مجله دیابت و لیپید ایران. دو ماهنامه آذر- دی ۱۳۹۱؛ دوره ۱۲ (شماره ۲) ۱۲۹-۱۱۸

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:58 IRDT on Sunday September 8th 2013

طراحی ایمونوسنسور الکتروشیمیایی جهت تشخیص آلبومین ادرار با استفاده از نانوذرات مغناطیسی به عنوان نشان

هانیه شیرازی[۱]، آنیتا احمدی[۲]، نرگس پورباقر[۲]، کبری امیدفر[۲*]

چکیده

مقدمه: طراحی روش‌های سنجشی با دقت و حساسیت بالا در تشخیص زودهنگام بسیاری از بیماری‌ها کمک زیادی می‌کند. در این راستا ایمونوسنسورها ارائه گردیدند که با استفاده از روش‌های الکتروشیمیایی و براساس سیگنال حاصل از میانکنش‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی قادر به تشخیص مقادیر بسیار کم یک آنتی‌ژن خاص در نمونه فرد بیمار می‌باشند. در این مطالعه، یک روش الکتروشیمیایی سریع مبتنی بر ایمونوسنسورها با استفاده از نانوذرات مغناطیسی با ساختار هسته/ پوسته/ پوسته برای سنجش میزان آلبومین (HAS) ادرار طراحی شده است.

روش‌ها: ابتدا نانوذرات اکسید آهن/ کیتوزان/ طلا (Fe_3O_4/Chitosan/Au) سنتز گردید. سپس آنتی‌بادی منوکلونال علیه آلبومین و نانوذرات مغناطیسی با تجمع نانوذرات طلا بر روی سطح آن جهت تهیه کونژوگه (Ab-MnGs) مورد استفاده قرار گرفت. سنسور مورد استفاده در این تحقیق الکترودهای کربنی صفحه‌ای (Screen Printed Carbon Electrode) SPCEs بوده که براساس نوع سنجش رقابتی طراحی شده، آنتی‌ژن به همراه پلیمر پلی‌وینیل الکل (PVA) در سطح آنها ثابت می‌گردد.

یافته‌ها: خصوصیات نانوذرات سنتز شده توسط تکنیک‌های TEM، XRD، VSM و الکتروشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. برای تایید کونژوگه (Ab-MnGs) از روش‌های الایزا و الکتروشیمیایی استفاده گردید. نهایتاً با برقراری اتصالات لازم در سطح الکترود کربنی صفحه‌ای و تکمیل مراحل آماده‌سازی ایمونوسنسور، سنجش‌های الکتروشیمی شامل ولتامتری چرخه‌ای (CV) نشان داد که فرایند تثبیت به خوبی انجام شده است و پالس ولتامتری تفاضلی (DPV) برای آشکارسازی کمی آنتی‌ژن انجام گرفت که با افزایش غلظت HSA در نمونه‌های استاندارد و بیمار، پاسخ‌های DPV کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: با طراحی این روش، آلبومین ادرار با حساسیت بسیار بیشتری نسبت به روش‌های مرسوم (تا حد نانوگرم) قابل اندازه‌گیری است. امکان تعمیم نتایج این مطالعه برای طراحی دیگر ایمونوسنسورهای زیستی نیز وجود دارد.

واژگان کلیدی: ایمونوسنسور، نانو ذره مغناطیسی، آلبومین

۱- گروه زیست‌شناسی- بیوشیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* ***نشانی:*** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان شریعتی، طبقه پنجم، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷، تلفن: ۸-۸۸۲۲۰۰۳۷-۰۲۱، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲-۰۲۱، پست الکترونیک: omidfar@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۵/۲۸ **تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۱/۰۶/۱۵** **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۶/۲۳**

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:58 IRDT on Sunday September 8th 2013

مقدمه

در سال‌های اخیر تحقیق در مورد روش ایمونواسی الکتروشیمیایی توجه دانشمندان را به خود جلب نموده است. در واقع ایمونوسنسورهای الکتروشیمیایی ابزارهای آنالیتیکی کوچک شده‌ای هستند که قدرت انتخاب‌پذیری واکنش‌های ایمونولوژیکی را با حساسیت بالا و آسانی تکنیک‌های تشخیص متفاوت تلفیق می‌کنند [۱]. چنین روشی می‌تواند به راحتی با استفاده از مبدل الکتروشیمیایی مقدار آنالیت مورد نظر را با اندازه‌گیری تغییر پتانسیل، جریان و رسانایی که توسط اندرکنش ایمونولوژیکی ایجاد می‌شود مشخص کند [۴-۲]. در این مطالعه نانوذرات مغناطیسی با تجمع طلا به عنوان نشانگر برای تثبیت آنتی‌بادی بر علیه آلبومین روش جایگزین جدیدی را برای ساخت ایمونوسنسور جهت تشخیص آلبومین ادرار فراهم کرده است. این نانوذرات دارای مزایایی نظیر فراهم کردن سطح بیشتر برای تثبیت مقدار بیشتری از ماده بیولوژیکی و جداسازی انتخابی ملکول زیستی (آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن) از یک مخلوط واکنش با استفاده از یک آهن‌ربا هستند [۵]. آلبومین پروتیینی با وزن مولکولی ۶۶ کیلودالتون فراوان‌ترین پروتیین سرم انسانی است. حضور آلبومین در ادرار با مقادیر ۲۹۹-۳۰ میلی‌گرم در ادرار ۲۴ ساعته، ۱۹۹-۲۰ میکروگرم در دقیقه در ادرار نمونه شبانه و ۲۹۹-۳۰ میکروگرم در میلی‌گرم کراتینین در نمونه ادرار رندوم معادل میکروآلبومینوری و بیشتر از مقادیر ذکر شده نشان دهنده ماکروآلبومینوری می‌باشد [۶]. اندازه‌گیری آلبومین به این دلیل دارای اهمیت است که میکروآلبومینوری شاخص بسیار مهم در پیش‌آگهی بیماری قلبی- عروقی، اختلال عملکرد اندوتلیال عروقی، بیماری کلیه در دیابت و در فشار خون بالا، یک عامل خطر برای بروز ترومبوآمبولی وریدی است [۷]. بنابراین اندازه‌گیری آلبومین در ادرار به منظور ارزیابی عملکرد کلیه در بیماری‌های مختلف دارای اهمیت است. روش‌های متفاوت سنجش آلبومین در مایعات بیولوژیک تاکنون بیشتر برپایه روش‌های ایمونولوژیک شامل رادیوایمونواسی، آنزیم ایمونواسی، ایمونوتوربیدومتری برای اندازه‌گیری کمی آلبومین ادراری و استریپ‌ها به منظور اندازه‌گیری نیمه کمی و کیفی آلبومین طراحی شده‌اند [۹،۸]. شاخصه‌هایی چون حساسیت بالا و حد تشخیص پایین، زمان کمتر انجام آزمایش و سرعت تشخیص بالاتر، به کار بردن حجم کمتر آنالیت، تحت تاثیر قرار نگرفتن توسط عوامل اسپکتروسکوپی (رنگ سنجی) از قبیل: تیرگی و آشفتگی محلول، دخالت ترکیبات فلورسانس و جذب کننده نور در محلول‌های حاوی نمونه، ارزان بودن، قابلیت کوچک‌سازی و تولید انبوه موجب برتری ایمونوسنسورهای الکتروشیمیایی نسبت به روش‌های قدیمی ایمونواسی شده است. همچنین این ویژگی‌ها ایمونوسنسورهای الکتروشیمیایی را کاندیدای مناسبی برای تشخیص کلینیکی و سریع بیماری‌های مرتبط با مارکرهای زیستی و پروتئینی کرده است. مارکرهای زیستی و عوامل بیولوژیکی اغلب مقدار خیلی کمی دارند. بنابراین طراحی روش‌های تشخیصی خیلی حساس جهت سنجش آنها ضرورت می‌یابد [۲].

