بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت اخذ دکترای عمومی داروسازی

عنوان

تهیه و مشخصه یابی زیست حسگر نانو ذرات طلا برای شناسایی نشانگر NSE به روش زیست حسگر نوری

اساتید راهنما

دکتر محمد جوهری اهر

دکتر حسن قبادی مراللو

استاد مشاور

دکتر پری کرمی

پژوهشگر

ابوالفضل خاکزاد

شماره پایان نامه

د-۱۰۳ ۱۴۰۰/۹

آذر ۱۴۰۰

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم که بستر پیمودن این راه را هموار کردند و هیچگاه در تشویق به آموختن کوتاهی نکردند.

تقدیر و تشکر :

به نام خداوند متعال و سپاس از هر آنچه نعمت بیکران که بهره‌مندم ساخته است.

در اینجا بر خود لازم دانسته که نهایت سپاس و قدردانی را نسبت به تمام عزیزانی که در انجام این پروژه از راهنمایی-ها و مساعدت‌های با ارزش آنان اعم از استادان محترم دانشگاه و بیمارستان و مدیران، و همچنین عزیزانی که از حمایت‌های معنوی آن‌ها، بهره‌مند بوده‌ام، ابراز نموده و توفیق روزافزونشان را از درگاه احدیت آرزو نمایم.

به‌خصوص از مساعدت‌های بی‌شائبه‌ی اساتید گرامی **جناب آقای دکتر محمد جوهری اهر** و **دکتر حسن قبادی مراللو** قبول زحمت هدایت این مهم کمال سپاس و امتنان را دارم.

چکیده

مقدمه: انولاز اختصاصی نورون (NSE) نشانگر ترجیحی برای نظارت بر سرطان ریه سلول های کوچک و نوروبلاستوما است. در این پروژه یک زیست حسگر فوق حساس برپایه الکتروکمی-لومینسانس (ECL) برای سنجش NSE طراحی گردیده است.

روش کار: این زیست حسگر "از یک نانوسیستم که شامل لیپوزوم حاوی گلوکز و نانوذرات مغناطیسی می باشد و همچنین از یک حسگر که بر پایه الکترود صفحه چاپی اصلاح شده با نانوذرات طلا، نانولوله های کربنی چند دیواره، آنزیم گلوکز اکسیداز و پلی لومینول" تشکیل شده است. قسمت نانوسیستم برای جداسازی NSE از محلول نمونه است و قسمت دیگر حسگر اندازه گیری سیگنال ECL است.در ساخت بخش نانو سیستم از آنتی بادی های مونوکلونال استفاده شده است که حساسیت روش را بالا می برد.در ساخت الکترود صفحه چاپی هم از نانو ذرات طلا و همچنین نانو لوله های کربنی چند دیواره استفاده شده است.از نانوسیستم برای جداسازیNSE از محلول نمونه استفاده می کنیم و بعد از جداسازی و تبدیل سیگنال بیوشیمیایی به سیگنالی که توسط الکترود صفحه چاپی قابل شناسایی باشد میزان سیگنال ECL را اندازه می گیریم.

یافته ها: نتایج نشان داد که این زیست حسگر دارای حساسیت و تکرار پذیری و انتخاب پذیری و دقت بالا، ثبات رضایت بخش، حد تشخیص پایین ($۱/۲۸\times۱۰^{-۵}$ $ng.mL^{-1}$) و محدوده خطی وسیع (۰/۰۰۰۱ تا $ng.mL^{-1}$ ۱۰۰) است.

نتیجه گیری: خصوصیات عملکرد آنالیز نمونه واقعی نشان می دهد که این زیست حسگر دارای عملکرد قابل توجه و پتانسیل بالایی در تشخیص بالینی آینده است و بستر بالقوه امیدوار کننده ای برای تشخیص زودهنگام سرطان ریه را فراهم می‌کند.

