

طراحی ایمونوسنسور الکتروشیمیایی با استفاده از Au-NP و PVA به منظور اندازه‌گیری کمی آلبومین ادراری

زهرا میرزایی‌زاده^۱، فاطمه قلی‌زاده^۱، زینب شیروانی‌فارسانی^۱، فاطمه سادات امجد زنجانی^۱، کبری امیدفر^{۱*}

چکیده

مقدمه: توسعه و بهبود ایمونوسنسورها با حساسیت و ویژگی بالا برای تشخیص فرایندهای فیزیولوژیک یا پاتولوژیک در بدن، فرصت مناسبی را برای تشخیص و درمان زود هنگام بیماری‌ها ایجاد می‌نماید.

روش‌ها: در این مطالعه، یک ایمونوسنسور رقابتی جدید با استفاده از یک آنتی‌بادی مونوکلونال علیه آلبومین سرم انسان (HSA)، متصل به نانو ذره طلا (AuNP) طراحی شد که آلبومین موجود در ادرار را تشخیص می‌دهد. در ابتدا، آنتی‌بادی مونوکلونال به سطح نانو ذره طلا متصل شده و سپس مخلوط آنتی ژن HSA و وینیل الکل روی سطح سنسور نواری با الکتروکد کار کربنی (Screen Printed Carbon Electrode) SPCE چکانده شد. با استفاده از موج UV، وینیل الکل پلیمریزه گردید تا پلی وینیل الکل (PVA) ایجاد گردد.

یافته‌ها: تصاویر میکروسکوپ الکترونی از الکتروکد تغییر یافته یک اتصال مناسب و پایدار بین آنتی ژن HSA و آنتی‌بادی مونوکلونال و نانو ذره طلا را نشان داد. روش ولتامتری چرخه‌ای، نشان داد که فرایند مدیفیکاسیون به خوبی انجام شده است. اندازه‌گیری‌های الکتروشیمی شامل ولتامتری تمایز پالسی (DPV) و ولتامتری امواج مربعی (SWV)، برای تشخیص کمی آنتی ژن استفاده گردید. با افزایش غلظت HSA در نمونه‌های استاندارد و واقعی، پاسخ‌های DPV و SWV کاهش یافت. اندازه‌گیری‌های الکتروشیمی با دیگر پروتئین‌های مخلوط شده با نمونه‌ها نیز انجام شد که ویژگی و حساسیت بالایی برای این ایمونوسنسور در تشخیص HSA را نشان دادند. در شرایط بهینه، ایمونوسنسور می‌تواند، HSA را در طیف خطی بالایی (از ۲/۵ تا ۲۰۰ $\mu\text{g/mL}$) اندازه‌گیری کند و دقت اندازه‌گیری آن 25ng/mL است.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، روشی آسان و جدید، با استفاده از ایمونوسنسورهای رقابتی برای تشخیص آلبومین در نمونه‌های ادرار ابداع شد. این راهبرد می‌تواند بهبود یافته و برای اندازه‌گیری آنتی ژن‌های دیگر به کار رود.

واژگان کلیدی: ایمونوسنسور، آلبومین، نانو ذره طلا، پلی وینیل الکل

این مقاله ترجمه مقاله‌ای است که در مجله Biosensors and Bioelectronics 26(2011)4177-4183 به چاپ رسیده است.

۱- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

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

مقدمه

پیشرفت بیوسنسورها برای تشخیص سریع و حساس، عامل مهمی در شناخت آنالیت‌های موجود در نمونه‌های زیستی است. ایمونوسنسورها، بیوسنسورهایی هستند بر پایه برهمکنش ویژه بین آنتی‌بادی و آنتی ژن که کاربردهای مفیدی در زمینه‌های پزشکی و علوم پایه دارند [۱، ۲].

در این مطالعه، یک ایمونوسنسور الکتروشیمیایی بر پایه آنتی‌بادی نشاندار شده با نانوذره طلا به منظور شناسایی آلبومین ادراری با حساسیت مورد نیاز طراحی گردیده است. آلبومین با وزن مولکولی ۶۷ هزار دالتون بیشترین پروتئین پلاسماست که مسؤول فشار اسمزی خون است. عمل بنیادی آلبومین تنظیم حجم خون و فشار اسمزی، به علاوه انتقال مولکول‌های مختلفی همچون هورمون‌ها، اسیدهای چرب، داروها، بیل‌روبین و ویتامین‌ها می‌باشد [۳، ۴].

در یک شخص سالم، تنها نسبت کوچکی از کل پروتئین دفع شده در ادرار، آلبومین است. اما در اکثر بیماری‌ها، افزایش نسبت آلبومین در ادرار مشاهده می‌گردد که آلبومینوری نامیده می‌شود [۴]. به عبارت دیگر، آلبومینوری شاخص آسیب گلوبمرول است و همچنین به عنوان عامل خطر مستقل نیز شناخته شده است که نشانه‌ای برای پیشرفت هر دو بیماری کلیوی و قلبی-عروقی در جمعیت عمومی و افراد دیابتی است.

به علاوه، افزایش آلبومین ادراری ممکن است با فشار خون، بعضی ناهنجاری‌های لیبیدی، اختلالات ایمنی، ورزش شدید، خون در ادرار، عفونت مجاری ادراری، دهیدراسیون و درمان‌های دارویی خاص مرتبط باشد [۵، ۶].

میزان غیر عادی دفع آلبومین به طور کلی با روش‌های ویژه‌ای چون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و ایمونواسی اندازه‌گیری شده که برابر با $30 \text{ mg}/24 \text{ h}$ یا $(20 \mu\text{g}/\text{min})$ است. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی مایع اسپکترومتری جرمی (LC-Mass) چندین تکنیک اندازه‌گیری با حساسیت بالا برای تعیین آلبومین ادراری هستند.

بیشتر روش‌های معمولی برای آنالیز آلبومین ادراری بر پایه ایمونواسی است. روش‌های ایمونوتوربی دایمتری^۱

فلوروایمونواسی^۲، الایزا^۳ و رادیوایمونواسی^۴ از جمله روش‌های ایمونواسی بوده که بر اندازه‌گیری کمی آلبومین ادراری بنا شده‌اند [۵-۱۱]. بنابراین این روش‌ها اغلب نیازمند یک واکنش طولانی مدت، معرف‌ها و وسایل ویژه هستند و مراحل گوناگونی را در بر می‌گیرند.

در موارد اورژانس، بیوسنسورها می‌توانند به عنوان یک روش ایده آل مورد استفاده قرار گیرند. برتری‌های این روش شامل پاسخ سریع، حساسیت بالا، کارایی ویژه، هزینه کم و تفسیر و استفاده آسان آن است [۱۲، ۲، ۱].