در مطالعه حاضر، نانوذرات Fe_3O_4 با استفاده از روش هم‌رسوبی نمک دو و سه آهن سنتز می‌گردند که نه تنها به عنوان یک بستر برای تجمع نانوذرات طلا به کار می‌روند، بلکه جداسازی سریع نانو کمپلکس‌های کونژوگه به آنتی‌بادی بر علیه آلبومین را پس از سنتز امکان‌پذیر می‌سازند [۱۰]. همچنین از کیتوزان به عنوان یک پلیمر مشتق شده از کیتین پلی‌ساکارید طبیعی، به عنوان یک پلیمر زیست سازگار و دارای توانایی اتصال به طلا مورد استفاده قرار گرفت. مزیت اصلی کیتوزان نسبت به کیتین آن است که در محلول اسیدی با پروتونه شدن گروه آمین خود قابل حل است. پوشش کیتوزان بر سطح Fe_3O_4 نه تنها از اگریگه شدن ذرات اکسید آهن جلوگیری کرده بلکه همچنین با ایجاد بار مثبت باعث افزایش تجمع نانوذرات طلا با بار منفی بر سطح کمپلکس می‌گردد [۱۱]. افزایش در تعداد ذرات طلا سبب اتصال بیشتر آنتی‌بادی به کمپلکس Fe_3O_4/Chitosan/Au شده است. استفاده از این کمپلکس به عنوان یک نشان در این مطالعه با وجود خاصیت اکسیداسیون – احیا طلا در محیط اسیدی، موجب الکترون‌دهی بیشتر و در نتیجه قدرت تشخیص بیشتر نسبت به روش‌های ارائه شده می‌باشد [۱۲]. با توجه به این که تثبیت بیوملکول بر سطح الکترود برای ساخت و پیشرفت موفق ایمونوسنسور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۱۳] در این مطالعه از پلیمر جهت به دام انداختن آنتی‌ژن استفاده شد. پلیمر غیر هادی پلی‌وینیل الکل،

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:58 IRDT on Sunday September 8th 2013

یک پلیمر زیست سازگار غیرسمی مصنوعی است که دارای ویژگی‌های منحصر به فرد، ازجمله زنجیره‌های مولکولی انعطاف‌پذیر، ثبات شیمیایی و طبیعت انعطاف‌پذیر است که می‌تواند با ایجاد ساختار سه بعدی به عنوان ماتریکس مناسبی برای تثبیت آنتی‌ژن آلبومین استفاده گردد و همچنین بر میزان پایداری آنتی‌ژن، مقدار آنتی‌ژن جهت تثبیت و در نتیجه بر افزایش حساسیت سنسور تاثیرگذار باشد [۱۴]. در این تحقیق ایمونوسنسور رقابتی طراحی شده است که سیگنال الکتروشیمیایی تولید شده از کونژوگه Ab-MnG بعد از اکسایش و کاهش در HCl یک مولار با ولتاژ ۱/۲۷ و زمان ۳۰ ثانیه با استفاده از روش‌های CV و DPV اندازه‌گیری می‌شود.

روش‌ها

معرف‌ها

نمک‌های کلرید آهن (Fe^{2+} Fe^{3+})، هیدرکسید سدیم (NaOH)، کیتوزان با جرم مولکولی کم، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، گلوتارآلدئید ۲۵٪ (GLA)، هیدروکسی تترامتیل آمونیوم (TMOH)، تتراکلرویوریک اسید($HAuCl_4$)، تری‌سدیم سیترات، RPMI۱۶۴۰، سرم جنینی گوساله (FCS)، استرپتومایسین، پنی‌سیلین، هموگلوبین، ستون پروتئین G، آلبومین سرم گاوی (BSA)، آلبومین سرم انسانی (HSA)، وینیل الکل و سدیم آزید که تمامی این مواد شیمیایی از Sigma-Aldrich خریداری شده‌اند (St. Louis, MO, USA).

همچنین سایر مواد شیمیایی به کار رفته در بافرها از Sigma-Aldrich یا Merk تهیه شده‌اند. محلول فسفات بافر (PBS) شامل فسفات بافر سالین ۰/۰۱M، کلرید سدیم (NaCl) ۰/۱۳۷ M، کلرید پتاسیم (KCl) ۰/۰۰۰۳ M با pH۷/۲ می‌باشد. تمامی مواد شیمیایی به همان صورت خریداری شده و بدون هیچ تغییری مورد استفاده قرار گرفتند. به علاوه همه محلول‌های آبی در آب مقطر دوبار تقطیر تهیه شدند.

دستگاه‌ها

سایز و مورفولوژی نانو ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی TEM فیلیپس (Model CM120 ,120KV) ساخت هلند بررسی گردید. شناسایی فاز ذرات سنتز شده توسط پراکنش اشعه ایکس (XRD) مدل pw1800 انجام گردید. خواص مغناطیسی کمپلکس نانو توسط VSM (7400, Lakeshore Co.) ساخت آمریکا سنجیده گردید. طراحی سنسور بر روی الکترودهای صفحه کربنی یک بار مصرف (SPCEs) که شامل یک الکترود کار مدور با قطر ۳ میلی‌متر، یک الکترود رفرنس Ag/AgCl و یک الکترود کمکی گرافیتی است صورت می‌گیرد (Drop Sens, Spain). الکترودهای صفحه کربنی برای اصلاحات لازمه در یک سل الکتروشیمیایی تفلن تک قسمتی با حفره‌ای به قطر ۳ میلی‌متر به حجم µl ۳۰ قرار می‌گیرند و برای خوانش توسط دستگاه الکتروشیمی پتانشیواستات با یک رابط وصل می‌گردند که در این حالت در سل به قطر ۵ میلی‌متر به حجم µl ۵۰ قرار می‌گیرند.

تهیه و خالص‌سازی آنتی‌بادی مونوکلونال آلبومین

از ادغام لنفوسیت طحال موش و سلول میلوما sp۲/۰، لاین سلولی هیبریدوما تولید کننده آنتی‌بادی مونوکلونال آلبومین تهیه شد [۱۵]. براساس روش گزارش شده توسط امیدفر و همکاران [۱۵] سلول هیبریدوما در ۵۰ml محیط کشت حاوی ۳٪ FCS رشد داده شدند و آنتی‌بادی‌ها از مایع رویی محیط کشت توسط ستون کروماتوگرافی تمایلی پروتیین (HiT rap protein) خالص‌سازی گردیدند. در نهایت آنتی‌بادی‌های تخلیص شده در مقابل بافر فسفات سالین دیالیز شده و تغلیظ گردیدند.

