



One-step Conjugation Method for Antibodies with CdTe Quantum Dots Using Activated Dextran

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Gheraat M.¹ PhD,
Sajedi R.*¹ PhD,
Jalilian N.¹ PhD,
Shanesaz M.² PhD,
MirShahi M.¹ PhD

How to cite this article

Gheraat M, Sajedi R, Jalilian N, Shanesaz M, MirShahi M. One-step Conjugation Method for Antibodies with CdTe Quantum Dots Using Activated Dextran. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(4):557-564.

¹Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Research Laboratory, Chemical Analysis, Mobin Chemistry Azma Company, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran

Phone: -

Fax: -

sajedi_r@modares.ac.ir

Article History

Received: December 21, 2017

Accepted: March 11, 2018

ePublished: December 21, 2018

ABSTRACT

Aims The use of semiconductor quantum dots (QD) nanoparticles with emission spectrum in the visible region as a marker in immunoassays provides the user with an opportunity to detect the desired agent without using advanced equipment. Accordingly, the aim of this study was to present a one-step conjugation method for antibodies with CdTe quantum dots, using activated dextran.

Materials & Methods In this experimental study, CdTe nanoparticles were synthesized and the transmission electron microscope was used to study the morphology of the synthesized QD of CdTe and the size, concentration, and stability of the synthesized nanoparticles were evaluated. In order to stabilize the nanoparticles synthesized by BSA (Bovine Serum Albumin), they were coated and connected to antibodies with activated dextran. Immunosuppression tests were used to evaluate the conjugated antibodies.

Findings Spot and spherical nature were completely evident in the morphology of nanoparticles. The difference in QD and dBSA-QD displacement from the agarose gel confirmed the formation of dBSA-QD and the same dilution spectrum from nanoparticles was obtained in the presence and absence of BSA. Connecting with dBSA, in addition to maintaining and improving the properties of the nanoparticle's diffusion led to the creation of diverse functional groups for the next steps of nanoparticle connection. The fluorescence emission of nanoparticles was higher in both coated with dBSA and conjugated with antibodies than free nanoparticles. By using antibodies connected to nanoparticles, the detection limit of 30ng for protein antigen was obtained as an eye.

Conclusion In the conjugation process, in order to connect CdTe quantum dots to antibodies via dextran, by coating nanoparticles with a denatured BSA in addition to increasing the stability of nanoparticles, new functional groups are created on the surface of the nanoparticle.

Keywords Conjugation; CdTe Quantum Dots; Activated Dextran; Immunosuppression tests

CITATION LINKS

[1] Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. science [2] Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels [3] Engineering luminescent quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging [4] Highly stable fluorescent nanocrystals as a novel class of labels for immunohistochemical analysis of paraffin-embedded tissue sections [5] Nanotechnology applications in cancer [6] Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells [7] Signal amplification using functional nanomaterials for biosensing [8] Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe₃O₄ nanoparticle aggregates as color reagents [9] Advanced procedures for labeling of antibodies with quantum dots [10] Microwave-assisted synthesis of water-dispersed CdTe nanocrystals with high luminescent efficiency and narrow size distribution [11] Multiplex detection of protease activity with quantum dot nanosensors prepared by intein-mediated specific bioconjugation [12] Creating self-illuminating quantum dot conjugates [13] Review: Biofunctionalized quantum dots in biology and medicine [14] Fluorescent colloidal particles as a detection tools in biotechnology systems [15] Albumin-CdTe nanoparticle bioconjugates: Preparation, structure, and interunit energy transfer with antenna effect [16] Simultaneous and sensitive determination of multiplex chemical residues based on multicolor quantum dot probes [17] Biological applications of quantum dots [18] Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals [19] Luminescent properties of water-soluble denatured bovine serum albumin-coated CdTe quantum dots [20] Stanford: Bio-protocol; 2011 [21] Synthesis of a unique high-performance poly-horseradish peroxidase complex to enhance sensitivity of immunodetection systems [22] A simple and fast synthesis route for preparing CdTe quantum dots in aqueous medium 11th International Conference on Advanced Materials [23] Bioconjugate techniques

روش تک‌مرحله‌ای برای کونژوگاسیون آنتی‌بادی‌ها با کوانتوم‌دات کادمیوم‌تلورید با استفاده از دکستران فعال

مرتضی قرائت PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

رضا حسن ساجدی* PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

نظام جلیلیان PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مریم شانه‌ساز PhD

آزمایشگاه تحقیقاتی شیمی تجزیه، شرکت مبین شیمی آزما، تهران، ایران

منوچهر میرشاهی PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: استفاده از نانوذرات نقاط کوانتومی نیمه‌هادی (QD) با طیف نشری در محدوده مرئی به‌عنوان نشانگر در روش‌های ایمنونواسی، امکان شناسایی عامل مورد نظر را بدون نیاز به تجهیزات خیلی پیشرفته به کاربر می‌دهد. بر همین اساس، هدف پژوهش، ارایه روش تک‌مرحله‌ای برای کونژوگاسیون آنتی‌بادی‌ها با کوانتوم‌دات کادمیوم‌تلورید با استفاده از دکستران فعال بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، نانوذرات کادمیوم‌تلورید (CdTe)، سنتز و از میکروسکوپ الکترونی عبوری برای بررسی مورفولوژی نقاط کوانتومی CdTe سنتز شده استفاده و اندازه، غلظت و پایداری نانوذرات سنتز شده ارزیابی شد. به‌منظور پایداری نمودن نانوذرات سنتز شده با استفاده از BSA (آلبومین سرم گاوی)، پوشش داده و با دکستران فعال به آنتی‌بادی‌ها متصل شدند. برای ارزیابی آنتی‌بادی‌های کونژوگه از آزمون‌های لکه‌گذاری ایمنی استفاده شد.

یافته‌ها: نقطه‌ای و کرووی بودن مورفولوژی نانوذرات کاملاً مشهود بود. اختلاف جابه‌جایی QD و dBSA-QD از روی ژل آگارز، تاییدکننده تشکیل dBSA-QD بود و طیف نشری رقت‌های یکسان از نانوذرات در حضور و عدم حضور BSA به‌دست آمد. اتصال با dBSA علاوه بر باقی‌ماندن و بهتر شدن خصوصیات نشری نانوذره، باعث به‌وجود آمدن گروه‌های عاملی متنوع برای مراحل بعدی اتصال نانوذرات شد. نشر فلئورسانسی نانوذرات در هر دو حالت پوشش‌دار با dBSA و کونژوگه با آنتی‌بادی از نانوذرات آزاد بیشتر بود. با استفاده از آنتی‌بادی‌های متصل شده به نانوذرات، حد تشخیص ۳۰ نانوگرم برای آنتی‌ژن پروتئینی به‌صورت چشمی به دست آمد.

نتیجه‌گیری: در فرآیند کونژوگاسیون به‌منظور اتصال نقاط کوانتومی CdTe به آنتی‌بادی‌ها از طریق دکستران، با پوشاندن سطح نانوذرات با BSA دناتوره شده علاوه بر افزایش پایداری نانوذرات، گروه‌های عاملی جدیدی روی سطح نانوذره به‌وجود می‌آید.

