő biokatalitikus szenzorok reakciórétegében oxigén és hidrogén-peroxid koncentrációeloszlását határoztam meg. Glükóz-oxidáz alapú, glükóz mérésére alkalmas bioszenzor esetén megállítottam az optimális reakcióréteg-vastagságot, mely 200 μm -nek adódott. Különböző szubsztrát koncentrációk illetve enzimaktivitások esetén is hasonló eredményekre jutottam. Vizsgáltam, hogy a közeg kémhatása hogyan befolyásolja a koncentrációprofilot. Azt tapasztaltam, hogy a legnagyobb jelváltozás pH 7.0-es pufferben mérhető.

3. Elsőként vizsgáltam szekvenciális sorrendű katalizáló glükóz-oxidáz alapú bioszenzor esetén több enzimet tartalmazó rendszerekben koncentrációprofilokat. Invertáz, mutarotáz és glükóz-oxidáz alapú, szacharóz kvantitatív meghatározását lehetővé tevő bioszenzor reakciórétegében vizsgálatokat végeztem. Ezek során megállapítottam, hogy a szacharóz meghatározása során mérhető jelnek – a glükóz mérés esetén tapasztaltakhoz hasonlóan – maximuma van, ami 200-300 μm távolságra található a membrántól. Megállapítottam, hogy a

mutarotáz szerepe az enzimatis reakcióisorban jelentős; hiányában a glükóz α - β inverzió válik sebességmegtáározó lépessé.

4. A szacharóz mérésére alkalmas szenzorhoz eliminátor réteget készítettem, mely lehetővé teszi szacharóz mérését glükóz jelenléte esetén is. A kataláz és glükóz-oxidáz enzimeken alapuló eliminátor réteggel folytatott vizsgálataim eredményeként egy optimális enzimkoncentráció és enzimarány kialakítására törekedtem, mellyel nagy mértékben kiküszöbölhető a glükóz zavaró hatása. Mindkét enzimből 100 U/ml-t használva elérhető a cél.

Az összetett, eliminátor réteggel felépített szenzor reakciórétegében a hidrogén-peroxid koncentrációprofilok sajátosan alakultak glükóz-mentes, valamint glükóz-tartalmú mintaoldatok esetén. Megfigyelhető, hogy a szacharóz koncentrációjának növekedésével a profilok a szacharózmérő-rétegben egyre nagyobb értéket érnek el, a maximumok azonban alatta maradnak az eliminátor nélkül készült szenzorok esetén mért hasonló értékeknek. Mindezek mellett megfigyelhető, hogy hidrogén-peroxid koncentrációja nagyon alacsony egy 600 μ m vastag eliminátor réteggel a szacharózmérő-réteggel érintkező határán, vagyis az eliminátor réteg a funkcióját megfelelően látja el.

5. Glükóz-oxidáz tartalmú reakciórétegben végzett oxigénkoncentráció vizsgálatokból kiderült, hogy ha a reakciórétegbe mindkét vég felől bejuthat az oxigén, a koncentrációprofil minimum jellegű függvénnyel írható le. A valós szenzort jobban közelítő modellhez jutottam amikor hátulról, a mikroelektrod irányából, akadályoztam az oxigén diffúzióját azáltal, hogy paraffinolajat rétegeztem a géltre. Ekkor a reakcióréteg folyamatosan elszegényedett oxigénben és ennek pótlása csak a diffúziós membránon keresztül történhetett. Ilyen elrendezésű bioszenzort vizsgálva már 4 mM glükóz esetén is olyan alacsony oxigénszint alakult ki, mely a reakcióréteg hátsó, membrántól távol eső részén az enzimatis folyamatok jelentős lassulását eredményezte.

Szacharózmérő szenzorok esetén a koncentrációprofilok alapján látható, hogy az enzim katalizálta folyamatok nagy (>10 mM) szubsztrátkoncentrációk esetén jelentős oxigénhiányt hozhatnak létre a reakciórétegben, ami szintén a reakciósebességek csökkenésének irányába hat.

