مقاله پژوهشی
یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۸، شماره ۱، صفحات ۱ الی ۱۲ (۱۴۰۰)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

Research Article
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 تتانی ایجاد میشود. به‌دلیل 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، بااین‌وجود 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 به‌عنوان 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 که توسط اتصال آنتی¬بادی ثانویه کانجوگه شده با نانوذرات-طلا و پس از آن تقویت نقره دنبال گردید. تغییر ولتامتری-چرخه‌ای و تغییرات سیگنال طلا نسبت به نقره بر اساس تغییرات یون Ag^{+1} بر روی سطح الکترود بررسی شد. نتایج نشان دادکه ΔE_p از ۰/۲۴ ولت پیش از واکنش تقویت نقره به ۰/۵۷ ولت پس از آن افزایش یافت. همچنین، پس از تقویت نقره، جریان به میزان چشم‌گیری افزایش یافت و نمودار جریان در E^c_p به سمت پتانسیل های مثبت و در E^a_p به سمت پتانسیل های منفی انتقال یافت. درمجموع این روش باعث افزایش حساسیت شناسایی شده و می‌تواند به راحتی برای شناسایی سایر مولکول‌های زیستی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی. 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^c_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

Received 12.06.2017/ Revised 10.12.2017/ Accepted 25.12.2017/ Published 10.06.2021
دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۲۲/ اصلاح: ۱۳۹۶/۰۹/۱۹/ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۰۴/ انتشار: ۱۴۰۰/۰۳/۲۰

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.8.7]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.1]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.8.7]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.1]

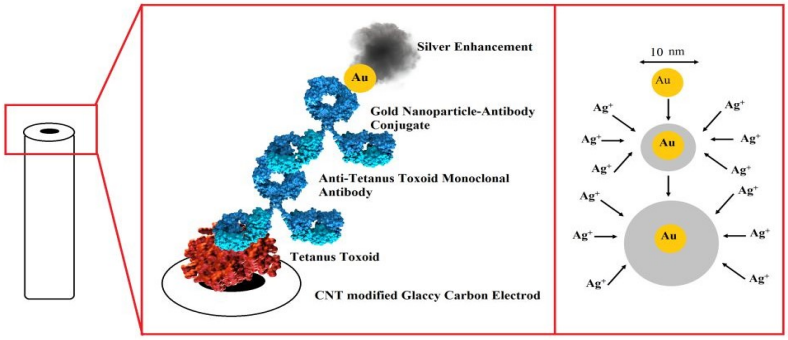
مقدمه

بیماری کزاز نوعی عفونت است که عامل ایجاد کننده آن توکسین حاصل از باکتری بی‌هوازی کلستریدیوم تتانی است. این باکتری نوعی سم عصبی به نام تتانوس ترشح می‌کند که به انقباض شدید عضلات و در نهایت مرگ بیمار منجر می‌شود. تتانوس، اگزوتوکسینی قوی است که مسئول بروز علائم ویژه بیماری کزاز است (Burkin et al., 2004; Jain et al., 2010; Van Hoeven et al., 2008). کزاز یک بیماری کاملاً قابل کنترل است، به‌طوری‌که با تزریق واکسن کزاز (توکسوئید کزاز)، بدن انسان در برابر سم میکروب ایمن می‌شود. ایمنی‌زایی در برابر کزاز به میزان زیادی توسط بررسی سطوح آنتی‌بادی علیه توکسوییید ارزیابی می‌شود (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). متداول‌ترین روش برای ارزیابی ایمونوگلوبولین‌های اختصاصی علیه توکسین کزاز درآزمایشگاه، سنجش جذب ایمنی متصل به آنزیم است (Burkin et al., 2004; Van Hoeven et al., 2008). شناسایی با حساسیت بالا و تحلیل صحیح بیومارکرها در نمونه‌های زیستی برای تشخیص زودهنگام، درمان و مدیریت بیماری‌ها حائز اهمیت است. باتوجه به ماهیت مولکول برچسب واکنش اختصاصی میان آنتی‌بادی و آنتی‌ژن به منزلهٔ سیگنال با روش‌های مختلف نوری، مغناطیسی، الکتروشیمیایی، رادیواکتیو، پیزوالکتریک، مکانیکی و اسپکتروسکوپی جرمی توسط مبدل ارائه می‌شود (Arruebo et al., 2009; Dobosz et al., 2015). از زمانی‌که سنجش‌های ایمنی مبتنی بر برچسب‌های فلزی توسعه یافته است، پیشرفت‌های گسترده‌ای با کاربرد انواع نانوذرات کلوئیدی فلزی ایجاد 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 الکتروشیمیایی باتوجه به سرعت، سادگی، کاربرد تجهیزات ارزان و قابل حمل امیدوار کننده هستند. حساسیت شناسایی این روش‌ها در مقایسه با روش‌های واجد برچسب‌های فلورسانس کافی نیست (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 به‌کار گرفته می‌شود. حساسیت شناسایی، زمانی‌که ویژگی‌های کاتالیتیک نانوذرات طلا به کاهش یون‌های نقره (Ag^{+1}) به فلز نقره (Ag^{0}) منجر می‌شود، افزایش می‌یابد و سیگنال را تقویت می‌کند (Gupta et al., 2007; Liu et al., 2014). ازاین‌رو، در بررسی اخیر با کاربرد نانوذرات کلوئیدی طلا با قطر ۱۰ نانومتر به‌مثابهٔ برچسب و پس از آن تقویت نقره، حضور آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضدتوکسوئید کزاز به‌صورت yes or no بهروش الکتروشیمیایی با قالب سنجش‌های ایمنی غیرمستقیم روی الکترودهای کربن-شیشه‌ای اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی تحت ارزیابی قرار گرفت. روش آنالیتیکال شامل برهم‌کنش آنتی‌ژن توکسوئیدکزاز و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد توکسوئیدکزاز (آنالیت) است که توسط اتصال آنتی‌بادی ثانویه کانجوگه‌شده با نانوذرات طلا و پس از آن تقویت نقره نانوذرات طلا روی الکترود کربن-شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله کربنی دنبال شد (شکل ۱).

