Archive of SID

مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، (JSIAU)
سال ۲۱ ، شماره ۸۰ ، تابستان ۱۳۹۰

اتصال واکسن مورفین به نانوذره‌های طلای تهیه شده با گلوتامیک اسید

داود زارع*
گروه شیمی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
عظیم اکبرزاده
بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران،تهران، ایران
شهرام تنگستانی نژاد، مجید مقدم
گروه شیمی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
نسیم برارپور
بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۲۰

چکیده

مقدمه: یکی از کاربردی‌ترین نانوذره‌ها در نانوزیست‌فناوری و نانوپزشکی نانوذره‌های طلا می‌باشند.

هدف: هدف از این پژوهش تولید نانوذره‌های طلا با اندازه کوچک توسط گلوتامیک‌اسید می‌باشد و پس از آن نانوذره‌های تولیدی به واکسن مورفین متصل می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه نانوذره‌های طلا با روش کاهش شیمیایی و استفاده از گلوتامیک‌اسید تهیه و پوشش‌دار شدند. شناسایی و بررسی این ذره‌ها توسط طیف‌سنجی فرابنفش مریی، تفرق دینامیکی نور و میکروسکوپ الکترونی عبوری انجام شد. به‌منظور اتصال نانوذره‌ها به واکسن ابتدا نانوذره‌های کلوییدی با بافرفسفات سالین سوسپانسیونی شده و سپس با واکسن‌مورفین کونژوگه شدند. بررسی اتصال این ذره‌ها توسط الکتروفورز ژلی سدیم دودسیل سولفات و طیف سنجی فرابنفش مریی انجام گردید.

*عهده دار مکاتبات: Zare_davood@yahoo.com، تلفن: ۶۶۴۶۵۴۰۶-۰۲۱، فاکس: ۶۶۴۶۵۱۳۲-۰۲۱

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج: نانوذره‌های تولید شده به این روش که دارای قطر میانگین ۲۰نانومتر بودند، بعد از اتصال به واکسن مورفین باندهایی متفاوت و موقعیت‌های بالاتری نسبت به واکسن خالص در الکتروفورز ژلی سوق یافته بودند که بیانگر عمل کونژوگه شدن می‌باشد.

نتیجه‌گیری: توانایی تولید نانوذره‌های طلا با گلوتامیک‌اسید با توجه به غیرسمی بودن آمینواسیدها، سبب استفاده‌ی مناسب از این ذره‌ها در پزشکی و زیست‌فناوری خواهد شد. اتصال نانوذره‌های طلا به واکسن مورفین، پیشنهاد استفاده از نانوذره‌های طلا به‌عنوان ادجوانت در واکسن‌های مختلف به‌خصوص واکسن مورفین را مطرح می‌کند.

واژه‌های کلیدی: کونژوگه‌کردن، واکسن مورفین، نانوذره‌های طلا، گلوتامیک اسید

مقدمه

امروزه تحقیق‌ها و کاربردهای فناوری نانو[1] به شکل گسترده‌ای در حال توسعه می‌باشد. یکی از مهمترین شاخه‌های فناوری نانو، نانوذره‌ها بوده که در این میان نانوذره‌های طلا از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. سئوال این است که چه ویژگی‌هایی طلا را به عنوان یک ماده‌ی ایده‌آل برای چنین کاربردهای گسترده‌ای مطرح می‌کند؟ طلا به شکل انبوه و توده (بالک[2])، یک فلز زرد رنگ، نرم، خنثی با ساختار مکعب مراکز وجوه پر[3] (fcc) و دمای ذوب $۱۰۶۸^{\circ}C$ است. هم‌چنین بی‌اثر[4] بودن طلا و مقاومت آن در برابر اکسایش سطحی یکی از ویژگی‌های مهم این ماده است. اما این ویژگی‌ها لزوماً در نانوذره‌های طلا مشاهده نمی‌شوند. طلا در مقیاس نانو، ویژگی‌هایی را بروز می‌دهد که آن را به فلز مهمی در فرآیندهای فناوری نانو تبدیل می‌کند. از سوی دیگر امروزه به اثبات رسیده است که نانوذره‌های طلا در تعدادی از واکنش‌های مهم تجاری، به‌عنوان کاتالیزگر کاربرد دارد. این نانو ذره‌ها در زمینه‌هایی چون کشاورزی، الکترونیک، کاتالیزگرها، رنگ‌ها، پوشش‌دهی سطوح و تولید داروهای زیستی کاربردهای متعددی دارد. با توجه به این ویژگی‌های بی‌نظیر، کاربردهای جدید فناوری نانو با استفاده از طلا در حال گسترش است.[۱-۶] یکی از این کاربردهای مهم نانوذره‌های طلا، پزشکی است، تحقیق‌های اخیر صورت گرفته توسط دانشمندان علوم زیستی، شیمی و پزشکی نتیجه‌های بسیار جالبی را ایجاد نموده‌اند، که می‌توان به استفاده از نانوذره‌های طلا در تولید نانو بارکد اشاره کرد، که به عنوان پایه‌ی روش نوین تشخیصی BCA[5] به شمار می‌رود، در این روش از کونژوگه‌های طلا و آنتی بادی استفاده می‌شود. در موارد دیگر از نانوذره‌های طلا و نقره به‌عنوان ذره‌های جایگزین ادجوانت (یاور) در واکسن‌ها نیز استفاده شده است.[۷-۸]

