مجله دیابت و متابولیسم ایران. بهمن- اسفند ۱۳۹۲؛ دوره ۱۳ (شماره ۳) ۲۳۴-۲۲۳

طراحی ایمونوسنسور الکتروشیمیایی بر اساس نانو ذره طلا به‌عنوان نشان و نانو کامپوزیت حاوی مواد کریستالی متحرک و پلی وینیل الکل

زهرا میرزایی زاده[۱]، هاجر زارع[۱]، کبری امیدفر[۱*]

چکیده

مقدمه: در این مطالعه با استفاده از، آنتی‌بادی آلبومین انسانی کونژوگه با نانوذرات طلا به‌عنوان نشان الکتروشیمیایی و همچنین نانوکامپوزیت مزوپوری حاوی مواد کریستالی متحرک-٤١ (MCM-41) و پلی‌وینیل‌الکل (PVA) به‌عنوان سطح تثبیت کننده ایمونوسنسور جدیدی ساخته شده است.

روش‌ها: برای تعیین خواص فیزیکوشیمیایی و الکتروشیمیایی این غشای هیبریدی در ایمونوسنسور طراحی شده، روش‌های میکروسکوپ الکترونی انتشار زمینه‌ای (FESEM) ، ولتامتری چرخه‌ای (CV) و ولتامتری تمایز پالسی (DPV) استفاده شده است.

یافته‌ها: با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انتشار زمینه‌ای (FESEM) اتصال مناسبی بین HSA و MCM-41 و همچنین رسوب لایه متراکمی از غشای MCM-41-HSA-PVA روی سطح الکترود مشاهده شد. DPV برای اندازه‌گیری کمی آنتی‌ژن استفاده گردید.

نتیجه‌گیری: در شرایط بهینه این بیوسنسور می‌تواند HSA را در محدوده خطی بالایی (0.5-200μg/ml) با حد تشخیصی پایین‌تر از 1ng/mlتشخیص دهد. این روش جدید تکرارپذیری، ثبات و پایداری و قابلیت اطمینان مناسبی را نشان داد و همچنین می‌تواند برای تشخیص آنتی‌ژن‌های دیگر مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ایمونوسنسور، آلبومین، MCM-41، PVA، نانو کامپوزیت

۱- مرکز تحقیقات بیوسنسور، پژوهشکده علوم سلولی- مولکولی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* ***نشانی***: بیمارستان شریعتی، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه تهران نشانی الکترونیک: omidfar@tums.ac.ir تلفن: ۰۹۱۲۲۲۱۷۳٤۲ فاکس: ۸۸۲۲۰۰۵۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۲ **تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۲/۱۱/۲۸** **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۴**

مقدمه

تشخیص دقیق و حساس بیومارکرها هم در زمینه تحقیقاتی هم در تشخیص‌های بالینی مهم می‌باشد. از میان روش‌های مختلف اندازه‌گیری بیومارکرها، ایمونواسی برترین تکنیک زیستی است که برای شناسایی آنالیت‌ها در نمونه‌های خون و مایعات بدن مورد استفاده قرار می‌گیرد. این تست‌ها کاربرد گسترده‌ای در تشخیص بیماری، ایمنی موادغذایی و آنالیز محیط دارند [۱و۲]. با این حال، طراحی ایمنواسی جدید با قیمت پائین‌تر و حساسیت بالاتر، مفید می‌باشد.

ایمونوسنسورها دستگاه تحلیلی کوچکی هستند که حساسیت روش‌های تشخیصی را با ویژگی‌های بالای واکنش‌های ایمونولوژیکی ترکیب می‌کنند. در حال حاضر، انواعی از ایمونوسنسورهای الکتروشیمیایی نوری، حرارتی و جرمی برای تشخیص نشانگرهای زیستی طراحی شده اند [۳]. در میان آنها، ایمونوسنسورهای الکتروشیمیایی به علت هزینه پائین، حساسیت بالا، سادگی و افزایش راحت سیگنال مورد توجه می‌باشند [۷-٤]. با این حال هنوز برای پیدا کردن روش‌های جدیدی که بتواند سادگی، پایداری و حساسیت ایمونواسی بالینی را بهبود ببخشد، چالشی وجود دارد [۸]. نانو مواد به‌علت ظرفیتشان در بهبود پایداری و حساسیت بیوسنسورها مورد استفاده قرار گرفته‌اند؛ این مزایا و همچنین ایجاد هزینه مناسب در بیوسنسورها، باعث استفاده بیشتر از نانومواد در بیوسنسورها شده است [۱۱-۹].

در این مطالعه، ایمونوسنسور الکتروشیمیایی، با استفاده از الکترود کربنی Screen-Printed (SPCE) اصلاح شده با نانوذرات سیلیکایی مزوپور(MSNs) و پلی وینیل الکل(PVA) به‌عنوان مبدل‌های الکتروشیمیایی و همچنین آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با نانوذرات طلا به‌عنوان پروب سیگنال‌های الکتروشیمیایی، برای اندازه‌گیری حساس و سریع بیومارکرها طراحی شده است.

مزوپورها با منافذی به قطر ۵۰-۲ نانومتر، نانومواد معدنی هستند که دارای ویژگی‌هایی همچون سطح بزرگ؛ پایداری شیمیایی، حرارتی و مکانیکی بالا؛ کیفیت خوب جذب و سمیت کم می‌باشند. مزوپورها می‌توانند به‌عنوان زمینه‌ای مناسب برای انتقال الکترون از محیط به سطح الکترود عمل کنند [۱۳، ۱۲]. MSNs در تثبیت پروتئین از مواد معدنی مؤثرترند [۱۵، ۱٤].

MCM-41، یک مزوپور سیلیکای شش ضلعی با سطح و ظرفیت بارگیری بالا، ساختار منافذ یکسان و منظم، سازگاری خوب زیستی و محیط مناسب برای انتقال الکترون است، این ماده توسط بسیاری از محققان به‌عنوان موردی عالی برای تثبیت پروتئین در بیوسنسور الکتروشیمیایی در نظر گرفته شده است [۱۷، ۱٦، ۱۳]. به‌ویژه ترکیب نانوکامپوزیت MCM-41 با پلی وینیل الکل (MCM-41-PVA) در طراحی بیوسنسور الکتروشیمیایی به عنوان سطح سنجش مورد توجه خاصی قرارگرفته است [۱۷، ۱۳، ۱۲]. توسط اشعه ماوراءبنفش عکسی از PVA گرفته شد که این عکس ساختار سه بعدی از PVA نشان می‌دهد که برای تثبیت مولکول‌های زیستی مناسب است.

