

Un Biocapteur associant une membrane à enzyme immobilisée et un transducteur ampérométrique

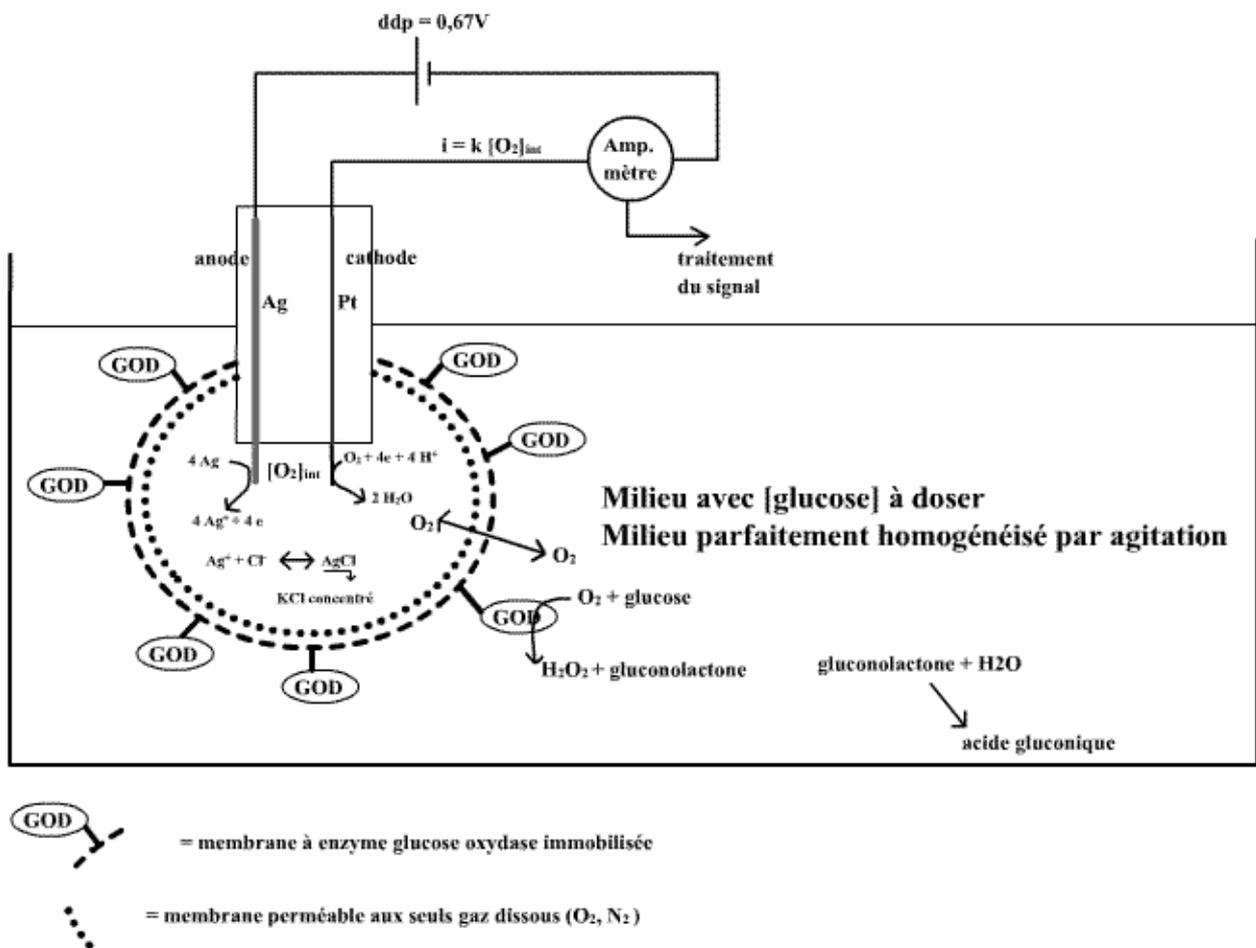
1. Présentation générale

Un biocapteur à enzyme est constitué d'un détecteur biologique de type enzyme et d'un transducteur chargé de convertir le signal biologique (l'enzyme catalyse un substrat à détecter) en un signal aisément exploitable (un signal électrique ou lumineux).