ابتدا تهیه نانوذرات طلا، نانوذره‌های طلا تا به حال به روش‌های مختلفی تهیه شده‌اند ولی استفاده از آمینواسیدها به عنوان عامل کاهنده در واکنش اکسایش-کاهش یون‌های طلا روشی جدید و قابل توجه می‌باشد، زیرا از یک سو آمینواسید ماده‌ای غیر سمی و سالم بوده (در مقایسه با سایر کاهنده‌ها مانند هیدرازین، ترکیبات بور هیدرات و سدیم سیترات) و سوی دیگر این ماده نه تنها سبب کاهش یون‌های طلا می‌شود بلکه نقش پوشش دهندگی این ذره‌ها را نیز ایفا

[1] Nanotechnology
[2] Balk
[3] Face centered cubic
[4] Noble
[5] Bio barcode amplification

www.SID.ir

Archive of SID

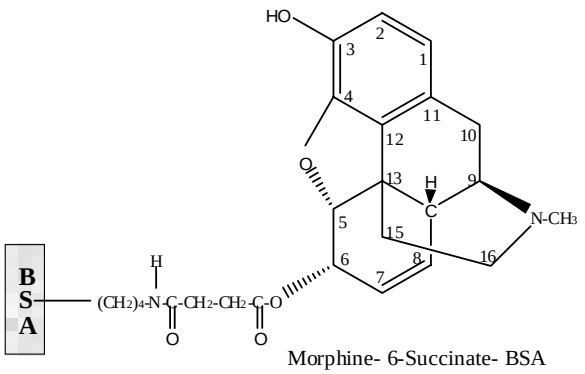
می‌کنند و این نکته مهمی در پایداری این نانوذره‌ها است. هدف دیگر اتصال نانوذره‌های طلا بـه واکـسن مـورفین اسـت کـه می‌تواند پیشنهادی برای استفاده از نانوذره‌های طلا به‌عنوان ادجوانت در واکسن‌ها باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

تتراکلروآئوریک اسید سه آبه[1]، ال-گلوتامیک اسید، بافر فسفات سالین (شامل سدیم کلرید، سدیم هیدروژن فـسفات ۱۲ آبه و مونو سدیم فسفات دو آبه)، مواد الکتروفورز ژلی سدیم دودسـیل سـولفات سـدیم[2] (شـامل متـانول، اسـتیک اسـید گلاسیال، تریس‌هیدروکسی آمینومتان هیدروکلراید، کماسی بلو G[3]، اکریل آمید، بیس اکریل آمیـد، سـدیم دودسـیل سـولفات، آمونیوم پرسولفات، گلیسرول، مرکاپتواتانول) که همگی از شرکت مرک آلمان تهیه شده‌انـد. در ضـمن آب مقطـر یـون‌زدایـی شده‌ی مصرفی از واحد آب مقطر انستیتو پاستور ایران تامین شده است.

واکسن مورفین- واکسن مورفین در سال ۱۳۷٤ شمسی توسط دکتر عظیم اکبرزاده به ثبت رسید، این واکـسن دارای ماده موثره مورفین-٦- سوکسینات- سـرم آلبـومین گـاوی[4] (M-6-S-BSA) اسـت، کـه از ایـن پـروتیین بـرای اتـصال بـه نانوذره‌های طلا استفاده می‌شود[۱۵-۱۲] (شکل ۱).



