

## طراحی بیوسنسور الکتروشیمیایی برای تشخیص ۳- هیدروکسی بوتیرات مبتنی بر کوفاکتور تثبیت شده در سطح نانولوله‌های کربنی عامل دار و الکتروود نواری (Screen Printed) اصلاح شده با آن

ارغوان گلباز حق<sup>۱</sup>، زهرا میرزایی‌زاده<sup>۱</sup>، فهیمه خورسند<sup>۱</sup>، مائده درزینی عزیزی<sup>۱</sup>، کبری امیدفر<sup>۱\*</sup>

### چکیده

**مقدمه:** ۳- هیدروکسی بوتیرات، یکی از عمده اجسام کتونونی بدن می‌باشد که شاخصی مهم در تشخیص کتواسیدوز دیابتی در نظر گرفته شده است. بیوسنسورهای طراحی شده برای ردیابی ۳- هیدروکسی بوتیرات بخاطر دقت، سهولت و عملکرد سریع، توجه زیادی را به خود جلب کرده است.

**روش‌ها:** این مطالعه سعی در توسعه بیوسنسورهای مبتنی بر ۳- هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز است به طوری که از نانولوله‌های کربنی تک دیواره (SWCNT) برای تثبیت کوفاکتور،  $NAD^+$ ، بر سطح الکتروود نواری استفاده شده است. تشکیل کونژوگه  $NAD^+$ -SWCNT با الکتروشیمی و میکروسکوپ الکترونی سنجیده شده و از ولتامتری چرخه‌ای برای آنالیز عملکرد الکتروشیمی بیوسنسور استفاده گردیده است. با این روش، عمر مفید و قابلیت اطمینان بیوسنسور پیشنهادی برای آنالیز نمونه واقعی تأیید شد.

**یافته‌ها:** کاهش قابل توجه پتانسیل اکسیداسیون الکتروشیمی  $NADH$  به  $15V$ - را می‌توان از ویژگی‌های برجسته این بیوسنسور مطرح کرد. این بیوسنسور قابلیت تشخیص ۳- هیدروکسی بوتیرات را در یک دامنه خطی از  $0.01$ - $0.1$  mM با حد تشخیص پایین  $0.09$  mM دارد. استفاده همزمان از الکتروود نواری و SWCNT باعث تمایز این بیوسنسور شده به طوری که چشم اندازه‌های جدیدی را برای تشخیص دیگر متابولیت‌های مهم بالینی باز می‌کند.

**نتیجه‌گیری:** بیوسنسور پیشنهادی از مزیت‌های الکتروشیمیایی نانولوله‌های کربنی تک دیواره بهره برده است. پتانسیل پایین اکسیداسیون  $NADH$ ، پایداری ذخیره‌سازی بیشتر و حد تشخیصی کمتر از طریق استفاده از چنین نانولوله‌هایی به دست آمده است. با در نظر گرفتن مزیت پیوند کووالانسی  $NAD^+$  به CNT، اضافه کردن  $NAD^+$  به ازای هر واکنش، در هر اندازه‌گیری نیاز نمی‌باشد. به همین خاطر از لحاظ اقتصادی با صرفه‌تر است.

**واژگان کلیدی:** بیوسنسور، ۳- هیدروکسی بوتیرات، نانولوله‌های کربنی تک دیواره، الکتروود نواری

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 دانشگاه علوم پزشکی تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷، تلفن: ۸-۰۳۷-۸۸۲۲۰۰۲۱، نمابر: ۰۲۱-۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: [omidfar@tums.ac.ir](mailto:omidfar@tums.ac.ir)

## مقدمه

بیوسنسورها به ویژه بیوسنسورهای الکتروشیمیایی توجه زیادی را به خاطر توانایی سریع در آنالیز آنالین و حساسیت بالا به خود اختصاص داده‌اند. خواص ویژه اجزای زیستی از جمله آنزیم‌ها و پروتئین‌ها در امر شناسایی و همچنین مزیت‌های روش‌های الکتروشیمیایی، باعث پیشرفت بیوسنسورهای الکتروشیمیایی شده است [۱]. استفاده از بیوسنسورها در پزشکی، همزمان با توسعه الکتروود در تشخیص گلوکز در دهه ۱۹۶۰ می‌باشد [۲]. از آن زمان به بعد تلاش‌های بسیاری برای توسعه انواع مختلف بیوسنسور به منظور مدیریت بیماری‌ها شده است [۳].

از اهداف اصلی تکنولوژی بیوسنسور در سال‌های اخیر، کنترل گلوکز و اجسام کتون در بیماران دیابتی است. آزمایش کتون خون می‌تواند به عنوان یک روش مفید برای تشخیص هایپرگلیسمی ساده و کتواسیدوز خطرناک در نظر گرفته شود. سطوح ۳-هیدروکسی بوتیرات (۳-HB)، یکی از ترکیبات اصلی کتون خون، بین ۱-۳mM در هایپرگلیسمی و بالای ۳mM در کتواسیدوز دیابتی (DKA) و با غلظت پائین‌تر از ۱mM در افراد سالم تعریف شده است. علاوه بر این، نسبت بین ۳-هیدروکسی بوتیرات و استوئاتات-دیگر جسم مهم کتون خون- در DKA به میزان بالای ۱۰:۱ می‌رسد. از این رو تعیین سطح ۳-هیدروکسی بوتیرات اهمیت زیادی در مدیریت DKA دارد [۴،۵]. روش‌های مرسوم در تشخیص ۳-هیدروکسی بوتیرات از جمله کروماتوگرافی، ایزوتوپی و سنجش‌های اسپکتروفتومتری بسیار وقت‌گیر و نیاز به وسایل گران‌قیمت و تکنسین‌های با تجربه دارد [۶-۸]. با در نظر گرفتن روش‌های قبلی و مزیت‌های چشم‌گیر بیوسنسورها در تشخیص انواع مختلف متابولیت‌ها، توجه زیادی به سمت تکنولوژی بیوسنسور شده است. اکثر بیوسنسورهای آمپرومتریک که برای تشخیص الکتروشیمی ۳-هیدروکسی بوتیرات توسعه یافته‌اند، بستگی به واکنش آنزیمی ۳-هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز دارند [۹-۱۲]. همانند دیگر بیوسنسورهای مبتنی بر دهیدروژناز، ۳-هیدروکسی بوتیرات از کوآنزیم-پیریدین [NAD(P+)] به عنوان پذیرنده الکترون استفاده می‌کند. چنین بیوسنسورهایی مبتنی بر تشخیص آندی NADH هستند که