در اصل PVA می‌تواند باعث به دام افتادن مولکول‌های زیستی شود [۱۹،۱۸]. با توجه به این ویژگی، ما از PVA به‌عنوان ستون چسبنده پلیمری برای تثبیت مؤثر مولکول‌های آنتی‌ژن عملکردی روی سطح الکترود استفاده کردیم.

در این بیوسنسور برای تقویت سیگنال‌های انتقال یافته از برهمکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی از نانوذرات طلا (AuNPs) به علت داشتن ویژگی‌های خاصی از جمله سطح بالا، هدایت و سازگاری زیستی خوب، استفاده شده است [۹،۲۰]. اخیراً الکترواکسیداز AuNPs در HCl با تولید الکتروفعال $AuCl_4$ [۲٦-۲۱]، به‌عنوان مدلی جهت افزایش حساسیت ایمونوسنسور الکتروشیمیایی مطرح شده است.

در این مطالعه، به‌عنوان مدل پروتئینی از آلبومین سرم انسانی (HSA) برای طراحی ایمونوسنسور استفاده شد. برای تثبیت HSA ، MCM- 41 به‌کار برده شد، و PVA هم برای تثبیت بهتر MCM-41-PVA روی سطح SPCE استفاده شد. با اتصال آنتی بادی مونوکلونال (mAb) ضد HSA به AuNPs (Ab-AuNPs) ، واکنش ایمنی رقابتی تولید شد. فرآیند تشخیص، بر پایه واکنش آنالیت با ترکیب Ab-AuNPs بود. اکسیداسیون اولیه این ترکیب در HCl ۰/۱، مولار و ولتاژ ۰/۱ ولت به مدت ۸۰ ثانیه با کاهش AuCl به Au° در ولتامتری تمایز پالسی در حالت تولید

سیگنال‌های الکتروشیمیایی دنبال شد. در واقع، با استفاده ازخاصیت اکسید و احیای AuNPs در محیط اسیدی، کمیت نانوذرات و به نوبه خود شناسایی آنالیت در نمونه سرم امکان پذیر خواهد بود [۲۷-۲۱].

روش‌ها

مواد

سرم جنین گوساله (FCS)، RPMI 1640 ، استرپتومایسین، پنی سیلین، سرم آلبومین گاوی (BSA)، سرم آلبومین انسانی (HSA)، هموگلوبین، ستون پروتئین G، تتراکلرویوریک اسید ($HAucL_4$)، تری سدیم سیترات ($Na_3C_6G_5o_7$)، سدیم آزاید، پروتئین شیر(Skim milk) و وینیل الکل که همه از Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA) خریداری شده است. HCl و محلول‌های دیگر از Merck (Spain) تهیه شده‌اند. محلول بافر فسفات (PBS, pH 7.5) از بافر فسفات سالین ۰/۰۱ مولار، سدیم کلراید (NaCl) ۰/۱۳۷ مولار و پتاسیم کلراید (KCl) ۰/۰۰۳ مولار تشکیل شده است. همه محلول‌ها در آب مقطر آماده شده‌اند. مزوپور MCM-41 در آزمایشگاه الکتروشیمیایی دانشگاه تهران بر پایه روشی مصنوعی که قبلاً طرح ریزی شده، آماده شده است.

تهیه نانوذره طلا و تثبیت آنتی‌بادی مونوکلونال

سنتز نانوذرات طلای ۲۰ نانومتری طبق مطالعه قبلی با احیاء $HAuCl_4$ توسط تری سدیم سیترات مطابق انجام شد [۲۸]. به‌طور خلاصه، ۱۰۰ml از تتراکلرویوریک اسید ($HAuCl_4$ [w/v] ۰/۰۱٪)را حرارت داده تا به جوش آید، سپس همان‌طور که محلول را به‌طور ثابت هم می‌زدیم محلول ۱٪ تری سدیم سیترات اضافه شد، با تغییر رنگ محلول از زرد به قرمز شرابی (این فرایند تقریباً ۸ دقیقه طول می‌کشد)، محلول را کناری گذاشته تا به دمای محیط برسد و pH آن با سدیم هیدروکساید غلیظ (NaoH) در ۸/۵ تنظیم و سپس سدیم آزاید ۰/۰۱٪ (w/v) به آن اضافه شد. محلول نانوذره طلای به‌دست آمده در یک شیشه تیره رنگ و در 4°C ذخیره شد.

به‌منظور تهیه کونژوگه زیستی، ۳۰۰ µg، HSA mAb (۳۰µg/ml در PBS، ۰/۰۱ مولار با pH 7.5) در دمای اتاق به 10ml محلول طلای کلوئیدی به pH رسیده، اضافه کرده و سپس در دمای 4°C به‌مدت یک شبانه روز استیرر گردید. سپس محلول ۱۰٪ BSA برای بلوکه کردن سطوح خالی نانوذرات طلای کلوئیدی اضافه شد. مخلوط به مدت ۵ دقیقه و در دمای اتاق استیرر شد. سپس در 15000 g و 4°C و ٤٥ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب جمع‌آوری شده و در ۱۰ میلی‌لیتر PBS حاوی BSA ۱% و سدیم آزاید ۰.۰۵٪ سوسپانسیون شد. در نهایت، کونژوگه چندین بار سانتریفوژ شد، و رسوب دوباره در 10ml ، PBS حل و در 4°C ذخیره شد [۲۸].

تهیه کونژوگه MCM-41-HSA

برای تهیه سوسپانسیون ٤١ -MCM، ۲mg ازMCM-41 به 1ml، PBS (۰/۰۱ مولار و pH ۷/۲) اضافه گردید. ۲µl از محلول حاوی ٦٠ µg، HSA در PBS، به ۱۵۰ µl سوسپانسیون ٤١ -MCM اضافه شد و به‌صورت شبانه روزی در دمای 4°C استیرر شد تا HSA روی مواد مزوپوری تثبیت شود. برای جداسازی پیوندهای ضعیف HSA و آلبومین‌های تثبیت نشده، سوسپانسیون به‌مدت ۳ دقیقه و در دمای 4°C و در دور3000 rpm سانتریفوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. برای بلوکه کردن سطوح پوشیده نشده، ۱۰۰µl از شیر خشک بدون چربی ۳٪ (Skim milk) به کونژوگه زیستیMCM- 41-HSA اضافه شد و روند با ۲۰ دقیقه استیرر پیگیری شد. در نهایت، محلول در 3000rpm برای ۲ دقیقه و در 4°C سانتریفوژ شده و رسوب سفید رنگ در۱۵۰ µl، PBS (۰/۰۱ مولار و 7.2 pH) حاوی سدیم آزاید ۰/۰۵٪ حل شد. قبل از استفاده، کونژوگه زیستی باید در 4°C ذخیره شود [۲۹].

