

חיישנים המבוססים על חד-שכבות מאורגנות עצמית

מאת: רון בלונדר*

בין החיישן לגורם הנמדד. תפקוד מוצלח של חיישן מתאפשר תודות לתכונות האלה:

« ספציפיות גבוהה כלפי הגורם הנמדד, המתאפשרת על ידי הכרה סלקטיבית בינו ובין החיישן, בזכות יכולתו של החיישן לזהות את הגורם הנמדד זיהוי סלקטיבי.

« רגישות חישה גבוהה הנובעת מקבועי קישור גבוהים בין החיישן לגורם הנמדד.

« יציבות החיישן בתנאים שונים ולאורך זמן.

« עלות נמוכה של החיישן תודות לשימוש בכמויות מזעריות של גורמי החישה בתוך מערכת החישה.

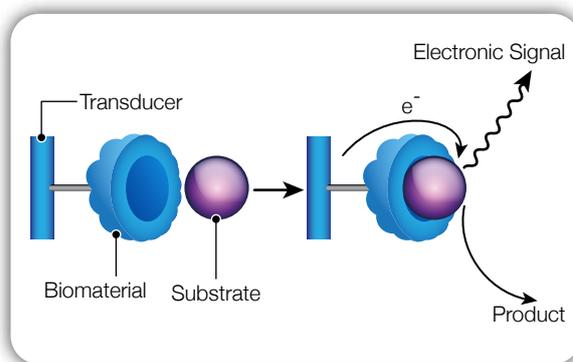
עקרון פעולת החיישן מתוארת באיור 1. כאשר מתקיימת אינטראקציה בין מערכת החישה לבין הגורם הנמדד, מתקבלת תגובת שידור של אות פיזיקלי, מתכונתי לשיעור התגובה בין הגורם הנמדד לבין מטריצת החישה. בין אותות השידור נכלל לציין אות אלקטרוכימי, הפעלת טרנזיסטור FET, אות אופטי (צבע, פלואורסנציה, כימילומינסנציה), אות רזוננס פלזמוני, אות תרמי, אות רדיואקטיבי, אות פיזיקלי ועוד. במאמר זה נתאר חיישנים שונים המבוססים כולם על חד-שכבות מאורגנות.

אלקטרודות במערך חד-שכבה נבסי לפיתוח חיישנים

עיגון של מרכיבי חישה לאלקטרודה במערך חד-שכבה או רב-שכבה מהווה שיטה ליצירת מערך חישה בקמדי עובי מולקולאריים. במאמר זה נתאר שימוש מגוון ביישום חד-שכבות מולקולאריות לעיגון חומרי חישה שונים. לפיכך אסקור כאן תחילה את הכימיה ואת הפיזיקה של חד-שכבות

בגליונות האחרונים של העיתון פורסמו מספר מאמרים בנושא חיישנים והמאמר הנוכחי מהווה ניסיון לגשר בין המידע המדעי הרלוונטי לנושא החיישנים ובין הוראת הכימיה בתיכון. המאמר בנוי ממבוא לנושא חיישנים המבוססים על חד-שכבות, אחריו יופיעו שלושה מאמרי מחקר, הסוקרים כל אחד חיישן ספציפי ומתארים את הרכבו הכימי, פעולת החישה והיישומים השונים שלו, ולסיום מופיעה הצעה לשימוש בחומרים אלה בהוראת הכימיה. המאמר הינו תוצר משותף של סטודנטיות להוראת הכימיה, הלומדות לתואר שני במסגרת תוכנית רוטשילד-ויצמן, במכון ויצמן למדע. ונכתב בהנחייתה של ד"ר רון בלונדר.

בשנים האחרונות מוקדש מאמץ מדעי ניכר לפיתוח חיישנים לשימוש בתחומים אנליטיים מגוונים, כגון: דיאגנוסטיקה רפואית, אנליזת מזון, חומרי נפץ, איכות הסביבה ועוד. חיישן הוא מערכת חישה של גורם אנליטי המבוססת על אינטראקציה



איור 1: תיאור סכמטי של פעולת החיישן

* ד"ר רון בלונדר, המחלקה להוראת המדעים מכון ויצמן.

פני משטח המתכת. במנגנון חלופי משערים כי התיאול גורם לחיזור פני המתכת תוך כדי שחרור מימן. ואכן מחקרים רבים הצביעו על איתור פליטת מימן במהלך היווצרות חד-השכבה. הקשר בין הזהב לתיאולאט חזק, והאנרגיה הדרושה לשבירה המוליטית של הקשר היא בשיעור של 44 קק"ל/מול.

קיימות שתי גישות כלליות לבניית חד-שכבות עם קבוצות קצה פונקציונאלי במבנה כימי מוגדר על פני משטחי זהב:

« גישת ה-Top-down: על פי גישה זו, מסנתזים נגזרת תיאולית המכילה את קבוצת הקצה הרצויה, כמוצג באיור 3a.

« גישת ה-Bottom-up: בגישה זו מארגנים את חד-השכבה על פני האלקטרודה בתהליך רב-שלבי. תהליך זה כולל שלב ראשוני שבו קושרים אל משטח הזהב קבוצת תיאול (או דיסולפיד) המכילה קבוצת קצה פונקציונאלית (X). קבוצה זו ניתנת לצימוד המשכי לתרכובות הנושאות קבוצה פונקציונאלית מתאימה לצימוד (Y). באופן זה הסינתזה של חד-השכבה הרצויה מתקיימת על מצע חד-שכבה בסיסי, כמתואר באיור 3b.

בעזרת הגישות האלה למודיפיקציה של פני שטח, נקשרו לאלקטרודות חישה מגוון של חומרים: ליגנדים לחישה יוני מתכות, מקטעי DNA לחישה של מקטעי DNA תואמים, אַנזימים לחישה ליגנדים, מוגדנים לחישה אנטיגנים ועוד ועוד. במאמר זה נציג שלוש דוגמאות למערכות חישה המבוססות על חד-שכבות מאורגנות על פני משטחים והצעה לפעילות בכיתה:

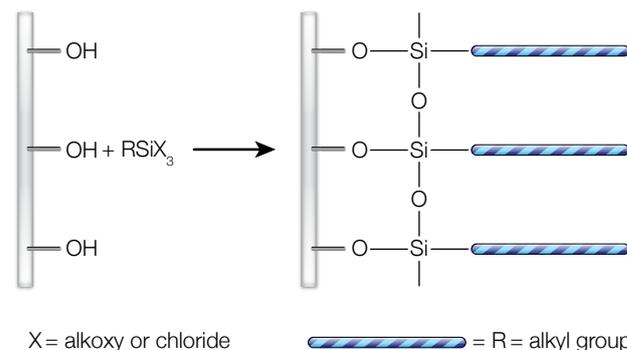
« **ביוסנסורים אלקטרוכימיים למי חמצן המבוססים על אנזים HRP וקולואידים של זהב, מאת נועה קריגר ואיגנה משולם**

« **חיישנים פלואורסנטיים כמודל לקישור ליגנד-רצפטור על גבי ממברנות של תאים, מאת מירב דינור ולינך סלע**

