

ساخت مالتی نانو حسگر جهت تشخیص همزمان تروپونین و هموگلوبین گلیکولیزه به روش پلیمر

نانوقالب مولکولی

میثم کریمی^۱، محمد ربیعی^۲، محمدرضا تحریری^۳، رضا سالاریان^۴

۱ دانشجوی دکتری، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

۲ دانشیار، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

۳ گروه علوم پیشرفته، دانشگاه مارکیت، میلواکی، آمریکا

۴ استادیار، موسسه آموزش عالی مازیار، پژوهشگر همکار در دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران



تاریخ دریافت:

۹۸/۰۴/۰۴

تاریخ پذیرش:

۹۸/۰۶/۰۱

مقاله

در پژوهش حاضر، یک حسگر پلیمری نانوقالب مولکولی (N-MIP) دارای دو پروب ساخته شده از الکتروود صفحه چاپی بر پایه گرافن برای شناسایی همزمان دو پروتئین خون (هموگلوبین گلیکوز شده و تروپونین T قلبی (cTnT) به صورت جداگانه، طراحی و ساخته شد. به منظور به دست آوردن سطح زیست تقلید، یک ماتریس کوپلیمری بر روی سطح الکتروودهای اکسید گرافن کاهیده (rGO) ایجاد شد. بدین منظور، پروب حسگر توسط الکتروپلیمریزاسیون آنیلین و آنیلین کربوکسیل دار شده بر روی الکتروود اکسید گرافن کاهیده (rGO)، در حضور پروتئین های الگو (cTnT) برای پروب تروپونین T قلب و HbA1c برای پروب هموگلوبین گلیکوز شده) با ولتامتری سیکی اصلاح شد. سطوح هر دو حسگر با استفاده از ولتامتری پالسی چرخه ای و دیفرانسیل (CV)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مشخصه یابی شد. بهترین بافت سطحی زیست تقلید در نسبت آنیلین / کربوکسیل آنیلین ۴:۱ بدست آمد. محدوده خطی cTnT و HbA1c از ۰/۰۲ تا ۰/۰۹ ng/ml و از ۰/۰۴ تا ۰/۸۱ میکروگرم بر میلی لیتر و با محدودیت تشخیص ۰/۰۰۸ نانو گرم در میلی لیتر و ۴/۳ نانو گرم در میلی لیتر بود. قابلیت اطمینان حسگرهای cTnT و HbA1c با مقایسه نتایج با نتایج حاصل از روش HPLC مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که نتایج حاصل از حسگرهای N-MIP و HPLC همبستگی خوبی داشتند.

حسگر دوگانه، حسگر پلیمری نانوقالب مولکولی، پلی آنیلین-گرافن،

تروپونین، هموگلوبین گلیکولیزه

واژگان کلیدی

A Novel Nano Multi MIP Sensor for Simultaneous Detection of cTnT & HbA1c

M. Karimi¹, M. Rabiee^{2*}, M.R. Tahriri³, R.Salari⁴

1. Ph. D., Biomaterials Group, Faculty of Biomedical Engineering, Amir Kabir University of Technology, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Biomaterials Group, Faculty of Biomedical Engineering, Amir Kabir University of Technology, Tehran, Iran
3. Ph. D., Department of Developmental Sciences, Marquette University, Milwaukee, WI 53233, USA
4. Assistant Professor, Maziar University, Tehran, Iran