هدف این مطالعه توسعه ایمونوسنسورهای الکتروشیمیایی یکبار مصرف برای تشخیص آلبومین ادراری است که بر اساس تغییر سطح الکتروود کار از جنس کربن با پلی وینیل الکل (PVA) و استفاده از نانو ذره طلا (AuNP) بنا نهاده شده و اندازه‌گیری سریع و حساس آنالیت‌ها در مایع زیستی را امکان‌پذیر می‌سازد.

در این روش اساس شناسایی نیز بر پایه واکنش آنالیت با آنتی‌بادی خاص کونژوگه با نانو ذره‌های طلا بنا گردیده است. با استفاده از خاصیت اکسیداسیون-احیای نانو ذره‌های طلا (AuNPs) در محیط اسیدی، امکان اندازه‌گیری نانو ذرات و در واقع آنالیت موجود در نمونه امکان‌پذیر می‌گردد. سیگنال الکتروشیمیایی تولید شده بعد از اکسیداسیون نانو ذرات در اسید کلریدریک یک مولار و ولتاژ $1/25$ و زمان 40 ثانیه و در ادامه احیای AuCl_4 با استفاده از روش‌های SWV و DPV اندازه‌گیری می‌شود.

برای ثبت جریان کاتالیتیکی تولید شده توسط اکسید و احیا شدن نانوذره طلا، از روش‌های الکتروشیمیایی همچون ولتامتری چرخه‌ای (CV)، ولتامتری تمایز پالسی (DPV) و ولتامتری امواج مربعی (SWV) استفاده می‌گردد. در این روش‌ها، سیگنال پتانسیل سنجی در حضور نانو ذرات طلا (AuNPs) در پتانسیل مناسبی در محیط اسیدی تولید می‌شود.

در این مطالعه پلی وینیل الکل (PVA) برای تثبیت آلبومین روی سطح الکتروود SPC به عنوان لایه سنسور استفاده شده است. پلی وینیل الکل (PVA) یک پلیمر مصنوعی غیر سمی و سازگار با محیط زیست است و از جمله ویژگی

2- Fluoroimmunoassay

3- ELISA

4- Radioimmunoassay

1- Immunoturbidimetry

روش‌ها

معرف‌ها

تترا کلروئوریک اسید (HAuCl_4)، تری سدیم سیترات، سدیم آزاید، $\text{RPMI}1640$ ، سرم جنینی گوساله (FCS)، استرپتومايسين، پنی‌سيلين، آلبومين سرم گاوی (BSA)، آلبومين سرم انسانی (HSA)، هموگلوبين، ستون پروتئين G و وينيل الكل که همه از Sigma-Aldrich خریداری شده‌اند (St.Louis, MO, USA).

همچنين همه مواد به کار رفته در بافر و مواد شيميايي معدني ديگر از Sigma-Aldrich يا Fluka تهيه شده‌اند. محلول فسفات بافر (PBS) شامل فسفات بافر سالين $0/01M$ ، كلريد سدیم $0/137M$ (NaCl)، كلريد پتاسيم $0/003M$ (KCl) با $\text{pH} 7/5$ می‌باشد. به علاوه، همه مواد شيميايي به همان صورت خريداري شده مورد استفاده قرار گرفتند و همه محلول‌های آبی در آب دو بار تقطير شده تهيه شدند.

دستگاه‌ها

همه اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی توسط پُنتتواستات با یک رابط برای الکترودهای صفحه‌ای و الکترودهای صفحه کربنی که شامل یک الکتروده کار گرافیتی مدور با قطر 3mm ، یک الکتروده رفرنس Ag/AgCl و یک الکتروده گرافیتی شمارشگر می‌باشد، انجام شد. به منظور محدود کردن منطقه واکنش سل الکتروشیمیایی تفلن تک قسمتی با حفره‌ای به قطر 5mm (حجم $50\mu\text{l}$) طراحی گردید. همه سانتی‌فیوژها توسط دستگاه سانتی‌فیوژ Beckman انجام شد. میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) برای نانوذره طلا و تعیین تغییرات الکتروده بکار گرفته شد.

تولید و خالص‌سازی آنتی‌بادی مونوکلونال

لاین سلول هیبریدوما که تولید کننده آلبومین mAb هستند از ادغام لنفوسیت طحال موش و سلول میلوما $\text{sp}2/0$ ساخته شده‌اند [۱۵]. سلول هیبریدوما در 50mL محیط کشت حاوی 3% FCS رشد داده شدند و آنتی‌بادی‌ها از مایع رویی محیط کشت توسط کروماتوگرافی تمایلی روی

های دیگری که برای آن گزارش شده است شامل زنجیره‌های مولکولی انعطاف‌پذیر، چسبندگی عالی به الکترودها و طبیعت رسانا می‌باشد. پلی وینیل الکل (PVA) کاربردهای زیادی در بیومواد، بیوسنسورها، سنسورهای الکتروشیمیایی، بیوتکنولوژی و صنعت غذایی و پزشکی دارد. پلی وینیل الکل (PVA) ویژگی‌های غیرطبیعی را در طول فریز شدن و ذوب شدن ملایم در یک محلول آبی از خود نشان می‌دهد. بعد از فرایند فریز و دفریز شدن، پیوندهای عرضی بین زنجیره‌های PVA به طور فیزیکی توسط پیوندهای نیمه پایدار، ارتباطات ملکولی یا کریستاله شدن ایجاد می‌شود. این ساختار سه بعدی به عنوان ماتریکس مناسبی برای تثبیت ملکول‌های زیستی در تهیه بیوسنسورها مطرح شده است.

در طی فرایند کپسول‌گذاری، مولکول‌های بیولوژی با به دام افتادن در منافذ ماتریکس جامد، تثبیت شده که در طول این فاز برهمکنش‌های ضعیفی همچون پیوند هیدروژنی، نیروهای الکترواستاتیک یا واندروالس بین مولکول‌های بیولوژی و ماتریکس اتفاق می‌افتد [۱۴، ۱۳]. انکوباسیون آنتی‌ژن تثبیت شده با آنتی‌بادی کونژوگه با نانوذره‌های طلا (AuNPs) از طریق سنجش مستقیم انجام شد.

هدف این تحقیق، ترکیب ویژگی‌های مفید نانو مواد و پلی‌مر نارسانا برای گسترش ایمونوسنسور الکتروشیمیایی پروتئینی است. در این بررسی پلی‌مر پلی وینیل الکل (PVA) و نانوذرات طلا (AuNPs) برای طراحی یک ایمونوسنسور الکتروشیمیایی و یکبار مصرف با حساسیت بالا استفاده شده که می‌تواند برای تعیین آلبومین (ALB) ادراری به کار رود.

