Nova Biologica Reperta 8(1): 1-12 (2021) Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115 https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.8.1.1

سنجش الکتروشیمیایی آنتیبادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز توسط تقویت نقره نانوذرات طلا بر الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با نانولولههای کربنی

سلیمه رئیسی، احمد مولاییراد، مینو صدری و حمیده روحانینژاد

پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران مسئول مکاتبات: احمد مولاییراد، molaeirad@mut.ac.ir

چکیده. کزاز توسط توکسین حاصل از باکتری کلستریدیوم تنانی ایجاد میشود. بدلیل آلودگی سریع و آسان با این باکتری، تشخیص وضعیت ایمنی افراد نسبت به این عامل حائز اهمیت است. از اینرو بیوسنسورهای الکتروشیمیایی یکی از ابزارهای سودمند در این رابطه بوده و دارای ویژگیهایی مانند سرعت، سادگی، تجهیزات ارزان و قابل حمل هستند، بالین وجود حساسیت شناسایی آنها کافی نیست. بنابراین، تقویت نقره در ارتباط با نانوذرات-طلا برای بهبود شناسایی آنالیتها پیشنهاد شده است. از اینرو در بررسی اخیر با یان باکتری ایند سرعت، سادگی، تجهیزات ارزان و قابل حمل هستند، بالین وجود حساسیت شناسایی آنها کافی نیست. بنابراین، تقویت نقره در ارتباط با نانوذرات-طلا برای بهبود شناسایی آنالیتها پیشنهاد شده است. از اینرو در بررسی اخیر با کاربرد نانوذرات-طلا بعنوان برچسب و پس از آن تقویت نقره، حضور آنتیبادی ضدتوکسوئید کزاز به صورت "آری یا نه" به روش الکتروشیمیایی با قالب سنجشهای ایمنی غیر مستقیم بر روی الکترودهای کربن-شیشه ای اصلاحشده با نانولوله کربنی مورد ارزیابی قرار گرفت. روش آنالیتیکال شامل برهمکنش سم کزاز و آنتی¬بادی بر روی الکترود است کار برد نانوذرات طلا بعنوان برچسب و پس از آن تقویت نقره، حضور آنتیبادی قرار گرفت. روش آنالیتیکال شامل برهمکنش سم کزاز و آنتی¬بادی بر روی الکترود است که توسایی با قالب سنجشهای الکترود است که توسا اصل آنتی¬بادی بازی و آناین کربنی مورد ارزیابی قرار گرفت. روش آنالیتیکال شامل برهمکنش سم کزاز و آنتی¬بادی بر روی الکترود است که توسا اس تغییرات سیگنال طلا نسبت به الکترود بر ساس تغییرات یون ¹⁴ ها بر روی سطح الکترود بر سی شده ناید که م⁴ و پس از آن تقویت نقره دنبال گردید. تغییر ولتامتری-چرخهای و تغییرات سیگنال طلا نسبت به میزو بر اساس تغییرات یون ¹⁴ ها بر می میدن یا مال این روی باغان ولی مالی می میند نایده میان دادکه م⁴ را کا رول پیش از واکنش تقویت نقره، مرا گردید. تغییرات سیگنال طلا نسبت به روش با مان تقویت نقره، مراین می از آن افزایش یافت. همو بر این ماید و تواع به موار و این با بر روش باعث و در مواب و قالی های مالی می میند و تواع به میزو مال بروی مال مای مندی موله و دنبال گردید. مولم و در مولم و در مولم و در مولم و مال بر مال مال می مالی می مان و در موم و در مولم و در موان مال و مال مال مال ماله مندی مولم و در مولم و در مولم و در

واژههای كلیدی. بیوسنسور، تقویت سیگنال، سنجش ایمنی، نانوذرات، ولتامتری-چرخهای

Electrochemical assay of anti-tetanus toxoid monoclonal antibody by silver enhancement of gold nanoparticles at carbon nanotubes modified glassy carbon electrode

Salimeh Raeisi, Ahmad Molaei Rad, Mino Sadri & Hamideh Rouhani Nejad

Faculty of Biological Science and Technology, Department of Chemistry and Chemical Engineering, Malek-e-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

Correspondent author: Ahmad Molaei Rad, molaeirad@mut.ac.ir

Abstract. Tetanus is caused by the toxin secreted by *Clostridium tetani*. Due to the rapid infection with this bacterium, it is so important to investigate the tetanus immunity of people. Therefore, electrochemical biosensors, as one of the most effective tools in this regard, have demanded characteristics such as being fast, simple, cost-effective and portable. However, their detection sensitivity is not sufficient. Hereon, silver enhancement of gold-nanoparticles was proposed for the improvement of detection. Hence, the current study applied gold-nanoparticles as label, following with silver enhancement, to investigate the yes/no electrochemical detection of anti-tetanus toxoid antibodies in the indirect immunoassay utilizing glassy-carbon electrodes modified by carbon nanotubes. The analytical procedure consists of the reactions of the tetanus toxoid with the antibody at electrode, so that followed by the interaction of gold-labeled secondary antibody and then silver enhancement process. In this study, the cyclic-voltammeter variation and difference of gold to silver signal based on silver ions fluctuations were also investigated. The results indicated that ΔE_p increased from 0.24 V before silver enhancement reaction to 0.57 V after the silver enhancement. The results also demonstrated that after silver enhancement, current significantly increased and current plot at E^e_p transferred to positive potentials and at E^a_p moved to negative potentials. In conclusion, this method increases the detection sensitivity and can simply use to other bio-molecules detection.

