

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

INGA MORKVĖNAITĖ-VILKONČIENĖ

SKENUOJANČIOS ELEKTROCHEMINĖS MIKROSKOPIJOS TAIKYMAS
MODIFIKUOTŲ ELEKTRODŲ PAVIRŠIŲ TYRIMUOSE

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius, 2016

Disertacija rengta 2012 – 2016 metais Vilniaus universiteto Chemijos fakultete

Mokslinis vadovas – prof. habil. dr. Arūnas Ramanavičius (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Mokslinis konsultantas – prof. dr. Henrikas Cesiulis (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Disertacija ginama jungtinėje Vilniaus universiteto ir VMTI FTMC chemijos mokslo krypties (03P) taryboje:

Pirmininkas – prof. habil. dr. Albertas Malinauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

Nariai:

prof. habil. dr. Rimantas Ramanauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

prof. dr. Vida Vičkačkaitė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

prof. habil. dr. Zineb Mekhalif (Namiuro universitetas, Belgija, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

doc. dr. Aušra Valiūnienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

Disertacija bus ginama viešame Chemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2016 m. rugsėjo 30 d. 14 val. Chemijos fakulteto Neorganinės chemijos auditorijoje.

Adresas: Naugarduko g. 24, LT-03225, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2016 m. rugpjūčio 30 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bei Fizinių ir technologijos mokslų centro bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

VILNIUS UNIVERSITY
CENTER FOR PHYSICAL SCIENCES AND TECHNOLOGY

INGA MORKVĖNAITĖ-VILKONČIENĖ

SCANNING ELECTROCHEMICAL MICROSCOPY AS A TOOL FOR THE
INVESTIGATION OF MODIFIED ELECTRODE SURFACES

Summary of doctoral dissertation
Physical sciences, Chemistry (03P)

Vilnius, 2016

Doctoral dissertation was prepared at Vilnius University, Faculty of Chemistry in the period of 2012 – 2016.

Scientific supervisor - Prof. habil. dr. Arūnas Ramanavičius (Vilnius University, Physical Sciences, Chemistry – 03 P).

Scientific advisor – prof. dr. Henrikas Cesiulis (Vilnius University, physical sciences, chemistry – 03P).

The doctoral dissertation will be defended at joint Vilnius University and SRI CPST Doctoral Dissertation Committee in Chemistry (03P):

Chairman - Prof. habil. dr. Albertas Malinauskas (Vilnius University, Physical Sciences, Chemistry – 03 P)

Members:

prof. habil. dr. Rimantas Ramanauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, Chemija – 03P)

prof. dr. Vida Vičkačkaitė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, Chemija – 03P)

prof. habil. dr. Zineb Mekhalif (Namiuro universitetas, Belgija, fiziniai mokslai, Chemija – 03P)

doc. dr. Aušra Valiūnienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, Chemija – 03P)

The doctoral dissertation will be defended at the public meeting of Council of Scientific Field of Chemistry at 2 p.m. on September 30, 2016 in the Inorganic Chemistry lecture hall, Faculty of Chemistry.

Address: Naugarduko st. 24, Vilnius, Lithuania.

The summary of doctoral dissertation has been mailed out on the 30th of August, 2016.

The doctoral dissertation is available for review at the libraries of Vilnius University and CPST, and on the Internet: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

Išvadas

Skenuojantis elektrocheminis mikroskopas (SECM) yra inovatyvus įrenginys, taikomas įvairių paviršių, tarp jų ir fermentinių biologinių jutiklių, elektrocheminio aktyvumo tyrimams. SECM yra paremtas elektrocheminiais matavimais, atliekamais erdvėje judinamu ultramikroelektrodu (UME). Įprastiniuose SECM eksperimentuose UME yra įjungiamas elektrocheminėje celėje kaip darbinis elektrodas, o juo tekanti srovė priklauso nuo elektriškai aktyvių junginių koncentracijos mikroelektrodo pozicionavimo vietoje. Tokiu būdu gali būti nustatoma cheminių medžiagų, susidarantių arba sunaudojamų reakcijos metu koncentracija įvairiose paviršiaus vietose. Pirmą kartą elektronų pernešimo kinetika nelaidžiuose fermentais modifikuotuose paviršiuose buvo iširta Allen Bard grupėje naudojant grįžtamojo ryšio režimą. Nuo to laiko, SECM yra taikoma daugelyje biologinių jutiklių tyrimų.

Svarbiausia SECM dalis – ultramikroelektrodas. Paprastai jo darbinis paviršius yra skritulio formos, kurio spindulys gali būti nuo kelių nanometrų iki 25 μm. UME yra judinamas trimis koordinatėmis – x, y, z, paprastai nedideliu atstumu nuo matuojamojo paviršiaus. Vienas iš informatyviausių SECM režimų yra paremtas vertikaliu UME judėjimu bandinio atžvilgiu, nes tai leidžia registruoti srovės priklausomybę nuo atstumo virš bandinio. Iš tokių kreivių, matuojamų grįžtamojo ryšio režimu, gali būti nustatomas atstumas nuo UME iki paviršiaus, gali būti iširti elektrochemiškai aktyvūs paviršiai ir gali būti skaičiuojama reakcijų kinetika. Srovės tekėjimas yra sąlygojamas oksidacijos/redukcijos reakcijos, vykstančios ant UME paviršiaus.

Darbo tikslas - pritaikyti SECM tokių biologinių jutiklių paviršių tyrimui, kurių biologinio atpažinimo elementai yra fermentai arba ląstelės. Šiam tikslui pasiekti buvo pasirinkti fermentas *Gliukozės oksidazė* ir mielių ląstelės *Saccharomyces cerevisiae*; tyrime buvo taikomi skirtingi SECM režimai ir naudojami skirtingo skersmens UME.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti, kaip RC-SECM ir GC-SECM režimai gali būti naudojami kartu ir atskirai tinkamam atstumo iki bandinio nustatymui ir GOx katalizuojamai β -D-gliukozės oksidacijos reakcijai ištirti, registruojant O₂ redukcijos srovę.
2. Nustatyti, kaip tariamoji Michaelio konstanta ($K_{M(app.)}$) priklauso nuo atstumo iki biologinio jutiklio paviršiaus ir kaip ši $K_{M(app.)}$ vertė priklauso nuo paviršiaus, ant kurio imobilizuotas fermentas, laidumo.
3. Sujungti EIS ir SECM metodus į apibendrintą SEIM sistemą, ir pritaikyti ją tirpalo laidumo tyrimams įvairiose pozicijose nuo fermentu modifikuoto paviršiaus, bei pademonstruoti SEIM tinkamumą reakcijos produktų difuzijai „realiame laike“ matuoti.
4. Sukurti matematinį RC-SECM režimo modelį, siekiant aprašyti GOx modifikuoto paviršiaus reakcijų kinetiką.
5. Parodyti galimybę tirti biologinių jutiklių paviršių, modifikuotų mielėmis, elektrocheminį aktyvumą GC-SECM režimu, taikant dviejų elektronų pernešimo tarpininkų sistemą.
6. Sukonstruoti ir ištirti fermentinį biokuro elementą, sudarytą iš anodo GOx/PD/GRE, kurio kuras - gliukozė ir katodo HRP/GRE, kurio kuras - vandenilio peroksidas.

Mokslinis naujumas:

Ginamieji teiginiai:

1. GC-SECM ir RC-SECM režimai yra tinkami biologinių jutiklių paviršių tyrimui, kai kartu fermentinės reakcijos produkto (H₂O₂) susidarymas ir reakcijoje dalyvaujančios medžiagos (O₂) sunaudojimas gali būti nustatomas ir vizualizuojamas.
2. Michaelio konstantos ($K_{M(app.)}$) nustatymas iš eksperimentinių duomenų gali būti supaprastintas matuojant RC-SECM režimu, kai „priartėjimo kreivės“ yra

registruojamos ir kinetika nustatoma naudojant specializuotus matematinius modelius.

3. Reakcijos produktų difuzijos nustatymas realiuoju laiku gali būti atliktas naudojant kombinuotą SECM/EIS sistemą.

4. Naudojant sukurtą matematinį modelį, yra įmanoma suskaičiuoti deguonies sunaudojimo greitį, ištirti fermentinės reakcijos kinetiką ir nustatyti deguonies difuzijos koeficientus įvairios sudėties tirpaluose.

5. Biologinių jutiklių paviršiai, kuriuose kaip atpažinimo elementas yra taikomos gyvos ląstelės, ir kurie yra skirti toksiškumo nustatymui, gali būti tiriama GC-SECM režimu, naudojant dviejų elektronų pernešimo tarpininkų sistemą, kurioje vienas iš elektronų pernešimo tarpininkų yra lipofilinis toksiškas chinonas, o kitas – hidrofilinis ferocianidas.

6. Naujos konstrukcijos biokuro elementas, sudarytas iš anodo GOx/PD/GRE, ir katodo HRP/GRE, naudoja gliukozę kaip kurą anodui, ir H₂O₂, susiformavęs kaip fermentinės reakcijos produktas, gali būti naudojamas kaip kuras to paties biokuro elemento katodui.

Santrumpų sąrašas

AFM – Atominių jėgų mikroskopas

A-PBS – natrio acetato – natrio fosfato buferinis tirpalas

DCPIP – 2,6-dichloroindofenolio natrio druska

BFC – biokuro elementas

EIS – Elektrocheminio impedanso spektroskopija

GOx – Gliukozės oksidazė

GOx/PD/GRE – GRE, modifikuotas PD ir GOx

GRE – grafito elektrodas

HRP – krienų peroksidazė

HRP/GRE – GRE, modifikuotas krienų peroksidaze

GC-SECM – generavimo-detekcijos skenuojančio elektrocheminio mikroskopo režimas

$i_{max(FeCN)}$ – didžiausia srovės reikšmė fericianidui

$i_{max(PQ)}$ – didžiausia srovės reikšmė 9,10-fenantrenchinonui

$K_{M(app.)}$ – tariamoji Michaelio konstanta

$K_{M(app. FeCN)}$ – tariamoji Michaelio konstanta fericianidui

$K_{M(app. PQ)}$ – tariamoji Michaelio konstanta 9,10-fenantrenchinonui

ME – mikroelektrodas (skersmuo iki 200 μm)

M_{ox} / M_{red} – oksiduota/redukuota elektronų pernešimo tarpininko forma

pBQ – p-benzochinonas

PBS – natrio fosfato buferinis tirpalas

PD – 1,10-fenantrolino-5,6-dionas

PQ – 9,10-fenantrenchinonas

RC-SECM – Redoks konkurencijos skenuojančio elektrocheminio mikroskopo režimas

SECM – skenuojantis elektrocheminis mikroskopas

SEIM – skenuojantis elektrocheminio impedanso mikroskopas

UME – ultramikroelektrodas (skersmuo iki 25 μm)

Disertacijos sandara

Disertacija parašyta anglų kalba ir turi šias sudedamąsias dalis: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos, metodika ir prietaisai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, su disertacija susijusių mokslinių darbų sąrašas, disertantės gyvenimo aprašymas, naudotos literatūros sąrašas.

Įvadas

Įvade aprašytas disertacinio darbo aktualumas šiuolaikiniame moksliniame kontekste, pabrėžiant skenuojančios elektrocheminės mikroskopijos taikymą biologiniams jutikliams tirti. Paminėti nauji metodai tirti difuzijai „realiame laike“ bei galimybės tirti ląsteles, taikant naują elektronų pernešimo tarpininką.

1. Literatūros apžvalga

Literatūros apžvalgoje aprašomi metodai biologiniams jutikliams tirti, taikant skenuojantį elektrocheminį mikroskopą. Literatūros apžvalgą sudaro penki poskyriai: skenuojantis elektrocheminis mikroskopas bei jo darbo režimai, skenuojančio elektrocheminio impedanso mikroskopija, mielių ląstelių kaip atpažinimo elementų naudojimas biologiniuose jutikliuose, biokuro elementai, ląstelių paruošimo metodų įtaka matavimo rezultatams.

2. Metodika

Šį skyrių sudaro keturios dalys: naudotų reagentų sąrašas (2.1. skyrius), bandinių ruošimo metodikos (2.2. skyrius), naudota mokslinė įranga (2.3. skyrius) ir skaičiavimai (2.4 skyrius). Bandinių ruošimo metodikos yra suskirstytos į tris poskyrius: gliukozės oksidazės imobilizavimas (2.2.1), gyvų ląstelių paruošimas bei imobilizavimas (2.2.2) ir elektrodų paruošimas biokuro elementui (2.2.3). 2.3. skyrius skirtas mokslinės įrangos aprašymui. Eksperimentai buvo atliekami: i) Sensolytics SECM (Bochum, Vokietija), naudojant disko formos platinos ultramikroelektrodus, kurių skersmenys 10 μm ir 100 μm ; ii) Veeco Bioscope II AFM (Veeco, Santa Barbara, CA, JAV), naudojant trikampį kantileverį, kurio tamprumo konstanta 0.1 N/m su ketursienės piramidės formos adata, kurios

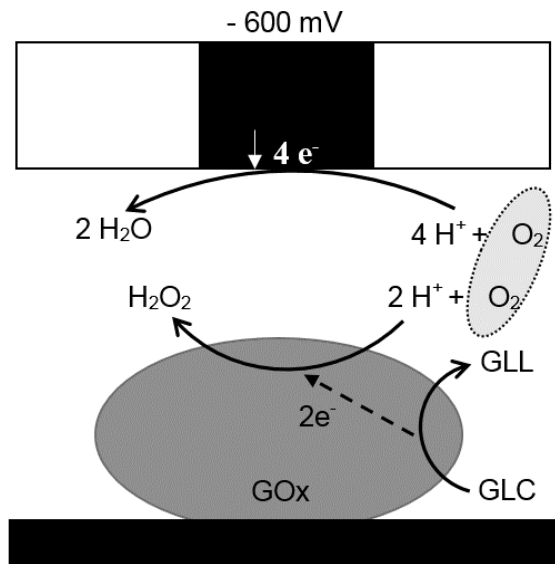
viršūnės spindulys nuo 20 iki 60 nm; iii) Autolab PGSTAT 30 Potenciostatu (Utrecht, Olandija). 2.4 skyriuje aprašomi skaičiavimai, taikyti kinetinei analizei, elektrocheminio impedanso parametrą nustatyti, mielių ląstelių aktyvumo parametrą nustatyti bei biokuro generuojamos elektros energijos galiai apskaičiuoti.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Ši dalis sudaryta iš penkių skyrių. Pirmame skyriuje aprašomos srovės-atstumo kreivės, gautos redoks konkurencijos režimu. Antrame skyriuje aprašomi matavimai generavimo-detekcijos režimu. Trečiame skyriuje aprašomi fermentinės reakcijos kinetikos tyrimai. Ketvirtame skyriuje aprašomi skenuojančios elektrocheminio impedanso mikroskopijos matavimai. Penktame skyriuje aprašomi mielių ląstelių matavimai. Šeštame skyriuje aprašomos biokuro elemento, sudaryto iš gliukozės oksidazės ir krienų peroksidazės, ypatybės.

3.1. Srovės – atstumo kreivių registravimas RC-SECM režimu

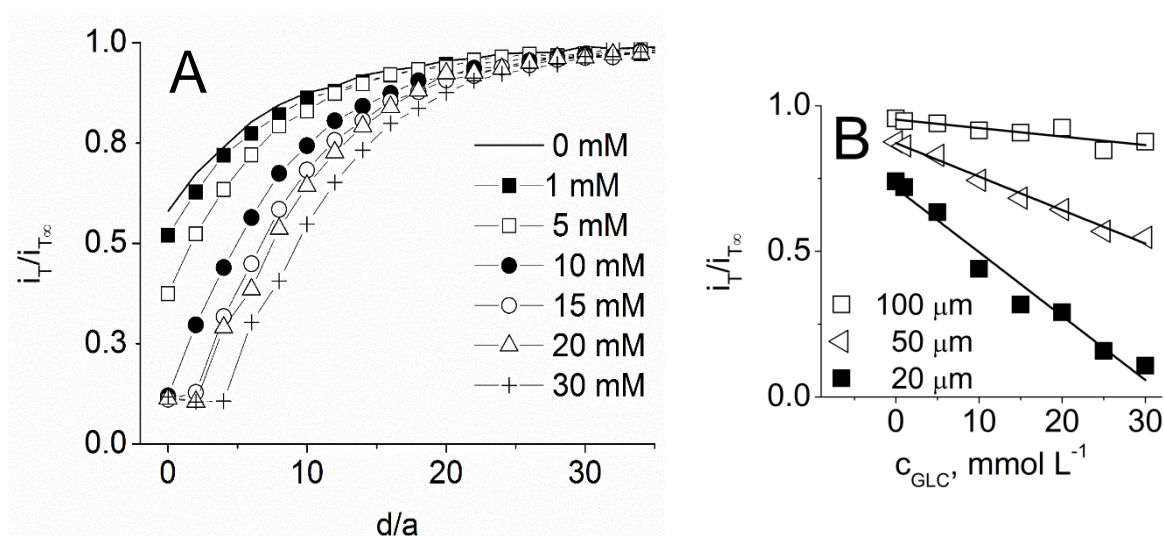
Matuojant neigiamo grįžtamojo ryšio režimu, srovė mažėja artinant UME prie paviršiaus. Kai ta pati medžiaga yra sunaudojama ant UME ir ant tiriamojo paviršiaus, procesas yra vadinamas redoks konkurencijos (RC-SECM) režimu. Mūsų tyrimuose, redoks konkurencijos procesai vyko tokiu būdu: (i) O_2 buvo redukuojamas ant GOx-modifikuoto paviršiaus vykstant 2-elektronų pernašai, ir (ii) O_2 buvo naudojamas ant UME vykstant 4-elektronų pernašai. Šie du procesai vyksta, kai UME yra nustatomas neigiamas potencialas, pakankamas deguoniui redukuoti (1 pav.). Tirpale be krūvio pernešimo tarpininkų ištirpusio deguonies redukcija vyksta ant UME, taip pat O_2 yra naudojamas GOx katalizuojamoje reakcijoje. Taigi, O_2 redukcijos ant elektrodo sąlygojama srovė mažėja, kai UME yra artinamas prie paviršiaus, panašiai, kaip neigiamojo grįžtamojo ryšio režimu, kai deguonies difuzija yra blokuojama elektrodo nelaidžios dalies. Tačiau šiuo atveju srovė mažėja greičiau, nes deguonies koncentracija greičiau mažėja dėl jo papildomo sunaudojimo ant paviršiaus modifikuoto GOx.



