



Interaction and Stability Study of Anti-Albumin Gold Nanorod Complex to Design Nanobiosensor

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Mirjalili S.S.¹ BSc,
Tohidi Moghadam T.*¹ PhD,
Hassan Sajedi R.² PhD

How to cite this article

Mirjalili S.S, Tohidi Moghadam T, Hassan Sajedi R. Interaction and Stability Study of Anti-Albumin Gold Nanorod Complex to Design Nanobiosensor. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):673-679.

ABSTRACT

Recent researches on the application of nanoparticles have been focused on nanostructures of gold with rod morphology, due to having outstanding optical properties for diagnostics and therapeutics of the diseases. The rod morphology of the nanostructures enables strong and sensitive absorption of surface plasmon in the infrared region. In the present research, based on the sensitivity of surface plasmon resonance of gold nanorods to trace changes in the local environment, as well as the importance of rapid detection of trace amounts of albumin in urine, functionalization, and stability of these nanostructures with anti-albumin antibody has been investigated in different concentrations, volumes, time and pH changes. The results of spectroscopic studies of different samples in the visible spectrum near-infrared waves showed that gold nanorods have desirable stability, and their rod morphology characteristic is maintained. The study of the temporal stability of samples showed that the complex samples were stable up to 48 hours for sensing applications. Primary monitoring of the function of the nanobiosensor in the presence of albumin with two normal and abnormal levels of concentration revealed remarkable changes in interparticle distance, size, and morphology of the nanostructures. According to this research, the rod nanostructures can be used to design simple nanobiosensors.

Keywords Gold Nanorods; Surface Plasmon Resonance; Nanobiosensor

CITATION LINKS

[1] Synthesis, physico-chemical properties, and biomedical applications of gold nanorods-a review [2] Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review [3] The effectiveness of the semi-quantitative assessment of microalbuminuria using routine urine dipstick screening in patients with diabetes [4] Heat induced aggregation of gold nanorods for rapid visual detection of lysozyme [5] Optical biosensors based on plasmonic nanostructures: A review [6] Interaction of lysozyme with gold nanorods: Conformation and activity investigations [7] A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications [8] Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis-a prospective review on drug delivery aspect [9] Small gold nanorods: Recent advances in synthesis, biological imaging, and cancer therapy [10] Conformation and activity of lysozyme on binding to two types of gold nanorods: A comparative study [11] Synthesis of less toxic gold nanorods by using dodecylethyltrimethylammonium bromide as an alternative growth-directing surfactant [12] Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies [13] Trends of gold nanoparticle-based drug delivery system in cancer therapy [14] Microalbuminuria: Definition, detection, and clinical significance [15] Gold nanorods: From synthesis and properties to biological and biomedical applications [16] Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery [17] A sensitive gold-nanorods-based nanobiosensor for specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* [18] Screen-printed carbon electrode-based electrochemical immunosensor for rapid detection of microalbuminuria [19] Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method [20] Seed-mediated synthesis of gold nanorods: Role of the size and nature of the seed

¹Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82883419
Fax: +98 (21) 82884717
t.tohidi@modares.ac.ir

Article History

Received: July 16, 2019

Accepted: August 26, 2019

ePublished: December 21, 2019

مطالعه میان‌کنش و پایداری کمپلکس نانومیله‌های طلا- آنتی‌بادی ضد آلبومین با رویکرد طراحی نانوزیست حسگر

سیدسینا میرجلیلی BSc

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

طاهره توحیدی‌مقدم* PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

رضا حسن‌ساجدی PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

در جدیدترین پژوهش‌های مبتنی بر استفاده از نانوذرات با رویکرد کاربردی، نانوساختارهای میله‌ای شکل طلا با داشتن خواص نوری بی‌نظیر در درمان و تشخیص بیماری‌ها مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند. شکل میله‌ای این نانوساختارها، باعث جذب قوی و حساس پلاسمون سطحی در ناحیه مادون قرمز می‌شود. در پژوهش حاضر، با توجه به حساسیت ویژه نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله‌های طلا نسبت به کوچک‌ترین تغییرات محیطی و اهمیت تشخیص سریع مقادیر بسیار کم آلبومین در ادرار، اتصال و پایداری نانومیله‌های طلا به آنتی‌بادی ضد آلبومین در شرایط مختلف غلظتی، حجمی، زمانی و همچنین تغییرات pH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعات طیف‌سنجی نمونه‌های مختلف در گستره طول موج مرئی- نزدیک مادون قرمز نشان داد که در غلظت، حجم و pH مشخص نانوساختار از پایداری مطلوبی برخوردار است و شکل میله‌ای آن به همراه ویژگی‌های پلاسمونیک محفوظ مانده است. مطالعه پایداری زمانی نمونه‌ها نشان داد که برای استفاده به‌عنوان نانوزیست حسگر، قابلیت نگهداری نمونه کمپلکس تا ۴۸ ساعت مناسب خواهد بود. پایش اولیه عملکرد نانوزیست حسگر در حضور آلبومین با دو غلظت در گستره نرمال و بیماری‌زا، تغییر شدید در فاصله بین نانوذرات، اندازه و مورفولوژی نانوساختارها را نشان داد. طبق این پژوهش، می‌توان از این نانوساختارهای میله‌ای در طراحی زیست حسگرهای ساده استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: نانومیله‌های طلا، نوسانات پلاسمون سطحی، نانوزیست حسگر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۴