کلیدواژه‌ها: کونژوگاسیون، نقاط کوانتومی کادمیوم‌تلورید، دکستران فعال شده، لکه‌گذاری ایمنی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰

* نویسنده مسئول: sajedi_r@modares.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر، نقاط کوانتومی نیمه‌هادی یا کوانتوم‌دات (QD) از نظر تاثیر آنها در استفاده از تصویربرداری بیولوژیکی، تشخیص و شناسایی پاتوژن‌ها، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند [1-3]. رشد آبی نانوذرات در یک دهه اخیر به‌شدت مورد توجه محققان قرار گرفته است. رشد آبی نانوذرات کادمیوم‌تلورید (CdTe) به واسطه واکنش بین تلوریم فعال شده (HTe⁻) و کادمیوم (Cd²⁺) در حضور تیول‌ها در دمای اتاق انجام می‌شود. سپس افزایش دمای محلول منجر به رشد نانوذرات و تشکیل خوشه‌هایی برای نمونه

کمپلکس Cd₅₄Te₃₂⁻ (SCH₂CH₂OH)₅₂ می‌شود که می‌توان از آن به‌عنوان هسته‌های اولیه نام برد. هر چند شکل دقیق مونومرهای تشکیل‌شده در محیط آبی کاملاً مشخص نیست، ترکیبی از چنین خوشه‌های اولیه و کمپلکس‌های مشتق‌شده از واکنش بین یون‌های HTe⁻ و Cd²⁺ در حضور عامل پوششی را می‌توان به‌عنوان مونومرهای اولیه موجود در محلول نام برد. یکی از مهم‌ترین مزیت‌های روش تولید آبی، جدابودن مرحله هسته‌سازی از رشد نانوذرات است. مرحله اول، شکل‌گیری یا هسته‌سازی و مرحله دوم، رشد به‌وسیله حرارت است [4]. درک بهتر از خواص فیزیکی و شیمیایی نقاط کوانتومی و همچنین بهبود مراحل ساخت این نانوذرات، آنها را به نشانگرهای فلئورسانسی منحصره‌فردی تبدیل کرده است که بر بسیاری از محدودیت‌های نوری فلئوروفورهای آلی غلبه کرده است [5-7]. به‌دلیل خواص منحصره‌فرد از جمله بازده کوانتومی و ضریب خاموشی مولی بالا، پایداری نوری استثنایی، پیک نشری متقارن و گستردگی جذب، استفاده از این نانوذرات در زمینه‌های سنجش ایمنی، در حال توسعه است [8-10] و بازده کوانتومی آنها از بهترین رنگ‌های آلی، حداقل ۲۰ برابر بیشتر است که امکان ردیابی مولکول‌های تکی متصل به QD را فراهم می‌کند.

امروزه بسیاری از کاربردهای بیولوژیکی QDها با شکل‌گیری نانوجست‌وجوگرهایی (nanoprobes) که در آنها آنتی‌بادی‌ها با QDها نشان‌دار شده‌اند، به ورطه ظهور رسیده است. فرآیند اتصال می‌تواند به‌صورت کووالانسی یا غیرکووالانسی باشد [11-14]. در اتصال کووالانسی بین نانوذره QD و آنتی‌بادی معمولاً گروه آمین یا کربوکسیل سطح نانوذره با گروه آمین یا سولفیدریل در آنتی‌بادی واکنش می‌دهد [15]. به‌منظور افزایش شدت و پایداری نوری این نانوذرات، می‌توان سطح خارجی این نانوذرات را با آلبومین سرم گاوی دناتوره شده (dBSA) پوشش داد [16, 17]. اضافه‌کردن dBSA روی سطح نانوذره باعث ظاهر شدن گروه‌های عاملی مختلفی در سطح QD برای اتصال با آنتی‌بادی‌ها می‌شود که این را می‌توان به‌عنوان یک مزیت به حساب آورد، چرا که در غیراین صورت، ایجاد گروه‌های عاملی مختلف روی سطح نانوذره نیازمند واکنش‌های شیمیایی مختلفی است. علاوه بر این در بیشتر واکنش‌های رایج، محدودیت‌هایی از جمله عدم تکرارپذیری و تجمع غیرقابل کنترل نانوذرات وجود دارد [18]. گروه‌های آمین از جمله گروه‌هایی هستند که به‌وجود آوردن آنها در سطح نانوذره مشکلاتی به‌همراه دارد و از پایداری نانوذره می‌کاهد. در این تحقیق، نانوذرات نقاط کوانتومی در محیط آبی سنتز و به‌منظور ایجاد گروه‌های عاملی مختلف و افزایش پایداری و شدت نوری، سطح خارجی نانوذرات با dBSA پوشانده شد. همچنین در این تحقیق، یک روش اتصال جدید بین نانوذره و ماکرومولکول‌ها با استفاده از دکستران فعال شده معرفی شد. در انتها کارکرد صحیح نانوبیوکونژوگه‌های به‌دست‌آمده در لکه‌گذاری ایمنی نشان داده شد. بنابراین هدف پژوهش حاضر، ارایه یک روش تک‌مرحله‌ای برای کونژوگاسیون آنتی‌بادی‌ها با کوانتوم‌دات کادمیوم‌تلورید با استفاده از دکستران فعال بود.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: در این پژوهش تجربی، از تریس، سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS)، کوماسی‌بلو G250 و آگارز (Acros؛ ایالات متحده)، فیلتر سانتریفیوژی ۱۰۰ کیلوالتونی (Pall Life Sciences؛ ایالات متحده)، غشای نیتروسولوز،

سنتز شده استفاده شد. در این پژوهش به موازات نانوذرات سنتز شده از یک نانوذره خریداری شده از شرکت plasmachem آلمان با طول موج نشری ۶۲۰ نانومتر نیز استفاده شد. غلظت استفاده شده از این نانوذره همانند نانوذرات سنتز شده در نظر گرفته شد تا در نهایت، کارایی آنها با هم مقایسه شود. زاویه پراش اسکن شده در گستره صفر تا ۹۰ درجه انتخاب شد. طیف‌های نشری و جذبی نانوذرات CdTe سنتز شده یکی از معمول‌ترین و ابتدایی‌ترین روش‌های اولیه برای حصول اطمینان از سنتز نانوذرات و تا حدودی کیفیت آنها است. پایداری نوری نانوذرات سنتز شده در یک دوره زمانی کوتاه نیز بررسی شد. بدین منظور مقدار ۱۰ میکرو لیتر از محلول نانوذرات سنتز شده به ۳ میلی لیتر محلول بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH برابر با ۷/۴ اضافه و به مدت ۲ ساعت با فاصله زمانی ۱۰ دقیقه، طیف نشری آن ثبت شد.

پوشش دار کردن نانوذرات CdTe با BSA: برای پوشاندن نقاط کوآنتومی با پروتئین BSA، ۴۰ میلی گرم NaBH₄ در ۳ میلی لیتر محلول ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر آلبومین حل و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس فرآیند دناتوره کردن و احیا کردن پیوندهای دی‌سولفیدی پروتئین از طریق حرارت دهی در دمای ۷۰-۶۰°C برای ۱۵ دقیقه تکمیل شد. ۱۲ میلی لیتر محلول ۵۰ میکرومولار از نانوذره به محلول پروتئینی دناتوره شده اضافه و به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در دمای ۸۰°C انکوبه شد. به منظور خالص سازی نانوذره از سدیم بوروهیدرات اضافی از دیالیز در بافر نمکی فسفات (PBS) استفاده شد. مرحله پوشش دار کردن، برای نانوذره خریداری شده از شرکت plasmachem آلمان نیز انجام شد [19].