« **חיישן מהפכני - החיישן ההפוך! מאת פאדיה חטיב וסוהיר סחניני**

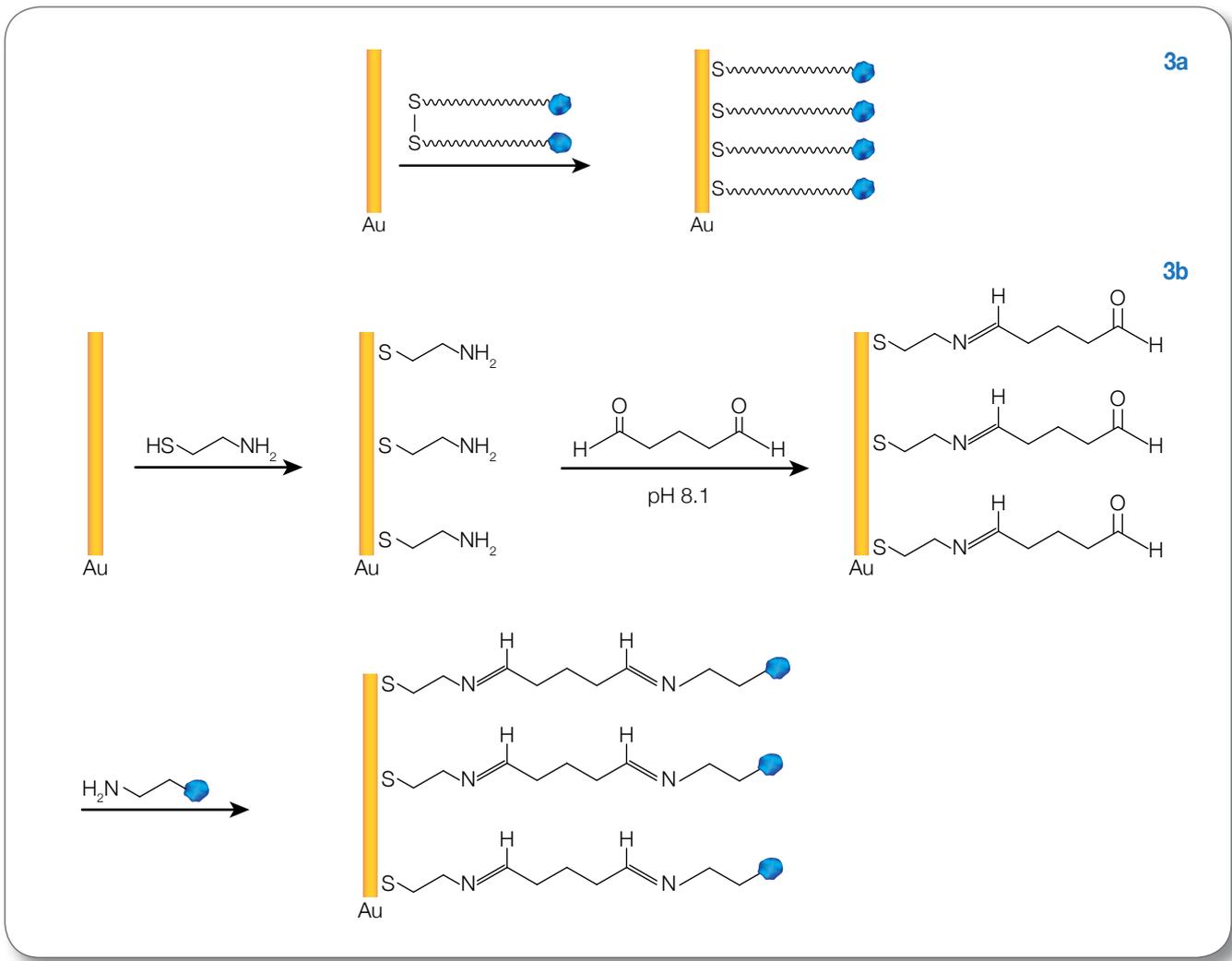
« **התאמה לשדה החימוכי, מאת רונית ברד**

מולקולאריות ואדון ביישומן ליצירת אלקטרודות חישה. קיימות שיטות רבות לארגון חד-שכבות על פני משטחים. העקרונות לבניית חד-שכבות מאורגנות עצמית (SAM-Self Assembled Monolayer), מתבססים על תגובה כימית בין קבוצות פונקציונאליות המעוגנות למונומר המרכיב את חד-השכבה לבין פני המשטח. קישור תרכובות סילאוקסאן למשטח זכוכית (SiO_2), לבדיל אוקסיד (SnO_2) או לאינדיום-טין- אוקסיד (ITO) מהווה דוגמה ליצירת חד-שכבות על ידי התמרה כימית. המונומר הסילאוקסאני מגיב עם קבוצות ההידרוקסיל המהוות קבוצות פעילות על פני המשטח, כפי שמוצג באיור 2. יש לציין כי קישור הסילקאסן לפני השטח יכול להיעשות בחד-שכבה מולקולארית או בשכבה דקה הבנויה ממספר שכבות מולקולאריות, בהתאם לכמות המים הנמצאים בתוך תמיסת המונומר בעת ביצוע התגובה.



איור 2: חד-שכבה מאורגנת של אלקיל-טריכלורו-סילאן או אלקיל-טריאלקאוקסי-סילאן על פני משטח המכיל יחידות הידרוקסיליות

גישה נוספת להכנת חד-שכבות מאורגנות עצמית, הזוכה ליישום רב, מתבססת על קישור תיאולים ($\text{thiol}=\text{R-SH}$) או דיסולפידים ($\text{disulfide}=\text{R-SS-R}$) למשטחים של מתכות אצילות דוגמת זהב, כסף או פלטינה. קישור יחידות המונומר של תיאולים ודיסולפידים לזהב מביא ליצירת קשר כימי בין תיאולאט ($\text{thiolate}=\text{R-S}^-$) לבין זהב יוני (Au^+). הקשר הכימי הוא יוני עם אופי קוולנטי. קיומו של הקשר הוכח בשיטות איפיון רבות, אך מנגנון יצירת הקשר עדיין נמצא במחלוקת. הועלתה השערה כי התיאול מחזר שכבת אוקסיד המצויה על



איור 3: ארגון של חד-שכבה של תיאול או די-סולפיד על פני זהב בשתי גישות: a- Top-down, b - Bottom-up

ביוסנסורים אלקטרוכימיים למי חמצן המבוססים על אנזים HRP וקולואידים של זהב

מאת: נועה קריגר ואינגה משולם*

אמידים). כעת קבוצת התיוול פונה כלפי חוץ, ואליה סופחים קולואידים של זהב (כפי שמתואר באיור מספר 4). לקולואידים של זהב קושרים את מולקולות האנזים, וכך יצרנו חיישן המורכב מחד-שכבות מאורגנות של ננו חלקיקים עם חומר ביולוגי פעיל (האנזים - פראוקסידאז HRP).

הגודל הקטן של ננו חלקיקי זהב מאפשר קרבה פיזית בין מרכז הפעילות של האנזים לננו חלקיק, דבר המקל על תהליך מעבר האלקטרונים ביניהם ומאפשר קישור חשמלי בין אנזים חמצון-חיזור (פראוקסידאז HRP), לננו חלקיק וממנו לאלקטרודה. מאחר ש-HRP מחזור ישירות על פני שטח של האלקטרודה בתנאים עדינים, הדבר יאפשר לבנות אלקטרודה ללא תיווך למעבר האלקטרון, כפי שקיים בדור השלישי של ביו-סנסורים המבצעים אנליזה ל- H_2O_2 , גלוקוז וכולסטרול. הקושי לקיום אלקטרוכימיה ישירה של חלבונים עם אלקטרודה נובע מהתהליך האטי שבו האלקטרון עובר מן האתר הפעיל של האנזים לאלקטרודה. בספיחה חזקה של חלבונים על פני שטח האלקטרודה, החלבון הנספח על פני האלקטרודה מהווה חומר המבודד את האלקטרודה בפני אלקטרונים וחוסם את פעילות האלקטרודה.

ניתן להתגבר על הקושי הזה ע"י שימוש בננו חלקיקים של זהב (קולואידים של זהב). בממדיהם המזעריים (כ-30 ננומטר), הקולואידים של זהב מגדילים את דרגת החופש בכיווניות של מולקולות החלבון ומגבירים את האפשרות ליתר קרבה בין הקבוצה המקובעת לבין פני שטח האלקטרודה. כך גם המרחק

ביוסנסור אלקטרוכימי הוא חיישן המבוסס על אנזים חיישן חיזור, ומיועד לזיהוי כמותי של הסובסטרט שלו. האפשרות לבניית ביוסנסורים המכילים אנזימים מחזרים כרכיבי חישה, מבוססת על היכולת של אלקטרונים לעבור ישירות בין ננו חלקיקים מולכים לבין חלבוני חמצון-חיזור. יישום אנזימי חיישן-חיזור בחיישן אפשרי כיוון שעוצמת הזרם החשמלי העובר דרך האלקטרודה- מתכונתי לכמות הסובסטרט. במאמר זה נציג דוגמה לאנזים העובר חמצון-חיזור על אלקטרודות HRP (Horseradish peroxidase)¹⁻³.