الکترود اصلاح شده

مخلوط سیلیکای مزوپوری به همراه پلیمر پلی‌وینیل الکل جهت تهیه نانو کامپوزیت- MCM-41-HSA –PVA به کار برده شد و به اصلاح سطح الکترود مورد استفاده قرار گرفت.

برای به‌دست آوردن سوسپانسیون کلوئیدی، ۱µl از MCM-41-HSA که حاوی 400ng، HSA می‌باشد با ٤µl

وینیل الکل مخلوط شد و روی سطح الکترود کار ریخته شد. در مرحله بعد زیر UV (۲۵۰-۲۲۰ نانومتر و ۲۰ دقیقه) قرار داده شد تا پلیمریزه شده و پلی‌وینیل الکل (PVA) تشکیل شود. در انتها، برای بلوکه کردن جایگاه‌های اتصال غیراختصاصی، الکترود با بافر فسفات (۰/۱ مولار و pH 7.2) حاوی ۰/۵٪ BSA، به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای 37°C انکوبه شد و سپس توسط توئین ۲۰، ۰/۰۵٪ در بافر فسفات (بافر شستشو) شسته شد تا BSA متصل نشده برداشته شود. الکترود اصلاح شده قبل از استفاده در دمای 4°C ذخیره شد.

اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی

آزمایش‌ها با قرار دادن مخلوطی از 20µl محلول Ab-AuNP و 5µl نمونه واقعی یا استاندارد HSA روی سطح الکترود ادامه پیدا کرد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در37°C انکوبه شد. سپس ۳ مرتبه توسط بافر شستشو، شسته شد تا Ab-AuNP باند نشده جدا شود.

الکترود اصلاح شده در سل الکتروشیمیایی قرار گرفت و 50µl از HCl، ۰/۱ مولار روی آن ریخته شد تا تمام سطح سه الکترود SPCE را بپوشاند. پاسخ زمینه تحت شرایط یکسان اما بدون HSA تثبیت شده روی مزوپور سیلیکا MCM-41 گزارش شد.

قبل از بررسی بیوسنسور، الکترود اصلاح شده با ولتامتری چرخه‌ای (CV) در محدوده پتانسیل ۰/۸- تا ۱/۲+ ولت و سرعت خوانش 50mV/s مورد بررسی قرار گرفت.

تشخیص الکتروشیمیایی HSA در حالت DPV انجام شد. که مراحل آن به قرار زیر می‌باشد: اکسیداسیون اولیه AuNPs در پتانسیل ثابت ۱/۳ ولت به‌مدت ۸۰ ثانیه در HCl، ۰/۱ مولار و تولید $AuCl_4^-$ ، سپس $AuCl_4^-$ توسط DPV به طلای احیا (Au°) تبدیل گردید. اندازه‌گیری DPV در محدوده پتانسیلی ۰/٤-۰/۱ ولت با یک مرحله پتانسیل ٤ میلی‌ولت، دامنه پالس 50mv و مدت پالس 20ms انجام شد. با توجه به اینکه شدت جریان تولید شده از طریق پیک جریان کاتدی، با مقدار HSA در نمونه متناسب است، این پیک به‌عنوان سیگنال آنالیتیکال برای بررسی الکتروشیمیایی HSA انتخاب شد. همه اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی در دمای اتاق انجام شد.

پایداری الکترودهای اصلاح شده MCM-41-HSA-PVA بعد از ۳ ماه ذخیره‌سازی در 45°C اندازه‌گیری شده و با پایداری الکترودهای آماده شده بدون نانوکامپوزیت MCM-41-PVA مورد مقایسه قرار گرفت. برای ارزیابی قابلیت تکرارپذیری سنجش، ۲ نمونه از غلظت‌های شناخته شده HSA (غلظت کم و متوسط) در هشت مرحله به‌طور مستقل سنجش شدند.

نتایج و بحث

شرایط بهینه نانوکامپوزیت MCM-41-HSA ، MCM-41-HSA-PVA و کلوئید Ab-AuNP برای سنجش حساسیت ایمونوسنسور

در این مطالعه برای طراحی ایمونوسنسور الکتروشیمیایی یکبار مصرف با حساسیت بالا، از نانوذره طلا به‌عنوان نشان و از نانوکامپوزیت MCM-41-PVA برای اصلاح سطح الکترود استفاده شده است.

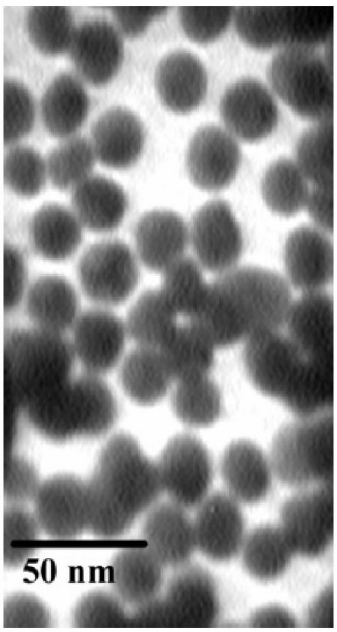
در ایمونوسنسور الکتروشیمیایی، PVA به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فردش از جمله؛ زنجیره‌های مولکولی انعطاف‌پذیر، چسبندگی عالی به الکترود و طبیعت شکل‌پذیر، به‌عنوان ماتریکس حمایتی استفاده شده است. مواد مزوپوری یکی از مواد معدنی جدید با ساختار نانو هستند که به‌دلیل ویژگی‌هایی همچون؛ استحکام مکانیکی منحصر به فرد، سطح بالا، هدایت الکتریکی عالی و پایداری شیمیایی خوب، به‌عنوان ماده‌ای تثبیت کننده استفاده شده‌اند.

برای به‌دست آوردن حداکثر حساسیت الکتروشیمیایی، غلظت‌های بهینه MCM-41 و آنتی‌ژن HSA مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب، اثر مقادیر مختلف MCM-41 (2,4,6,8 mg/ml) و آلبومین (100,200,400,800 ng/µl) توسط روش الایزای رقابتی مستقیم انجام شد.

از طرف دیگر، سوسپانسیون‌های مختلفی از Ab-AuNPs (15,20,25,30 µl/assay) روی سطح الکترود پخش شد. با توجه به کاهش پیک جریان‌ها در ولتامتری چرخه‌ای مقادیر مناسب MSN، آلبومین و Ab-AuNPs تعیین شدند

که به ترتیب عبارتند از 2mg/ml، 400ng و 20µl (داده‌ها ارائه نشده است). بر اساس نتایج قبلی [۲۱]، زمان مناسب برای انکوباسیون Ab-AuNPs، ۳۰ دقیقه در 37°C انتخاب شد؛ مانند مطالعه قبلی، زمان کل سنجش تقریباً ۸۰ دقیقه بود که کوتاه‌تر از مدت زمانی است که در یافته‌های دیگران گزارش شده است [۳۰ ، ۲۵،۲۲].

