

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

هانیه شیرازی^۱، آیتا 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 آلومین (HAS) ادرار طراحی شده است.

روش‌ها: ابتدا نانوذرات اکسید آهن/ کیتوزان/ طلا ($Fe_3O_4/Chitosan/Au$) سنتز گردید. سپس آنتی‌بادی منوکلونال علیه آلومین 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 (SPCEs) (Screen Printed Carbon Electrode) 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 الکترودهای 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، آلومین 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، آلومین

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: ۰۲۱-۸۸۲۲۰۰۳۷-۸، نمابر: ۰۲۱-۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: omidfar@tums.ac.ir

مقدمه

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 آشفتنگی 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 زیست‌سازگار 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 آگریگه 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 بیومولکول بر سطح الکتروود 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 پلی‌وینیل‌الکل،

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 [۲-۴]. 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 آهن‌ریا هستند [۵]. آلبومین پروتئینی با وزن مولکولی ۶۶ کیلو دالتون فراوان‌ترین پروتئین 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 و ریدی 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 [۸،۹]. شاخصه‌هایی چون حساسیت بالا و حد تشخیص پایین، زمان

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) ساخت آمریکا سنجیده گردید. طراحی سنسور بر روی (Co) ساخت آمریکای صفحه کربنی یک بار مصرف (SPCEs) که شامل یک الکتروود کار مدور با قطر ۳ میلی‌متر، یک الکتروود رفرنس Ag/AgCl و یک الکتروود 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 ۳۰ μ l قرار می‌گیرند و برای خوانش توسط دستگاه الکتروشیمی پتانسیواستات با یک رابط وصل می‌گردند که در این حالت در سل به قطر ۵ میلی‌متر به حجم ۵۰ μ l قرار می‌گیرند.

تهیه و خالص سازی آنتی بادی مونوکلونال آلبومین

از ادغام لنفوسیت طحال موش و سلول میلوما sp2/0، لاین سلولی هیبریدوما تولید کننده آنتی بادی مونوکلونال آلبومین تهیه شد [۱۵]. براساس روش گزارش شده توسط امیدفر و همکاران [۱۵] سلول هیبریدوما در ۵۰ ml محیط کشت حاوی ۳٪ FCS رشد داده شدند و آنتی بادی‌ها از مایع رویی محیط کشت توسط ستون کروماتوگرافی تمایلی پروتیین (HiT rap protein) خالص سازی گردیدند. در نهایت آنتی بادی‌های 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 Fe₃O₄ به عنوان هسته به روش هم‌رسوبی در حضور باز هیدروکسید سدیم به عنوان عامل احیا کننده تولید گردیدند [۱۶]. به طور خلاصه، حدود ۲/۳۶۵ gr از FeCl₂ · ۴H₂O و ۰/۹۹ gr از FeCl₃ · ۶H₂O (با نسبت

یک پلیمر زیست سازگار غیرسمی مصنوعی است که دارای ویژگی‌های منحصر به فرد، از جمله زنجیره‌های مولکولی انعطاف پذیر، ثبات شیمیایی و طبیعت انعطاف پذیر است که می‌تواند با ایجاد ساختار سه بعدی به عنوان ماتریکس مناسبی برای تثبیت آنتی ژن آلبومین استفاده گردد و همچنین بر میزان پایداری آنتی ژن، مقدار آنتی ژن جهت تثبیت و در نتیجه بر افزایش حساسیت سنسور تاثیرگذار باشد [۱۴]. در این تحقیق ایمونوسنور 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 اندازه گیری می‌شود.

روش‌ها

معرف‌ها

نمک‌های کلرید آهن (Fe²⁺ Fe³⁺)، هیدروکسید سدیم (NaOH)، کیتوزان با جرم مولکولی کم، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، گلو تار آلدئید ۲۵٪ (GLA)، هیدروکسی تترامیتیل آمونیوم (TMOH)، تتراکلروئورید سیسید (HAuCl₄)، تری سدیم سیترات، RPMI ۱۶۴۰، سرم جنینی گوساله (FCS)، استرپتومایسین، پنی سیلین، هموگلوبین، ستون پروتئین G، آلبومین سرم گاو (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 ۰/۰۰۳ M (NaCl)، کلرید پتاسیم ۰/۰۰۳ M (KCl) با pH ۷/۲ 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.

