

نانوزیست حسگر فوق العاده حساس و سریع بر پایه ی هیبرید پلاگزیتونیک نانومیله طلا-نقاط کوانتومی خودسامان ده آپتامری برای شناسایی تروپونین I قلبی

زهرا رضایی^۱ | بیژن رنجبر^{۲*}

۱. گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲. گروه بیوفیزیک و نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

چکیده

سکته حاد قلبی یکی از علل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است. روش های متداول تشخیص سکته قلبی پرهزینه و زمان بر هستند و معمولاً از نمونه خون به عنوان نمونه زیستی استفاده می کنند؛ بنابراین، ساخت یک ابزار تشخیصی فوق العاده سریع، حساس و غیرتهاجمی ضروری به نظر می رسد. در این تحقیق یک نانوزیست حسگر جدید فوق العاده حساس و فلورسنت پلاگزیتونیک آپتامری که از جفت شدگی پلاسمون-آگزایتون هیبرید نانومیله طلا-نقاط کوانتومی (RQ) ساخته شده است، جهت تشخیص پروتئین انسانی تروپونین I قلبی (cTnI)، نشانگر زیستی طلایی تشخیص سکته حاد قلبی، معرفی می شود. آزمایش های پیش-بالینی با کمک بزاق انجام شده است و اتصال پروتئین cTnI به آپتامر منجر به تشدید فلورسانس سامانه هیبرید پلاگزیتونیک شد. حد تشخیص این نانوزیست حسگر نیم فمتومولار است. به نظر می رسد که این نانوزیست حسگر جدید بر پایه سامانه هیبرید پلاگزیتونیک RQ، می تواند دریچه جدیدی را به سوی فرصت های تازه برای توسعه طراحی و ساخت نانوزیست حسگرها در حوزه نانوزیست فناوری باز کند.

واژگان کلیدی: آپتامر، تروپونین I قلبی انسانی، سکته حاد قلبی، نقاط کوانتومی، نانوزیست حسگر، نانومیله طلا.

۱ مقدمه

سکته حاد قلبی^۱ یکی از علل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان و یکی از مشکلات عمده بهداشتی است که سلامت انسان ها را تحت تأثیر قرار می دهد [۱]. در پاتوژنز سکته حاد قلبی، عروق خونی که اکسیژن و مواد غذایی را به سلول های ماهیچه قلبی می رسانند (عروق کرونر) با یک پلاک آترواسکلروز تنگ می شوند. اگر پلاک ترک بردارد یا پاره گردد، یک لخته خونی در سطح پلاک تشکیل شده و لخته می تواند به طور کامل، جریان خون را در عروق کرونر مسدود کند. زمانی که جریان خون مسدود شود، سکته حاد قلبی، به دنبال آسیب به سلول های ماهیچه قلبی رخ می دهد و قلب قادر نخواهد بود پمپاژ خون در سرتاسر بدن را به خوبی انجام دهد و این منجر به درد قفسه سینه، بازو، درد پشت، تنفس کوتاه و سایر نشانه ها خواهد شد [۲]. به دنبال نکرور سلول های ماهیچه قلبی (کاردیومیوسایت) نشانگر زیستیهای قلبی به درون جریان خون آزاد می شوند [۳، ۴].

چندین نشانگر زیستی برای کمک به تشخیص به موقع سکته حاد قلبی مورد استفاده قرار گرفته اند [۵]. پروتئین انسانی تروپونین I قلبی^۲ (hcTnI) در مقایسه با تروپونین T قلبی (cTnT) و تروپونین C (TnC) که در ماهیچه اسکلتی و قلبی بیان می شوند، تنها در کاردیومیوسایت ها بیان می شود [۶، ۷]. علاوه بر این، hcTnI در مقایسه با سایر نشانگرهای زیستی قلبی همچون کراتین کیناز- ماهیچه^۳ b (CK-MB) که در ماهیچه اسکلتی نیز بیان می شود، به عنوان نشانگر زیستی اختصاصی سکته حاد قلبی می باشد [۸]؛ بنابراین در میان نشانگر زیستیهای سکته حاد قلبی، cTnI به عنوان نشانگر انتخابی و استاندارد طلایی

1. Myocardial infarction
2. Human cardiac troponin I
3. Creatine kinase-muscle b

اخیرا پژوهشگران به کاربردهای سامانه‌های هیبرید پلاگزیوتونیک در نانوزیست‌حسگرها [۲۶]، نانواتن‌ها [۲۷]، دیودهای نشردهنده نوری^۴ [۲۸] و سلول‌های خورشیدی [۲۹] علاقه‌مند شده‌اند. سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک از جفت‌شدگی^۵ پلاسمون‌های موضعی سطحی در حال نوسان^۶ (LSPR) نانوذرات فلزی با اگزایتون نانوبلورهای نیم‌رسانا به وجود می‌آید. سامانه‌های هیبرید پلاگزیوتونیک برهم‌کنش‌های بسیار متنوع و پیچیده‌ای دارند [۳۰]، از تشدید فلورسانس فلزی^۷ (MEF) [۳۱] تا فرونشانی^۸ فلورسانس نانوبلورهای نیم‌رسانا [۳۲] را می‌توان مثال زد. انتقال انرژی در این سامانه‌ها به نوع، اندازه [۳۳، ۳۴]، غلظت [۳۴]، فاصله^۹ بین نانوذرات و ثابت دی‌الکتریک محیط اطراف بستگی دارد [۳۴، ۳۵]. در این مقاله، cTnI از طریق یک طراحی جدید سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک با استفاده از نانومیله طلا^{۱۰} (GNR) به عنوان نانوذرات پلاسمونیک و نقاط کوانتومی (QD) به عنوان نانوبلورهای نیم‌رسانا اگزایتونیک استفاده شد.

۲ بخش تجربی

مواد و تجهیزات

HAuCl_۴ (با درجه خلوص ACS)، ستیل‌تری‌متیل‌آمونوم برومید^{۱۱} (CTAB) (درجه خلوص ۹۵ درصد)، ویتامین سی، نیترات نقره (درجه خلوص ۹۰ درصد)، دی‌تیوتری‌تول^{۱۲} (DTT) (درجه خلوص ۹۹ درصد) و نقاط کوانتومی آلیاژ CdSeS/ZnS عامل‌دار شده با COOH از شرکت سیگما-آلدریج خریداری شد. به علاوه، ۱-اتیل-۳-(۳-دی‌متیل‌آمین‌پروپیل) کاربامید^{۱۳} (EDC) (درجه خلوص ۹۸ درصد)، نمک سدیم هیدروکسی-۳،۲-دی‌اکسی‌پیرولیدین-۳-سولفونیک اسید^{۱۴} (Sulfo-NHS) (درجه خلوص ۹۸ درصد) از شرکت بیوتکنولوژی سانتاکروز خریداری شدند. الیگونوکلیوتیدهای تک‌رشته^{۱۵} ویژه با درجه خلوص بالا به کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به شرکت فضاپژوه (فضابیوتک) سفارش داده شدند، همچنین پروتئین hcTnI از شرکت لایف دایاگنوستیک با درجه خلوص بیش از ۹۵ درصد تهیه شد.