לביוסנסור המבוסס על אנזים החמצון-חיזור HRP שני יתרונות:

« לאנזים יש ספציפיות גבוהה לסובסטרט, במקרה של HRP הסובסטרט הוא מי חמצן- H_2O_2 .

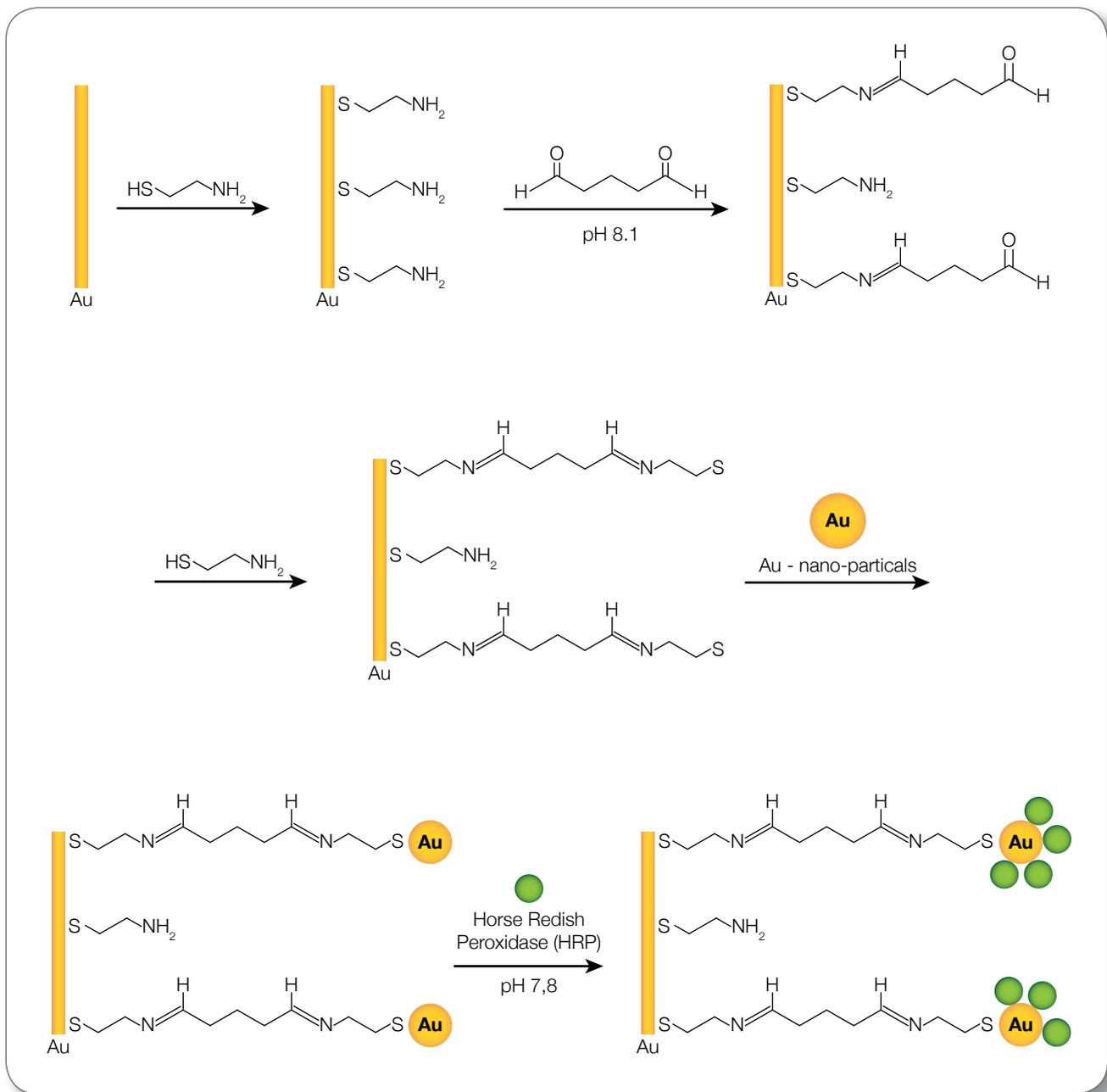
« ניתן לקבע את האנזים HRP בצורה טובה על קולואידים מזהב ללא פגיעה בפעילותו הביולוגית.

כעת נציג את מבנה החיישן ונתאר כיצד האנזים משולב במבנה זה ומהי חשיבותם של ננו חלקיקים של זהב לפעילות החיישן.

מבנה החיישן

מקרומוולקולות ביולוגיות - לדוגמה, אנזימים - שומרות על פעילותן הביולוגית כאשר הן נקשרות לקולואידים של זהב. תהליך החיבור של המקרומוולקולות נעשה בשלבים הבאים: לאלקטרודת זהב סופחים מולקולות עם קצה של תיוול -SH וקצה אמיני- NH_2 (לקבוצת הקצה האמינית קושרים מולקולות די-אלדהיד) ואליה קושרים מולקולות תיוול ואמין נוספת (קשר

* נועה קריגר, מורה לכימיה, תיכון רב תחומי, פתח תקוה. אינגה משולם, מורה לכימיה, תיכון בליך, רמת גן. שתיהן סטודנטיות לתואר שני בתוכנית רוטשילד-ויצמן במכון ויצמן.



איור 4 : הכנת חיישן ל- H_2O_2 המבוססת על ננו חלקיקי זהב הקושרים מולקולות של האנזים HRP

הנעשית ע"י האנזים מתורגמת לאות חשמלי ומנוצלת לתהליכי חישה. כאמור, ל- HRP יש ספציפיות גבוהה ל- H_2O_2 . האנזים HRP יכול לחזר 25,000 מולקולות H_2O_2 ל- H_2O בדקה, ולכל מולקולה שהוא מחזר על פני השטח של החיישן, עוברים שני

להעברת האלקטרונים בין מולקולות החלבון לאלקטרודה קטן וזמן העברת האלקטרונים מתקצר.

עיקרון הפעולה של החיישן מבוסס על כך שהסיגנל החשמלי עולה עם עלייה בריכוז הסובסטרט. כך שהפעילות הקטליטית

המעבירה אלקטרונים באופן ישיר היא קלה יותר לייצור ואף שומרת על הפעילות הביולוגית של האנזים לאורך זמן.

לסיכום, האינטראקציות החזקות בין האנזים הקשור לנו חלקיקים של זהב, הצפיפות הגבוהה של האנזים על פני שטח האלקטרודה והאוריינטציות המתאימות, גורמות להעדפת מעבר אלקטרונים ישיר בין מולקולות האנזים HRP ובין פני האלקטרודה, וכך מתקבל חיישן מתקדם ורגיש לזיהוי מי חמצן.

References

1. Shipway, A., Katz, E., Willner, I. (2000). Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications, *Chem.Phys*, 1, 18-52.
2. Zhao, J., Henkens, R., Stonehuerner, T., O'Daly, J., Crunbliss, A. (1992). Direct electron transfer at horseradish peroxidase-colloidal gold modified electrodes, *J Electroanal Chem*, 327, 109-119.
3. Limiao Li, Shoujiang Xu, Zhifeng Du, Yanfang Gao, Jinghong Li, Taihong. (2010). Electrografted Poly(*N*-mercaptoethyl acrylamide) and Au Nanoparticles-Based Organic/Inorganic Film: A Platform for the High-Performance Electrochemical Biosensors. *Chemistry - An Asian Journal*, 5, 919- 924

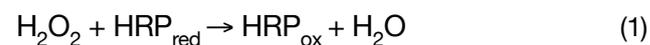
אלקטרונים מן האלקטרודה (מן החיישן) אל האנזים, כלומר, הזרם עולה, כפי שניתן להבין ממשוואות 1 ו-2.

מנגנון התגובה ומעברי האלקטרונים

בנוכחות H_2O_2 (מי חמצן) - HRP עובר למצב מחומצן HRP_{ox} , כפי שניתן לראות בתגובה 1.