نانوذرات طلا (AuNPs) با استفاده از تغلیظ شیمیایی به وسیله احیای تترا کلرو یوریک اسید با تری سدیم سیترات به عنوان یک احیا کننده در دمای بالا ساخته شدند. تشکیل کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی HSA روی سطح الکتروده توسط خاصیت اکسید - احیای نانوذرات طلا در محیط اسیدی جستجو شد و توسط CV و DPV نشان داده شد.

الکتروود تغییر یافته کربنی صفحه‌ای (ساخت ایمونوسنسورها)

ساخت ایمونوسنسورهای HSA روی سطح SPCEs مطابق روش زیر انجام شد: در ابتدا وینیل الکل در بافر استات در 70°C به مدت نیم ساعت حل شد تا محلول هموزن وینیل الکل با درصدهای متفاوت به دست آید. سپس HSA با وینیل الکل مخلوط و استیرر شد تا محلولی هموزن به دست آید. مرحله بعد $5\mu\text{l}$ وینیل الکل حاوی HSA (250ng/mL) روی سطح الکتروود قرار داده شد و سپس وینیل الکل تحت شرایط UV به مدت ۲۰ دقیقه پلی‌مریزه گردید. بدین ترتیب پلی وینیل الکل (PVA) حاوی HSA حاصل شد. طبق این پروتکل آنتی‌ژن HSA توسط تله فیزیکی پلی وینیل الکل (PVA) در سطح الکتروود تثبیت گردید. پلی وینیل الکل با هدف افزایش پایداری و قابلیت تکرارپذیری الکتروود اصلاح شده، استفاده شد.

بعد از آن جایگاه‌های اتصال غیر اختصاصی توسط انکوباسیون با PB (0.1M , $\text{pH}=7$) حاوی ۱٪ BSA و توئین ۲۰، ۰/۰۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه در 37°C بلوکه شدند. سپس SPEs توسط PBS و توئین ۲۰، ۰/۰۵٪ شسته شد تا پروتئین‌های باند نشده از سطح الکتروود برداشته شود. متعاقباً $25\mu\text{l}$ از محلول نانوذره طلای کونژوگه شده با Ab در سطح SPCEs پخش شد و الکتروودها برای ۳۰ دقیقه در 37°C انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، SPCEs توسط PBS حاوی توئین ۲۰، ۰/۰۵٪ شسته شد تا کونژوگه باند نشده برداشته شود. طرح ۱ تصویر شماتیکی از روند طراحی سنجش را نشان می‌دهد.

روش اندازه‌گیری

بعد از اینکه الکتروود اصلاح شده در سل الکتروشیمیایی قرار داده شد، $50\mu\text{l}$ از محلول HCl یک مولار در سطح SPC ریخته شد. متعاقباً، سیگنال‌های آنالیتیکالی توسط CV و DPV و SWV ثبت گردیدند. اندازه‌گیری‌های CV در محدوده پتانسیلی ۱- تا $1/37$ - در سرعت خوانش 50mv/s انجام شد. برای بررسی‌های DPV و SWV، الکتروود تغییر یافته در پتانسیل ثابت $1/25\text{V}$ برای ۴۰ ثانیه در همان شرایط زمانی نگه داشته شد. به‌علاوه

ستون HiT rap protein G خالص‌سازی گردیدند. آنتی‌بادی‌های جدا شده در مقابل بافر فسفات سالین دیالیز شده و تغلیظ گردید.

سنتز نانوذره طلا

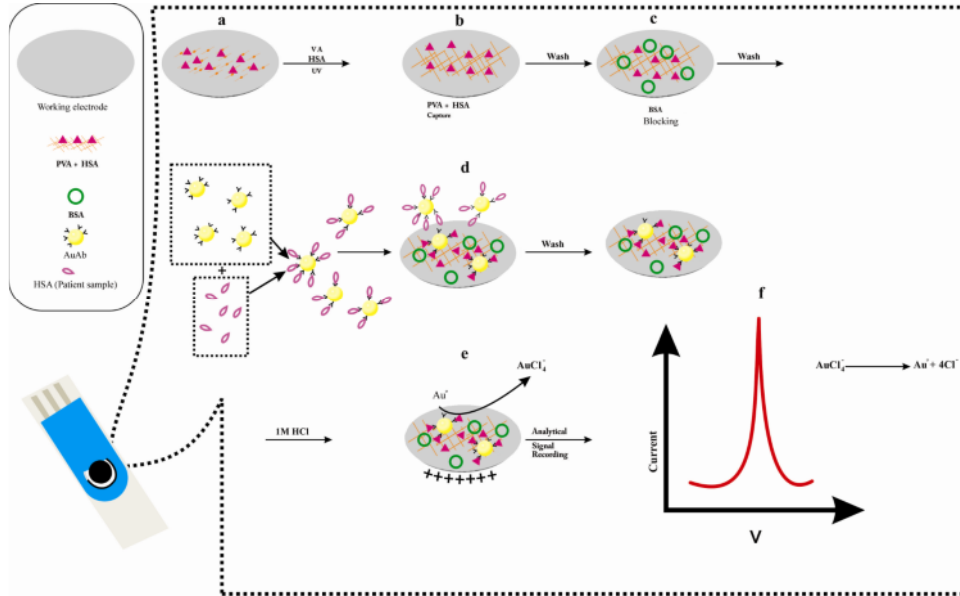
نانوذرات فلزی می‌توانند به طور شیمیایی با احیای نمک فلزی به واسطه یک عامل احیا کننده قوی در محلول سنتز شوند. در این مطالعه سنتز نانوذره طلا با استفاده از فرایند شیمیایی انجام شد. به طور خلاصه، نانوذره‌های طلای 20nm با احیای تتراکلروئوریک اسید (HAuCl_4) توسط سدیم سترات سنتز شدند. به این صورت که 100mL تتراکلروئوریک اسید (HAuCl_4 , $0.01\% \text{w/v}$) را گرم نموده تا بجوشد سپس در حال هم خوردن اسید، محلول تری سدیم سترات ۱٪ به آن اضافه شد. بعد از ۸ دقیقه هنگامی که محلول از رنگ زرد تا قرمز شرابی تغییر رنگ داد در دمای اتاق قرار داده شد تا خنک شود. سپس pH آن با سدیم هیدروکساید (NaOH) غلیظ روی $8/5$ تنظیم و در نهایت سدیم آزاید (w/v) ۰/۰۱٪ به محلول اضافه شد. محلول نانوذره طلای تهیه شده در 4°C و در ظرف شیشه‌ای تیره رنگ برای چندین ماه قابل نگهداری است [۱۶].

