

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایاننامه جهت دریافت دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

تشخیص آنتیژن سطحی هپاتیت B با استفاده از زیست حسگر

الکتروشیمیایی

استاد راهنما:

دکتر محمد جوهری

نگارش:

پروین دشتی

تیرماه ۱۳۹۹

شماره پایان نامه:

۹۹/۰۴-۳۵۰

تقدیم:

ما حصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به پدرم که مهر آسمانی اش
آرام بخش آلام زمینی ام است
به سبزترین و پرمهرترین نگاه زندگیم، چشمان مادرم
به استوارترین تکیه گاهم، دستان پرمهر همسرم
که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره
ای از دریای بی کران مهربانیتان را سپاس توانم بگویم.

تشکر:

شکر شایان شار ایزد منان که توفیق را رفیق راهم ساخت تا این پایان نامه را به پایان برسانم. نمی توانم معنایی بالاتر از تقدیر و تشکر بر زبانم جاری سازم و سپاس خود را در وصف استاد خویش آشکار نمایم، که هر چه گویم و سرایم، کم گفته ام. با زبان قادر خود از استاد با کمالات و شایسته ام، جناب آقای دکتر محمد جوهری که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند کمال تشکر و قدردانی را دارم باشد که بتوانم بخشی از خدمات ایشان را سپاس گویم.

چکیده

مقدمه: تشخیص عفونت های ویروسی از جمله هپاتیت و ایدز از اولویت های اصلی سیستم سلامت کشورها می باشد. عفونت-های مزمن با ویروس هپاتیت B (ب) ممکن است به کارسینوم کبدی و سیروز منجر شود. آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) بخشی از این ویروس است که در موارد عفونت فعال در جریان خون ظاهر می شود و به عنوان یک نشانگر برای تشخیص عفونت حاد و مزمن هپاتیت ب بکار می رود. در سال های اخیر از زیست حسگرها به عنوان یکی از ابزارهای قدرتمند در تشخیص مقادیر خیلی پایین آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B استفاده شده است.

روش کار: در این مطالعه، ابتدا، سطح الکترود صفحه چاپی (SPE) با نانولوله های کربنی چند دیواره (MWCNT) اصلاح - گردید. سپس، آنتی بادی (Ab) اختصاصی ضد آنتی ژن سطحی هپاتیت B بر روی سطح الکترود اصلاح شده - MWCNT SPE متصل شد و در ادامه آلبومین سرم گاوی (BSA) برای پوشش سطوح واکنش نداده استفاده شد تا از اتصالات غیر (HBsAg*) کثروگه و نشاندار شده بود (*). در تماس با الکترود اصلاح شده Ab/BSA-MWCNT-SPE قرار گرفت و با انکوباسیون، تمام سایت های آنتی بادی های سطح الکترود با HBsAg* به عنوان سیگنال دهنده اشغال گردید. در نهایت الکترود تهیه شده با آنتی ژن غیر نشاندار انکوبه شد و سیگنال های روش-نمایش آن اندازه گیری شد.

نتایج: در این مطالعه، زیست حسگر HBsAg*-Ab/BSA-MWCNT-SPE، با توجه به حضور فروسن در ساختار آنتی بادی ثانویه، با اعمال پتانسیل مناسب، سیگنال الکتروشیمیایی قابل تشخیص را ایجاد کرد. در حضور نمونه واقعی و آنتی ژن غیر کثروگه (HBsAg)، سیگنال های الکتروشیمیایی با کاهش مواجه شد که به دلیل جایگزین شدن آنتی ژن طبیعی با آنتی ژن نشاندار شده با فروسن بود. در شرایط بهینه، حد تشخیص و محدوده خطی به ترتیب برای زیست حسگر معرفی شده ۷۳ پیکوگرم بر میلی لیتر و ۰/۰۱ تا ۳۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر بدست آمد.