شکل ۱ اندازه نانوذرات طلای به‌دست آمده با میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) را نشان می‌دهد. متوسط قطر به‌دست آمده برای طلای کلوئیدی 18-20nm بود.



شکل ۱- تصویر TEM از AuNPs به دست آمده. قطر ذرات ۲۰-۱۸ نانومتر

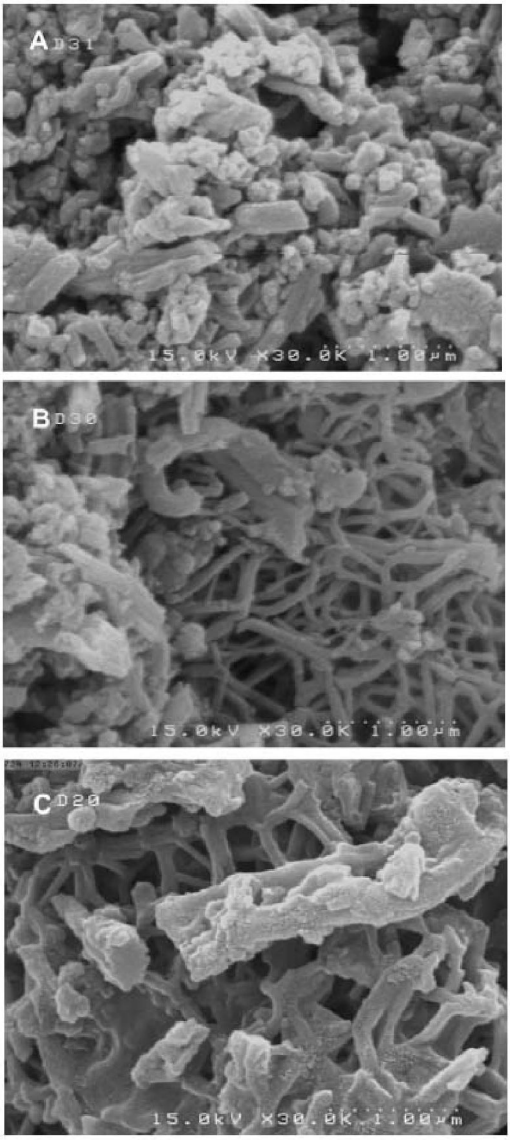
میکروسکوپ الکترونی

مورفولوژی سطح غشای هیبریدی با میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. در شکل۲ (A و B و C) مشخصات SPCEs اصلاح شده بعد از گذاشتن نانوکامپوزیت‌های MCM-41 ، MCM-41-HSA و MCM-41-HSA-PVA روی الکترودهای ساخته شده، با استفاده از SEM به ترتیب نشان داده شده است.

شکل 2A، توزیع خوبی از ساختارهای رشته‌ای جمع شده ماتریکس MCM-41 روی سطح الکترود اصلاح شده را نشان می‌دهد. ساختاری لوله‌ای و متخلخل که نتیجه بسته‌های شش ضلعی از منافذ استوانه‌ای یک جهته و اتصالات شبکه‌ای از حفره‌های بین رشته‌ای است.

شکل 2B، نمایش متراکم‌تر و ضخیم‌تری از ساختار را در مقایسه با شکل 2A نشان می‌دهد، تثبیت HSA در ماتریکس MCM-41 توسط جذب‌های فیزیکی مثل نیروی واندروالس و برهمکنش آب‌گریزی می‌باشد [۳۱]. جایگاه‌های تو خالی بین رشته‌های MCM-41 قطری حدود 50nm دارند که به اندازه کافی برای قرارگیری مواد در آنها بزرگ هستند.

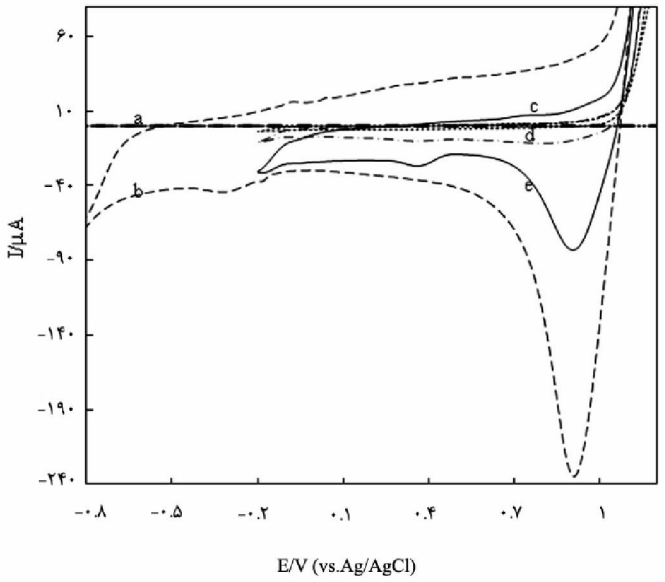
شکل 2C به دام افتادن MCM-41-HSA بعد از حضور PVA را نشان می‌دهد. تفکیک پذیری بالای FESEM نشان داد که غشای نانوکامپوزیت MCM-41-HSA-PVA بسیار متخلخل و متشکل از شبکه‌ای سه بعدی شامل فیبرهای پیوسته با قطرهای یکسان بوده است (شکل 2C).



شکل ۲- تصاویر FESEM از الکترود اصلاح شده با MCM-41 (A). MCM-41-HSA (B). و MCM-41-HSA-PVA (C).
شرایط: ولتاژ ۱۵۰ کیلو ولت؛ بزرگنمایی ۳۰۰۰۰×

بهینه‌سازی الکتروشیمیایی بیوسنسور

شکل ۳، ولتاموگرام‌های چرخه‌ای از الکترود برهنه و SPCEs اصلاح شده در HCl، ۰/۱ مولار را نشان می‌دهد. در ولتاموگرام‌های چرخه‌ای الکترود برهنه (ولتاموگرام a)، هیچ پیکی مشاهده نشد. الکترودهای اصلاح شده با MCM-41-HSA کاهش پیک در ۰/۳ ولت را نشان داد که نمایانگر این است که MCM-41 در حضور HCl الکتروفعال است (ولتاموگرام b). هنگامی که محلول بافر (۰/۰۱ مولار و pH 7.2) بدون HCl استفاده شد هیچ پاسخ جریانی با الکترود اصلاح شده MCM-41 گزارش نشد. کاهش پیک ضعیفی از ایمونوسنسور SPCE اصلاح شده با MCM-41-HSA-PVA شناسایی شد (ولتاموگرام c) که نشان دهنده این است که در مقایسه با ولتاموگرام b، پیک، حرکتی به سمت پتانسل بیشتر داشته و با کاهش جریان قابل توجهی همراه بوده است. دلیل این کاهش می‌تواند فقدان واکنش اکسید واحیاء ایجاد شده روی سطح الکترود با حضور پلیمر نارسانای PVA باشد [۲۱].