اندازه نانومیله‌های طلا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TE) (TEM ۲۰۰۰ زایس) تعیین گردید. پیش از اندازه‌گیری TEM، نانومیله‌های طلا به مدت ۱۵ دقیقه با پروب فراصوت، پخش شدند. توصیف سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک نیز با کمک TEM انجام شد.

تشخیص سکتی حاد قلبی شناخته شده است [۹]. در آزمایش‌های متداول، در مراکز درمانی و اورژانس‌ها، CK-MB و cTnT را به عنوان نشانگر زیستی سکتی حاد قلبی اندازه‌گیری می‌کنند [۱۰-۱۲] و از خون بیماران به عنوان نمونه‌های زیستی استفاده می‌شود [۱۳]. به علاوه، روش‌هایی مثل الکتروکمی‌لومینسانس و الیزا گران و زمان بر هستند [۱۴]. روش‌های تشخیصی متداول در بیش از نیمی از موارد سکتی حاد قلبی که به اورژانس‌ها و مراکز درمانی مراجعه می‌کنند، جواب‌های مبهمی ارائه می‌دهند که درمان‌های مؤثر لخته‌زدایی را به تعویق می‌اندازند و سبب از دست رفتن زمان طلایی درمان می‌شوند [۱۵]. لذا در صورت امکان، دستیابی به یک سنجش تشخیصی سریع، غیرتهاجمی، ارزان و دقیق برای شناسایی cTnI، در حداقل زمان ممکن، یک گام مهم در تشخیص به موقع، درمان مؤثر و کاهش قابل توجه عوارض حاصل از سکتی حاد قلبی است.

بزاق یک گزینه مناسب در میان نمونه‌های زیستی است، چراکه نمونه‌گیری آن آسان، سریع و راحت است [۱۶، ۱۷]. همچنین، مطالعات نشان داده‌اند که در بیماران با سکتی حاد قلبی، cTnI در بزاق افزایش می‌یابد [۱۸، ۱۹]. به علاوه، ۹۹/۵ درصد بزاق از آب تشکیل شده است و ۰/۵ درصد باقی‌مانده شامل آنزیم‌ها، موکوز، گلیکوپروتئین‌ها و غیره است [۲۰، ۲۱]. به عنوان نمونه‌ی زیستی، بزاق از محیطی ساده‌تر با تنوع پروتئینی کمتری برخوردار است، لذا گزینه بسیار مناسب‌تری برای زیست‌حسگر در مقایسه با نمونه‌های خونی با یک محیط پیچیده است.

در نانوزیست‌حسگرها، عناصر شناسایی‌کننده^{۱۶}، اجزای کلیدی و مهمی هستند، زیرا که این عوامل به هدف متصل شده و منجر به شناسایی می‌شوند [۲۲]. آنتامرها توالی‌های کوتاه تک‌رشته‌ای DNA یا RNA هستند که به یک هدف اختصاصی با تمایل^{۱۷} بسیار بالا متصل می‌شوند [۲۳]. آنتامرها مزایای زیادی در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها دارند، این مولکول‌ها در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها کوچک‌ترند، به‌سادگی با SELEX^{۱۸} تهیه می‌شوند [۲۴] و دارای اهداف گسترده‌تری در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها که باید اهدافشان ایمونوزنیک باشد، هستند. به علاوه، ارزان بوده و به‌سادگی بعد از دناتوراسیون دوباره رناتوره می‌شوند؛ درحالی‌که رناتوراسیون پروتئین به سبب طبیعت پروتئینی‌اش دشوار است [۲۵]. به دلیل مزایای فوق، در این مطالعه از آنتامر ویژه cTnI استفاده شد.

1. Recognition elements
2. Affinity
3. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
4. Light emitting diodes

5. Coupling
6. Localized surface plasmon resonance
7. Metal enhancement fluorescence
8. Quenching

9. Gold Nano Rod
10. Cetyltrimethylammonium bromide
11. Dithiothreitol

12. 1-1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
13. Hydroxy-2, 3-dioxypyrrolidine-3-sulfonic acid sodium salt
14. Characterization

سنتر نانومیله‌های طلا

نانومیله‌های طلا از طریق روش رشد دانه، مطابق با روش توحیدی مقدم و همکاران سنتز شد [۳۸].

آماده‌سازی و تخلیص نانومیله طلا-الیگونوکلتوتید تیوله

زیست‌مزدوج^۲

نانومیله‌های طلا با توالی‌های الیگونوکلتوتیدی تیوله شده در انتهای (۵)، اتصال‌دهنده ۲ (L_۲)، بر اساس روش عزیز و همکاران ترکیب شدند [۳۹] (شکل ۱-الف). نانومیله‌های طلای زیست‌مزدوج از الیگونوکلتوتیدهای آزاد تیوله، با کمک سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه جدا شدند و رسوب در ۲۵۰ μL بافر فسفات حل گردید.

آماده‌سازی و تخلیص نقاط کوانتومی الیگونوکلتوتید

آمینه زیست‌مزدوج

نقاط کوانتومی با توالی‌های الیگونوکلتوتیدی آمینه در انتهای (۳)، اتصال‌دهنده ۱ (L_۱)، از طریق تشکیل پیوند آمیدی با کمک واکنشگرهای EDC و Sulfo-NHS بر اساس روش توصیفی Wu و همکاران ترکیب شدند [۴۰] (شکل ۱-ب). نقاط کوانتومی زیست‌مزدوج با کمک سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه تخلیص شدند. رسوب زردرنگ در ۲۵۰ μL بافر فسفات حل گردید.

تشکیل و تخلیص سامانه هیبرید پلاگزیتونیک

به‌طور خلاصه، ۲۵۰ μL نانومیله طلا زیست‌مزدوج و ۲۵۰ μL نقاط کوانتومی زیست‌مزدوج به‌دست‌آمده از مرحله قبل، با یکدیگر مخلوط شدند؛ سپس آپتامر (۵ μM) به آن افزوده شد. این محلول جهت تشکیل سامانه هیبرید پلاگزیتونیک RQ، در ترموبلاک قرار گرفت (شکل ۱-ج). برای تخلیص، سامانه هیبرید پلاگزیتونیک در دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب قهوه‌ای‌رنگ به‌دست‌آمده در ۵۰۰ μL بافر فسفات حل شد. در ادامه به مدت ۲ دقیقه با کمک حمام فراصوت، پخش انجام شد و سپس تا زمان استفاده، در دمای ۴۰°C نگهداری شد. بزاق با کمک روش توصیفی توسط میرزاده و همکاران جمع‌آوری شد [۱۸]. در ابتدا، دهان با آب شسته شد. در ادامه بزاق بعد از ۵ دقیقه بدون حرکت دادن زبان یا صحبت کردن، در میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری جمع‌آوری شد.