نتیجه گیری: زیست حسگر طراحی شده در این مطالعه علاوه بر دارا بودن حد تشخیص پایین و محدوده خطی وسیع، از دقت، انتخاب پذیری، و حساسیت قابل قبولی برخوردار بود. از مزایای قابل توجه این زیست حسگر می توان به سادگی ساخت آن و پایداری سیگنال های الکتروشیمیایی حاصل اشاره کرد. ساختار این زیست حسگر به گونه ای است که می تواند به عنوان مدلی برای ساخت سایر زیست حسگرها بر پایه سنسورهای صفحه چاپی بکار رود.

کلمات کلیدی: آنتی ژن - هپاتیت B - زیست حسگر

فهرست مطالب

۱	ا	چکیده.....
		فهرست مطالب.....
		فهرست جداول.....
		فهرست شکل‌ها.....
		فهرست اختصارات.....
		۱ - فصل اول: مقدمه.....
۱		۱ - ۱ - ۱ - بیان مسئله و اهمیت موضوع.....
۱		۱ - ۲ - ۱ - بررسی متون.....
۱		۱ - ۲ - ۱ - هپاتیت.....
۲		۱ - ۲ - ۱ - هپاتیت B.....
۵		۱ - ۲ - ۱ - زیست حسگر.....
۷		۱ - ۲ - ۱ - انواع اصلاحگر یا پروب تشخیص بیولوژیکی.....
۷		۱ - ۲ - ۱ - ایمونوحسگرهای الکتروشیمیایی.....
۹		۱ - ۲ - ۱ - روش‌های تثیت آنتی بادی بر سطح الکترود.....
۱۰		۱ - ۲ - ۱ - روش‌های الکتروشیمیایی.....
۱۱		۱ - ۲ - ۱ - ولنامتری.....
۱۴		۱ - ۲ - ۱ - الکترود کار.....
۱۴		۱ - ۲ - ۱ - الکترودهای کربنی.....
۱۴		۱ - ۲ - ۱ - الکترود صفحه چاپی SPE.....
۱۹		۱ - ۲ - ۱ - نانومواد.....
۲۱		۱ - ۲ - ۱ - روش‌های مختلف طراحی شده برای اندازه‌گیری HBsAg.....
۲۶		۱ - ۳ - ۱ - اهداف پژوهه حاضر.....
۲۸		۲ - فصل دوم: مواد و روش‌ها.....
۲۸		۲ - ۱ - ۲ - معرفه مواد شیمیایی.....
۲۹		۲ - ۲ - دستگاه‌های.....
۲۹		۲ - ۳ - ۲ - تهیه محلول‌ها.....
۲۹		۲ - ۳ - ۲ - محلول HBsAg.....
۳۰		۲ - ۳ - ۲ - محلول Ab.....
۳۰		۲ - ۳ - ۲ - تهیه سوپسپانسیون MWCNT.....
۳۰		۲ - ۴ - تهیه زیست حسگر.....