1 pav. SECM redoks konkurencijos režimo matavimo metu vykstančių procesų schema. GLL – gliukonorūgšties laktonas, GLC - gliukozė.

Siekiant nustatyti UME atstumą nuo paviršiaus, artinant UME prie paviršiaus, buvo matuojama O_2 redukcijos srovė. Srovės-atstumo priklausomybė buvo registruota buferiniame tirpale, nustatant -600 mV potencialą palyginamojo Ag/AgCl elektrodo atžvilgiu ir artinant UME prie nemodifikuoto nelaidaus paviršiaus (2 pav. A, 0 mM). Tolesni eksperimentai buvo atliekami pridodant gliukozės į tirpalą ir matuojant UME srovei elektrodai judant ta pačia trajektorija žemyn. Srovės-atstumo kreivės pobūdį įtakoja du pagrindiniai veiksniai: (i) blokuojama difuzija, kai UME yra arti paviršiaus ir (ii) O_2 sunaudojimas GOx katalizuojamoje reakcijoje. Srovės-atstumo kreivės buvo registruojamos RC-SECM režime, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms (2 pav. A). Ištirpusio deguonies koncentracija vandenyje $20^\circ C$ temperatūroje yra apie $250 \mu M$. Siekiant išvengti deguonies koncentracijų fliktuacijų dėl temperatūros bei kitų veiksnių įtakos vertinant eksperimento rezultatus, srovė buvo normalizuota. Kadangi O_2 yra naudojamas fermento katalizuojamoje reakcijoje, gliukozės koncentracijos padidėjimas tirpale pagreitina deguonies sunaudojimą fermentinėje reakcijoje. Jei srovės sumažėjimas būtų susijęs tik su blokuojama deguonies difuzija link elektrochemiškai aktyvaus UME paviršiaus, kreivės pobūdis turėtų būti toks pat visuose matavimuose. Bet rezultatai parodė, kad virš fermentu modifikuoto paviršiaus susidaro sluoksnis, kuriame deguonies koncentracija yra santykinai maža, ir mažėja, didinant gliukozės koncentraciją tirpale. Tai įrodo, kad deguonies

sunaudojimas fermentu modifikuoto sluoksnio paviršiuje turi ženklesnę įtaką srovės signalui nei blokuojama deguonies difuzija. Kitas šio reiškinio įrodymas yra tai, kad srovės signalas yra tame pačiame lygyje ($i_T/i_{T,\infty} = 0,1$), jei gliukozės koncentracija yra koncentracijų ribose nuo 10 mM iki 30 mM ir UME yra artimame atstume (nuo 0 iki 4 d/a) nuo paviršiaus. Šiuo atveju mažesnės deguonies koncentracijos sluoksnis yra storesnis dėl greitesnio deguonies suvartojimo. O₂ suvartojimo nuo gliukozės koncentracijos priklausomybė esant skirtingiems atstumams nuo paviršiaus yra tiesinė (2 pav., B). Artimuose atstumuose srovė sumažėjo iki 25–100%, o tai yra aiškus deguonies sunaudojimo įrodymas.

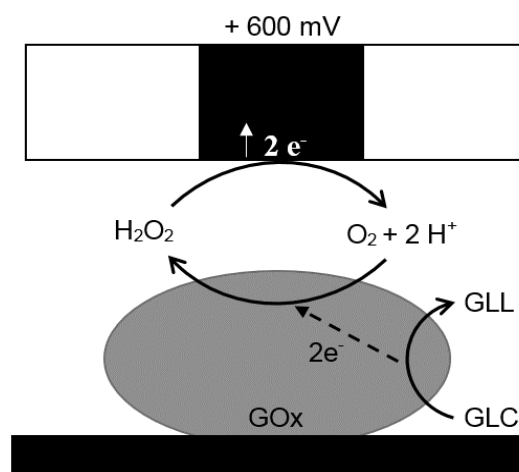


2 pav. A. Normalizuotos srovės priklausomybė nuo normalizuoto atstumo, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms. **B.** Normalizuotos srovės priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. Matavimai atlikti buferiniame tirpale. UME potencialas -600 mV Ag/AgCl atžvilgiu.

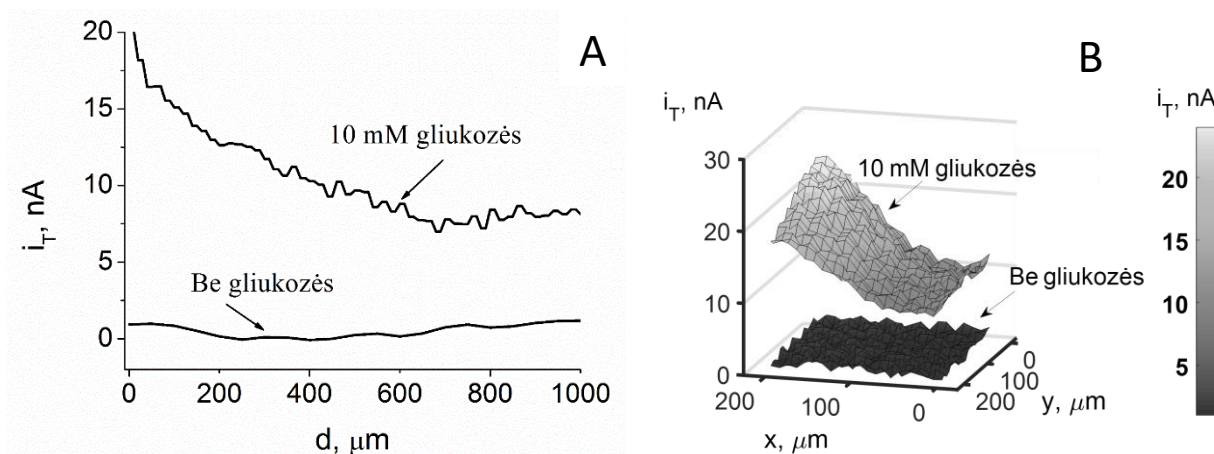
3.2. Matavimai GC-SECM režimu

Matuojant GC-SECM režimu (3 pav.), buvo registruojama H₂O₂ oksidacijos srovė. H₂O₂ koncentracijos profilis buvo nustatytas (4 pav., A) registruojant srovės atstumo priklausomybę. Srovės priklausomybės nuo UME atstumo nuo paviršiaus matavimas GC-SECM režimu buvo pradėtas 1 mm atstumu nuo tiriamojo paviršiaus. Buvo nustatyta, kad UME srovė GC-SECM režime mažėja daug lėčiau artinant UME prie tiriamojo paviršiaus, lyginant su UME srove registruota RC-SECM režime. Šis reiškinys gali būti aiškinamas taip: H₂O₂ difuzija nuo GOx modifikuoto paviršiaus yra greita, nes srovės didėjimas lyginant su matavimais be

gliukozės gali būti registruojamas net 1 mm atstume. Tačiau, H_2O_2 koncentracija yra didesnė artimame atstume ir tai gali būti susiję su fermentine reakcija, kurios produktas yra H_2O_2 . Čia blokuojamos difuzijos efektas yra nestebimas, nes matavimo atstumas buvo parinktas pagal neigiamojo grįžtamojo ryšio matavimo rezultatus. Taigi, abiejų režimų derinimas yra svarbus parenkant tinkamą atstumą vaizdinimui.



3 pav. GC-SECM režimo matavimo schema. GLL - gliukonolaktonas, GLC - gliukozė.



4 pav. A - Srovės priklausomybė nuo atstumo, buferiniame tirpale be gliukozės ir su gliukoze. UME potencialas +600 mV palyginamojo Ag/AgCl elektrodo atžvilgiu. **B** - UME srovė, registruota fermentu modifikuoto ir nmodifikuoto paviršių sandūroje, esant +600 mV potencialui palyginamojo Ag/AgCl elektrodo atžvilgiu, skenuojant $40 \mu\text{m}$ ($d/a=8$) atstumu.

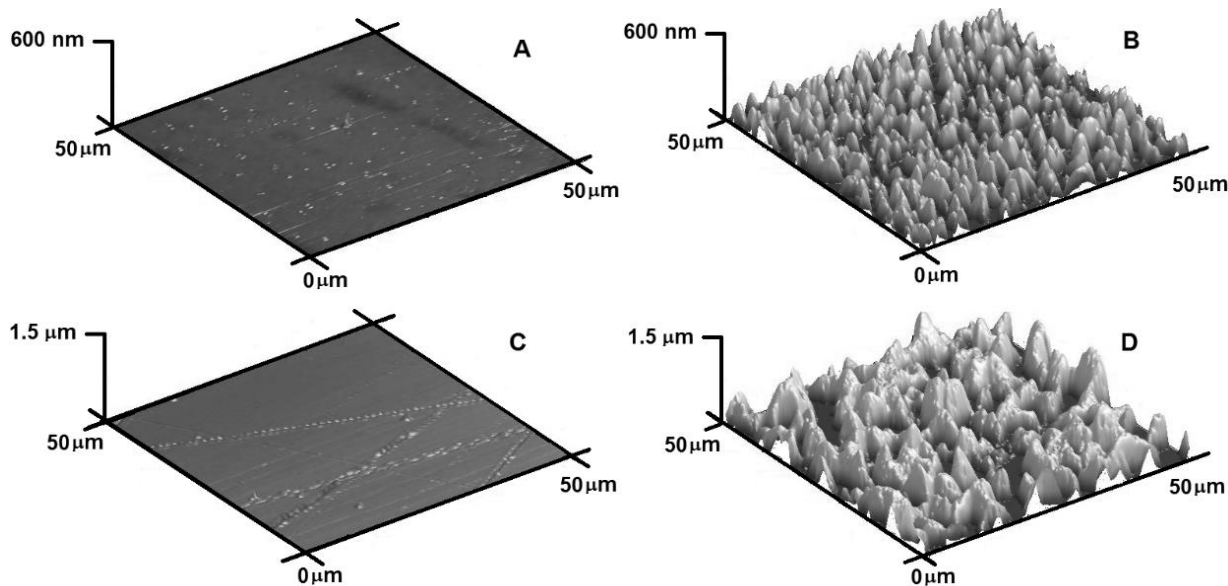
Tokiu būdu, iš abiem režimais pamatuotų srovės atstumo kreivių, vaizdinimui buvo parinktas optimalus $40 \mu\text{m}$ atstumas iš, nes: i) O_2 redukcijos normalizuota srovė yra $i_T/i_{T,\infty} = 0,85$; ii) H_2O_2 oksidacijos srovė yra maksimalios vertės. Šios sąlygos leidžia skenuoti atstume, kur blokuojama difuzija neveikia –

O₂ redukcijos srovė šiame atstume nuo nusistovėjusios srovės vertės keitėsi iki $i_T/i_{T,\infty} = 0,2$. H₂O₂ koncentracija šiame atstume yra maksimali, todėl tai leidžia atlikti matavimus aukščiausia raiška. Horizontalus skenavimas, kuris buvo atliktas pastoviam 40 μm (d/a = 8) aukštyje nuo tiriamojo GOx modifikuoto paviršiaus, rodo, kad UME srovė nesant gliukozės tirpale yra santykinai maža (0-3 nA); esant 10 mM gliukozės, UME srovė išauga iki 24 nA (4 pav., B). Vaizdinimas buvo atliktas iš karto po reakcijos pradžios, tačiau H₂O₂ difuzija nuo GOx paviršiaus yra labai greita ir srovė didėja ne tik arti GOx paviršiaus (24 nA, x koordinatė nuo 100 iki 200 μm), bet taip pat aplink imobilizuotos GOx zoną (9 nA, x koordinatė nuo 0 iki 100 μm). Tuo pačiu metu srovės-atstumo kreivėje srovė keičiasi nuo 8 nA, kai UME yra toli (600-1000 μm) nuo GOx modifikuoto paviršiaus, iki 20 nA kai UME yra arti (20 μm) prie GOx modifikuoto paviršiaus.

3.3. GOx katalizuojamos reakcijos kinetikos tyrimai

3.3.1. Gliukozės oksidazės pasiskirstymo ant skirtingu elektriniu laidumu pasižyminčių paviršių

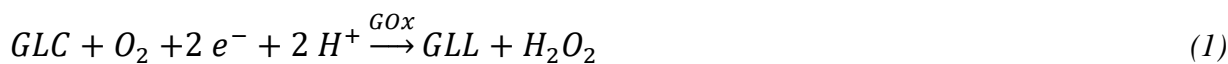
Gliukozės oksidazės pasiskirstymas skirtingo laidumo paviršiuose yra pateiktas AFM paveiksluose (5 pav.). 1 mm skersmens GOx lašai buvo suformuoti ant laidaus (aukso) ir nelaidaus (polimetilmetakrilato, PMMA) paviršių. Buvo nustatyta, kad ant PMMA modifikuoto GOx paviršiaus šiurkštumas yra 4,5 kartus didesnis negu ant aukso paviršiaus modifikuoto GOx. Išmatuota vidutinė šiurkštumo (RMS) vertė GOx nemonifikuoto PMMA paviršiui buvo 4 nm, tuo tarpu kai RMS vertė GOx nemonifikuoto PMMA buvo 84 nm. RMS vertė GOx nemonifikuotam aukso paviršiui buvo 25 nm, o RMS aukso paviršiui modifikuotam GOx buvo 386 nm. Tačiau GOx struktūros, suformuotos ant PMMA paviršiaus buvo tankesnės ir smulkesnės nei GOx struktūros susiformavusios ant GOx modifikuoto aukso paviršiaus.



5 pav. AFM matavimai prieš ir po fermento imobilizavimo: **A** – PMMA paviršius, **B** – PMMA paviršius modifikuotas GOx, **C** – aukso paviršius, **D** – aukso paviršius modifikuotas GOx. Matavimai atlikti ore kontaktiniu režimu.

3.3.2. Imobilizuotos gliukozės oksidazės kinetikos tyrimai

Tyrimai buvo atliekami RC-SECM režimu, kurio schema pateikta 1 pav. Gliukozė, tirpale esant ištirpusio deguonies, yra katalizuojama gliukozės oksidazės, o vandenilio peroksidas ir gliukonolaktonas susidaro reakcijos pavaizduoto 1-moje reakcijos lygtyje metu. Srovės vertė priklauso nuo elektrochemiškai aktyvių medžiagų koncentracijos arti UME paviršiaus ir nuo UME elektrodai užduoto potencialo. RC-SECM matavimo sistemoje (1 pav.) deguonis yra sunaudojamas: (i) redoks reakcijoje ant UME paviršiaus (2), o taip pat (ii) fermentinėje reakcijoje, kur deguonis atlieka oksidatoriaus vaidmenį perimdamas elektronus iš GOx (1).

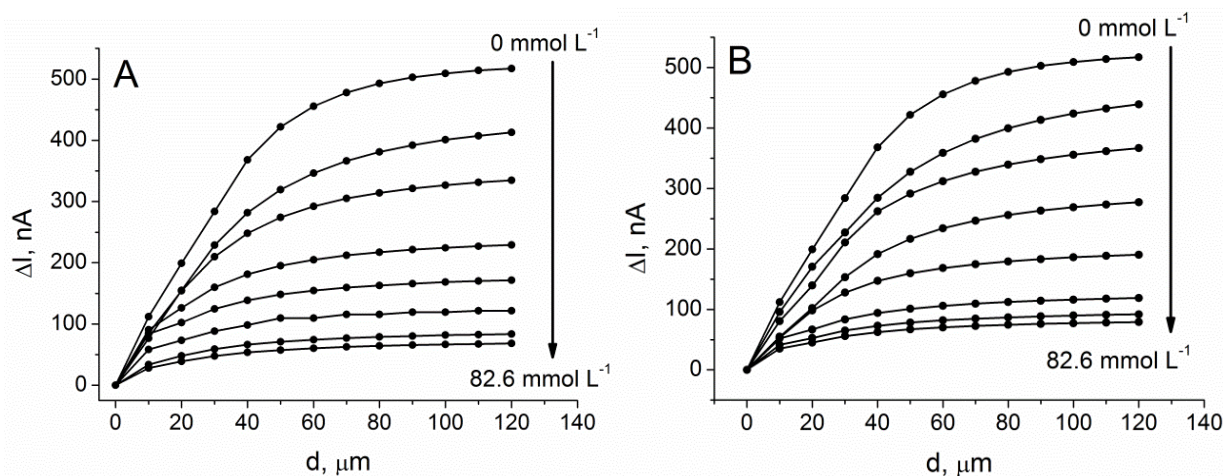


kur GLC - gliukozė, GLL - gliukonolaktonas.



Redoks konkurencijos režimas buvo naudojamas matuojant deguonies redukcijos srovę, užduodant UME elektrodai neigiamą -750 mV potencialą. GOx buvo imobilizuota ant skirtingo laidumo paviršių ir srovės atstumo matavimai buvo

atliekami buferiniame tirpale, keičiant gliukozės koncentraciją nuo 0 iki 82,6 mM (6 pav).