Abstract nano-molecularly imprinted polymer (N-MIP) dual-sensor based on a graphene screen-printed electrode was developed for the detection of glycosylated hemoglobin and cardiac troponin T (cTnT), separately. In order to obtain a biomimetic surface, a conductive copolymer matrix was deposited on the surface of graphene oxide (GO) electrode. The sensor probe was modified via electropolymerization of aniline and carboxylated aniline on the graphene oxide (GO) electrode, in the presence of template proteins (cTnT for cardiac troponin T probe and HbA1c for glycosylated hemoglobin probe) by cyclic voltammetry. The surfaces of both sensors were characterized using cyclic and differential pulse voltammetry (CV), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), quartz crystal microbalance (QCM). The best biomimetic surface nanotexture was obtained at aniline/carboxylated aniline ratio of 1:4. The linear ranges of cTnT and HbA1c were from 0.02 to 0.09 ng/mL and from 0.004 to 0.81 µg/mL, with detection limits of 0.008 ng/mL and 4.3 ng/mL, respectively. The reliability of the M-NIP cTnT and HbA1c sensors was examined by comparing the results with those obtained from HPLC method and it was observed that the results from N-MIP sensors and HPLC had a great correlation.

Keywords

Dual-sensor; Molecularly imprinted polymer, Polyaniline-Graphene, Troponin, HbA1c

۱- مقدمه

تشخیص پروتئین‌های خون به عنوان نشانگرهای زیستی می‌تواند در زمینه‌های گوناگونی از جمله برنامه‌های علمی و بالینی مانند پژوهش و شناخت داروها و نظارت بر محیط‌زیست، تشخیص زود هنگام بیماری و درمان آن‌ها، بسیار مفید باشد. نشانگر زیستی یک شاخص با مشخصه‌های خاصی است که نمایانگر پدیده یا حالت بیولوژیکی می‌باشد (به عنوان مثال، غلظت قند خون بالا می‌تواند نشان دهنده دیابت بالقوه باشد، بنابراین قند خون یک شاخص برای دیابت است) [۱].

انفارکتوس حاد قلب (AMI) جزء بیماری‌های قلبی عروقی خطرناک در سراسر جهان است که تروپونین T قلبی (cTnT، 37kDa)، که یک پروتئین تنظیم کننده قلب است، بیومارکر خاص آن است [۲-۴]. AMI موجب آزاد شدن سریع cTnT از سلول‌های عضلانی قلبی به جریان خون می‌شود که تا ۱۴ روز پس از ایسکمی قلبی در خون باقی می‌ماند که امکان پیش‌آگهی بیماری را فراهم می‌کند [۴]. بنابراین اندازه‌گیری میزان تروپونین بسیار با اهمیت است. در مطالعاتی که اخیراً انجام شده‌است، گزارش شده که فاصله غلظت تروپونین I بین دو حالت نرمال و بیمار حدود ۰/۵ تا ۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. هنگامی که سکنه قلبی ایجاد می‌شود میزان تروپونین بین ۲۰ تا ۵۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌رسد.

هموگلوبین گلیکوزه شده (HbA1c) نشانگر خاصی از گلیسین است که نشان‌دهنده میانگین طولانی مدت گلوکز خون (تا دو تا سه ماه) است. HbA1c یک عامل قابل اعتماد برای تعیین سطح گلوکز در بیماران دیابتی است [۵-۷]. در مقایسه با سایر نشانگرهای گلوکز

HbA1c دقیق‌ترین نتایج مربوط به قند خون را فراهم می‌کند. سطح HbA1c از ۹٪ به عنوان سطح بحرانی برای گلوکز خون محسوب می‌شود و سطوح بالاتر از آن به عنوان دیابت بر اساس انجمن دیابت آمریکا (ADA) شناخته می‌شود [۸-۱۱].

اخیراً روش پلیمر قالب مولکولی (MIP) به عنوان یک روش موثر برای ساخت گیرنده‌های زیست تقلید مصنوعی معرفی شده‌است که روند تشخیص یک آنالیت هدف را با خاصیت اتصال اختصاصی به مولکول الگو تسهیل می‌کند [۱۲]. MIP ها در مقایسه با عوامل بیولوژیکی (آنتی‌بادی، گیرنده‌ها، آنزیم‌ها) مزایای متعددی دارند نظیر پایداری حرارتی و شیمیایی، ارزانی و تولید ساده، حساسیت خوب و قابلیت استفاده مجدد که آنها را انتخاب‌های ایده‌آل برای کاربردهای الکتروشیمیایی می‌سازد [۱۳].