توزیع نانومیله‌های طلا و تخمین اندازه هیدرودینامیک نانومیله‌های طلا و نانومیله‌های طلای زیست‌مزدوج، با استفاده از روش پراکنش نوری پویا (DLS) (مالورن زتا نانسایزر ZS، آمریکا) انجام شد. پیش از آنالیز DLS، نمونه‌ها با کمک پالایه ۰/۲ μm پالایه شدند. نانومیله‌های طلا و نقاط کوانتومی، قبل و بعد از فرآیند زیست‌مزدوج، با کمک دستگاه طیف‌سنج مرئی-فرابنفش (طیف‌سنج Agilent Technologies Cary، آمریکا) در محدوده مرئی-فرابنفش مورد مطالعه قرار گرفتند. طیف‌سنجی فلورسانس با استفاده از دستگاه فلئورومتر تک بیم (Perkin Elmer، آمریکا) انجام شد. مطالعه فلورسانس سامانه هیبرید پلاگزیتونیک RQ، در مقایسه با نقاط کوانتومی زیست‌مزدوج، در دامنه طول موجی تهییجی ۶۰۰-۲۲۰ نانومتر صورت پذیرفت. هم‌چنین، سینتیک سامانه هیبرید پلاگزیتونیک RQ مورد مطالعه قرار گرفت. به علاوه، پاسخ سامانه هیبرید پلاگزیتونیک، در غلظت‌های مختلف cTnI، در بزاق مورد سنجش قرار گرفت. در ادامه اختصاصیت حسگر در حضور cTnI و لیزوزیم به عنوان کنترل، در بافر فسفات مورد بررسی قرار گرفت.

روش آزمایش

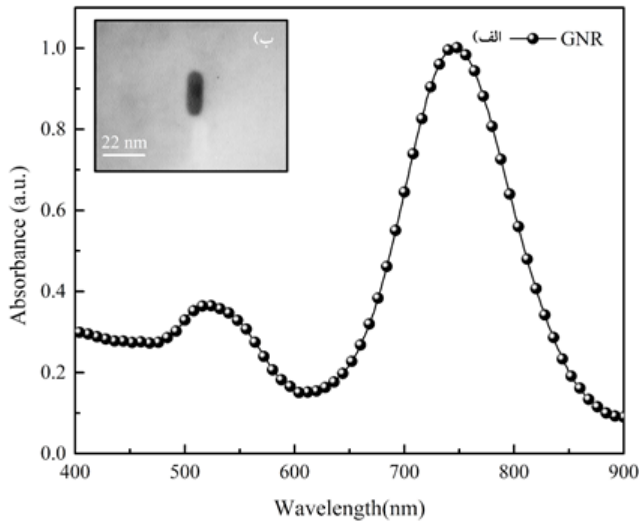
طراحی توالی تک‌رشته الیگونوکلتوتیدی

توالی آپتامر برحسب cTnI از ثبت اختراع آمریکا Changill Ban در سال ۲۰۱۲ [۳۶] انتخاب شد و با کمک وب سرور Mfold مورد بررسی قرار گرفت [۳۷]. دو توالی کوتاه ۹-بازی الیگونوکلتوتیدی، در دو انتهای آپتامر قرار گرفتند، به‌گونه‌ای که این توالی‌ها نه با یکدیگر و نه با آپتامر، تشکیل جفت نمی‌دادند. به علاوه، دو توالی ۹-بازی کوتاه الیگونوکلتوتیدی دیگر (L_۱، L_۲)، اتصال‌دهنده‌های مکمل با انتهای عامل‌دار ویژه، طراحی شدند. توالی‌های الیگونوکلتوتیدی در جدول ۱ آورده شده است.

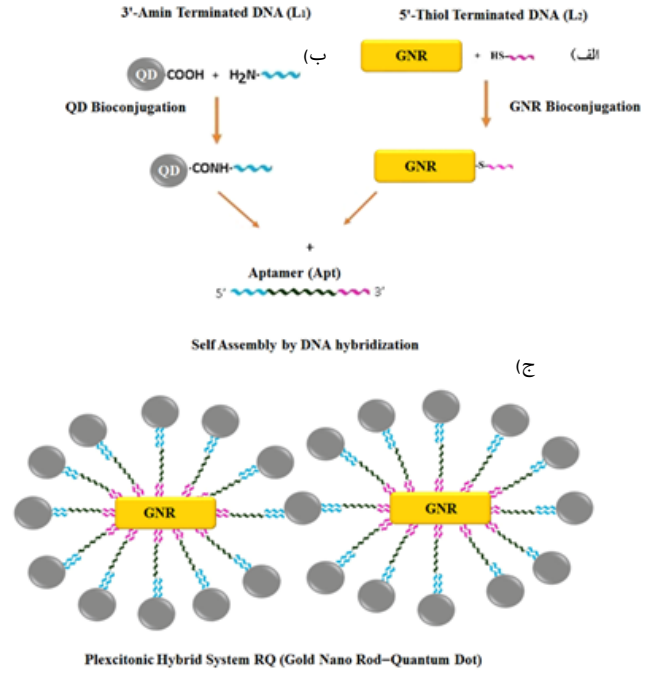
جدول ۱ | توالی آپتامر و الیگونوکلتوتیدهای اتصال‌دهنده L_۱ و L_۲

نام	توالی (۳'-۵')
A	ACCACCACCCGCATGCCAAACGTTGCCTCATAGTTCCTCC
pt	CGTGTCTTCTCTTC
L _۱	GGTGGTGGT - C۶ Amine
L _۲	Thiol-GAAGAAGAA

لازم به ذکر است که حساسیت نوسان‌های پلاسمون‌های سطحی موضعی نانومیله‌های طلا به تغییرات اندک در ضریب شکست محیط اطراف، به علت انجام فرآیند زیست‌مزدوج است [۴۱].



شکل ۲ الف طیف‌سنجی مرئی - فرابنفش نانومیله‌های طلای سنتز شده (GNRs)، (ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانومیله‌ی طلا.

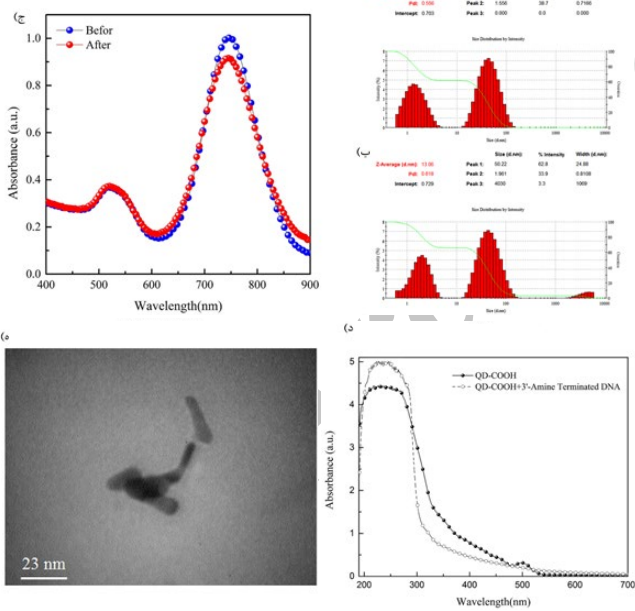


شکل ۱ الف تصویر شماتیک تشکیل سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک. (الف) فرآیند زیست‌مزدوج نانومیله‌های طلا (GNRs)، (ب) فرآیند زیست‌مزدوج نقاط کوانتومی (QDs)، (ج) خودسامان‌دهی سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک (GNR-QD).