باعث تخلیه اکسیژن در واکنش آنزیمی و ممانعت از دخالت اکسیژن در مراحل تشخیص می‌شوند [۱۳،۱۴]. تشخیص غیرمستقیم اکسیداسیون NADH بر سطح الکتروود با به کار بردن حد واسط‌های شیمیایی انتقال الکترون در فرایند بیوسنسوری است. با این وجود، تداخل مواد فعال الکتریکی و بازدارندگی آنزیمی توسط واسطه‌گرها از دیگر معایب روش تشخیص غیرمستقیم است [۹،۱۱]. از طرفی تشخیص مستقیم اکسیداسیون NADH از طریق سنسور پروتوتایپ ایریدیوم تغییر یافته، اجرا شد [۱۲]. با این حال، این روش نیاز به پردازش‌های پیچیده، آزمایشگاه‌های مجهز و پرسنل متخصص دارد. احیا موثر کوفاکتور NAD<sup>+</sup> از فرم احیا شده، NADH، با پیشرفت بیوسنسور بیوآنزیمی سنجیده شد. این بیوسنسور با تثبیت همزمان هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز با سالیلات هیدروکسیلاز در الکتروود کلارک ساخته شد [۱۰]. از آنجایی که این روش بر پایه کاربرد دو آنزیم است، پیچیدگی و ارزش سیستم افزایش یافت. نداشتن حساسیت به خاطر ناپایداری آنزیم در طول زمان، از معایب این چنین سیستم‌هایی است.

برای توسعه وسایل بیوآنالیتیکی تغییر یافته با انواع مختلف نانوذره، تلاش‌های بیشتری باید صورت گیرد [۱۵]. در بیوسنسورهای الکتروشیمیایی، اتحاد نانوذرات با الکترودهای کربنی برهنه با قابلیت هدایت پایین، می‌تواند تشخیص را با افزایش حساسیت و پایداری سیستم آسان کند [۱۶-۱۸]. توجه زیادی برای بهبود عملکرد بیوسنسورهایی با نانولوله‌های کربنی (CNT) در تشخیص NADH و پراکسید هیدروژن شده است. تشخیص وسیع و افزایش سیگنال با استفاده از CNT بر سطح الکتروود باعث ایجاد سطح وسیع، ولتاژ پایین و کینتیک سریع الکتروود می‌شود. با این وجود حالیت پایین CNT در حلال، استفاده از آن را گسترده کرده است. چندین روش برای عامل‌دار کردن CNT به صورت کووالانی و غیر کووالانی معرفی شده که علاوه بر این که بر چنین مشکلاتی فائق گردیده، باعث بهبود خواص الکتروشیمیایی هم شده است [۱۹-۲۱]. حائز اهمیت است که CNT عامل‌دار می‌تواند از تثبیت اجزای زیستی در سیستم‌های پایدارتر محافظت کند [۲۲-۲۳]. در این مطالعه، علاوه بر ایجاد گروه‌های اسیدکربوکسیلیک، CNT با

### تهیه SWCNT های عامل دار

جزئیات کامل عامل دار سازی SWCN در گزارش قبلی [۲۹] توضیح داده شده است. به طور خلاصه، SWCNTs (۵mg) در ۱۰ ml از محلول ۶۵٪ HNO<sub>3</sub> به مدت ۵ ساعت در دمای ۴۰°C سونیکیت شد. محتوا به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰rpm سانتریفوژ و به طور مرتب با آب مقطر و بافر فسفات پتاسیم (pH ۷) شستشو داده شد. شستشو تا زمانی ادامه داشت که بافر SWCNT در pH ۷ ثابت ماند، سپس خشک و تا زمان استفاده ذخیره شد. این روند باعث قطعه قطعه شدن و کربوکسیلاسیون SWCNT شد.

### تهیه کونژوگه SWCNT-NAD<sup>+</sup>

کونژوگه SWCNT-NAD<sup>+</sup> با پیوندهای کووالان به کمک ۱-اتیل-۳-(۳-دی متیل آمینو پروپیل) کربودی ایمید (EDC) و N-هیدروکسی سوکسین ایمید (NHS) آماده شد. به طور خلاصه، SWCNT های عامل دار شده در دی متیل فرمامید (DMF) (۲mg/ml) پخش شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سونیکیت شد. ۵ mg N-هیدروکسی سوکسینامید (NHS) و ۱ mg از ۱-اتیل-۳-(۳-دی متیل آمینو پروپیل) کربودی ایمید (EDC) به ۲۰۰ μl از محلول SWCNT اضافه شد و ۳ ساعت در یخچال تحت حرکت بود. ۳۰۰ μl از محلول ۳۰mM NAD<sup>+</sup> با محلول ذکر شده مخلوط شد و ۲۰ ساعت تحت حرکت قرار داده شد. به منظور حذف اضافی NAD<sup>+</sup>، محلول با دور ۱۳۲۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ شد و دو مرتبه با بافر فسفات شستشو شد (pH ۷/۵). کونژوگه NAD<sup>+</sup>-SWCNT در یخچال ذخیره شد.

### تهیه بیوسنسور ۳-هیدروکسی بوتیرات

بیوسنسور با ریختن ۴ μl از کونژوگه SWCNT-NAD<sup>+</sup> پراکنده شده در بافر فسفات (pH ۷/۵) بر سطح الکتروود تهیه شد. الکتروود حاصل در ۴°C خشک شد و سطح SWCNT-NAD<sup>+</sup> با ۱/۲U از ۳-هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز پوشانده و در ۴°C قرار داده شد تا خشک شود. برای اطمینان از آمادگی NAD<sup>+</sup>، دوباره ۲ μl از SWCNT-NAD<sup>+</sup> بر لایه آنزیمی قرار داده شد.

تیمارهای اسیدی به عنوان روشی وسیع برای عامل دار کردن، اکسید شد. اتصال کووالان NAD<sup>+</sup> به CNT با استفاده از اتصال عرضی معروف ۱-اتیل-۳-(۳-دی متیل آمینو پروپیل)-کربودی ایمید (EDC) [۲۲] انجام شد تا NAD<sup>+</sup> را بر سطح الکتروود نواری کربن (SPCE) تثبیت کند. سپس هیدروکسی بوتیرات بر روی الکتروود تغییر یافته گذاشته شد. SPCE یک سنسور مینیاتوری است که دارای الکترودهای کار، مرجع و کمکی در یک چیپ واحد است. قیمت ارزان، اندازه کوچک و سهولت استفاده از دیگر مزیت های این الکتروود تغییر یافته با تکنولوژی الکتروود نواری است [۲۴]. علاوه بر این از دیگر خواص برجسته این نوع سنسور، امکان تغییر سطح الکتروود با نانوذرات، پلیمرها و مولکول های زیستی است، و انتخاب خوبی برای ساخت بیوسنسور در این مطالعه است [۲۸-۲۵]. در مطالعه گذشته [۲۹] برای تشخیص ۳-هیدروکسی بوتیرات، از SPCE به همراه نانولوله های کربنی تک دیواره (SWCNT) استفاده کردیم به طوری که SWCNT باعث انتقال کربن و کاهش پتانسیل اکسیداسیون NADH شد. در این مطالعه به منظور کارآمدی بیشتر، از SWCNT برای نگهداری NAD<sup>+</sup> در اتصال کووالان مولکول های CNT استفاده شده است. لذا، اضافه کردن NAD<sup>+</sup> برای تمام تست های الکتروشیمیایی ضرورتی نداشته و تنها اولین قطره از NAD<sup>+</sup> کونژوگه با SWCNT، بر سطح الکتروود کاری، برای چندین تست الکتروشیمیایی کافی است. شکل ۱ مراحل متوالی را در ساخت بیوسنسور نشان می دهد.