کلید واژه ها: زیست حسگر، زیست نشانگر NSE، الکتروکمی لومینسانس، پلی لومینول، لیپوزوم

فهرست مطالب

چکیده ..... أ
فهرست مطالب ..... ب
فهرست جداول ..... د
فهرست شکل‌ها ..... ج
فهرست اختصارات ۱
۱-فصل اول: بررسی منابع ۲
۱-۱-سرطان ریه و نشانگرهای زیستی آن ۲
۱-۲-انولاز اختصاصی نورون (NSE) ٤
۱-۳-زیست حسگر ٥
۱-۳-۱-انواع پروب تشخیص بیولوژیکی ۷
۱-۳-۲-آنتی بادی ۸
۱-۳-۳-روش های تثبیت اجزای بیولوژیکی ۹
۱-٤-استفاده از نانومواد در ساخت زیست حسگر ها ۱۰
۱-٥-لیپوزوم ۱۲
۱-٥-۱-طبقه‌بندی لیپوزوم‌ها ۱٤
۱-٥-۲-روش‌های سنتز لیپوزوم‌ها ۱٦
۱-٦-زیست حسگر های بر پایه الکتروکمی لومینسانس ۱۷
۱-٦-۱-مزایای ECL ۱۸
۱-٦-۲-معایب ECL ۱۹
۱-٦-۳-انواع روش های ECL ۱۹
۱-۷-مروری بر برخی زیست حسگر های الکتروکمی لومینسانس گزارش شده برای اندازه گیری NSE ۲۰
۱-۸-هدف از تحقیق حاضر ۲۳
۲-فصل دوم: مواد و روش‌ها ۲٦
۲-۱-معرف‌ها و مواد شیمیایی ۲٦
۲-۲-دستگاهها ۲۸
۲-۳-تهیه نانوذرات مغناطیسی Fe3O4 اصلاح شده با آنتی بادی (Ab1-F3O4) ۲۹
۲-٤-تهیه لیپوزوم های حاوی گلوکز اصلاح شده با آنتی بادی (Glu@LP-Ab2) ۳۰
۲-٥-سنتز نانوذرات طلا ۳۱
۲-٦-تهیه زیست حسگر PLu-GOx-MW-Au-SPE ۳۲
۲-۷-جداسازی NSE از محلول نمونه توسط نانوسیستم Ab1-F3O4 و Glu@LP-Ab2 ..... ۳۳

۲-۸-انجام آزمایش ECL و اندازه گیری محلول گلوکز جدا شده توسط نانو سیستم توسط حسگر PLu-GOx-MW-Au-SPE ۳۳
۲-۹-ملاحظات اخلاقی ۳٤
۳-فصل سوم: نتایج و بحث ۳٦
۳-۱-مطالعه رفتار حسگر PLu-GOx-MW-Au-SPE به روش ولتامتری چرخه‌ای ۳۹
۳-۲-پلیمریزاسیون الکتروشیمیایی لومینول ٤۰
۳-۳-مطالعه رفتار حسگر PLu-GOx-MW-Au-SPE به روش الکتروکمی لومینسانس ٤۲
۳-٤- مطالعه رفتاراسپکتروسکوپی امپدانس الکتروشیمیایی حسگر طراحی شده PLu-GOx-MW-Au-SPE ٤۸
۳-۵-مطالعه رفتار نانوسیستم Ab1-F3O4 و Glu@LP-Ab2 توسط اسپکتروسکوپی UV-Vis ۵۰
۳-٦-بررسی اندازه نانوسیستم Ab1-F3O4 و Glu@LP-Ab2 توسط DLS ۵۲
۳-۷-بهینه سازی پارامترهای مختلف موثر بر روی عملکرد زیست حسگر ۵۲
۳-۷-۱-تاثیر pH بر فعالیت و پایداری آنزیم گلوکز اکسیداز و نشر ECL پلی لومینول ۵٤
۳-۷-۲-بهینه‌سازی حجم نانوذرات طلا برای اصلاح سطح حسگر ۵۵
۳-۷-۱-بهینه‌سازی مقدار MW برای اصلاح سطح حسگر ۵۵
۳-۷-۲-بهینه‌سازی مقدار آنزیم گلوکز اکسیداز برای اصلاح سطح حسگر ۵۷
۳-۷-۳-بهینه‌سازی تعداد روبش پتانسیل چرخه ای اعمال شده برای سنتز الکتروشیمیایی پلی لومینول..... ۵۷
۳-۷-۱-بهینه سازی مدت زمان انجام حمام فراصوت برای سنتز لیپوزوم حاوی گلوکز ۵۸
۳-۷-۲-بهینه سازی مدت زمان انکوباسیون NSE با Ab1-F3O4 و Glu@LP-Ab2 ..... ۵۹
۳-۸-منحنی کالیبراسیون و تعیین حد تشخیص زیست حسگر طراحی شده ٦۰
۳-۹-مطالعه اثر گونه‌های مزاحم در زیست حسگر طراحی شده ٦۳
۳-۱۰-اندازه گیری NSE در نمونه‌های حقیقی توسط زیست حسگر طراحی شده ٦۳
۳-۱۱-بررسی پایداری و تکرارپذیری زیست حسگر طراحی شده ٦۵
۳-۱۲-مقایسه زیست حسگر طراحی شده با حسگر های گزارش شده برای NSE ٦۵
٤-فصل چهارم:نتیجه گیری و پیشنهادات..... ٦۸
٤-۱-نتیجه‌گیری ٦۹
٤-۲-پیشنهادهایی برای ادامه این کار پژوهشی ۷۰
منابع ۷۱
Abstract i