* نویسنده مسئول: t.tohidi@modares.ac.ir

مقدمه

امروزه با تفکر در حیات و فرآیندهای بنیادین آن، در دنیایی بسیار کوچک اما ژرف قدم گذاشته می‌شود که برای درک آن هر بار به ریزبینی بیشتری نیاز است. با تکامل علوم مختلف، تحقیقات و پدیده‌های علمی روز به روز در ابعاد کوچک‌تری شکل می‌گیرند. نوآوری در ایجاد سامانه‌های ترکیبی از نانوذرات و زیست‌مولکول‌ها در حل مسایل و مشکلات تکنیکی علوم پزشکی و زیستی همواره تاثیر بسیاری داشته است. هم‌اکنون استفاده از نانوذرات به جای مواد متداول در مطالعات کاربردی علم حیات، باعث افزایش کارایی و کاهش چشمگیر هزینه‌ها شده است. بنابراین با ترکیب دو فناوری "نانو" و "بیو" زمینه طراحی روش‌های نوین، دست‌ورزی سامانه‌های زیستی، تقلید قوانین مربوط به علم حیات، توسعه کاوشگرهای

مختلف برای مطالعه فرآیندهای زیستی داخل و خارج سلولی، تشخیص کارای آنالیت‌های مختلف در غلظت‌های بسیار پایین و غیره فراهم می‌شود. در مقایسه با سایر شاخه‌های مربوط به فناوری نانو، نانوزیست‌فناوری برای پاسخ‌گویی به نیازهای جامعه از توانایی‌های بسیار بالایی برخوردار است. امروزه در کاربردهای گوناگونی همچون طراحی حسگرهای زیستی [1-3]، طراحی عوامل به‌گزین‌درمانی [4-6] و تشخیصی [1، 7]، حمل دارو [8-10]، حمل ژن [8]، تصویربرداری [4، 5، 11] و غیره، بهره‌برداری از این فناوری امری اجتناب‌ناپذیر است.

از بین نانوذرات گوناگون، نانوساختارهای طلا که به شکل میله فرم‌دهی شده‌اند، از سایر رقبای پلاسمونیک خود پیشی گرفته‌اند. رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) الکترون‌های لایه هدایت در نانومیله‌های طلا به‌راحتی قابل دست‌ورزی و جذب در طول موج‌های خاص است. دست‌یابی به SPR جذبی در یک محل مشخص و ایده‌آل، مزایا و کاربردهای فراوانی را نوید می‌دهد. به‌طور کلی پدیده SPR نتیجه تابش پرتوالکترومغناطیس فرودی و میان‌کنش با الکترون‌های مستقر در لایه هدایت فلزات پلاسمونیک است که در نهایت به نوسان دسته‌جمعی الکترون‌ها در یک طول موج معین می‌انجامد.

به دلیل ماهیت منحصر به فرد نانوساختارهای میله‌ای شکل طلا، تحقیقات اخیر با سرعتی شگفت‌انگیز به کشف کاربردهای زیستی و زیست‌پزشکی این ذرات اختصاص داده شده است [4، 9، 10]. طراحی پروب‌های نانومیله‌ای و مولکولی برای تشخیص همزمان پروتئین‌ها [8، 12]، نوکلئیک‌اسیدها [11] و پاتوژن‌ها، عوامل دارویی مولکولی [14-16]، پایش تغییرات صورت‌بندی در ساختار نوکلئیک‌اسیدها [11]، رهایش کنترل‌شده ژن و دارو [7، 13]، تصویربرداری [4، 5، 17] و گرمادرمانی (هایپرترمیا) [7، 18، 19] مثال‌هایی از کاربردهای بالقوه نانومیله طلا هستند.

با در نظر گرفتن حساسیت نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله‌های طلا نسبت به کوچک‌ترین تغییرات محیطی و کاربردی‌پذیری در طراحی نانوبیوسنسورها، بررسی میزان پایداری این نانوساختارها در شرایط گوناگون محیطی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. در صورتی که نانوساختار از مقاومت و پایداری مطلوبی برخوردار نباشد، شکل میله‌ای و منحصر به فرد آن آسیب‌پذیر بوده و ممکن است منجر به تجمع برگشت‌ناپذیر شود. بنابراین پیش از طراحی هر گونه زیست حسگر مبتنی بر رزونانس پلاسمون سطحی نانومیله طلا، انجام یک‌سری مطالعات بنیادین در مورد پایداری و حفظ مورفولوژی میله‌ای آن ضروری به نظر می‌رسد. در پژوهش حاضر به بررسی پایداری این نانوساختارها پس از تشکیل کمپلکس با آنتی‌بادی ضد آلبومین در شرایط مختلف پرداخته شد. پروتئین آلبومین در یک انسان سالم تقریباً به میزان ۳۰ میلی‌گرم در روز از طریق ادرار دفع می‌شود. وجود مقادیر ۳۰۰-۳۰ میلی‌گرم در روز در ادرار فرد، شناخته‌شده‌ترین بیومارکر بیماری‌های قلبی-عروقی، نفروپاتی، بیماری‌های ناشی از مراحل پیش‌رونده دیابت نوع ۱ و ۲

واکنش شرکت نکرده‌اند و نیز نانوذرات کروی شکل احتمالی از محیط ساخت خارج شوند. به این منظور یک دور سانتریفیوژ با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه مناسب بود. بالاتر بردن دور در دقیقه منجر به تجمع برگشت‌ناپذیر نانوساختارها می‌شود. پس از تخلیه محلول رویی، نانوساختارهای ته‌نشین شده در میکروتیوب با بافر مورد استفاده در آزمایش به حجم رسانده شد. بهتر است هر بار پیش از دور بعدی سانتریفیوژ و یا استفاده از نانوساختارها در آزمایش‌ها، محلول را تحت امواج اولتراسوند قرار داد تا از تجمع احتمالی و موقت نانومیله‌ها جلوگیری و توزیع‌پذیری ذرات یکنواخت‌تر شود.