۳۰.....MWCNT-SPE تهیه ۱ - ۴ - ۲
۳۰.....Ab-MWCNT-SPE تهیه الکترود ۲ - ۴ - ۲
۳۱.....Ab/BSA-MWCNT-SPE تهیه الکترود ۳ - ۴ - ۲
۳۱.....HBsAg*-Ab/BSA-MWCNT-SPE تهیه زیست حسگر ۴ - ۴ - ۲
۳۱.....HBsAg*-Ab/BSA-MWCNT-SPE اندازه گیری HBsAg توسط زیست حسگر ۵ - ۲
۳۲.....اندازه گیری های ولتاوی پالس تفاضلی (DPV) ۶ - ۲
۳۲.....اندازه گیری های ولتاوی چرخه ای ۷ - ۲
۳۲.....HBsAg* تهیه ۱ - ۷ - ۲
۳۲.....طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (EIS) ۸ - ۲
۳۳.....آماده سازی نمونه های حقیقی ۹ - ۲
۳ - فصل سوم: نتایج و بحث.....	
۳۵.....مطالعه رفتار طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (EIS) حسگر ۱ - ۱ - ۳
۳۶.....بررسی رفتار زیست حسگر طراحی شده به روش ولتاوی چرخه ای ۱ - ۲ - ۳
۳۹.....مطالعه تاثیر سرعت روی پتانسیل بر روی اکسیداسیون فروسن ۱ - ۳
۴۲.....بررسی رفتار زیست حسگر طراحی شده به روش ولتاوی پالس تفاضلی ۱ - ۴ - ۳
۴۵.....آنالیز تفرق دینامیکی نور HBsAg* و HBsAg ۱ - ۵ - ۳
۴۶.....نمودار معیار گیری و تعیین حد تشخیص HBsAg توسط زیست حسگر ۱ - ۷ - ۳
۴۸.....مطالعه اثر گونه های مزاحم در زیست حسگر ۱ - ۸ - ۳
۵۶.....HBsAg*-Ab/BSA-MWCNT-SPE از HBsAg* در نمونه های حقیقی توسط زیست حسگر ۱ - ۹ - ۳
۵۷.....HBsAg*-Ab/BSA-MWCNT SPE اندازه گیری HBsAg در نمونه های حقیقی توسط زیست حسگر ۱ - ۱ - ۳
۵۹.....بررسی پایداری و تکرار پذیری زیست حسگر ۱ - ۱ - ۳
۶۰.....مقایسه حسگرهای گزارش شده با زیست حسگر مورد مطالعه ۱ - ۱ - ۳
۶۲.....نتیجه گیری ۲ - ۲ - ۳
۶۳.....پیشنهادات ۳ - ۳
۶۴.....منابع ۴
i.....Abstract

فهرست جداول

جدول ۱-۲: مشخصات مواد شیمیایی به کار رفته.....	۲۸
جدول ۱-۳: مدارهای معادل نمودار EIS و پارامترهای جفت‌سازی برای تمام الکترود های تهیه شده در مراحل ساخت زیست حسگر.....	۳۹
جدول ۲-۳: داده‌های حاصل از آنالیز HBsAg در نمونه‌ی سرم توسط زیست حسگر طراحی شده و الیزا.....	۶۰
جدول ۳-۳: مقایسه زیست حسگر مورد مطالعه HBsAg با سایر حسگر های الکتروشیمیایی گزارش شده.....	۶۱