تهیه کمپلکس نانوذرات مگنتیک اکسید آهن با پوشش پلیمری کیتوزان و تجمع نانو ذرات طلا بر سطح آن (Fe3O4/Chi/Au)

نانوذرات Fe_3O_4 به عنوان هسته به روش هم‌رسوبی در حضور باز هیدروکسید سدیم به عنوان عامل احیا کننده تولید گردیدند [۱۶]. به طورخلاصه، حدود ۲/۳۶۵ gr از $FeCl_3$ ،$H_2O.6$ و ۰/۹۹ gr از $FeCl_2$ ،$H_2O.4$ (با نسبت

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:58 IRDT on Sunday September 8th 2013

مولی ۰/۵) را در ml ۱۰۰ آب مقطر بدون اکسیژن ریخته و سپس در حضور نیتروژن می‌گذاریم ۳۰ دقیقه استیرر گردد. سپس هیدروکسید سدیم M ۲ (حدود ml ۵۰) را سریعاً به داخل مخلوط واکنش وارد کرده تا pH به حدود ۱۲ برسد. محلول حاصله را به مدت چند دقیقه استیرر کرده، باید مدنظر داشت که به محض افزودن هیدروکسید سدیم محلولی که زرد رنگ می‌باشد قهوه‌ای شده و سپس سیاه می‌گردد که نشانگر تشکیل نانوذرات مغناطیسی است. نانوذرات اکسید آهن تولیدی ابتدا در دمای اتاق خنک می‌گردند و سپس چندین بار توسط آب شسته می‌شوند. برای استفاده طولانی مدت نانوذرات اکسید آهن، می‌توان آنها را در هیدروکسی تترامتیل آمونیوم (TMOH) M ۰/۱ و در دمای اتاق نگهداری کرد.

مرحله بعد، آماده‌سازی نانوذرات اکسید آهن سوپر پارامگنتیک برای اتصال به نانو ذرات طلا است. در ابتدا برای این منظور gr۰/۲ از نانوذرات اکسید آهن سوپر پارامگنتیک تولید شده را بعد از ۲۰ دقیقه اولتراسونیکاسیون با اتانول خالص، به ml ۲۷/۵ محلول Nacl ۰/۵ مولار حاوی SDS ۰/۰۲۵ مولار و gr ۰/۰۹۴۸۵ کیتوزان حل شده در ml۲ استیک اسید ۲٪ مخلوط کرده و برای یک ساعت در اولتراسونیکاسیون $20^{o}C$ قرار داده می‌شود. سپس ml ۲/۷۵ گلوتارآلدئید (GLA٪۲۵) را به عنوان یک کراس- لینکر اضافه کرده و برای ۵ ساعت در حرارت ^{o}C ۵۰ استیرر می‌گردد. در ادامه پس از شستشو با آب مقطر، سدیم آزاید (w/v)٪۰/۰۱ به محلول اضافه گشته و در فور ^{o}C ۱۰۰ خشک می‌گردد. در نهایت برای تشکیل کمپلکس نانوذرات مگنتیت طلا، gr ۰/۲ کمپلکس Fe_3O_4/Chi را به مدت ۲ ساعت در مجاورت ml ۲۵ نانوذره طلا nm ۱۸-۱۶، که از احیاء نمک طلا در مجاورت سدیم سیترات براساس پروتوکل امیدفر و همکاران سنتز شده [۱۵] بر روی استیرر قرار داده می‌شود. با گذشت زمان نانوذرات طلا از طریق واکنش الکتروستاتیک به کمپلکس Fe_3O_4/Chi اتصال یافته که بی‌رنگ شدن محلول طلا اثباتی بر این مسئله است. پس از شستشو با آب مقطر، سدیم آزاید (w/v)٪۰/۰۱ به محلول اضافه گشته و در فور ^{o}C ۱۰۰ خشک می‌گردد. پودر حاصله در ^{o}C ۴ و در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ برای چندین ماه قابل نگهداری است. در شکل ۱ روند سنتز نانوذرات آهن با تجمع طلا نشان داده شده است.

اتصال آنتی‌آلبومین به سطح نانوذرات مگنتیک طلا (Ab-MnGs)

برای انجام کونژوگاسیون، mg ۲۰ از نانوذرات مگنتیک طلا را در ml ۱ بافر PBS ۰/۱M با pH ۷/۲ ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه برای جلوگیری از کلوخه شدن نانوذرات، ابتدا سونیکاسیون و بعد استیرر می‌گردد. سپس ذرات را در µl ۵۰۰ بافر PBS ۰/۱M، مخلوط کرده و pH را روی ۹ تنظیم [۱۷،۱۸] و حال µg ۴۰ آنتی‌بادی علیه آلبومین اضافه و در ^{o}C ۳۷ به مدت ۳ ساعت انکوبه می‌شود. ذرات با بافر PBS ۰/۱M با pH ۷/۲ شستشو داده شده و به منظور جلوگیری از جذب‌های غیر تخصصی BSA ٪۰/۱ اضافه و در ^{o}C ۳۷ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه می‌شود. آب رویی توسط مگنت خارجی دور ریخته و نانوذرات کونژوگه با آنتی‌بادی با بافر PBS ۰/۰۱ M با pH ۷/۲ شسته شده و سرانجام نانوذرات کونژوگه شده با آنتی‌بادی برای مصارف بعدی در ml ۱ بافر PBS ۰/۰۱ M با pH ۷/۲ حاوی سدیم آزاید (w/v)٪۰/۰۱ در ظروف تیره و در ^{o}C ۴ قابل نگهداری است.

طراحی ایمونوسنسور آلبومین بر روی الکترود اصلاح شده کربنی صفحه‌ای

در ابتدا وینیل الکل در بافر استات در ^{o}C ۷۰ به مدت نیم ساعت حل شده تا محلول هموژن وینیل الکل ٪۲ (PVA٪۲) به دست آید. وینیل الکل ٪۲ برای تثبیت HSA و همچنین اصلاح سطح الکترود براساس گزارش قبلی ما انتخاب گردید [۱۴]. سپس مخلوط هموژن وینیل الکل ٪۲ حاوی HSA (ng/ml ۵۰۰) تهیه گردید و µl ۵ از این محلول روی سطح الکترود چکانده و تحت شرایط UV (۲۲۰-۲۵۰nm) به مدت ۲۰ دقیقه به منظور پلی‌مریزاسیون وینیل الکل قرار گرفت. پلی‌وینیل الکل با هدف افزایش حساسیت و قابلیت تکرارپذیری الکترود اصلاح شده، آنتی‌ژن HSA را در سطح الکترود به صورت فیزیکی تثبیت می‌کند. بعد از آن جایگاه‌های اتصالی غیر