Key words. biosensor, cyclic voltammeter, immunoassay, nanoparticles, signal enhancement

دريافت: ۲۲۹۶/۱۹/۱۲ / الصلاح: ۱۳۹۶/۱۹/۱۹ / التشار: ۱۴۰۰/۱۳۹۶/۱۳۹۲/ التشار: ۱۴۰۰/۱۳۹۶ / ۱۳۹۶/۱۹/۱۹ دريافت: ۲۲۹۶/۱۹/۱۹ / مدونه ما ۲۹۶/۱۹/۱۹

مقدمه

بيماري كزاز نوعي عفونت است كه عامل ايجاد كننده آن توکسین حاصل از باکتری بی هوازی کلستریدیوم تتانی است. این باكترى نوعى سم عصبى به نام تتانوس ترشح مىكند كه به انقباض شدید عضلات و در نهایت مرگ بیمار منجر می شود. تتانوس، اگزوتوکسینی قوی است که مسئول بروز علائم ویژه بيماري كزاز است (Burkin et al., 2004; Jain et al., 2010;) Van Hoeven et al., 2008). كزاز يک بيماري كاملاً قابل كنترل است، بهطورىكه با تزريق واكسن كزاز (توكسوئيد كزاز)، بدن انسان در برابر سم میکروب ایمن می شود. ایمنیزایی در برابر کزاز به میزان زیادی توسط بررسی سطوح آنتیبادی علیه توكسوييد ارزيابي مي شود (Burkin et al., 2004; Reder et) al., 2008; Schauer et al., 2003; Van Hoeven et al., 2008). ارزیابی سطوح آنتیبادی IgG طی ایمنیزایی با توکسوئید کزاز، شاخص مفیدی در پاسخ ایمنی است. بررسی وضعیت ایمنی افراد در برابر کزاز دارای اهمیت بسیاری است و بهمنظور افزایش فعالیت سیستم ایمنی علیه این بیماری به تزریقهای یادآور نیاز مبرم دارد (Schauer et al.,2003). متداول ترین روش برای ارزیابی ایمونو گلوبولین های اختصاصی عليه توكسين كزاز درآزمايشگاه، سنجش جذب ايمني متصل به Burkin et al., 2004; Van Hoeven et al.,) آنزیم است 2008). شناسایی با حساسیت بالا و تحلیل صحیح بیومارکرها در نمونههای زیستی برای تشخیص زودهنگام، درمان و مدیریت بيمارىها حائز اهميت است. باتوجه به ماهيت مولكول برچسب واکنش اختصاصی میان آنتیبادی و آنتیژن به منزلهٔ سیگنال با روشهای مختلف نوری، مغناطیسی، الکتروشیمیایی، رادیواکتیو، پیزوالکتریک، مکانیکی و اسپکتروسکوپی جرمی توسط مبدل Arruebo et al., 2009; Dobosz et al.,) ارائه می شود 2015). از زمانی که سنجشهای ایمنی مبتنی بر برچسبهای فلزی توسعه یافته است، پیشرفتهای گستردهای با کاربرد انواع نانوذرات كلوئيدى فلزى ايجاد شده است (Jazayeri et al., 2016). اگرچه روشهای آنالیتیکال بسیاری، از جمله روشهای طیفسنجی برای تعیین کمی سنجشهای ایمنی مبتنی بر نانوذرات فلزی وجود دارد، اما بااینوجود، شناساییهای الكتروشيميايي باتوجه به سرعت، سادكي، كاربرد تجهيزات ارزان و قابل حمل اميدوار كننده هستند. حساسيت شناسايي اين روشها در مقایسه با روشهای واجد برچسبهای فلورسانس كافى نيست (Chu et al., 2005; Gupta et al., 2007). تقویت نقره برای بهبود حساسیت شناسایی پیشنهاد شده است.

تقویت نقره در ارتباط با نانوذرات طلا در سنجشهای ایمنی به-کار گرفته میشود. حساسیت شناسایی، زمانی که ویژگیهای کاتالیتیک نانوذرات طلا به کاهش یونهای نقره (⁽⁺Ag) به فلز نقره (^{Ag0}) منجر میشود، افزایش مییابد و سیگنال را تقویت می کند (Ag⁰) منجر میشود، افزایش مییابد و سیگنال را تقویت می کند (Ag⁰) منجر میشود، افزایش می طلا با قطر ۱۰ نانومتر بررسی اخیر با کاربرد نانوذرات کلوئیدی طلا با قطر ۱۰ نانومتر بمثابهٔ برچسب و پس از آن تقویت نقره، حضور آنتیبادیهای مونوکلونال ضدتوکسوئید کزاز به صورت ves or no بهروش الکتروشیمیایی با قالب سنجشهای ایمنی غیرمستقیم روی الکترودهای کربن-شیشهای اصلاح شده با نانولولههای کربنی الکترودهای کربن-شیشهای اصلاح شده با نانولولههای کربنی نانوزرات طلا و پس از آن تقویت نقره نانوذرات طلا روی الکترود کربن-شیشهای اصلاح شده با نانوذرات طلا روی الکترود

مواد و روشها

اصلاح سطح الکترود کربن شیشهای توسط نانولولههای کربنی

الكترود كربن شيشهاي، تا زماني كه سطح الكترود كاملاً شفاف شود، با محلول ۰/۰۵ میکرومولار آلومینیوم پولیش داده شد و به مدت ۵ دقیقه سونیکه شد. برای اطمینان از تمیزی سطح الکترود و فقدان ناخالصی روی آن، در ابتدا، نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکترود درحضور آب مقطر بررسی شد. پس از آن، دوباره نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکترود درحضور محلول الكتروليت ۵ ميلىمولار پتاسيم هگزا-سيانوفرات و ۵ ميلىمولار پتاسیم نیترات بررسی شد و از ایجاد واکنش در محلول الکترولیت اطمينان حاصل شد (Musameh et al., 2002). برای اصلاح الکترود کربن شیشهای از نانولولههای کربنی با غلظت ۱ میلی گرم در میلیلیتر در محلول ۱ درصد وزن به حجم نافیون در اتانول استفاده شد. نانولولههای کربنی با ساختارهای چندلایه با طول ۷-۱۵ نانومتر و قطر ۰/۵ تا ۱۰ میکرومتر به صورت دستساز از پژوهشگاه ملی نفت تهیه شدند. این محلول به مدت ۱۰ دقیقه سونیکه شد و حجم ۱۰ میکرولیتر از این محلول روی سطح الكترود به روش نقطه گذارى ريخته شد. الكترود به مدت يک شبانه روز در دمای اتاق (۲۵ درجهٔ سانتیگراد) قرار گرفت تا کاملاً Grieshaber et al., 2008; Thvenot et al.,) خشک شود .(2001; Wang & Li 2007



شکل ۱- طرح کلی شناسایی آنتیبادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز با کاربرد تقویت نقرهٔ نانوذرات طلا روی الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با نانولولههای کربنی. Figure 1. The outline for the detection of anti-tetanus toxoid monoclonal antibody by using silver enhancement of gold nanoparticles at carbon nanotubes modified glassy-carbon electrode.