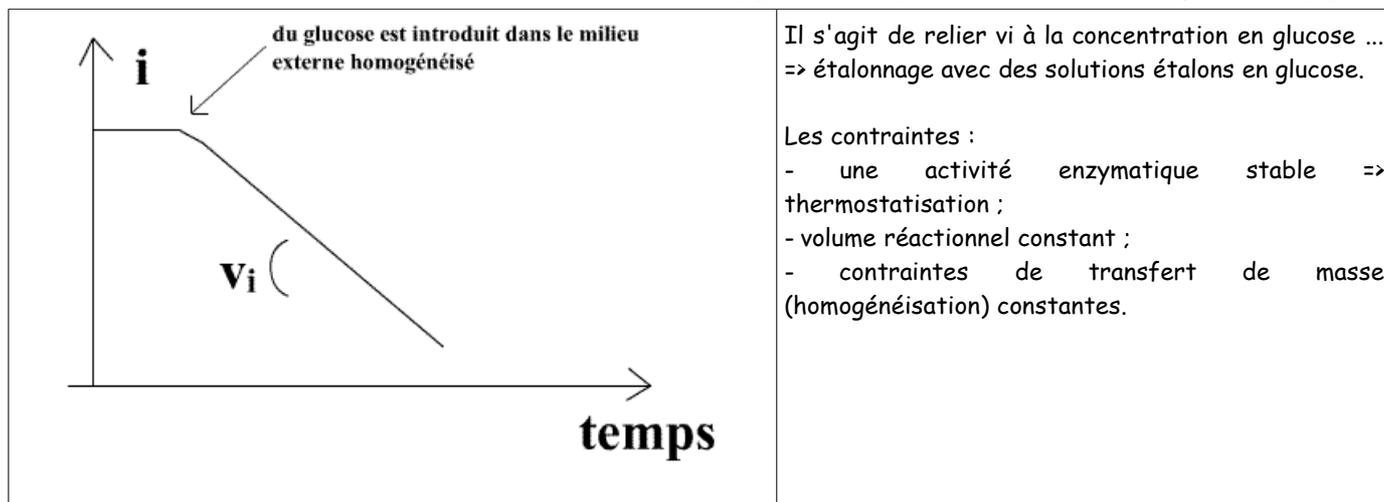
Les biocapteurs actuels en développement utilisent pour la plupart des technologies très complexes : associations de protéines à des matériaux semi-conducteurs (associations pH-ISFET et membrane à enzyme, mesures d'ondes évanescentes sur guides d'onde à protéines immobilisées ...).

Le travail pratique présenté propose la construction d'un biocapteur à glucose construit en associant une membrane à glucose oxydase (GOD) immobilisée et une électrode ampérométrique à dioxygène (selon une construction proche de la construction historique du premier biocapteur de Clark et Lyons en 1962). Le biocapteur ainsi réalisé est technologiquement dépassé mais présente un intérêt technique, pédagogique et historique.

La structure du biocapteur proposé - qui associe une membrane à enzyme immobilisée et un transducteur ampérométrique - peut se résumer avec le schéma suivant :



Lorsque le biocapteur est introduit dans un milieu contenant du glucose (milieu homogénéisé saturé en dioxygène au départ), le dioxygène est consommé au niveau de la réaction enzymatique. Par diffusion, le dioxygène diminue dans le compartiment interne de l'électrode (électrode ampérométrique de Clark = système oxymétrique). Ainsi, l'intensité de courant délivrée par l'électrode de Clark (sensible à $[O_2]_{int}$) diminue. Le signal délivré par le biocapteur est donc une cinétique de diminution d'intensité de courant.



2. Manipulations à réaliser

2.1 Organigramme

- Immobilisation de la GOD sur membrane activée.
- Mise en place du montage électrode de Clark/membrane à enzyme.
- Polarisation de l'électrode de Clark (la durée nécessaire à la saturation en Ag_+ du compartiment interne).
- Etude des caractéristiques du biocapteur à glucose (électrode à glucose) ainsi obtenue : fonction d'étalonnage, domaine de praticabilité, sensibilité ...

2.2 Réactifs et matériels

- Membrane préfonctionnalisée « Ultrabind » (fonctions amines)
- Petit ventilateur à air ambiant
- Tp 5,6 saturé en dioxygène = tampon acétate sodique 0,1 mol/L pH 5,6 (saturé en dioxygène)
- Tp 7 = tampon phosphate sodique 0,1 mol/L pH 7
- Glutaraldéhyde à 2,5 % : DANGER, consulter les données de risques et de sécurité
- Glucose oxydase 50 mg/mL en Tp 7
- KCl solution à demi saturée
- Glucose
- Système ampérométrique à électrode de Clark (une mini électrode) avec sortie analogique et associé à un système d'acquisition informatique (conversion analogique/numérique et acquisition informatique des données). L'appareillage a été préalablement utilisé en fonction oxymétrique (zéro et 100% réglés).
- Petite cuve à double enveloppe thermostatée par circulation d'eau et agitateur magnétique et barreau aimanté adapté

2.3 Mode opératoire

Organisation de la paillasse

Installer la petite cuve à double enveloppe sur l'agitateur magnétique ; mettre en place le barreau aimanté ; installer la thermostatisation (30°C). Préparer le système porte électrode qui devra permettre de plonger l'électrode dans la cuve thermostatée.