تعیین خصوصیات نانوذرات QD-dBSA

طیف‌سنجی فلئورسانس: مقدار ۳۰ میکرو لیتر از نانوذره بدون آلبومین و نانوذره آلبومین دار با غلظت ۲۰ نانومولار درون ۳ میلی لیتر بافر ریخته (ده برابر رقیق) و طیف فلئورسانس آنها در حالی که شکاف دستگاه برای نور جذبی و نشری روی ۵ میلی متر تنظیم شده بود، اندازه گیری شد. طول موج مناسب برای برانگیخته کردن نانوذرات، ۴۵۰ نانومتر در نظر گرفته شد تا در اثر تابش نور آسیب کمتری ببیند. طیف فلئورسانس در بازه طول موجی ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه پلیت ریدر فلئورسانس Synerg H4 (بیوتک؛ ایالات متحده) ثبت شد.

ژل الکتروفورز آگارز: ۲٪ ژل آگارز در بافر تریس-بورات-ا.د.ت.آ (TBE 1X) استفاده و بندهای مربوط به نقاط کوآنتومی زیر لامپ UV با طول موج تابشی ۳۱۰ نانومتر آشکارساز شدند.

الکتروفورز سدیم دودسیل- پلی اکریل امید (SDS-PAGE): SDS-PAGE براساس روش لاملی انجام [20] و برای شناسایی باندهای پروتئینی از روش رنگ آمیزی کوماسی بلو و نیترات نقره استفاده شد. $E = 10043(D)^{2.12}$

آزمون‌های مربوط به آنالیز آنتی‌بادی‌ها

به منظور بررسی کیفیت آنتی‌بادی‌های مورد استفاده از روش‌های سنجش ایمنی از جمله آزمون الایزا و لکه گذاری ایمنی استفاده شد.

آزمون الایزا به منظور تعیین رقت مناسب آنتی‌بادی ثانویه متصل به پراکسیداز ترب کوهی (HRP): مقدار ۲ میکروگرم از آنتی‌بادی موشی استاندارد درون هر چاهک پلیت الایزا ریخته و در دمای ۳۷°C به مدت دو ساعت انکوبه شد. سپس شست و شو با بافر فسفات حاوی ۰/۱٪ توئین و مرحله مسدودسازی با محلول ۱٪

پلی‌وینیلیدین فلوراید (PVDF)، کیسه دیالیز و آنتی‌بادی‌ها (mouse antibody) (سیتومتین ژن؛ ایران)، دکستران T500KD، سدیم پریدوات، توئین ۲۰، پودر تلوریم، کادمیوم کلرید ۲/۵، آبه، تیوگلیکولیک اسید (TGA)، سدیم بروهیدرید (NaBH₄)، آلبومین سرم گاوی (BSA)، سوسترهای دی‌آمینوبنزدیدین (DAB) و تترامتیل بنزدیدین (TMB؛ سیگما؛ آلمان)، آنتی‌بادی ضد موشی گرفته شده از بز (Goat anti-mouse antibody؛ Kenosha C.V؛ سوئیس) و کوآنتوم‌دات با طول موج نشری ۶۲۰ نانومتر (Plasmachem؛ آلمان) استفاده شد.

سنتز نانوذرات CdTe: ۵۰۰ میلی گرم از پودر NaBH₄ به یک بالن سه دهانه ۵۰ میلی لیتری روی همزن مغناطیسی به همراه ۷ میلی لیتر آب اضافه شد. سپس حین جریان گاز آرگون، ۹۰ میلی گرم از پودر تلوریم به محلول اضافه شد. در ابتدا از آنجا که مخلوط داخل بالن به شدت با اکسیژن واکنش می‌دهد، رنگ محلول بنفش می‌شود، اما با جریان گاز آرگون، رنگ بنفش از بین رفته و محلول بی‌رنگ می‌شود. در حالی که مگنت در حال چرخش است، ۲/۵ ساعت بعد، پودر سفید رنگ سدیم تترابورات ته نشین می‌شود. نکته مهم که باید بدان توجه کرد این است که گاز آرگون از یک سر وارد و از روی محلول عبور می‌کند و از سر دیگر خارج می‌شود. NaHTe تولید شده توسط یک سرنگ متصل به نگه دارنده کاغذ صافی، از رسوب جدا شده و برای مرحله بعد نگه داری می‌شود. در مرحله بعد در یک بالن سه دهانه ۲۵۰ میلی لیتری محلول نمک کادمیوم آماده و سپس عامل پوششی تیوگلیکولیک اسید (TGA) اضافه شد. از آنجا که از عامل تیول دار به عنوان عامل پوششی استفاده شد، بنابراین باید محیط از اسیدی به بازی تبدیل شود که برای این کار از سدیم هیدروکسید (NaOH) یک مولار برای رسانیدن pH محلول به بالای ۷/۰ استفاده و در حالی که گاز آرگون جریان داشت، قطره قطره محلول NaHTe به نمک کادمیوم اضافه شد. اولین نانوذرات هنگامی که یون‌های Cd²⁺ و Te²⁻ به هم می‌رسند، تشکیل و رشد خوشه‌ای آغاز می‌شود. برای رشد خوشه‌ها بالن در حمام آب ۹۰°C قرار داده شد. از نظر تئوری، اندازه نانوذرات را می‌توان براساس طیف جذبی آنها تخمین زد و برای تعیین اندازه نقاط کوآنتومی می‌بایست از فرمول خاص همان نانوذره استفاده کرد. برای نقاط کوآنتومی CdTe، فرمول زیر به کار رفت:

$$D = (9.8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1.7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1.0064)\lambda - (194.84)$$

D: نشان دهنده اندازه نانوذرات

λ: نشان دهنده ماکزیمم طول موج جذبی نانوذرات است [18]. غلظت نانوذرات را می‌توان براساس اندازه نانوذرات تخمین زد. ابتدا ضریب جذب مولی برای هر نانوذره CdTe از فرمول زیر محاسبه شد:

با جای گذاری D به عنوان اندازه نانوذره در فرمول، ضریب جذب مولی بر حسب mol⁻¹.cm⁻¹ به دست آمد. سپس با خواندن جذب در بیشینه طول موج جذبی نانوذره و با استفاده از ضریب جذب مولی محاسبه شده و رابطه بیر-لمبرت، غلظت نانوذره بر حسب مولار به دست آمد. پس از سنتز نانوذرات CdTe در شرایط مختلف و به دست آوردن شرایط بهینه برای ساخت بهتر این نانوذرات، با برداشتن نمونه در زمان‌های مختلف، نانوذرات با اندازه‌ها و طیف‌های نشری متفاوت به دست آمد. از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای بررسی مورفولوژی نقاط کوآنتومی CdTe

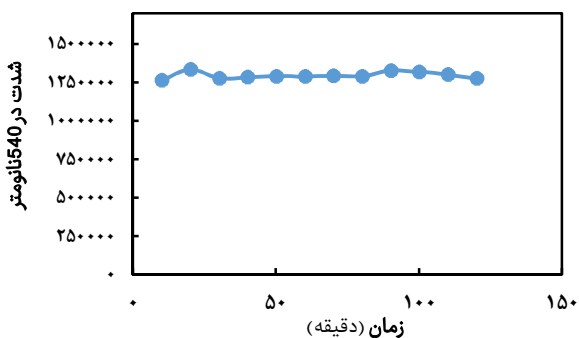
۱۰۰ کیلودالتونی و سانتیفریوژ در ۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴°C به مدت ۶ دقیقه، از نانوذرات پوشش‌دار شده جداسازی شد. میزان خلوص و کیفیت آنتی‌بادی‌ها و همچنین میزان کونژوگاسیون از طریق الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل‌آمید مورد بررسی قرار گرفت. در موارد حساس، رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره انجام شد.

