بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان‌نامه جهت دریافت دکتری عمومی داروسازی

عنوان

ساخت و استفاده از زیست حسگر فوتوالکتروشیمیایی در شناسایی تومرمارکر CA19-9

استاد راهنما:

دکتر محمد جوهری

نگارش:

دانیال غلامین

اسفند ۱۴۰۰

شماره پایان نامه: د-۱۱۳

تقدیم:

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به مادرم، دریای بی کران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر.

تشکر و قدردانی :

از استاد راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر محمد جوهری که وجودشان همیشه قوتی برای انجام کارهایم بوده است و بی شک انجام این پایان نامه بدون کمک و راهنمایی های ارزنده ایشان امکان پذیر نبوده است، کمل تشکر و قدردانی را دارم.

چکیده

مقدمه: CA19-9 به طور منظم در بیماران مبتلا به سرطان لوزالمعده اندازه گیری می شود. مطمئناً، پتانسیل آن به عنوان بیومارکر با نتایج منفی کاذب در بیماران منفی CA19-9 و نتایج مثبت کاذب در بیماریهای خوش خیم لوزالمعده – صفراوی به خطر افتاده است. سطح سرمی CA19-9 می تواند اطلاعات مهمی را در رابطه با پیش آگهی، بقای کلی و پاسخ به شیمی درمانی و همچنین پیش بینی عود بعد از عمل فراهم کند. یکی از ابزارهای قدرتمند در تشخیص مقادیر خیلی پایین CA19-9، استفاده از زیست حسگرها می باشد. در این میان زیست حسگرهای فوتو الکتروشیمیایی به دلیل پایداری بالا، سهولت در ساخت و قابلیت پیاده سازی در مصارف بالینی از اهمیت خاصی برخوردار هستند.

روش کار: در این مطالعه پروژه ابتدا اقدامات لازم برای طراحی یک حسگر مناسب انجام گردید (شکل ۳–۱، پنل A) که در آن سطح الکترود صفحه چاپی (SPE) با نانوذرات طلا (AuNP) و آنتی‌بادی اولیه CA19-9 (Ab_1) اصلاح گردید. در ادامه این پروژه اقدامات لازم برای طراحی نانوذرات SnSe با خواص فوتوالکتروشیمیایی مناسب که اطراف آن به صورت ساختار پوسته@هسته طلا پوشش داده شده (SnSe@Au) انجام گردید. سپس سطح SnSe@Au توسط آنتی‌بادی ثانویه CA19-9 (Ab_2) اصلاح شد. الکترود تهیه شده Ab_1-AuNP-SPE ابتدا با محلول CA19-9 سپس با نانوذرات $SnSe@Au-Ab_2$ انکوبه گردید تا الکترود $SnSe@Au-Ab_2$-(CA19-9)-Ab_1-AuNP-SPE حاصل گردد. سیگنال فوتوالکتروشیمیایی الکترود حاصل در حضور زوج ردوکس $Fe(CN)_6^{-4/-3}$ ثبت گردید.

نتایج و نتیجه‌گیری: زیست حسگر طراحی شده برای CA19-9 دارای حد تشخیص $U.mL^{-1}$ $۹/۷\times۱۰^{-٤}$ و محدوده خطی ۰/۰۰۱ تا $U.mL^{-1}$ ۱۰۰ می باشد. 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 لوزالمعده را فراهم می‌کند.