مواد و روش‌ها

اصلاح سطح الکترود کربن شیشه‌ای توسط نانولوله‌های کربنی

الکترود کربن شیشه‌ای، تا زمانی که سطح الکترود کاملاً 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 الکترولیت ۵ میلی‌مولار پتاسیم هگزا-سیانوفرات و ۵ میلی‌مولار پتاسیم نیترات بررسی شد و از ایجاد واکنش در محلول الکترولیت اطمینان حاصل شد (Musameh et al., 2002). برای اصلاح الکترود کربن شیشه‌ای از نانولوله‌های کربنی با غلظت ۱ میلی‌گرم 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 الکترود به روش نقطه‌گذاری ریخته شد. الکترود به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق (۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) قرار گرفت تا کاملاً خشک شود (Grieshaber et al., 2008; Thvenot et al., 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 الکترود، آنتی‌ژن توکسوئید کزاز با غلظت (۵۰ µg/ml) در بافر فسفات با pH=7.4 منتقل شد و به میزان ۴ میکرولیتر روی الکترود اصلاح شده توسط میکروپیپت چکانده 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 Songbai et al., 2016). استوک آنتی‌ژن توکسوئید کزاز lf/ml 2550 معادل (۱.۲۴ mg/ml) از مؤسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد که توسط بافر PBS رقیق‌سازی شد و به غلظت نهایی (۵۰ µg/ml) رسید. در مرحلهٔ بعد الکترود کربن شیشه‌ای که واجد آنتی‌ژن تثبیت شده است توسط بافر بلوکه کننده به مدت ۲ ساعت به منظور کاهش برهم کنش‌های غیر-اختصاصی انکوبه شد. بافر بلوکه کننده شامل ۲۰ میلی‌مولار سدیم فسفات، ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم‌کلراید، ۴ درصد آلبومین سرم گاوی و ۲ میلی‌مولار سدیم آزید در pH=7.4 بود. در ادامه، آنتی‌بادی مونوکلونال ضدتوکسوئید کزاز روی الکترود 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 اولیه (۱ IU/ml) استفاده شد. برای سنجش زیستی آنتی‌بادی با غلظت مشخص (۰.۰۸ IU/ml) 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 UV-Vis (4300 Pro UV–vis, Amersham Biosciences) در طول‌موج ۴۰۰-۷۰۰ نانومتر و همچنین توسط تصاویر میکروسکوپ الکترون عبوری (TE 2000 Ziess TEM) تحت ارزیابی قرار گرفتند. پیش از تصویربرداری توسط TEM، نانوذرات طلا در ۱۵۰۰۰rpm برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و پس از آن برای چند دقیقه سونیکه شدند. نمونهٔ نانوذرات طلا که از هر نوع ماده‌ای خالص‌سازی شده‌اند روی یک شبکهٔ کربن پوشیده شده با مس ته‌نشین شدند، تا این که به وسیلهٔ TEM تصویربرداری و ویژگی‌های آن‌ها مشخص شود (Jana et al., 2001).

برهم‌کنش‌های فیزیکی (برهم‌کنش‌های 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 (۱۴۰۰۰ rpm) در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد 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 روی الکترود انکوبه شدند تا با آنتی‌بادی اولیه برهم‌کنش

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.8.7]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.1]

دهند (Ashworth-Sharpe et al., 2016; Lange et al., 2006; 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 Silver, Abcam)، برای واکنش کاهشی نقره استفاده شد. برای 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 برهم‌کنش نشان دهند و یک واکنش کاهشی برای رسوب نقره انجام پذیرد (Gupta Shalini et al., 2007; Liu et al., 2014). پس از ۴۰ دقیقه، نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکترود درحضور محلول الکترولیت ۵ میلی‌مولار پتاسیم هگزا سیانوفرات و ۵ میلی‌مولار پتاسیم نیترات ارزیابی شد (Musameh et al., 2002).