۳ نتایج و بحث آنالیزهای توصیفی

شکل (۲-الف) طیف جذب برحسب طول موج نانومیله‌های طلا سنتز شده را نشان می‌دهد. با توجه به شکل، دو باند جذبی عرضی و طولی نوسان‌های پلاسمون‌های موضعی سطحی، مربوط به نانومیله‌های طلا، به ترتیب در ۵۲۱ nm و ۷۴۱ nm دیده می‌شوند. بر اساس تصاویر به دست آمده از TEM (شکل ۲-ب) نسبت ابعاد نانومیله‌های طلا با توزیع همگون ۳/۳ تخمین زده می‌شود (۷ پهنای و ۲۲ طول).

آنالیز DLS نشان داد که نانومیله‌های طلا، نانوذراتی با اندازه همگون و با یک اندازه نسبی مناسب هستند (شکل ۳-الف) و اندازه هیدرودینامیک نانومیله‌های طلا در اثر فرآیند زیست‌مزدوج افزایش یافته است (شکل ۳-ب). به علاوه در شکل (۳-ج) مشاهده می‌شود که بیشینه جذب نوسان‌های پلاسمون‌های سطحی موضعی طولی (۷۴۱ نانومتر) در اثر فرآیند زیست‌مزدوج نانومیله‌های طلا با الیگونوکلئوتید تیوله در انتهای (۵ کاهش یافته است. به عبارت دیگر این رخداد نشان‌دهنده میان‌کنش بیش‌تر سطح طولی نانومیله‌های طلا در مقایسه با سطح عرضی آن‌ها است.



شکل ۳ الف آنالیزهای نانومیله‌های طلا قبل و بعد از فرآیند زیست‌مزدوج، (الف و ب) DLS، (ج) طیف UV-Vis نانومیله‌های طلا زیست‌مزدوج شده با الیگونوکلئوتیدهای تیوله در انتهای ۵- (د) طیف UV-Vis نقاط کوانتومی زیست‌مزدوج شده با الیگونوکلئوتیدهای آمینه در انتهای ۳- (ه) TEM هیبرید پلاگزیوتونیک ساخته شده از نانومیله‌های طلا و نقاط کوانتومی

بایستی توجه داشت که برای انتخاب مناسب‌ترین طول موج تهیه‌ی در مطالعه ساختارهای وابسته به نقاط کوانتومی پوسته / هسته که در این تحقیق به صورت سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک RQ می‌باشند، بایستی این سامانه‌ها در تمام دامنه طول موجی تهیه‌ی شان مورد بررسی قرار گیرند.

طیف‌های شدت فلورسانس برحسب طول موج سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک RQ در محدوده طول موجی تهیه‌ی ۶۰۰-۲۲۰ نانومتر در شکل ۵ نشان داده شده است. تغییرات مشاهده شده در طیف‌ها وابسته به تشکیل سامانه هیبرید نقاط کوانتومی- نانومیله طلا است که در آن نوسان‌های پلاسمون‌های سطحی موضعی نانومیله‌های طلا با اگزایتون نقاط کوانتومی جفت شده و در نتیجه اپتیک نقاط کوانتومی را به طور معناداری تغییر داده است [۲۶]. هم‌چنین باعث افزایش فوق‌العاده حساسیت سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک RQ به تغییرات کوچک در ثابت دی‌الکتریک محیط اطراف این سامانه شده است [۲۶] و RQ را برای اهداف حسگری مناسب می‌سازد [۳۰]. در این تحقیق تهیه‌ی در طول موج ۲۲۰ نانومتر (شکل ۵-الف) به دلیل شدت فلورسانس مناسب، برای مطالعه پاسخ فلورسانس نانوزیست حسگر انتخاب گردید.

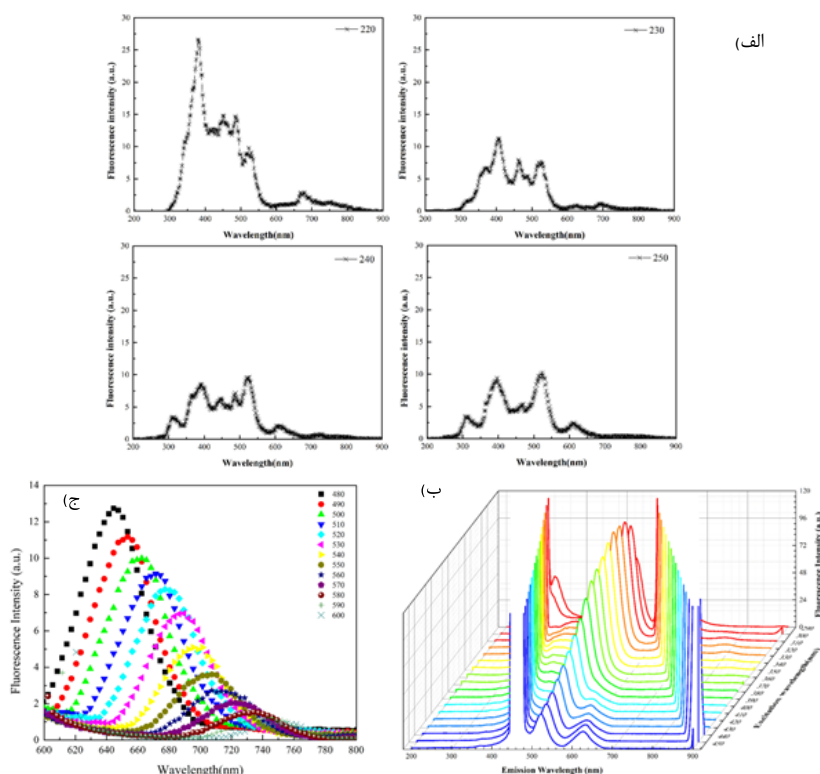
سینتیک نانوزیست حسگر

قبل از مطالعه پاسخ نانوزیست حسگر به cTnI، سینتیک حسگر مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل (۶-الف) شدت فلورسانس را برحسب زمان نشان می‌دهد، نتیجه به دست آمده بیان‌گر این است که حسگر از یک پاسخ بسیار سریع برخوردار است و در مقیاس ثانیه هیچ سینتیکی نشان نمی‌دهد و در مرحله ایستایی^۲ قرار دارد. تمامی اندازه‌گیری‌های شدت فلورسانس در ۳۰ ثانیه بعد از افزودن نشانگر زیستی ثبت شد.