6. A kísérletesen vizsgált bioszenzor esetén szimulációs eljárással is tanulmányoztam a reakciórétegekben különböző anyagfésleségek tér- és időbeli eloszlását. A kísérletesileg meghatározott koncentrációprofilokkal jól korreláló számított görbéket kaptam. A szimuláció paramétereinek pontosításával sikerült az összetett enzimrendszerek működésének

modellezése is. Az eredmények azt mutatták, hogy a digitális szimuláció alátámasztja a mérési eredményeket. A szimulációval értékes információt nyertem a kísérleti úton nem vizsgált anyagok (pl. glükóz, szacharóz) eloszlásáról is, melyet felhasználtam a kísérleti munka további céljainak kitűzéséhez.

7. Pásztázó Elektrokémiai Mikroszkópiás módszert dolgoztam ki elektrokémiailag aktív komponensek diffúziós koefficienseinek mérésére. E módszer alkalmazásával vizes közegben (oldatokban és gélekben), valamint ionfolyadékokban meghatároztam különféle elektrokémiailag aktív molekulák és ionok diffúziós koefficiensét. A kapott értékek az irodalmi adatok – általában széles – tartományába estek. Véleményem szerint a kapott értékek az adott körülmények között érvényes, meglehetősen pontos diffúziós koefficiensnek tekinthetők – a módszer előnyös sajátosságainak köszönhetően.

8. Vizsgáltam polielektrolitok hatását a diffúzió sebességére. Agaróz gélben, valamint kationcserélő tulajdonsággal rendelkező Nafion®-t tartalmazó gélben végeztem el a diffúziós koefficiens meghatározását. $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ esetén 0.3% Nafion® tartalmú gélben a diffúziós koefficiens mintegy 15%-os csökkenést mértem.

Összefoglalás és következtetések

A pásztázó elektrokémiai mikroszkópot egy új, korábban kevésbé vizsgált területen, a bioszenzorok tanulmányozására használtam. A megfogalmazott feladatok elvégzésére kialakított készülékkel bioszenzorok reakciórétege működés közben vizsgálható számos, ott lokálisan termelődő vagy elfogyó anyagfésleség koncentrációváltozásai követhetők. A szubsztrát hozzáadása után kialakult koncentrációprofilokat a mikroelektrodos vizsgálatok csak kevésé perturbálják, így a vizsgálatokból a valóságos rendszerekre jellemző információkhoz jutottam.

A vizsgálatok alapjául választott glükóz-oxidáz alapú bioszenzor jól ismert, számos területen használt glükózkoncentráció-mérő eszköz. A valós bioszenzort gélben immobilizált enzimmel modelleztem, ebben a reakcióban keletkező hidrogén-peroxid és az enzimregeneráláshoz szükséges oxigén koncentrációjának hely szerinti megváltozását mérve koncentrációprofilokat nyertem. Az eredmények alapján olyan reakcióréteg vastagságokat találtam, mellynél a legnagyobb jelváltozás érhető el. Ezen új ismeretek figyelembe vételével

kialakítható a bioszenzorok olyan optimális rétegvastagsága, amely esetben a jelváltozás maximális értéke feltételezhető.

A szekvenciális bioszenzorral végzett vizsgálatok eredményeként – a glükóz méréséhez hasonlóan – található egy olyan távolság, melynél a termékként keletkező H₂O₂ koncentrációnak maximuma van. Ezt a rétegvastagságot alkalmazva növelhető a bioszenzor érzékenysége.

A diffúziós koefficiensek meghatározása során kapott értékek pontosabb számítások elvégzését teszik lehetővé. A vizes oldatokban mért értékek jól használhatók bonyolult (sík- és térbeli) szimulációkhoz is, míg az ionfolyadékokban végzett mérések eredményei a bioszenzor kutatás újabb irányához, a nem vizes közegben működő biokatalitikus érzékelők kutatásához nyújt kiindulási pontot.

Véleményem szerint a Páasztázó Elektrokémia Mikroszkóppal végzett vizsgálatok értékesek, pontos módszereken alapulnak. A kapott eredmények a bioszenzor fejlesztéshez nyújtanak hatékony támpontot, sőt újabb irányokat is kijelölnek a kutatásokhoz. Az eredmények figyelembe vételével várható, hogy a jövőben a bioszenzorok vizsgálata mellett a szenzorfejlesztés más területein is használatba kerül a PEKM technika.