ایجاد سنجشهای زیستی غیر مستقیم روی الکترود کربن شیشهای اصلاح شده

پس از اصلاح سطح الكترود، آنتى زن توكسوئيد كزاز با غلظت (μg/ml ۵۰) در بافر فسفات با pH=7.4 منتقل شد و به میزان ۴ ميكروليتر روى الكترود اصلاح شده توسط ميكروپيپت چكانده شد و پس از آن به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد نگهداری شد (Dutta et al., 2017; Qu et al., 2011; Zhang)نگهداری شد (Songbai et al., 2016). استوک آنتی ژن توکسوئید کزاز 2550 معادل (mg/ml 1.۲۴) از مؤسسة تحقيقات واكسن و سرم سازی رازی تهیه شد که توسط بافر PBS رقیقسازی شد و به غلظت نهایی (µg/ml ۵۰) رسید. در مرحلهٔ بعد الکترود کربن شیشهای که واجد آنتی ژن تثبیت شده است توسط بافر بلوکه کننده به مدت ۲ ساعت به منظور کاهش برهم کنشهای غیر-اختصاصى انكوبه شد. بافر بلوكه كننده شامل ۲۰ ميلىمولار سديم فسفات، ۱۵۰ میلیمولار سدیم کلراید، ۴ درصد آلبومین سرم گاوی و ۲ میلیمولار سدیم آزید در pH=7.4 بود. در ادامه، آنتیبادی مونوكلونال ضدتوكسوئيد كزاز روى الكترود منتقل شدند و اجازه داده شد تا به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با سطح الکترود واکنش دهند. استوک اولیه آنتیبادی از نمونههای استاندارد کیت ELISA برای شناسایی آنتیبادی مونوکلونال ضدتوکسوئید کزاز با غلظت اوليه (IU/ml ۱) استفاده شد. برای سنجش زيستی آنتی بادی با غلظت مشخص (IU/ml ۰.۰۸) در بافر فسفات تهیه شد (Qu et al., 2011; Xu et al., 2016).

ایجاد کانجوگههای نانوذرات طلا-آنتی بادی ثانویه به روش الکترواستاتیک

در این مرحله، از نانوذرات طلا با ویژگیهای قطر ۱۰ نانومتر، میزان نانوذره در میلیلیتر ۱۰۱۲×۵٬۹۸، پیک رزونانس پلاسمون سطحی ۵۲۵–۵۲۰ نانومتر، چگالی نوری ۱/۵ در ۵۲۰ نانومتر و جذب مولی 01/1 ×108 (M-1cm-1) استفاده شد. نانوذرات

کروی طلا با قطر ۱۰ نانومتر از شرکت نانو سلامت آروین خریداری شد. در بررسی حاضر، در ابتدا، نانوذرات طلا توسط اسپکتروفوتومتر (4300 Pro UV–vis, Amersham Biosciences) UV-Vis طول موج ۴۰۰–۲۰۰ نانومتر و همچنین توسط تصاویر میکروسکوپ الکترون عبوری (TE 2000 Ziess TEM) تحت ارزیابی قرار گرفتند. پیش از تصویربرداری توسط MEM، نانوذرات طلا در کرفتند. پیش از تصویربرداری توسط MeM، نانوذرات طلا در دقیقه سونیکه شدند. نمونهٔ نانوذرات طلا که از هر نوع مادهای خالص سازی شدهاند روی یک شبکهٔ کربن پوشیده شده با مس تهنشین شدند، تا این که به وسیلهٔ TEM تصویربرداری و ویژگیهای آنها مشخص شود (2001, Jana et al., 2001).

برهم کنشهای فیزیکی (برهم کنشهای الکترواستاتیک) برای ایجاد کانجوگههای آنتیبادی با نانوذرات طلا استفاده شد. روش اخیر مبتنی بر روش (Hall et al., 2011) است. از آنجا که آنتیبادی IgG انسانی دارای pI=6.6-7.2 و دارای بار مثبت است، در ابتدا pH محلول نانوذرات از ۳ به ۹ تغییر کرد تا pH محلول به بالاتر از pI پروتئین منتقل شود و نانوذرات به صورت الکترواستاتیک به آنتیبادی اتصال یابند. سپس، به ۳۰۰ میکرولیتر از محلول نانوذره با pH=9 میزان ۲۴ میکرولیتر آنتیبادی (۰.۰۸ IU/ml) اضافه شد. این محلول به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد و پس از گذشت زمان انکوباسیون برای خارج کردن آنتیبادیهای اتصال نیافته محلول به مدت ۱۵ دقیقه و با دور (rpm ۱۴۰۰۰) در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی گراد سانتریفیوژ شد. کانجوگههای آنتیبادی نانوذرات تهنشین شده، در نهایت برای رسیدن به حجم قبلی با آب مقطر استریل رقیقسازی و در دمای ۴ درجهٔ سانتیگراد نگهداری شدند (Hall et al., 2011). پس از آن ۴ میکرولیتر از کانجوگههای نانوذرات طلا آنتیبادی، روی الکترود کربن شیشهای منتقل شدند و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق روى الكترود انكوبه شدند تا با آنتىبادى اوليه برهم كنش

Ashworth-Sharpe et al., 2016; Lange et al.,) دهند (Ashworth-Sharpe et al., 2016; Li et al., 2014). در این بررسی، همچنین پایداری کانجوگههای نانوذرات طلا آنتیبادی طی یک هفته با بررسی تغییرات طیف رزونانس پلاسمون سطحی موضعی ارزیابی شدند. تقویت نقره نانوذرات طلا

برای انجام اتومتالوگرافی و یا تقویت نقرهٔ نانوذرات طلا، از یک کیت واکنشی، که به ترتیب حاوی دو محلول نیترات نقره و عامل کاهشی (هیدروکوئینون) است (Silver Enhancer Kit, Li کاهشی (هیدروکوئینون) است (Silver, Abcam بررسی تقویت نقره در انتهای مراحل سنجش زیستی مخلوطی از حجمهای مساوی از محلولهای آغازگر (نیترات نقره) و تقویت کننده (هیدروکوئینون) روی سطح الکترود کربن شیشهای ریخته شد تا با کانجوگههای نانوذرات طلا آنتیبادی روی سطح الکترود برهم کنش نشان دهند و یک واکنش کاهشی برای رسوب نقره انجام پذیرد (Gupta Shalini et al., 2007; Liu et al., 2014). پس از پذیرد (402 بالا و یک میلیمولار پتاسیم هگزا سیانوفرات و ۵ محلول الکترولیت ۵ میلیمولار پتاسیم هگزا سیانوفرات و ۵ میلیمولار پتاسیم نیترات ارزیابی شد (Musameh et al., 2002).