در روش MIP، مخلوطی از مونومرها و مولکول‌های الگو پلیمریزاسیون شده و به دنبال آن مولکول‌های قالب حذف می‌شود تا حفره‌های پلیمری زیست تقلید که برای گیر انداختن آنالیت خاص هدف مورد استفاده قرار می‌گیرد، ایجاد شوند. در سطوح MIP، گروه‌های عاملی مونومرها، محل‌های مناسب درون حفره‌ها را ایجاد می‌کنند که شرایط اتصال مجدد مطلوبی را برای آنالیت الگو ایجاد می‌کنند [۱۴-۱۷].

گرافن، دگرشکل کربن، یک مولکول دو بعدی با خواص الکتریکی عالی است که باعث می‌شود انتخاب ایده‌آل برای کاربردهای بیوحسگر باشد. به منظور بهبود هدایت و انتقال الکترونیکی گرافن، اکسید گرافین کاهیده (RGO) توسعه یافته‌است [۱۸، ۱۹]. یک رویکرد جایگزین برای افزایش انتقال الکترونیکی در پروب‌های پوشش داده شده با گرافن، استفاده از پلیمرهای رسانایی است که محتوای حفرات

جدول ۱: لیست مواد مصرفی در این پژوهش

نام ماده مورد استفاده	فرمول شیمیایی	شرکت سازنده
آنیلین (۹۸٪)	C ₆ H ₆ N ₂ S ₂	WorldChem
آنیلین-۳-کربوکسیلیک اسید	C ₇ H ₅ BFNO ₂	WorldChem
فریسیانید پتاسیم ۹۹٪	K ₃ [Fe (CN) ₆]	Merck
فروسیانید پتاسیم ۹۹٪	K ₄ [Fe ₄ (CN) ₆]	Merck
اسیدازالیک (۹۹٪)		Merck
تروپونین T قلبی (cTnT)	Mw = 37 kDa	Sigma-Aldrich
HbA1c	-----	Sigma-Aldrich
پودر گرافیت	Electrodag PF-407 C	Fluka
جوهر کربن	-----	Henkel
فسفات بافر سیلین	-----	Sigma-Aldrich
آب دیونیزه	(18MΩ, Millipore, Milli-Q)	-----
اتانول	C ₂ H ₅ OH	Merck
سرم فیزیولوژی	-----	-----
پودر بافر Tris Glycine	-----	Sigma-Aldrich
محلول همولیزینگ	-----	Merck

زیست تقلید را در الکترودهای N-MIP نیز افزایش می دهد.

۲- بخش تجربی

۱-۲- مواد

نمونه های سرم خون از بیماران داوطلب جمع آوری شد و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. محتویات cTnT و HbA1c در نمونه های خون از طریق ایمنی سنجی الکتروشیمیایی لومینسنس (آنالیزر ایمنی سنجی، RocheDiagnostics) شناسایی شد. در همه آزمایشات برای رقت از آب دیونیزه و بافر فسفات (PB) استفاده شد.

۲-۲- وسایل و تجهیزات مورد استفاده

جهت انجام واکنش های الکتروشیمیایی و ثبت داده های مربوط به آن از تجهیزات زیر استفاده شده است:

۱- دستگاه پتانسیو استا گالواناستای Autolab ساخت شرکت متروهم از کشور هلند، مجهز به نرم افزارهای GPES و Fra جهت ثبت ولتاگرام های چرخه ای، پالس تفاضلی، کرونو آمپرومتری و طیف بینی امپدانس الکترونی.

۲- دستگاه pH متر Ion Analyzer 250 Corning ساخت کشور انگلستان جهت اندازه گیری pH محلول های آزمایشی.

۳- حمام فرا صوت Dawe ساخت کشور انگلستان برای تمیز کردن سطح الکتروود کار.