قابل نگهداری است. در شکل ۱ روند سنتز نانوذرات آهن با تجمع طلا نشان داده شده است.

اتصال آنتی آلبومین به سطح نانوذرات مگنتیک طلا (Ab-MnGs)

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

طراحی ایمونوسنسور آلبومین بر روی الکتروود اصلاح شده کربنی صفحه‌ای

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

مولی (۰/۵) را در ۱۰۰ ml آب مقطر بدون اکسیژن ریخته و سپس در حضور نیتروژن می‌گذاریم ۳۰ دقیقه استیرر گردد. سپس هیدروکسید سدیم ۲ M (حدود ۵۰ ml) 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 تترامیتیل آمونیوم (TMOH) ۰/۱ M 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 ۰/۲gr از نانوذرات اکسید آهن سوپر پارامگنتیک تولید شده را بعد از ۲۰ دقیقه اولتراسونیکاسیون با اتانول خالص، به ۲۷/۵ ml محلول NaCl ۰/۵ مولار حاوی SDS ۰/۰۲۵ مولار و ۰/۰۹۴۸۵ gr کیتوزان حل شده در ۲ml استیک اسید ۲٪ مخلوط کرده و برای یک ساعت در اولتراسونیکاسیون ۲۰°C قرار داده می‌شود. سپس ۲/۷۵ ml گلو تار آلدئید (GLA/۲۵) را به عنوان یک کراس-لینکر اضافه کرده و برای ۵ ساعت در حرارت ۵۰ °C استیرر می‌گردد. در ادامه پس از شستشو با آب مقطر، سدیم آزاید (۰/۰۱(w/v)٪ به محلول اضافه گشته و در فور ۱۰۰ °C خشک می‌گردد. در نهایت برای تشکیل کمپلکس نانوذرات مگنتیت طلا، ۰/۲ gr کمپلکس Fe₃O₄/Chi را به مدت ۲ ساعت در مجاورت ۲۵ ml نانوذره طلا ۱۸-۱۶ nm، 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 Fe₃O₄/Chi اتصال یافته که بی‌رنگ شدن محلول طلا اثباتی بر این مسئله است. پس از شستشو با آب مقطر، سدیم آزاید (۰/۰۱(w/v)٪ به محلول اضافه گشته و در فور ۱۰۰ °C خشک می‌گردد. پودر حاصله در ۴ °C و در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ برای چندین ماه

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 الکتروود برای افزایش پایداری اتصال آنتی‌ژن HSA و در نتیجه افزایش حساسیت سنسور راهبرد جدیدی ارائه کرده است.

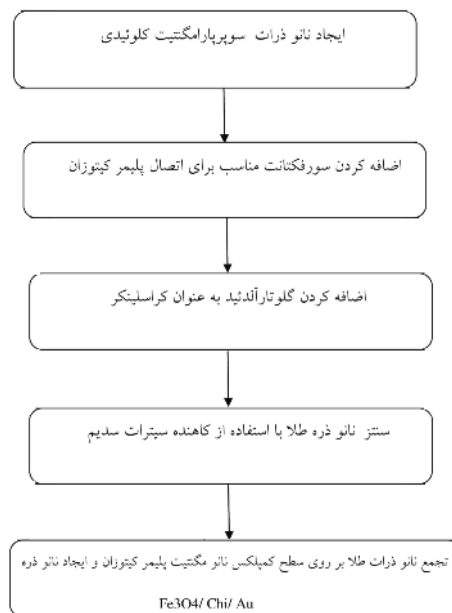
بررسی صحت سنتز نانوذرات مگنتیت طلا

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 الکترونی 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 ۲۷-۳۰ 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.