برای بررسیهای الکتروشیمیایی از آزمایشهای ولتامتری چرخهای با دستگاه Drop Sens, Microstate 200 و از یک سلول با حجم ۲۰ میلی لیتر واجد سه الکترود استفاده شد. الکترود کربن شیشهای اصلاح شده بهعنوان الکترود کار، الکترود آمد، الکترود کربن شیشهای مرجع و الکترود پلاتین به منزلهٔ الکترود شمارنده استفاده شد. اندازه گیری الکتروشیمیایی بر مبنای تغییر در سیگنال الکتریکی جریان در برابر پتانسیل پس از برهم کنش میان آنتیژن-آنتیبادی و ایمنی سیگنال حاصل از نانوذرات طلا پس از قرار گیری در معرض یتانسیلهای ۸۰۰- تا ۱۰۰۰ میلیولت و سرعت اسکن ۱۰۰ میلی-ولت بر ثانیه استفاده شد. اندازه گیریها در محلول الکترولیت حاوی ۵ پتانسیلهای ۸۰۰- تا ۱۰۰۰ میلیولت و سرعت اسکن ۱۰۰ میلی-ولت بر ثانیه استفاده شد. اندازه گیریها در محلول الکترولیت حاوی ۵ یعلیمولار ۲۰۵3 و ۵ میلیمولار SFe(CN)6 و تمامی اندازه-گیریها دردمای اتاق انجام شد (, STe al., 2013; Xu et al., 2016; Zhang Songbai et al., 2016;

نتايج

ویژگیهای نانوذرات طلا توسط اسپکتروفوتومتر UV-Vis در طول موج ۴۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر و همچنین تصویر TEM تحت ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی ویژگیهای نانوذرات طلا توسط اسپکتروسکوپی UV-Vis و تصویر TEM در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج

نشان دادند که باند جذب پلاسمون سطحی نانوذرات طلا در ناحیهٔ مرئی در طول موج ۵۲۴ نانومتر دیده شد. همچنین، باتوجه به تصویر TEM میانگین قطر نانوذرات طلا ۱۰ نانومتر تخمین زده شد.

پس از ایجاد کانجوگههای آنتیبادی-نانوذرات طلا، بهمنظور بررسی تأييد كانجوگه شدن نانوذرات طلا به آنتىبادىھاى ثانويه، تغييرات طيف رزونانس پلاسمون سطحی موضعی برای نانوذرات طلا قبل از کانجوگه شدن با آنتی بادی و پس از کانجوگه شدن با آنتی بادی های مونوكلونال ضد توكسوئيد كزاز توسط بررسي طيفهاي جذبي حاصل از طيف سنجي UV/Vis در محدودهٔ طول موج ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر تحت ارزيابي قرار گرفت. شکل ۳ مبين نتايج کانجوگاسيون است. نانوذرات طلای کلوئیدی بهتنهایی یک طولموج در بیشینه جذب کا نانومتر نشان میدهد. پس از کانجوگه شدن و اتصال (λ_{max}) نانوذرات به آنتیبادی λ_{\max} به میزان ۷ نانومتر به ۵۳۱ نانومتر به سمت طول موجهای بالاتر منتقل شد. همچنین، جذب به میزان ۰/۳۰۳ (از ۰/۵۸۰ پیش از اتصال به ۰/۲۷۷ پس از اتصال) کاهش يافت. اين تغييرات تأييد كنندهٔ اتصال نانوذرات طلا به آنتيبادي مونوكلونال است. بهمنظور ارزيابی كانجوگههای نانوذرات طلا-آنتىبادى ثانويه، طيف LSPR اين كانجوگەها طى يک هفته توسط طیف سنجی UV/Vis ارزیابی شد. نتایج بهوضوح نشان دادند که بیشینه جذب کانجوگههای نانوذرات طلا-آنتیبادی ثانویه طی یک هفته با میانگین ۲±۵۳۱ نانومتر ثابت باقی مانده که حاکی از پایداری این کانجوگهها به مدت یک هفته است. ولی باوجود این، میزان جذب طی یک هفته از ۰/۵۹ بهمیزان ۰/۴۴ کاهش یافت.

شکل ۶ نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکترود کربن شیشهای در آب مقطر (نمودار 🔶 شکل ۵) را نشان میدهد. تصویر مبین یک خط صاف که هیچگونه جریانی را در هیچ پتانسیلی نشان نمی دهد و حاکی از فقدان هر نوع واکنش دهندهای روی سطح الكترود است. شكل ۶ همچنين، نمودار جريان در برابر پتانسیل را برای الکترود کربن شیشهای در محلول الکترولیت (نمودار ■ شکل ۵) نشان میدهد، با بررسینمودار کاتدی و آندی، از ایجاد واکنش در محلول الکترولیت اطمینان حاصل شد. پس از اصلاح الکترود کربن شیشهای توسط نانولولههای کربنی، با توجه به نمودار مندرج درشکل ۵ پتانسیل کاتدی در بیشینهٔ جریان (E_) برابر با ۰/۳۷ و پتانسیل آندی در کمینهٔ جریان (E_) برابر با است. کاهش ΔE_p تا میزان $^{1/7}$ ولت بهاین علت است که $^{1/7}$ نانولولههای کربنی سبب افزایش جریان در سطح الکترود شدهاند. این افزایش جریان مرتبط با هدایت پذیری الکتریکی خوب نانولولههای کربنی چند دیواره و تسهیل انتقال الکترون میان یون-های یتاسیم هگزانوسیانوفرات و الکترود می شود.



شکل ۲- طیف UV-Vis و تصویر TEM نانوذرات ۱۰ نانومتری به کار رفته در مطالعهٔ اخیر. Figure 2. UV-Vis spectrum and TEM image of employed 10 nm gold nanoparticles in this study



شکل ۳- طیف LSPR تأیید کننده کانجوگاسیون نانوذرات طلا-آنتیبادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز؛ طیف LSPR نانوذرات کلوئیدی ۱۰ نانومتر یک _{max} برابر با ۵۲۴ نانومتر (خط ممتد آبی) نشان میدهد و پس از کانجوگه شدن با آنتیبادی λ_{max} به میزان ۷ نانومتر به سمت راست جابهجا میشود (خط نقطهچین قرمز).

Figure 3. LSPR spectra confirming of gold nanoparticles-anti tetanus toxoid antibody conjugation; the LSPR spectrum of bare 10 nm gold colloids shows a λ_{max} of 524 nm (solid blue), after conjugation with the monoclonal antibody, the λ_{max} shifts 7 nm to the red (dashed red).