شکل ۱- شمایی از ساختار ماده موثره واکسن مورفین

روش تحقیق

روش تحقیق در این پژوهش شامل چند مرحله است که جداگانه توضیح داده می‌شود:

مرحله اول: تهیه نانوذره‌های طلا

نانوذره‌های طلا به روش کاهش نمک طلای (III) در حضور آمینو اسید گلوتامیک اسـید تهیـه مـی‌شـوند. بـه ایـن منظور ۲mL محلول ۵mM تتراکلروآئوریک اسید (که قبلاً در آب مقطر یون زدایی شده حل شده اسـت)، در یـک بـالون ۱۰ ۰میلی‌لیتری حاوی ۵۰mL آب مقطر یون زدایی شده اضافه شده و بالون روی گـرم‌کـن-هـم‌زن قـرار داده مـی‌شـود. پـس از رسیدن محلول به نقطه‌ی جوش خود، ۳mL از محلول گلوتامیک اسید (که قبلاً در آب مقطر یون زدایـی شـده حـل شـده و

[1] $HAuCl_4.3H_2O$
[2] Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
[3] Coomassie Blue G
[4] Bovine serum albumin

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت آن ۲۵mM است) روی آن افزوده و گرم کردن آن‌قدر ادامه می‌یابد تا رنگ محلول از بی‌رنگ به صورتی مایل به سرخ تغییر کند (که نشانه تولید نانوذره‌های طلا و انجام واکنش است)، سپس محلول به سرعت در حمام آب/ یخ قرار داده می‌شود.

مرحله دوم: شناسایی نانوذره‌های طلا

در این مرحله با استفاده از روش‌های طیف سنجی فرا بنفش- مریی[1] (UV-Vis) (طیف سنج ساخت شرکت شیمادزو[2] و مدل ۱۶۰۱ می‌باشد)، تفرق دینامیکی نور[3] (DLS) (از دستگاه زتا-سایزر[4] مدل ۳۰۰۰ ساخت شرکت مال‌ورن[5] استفاده شده است) و میکروسکوپ الکترونی عبوری[6] (میکروسکوپ مورد استفاده مدل JEOL-JEN 2010 است) به شناسایی نانوذره‌های تولید شده بررسی و آن‌ها پرداخته می‌شود.

مرحله سوم: سوسپانسون کردن نانوذره‌های کلوییدی طلا

در مرحله سوم از روش‌های تحقیق، نانوذره‌های طلا تولید شده به منظور آماده سازی جهت کونژوگه شدن به واکسن مورفین، توسط بافر فسفات سالین[7] سوسپانسیونی می‌شوند. نحوه‌ی انجام این کار بدین صورت است که ابتدا بافر فسفات سالین (PBS) با pH=۷/٤ از انحلال ۸ گرم سدیم کلرید، ۲/۸۲ گرم سدیم هیدروژن فسفات ۱۲ آبه و ۱/٤۲ گرم مونو سدیم فسفات دو آبه در یک لیتر آب مقطر یون زدایی شده تهیه می‌شود. سپس، ۲mL از آن با ۲mL محلول کلوییدی طلا در یک لوله درپوش‌دار مخلوط می‌شود، به محض مخلوط کردن این محلول‌ها با هم، رنگ محلول طلا از صورتی به بی‌رنگ (مایل به خاکستری) تغییر می‌یابد.

مرحله چهارم: کونژوگه کردن نانوذره‌های طلا به واکسن مورفین

پس از تولید، شناسایی و سوسپانسیونی کردن نانوذره‌های طلا، به منظور کونژوگه کردن این ذره‌ها ۳۰ µL از نانوذره‌های طلا با ٤۰ µL واکسن مورفین (با غلظت ۰/۵mM) در یک لوله‌ی اپندورف ریخته شده به آرامی مخلوط می‌شود و سپس به مدت ۱۱۵ ساعت در انکوباتور با دمای ٤°C قرار داده می‌شود.