### روش ها

#### مواد شیمیایی

نانولوله های کربنی تک دیواره (SWCNT) با ضخامت ۱-۲nm از Neutrino خریداری شدند. ۳-هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز (۴۰۰U/mg)، NAD<sup>+</sup>، ۳-هیدروکسی بوتیرات، N-هیدروکسی سوکسینامید (NHS) و ۱-اتیل-۳-(۳-دی متیل آمینو پروپیل) کربودی ایمید (EDC) از سیگما و دیگر مواد شیمیایی از شرکت های معتبر تهیه شدند.

$1645\text{cm}^{-1}$  تشکیل گروه‌های C=O در انتهای لوله‌ها را نشان می‌دهد. باندهای موجود در ۳۴۱۸ تا ۱۳۸۰ می‌توانند به ترتیب به کشش O-H در اسید کربوکسیلیک یا گروه‌های الکلی و اثر متقابل خمش O-H و کشش C-O در گروه‌های فنلی نسبت داده شود. وجود باندهای مذکور عامل کربوکسیل SWCNT را تأیید کرده که برای اتصال کووالان  $\text{NAD}^+$  ضروری و لازم است [۳۲، ۳۳].

مزایای اکسیداسیون الکتروشیمیایی NADH روی الکتروده تغییر یافته CNT از جمله کاهش پتانسیل اکسیداسیون NADH و عدم رسوب روی سطح الکتروده، منجر به کاربرد وسیع CNT در بیوسنسورهای مبتنی بر دهیدروژناز شده است [۳۴]. بنابراین، اکثر این مطالعات، فقط شکل آزاد و فعال  $\text{NAD}^+$  در محلول را به کار گرفته است. گزارشات مربوط به اتصال مستقیم  $\text{NAD}^+$  به نانولوله‌های کربنی بسیار نادر است مثل اتصال غیر کووالان  $\text{NAD}^+$  به نانولوله‌های کربنی چند دیواره (MWCNT) توسط Zhou و همکاران [۳۵] و مطالعه اخیر دیگر که در آن  $\text{NAD}^+$  به طور کووالانی به MWCNT با تشکیل باندهای آمیدی به کمک EDC و NHS متصل شده بود [۳۶]. مطالعه اخیر از مزایای استفاده از مواد کوآنزیم عامل‌دار سود برده است. بر این اساس، ما این روش را برای بهبود کونژوگه SWCNT- $\text{NAD}^+$ ، غلبه بر پتانسیل بالای اکسایش NADH و همچنین هزینه بالای ناشی از مصرف اضافی  $\text{NAD}^+$  به کار بردیم. بعد از تیمار اسیدی، SWCNT دارای گروه‌های عاملی همچون COOH- و OH- می‌شود، که از این خاصیت برای تثبیت استفاده شد [۳۷، ۳۸]. طبق مطالعات الکتروشیمیایی اخیر، SWCNT این توانایی را دارد که نوع خاصی از واکنش‌های انتقال الکترون را تقویت و فعالیت الکتروکاتالیتیکی را بهبود بخشد.

شکل و سطح وسیع SWCNT اثرات سودمندی همچون هدایت الکتریکی همراه با سطح افزایش یافته الکتروده را نشان می‌دهد. بعد از تخلیص، SWCNT دارای بار منفی شد [۳۹]. بنابراین، آنها می‌توانند به آسانی روی سطح  $\text{NAD}^+$  که دارای بار مثبت است جذب شوند. با توجه به توانایی جذب بالای داده شده به SWCNTs، بیومولکول‌ها می‌توانند به طور ثابت جذب سطح آنها شوند.

## ابزارها و اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی

طیف‌های FTIR با اسپکتروفتومتر Thermo Nicolet Nexus 870FTIR ثبت و از Eurosonic 4D برای عامل‌دار کردن صوتی شیمیایی SWCNT استفاده شد. DropSens400 $\mu\text{potentiostat}$  و الکترودهای نواری DropSense با کامپیوتر کنترل و اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی و ساختار بیوسنسور با الکتروده کار گرافیتی (GE) کروی شکل (با ضخامت ۳mm)، الکتروده کار Ag/AgCl و الکتروده کمکی گرافیتی صورت گرفت. از بافر فسفات پتاسیم (۰/۱M، pH ۷/۵) برای ثبت پاسخ استفاده شد. ولتاژتری چرخه‌ای بدون افزودن محلول  $\text{NAD}^+$  در محدوده ۱ تا -۱ ولت و سرعت اسکن ۵۰mV/sec اجرا شد. تمام اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی با ۳ تکرار در دمای اتاق انجام شد. ثبات پایداری بیوسنسور برای مدت طولانی، با یک غلظت از ۳- هیدروکسی بوتیرات در طی ۱۸۰ روز توسط ولتاژتری چرخه‌ای بررسی شد و بعد از انجام هر آزمایش، سنسور با محلول بافر شسته و در  $4^\circ\text{C}$  نگهداری شد [۳۰]. الکتروده تغییر یافته در سلول الکتروشیمیایی تغلونی با ضخامت ۵ mm (با حجم ۱۰۰-۵) در منطقه حسی قرار داده شد و ۵۰ $\mu\text{l}$  از محلول استاندارد یا نمونه واقعی چکیده شد تا تمام سه الکتروده را به منظور بررسی الکتروشیمیایی پوشش دهد.

## یافته‌ها و بحث

### آماده‌سازی کونژوگه SWCNT- $\text{NAD}^+$

تغییر شیمیایی CNT برای ساختن گروه‌های واکنشی روی سطح آن، پیش‌نیازی برای تثبیت کووالان هر مولکولی است. تیمار اسیدی CNTs به عنوان روش متداول عامل‌دار کردن با پروتکل‌های مختلفی که در بر گیرنده ترکیبات متفاوت محلول‌های اسیدی می‌باشد، صورت گرفته است [۳۱]. در این مطالعه، برای تیمار صوتی شیمیایی SWCNTs از اسید نیتریک استفاده شد. طیف FTIR از SWCNTs تیمار شده با اسید نیتریک (شکل ۲) باندهایی در  $1645$ ،  $1380$ ،  $3418\text{cm}^{-1}$  نشان داده است. ظهور باندها

## میکروسکوپ الکترونی

مورفولوژی SWCNT عامل دار و SWCNT عامل دار کونژوگه با  $NAD^+$  (SWCNT-NAD+) به وسیله SEM مشخص شد (شکل ۳). تصاویر SEM نشان می‌دهد که بعد از معرفی مولکول‌های  $NAD^+$ ، SWCNT سطح بسیار خشن‌تر و قطر بزرگ‌تری به عنوان نتیجه اصلاح لوله‌ها نمایش می‌دهد. همان طور که قبلاً بحث شده بود، استفاده از EDC برای جفت نانولوله‌های کربنی با مولکول‌های دیگر می‌تواند در اثر تجمع لوله‌ها باشد [۴۰]. تجمع آشکار  $NAD^+$ -SWCNT نشان می‌دهد که EDC به عنوان عامل جفت کننده می‌تواند اتصال  $NAD^+$  به نانو لوله‌های کربنی را تسهیل کند.