شکل ۴- ارزیابی پایداری کانجوگههای نانوذرات طلا-آنتی بادی ثانویه طی یک هفته. Figure 4. Consideration of gold nanoparticles-secondary antibody stability during one week



شکل ۵- طیف LSPR تأیید کنندهٔ تقویت نقره کانجوگههای نانوذرات طلا-آنتی بادی؛ طیف LSPR کانجوگههای نانوذرات طلا-آنتیبادی یک ۵۳۱ ۵۳۱ نانومتر با جذب ۰/۲۷۷ (خط پر رنگ قرمز) را نشان میدهد، پس از تقویت نقرهٔ این کانجوگهها طیف LSPR. یک ۵۳۰ ۵۲۰ نانومتر با جذب ۴۵۵/۰ (خط چین آبی) را نشان میدهد.

Figure 5. LSPR spectra confirming of silver enhancement of gold nanoparticles- antibody conjugates; the LSPR spectrum of gold nanoparticles-monoclonal antibody conjugates shows a λ_{max} of 531 nm with absorbance of 0.277 (solid red), after silver enhancement of gold nanoparticles-monoclonal antibody conjugates, the absorbance increase to 0.455 and LSPR spectra shows a λ_{max} of 520 nm (dashed blue).



شکل ۶– نمودار جریان در برابر پتاسیل برای الکترود کربن شیشهای در آب مقطر (نمودار خاکستری ♦)، الکترود کربن شیشهای در محلول الکترولیت (نمودار آبی ■) و الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با نانولولههای کربنی (نمودار قرمز ▲).

Figure 6. The plot of current versus potential for GCE in mili-Q water (gray plot \blacklozenge), GCE in electrolyte solution (blue plot \blacksquare) and CNT modified GCE (red plot \blacktriangle).

انتقال بهتر الکترون و افزایش جریان پس از قرار گیری آنتی ژن روی آن می شود. از طرفی، از آنجایی که با ارائهٔ آنتی بادی مونو کلونال یا همان مولکول هدف سبب برهم کنش با آنتی ژن شده، بنابراین، انتقال الکترون از محلول الکترولت به سمت الکترود با تأخیر صورت می گیرد.

اصول کلی تقویت نقره در کانجوگههای نانوذرات طلا-آنتیبادی ثانویه برای شناسایی آنتیبادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز، در شکل ۱ نشان داده شده است. در اینجا شناسایی ولتامتری چرخهای بر اساس تغییرات یون Ag⁺¹ روی سطح الکترود کربن شیشهای است. فرایند تقویت نقره به تهنشین شدن میزان زیادی نقره بهعلت كاهش كاتاليتيك يونهاى نقره توسط برچسبهاى نانوذرات طلا منجر می شود. با توجه به نمودار مندرج در شکل ۹، کاملاً مشخص است که پس از تقویت نقره در کانجوگههای نانوذرات-آنتیبادی ثانویه، جریان بهمیزان چشمگیری افزایش می یابد و نمودار جریان در بیشینه پتانسیل کاتدی (E5) به سمت پتانسیلهای مثبت و در کمینهٔ پتانسیل آندی (Е.) بهسمت پتانسیل های منفی انتقال یافت. همچنین، نتایج نشان دادند که از ۲/۲۴ ولت پیش از واکنش تقویت نقره به ۰/۵۷ ولت پس ΔE_p از واكنش تقويت نقره افزايش يافت. اين پاسخ ناشي از واكنش کاهشی تبدیل یون نقره (+Ag) به فلز نقره (Ag⁰) و رسوب نقره فلزی بر روی سطح الکترود است که سبب تقویت سیگنال نانو ذرات طلا و افزایش جریان می شود. پس از ایجاد سنجشهای زیستی روی الکترود کربن شیشهای اصلاح شده، یتانسیلهای آندی و کاتدی نسبت به الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با نانولولههای کربنی سنجیده شد. با توجه به نمودار شکل ۷، نمودارها به ترتیب مبین، نمودار جریان در برابر پتاسیل برای الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با نانو لولههای کربنی در محلول الكتروليت (نمودار ♦) و الكترود كربن شيشهاي اصلاح شده با نانولولههای کربنی پس از قرارگرفتن توکسوئید کزاز روی آن (نمودار ■) هستند. با توجه به نمودار شکل ۷ پتانسیل کاتدی در بیشینهٔ جریان (E، برای آنتیژن توکسوئید کزاز برابر با ۱/۵۶ ولت و پتانسیل آندی در کمینهٔ جریان (۲۹) برابر با ۰/۰۴ ولت است. همچنین، نمودارها در شکل ۸ بهترتیب مبین، نمودار جریان در برابر یتاسیل برای الکترودکربن شیشهای اصلاح شده با نانو لولههای کربنی یس از قرارگیری توکسوئید کزاز روی آن (نمودار ♦) و الکترود کربن شیشهای تغییریافته با نانولولههای کربنی پس از ارائهٔ آنتیبادی مونوکلونال هستند. پتانسیل کاتدی در بیشینهٔ جریان (📲) برای آنتیبادی مونوکلونال پس از واکنش با آنتیژن توکسوئید کزاز برابر با ۰/۴ ولت و پتانسیل آندی در کمینهٔ جریان (En) برابر با صفر است. پتانسیل کاتدی در بیشینهٔ جریان (Е 🖁) برای آنتیبادی کانجوگه شده با نانوذرات طلا پس از واکنش با آنتی بادی اولیه-آنتی ژن توکسوئید کزاز ۰/۳۴ ولت و پتانسیل آندی در کمینهٔ جریان (E ا) برابر ۰/۱ ولت است. کاملاً مشخص است که حضور نانو لولههای کربنی سبب



شکل ۷– نمودار جریان در برابر پتاسیل برای الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با نانولولههای کربنی در محلول الکترولیت (نمودار آبی♦) و الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با نانولولههای کربنی پس از قرارگیری توکسوئید کزاز روی آن (نمودار قرمز∎).

Figure 7. The plot of current versus potential for CNT modified GCE (blue plot \blacklozenge) and CNT modified GCE with tetanus toxoid antigen (red plot \blacksquare).



شکل ۸– نمودار جریان دربرابر پتاسیل برای الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با نانولولههای کربنی پس از قرارگیری توکسوئید کزاز روی آن (نمودار قرمز ♦) و الکترود کربن شیشهای تغییریافته با نانولولههای کربنی پس از ارائه آنتیبادی مونوکلونال (نمودار سبز∎).