מולקולות HRP הנוכחות על פני שטח האלקטרודה נמצאות במצב מחומצן ומחוזרות ישירות או על ידי מתווך של מעבר אלקטרונים (תגובה 2).

משוואות



ממחקרים שהשוו אלקטרודות של חיישנים הקושרות אנזים HRP עולה שיש עדיפות ברורה לשימוש בקולואידים של זהב לאנזים HRP על פני שימוש באנזים נקי, עם ובלי מתווך מעבר אלקטרוני.

יתרונות השימוש באלקטרודות בהן אנזים קשור לקולואידים של זהב

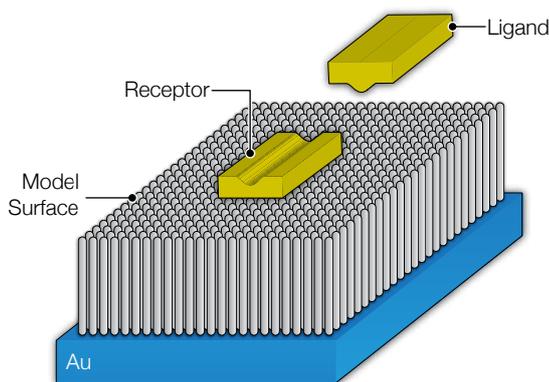
קישור האנזים HRP לנו חלקיקים של זהב הקשורים לאלקטרודה, מאפשר מעבר אלקטרונים ישיר בין האנזים לאלקטרודה (דרך הננו חלקיקים של הזהב). אלקטרודה

חיישנים פלואורסנטיים כמודל לקישור ליגנד-רצפטור על גבי ממברנות של תאים

מאת: מירב דינור ולילך סלע*

מבנה החיישן

החיישן בנוי כחד-שכבה של אלקאן-תיאולים הקשורים לזהב. בקצה התיאול קשורה קבוצה פונקציונלית המשמשת כרצפטור (איור 5). הקבוצות הפונקציונליות (הרצפטורים) הקשורות בקצה שרשרות התיאול, מרוחקות זו מזו במרווח של 1-2 תיאולים כך שמתקבלת מעין מטרייה של הרצפטור מעל לשרשרות התיאולים. באופן זה מושגת המטרה של מזעור האינטראקציות של מולקולות הרצפטור זו עם זו על פני שטח



איור 5: תיאור סכמטי של מערכת למחקר לזיהוי מולקולרי בין ליגנד לרצפטור שהוא קבוצה פונקציונלית בחד שכבה של תיאולים על זהב.

הפנים. כלומר, כל רצפטור נמצא בסביבה שבה אין הוא חש את הרצפטורים האחרים המרוחקים ממנו.

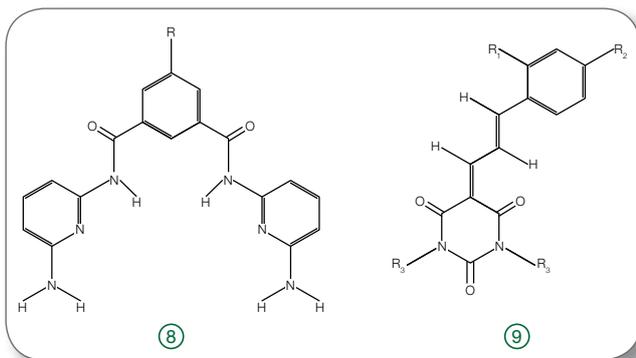
כפי שהוצג במבוא, לחד-שכבות המבוססות על תיאולים הקשורים לזהב יש יתרונות רבים: שרשרות התיאול הארוכות

ממברנה היא אזור הידרופובי המצוי בסביבה הידרופילית, דבר המקשה על ביצוע מחקרים במעבדה אשר נעשים בסביבה הידרופילית או הידרופובית, אך לא מעורבת, ולכן קשה לדמות תהליכים המתרחשים על פני הממברנות. חד-שכבות מאורגנות יכולות לשמש מודל ללימוד ולבחינת אינטראקציות בפני שטח. חד-השכבה מורכבת ממולקולות אורגניות הידרופוביות (אלקאן-תיאול) הקשורות לזהב שהוא אינרטי, בקצה התיאולים קשורות קבוצות פונקציונליות בהתאם לצורך.

בחיישן המוצע קיים חלק הידרופובי שעליו מתבצע תהליך הקשירה באמצעות הרצפטור בדומה לממברנת התא, וניתן לעבוד איתו בסביבות שונות. מכאן נובעת חשיבות המחקר המאפשר ללמוד על התנהגות חומרים על ממברנה של תא. חיישן הבנוי כחד-שכבה של תיאולים על זהב שאליה קשורה מולקולה פלואורסנטית הידרופילית, מייצג מודל לזיהוי של קישור חומרים על שטח פנים בדומה לתהליך המתרחש על פני ממברנות. מטרת החיישן היא לדמות קישור של ליגנד הידרופילי לרצפטור בסביבה הידרופובית. זיהוי האינטראקציות נעשה על ידי מדידה פלואורסנטית. מכיוון שנמצא שספקטרוסקופיה של פלואורסנציה היא טכניקה יעילה ביותר למחקרים על שכבות דקות.

Kianoush Motesharei & David C. Myles מהמחלקה לכימיה וביוכימיה באוניברסיטת קליפורניה, לוס אנג'לס, שפיתחו את החיישן בשנת 1997.

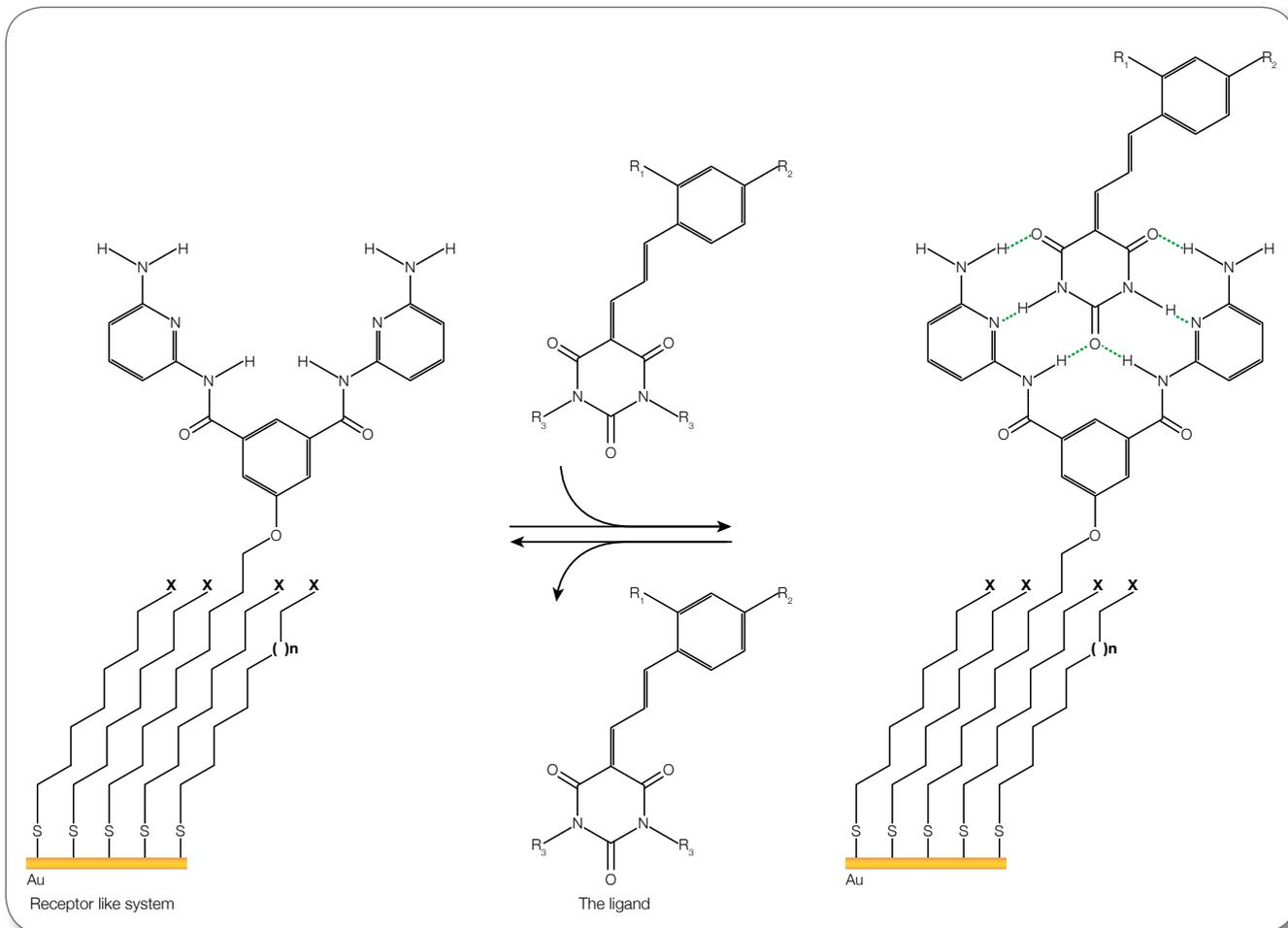
* מירב דינור, מורה לכימיה, אולפנת להבה, קדומים. לילך סלע, מורה לכימיה, ביה"ס העל-יסודי, משגב. שתיהן סטודנטיות לתואר שני בתוכנית רוטשילד-ויצמן במכון ויצמן