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:58 IRDT on Sunday September 8th 2013

اختصاصی توسط انکوباسیون با PB (pH=۷/۲، ۰/۰۱M) حاوی ۰/۵٪ شیر خشک بدون چربی و توئین۲۰، ۰/۰۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷°C بلوکه شدند (الکترود اصلاح شده در تمامی این مراحل در سل الکتروشیمیایی ۳ mm به حجم ۳۰µl که محدوده الکترود کار را مشخص می‌کند قرار داده شده). سپس SPCE توسط PBS حاوی توئین۲۰، ۰/۰۵٪ شسته شده تا پروتیین‌های اتصال نیافته از سطح الکترود برداشته شود و در آخر ۲۰µl از محلول نانوذره مگنتیک طلا کونژوگه شده با Ab در سطح SPCE ریخته شد. الکترود پس از ۳۰ دقیقه انکوبه در ۳۷°C توسط PBS حاوی توئین۲۰، ۰/۰۵٪ شسته شده تا کونژوگه باند نشده برداشته شود. الکترود اصلاح شده برای خوانش در سل الکتروشیمیایی ۵ mm و حجم ۵۰ µl قرار داده شد.

اندازه‌گیری الکتروشیمیایی

پس از اصلاح الکترود و قرار دادن آن در سل الکتروشیمیایی، ۵۰ µl از محلول HCl یک مولار در سطح الکترود ریخته شد. مطالعه پایه الکترود اصلاح شده توسط ولتامتری چرخه‌ای (CV) در محدوده پتانسیلی ۱- تا ۱+ در سرعت خوانش ۵۰mV/s انجام شد. متعاقباً، سیگنال‌های آنالیتیکالی با روش پالس ولتامتری تفاضلی (DPV) برای الکترود تغییر یافته، در حضور نمونه استاندارد و یا نمونه بیمار در محدوده پتانسیلی ۰/۲- تا ۰/۸- ولت، در پتانسیل ثابت ۱/۲۷ ولت برای ۳۰ ثانیه در همان شرایط زمانی نگه‌داری و ثبت شدند. ایجاد جریان کاتدی براساس سیگنال‌های آنالیتیکالی از اکسایش و کاهش نانوذرات طلا در حضور HCl در مطالعه الکتروشیمیایی ثبت گردید. همه سنجش‌های الکتروشیمیایی در دمای اتاق انجام شدند.

یافته‌ها و بحث

هدف از این پژوهش، ترکیبی از خواص مفید نانومواد و پلیمر نارسانا برای توسعه ایمونوسنسور الکتروشیمیایی جهت سنجش آلبومین است. برای این منظور نانوذرات با تجمع خودبخودی ذرات طلا بر روی کمپلکس مگنتیک با پوشش پلیمری کیتوزان به عنوان نشانگر سنتز شد که دارای مزایایی نظیر تقویت سیگنال تولید شده، افزایش تمایل آنتی‌ژن-آنتی‌بادی به یکدیگر و پایدارسازی بیشتر این اتصالات، می‌باشد. همچنین پلیمر PVA با سازگاری زیستی، سبب کاهش اتصالات غیر اختصاصی به منظور اصلاح سطح الکترود برای افزایش پایداری اتصال آنتی‌ژن HSA و در نتیجه افزایش حساسیت سنسور راهبرد جدیدی ارائه کرده است.

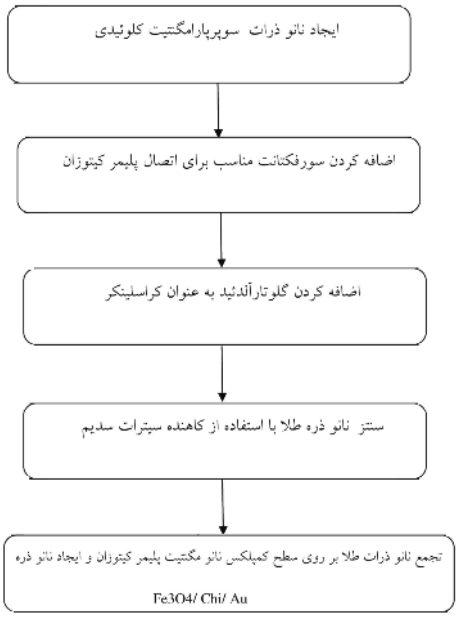
بررسی صحت سنتز نانوذرات مگنتیت طلا

در این مطالعه، نانوذرات مغناطیسی با استفاده از روش هم‌رسوبی، در حضور آمونیاک و گاز نیتروژن و شرایط ویژه‌ای مانند pH ۱۰ سنتز گردیدند. مورفولوژی نانوذرات سنتز شده توسط بررسی میکروسکوپ االکترونی گذاره (TEM) مشخص گردید که ذرات اکسید آهن تولید شده در این روش سایزی کمتر از ۱۲ nm دارند (شکل ۲-الف) و همچنین نانوذرات طلا با سایز حدود ۱۸-۱۶ nm (شکل ۲-ب) سنتز گردیدند. در حالی که کمپلکس نانوذرات مگنتیت طلا سایزی در حدود ۳۰-۲۷ nm دارند (شکل ۲-ج). افزایش قطر کمپلکس سنتز شده نسبت به سایز نانوذرات آهن تایید کننده حضور نانوذرات طلا بر سطح اکسید آهن است.

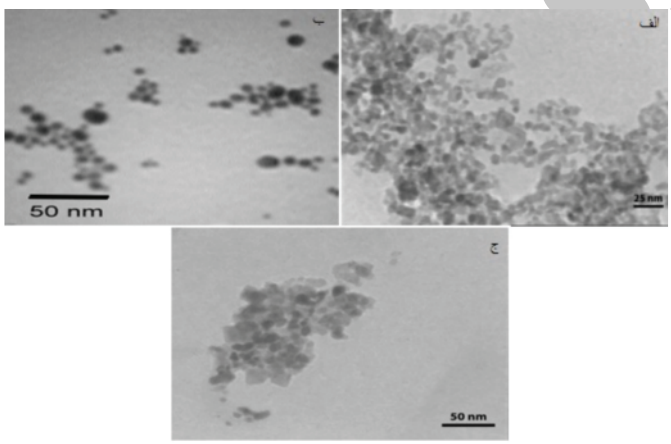
Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:58 IRDT on Sunday September 8th 2013



شکل ۱- روند سنتز نانوذرات مگنتیت طلا



شکل ۲-(الف) تصویر نانوذرات اکسید آهن تولید شده با سدیم هیدرکسید با میکروسکوپ الکترونی، متوسط اندازه ذرات nm ۱۲-۱۰، (ب) تصویر نانوذرات طلا سنتز شده با میکروسکوپ الکترونی TEM، متوسط اندازه ذرات (nm ۱۸-۱۶) می‌باشد و (ج) تصویر نانوذرات اکسید آهن با تجمع نانوذرات طلا بر روی سطح آن با میکروسکوپ الکترونی، متوسط اندازه (nm ۳۰-۲۷) می‌باشد.