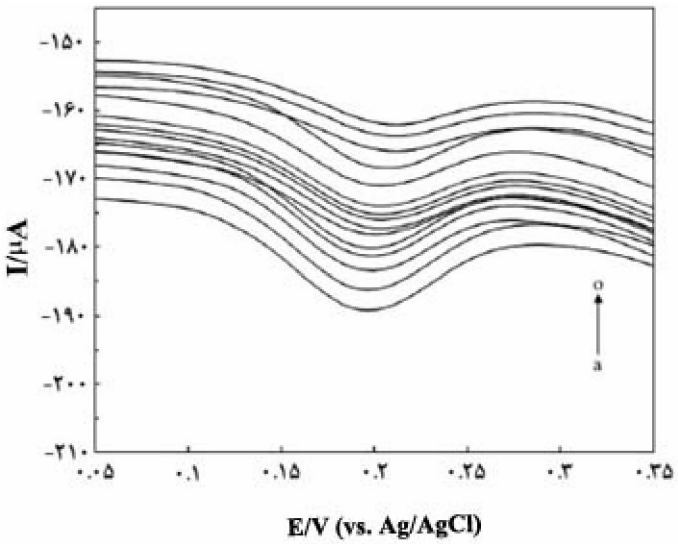
شکل ۳- ولتاموگرام‌های چرخه‌ای از الکترودهای اصلاح شده مختلف اندازه‌گیری شده در HCl، ۰/۱ مولار و در سرعت خوانش 50mV/s ; (a) الکترود برهنه؛ (b) MCM-41-HSA ; (c) MCM-41-HSA-PVA ;(d) MCM-41-HSA-PVA-;AuNPs (e) MCM-41-HSA-PVA-Ab-AuNPs

برای تعیین جذب غیراختصاصی، 25µl از محلول AuNP به الکترود اصلاح شده MCM-41-HSA-PVA اضافه و سپس پاسخ جریان اندازه‌گیری شد. سیگنال ضعیفی از ایمونوسنسور (شکل۳، ولتاموگرام d) برای الکترود نواری کربنی MCM-41-HSA-PVA-AuNP مشاهده کردیم، که ممکن است نتیجه واکنش غیراختصاصی بین AuNPs و کامپوزیت MCM-41-HSA-PVA باشد. سیگنال قوی‌تری در ۰/۲ ولت در حضور Ab-AuNPs در الکترود نواری کربنی اصلاح شده MCM-41-HSA-PVA مشاهده شد (شکل۳، ولتاموگرام e)، که به احتمال زیاد با اکسیداسیون اولیه پیوند AuNPs و سپس احیاء $AuCl_4^-$ در روش‌های الکتروشیمیایی تولید شده بود. پتانسیل استفاده شده در این کار برای کاهش $AuCl_4^-$ کمتر از مطالعه قبلی است [۲۵-۲۱]. نتایج بالا نشان می‌دهد که MCM-41 ماتریکس رسانایی است که به‌طور مستقیم افزایش سرعت انتقال الکترون به سطح الکترود را فراهم می‌کند. متناوباً، افزایش غلظت AuNP روی سطح الکترود به‌طور چشمگیری منجر به افزایش پیک کاتدی جریان در روش‌های CV می‌شود.

عملکرد سنجشی ایمونوسنسور

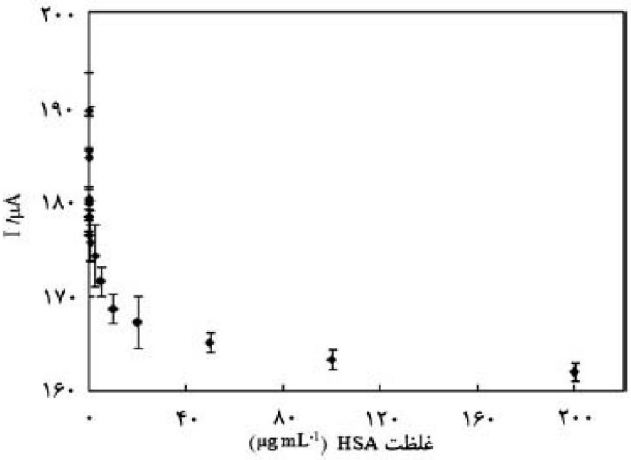
غلظت‌های شناخته شده آلبومین را با نمونه‌های نرمال ادرار رقیق کرده و غلظت‌های سریالی محلول استاندارد به‌دست آمد، غلظت‌های نهایی در محدوده 0-200µg/ml ساخته شدند. برای هر غلظت ۳ بار آزمایش انجام شد.

مخلوط 5µl از هر غلظت محلول استاندارد و 20µl از محلول Ab-AuNP روی سطح الکترودهای اصلاح شده قرار داده شد. بعد از نگه داشتن الکترود کار در HCl و پتانسیل ۱/۳ ولت به مدت ۸۰ ثانیه، اندازه‌گیری‌های DPV بین ۰/۰۵ و ۰/۳۵ ولت با سرعت خوانش 50mV/S انجام شد (شکل ٤). سیگنال جریان تولید شده با احیاء Au-آنتی‌بادی هدف، به‌عنوان پاسخ الکتروشیمیایی گزارش و افزایش در پیک جریان DPV با کاهش غلظت HSA در نمونه‌های استاندارد مشاهده شد.



شکل ۴- ولتاموگرام‌های مختلف تعیین HSA در حضور HCl ، ۰/۱ مولار و سرعت خوانش 50mV/s در رقت‌های سری آنتی‌ژن: ۰، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲۵، ۰/۰۰۵، ۰/۰۲۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ μg/ml . DPV نیز با اکسیداسیون اولیه AuNPs در ولتاژ ۱/۳ ولت و مدت زمان ۸۰ ثانیه روی سطح الکترود SCPE اصلاح شده با MCM-41-HSA-PVA-Ab-AuNPs انجام شد.

منحنی استاندارد ایمونوسنسور HSA در محدوده صفر تا 200μg/ml رسم شده است (شکل ۵). تحت شرایط بهینه حدود تشخیصی HSA، 1ng/ml تخمین زده شد. این بیوسنسور محدوده خطی بین 0.5-200μg/ml را اندازه‌گیری می‌کند که نسبت به مطالعه قبلی محدوده خطی وسیع‌تری دارد [۲۵، ۲۲، ۲۱].