اندازه گیری الکتروشیمیایی توسط ولتامتری چرخه‌ای

برای بررسی‌های الکتروشیمیایی از آزمایش‌های ولتامتری چرخه‌ای با دستگاه Drop Sens, Microstate 200 و از یک سلول با حجم ۲۰ میلی‌لیتر واجد سه الکترود استفاده شد. الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده به‌عنوان الکترود کار، الکترود Ag/AgCl به منزلهٔ الکترود مرجع و الکترود پلاتین به منزلهٔ الکترود شمارنده استفاده شد. اندازه‌گیری الکتروشیمیایی بر مبنای تغییر در سیگنال الکتریکی جریان در برابر پتانسیل پس از برهم‌کنش میان آنتی‌ژن-آنتی‌بادی و همچنین آنتی‌بادی اولیه-آنتی‌بادی ثانویه است. در پایان، سنجش‌های ایمنی سیگنال حاصل از نانوذرات طلا پس از قرارگیری در معرض محلول تقویت نقره ارزیابی شد. برای بررسی ولتامتری چرخه‌ای از پتانسیل‌های ۸۰۰- تا ۱۰۰۰ میلی‌ولت و سرعت اسکن ۱۰۰ میلی-ولت بر ثانیه استفاده شد. اندازه‌گیری‌ها در محلول الکترولیت حاوی ۵ میلی‌مولار KNO3 و ۵ میلی‌مولار K3Fe(CN)6 و تمامی اندازه-گیری‌ها دردمای اتاق انجام شد (Brun et al., 2013; Xu et al., 2016; Zhang Songbai et al., 2016).

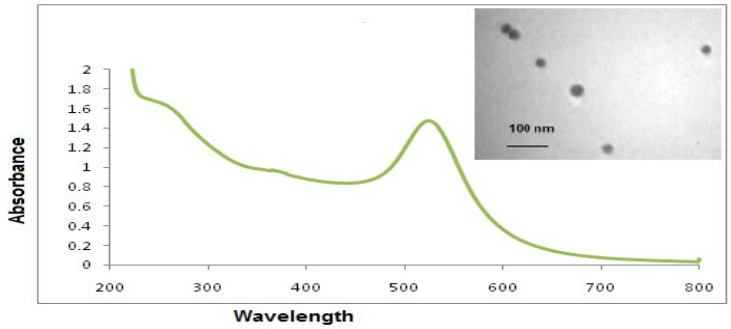
نتایج

ویژگی‌های نانوذرات طلا توسط اسپکتروفوتومتر UV-Vis در طول موج ۴۰۰ تا ۷۰۰ 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 تأیید کانجوگه شدن نانوذرات طلا به آنتی‌بادی‌های ثانویه، تغییرات طیف رزونانس پلاسمون سطحی موضعی برای نانوذرات طلا قبل از کانجوگه شدن با آنتی‌بادی و پس از کانجوگه شدن با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز توسط بررسی طیف‌های جذبی حاصل از طیف سنجی UV/Vis در محدودهٔ طول موج ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر تحت ارزیابی قرار گرفت. شکل ۳ مبین نتایج کانجوگاسیون است. نانوذرات طلای کلوئیدی به‌تنهایی یک طول‌موج در بیشینه جذب (λ_{max}) در ۵۲۴ نانومتر نشان می‌دهد. پس از کانجوگه شدن و اتصال نانوذرات به آنتی‌بادی λ_{max} به میزان ۷ نانومتر به ۵۳۱ نانومتر به سمت طول‌موج‌های بالاتر منتقل شد. همچنین، جذب به میزان ۰/۳۰۳ (از ۰/۵۸۰ پیش از اتصال به ۰/۲۷۷ پس از اتصال) کاهش یافت. این تغییرات تأیید کنندهٔ اتصال نانوذرات طلا به آنتی‌بادی مونوکلونال است. به‌منظور ارزیابی کانجوگه‌های نانوذرات طلا-آنتی‌بادی ثانویه، طیف LSPR این کانجوگه‌ها طی یک 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 نانومترثابت 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.

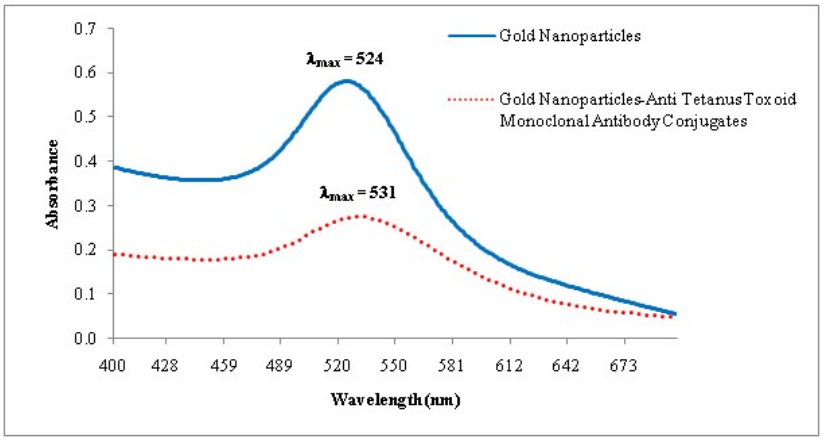
شکل ۶ نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکترود کربن شیشه‌ای در آب مقطر (نمودار ♦ شکل ۵) را نشان می‌دهد. تصویر مبین یک خط صاف که هیچ‌گونه جریانی را در هیچ پتانسیلی نشان نمی‌دهد و حاکی از فقدان هر نوع واکنش دهنده‌ای روی سطح الکترود است. شکل ۶ همچنین، نمودار جریان در برابر پتانسیل را برای الکترود کربن 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_p^c) برابر با ۰/۳۷ و پتانسیل آندی در کمینهٔ جریان (E_p^a) برابر با ۰/۱۴ است. کاهش ΔE_p تا میزان ۰/۲۳ ولت به‌این علت است که 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 پتاسیم هگزانوسیانوفرات و الکترود می‌شود.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.8.7]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.1]