پایش نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله‌های طلا

سریع‌ترین و ساده‌ترین روش برای تایید ساخت نانومیله‌های طلا استفاده از طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی است. نوسانات پلاسمون سطحی نانوساختارها پس از تخلیص، در گستره طول موج ۴۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر Perkin Elmer (پرکین المر؛ ایالات متحده) ثبت شد.

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری نانومیله طلا

برای تعیین مورفولوژی و اندازه دقیق نانومیله‌های طلا از میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل LEO 906 (LEO؛ آلمان) استفاده شد. نمونه آماده‌سازی‌شده روی شبکه مسی پوشیده از کربن نشانداده شد و برای چند ساعت در مکانی آرام قرار گرفت تا خشک و برای تصویربرداری آماده شود.

میان‌کنش نانومیله طلا و آنتی‌بادی

آنتی‌بادی ضد آلبومین از طریق جذب فیزیکی روی سطح نانومیله‌های طلا نشانداده شد. برای تهیه بافر آنتی‌بادی ۱۲ گرم تریس و ۴ گرم کلرید سدیم در بالن ژوژه یک‌لیتری ریخته، با آب مقطر دو بار تقطیر به حجم رسانده و اسیدیته آن روی ۸ تنظیم شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول نانومیله‌های طلا با میزان حجمی ۲۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی با غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مخلوط و پس از ۵ دقیقه آنکوباسیون در دمای محیط طیف جذبی خوانده شد.

یافته‌ها و بحث

مشخصه‌یابی نانومیله‌های طلا

ساده‌ترین راه برای تایید ساخت نانومیله‌های طلا، بررسی طیف جذبی آنها در ناحیه مرئی تا مادون قرمز نزدیک است. با برخورد پرتو الکترومغناطیس به نمونه نانومیله طلا، بسته به قطبش‌پذیری پرتو، نوسانات الکترونی در دو جهت اتفاق می‌افتد. برانگیختگی الکترون‌ها در قسمت عرضی نانومیله و نوسانات پلاسمون سطحی در این ناحیه، یک پیک جذبی در محدوده مرئی نشان می‌دهد که به SPR عرضی معروف است. از سوی دیگر، الکترون‌ها در طول نانومیله‌های طلا رفتار نوسانی متفاوتی نشان می‌دهند که به پدیدارشدن یک پیک پلاسمونی جذبی قوی در محدوده نزدیک مادون قرمز می‌انجامد و به SPR طولی شهرت دارد. محدوده این نوع جذب پلاسمونی به طول نانوساختار، شکل و شرایط ساخت آن

و تخریب بافت کبدی است. همچنین نسبت میزان آلبومین به میزان کراتینین موجود در ادرار (ACR)، در صورت بالاتر رفتن از حد مجاز می‌تواند نشانه مراحل حاد ضایعات گلومرولی کلیه، تخریب دیواره‌های عروقی، اختلالات ایمنی، التهابی و حتی برخی از سرطان‌های نادر باشد^[18]. از این رو تشخیص سریع و اختصاصی این پروتئین اهمیت زیادی دارد. در طراحی نانوزیست حسگرهای کارای مبتنی بر ویژگی تجمع‌پذیری نانوذرات، نخستین و مهم‌ترین گام بررسی میان‌کنش نانوساختارها با عامل تشخیص زیستی مورد نظر، پایداری سامانه تشخیصی و عدم تجمع آن در حضور عوامل جانبی غیر اختصاصی است که تمرکز پژوهش حاضر نیز بر این موضوع بود. در این پژوهش برای ساخت نانوزیست حسگر مورد نظر، آنتی‌بادی ضد آلبومین به‌عنوان یک عامل تشخیص زیستی اختصاصی برای پروتئین آلبومین انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

مواد

پودر تتراکلروآورات ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (۹۹/۹۹٪)، سدیم‌بوروهیدراید (NaBH_4) (۹۹٪)، ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم‌برومید (CTAB)، اسیدآسکوربیک (۹۹٪) و نیترات‌نقره (AgNO_3) (۹۹٪) خریداری شدند (سیگما؛ ایالات متحده). در تمام آزمایش‌ها از آب دیونیزه استفاده شد. کلیه ظروف شیشه‌ای با محلول رقیق سولفونیک‌اسید، شوینده تمیز و آب دیونیزه شست‌وشو داده شد. آنتی‌بادی ضد آلبومین انسانی (Lot No 22709) و کالیبراتور میکروآلبومین (Lot No 21293-21297) نیز تهیه شدند (پارس‌آزمون؛ ایران). بافر مناسب آنتی‌بادی حاوی ۰۰ میلی‌مولار تریس و ۷۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و دارای pH=۸ بود.

