

Biojutiklių su perforuota membrana modeliavimas*

Romas BARONAS (VU), Feliksas IVANAUSKAS (VU, MII)

Juozas KULYS (VGTU)

el. paštas: romas.baronas@maf.vu.lt

Reziumė. Straipsnyje pateikiamas biojutiklių su perforuota membrana matematinis modelis dvimatėje erdvėje. Modelio pagrindas – difuzijos lygtys su netiesiniu nariu, aprašančiu fermento reakcijos Michaelio–Menteno kinetiką. Suformuluotas uždavinys sprendžiamas baigtinių skirtumų metodu. Kompiuterinis modeliavimas panaudotas perforuotos membranos geometrijos įtakai biojutiklio atsakui ištirti.

Raktiniai žodžiai: reakcija-difuzija, matematinis modeliavimas, biojutiklis, perforuota membrana.

1. Įvadas

Biojutikliai – tai matavimo įrenginiai, kuriuose naudojama biologiškai aktyvi medžiaga, dažniausiai fermentas [1]. Fermentui reaguojant su analizuojamąja medžiaga, fizikiniai-cheminiai pasikeitimai yra paverčiami elektros signalu, kurio stiprumas priklauso nuo tirpalo koncentracijos. Amperometriniais biojutikliais matuojama srovė, kuri atsiranda dėl biocheminės reakcijos produkto oksidacijos arba redukcijos, išlaikant elektrodo potencialą pastoviu. Amperometriniai biojutikliai išsiskiria iš kitų savo patikimumu, pigumu ir dideliu jautriu. Jie plačiai taikomi įvairiausiose analitinėse sistemose [2].

Praktikoje dažniausiai naudojami daugiasluoksniai biojutikliai [1, 2]. Juose elektrodas būna padengtas selektyvia membrana, kuri padengiama fermento sluoksniu ir ant jo uždedama perforuota membrana. Tokių biojutiklių tyrimui jau yra taikomi matematiniai modeliai [3]. Tačiau juose neatsižvelgiama į perforavimo geometriją ir dėl to yra naudojami parametrai, kurie neturi aiškios fizinės prasmės [3].

Šio darbo tikslas yra sudaryti amperometrinių biojutiklių, sudarytų selektyvios ir perforuotos membranų pagrindu, matematinį modelį, kuriame būtų atsižvelgiama į perforavimo geometriją ir, taikant sudarytąjį modelį, ištirti perforuotos membranos geometrijos įtaka biojutiklių atsakui. Skaitinis modeliavimas atliktas naudojant baigtinių skirtumų metodą [4].

2. Matematinis modelis

Bendrasis biojutiklio storis dažniausiai būna žymiai mažesnis už jo plotį ir ilgį. Šiuolaikinės membranų gamybos technologijos pakankamai gerai užtikrina reikiamą membranų storį ir jų perforavimo geometriją. Perforuotosios membranos skyles modelia-

*Darbą dalinai parėmė Lietuvos valstybinis mokslo ir studijų fondas, projektas Nr. C-03048.

vome vienodais taisyklingais stačiais cilindrais, kurie išdėstyti taisyklingais šešiakampiais (1a pav.).

Visą modeliuojamą biojutiklį galima padalinti vienodomis taisyklingomis stačiosiomis šešiakampėmis prizmėmis ir nagrinėti tik vieną jų. Kad būtų paprasčiau, vietoje šešiakampės prizmės galima nagrinėti cilindą, kurio pagrindo plotas sutampa su prizmės pagrindo plotu. Cilindre vykstantys biocheminiai procesai gali būti modeliuojami nagrinėjant cilindro pjūvio, statmeno pagrindui, pusę. Visa nagrinėjamoji sritis yra pavaizduota 1b pav.

Atvirąją sritį, atitinkančią selektyviąją membraną, pažymėkime Ω_1 , fermento sritį pažymėkime Ω_2 ir viršutinį fermento sluoksnio kraštą – Γ_2 ,

$$\begin{aligned}\Omega_1 &= (0, a_2) \times (0, b_1), \\ \Omega_2 &= ((0, a_2) \times (b_1, b_2)) \cup ((0, a_1) \times [b_2, b_3]), \\ \Gamma_2 &= [0, a_1] \times b_3,\end{aligned}\quad (2.1)$$

čia a_2 yra pusė atstumo tarp gretimų perforuotosios membranos skylių centrų, a_1 yra skylių spindulys, b_1 žymi selektyviosios membranos storį, $b_3 - b_2$ atitinka perforuotosios membranos storį, $b_2 - b_1$ yra ištisinio fermento sluoksnio storis. Tariame, kad perforuotosios membranos skylės yra užpildytos fermentu. $z = 0$ atitinka elektrodo paviršių.