نتایج و بحث

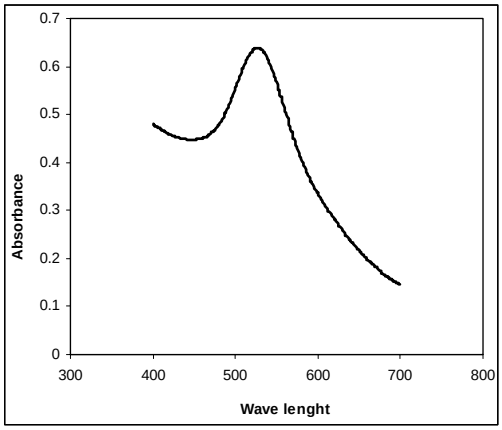
در مرحله دوم از روش تحقیق، یعنی شناسایی نانوذره‌های کلوییدی طلا، سه روش مورد استفاده قرار گرفت که عبارت است از طیف سنجی UV-Vis، DLS و TEM, نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که نانوذره‌های کلوییدی طلا دارای بیشینه جذبی در طول موج ۵۲۵nm ایجاد کرد. این عدد که بیان‌گر تشکیل نانوذره‌های طلاست (شکل۲). [۹-۱۱]

سپس نانوذره‌های طلا توسط زتا-سایزر مورد آنالیز DLS قرار گرفتند که نتیجه حاصل شده نشان داد که قطر میانگین ذره‌های طلا تقریباً ٤۹nm است (شکل۳) و پس از آنالیز TEM مشخص گردید این ذره‌ها دارای قطر تقریبی ۲۰nm هستند (شکل٤).

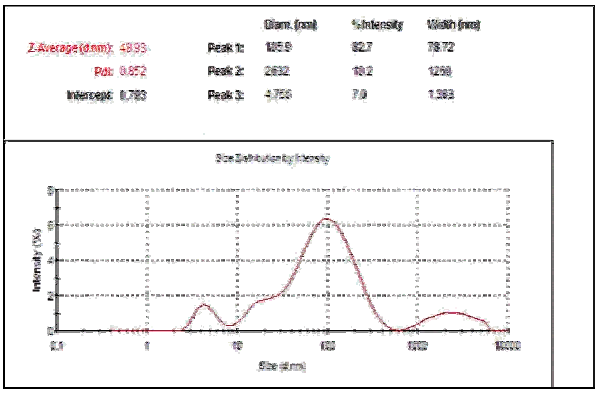
1- Ultra violet spectroscopy = UV-Vis
2- Shimadzu
3- Dynamic light scattering
4- Zeta-sizer
5- Malvern
6- Transmission electron microscopy
7- Phosphate buffer saline

www.SID.ir

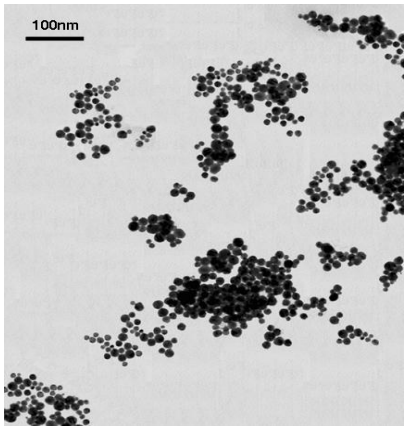
Archive of SID



شکل ۲- طیف UV-Vis نانوذره‌های طلای تهیه شده توسط گلوتامیک اسید



شکل۳ - آنالیز DLS نانوذره‌های طلا توسط زتاسایزر

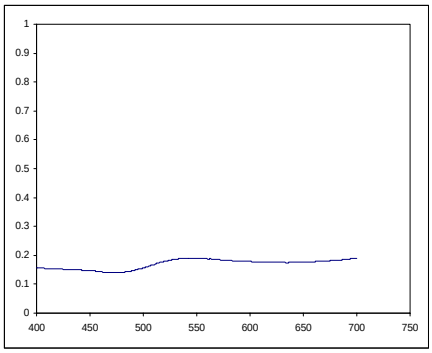


شکل٤- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذره‌های طلای تهیه شده با گلوتامیک اسید

در مرحله سوم از روش تحقیق، نانوذره‌های طلا توسط PBS سوسپانسیونی شدند، در این مرحله جهت اطمینان از تشکیل سوسپانسیون طلا، از نمونه، طیف UV-Vis گرفته شد که مشاهده شد باند جذبی موجود در ۵۲۵nm از بین رفته است، که دلیلی بر سوسپانسیونی شدن این ذره‌ها است (شکل۵).