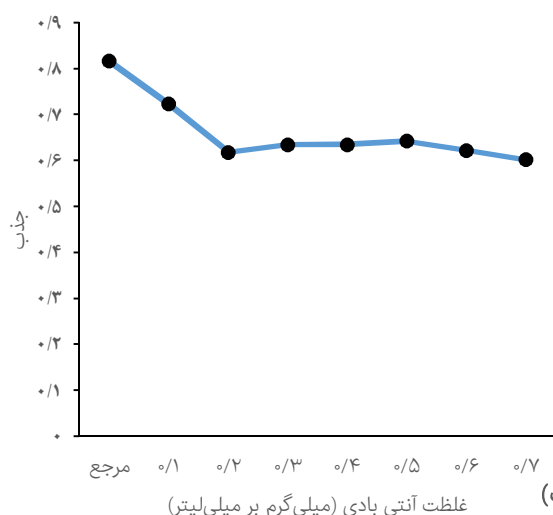
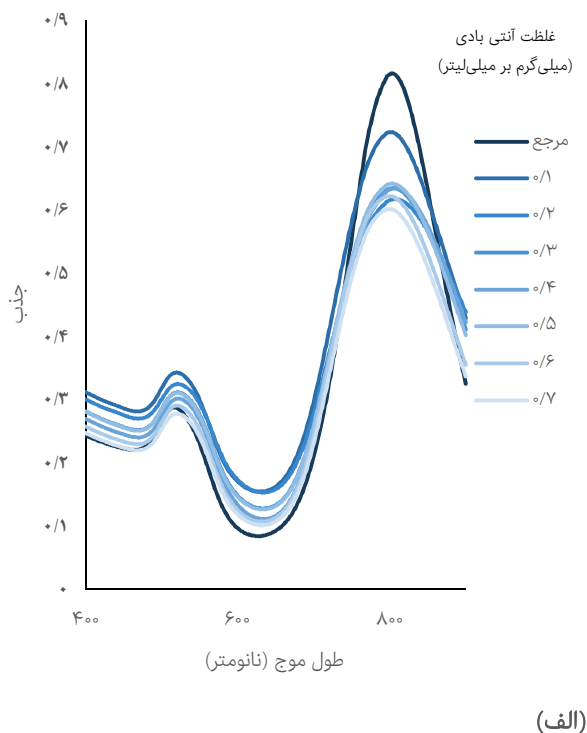
روش‌ها

سنتر نانومیله طلا

نانومیله طلا براساس روش "رشد روی ذرات دانه" ساخته شد.^[8, 12, 17, 20] ابتدا نانوذرات کروی شکل دانه با اضافه‌کردن ۲۵۰ میکرولیتر محلول طلا (۰/۰۱ مولار) به ۷/۵ میلی‌لیتر محلول سورفکتانت کاتیونی (۰/۰۹۵ مولار) و ۶۰۰ میکرولیتر از محلول خنک سدیم‌بوروهیدراید (۰/۰۱ مولار) و تکان شدید ساخته شد. به‌منظور رشد دانه‌ها، محلول قهوه‌ای کم‌رنگ حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. در مرحله بعد ۹/۵۰ میلی‌لیتر CTAB (۰/۰۹۵ مولار)، ۴۰۰ میکرولیتر محلول طلا (۰/۰۱ مولار)، ۹۰ میکرولیتر نقره‌نیترات (۰/۰۲ مولار)، ۶۴ میکرولیتر آسکوربیک‌اسید (۰/۰۱ مولار) و در نهایت ۴۰ میکرولیتر از محلول دانه به محیط واکنش افزوده شد و پس از ۱۰ ثانیه تکان آرام، نانوذرات حاصل به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. رنگ ارغوانی در محلول نشان‌دهنده رشد میله‌ای نانوساختار بود.

تخلیص نانومیله‌های طلا

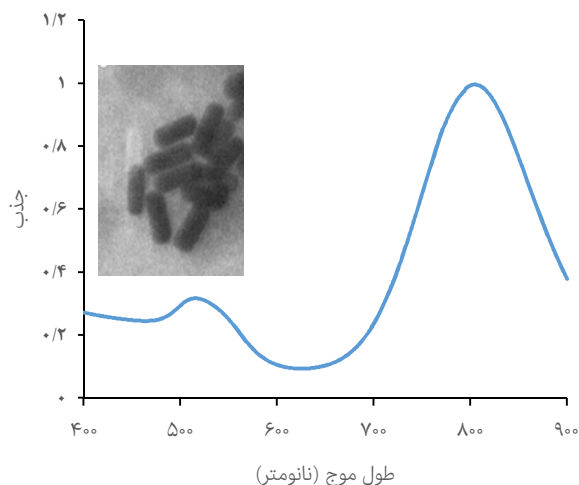
پس از کامل‌شدن رشد نانوساختارها لازم بود که محلول نانومیله‌های طلا شست‌وشو داده شوند تا سورفکتانت اضافی، یون‌های طلا که در



نمودار ۲ (الف) نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله‌های طلا پس از میان‌کنش با غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی؛ (ب) اختلاف جذب LSPR نمونه‌های کمپلکس نانومیله-طلا-آنتی‌بادی نسبت به شاهد