Figure 8. The plot of current versus potential for CNT modified GCE with tetanus toxoid antigen (red plot \blacklozenge) and monoclonal antibody after reaction with tetanus toxoid(green plot \blacksquare).



شکل ۹- نمودار جریان در برابر پتانسیل برای آنتی بادی کانجوگه شده با نانوذرات طلا پس از واکنش با آنتیبادی اولیه-آنتی ژن توکسوئیدکزاز (نمودار قرمز ♦) و پس از واکنش تقویت نقرهٔ آنتیبادی کانجوگه شده با نانوذرات طلا-آنتیبادی اولیه-آنتیژن توکسوئید کزاز روی الکترودکربن شیشهای اصلاح شده با نانولولههای کربنی (نمودار آبی ∎).

Figure 9. The plot of current versus potential for gold nanoparticle secondary antibody conjugates after reaction with tetanus toxoid- monoclonal antibody (red plot \blacklozenge) and after silver enhancement of gold nanoparticle secondary antibody conjugates at CNT modified GCE (blue plot \blacksquare).



شكل ۱۰- بررسى تكرار پذيرى واكنش تقويت نقرهٔ كانجو گههاى نانوذرات طلا-آنتى بادى ثانويه روى الكترود.

Figure 10. Consideration of repetition for silver enhancement of gold nanoparticles-secondary antibody conjugates on electrode.

ازطرفی تکرارپذیری یکی از ویژگیهای مهم برای نشان دادن عملكرد الكترود اصلاح شده است. بهطورىكه تكرار پذيرى سيگنال-های آنالیتیکال طی یک هفته تحت ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با نانولولههای کربنی چند دیواره پایداری طولانی مدت و تکرارپذیری خوبی برای بررسی پاسخهای ولتامتری چرخهای را دارند. همچنین، تکرارپذیری تقویت نقرهٔ نانوذرات طلا در کانجوگههای نانوذرات طلا-آنتیبادی ثانویه هر ۱۰ دقیقه یک بار ارزیابی شد. شکل ۱۰ نتایج تکرار پذیری تقویت نقره را نشان میدهد. با توجه به نمودارهای مندرج در شکل ۹ کاملاً مشخص شد که کانجوگههای نانوذرات طلا-آنتیبادی ثانویه کاملاً پایدار هستند و نمودارهای تقویت نقرهٔ این نانوذرات تغییرات بسیار اندکی را نشان داد که از تکرارپذیری بالای این سنجش حکایت دارد. با وجود این بعد از گذشت ۱۲۰ دقیقه از واکنش تقویت نقره و ارزیابی مکرر سیگنالهای حاصل، مشخص شد که سیگنالهای تقویت نقره به سیگنال نانوذرات طلا نزدیک شده است. این موضوع بهعلت بررسیهای مکرر تقویت نقره برای ارزیابی تکرار پذیری است (شسته شدن محلول تقويت نقره به مرور زمان از روى سطح الكترود).

بحث

نتایج نشان دادند که نوسانهای موجود در محیط اطراف نانوذرات طلا سبب تغییر در طیف LSPR این نانوذرات می شوند. بنابراین، با کانجوگه شدن نانوذرات به آنتی بادی سبب انتقال بیشینهٔ جذب به سمت طول موجهای بالاتر می شوند. در برخی مطالعات بیان شده است که نانوذرات یک پیک جذبی UV/Vis قوی که در بقیهٔ اجزای

محلول مشاهده نمى شود ارائه مىكنند، بهطورىكه اين پيك جذبى منحصراً براى آن نانوذره اختصاصى است (Arruebo et al., 2009). همچنین، در مطالعات مشخص شد که با توجه به ویژگیهای نوری منحصربهفرد نانوذرات، اتصال هر نوع آنالیت به مولکولهای شناساگر كانجوگه شده با نانوذرات سبب تغيير ويژگيهاي نوري نانوذرات به-علت تغییر در ضریب شکست موضعی در محیط اطراف نانوذره می-شود، بهطوریکه این تغییر در بقیهٔ اجزای محیط مشاهده نمی شود. نانوذرات طلا یکی از مناسبترین ساختارها برای تعیین اثر موضعی اتصال پروتئينها با استفاده از بيشينهٔ جذب طيف رزونانس پلاسمون سطحى موضعى هستند (Hall et al., 2011). در مطالعة حاضر، بررسی تقویت سیگنال با استفاده از اتومتالوگرافی (تقویت نقره) به-صورت بررسى پاسخهاى رزونانس پلاسمون سطحى و بررسى بيشينه جذب در طیفهای بهدست آمده از طیف سنجی UV/Vis، گزارش شد. با توجه به نتایج بهدست آمده از تقویت نقره در کانجوگههای نانوذرات طلا-آنتی بادی ثانویه، تغییر در محیط اطراف نانوذرات طلا می تواند در این مرحله نیز بیشینهٔ جذب طیف LSPR را تغییر دهد، بهطوریکه λ_{\max} را به طول موجهای پایینتر و بهسمت چپ منتقل می کند. نتایج بهدست آمده با مطالعات محققان زیادی توافق دارد، به-طورى كه اين مطالعات نشان مىدهند محلول تقويت نقره (نيترات نقره بهعلاوهٔ هیدروکوئینون) بهسرعت توسط نانوذرات طلا هسته تشکیل میدهد و به رسوب نقره فلزی و مشاهده تغییر رنگ تیره منجر می-شود (Liu et al., 2014).

با بررسی منابع مختلف مشخص شد که مواد کربنی بهطور گسترده در تحلیلهای الکتریکی بهعلت فعالیت الکتروکاتالیتیک چشمگیر آنها