کونژوگه آنتی‌بادی - طلای کلونیدی

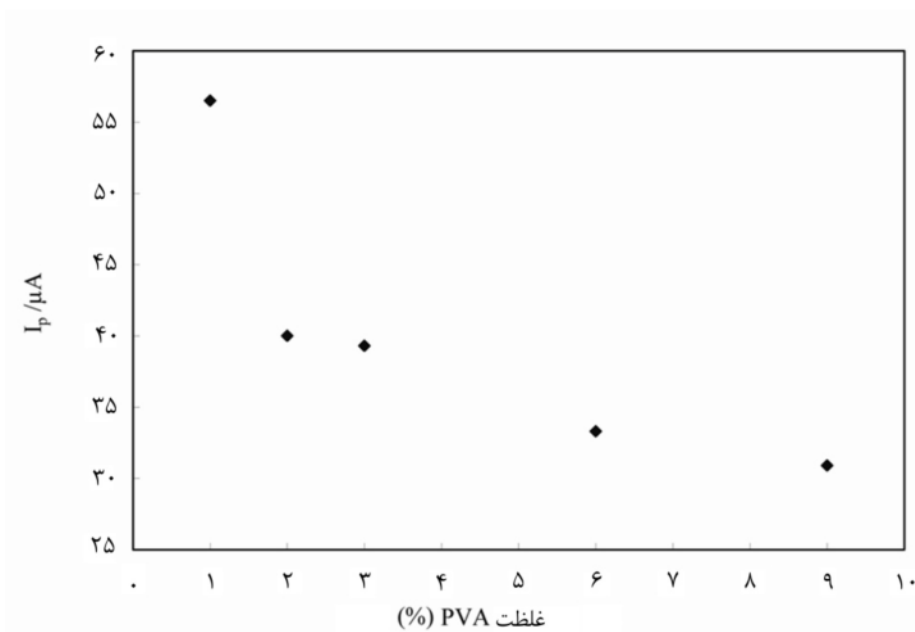
کونژوگه آنتی‌بادی - طلا طبق روش زیر ساخته شد: برای کونژوگه کردن، $300\mu\text{g}$ از $300\mu\text{g/mL}$ HSA mAb حل شده در بافر فسفات، $\text{pH}=7/5$ به 10mL محلول طلای کلونیدی با pH مناسب اضافه شد. مخلوط یک شبانه روز در دمای 4°C استیرر گردید. سپس محلول ۱۰٪ BSA به جهت بلوکه کردن فضای خالی موجود در سطح ذرات طلا به آن اضافه و مجدداً به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق استیرر گردید. سپس در دور 15000g ، به مدت ۴۵ دقیقه و در دمای 4°C سانتریفیوژ و رسوب حاصله در 10mL PBS حاوی $1\% \text{w/v}$ BSA و سدیم آزاید ۰/۰۵٪ حل شد. سانتریفیوژ همانند شرایط قبل دو بار دیگر تکرار شد و سرانجام رسوب نهایی در 10mL PBS حل و در 4°C ذخیره شد [۱۶].

اندازه‌گیری‌های DPV و SWV در محدوده پتانسیلی ۰/۲- تا ۰/۷۷- انجام شدند. تولید جریان کاتدی به صورت سیگنال‌های آنالیتیکالی از اکسید و احیای نانوذره طلا در حضور HCl در مطالعه بیوالکتروشیمیایی ثبت گردید. همه اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی در دمای اتاق انجام شد.

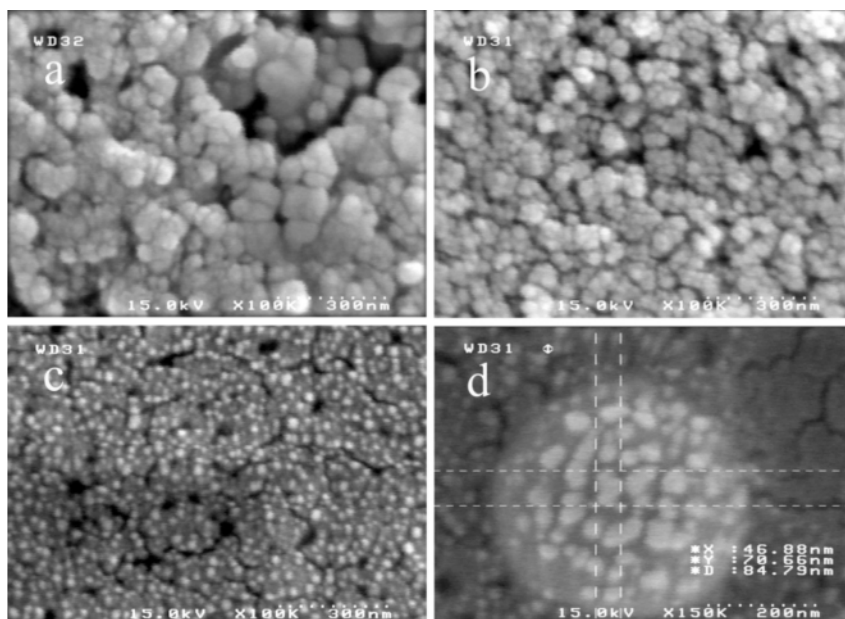
اندازه‌گیری‌های DPV و SWV در محدوده پتانسیلی ۰/۲- تا ۰/۷۷- انجام شدند. تولید جریان کاتدی به صورت سیگنال‌های آنالیتیکالی از اکسید و احیای نانوذره طلا در