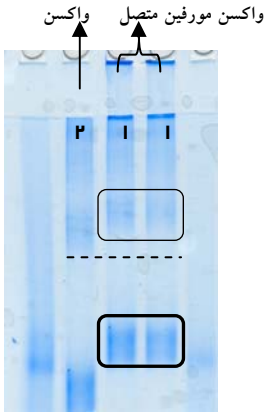
www.SID.ir

Archive of SID



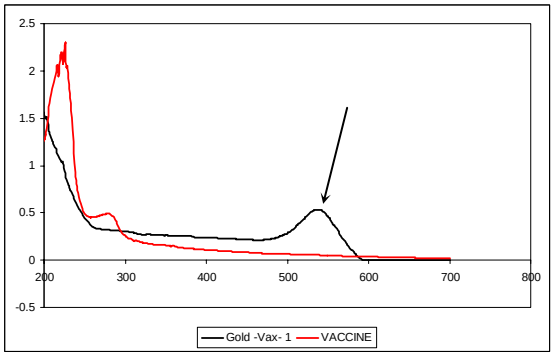
شکل۵- طیف UV-Vis حاصل از نانوذره‌های سوسپانسیونی طلا

در مرحله چهارم از روش تحقیق، پس از کونژوگه کردن نانوذره‌های طلا و واکسن، با استفاده از طیف سنجی UV-Vis و الکتروفورز ژلی پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) نمونه‌ها مورد تحلیل و آزمایش قرار گرفتند، نتایج SDS-PAGE نشان داد که نوارهای مربوط به نانوذره‌های کونژوگه شده اندکی بالاتر از لکه‌های نمونه استاندارد واکسن خالص قرار گرفته است. هم‌چنین از محلول نانوذره‌های کونژوگه شده طیف UV-Vis در محدوده ۲۰۰-۷۰۰nm گرفته شد که در مقایسه با طیف UV-Vis واکسن خالص، پیک‌ها جابه‌جا شده و باند مربوط به نانوذره‌های طلا که در نمونه سوسپانسونی طلا از بین رفته بود، دوباره در ۵۲۸nm ظاهر شده است (توضیحات در قسمت بحث و نتیجه گیری) (شکل ٦ و۷).



شکل ٦- تصویر ژل SDS-PAGE حاصل از کونژوگه شدن نانوذره‌های طلا و واکسن [۱] و واکسن خالص (نمونه استاندارد) (۲)

* توضیح: لکه‌هایی که اطراف آن‌ها خط کشیده شده است به وضوح بالا رفتگی نمونه های کونژوگه شده با نانوذره‌های طلا را نشان می‌دهد.



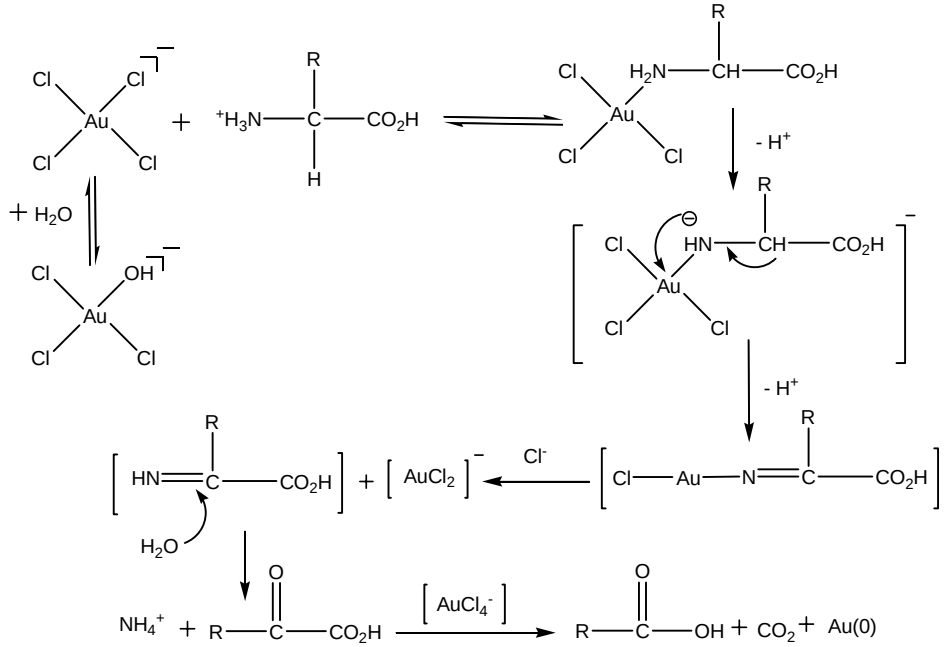
شکل۷- طیف‌های UV-Vis مربوط به واکسن مورفین خالص(قرمز) و نانوذره‌های کونژوگه شده با واکسن