شکل (۳-د) طیف جذب برحسب طول موج نقاط کوانتومی را قبل و بعد از فرآیند زیست‌مزدوج نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود بعد از فرآیند زیست‌مزدوج نقاط کوانتومی با الیگونوکلئوتیدهای آمینه در انتهای^۳، افزایش و کاهش جذب به ترتیب در محدوده طول موجی ۳۰۰-۱۹۰ نانومتر و ۵۰۰-۳۰۰ نانومتر مشاهده می‌شود. در اثر فرآیند زیست‌مزدوج با توالی اتصال‌دهنده، سطوح متفاوت HOMO-LUMO نوکلئوبازهای الیگونوکلئوتیدی با حالت‌های اگزایتونیک نقاط کوانتومی جفت شده و منجر به انتقال انرژی-بار می‌گردند؛ بنابراین این انتقال انرژی-بار می‌تواند منجر به تغییر در طیف جذبی شود [۴۲]. شکل (۳-ه) تصویر TEM را نشان می‌دهد که حاکی از شکل‌گیری سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک RQ می‌باشد.

طیف‌سنجی فلورسانس سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک RQ

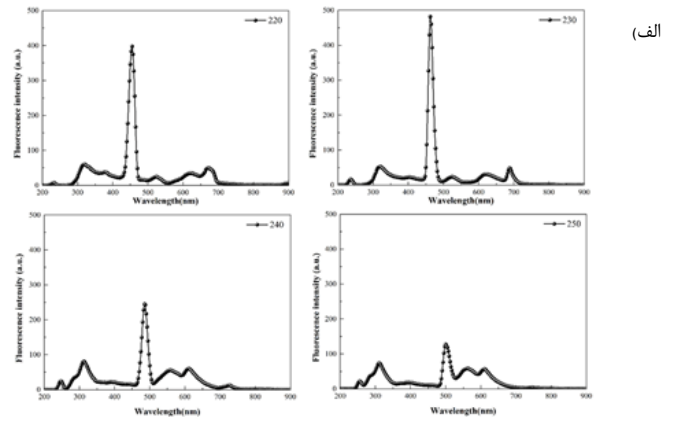
شکل‌های ۴ طیف‌های شدت فلورسانس برحسب طول موج نقاط کوانتومی زیست‌مزدوج با الیگونوکلئوتید، در محدوده طول موجی تهیه‌ی ۶۰۰-۲۲۰ نانومتر را نشان می‌دهند که حاکی از این است که نقاط کوانتومی دارای فاصله پیوندی قابل تنظیم^۱ در محدوده وسیعی از سطوح انرژی هستند. به عبارت دیگر، نقاط کوانتومی قابلیت تهیه و نشر در دامنه وسیعی از طول موج‌ها را نشان می‌دهند که به صورت دامنه‌های مجزا در اشکال الف، ب و ج نشان داده شده است.



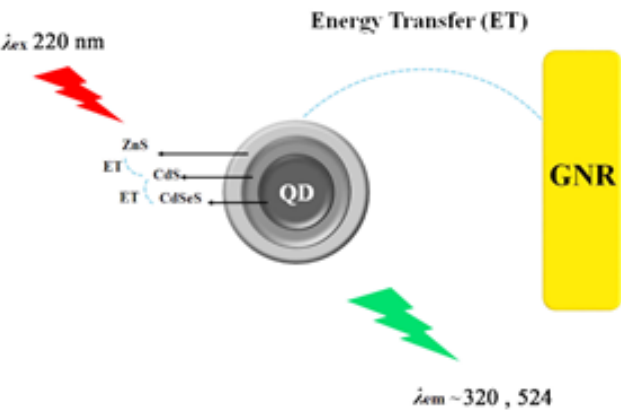
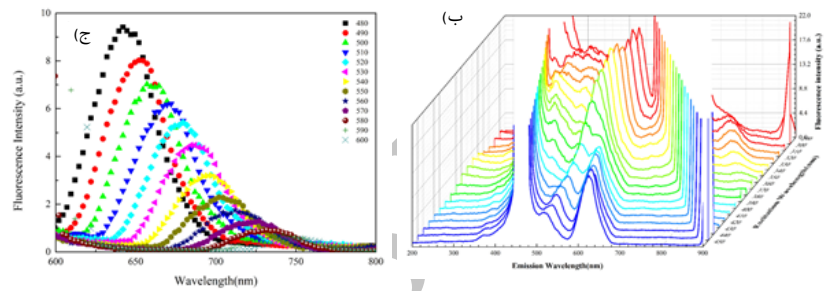
شکل ۴ الف) فلورسانس نقاط کوانتومی زیست‌مزدوج در ۲۵۰-۲۲۰ nm exc. (ب) فلورسانس نقاط کوانتومی زیست‌مزدوج در ۴۶۰-۲۹۰ nm exc. (ج) فلورسانس نقاط کوانتومی زیست‌مزدوج در ۶۰۰-۴۸۰ nm exc.

پاسخ نانوزیست حسگر به پروتئین هدف

حسگر در حضور غلظت‌های افزایشی cTnI در بزاق، افزایش در شدت فلورسانس سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک از خود نشان می‌دهد که از یک رابطه خطی پیروی می‌کند (شکل ۶-ب). این افزایش ممکن است به دلیل پدیده تشدید فلورسانس فلزی باشد که از طریق مکانیسم انتقال انرژی رزونانس فلورسانس (FRET) (شکل ۷) رخ می‌دهد [۳۱].

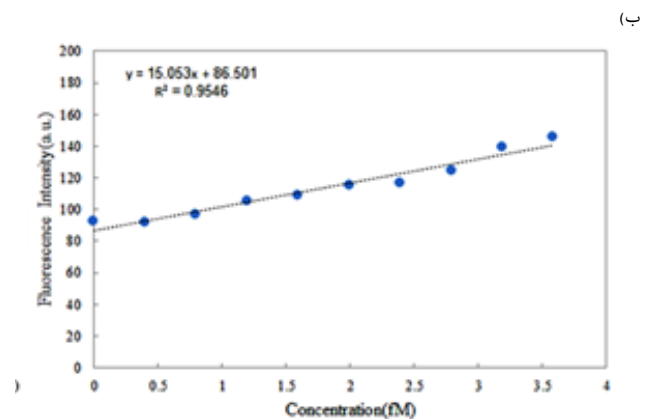
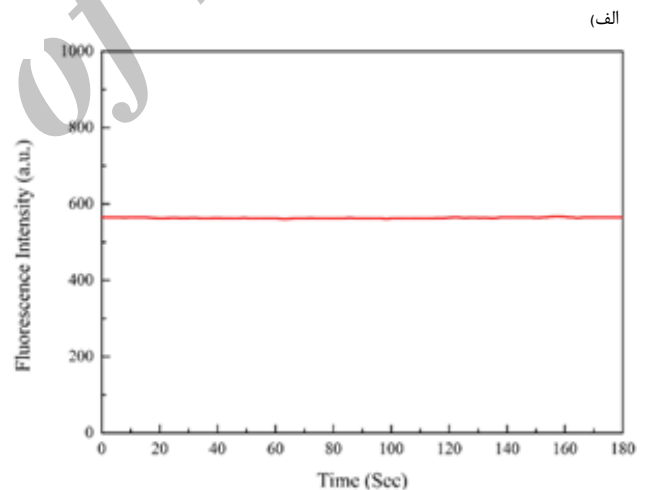


شکل ۵ الف فلورسانس سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک RQ در ۲۲۰-۲۵۰ nm exc. (ب) فلورسانس سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک RQ در ۲۹۰-۴۶۰ nm exc. (ج) فلورسانس سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک RQ در ۴۸۰-۶۰۰ nm exc.