## در مسیر بیوسنسور الکتروشیمیایی

همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، آنزیم شناسایی ۳- هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز، برای طراحی بیوسنسور ۳- هیدروکسی بوتیرات روی سطح الکتروود اصلاح شده  $NAD^+$ -SWCNT چکانده شد. ما تعداد زیادی از ارتباطات موثر را انتظار داشتیم، با وجود این حقیقت که اتصال فیزیکی  $NAD^+$  به مولکول‌های CNT (مرحله a) و اتصال نامناسب آنزیم به کونژوگه  $NAD^+$ -SWCNT (مرحله ۳) اجتناب ناپذیر بود. علاوه بر کونژوگه‌های SWCNT- $NAD^+$ ، به کارگیری الکترودهای نواری Screen-Printed، نقطه قوت دیگری است که باعث می‌شود این بیوسنسور از لحاظ اقتصادی سودمند گردد. در مقایسه با انواع دیگر الکترودها به ویژه الکترودهای اکسیژن، الکترودهای نواری Screen-Printed دارای قابلیت استفاده آسان و پایداری طولانی مدت هستند. این شرایط استفاده از تنها یک الکتروود برای چندین آزمایش را فراهم می‌کند.

شکل ۴a، به ترتیب ولتاموگرام‌های چرخه‌ای از ۳- هیدروکسی بوتیرات ۳mM در محلول بافر با استفاده از الکترودهای نواری برهنه (منحنی a) و SWCNT-نواری (منحنی c) را نشان می‌دهد. پس از استفاده متوالی از برنامه پتانسیل مثلثی بین ۱ و ۱- ولت، توده غیر قابل تشخیصی از ۳- هیدروکسی بوتیرات روی الکتروود نواری برهنه مشاهده گردید (منحنی b). با این حال، با استفاده از الکتروود -

SWCNT نواری، ۳- هیدروکسی بوتیرات نماینده دو پیک نشان داده شده در ولتاموگرام با جریان بالاتر است (منحنی d). جریان زوج اکسایشی- کاهشی ۳- هیدروکسی بوتیرات به طور چشم‌گیری افزایش یافته است، که نشان می‌دهد تثبیت SWCNT روی الکتروود نواری می‌تواند، برهمکنش با غلظت‌های مختلف ۳- هیدروکسی بوتیرات را غنی سازد.

ولتامتری چرخه‌ای این بیوسنسور در حضور غلظت‌های مختلف ۳- هیدروکسی بوتیرات، کارایی ارتباطات و عملکرد خوب بیوسنسور را تأیید می‌کند (شکل ۴b). کاهش کوآنزیم در نیمه سیکل کاتدی با پیک جریانی در حدود ۰/۶۵- میلی ولت اتفاق افتاده است. پیک جریان در ۰/۱۵- ولت که مربوط به پتانسیل اکسایش NADH است با غلظت هیدروکسی بوتیرات در محلول در اثر تشکیل مقدار بالاتری از NADH افزایش یافت. به منظور کاهش پتانسیل بالای اکسیداسیون NADH در بیوسنسورهای مبتنی بر دهیدروژناز، انواع مختلف الکتروود و دامنه وسیعی از واسطه‌های انتقال الکترون مورد بررسی قرار گرفت. پتانسیل بالای اکسیداسیون NADH متغیر است که، به انواع الکتروود و واسطه‌های انتقال الکترون وابسته است [۳۴]. در حالی که پیک پتانسیل اکسیداسیون NADH با الکتروود کربنی شیشه‌ای اصلاح نشده ۰/۸۲ ولت گزارش شده بود، پیک اکسیداسیون الکتروود اصلاح شده با CNT چند دیواره و تک دیواره به ترتیب به ۰/۳۳+ و ۰/۳۶+ ولت تغییر یافته بود [۴۱]. اخیراً در مطالعه CNT عامل دار برای تشخیص NADH، کاهش پتانسیل اکسایش NADH به حدود ۰/۰۷- گزارش شده بود [۴۲]. با استفاده از اصلاحات دیگر روی سطح الکتروود که نیازمند روند پیچیده و آزمایشگاه‌های مجهز می‌باشد، پتانسیل اکسیداسیون NADH در مطالعات مختلف کاهش یافته است.

تغییر در پیک پتانسیل اکسایش نشان می‌دهد که شکل کاهش یافته آنزیم (NADH) در مقایسه با شکل اکسایشی ( $NAD^+$ ) واکنش قوی‌تری با SWCNT می‌دهد. از آنجایی که پیک پتانسیل انتقال اکسایش- کاهش NADH با استفاده از الکتروود SWCNT-نواری تغییر نمی‌کند، کینتیک انتقال بار نامتناهی روی سطح الکتروود اصلاح شده تغییر نمی‌کند. با توجه به ماهیت میانجی‌گری ۳- هیدروکسی بوتیرات، و

همچنین ارزش مثبت  $E_{surf}^{\circ}$  در مقایسه با ارزش  $E_{bulk}^{\circ}$ ، جاذبه سطح میانی و تجمع فعل و انفعالات ۳- هیدروکسی بوتیرات بین جفت‌های بازی، SWCNT می‌تواند بر جاذبه الکترواستاتیک در درازمدت غلبه کند [۱۲]. همان طور که از واکنش‌های آنزیمی کاتالیز شده توسط ۳- هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز انتظار می‌رفت، غلظت NADH تولید شده از کاهش  $NAD^{+}$  با غلظت ۳- هیدروکسی بوتیرات افزایش می‌یابد. در نتیجه شدت پیک آندی باید افزایش یابد. طبق ولتاموگرام‌های چرخه‌ای که در شکل ۴b نشان داده شده است، باید غلظت NADH با توجه به غلظت پائین‌تر ۳- هیدروکسی بوتیرات در محلول روی سطح الکتروود SWCNT- نواری افزایش یابد. ضریب نفوذ NADH باید در استفاده از الکتروود SWCNT- نواری کاهش یابد، زیرا محصول  $(C.D)^{1/2}$  همان طور باقی می‌ماند. با توجه به این حقیقت که فرایند انتقال ماده نباید به سطح هدف بستگی داشته باشد، می‌توان چنین نتیجه گرفت که فرایند انتقال ماده، با نفوذ در لایه باریک SWCNT متورم بر سطح الکتروود رخ داده است که با توجه به بخش ی از محلول، ویسکوزیته بالاتری دارد. این بدان معناست که در نتیجه اثر متقابل SWCNT با NADH، غلظت NADH در خط اتصال سطح SWCNT با محلول افزایش یافته است و NADH از طریق لایه میانی SWCNT به طور مستقیم به سمت سطح نواری پخش می‌شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً SWCNT جذب شده روی سطح الکتروود نواری نمی‌تواند به عنوان واسطه انتقال الکترون عمل کند. از این رو، به علت جذب SWCNT از طریق گروه‌های COOH پایه و یا بیرونی، به طور تصادفی جذب سطحی می‌شوند که تحت تاثیر طول سطح نواری قرار گرفته است.