لکه‌گذاری ایمنی برای ارزیابی آنتی‌بادی کونژوگ با dBSA-QD: پس از بهینه‌کردن واکنش اتصال آنتی‌بادی و نانوذره به وسیله دکستران و ساخت کونژوگ، در مرحله بعد با انجام لکه‌گذاری ایمنی و عکس‌برداری فلورسانس، توانایی آنتی‌بادی نشان‌دار شده مورد بررسی قرار گرفت. به منظور یافتن پایین‌ترین حد تشخیص با چشم غیرمسلح، آزمون ایمونوفلورسانس با کونژوگ‌های جدید که از نانوذرات با اندازه‌ها و رنگ‌های مختلف برای کونژوگاسیون استفاده شده بود، انجام شد.

روی یک قطعه کاغذ نیتروسولوز به ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر به کمک میکروسرنگ، مقدار ۳ میکرولیتر نمونه‌گذاری انجام شد. برای نمونه مثبت از آنتی‌بادی موشی و برای کنترل منفی از دو پروتئین غیراختصاصی (نمیوپسین و تاو) استفاده شد. پس از خشک‌شدن لکه‌ها، با قراردادن کاغذ در محلول مسدودکننده حاوی ۵% BSA به مدت یک ساعت، جایگاه‌های خالی موجود روی کاغذ اشباع و مسدود شد. سپس آنتی‌بادی ضد موشی کونژوگ با نانوذره در رقت ۱/۵۰۰ اضافه و به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه شد. سپس کاغذ نیتروسولوز با PBS، ۵ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شست‌وشو داده شد. پس از ۵ بار شست‌وشو، نتایج زیر لامپ UV با طول موج تابشی ۳۱۰ نانومتر بررسی و لکه‌ها آشکارسازی شد.

یافته‌ها

سنتز نانوذرات ذرات CdTe: نقطه‌ای و کروی بودن مورفولوژی نانوذرات کاملاً مشهود بود (شکل ۱-آ). الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) نقاط کوانتومی CdTe سنتز شده پس از ۶ ساعت حرارت‌دهی تعیین شد (شکل ۱-ب). طیف‌های جذبی و نشری نانوذرات سنتز شده CdTe پوشیده شده با تیوگلیکولیک‌اسید (TGA) در زمان رفلکس ۶ ساعت تعیین شد (شکل ۱-پ و ت). برای نانوذره سنتز شده CdTe، با استفاده از قانون بیر-لمبرت مقدار غلظت نانوذره 5×10^{-5} مولار به دست آمد (شکل ۱ پ و ت). پروفایل شدت نشر نانوذرات بر حسب زمان طیف‌گیری نیز تعیین شد. در ارتباط با پایداری، طیف نشری نانوذرات حاصله در مدت زمان معین ثابت بود و خاموشی شدت نشر نمونه نانوذرات سنتز شده در برابر نور تحریکی بسیار ناچیز بود که در این صورت می‌توان گفت هر گونه تغییر در طیف نشری آنها هنگام استفاده از این نانوذرات، ناشی از عوامل محیطی بود (نمودار ۱).



نمودار ۱) آنالیز پایداری قدرت نشری نانوذره با استفاده از اندازه‌گیری نشر فلورسانس آن

BSA به مدت یک ساعت انجام شد. بعد از یک بار شست‌وشو، رقت‌های مختلف آنتی‌بادی ضد موشی کونژوگ با پروکسیداز (goat anti-mouse IgG antibody) درون چاهک‌ها ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شد. در این مرحله ۵ مرتبه شست‌وشو انجام و ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای TMB حاوی هیدروژن پروکساید (H_2O_2) درون هر چاهک ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس واکنش با اسیدسولفوریک ۲ مولار متوقف و در طول موج ۴۵۰ نانومتر رنگ‌سنجی شد.

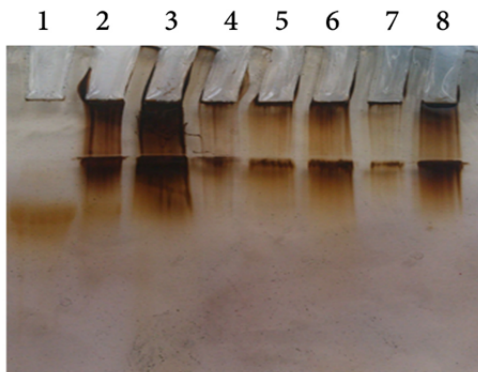
آزمون الیزا به منظور سنجش آنتی‌بادی ضد موشی: مقدار ۲ میکروگرم از آنتی‌بادی موشی به عنوان آنتی‌ژن، درون هر چاهک پلیت الیزا ریخته و در دمای ۳۷°C به مدت دو ساعت انکوبه شد. سپس شست‌وشو با بافر فسفات حاوی ۰/۱% توئین و مرحله مسدودسازی با محلول ۱% BSA به مدت یک ساعت انجام شد. بعد از یک بار شست‌وشو، رقت‌های مختلف آنتی‌بادی ضد موشی به مدت ۱/۵ ساعت با آنتی‌ژن انکوبه و در انتها سه مرتبه شست‌وشو انجام شد. رقت مناسب آنتی‌بادی ثانویه کونژوگ با پروکسیداز (rabbit anti goat IgG antibody) درون چاهک‌ها ریخته و ادامه کار طبق روش ارائه شده در بالا برای تعیین رقت مناسب آنتی‌بادی ثانویه انجام شد.

مقدار رقت مناسب آنتی‌بادی ثانویه، ۱/۱۰۰۰ انتخاب شد. با بررسی نسبت‌های مختلف آنتی‌بادی و دکستران و نانوذره پوشش‌دار با BSA داناتوره شده، مقدار بهینه برای تهیه آنتی‌بادی‌های متصل به نانوذرات به دست آمد. اگر چه اتصال نقاط کوانتومی به مولکول آنتی‌بادی نسبتاً ساده به نظر می‌رسد، اما در عمل حساسیت‌های موجود در تکنیک بعضاً باعث ایجاد مشکلاتی می‌شود. با این وجود، عمل اتصال نقاط کوانتومی به آنتی‌بادی به واسطه دکستران فعال، آسیب‌رسانی کمتری نسبت به سایر روش‌های نشان‌دار کردن برای آنتی‌بادی دارد.