איור 6: הרצפטור (8) bis-diaminopyridine (9) והליגנד נגזרת של חומצה ברביטורית 2

מתארגנות ביעילות ובצורה מסודרת, וכך מתקבלת חד-שכבה בעלת מבנה צפוף הקרוב למבנה גבישי. קלות ההכנה והאפיון, מגוון האפשרויות בבחירת קבוצות פונקציונליות כקבוצות קצה, והאינרטיות (חוסר פעילות כימית) של הזהב כלפי רוב הקבוצות האורגניות - הופכות את חד-השכבה הזו למערכת אידאלית שמשמשת מודל לתופעות חשובות המתרחשות בשטח הפנים.

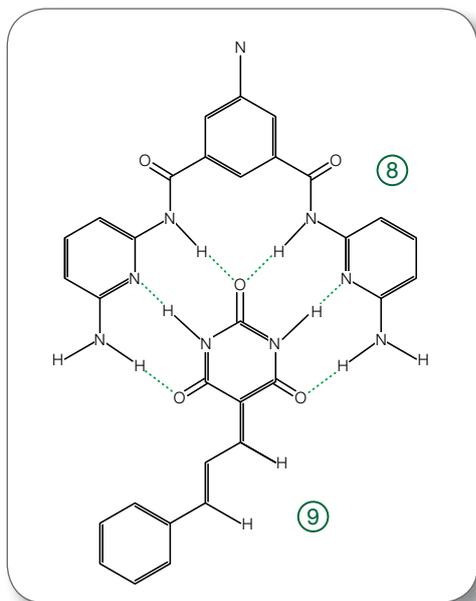
מערכת כזו מאפשרת בחינה של פרמטרים יחודיים המשפיעים על הזיהוי והקישור של הרצפטור לליגנד (קומפלקס ליגנד-רצפטור), כדוגמת אינטראקציות בין הממס לליגנד, בין הממס



איור 7: זיהוי מולקולרי בין נגזרת של barbituric acid לבין bis (2,6-diaminopyridine) amide על חד-שכבה של תיאולים על זהב. יש לשים לב שמדובר במגוון חומרים השונים במספר פרמטרים.



בפליטה הפלואורסנטית ($\Delta\lambda$) - ההפרש בין אורך הגל הנפלט בהארת הקומפלקס ליגנד-רצפטור לעומת אורך הגל הנפלט בהארת רצפטור חופשי. זאת במטרה למצוא את התנאים האופטימליים לפעילותו של החיישן.



איור 8: הקומפלקס ליגנד-רצפטור

נבחנה השפעתם של ממסים שונים על הצימוד ליגנד-רצפטור. נמצא כי ממס פולרי מפחית את הקומפלקסציה ליגנד-רצפטור מכיוון שהקישור בין הליגנד לרצפטור המבוסס על קשרי מימן נחלש כתוצאה מנוכחות הממס הפולרי, המקיים קשרי מימן עם הליגנד והרצפטור. אורך גל הפליטה של הקומפלקס ליגנד-רצפטור (הסטה לאדום) גדולמה של הרצפטור החופשי. בטבלה 1 ניתן לראות שממס פולרי מוריד את גודל ההסטה ($\Delta\lambda$ יורד), ואורך הגל הנפלט מתקצר באופן משמעותי.

לעומת זאת בממס אפולרי יועדפו האינטראקציות ליגנד-רצפטור על פני האינטראקציות עם הממס. ההסטה החיובית באורך הגל הנפלט ($\Delta\lambda$) היא גדולה יחסית. הממס הפולרי מייצב את המצב המעורר ובכך מוריד את האנרגיה שלו; הפרש האנרגיה (ΔE) בין המצב המעורר למצב היסוד קטן, ולכן אורך הגל של האור שנפלט יהיה גדול יותר ($E=hc/\lambda$).

לרצפטור וכן השפעתה של סביבת שטח הפנים על היכולת של הרצפטור המצוי על שטח הפנים לזהות ליגנדים בתמיסה. בשלבים ראשונים של המחקר נחקרה המערכת של הרצפטור bis-diaminopyridine amid (חומרים 8-9 באיור 8) ומגוון ליגנדים שהם נגזרות של חומצה בריטורית (2) בתמיסה (לא על חד-שכבה), על מנת לבדוק את הסטוכיומטריה של הקישור ליגנד-רצפטור. נמצא כי בממס הידרופובי נוצר קומפלקס ליגנד-רצפטור ביחס של 1:1.

בהמשך נערך מחקר על החיישן-רצפטור הקשור לחד-שכבה של אלקאן תיאולים על זהב. במחקר בוצעו מספר ניסויי חקר שבהם שינו החוקרים בכל פעם משתנה בלתי תלוי אחר ובחנו את השפעתו של כל משתנה על הקישור ליגנד-רצפטור. השינויים שנבדקו מוצגים באיור 9 וכללו את השינויים האלה: שינוי ההרכב והיחס של התיאולים המרכיבים את החד-שכבה, ועקב כך שינוי בריכוז הרצפטור המשולב בחד-השכבה; שינוי בקבוצות הקצה הפונקציונליות ובאורך השרשרת וכן שינוי הקוטביות והמטען של פני השטח המקיפים את הרצפטור. בכל אחד מן השינויים נבדקה יעילותן של מולקולות הרצפטור בקישור אל הליגנד באמצעות מעקב אחר עוצמת אות הזיהוי המתקבל על ידי החיישן כתוצאה מאותו הקישור, כפי שיפורט בהמשך.

התהליך הכימי בעת החישה

תהליך הזיהוי של החיישן הוא תהליך הפיך (איור 7), מכיוון שהקישור בין הליגנד לרצפטור מבוסס על קשרי מימן הנוצרים בשישה מוקדים (איור 8).

הקבוצה הפונקציונלית הנקשרת לחד-השכבה (2,6 bis-diaminopyridine amid היא פלואורסנטית: כאשר מאירים אותה באורך גל המתאים לבליעה שלה (λ_{exc} 335nm), נפלטת קרינה בתחום הנראה (פלואורסנציה). כאשר נקשר הליגנד, יש הסטה באורך הגל של הפלואורסנציה, בעקבות הקשרים החדשים שנוצרו.