Publikációs jegyzék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Csóka B., Kovács B., Nagy G.: Bioszenzorok katalitikus rétegének vizsgálata páasztázó elektrokémiai mikroszkópiás mérés technikával
Magyar Kémiai Folyóirat, 2002 (108) 4, 185-194.

B. Csóka, B. Kovács, G. Nagy: Investigation of concentration profiles inside operating biocatalytic sensors with Scanning Electrochemical Microscopy (SECM)
Biosensors and Bioelectronics, 2003, 18(2-3), 141-149.

B. Csóka, B. Kovács, G. Nagy: Scanning Electrochemical Microscopy inside the biocatalytic layer of biosensors. Investigation of a double function complex multienzyme reaction layer
Electroanalysis, 2003, 15(15-16), 1335 - 1342.

B. Csóka, G. Nagy: Determination of diffusion coefficient in gel and in aqueous solutions using Scanning Electrochemical Microscopy (SECM)
Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2004, 61(1-2), 57 - 67.

A doktori képzés időszaka alatt megjelent egyéb közlemények

B. Kovács, **B. Csóka**, G. Nagy, I. Kapui, R. Gyurcsányi, K. Tóth: Automatic Target Location Strategy, a Novel Approach in Scanning Electrochemical Microscopy
Electroanalysis, 1999, 11(5), 349-355.

B. Kovács, **B. Csóka**, G. Nagy, A. Ivaska: All-solid-state surfactant sensing electrode using conductive polymer as internal electric contact
Analytica Chimica Acta, 2001, 437, 67-76.

M. Södergård, **B. Csóka**, G. Nagy, A. Ivaska: Lowering the Detection Limit of Solvent Polymeric Ion-selective Membrane Electrodes. An Experimental Study with Calcium-selective Micropipette Electrodes
Analytical Letters, 2003, 36(14), 2909 – 2923.

A doktori értekezés témakörében tartott előadások

Csóka B., Kovács B., Nagy G.: A páasztázó elektrokémiai mikroszkópiás technika fejlesztésének újabb eredményei
Vegyészkonferencia 2000 – Debrecen, 2000. július 5-7.

B. Csóka, B. Kovács, G. Nagy: Investigating the reaction layer of working biosensors by SECM
2nd international workshop on Scanning Electrochemical Microscopy – Southampton, UK, 2001. június 29.- július 2.

Csóka B., Kovács B., Nagy G.: Pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás mérés technika alkalmazása a bioszenzorok fejlesztésében
Kémiai Szektorok Kutatásának Eredményei Workshop – Pécs, 2001. november 22-23.

G. Nagy, **B. Csóka**, B. Kovács: Application of microelectrodes in biosensor research
Mátrafüred 2002 – 2002. október 13-18.

Csóka Balázs: Bioszenzorok vizsgálata pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás mérés technikával
XXV. Kémiai Előadói Napok – Szeged, 2002. október 28-30.

Csóka Balázs, Nagy Géza, Kovács Barna: Bioszenzorok vizsgálata pásztázó elektrokémiai mikroszkópiával
VIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia – Kolozsvár, 2002. november 15-17.

Csóka Balázs, Kovács Barna, Nagy Géza: Biokatalitikus szenzorok működésének tanulmányozása Pásztázó Elektrokémiai Mikroszkópiával
Analitikai Napok 2003 – Budapest, 2003. január 29-30.

B. Kovács, **B. Csóka**, D. Tesanovic, G. Nagy: Real-time investigation of biosensors during their operation
Teh 3rd Bi-national France-Israeli Workshop on Biosensors, Biochips and Nanobiotechnology – Eilat, Izrael, 2003. november 30. - december 4.

Tesanovic Damir, **Csóka Balázs**, Kovács Barna, Nagy Géza: Diffúziós együttható meghatározása és modellezése gélekben
Vegyészkonferencia 2004 – Balatonföldvár, 2004. június 30. - július 2.

Poszterek

B. Csóka, G. Nagy: Methods for Determination of Diffusion Coefficients of Electrochemically Active Species Using Scanning Electrochemical Microscopy (SECM)
7th International Symposium on Instrumental Analysis – Pécs, 2003. szeptember 21-24.