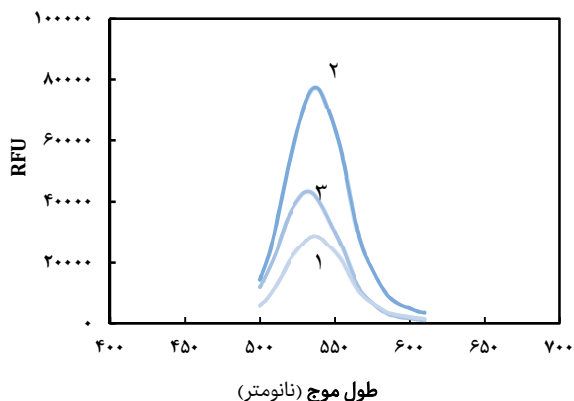
لکه‌گذاری ایمنی: مقدار ۲ میکروگرم آنتی‌بادی موشی به عنوان آنتی‌ژن روی غشای نیتروسولوز لکه‌گذاری شد تا کاملاً خشک شود. سطح غشا با قراردادن در محلول مسدودکننده حاوی ۵% BSA به مدت یک ساعت پوشش داده شد. سپس آنتی‌بادی ضد موشی کونژوگ با پروکسیداز با رقت ۱/۵۰۰ روی غشا ریخته و پس از ۹۰ دقیقه پنج بار شست‌وشو داده شد. محلول سوبسترای DAB حاوی H_2O_2 روی غشا ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس واکنش با اسیدسولفوریک ۲ مولار متوقف شد.

آزمون‌های سنتز و بررسی کیفیت آنتی‌بادی‌های متصل به نانوذرات (Bioconjugates): برای به دست آوردن نسبت‌های مولی مناسب دکستران، آنتی‌بادی و نانوذره آلومین‌دار، ابتدا دکستران فعال شده و نسبت‌های مختلف آنتی‌بادی و نانوذره مورد بررسی قرار گرفت. نسبت‌ها برای یک نانوذره به دست آمد و سپس برای نانوذرات با طول موج‌های نشری دیگر نیز استفاده شد. دکستران در بافر سدیم‌استات ۵۰ میلی‌مولار (pH برابر با ۵/۰) حل و به منظور اکسایش گروه‌های هیدروکسیل آن به آلدئید، ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول پریدات به آن اضافه شد. سپس مخلوط حاصل به مدت نیم ساعت در دمای صفر درجه سانتی‌گراد انکوبه شد [21]. ۴۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد موشی با ۵ میکرولیتر دکستران فعال با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات با pH برابر با ۱۰/۴ به مدت دو تا چهار ساعت انکوبه و سپس مقادیر مختلف dBSA-QD اضافه و ۲۴ ساعت در دمای ۴°C انکوبه و با اضافه کردن گلیسین، واکنش متوقف و در انتها pH محلول روی ۷/۴ تنظیم شد. پروتئین‌های آزاد (آلبومین) با استفاده از فیلترهای

اتصال نانوذرات شد. نشر فلوروسانس نانوذرات پس از پوشانده شدن توسط dBSA افزایش یافت (نمودار ۲). همچنین طیف نشری، نشان‌دهنده مقداری کاهش در نشر فلوروسانس نانوذره پس از اتصال به دکستران و آنتی‌بادی بود. به‌طور کلی نشر فلوروسانسی نانوذرات در هر دو حالت پوشش‌دار با dBSA و کونژوگه با آنتی‌بادی، از نانوذرات آزاد بیشتر بود.



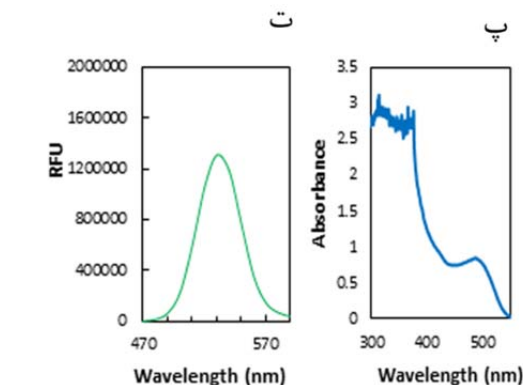
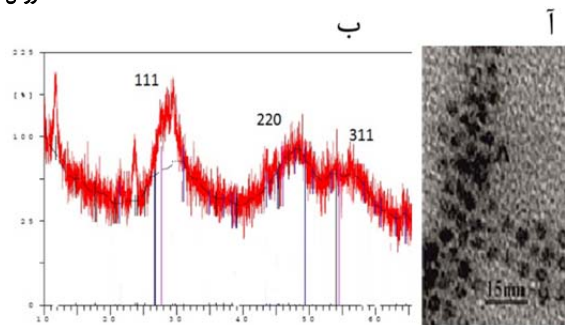
شکل ۳ آنالیز SDS-PAGE مربوط به اتصال آنتی‌بادی و نانوذره به دکستران در مدت زمان آنکوباسیون ۴۸ ساعت (اعداد نشان‌دهنده نسبت‌های مولی Ab-dBSA-QD: Dex: کونژوگاسیون است؛ چاهک ۱) آنتی‌بادی (Ab) چاهک ۲) ۱:۴۰ چاهک ۳) ۱:۶۰ چاهک ۴) ۱:۲ چاهک ۵) ۱:۴ چاهک ۶) ۱:۸ چاهک ۷) ۱:۱ چاهک ۸) ۱:۲۰



نمودار ۲ طیف‌های فلوروسانس نانوذرات آزاد و پوشش‌دار با dBSA و نانوذرات کونژوگه با آنتی‌بادی (در همه موارد از غلظت ۵۰۰ نانومتر نانوذرات برای طیف‌گیری استفاده شد)، ۱-QD -۲ dBSA-QD -۳ dBSA-QD + Dex + Ab

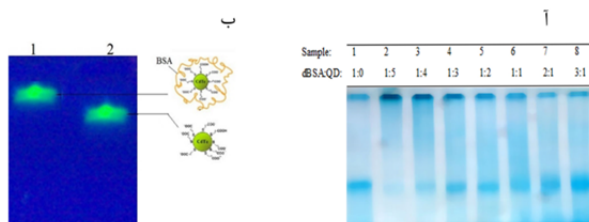
بررسی کارایی نانوبیوکونژوگه‌ها با استفاده از لکه‌گذاری ایمنی: به‌منظور بررسی کارایی آنتی‌بادی کونژوگه انجام گرفت. حداقل نسبتی که در لکه‌گذاری ایمنوفلوروسانس به کار گرفته شد، نسبت مولی ۶۰:۱:۱ به‌ترتیب برای آنتی‌بادی:دکستران:نانوذره بود (شکل ۳، مورد ۳) بود. لکه‌گذاری ایمنی با آنتی‌ژن‌های رقیق‌تر نشان داد که حداقل مقدار آنتی‌ژنی که مورد آزمایش قرار گرفت و به‌طور چشمی قابل‌رؤیت بود حدود ۳۰ نانوگرم بود. توانایی آنتی‌بادی نشان‌دار شده برای شناسایی آنتی‌ژن اختصاصی و همچنین طیف نشری نانوذرات متصل به آنتی‌بادی مورد بررسی قرار گرفت (نمودار ۲؛ شکل ۴). لکه‌گذاری ایمنی با مقادیر مختلف آنتی‌ژن تکرار شد (شکل ۵).