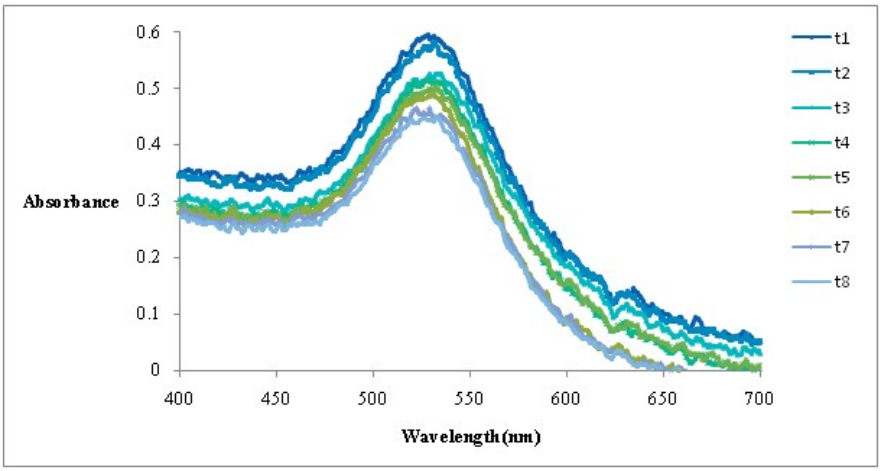
شکل ۲- طیف UV-Vis و تصویر TEM نانوذرات ۱۰ نانومتری به‌کار رفته در مطالعهٔ اخیر.

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 λ_{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).

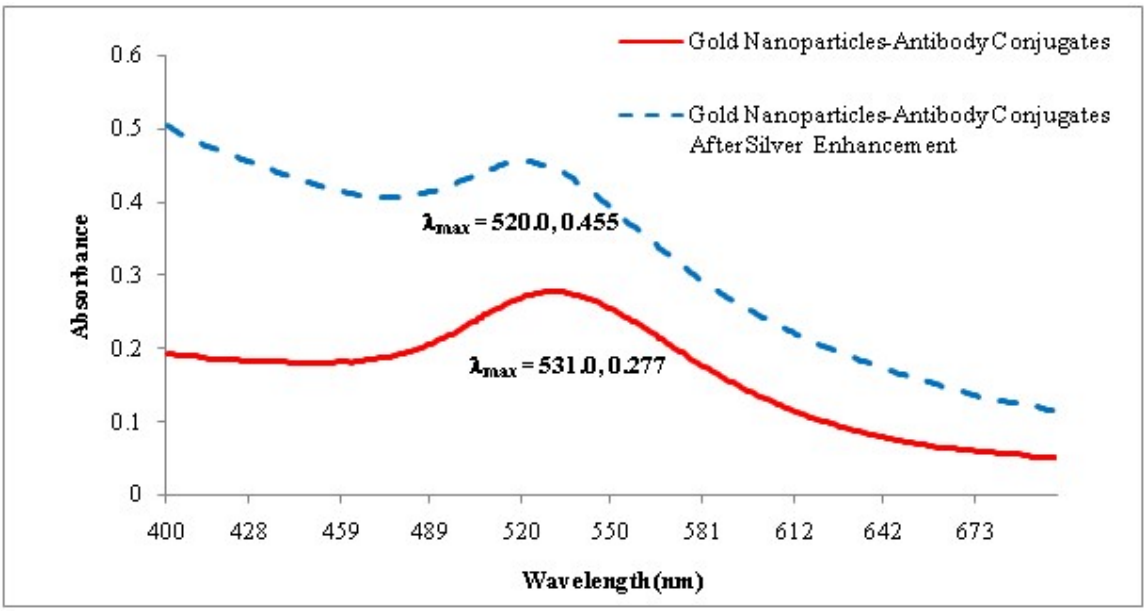
Figure 3. LSPR spectra confirming of gold nanoparticles-anti tetanus toxoid antibody conjugation; the LSPR spectrum of bare 10 nm gold colloids shows a λ_{max} of 524 nm (solid blue), after conjugation with the monoclonal antibody, the λ_{max} shifts 7 nm to the red (dashed red).



شکل ۴- ارزیابی پایداری کانجوگه‌های نانوذرات طلا-آنتی بادی ثانویه طی یک هفته.