במהלך המחקר החוקרים בדקו את השפעותיהם של הגורמים שונים על הקישור ליגנד-רצפטור על ידי ההסטה

טבלה 2: ההסטה באורך הגל הנפלט כפונקציה של אורך שרשרות האלקאן-תיאול

$(\Delta\lambda)$	אורך הגל הנפלט (nm)		סוג החד-שכבה המשמשת לקומפלקסציה*
	אחרי קישור לליגנד	לפני קישור לליגנד	
14	520	506	1a
10	517	507	1b
4	513	509	1c
0	523	523	1d

המולקולות 1a-1d מתוארות באיור 9

באופן דומה נבדקה ההשפעה של קבוצות קצה הידרופיליות בקצה התיאולים. נמצא כי בדומה לממס הידרופילי גם קבוצות OH בקצה השרשרות (1d, בטבלה 2) מתחרות על קשרי המימן בין הרצפטור לליגנד, ולכן מפריעות לקישור ביניהם, ולא מתקבלת הסטה באורך הגל הנפלט ($\Delta\lambda=0$).

לסיכום: נמצא כי החיפוש המוצג מאפשר לדמות קישור של מולקולות לסביבה מעורבת - הידרופילית והידרופובית - וללמוד על הגורמים המשפיעים על האינטראקציות בין הליגנד לרצפטור. ניתן לראות כי החיפוש יעיל בקישור של ליגנד ורצפטור הידרופיליים בסביבה הידרופובית.

Motesharei, K. & Myles, D. C. (1998). Molecular Recognition on Functionalized Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols on Gold. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 7328-7336

טבלה 1: ההסטה באורך הגל הנפלט ($\Delta\lambda$) כפונקציה של הממס

$(\Delta\lambda)$	אורך הגל הנפלט (nm)		הממס המשמש לקומפלקסציה
	אחרי קישור לליגנד	לפני קישור לליגנד	
14	520	506	CH_2Cl_2
12	518	506	CH_3CN
10	516	506	H_2O in 20% CH_3CN
0	506	506	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

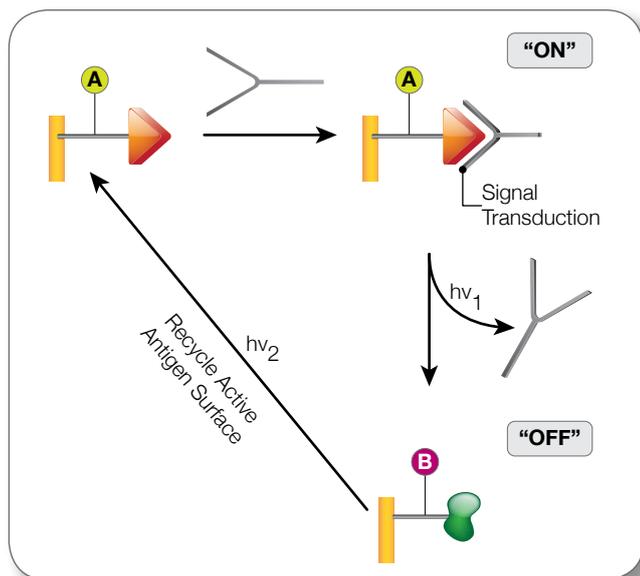
נבחנה גם ההשפעה של אורך שרשרות האלקאן-תיאול המקיפות את רצפטור. על פי טבלה 2 ניתן לראות שככל שהשרשרות ארוכות יותר, ההסטה באורך הגל הנפלט ($\Delta\lambda$) קטנה בעקבות הפחתת קומפלקסציה לליגנד-רצפטור. הדבר נובע מכך ששרשרות ארוכות בקרבת הרצפטור גורמות לצפיפות מרחבית ולעיוות באריזה של הרצפטור עם שכבת שטח הפנים; עיוות זה אינו מאפשר קשר מושלם בין הליגנד לרצפטור. לעומת זאת כאשר שרשרות התיאול קצרות, אין הפרעה מרחבית לקישור של הליגנד לרצפטור, וההסטה באורך הגל הנפלט ($\Delta\lambda$) גדלה.

חיישן מהפכני – החיישן ההפוך!

מאת: פאדיה חטי'ב וסוהיר סחניני*

סמן חמזור, $K_3Fe^{III}(CN)_6$, מתחזר ליד האלקטרודה במעבר חד-אלקטרוני לקבלת הצורן המחזור $K_4Fe^{II}(CN)_6$. סמן החמזור מאופיין בתכונות אלקטרוכימיות הפיכות ואינו רגיש לתנאי הסביבה.

על מנת להשיג הפיכות בפעילות האימיונסנסור – החיישן האימונולוגי **חייב להגיב** על תהליך קישור הנוגדן לאנטיגן. כמו כן עליו **להכיל מרכיב קולט** אור המהווה מתג (OFF-ON) לתהליך הקישור של הנוגדן לאנטיגן. מערכת אימיונסנסור הפיכה מוצגת באיור 9.



איור 9: הדגמה סכמטית של העיקרון למיתוג חיישנים לשם זיהוי נוגדנים באמצעות אנטיגן פוטואיזומרזאבילי.

במערכת זו האנטיגן עובר התמרה באמצעות חומר פוטואיזומרזאבילי (A), בתנאים אלה האנטיגן פעיל בקישור הנוגדן, ועם קיום תהליך הקישור הנוגדן-אנטיגן מתקבל סיגנל

הקדמה

אימיונסנסורים הם חיישנים המבוססים על אינטראקציות בין נוגדן לאנטיגן ומהווים מערכת חישה מעניינת ושימושית שמטרתה לגלות את הימצאותם של נוגדנים במערכות חיות. לזיהוי נוגדנים חשיבות דיאגנוסטית רבה. בנוסף לזיהוי נוגדנים ניתן לפתח אימיונסנסורים לבדיקת הימצאותם של אנטיגנים בגוף (חיידקים או טפילים שחדרו לגוף).

אחת הבעיות המרכזיות בפיתוח חיישנים לזיהוי נוגדנים נעוצה בהקניית תכונות הפיכות לחיישן. בכל התקני החישה האימונולוגיים הקיימים אינטראקציות הקישור החזקות בין הנוגדן לאנטיגן הופכות את האימיונסנסור להתקן חישה חד-סבבי. הסיבה לכך היא שקישור הנוגדן לאנטיגן כה חזק, עד כי ניתן להתייחס אליו כבלתי הפיך, ולפיכך עם קישור הנוגדן לאנטיגן שעל פני שטח החיישן אתרי החישה האנטיגנים של החיישן מנוטרלים, ולא ניתן לבצע סבב חישה נוסף בעזרת האלקטרודה.

יצירת אימיונסנסורים בעלי תכונות מדידה הפיכות עשויה לתרום לפיתוח שיטות מדידה אימונולוגיות חדשניות ולהפוך את החיישן האימונולוגי לחיישן רב-סבבי – תכונה שתקטין את עלות הבדיקה.

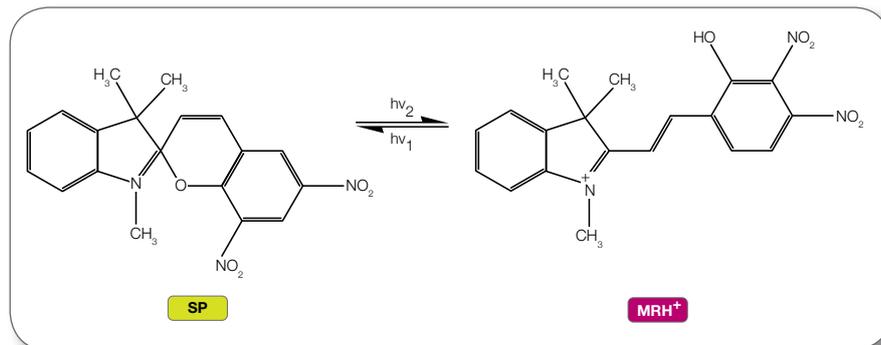
במאמר זה נראה איך ניתן לפתח חיישנים אימונולוגיים הפיכים על ידי מיתוג תהליך הקישור של אנטיגן פוטואיזומרזאבילי לנוגדן (Blonder et al., 1997).