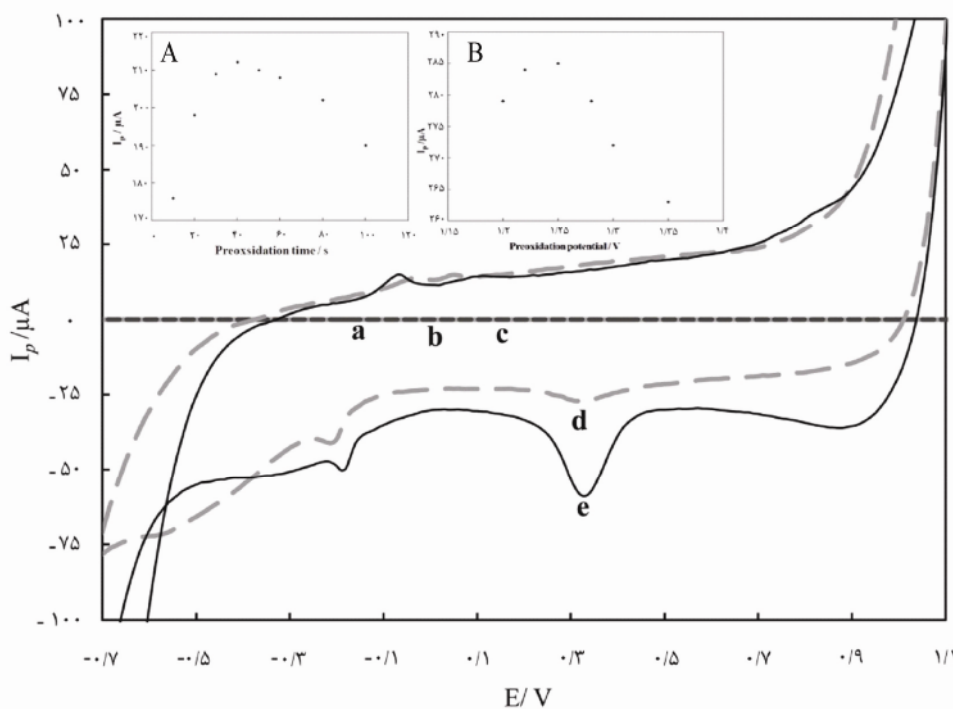
طرح ۱- تصویر شماتیکی از عملکرد ایمونوسنسور الکتروشیمیایی برای تشخیص آلبومین ادراری



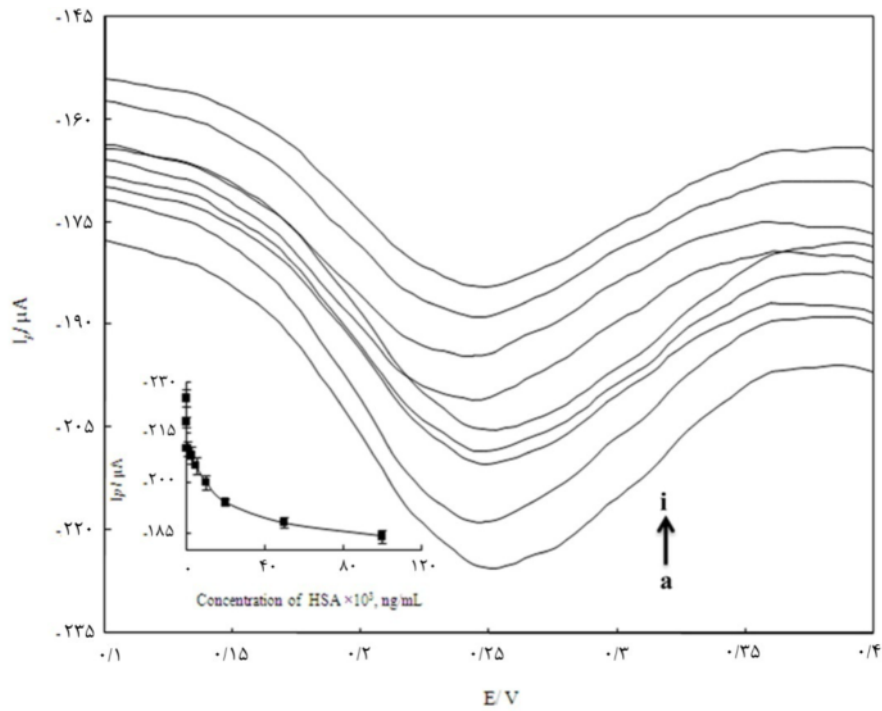
شکل ۱- پاسخ ایمونوسنسور نسبت به غلظت‌های مختلف PVA (۱٪ و ۲٪ و ۳٪ و ۶٪) در حضور HSA



شکل ۲- تصاویر SEM از ایمونوسنسور (a) PVA (b) PVA-HSA (c) الکتروود تغییر یافته PVA-HSA-Ab-AuNPs - (d) توزیع نانوذره طلا بعد از تشکیل Ab-AuNPs



شکل ۳- انواع اشکال الکتروود تغییر یافته در حضور HCl یک مولار در محدوده پتانسیل -۰/۷ تا +۱/۱ ولت. سرعت خوانش: ۵۰ mV/s (a) الکتروود برهنه- (b) PVA (c) PVA-HSA (d) PVA-HSA-AuNP (e) PVA-HSA-Ab-AuNPs و لئاموگرام‌های تمایز پالسی پاسخ الکتروود تغییر یافته برای بهینه سازی زمان الحاق: (a) (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰) ثانیه (b) پتانسیل (۱/۲۲/۲، ۱/۱، ۲۵/۱، ۱/۲۷، ۱/۳۰، ۱/۳۵، ۱/۴۰ ولت)



شکل ۴- ولتاموگرام‌های تمایز پالسی برای تشخیص HSA بر اساس رقت‌های سریالی مختلف آنتی ژن (۱۵۰ و ۱۸۰ و ۲۰۰ μg/mL) و ۸۰ و ۲۰ و ۱۰ و ۲/۵ و ۰/۵ و ۰/۲۵ در HCl یک مولار در سرعت خوانش ۵۰ mV/s. الحاق: منحنی استاندارد HSA در ادرار با استفاده از الکتروود تغییر یافته با PVA.

جدول ۱- مقایسه تعیین غلظت آلبومین ادرار با استفاده از ایمونوسنسور، IT و CLIA. نتایج ارائه شده میانگین ۳ بار آزمون می‌باشند.

نمونه‌ها	روش‌ها			RSD (%)
	ایمونوسنسور (μg/ mL)	IT (μg/ mL)	CLIA (μg/ mL)	
۱	۹/۵	۱۰	۱۰	۵/۲
۲	۲/۵	۲/۶۵	۲/۷۵	۶/۶
۳	۵	۵/۲۵	۵/۱۵	۵/۵
۴	۱۰	۱۰/۵	۱۰	۵
۶	۳۳/۱	۳۵	۳۴/۲	۵/۷
۷	۲۰	۲۰/۶	۲۱	۳
۸	۵۰	۵۲/۲	۵۱/۲	۴/۴
۹	۱۸۰	۲۰۰	۱۸۹	۵/۵
۱۰	۳۷	۳۵	۳۵	۵/۴
۱۳	۶۳/۴	۵۸/۲	۶۰/۲	۸/۲
۱۴	۵۵/۶	۵۱/۲	۵۳/۲	۷/۹
۱۵	۹۷/۲	۸۷	۹۲	۹
۱۶	۱۲۱/۶	۱۲۴	۱۱۴	۱/۹
۱۷	۱۵۰/۱	۱۴۱/۳	۱۴۵/۳	۶

ایمونوتوربی دایمتری: IT؛ کمی لومینومتریکی: CLIA

غلظت آلبومین > ۳۰ μg/mL = طبیعی؛ غلظت آلبومین ۲۹۹-۳۰ = میکروآلبومین یوریا؛ آلبومین < ۳۰ μg/mL = ماکروآلبومین یوریا
 نمونه ادرار با غلظت برابر یا بیشتر از ۱۸۰ μg/mL می‌بایستی رقیق گردند.