شکل ۶ شماتیک انتقال انرژی بین بخش‌های مختلف سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک RQ.

نقاط کوانتومی از سه لایه تشکیل شده است: هسته CdSeS، پوسته داخلی CdS و پوسته بیرونی ZnS و ZnCdS؛ که به ترتیب نزدیک انرژی فاصله پیوندی ZnS (۳/۶ eV) و CdS (۲/۴ eV) هستند (جدول ۲).



شکل ۶ الف مطالعه سینتیک سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک RQ ساخته شده از نانومیله‌های طلا (GNRs) و نقاط کوانتومی (QDs). (ب) مطالعه سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک در غلظت‌های مختلف cTnI در بزاق که پاسخ حسگر RQ در طول موج نشری ۳۲۰ نانومتر ثبت شد.

جدول ۲ خلاصه ی ویژگی های اجزای سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک

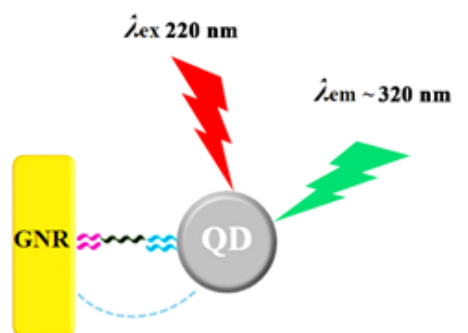
GNR	RQ plexcitonic hybrid system		QD	
	$\lambda_{Em}(nm)$	$\lambda_{Ex}(nm)$	فاصله پیوندی $\lambda(nm)$	انرژی فاصله پیوندی (eV)
	۳۲۰	۲۲۰	~۳۴۴/۴۰۰	~۳/۶۰
۵۲۱	۵۲۴	۳۲۰	~۵۱۲/۳۳۳	~۲/۴۲
۷۴۱	۶۷۳	۲۲۰	~۷۱۶/۶۷۰	~۱/۷۳

هم چنین حد تشخیص (LOD) این حسگر بر اساس روش محاسبه ارائه شده اتحادیه بین المللی شیمی محض و کاربردی [۴۳]، ۰/۵ فمتومولار محاسبه شد. با توجه به حد تشخیص زیست حسگر که در محدوده فمتومولار است، به نظر می رسد که این کار دارای پایین ترین حد تشخیص تاکنون است (جدول ۳ برگرفته از مقاله مروری Fathil و همکاران [۴۴]).

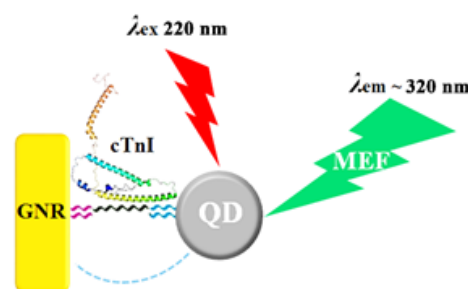
جدول ۳ مقایسه میان زیست حسگرهای cTnI (برگرفته از مقاله مروری Fathil و همکاران [۴۴])

حد تشخیص	عامل شناسایی کننده	نوع زیست حسگر
۸۳۳۰	آنتی بادی	Functionalized SnO ₂ nanobelt FETs
۷۹۱۷۰	آنتی بادی	ELISA
۵۸۳۳۰	آنتی بادی	Fiber-optic-based SPR sensor
۴۹۷۴۰	آپتامر	Aptamer-based biosensor
۱۰۴۲۰	آنتی بادی	Optical-based-SPR
۴۱۷۰	آنتی بادی	Fluoro-microbead guiding chip (FMGC)
۳۸۳۰	آنتی بادی	SiNW FETs CMOS
۱۱۳۰	آنتی بادی	Chemiluminometric EOC
۴۱۶/۶۷	آنتی بادی	PDMS-gold nano particle composite film
۱۲۵	آنتی بادی	Mitsubishi PATHFAST
۱۰/۴۲	آنتی بادی	Single PANI nanowire
~۴/۱۷	آنتی بادی	Monolithic graphene sheet
۰/۵ این مقاله	آپتامر	Gold Nano Rod-Quantum Dots plexcitonic

بنابراین، پدیده بسیار جالبی در سامانه هیبرید RQ روی می دهد که می تواند در λ_{220} و λ_{320} تهییج شود. به علاوه، تهییج در λ_{220} می تواند منجر به نشر در λ_{320} و λ_{524} شود (شکل ۵-الف) که با λ_{Ex} نوسان های پلاسمون سطحی موضعی عرضی نانومیله های طلا در λ_{521} هم پوشانی دارد؛ بنابراین به دلیل این هم پوشانی ها میان طول موج تهییج و نشر نقاط کوانتومی و نانومیله های طلا، انتقال انرژی بین لایه های مختلف نقاط کوانتومی و نانومیله های طلا رخ می دهد که می تواند منجر به تشدید فلورسانس فلزی و افزایش حساسیت سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک RQ در پی اتصال cTnI به آپتامر هدف گردد (شکل ۸).



Energy Transfer (ET)



Energy Transfer (ET)

مشخصه حسگر

مشخصه حسگر نیز در حضور نشانگر زیستی cTnI و لیزوزیم به عنوان پروتئین کنترل مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج کسب شده به صورت شدت فلورسانس بر حسب طول موج در شکل ۹ مشاهده می شود. نتایج نشان می دهند که حسگر پاسخ اختصاصی به پروتئین هدف دارد. از آنجایی که آپتامر ویژه cTnI است، لذا منجر به برهم کنش های مشابه با اتصال آنتی بادی-آنتی ژن می گردد.

شکل ۸ شماتیک مکانیسم احتمالی افزایش شدت فلورسانس حسگر RQ در حضور cTnI.

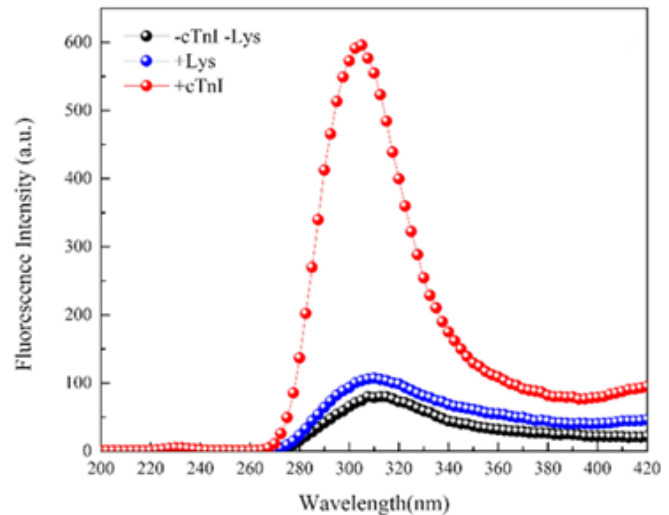
و بیمار با کمک آزمون‌های آماری، تکرارپذیری، صحت و دقت نانوزیست‌حسگر در جمعیت به دست آید.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس برای پشتیبانی مالی تشکر و قدردانی می‌شود.