استفاده می شوند. داشتن مساحت بالا و هدایت پذیری الکتریکی عالی سبب می شود تا نانولوله های کربنی چند دیواره به طور گسترده برای ساخت سنسورهاى الكتروشيميايي بهمنظور تقويت پاسخهاي آناليتيكال Feldman et al., 2008; Gupta Rakesh K. et al., استفاده شوند (Feldman et al., 2008; Gupta Rakesh K. et al., ا 2016; Musameh et al., 2002). نتايج بهوضوح نشان دادند كه چون توانايي نانولولههاي كربني براي توسعه واكنشهاي انتقال الكترون با ساختار الكترونيك و هدايت الكتريكي بالاي آنها مرتبط است، پس از اصلاح الكترود كربن شيشهاى توسط نانولولههاى كربني، افزايش جريان مرتبط با هدایت پذیری الکتریکی خوب و تسهیل انتقال الکترون میان یونهای پتاسیم هگزانو سیانوفرات و الکترود می شود. ارزیابی پاسخهای ولتامتری بهعلت همپوشانی نمودارهای جریان در این قسمت کمی پیچیده است. باوجوداین، نتایج نشان دادندکه، نمودارهای جریان نسبت به نمودار اولیهٔ جریان در الکترود کربن شیشهای (Bare) افزایش یافته-اند که حاکی از اثر نانولولههای کربنی چند دیواره بر تقویت هدایت پذیری است. همچنین، نتایج به این موضوع اشاره دارند که با افزودن هریک از عناصر سنجش زیستی به الکترود اصلاح شده، اعم از آنتیژن، آنتیبادی اولیه و آنتیبادی ثانویه، کمینه جریان های آندی (💾) کاهش می یابند. نتایج مبین این احتمال هستند که تعادل ایجاد شده در سطح الكترود طولانى نيست و انتقال الكترون برگشت پذير نيست. ولتامترى چرخهای برای حالتهای که انتقال الکترون برگشت پذیر نیست رفتار کاملاً متفاوتی نسبت به حالات برگشت پذیر نشان میدهد. در این حالت، پتانسیل کاتدی در بیشترین جریان و پتانسیل آندی در کمترین جريان با توجه به واكنش آنتىبادى-آنتى زن موجود روى سطح الكترود تغيير مىيابد (Kissinger & Heineman 1983). ازطرفى،كاملاً مشخص است که پس از قرارگیری آنتی ژن روی الکترود، به علت حضور نانولولههای کربنی سبب افزایش جریان و هدایت پذیری آن می شود. با-وجوداین، در مرحلهٔ بعد، از آنجایی که با ارائهٔ آنتی بادی مونو کلونال و یا همان مولكول هدف سبب برهم كنش با آنتي ثن شده، انتقال الكترون از محلول الكترولت به سمت الكترود با تأخير صورت مي گيرد.

ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی منحصربهفرد نانوذرات سبب شده است که آنها گزینهٔ مناسبی برای طراحی ابزارهای سنجش خصوصاً سنسورها و بیوسنسورهای الکتروشیمیایی باشند. یکی از عملکردهای مهم نانوذرات برچسبگذاری بیومولکول و تقویت انتقال الکترون میان محلول الکترولیت و سطح الکترود است (Luo et al., 2006; Qu et). در مطالعهٔ حاضر، از نانوذرات طلا برای برچسبگذاری آنتیبادی استفاده شد. پس از آن، سیگنال ایجاد شده از سوی نانوذرات طلا، توسط واکنش تقویت نقره، افزایش یافت. نتایج به وضوح نشان دادند که پس از تقویت نقره در کانجوگههای نانوذرات طلا–آنتیبادی ثانویه، جریان به میزان

چشمگیری افزایش یافت. نتایج بهدست آمده با پژوهشهای محققان دیگر هماهنگ است (Chu et al., 2005; Qu et al., 2011). طی پژوهشهای انجام شده دربارهٔ کاربرد تقویت نقره در بیوسنسورهای الکتروشیمیایی برای شناسایی بیومولکولهای مختلف، از روش شناسایی ولتامتری رنگ گیری آندی روی الکترودهای کربن شیشهای استفاده شده است (Chu et al., 2011). حال آنکه در مقالهٔ حاضر از روش ولتامتری چرخهای استفاده شد. باوجود این نتایج بهدست آمده کاملاً هماهنگ و حاکی از تقویت چشمگیر سیگنال هستند. تقویت سیگنال ناشی از واکنش کاتالیتیک رسوب نقره روی نانوذرات طلا (مولکول برچسب) است که سبب افزایش حساسیت سنجشهای ایمنی مبتنی بر نانوذرات فلزی میشود.

نتيجهگيرى

یک نمونهٔ ایمونوسنسور الکتروشیمیایی برای ارزیابی شناسایی yes or no آنتیبادی مونوکلونال اختصاصی ضد توکسوئید کزاز توسط الكترود كربن شیشهای اصلاح شده با نانولولههای كربنی چند دیواره توسعه یافت. در ایمونوسنسور ارائه شده در اینجا بهمنظور افزایش پاسخهای آنالیتیکال به صورت افزایش جریان، از تقویت نقره در نانوذرات طلا استفاده شده است. مشخص شد که سنجشهای ایمنی مبتنی بر تقویت نقره در کانجوگههای نانوذرات طلا-آنتیبادی ثانویه برای شناسایی آنتیبادی مونوکلونال ضد توکسوئیدکزاز امکان-پذیر است. روش توصیف شده در اینجا مزیتهای بسیاری دارد از-جمله اينكه اين روش بهدليل كاربرد تقويت نقره، سبب افزايش و بهبود حساسيت شناسايي روش الكتروشيميايي مي شود. علاوه بر-این، برچسبهای نانوذرات کلوئیدی طلا پایدارتر از برچسبهای رادیوایزوتوپی یا آنزیمی هستند. همچنین، فرایند برچسب گذاری نانوذرات طلا بسیار ساده است و بهطور کلی فعالیت بیوشیمیایی بیومولکول را تحت تأثیر قرار نمیدهد. ازطرفی روشهای الكتروشيميايي ميتوانند بهراحتي به كار روند و داراي قابليت تکرارپذیری هستند. نهایتاً روش توصیف شده در اینجا میتواند به راحتی برای شناسایی دیگر بیومولکولهای مهم استفاده شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی کسانی که در انجام این مطالعه حمایت و کمک نمودند، ابراز میدارند. این مطالعه مربوط به نتایج حاصل از رساله دکتری تخصصی نویسنده اول است.