شکل ۵- منحنی کالیبراسیون جریان پیک کاتدی در مقابل غلظت HSA هدف در ادرار. هر نتیجه موجود در نمودار میانگین ۳ بار تکرار آزمایش‌ها می‌باشد.

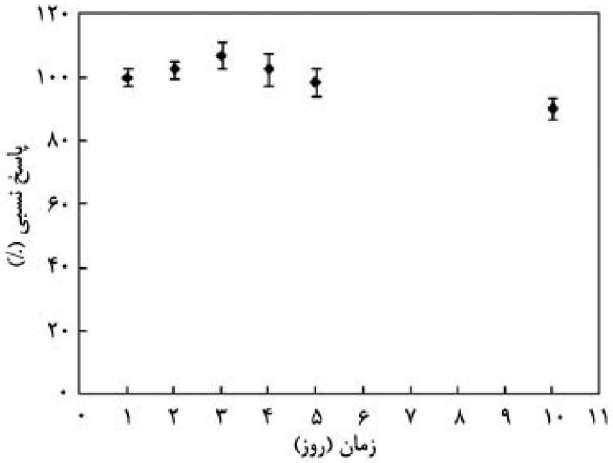
در واقع نسبت به الکترود اصلاح شده با PVA در مطالعه قبلی، این ایمونوسنسور محدوده تشخیصی پایین‌تر و حساسیت بالاتری دارد، که می‌تواند به‌دلیل نسبت سطح به حجم بیشتر و قابلیت رسانایی MCM-41 باشد. علی‌رغم عملکرد خوب MCM-41، ممکن است که این ماده طی فرآیند شستشو از سطح الکترود برداشته شود. برای غلبه بر این اشکال مهم، PVA را به‌علت توانایی چسبندگی عالی آن انتخاب کردیم، PVA می‌تواند [۱۹] به‌طور مؤثر MCM-41-HSA را روی سطح الکترود تثبیت کند [۲۱].

قابلیت تکرارپذیری و پایداری ایمونوسنسور

قابلیت تکرارپذیری پاسخ ایمونوسنسور، در غلظت‌های کم و متوسط HSA (۰/۵ و 20μg/ml) مورد بررسی قرار

گرفت. نسبت انحراف استاندارد (RSDs) برای ۵ ارزیابی درون سنجشی (اینتراسی) HSA در غلظت‌های ۰/۵ و 20μg/ml به ترتیب ٤/۳٪ و ۱/۳٪ بود، و برای ارزیابی بین سنجشی (اینتراسی) به ترتیب ٤/۱٪ و ۲/۵٪ بود، که قابلیت تکثیر خوبی برای ایمونوسنسور در طی سنجش‌ها نشان می‌دهد.

جهت بررسی پایداری MCM-41-HSA-PVA در سطح الکترود مطالعه امیدفر و همکارارن [۳۲] به‌کار گرفته شد. پایداری دمایی ایمونوسنسور در طی یک دوره ۱۰روزه در شکل ٦ نشان داده شده است. فعالیت کامل (۱۰۰٪) بیوسنسور برای مدت حداکثر ٤ روز در 45°C حفظ شد و سپس پایداری سنسور به آرامی شروع به کاهش کرد، تا ۱۰روز، فعالیت ۹۰ درصدی بیوسنسور وجود داشت (شکل ٦). ممکن است این کاهش در پایداری بیوسنسور به‌علت کاهش فعالیت آنتی‌ژن و آنتی‌بادی باشد. در مشاهدات اولیه، افزایش کمی در سیگنال جریان وجود داشت که احتمالاً می‌تواند به تغییرات ساختار سه بعدی پروتئین (آنتی‌بادی) در ماتریکس تثبیت شده، روی فرآیند آب رسانی نسبت داده شود.

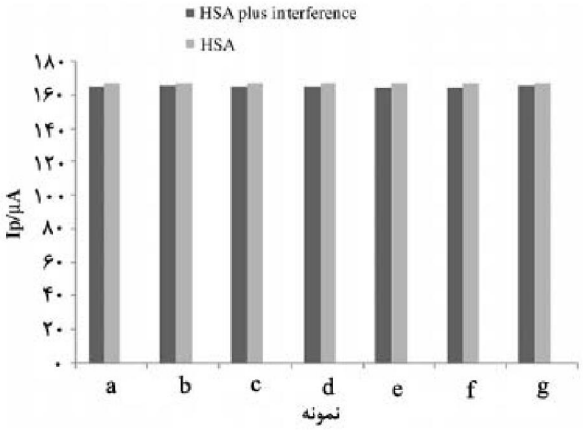


شکل ۶- پایداری دمایی ایمونوسنسور HSA. اندازه‌گیری با DPV در HCl ، ۰/۱ مولار انجام شد. (زمان و پتانسیل اکسیداسیون اولیه: ۸۰ ثانیه و ۱/۳ ولت). در فاصله بین اندازه‌گیری‌ها (n=3) الکترودها در دمای 45°C نگهداری شدند. پاسخ نسبی (٪) با نرمال سازی سیگنال تا حداکثر سیگنال محاسبه شد.

نتایج نشان می‌دهد که الکترود اصلاح شده MCM-41-HSA-PVA ظرفیت تشخیصی خود را بهتر از مطالعه قبلی حفظ می‌کند [۲۳]. این نکات ما را به یک ویژگی بزرگتری یعنی سازگاری زیستی MCM-41-PVA و AuNPs برای حفظ عملکرد مولکول‌های زیستی مربوطه، می‌رساند.

اختصاصیت ایمونوسنسور

برای به‌دست آوردن اختصاصیت ایمونوسنسور، اثر داروهای معمولی و پروتئین‌های انسانی که ممکن است با آنالیت‌های هدف، واکنش متقابل داشته و بدین ترتیب بر روی اختصاصیت ایمونوسنسور تأثیر بگذارند، مورد بررسی قرار گرفت. محلول HSA (30μg/ml) حاوی؛ اوره (1mol/L)، کراتینین (10g/L)، هموگلوبین انسانی (10mg/L)، ایمونوگلوبولین انسانی (10mg/L)، گلوکز (20g/L)، تتراسایکلین (200mg/L) و استامینوفن (200mg/L) آماده شد. ایمونوسنسور به‌طور جداگانه با همه ترکیبات فوق در غلظتی بالاتر از سطوح تکنیکی آنها سنجش شد بدین منظور ایمونوسنسور به‌طور جداگانه با 30μg/ml، محلول HSA در حضور و عدم حضور مداخله‌گر انکوبه شد. این ایمونوسنسور اختصاصیت خوبی برای تشخیص HSA نشان داد که به‌دنبال انکوباسیون ایمونوسنسور با مواد فوق هیچ تغییری در پیک جریان‌ها (Ip=165±5) (شکل ۷) مشاهده نشد.