مراجع

- [1] "World Health Organization. The top 10 causes of death," <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en>, May 8, 2015.
- [2] J. A. Ambrose, and M. Singh, "Pathophysiology of coronary artery disease leading to acute coronary syndromes," F1000Prime. Rep., vol. 7, pp. 08, 2015.
- [3] V. Singh, P. Martinezclark, M. Pascual, E. S. Shaw, and W. W. O'Neill, "Cardiac biomarkers - the old and the new: a review," Coron. Artery Dis., vol. 21, no. 4, pp. 244-256, 2010.
- [4] M. A. Daubert, and A. Jeremias, "The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings," Vasc. Health Risk Manage., vol. 6, pp. 691-699, 2010.
- [5] D. Chan, and L. L. Ng, "Biomarkers in acute myocardial infarction," BMC Med., vol. 8, pp. 34, 2010.
- [6] S. Sharma, P. G. Jackson, and J. Makan, "Cardiac troponins," J. Clin. Pathol., vol. 57, no. 10, pp. 1025-1026, 2004.
- [7] T. Schreier, L. Kedes, and R. Gahlmann, "Cloning, structural analysis, and expression of the human slow twitch skeletal muscle/cardiac troponin C gene," J. Biol. Chem., vol. 265, no. 34, pp. 21247-21253, 1990.
- [8] J. G. Schwartz, T. J. Prihoda, J. H. Stuckey, C. L. Gage, and M. L. Darnell, "Creatine kinase MB in cases of skeletal muscle trauma," Clin. Chem., vol. 34, no. 5, pp. 898-90, 1988.
- [9] S. Hasić, E. Kiseljaković, R. Jadrić, J. Radovanović, and M. Winterhalter-Jadrić, "Cardiac troponin I: the gold standard in acute myocardial infarction diagnosis," Bosnian J. Basic Med. Sci., vol. 3, no. 3, pp. 41-44, 2003.



شکل ۹ | مشخصه حسگر

۴ نتیجه‌گیری

در پایان بایستی اشاره کرد که در این پژوهش یک سامانه هیبرید پلاگزیوتونیک جدید که از نانومیله طلا-نقاط کوانتومی ساخته شده است و بر پایه آپتامر عمل می‌کند، برای شناسایی cTnI معرفی شده است که می‌تواند cTnI را در بزاق به سرعت شناسایی کند. این چهارچوب جدید می‌تواند پنجره جدیدی را به سوی فرصت‌های تازه برای توسعه طراحی و ساخت نانوزیست‌حسگرها در حوزه نانوزیست‌فناوری باز کند.

در روش‌های مرجع کنونی و متداول همچون ELISA حد تشخیص همان‌طور که در جدول ۳ اشاره شده بالا است. از طرف دیگر در آزمون‌های متداول، پروتئین تروپونین قلبی و CK-MB که برای سکتة حاد قلبی اختصاصی نیستند اندازه‌گیری می‌شوند. در این تحقیق حد استاندارد اندازه‌گیری پروتئین تروپونین I قلبی که نشانگر اختصاصی سکتة حاد قلبی است بهبود داده شده است و به حد تشخیص ۰/۵ فمتومولار رسیده است که نسبت به روش‌های متداول و مرجع کنونی جهش بسیار بالایی یافته است.

هم‌چنین آزمایش‌های پیش‌بالینی با موفقیت بر روی بزاق انجام شده است؛ لیکن بایستی در نظر داشت که برای کاربردهای بالینی نانوزیست‌حسگر جدید، از آنجایی که مطالعات اندکی بر روی cTnI در بزاق بیماران با سکتة حاد قلبی انجام شده است، پیشنهاد می‌شود که بررسی‌های پیش-بالینی و بالینی گسترده‌ای با کمک این نانوزیست‌حسگر جدید انجام شود. به ویژه برای تعیین نقطه حد پایین cTnI در بزاق بر روی جمعیت‌های سالم

- [10] Y. Kim, H. Kim, S.-Y. Kim, H. K. Lee, H. J. Kwon, Y. G. Kim, J. Lee, H. M. Kim, and B. H. So, "Automated heart-type fatty acid-binding protein assay for the early diagnosis of acute myocardial infarction," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 134, no. 1, pp. 157-162, 2010.
- [11] Y. U. Budak, K. Huysal, M. Bulut, and M. Polat, "Evaluation in an emergency department of rapid separator tubes containing thrombin for serum preparation prior to hs-cTnT and CK-MB analyses," *BMC Clin. Pathol.*, vol. 13, pp. 20, 2013.
- [12] P. O. Collinson, D. C. Gaze, F. Morris, B. Morris, A. Price, and S. Goodacre, "Comparison of biomarker strategies for rapid rule out of myocardial infarction in the emergency department using ACC/ESC diagnostic criteria," *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 43, no. 4, pp. 273-280, 2006.
- [13] A. S. Jaffe, L. Babuin, and F. S. Apple, "Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 1-11, 2006.
- A. Qureshi, Y. Gurbuz, and J. H. Ni- [14] azi, "Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review," *Sens. Actuators, B*, vol. 171-172, no. 2012, pp. 62-67, 2012.
- [15] K. Tataris, S. Kivlehan, and P. Govindarajan, "National Trends in the Utilization of Emergency Medical Services for Acute Myocardial Infarction and Stroke," *West. J. Emerg. Med.*, vol. 15, no. 7, pp. 744-748, 2014.
- [16] R. S. P. Malon, S. Sadir, M. Balakrishnan, and E. P. Córcoles, "Saliva-based biosensors: noninvasive monitoring tool for clinical diagnostics," *BioMed. Res. Int.*, vol. 2014, pp. 962903, 2014.
- [17] F. Wei, and D. T. W. Wong, "Point-of-care platforms for salivary diagnostics," *Chin. J. Dent. Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 7-15, 2012.
- [18] I. Mirzaii-Dizgah, and E. Riahi, "Salivary troponin I as an indicator of myocardial infarction," *Indian J. Med. Res.*, vol. 138, no. 6, pp. 861-865, 2013.
- [19] M. A. A. Rahim, Z. H. A. Rahim, W. A. W. Ahmad, and O. H. Hashim, "Can saliva proteins be used to predict the onset of acute myocardial infarction among high-risk patients?," *Int. J. Med. Sci.*, vol. 12, no. 4, pp. 329-335, 2015.
- [20] G. H. Carpenter, "The secretion, components, and properties of saliva," *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, vol. 4, pp. 267-276, 2013.
- [21] P. D. V. de Almeida, A. M. T. Grégio, M. A. N. Machado, A. A. S. de Lima, and L. R. Azevedo, "Saliva composition and functions: a comprehensive review," *J. Contemp. Dent. Pract.*, vol. 9, no. 3, pp. 72-80, 2008.
- [22] J. P. Chambers, B. P. Arulanandam, L. L. Matta, A. Weis, and J. J. Valdes, "Biosensor recognition elements," *Curr. Issues Mol. Biol.*, vol. 10, no. 1-2, pp. 1-12, 2008.
- [23] G. Mayer, "The chemical biology of aptamers," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48, no. 15, pp. 2672-2689, 2009.
- [24] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strohrieglitz, "SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands," *Biomol. Eng.*, vol. 24, no. 4, pp. 381-403, 2007.
- [25] A. Ozer, J. M. Pagano, and J. T. Lis, "New Technologies Provide Quantum Changes in the Scale, Speed, and Success of SELEX Methods and Aptamer Characterization," *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 3, no. 4, pp. e183, 2014.
- [26] A. Hatef, S. M. Sadeghi, É. Boulais, and M. Meunier, "Quantum dot-metallic nanorod sensors via exciton-plasmon interaction," *Nanotechnology*, vol. 24, no. 1, pp. 015502, 2013.
- [27] S. M. Sadeghi, A. Hatef, and M. Meunier, "Quantum detection and ranging using exciton-plasmon coupling in coherent nanoantennas," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 102, no. 20, pp. 203113, 2013.
- [28] J. Chen, Q. Huang, Q. G. Du, D. Zhao, F. Xu, J. Pan, W. Lei, and A. Nathan, "Localized surface plasmon resonance enhanced quantum dot light-emitting diodes via quantum dot-capped gold nanoparticles," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 101, pp. 57574-57579, 2014.