آزمون ایمنوفلوروسانس با کونژوگه‌هایی که از نانوذرات با اندازه‌ها و رنگ‌های مختلف استفاده شده بود، انجام و مشخص شد که استفاده از نانوذرات با اندازه بزرگتر با طیف نشری قرمز در مقادیر



شکل ۱ خصوصیات نانوذرات سنتز شده ذرات کادمیوم-تولرید: آ- تصویر TEM از محلول سنتزی نقاط کوانتومی CdTe پوشیده شده با تیوگلیکولیک اسید (ب) طیف XRD نقاط کوانتومی CdTe بعد از ۶ ساعت رفلکس (پ) طیف جذبی (ت) طیف نشری نقاط کوانتومی CdTe با طیف نشری سبز (نقاط کوانتومی با اندازه ۴-۵ نانومتر)

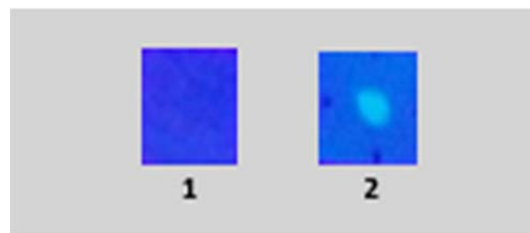
تهیه نانوذرات CdTe پوشش‌دار شده با dBSA: نتایج SDS-PAGE نشان‌دهنده تشکیل dBSA-QD بود (شکل ۲). اختلاف جابه‌جایی QD و dBSA-QD از روی ژل آگارز نیز تاییدکننده تشکیل dBSA-QD بود (شکل ۲-ب). برای دستیابی به نسبت مناسبی از نانوذره و dBSA، پس از بررسی برهم‌کنش نسبت‌های مختلف از نانوذره و dBSA، نسبت مولی از QD و dBSA استفاده شد تا بند مربوط به آلومین دناتوره روی ژل ناپدید شود (شکل ۲-آ- ردیف ۲).



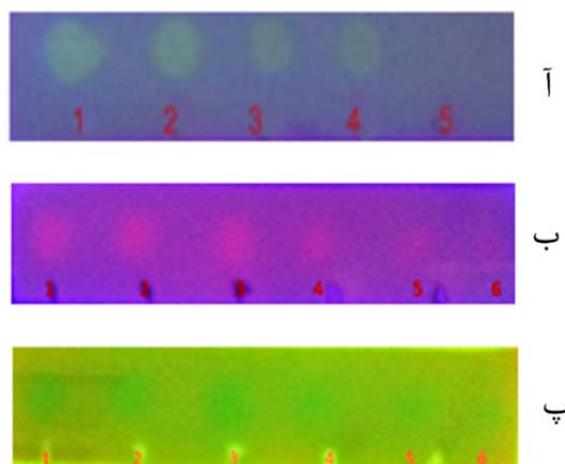
شکل ۲ تهیه نانوذرات CdTe پوشش‌دار شده با dBSA؛ آ) آنالیز SDS-PAGE برای اتصال dBSA و QD با نسبت‌های مولی مختلف (ب) حرکت نانوذرات QD و dBSA-QD روی ژل آگارز

اتصال آنتی‌بادی به نانوذره و تولید بیوکونژوگه‌ها (Bioconjugates): نسبت بهینه برای واکنش کونژوگاسیون تعیین شد (شکل ۳). طیف نشری رقت‌های یکسان از نانوذرات در حضور و عدم حضور BSA به دست آمد (نمودار ۲). اتصال با dBSA علاوه بر باقی‌ماندن و بهتر شدن خصوصیات نشری نانوذره، باعث به‌وجود آمدن گروه‌های عاملی متنوع برای مراحل بعدی

کمتری از آنتی ژن، پاسخ مناسب تری را به همراه داشت و حد تشخیص را با وضوح بیشتری نشان داد (شکل ۵).



شکل ۴) آزمون لکه گذاری ایمونوفلوئورسانس؛ ۱) کنترل منفی، آنتی ژن: ۱۰ میکروگرم پروتئین نمپوسین، آنتی بادی: 40 dBSA-QD + GAM+dex (۲) آنتی ژن: ۴۰ میکروگرم آنتی بادی موشی، آنتی بادی: 40 dBSA-QD + GAM+dex



شکل ۵) آزمون ایمونوفلوئورسانس در رقت های مختلف آنتی ژن (Ag) با آنتی بادی کونژوگه؛ (آ) ۱- ۳۲ میکروگرم ۲- ۱۶ میکروگرم ۳- ۸ میکروگرم پروتئین نمپوسین، ۴- ۴ میکروگرم ۵- ۵ میکروگرم پروتئین تاو ۶- ۴ میکروگرم پروتئین نمپوسین، ب و پ) آزمون ایمونوفلوئورسانس در رقت های پایین تر آنتی ژن با آنتی بادی های نشاندار شده با دو سایز مختلف نانوذره به منظور تعیین پایین ترین حد تشخیص، پ) کونژوگه با نانوذره ۶۲۰ نانومتر پ) کونژوگه با نانوذره ۵۴۰ نانومتر (مقدار آنتی ژن در هر دو آزمایش: ۱- ۱۰۰۰ نانوگرم ۲- ۵۰۰ نانوگرم ۳- ۲۵۰ نانوگرم ۴- ۱۲۵ نانوگرم ۵- ۶۰ نانوگرم ۶- ۳۰ نانوگرم (Ag)

بحث

پژوهش حاضر با هدف ارایه یک روش تک مرحله ای برای کونژوگاسیون آنتی بادی ها با کوانتوم دات کادمیوم تلورید با استفاده از دکستران فعال انجام شد. CdTe از جمله نقاط کوانتومی هستند که می توان آنها را در محیط آبی از مواد اولیه آن سنتز نمود. نقاط کوانتومی در اندازه های مختلف را می توان طی رفلکس محلول در دمای ۱۰۰°C به دست آورد. طیف های حاصل حاکی از آن بود که با افزایش زمان حرارت دهی، افزایش اندازه نانوذرات و جابه جایی به سمت طول موج های بالاتر (red shift) دیده می شود. بعد از سنتز نقاط کوانتومی، خالص سازی محلول نقاط کوانتومی سنتز شده برای حذف پیش ماده های اولیه مصرف نشده در بیشتر مواقع به خصوص زمانی که برای اتصال با زیست مولکول ها به کار می روند، لازم و ضروری است [22].