یافته‌ها و بحث

مشخصات سطح SPCEs اصلاح شده با PVA

برای اطمینان از سطح الکتروود با سازگاری زیستی مورد نظر و کم شدن جذب غیر اختصاصی، PVA برای تثبیت HSA روی الکتروود در نتیجه سازگاری زیستی و سختی بالا انتخاب شد. برای این هدف غلظت اپتیمم PVA را برای تثبیت آنتی ژن روی سطح الکتروود تعیین کردیم. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای به دست آمده از SPCEs اصلاح شده با غلظت‌های مختلف PVA در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داده‌اند که پاسخ جریان ۱٪ PVA به ترتیب بیشتر از ۲٪ و ۳٪ است. به عبارت دیگر تفاوت پاسخ جریان بین PVA، ۲٪ و ۳٪ ناچیز بود که شاید به علت تشابه در شدت جریان‌شان بود. اگرچه پوشش سطح، پایداری و نگهداری HSA در ۲٪ PVA بهتر از ۳٪ PVA بود. بر اساس این مشاهدات، ۲٪ PVA برای تثبیت HSA و ساخت بیوسنسور انتخاب شد. همه اندازه‌گیری‌های CV در HCl یک مولار و سرعت خوانش ۵۰ mv/s انجام شده. کارایی تثبیت آنتی ژن روی سطح الکتروود در حضور و عدم حضور PVA به طور جداگانه طبق پروتکل امیدفر و همکاران آزمایش شده بود [۱۷].

ما دریافتیم کارایی آنتی ژن تثبیت شده تقریباً ۲۰-۱۵٪ بیشتر از الکتروود برهنه است. این روش، پایداری و کارایی بهتری از یافته‌های Ho و همکارانش در استفاده از الکتروود اصلاح شده PEG داشت [۱۸]. این یافته نشان می‌دهد که لایه PVA روی سطح الکتروود، نه تنها پایداری و تکرارپذیری الکتروود تغییر یافته را بهبود می‌بخشد، بلکه کارایی آنتی ژن تثبیت شده در سطح الکتروود را نیز افزایش می‌دهد و تعداد بیشتری از آبی توپ‌های فعال توسط Ab-AuNP تشخیص داده می‌شود.

بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی

مورفولوژی نانوذره طلا و آنتی‌بادی کونژوگه به سطح نانوذره طلا و مورفولوژی سطح فیلم بیوکامپوزیت الکتروود اصلاح شده توسط بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی مشخص گردید. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از

نانوذره سنتز شده، ذرات کروی را نشان می‌داد که نمایانگر این است که نانوذره طلا در طول فرایند احیای شیمیایی تتراکلروویوریک اسید توسط تری‌سدیم سیترات شکل گرفته است. ساختمان نانوذره طلا توسط فرایند احیا در دمای بالا در آب ایجاد شد. متوسط قطر به دست آمده از ذرات کلونیدی طلا که توسط اندازه‌گیری‌های UV-Vis و آزمایشات میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) به دست آمده حدود ۲۰-۱۸ nm بود [۱۶].

شکل ۲a و ۲c مشخصات SPCEs تغییر یافته با PVA و PVA-HSA و PVA-HSA-AuNPs-Ab به ترتیب در تصاویر SEM نشان داده است. در شکل ۲a ساختار متراکم الکتروود در فقدان PVA نشان داده شده است. ساختار سختی که از HSA نشان داده شده شاخصی از جذب پروتئین پدیدار شده است (شکل ۲b). به علاوه ساختار سه بعدی مناسبی برای هر دو الکتروود PVA-HSA و PVA-HSA در شکل ۲a و ۲b نشان داده شده است. ساختارهای سختی از الکتروود با نظمی ساخته شده از ساختارهای نانو ذره-آنتی‌بادی کونژوگه گلوبولار و شعاعی روی الکتروود تغییر یافته نشان داده شده (شکل ۲c) در حالی که SPCEs تغییر یافته با PVA و PVA-HSA چنین ساختاری را نشان نداده است. افزایش اندازه (۸۰-۶۰ nm) نانو ذرات طلای سنتز شده بعد از اتصال آنتی‌بادی که در تصاویر SEM نشان داده شده موفقیت اتصال mAb به سطوح نانوذرات طلا را تصدیق می‌کند (شکل ۲d).

بررسی ولتامتری چرخه‌ای

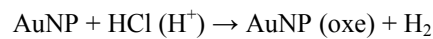
مطالعات پایه‌ای برای ایمونوسنسور HSA به وسیله روش‌های CV انجام شد. همه اندازه‌گیری‌ها در PBS ۰/۰۱ M با pH ۷/۲ در سرعت خوانش ۵۰ mv/s انجام گردید. منحنی a و b در شکل ۳ ولتاموگرام‌های چرخه‌ای از الکتروود برهنه و SPCE تغییر یافته با PVA هستند. این منحنی‌ها هیچ پیککی در روش‌های CV از ولتاموگرام‌های چرخه‌ای نشان ندادند، عمدتاً به علت اینکه PVA یک پلیمر نارسا است و هیچ واکنش اکسایش-کاهش در سطح الکتروود رخ نمی‌دهد. برای اندازه‌گیری جذب غیر اختصاصی، ۲۵ μ l از محلول AuNP بر روی الکتروود PVA-

شد. محلول استاندارد به وسیله رقیق‌سازی محلول ذخیره آلبومین (۱mg/mL) با نمونه‌های طبیعی ادرار آماده شد، تا غلظت‌های نهایی ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۲/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۴۵، ۸۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ μg/mL حاصل شود.