شکل ۷- تفاوت در شدت سیگنال در مقابل انواع مختلفی از ترکیبات مداخله‌گر که بر اثر اکسیداسیون AuNPs تولید شده‌اند و احیاء $AuCl_4^-$ در DPV . مطالعه مداخله‌گرها با استفاده از محلول HSA (۳۰μg/ml) حاوی مواد زیر انجام شد: (a) اوره (1mol/L)، (b) کراتینین (۱۰g/L)، (c) هموگلوبین انسانی (۱۰mg/L)، (d) ایمونوگلوبولین انسانی (۱۰mg/L)، (e) گلوکز (۲۰g/L)، (f) تتراسیکلین (۲۰۰mg/L)، (g) استامینوفن(۲۰۰mg/L).

قابلیت اطمینان از سنجش ایمونوسنسور

برای اینکه از سنجش ایمونوسنسور اطمینان حاصل شود ۱٤ نمونه ادرار ناشناس مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن با یافته‌های روش ایمونوتوربیدومتری (IT) مقایسه شد (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه غلظت‌های HSA در نمونه‌های ادرار اندازه‌گیری شده با ایمونوسنسور طراحی شده در این کار با روش IT

نمونه	روش		RSD%
	ایمونوسنسور (μg/ml)	IT (μg/ml)	
۱	٤/۲	٤/۵	۷/۰
۲	۵/۵	۵/٤۵	۵/٤
۳	۱۰/٦	۱۱/۱	۳/۷
٤	۲۲/۸	۲٤/۱	۵/۳
۵	۲۲/۰	۲۳/۵	٦/۸
٦	۰/۰۰٤	≤۲/۵	–
۷	۵۰۰×۱۰^{-٦}	≤۲/۵	–
۸	۲۵۰×۱۰^{-٦}	≤۲/۵	–
۹	۳۷/۰	۳۵/۰	۵/٤
۱۰	٦۲/٤	۵۹/۲	۸/۲
۱۱	۵۳/٦	۵۱/۲	۷/۹
۱۲	۹۵/۲	۸۷/۸	۹/۰
۱۳	۱۲۵/٦	۱۲٤/۰	۱/۹
۱٤	۱٤۳/۱	۱٤۱/۳	٦/۰

نکته: IT: ایمونوتوربیدومتری؛ نتایج به‌صورت میانگین ۳ بار تکرار آزمایش‌ها ارائه شده‌اند. غلظت‌های آلبومین پایین‌تر از ۳۰μg/ml= نرمال؛ غلظت‌های آلبومین بین ۳۰ و ۲۹۹ μg/ml= میکروآلبومینوریا؛ غلظت‌های آلبومین بالاتر از ۳۰۰ μg/ml= ماکروآلبومینوریا یا آلبومینوریای بالینی. نمونه‌های ادرار با غلظت‌های برابر با ۱۸۰μg/ml یا بالاتر از آن رقیق شده‌اند.

RSDs دو روش اندازه‌گیری گزارش شده برای نمونه‌های کنترل و دیابتی تخمین زده شد که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. RSD به‌دست آمده، کمتر از ۷٪ شد که شاخص قابل قبولی برای دقت ایمونوسنسور و مطابق مطالعه قبلی بود.

رابطه قابل توجیه بین این دو روش نشان می‌دهد که این بیوسنسور می‌تواند برای تشخیص بالینی HSA در نمونه‌های واقعی استفاده شود. لازم به ذکر است که غلظت آلبومین کمتر از ۲/۵ μg/ml نمی‌تواند با روش IT تشخیص داده شود چون پایین‌ترین حد تشخیصی این روش 2.5μg/ml می‌باشد.

در این مطالعه، HSA به‌عنوان پروتئین مدل انتخاب شده است تا برای بررسی پاسخ الکتروشیمیایی ایمونوسنسور مبتنی بر MCM-41-PVA و AuNPs استفاده شود. بنابراین، امکان استفاده از این ایمونوسنسور برای ردیابی حساسیت مولکول‌های زیستی دیگر در تشخیص‌های بالینی وجود دارد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است، همچنین از جناب آقای محمدرضا گنجعلی به خاطر اهدای نانوذرات سیلیکا MCM-41 قدردانی می‌شود.

مأخذ

1. sagkogeorgas F, Ochsenkuhn-Petropoulou M, Niessner R, Knopp D. Encapsulation of biomolecules for bioanalytical purposes: preparation of antibody-doped nanometer-sized silica particles by reverse micelle and sol–gel processing. *Anal. Chim. Acta* 2006; 573/574: 30–37.
2. Wu J, Fu Z, Yan F, Ju H. An amperometric immunosensor for separation-free immunoassay of CA125 based on its covalent immobilization coupled with thionine on carbon nanofiber. *J. Immunol Methods* 2007; 322: 2-19.
3. Jiang X, Li D, Xu X, Ying Y, Li Y, Ye Z, Wang J. Immunosensors for detection of pesticide residues, Biosens. *Bioelectron* 2008; 23: 1577–1587.
4. Wang S.F, Tan Y.M. A novel amperometric immunosensor based on Fe3O4 magnetic nanoparticles/chitosan composite film for determination of ferritin. *Anal. Bioanal. Chem* 2007; 387: 703–708.
5. Liu Z.M, Yang H.F, Li Y.F, Liu Y.L, Shen G.L, Yu R.Q. Core–shell magnetic nanoparticles applied for immobilization of antibody on carbon paste electrode and amperometric immunosensing. *Sens. Actuat B* 2006; 113: 956–962.
6. Wilson M.S, Rauh R.D. Novel amperometric immunosensors based on iridium matrices. *Biosens. Bioelectron* 2004; 19: 693–699.
7. Kerman K, Vestergaard M, Tamiya E. Label-free electrical sensing of small-molecule inhibition on tyrosine phosphorylation. *Anal. Chem.* 2007; 79: 6881–6885.
8. Tang D, Yuan R, Chai Y, An H. Magnetic-core/porous-shell CoFe2O4/SiO2 composite nanoparticles as immobilized affinity supports for clinical immunoassays. *Adv. Funct. Mater* 2007; 17: 976–982.
9. Liu G, Lin Y. Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays. *Talanta* 2007; 74: 308–317.
10. Wu J, Fu Z, Yan F, Ju H. Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers. *Trends Anal. Chem* 2007; 29: 679–688.
11. Xie G.Q, Hana X, Long S.Y. Effect of small size on dispersion characteristics of wave in carbon nanotubes. *Int. J. Solids Struct* 2007; 44: 1242–1255.
12. Dai Z, Lu G, Bao J, Huang X, Ju H. Low potential detection of NADH at titanium-containing MCM-41 modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis* 2007; 19: 604–607.
13. Dai Z, Xu X, Wu L, Ju H. Detection of trace phenol based on mesoporous silica derived tyrosinase–peroxidase biosensor. *Electroanalysis* 2005; 17: 1571–1577.
14. Hartmann M. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis. *Chem. Mater.* 2005; 17: 4577– 4593
15. Lei C, Shin Y, Magnuson G.K, Fryxell G, Lasure L.L, Elliott D.C, Liu J, Ackerman E.J. Characterization of functionalized nanoporous supports for protein confinement. *Nanotechnology* 2006; 17: 5531–5538.
16. Li Y, Zeng X, Liu X, Wei W, Luo S. Direct electrochemistry and electrocatalytic properties of hemoglobin immobilized on a carbon ionic liquid electrode modified with mesoporous molecular sieve MCM-41. *Colloids Surf. B* 2010; 79: 241–245.
17. Xu X, Lu P, Zhou Y, Zhao Z, Guo M. Laccase immobilized on methylene blue modified mesoporous silica MCM-41–PVA. *Mater. Sci. Eng. C* 2009; 29: 2160–2164.