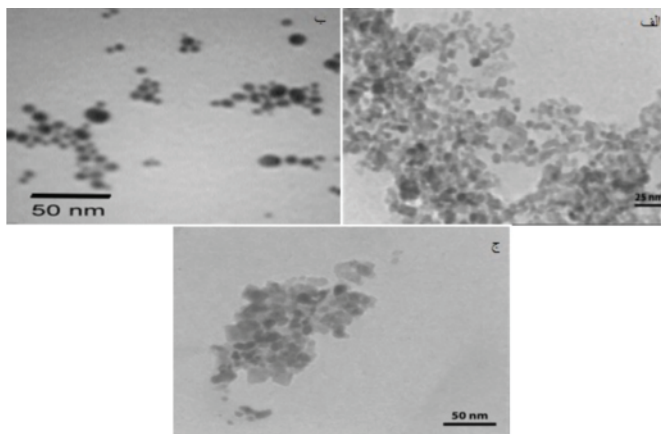
اختصاصی توسط انکوباسیون با PB (pH=۷/۲، ۰/۰۱M) حاوی ۰/۰۵٪ شیر خشک بدون چربی و توئین ۲۰، ۰/۰۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷°C بلوکه شدند (الکتروود اصلاح شده در تمامی این مراحل در سل الکتروشیمیایی ۳ mm به حجم ۳۰ μl که محدوده الکتروود کار را مشخص می‌کند قرار داده شده). سپس SPCE توسط PBS حاوی توئین ۲۰، ۰/۰۵٪ شسته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

اندازه‌گیری الکتروشیمیایی

پس از اصلاح الکتروود و قرار دادن آن در سل الکتروشیمیایی، ۵۰ μl از محلول HCl یک مولار در سطح الکتروود ریخته شد. مطالعه پایه الکتروود اصلاح شده توسط ولتامتری چرخه‌ای (CV) در محدوده پتانسیلی -۱ تا +۱ در سرعت خوانش ۵۰ mV/s انجام شد. متعاقباً، سیگنال‌های آنالیتیکالی با روش پالس ولتامتری تفاضلی (DPV) برای الکتروود 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.



شکل ۱- روند سنتز نانوذرات مگنتیت طلا

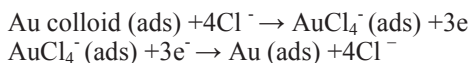


شکل ۲- (الف) تصویر نانوذرات اکسید آهن تولید شده با سدیم هیدروکسید با میکروسکوپ الکترونی، متوسط اندازه ذرات ۱۰-۱۲ nm، (ب) تصویر نانوذرات طلا سنتز شده با میکروسکوپ الکترونی TEM، متوسط اندازه ذرات (۱۶-۱۸ nm) می باشد و (ج) تصویر نانوذرات اکسید آهن با تجمع نانوذرات طلا بر روی سطح آن با میکروسکوپ الکترونی،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

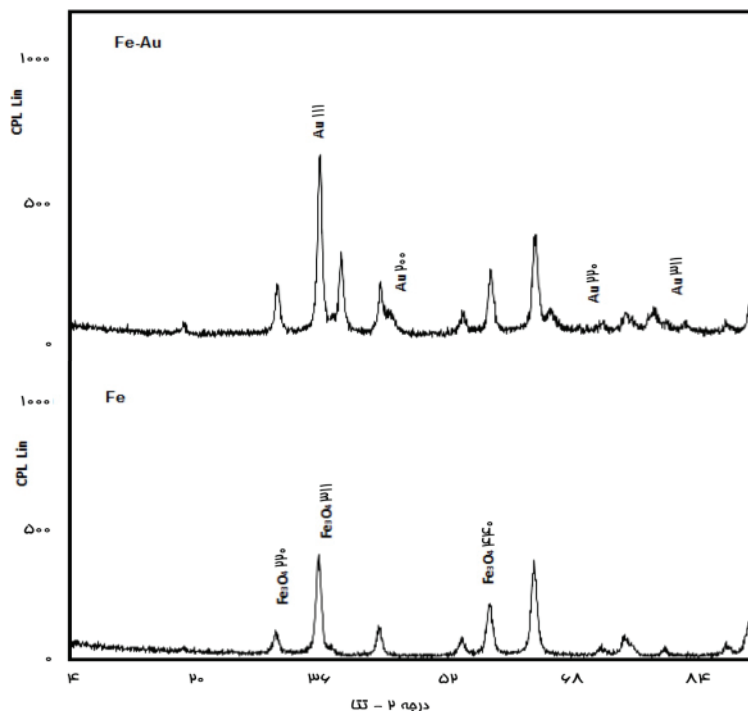
(۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) از سطح Au نشان می دهد که نانوذرات طلا در کمپلکس مگنتیت طلا حضور دارد. در نتیجه این مطالعه نشان داد که فاز اصلی در محلول نانوذرات هم آهن و هم طلا می باشد و این تایید کننده تجمع مناسب نانوذرات طلا بر روی سطح اکسید آهن می باشد. مطالعه دیگری که به منظور تایید تشکیل نانوذرات سنتز شده انجام گردید، نشان دادن خاصیت پارامغناطیسی Fe_3O_4 با حضور میدان مغناطیسی بود. مقدار مغناطیس اشباع ذرات مگنتیک بدون پوشش برابر با $66/52 \text{ emu/g}$ در حالی که بعد از تجمع نانوذرات طلا بر روی سطح اکسید آهن این میزان کاهش