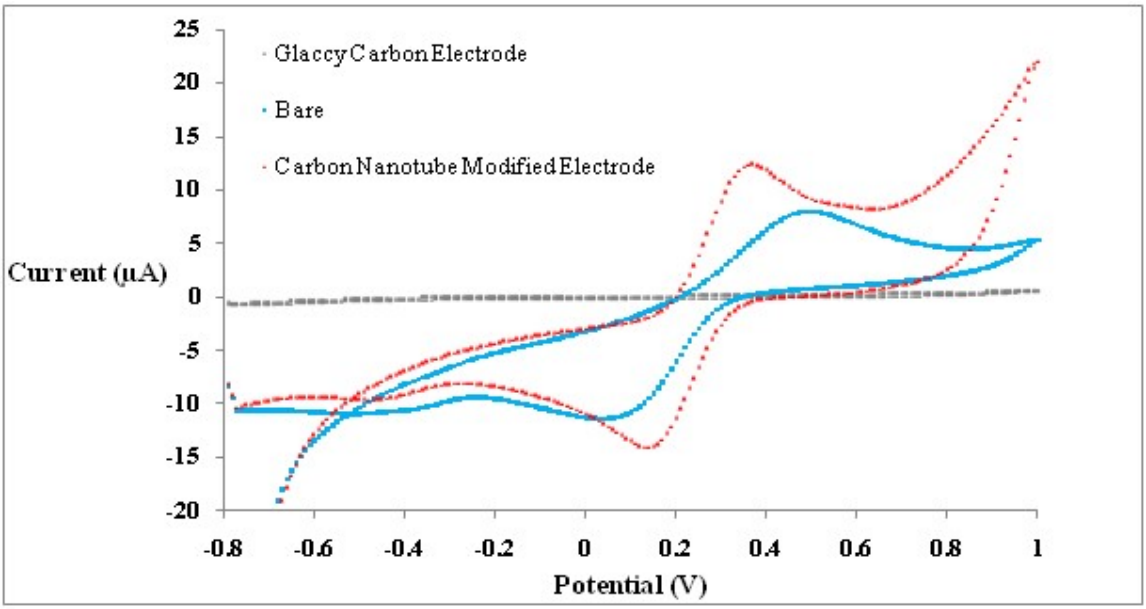
Figure 4. Consideration of gold nanoparticles-secondary antibody stability during one week

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.8.7]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.1]



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



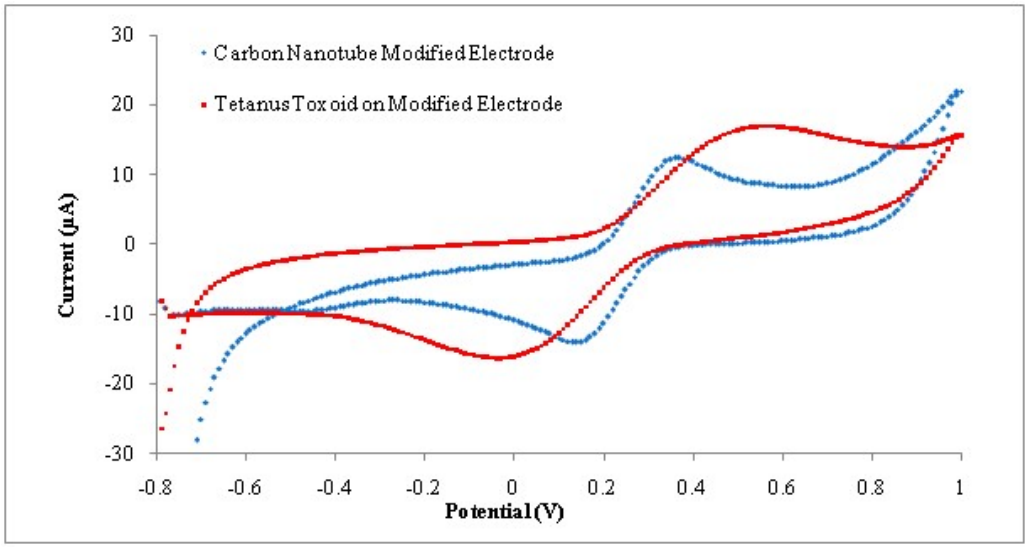
شکل ۶- نمودار جریان در برابر پتاسیل برای الکترود کربن شیشه‌ای در آب مقطر (نمودار خاکستری ♦)، الکترود کربن شیشه‌ای در محلول الکترولیت (نمودار آبی ■) و الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی (نمودار قرمز ▲).