Installer le système d'acquisition : sortie analogique du système de Clark connectée au boîtier orphy branché au secteur. Boîtier Orphy connecté au port RS232 (V24) COM1 du PC. PC allumé, logiciel Orphy GTI sur COM1. Paramétrage du logiciel d'acquisition (voie d'entrée, tension d'entrée ...).

Immobilisation de la glucose oxydase et montage du biocapteur

Sur une lame de verre propre, déposer un carré de membrane hydrophobe perméable aux gaz (téflon ou de membrane de polypropylène) de 2 cm de côté. Préparer aussi un carré de membrane Ultrabind de 2 cm de côté, face mate vers le haut, en évitant le contact des doigts (pinces plastiques propres). Mouiller avec 200 μL de Tp7 pour faciliter le montage sur le corps de l'électrode.

Placer la membrane hydrophobe sur le petit support plastique vissable de compartiment interne d'électrode. Placer par dessus le carré de membrane Ultrabind, face mat vers l'extérieur. Mettre en place le joint torique d'étanchéité (opérer délicatement pour ne pas déchirer la membrane Ultrabind, éviter les plis). Remplir, à ras bord et sans bulle d'air, le compartiment ainsi réalisé avec du KCl demi saturé. Visser sur le corps de l'électrode. Tailler les surplus de film autour du joint torique d'étanchéité de compartiment interne de l'électrode. Sécher la membrane Ultrabind en place sur l'électrode par ventilation à température ambiante.

Sur la membrane Ultrabind maintenant en place sur l'électrode, juste au dessus de la cathode de platine, déposer en 3 fois, au centre, 5 μL de solution de GOD à 50 mg/mL en séchant au séchoir à froid entre chaque dépôt (pour éviter la dénaturation thermique de l'enzyme). Une fois les 3 dépôts réalisés, déposer en 2 fois 10 μL de solution de glutaraldéhyde à 2,5 % et laisser en contact 10 minutes.

Monter aussitôt l'électrode dans la chambre de mesure et remplie de Tp7 (élimination de l'excès de glutaraldéhyde encore éventuellement présent). Laisser 30 minutes sous agitation magnétique. Rincer abondamment avec du Tp 5,6 saturé en dioxygène.

Mise en route de la chaîne de mesurage et test de l'électrode

- Relier le biocapteur au système oxymétrique.
- Mettre en route.
- Polariser 30 minutes.
- Vérifier et/ou terminer les paramétrage d'acquisition
- Passer en mode acquisition, tester la fonctionnalité en introduisant une charge de glucose (cf. paragraphe suivant).

Etude du biocapteur réalisé

Travailler à 30°C sous agitation constante stable !!

Le déroulement d'un cycle de mesures est le suivant :

- Tp 5,6 saturé en dioxygène : 5 mL ;
- déclencher l'acquisition (par exemple sur 3 minutes) ;
- ajouter 100 μL de solution de glucose étalon ou à doser ;
- acquisition suffisamment longue pour bien visualiser l'état dynamique stationnaire (v_i) ;
- arrêter l'acquisition, vider la chambre de mesure, rincer au tp 5,6, vider, rincer au tp 5,6, vider.

Propositions d'études à réaliser :

- Étude de fonction de réponse à l'aide d'une série de solutions glucose étalons (par exemple à partir d'une solution étalon de glucose à 0,5 mol/L qui pourra être diluée au $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{10}$...). Commentaire théorique en supposant un comportement Michaélien de la GOD immobilisée et le dioxygène saturant. Conclusion sur le domaine de praticabilité pour le dosage du glucose avec l'électrode ...
- Estimation de durée de phase préstationnaire, de durée de réponse nécessaire pour obtenir une bonne qualité d'estimation de v_i .
- Mesures de solutions inconnues : milieux de culture, boissons ...

Bibliographie et liens internet

Remerciements à Chantal Brut pour ses précieuses indications.

<http://www.esi.umontreal.ca/~badiaa/biocapteurs.pdf>

http://pagesperso-orange.fr/michel.hubin/capteurs/chimi/chap_c8.htm