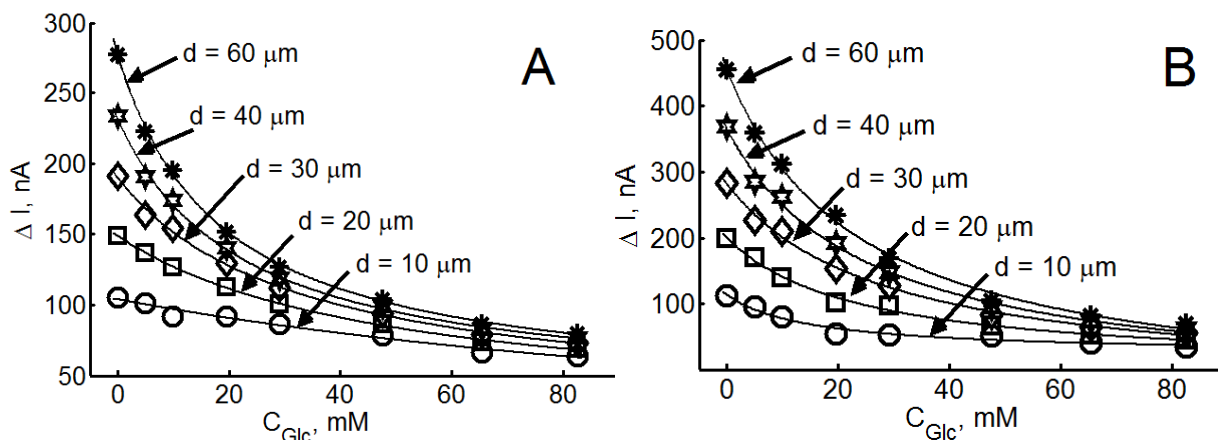


6 pav. Srovės priklausomybė nuo atstumo: **A** – fermentas imobilizuotas ant polimerinio elektrai nelaidaus paviršiaus; **B** – fermentas imobilizuotas ant auksinio elektrai laidaus paviršiaus. Matavimai atlikti 0,1 mM fosfatiniame-acetatiname buferyje, pH 6,7, esant 0-82,6 mM gliukozės koncentracijai. UME elektrodui užduotas –750 mV potencialas palyginamojo Ag/AgCl elektrodo atžvilgiu.

Foninė UME srovė, registruota esant mažiausiam atstumui iki tiriamo paviršiaus, buvo atimta iš visų kitų UME registruotų srovės verčių, siekiant įvertinti srovės pokytį ΔI . Didžiausias pokytis abiejų tiriamų paviršių atveju registruotas esant mažiausioms gliukozės koncentracijoms (6 pav.). Matavimuose be gliukozės srovės pokytis buvo 500 nA, tuo tarpu esant 82,6 mM gliukozės koncentracijai srovė pasikeitė tik 40 nA, lyginant su matavimais 120 μm atstumu nuo paviršiaus. UME srovės matavimai be gliukozės atspindi tik blokuojamos difuzijos įtaką elektrocheminiam signalui, nes deguonies koncentracija visame likusiame elektrodo neapribotame tirpale yra vienoda. Įdėjus gliukozės, UME srovė mažėja dėl deguonies suvartojamo fermentinėje reakcijoje. Lyginant duomenis, gautus ant skirtingo laidumo paviršių (6 pav.), matoma, kad rezultatai labai panašūs. Tokie rezultatai gaunami, nes, matuojant deguonį, ant aukso paviršiaus nevyksta atvirkščias deguonies redukcijai procesas, kaip būtų naudojant elektronų pernešimo tarpininkus. Todėl srovė artėjant prie paviršiaus tik mažėja. Tai vyksta dėl tokių priežasčių: i) O_2 naudojamas ant UME ir ant GOx paviršių esant neigiamam potencialui; ii) blokuojamoji difuzija gali būti įvertinta žinant elektrodo geometriją, ir šis sąryšis yra aprašytas neigiamojo grįžtamojo

ryšio teorija. Tačiau ši teorija gali būti taikoma tik tuo atveju, jei O_2 koncentracija yra vienoda visame tirpalo tūryje, tik tuomet srovės sumažėjimas arti paviršiaus yra sietinas su UME geometrija ir jo nelaidaus sluoksnio storium. Reikėtų pažymėti, kad difuzijos ribojama srovė (100-60 μm atstume) po gliukozės įdėjimo taip pat keičiasi ir yra kitokia, lyginant su srove, gauta matuojant tirpale be gliukozės.

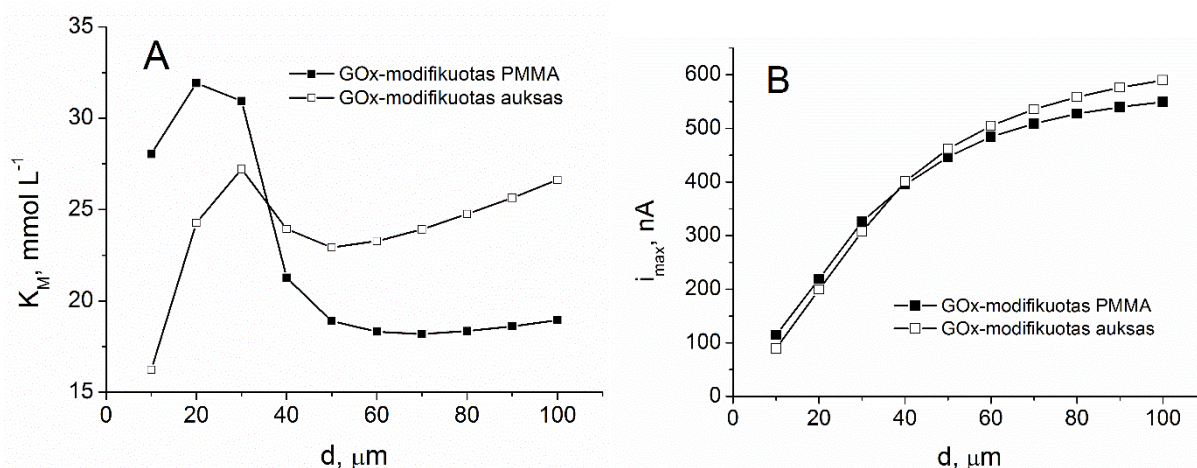
Metodas, taikytas fermentinei kinetikai įvertinti, buvo paremtas srovės-substrato koncentracijos priklausomybe, kuri yra tinkama taikyti Michaelio-Menten lygčiai. Iš srovės-atstumo matavimų, atliktų esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms (6 pav.), mes nustatėme srovės-koncentracijos priklausomybes (7 pav.). Didžiausias srovės pasikeitimas buvo užregistruotas tolimiausiuose tirtuose atstumuose nuo paviršiaus; pavyzdžiui, 100 μm atstume UME srovės pokytis buvo 500 nA, o 10 μm atstume srovės pokytis buvo tik 40 nA. Šis efektas yra susijęs su blokuojamąja difuzija, nes artimuose atstumuose šis efektas turi didesnę įtaką. Taip pat, šalia imobilizuotos GOx sluoksnio O_2 koncentracija yra daug mažesnė dėl O_2 suvartojimo fermento katalizuojamoje reakcijoje.



7 pav. A – GOx imobilizuota ant nelaidaus (PMMA), **B** – ant laidaus (Aukso) paviršiaus. Aproximavimui buvo pritaikyta Michaelis-Menten kinetika. UME potencialas -750 mV palyginamojo Ag/AgCl elektrodo atžvilgiu.

Teoriškai tariamosios Michaelio konstantos ($K_{\text{M(app.)}}$) vertė GOx sluoksniui turi būti ta pati. Tačiau naudojant SECM, galima suskaičiuoti skirtingas $K_{\text{M(app.)}}$ vertes skirtingiems atstumams (8 pav., A), nes UME visada bus tam tikrame atstume nuo bandinio, o tirpalo sluoksnis, esantis tarp bandinio ir UME, atlieka difuzinio sluoksnio vaidmenį. Priklausomybės, nusakančios $K_{\text{M(app.)}}$ priklausomybę nuo atstumo tarp UME ir laidaus bei nelaidaus tiriamojo paviršiaus, ant kurių yra

imobilizuota GOx yra panašaus pobūdžio (8 pav., A). $K_{M(app.)}$ vertė išlieka ta pati 100-60 μm atstumuose, kur blokuojamoji difuzija signalui neturi įtakos. Nuo 20 μm iki 60 μm atstumų ribose $K_{M(app.)}$ vertė didėja didėjant atstumui, kai GOx yra imobilizuota ant nelaidaus paviršiaus ir atstumų ribose nuo 30 μm iki 60 μm $K_{M(app.)}$ vertė didėja didėjant atstumui kai GOx yra imobilizuota ant laidaus paviršiaus. Tik atstumų ribose, mažesnėse nei 20-30 μm $K_{M(app.)}$ žymiai sumažėja: kai GOx yra imobilizuota ant nelaidaus paviršiaus, $K_{M(app.)}$ yra 23 mM; kai GOx yra imobilizuota ant laidaus paviršiaus, $K_{M(app.)}$ yra 18 mM. Ta pati $K_{M(app.)}$ vertė nustatoma abiem atvejais 36 μm atstume, kur $K_{M(app.)}$ yra lygi 26 mM. Suskaičiuotos maksimalios srovės i_{max} vertės pasižymi panašia priklausomybe ant abiejų laidaus ir nelaidaus paviršių (8 pav., B).

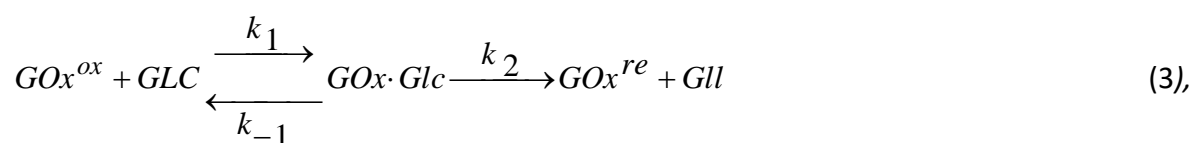


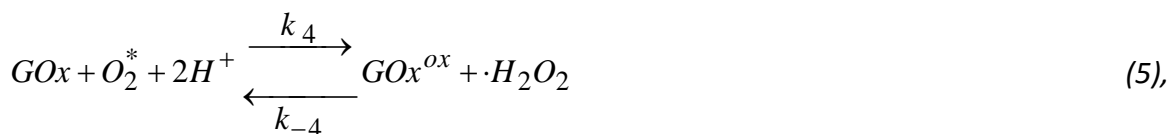
8 pav. Tiriamosios Michaelio konstantos - **A** ir maksimalios srovės - **B** priklausomybės nuo atstumo. GOx – gliukozės oksidazė.

3.3.2. SECM Redoks konkurencijos režimo modeliavimas

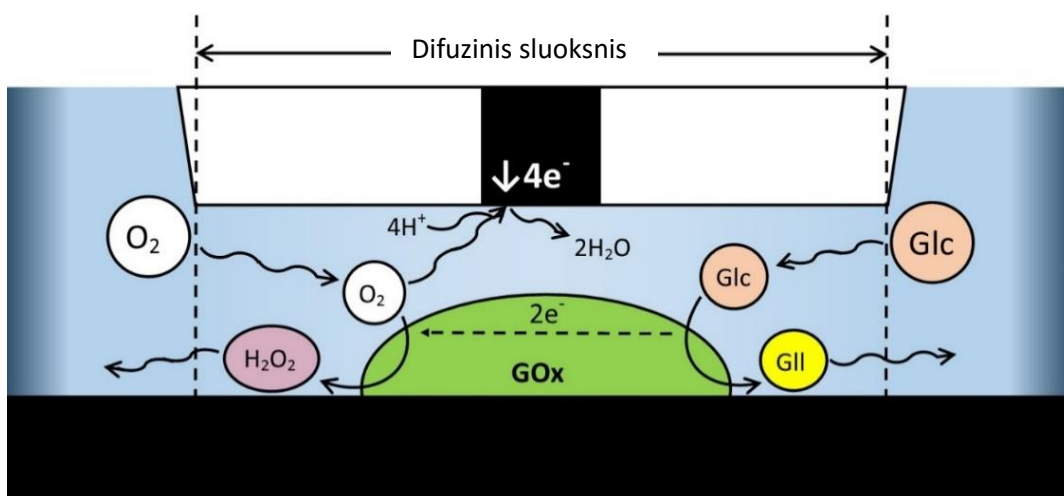
Teorija

Gliukozės oksidazė, esant tirpale ištirpusiam deguoniui (O_2^*) yra katalizuojama GOx. Šio proceso metu O_2^* yra naudojamas, vandenilio peroksidas ir gliukonolaktonas susidaro pagal lygtis (3-5).





kur *Glc* yra gliukozė, *Gll* yra gliukono rūgšties laktonas.



9 pav. SECM Redoks konkurencijos režimo matavimo schema. Deguonis yra naudojamas: (i) GOx katalizuojamoje reakcijoje ir (ii) elektrocheminėje reakcijoje ant UME paviršiaus, esant -500 mV potencialui Ag/AgCl elektrodo atžvilgiu, kai deguonis, esant tirpale H^+ , yra konvertuojamas į H_2O . *Glc* – gliukozė, *Gll* – gliukono rūgšties laktonas.

Redoks konkurencijos režimas buvo taikomas siekiant išmatuoti O_2^* redukcijos srovę. Esant -500 mV potencialui, O_2^* yra redukuojamas į vandenį ant UME paviršiaus pagal reakciją (6). Matematinis modelis buvo kuriamas atsižvelgiant į sąlygas, pateiktas 9 pav. Difuzinis sluoksnis formuojasi tarp GOx paviršiaus ir UME. Deguonis ir gliukozė difunduoja iš išorinio sluoksnio į difuzinį sluoksnį. Vykstant reakcijai, jos metu susidarę produktai (H_2O_2 ir gliukono rūgšties laktonas) difunduoja iš difuzinio sluoksnio į išorinį tirpalą. UME paviršiuje elektronai yra perduodami deguoniui, kuris redukuojasi esant tirpale H^+ . Deguonis yra taip pat naudojamas ant GOx ir dėl to ši konkurencijos srovė mažėja proporcingai GOx suvartojamam deguoniui. Deguonies koncentracija nevykstant reakcijai tirpale yra $253 \mu M$.

Matematinis modelis

Difuziniai procesai buvo išreiškiami pagal antrą Fiko dėsnį:

$$\begin{aligned}\frac{\partial[O_2]}{\partial t} &= D_{O_2} \Delta[O_2], & \frac{\partial[Glc]}{\partial t} &= D_{Glc} \Delta[Glc], \\ \frac{\partial[H_2O_2]}{\partial t} &= D_{H_2O_2} \Delta[H_2O_2], & \frac{\partial[GII]}{\partial t} &= D_{GII} \Delta[GII]\end{aligned}$$

kai $0 < t \leq T, 0 < z < d, 0 < r < r_{glass}$,

kur d yra atstumas tarp fermentu modifikuoto paviršiaus ir UME. $[O_2]$, $[Glc]$, $[H_2O_2]$, $[GII]$ yra atitinkamų reagentų koncentracijos, išreiškiamos kaip laiko t funkcijos koordinatėse z (vertikali koordinatė) ir r (horizontali koordinatė, UME spindulys). r_{glass} – nelaidaus sluoksnio spindulys, D_{O_2} , ..., D_{GII} yra difuzijos koeficientai, atitinkamai O_2, \dots, GII ir Laplaso operatorius Δ deguoniui O_2 cilindrinėse koordinatėse yra:

$$\Delta[O_2] = \frac{\partial^2[O_2]}{\partial z^2} + \frac{\partial^2[O_2]}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial[O_2]}{\partial r}$$

Diferencialinės reakcijų lygtys nedifunduojantiems reagentams ant paviršiaus $z = 0$ yra užrašomos iš cheminių lygčių (3-5):

$$\begin{aligned}\frac{\partial[GOx^{ox}]}{\partial t} &= -k_1[GOx^{ox}][Glc] + k_{-1}[GOx \cdot GII] + k_4[GOx \cdot O_2^*][H^+]^2 - \\ &\quad - k_{-4}[GOx^{ox}][H_2O_2], \\ \frac{\partial[GOx \cdot GII]}{\partial t} &= k_1[GOx^{ox}][Glc] - (k_{-1} + k_2)[GOx \cdot GII], \\ \frac{\partial[GOx^{red}]}{\partial t} &= k_2[GOx \cdot GII] - k_3[GOx^{red}][O_2^*] + k_{-3}[GOx \cdot O_2^*], \\ \frac{\partial[GOx \cdot O_2^*]}{\partial t} &= k_3[GOx^{red}][O_2^*] - k_{-3}[GOx \cdot O_2^*] - k_4[GOx \cdot O_2^*][H^+]^2 + \\ &\quad + k_{-4}[GOx^{ox}][H_2O_2]\end{aligned}$$

$$\text{kai } 0 < t \leq T, \quad 0 < r < r_{glass}$$

kur $[GOx^{ox}]$, $[GOx \cdot GII]$, $[GOx^{red}]$, $[GOx \cdot O_2^*]$ yra koncentracijos, priklausančios nuo laiko t ir UME spindulio r .