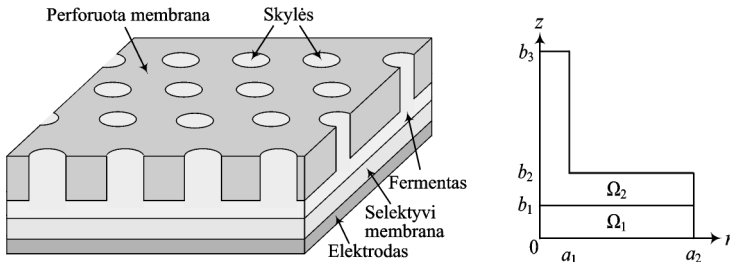
Biojutiklio veiksmą galima aprašyti reakcijos-difuzijos lygčių sistema ($t > 0$)

$$\frac{\partial P_1}{\partial t} = D_1 \Delta P_1, \quad (r, z) \in \Omega_1, \quad (2.2)$$

$$\frac{\partial S}{\partial t} = D_2 \Delta S - \frac{V_{max} S}{K_M + S}, \quad \frac{\partial P_2}{\partial t} = D_2 \Delta P_2 + \frac{V_{max} S}{K_M + S}, \quad (r, z) \in \Omega_2, \quad (2.3)$$

čia Δ yra Laplaso operatorius cilindrinėse koordinatėse, $S(r, z, t)$ – substrato koncentracija, $P_i(r, z, t)$ – fermentinės reakcijos produkto koncentracija srityje Ω_i , V_{max} – maksimalusis fermentinės reakcijos greitis, K_M yra Michaelio konstanta, $i = 1, 2$ [5].

Atvirosios srities Ω_i uždarinį pažymėkime Ω_i , $i = 1, 2$. Biojutiklis pradeda veikti panardinus jį į substratą – analizuojamąjį tirpalą. Tai atsispindi pradinėse sąlygose ($t = 0$)



1 pav. Biojutiklio sandara ir dedamosios profilis.

$$\begin{aligned}
 S(r, z, 0) &= 0, & (r, z) \in \overline{\Omega}_2 \setminus \Gamma_2, \\
 S(r, z, 0) &= S_0, & (r, z) \in \Gamma_2, \\
 P_i(r, z, 0) &= 0, & (r, z) \in \overline{\Omega}_i, \quad i = 1, 2,
 \end{aligned}
 \tag{2.4}$$

čia S_0 yra substrato koncentracija biojutiklio išorėje.

Tarus, kad tirpalas yra aktyviai maišomas, substrato ir produkto koncentracijos fermento ir tirpalo lietimose taškuose išlieka pastovios. Tai aprašoma kraštinėmis sąlygomis ($t > 0$)

$$S(r, b_3, t) = S_0, \quad P_2(r, b_3, t) = 0, \quad r \in [0, a_1]. \tag{2.5}$$

Dėl elektrodo poliarizacijos, reakcijos produkto koncentracija elektrodo paviršiuje išlieka lygi nuliui

$$P_1(r, 0, t) = 0, \quad r \in [0, a_2]. \tag{2.6}$$

Sričių lietimosi taškuose produktui apibrėžiame suderinamumo, o substratui, kuris nepatenka į selektyviąją membraną, – nepratekėjimo sąlygas

$$\begin{aligned}
 D_1 \frac{\partial P_1}{\partial z} \Big|_{z=b_1} &= D_2 \frac{\partial P_2}{\partial z} \Big|_{z=b_1}, & P_1(r, b_1, t) &= P_2(r, b_1, t), \\
 \frac{\partial S}{\partial z} \Big|_{z=b_1} &= 0, & r \in [0, a_2].
 \end{aligned}
 \tag{2.7}$$