به منظور بررسی ترکیب نمونه های نانوذرات اکسید آهن و اکسید آهن- طلا آنالیز XRD انجام گردید. شکل ۳ نشان دهنده الگوی پراش پرتو ایکس XRD اکسید آهن سنتز شده می باشد پیک های موجود در $30/16^\circ$ ، $35/39^\circ$ ، $43/12^\circ$ ، $57/06^\circ$ و $62/58^\circ$ نشان دهنده فاز مگنتیت اکسید تولید شده است که می تواند به پراش از (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۴۰۰)، (۵۱۱)، (۴۴۰) و (۵۳۳) سطح اکسید آهن اختصاص داده شود. برای تایید تشکیل کمپلکس مگنتیت طلا پیک های موجود در $38/2^\circ$ ، $44/4^\circ$ ، $64/4^\circ$ و $77/6^\circ$ نشان دهنده نانوذرات آهن با تجمع طلا می باشند. بازتاب های براگ

مگنتیک طلا براساس سیگنال احیا در محیط اسیدی (HCl) قابل شناسایی هستند. تشخیص بر اساس واکنش زیر است:



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 $60/80 \text{ emu/g}$ تخمین زده شد. نتایج مطالعات الکتروشیمی در سنجش الکتروشیمی ذرات طلا موجود در کمپلکس



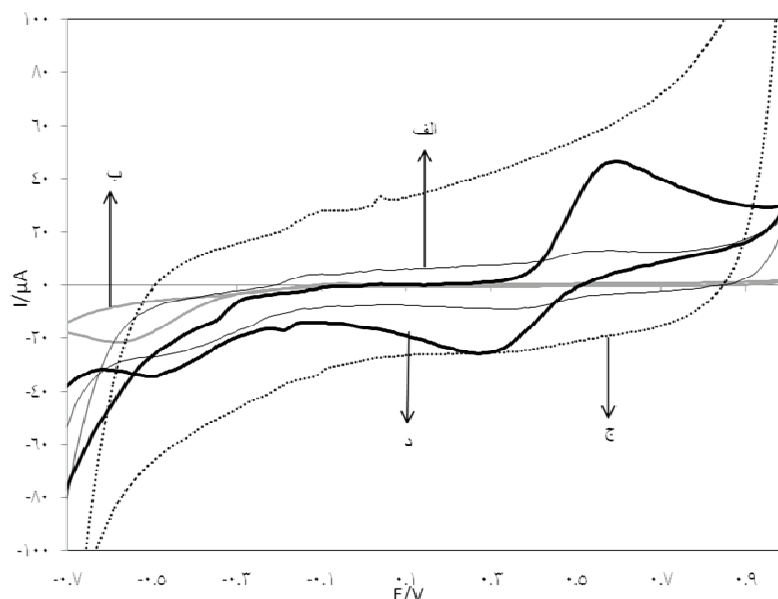
شکل ۳ - XRD مربوط به نانوذرات آهن و نانوذرات مگنتیک طلا