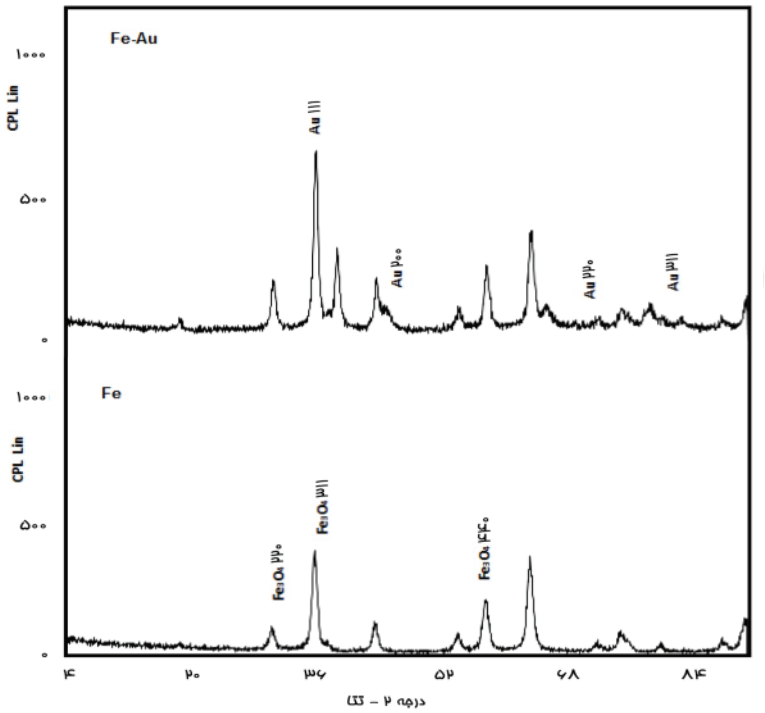
به منظور بررسی ترکیب نمونه‌های نانوذرات اکسید آهن و اکسید آهن- طلا آنالیز XRD انجام گردید. شکل ۳ نشان دهنده الگوی پراش پرتو ایکس XRD اکسید آهن سنتز شده می‌باشد پیک‌های موجود در $30/16^o$، $35/39^o$، $43/12^o$، $57/06^o$، $62/58^o$ و $73/96^o$ نشان دهنده فاز مگنتیت اکسید تولید شده است که می‌تواند به پراش از (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۴۰۰)، (۵۱۱)، (۴۴۰) و (۵۳۳) سطح اکسید آهن اختصاص داده شود. برای تایید تشکیل کمپلکس مگنتیت طلا پیک‌های موجود در $38/2^o$، $44/4^o$، $64/4^o$ و $77/6^o$ نشان دهنده نانوذرات آهن با تجمع طلا می‌باشند. بازتاب‌های براگ (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) از سطح Au نشان می‌دهد که نانوذرات طلا در کمپلکس مگنتیت طلا حضور دارد. در نتیجه این مطالعه نشان داد که فاز اصلی در محلول نانوذرات هم آهن و هم طلا می‌باشد و این تایید کننده تجمع مناسب نانوذرات طلا بر روی سطح اکسید آهن می‌باشد. مطالعه دیگری که به منظور تایید تشکیل نانوذرات سنتز شده انجام گردید، نشان دادن خاصیت پارامغناطیسی Fe_3O_4 با حضور میدان مغناطیسی بود. مقدار مغناطیس اشباع ذرات مگنتیک بدون پوشش برابر با 66/52emu/g در حالی که بعد از تجمع نانوذرات طلا بر روی سطح اکسید آهن این میزان کاهش

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:58 IRDT on Sunday September 8th 2013

می‌یابد. این مطلب حاکی از آن است که خواص مغناطیسی ذرات پس از پوشش در مقایسه با ذرات مغناطیسی بدون پوشش کاهش می‌یابد. مقدار مغناطیس اشباع کمپلکس نانو ۶۰/۸۰emu/g تخمین زده شد. نتایج مطالعات الکتروشیمی در سنجش الکتروشیمی ذرات طلا موجود در کمپلکس مگنتیک طلا براساس سیگنال احیا در محیط اسیدی (HCl) قابل شناسایی هستند. تشخیص بر اساس واکنش زیر است:

$$Au\ colloid\ (ads) + 4Cl^- \rightarrow AuCl_4^-\ (ads) + 3e$$
$$AuCl_4^-\ (ads) + 3e^- \rightarrow Au\ (ads) + 4Cl^-$$



شکل ۳ - XRD مربوط به نانوذرات آهن و نانوذرات مگنتیت طلا

اکسایش نانوذرات طلا، یون‌های $AuCl_4^-$ که به شدت بر روی سطح الکترود جذب می شود را تولید می‌کند. در مرحله بعد یون‌های $AuCl_4^-$ احیا شده و پیک کاتدی در محیط HCl یک مولار در محدوده ۰/۲ تا ۰/۴ ولت را ایجاد می‌کند. همان طور که در نمودار (الف، ب و ج) شکل ۴ مشاهده می‌گردد به علت عدم حضور ذرات طلا پیکی در محدوده ۰/۳ نداریم ولی در نمودار (د) در تایید سنتز کمپلکس نانو مگنتیت طلا پیک قوی طلا که تاییدی بر حضور آن در سطح اکسید آهن است مشاهده گردید. در مطالعه بیوالکتروشیمیایی، ولتامتری چرخه‌ای (CV) در محدوده پتانسیلی ۱- تا ۱+ ولت و سرعت خوانش ۵۰mV/s انجام شد. پس از اطمینان از صحت سنتز نانوذرات مگنتیک طلا، آنتی‌بادی علیه آلبومین به آنها وصل گردید. برای صحت اتصال الایزایی طراحی شد که نه تنها کونژوگه آنتی‌بادی به نانوذرات را تایید کرد بلکه نشان داد آنتی‌بادی بعد از اتصال همچنان تمایل خود را نسبت به آلبومین حفظ کرده‌اند (جدول ۱).

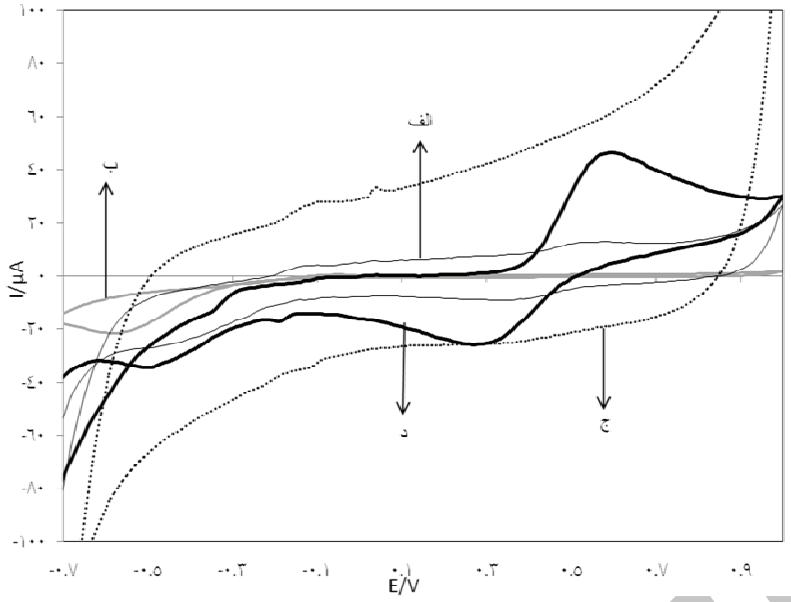
جدول ۱- نتایج آزمایش الایزا اتصال آنتی بادی به نانوذره مغناطیسی