- [29] N. K. Pathak, A. Ji, and R. P. Sharma, "Study of efficiency enhancement in layered geometry of excitonic-plasmonic solar cell," *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.*, vol. 115, no. 4, pp. 1445-1450, 2013.
- [30] A. Hatef, S. M. Sadeghi, S. Fortin-Deschênes, E. Boulais, and M. Meunier, "Coherently-enabled environmental control of optics and energy transfer pathways of hybrid quantum dot-metallic nanoparticle systems," *Opt. Express*, vol. 21, no. 5, pp. 5643-5653, 2013.
- [31] J. C. Bian, F. Yang, Z. Li, J. L. Zeng, X. W. Zhang, Z. D. Chen, J. Z. Y. Tan, R. Q. Peng, H. Y. He, and J. Wang, "Mechanisms in photoluminescence enhancement of ZnO nanorod arrays by the localized surface plasmons of Ag nanoparticles," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, no. 22, pp. 8548-8551, 2012.
- [32] T. Pons, I. L. Medintz, K. E. Sapsford, S. Higashiya, A. F. Grimes, D. S. English, and H. Mattoussi, "On the quenching of semiconductor quantum dot photoluminescence by proximal gold nanoparticles," *Nano Lett.*, vol. 7, no. 10, pp. 3157-3164, 2007.
- [33] P. Viste, J. Plain, R. Jaffiol, A. Vial, P. M. Adam, and P. Royer, "Enhancement and quenching regimes in metal-semiconductor hybrid optical nanosources," *ACS Nano*, vol. 4, no. 2, pp. 759-764, 2010.
- [34] Q. Wang, H. Wang, C. Lin, J. Sharma, S. Zou, and Y. Liu, "Photonic interaction between quantum dots and gold nanoparticles in discrete nanostructures through DNA directed self-assembly," *Chem. Commun.*, vol. 46, no. 2, pp. 240-242, 2010.
- [35] Y. Q. Li, L. Y. Guan, H. L. Zhang, J. Chen, S. Lin, Z. Y. Ma, and Y. D. Zhao, "Distance-dependent metal-enhanced quantum dots fluorescence analysis in solution by capillary electrophoresis and its application to DNA detection," *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 11, pp. 4103-4109, 2011.
- [36] C. Ban, K. M. Song, and W. Jeong, U.S. Patent 8 404 448, 2012 [DNA aptamer specifically binding to human cardiac troponin I.]
- [37] M. Zuker, "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 13, pp. 3406-3415, 2003.
- [38] T. T. Moghadam, B. Ranjbar, K. Khajeh, S. M. Etehad, K. Khalifeh, and M. R. Ganjalikhany, "Interaction of lysozyme with gold nanorods: conformation and activity investigations," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 49, no. 4, pp. 629-636, 2011.
- [39] A. Azizi, B. Ranjbar, T. T. Moghadam, and Z. Bagheri, "Plasmonic Circular Dichroism Study of DNA-Gold Nanoparticles Bioconjugates," *Plasmonics*, vol. 9, no. 2, pp. 273-281, 2013.
- [40] C. S. Wu, J. M. Cupps, and X. Fan, "Compact quantum dot probes for rapid and sensitive DNA detection using highly efficient fluorescence resonant energy transfer," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 30, pp. 305502-305529, 2009.
- [41] J. N. Anker, W. P. Hall, O. Lyandres, N. C. Shah, J. Zhao, and R. P. Van Duyne, "Biosensing with plasmonic nanosensors," *Nat. Mater.*, vol. 7, no. 6, pp. 442-453, 2008.
- [42] S. M. Goodman, V. Singh, J. C. Ribot, A. Chatterjee, and P. Nagpal, "Multiple Energy Exciton Shelves in Quantum-Dot-DNA Nanobioelectronics," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 5, no. 21, pp. 3909-3913, 2014.
- [43] M. Ramezani, N. Mohammad Danesh, P. Lavaee, K. Abnous, and S. Mohammad Taghdisi, "A novel colorimetric triple-helix molecular switch aptasensor for ultrasensitive detection of tetracycline," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 70, pp. 181-187, 2015.
- [44] M. F. M. Fathil, M. K. Md Arshad, S. C. B. Gopinath, U. Hashim, R. Adzhri, R. M. Ayub, A. R. Ruslinda, M. Nuzaihan M N, A. H. Azman, M. Zaki, and T. H. Tang, "Diagnostics on acute myocardial infarction: Cardiac troponin biomarkers," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 70, pp. 209-220, 2015.

Ultra-Sensitive, Rapid Gold Nano Rod-Quantum Dot (RQ) Plexcitonic Self-Assembled Aptamer-based Nanobiosensor for the Detection of Human Cardiac Troponin I

Z. Rezaei¹ | B. Ranjbar^{1,2}

1.Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2.Departments of Biophysics and Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Abstract

Acute Myocardial Infarction (AMI) is one of the leading causes of death throughout the world. Usual methods for detecting AMI are expensive, time-consuming and using blood samples as biological samples. Therefore, creating an ultra-fast, sensitive and non-invasive diagnostic test is necessary. Herein, a novel ultra-sensitive, fluorescent, plasmon-exciton coupling hybrid of a Gold Nano Rod-Quantum Dot (RQ)-based aptamer nanobiosensor is presented for the detection of human cardiac troponin I (cTnI), the golden biomarker of AMI, and a preclinical test is performed with saliva. The binding of the cTnI protein to aptamer leads to a fluorescence enhancement of the plexcitonic hybrid system. The limit of detection of this nanobiosensor is 0.5 fM. It seems this novel nanobiosensor of the RQ plexcitonic hybrid system can open up new opportunities for the design and fabrication of nanobiosensor progress in nanobiotechnology.

Keywords

Acute Myocardial Infarction, Aptamer, Gold Nano Particle, Human Cardiac Troponin I, Nanobiosensor, Quantum Dot.