۴- دستگاه HPLC مدل Breeze ساخت کمپانی Waters Corpo-ration کشور آمریکا، جهت اندازه گیری HbA1c، GA، هموگلوبین.

۵- اولترا سانتریفیوژ ساخت کمپانی Hettich آلمان، برای جدا سازی هموگلوبین از خون.

۶- دستگاه رزونانس مغناطیس هسته ای مدل Avance400 MHz ساخت کمپانی BRUKER کشور آمریکا، به منظور آنالیز ترکیب تولید شده.

۷- دستگاه پراش اشعه ایکس ساخت کارخانه PHILIPS و مدل PW1800 و لامپ دستگاه مس. ولتاژ کاری دستگاه حدود ۴۰ کیلوولت و جریان حدود ۳۰ میلی آمپر بود. در تمام آزمایشات از اشعه ایکس Cu- α با طول موج ۱/۵۴۱۸۷۴ آنگستروم استفاده شده و محدوده روبش بین ۰-۱۲۰ درجه با گام ۰/۱ بوده است.

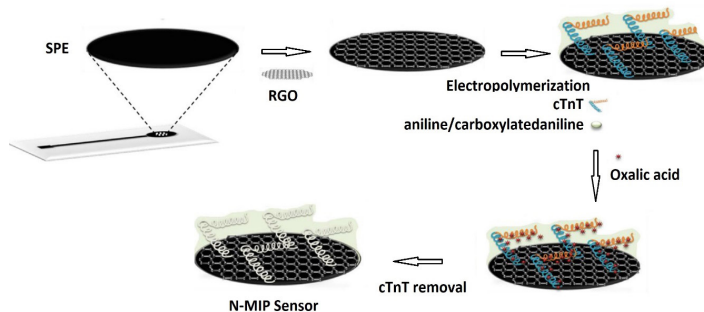
۷- هات پلیت مگنت استیرر MTops مدل HS12

۸- ترازوی AND مدل GF ساخت کشور ژاپن

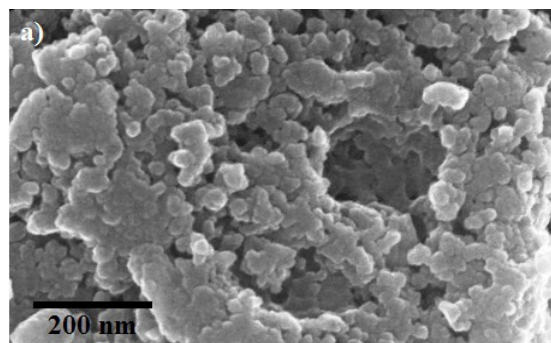
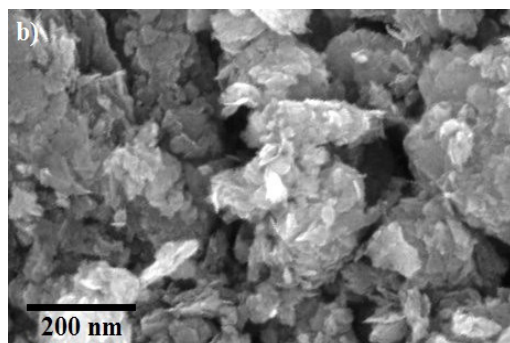
۹- نمونه گیر، پیپت، ارلن، بالن، لوله آزمایش و دیگر وسایل معمول در آزمایشگاه

۲-۳- روش انجام آزمایش

ابتدا دو پروب N-MIP برای تشخیص دو نوع پروتئین هموگلوبین گلیکوزیله و تروپونین T قلبی ساخته شد. این حسگر با استفاده از نمودارهای ولتامتری، آمپرومتری، امپدانس و ... بهینه سازی شده است. نمودار استاندارد برای اندازه گیری HbA1c و cTnT رسم گردید، دقت سیستم طراحی شده با روش مرجع HPLC مقایسه شد تا نسبت به اطلاعات حاصل از آن در مراحل بعدی آزمایش اطمینان حاصل شود.