فهرست جداول

جدول ۲-۱مشخصات مواد شیمیایی به کار رفته. ۲۶
جدول ۳-۱: داده‌های حاصل از آنالیز NSE در نمونه‌های حقیقی توسط زیست حسگر طراحی شده و ELISA. ٦٤
جدول ۳-۲: مقایسه زیست حسگر مورد مطالعه با سایر زیست حسگرهای ECL گزارش شده برای NSE. ٦٦

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱: ساختار سه بعدی آنزیم NSE. ۵
شکل ۱-۲: اجزای مختلف یک زیست حسگر [۱۱]. ٦
شکل ۱-۳: ساختار کلی آنتی بادی. ۸
شکل ۱-٤: اندازه نسبی ذرات در مقیاس نانو در مقایسه با مولکولهای دیگر ۱۰
شکل ۱-۵: شکلهای مختلف نانوذرات که تاکنون ساخته شده اند. ۱۱
شکل ۱-٦: نمای شماتیک از لیپوزوم [۲۲]. ۱۳
شکل ۱-۷: تفاوت ساختمان میسل و لیپوزوم [۲۳]. ۱٤
شکل ۱-۸: طبقه‌بندی لیپوزوم‌ها براساس اندازه [۲٤]. ۱۵
شکل ۱-۹:انواع لیپوزوم‌ها براساس ماهیت و عملکرد [۲۵]. ۱٦
شکل ۱-۱۰:انواع روش های ECL. ۲۰
شکل ۱-۱۱: زیست حسگر گزارش شده برای سنجشNSE به روش ECL [۲۸]. ۲۱
شکل ۱-۱۲: زیست حسگر گزارش شده برای سنجشNSE به روش ECL [۲۹]. ۲۲
شکل ۱-۱۳: زیست حسگر گزارش شده برای سنجشNSE به روش ECL [۳۰]. ۲۳
شکل ۱-۱٤: شمای کلی از مراحل مختلف ساخت زیست حسگر NSE. مراحل تهیه نانوسیستم (A) لیپوزوم حاوی گلوکز و (B) نانوذرات مغناطیسی. (C) مراحل جداسازی NSE توسط نانوسیستم. (D) مراحل تهیه و عملکرد حسگر بر پایه الکترود صفحه چاپی(SPE) اصلاح شده با نانوذرات طلا، نانولوله های کربنی چند دیواره، آنزیم گلوکز اکسیداز و پلی لومینول. ۲٤
شکل ۳-۱: مراحل تهیه Ab_1-F_3O_4. ..... ۳۷
شکل ۳-۲: مراحل تهیه $Glu@LP\text{-}Ab_2$. ۳۷
شکل ۳-۳: عملکرد نانوسیستم Ab_1-F_3O_4 و $Glu@LP\text{-}Ab_2$ برای جداسازی NSE از محلول نمونه. ۳۷
شکل ۳-٤: مراحل ساخت و عملکرد حسگر PLu-GOx-MW-Au-SPE. ۳۹
شکل ۳-۵: ولتاموگرام‌های چرخه‌ای SPE (a)، Au-SPE (b)، MW-Au-SPE (c)، GOx-MW-Au-SPE (d) و PLu-GOx-MW-Au-SPE (e) برای محلول PBS ۰/۰۱ M با pH = ٦/۲، با سرعت روبش ۱۰۰mV/s در غیاب (A) و حضور ۱۰۰ µM (B) گلوکز. ٤۰
شکل ۳-٦: فرآیند پلیمریزاسیون لومینول به صورت الکتروشیمیایی [۳۵]. ٤۱
شکل ۳-۷: ولتاموگرام‌های چرخه‌ای GOx-MW-Au-SPE برای محلول PBS ۰/۰۱ M با pH = ٦/۲ حاوی لومینول با غلظت ۱۰۰ µM با سرعت روبش ۱۰۰mV/s و در طول پلیمریزاسیون پلی لومینول و در طی ۱۵ چرخه متوالی (منحنی سبز و قرمز به ترتیب چرخه اول و چرخه آخر را نشان می دهند). ٤۲
شکل ۳-۸: مکانیسم ECL پیشنهادی برای پلی لومینول بر روی زیست حسگر طراحی شده. ٤٤