*** توضیح: پیکان نشان داده شده در شکل بالا بیان‌گر ظاهر شدن مجدد پیک مربوط به نانوذره‌های کلوییدی طلاست که پس از کونژوگه شدن با واکسن دوباره ایجاد شده است.**

www.SID.ir

Archive of SID

تتراکلروآئوریک اسید بر اثر انحلال در آب تولید یون یک بار منفی تتراکلروطلا خواهند کرد، این آنیون حاوی کاتیون طلای (III) بوده که این کاتیون می‌بایست طی یک فرایند اکسایش-کاهش به طلای(0) تبدیل شود. این کار توسط گلوتامیک اسید انجام می‌گیرد. گلوتامیک اسید یک آمینواسید با دو گروه کربوکسیلیک اسید است که طی سازوکار زیر اکسید شده، سبب کاهش یون‌های طلای(III) به طلای (0) می‌شود. در مورد نحوه اکسایش آمینواسیدها پژوهش‌هایی در مقالات محققان وجود دارد که از آن جمله می‌توان به سازوکار ارائه شده در مورد گلایسین اشاره کرد که در این‌جا جهت روشن شدن نحوه کاهش طلای(III) توسط گلوتامیک اسید استفاده شده است [۱۶] (شکل۸).



شکل۸- سازوکار کاهش یون طلای(III) در حضور گلوتامیک اسید

همان‌طور که در سازوکار[1] مشاهده می‌شود نانوذره‌های طلا طی یک فرآیند اکسایش-کاهش تولید می‌شوند. این ذره‌ها به‌صورت کلویید در محلول خواهند بود و سبب رنگی شدن محلول می‌شوند. همین عامل موجب می‌شوند که طیف سنجی UV-Vis یکی از روش‌های ساده برای شناسایی نانوذره‌های کلوییدی طلا می‌باشد و همان طور که گفته شد این ذره‌ها دارای بیشینه جذب در طول موج ۵۲۵nm هستند که با توجه به گزارش‌های دیگر، وجود چنین جذبی بیان‌گر تولید نانوذره‌های طلا است.[۹-۱۱]

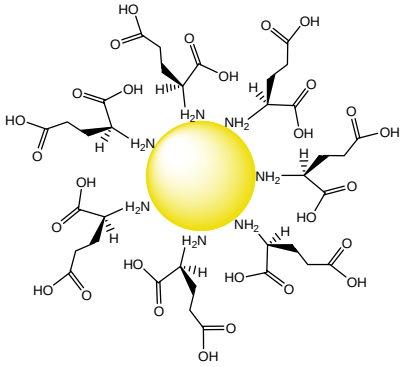
از نکات قابل توجه در این پژوهش مقدار اضافی گلوتامیک اسید (عامل کاهنده یون طلا) است. کاتیون طلا دارای سه بار مثبت بوده و جهت کاهش به طلای خالص نیاز به سه الکترون دارد، از سوی دیگر به ازای اکسایش هر مولکول گلوتامیک اسید یک الکترون آزاد می‌شود، با این توضیح نسبت سه به یک از گلوتامیک اسید به طلا جهت کاهش یون‌های طلا کافی می‌باشد، در حالی که نسبت مورد استفاده در این پژوهش ۷/۵ به ۱ است. علت این موضوع این است که، مقدار اضافی آمینواسید در این فرایند دو مزیت دارد، اول این که سبب کامل شدن واکنش کاهش شده و دوم این که به دلیل فعالیت