بررسی نسبت حجمی مناسب برای میان‌کنش نانومیله و آنتی‌بادی
در این مرحله، حجم ثابتی از نانومیله طلا (۲۰۰ میکرولیتر) به حجم‌های متغیری از آنتی‌بادی با غلظت بهینه که در آنالیز قبل ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد، اضافه شد. بر این اساس نسبت‌های حجمی نانوساختار به آنتی‌بادی ۵، ۸، ۱۰ و ۲۰ (نانوساختار: آنتی‌بادی) بود. نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله‌های طلا پس از میان‌کنش با آنتی‌بادی با نسبت‌های حجمی ذکر شده نیز مشاهده شد (نمودار ۳). شدت پیک LSPR همچنان در مقایسه با TSPR حساسیت بیشتری نسبت به تغییر در محیط اطراف نانوساختار نشان داد. با کم‌تر شدن نسبت حجمی، شدت پیک

وابسته است. بنابراین تاثیر دست‌ورزی شرایط ساخت در شدت جذب پلاسمون سطحی طولی و محل پدیدار شدن آن نمایان می‌شود. به همین ترتیب بلندی یا کوتاهی میله در هر مورد ویژگی معینی برای نانوساختار تعریف می‌کند. در پژوهش حاضر نوسانات پلاسمون سطحی نانوساختارهای میله‌ای مورد استفاده به ترتیب در گستره طول موج ۵۱۸ و ۸۰۳ نانومتر پدیدار شدند (نمودار ۱).

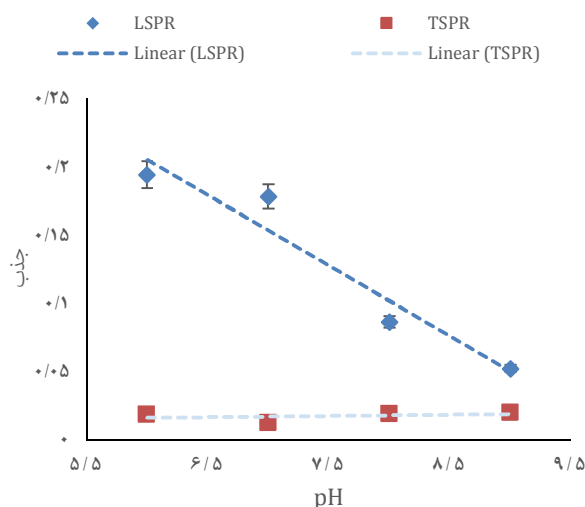


نمودار ۱ نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله‌های طلا و تصویر میکروسکوپ عبوری

بررسی طیف جذبی نانومیله‌های طلا در حضور غلظت‌های متفاوت آنتی‌بادی ضد آلبومین در محیط

در پژوهش حاضر نوسانات پلاسمون سطحی نمونه تخلیص‌شده نانومیله طلا با غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی مشاهده شد (نمودار ۲، الف). هم‌زمان با میان‌کنش نانوساختارها و آنتی‌بادی از شدت پیک رزونانس پلاسمون سطحی منطقه‌ای (LSPR) نانوساختارها کاسته و محل پیدایش آن اندکی به سمت طول موج قرمز جا به جا شد. همچنین میزان جذب LSPR نمونه‌های کمپلکس آنتی‌بادی-نانومیله طلا نسبت به شاهد (نانوساختار) متفاوت بودند (نمودار ۲، ب). پدیدار شدن پلاتو به معنی اشباع شدن سطح نانوساختارها و میان‌کنش غلظت کافی از آنتی‌بادی با آنها بود. با وجود افزایش قابل توجه آنتی‌بادی، نانوساختارهای طلا همچنان شکل ویژه میله‌ای خود را حفظ کردند. این پایداری مورفولوژیک در هر نوع کاربرد نانومیله طلا از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. این امر در بهره‌برداری از حساسیت ویژه این نانوساختارها نسبت به کوچک‌ترین تغییر در محیط اطراف، جلوه پررنگ‌تری می‌یابد، زیرا در طراحی نانوبیوسنسورهای مبتنی بر سنجش کالریمتریک و یا تغییر در فاصله میان نانوذرات، مهم‌ترین چالش پیش رو توسعه سامانه‌های تشخیصی بدون تغییر غیراختصاصی در غیاب مولکول هدف است. در کنار پایداری شکل میله‌ای با وجود افزایش غلظت آنتی‌بادی، شدت نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله‌های طلا تغییر قابل توجهی نداشتند.

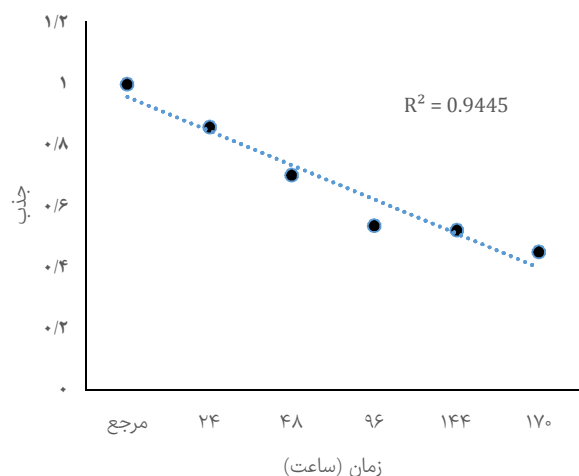
پتانسیل و کاربردپذیری این مورفولوژی در طراحی سامانه‌های نوین زیست حسگرها را تایید می‌کند.