شکل ۳-۹: منحنی های چرخه ای الکتروکمی لومینسانسSPE (a)، Au-SPE (b)، MW-Au-SPE (c)، GOx-MW-Au-SPE (d) و PLu-GOx-MW-Au-SPE (e) برای محلول PBS ۰/۰۱ M با ٦/۲ = pH، با سرعت روبش ۱۰۰mV/s. ٤٤

شکل ۳-۱۰: منحنی های چرخه ای الکتروکمی لومینسانس SPE (a)، Au-SPE (b)، MW-Au-SPE (c)، GOx-MW-Au-SPE (d)، PLu-GOx-SPE (e)، PLu-GOx-Au-SPE (f)، PLu-GOx-MW-SPE (g) و PLu-GOx-MW-Au-SPE (h) برای محلول PBS ۰/۰۱ M با ٦/۲ = pH حاوی ۱۰۰ µM گلوکز، با سرعت روبش ۱۰۰mV/s. ٤٦

شکل ۳-۱۱: منحنی های ECL برحسب زمان SPE (a)، Au-SPE (b)، MW-Au-SPE (c)، GOx-MW-Au-SPE (d)، PLu-GOx-SPE (e)، PLu-GOx-Au-SPE (f)، PLu-GOx-MW-SPE (g) و PLu-GOx-MW-Au-SPE (h) برای محلول PBS ۰/۰۱ M با ٦/۲ = pH حاوی ۱۰۰ µM گلوکز، با سرعت روبش ۱۰۰mV/s. ٤٧

شکل ۳-۱۲: منحنی های چرخه ای الکتروکمی لومینسانس MW-Au-SPE (a) برای محلول PBS ۰/۰۱ M با ٦/۲ = pH حاوی ۱۰۰ µM، ۵ $\mu g.mL^{-1}$گلوکز اکسیداز و ۱۰۰ µM لومینول و PLu-GOx-MW-Au-SPE (b) برای محلول PBS ۰/۰۱ M با ٦/۲ = pH حاوی ۱۰۰ µM گلوکز، با سرعت روبش ۱۰۰mV/s. ٤٨

شکل ۳-۱۳: نمودار نایکوئیست EIS برای Au-SPE (a)، Au-SPE (b)، MW-Au-SPE (c)، GOx-MW-Au-SPE (d) و PLu-GOx-MW-Au-SPE (e) شناور در محلول حاوی ۰/۵ mM $K_4[Fe(CN)_6]$ و $K_3[Fe(CN)_6]$ و KCl ۰/۱ M در بافر PBS ۰/۱ M با pH = ۷. ..... ۵۰

شکل ۳-۱٤: طیف جذبی UV-Vis برای DPPC (A) (a)، کلسترول(b)، گلوکز(c)، لیپوزوم حاوی گلوکز (d) و لیپوزوم اصلاح شده با آنتی بادی (e)، Fe_3O_4 (B) (a)، Ab_1-Fe_3O_4 (b)، (NSE)-Ab_1-Fe_3O_4 (c) و Glu@LP-Ab_2-(NSE)-Ab_1-Fe_3O_4 (d). ۵۱

شکل ۳-۱۵: آنالیز DLS برای Ab_1-Fe_3O_4 (A)، Glu@LP-Ab_2 (B) و Glu@LP-Ab_2-(NSE)-Ab_1-Fe_3O_4 (C). ۵۳

شکل ۳-۱٦: تغییرات شدت ECL الکترود PLu-GOx-SPE تهیه شده در حضور ۱۰۰ µM گلوکز با تغییر pH (٤، ..... ۵، ۵/۲، ۵/٤، ۵/٦، ۵/۸، ٦، ٦/۲، ٦/٤، ٦/٦، ٦/۸، ۷ و ۸) (تعداد تکرار = ۳). ۵۵

شکل ۳-۱۷: تغییرات شدت ECL الکترود PLu-GOx-Au-SPE تهیه شده در حضور ۱۰۰ µM گلوکز برای حجم‌های مختلف از نانوذرات طلا ترسیب شده (۰، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱٤ µL) (تعداد تکرار = ۳). ۵٦