[1]- Mechanism

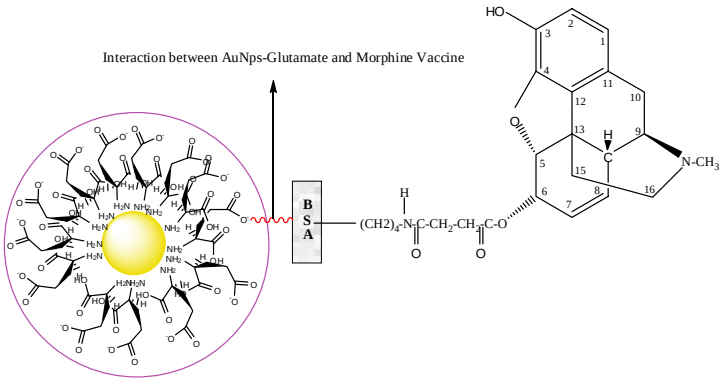
www.SID.ir

Archive of SID

بسیار بالای نانوذره‌های طلا، مقدار اضافی گلوتامیک اسید به‌عنوان پوشش دهنده‌ی ذره‌های طلا عمل کرده و نقش پایدار کننده را نیز ایفا می‌کند، این اتصال از طریق جاذبه بین جفت الکترون‌های غیر پیوندی در گروه آمین آمینواسید و اوربیتال‌های خالی طلا ایجاد خواهد شد (شکل۹). این کار نه تنها موجب پایداری بیش‌تر نانوذره‌های طلا می‌شود بلکه سبب اتصال (کونژوگه شدن) راحت‌تر پروتیین به نانوذره‌های می‌شود. گروه کربوکسیل موجود در موقعیت گامای گلوتامیک اسید محل مناسبی جهت کونژوگه شدن پروتیین به این نانوذره‌ها است (شکل ۱۰).



شکل۹- نمایی از اتصال گلوتامیک اسیدهای اضافی به نانوذره طلا



شکل۱۰- شمایی از برهم کنش نانوذرات پوشیده شده از گلوتامات و واکسن مورفین

پس از شناسایی نانوذرات طلا توسط UV-Vis، اندازه‌ی آنها ابتدا با استفاده از DLS سپس TEM اندازه‌گیری شده است و از آنجایی که DLS قطر دینامیکی ذره‌ها را اندازه می‌گیرد عددی متفاوت و بزرگتر از TEM گزارش خواهد کرد (قطر نانوذره‌های طلا با روش DLS ٤٩nm بوده و با روش TEM تقریباً ٢٠nm است). [۱۷]

اساس الکتروفورز ژلی (SDS-PAGE) جابجایی هر گونه بر حسب وزن مولکولی آن است و هرچه وزن مولی آن گونه بزرگتر باشد، جریان الکترون‌ها گونه‌ی مذبور را کمتر به سمت پایین ژل جابجا می‌نمایند. از این رو و همان‌گونه که در شکل ٦ مشخص است، نانوذره‌های طلا پس از کونژگه شدن با مولکول‌های واکسن ذره‌های کمپلکس جدیدی تولید کرده‌اند که این ذرات نسبت به خود واکسن از جرم بیشتری برخوردار خواهد بود. لذا همان‌طور که نتایج SDS-PAGE نشان می‌دهد این ذرات کمپلکس در موقعیت‌های بالای ژل ظاهر شده‌اند و از این رو می‌توان فهمید که عمل کونژگه کردن با موفقیت صورت گرفته است (در شکل موقعیت‌های توضیح داده شده، مشخص شده‌اند). از سوی دیگر با مقایسه طیف

www.SID.ir

Archive of SID

UV-Vis واکسن خالص با واکسن کونژوگه در شکل ۷، می‌توان مشاهده کرد که باندهای جذبی مربوط به واکسن خالص (در محدوده ۳۰۰nm-۲۰۰)، در نمونه واکسن کونژوگه شده جابه‌جا شده و به سمت طول موج‌های کوتاهتر سوق پیدا کرده‌اند (باندهای جذبی در نمونه کونژوگه جابجایی آبی پیدا کرده‌اند). همچنین همان‌طور که در شکل ۷ مشخص است نانوذره‌های طلا که قبل از عمل کونژوگه شدن سوسپانسونی شده و جذبی در UV-Vis نشان نمی‌دادند (شکل ۵)، پس از کونژوگه شدن دوباره پیک جذبی مشخصی در UV-Vis پدیدار کرده‌اند. علت این موضوع را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که در زمان برهم‌کنش نانوذرات طلا با مولکول‌های پروتئینی، از آنجا که ذره‌های طلا تمایل به اتصال در محل‌های فعال پروتئین را دارند، به ناچار جاذبه‌ی فیزیکی بین خود را رها کرده و دوباره به حالت کلوئیدی باز می‌گردند. اما به‌دلیل کونژوگه شدن، باند جذبی مربوط به نانوذره های طلا نسبت به حالت خالص اندکی جابه‌جایی سرخ داشته و در ۵۲۸ nm ظاهر می‌گردد که می‌توان علت آن را درشت‌تر شدن نانوذره‌های طلا در حالت کونژوگه نسبت به حالت خالص دانست.