Biojutiklio dedamosios šonuose apibrėžiame nepratekėjimo sąlygas

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial P_1}{\partial r} \Big|_{r=0} &= \frac{\partial P_1}{\partial r} \Big|_{r=a_2} = 0, & z \in [0, b_1], \\
 \frac{\partial S}{\partial r} \Big|_{r=0} &= \frac{\partial P_2}{\partial r} \Big|_{r=0} = 0, & z \in [b_1, b_3], \\
 \frac{\partial S}{\partial r} \Big|_{r=a_2} &= \frac{\partial P_2}{\partial r} \Big|_{r=a_2} = 0, & z \in [b_1, b_2], \\
 \frac{\partial S}{\partial r} \Big|_{r=a_1} &= \frac{\partial P_2}{\partial r} \Big|_{r=a_1} = 0, & z \in [b_2, b_3], \\
 \frac{\partial S}{\partial z} \Big|_{z=b_2} &= \frac{\partial P_2}{\partial z} \Big|_{z=b_2} = 0, & r \in [a_1, a_2].
 \end{aligned}
 \tag{2.8}$$

Tariame, kad sistema (2.2)–(2.8) pasiekia pusiausvyrą. Matuojamosios biojutiklio srovės stiprumo tankį $i(t)$ ir pusiausvirąją srovę (biojutiklio atsaką) i_∞ galima išreikšti taip

$$i(t) = n_e F D_1 \frac{1}{\pi a_2^2} \int_0^{2\pi} \int_0^{a_2} \frac{\partial P_1}{\partial z} \Big|_{z=0} r \, dr \, d\varphi, \quad i_\infty = \lim_{t \rightarrow \infty} i(t), \tag{2.9}$$

čia n_e – elektronų skaičius, F – Faradėjaus konstanta.

Lygtis (2.2)–(2.8) sprendėme baigtinių skirtumų metodu [4]. Analizuojamąsias tolydžias sritis $\overline{\Omega}_1$, $\overline{\Omega}_2$ pakeitėme netolygiu visomis trimis kryptimis: r , z ir t tinklu. Taikant kintamų krypčių metodą, skaičiavimams atlikti buvo sudaryta neišreikštinė skirtuminė schema. Gautųjų tiesinių algebrinių lygčių sistemų matricos yra trištrižinės, todėl lygčių sistemos buvo sprendžiamos labai efektyviai.

3. Skaičiavimų rezultatai

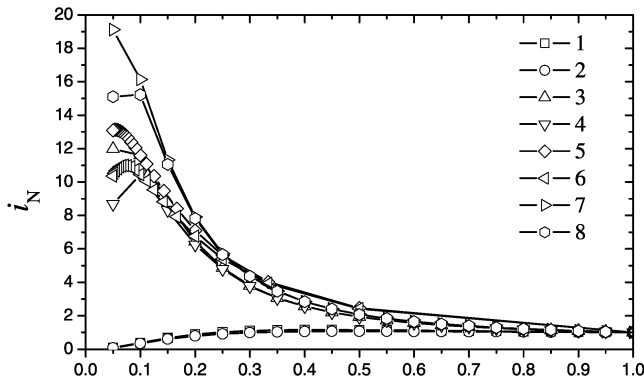
Panaudojant skaitinį modelį, ištyrėme perforuotosios membranos geometrijos įtaką biojutiklio atsakui. Skaičiavimuose buvo keičiamos visų trijų perforuotosios membranos geometrijos parametru: a_1 , a_2 ir $b_3 - b_2$ reikšmės.

Skylių išdėstymo svarbai įvertinti taikėme santykinį skylių spindulį $\alpha = a_1/a_2$. Ypatinguoju atveju, kai $\alpha = 1$ ($a_1 = a_2$), modelis (2.2)–(2.8) aprašo biojutiklį be perforuotosios membranos [1, 2]. Kadangi amperometrinių biojutiklių atsakas labai priklauso nuo fermento reakcijos greičio V_{max} ir analizuojamojo substrato koncentracijos S_0 [5], tai skaičiavimus atlikome skirtingoms šių parametru reikšmėms ir pusiausvirąją srovę normavome biojutiklio, kuriame nėra perforuotosios membranos, atžvilgiu,

$$i_N(\alpha) = \frac{i_\infty(\alpha)}{i_\infty(1)}, \quad \alpha = \frac{a_1}{a_2}, \quad 0 < \alpha \leq 1,$$

čia $i_\infty(\alpha)$ – pusiausviroji srovė, kai perforavimo skylių santykinis spindulys yra α . Skaičiavimų rezultatai pavaizduoti 2 pav.