Reakcijų lygtys difunduojančioms substancijoms ant pagrindo $z=0$ yra taip pat išvedamos iš lygčių (3-5) ir naudojamos kaip pradinės sąlygos ant $z=0$:

$$D_{O_2} \frac{\partial [O_2^*]}{\partial z} = k_3 [GOx^{red}] [O_2^*] - k_{-3} [GOx \cdot O_2^*],$$

$$D_{Glc} \frac{\partial [Glc]}{\partial z} = k_1 [GOx^{ox}] [Glc] - k_{-1} [GOx \cdot Gll],$$

$$D_{H_2O_2} \frac{\partial [H_2O_2]}{\partial z} = -k_4 [GOx \cdot O_2^*] [H^+]^2 + k_{-4} [GOx^{ox}] [H_2O_2],$$

$$D_{Gll} \frac{\partial [Gll]}{\partial z} = -k_2 [GOx \cdot Gll] \quad \text{kai } 0 < t \leq T, \quad 0 < r < r_{glass}.$$

Reakcijos pradžioje, kai $t = 0$ pradinės medžiagų koncentracijos yra tokios:

$$[O_2^*] = 253 \mu M, \quad [Glc] = [H_2O_2] = [Gll] = 0 M$$

kai $0 < z < d, \quad 0 < r < r_{glass}$

$$[GOx^{ox}] = 2,114 \text{ mol} / m^2,$$

$$[GOx \cdot Gll] = [GOx^{red}] = [GOx \cdot O_2^*] = 0 \text{ mol} / m^2$$

kai $z = 0, \quad 0 < r < r_{glass}.$

Kadangi procesas yra neįtakojamas $[H^+]$, tuomet $[H^+] = 1$. Dėl simetrijos, centre $r = 0$, kur nėra pratekėjimo:

$$\frac{\partial [O_2^*]}{\partial r} = \frac{\partial [Glc]}{\partial r} = \frac{\partial [H_2O_2]}{\partial r} = \frac{\partial [Gll]}{\partial r} = 0 \quad \text{kai } 0 < t \leq T, \quad 0 < z < d.$$

Difuzinio sluoksnio kraštuose $r = r_{glass}$, tai yra ant nelaidaus sluoksnio kraštų, pradinės sąlygos yra:

$$O_2^* = 253 \mu M, \quad [Glc] \in (0-0,6) \text{ mM}, \quad \text{kai } 0 < z < d, \quad t > 0.$$

Visas kiekis $[H_2O_2]$ ir $[Gll]$ difunduoja į išorę nuo krašto $r = r_{glass}$, tuomet

$$[H_2O_2] = [Gll] = 0, \quad \text{kai } 0 < z < d, \quad t > 0 \text{ ir } r = r_{glass}.$$

Pagaliau, kraštui $z = d$ ant nelaidaus sluoksnio $r > r_{el}$ kur nėra pratekėjimo:

$$\frac{\partial [O_2^*]}{\partial z} = \frac{\partial [Glc]}{\partial z} = \frac{\partial [H_2O_2]}{\partial z} = \frac{\partial [Gll]}{\partial z} = 0 \quad \text{kai } z = d \text{ ir } r_0 < r < r_{glass}.$$

Ant elektrodo ($r < r_{el}$) visas O_2^* yra suvartojamas dėl reakcijos (6) greičio:

$$O_2^* = 0, \quad \text{kai } z = d \text{ ir } 0 < r < r_{el}$$

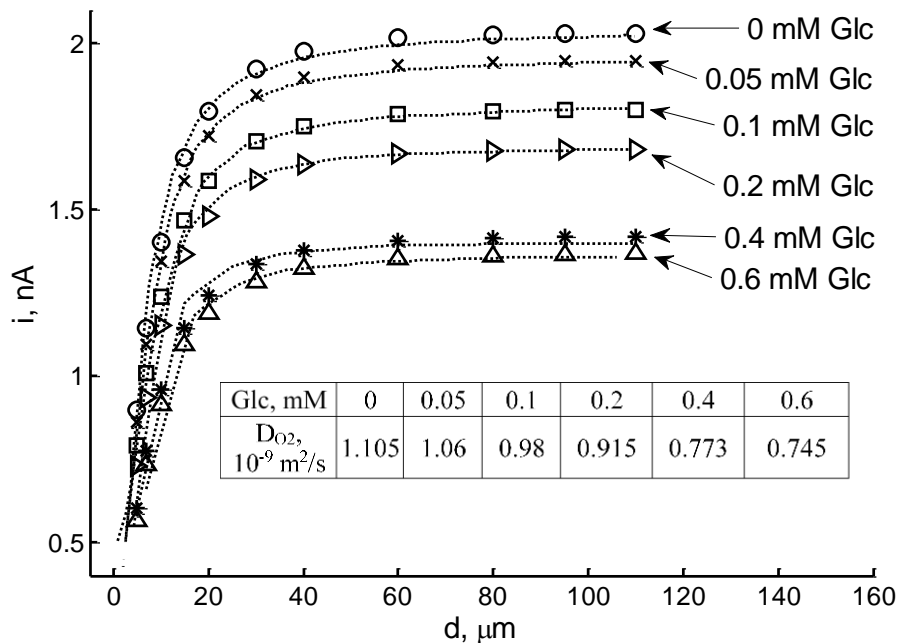
kur r_{el} yra laidaus elektrodo sluoksnio spindulys.

Kitos trys medžiagos yra blokuojamos elektrodo ir nelaidaus sluoksnio:

$$\frac{\partial[Glc]}{\partial z} = \frac{\partial[H_2O_2]}{\partial z} = \frac{\partial[GlI]}{\partial z} = 0 \quad \text{kai } z = d \text{ ir } 0 < r < r_{glass}.$$

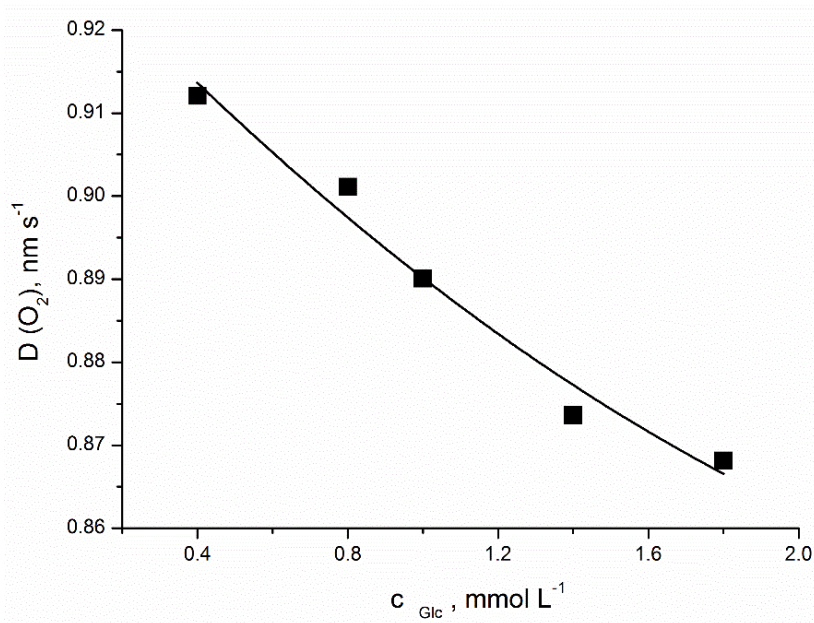
Palyginimas su eksperimento rezultatais

Modeliavimo duomenys buvo palyginti su eksperimento duomenimis (10 pav.). Ribinės difuzijos srovės vertės keitėsi keičiant gliukozės koncentraciją tirpale. Deguonies koncentracija, tuo pačiu ir UME srovė srityje, kuri yra neveikiama difuzijos, buvo laikoma ta pati visoms gliukozės koncentracijoms. Tačiau srovė yra proporcinga ne tik deguonies koncentracijai, bet taip pat priklauso ir nuo deguonies difuzijos greičio tirpale. Deguonies difuzijos koeficientas priklauso nuo tam tikrų medžiagų koncentracijos tirpale, pavyzdžiui: druskų (NaCl, KH₂PO₄, K₂HPO₄), kurios būna buferiniame tirpale, gliukozės, ir t.t.



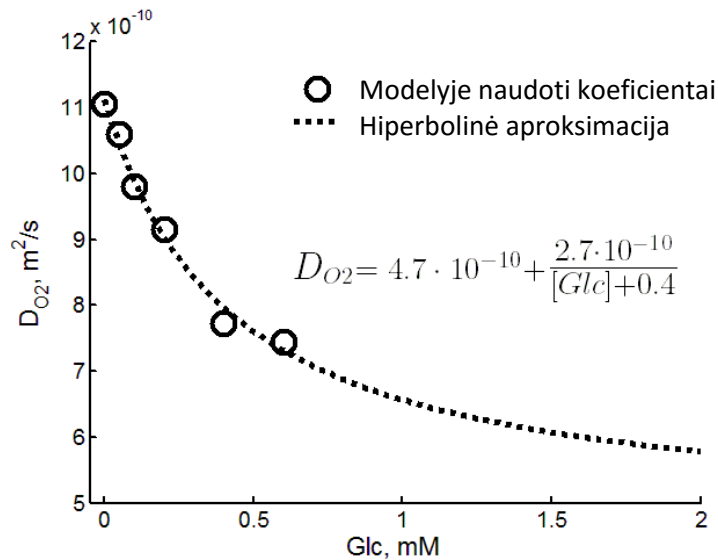
10 pav. Srovės-atstumo priklausomybės, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms buferiniame tirpale. Glc – gliukozė, D_{O₂} – deguonies difuzijos koeficientas. Simboliais pažymėti modeliavimo duomenys, linijomis – eksperimentiniai duomenys.

Todėl difuzijos koeficientas buvo pritaikytas atskirai kiekvienai gliukozės koncentracijai. Buvo ištirta difuzijos įtaka UME srovei tirpale su skirtingomis gliukozės koncentracijomis be imobilizuoto fermento. Šis eksperimentas parodė ryškų difuzijos koeficiento sumažėjimą lyginant su gautuoju buferiniame tirpale (11 pav.).



11 pav. Difuzijos greičio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos buferiniame tirpale. Glc – gliukozė, $D(\text{O}_2)$ – deguonies difuzijos koeficientas. Matavimai atlikti nesant fermentinės reakcijos.

Taigi, taikant modelį prie išmatuotų srovės verčių, difuzijos koeficientas buvo vienas iš svarbiausių kintamų parametrų. Mūsų eksperimentuose naudojome buferinį tirpalą su 0,1 M KCl ir su tam tikra gliukozės koncentracija. Iš literatūros analizės yra žinoma, kad deguonies difuzijos koeficientas kinta priklausomai nuo gliukozės koncentracijos ir NaCl, įdėtų į vandenį atskirai. Mūsų atveju buferiniame tirpale buvo keletas druskų ir gliukozė kartu, todėl tikėtina, kad tai galėjo smarkiau įtakoti difuzijos koeficientą. Siekiant nustatyti mūsų naudojamos sudėties tirpalo įtaką difuzijos koeficientui, atlikome eksperimentą tomis pačiomis sąlygomis, bet nesant fermentinės reakcijos (11 pav.). Kai fermentinė reakcija vyksta, difuzijos koeficientas yra beveik vienodas esant 0,4-0,6 mM gliukozės koncentracijai (12 pav.), tuo tarpu kai matavimai nesant fermentinės reakcijos rodo tiesinę priklausomybę esant 0,4-1,8 mM gliukozės koncentracijai.

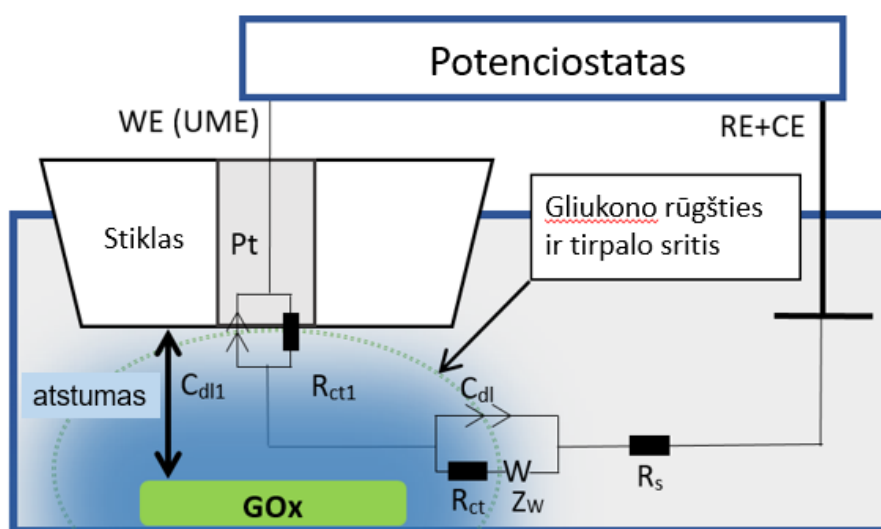


12 pav. Difuzijos greičio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos buferiniame tirpale. Glc – gliukozė, $D(O_2)$ – deguonies difuzijos koeficientas.

3.4. Skenuojančios elektrocheminio impedanso mikroskopijos taikymas

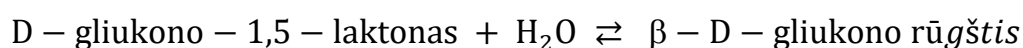
Elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS) yra paremta kintamosios srovės matavimu, kai sinusinis mažos įtampos amplitudės žadinimo signalas pasirinktame dažnių spektre yra taikomas elektrocheminei sistemai. Tokio žadinimo rezultatas yra kintamoji srovė su pasislinkusia faze, kuri yra matuojama darbinio elektrodo (SECM atveju – UME). Matuojamasis signalas yra paremtas kompleksiniu impedansu, kuris priklauso nuo tirpalo varžos, dvigubo elektrinio sluoksnio talpų ant darbinio ir atraminio elektrodų, bei krūvio pernešimo varžos tarp šių elektrodų. Derinant EIS ir SECM, galima matuoti kintamosios srovės pokyčius tirpalo tūryje, nes UME gali būti pozicionuojamas pasirinktu atstumu virš tiriamojo paviršiaus. Tokia metodika vadinama skenuojančia elektrocheminio impedanso mikroskopija (SEIM). Gauti duomenys buvo analizuojami naudojant ekvivalentinę elektrinę grandinę, kuri pateikta 13 pav. SEIM yra naudojamas rečiau lyginant su kintamosios srovės vieno dažnio SECM, kadangi skenavimas vienu dažniu trunka daug trumpiau. Tačiau SEIM privalumas yra tas, kad EIS matavimai taikomi plačiame dažnių ruože kiekvienoje UME padėtyje bandinio atžvilgiu. Tokie matavimai leidžia įvertinti elektrocheminės sistemos atsaką į elektrocheminį žadinimą sinusoidės formos kintančiu potencialu; taip pat galima

sukurti sistemos 3D modelį, nustatyti tinkamiausią ekvivalentinę elektrinę grandinę ir jos parametrus, kurie nusako sistemą. Svarbu yra tai, kad tokie matavimai leidžia tuos parametrus nustatyti pasirinktoje tirpalo pozicijoje virš tiriamojo bandinio. Reakcijos produktai, įtakojantys tirpalo laidumą, difunduoja nuo chemiškai aktyvių bandinio zonų į tirpalą; todėl SEIM su judinamu UME yra vienas iš geriausių metodų reakcijos produktų difuzijai tirti pasirinktame tirpalo tūryje. Žinant, kad EIS matavimai dažnai trunka ilgą laiką, laidumo pokytis laike taip pat yra įvertinamas.



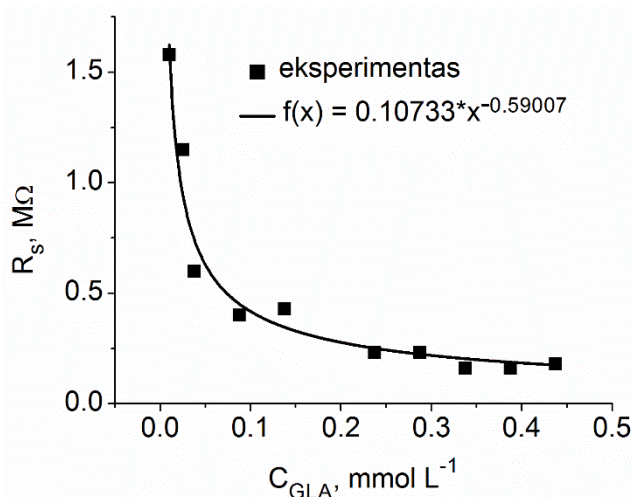
13 pav. Eksperimento schema. R_s – tirpalo varža, R_{ct} – krūvio pernešimo varža, C_{dl} – pseudo dvigubo elektrinio sluoksnio talpa, Z_w – Warburgo impedansas. C_{dl1} – dvigubo elektrinio sluoksnio talpa UME/tirpalo srityje, R_{ct1} – krūvio pernešimo varža per UME/tirpalo sritį. GOx – gliukozės oksidazė.

Gliukozės oksidacija, tirpale esant O_2 , yra katalizuojama GOx, šioje reakcijoje susidarantys produktai yra vandenilio peroksidas (H_2O_2) ir D-gliukono-1,5-laktonas, kuris greitai hidrolizuojamas į β -D-gliukono rūgštį:



Taigi, impedanso spektro pokyčiai yra labiausiai susiję su gliukono rūgšties koncentracijos pokyčiu, nes jos koncentracija įtakoja pseudo dvigubo sluoksnio elektrinę talpą ir tirpalo varžą. Dėl difuzijos efekto, gliukono rūgšties koncentracija mažėja didėjant atstumui tarp UME ir GOx. Siekiant patikrinti tirpalo varžos

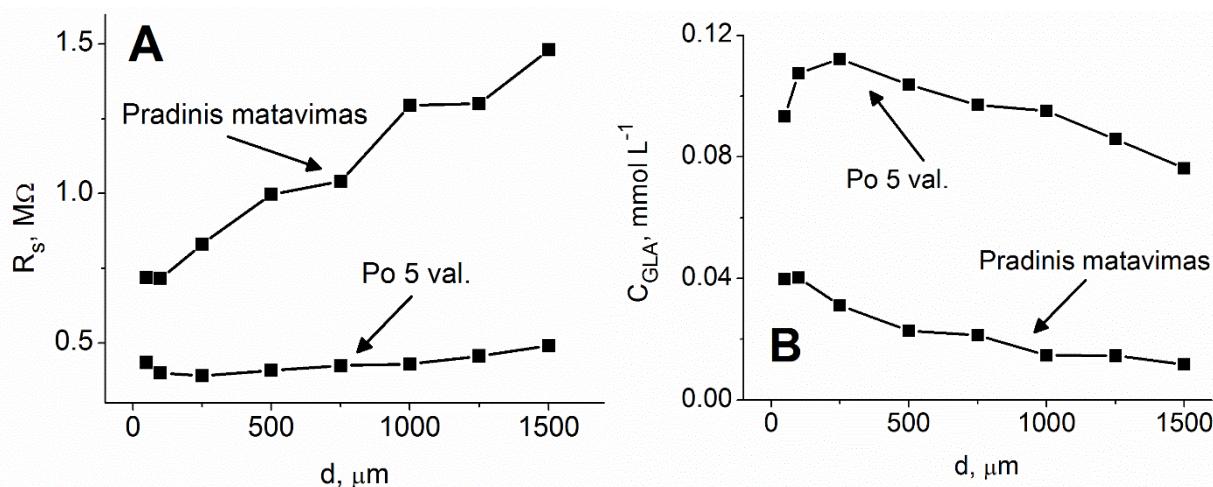
pokyčio priklausomybę nuo gliukono rūgšties koncentracijos, elektrocheminis impedansas buvo matuojamas esant skirtingoms gliukono rūgšties koncentracijoms (14 pav.). Ekvivalentinės elektrinės grandinės vertės buvo taikomos išmatuotiems impedanso spektrams, ir buvo apskaičiuota tirpalo varžos priklausomybė nuo gliukono rūgšties koncentracijos. Tirpalo varža R_s mažėjo, didinant gliukono rūgšties koncentraciją.