18. Tsai Y.C, Huang G.D, Chiu C.C. Amperometric ethanol biosensor based on poly (vinyl alcohol)–multiwalled carbon nanotube–alcohol dehydrogenase biocomposite. *Biosens. Bioelectron.* 2007; 22: 3051–3056.
19. Doretti L, Ferrara D, Gattolin P, Lora S, Schiavon F, Veronese F.M. PEG modified glucose oxidase immobilized on a PVA cryogel membrane for amperometric biosensor applications. *Talanta* 1998; 45: 891–898.
20. Crespilho F.N, Ghica M.E, Zucolotto V, Nart F.C, Oliveira Jr. O.N, Brett C.M.A. Electroactive nanostructured membranes (ENM): synthesis and electrochemical properties of redox mediator-modified gold nanoparticles using a dendrimer layer-by-layer approach. *Electroanalysis* 2007; 19: 805–812.
21. Omidfar K, Dehdast A, Zarei H, Sourkohi B.K, Larijani B. Development of urinary albumin immunosensor based on colloidal Au-NP and PVA, Biosens. *Bioelectron* 2011; 26: 4177–4183.
22. Ho J.A, Chang H.C, Shih N.Y, Wu L.C, Chang Y.F, Chen C.C, Chou C. Diagnostic detection of human lung cancer-associated antigen using a gold nanoparticles based electrochemical immunosensor. *Anal. Chem.* 2010; 82: 5944–5950.
23. Leng C, Lai G, Yanb F, Jua H. Gold nanoparticles as an electrochemical label for inherently crosstalk-free multiplexed immunoassay on a disposable chip. *Anal. Chim. Acta* 2010; 666: 97–101.
24. Wang S, Zhang X, Mao X, Zeng Q, Xu H, Lin Y, Chen W, Liu G. Electrochemical immunoassay of carcinoembryonic antigen based on a lead sulfide nanoparticle label. *Nanotechnology* 2008; 19: 435501–435507.
25. Idegami K, Chikae M, Kerman K, Nagatani N, Yuhi T, Endo T, Tamiyae E. Gold nanoparticles-based redox signal enhancement for sensitive detection of human chorionic gonadotropin hormone. *Electroanalysis* 2008; 20:14–21.
26. Pumera M, Aldavert M, Mills C, Merkoci A, Alegret S. Direct voltammetric determination of gold nanoparticles using graphite–epoxy composite electrode. Electrochim. Acta 2005; 50: 3702–3707.
27. Escosura-Muniz A, Parolo C, Maranb F, Merkoci A. Size-dependent direct electrochemical detection of gold nanoparticles: application in magnetoimmunoassays. *Nanoscale* 2011; 3: 3350–3356.
28. 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. Biotechnol.* 2010; 160: 843–855.
29. Omidfar K, Sourkohi B.K, Larijani B. Development of a new sensitive immunostrip assay based on mesoporous silica and colloidal Au-nanoparticles. *Mol. Biol. Rep* 2011; doi:10.1007/s11033-011-0856-5.
30. Bonel L, Vidal J.C, Duato P, Castillo J.R. Ochratoxin a nanostructured electrochemical immunosensors based on polyclonal antibodies and gold nanoparticles coupled to the antigen. *Anal. Methods* 2010; 2: 335–341.
31. Omidfar K, Kashanian S, Paknejad M, Kashanian S, Larijani B, Roshanfekr H. Production and characterization of monoclonal antibody against human serum albumin. *Hybridoma* 2007; 26: 217–222.
32. Omidfar K, Rasaee M.J, Zaraee A.B, Amir M.P, Rahbarizadeh F. Stabilization of penicillinase–hapten conjugate for enzyme immunoassay. *J. Immunoassay Immunochem* 2002; 23: 385–398.

ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR DEVELOPMENT USING MCM-41/ PVA AND AUNPS

Zahra Mirzaeezadeh[1], Hajar Zarei[1], Kobra Omidfar[1*]

1. *Biosensor Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular -Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

ABSTRACT

Background: In this study, using anti-human serum albumin (HSA)-conjugated gold nanoparticles (AuNPs) as an electrochemical label and mobile crystalline material-41 (MCM-41)–polyvinyl alcohol (PVA) mesoporous nanocomposite as an immobilization platform, a new immunosensor was established.
Methods: Field emission scanning electron microscopy (FESEM), cyclic voltammetry (CV), and differential pulse voltammetry (DPV) have been applied to determine the physicochemical and electrochemical properties of this hybrid film in immunosensor development.
Results: A suitable attachment between HSA and MCM-41 and also a thick layer deposition of MCM-41–HSA–PVA film onto the electrode surfaces was observed by FESEM. DPV was employed for quantitative determination of antigen.
Conclusion: In optimal conditions, this immunosensor could detect HSA in a high linear range (0.5–200 μg ml^{-1} with a low detection limit of 1 ng ml^{-1}. This new strategy showed acceptable reproducibility, stability, and reliability and could also be applied to detect the other antigens.

Keywords: Immunosensor, Albumin, MCM-41, PVA, Nanocomposite

* Floor 5th , Shariati Hospital, North Karegar St., Tehran, Iran, Post code:1411413137, Tel: +98(21)88220037, Fax: +98(21)88220052, Email: omidfar@tums.ac.ir