برای تعیین مشخصات نانوذرات سنتز شده، به ابزارها و تجهیزات دقیقی نیاز است. از آنجایی که خواص مواد نانو ساختار به شکل و اندازه آنها بستگی دارد، بنابراین مطالعات پیرامون شکل، اندازه و آرایش این مواد از نظر فهم پدیده های موجود و در نهایت استفاده

از آنها در کاربردهای مختلف، ضروری است. روش های مختلفی برای تعیین شکل و اندازه ذرات به کار می رود که از جمله آنها می توان به آنالیز میکروسکوپی، آنالیز ساختاری، آنالیز عنصری، آنالیز پیوندی، روش های تعیین مشخصات و سطوح ویژه، آنالیزهای اسپکتروسکوپی و همچنین آنالیزهای کلاسیک و روش های جداسازی اشاره کرد. نتیجه آنالیزهای مذکور به صورت تصویر، طیف یا گراف است که اطلاعاتی در مورد ابعاد، شکل، انواع پیوندها، عناصر و مقدار تخلخل نشان می دهند. میکروسکوپ الکترونی براساس رفتار الکترون یا تغییر شرایط محیط، روش های مختلفی را برای مشخصه یابی نانوذرات ارایه می دهند. در پژوهش حاضر، مورفولوژی نانوذرات در تصویر TEM به صورت نقطه ای و کوری بودند. از روش های مرسوم برای آنالیز ساختاری، XRD است. ناحیه پرتوی X در طیف الکترومغناطیس در محدوده بین پرتوی ۷ و پرتوی فرابنفش قرار دارد. با استفاده از این ناحیه طیفی می توان در خصوص ساختار، جنس ماده و نیز تعیین مقادیر عناصر، اطلاعاتی به دست آورد. صفحات پراش برای ماده استاندارد کادمیوم تلورید در XRD، صفحات ۱۱۱، ۲۲۰، ۳۱۱ و مکان پیک های نانوذرات سنتز شده کاملاً منطبق بر مکان پیک های استاندارد CdTe بود. در صورتی که عامل پوششی نیوله تجزیه و گوگرد آزاد شود، CdS تولید و صفحات پراش مربوط به CdS نیز در طیف XRD ظاهر می شود. در نمونه سنتزی حاضر، صفحاتی برای ماده CdS دیده نشد که می توان نتیجه گرفت، تشکیل CdTe به طور خالص صورت گرفت.

طیف سنجی های نشری و جذبی گرفته شده از نانوذرات نشان داد که با افزایش زمان حرارت دهی، اندازه نانوذرات و جابه جایی قرمز طول موج نشری و جذبی افزایش یافت. پهن بودن پیک جذبی این نانوذرات کاملاً با تئوری جذبی نقاط کوانتومی همخوانی داشت و می توان این نانوذرات را در ناحیه گسترده ای از ناحیه جذبی تحریک کرد. نزدیک بودن لبه جذب به قله طیف نشری را می توان به نورتابی ناشی از لبه جذبی ربط داد و به این نتیجه رسید که تراز تله بین شکاف های انرژی در این سری نانوذرات سنتز شده وجود ندارد و بلورینگی نانوذرات به خوبی صورت گرفت. در مورد پایداری طولانی مدت نانوذرات سنتز شده CdTe، تغییرات شدت نشر آنها در طول مدت ۶ ماه بررسی شد. هر بار مقدار ۱۰ میکرو لیتر از محلول نانوذرات سنتز شده به ۳ میلی لیتر محلول بافر فسفات ۰/۰۵ مولار pH برابر با ۷/۴ اضافه و یک کاهش حدود ۶ درصدی برای ۳ ماه اول و کاهش ۱۰ درصدی بعد از گذشت ۶ ماه در شدت نشر نانوذرات مشاهده شد که بیانگر پایداری بسیار مناسب محلول نانوذرات سنتز شده بود.

به منظور به دست آوردن نانوذراتی با ویژگی های نوری بهتر و پایداری، از dBSA برای پوشاندن سطح نانوذرات کادمیوم تلورید محلول در آب استفاده شد. اتصال پروتئین از طریق واکنش تبادل لیگاندی در سطح نانوذره انجام شد. اتصال با dBSA، باعث به وجود آمدن گروه های عاملی متنوع برای مراحل بعدی اتصال نانوذرات شد. استفاده از این گروه های عاملی به منظور اتصال به ماکرومولکول ها برای اولین بار در پژوهش حاضر مطرح شد. به منظور اطمینان از وجود حداقل پروتئین دنانوره آزاد در محیط مقدار نانوذره پس از بررسی برهم کنش نسبت های مختلف از نانوذره و dBSA، نسبت نانوذرات نقاط کوانتومی پنج برابر نسبت مولی BSA استفاده شد تا بند مربوط به آلبومین دنانوره در ژل ناپدید شود که بند مربوط به کمپلکس نانوذره- پروتئین (dBSA-QD) در بالای ژل جدا کننده مشخص است. لازم به ذکر است که پراکندگی بندهای مربوط به

تکرارپذیری و تجمع غیرقابل کنترل نانوذرات وجود دارد [18]. همچنین به دلیل اتصال بیش از یک نانوذره به مجموعه آنتی‌بادی و دکستران، امکان ارتقای حد تشخیص وجود دارد.

نتیجه‌گیری

در فرآیند کوئوگاسیون به منظور اتصال نقاط کوانتومی CdTe به آنتی‌بادی‌ها از طریق دکستران، با پوشاندن سطح نانوذرات با BSA دناتوره شده علاوه بر افزایش پایداری نانوذرات، گروه‌های عاملی جدیدی روی سطح نانوذره به وجود می‌آید.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و مجتمع تحقیقاتی شهیدمیثی به خاطر فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی کمال تشکر را دارند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

سهم نویسندگان: مرتضی قرائت (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۰٪)؛ رضا حسن ساجدی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ نظام جلیلیان (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ مریم شانه‌ساز (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ منوچهر میرشاهی (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

منابع

- 1- Michalet X, Pinaud F, Bentolila L, Tsay J, Doose S, Li J, et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *science*. 2005;307(5709):538-44.
- 2- Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods*. 2008;5(9):763-75.
- 3- Smith AM, Ruan G, Rhyner MN, Nie S. Engineering luminescent quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Ann Biomed Eng*. 2006;34(1):3-14.
- 4- Sukhanova A, Venteo L, Devy J, Artemyev M, Oleinikov V, Pluot M, et al. Highly stable fluorescent nanocrystals as a novel class of labels for immunohistochemical analysis of paraffin-embedded tissue sections. *Lab Invest*. 2002;82(9):1259-61.
- 5- Nie S, Xing Y, Kim GJ, Simons JW. Nanotechnology applications in cancer. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007;9:257-88.
- 6- Sukhanova A, Devy J, Venteo L, Kaplan H, Artemyev M, Oleinikov V, et al. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. *Anal Biochem*. 2004;324(1):60-7.
- 7- Lei J, Ju H. Signal amplification using functional nanomaterials for biosensing. *Chem Soc Rev*. 2012;41(6):2122-34.
- 8- Liu C, Jia Q, Yang C, Qiao R, Jing L, Wang L, et al. Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe₃O₄ nanoparticle aggregates as color reagents. *Anal Chem*. 2001;83(17):6778-84.
- 9- Mahmoud W, Rousserie G, Reveil B, Tabary T, Millot J, Artemyev M, et al. Advanced procedures for labeling of antibodies with quantum dots. *Anal Biochem*. 2011;416(2):180-5.
- 10- He Y, Sai LM, Lu H, Hu M, Lai W, Fan Q, et al. Microwave-assisted synthesis of water-dispersed CdTe nanocrystals with high luminescent efficiency and arrow

BSA آزاد، به اختلاف در میزان دناتوره شدن مولکول‌های آلبومین ارتباط داشت که بر سرعت حرکت روی ژل به طور جزئی اثر گذاشت. همان طور که در گزارش‌های علمی آمده است میزان پایداری و نشر فلوروسانس برای نانوذره با سطح پوشیده از پروتئین، به خوبی افزایش یافته است [16, 17] که پژوهش حاضر با آنها همخوانی داشت.