Figure 6. The plot of current versus potential for GCE in mili-Q water (gray plot ♦), GCE in electrolyte solution (blue plot ■) and CNT modified GCE (red plot ▲).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.8.7]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.1]

پس از ایجاد سنجش‌های زیستی روی الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده، پتانسیل‌های 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 الکترولیت (نمودار ♦) و الکترود کربن شیشه‌ای 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_p^c) برای آنتی‌ژن توکسوئید کزاز برابر با ۰/۵۶ ولت و پتانسیل آندی در کمینهٔ جریان (E_p^a) برابر با ۰/۰۴- ولت است. همچنین، نمودارها در شکل ۸ به‌ترتیب مبین، نمودار جریان در برابر پتاسیل برای الکترودکربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانو لوله‌های کربنی پس 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 (E_p^c) برای آنتی‌بادی مونوکلونال پس از واکنش با آنتی‌ژن توکسوئید کزاز برابر با ۰/۴ ولت و پتانسیل آندی در کمینهٔ جریان (E_p^a) برابر با صفر است. پتانسیل کاتدی در بیشینهٔ جریان (E_p^c) برای آنتی‌بادی کانجوگه شده با نانوذرات طلا پس از واکنش با آنتی‌بادی اولیه-آنتی‌ژن توکسوئید کزاز ۰/۳۴ ولت و پتانسیل آندی در کمینهٔ جریان (E_p^a) برابر ۰/۱ ولت است. کاملاً مشخص است که حضور نانو لوله‌های کربنی سبب انتقال بهتر الکترون و افزایش جریان پس از قرارگیری آنتی‌ژن روی آن می‌شود. از طرفی، از آنجایی‌که با ارائهٔ آنتی‌بادی مونوکلونال یا همان مولکول هدف سبب برهم‌کنش با آنتی‌ژن شده، بنابراین، انتقال الکترون از محلول الکترولت به‌سمت الکترود با تأخیر صورت می‌گیرد.

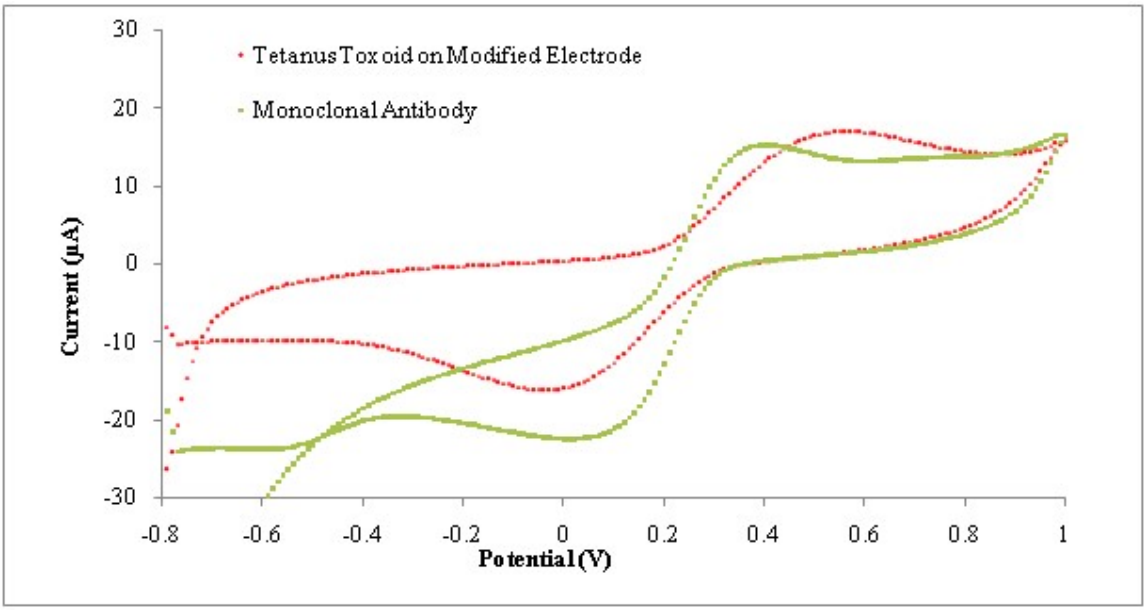
اصول کلی تقویت نقره در کانجوگه‌های نانوذرات طلا-آنتی‌بادی ثانویه برای شناسایی آنتی‌بادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز، در شکل ۱ نشان داده شده است. در اینجا شناسایی ولتامتری چرخه‌ای بر اساس تغییرات یون Ag^{+1} روی سطح الکترود کربن شیشه‌ای است. فرایند تقویت نقره به تهنشین شدن میزان زیادی نقره به‌علت کاهش کاتالیتیک یون‌های نقره توسط برچسب‌های نانوذرات طلا منجر می‌شود. 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 می‌یابد و نمودار جریان در بیشینه پتانسیل کاتدی (E_p^c) به‌سمت پتانسیل‌های مثبت و در کمینهٔ پتانسیل آندی (E_p^a) بهسمت پتانسیل‌های منفی انتقال یافت. همچنین، نتایج نشان دادند که ΔE_p از ۰/۲۴ ولت پیش از واکنش تقویت نقره به ۰/۵۷ ولت پس از واکنش تقویت نقره افزایش یافت. این پاسخ ناشی از واکنش کاهشی تبدیل یون نقره (Ag^+) به فلز نقره (Ag^0) و رسوب نقره فلزی بر روی سطح الکترود است که سبب تقویت سیگنال نانو ذرات طلا و افزایش جریان می‌شود.



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■).