کلید واژه ها: زیست حسگر، فوتوالکتروشیمیایی، بیومارکر، نانوذرات

فهرست مطالب

چکیده ..... أ
فهرست مطالب ..... ب
فهرست جداول ..... ج
فهرست شکل‌ها ..... ح
فهرست اختصارات ۲
۱ – فصل اول: مقدمه ۱
۱ – ۱ – سرطان لوزالمعده ۱
۱ – ۲ – بیومارکر ca19-9 ..... ۲
۱ – ۳ – زیست حسگرها ٤
۱ – ۳ – ۱ – بیورسپتور های مورد استفاده در زیست حسگر ها ۷
۱ – ۳ – ۲ – طبقه بندی زیست حسگرها ۸
۱ – ۳ – ۳ – نانومتریال های کاربردی در حسگرها ۱۳
۱ – ۳ – ٤ – زیست حسگرهای فوتوالکتروشیمیایی ۲۰
۱ – ٤ – مطالعات پیشین انجام شده برای تشخیص ca19-9 ..... ۲۲
۱ – ٥ – هدف از تحقیق حاضر ۲٥
۲ -فصل دوم: مواد و روش‌ها ۲۸
۲ – ۱ – معرف‌ها و مواد شیمیایی ۲۸
۲ – ۲ – دستگاهوری ۲۹
۲ – ۳ – سنتز نانوذرات طلا ۳۰
۲ – ٤ – تهیه الکترود aunp-spe ۳۱
۲ – ٥ – تهیه الکترود ab_1-aunp-spe ۳۱
۲ – ٦ – تهیه snse ۳۱
۲ – ۷ – تهیه snse@au ۳۲
۲ – ۸ – تهیه snse@au-ab2 ..... ۳۲

۲ – ۹ – اندازه گیری ca19-9 توسط زیست حسگر ۳۳

۲ – ۱۰ – اندازه‌گیری کرونوآمپرومتری (ca) ۳٤

۲ – ۱۱ – اندازه‌گیری ولتامتری چرخهای ۳٤

۲ – ۱۲ – طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (eis) ۳٤

۲ – ۱۳ – ملاحظات اخلاقی ۳٤

۳ – فصل سوم: مشخصه‌یابی و نتایج ۳۷

۳ – ۱ – بررسی رفتار زیست حسگر طراحی شده به روش ولتامتری چرخه‌ای ۳۹

۳ – ۲ – مکانیسم فوتوالکتروشیمیایی snse ٤۲

۳ – ۳ – بررسی رفتار زیست حسگر طراحی شده به روش کرونوآمپرومتری ٤۳

۳ – ٤ – مطالعه رفتار اسپکتروسکوپی امپدانس الکتروشیمیایی زیست حسگر طراحی شده ٤٤

۳ – ٥ – مطالعه طیف سنجی مادون قرمز snse ٤٦

۳ – ٦ – مطالعه رفتار نانوسیستم $snse@au\text{-}ab_2$ توسط اسپکتروسکوپی uv-vis ٤۷

۳ – ۷ – مطالعه رفتار snse توسط اسپکتروسکوپی فلورسانس ٤۸

۳ – ۸ – آنالیز تفرق دینامیکی نور و تعیین زتا پتانسیل $snse@au\text{-}ab_2$ ٥۰

۳ – ۹ – بررسی شکل نانوذرات طراحی شده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری ٥۳

۳ – ۱۰ – مشخصه یابی زیست حسگر طراحی شده توسط sem ٥۳

٤ – فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری ٥۷

٤ – ۱ – بررسی نتایج بدست آمده از آزمایش ولتامتری چرخه‌ای ٥۷

٤ – ۲ – بررسی نتایج بدست آمده از آزمایش کرونوآمپرومتری ٥۸

٤– ۳ – بررسی نتایج مطالعه رفتار اسپکتروسکوپی امپدانس الکتروشیمیایی ٥۸

٤ – ٤ – بررسی نتایج بدست آمده از مطالعه طیف سنجی مادون قرمز snse ٦۰

٤ – ٥ – بررسی نتایج مطالعه رفتار نانوسیستم $snse@au\text{-}ab_2$ توسط اسپکتروسکوپی uv-vis ٦۰

٤ – ٦ – بررسی نتایج مطالعه رفتار snse توسط اسپکتروسکوپی فلورسانس ٦۱

٤ – ۷ – بررسی نتایج آنالیز تفرق دینامیکی نور و تعیین زتا پتانسیل $snse@au\text{-}ab_2$ ٦۲