آنتی ژن کوت شده	تست	کنترل
نانو ذره مغناطیسی	HSA	Skim milk 3%
Ab-MnGs	۱/۳	۰/۳۷۱

Archive

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:58 IRDT on Sunday September 8th 2013



سرعت خوانش: ۵۰mV/s. (a) الکترود برهنه (b) Fe_3O_4/Chitosan (c) Fe_3O_4/Chitosan/Gla (d) Fe_3O_4/Chi/Au

شکل ۴- انواع اشکال الکترود با نانوذرات در مراحل مختلف سنتز، در حضور HCl یک مولار در محدوده پتانسیل ۱- تا ۱+ ولت

بررسی الکتروشیمیایی ولتامتری چرخه‌ای

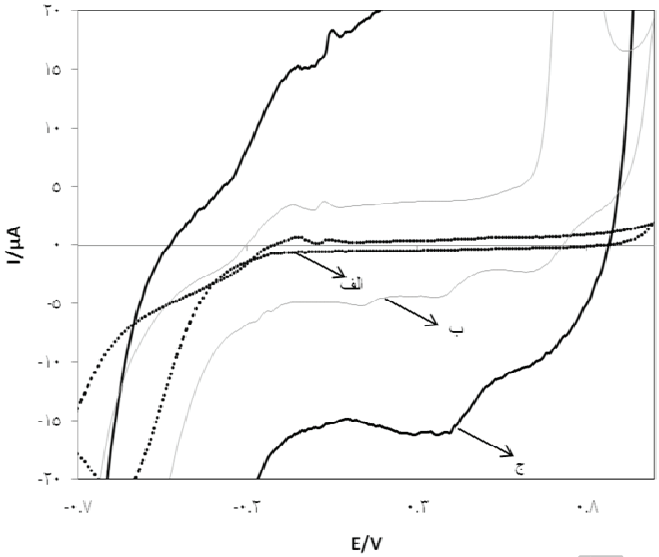
روش CV جهت بررسی پایه‌ای ایمونوسنسور HSA طراحی شده، استفاده شد. همه اندازه‌گیری‌ها در حضور HCl یک مولار در محدوده پتانسیل ۱- تا ۱+ و سرعت خوانش ۵۰mV/s انجام گردید. منحنی (الف و ب) در شکل ۵ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای از الکترود برهنه و SPCE تغییر یافته با PVA هستند. این منحنی‌ها هیچ پیکی در روش CV از ولتاموگرام‌های چرخه‌ای نشان ندادند، عمدتاً به علت اینکه PVA یک پلیمر نارسانا است و هیچ واکنش اکسایش- کاهشی در سطح الکترود رخ نمی‌دهد. در صورتی که منحنی (ج) پیک قوی در ۰/۳ ولت را به علت حضور نانوذره مگنتیک طلا-آنتی‌بادی روی سطح الکترود اصلاح شده ایجاد کرده که به علت اکسیداسیون نانوذره طلا موجود در کمپلکس مگنتیک و در ادامه احیای $AuCl_4^-$ در روش‌های الکتروشیمی ایجاد گردیده است. وجود نانوذرات طلا بر روی هسته مگنتیک باعث افزایش پیک کاتدی جریان در روش CV که به علت قابلیت رسانایی بالا می‌تواند انتقال الکترون از سطح به الکترود را افزایش دهد در نتیجه افزایش میزان جریان در ایمونوسنسور ارتباط مستقیم با مقدار نانوذره کونژوگه با آنتی‌بادی را دارد.

در ادامه به منظور به دست آوردن حداکثر حساسیت الکترو- شیمی، غلظت بهینه آنتی‌ژن کوت شده (HSA) و Ab-MnG توسط این روش مطالعه گردید. برای این منظور غلظت‌های متفاوت از آنتی ژن آلبومین (۱۰۰،۲۰۰ ng، ۴۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰) در PVA تهیه و در سطح الکترود تثبیت گردید. براساس شدت پیک کاتدی، ۵۰۰ نانوگرم به عنوان غلظت بهینه تعیین گردید. انتظار می‌رفت در غلظت‌های بالاتر شدت جریان افزایش پیدا کند ولی برعکس کاهش داشت، در نتیجه این غلظت انتخاب گردید. در مرحله بعد برای تعیین مقدار بهینه Ab-MnG بر روی الکترود اصلاح شده با مقدار مناسب آنتی‌ژن (۵۰۰ ng)، حجم‌های مختلف ۱۰،۱۵،۲۰،۲۵µl از نانوذره کونژوگه را بر روی سطح الکترود ریخته و باز هم با مشاهده شدت پیک کاتدی در ۰/۳ ولت، ۲۰µl به عنوان حجم بهینه انتخاب گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:58 IRDT on Sunday September 8th 2013



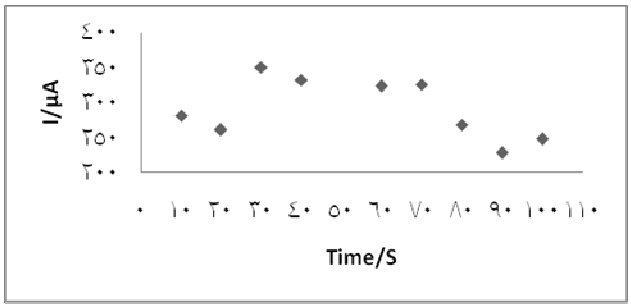
سرعت خوانش: ۵۰mV/s. (a) الکترود برهنه (b) PVA-HSA (c) PVA-HAS-Ab-MnG

شکل ۵- انواع اشکال الکترود تغییر یافته در حضور HCl یک مولار در محدوده پتانسیل ۱- تا ۱+ ولت

روش پالس ولتامتری تفاضلی برای تشخیص آلبومین

(روش آنالیتیکالی برای تشخیص HSA)

ایمونوسنسور بهینه شده توسط روش الکتروشیمیایی DPV برای بررسی سه پارامتر حاکم در این سنجش شامل زمان، پتانسیل و سرعت خوانش براساس ایجاد جریان بیشتر آزمایش شد. در ابتدا، یک پتانسیل ثابت (۱/۳V) با توجه به مقالات انتخاب گردید [۱۹]. دوم، اندازه‌گیری DPV در طیف‌های زمانی مختلف از ۱۰s تا ۱۲۰s (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۲۰،۱۰۰) انجام شد. در نهایت، زمان بهینه براساس پیک جریان کاتدی و پتانسیل پاسخ بیوسنسور ۳۰s انتخاب گردید (شکل ۶-الف). برای انتخاب پتانسیل‌های بهینه ایمونوسنسور در طیف‌های مختلف پتانسیل از ۱/۲ ولت تا ۱/۴ (۱/۲، ۱/۲۵، ۱/۲۷، ۱/۳۰ و ۱/۴۰ ولت) آزمایش شد و پتانسیل ۱/۲۷ ولت به عنوان پتانسیل بهینه برای بررسی پالس ولتامتری تفاضلی ایمونوسنسور انتخاب گردید (شکل ۶-ب) و در نهایت در طیف‌های مختلف سرعت خوانش ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه، ۵۰mV/s در نتیجه شدت پیک کاهشی انتخاب گردید (شکل ۶-ج).