مطالعه بیوالکتروشیمیایی، ولتاژتری چرخه‌ای (CV) در محدوده پتانسیلی ۱- تا ۱+ ولت و سرعت خوانش 50 mV/s انجام شد. پس از اطمینان از صحت سنتز نانوذرات مگنتیک طلا، آنتی‌بادی علیه آلبومین به آنها وصل گردید. برای صحت اتصال الیازبی 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).

اکسایش نانوذرات طلا، یون‌های AuCl_4^- که به شدت بر روی سطح الکتروود جذب می‌شود را تولید می‌کند. در مرحله بعد یون‌های AuCl_4^- احیا شده و پیک کاتدی در محیط HCl یک مولار در محدوده $0/2$ تا $0/4$ 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 $0/3$ نداریم ولی در نمودار (د) در تایید سنتز کمپلکس نانو مگنتیک طلا پیک قوی طلا که تاییدی بر حضور آن در سطح اکسید آهن است مشاهده گردید. در

جدول ۱- نتایج آزمایش الیازا 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



سرعت خوانش: 50 mV/s . (a) الکتروده برهنه (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Chitosan}$ (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Chitosan}/\text{Gla}$ (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Chi}/\text{Au}$

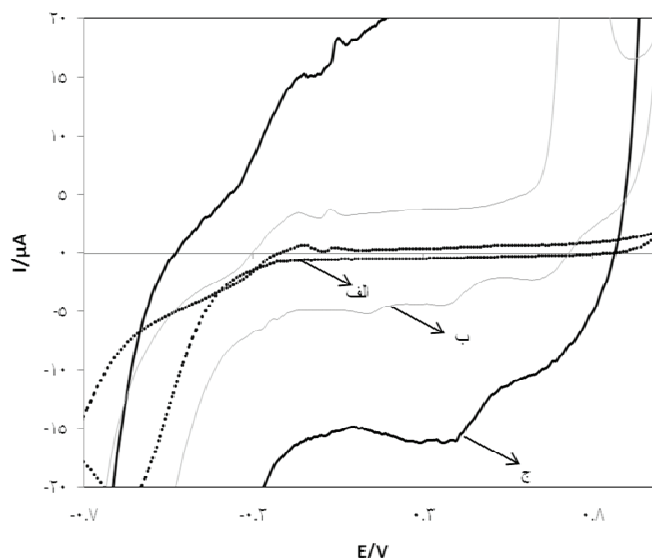
شکل ۴- انواع اشکال الکتروده با نانوذرات در مراحل مختلف سنتز، در حضور HCl یک مولار در محدوده پتانسیل -1 تا $+1$ ولت

الکترون از سطح به الکتروده 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 الکتروشیمی، غلظت بهینه آنتیژن کوت شده (HSA) و Ab-MnG توسط این روش مطالعه گردید. برای این منظور غلظت‌های متفاوت از آنتی ژن آلبومین (800 ، 500 ، 400 ، 100 ، 200 ng) در PVA تهیه و در سطح الکتروده تثبیت گردید. براساس شدت پیک کاتدی، 500 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 الکتروده اصلاح شده با مقدار مناسب آنتیژن (500 ng)، حجم‌های مختلف 10 ، 15 ، 20 ، $25 \mu\text{l}$ از نانوذره کونژوگه را بر روی سطح الکتروده ریخته و باز هم با مشاهده شدت پیک کاتدی در 0.3 ولت، $20 \mu\text{l}$ به عنوان حجم بهینه انتخاب گردید.