14 pav. Tirpalo varžos priklausomybė nuo gliukono rūgšties koncentracijos. Kalibravimo kreivė.

Buvo atliekami elektrocheminio impedanso matavimai įvairiuose atstumuose nuo paviršiaus, tirpalo varžai apskaičiuoti buvo taikomas tas pats ekvivalentinės elektrinės grandinės modelis. UME artėjant prie bandinio (15 pav.), tirpalo varža mažėjo nuo 1,5 iki 0,7 MΩ. Šie pokyčiai yra susiję su gliukono rūgšties difuzija iš fermentu modifikuoto sluoksnio į tirpalą. Tirpalo varžos pokyčiai buvo susieti su gliukono rūgšties koncentracija naudojant priklausomybę, pateiktą 14 paveiksle. Kai UME artėja prie paviršiaus, jis pirmiausia pasiekia sluoksnį kuriame yra nedidelė, bet tirpalo laidumą pakankamai ženkliai įtakojanti gliukono rūgšties koncentracija; tačiau artėjant dar arčiau, UME pasiekia tokį tašką, kuriame gliukono rūgšties koncentracija yra didžiausia. Apskaičiuota gliukono rūgšties koncentracija keitėsi nuo 0,011 mM (1,5 mm atstume nuo GOx) iki 0,040 mM (50 μm nuo GOx). Po 5 valandų nuo reakcijos pradžios tirpalo varža visuose atstumuose nusistovėjo beveik vienoda ir buvo apytikriai 0,4 MΩ. Gliukono rūgšties koncentracija keitėsi nuo 0,076 mM (1,5 mm atstumu nuo GOx

modifikuoto sluoksnio) iki 0,093 mM (50 μm atstumu nuo GOx modifikuoto sluoksnio).



15 pav. A – Apskaičiuota tirpalo varžos priklausomybė nuo atstumo 0,1 mM gliukozės tirpale; **B** – Gliukono rūgšties (GLA) koncentracijos priklausomybė nuo atstumo, perskaičiuota iš duomenų 15 pav. A.

Visuose atstumuose (nuo 250 iki 1500 μm) tarp UME ir tiriamojo paviršiaus gliukono rūgšties koncentracija artėjant prie GOx didėja. Kai atstumas tarp UME ir tiriamojo paviršiaus tampa mažesnis nei 100 μm UME patenka į „artimo paviršiaus“ zoną, kur srovė yra blokuojama dėl itin apsunkintos difuzijos.

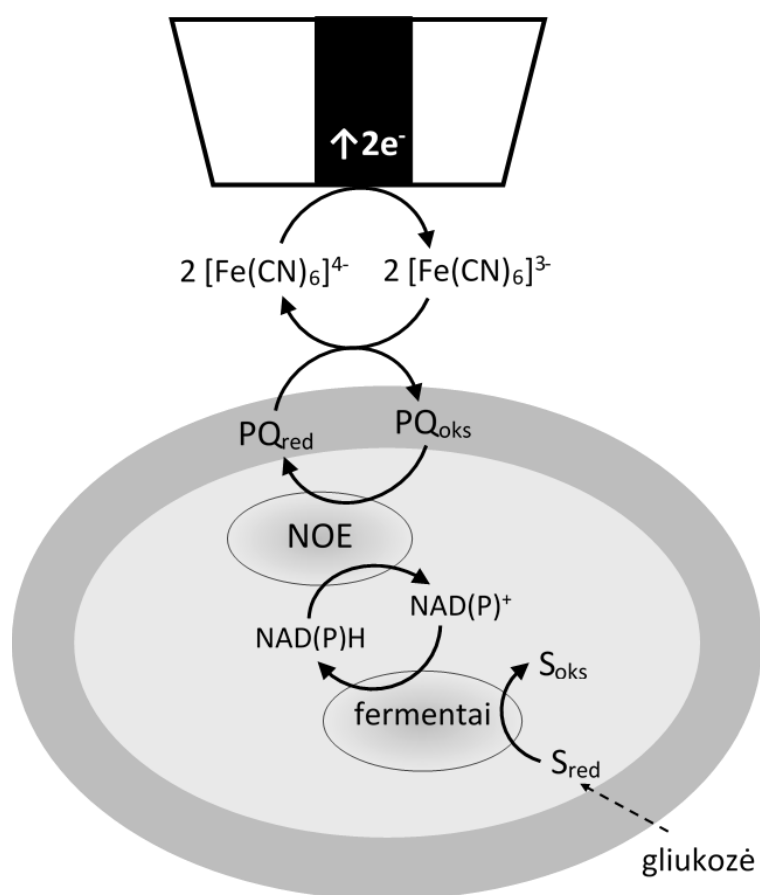
3.5. Mielių ląstelių tyrimai SECM metodu

Gyvos ląstelės yra bene sudėtingiausios ir įdomiausios biocheminės sistemos naudojamos tyrimams, todėl įvairių efektų įtakos tyrimai ląstelėse vykstantiems procesams yra labai svarbūs. SECM metodu tiriamos ląstelės turi būti imobilizuotos, o ląstelėse vykstančių procesų metu susidarantys produktai yra registruojami UME.

3.5.1. Dviejų krūvio pernešimo tarpininkų sistemos taikymas mielių ląstelių tyrimuose SECM metodu

Procesų, vykstančių naudojant dviejų elektronų pernešimo tarpininkų sistemą, schema pateikta 16 pav. NAD(P)H yra oksiduojamas į NAD(P)⁺, toks procesas vyksta daugybėje reakcijų gyvoje ląstelėje. NADH ir NAD(P)H yra redukuota nikotinamido adenino dinukleotido (NAD) ir nikotinamido adenino dinukleotido fosfato (NAD(P)) kofaktorių forma, NAD⁺ ir NAD(P)⁺ yra oksiduotos

formas. NAD yra ląstelėje esanti biologinė molekulė, kuri dalyvauja daugelyje metabolizmo reakcijų. Daug žmogaus ligų yra susiję su NAD ir/arba NAD⁺ koncentracijų arba NAD/NAD⁺ santykio pasikeitimu. Ląstelėse *S. cerevisiae*, dviejų krūvio pernešimo tarpininkų sistemos atsakas atsiranda iš lipofilinio mediatoriaus redukcijos, atliekamos NAD(P)H, kuris gaminamas pentozų fosfatų kelyje. NAD(P)H ląstelėje yra gaminamas iš NAD(P)⁺ ir H⁺ naudojant du elektronus, kurie yra gaunami iš gliukozės oksidacijos. Reakcijos produktas NAD(P)H gali būti reoksiduotas naudojant NAD(P)H oksiduojančius fermentus (NOE) atgal į NAD(P)⁺.

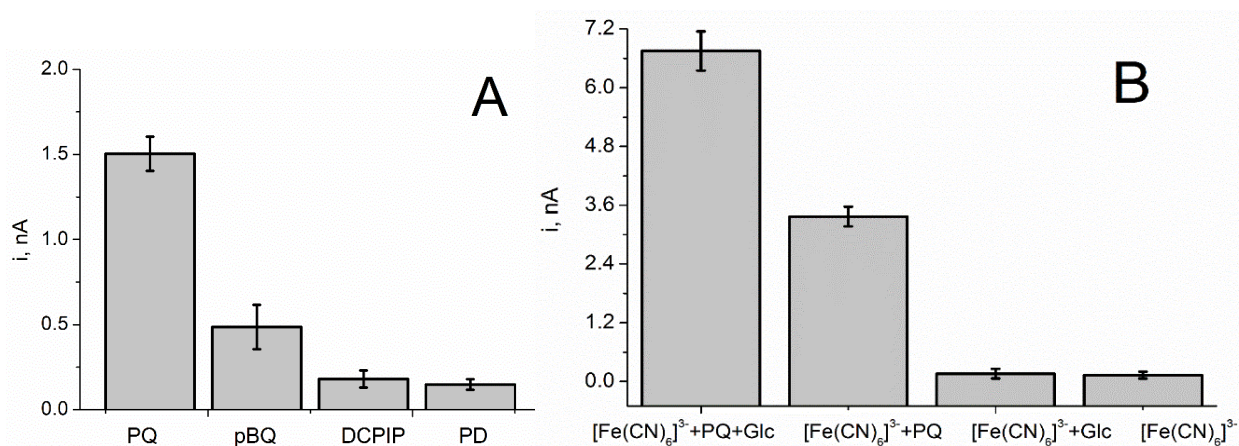


16 pav. SECM matavimo sistema, naudojant du elektronų pernešimo tarpininkus. PQ difunduoja į ląstelės sienelę, į vidinę membranos pusę ir ten yra redukuojamas NAD(P)H. Vėliau difunduojant atgal į išorinę membranos pusę ir perduoda elektronus $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Susidariusio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ oksidotos formos koncentracija yra nustatoma amperometriškai, kai UME potencialas +400 mV. Gliukozės įdėjimas į tirpalą leidžia formuotis NADH ir NAD(P)H glikolizės procese ir pentozės fosfato metaboliniuose keliuose. Šiame paveiksle terminas „fermentai“ apibendrina gliceraldehido 3-fosfat dehidrogenazę, gliukozės 6-fosfato dehidrogenazę, 6-fosfogliukonato dehidrogenazę ir kitus fermentus, dalyvaujančius metabolizmo procesuose vykstančiuose ląstelėje; sutrumpinimai „S_{red}“ and „S_{oks}“ atitinkamai reiškia redukuotą ir oksiduotą formas šių fermentų substratų; sutrumpinimas „NOE“ reiškia NAD(P)H oksiduojančius fermentus.

Abi aukščiau minėtos reakcijos yra viduląstelinės, todėl elektronų pernašą per ląstelės membraną gali atlikti tik lipofilinis mediatorius. Lipofilinis 9,10-fenantrenchinonas (PQ) gali pasiekti ląstelės membranos vidinę pusę, kur jis yra redukuojamas, difunduoja atgal per membraną į tirpalą ir perduoda elektronus hidrofiliniam $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ jonui, redukuodamas jį į $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ant elektrodo generuoja srovę, kuri indikuoja NOE aktyvumą mielių ląstelėje. Kai ląstelės yra imobilizuotos ant paviršiaus, UME yra visada tam tikrame atstume nuo paviršiaus, todėl matuojamasis rezultatas priklauso nuo atstumo. Mūsų tikslas buvo ne tik matuoti elektrocheminį aktyvumą, bet taip pat gauti aukštos skyros ląstelių aktyvumo paveikslą, o šiam tikslui pasiekti turi būti tinkamai parinktas skenavimo atstumas. Naudojant GC-SECM režimą, reakcija vyksta visą laiką, kol atliekamas matavimas. Mūsų tyrimai rodo, kad nusistovėjusi srovė pasiekama tik po 18 min mielių ląstelių inkubacijos su abiem elektronų pernešimo tarpininkais.

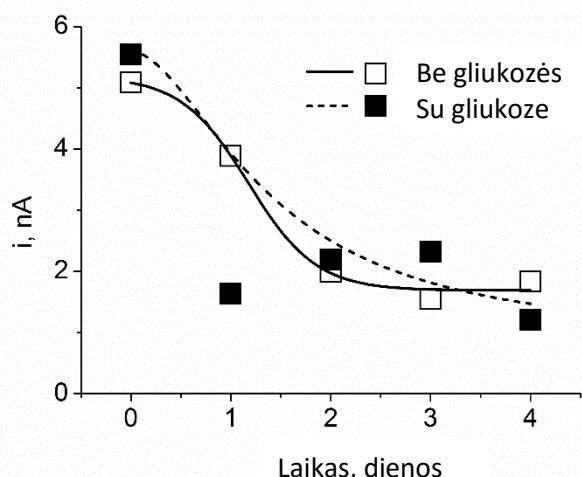
3.5.2. Chronoamperometriniai matavimai

Keturi skirtingi elektronų pernešimo tarpininkai PQ, pBQ, PD, DCPIP buvo panaudoti neimobilizuotų mielių ląstelių matavimams tirpale, kuriame fericianidas buvo ištirpintas PBS (17 pav., A). UME srovė, išmatuota naudojant PQ kaip antrą elektronų pernešimo tarpininką, buvo daugiau nei 3 kartus didesnė naudojant kitus elektronų pernešimo tarpininkus. Kitas chronoamperometrinis eksperimentas buvo atliktas siekiant parodyti, kad srovės signalas atitinka mielių elektrocheminį aktyvumą (17 pav., B). Kai tik fericianidas buvo PBS su ištirpintomis mielių ląstelėmis, tuomet UME srovės buvo labai maža. UME srovė liko tokia pati, įdėjus į tirpalą 10 mM gliukozės. Tai patvirtina, kad naudojant tik vieną elektronų pernešimo tarpininką kalio fericianidą, mielių elektrocheminio aktyvumo užregistruoti neįmanoma, nes jis nepereina per ląstelės membraną. Bet dviejų elektronų pernešimo tarpininkų (fericianido ir PQ) sistemos taikymas leidžia registruoti srovės signalą, netgi jei gliukozės nėra tirpale. Šis reiškinys gali būti aiškinamas tuo, kad mielių ląstelės turi savyje tam tikrų medžiagų, tinkamų metabolizmui. Pagaliau, įdėjus 10 mM gliukozės, UME srovė stipriai išauga. Inkubacijos eksperimentas su ir be gliukozės tirpale buvo atliekamas 4 dienas (18 pav.).

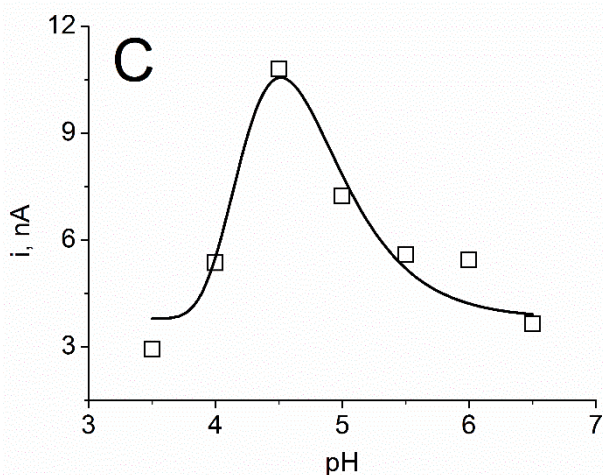
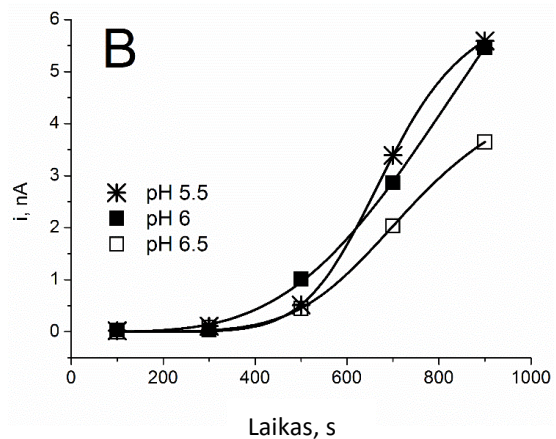
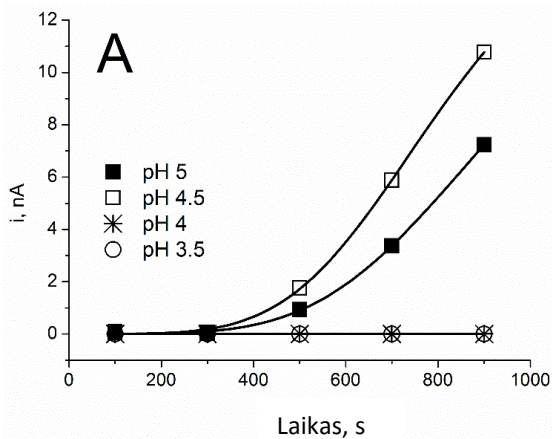


17 pav. A. Nusistovėjusios srovės, išmatuotos chronoamperometriškai esant +400 mV potencialui Ag/AgCl atžvilgiu tirpale esant: 6,7 mg mL⁻¹ mielių, 5 mM kalio fericianido, 10 mM gliukozės (Glc) ir 100 μM antro elektronų pernešimo tarpininko, po 10 min inkubacijos. **B.** Srovės priklausomybė nuo tirpalo sudėties po 10 min inkubacijos.

Mielių aktyvumo sumažėjimas gali būti gerai aprašomas Hilo funkcija. Geresnis atitikimas Hilo funkcijai buvo gautas ląstelėms, inkubuotoms PBS be gliukozės. Tai gali būti susiję su gliukozės ir kitų maitinančių medžiagų koncentracijos sumažėjimu ląstelėse, nes esant šioms sąlygoms ląstelės greičiau žūva. Mielių ląstelės, inkubuotos su gliukoze PBS, po 24 valandų rodo mažą gyvybingumą. Tai gali būti susiję su etanolio gamyba, kuris įtakoja ląstelių gyvybingumą.