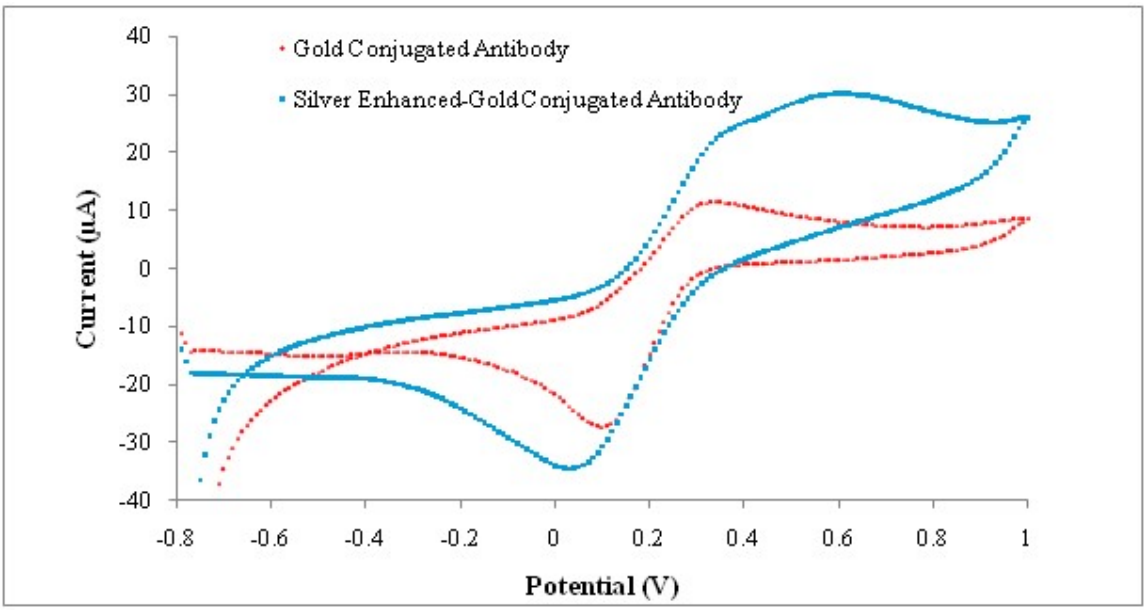
Figure 7. The plot of current versus potential for CNT modified GCE (blue plot ♦) and CNT modified GCE with tetanus toxoid antigen (red plot ■).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.8.7]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.1]



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■).

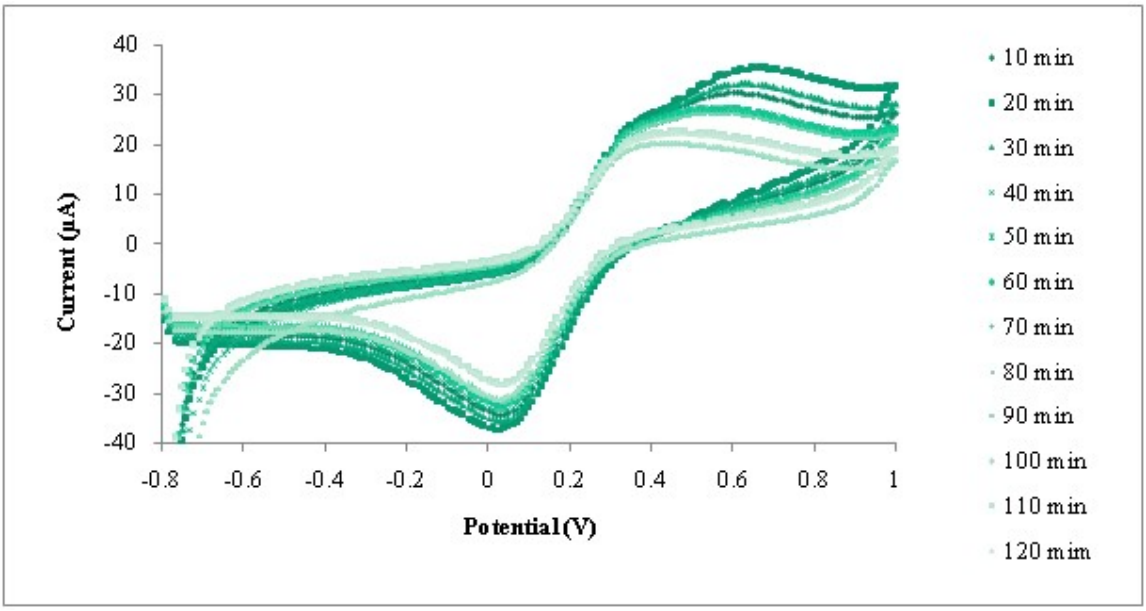
Figure 8. The plot of current versus potential for CNT modified GCE with tetanus toxoid antigen (red plot ♦) and monoclonal antibody after reaction with tetanus toxoid(green plot ■).



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 ♦) and after silver enhancement of gold nanoparticle secondary antibody conjugates at CNT modified GCE (blue plot ■).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.8.7]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.1]



شکل ۱۰- بررسی تکرارپذیری واکنش تقویت نقرهٔ کانجوگه‌های نانوذرات طلا-آنتی بادی ثانویه روی الکترود.