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 -1 تا $+1$ و سرعت خوانش 50 mV/s انجام گردید. منحنی (الف و ب) در شکل ۵ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای از الکتروده 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-کاهش در سطح الکتروده رخ نمی‌دهد. در صورتی که منحنی (ج) پیک قوی در 0.3 ولت را به علت حضور نانوذره مگنتیک طلا-آنتیبادی روی سطح الکتروده 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



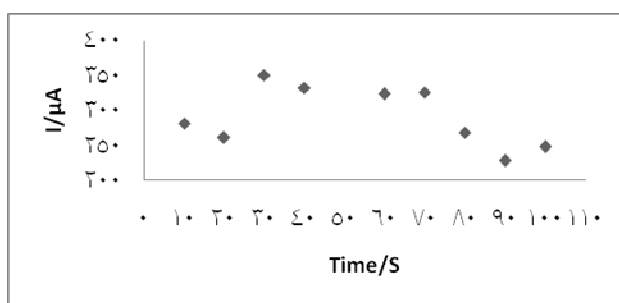
سرعت خوانش: 50 mV/s . (a) الکتروود برهنه (b) PVA-HSA (c) PVA-HAS-Ab-MnG
 شکل ۵- انواع اشکال الکتروود تغییر یافته در حضور HCl یک مولار در محدوده پتانسیل -1 تا $+1$ ولت

روش پالس ولتامتری تفاضلی برای تشخیص آلومین

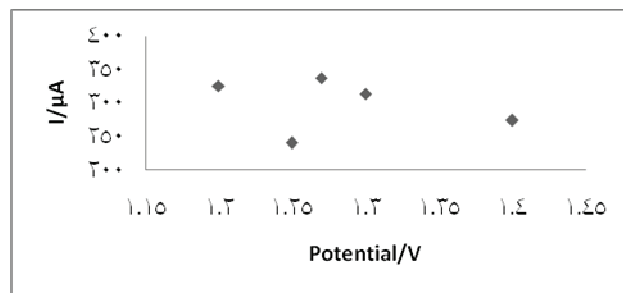
(روش آنالیتیکالی برای تشخیص HSA)

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 ($1/37$) با توجه به مقالات انتخاب گردید [۱۹]. دوم، اندازه گیری DPV در طیف های زمانی مختلف از 10s تا 120s ($10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120$) انجام شد. در نهایت، زمان

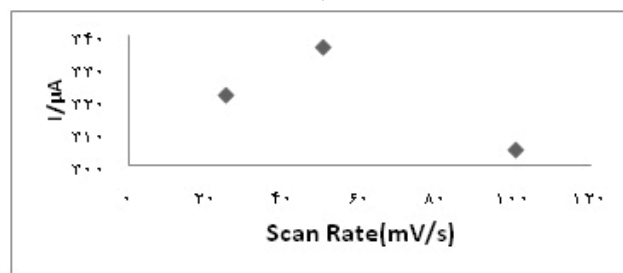
بهینه براساس پیک جریان کاتدی و پتانسیل پاسخ بیوسنسور 30s انتخاب گردید (شکل ۶-الف). برای انتخاب پتانسیل های بهینه ایمونوسنسور در طیف های مختلف پتانسیل از $1/2$ ولت تا $1/4$ ($1/2, 1/25, 1/27, 1/30$) و $1/40$ (ولت) آزمایش شد و پتانسیل $1/27$ ولت به عنوان پتانسیل بهینه برای بررسی پالس ولتامتری تفاضلی ایمونوسنسور انتخاب گردید (شکل ۶-ب) و در نهایت در طیف های مختلف سرعت خوانش $25, 50$ و 100 میلی ولت بر ثانیه، 50 mV/s در نتیجه شدت پیک کاهش انتخاب گردید (شکل ۶-ج).