شکل ۱: شماتیکی از فرایند ساخت سطح زیست تقلید پلیمر نانو قالب مولکولی به صورت مرحله به مرحله



شکل ۲: مورفولوژی سطحی (الف) الکتروود صفحه-چاپی ساده و (ب) اصلاح شده با اکسید گرافن کاهیده (SEM) (RGO).

۲-۳-۱- تولید الکتروود RGO اصلاح شده به روش صفحه-چاپی (SPE)

الکتروود RGO به صورت زیر بدست آمده است: ابتدا محلولی شامل ۶ گرم گرافیت، ۳ گرم NaNO_3 و ۱۴ گرم KMnO_4 در ۱۲۰ میلی لیتر H_2SO_4 تهیه شده و در یک حمام یخ برای ۲۴ ساعت بر روی همزن قرار گرفته شد و سپس این مخلوط به مدت ۱ شبانه روز در دمای آزمایشگاه قرار می گیرد. سپس مخلوط با آب دو بار تقطیر شده به طور مداوم به pH ۷ رسید و اکسید گرافن (GO) با این پروتکل به دست آمد. به منظور کاهش GO، پودر به دست آمده به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵۰۰ درجه سانتیگراد نگهداری می شود و سپس در دمای اتاق سرد می شود. در نهایت، RGO تولید شده با غلظت ۱ میلی گرم بر یک میلی لیتر در آب دیسپرس شد [۲۴]. ترکیب الکتروود صفحه-چاپی (SPE) حاوی گرافیت اصلاح شده (۱۵٪) جوهر کربنی بود. مخلوطی از کربن و گرافیت بر روی سطح پلی اتیلن چاپ شده و الکتروودهای لایه نازک اصلاح شده پلی اتیلنی تشکیل گردید. الکتروودهای مورد استفاده دارای سطح مقطع دایره ای با قطر ۵ میلی متر بودند که به الکتروودی با ابعاد ۲ میلیمتر در ۱۰ میلی متر متصل شد.