18 pav. Mielių ląstelių inkubacija su ir be gliukozės PBS. Chronoamperometriniai matavimai buvo atlikti esant +400 mV potencialui Ag/AgCl atžvilgiu tirpale esant: 6,7 mg/mL mielių, 5 mM kalio fericianido, 100 μM PQ ir 10 mM gliukozės. Eksperimentiniai duomenis buvo pritaikyta Hilo funkcija.



1 lentelė. Hilo funkcijos taikymo parametrai

pH	i_{max} , nA	k_M , s	n
3.5	9.7	1084	4.5
4.0	6.2	683	6.9
4.5	17.5	812	4.6
5.0	16.3	947	4.4
5.5	6.3	686	7.6
6.0	12.1	947	3.8
6.5	4.8	739	5.8

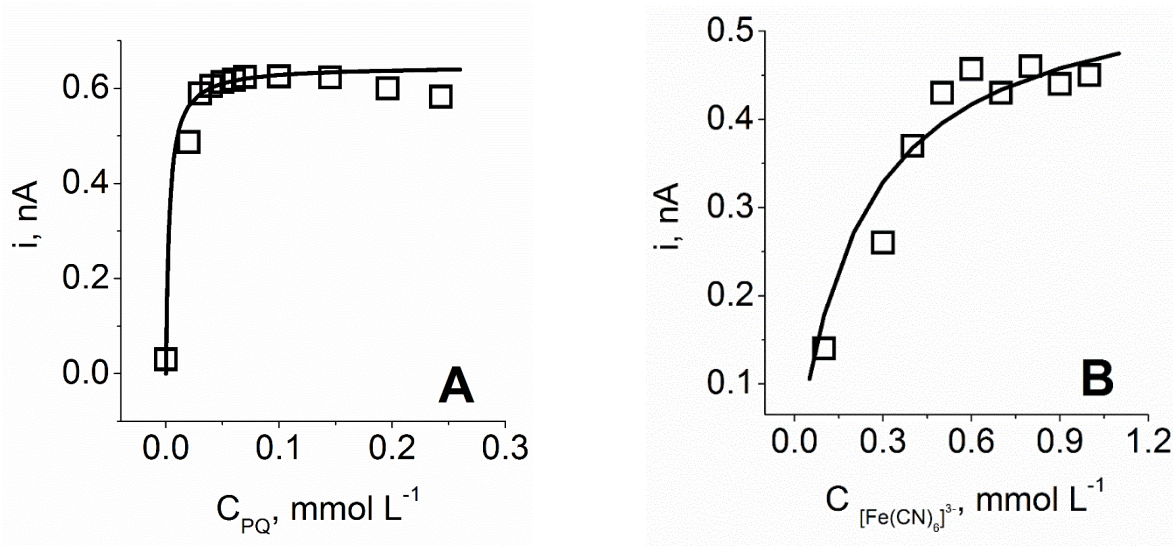
19 pav. A, B. Chronoamperometriniai matavimai esant skirtingiems pH. Sąlygos tokios pat, kaip 14 paveiksle. **C.** Srovės priklausomybė nuo pH gauta esant 900 s laikui iš šio paveikslo A ir B dalių. Pritaikyta 'Extreme fit' funkcija naudojant Origin 8 programą.

pH įtaka buvo tiriama esant toms pačioms sąlygoms. Chronoamperometriniai matavimai buvo įvertinti taikant Hilo funkciją (19 pav.). Didžiausia srovė buvo gauta esant 4,5 pH (19 pav., C). Hilo funkcijos taikymo rezultatai yra pateikti 1 lentelėje. Esant mažiau nei 4,5 pH, Hilo funkcijos taikymai buvo labiau sėkmingi, tačiau suskaičiuotos i_{max} vertės buvo labai mažos, todėl duomenys, esant mažesnėms nei 4,5 pH vertėms nebuvo vertinami. Didžiausias Hilo skaičius buvo gautas esant 5,5 pH (19 pav., B). Esant tokiam pH, tariamoji Michaelio konstanta yra mažiausia, taigi reakcija yra santykinai greita lyginant su kitais pH (1 lentelė). Kadangi Hilo skaičius rodo kooperatyvumo laipsnį, didžiausias PQ kooperatyvumas su mielių ląstelėmis buvo gautas esant 5,5 pH. Tuo pačiu metu tariamoji Michaelio konstanta buvo mažiausia, lyginant su

apskaičiuota esant kitiems pH, o tai gali reikšti didesnį toksinį efektą šiame pH. Taigi, 6,5 pH buvo pasirinkta tolesniems eksperimentams, nes esant tokiam pH Hilo skaičius yra mažesnis, o tariamoji konstanta didesnė. Esant tokioms sąlygoms, išlaikomas balansas tarp toksiškumo ir elektronų pernešimo efektyvumo.

3.5.3. Optimalių elektronų pernešimo tarpininkų koncentracijų nustatymas

Optimalios vaizdinimo sąlygos buvo nustatytos matuojant srovę horizontalaus skenavimo metu, keičiant abiejų elektronų pernešimo tarpininkų koncentracijas. PQ koncentracija buvo keičiama nuo 0 mM iki 0,25 mM ir registruojama maksimali srovė (20 pav., A). Ši srovė buvo didžiausia esant mažesnėms PQ koncentracijoms, kurios neviršijo 0,08 mM, tuo tarpu esant 0-0,08 mM, srovė didėjo. Tačiau esant didesnėms PQ koncentracijoms, laike buvi stebimas srovės sumažėjimas, kuris parodo neigiamą ir galbūt toksišką efektą ląstelėms. Išmatuota UME srovė yra susijusi su metabolizmo intensyvumu ląstelėse, todėl srovės sumažėjimas didinant PQ koncentraciją virš 0,08 mM rodo ląstelės gyvybingumo sumažėjimą.



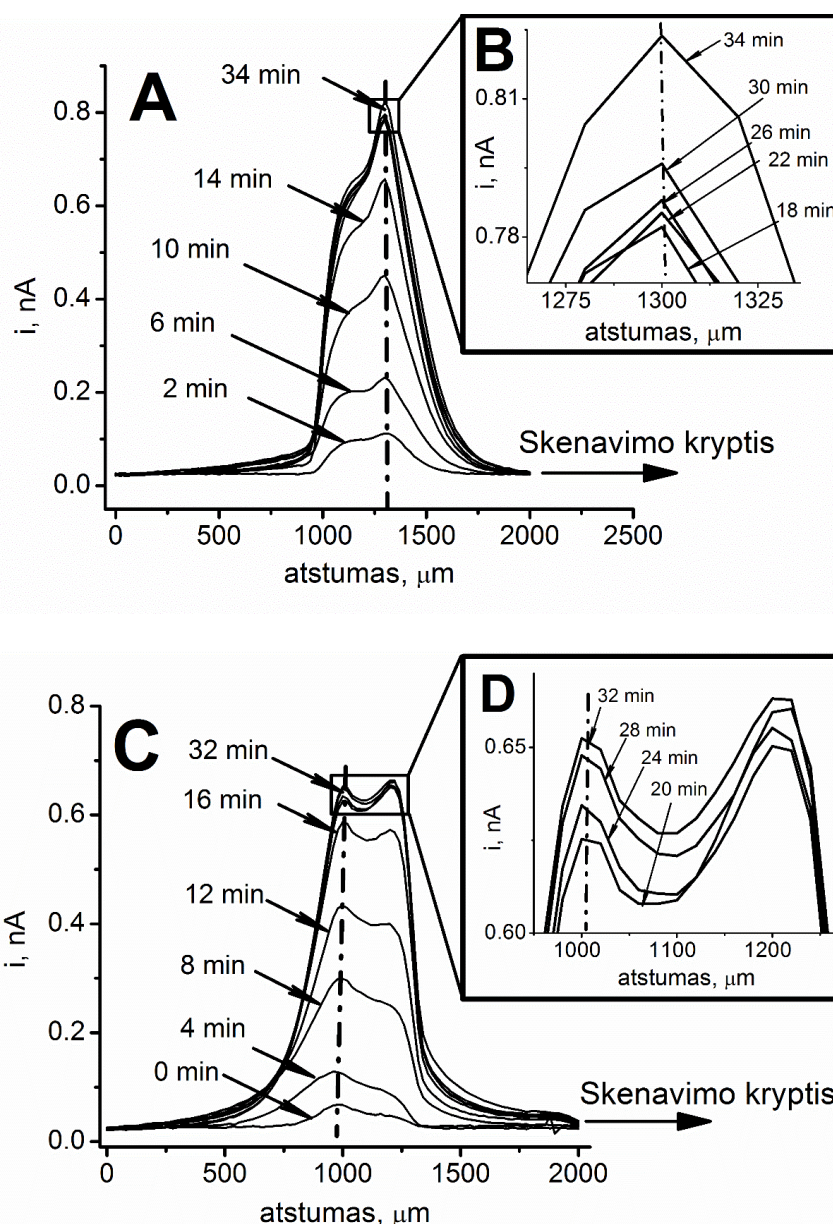
20 pav. Srovės priklausomybės nuo elektronų pernešimo tarpininkų koncentracijos. **A** - Srovės priklausomybė nuo PQ koncentracijos, tirpale esant 0,6 mM kalio fericianido ir 60 mM gliukozės. Linija nubrėžta pritaikius Michaelio-Menten teorinį modelį: $i_{max(PQ)} = 0,65$ nA, $K_{M(app. PQ)} = 0,003$ mM. **B** - Srovės priklausomybė nuo kalio fericianido koncentracijos, tirpale esant 60 mM gliukozės ir 0,04 mM PQ. Linija nubrėžta pritaikius Michaelio-Menten teorinį modelį: $i_{max(FeCN)} = 0,57$ nA, $K_{M(app. FeCN)} = 0,22$ mM.

Todėl, siekiant rasti kompromisą tarp ląstelės gyvybingumo ir didesnių srovių, kurios reikalingos efektyviam vaizdinimui, PQ koncentracija buvo pasirinkta naudojant pusę koncentracijos vertės ($0,04 \text{ mmol L}^{-1}$), kuriai esant gauta didžiausia srovė. Srovės ir PQ koncentracijos priklausomybė buvo nustatyta naudojant nusistovėjusios fermentinės reakcijos kinetinį modelį su šiais dydžiais: $i_{\text{max(PQ)}} = 0,65 \text{ nA}$, $K_{\text{SX(PQ)}} = 0,003 \text{ mM}$. Maža $K_{\text{SX(PQ)}}$ vertė priklauso nuo PQ gebėjimo elgtis kaip elektronų pernešimo tarpininkas ir tai rodo, kad PQ efektyviai perneša elektronus iš redoks fermentų ląstelės viduje ir perduoda juos $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ esančiam ląstelės išorėje. Pusė maksimalios srovės vertės buvo registruota esant $0,003 \text{ mM}$ PQ koncentracijai.

Siekiant nustatyti optimalią kalio fericianido koncentraciją, taip pat buvo registruojama maksimali srovė (20 pav., B). Optimali srovės iš srovės koncentracijos priklausomybės buvo gauta esant $0,6 \text{ mM}$ kalio fericianido koncentracijai. Buvo suskaičiuoti tokie dydžiai naudojant nusistovėjusios reakcijos kinetinį modelį: $i_{\text{max(FeCN)}} = 0,57 \text{ nA}$, $K_{\text{SX(FeCN)}} = 0,22 \text{ mM}$. Ši $K_{\text{SX(for FeCN)}}$ vertė įrodo kalio feri-/fero-cianido gebėjimą atlikti elektronų pernešimo vaidmenį tarp PQ ir UME. $K_{\text{SX(FeCN)}}$ yra beveik tris kartus mažesnė už pasirinktą vaizdinimui $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ koncentraciją, todėl ji gerai tinka ląstelių vaizdinimui.

3.5.3. Ląstelės redoks aktyvumo įvertinimas GC-SECM režimu

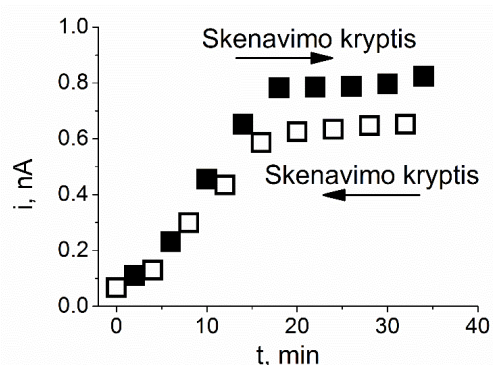
Ląstelės redoks aktyvumo įvertinimas buvo atliekamas horizontaliai skenuojant imobilizuotų ląstelių sancaupą įvairiais laiko intervalais po $0,6 \text{ mM}$ fericianido, $0,04 \text{ mM}$ PQ ir 60 mM gliukozės įdėjimo į buferinį tirpalą, esant $6,7 \text{ pH}$, (21 pav.). Matavimai buvo atliekami kas 2 minutes skirtingomis skenavimo kryptimis. Srovė keitėsi laike dėl metabolizmo procesų ir reakcijų vyksmo po gliukozės įdėjimo, kol šie procesai nusistovėjo. Matavimai viena kryptimi pateikti 21 pav. A, matavimai kita kryptimi yra pateikti 21 pav. B. Dvi priklausomybės rodo srovės pasikeitimą skenuojant abiem kryptimis (22 pav.). Taigi, skenuojant skirtingomis kryptimis galima gauti skirtingus rezultatus, o srovės padidėjimas imobilizuotos ląstelių sancaupos kraštuose yra susijęs su asimetrija topografijoje arba elektrocheminio aktyvumo asimetriniais skirtumais.



21 pav. UME srovės priklausomybė nuo atstumo, po 60 mM gliukozės įdėjimo į buferinį tirpalą, kurio pH 6,7, tirpale esant 0,6 mM kalio fericianido ir 0,04 mM PQ. UME signalas buvo matuojamas GC-SECM režimu, 20 μm atstumu, esant +400 mV potencialui, žingsnis tarp matuojamųjų taškų buvo 20 μm, skenavimo greitis 10 μm/s. **A:** Skenavimas 0-34 min, tiesiogine kryptimi, **B:** Skenavimas 18-34 min, tiesiogine kryptimi, **C:** Skenavimas 0-32 min, atgaline kryptimi, **D:** Skenavimas 20-32 min, atgaline kryptimi.

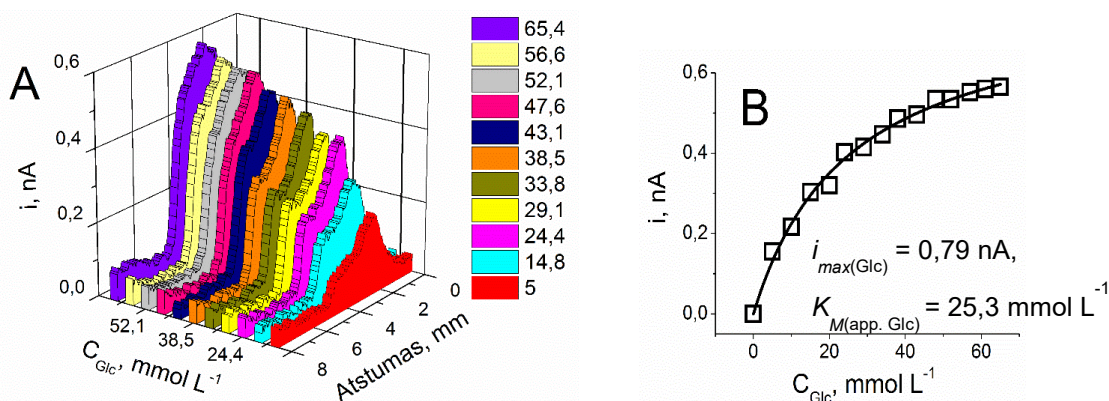
Papildomai šios prielaidos buvo patikrintos optiniu mikroskopu ir buvo nustatyta, kad ląstelės yra imobilizuotos toroido formos laše, nes džiūstant lašui, daugiau ląstelių susikaupia kraštuose. Šis toroidinis profilis yra matomas paveiksle 3D nuo 20 iki 32 minutės, kur yra išmatuotas didesnis elektrocheminis aktyvumas kraštuose. Srovės vertės viename padėties taške buvo naudojamos srovės-laiko priklausomybėms įvertinti, kurios yra pateikiamos 22 pav.

Nusistovėjusi srovė registruojama po 18 min. inkubacijos, nusistovėjimas matomas skenuojant abiem kryptimis.



22 pav. UME srovės priklausomybė nuo laiko, matuota buferiniame tirpale, pH 6,7, tirpale esant 0,6 mM kalio fericianido, 0,04 mM PQ ir 60 mM gliukozės; Pateikiamos vertės paimtos iš vertikalia brūkšnine-taškine linija pažymėtos pozicijos paveiksluose 21 A,B,C,D.

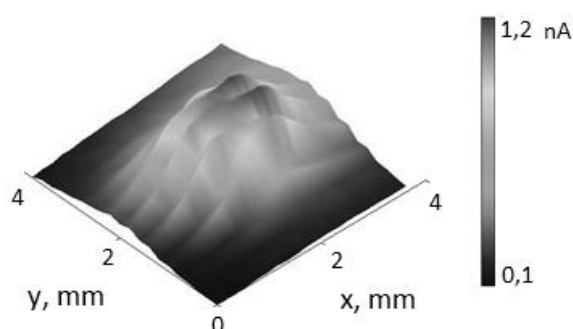
Kita eksperimentų dalis buvo atliekama skenuojant imobilizuotų ląstelių sandaigą esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms (23 pav.). Kai gliukozės koncentracija buvo 5 mM, srovės pasiketimas buvo tik 0,15 nA; didinant koncentraciją iki 65,4 mM, srovė ryškiai padidėjo, pasiekdama 0,55 nA vertę. Tačiau paveikslo raiška, esant maksimaliai gliukozės koncentracijai, labai pablogėjo. Kaip jau buvo minėta, ląstelės imobilizuojamos torido formos sandaigoje.