٤ – ۸ – بررسی نتایج مشخصه یابی زیست حسگر طراحی شده توسط tem و sem ٦۳

٤ – ۹ – بهینه‌سازی پارامترهای مختلف ٦۳

٤ – ۹ – ۱ – بهینه‌سازی حجم نانوذرات طلا برای اصلاح سطح زیست حسگر ٦۳

٤ – ٩ – ٢ – بهینه‌سازی مقدار آنتی‌بادی ترسیب شده بر روی زیست حسگر ٦٤
٤ – ٩ – ٣ – بهینه سازی مدت زمان برهمکنش ca19-9 با ab1-aunp-spe ٦٥
٤ – ٩ – ٤ – بهینه سازی مدت زمان ترسیب $snse@au-ab_2$ بر روی زیست حسگر ٦٦
٤ – ١٠ – منحنی کالیبراسیون و تعیین حد تشخیص زیست حسگر طراحی شده ٦٧
٤ – ١١ – مطالعه اثر گونه‌های مزاحم در زیست حسگر طراحی شده ٧٠
٤ – ١٢ – اندازه‌گیری ca19-9 در نمونه‌های حقیقی توسط زیست حسگر طراحی شده ٧١
٤ – ١٣ – بررسی پایداری و تکرارپذیری زیست حسگر طراحی شده ٧٢
٤ – ١٤ – مقایسه حسگرهای گزارش شده با زیست حسگر مورد مطالعه ٧٣
٤ – ١٥ – نتیجه‌گیری ٧٥
٤ – ١٦ – پیشنهادات ٧٦
منابع ٧٧
abstract i

فهرست جداول

جدول ۲-۱مشخصات مواد شیمیایی به کار رفته. ۲۸

جدول ۳-۱: داده‌های حاصل از آنالیز CA19-9 در نمونه‌های حقیقی توسط زیست حسگر طراحی شده و ELISA.

..... ۷۱

جدول ۳-۲: مقایسه زیست حسگر مورد مطالعه CA19-9 با سایر زیست حسگر های گزارش شده..... ۷۳

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱: ساختار سیالیل لوئیس A (CA19-9)..... ۳
شکل ۱-۲: تصویر شماتیک از عملکرد یک زیست حسگر [۱۲]..... ۵
شکل ۱-۳: شماتیکی از یک زیست حسگر نوری [۲۵]..... ۱۰
شکل ۱-٤: انواع مختلفی از نانوذرات..... ۱۳
شکل ۱-۵: نقاط کوانتومی مواد مختلف رنگهای متفاوتی دارد..... ۱۸
شکل ۱-٦: اشکال رایج و مورفولوژی نانوذرات طلا [٤١]..... ۲۰
شکل ۱-۷: شماتیکی از مراحل ساخت زیست حسگر فوتوالکتروشیمیایی بیومارکر CA125..... ۲۱
شکل ۱-۸: شماتیکی از مراحل ساخت زیست حسگر فوتولومینسانس بیومارکر CA19-9..... ۲۳
شکل ۱-۹: شماتیکی از مراحل ساخت زیست حسگر ایمونوکروماتوگرافی بیومارکر CA19-9..... ۲٤
شکل ۱-۱۰: شماتیکی از مراحل ساخت زیست حسگر فوتوالکتروشیمی بیومارکر CA19-9..... ۲٤
شکل ۱-۱۱: شماتیکی زیست حسگر فوتوالکتروشیمی بیومارکر CA19-9..... ۲۵
شکل ۳-۱: شمایی مراحل ساخت زیست حسگر و نحوه عملکرد آن..... ۳۸
شکل ۳-۲: شمایی از برهمکنش DSP با سطح طلا و آنتی بادی..... ۳۸
شکل ۳-۳: ولتاموگرام‌های چرخه‌ای Ab_1-AuNP-SPE (a)، (CA19-9)-Ab_1-AuNP-SPE (b) و SnSe@Au-Ab_2-(CA19-9)-Ab_1-AuNP-SPE (c)، برای محلول PBS ۰/۰۱ M با pH = ۷/٤ با سرعت روبش $V.s^{-1}$ ۰/۱..... ٤۰
شکل ۳-٤: واکنش اکسیداسیون و احیای زوج ردوکس $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$..... ٤۰
شکل ۳-۵: ولتاموگرام‌های چرخه‌ای Ab_1-AuNP-SPE (A)، (CA19-9)-Ab_1-AuNP-SPE (B) و SnSe@Au-Ab_2-(CA19-9)-Ab_1-AuNP-SPE (C)، برای محلول PBS ۰/۰۱ M با pH = ۷/٤ حاوی ۰/۵ mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ با سرعت روبش $V.s^{-1}$ ۰/۱ بدون (a) و با تابش نور (b)..... ٤۱
شکل ۳-٦: مکانیسم فوتوالکتروشیمیایی SnSe..... ٤۳
شکل ۳-۷: کرونوآمپروگرام های Ab_1-AuNP-SPE (a)، (CA19-9)-Ab_1-AuNP-SPE (b) و SnSe@Au-Ab_2-(CA19-9)-Ab_1-AuNP-SPE (c)، برای محلول PBS ۰/۰۱ M با pH = ۷/٤ حاوی ۰/۵ mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ در غیاب و در حضور تابش نور..... ٤٤
شکل ۳-۸: آنالیز EIS و نمودار نایکوئیست برای SPE (A) (a)، AuNP-SPE (b)، DSP-SPE (c) و (Ab_1- (B و C) AuNP-SPE (d)، (CA19-9)-Ab_1-AuNP-SPE (e) و SnSe@Au-Ab_2-(CA19-9)-Ab_1-AuNP-SPE (f)، بدون (B) و با تابش نور (C)..... ٤۵
شکل ۳-۹: فرآیند تهیه SnSe..... ٤٦
شکل ۳-۱۰: طیف مادون قرمز SnSe..... ٤۷
شکل ۳-۱۱: طیف جذبی UV-Vis برای SnSe (a)، SnSe@Au (b)، SnSe@Au-Ab_2 (c) و AuNP (d)..... ٤۸
شکل ۳-۱۱: طیف فلورسانس برای SnSe با طول موج تحریک ۲۰۰ (a)، ۲۵۰ (b)، ۲۸۰ (c)، ۳۰۰ (d)، ۳۵۰ (e)، ٤۰۰ (f)، ٤۵۰ (g)، ۵۰۰ nm (h)..... ٤۹