نمودار ۴) نوسانات پلاسمون سطحی کمپلکس نانومیله- آنتی‌بادی در اسیدیته‌های مختلف

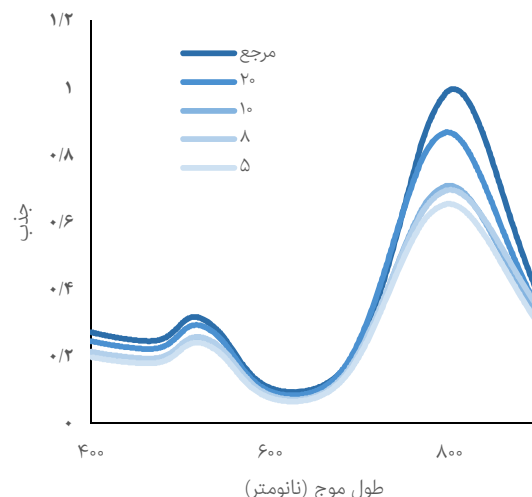
بررسی پایداری زمانی میان‌کنش آنتی‌بادی و نانومیله

میان‌کنش آنتی‌بادی و نانومیله طلا از نظر زمانی (صفر تا ۱۷۰ ساعت) نیز بررسی شد (نمودار ۵). ۲۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در pH=۷ به ۲۰۰ میکرولیتر نانومیله اضافه شد و در زمان‌های مختلف نوسانات پلاسمون سطحی نانوساختارها بررسی شد. پس از ۴۸ ساعت تغییرات قابل ملاحظه‌ای در LSPR نانوبیوسنسور مشاهده شد. با گذشت زمان، پس از ۱۷۰ ساعت در نمونه‌های مورد آزمایش رسوب دیده شد که نشان‌دهنده تجمع شدید و ازبین‌رفتن ویژگی پلاسمونیک نانوساختارها بود. نتایج این بخش، مؤید لزوم اتصال زیستی آنتی‌بادی و نانوساختار به‌صورت تازه و استفاده از نمونه‌های کمپلکس پیش از کاربرد مورد نظر بود.



نمودار ۵) تغییرات نوسانات پلاسمون سطحی وابسته به زمان کمپلکس نانومیله طلا- آنتی‌بادی

LSPR نمونه‌های کمپلکس نسبت به نانوساختار شاهد به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرد. هر چند این کاهش شدید به مورفولوژی میله‌ای نانوساختار آسیبی وارد نکرد. در سه نسبت حجمی ۵، ۸ و ۱۰، آهنگ تغییرات LSPR نسبت به سمت نمونه شاهد به سمت ثابت شدن پیش رفت.



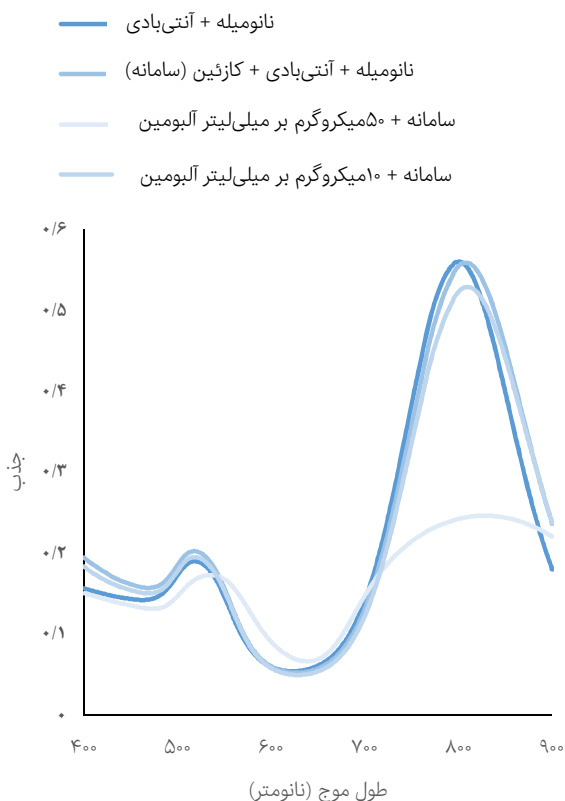
نمودار ۳) نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله‌های طلا پس از میان‌کنش با آنتی‌بادی (۲/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با نسبت‌های حجمی مختلف (نسبت‌ها براساس حجم نانومیله به آنتی‌بادی هستند).