فهرست شکل‌ها

..... ۴	شکل ۱-۱: ساختار کلی ویروس هپاتیت B
..... ۶	شکل ۲-۱: اجزای مختلف یک زیست حسگر
..... ۱۰	شکل ۳-۱: انواع ایمونوحسگرهای الکتروشیمیایی (A) عاری از برچسب و (B) متنی بر برچسب
..... ۱۳	شکل ۴-۱: نمودار پتانسیل-زمان (A) و جریان-پتانسیل (B) در ولتامتری پالس تفاضلی
..... ۱۳	شکل ۵-۱: نمودار پتانسیل-زمان (چپ) و جریان-پتانسیل (راست) در ولتامتری چرخه‌ای
..... ۱۶	شکل ۶-۱: (A) اجزای یک SPE سه الکترودی (B) ساختار یک SPE با الکترودهای مرجع و کمکی و ۱۶ الکترود کار (C) سه الکترودی با جنس‌های مختلفی (طلاء، کربن، نقره) از الکترود کار (D) SPE با الکترودهای مرجع و کمکی و ۲ الکترود کار (E) SPE با یک الکترود کمکی و ۸ الکترود کار (سمت چپ) (F) مقایسه اندازه SPE ای متعارف با اندازه سکه نمونه‌های دیگر از SPE‌های تجاری در اشکال، اندازه‌ها و تعداد الکترودهای مختلف
..... ۱۹ [۲۰]
..... ۲۴	شکل ۷-۱: شماتیک از الکترودهای مرجع چاپی [۲۰]
..... ۲۵	شکل ۸-۱: ایمونوحسگر الکتروشیمیایی با سیستم ساندویچی برای سنجش آنتی ژن سطح هپاتیت (HBsAg) [۴۵]
..... ۲۶	شکل ۹-۱: ایمونوحسگر الکتروشیمیایی با سیستم ساندویچی برای سنجش آنتی ژن سطح هپاتیت B (HBsAg) [۴۶]
..... ۲۶	شکل ۱۰-۱: ایمونوحسگر الکتروشیمیایی بر پایه چیتوسان اصلاح شده با فروسن برای سنجش آنتی ژن سطح هپاتیت B (HBsAg) [۱]
..... ۳۶	شکل ۱-۳: شماتیک مراحل ساخت زیست حسگر و نحوه عملکرد آن
..... ۴۰	شکل ۲-۳: (A) آنالیز EIS و نمودار نایکوئیست برای SPE، (b) MWCNT-SPE، (c) Ab-MWCNT-SPE، (d) Ab/BSA-MWCNT-SPE، (e) HBsAg*-Ab/BSA-MWCNT-SPE و (f) PBS با pH = ۷/۰ برای محلول حاوی K ₃ [Fe(CN) ₆] ۰/۵ mM و K ₄ [Fe(CN) ₆] ۰/۱ M مولار KCl در بافر PBS ۰/۰۱ M با pH = ۷ مدار معادل برای (B) MWCNT-SPE و (C) سایر الکترود ها. (D) نمودار بُد مدول برای SPE (a) و (b) SPE
..... ۴۰	شکل ۳-۱: ولتاژگرام‌های چرخه‌ای SPE (a) MWCNT-SPE، (b) Ab-MWCNT-SPE، (c) Ab/BSA-MWCNT-SPE و (d) PBS با pH = ۷/۰ برای محلول M PBS ۰/۰۱ با pH = ۷/۰
..... ۴۱	شکل ۳-۲: واکنش الکتروشیمیایی فروسن
..... ۴۲	شکل ۳-۳: ولتاژگرام‌های چرخه‌ای SPE (a) MWCNT-SPE، (b) Ab-MWCNT-SPE، (c) Ab/BSA-MWCNT-SPE و (d) PBS با pH = ۷/۰ برای محلول K ₃ [Fe(CN) ₆] ۰/۵ mM و K ₄ [Fe(CN) ₆] ۰/۰۱ M
..... ۴۴	شکل ۳-۴: ولتاژگرام چرخه‌ای PBS با pH = ۷/۰ در سطح الکترود (A) در سرعت روبش پتانسیل مختلف از ۱۰ mV/s تا ۱۵۰ mV/s (B) HBsAg-Ab/BSA-MWCNT-SPE
..... ۴۵	شکل ۳-۵: نمودار تغییرات جریان دماغه آندی بر حسب سرعت روبش (A و C) و جذر سرعت روبش (B و D) در سطح الکترود (C) HBsAg-Ab/BSA-MWCNT-SPE (B) و (B A) HBsAg*-Ab/BSA-MWCNT-SPE
..... ۴۶	شکل ۳-۶: ولتاژگرام‌های پالس تفاضلی MWCNT-SPE شناور در محلول PBS ۰/۰۱ M در سطح الکترود-Ab/BSA (c) HBsAg-Ab/BSA-MWCNT-SPE (b) HBsAg*-Ab/BSA-MWCNT-SPE (a) MWCNT-SPE در غیاب و در حضور Ag HbsAg با غلظت ۱۰۰ ng.mL ⁻¹
..... ۴۸	شکل ۳-۷: آنالیز تفرق دینامیکی نور (DLS) برای (A) HBsAg و (B) HBsAg*

شکل ۱۱-۳: (A) ولتاوگرام‌های پالس تفاضلی MWCNT-SPE اصلاح شده با مقادیر مختلف از اصلاح‌گر MWCNT (ترسیب ۰/۵ mM) با غلظت 1 mg mL^{-1} ۱ شناور در محلول حاوی $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ در $0/01 \text{ M PBS}$ با (B) تغییرات جریان پیک نسبت به مقادیر مختلف از اصلاح‌گر MWCNT (تعداد تکرار = ۳) ۵۰