شکل ۳-۱۲: طیف پدیده نوترکیبی لومینسانس در SnSe..... ٤٩
شکل ۳-۱٤: آنالیز تفرق دینامیکی نور (DLS) برای SnSe (A)، SnSe@Au (B) و $SnSe@Au-Ab_2$ (C). ٥١
شکل ۳-۱٥: آنالیز زتا پتانسیل برای SnSe (A)، SnSe@Au (B) و $SnSe@Au-Ab_2$ (C)..... ٥٢
شکل ۳-۱٦: تصاویر TEM برای SnSe (A) و SnSe@A (B). ٥٤
شکل ۳-۱۷: تصاویر SEM حاصل از SPE (A)، AuNP-SPE (B) و$SnSe@Au-Ab_2$-(CA19-9)-Ab_1-AuNP- (C) SPE..... ٥٥
شکل ۳-۱۸: تغییرات R_{ct} الکترود AuNP-SPE تهیه شده برای حجم‌های مختلف از نانوذرات طلا ترسیب شده (۰، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲ و ١٤ µL) (تعداد تکرار = ۳). ٦٤
شکل ۳-۱۹: تغییرات R_{ct} الکترود Ab_1-AuNP-SPE تهیه شده برای غلظت های مختلف از آنتی بادی ترسیب شده (۰/۰۰۱، ۰/۰۰٥، ۰/۰۱، ۰/۰٥، ۰/۱، ۰/۲٥ و ۰/٥ $mg.mL^{-1}$) (تعداد تکرار = ۳)..... ٦٥
شکل ۳-۲۰: تغییرات R_{ct} الکترود CA19-9-Ab_1-AuNP-SPE تهیه شده مدت زمان های مختلف انکوباسیون با CA19-9 (۰، ۱٥، ۲۰، ۳۰، ٤۰، ٥۰، ٦۰ و ۷۰min) (تعداد تکرار = ۳). ٦٦
شکل ۳-۲۱: تغییرات جریان فوتوالکتروشیمیایی الکترود $SnSe@Au-Ab_2$-(CA19-9)-Ab_1-AuNP-SPE تهیه شده در حضور $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ با غلظت ۰/٥ mM برای مدت زمان های مختلف انکوباسیون با $SnSe@Au-Ab_2$ (۰، ۱٥، ۲۰، ۳۰، ٤۰، ٥۰، ٦۰ و ۷۰ min) (تعداد تکرار = ۳)..... ٦٧
شکل ۳-۲۲: (A) کرونوآمپروگرام های$SnSe@Au-Ab_2$-(CA19-9)-Ab_1-AuNP-SPE انکوبه شده با غلظت های مختلف CA19-9 (۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ٥، ۱۰، ٥۰ و ۱۰۰ $U.mL^{-1}$) برای محلول PBS ۰/۰۱ M با pH = ۷/٤ حاوی ۰/٥ mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ در غیاب و در حضور تابش نور (منحنی قرمز کرونوآمپروگرام Ab_1-AuNP-SPE محلول بلانک بدون CA19-9 می باشد). (B) منحنی کالیبراسیون لوگاریتمی حاصل(تعداد تکرار = ۳)..... ٦٩
شکل ۳-۲۳ کرونوآمپروگرام Ab_1-AuNP-SPE محلول PBS ۰/۰۱ M با pH = ۷/٤ حاوی mM.... $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$... ۷۰
شکل ۳-۲٤: مطالعه اثر مزاحمت $U.ml^{-1}$ ٥۰ CA15-3، CA72-4 و CA-125 و $ng.ml^{-1}$ ۱۰ PSA و CEA و $ng.ml^{-1}$ ۱۰۰ HSA و $U.ml^{-1}$ ٥ CA19-9. ..... ۷۱