REFERENCES

- Arruebo, M., Valladares, M.N. & Gonzalez-Fernandez, A.F. 2009. Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications. Journalof Nanomaterials 2009.1: 37.
- Ashworth-Sharpe, J., Yun, C.S., Zhilina, Z., Murillo, A.E.& Johnson, D.Det al. 2016. Antibodynanoparticle conjugates and methods for making and using such conjugates. Google Patents.
- Brun, E.M., Puchades, R. & Maquieira, A. 2013. Gold, Carbon, and Aluminum Low-Reflectivity Compact Discs as Microassaying Platforms. Analytical Chemistry 85: 4178-86.
- Burkin, M.A., Sviridov, V.V. & Perelygina, O.V. 2004. Determination of tetanus toxin and toxoid by ELISA using monoclonal antibodies. Applied Biochemistry and Microbiology 40: 409-14.
- Chu, X., Fu, X., Chen, K., Shen, G.L. & Yu, R.Q. 2005. An electrochemical stripping metalloimmunoassay based on silver-enhanced gold nanoparticle label. Biosensors and Bioelectronics. 20: 1805-12.
- **Dobosz, P., Morais, S., Puchades, R. & Maquieira, A.** 2015. Nanogold bioconjugates for direct and sensitive multiplexed immunosensing. Biosensors and Bioelectronics 69: 294-300.
- **Dutta, G., Nagarajan, S., Lapidus, L.J. & Lillehoj, P.B.** 2017. Enzyme-free electrochemical immunosensor based on methylene blue and the electro-oxidation of hydrazine on Pt nanoparticles. Biosensors and Bioelectronics 92: 372-77.
- Feldman, A.K., Steigerwald, M.L., Guo, X. & Nuckolls, C. 2008. Molecular electronic devices based on single-walled carbon nanotube electrodes. Accounts of Chemical Research 41: 1731-41.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voeroes, J. & Reimhult, E. 2008. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. Sensors 8: 1400-1458.
- Gupta, R.K., Pandya, R., Sieffert, T., Meyyappan, M. & Koehne, J.E. 2016. Multiplexed electrochemical immunosensor for label-free detection of cardiac markers using a carbon nanofiber array chip. Journal of Electroanalytical Chemistry 773: 53-62.
- Gupta, S., Huda, S., Kilpatrick, P.K. & Velev, O.D. 2007. Characterization and optimization of gold nanoparticle-based silver-enhanced immunoassays. Analytical Chemistry 79: 3810-3820.
- Hall, W.P., Ngatia, S.N. & Van Duyne, R.P. 2011. LSPR Biosensor Signal Enhancement Using Nanoparticle Antibody Conjugates. The Journal of Physical Chemistry 115: 1410-1414.
- Jain, S., Chattopadhyay, S., Jackeray, R., Abid, C.K.V.Z., Kumar, M. & Singh, H. 2010. Detection of anti-tetanus toxoid antibody on modified polyacrylonitrile fibers. Talanta 82: 1876-1883.
- Jana, N.R., Gearheart, L. & Murphy, C.J. 2001. Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles. Langmuir. 17: 6782-6786.
- Jazayeri, M.H., Amani, H., Pourfatollah, A.A., Pazoki-Toroudi, H. & Sedighimoghaddam, B. 2016. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. Sensing and Bio-Sensing Research 9: 17-22.

- Kissinger, P.T. & Heineman, W.R. 1983. Cyclic voltammetry. Journal of Chemical Education 60: 702.
- Lange, S.A., Roth, G., Wittemann, S., Lacoste, T. & Vetter, A. 2006. Measuring biomolecular binding events with a compact disc player device. Angewandte Chemie 118: 276-79.
- Li, X., Weng, S., Ge, B., Yao, Z. & Yu, H.Z. 2014. DVD technology-based molecular diagnosis platform: quantitative pregnancy test on a disc. Lab on a Chip. 14: 1686-1694.
- Liu, R., Zhang, Y., Zhang, S., Qiu, W. & Gao, Y. 2014. Silver enhancement of gold nanoparticles for biosensing: from qualitative to quantitative. Applied Spectroscopy Reviews 49: 121-138.
- Luo, X., Morrin, A., Killard, A.J. & Smyth, M.R. 2006. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. Electroanalysis 18: 319-326.
- Musameh, M., Wang, J., Merkoci, A. & Lin, Y. 2002. Low-potential stable NADH detection at carbonnanotube-modified glassy carbon electrodes. Electrochemistry Communications. 4: 743-746.
- Qu, F., Lu, H., Yang, M. & Deng, C. 2011. Electrochemical immunosensor based on electron transfer mediated by graphene oxide initiated silver enhancement. Biosensors and Bioelectronics 26: 4810-4814.
- Reder, S., Riffelmann, M., Becker, C. & Von Knig, C.H.W. 2008. Measuring immunoglobulin G antibodies to tetanus toxin, diphtheria toxin, and pertussis toxin with single-antigen enzyme-linked immunosorbent assays and a bead-based multiplex assay. Clinical and Vaccine Immunology 15: 744-749.
- Schauer, U., Stemberg, F., Rieger, C.H.L., Battner, W.
 & Borte, M. 2003. Levels of antibodies specific to tetanus toxoid, Haemophilus influenzae type b, and pneumococcal capsular polysaccharide in healthy children and adults. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 10: 202-207.
- Thvenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A. & Wilson, G.S. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. Biosensors and Bioelectronics 16: 121-131.
- Van Hoeven, K.H., Dale, C., Foster, P. & Body, B. 2008. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of immunoglobulin g antibodies to tetanus toxoid with reference standards and the impact on clinical practice. Clinical and Vaccine Immunology 15: 1751-1754.
- Wang, Z. & Li, R.X. 2007. Fabrication of DNA micropatterns on the polycarbonate surface of compact discs. Nanoscale Research Letters 2: 69-74.
- Xu, M., Wang, R. & Li, Y. 2016. Rapid detection of Escherichia coli O157: H7 and Salmonella Typhimurium in foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation. Talanta 148: 200-08.
- Zhang, J., Wang, J., Zhu, J., Xu, J., Chen, H. & Xu,D. 2008. An electrochemical impedimetric arrayed immunosensor based on indium tin oxide electrodes

and silver-enhanced gold nanoparticles. Microchimica Acta 163: 63-70.

Zhang, S., Shen, Y., Shen, G., Wang, S., Shen, G. & Yu, R. 2016. Electrochemical immunosensor based on Pd-Au nanoparticles supported on functionalized PDDA-MWCNT nanocomposites for aflatoxin B1 detection. Analytical Biochemistry 494: 10-15.

How to cite this article:

Raeisi, S., Molaei Rad, A., Sadri, M. & Rouhani Nejad, H. 2021. Electrochemical assay ofanti-tetanus toxoid monoclonal antibody by silver enhancement of gold nanoparticles at carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. Nova Biologica Reperta 8: 1-12. (In Persian).

رئیسی، س.، مولاییراد، ا.، صدری، م. و روحانینژاد، ح. ۱۴۰۰. سنجش الکتروشیمیایی آنتیبادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز توسط تقویت نقره نانوذرات طلا بر الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با نانولولههای کربنی. یافتههای نوین در علوم زیستی ۸: ۱۲–۱.