23 pav. A: Srovės priklausomybė nuo UME pozicijos esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms. B: Srovės priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. Matavimai atlikti po 18 min nuo metabolizmo procesų pradžios, buferiniame, pH 6,7, tirpale su 0,6 mM kalio fericianido, 0-65,4 mM gliukozės ir 0,04 mM PQ.

Profilio vaizdas rodo, kad ryškesnis UME signalas yra viename krašte, o taip pat šis signalas priklauso nuo skenavimo krypties (21 pav.). Dėl šių apribojimų

esant didesnėms gliukozės koncentracijoms profilis praranda savo formą. Iš literatūros žinoma, kad jeigu šalia yra dvi aktyvios sritys, jos korektiškai atvaizduojamos gali būti tik tada, kai jų maksimali srovė skiriasi du kartus. Kitu atveju difuziniai sluoksniai persikloja ir registruojamas bendras signalas iš abiejų sričių. Buvo nustatyta, kad optimali gliukozės koncentracija yra tarp 50 ir 65,4 mM. Todėl 60 mM gliukozės koncentracija buvo naudojama vaizdinant imobilizuotą mielių ląstelių sankaupą (24 pav.). Maksimali gauta srovė gauta 1,2 nA ant ląstelių paviršiaus, tolstant nuo šios vietos srovė sumažėjo iki 0,6-0,7 nA.

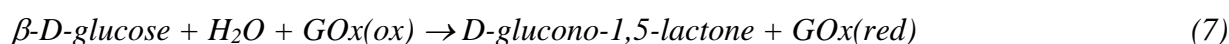


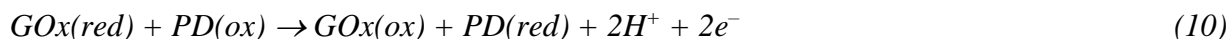
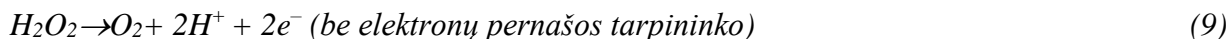
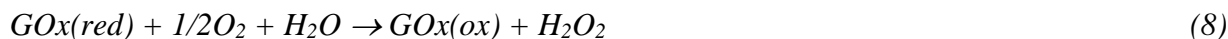
24 pav. Imobilizuotos mielių ląstelių sankaupos elektrocheminio aktyvumo vaizdas po 18 min nuo metabolizmo procesų iniciavimo; vertikalus atstumas 20 μm , žingsnis 100 μm , greitis 10 $\mu\text{m/s}$.

1.1 Biokuro elementas, sudarytas iš gliukozės oksidazės ir krienų peroksidazės

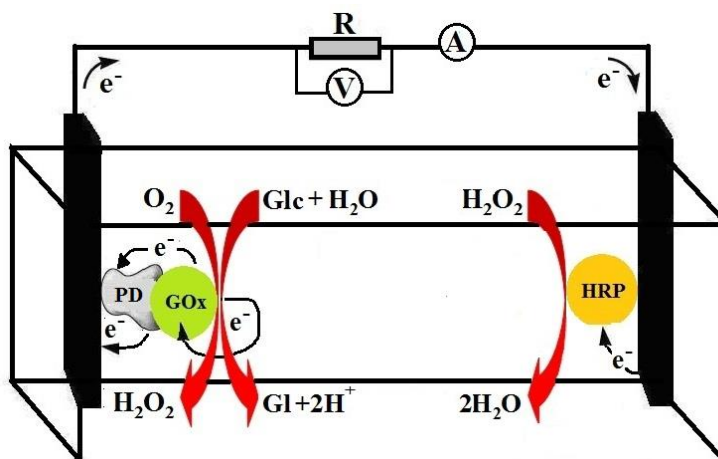
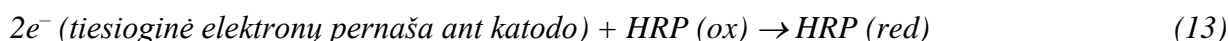
Biokuro elemento, sudaryto iš anodo GOx/PD/GRE ir katodo HRP/GRE, schema pateikiama 25 paveiksle, o biocheminės ir bioelektrocheminės reakcijos yra pateiktos (7–11). Lygtys (7–11) parodo GOx katalizuojamą gliukozės oksidaciją ir kitus vykstančius procesus nenaudojant elektronų pernešimo tarpininko (7–9) bei naudojant elektronų pernešimo tarpininką PD (10 ir 11) ant GOx/PD/GRE anodo. Vandenilio peroksidas yra naudojamas kaip substratas HRP, kuri katalizuoja vandenilio peroksido redukciją į vandenį (12) ir šios reakcijos metu oksiduota HRP forma yra atkuriamą į redukuotą formą, priimant elektronus iš elektrodo tiesiogiai (13).

Reakcijos ant anodo:





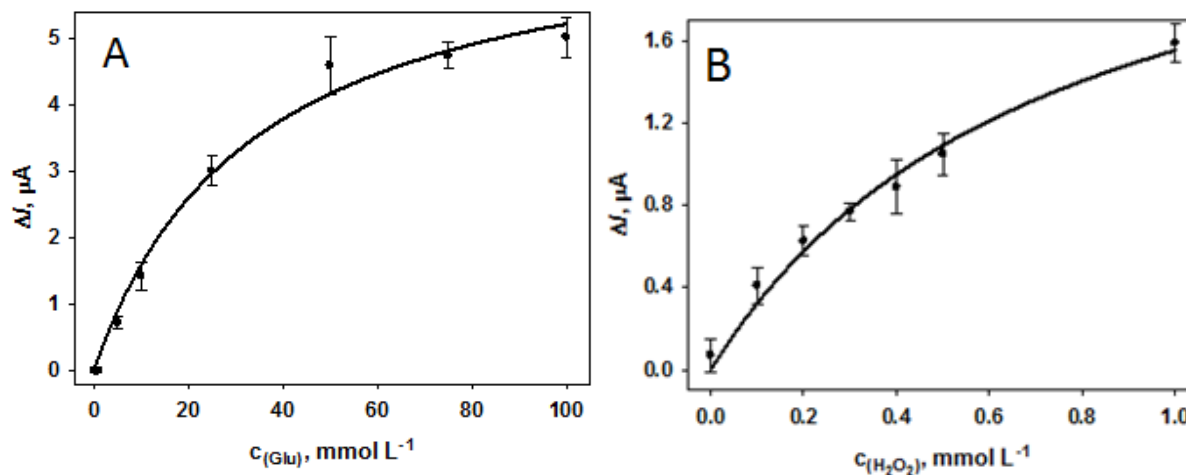
Reakcijos ant katodo:



25 pav. Biokuro elemento schema. PD – 1,10-fenantrolino-5,6-dionas; GOx – gliukozės oksidazė; HRP – krienų peroksidazė, Glc – gliukozė, Gl – gliukono rūgštis

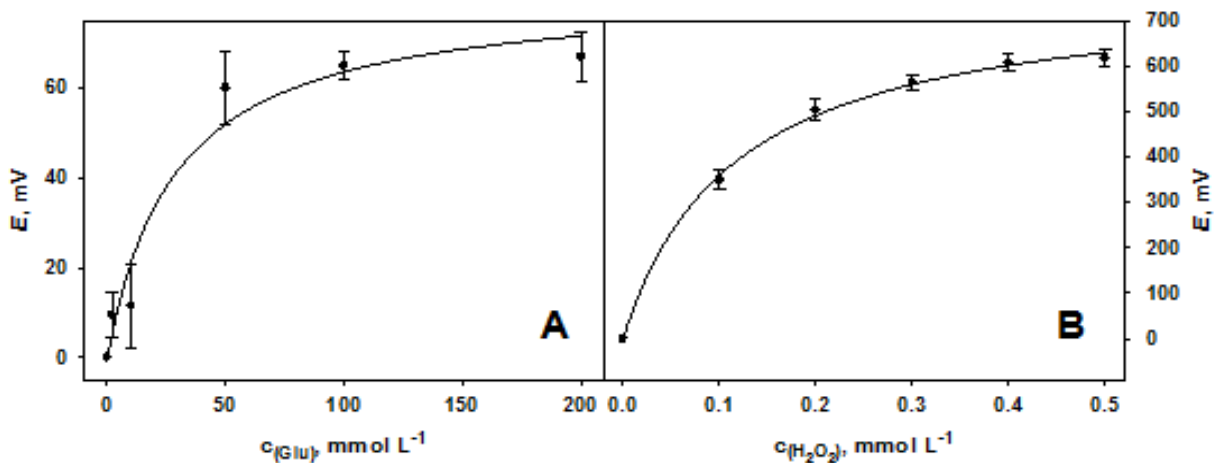
Taigi, potencialų skirtumas biokuro elemente yra generuojamas tiesioginės elektronų pernašos dėl HRP katalizuojamos reakcijos ant katodo ir GOx katalizuojamos reakcijos su elektronų pernašos tarpininku PD ant anodo (25 pav.). Prieš biokuro elemento konstravimą GOx/PD/GRE ir HRP/GRE elektrodai buvo ištirti amperometriškai esant pastoviams potencialams. GOx/PD/GRE elektrodas buvo tiriamas esant pastoviam +150 mV Ag/AgCl atžvilgiu potencialui (26 pav.) ir buvo nustatyta tariamoji Michaelio konstanta ($K_{M(app.)}$) gliukozei 33,73 mM, kuri žymiai padidėjo lyginant su fermento K_M , kurios vertė, pateikiama literatūroje, yra 12,9–15,4 mM. $K_{M(app.)}$ padidėjimas yra įtakojamas papildomai dėl substrato difuzijos apribojimo į GOx aktyvią sritį. Suskaičiuota I_{max} vertė GOx/PD/GRE elektrodai buvo 6,99 μA . Tiesioginės elektronų pernašos efektyvumas tarp HRP ir GRE paviršiaus, naudojamo HRP/GRE elektrode, buvo įvertintas amperometriškai esant 200 mV potencialui Ag/AgCl atžvilgiu A-PBS, 6,0 pH, esant skirtingoms vandenilio peroksido koncentracijoms (26 pav. B).

Suskaičiuota HRP/GRE elektrodo $K_{M(app.)}$ vandenilio peroksidui buvo 0,74 mM, o suskaičiuota I_{max} vertė buvo 2,69 μ A. K_M vertė HRP, pateikiama literatūroje, yra 0,19 mM.

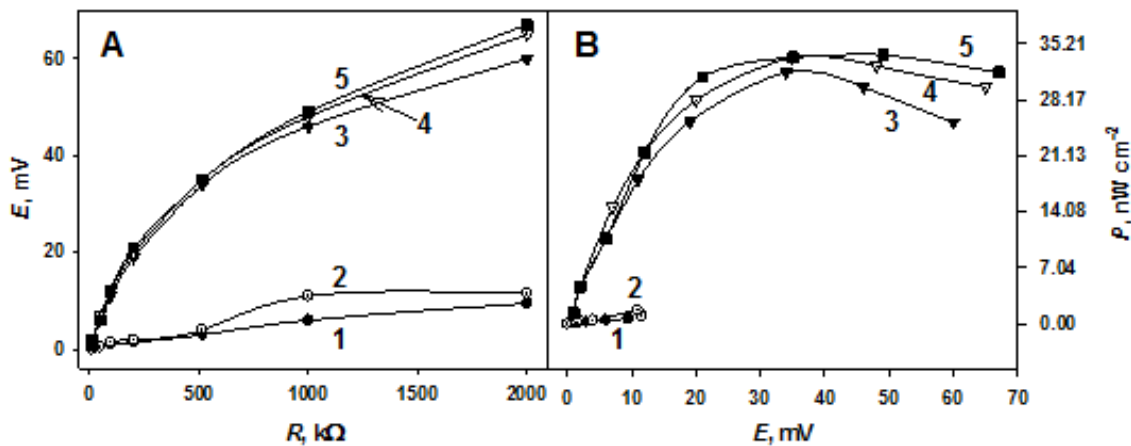


26 pav. A. Srovė, generuojama GOx/PD/GRE elektrodo A-PBS, 6,0 pH, esant +150 mV Ag/AgCl atžvilgiu. B. Srovė, generuojama HRP/GRE elektrodo A-PBS, 6,0 pH, esant –200 mV potencialui Ag/AgCl atžvilgiu.

Sukonstravus biokuro elementą buvo matuojamas atviros grandinės potencialas: (i) esant keletui skirtingų gliukozės koncentracijų anodo dalyje (23 pav. A), (ii) esant keletui skirtingų vandenilio peroksido koncentracijų katodo dalyje (27 pav. B). Rezultatai parodė, kad atviros grandinės potencialas, esant 200 mM gliukozės koncentracijai anodo dalyje pasiekė 70 mV, o kai esant 200 mM gliukozės koncentracijai anodo dalyje papildomai 0,5 mM H_2O_2 buvo pridėta katodo dalyje, potencialas padidėjo iki 640 mV. Potencialai, generuoti GOx/PD/GRE anodo dalyje, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms ir HRP/GRE katode, esant skirtingoms H_2O_2 koncentracijoms yra pateikti 27 pav. Amperometriniai ir potenciometriniai tyrimai HRP/GRE aiškiai parodo, kad HRP gali vykdyti tiesioginę elektronų pernašą, kai fermentas yra imobilizuotas ant GRE paviršiaus. Eksploatacinės BFC savybės buvo tiriamos esant keletui skirtingų (2–200 mM) gliukozės koncentracijų GOx/PD/GRE anodo dalyje, nesant vandenilio peroksido katodo dalyje, bei esant apkrovai (apkrova buvo sudaroma, įjungiant skirtingas varžas į grandinę, kaip tai parodyta 25 pav.). Buvo nustatyta, kad maksimali galia 2 μ W/cm gaunama, esant 30–60 mV (28 pav.).

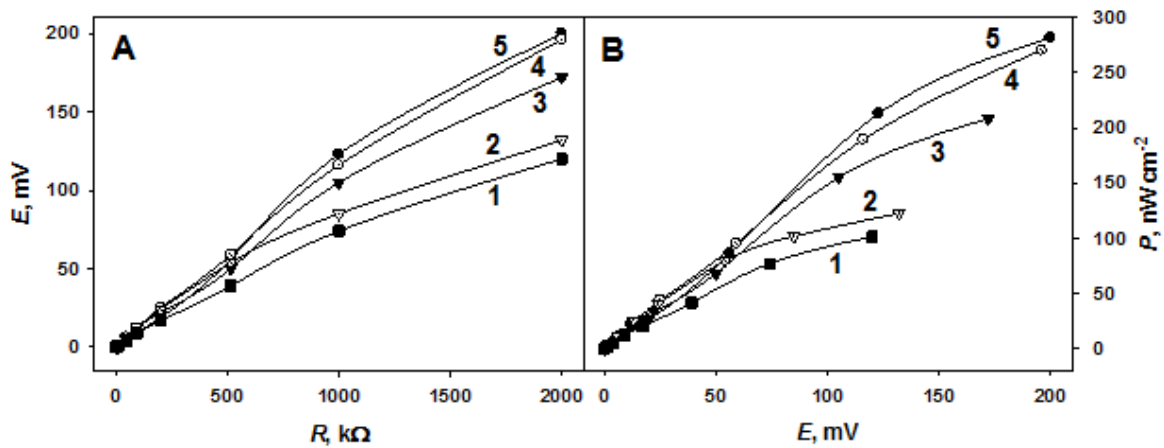


27 pav. Atviros grandinės potencialas, generuojamas BFC, sudaryto iš GOx/PD/GRE anodo ir HRP/GRE katodo, patalpintų į dviejų dalių elektrocheminę celę, kurios dalys sujungtos elektrolitiniu raktu, keičiant: A. gliukozės koncentraciją anodo dalyje; B. H_2O_2 koncentraciją katodo dalyje esant 200 mM gliukozės anodo dalyje.

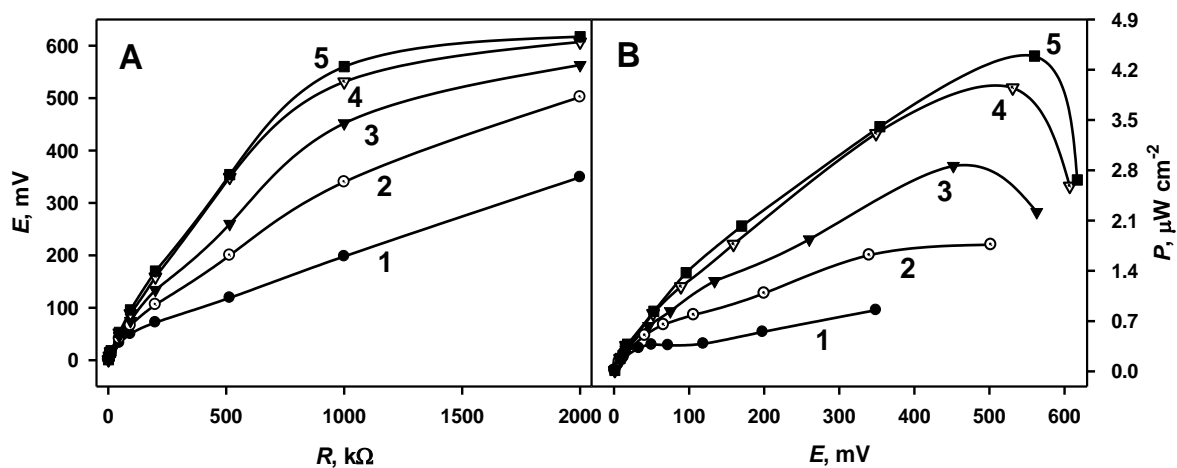


28 pav. BFC potencialo priklausomybė nuo apkrovos (A) ir BFC galios tankio priklausomybė nuo generuojamo potencialo (B). Biokuro elementas, sudarytas iš GOx/PD/GRE anodo ir HRP/GRE katodo esant 2 mM (1), 10 mM (2), 50 mM (3), 100 mM (4) ir 200 mM (5) gliukozės anodo dalyje.