آزمایش‌ها در این روش با قرار دادن ۵ μl از مخلوط غلظت‌های سریالی محلول استاندارد و ۲۰ μl از محلول نانوذره‌های طلا روی سطح الکترودها به دست آمده بود و سپس الکترودهای کار در شرایط پتانسیلی ۱/۲۵+ ولت به مدت ۴۰ ثانیه نگهداری شده و در نهایت اندازه‌گیری‌های DPV در یکی از این ولتاژها، ۰/۷+ ولت و ۰/۲- ولت یا بین آن‌ها با سرعت خوانش ۵۰ mv/s انجام شد (شکل ۴). جریان کاتدی تولید شده به صورت پاسخ الکتروشیمیایی گزارش شده بود. واکنش زمینه با گذاشتن ۵۰ μl از محلول HCl یک مولار روی سطح الکترودها مطابق روش الکتروشیمیایی گزارش شد. پیک جریان DPV با کاهش غلظت HSA در محلول استاندارد و نمونه‌های واقعی برای تشخیص دیابتی و نرمال افزایش یافته است. پاسخ جریان از ۰/۲۵ تا ۲۰۰ μg/mL با حدود تشخیصی ۰/۲۵ μg/mL افزایش یافت (الحاق شکل ۴). طیف خطی ایمونوسنسور طراحی شده، بین ۲/۵ تا ۲۰۰ μg/mL است که در مقایسه با ایمونوسنسورهای الکتروشیمی دیگر طیف خطی گسترده‌تری دارد [۱۸، ۱۹]. اندازه‌گیری با SWV در همان شرایط DPV و شرایط پتانسیل ۱/۲۵+ ولت برای ۴۰ ثانیه انجام شد و سپس اندازه‌گیری‌های SWV یا DPV در ۰/۷+ ولت و ۰/۲- ولت با فرکانس ۱۵ هرتز انجام شد. داده‌های SWV، اثر همان شرایط DPV را نشان داد، که نتیجه‌گیری می‌شود ایمونوسنسور HSA طراحی شده در این مطالعه قابلیت تشخیص آنتی‌ژن با روش‌های الکتروشیمیایی متنوع را دارد.

برای بهینه‌سازی شرایط زمانی و پتانسیل، پارامترهای زیر آزمایش شد. در ابتدا، یک پتانسیل ثابت (۱/۳۷) با توجه به مقالات انتخاب گردید [۲۰]. دوم، اندازه‌گیری DPV در طیف‌های زمانی مختلف از ۲۰ s تا ۱۰۰ s (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰) انجام شد. در نهایت، زمان بهینه بر اساس پیک جریان کاتدی و پتانسیل پاسخ بیوسنسور انتخاب گردید (شکل ۳a). برای انتخاب پتانسیل‌های بهینه

HSA تغییر یافته چکانده و پاسخ جریان ثبت شد. سیگنال ضعیفی از ایمونوسنسور PVA-HSA-AuNPs SPCE مشاهده گردید، که ممکن است به علت برهمکنش غیر اختصاصی بین AuNP و PVA باشد. پیک قوی‌تری در ۰/۳ ولت در حضور نانوذره طلا-آنتی‌بادی روی سطح الکترودها تولید شد (شکل ۳) که به وسیله پراکسیداسیون نانوذره طلا و احیای AuCl در روش‌های الکتروشیمی ایجاد گردیده است. در ۰/۳ ولت نانوذره‌های طلا می‌توانند هیدروژن یونی را به هیدروژن مولکولی طبق مسیر زیر احیا کنند:



به عبارت دیگر افزایش غلظت نانوذره طلا روی سطح الکترودها باعث افزایش پیک کاتدی جریان در روش‌های CV می‌شود، جایی که نشان می‌دهد نانوذرات طلا با قابلیت رسانایی بالا می‌توانند انتقال الکترون از سطح به الکترودها را افزایش دهند. علاوه بر این، احیای هیدروژن یونی دلیلی بر انتقال الکترون در سل الکتروشیمیایی است و همچنین علت دومی برای افزایش جریان در ایمونوسنسور در حضور نانوذرات طلا است. این نتایج نشان می‌دهد که ایمونوسنسور ممکن است به غلظت نانوذرات طلای تثبیت شده روی سطح الکترودها وابسته باشد.

روش‌های ولتامتری تمایز پالسی و ولتامتری امواج مربعی (روش آنالیتیکالی برای تشخیص HSA)

پاسخ ایمونوسنسور HSA بر پایه واکنش آنتی ژن و کوئزوگه آنتی‌بادی- نانوذره طلا می‌باشد. شدت جریان توسط افزایش اثر متقابل بین HSA آزاد در غلظت‌های بالای نمونه استاندارد و واقعی کاهش خواهد یافت و این کاهش بین کوئزوگه آنتی‌بادی- نانوذره طلا با آنتی ژن تثبیت شده مقایسه شد. در اینجا، اکسیداسیون نانوذره طلا در پتانسیل بالا، و دناتوره مولکول‌های زیستی در شرایط اسیدی بالا به‌طور همزمان انجام شد. بنابراین جداسازی سطح بیوکامپوزیت، ناحیه بزرگی که از نظر الکتریکی فعال است را برای اکسیداسیون یون‌های طلا فراهم می‌کند تا کارایی در طول روش‌های SWV و DPV را کاهش دهد. آنالیزهای کمی به وسیله روش‌های SWV و DPV با غلظت‌های مختلف HSA انجام

اطمینان ایمونوسنسور طراحی شده توسط انجام آزمایش در نمونه‌های ادراری ۲۴ ساعته و مقایسه نتایج آن با روش‌های ایمونوتوربی دایمتری IT و کمی لومینومتری (CLIA) بررسی گردید (جدول ۱). در این مطالعه ایمونوسنسور و IT را استفاده کردیم تا ۱۷ نمونه ادرار افراد دیابتی و کنترل را تست کنیم. افزایش در جریان پیک DPV با کاهش غلظت‌های HSA هم در نمونه‌های اصلی افراد طبیعی و هم افراد دیابتی مشاهده گردید (جدول ۱). انحراف استاندارد نسبی (RSDs) بدست آمده از سه اندازه‌گیری تکرار شده برای نمونه‌های دیابتی و کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که هر دو روش، انطباق معناداری در تشخیص دارد.