אימיונסנסורים הפיכים על בסיס אנטיגן פוטואיזומרזאבילי מכילים מספר מרכיבים:

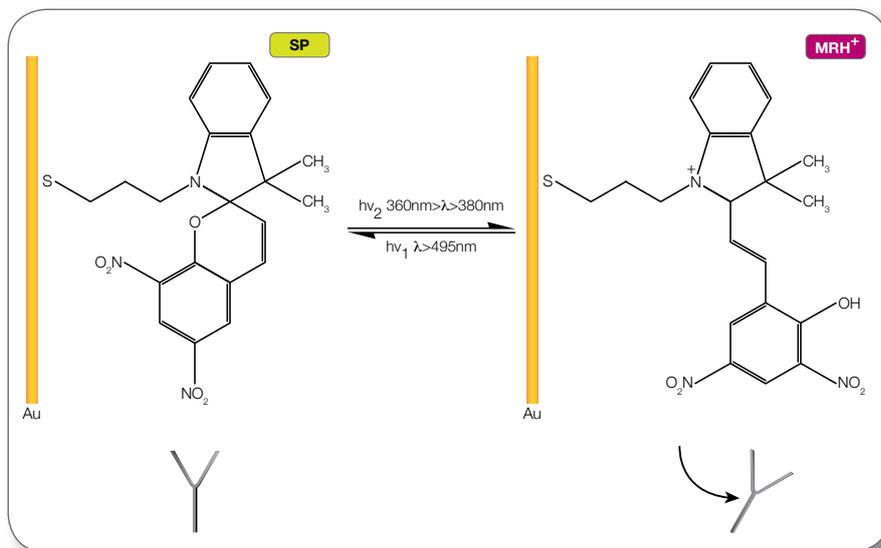
« אלקטרודה בהרכב חד-שכבה של האנטיגן

« תמיסה המכילה את הנוגדן anti-DNP.

* פאדיה חטי'ב, מורה לכימיה, ביה"ס עמל, טירה. סוהיר סחניני, מורה לכימיה, התיכון האיטלקי, חיפה. שתיהן סטודנטיות לתואר שני בתוכנית רוטשילד-ויצמן במכון ויצמן.



איור 10: תהליך הפוטואיזומריזציה של ספירופיראן, (SP) - האיזומר הספירופיראני, (+MRH) - האיזומר המרוציאניני. שניהם (SP ו-MRH+) פוטואיזומרים שמגלים תכונות אנטיגניות שונות כלפי נוגדן ה-anti-DNP.



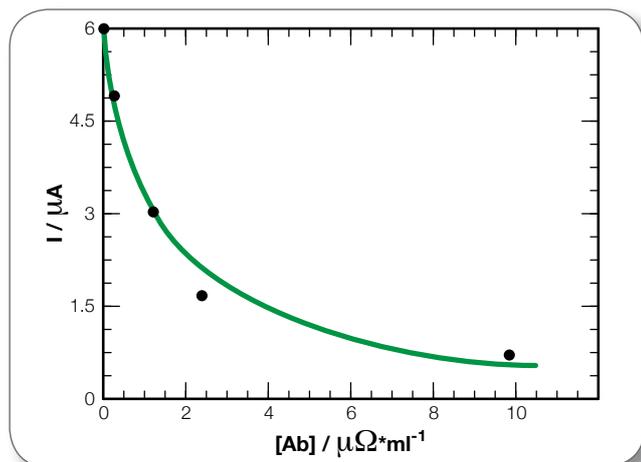
איור 11: יישום דיטרנספירופיראן כאנטיגן פוטואיזומריזאבילי למיתוג תכונות הקישור של הנוגדן anti-DNP.

מערכת המורכבת מחד-שכבה אנטיגנית פוטואיזומריזאבילית לחישה נוגדן ה-anti-DNP. לאיזומרים (SP) ו-(MRH+) שהמעבר ביניהם מתבצע בעזרת אור (פוטואיזומרים) ה-anti-DNP (נוגדן שנקשר לקבוצת דיטרופניל) לאנטיגן כמוצגים באיור 10.

האיזומר SP הוא בעל אפיניות גבוהה לנוגדן ה-anti-DNP; לעומתו איזומר MRH+ חסר תכונות קישור לנוגדן. האפיניות השונה של האיזומרים SP ו-MRH+ כלפי הקישור של הנוגדן

חישה. בהקרנת החומר (A) באורך גל $h\nu_1$ מתקיימת איזומריזציה למבנה (B) הגורמת לעיוות במבנה האנטיגן. בתנאים אלה מתפרק הקומפלקס נוגדן-אנטיגן, והנוגדן משתחרר מן האנטיגן. בהקרנת האיזומר (B) באורך גל $h\nu_2$ משוחזר מבנה האנטיגן הראשוני לחישה חוזרת של הנוגדן (מעגל חישה שני). כלומר, לאחר קיום חישה ראשונית ניתן לשחזר את החישה האנטיגנית על ידי הקרנה בשני אורכי גל שונים תוך כדי שטיפת ביניים של הנוגדן.

העקרונות לפיתוח חיישנים לזיהוי נוגדנים הפיכים נחקרו בעזרת



איור 12: תגובות אמפרומטריות של אלקטרודת חד-שכבה של SP אשר טופלו בריכוזים שונים

האינטראקציה של אלקטרודת חד-השכבה (SP), עם הנוגדן anti-DNP מובילה לבידוד החשמלי של אלקטרודת החישה כלפי החמצון של סמן החמזור פרי / פרו-ציאניד, $K_4Fe^{II}(CN)_6 / K_3Fe^{III}(CN)_6$ הנגרם כתוצאה מקישור הנוגדן לחד-השכבה האנטיגנית. פוטואיזומריזציה של החד-שכבה למצב MRH^+ ולאחר מכן שטיפת האלקטרודה מובילים לשחזור התגובה האמפרומטרית האופיינית לאלקטרודת חד-השכבה SP. כלומר, נוגדן ה- anti-DNP נשטף ומתנתק ממשטח החישה. איזומריזציה נוספת של אלקטרודת חד-השכבה MRH^+ לקבלת אלקטרודת חד-השכבה SP משחזרת את פני השטח האנטיגניים הפעילים, אשר שוב הופכים מבודדים חשמליים במגע עם תמיסת נוגדן anti-DNP.

פוטואיזומריזציה הפיכה של אלקטרודת חד-השכבה (SP) אשר עברה אינטראקציה עם הנוגדן anti-DNP לחד-השכבה האיזומרית MRH^+ מאפשרת שטיפה וניתוק של הנוגדן ה- anti-DNP מפני השטח של אלקטרודת החישה, ובעזרת פוטואיזומריזציה המשכית של חד-השכבה MRH^+ למצב ה-SP משוחזרים פני השטח של אלקטרודת החישה למדידה נוספת כמוצג איור 13.

anti-DNP הובילה לפיתוחו של חיפושן אמפרומטרי הפיך לזיהוי נוגדים, שהפיכותו מושגת ע"י אור, כפי שמתואר באיור 13.

בניית חד-שכבה לקבלת החיפושן

כדי ליצור את החד-שכבה של האנטיגן הפוטואיזומריזאבילי הכינו במעבדה נגזרת תיאולית של האנטיגן. תיאולים יוצרים חד-שכבה מאורגנת על פני אלקטרודות זהב, כפי שהוצג במבוא.

תכונות חד-השכבה הפוטואיזומריזביליות

חד-השכבה הדינטרוספירופיראנית, איזומר ה-SP באורך גל $360nm < \lambda < 380nm$ מובילה לקבלת חד-השכבה של האיזומר הדינטרוספירופיראניני, MRH^+ העובר פרוטונציה ב-pH ניטרלי. הקרנה נוספת של חד-השכבה של האיזומר MRH^+ , $\lambda > 495nm$ משחזרת את חד-השכבה של האיזומר SP.

תהליך חישה הפיכה של נוגדן ה- anti-DNP באמצעות אלקטרודה פוטואיזומריזאבילית של SP

המערכת מורכבת מאלקטרודה המכוסה חד-שכבה אנטיגנית פוטואיזומריזאבילית של האנטיגן SP, ומתמיסה המכילה את הנוגדן anti-DNP. משתמשים בסמן חמזור שהוא פרי/פרו-ציאניד $K_4Fe^{II}(CN)_6 / K_3Fe^{III}(CN)_6$.