بررسی pH مناسب برای میان‌کنش آنتی‌بادی و نانومیله

۲۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۲۰۰ میکرولیتر نانومیله با جذب برابر با یک در اسیدیته‌های ۶-۹ مخلوط و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. به این ترتیب نوسانات پلاسمون سطحی کمپلکس نانو میله- آنتی‌بادی در اسیدیته‌های مختلف مشاهده شد (نمودار ۴). واضح است که کمپلکس نانو میله- آنتی‌بادی در اسیدیته‌های ۶ و ۷ از پایداریترین شرایط برخوردار بودند. با عبور از اسیدیته خنثی به سمت اسیدیته‌های قلیایی، شدت نوسانات پلاسمون سطحی نانوساختارها به‌طور قابل‌توجهی کاهش پیدا کردند که این امر می‌تواند در حضور مولکول‌های هدف و در نهایت گستره خطی نانوبیوسنسور طراحی‌شده تداخل ایجاد کند. با توجه به کاهش قابل ملاحظه LSPR در اسیدیته‌های قلیایی، pH نانومیله سنتز شده اصلی (۵/۵) و پایداری مناسب کمپلکس در pH خنثی، pH بهینه برای میان‌کنش آنتی‌بادی و نانومیله، ۷ در نظر گرفته شد. همچنین تغییرات نوسانات پلاسمون سطحی نانومیله‌ها در عرض نانوساختار که به TSPR شهرت دارد، نسبت به LSPR که در طول نانومیله رخ می‌دهد، کاملاً ثابت بود (نمودار ۴). تغییرات TSPR خود به‌نوعی مشابه طیف جذبی نانوذرات کروی شکل طلا بود که در محدوده مرئی نمایان شد. عدم تغییر در TSPR نانومیله‌ها نسبت به LSPR در این شرایط، گواه دیگری بر حساسیت منحصر به فرد این نانوساختارها نسبت به محیط اطراف و ضریب شکست آنها در مقایسه با همتای کروی شکل است. این ویژگی

بلاکینگ

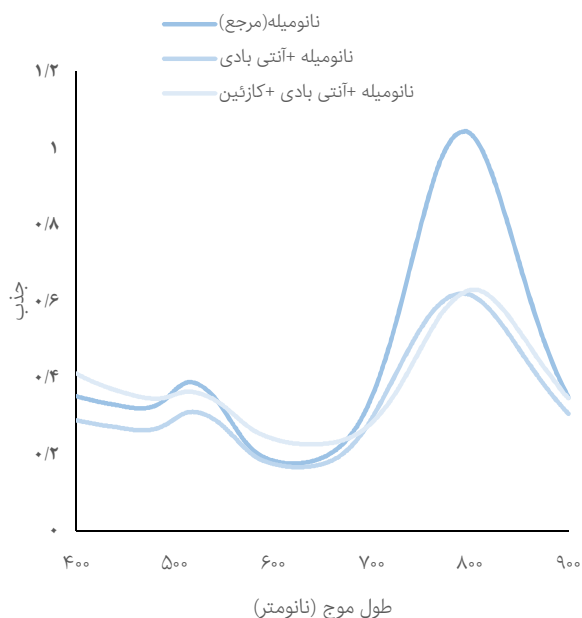
در استفاده از نانوبیوسنسورهای میله‌ای طلا، برای جلوگیری از اتصال غیراختصاصی سایر زیست‌مولکول‌ها به سطح نانوساختارها، بلوکه کردن سطح آنها ضروری بود. در پژوهش حاضر از پروتئین کازئین شیر برای بلاکینگ استفاده شد. ۲۰۰ میکرولیتر نانومیل طلا به ۲۰ میکرولیتر آنتی‌بادی با غلظت ۲/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در pH=۷ انکوبه شد و سپس ۵۰ میکرولیتر کازئین با غلظت ۱٪ وزنی-حجمی به آن افزوده شد. پلاسما سطحی نانومیل‌های طلا پس از میان‌کنش با آنتی‌بادی و بلاکینگ با پروتئین کازئین نوسانات مختلفی را نشان داد (نمودار ۶). پس از میان‌کنش با کازئین، تغییر LSPR به سمت طول موج‌های بالاتر همراه با کاهش شدت مشاهده شد. با این حال نانوساختارها همچنان مورفولوژی میله‌ای خود را به خوبی حفظ کردند.



نمودار ۷) پایش عملکرد نانوزیست حسگر در حضور آلبومین

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، نانومیل طلا براساس روش رشد روی ذرات دانه سنتز شد و با در نظر گرفتن حساسیت نوسانات پلاسما سطحی این نانوساختارها نسبت به کوچک‌ترین تغییرات محیطی و کاربرپذیری در طراحی نانوبیوسنسورها، پایداری آنها در حضور عامل تشخیص زیستی، در شرایط مختلف غلظتی، حجمی، زمانی و همچنین تغییرات pH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعات طیف‌سنجی نمونه‌های مختلف در گستره طول موج مرئی و نزدیک مادون قرمز نشان داد که در غلظت‌ها، حجم‌ها و pH مشخص نانوساختار از پایداری مطلوبی برخوردار است و شکل میله‌ای آن به همراه ویژگی‌های پلاسمونیک همچنان محفوظ مانده است. مطالعه پایداری زمانی کمپلکس آنتی‌بادی- نانومیل طلا نشان داد که نمونه‌ها پس از گذشت ۱۷۰ ساعت از میان‌کنش تجمع می‌یابند و برای استفاده به عنوان نانوبیوسنسور تهیه نمونه تازه با قابلیت نگهداری تا ۴۸ ساعت مناسب خواهد بود. پایش عملکرد نانوزیست حسگر در حضور آلبومین با دو غلظت در گستره نرمال و بیماری‌زا تغییر شدید در فاصله بین نانوذرات، اندازه و مورفولوژی نانوساختارها را نشان داد. نتایج حاصل از این پژوهش بنیادین، کاربرپذیری این نانوساختارهای جالب در طراحی نانوسامانه‌های هیبریدی گوناگون به‌ویژه نانوبیوسنسورهای مبتنی بر رنگ‌سنجی و تغییرات نوسانات پلاسمونیک را تایید می‌کند.