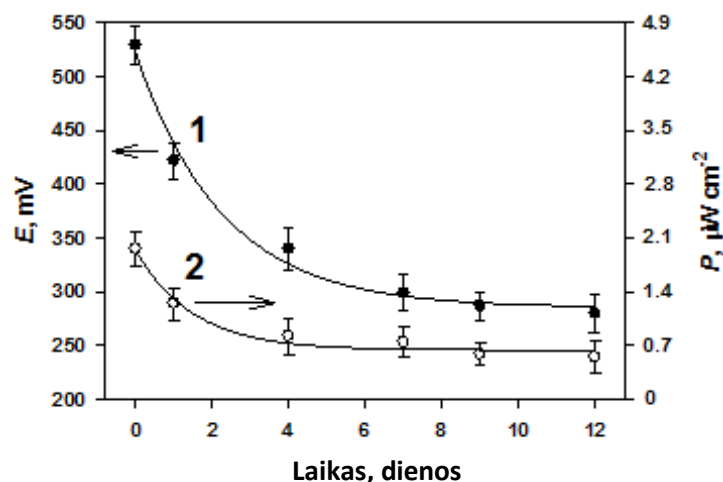
Buvo nustatyta, kad didžiausia įtampa ir galia buvo užregistruota esant 50–200 mM gliukozės koncentracijai. Žema įtampa buvo įtakojama tik GOx/PD/GRE anodo, nes elektronų pernaša iš HRP/GRE katodo nesant H_2O_2 yra labai ribota. Kitoje eksperimentų dalyje tas pats principas buvo taikomas, siekiant išmatuoti potencialus nesant gliukozės anodo dalyje ir esant vandenilio peroksido koncentracijoms 0,1–0,5 mM (29 pav.). Šiuo atveju buvo gautas žemas potencialas, žemesnis nei 200 mV ir galios tankis - žemesnis nei 300 nA/cm. Tada tos pačios apkrovos buvo taikomos BFC, kuris anodo dalyje sudarė 200 mM gliukozės ir katodo dalyje 0,1–0,5 mM vandenilio peroksido. Įtampa priklausė nuo apkrovos (30 pav. A).



29 pav. BFC potencialo priklausomybė nuo apkrovos (A) ir BFC galios tankio priklausomybė nuo generuojamo potencialo (B); Biokuro elementas, sudarytas iš GOx/PD/GRE anodo ir HRP/GRE katodo, esant 0,1 mM (1), 0,2 mM (2), 0,3 mM (3), 0,4 mM (4) ir 200 mM (5) H₂O₂ katodo dalyje.



30 pav. BFC potencialo priklausomybė nuo apkrovos (A) ir BFC galios tankio priklausomybė nuo generuojamo potencialo (B); Biokuro elementas, sudarytas iš GOx/PD/GRE anodo ir HRP/GRE katodo, esant 200 mM gliukozės anodo dalyje ir 0,1 mM (1), 0,2 mM (2), 0,3 mM (3), 0,4 mM (4) ir 0,5 mM (5) H₂O₂ katodo dalyje.



31 pav. Biokuro elemento, sudaryto iš GOx/PD/GRE anodo ir HRP/GRE katodo, potencialo stabilumas (1●) ir galia (2○), esant 200 mM gliukozės anodo dalyje ir 0,5 mM vandenilio peroksido katodo dalyje. Matavimai atlikti esant 2 MΩ apkrovai.

Didžiausia įtampa (640 mV) buvo registruojama esant 0,4 – 0,5 mM H₂O₂ katodo dalyje ir 200 mM gliukozės anodo dalyje, tuo tarpu kai didžiausia galia buvo registruota esant 200 mM gliukozės anodo dalyje ir 0,5 mM vandenilio peroksido katodo dalyje, ir siekė 4,2 μW/cm² esant 530 mV (30 pav., B). Didžiausia galia, esant 530 mV potencialui daro šį biokuro elementą ypač patrauklų praktiniam taikymui, nes toks potencialas yra jau tinkamas maitinti žemos galios elektronikos įtaisams. Šio BFC stabilumas buvo testuojamas esant 20 °C ir 2 MΩ apkrovai. Potencialo stabilumo tyrimas parodė, kad apytiksliai 40% atviros grandinės įtampos buvo prarasta per 12 dienų (31 pav., 1 kreivė), o galia sumažėjo 25% (31 pav., 2 kreivė). Toks ribotas stabilumas yra sąlygojamas pačių fermentų stabilumo.

Išvados

1. Lyginant matavimus deguonies konkurencijos ir generavimo-detekcijos režimais, buvo nustatyta, kad H₂O₂ koncentracija žymiai skiriasi nuo 0 iki 600 μm atstumuose nuo gliukozės oksidaze modifikuoto paviršiaus, tuo tarpu kai O₂ koncentracija keičiasi nuo 0 iki 100 μm atstume. Tai reikštų, kad H₂O₂ difunduoja žymiai greičiau nuo GOx-modifikuoto paviršiaus, tuo tarpu kai O₂ yra sunaudojamas arti GOx-modifikuoto paviršiaus. Pasirenkant atstumą, reikia įvertinti priartėjimo kreivės pobūdį matuojant tiek deguonies konkurencijos, tiek generavimo-detekcijos režimu.
2. Redoks konkurencijos režimas gali būti naudojamas fermentinių reakcijų kinetikos tyrimams, taikant Michaelio-Menten modelį. Michaelio konstantos skaičiavimo kokybė gali būti įvertinta pagal Michaelio konstantos priklausomybę nuo atstumo tarp UME ir fermentu modifikuoto mėginio. Paviršių, ant kurių imobilizuotas fermentas, laidumas panašiai įtakoja šią priklausomybę, todėl RC-SECM režimas yra tinkamas biologinių jutiklių ir biokuro celių tyrimams jų veikimo metu.
3. Elektrocheminio impedanso matavimai tirpale įvairiuose atstumuose nuo GOx modifikuoto paviršiaus leidžia nustatyti gliukono laktono rūgšties, susiformavusios tirpale fermentinės reakcijos metu koncentraciją. Tyrimo rezultatai parodė, kad

SEIM galėtų būti taikoma biologinių jutiklių bei biokuro elementų charakterizavimui „realiame laike“, nenaudojant elektronų pernešimo tarpininkų ir nepažeidžiant mėginio paviršiaus.

4. Šiame tyrime pateikiamas matematinis RC-SECM režimo modelis gali būti taikomas deguonies sunaudojimo fermentinėje reakcijoje greičiui skaičiuoti, įvertinti fermentinei kinetikai ir nustatyti deguonies difuzijos koeficientus įvairios sudėties tirpaluose. RC-SECM režimo modeliavimas parodė, kad pagrindinis parametras, nuo kurio priklauso ribinės difuzijos srovės signalas, yra difuzijos koeficientas. Mūsų žiniomis, RC-SECM režimą aprašantis matematinis modelis yra pateikiamas pirmą kartą.

5. Keturi elektronų pernešimo tarpininkai (p-benzochinonas, (pBQ), 1,10-fenantrolino-5,6-dionas (PD), 2,6-dichlorofenolindofenol natrio druskos hidratas (DCPIP)) ir 9,10-fenantrenchinonas (PQ)) buvo taikomi dviejų elektronų pernešimo tarpininkų sistemoje, siekiant patikrinti krūvio pernešimo efektyvumą iš mielių ląstelių esant aerobinėms sąlygoms. Buvo nustatyta, kad efektyviausias elektronų pernešimo tarpininkas yra PQ, esant tirpale PQ, srovė buvo tris kartus didesnė lyginant su kitais elektronų pernešimo tarpininkais.

6. Fermentinis biokuro elementas, sudarytas iš anodo GOx/PD/GRE ir katodo HRP/GRE buvo sukonstruotas ir ištirtas. Tokio naujo dizaino biokuro elementas leidžia naudoti gliukozę kaip kurą anodui, o vandenilio peroksidas, kuris susiformuoja Gox katalizuojamos reakcijos metu, gali būti naudojamas kaip kuras to paties biokuro elemento katodui. Mūsų žiniomis, tokio dizaino biokuro elementas buvo pasiūlytas pirmą kartą.

Tyrimų rezultatai paskelbti 5-kiuose recenzuojamų žurnalų straipsniuose ir 12-koje tarptautinių konferencijų tezių.

Paskelbtos mokslinės publikacijos:

Morkvenaite-Vilkonciene, Inga, Ramanaviciene, Almira, and Ramanavicius, Arunas, 9,10-Phenanthrenequinone as a Redox Mediator for the Imaging of Yeast Cells by Scanning Electrochemical Microscopy. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 2016. **228**: p. 200-206.

Morkvenaite-Vilkonciene, Inga, Genys, Povilas, Ramanaviciene, Almira, and Ramanavicius, Arunas, Scanning electrochemical impedance microscopy for investigation of glucose oxidase catalyzed reaction. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015. **126**: p. 598-602.

Ramanavicius, Arunas, Kausaite-Minkstimiene, Asta, **Morkvenaite-Vilkonciene, Inga,** Genys, Povilas, Mikhailova, Raisa, Semashko, Tatiana, Voronovic, Jaroslav and Ramanaviciene, Almira, Biofuel cell based on glucose oxidase from *Penicillium funiculosum* 46.1 and horseradish peroxidase. *Chemical Engineering Journal*, 2015. **264**(0): p. 165-173.

Morkvenaite-Vilkonciene, Inga, Ramanaviciene, Almira, and Ramanavicius, Arunas, Redox competition and generation-collection modes based scanning electrochemical microscopy for the evaluation of immobilised glucose oxidase-catalysed reactions. *RSC Advances*, 2014. **4**(91): p. 50064-50069.

Morkvenaite-Vilkonciene, Inga, Ramanavicius, Arunas, and Ramanaviciene, Almira, Atomic Force Microscopy as a Tool for the Investigation of Living Cells. *Medicina*, 2013. **49**(4): p. 155-164.

Pranešimų mokslinėse konferencijose tezės

Autorius

Morkvenaite-Vilkonciene, I., Sareikaite, A. Ramanavicius. 9,10-Phenanthrenequinone as a Redox Mediator for the Imaging of Yeast Cells by Scanning Electrochemical Microscopy. S5. 2nd International Conference of

Chemists „Nanochemistry and Nanomaterials“, Vilnius University. October 23, 2015.

Morkvenaite-Vilkonciene, I., Genys, P., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A. Scanning electrochemical microscopy in combination with electrochemical impedance spectroscopy as a tool for the monitoring of glucose oxidase catalyzed reaction. Nanotechnology: research and development : conference book : Vilnius, Lithuania, 15-16 May 2014. Vilnius, Lietuvos mokslų akademija, 2014. ISBN 9789955937142. 2014. P. 72.

Morkvenaite-Vilkonciene, I., Kisieliute, A., Voronovic, J., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A. Investigation of electrochemical activity of *Saccharomyces cerevisiae* by scanning electrochemical microscopy. Advanced materials and technologies : book of abstracts of the 16-th international conference-school, Palanga, Lithuania, 27-31 August 2014. Kaunas, Technologija. ISSN 1822-7759. 2014. p. [31 p.].

Morkvenaite-Vilkonciene, I., Ramanavicius, A., Ramanaviciene, A. Scanning electrochemical microscopy for the determination of enzymatic kinetics. CEEC-TAC2 : 2nd Central and Eastern European conference on thermal analysis and calorimetry : book of abstracts, 27-30 August 2013, Vilnius, Lithuania. Vilnius, 2013. ISBN 9783940237330. 2013. p. 90.

Morkvenaite-Vilkonciene, I., Astrauskaite, I., Ramanavicius, A. Scanning electrochemical microscopy analysis in feedback mode of immobilized glucose oxidase. EcoBalt 2013 : 18th international scientific conference, Vilnius, Lithuania, October 25-27, 2013 : book of abstracts. Vilnius, Vilniaus universiteto leidykla, 2013. ISBN 9786094592416. p. 34.

Morkvenaite-Vilkonciene, I., Genys, P., Ramanavicius, A. Alternating current scanning electrochemical microscopy for investigation of conducting surfaces. ITELMS'2013 : Intelligent technologies in logistics and mechatronics systems : proceedings of the 8th international conference, May 23-24, 2013, Panevėžys, Lithuania. Kaunas, Technologija. ISSN 2345-0088. 2013.

Morkvenaite-Vilkonciene, I., Astrauskaite, I., Ramanavicius, A. Characterization of biosensor surface by scanning electrochemical microscopy. ITELMS'2013 : Intelligent technologies in logistics and mechatronics systems : proceedings of the 8th international conference, May 23-24, 2013, Panevėžys, Lithuania. Kaunas, Technologija. ISSN 2345-0088. 2013.

Morkvenaite-Vilkonciene, I. and Ramanavicius, A.. Imaging Glucose Oxidase by Scanning Electrochemical Microscopy. in 2nd International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. 2013. Chisinau, Moldova: Technical University of Moldova.

Bendraautorius:

Ramanavicius, A., **Morkvenaite-Vilkonciene, I.,** Sareikaite, R., Kisieliute, A., Genys, P., Petroniene, J., Ramanaviciene, A. Imaging of Immobilized Enzymes and Yeast Cells by Scanning Electrochemical Microscopy. (1000-6). PITTCON 2016. March 6 -10, 2016. Atlanta, Georgia, USA.

Ramanavicius, A., German, N., Kausaite-Minkstimiene, A., **Morkvenaite-Vilkonciene, I.,** Genys, P., Voronovic, J., Petroniene, J., Ramanaviciene, A. Advances in Development of Glucose Biosensors. (980-2). PITTCON 2016. March 6 -10, 2016. Atlanta, Georgia, USA.

Kisieliute, A., **Morkvenaite-Vilkonciene, I.,** Andriukonis, E., Ramanavicius, A. Investigation of Yeast Modified with Polypyrrole by Scanning Electrochemical Microscopy. P4. 2nd International Conference of Chemists „Nanochemistry and Nanomaterials“ Vilnius University. October 23, 2015.

Ramanavicius, A., **Morkvenaite-Vilkonciene, I.,** Kausaite, A., Ramanaviciene, A. Electron transfer pathways in electrochemical biosensors and in some other biodevices. Photosynthetic proteins for technological applications: biosensors and biochips (PHOTOTECH) : 2nd plenary workshop and management committee meeting: information, programme and abstracts, 9-11 April, 2014, Istanbul, Turkey. Ankara, Hacettepe university. 2014. p. 4.

Summary

Scanning electrochemical microscopy (SECM) is an innovative method, which could be applied for the surface-activity analysis of enzymatic biosensors and biofuel cells. The SECM is based on electrochemical measurements performed by ultramicroelectrode (UME), which is scanning the 3D space, which is close to surface of the interest that is containing catalytic, redox or other electrochemically active sites. In such experiments the UME is mostly connected as a working electrode in electrochemical setup, and the current, which is measured by the UME, depends on the local concentration of electroactive species. In this work, SECM was applied for the investigation of biosensors', when biorecognition elements are enzymes and living cells. For this purpose, enzyme *Glucose oxidase* and yeasts cells *Saccharomyces cerevisiae* were selected, and different modes of SECM were applied using electrodes of different geometry. It was found, that Generation-Collection and Redox Competition modes of SECM are suitable for the investigation of biosensor's surface. At the same time the formation of product of enzymatic reaction (H_2O_2) and consumption of reactant – O_2 kinetics' can be determined and visualized in 3D space. Redox Competition SECM mode could be applied for simplified determination of Michaelis constant, when only approaching curves of SECM are recorded. Determination of diffusion of reaction products from biosensors' or biofuel cells' surfaces in real time can be performed by combined SECM and Electrochemical Impedance Spectroscopy system. The surface of biosensors modified by living cells devoted for the determination of toxicity can be investigated by Generation-Collection SECM mode using two redox mediators based system; one of which is lipophilic toxic 9,10-Phenanthrenequinone, and a second – hydrophilic ferricyanide. For the determination of cell viability at different pH the Hill's function was successfully applied. The calculation of Hill's number has showed that the 9,10-Phenanthrenequinone has high degree of cooperativity to yeast cells at different pH.

Gyvenimo aprašymas

Vardas, pavardė Inga Morkvėnaitė-Vilkončienė
El. paštas inga.morkvenaite-vilkonciene@chf.vu.lt
Gimimo data 1979-07-06

Išsilavinimas

2012 – 2016 Vilniaus Universitetas, Chemijos fakultetas, doktorantūros studijos, Chemija
2009 – 2011 Kauno Technologijos universitetas, Technologijų fakultetas, Magistro studijos, Valdymo inžinerija
2005 – 2009 Kauno Technologijos universitetas, Technologijų fakultetas, Bakalauro studijos, Elektros inžinerija
2001 – 2004 Panevėžio kolegija, Verslo ir technologijų fakultetas, Elektros ir automatikos įrenginiai

Darbinė veikla

2016 – ... Vilniaus Gedimino Technikos universitetas, lektorė
2013 – 2016 Vilniaus kolegija, lektorė
2013 – 2014 Fizinių ir technologijos mokslų centras, tyrėja
2010 – 2012 Panevėžio kolegija, asistentė
2008 – 2012 Panevėžio mechatronikos centras, tyrėja
2004 – 2008 Kauno technologijos universiteto Panevėžio institutas, administratorė

Stażuotės užsienio mokslo ir studijų institucijose

2013 lapkritis. Stažuotė Fizikinės chemijos ir mikrobiologijos laboratorijoje, Nancy, Prancūzijoje.