הנוגדן משתחרר מהאנטיגן בעזרת קרינה כתוצאה משינוי איזומרי במבנה האנטיגן. הקרנה נוספת באורך גל מתאים הופכת חזרה את המבנה של האנטיגן למצבו ההתחלתי, כך שנוגדן יוכל להיקשר אליו שוב, וכך מתקבל תהליך הפיך.

איור 12 מציג את הירידה בתגובה האמפרומטרית (ירידה בעוצמת הזרם) של אלקטרודת חד-שכבה האנטיגנית של SP אשר עברה טיפול עם תמיסת נוגדן ה-anti-DNP בריכוזים שונים. סמן החמזור עוקב אחר היווצרות הקומפלקס בין הנוגדן לאנטיגן שעל פני השטח. גודל הזרם יורד ככל שריכוז נוגדן ה- anti-DNP עולה, כלומר, אלקטרודת חד-שכבה ספירופיראנית (SP) מהווה משטח אנטיגני פעיל לחישה כמותית אלקטרוכימית של הנוגדן anti-DNP, ולכן רואים ירידה בזרם כתוצאה מהקישור בין האנטיגן לנוגדן anti-DNP, (הזרמים נמדדו בפוטנציאל $E=0.4V$).

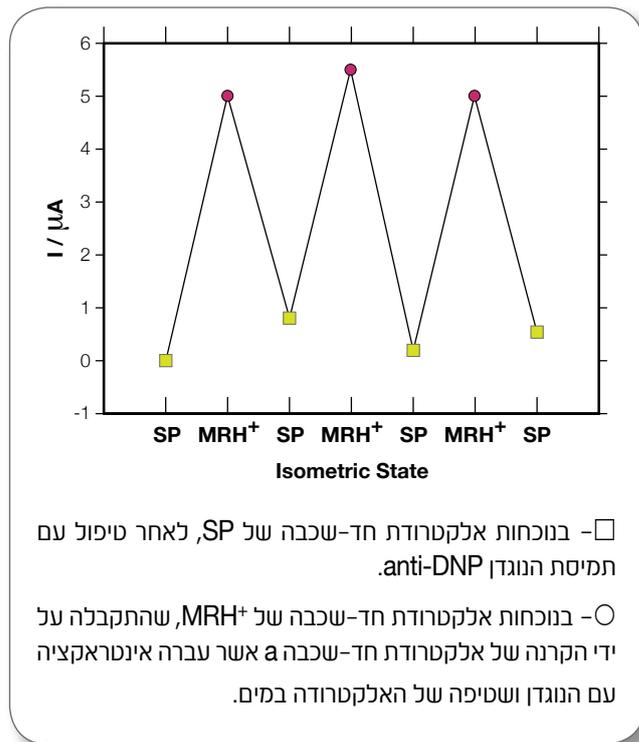
סיכום: מאמר זה חושף אותנו לסוג חדש של חיישנים - חיישנים אימונוסנסורים הפיכים, אשר מתאימים לשימוש חוזר ובכך ייחודם. הגישה בפיתוח של חיישנים אלה התבססה על שימוש באנטיגן פוטואזומרזאבילי אשר תכונות הקישור שלו לנוגדן נשלטות ע"י המבנה של המרכיב הפוטואזומרזאבילי.

אימונוסנסורים הפיכים עשויים לתרום לפיתוח שיטות מדידה אימונולוגיות חדשניות בתחומים שונים ולפיתוח חיישן אימונולוגי רב-סבבי - תכונה שתוביל להורדה בעלות הבדיקה.

כמורות לכימיה, היה חשוב לנו לשתף אתכם בנושא מעניין ועדכני מחזית המדעשיש לו השלכות על תחומים שונים בחיי היומיום. הנושא קשור באופן בלתי הפיך (: לכימיה והוא מדגיש את חשיבות הכימיה בכלל ואת תרומתה לאנושות ביישומים מדעיים-טכנולוגיים.

Reference:

Blonder, R.; Levi, S.; Tao, G.; Ben-Dov, I.; Willner, I. J. *Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10467-10478



איור 1.3: תגובות אמפירומטריות מחזוריות של אלקטרודת חד-שכבה של האנטיגן

חיישנים המבוססים על חד שכבות מאורגנות - התאמה לשדה החינוכי

מאת: רונית ברד*

פעילות 1

בפתיח למאמר מוצגים תחומים שונים שבהם משתמשים בחיישנים. התייחסו לכל אחד מהתחומים וציינו לפחות גורם נבדק אחד שהייתם בודקים בעזרת חיישן. לדוגמה: בתחום חומרי נפץ ניתן לפתח חיישן ל-TNT (שהוא חומר פציץ ביותר).

« לפיכם מגוון פעילויות אפשריות לעבודה עם המאמרים המצורפים. את הפעילויות ניתן לתת לתלמידים בכל הרכב אפשרי ללא תלות ברצף שבו הן מופיעות.

« כל הפעילויות המוצעות מיועדות לעבודה בקבוצות של 3-4 תלמידים.

« מומלץ לשלב את פעילות 1 ופעילות 2 בכל גרסה.

* רונית ברד, מורה לכימיה, תיכון ע"ש קציר רחובות, סטודנטית לתואר שני בתוכנית רוטשילד-ויצמן במכון ויצמן.



פעילות 2

התייחסו למבוא של המאמר וכתבו בשפתכם מה הייתם מספרים לילדים צעירים על חיישנים המבוססים על חד-שכבות מאורגנות עצמית. הקפידו על קטע המכיל 50-100 מילים.

פעילות 3

התייחסו לשלושת החיישנים המופיעים במאמר וציינו כיצד באים לידי ביטוי המאפיינים הרשומים בטבלה.

במאפיין	חיישן 1	חיישן 2	חיישן 3
מטרת החיישן (בשביל מה פיתחו אותו?)			
העיקרון או סוג התהליך הכימי המתרחש במהלך בניית חד-השכבה			
באיזו חד-שכבה מדובר?			
העיקרון או סוג התהליך הכימי בעת פעולת החישה			
מהו הסיגנל של החישה (חשמלי/פלאוארסנטי וכדומה)?			

פעילות 4

בחרו את אחד החיישנים המוצגים במאמר ובמידת האפשר התאימו את רכיבי החיישן ואת פעולתו לתיאור הסכמטי של פעולת החיישן המוצג באיור מס 1.

פעילות 5

בחרו את אחד החיישנים המופיעים במאמר ותכננו מהלך עבודה שבאמצעותו תוכלו לבנות מודל מתאים לחיישן: הגדירו מטרת מרכזיות (אחת או יותר) שברצונכם להשיג בבניית המודל.

הגישו רשימת ציוד וחומרים מפורטת המתאימה לבניית המודל. קבלו את הציוד ואת אישור המורה ובנו את המודל.

ציינו שני יתרונות בולטים למודל שבניתם.

ציינו שני חסרונות בולטים למודל שבניתם.

התייחסו באופן ביקורתי לתהליך בניית המודל. (האם הושגו המטרות שהצבתם לעצמכם, מה הייתם משנים במודל? מה הייתם עושים אחרת בבניית המודל הבא? האם ניתן לבנות יותר ממודל אחד לכל חיישן?).

ניתן להשתמש באותם הקריטריונים כדי לאפשר לחברי קבוצה אחת להתייחס למודל החיישן של קבוצה אחרת.

פעילות 6

בחרו את אחד הגורמים הנבדקים שהצעתם לבדוק בשאלה הראשונה.

תכננו מהלך עבודה לבניית חיישן שיבדוק את הגורם הנבדק, הקפידו לכלול בתכנון את מטרת החיישן (מה הוא נועד לחוש). תארו את התהליך הכימי המתרחש בעת החישה. כתבו מהו הסיגנל של החישה (חשמלי/פלאוארסנטי וכו').

פעילות 7

את הפעילות ניתן להתאים לכל אחד מהחיישנים בנפרד או לכל שלושת החיישנים.

בקטע המבוא מופיעות 4 דרישות המובילות לתפקוד מוצלח של חיישן.

התייחסו באופן ביקורתי לאחד החיישנים המופיעים במאמר והעריכו את רמת החיישן בהתייחס לארבע הדרישות הנ"ל.