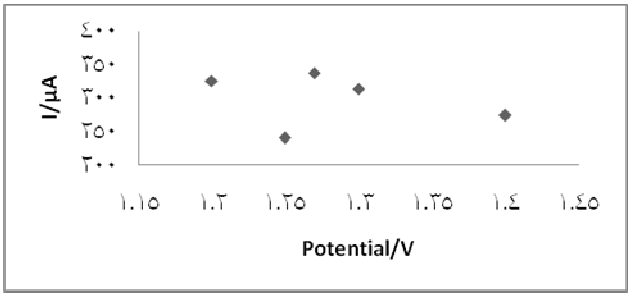


الف

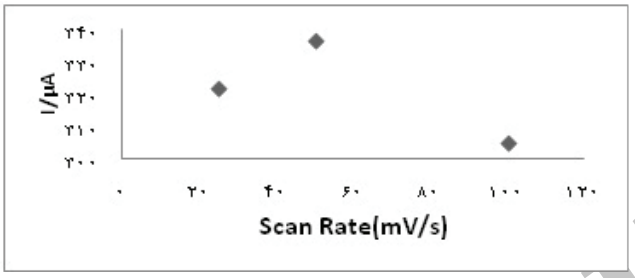
Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:58 IRDT on Sunday September 8th 2013



ب



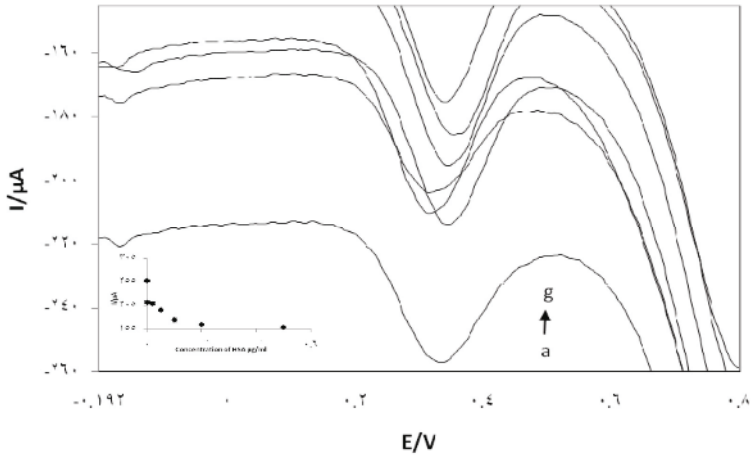
ج

شکل ۶- ولتاموگرام‌های تمایز پالسی پاسخ الکترود تغییر یافته برای بهینه سازی زمان (الف) (۹۰،۸۰،۷۰،۶۰،۵۰،۴۰،۳۰،۲۰،۱۰ ثانیه) (ب) پتانسیل (۱/۴۰، ۱/۳۵، ۱/۳۰، ۱/۲۷، ۱/۲۵/۱،۲۲/۲، ۱/۱۵ ولت)، (ج) سرعت خوانش (۵۰،۲۵ و ۱۰۰ mV/s)

اساس عملکرد ایمونوسنسور HSA طراحی شده بر پایه PVA و کونژوگه Ab-MnG است و به عنوان یک ایمونو- سنسور رقابتی محسوب می‌شود. در سل الکتروشیمیایی، HSA تثبیت شده و آزاد در محلول استاندارد و نمونه اصلی (شخص نرمال و بیمار) برای واکنش متقابل با کونژوگه Ab-MnG رقابت می‌کنند. آنالیزهای کمی به وسیله روش DPV با غلظت‌های مختلف HSA انجام شد. محلول استاندارد به وسیله رقیق‌سازی محلول ذخیره آلبومین (۱ µg/ml) با نمونه طبیعی ادرار (برای عاری بودن از هرگونه پروتیین سانتریفیوژ گردیدند) در محدوده غلظتی ۰/۵، ۰/۲، ۰/۰۵، ۰/۰۲، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۵ و ۰/۰۰۰۲ µg/ml تهیه شد. در این تحقیق به منظور رسم منحنی استاندارد دو روش رقابتی هم‌زمان و رقابتی تأخیری استفاده شد. در روش رقابتی هم‌زمان ۵ µl از مخلوط غلظت‌های سریالی محلول استاندارد و ۲۰µl از محلول Ab-MnGs روی سطح الکترودهای اصلاح شده قرار داده شد. در روش رقابتی تأخیری ۵ µl از مخلوط غلظت‌های سریالی محلول استاندارد و ۲۰µl از محلول Ab-MnGs را ابتدا مخلوط کرده و بعد از ۲۰ دقیقه انکوبه در ۳۷°C، مخلوط را روی سطح الکترودهای اصلاح شده قرار داده شد. متعاقباً واکنش زمینه با گذاشتن ۵۰µl از محلول HCl یک مولار روی سطح الکترود و نگهداری الکترودهای کار در شرایط پتانسیلی ۱/۲۷+ ولت به مدت ۳۰ ثانیه و نهایتاً اندازه‌گیری DPV مابین ۰/۲- تا ۰/۸+ ولت با سرعت خوانش ۵۰mV/s انجام شد که با توجه به پاسخ مناسب‌تر روش رقابتی تأخیری در نظر گرفته شد (شکل ۷). جریان کاتدی تولید شده به صورت پاسخ الکتروشیمیایی گزارش شده است. نتایج شکل ۷ نشان داد که رابطه متناسبی بین افزایش غلظت HSA و کاهش شدت جریان پیک DPV وجود دارد، به نحوی که در محدوده طیف خطی ۰/۰۰۰۵ تا ۰/۲ µg/ml پاسخ جریان افزایش می‌یابد. با درنظر گرفتن طیف خطی به دست آمده و دقت اندازه‌گیری ۰/۲ ng/ml ایمونوسنسور طراحی شده، در مقایسه با ایمونوسنسورهای الکتروشیمی دیگر عملکرد قابل توجهی دارد [۲۰].