نمودار ۶) مقایسه نوسانات پلاسما سطحی نانومیل‌های طلا پس از میان‌کنش با آنتی‌بادی و بلاکینگ با پروتئین کازئین

آزمون عملکرد آنتی‌بادی و قابلیت سنجش آلبومین

پس از تکمیل اطلاعات میان‌کنش کمپلکس نانومیل‌های طلا-آنتی‌بادی و بهینه‌سازی سامانه زیست حسگری قابلیت تشخیص آلبومین در دو غلظت آنالیت آزمون و عملکرد نانوزیست حسگر در دو غلظت ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بررسی شد که غلظت اول مربوط به مقدار آلبومین در گستره نرمال و غلظت دوم مربوط به مقدار گزارش شده برای افراد مبتلا به میکروآلبومینوری غیرحاد بود. نوسانات پلاسما سطحی نانوزیست حسگر به‌طور واضحی نسبت به غلظت دوم پاسخ داد. پهن‌شدگی پیک LSPR را می‌توان به تغییر شدید در فاصله بین نانوذرات، اندازه و مورفولوژی نانوساختارها نسبت داد (نمودار ۷).

trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis-a prospective review on drug delivery aspect. *OpenNano*. 2017;2:37-46.

9- An L, Wang Y, Tian Q, Yang Sh. Small gold nanorods: Recent advances in synthesis, biological imaging, and cancer therapy. *Materials*. 2017;10(12):1372.

10- Tohidi Moghadam T, Ranjbar B, Khajeh K. Conformation and activity of lysozyme on binding to two types of gold nanorods: A comparative study. *Int J Biol Macromol*. 2012;51(1-2):91-6.

11- Allen JM, Xu J, Blahove M, Canonico-May SA, Santaloci TJ, Braselton ME, et al. Synthesis of less toxic gold nanorods by using dodecylethyldimethylammonium bromide as an alternative growth-directing surfactant. *J Colloid Interface Sci*. 2017;505:1172-6.

12- Jazayeri MH, Amani H, Pourfatollah AA, Pazoki Toroudi H, Sedighimoghaddam B. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sens Biosens Res*. 2016;9:17-22.

13- Ajnai G, Chiu A, Kan T, Cheng CC, Tsai TH, Chang J. Trends of gold nanoparticle-based drug delivery system in cancer therapy. *J Exp Clin Med*. 2014;6(6):172-8.

14- Toto RD. Microalbuminuria: Definition, detection, and clinical significance. *J Clin Hypertens*. 2004;6(S11):2-7.

15- Huang X, Neretina S, El-Sayed MA. Gold nanorods: From synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Adv Mater*. 2009;21(48):4880-910.

16- Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*. 2017;252:28-49.

17- Shams S, Bakhshi B, Tohidi Moghadam T, Behmanesh M. A sensitive gold-nanorods-based nanobiosensor for specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Nanobiotechnol*. 2019;17(1):43.

18- Tsai JZ, Chen CJ, Settu K, Lin YF, Chen CL, Liu JT. Screen-printed carbon electrode-based electrochemical immunosensor for rapid detection of microalbuminuria. *Biosens Bioelectron*. 2016;77:1175-82.

19- Nikoobakht B, El-Sayed MA. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem Mater*. 2003;15(10):1957-62.

20- Gole A, Murphy CJ. Seed-mediated synthesis of gold nanorods: Role of the size and nature of the seed. *Chem Mater*. 2004;16(19):3633-40.

تشکر و قدردانی: از دانشگاه تربیت مدرس به‌دلیل حمایت مالی برای انجام این مطالعه تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تاییدیه اخلاقی: مسئولیت علمی و اخلاقی مطالعه حاضر بر عهده نویسندگان است.

تعارض منافع: نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافع را اعلام نکرده‌اند.

سهم نویسندگان: سیدسینا میرجلیلی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۰٪)؛ طاهره توحیدی‌مقدم (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ رضا حسن‌ساجدی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۲۰٪).

منابع مالی: کلیه منابع مالی این مطالعه توسط دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است.

منابع

- 1- Marangoni VS, Cancino-Bernardi J, Zucolotto V. Synthesis, physico-chemical properties, and biomedical applications of gold nanorods-a review. *J Biomed Nanotechnol*. 2016;12(6):1136-58.
- 2- Elahi N, Kamali M, Baghersad MH. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*. 2018;184:537-56.
- 3- Shiwa T, Nishimura M, Kato M. The effectiveness of the semi-quantitative assessment of microalbuminuria using routine urine dipstick screening in patients with diabetes. *Intern Med*. 2018;15(4):503-6.
- 4- Tohidi Moghadam T, Ranjbar B. Heat induced aggregation of gold nanorods for rapid visual detection of lysozyme. *Talanta*. 2015;144:778-87.
- 5- Špačková B, Wrobel P, Bocková M, Homola J. Optical biosensors based on plasmonic nanostructures: A review. *ProcIEEE*. 2016;104(12):2380-408.
- 6- Tohidi Moghadam T, Ranjbar B, Khajeh K, Eteazad SM, Khalifeh K, Ganjalikhany MR. Interaction of lysozyme with gold nanorods: Conformation and activity investigations. *Int J Biol Macromol*. 2011;49(4):629-36.
- 7- Menon S, Rajeshkumar S, Kumar V. A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. *Resour Effic Technol*. 2017;3(4):516-27.
- 8- Sengani M, Grumezescu AM, Devi Rajeswari V. Recent