الف



ب

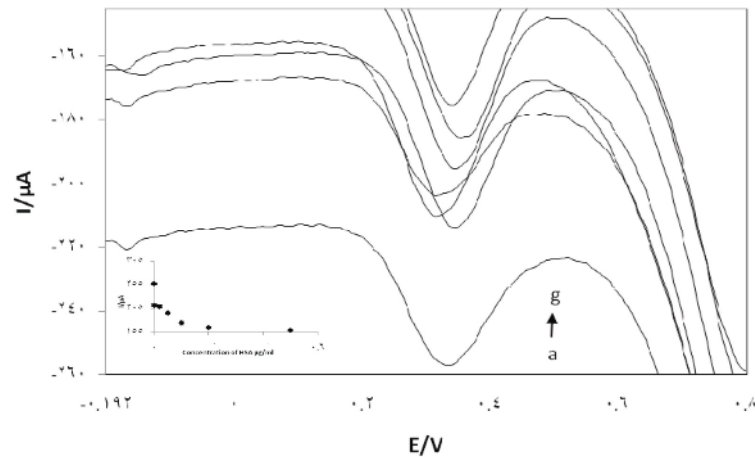


ج

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

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 ۵۰ μl از محلول HCl یک مولار روی سطح الکترودهای 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 ۵۰ mV/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 در نظر 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].

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 پروتئین سانتیفریوژ 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 ۲۰ μl 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 ۲۰ μl از محلول Ab-



شکل ۷- ولتاموگرام‌های تمایز پالسی برای تشخیص HSA بر اساس رقت‌های سریالی مختلف آنتی‌ژن (a تا g) (۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۲، ۰/۵)، ولتاموگرام‌های تمایز پالسی برای تشخیص HSA بر اساس رقت‌های سریالی مختلف آنتی‌ژن (a تا g) (۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۲، ۰/۵)، ولتاموگرام‌های تمایز پالسی برای تشخیص HSA بر اساس رقت‌های سریالی مختلف آنتی‌ژن (a تا g) (۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۲، ۰/۵) در HCl یک مولار در سرعت خوانش ۵۰ mV/s

در مجموع هدف از این تحقیق ارائه روشی جدید جهت طراحی ایمونوسنسور 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 سوپراپارامگنتیک، غیر سمی بودن پلیمر به کار رفته در کمپلکس، 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 در غلظت‌های 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.

نتیجه‌ای که از همه داده‌های مربوط به ایمونوسنسور رقابتی HSA بر اساس 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 الکتروود، نقش عوامل مداخله‌گر شامل اوره (1 mol/L)، کراتینین (10 gr/L)، هموگلوبین انسان (10 mg/L)، ایمونوگلوبین انسان (10 mg/L)، گلوکز (20 gr/L)، تتراسایکلین (200 mg/L) و استامینوفن (200 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.

مأخذ

- Knopp D. Immunoassay development for environmental analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2006; 385 (3):425-7.
- 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.
- 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.
- Vo-Dinh T, Cullum B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' journal of analytical chemistry* 2000; 366 (6):540-51.
- Luo X, Morrin A, Killard AJ, Smyth MR. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. *Electroanalysis* 2006; 18 (4):319-26.
- Khatami Z, McIlveen DW, Nesbitt SG, Young IS. Screening for microalbuminuria by use of microproteinuria. *Eastern Mediterranean Health Journal* 2005; 11 (3):359.
- Klein R, Klein BEK, Moss SE. Prevalence of microalbuminuria in older-onset diabetes. *Diabetes care* 1993; 16 (10):1325-30.
- Teppo AM. Immunoturbidimetry of albumin and immunoglobulin G in urine. *Clinical chemistry* 1982; 28 (6): 1359-61.
- Woo J, Floyd M, Cannon DC, Kahan B. Radioimmunoassay for urinary albumin. *Clinical chemistry* 1978; 24(9):1464-7.
- Cheng Q, Peng TZ, Liu AL. Preparation of functional magnetic nanoparticles and its application in diagnostic analysis. *Chinese Chemical Letters* 2005; 16 (8):1059.
- Tang D, Saucedo 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.
- 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.
- Doretto 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.
- Omidfar K, Dehdast A, Zarei H, Sourkahi BK, Larijani B. Development of urinary albumin immunosensor based on colloidal AuNP and PVA. *Biosensors and Bioelectronics* 2011
- Paknejad M, Rasaei 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.
- Mashavhela M. Synthesis and characterization of coated and uncoated magnetic nanoparticles. 2009.
- Castaeda Briones MT. Electrochemical stripping analysis and nanoparticles for affinity biosensors. 2008.
- 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.
- 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.
- 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.