شکل ۳-۱۸: تغییرات شدت ECL الکترود PLu-GOx-MW-Au-SPE تهیه شده در حضور ۱۰۰ µM گلوکز برای مقادیر مختلف از نانوذرات طلا ترسیب شده (۰، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱٤ µg) (تعداد تکرار = ۳). ۵٦

شکل ۳-۱۹: تغییرات شدت ECL الکترود PLu-GOx-MW-Au-SPE تهیه شده در حضور ۱۰۰ µM گلوکز برای مقادیر مختلف از آنزیم گلوکز اکسیداز ترسیب شده (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ ng) (تعداد تکرار = ۳). ۵۷

شکل ۳-۲۰: تغییرات شدت ECL الکترود PLu-GOx-MW-Au-SPE تهیه شده در حضور ۱۰۰ µM گلوکز برای تعدادهای مختلف روبش اعمال شده برای سنتز پلی لومینول (۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰ و ۲۱) (تعداد تکرار = ۳). ۵۸

شکل ۳-۲۱: تغییرات شدت ECL الکترود PLu-GOx-MW-Au-SPE برای محلول ۰/۰۱ M PBS با ۶/۲ = pH حاوی گلوکز حاصل از انکوباسیون نانوسیستم $Glu@LP-Ab_2$ و $Ab1-Fe_3O_4$ با $1\ ng.mL^{-1}$ NSE برای زمان های مختلف اعمال حمام فراصوت برای سنتز لیپوزوم (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ min) (تعداد تکرار = ۳). ۵۹

شکل ۳-۲۲: تغییرات شدت ECL الکترود PLu-GOx-MW-Au-SPE برای محلول ۰/۰۱ M PBS با ۶/۲ = pH حاوی گلوکز حاصل از اعمال زمان های مختلف انکوباسیون نانوسیستم $Glu@LP-Ab_2$ و $Ab1-Fe_3O_4$ با $1\ ng.mL^{-1}$ NSE (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ min) (تعداد تکرار = ۳). ۶۰

شکل ۳-۲۳: (A) منحنی های ECL بر حسب زمان الکترود PLu-GOx-MW-Au-SPE برای محلول ۰/۰۱ M PBS با ۶/۲= pH حاوی گلوکز حاصل از انکوباسیون نانوسیستم $Glu@LP-Ab_2$ و $Ab1-Fe_3O_4$ با غلظت های مختلف (۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵، ۱۰، ۵۰ و $100\ ng.mL^{-1}$) NSE. (B) منحنی کالیبراسیون لگاریتمی حاصل(تعداد تکرار = ۳). ۶۲

شکل ۳-۲۴: منحنی های ECL بر حسب زمان برای نمونه بالانک (بافر PBS به غلظت ۰/۰۱ M با ۶/۲ = pH) توسط حسگر PLu-GOx-MW-Au-SPE با ۵ بار روبش چرخه ای پتانسیل در محدوده ۰ تا ۰/۶ V. ۶۳

شکل ۳-۲۵: مطالعه اثر مزاحمت و سیگنال ECL ثبت شده توسط زیست حسگر طراحی شده برای $ng.ml^{-1}$ Myo۱۰۰۰ و $ng.ml^{-1}$ ۱۰ PSA، CEA، VEGF وEGFR، $ng.ml^{-1}$ ۱۰۰ COR و HSA و $1\ ng.ml^{-1}$ NSE. ۶۴

شکل ۳-۲۶: منحنی های ECL بر حسب زمان برای $1\ ng.ml^{-1}$ NSE توسط زیست حسگر طراحی شده با ۱۶ بار روبش چرخه ای پتانسیل در محدوده ۰ تا ۰/۶ V. ۶۵

فهرست اختصارات

نام اختصار	معادل انگلیسی	معادل فارسی
Ab	Antibody	آنتی بادی
AuNPs و یا Au	Gold Nanoparticles	نانوذرات طلا
DLS	Dynamic light Scattering	پراکندگی دینامیکی نور
ECL	Electrochemiluminescence	الکتروکمی لومینسانس
Glu	Glucose	گلوکز
GOx	Glucose oxidase	گلوکز اکسیداز
LP	Liposome	لیپیوزوم
MWCNT و یا MW	Multi-walled carbon nanotubes	نانولوله‌های کربنی چند دیواره
NSE	Neuron specific enolase	انولاز اختصاصی نرون
PLu	Polyluminol	پلی لومینول
SPE	Screen printed electrode	الکترود صفحه چاپی