همچنین ارزش مثبت  $E_{surf}^{\circ}$  در مقایسه با ارزش  $E_{bulk}^{\circ}$ ، جاذبه سطح میانی و تجمع فعل و انفعالات ۳- هیدروکسی بوتیرات بین جفت‌های بازی، SWCNT می‌تواند بر جاذبه الکترواستاتیک در درازمدت غلبه کند [۱۲]. همان طور که از واکنش‌های آنزیمی کاتالیز شده توسط ۳- هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز انتظار می‌رفت، غلظت NADH تولید شده از کاهش  $NAD^{+}$  با غلظت ۳- هیدروکسی بوتیرات افزایش می‌یابد. در نتیجه شدت پیک آندی باید افزایش یابد. طبق ولتاموگرام‌های چرخه‌ای که در شکل ۴b نشان داده شده است، باید غلظت NADH با توجه به غلظت پائین‌تر ۳- هیدروکسی بوتیرات در محلول روی سطح الکتروود SWCNT- نواری افزایش یابد. ضریب نفوذ NADH باید در استفاده از الکتروود SWCNT- نواری کاهش یابد، زیرا محصول  $(C.D)^{1/2}$  همان طور باقی می‌ماند. با توجه به این حقیقت که فرایند انتقال ماده نباید به سطح هدف بستگی داشته باشد، می‌توان چنین نتیجه گرفت که فرایند انتقال ماده، با نفوذ در لایه باریک SWCNT متورم بر سطح الکتروود رخ داده است که با توجه به بخش ی از محلول، ویسکوزیته بالاتری دارد. این بدان معناست که در نتیجه اثر متقابل SWCNT با NADH، غلظت NADH در خط اتصال سطح SWCNT با محلول افزایش یافته است و NADH از طریق لایه میانی SWCNT به طور مستقیم به سمت سطح نواری پخش می‌شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً SWCNT جذب شده روی سطح الکتروود نواری نمی‌تواند به عنوان واسطه انتقال الکترون عمل کند. از این رو، به علت جذب SWCNT از طریق گروه‌های COOH پایه و یا بیرونی، به طور تصادفی جذب سطحی می‌شوند که تحت تاثیر طول سطح نواری قرار گرفته است.

برای به دست آوردن غلظت نهایی ۳- میلی‌مولار، سری غلظتی از محلول‌های استاندارد توسط رقت‌های شناخته شده از غلظت‌های ۳- هیدروکسی بوتیرات با نمونه‌های سرم نرمال آماده شد. منحنی استاندارد برای غلظت‌های ۳- هیدروکسی بوتیرات در شکل ۵ نشان داده شده است که منحنی، افزایش خطی از ۰/۰۱ تا ۰/۱ میلی‌مولار دارد. حساسیت بالا برای تشخیص غلظت‌های پایین ۳-

برای بررسی قابلیت تکرارپذیری این بیوسنسور، پاسخ الکتروشیمیایی در غلظت‌های پایین (۰/۱ mM) و بالا (mM) (۳ از ۳- هیدروکسی بوتیرات در ۸ روند آنالیتیکالی مستقل اندازه‌گیری شد. این بیوسنسور برای دو غلظت ذکر شده که قابلیت تکرارپذیری خوبی برای تشخیص ۳- هیدروکسی بوتیرات داشته است به ترتیب درصد ضریب تغییراتی (%CV) معادل ۴/۷۵٪ و ۷/۶۲٪ نمایش داده است. به منظور ارزیابی قابلیت اطمینان از این بیوسنسور، غلظت ۳- هیدروکسی بوتیرات در ۵ نمونه سرم رقیق شده با بافر فسفات (۲۰ بار) از طریق بیوسنسور پیشنهاد شده و کیت

### پایداری و قابلیت تکرارپذیری بیوسنسور

شکل ۶ پایداری درازمدت این بیوسنسور بعد از ذخیره‌سازی برای مدت ۱۸۰ روز را نشان می‌دهد. به علاوه این نمودار می‌تواند به عنوان شاهدهی برای پایداری اتصال SWCNT-NAD<sup>+</sup> در نظر گرفته شود. به دنبال افزایش پاسخ بیوسنسور در روز چهارم، می‌تواند روند ثابتی در پاسخ بیوسنسور دیده شود. بیوسنسور پیشنهاد شده با قابلیت ثبات ذخیره‌سازی درازمدت، می‌تواند بیش از ۶ ماه بدون از دست دادن قابل توجهی از حساسیتش مورد استفاده قرار گیرد. صرف نظر از بیوسنسور طراحی شده توسط Forrow و همکاران با نیمه عمر ۱۸ ماه [۹]، دیگر بیوسنسورهای ۳- هیدروکسی بوتیرات طراحی شده می‌توانند برای کمتر از دو ماه استفاده شوند و نمی‌توانند استفاده طولانی مدت قابل توجهی داشته باشند.

برای بررسی قابلیت تکرارپذیری این بیوسنسور، پاسخ الکتروشیمیایی در غلظت‌های پایین (۰/۱ mM) و بالا (mM) (۳ از ۳- هیدروکسی بوتیرات در ۸ روند آنالیتیکالی مستقل اندازه‌گیری شد. این بیوسنسور برای دو غلظت ذکر شده که قابلیت تکرارپذیری خوبی برای تشخیص ۳- هیدروکسی بوتیرات داشته است به ترتیب درصد ضریب تغییراتی (%CV) معادل ۴/۷۵٪ و ۷/۶۲٪ نمایش داده است.