Kaip matyti iš 2 pav., biojutiklio pusiausviroji srovė labai priklauso nuo fermentinės reakcijos greičio V_{max} . Esant mažam reakcijos greičiui ($V_{max} = 1 \mu\text{M/s}$) biojutiklis su perforuota membrana ($0 < \alpha < 1$) gali generuoti srovę, kuri būtų net keliasdešimt kartų didesnė už srovę biojutiklio be perforuotosios membranos ($\alpha = 1$). Kai perforuotoji membrana yra plonesnė ($b_3 = 8 \mu\text{m}$), biojutiklio srovė yra pastebimai didesnė



2 pav. Normuotosios srovės i_N priklausomybė nuo perforuotosios membranos skylių santykinio spindulio $\alpha = a_1/a_2$, $a_2 = 1$ (1-4, 7-8), $a_1 = 0.1$ (5-6), $b_1 = 2$, $b_2 = 4$, b_3 : 14 (1-6), 8 (7, 8) μm , S_0 : 100 (1, 3, 5, 7), 1 (2, 4, 6, 8) μM , V_{max} : 1000 (1, 2), 1 (3-8) $\mu\text{M/s}$, $D_1 = 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_2 = 300 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $K_M = 100 \mu\text{M}$, $n_e = 2$.

nei tuomet, kai ji yra storesnė ($b_3 = 14 \mu\text{m}$). Šias savybes galima taikyti konstruojant labai jautrius biojutiklius. Taikant skaitinį modelį, galima parinkti perforuotosios membranos geometriją, leidžiančią padidinti konstruojamo biojutiklio jautrį. Tačiau, kaip matyti iš 2 pav., biojutiklio jautrį ženkliai galima padidinti tik esant mažam fermentinės reakcijos greičiui. Biojutiklio jautris priklauso ir nuo analizuojamojo tirpalo koncentracijos, bet ši įtaka nėra didelė (2 pav.).

Išvados

Matematinį modelį (2.2)–(2.8) galima taikyti amperometrinių biojutiklių su selektyvia ir perforuota membranomis kinetikos dėsningumams tirti.

Biojutiklio srovės stiprumas priklauso nuo perforuotosios membranos storio, skylių dydžio ir jų išdėstymo tankio. Modeliuojant biojutiklio veiksmą kompiuteriu, galima parinkti perforuotosios membranos geometriją, leidžiančią padidinti biojutiklio jautrį (2 pav.). Ženklus jautrio padidėjimas yra galimas tik esant mažiems fermentinės reakcijos greičiams.

Literatūra

1. F. Scheller, F. Schubert, *Biosensors*, Elsevier, Amsterdam (1992).
2. U. Wollenberger, F. Lisdat, F.W. Scheller, *Frontiers in Biosensorics 2, Practical Applications*, Birkhauser Verlag, Basel (1997).
3. T. Schulmeister, D. Pfeiffer, Mathematical modelling of amperometric enzyme electrodes with perforated membranes, *Biosens. Bioelectron.*, **8**, 75–79 (1993).
4. A.A. Samarskii, *The Theory of Difference Schemes*, Marcel Dekker, New York–Basel (2001).
5. R. Baronas, F. Ivanauskas, J. Kulys, The influence of the enzyme membrane thickness on the response of amperometric biosensors, *Sensors*, **3**, 248–262 (2003).

SUMMARY

R. Baronas, F. Ivanauskas, J. Kulys. Modelling biosensors with perforated membrane

This paper presents a two-dimensional-in-space mathematical model of amperometric biosensors with perforated membrane. The model is based on the diffusion equations containing a non-linear term related to the Michaelis–Menten kinetics of the enzymatic reaction. The digital simulation was carried out using the finite difference technique. Using computer simulation of the biosensors action, the influence of the geometry of the perforated membrane on the biosensor response was investigated.

Keywords: reaction-diffusion, mathematical modelling, biosensor, perforated membrane.