Archive of SID

www.SID.ir



الحاق: منحنی استاندارد HSA در ادرار با استفاده از الکترود تغییریافته با PVA. هر نقطه نشان دهنده میانگین سه تکرار است

شکل ۷- ولتاموگرام‌های تمایز پالسی برای تشخیص HSA براساس رقت‌های سریالی مختلف آنتی‌ژن (a تا g) (۰/۵، ۰/۲، ۰/۰۵، ۰/۰۲، ۰/۰۱، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۰۲ µg/ml) در HCl یک مولار در سرعت خوانش ۵۰mV/s

نتیجه‌ای که از همه داده‌های مربوط به ایمونوسنسور رقابتی HSA براساس نانوذرات به دست آمده نشان می‌دهد که ایمونوسنسور HSA، یک ایمونوسنسور بهینه شده و توسعه یافته و با اختصاصیت بالا است. به علاوه دارای دقتی در حد µg/ml و ng ml برای ردیابی HSA در تعداد متنوعی از نمونه‌ها از جمله نمونه‌های استاندارد و اصلی می‌باشد.

اختصاصیت ایمونوسنسور

حضور عوامل مداخله‌گر در زمینه ادرار می‌تواند بر عملکرد آنتی‌بادی و نتایج به دست آمده از سنجش تاثیر داشته باشد. در طراحی سیستم الکتروشیمیایی مبتنی بر نانوذرات مگنتیک طلا به عنوان نشان و PVA به عنوان تثبیت کننده سطح الکترود، نقش عوامل مداخله‌گر شامل اوره (1mol/L)، کراتینین (۱۰gr/L)، هموگلوبین انسان (۱۰ mg/L)، ایمونوگلوبین انسان (۱۰ mg/L)، گلوکز (۲۰ gr/L)، تتراسایکلین (۲۰۰ mg/L) و استامینوفن (۲۰۰ mg/L) بررسی شده و مشاهده شده که حضور ترکیبات ذکر شده در نمونه ادرار تأثیری در نتیجه آزمایش ندارد. با توجه به اینکه در این تحقیق از آنتی‌بادی مشابه استفاده شده است، پیش‌بینی می‌شود که حضور این عوامل در نتایج به دست آمده از روش پیشنهادی نیز تاثیر نداشته باشد.

در مجموع هدف از این تحقیق ارائه روشی جدید جهت طراحی ایمونو سنسور الکتروشیمیایی برای سنجش آلبومین ادرار با توجه به خواص منحصر به فرد شیمیایی و فیزیکی کمپلکس نانومگنتیک طلا سنتز شده است. ویژگی‌های اختصاصی مگنتیت طلا از جمله خاصیت سوپرپارامگنتیک، غیر سمی بودن پلیمر به کار رفته درکمپلکس، جمع‌آوری آسان در پاسخ سریع آنها به مگنت خارجی، توانایی اتصال آسان به آنتی‌آلبومین جهت نشاندار کردن و در نتیجه ایجاد سیگنال مناسب در بهینه‌سازی ایمونوسنسور مورد نظر نقش بسزایی داشت. سیستم ایمونواسی طراحی شده به دلیل دقت و حساسیت بالا می‌تواند آلبومین را درغلظت‌های بسیار کم در نمونه‌های ادرار اندازه‌گیری کنند و همچنین در مواردی به دلیل عدم نیاز به وسایل پیشرفته و صرف زمان و هزینه زیاد برای تشخیص آلبومین در مراکز کوچک با امکانات کم کاربرد دارد. از مزیت‌های این سیستم، امکان تعمیم نتایج آن برای طراحی دیگر ایمونوسنسورهای زیستی می‌باشد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:58 IRDT on Sunday September 8th 2013
Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:58 IRDT on Sunday September 8th 2013

مأخذ

1. Knopp D. Immunoassay development for environmental analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2006; 385 (3):425-7.
2. Wu J, Fu Z, Yan F, Ju H. Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2007; 26 (7):679-88.
3. Jiang X, Li D, Xu X, Ying Y, Li Y, Ye Z, Wang J. Immunosensors for detection of pesticide residues. *Biosensors and Bioelectronics* 2008; 23 (11): 1577-87.
4. Vo-Dinh T, Cullum B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' journal of analytical chemistry* 2000; 366 (6):540-51.
5. Luo X, Morrin A, Killard AJ, Smyth MR. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. *Electroanalysis* 2006; 18 (4):319-26.
6. Khatami Z, McIlveen DW, Nesbitt SG, Young IS. Screening for microalbuminuria by use of microproteinuria. *Eastern Mediterranean Health Journal* 2005; 11 (3):359.
7. Klein R, Klein BEK, Moss SE. Prevalence of microalbuminuria in older-onset diabetes . *Diabetes care* 1993; 16 (10):1325-30.
8. Teppo AM. Immunoturbidimetry of albumin and immunoglobulin G in urine. *Clinical chemistry* 1982; 28 (6): 1359-61.
9. Woo J, Floyd M, Cannon DC, Kahan B. Radioimmunoassay for urinary albumin. *Clinical chemistry* 1978; 24(9):1464-7.
10. Cheng Q, Peng TZ, Liu AL. Preparation of functional magnetic nanoparticles and its application in diagnostic analysis. *Chinese Chemical Letters* 2005; 16 (8):1059.
11. Tang D, Sauceda JC, Lin Z, Ott S, Basova E, Goryacheva I, Biselli S, Lin J, Niessner R, Knopp D. Magnetic nanogold microspheres-based lateral-flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B in food. *Biosensors and Bioelectronics* 2009; 25 (2):514-8.
12. Li J, Gao H, Chen Z, Wei X, Yang CF. An electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen enhanced by self-assembled nanogold coatings on magnetic particles. *Analytica chimica acta* 2010; 665(1):104-98.
13. Doretti L, Ferrara D, Gattolin P, Lora S, Schiavon F, Veronese FM. PEG-modified glucose oxidase immobilized on a PVA cryogel membrane for amperometric biosensor applications. Talanta 1998; 45(5):891-8.
14. Omidfar K, Dehdast A, Zarei H, Sourkohi BK, Larijani B. Development of urinary albumin immunosensor based on colloidal AuNP and PVA. Biosensors and Bioelectronics 2011
15. Paknejad M, Rasaee MJ, Tehrani FK, Kashanian S, Mohagheghi MA, Omidfar K, Bazl MR. Production of monoclonal antibody, PR81, recognizing the tandem repeat region of MUC1 mucin. Hybridoma and hybridomics 2003; 22 (3):153-8.
16. Mashavhela M. Synthesis and charaterization of coated and uncoated magnetic nanoparticles. 2009.
17. Castaeda Briones MT. Electrochemical stripping analysis and nanoparticles for affinity biosensors. 2008.
18. Chen ZP, Peng ZF, Zhang P, Jin XF ,Jiang JH, Zhang XB, Shen GL, Yu RQ. A sensitive immunosensor using colloidal gold as electrochemical label. Talanta 2007; 72 (5):1800-4.
19. Idegami K, Chikae M, Kerman K, Nagatani N, Yuhi T, Endo T, Tamiya E. Gold Nanoparticles Based Redox Signal Enhancement for Sensitive Detection of Human Chorionic Gonadotropin Hormone. Electroanalysis 2008; 20 (1):14-21.
20. Bonel L, Vidal JC, Duato P, Castillo JR. An electrochemical competitive biosensor for ochratoxin A based on a DNA biotinylated aptamer. Biosensors and Bioelectronics 2011; 26 (7):3254-9.

Archive of SID

www.SID.ir