دکستران، پلیمری منشعب از گلوکز است که ۹۵٪ پیوند بین واحدهای گلوکز از نوع 1-6 و باقیمانده آن از نوع پیوندهای 1-2، 1-3 و 1-4 است. پیوندهای اخیر در محل انشعابات قرار دارند. با توجه به اینکه در دکستران، هر واحد گلوکز دارای سه گروه هیدروکسیل است، این گروه‌های هیدروکسیل تحت تاثیر تغییرات شیمیایی خاص به گروه‌های مختلفی تبدیل می‌شوند و مشتقات چندظرفیتی متفاوتی ایجاد می‌شود [23]. به عنوان مثال، یکی از این تغییرات شیمیایی، اکسایش گروه‌های هیدروکسیل توسط سدیم پریدات است که سبب ایجاد دو گروه آلدئید فعال به ازای هر واحد گلوکز در دکستران می‌شود. این گروه‌های آلدئید از طریق تشکیل پیوندهای شیف- باز، توانایی اتصال به گروه‌های آمین مولکول‌های زیستی را دارند [21]. نسبت مولی dBSA-QD به دکستران تا بیست برابر مقدار مول دکستران مورد بررسی قرار گرفت و در نسبت‌های مختلف آزمون لکه‌گذاری ایمونوفلوروسانس صورت گرفت. در این پژوهش از آنتی‌بادی ضد موشی گرفته شده از بز به منظور اتصال به نانوذرات و از آنتی‌بادی موشی به عنوان آنتی‌ژن برای آنتی‌بادی مذکور استفاده شد. با توجه به آزمایش‌های انجام شده مشخص شد که با افزایش زمان انکوباسیون، کارایی اتصال افزایش یافته است. با انجام لکه‌گذاری ایمنی، کارایی آنتی‌بادی‌های متصل به نانوذرات مورد بررسی قرار گرفت و لکه‌گذاری ایمنی با آنتی‌ژن‌های رقیق‌تر تکرار شد.

به منظور استفاده از نقاط کوانتومی لازم است این نانوذرات به مولکول‌های زیستی متصل شوند. در این اتصال باید به مواردی همچون جهت‌گیری مولکول زیستی و موقعیت آن نسبت به نقاط کوانتومی، حفظ فعالیت مولکول زیستی، تعداد مولکول‌های هدف متصل شده به هر نقطه کوانتومی و پایداری ترکیب حاصل از اتصال این دو توجه کرد. اتصال می‌تواند به صورت کوالانسی یا غیرکوالانسی انجام گیرد. انتخاب هر روش بستگی به هدف از اتصال و کاربردهای بعدی دارد. به عنوان مثال، برای اتصال نقاط کوانتومی به آنتی‌بادی‌ها از استرهای فعال، پل‌های آویدینی و پروتئین G و همچنین برچسب‌های پلی‌هیستیدینی استفاده می‌شود [17]. انواعی از نقاط کوانتومی که دارای گره کربوکسیل در سطح خود هستند، می‌توانند با واسطه نیکل (Ni²⁺) به بخش‌های پلی‌هیستیدینی پروتئین‌ها به صورت غیرکوالانسی متصل شوند. اتصال غیرکوالانسی از طریق آویدین و بیوتین نیز امکان‌پذیر است [23]. اتصال بین نانوذرات و ماکرومولکول‌های زیستی را می‌توان از طریق تشکیل پیوند کوالانسی بین گروه‌های آمین و کربوکسیل انجام داد. یکی از معروف‌ترین کربودی‌ایمیدها، ۱-اتیل-۳-(۳-دی‌متیل‌آمینوپروپیل) کربودی‌ایمید (EDC) است که به‌تنهایی یا به همراه هیدروکسی‌سوکسینیمید (NHS) استفاده می‌شود و موجب فعال‌سازی گروه‌های کربوکسیل سطح مولکول‌های زیستی یا نقاط کوانتومی می‌شود [13]. (ان- مالامیدومتیل) سیکلو‌هگزان کربوکسیلیک‌اسید ان- هیدروکسی‌سوکسینیمید استر (SMCC) برای اتصال کوالانسی گروه‌های سولفیدریل به گروه‌های آمین مورد استفاده قرار می‌گیرد [23]. بر خلاف اتصال از طریق پلیمر دکستران در بیشتر واکنش‌های رایج محدودیت‌هایی از جمله عدم

- Seifalian AM. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*. 2007;28(31):4717-32.
- 18- Yu W, Qu L, Guo W, Peng X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals. *Chem Mater*. 2003;15(14):2854-60.
- 19- Wang Q, Kuo Y, Wang Y, Shin G, Ruengruglikit C, Huang Q. Luminescent properties of water-soluble denatured bovine serum albumin-coated CdTe quantum dots. *J Phys Chem B*. 2006;110(34):16860-6.
- 20- He F. Laemmli-SDS-PAGE [Internet]. Stanford: Bio-protocol; 2011 [cited 2015 May 20]. Available from: <https://bio-protocol.org/bio101/e80>.
- 21- Charbgo F, Mirshahi M, Sarikhani S, Saifi Abolhassan M. Synthesis of a unique high-performance poly-horseradish peroxidase complex to enhance sensitivity of immunodetection systems. *Biotechnol Appl Biochem*. 2012;59(1):45-9.
- 22- de Menezes F, de Azevedo W, Alves JrS. A simple and fast synthesis route for preparing CdTe quantum dots in aqueous medium. 11th International Conference on Advanced Materials, September 20-25, 2009, Rio de Janeiro, Brazil; 2009.
- 23- Hermanson GT. *Bioconjugate techniques*. New York: Academic Press; 2013.
- size distribution. *Chem Mater*. 2007;19(3):359-65.
- 11- Xia Z, Xing Y, So MK, Koh AL, Sinclair R, Rao J. Multiplex detection of protease activity with quantum dot nanosensors prepared by intein-mediated specific bioconjugation. *Anal Chem*. 2008;80(22):8649-55.
- 12- So MK, Loening AM, Gambhir SS, Rao J. Creating self-illuminating quantum dot conjugates. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1160-4.
- 13- Mazumder S, Dey R, Mitra MK, Mukherjee S, Das GC. Review: Biofunctionalized quantum dots in biology and medicine. *J Nanomater*. 2009;2009:815734.
- 14- Nabiev I, Sukhanova A. Fluorescent colloidal particles as a detection tools in biotechnology systems. In: Eliassari A, editor. *Colloidal Nanoparticles in Biotechnology*. New York: Wiley & Sons Inc; 2008.
- 15- Mamedova NN, Kotov NA. Albumin-CdTe nanoparticle bioconjugates: Preparation, structure, and interunit energy transfer with antenna effect. *Nano Lett*. 2001;1(6):281-6.
- 16- Peng C, Li Z, Zhu Y, Chen W, Yuan Y, Liu L, et al. Simultaneous and sensitive determination of multiplex chemical residues based on multicolor quantum dot probes. *Biosens Bioelectron*. 2009;24(12):3657-62.
- 17- Jamieson T, Bakhshi R, Petrova D, Pocock R, Imani M,