نتیجه گیری

نانوذره‌های فلزی از زمینه‌های جالب و مورد علاقه بسیاری از پژوهشگران علوم مختلف قرار داشته و از این میان نانوذره‌های طلا کاربرد وسیعی در حوزه‌های مختلف به‌ویژه علوم پزشکی و زیستی دارند. تولید نانوذره‌های طلا که درتهیه آنها از آمینواسید به‌عنوان یک ماده‌ی غیرسمی استفاده شده است گام مهمی در استفاده از کاهنده‌های غیرسمی برای تولید نانوذرات می‌باشد. هم‌چنین با توجه به ساختار گلوتامیک اسید و وجود دو گروه کربوکسیلیک اسید، ساختاری ویژه پس از اتصال آن به نانوذره ایجاد خواهد شد که محل مناسبی جهت اتصال پروتیین‌ها و آنزیم‌ها خواهد بود که مولکول واکسن ماده‌ی موردنظر در اتصال به این ذره‌ها در این پژوهش بود. همچنین با توجه به اینکه کونژگه کردن سبب اتصال تعدادی مولکول واکسن به نانوذرات طلا می‌شود، از این رو می‌توان از نانوذرات طلا به‌عنوان جایگزین و پیشنهاد مناسب برای استفاده از این ذره‌ها به‌عنوان ادجوانت (یاور) در واکسن مورفین و سایر واکسن‌ها نام برد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از اعضای بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران، بخش نانوبیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران به‌ویژه آقای دکتر علمدار آشناگر و امیر عباس رحیمی، گروه بیوشیمی انستیتو پاستور ایران به ویژه آقای دکتر محمد ارجمند، خانم دکتر روحی و آقای شهباز محمدی جهت همکاری بی‌دریغ و انجام آنالیزهای مختلف ابراز می‌داریم.

Refrences:

1. Watanabe, K., Menzel, D., Nilius, N., Freund, H,J., *Chem. Rev.*, **106**, 4301 (2006).
2. Salata, O., *J. Nanobiotechn.*, **2**, 1 (2004).
3. Mirkin, C.A., Taton, T.A., *Nature*, **405**, 626 (2000).
4. Yang, P., Zhang, W., Du, Y., Wang, X., *J. Mol. Catalysis* A, **260**, 4 (2006).
5. Daniel M.C., Astruc, D., *Chem. Rev.*, **104**, 293 (2004).
6. Thompson D.T. *Nanotoday*, **2**(4), 40 (2007)
7. Nam J., Thaxton, C.S., and Mirkin, C.A., *Sci.*, **301**, 1884 (2003)
8. Klein, L., and Mirkin, C.A., *P. N. A. S.*, **102**(7), 2273 (2005)

www.SID.ir

Archive of SID

9. Humbert, C., Busson, B., Abid, J.P., Six, C., Girault, H.H., Tadjeddine, A., *Electrochimica Acta*., **50**, 3101 (2005).
10. Kumar, Jena, B., Raj C.R., *Langmuir*, **23**, 4064 (2007).
11. Sardar, R., Park, J.W., Shumaker-Parry, J.S., *Langmuir*, **23**, 11883 (2007).
12. Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Farahmand, B., Nouri Inanlou, D., *Current science*, **83**(1), 57 (2002).
13. Akbarzadeh, A., Mehraby, M., Zarbakhsh, M., Farzaneh, H., *Appli. Biochem.*, **30**, 139 (1999).
14. Akbarzadeh, A., *Asrar*, **1**, 9 (1996).
15. Akbarzadeh, A., Farahmand, B., *Asrar*, **3**, 10 (1999).
16. Zou, J., Guo, Z., Parkinson, J., Chen, Y., Sadler, P., *Chem. Commun*, 1359 (1999).
17. Dynamic Light Scattering (DLS), Malvern Instruments, Available at http://www.malvern.co.uk/LabEng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm (2007)

www.SID.ir