به منظور ارزیابی قابلیت اطمینان از این بیوسنسور، غلظت ۳- هیدروکسی بوتیرات در ۵ نمونه سرم رقیق شده با بافر فسفات (۲۰ بار) از طریق بیوسنسور پیشنهاد شده و کیت

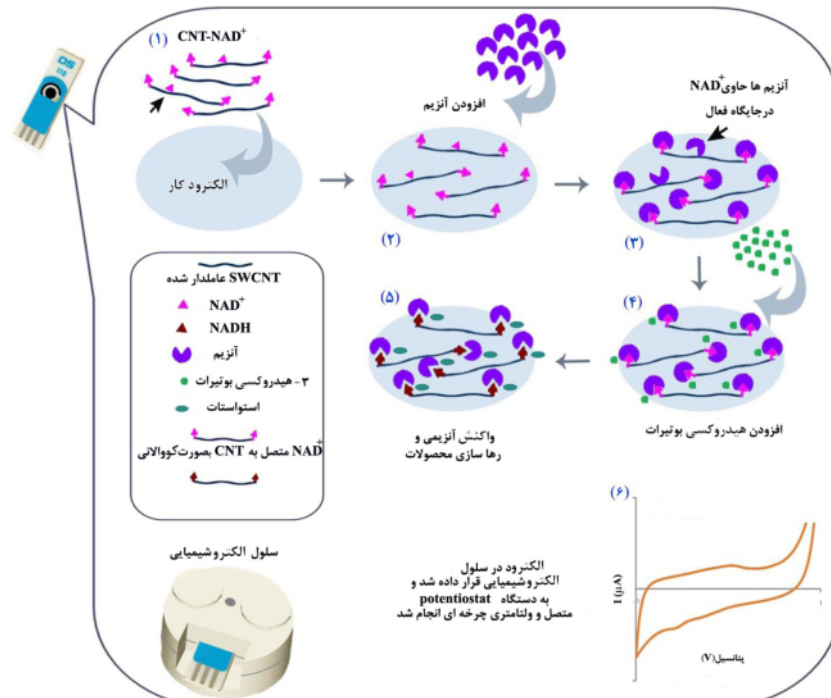
بوتیرات به طور جداگانه مورد مطالعه قرار گرفت. پاسخ در نمونه بلانک و همچنین در غلظت‌های مختلف ۳- هیدروکسی بوتیرات ۱۷٪ افزایش داشت. با توجه به این مطلب که حضور اسیدها در نمونه ۳- هیدروکسی بوتیرات می‌تواند باعث برخی اختلالات در نتایج نهایی شود، باید بیشتر مطالعات در مورد چنین مشکلاتی انجام شود.

در این مطالعه، بیوسنسور الکتروشیمیایی برای تشخیص ۳- هیدروکسی بوتیرات طراحی شده است. بیوسنسور پیشنهادی از مزیت‌های الکتروشیمیایی نانولوله‌های کربنی تک دیواره بهره برده است. پتانسیل پایین اکسیداسیون NADH، پایداری ذخیره‌سازی بیشتر و حد تشخیصی کمتر از طریق استفاده از چنین نانولوله‌هایی به دست آمده است. با در نظر گرفتن مزیت پیوند کووالانی  $NAD^+$  به CNT، اضافه کردن بیشتر  $NAD^+$  برای واکنش سلول در هر اندازه‌گیری نیاز نمی‌باشد. به همین خاطر از لحاظ اقتصادی با صرفه‌تر است. تطابق نتایج نشان داده شده این بیوسنسور با کیت تشخیصی ۳- هیدروکسی بوتیرات، پتانسیل خوب بیوسنسور برای اهداف تشخیصی را تأیید کرده است.

سنجش بتا هیدروکسی بوتیرات، Biovision، سنجیده شد. مقایسه نتایج نشان داد که دو روش مذکور بر هم منطبق بوده و از این بیوسنسور می‌توان در نمونه‌های واقعی هم استفاده کرد (شکل ۷).

### اختصاصیت بیوسنسور

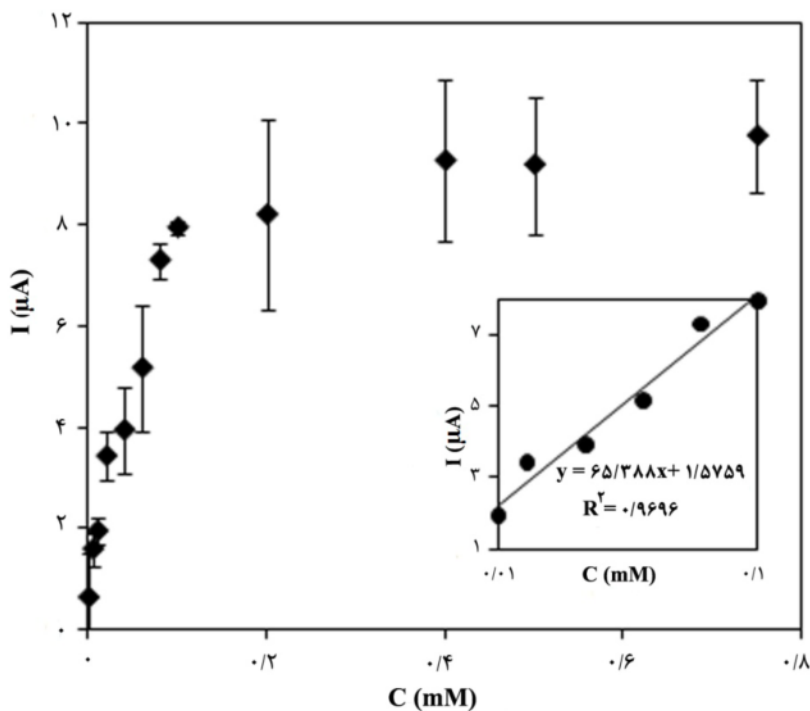
از آنجایی که حضور ترکیبات مداخله‌گر می‌تواند در تعیین دقیق آنالیت هدف تأثیرگذار باشد، این ویژگی بیوسنسور در حضور و عدم حضور برخی مواد مداخله‌گر همچون اسید آسکوربیک، اسید اوریک و مخلوطی از اسید آمینه‌های نوع L مورد بررسی قرار گرفت. پاسخ نمونه بلانک حاوی اسید آمینه‌های نوع L با نمونه‌های فاقد آن نسبتاً مشابه بود. اگرچه وجود مخلوط ۰/۵ mM اسید آمینه‌های نوع L در غلظت‌های مختلف ۳- هیدروکسی بوتیرات باعث نوسان ۱٪ تا ۲/۵٪ شد، ولی می‌توان آن را با توجه به اثر ناچیزش روی پاسخ نهایی نادیده گرفت. تداخل اسید آسکوربیک (۰/۱ mM) و اسید اوریک (۰/۵ mM) با غلظت‌های مختلف ۳- هیدروکسی