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 عملکرد الکترود اصلاح شده است. به‌طوری‌که تکرارپذیری سیگنال-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 تقویت نقره به مرور زمان از روی سطح الکترود).

بحث

نتایج نشان دادند که نوسان‌های موجود در محیط اطراف نانوذرات طلا سبب تغییر در طیف LSPR این نانوذرات می‌شوند. بنابراین، با کانجوگه شدن نانوذرات به آنتی‌بادی سبب انتقال بیشینهٔ جذب به سمت طول موج‌های بالاتر می‌شوند. در برخی مطالعات بیان شده است که نانوذرات یک پیک جذبی UV/Vis قوی که در بقیهٔ اجزای محلول مشاهده نمی‌شود ارائه می‌کنند، به‌طوری‌که این پیک جذبی منحصراً برای آن نانوذره اختصاصی 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 کانجوگه شده با نانوذرات سبب تغییر ویژگی‌های نوری نانوذرات به-علت تغییر در ضریب شکست موضعی در محیط اطراف نانوذره می-شود، به‌طوری‌که این تغییر در بقیهٔ اجزای محیط مشاهده نمی‌شود. نانوذرات طلا یکی از مناسب‌ترین ساختارها برای تعیین اثر موضعی اتصال پروتئین‌ها با استفاده از بیشینهٔ جذب طیف رزونانس پلاسمون سطحی موضعی هستند (Hall et al., 2011). در مطالعهٔ حاضر، بررسی تقویت سیگنال با استفاده از اتومتالوگرافی (تقویت نقره) به-صورت بررسی پاسخ‌های رزونانس‌پلاسمون سطحی و بررسی بیشینهٔ 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-آنتی‌بادی ثانویه، تغییر در محیط اطراف نانوذرات طلا می‌تواند در این مرحله نیز بیشینهٔ جذب طیف LSPR را تغییر دهد، به‌طوری‌که λ_{max} را به طول موج‌های پایین‌تر و به‌سمت چپ منتقل می‌کند. نتایج به‌دست آمده با مطالعات محققان زیادی توافق دارد، به-طوری‌که این مطالعات نشان می‌دهند محلول تقویت نقره (نیترات 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

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.8.7]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.1]

استفاده می‌شوند. داشتن مساحت بالا و هدایت پذیری الکتریکی عالی سبب می‌شود تا نانولوله‌های کربنی چند دیواره به‌طور گسترده برای ساخت سنسورهای الکتروشیمیایی به‌منظور تقویت پاسخ‌های آنالیتیکال استفاده شوند (Feldman et al., 2008; Gupta Rakesh K. et al., 2016; Musameh et al., 2002). نتایج به‌وضوح نشان دادند که چون توانایی نانولوله‌های کربنی برای توسعه واکنش‌های انتقال الکترون با ساختار الکترونیک و هدایت الکتریکی بالای آن‌ها مرتبط است، پس از اصلاح الکترود کربن شیشه‌ای توسط نانولوله‌های کربنی، افزایش جریان مرتبط با هدایت‌پذیری الکتریکی خوب و تسهیل انتقال الکترون میان یون‌های پتاسیم هگزانو سیانوفرات و الکترود می‌شود. 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 یافته‌اند 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 جریان‌های آندی (i_p) کاهش می‌یابند. نتایج مبین این احتمال هستند که تعادل ایجاد شده در سطح الکترود طولانی نیست و انتقال الکترون برگشت‌پذیر نیست. ولتامتری 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 جریان با توجه به واکنش آنتی‌بادی-آنتی‌ژن موجود روی سطح الکترود تغییر می‌یابد (Kissinger & Heineman 1983). ازطرفی،کاملاً مشخص است که پس از قرارگیری آنتی‌ژن روی الکترود، به‌علت حضور نانولوله‌های کربنی سبب افزایش جریان و هدایت پذیری آن می‌شود. با-وجوداین، در مرحلهٔ بعد، از آنجایی‌که با ارائهٔ آنتی‌بادی مونوکلونال و یا همان مولکول هدف سبب برهم کنش با آنتی‌ژن شده، انتقال الکترون از محلول الکترولت به سمت الکترود با تأخیر صورت می‌گیرد.

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 al., 2011; Zhang Jingjing et al., 2008). 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 رنگ‌گیری 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.

نتیجه‌گیری

یک نمونهٔ ایمونوسنسور الکتروشیمیایی برای ارزیابی شناسایی yes or no آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی ضد توکسوئید کزاز توسط الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی چند دیواره توسعه یافت. در ایمونوسنسور ارائه شده در اینجا به‌منظور افزایش پاسخ‌های آنالیتیکال به‌صورت 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 اینکه این روش به‌دلیل کاربرد تقویت نقره، سبب افزایش و بهبود حساسیت شناسایی روش الکتروشیمیایی می‌شود. 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 الکتروشیمیایی می‌توانند به‌راحتی به کار روند و دارای قابلیت 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.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.8.7]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.1]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.8.7]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.1]

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. Antibody-nanoparticle 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 carbon-nanotube-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.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.1.8.7]
[DOI: 10.52547/nbr.8.1.1]