شکل ۱۲-۳: (A) تغییرات مقادیر R_{ct} حاصل از EIS برای Ab-MWCNT-SPE در محلول حاوی $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] 0/5 \text{ mM}$ و $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] 0/1 \text{ M}$ در بافر KCl با $\text{pH} = 7$ برای غلظت‌های مختلف از آنتی‌بادی ترسیب شده ۵۱ (تعداد تکرار = ۳) ۶۰

شکل ۱۳-۳: (A) تغییرات مقادیر R_{ct} حاصل از EIS برای Ab-MWCNT-SPE در محلول حاوی $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] 0/5 \text{ mM}$ و $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] 0/1 \text{ M}$ در بافر KCl با $\text{pH} = 7$ برای مدت زمان‌های مختلف انکوباسیون با BSA ۵۲ (تعداد تکرار = ۳) ۵۲

شکل ۱۴-۳: (A) ولتاوگرام‌های پالس تفاضلی HBsAg*-Ab/BSA-MWCNT-SPE در محلول $0/01 \text{ M PBS}$ با $\text{pH} = 7$ برای مدت زمان‌های مختلف انکوباسیون با HBsAg^* (تعادل تکرار = ۳) ۵۴ (B) تغییرات جریان پیک نسبت به زمان‌های مختلف انکوباسیون (تعادل تکرار = ۳) ۱۲۰ و ۱۵۰

شکل ۱۵-۳: (A) ولتاوگرام‌های پالس تفاضلی HBsAg*-Ab/BSA-MWCNT-SPE در محلول حاوی HbsAg با غلظت 100 ng mL^{-1} و $0/01 \text{ M PBS}$ با $\text{pH} = 7$ برای مدت زمان‌های مختلف انکوباسیون با HbsAg ۵۵ (B) تغییرات جریان پیک نسبت به زمان‌های مختلف انکوباسیون (تعادل تکرار = ۳) ۱۵۰

شکل ۱۶-۳: (A) ولتاوگرام‌های پالس تفاضلی HBsAg*-Ab/BSA-MWCNT-SPE در محلول حاوی $0/01 \text{ M PBS}$ با $\text{pH} = 7$ و HbsAg با غلظت مختلف (1 ng mL^{-1}) ۵۸ (B) تغییرات جریان پیک نسبت غلظت HbsAg (تعادل تکرار = ۳) ۶۰ ۶۰ min انکوباسیون ۱۷-۳: اثر مزاحمت 500 ng mL^{-1} آلبومین (ALB)، بتا-۲-میکروگلوبین (B2M)، اوره (Urea)، یون سدیم (Na^+)، یون پتاسیم (K^+) و سدیم لاکتات (SL) و 100 ng mL^{-1} HBsAg محلول در بافر $0/01 \text{ M PBS}$ با $\text{pH} = 7$ ۵۹

فهرست اختصارات

نام اختصار	معادل انگلیسی	معادل فارسی
Ab	Antibody	آنتی بادی
HBsAg	Hepatitis B virus surface antigen	آنتی ژن سطحی هپاتیت B
C _{dl}	Double-layer capacitance	ظرفیت لایه دو گانه الکتریکی
CV	Cyclic voltammetry	ولتاومتری چرخه ای
DLS	Dynamic light Scattering	تفرق نور دینامیک
DPV	Differential pulse voltammetry	ولتاومتری پالس تفاضلی
EIS	Electrochemical impedance spectroscopy	طیف سنجی امپدانس الکتروشیمی
BSA	Bovine serum albumin	آلبومن سرم گاوی
MWCNT	Multi-walled carbon nanotubes	نانولوله های کربنی چند دیواره
PBS	Phosphate buffered saline	بافر فسفات
R _{CT}	Charge transfer resistance	مقاومت انتقال بار
R _S	Solution resistance	مقاومت محلول
SPE	Screen-Printed Electrode	الکترود صفحه چاپی
Zw	Warburg impedance	امپدانس واربرگ
*	Ferrocene	فرروسن