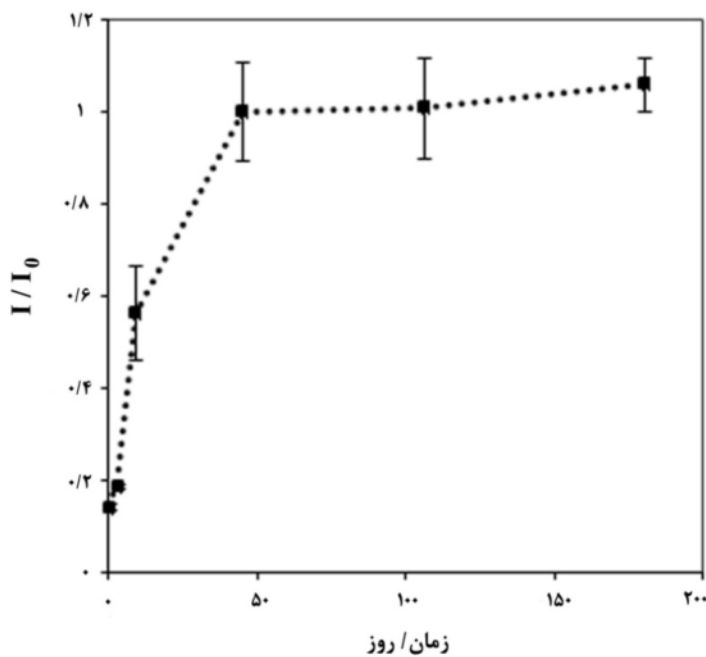
CNT و  $NAD^+$  به طور شیمیایی به یکدیگر متصل و بر سطح الکتروود کار، قرار داده شدند. آنزیم بر سطح الکتروود پاشیده شد و افزودن ۳- هیدروکسی بوتیرات باعث واکنش آنزیمی گردید. اندازه‌گیری الکتروشیمیایی با اتصال الکتروود به potentiostat اجرا شد که براساس اکسیداسیون NADH با تشکیل پیک در ولتاموگرام بود. پیکان‌های نمایش داده شده در مرحله ۱ و ۳، دیگر اتصالات ممکن نامناسب برای بیوسنسور را نشان می‌دهد.

شکل ۱- طرح شماتیک بیوسنسور

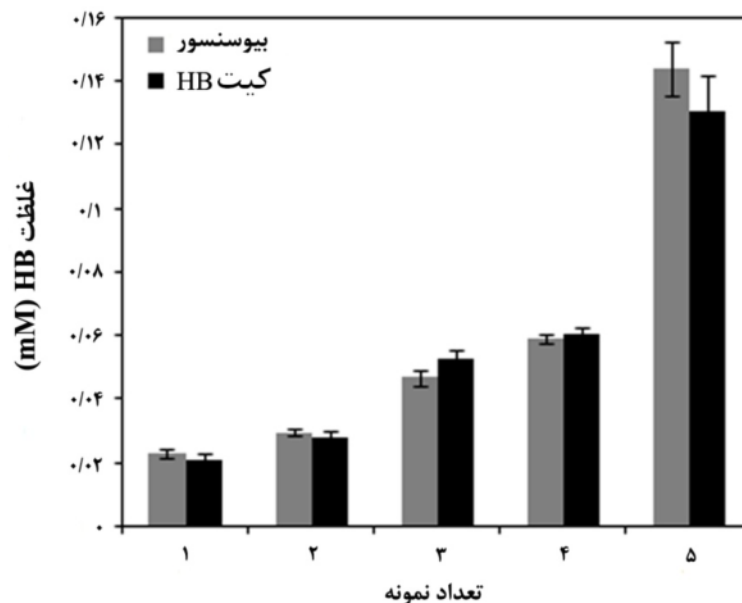




شکل ۵- منحنی استاندارد بیوسنسور در حضور غلظت‌های مختلف از ۳- هیدروکسی بوتیرات (۰/۰۱-۰/۱ mM). دامنه خطی تشخیص ۳- هیدروکسی بوتیرات (۰/۰۱-۰/۱ mM) در داخل نمودار نمایان است.



شکل ۶- پایداری ذخیره درازمدت بیوسنسور بررسی شده. گذشت زمان اثر مثبتی بر جریان نسبی ۰/۲ به ۱ در حدود ۴۰ روز بر بیوسنسور دارد. جریان حاصل در روز ۰/۴۰ (پاسخ حداکثر) عنوان شده است.



شکل ۷- مقایسه غلظت ۳- هیدروکسی بوتیرات توسط کیت سنجش بتا هیدروکسی بوتیرات و بیوسنسور ۳- هیدروکسی بوتیرات در نمونه‌های مختلف. تناسب پاسخ کیت سنجش بتا هیدروکسی بوتیرات با بیوسنسور ما، عملکرد خوب آنها را برای اندازه‌گیری سرم هیدروکسی بوتیرات نشان می‌دهد. مقدار سرم استفاده شده در هر سلول ۲/۵ μl از ۵۰ μl حجم کل بود. از این رو غلظت هیدروکسی بوتیرات به دست آمده از بیوسنسور باید ضرب در ۲۰ شود.

## سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

## مأخذ

- Adam V, Kizek R. Utilization of Electrochemical Sensors and Biosensors in Biochemistry and Molecular Biology. *Sensors* 2008; 8: 6125-6131.
- Clark L.C, Lyons C, Ann N Y. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Acad Sci* 1962; 102: 29-45.
- Wang Y, Xu H, Zhang J, Li G. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. *Sensors* 2008; 8:2043-2081.
- Wallace TM, Matthews DR. Recent advances in the monitoring and management of diabetic ketoacidosis. *QJM*, 97 (2004) 773-780
- Laffel L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 1999; 15:412-426.
- Kiba N, Saegusa K, Furusawa M. Post-column enzyme reactors for chemiluminometric detection of glucose, 1,5-anhydroglucitol and 3-hydroxybutyrate in an anion-exchange chromatographic system. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 689: 393-398.
- Kimura M, Kobayashi K, Matsuoka A, Hayashi K, Kimura Y. Head-space gas-chromatographic determination of 3-hydroxybutyrate in plasma after enzymic reactions, and the relationship among the three ketone bodies. *Clin Chem* 1985; 31: 596-598.
- Tabata M, Totani M. A Chemiluminescence-Flow Injection Analysis of Serum 3-Hydroxybutyrate Using a Bioreactor Consisting of 3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase and NADH Oxidase. *Anal Biochem* 1995; 229: 133-138.
- Forrow NJ, Sanghera GS, Walters SJ, Watkin JL. Development of a commercial amperometric biosensor electrode for the ketone d-3-hydroxybutyrate. *Biosens Bioelectron* 2005; 20:1617-1625.
- Kwan RCH, Hon PYT, Mak WC, Law LY, Hu J, Renneberg R. Biosensor for rapid determination of 3-hydroxybutyrate using bienzyme system. *Biosens Bioelectron* 2006; 21:1101-1106.
- Li G, Ma NZ, Wang Y. A new handheld biosensor for monitoring blood ketones. *Sensor Actuat B-Chemical*, 109 (2005) 285-290.
- Fang L, Wang SH, Liu CC. An electrochemical biosensor of the ketone 3-β-hydroxybutyrate for potential diabetic patient management. *Sensor Actuat B-Chem* 2008; 129: 818-825.