فهرست اختصارات

نام اختصار	معادل انگلیسی	معادل فارسی
Ab	Antibody	آنتی‌بادی
AuNPs	Gold nanoparticles	نانوذرات طلا
CA	Chronoamperometry	کورونوآمپرومتری
CA19-9	Carbohydrate antigen 19-9	آنتی ژن کربوهیدرات ۱۹-۹
CV	Cyclic voltammetry	ولتامتری چرخه ای
DLS	Dynamic light Scattering	تفرق نور دینامیک
DSP	3,3′-dithiodipropionic acid di(N-hydroxysuccinimide ester)	۳،۳'-دی‌تیودی‌پروپیونیک اسید دی(ان-هیدروکسی‌سوکسینیمید)
EIS	Electrochemical impedance spectroscopy	طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمی
BSA	Bovine serum albumin	آلبومین سرم گاوی
MWCNT	Multi-walled carbon nanotubes	نانولوله‌های کربنی چند دیواره
PBS	Phosphate buffered saline	بافر فسفات
PSA	Prostate-specific antigen	آنتی ژن اختصاصی پروستات
HSA	Human Serum Albumin	سرم‌آلبومین انسانی
CEA	Carcinoembryonic antigen	آنتی ژن کارسینوامبریونیک
RSD	Relative standard deviation	انحراف استاندارد نسبی
PEC	Photoelectrochemical cell	فوتوالکتروشیمیایی
CNT	Carbon nanotube	نانومواد کربنی
swCNTs	Single-walled carbon nanotubes	نانوتیوب های کربنی تک جداره
mwCNTs	Multi-walled carbon nanotubes	نانوتیوب های کربنی چند جداره
CP	Conducting polymer	پلیمرهای رسانا
SiNW	Silicon Nanowire	نانوسیم های سیلیکونی
QD	Quantum dot	کوانتوم دات ها
ECL	Electrochemiluminescence	الکترو کمی لومینسانس
SPR	Surface plasmon resonance	رزونانس سطح پلاسمون
IEP	Isoelectric point	نقطه ایزوالکتریک
LDR	range dynamic Linear	گستره ی غلظت
LOD	limit of detection	سازی آشکار
R_{ct}	Charge transfer resistance	مقاومت انتقال بار
SEM	Scanning electron microscope	میکروسکوپ روبش الکترونی
SnSe	Tin selenide	نانوذرات سلنید قلع
SnSe@Au	Tin selenide@Gold Core shell	پوسته-هسته طلا@سلنید قلع
SPE	Screen-Printed Electrode	الکترود صفحه چاپی
TEM	Transmission electron micrtoscopy	میکروسکوپ الکترونی عبوری