در نتیجه ایمونوسنسور HSA بر پایه PVA و کونژوگه AuNP-Ab یک ایمونوسنسور رقابتی است. در سل الکتروشیمیایی، HSA تثبیت شده و آزاد در محلول استاندارد و نمونه اصلی (شخص نرمال و دیابتی) برای واکنش متقابل با کونژوگه AuNP-Ab رقابت می‌کنند. اگر غلظت HSA در نمونه پایین باشد، باعث می‌شود که سطح بالایی از کونژوگه AuNP-Ab با HSA تثبیت شده روی سطح الکتروود برهمکنش کند، که منجر به افزایش پاسخ جریان در DPV یا SWV گردید. از طرف دیگر، اگر غلظت HSA در نمونه بالا باشد، باعث سطح بالایی از برهمکنش کونژوگه AuNP-Ab با HSA آزاد در سل الکتروشیمیایی می‌شود که منجر به کاهش نانوذره طلا روی سطح الکتروود و نهایتاً کاهش جریان در هر دو روش الکتروشیمیایی DPV یا SWV می‌گردد. علاوه بر این، نتایج داده‌های مربوط به ایمونوسنسور رقابتی HSA بر اساس نانو مواد بدست آمده نشان می‌دهد که ایمونوسنسور HSA، یک ایمونوسنسور بهینه شده و توسعه یافته و با ویژگی بالا و فعالیت بلند مدت 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.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

ایمونوسنسور در طیف‌های مختلف پتانسیل از ۱/۲۷ تا ۱/۴۷ (۱/۲، ۱/۲۲، ۱/۲۵، ۱/۲۷، ۱/۳۰، ۱/۳۵ و ۱/۴۰ ولت) آزمایش شد و پتانسیل ۱/۲۵ ولت به عنوان پتانسیل بهینه برای بررسی DPV ایمونوسنسور انتخاب گردید (شکل ۳b). به منظور بدست آوردن حداکثر حساسیت الکتروشیمی، غلظت بهینه آنتی‌ژن کوت شده (HSA) و Ab-AuNPs لازم است. در این مطالعه، از الیقای رقابتی مستقیم همراه با آزمایش چکربرد برای بدست آوردن این غلظت بهینه استفاده گردید.

بنابراین، غلظت مناسب HSA و Ab-AuNPs به صورت زیر آماده شد: ابتدا، غلظت‌های مختلف HSA (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ نانوگرم) در PVA تثبیت و روی سطح الکتروود چکانده شد. مقدار مناسب آنتی‌ژن برای سنجش، ۲۵۰ نانوگرم تعیین گردید. سپس حجم‌های مختلف Ab-AuNPs برای آماده‌سازی ایمونوسنسور، آزمایش شد. نتایج نشان داد که مقدار بهینه Ab-AuNPs، ۲۰ μL است. غلظت‌های بهینه واکنشگر تعیین گردیدند. به طوری که این غلظت‌ها، سیگنال جریان ماکزیمم حدود ۲۰۰-۲۲۰ μA را در غیاب آنالیت با حداقل مصرف واکنشگر نشان دادند. زمان‌های مختلف انکوباسیون (۲۰ تا ۶۰ دقیقه) به منظور بدست آوردن زمان بهینه، ارزیابی شد. ماکزیمم جریان تولید شده در ۳۰ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه حاصل شد. در این مطالعه زمان کل بدست آمده برای تکمیل سنجش تقریباً ۸۰ دقیقه بود در حالی که روش‌های دیگر نیاز به زمان بیشتری دارد [۱۹،۲۰].

ویژگی و اطمینان ایمونوسنسور

ویژگی سنجش به وسیله مطالعه‌ای، آزمایش گردید که در آن، اوره (۱ mol/L)، کراتینین (۱۰ g/L)، هموگلوبین انسان (۱۰ mg/L)، ایمونوگلوبین انسان (۱۰ mg/L)، گلوکز (۲۰ mg/L)، تتراسایکلین (۲۰۰ mg/L) و استامینوفن (۲۰۰ mg/L) به نمونه ادرار حاوی آلبومین (۲۰ mg/L) اضافه گردید. توجه شود که همه این مواد در غلظت‌هایی استفاده شدند که بالاتر از غلظت ماکزیمم در نمونه‌های کلینیکی بودند. دریافتیم که هیچ یک از سوبستراهای بالا با نتایج ایمونوسنسور HSA تداخل ندارد.

مأخذ

1. Wei Q, Li T, Wang G, Li H, Qian Z, Yang M. *Biomaterials* 2010; 31: 7332-7339.
2. Yang M, Li H, Javadi A, Gong S. *Biomaterials* 2010; 31: 3281-3286
3. Buttris CA, Ashwood ER. *Tietz textbook of clinical chemistry*, third ed 1999; Sanders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
4. Datta P, Dasgupta A. *J Clin Lab Anal* 2009; 23: 314-318.
5. Matheson ADP, Willcox M, Flanagan JJ, Walsh B. *Diabetes Metab Res Rev* 2010; 26: 150-171.
6. Romundstad S, Holmen J, Hallan H, Kvenild K, Kruger Q, Midthjell K. *J Intern Med* 2002; 252: 164-172.
7. Contois JH, Hartigan CV, Rao L, Snyder LM J, Thompson M. *ClinicaChimica Acta* 2006; 367: 150-155.
8. Comper WD, Osicka TM, Clark M, Macisaac RJ, Jerums G. *Kidney Int* 2004; 65: 1850-1855
9. Hoffmann MM, Bugert P, Seelhorst U, Wellnitz B, Winkelmann BR, Boehm O, März BW. *Clin Chem* 2007; 53: 540-542.
10. Shaikh A, Seegmiller CJ, Borland MT, Burns EB, Ladwig MP, Singh JR, Kumar R, Larson TS, Lieske JC. *Clin Chem* 2008; 54:1504-1510.
11. Townsend JC. *Clin Chem* 1986; 32/7: 1372-1374.
12. Piro B, Zhang QD, Reisberg S, Novel V, Dang LA, Duc HT, Pham MC. *Talanta* 2010; 82: 608-612.
13. Tsai YC, Huang JD, Chiu CC. *Biosens Bioelectron* 2007; 22: 3051-3056
14. Yu JJ, Zhao FQ, Zeng BZ. *J Solid State Electrochem* 2008; 12: 1167-1172
15. Omidfar K, Kashanian S, Paknejad M, Kashanian S, Larijani B, Roshanfekar H. *Hybridoma* 2007; 26: 217-222.
16. Omidfar K, Kia S, Kashania S, Paknejad M, Besharatie A, Kashanian S, Larijani B. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 160(3): 843-55.
17. Omidfar k, Rasae MJ, Zaraee AB, Amir MP, Rahbarizadeh F. *J Immunoass Immunoch* 2002; 23: 385-398
18. Ho JA, Chang HC, Shih NY, Wu LC, Chang YF, Chen CC, Chou C. *Anal. Chem* 2010; 82: 5944-5950.
19. Bonel L, Vidal JC, Duato P, Castillo JR. *Anal Methods* 2010; 2: 335-341.
20. Idegami K, Chikae M, Kerman K, Nagatani N, Yuhi T, Endo T, Tamiyae E. *Electroanalysis* 2008; 20:14 – 21.