13. Zhou JL, Nie PP, Zheng HT, Zhang JM. Progress of Electrochemical Biosensors Based on Nicotinamide Adenine Dinucleotide (phosphate)-Dependent Dehydrogenases. *Chinese J Anal Chem* 2009; 37:617-623.
14. Lobo MJ, Miranda AJ, Tuñón P. Amperometric biosensors based on NAD(P)-dependent dehydrogenase enzymes. *Electro-analysis* 1997; 9: 191-202.
15. Omidfar K, Kia S, Kashanian S, Paknejad M, Besharatie A, Kashanian S, Larijani B. Colloidal nanogold-based immunochromatographic strip test for the detection of digoxin toxicity. *Appl Biochem. Biotech* 2010; 160: 843-855.
16. Hyun S, Park TH. Integration of biomolecules and nanomaterials: Towards highly selective and sensitive biosensors. *Biotechnol J* 2011; 6:1310-1316.
17. Omidfar K, Dehdast A, Zarei H, Sourkahi BK, Larijani B. Development of urinary albumin immunosensor based on colloidal AuNP and PVA. *Biosens Bioelectron* 2011; 26: 4177-4183.
18. Omidfar K, Zarei H, Gholizadeh F, Larijani B. A high-sensitivity electrochemical immunosensor based on mobile crystalline material-41-polyvinyl alcohol nanocomposite and colloidal gold nanoparticles. *Anal Biochem* 2012; 421: 649-656.
19. Endo M, Strano M, Ajayan P. Potential Applications of Carbon Nanotubes, in: Carbon Nanotubes. *Springer Berlin/ Heidelberg* 2008; pp. 13-61.
20. Jeykumari DRS, Narayanan SS. Fabrication of bienzyme nanobiocomposite electrode using functionalized carbon nanotubes for biosensing applications. *Biosens Bioelectron* 2008; 23: 1686-1693.
21. Xue CH, Zhou RJ, Shi MM, Wu G, Zhang XB, Wang M, Chen HZ. Electrochemistry of glucose oxidase immobilized on carbon nanotubes noncovalently functionalized by multihydroxyl and multicarboxyl groups. *J Electroanal Chem* 2010; 642: 92-97.
22. Gao Y, Kyratzis I. Covalent Immobilization of Proteins on Carbon Nanotubes Using the Cross-Linker 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide—a Critical Assessment. *Bioconjugate Chemistry* 2008; 19: 1945-1950.
23. Kim J, Grate JW, Wang P. Nanostructures for Enzyme Stabilization. *Chem Eng. Sci* 2006; 61: 1017-1026.
24. Hart JP, Crew A, Crouch E, Honeychurch KC, Pemberton RM. Some Recent Designs and Developments of Screen - Printed Carbon Electrochemical Sensors/Biosensors for Biomedical, Environmental, and Industrial Analyses. *Analytical Letters* 2005; 37: 789-830.
25. Fanjul-Bolado P, Queipo P, Lamas-Ardiansa PJ, Costa-García A. Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools. *Talanta* 2007; 74: 427-433.
26. Sharma MK, Agarwal GS, Rao VK, Upadhyay S, Merwyn S, Gopalan N, Rai GP, Vijayaraghavan R, Prakash S. Amperometric immunosensor based on gold nanoparticles/ alumina sol-gel modified screen-printed electrodes for antibodies to Plasmodium falciparum histidine rich protein-2. *Analyst* 2010; 135: 608-614.
27. Silva Nunes G, Jeanty G, Marty JL. Procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides Comparative study. *Analytica Chimica Acta* 2004; 523: 107-115.
28. Pellicer C, Gomez-Caballero A, Unceta N, Goicolea MA, Barrio RJ. Using a portable device based on a screen-printed sensor modified with a molecularly imprinted polymer for the determination of the insecticide fenitrothion in forest samples. *Analytical Methods* 2010; 2:1280-1285.
29. Khorsand F, Riahi S, EynollahiFard S, Kashanian S, Naeemy A, Larijani B, Omidfar K. IET Nanobiotechnol, (in press).
30. Omidfar K, Rasae MJ, Zaraee AB, Amir MP, Rahbarizadeh F. Stabilization of penicillinase-hapten conjugate for enzyme immunoassay. *J Immunoassay Immunochem* 2002; 23: 385-398.
31. Osorio AG, Silveira ICL, Bueno VL, Bergmann CP. H<sup>2</sup>SO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub>/HCl-Functionalization and its effect on dispersion of carbon nanotubes in aqueous media. *Appl Surf Sci* 2008; 255: 2485-2489.
32. Chakraborty S, Raj CR. Mediated electrocatalytic oxidation of bioanalytes and biosensing of glutamate using functionalized multiwall carbon nanotubes-biopolymer nanocomposite. *Electroanal Chem* 2007; 609: 155-162.
33. Kim UJ, Furtado CA, Liu X, Chen G, Eklund PC. Raman and IR Spectroscopy of Chemically Processed Single-Walled Carbon Nanotubes. *J Am Chem Soc* 2005; 127:15437-15445.
34. Kumar S, Chen SM. Electroanalysis of NADH Using Conducting and Redox Active Polymer/ Carbon Nanotubes Modified Electrodes-A Review. *Sensors* 2008; 8: 739-766.
35. Zhou H, Zhang Z, Yu P, Su L, Ohsaka T, Mao L. Noncovalent Attachment of NAD<sup>+</sup> Cofactor on to Carbon Nanotubes for Preparation of Integrated Dehydrogenase-Based Electrochemical Biosensors. *Langmuir* 2010; 26: 6028-6032.
36. Wang XS, Liu P, Zheng HT, Hu H, Zheng WJ, Suye SI. Preparation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotube and its Application to Dehydrogenase Biosensor. *Advanced Materials Research* 2011; 298:121-127.
37. Wu BY, Hou SH, Yin F, Zhao ZX, Wang YY, Wang XS, Chen Q. Amperometric glucose biosensor based on multilayer films via layer-by-layer self-assembly of multi-wall carbon nanotubes, gold nanoparticles and glucose oxidase on the Pt electrode. *Biosens Bioelectron* 2007; 22: 2854-2860.

38. Zhang M, Smith A, Gorski W. Carbon Nanotube-Chitosan System for Electrochemical Sensing Based on Dehydrogenase Enzymes. *Anal Chem* 2004; 76: 5045-5050.
39. Xu Z, Gao N, Chen H, Dong S. Biopolymer and Carbon Nanotubes Interface Prepared by Self-Assembly for Studying the Electrochemistry of Microperoxidase-11. *Langmuir* 2005; 21: 10808-10813.
40. Zhang R, Wang X, Shiu KK. Accelerated Direct Electrochemistry of Hemoglobin Based on Hemoglobin-carbon Nanotube (Hb-CNT) Assembly. *J Colloid Interface Sci* 2007; 316: 517-522.
41. Musameh M, Wang J, Merkoci A, Lin Y. Low potential stable NADH detection at carbon-nanotube modified glassy carbon electrodes. *Electrochem. Commun* 2002; 4: 743-746.
42. Wooten M, Gorski W. Facilitation of NADH Electro-oxidation at Treated Carbon Nanotubes. *Anal Chem* 2010; 82: 1299-1304.