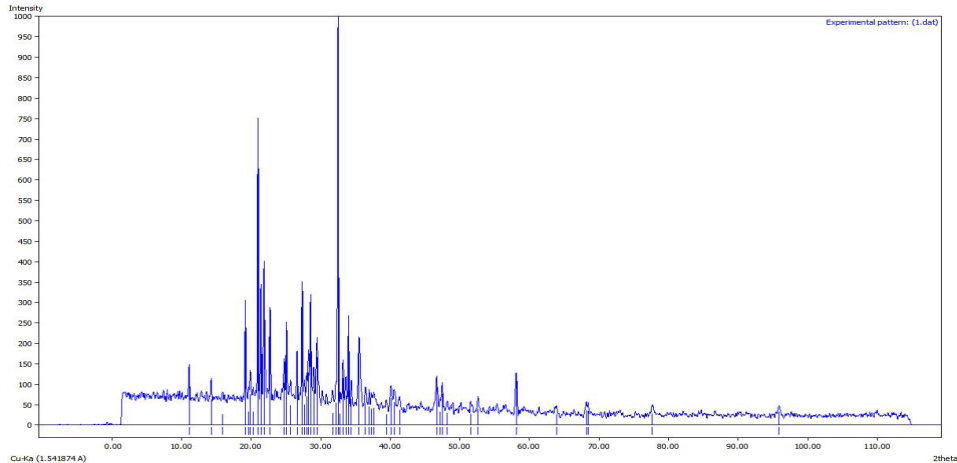
۲-۳-۲- ساخت حسگر N-MIP

برای ساخت سطح الکتروود N-MIP، محلول cTnT یا HbA1c و

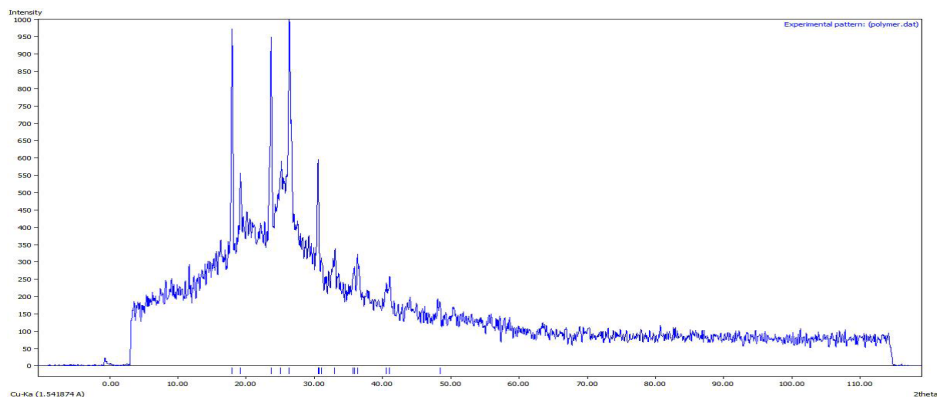
مونومرهای آنیلین کربوکسیل شده بر روی الکتروودهای کربنی اصلاح شده گرافیت الکترو پلیمریزه شدند. برای ایجاد برهم کنش مناسب الکترواستاتیک بین مونومرها و cTnT یا HbA1c، در ابتدا ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر cTnT یا HbA1c به یک محلولی از مونومرهای آنیلین و کربوکسیلات آنیلین (۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر) به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قبل از الکتروپلیمریزاسیون اضافه شد. [۷].

محلول مونومرهای آنیلین و کربوکسیل شده آنیلین و cTnT یا HbA1c بر روی سطح الکتروودهای SPE الکتروپلیمریزه شدند و با ۲۰ ولتاموگرام چرخه در محدوده بالقوه از ۱/۲ تا -۰/۲ ولت (در مقابل $\text{Ag/AgCl}(\text{KCl sat})$) و سرعت اسکن 0.02 Vs^{-1} پس از افزودن محلول LiClO_4 (۰/۰۰۸ مول بر لیتر) در PB با ۰/۰۱ مول در لیتر و pH ۵/۸.

در ادامه مولکول زیرلایه با افزودن یک قطره محلول اکزالیک اسید (۰/۰۰۵ مول بر لیتر) به فیلم الکترو پلی امید شده حذف شد (شکل ۱) و به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد در یک محیط مرطوب نگهداری شد. برای جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی از نمونه خون، پروب N-MIP به مدت ۱ ساعت در محلول BSA ۰/۱٪ از غوطه ور شد. پس از آن پروب با آب کافی شسته شد و سپس آزمایش های الکتروشیمیایی انجام شد. در نهایت، سطح دو حسگر با استفاده



شکل ۳: تصویر پراش اشعه ایکس پلی آنیلین-اکسید گرافن کاهیده



شکل ۴: تصویر پراش اشعه ایکس پلی آنیلین

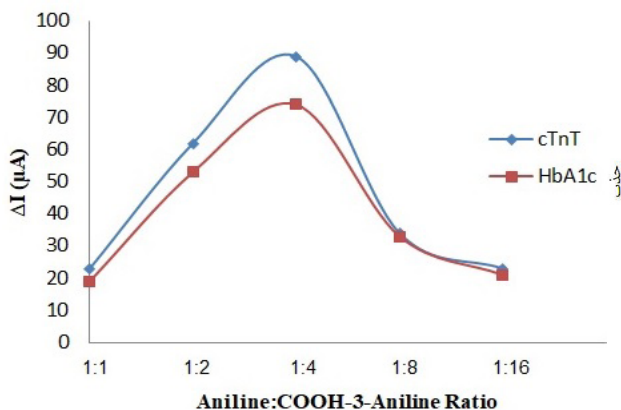
۳- نتایج و بحث

۳-۱- مورفولوژی سطح الکتروود صفحه-چاپی N-MIP
 پروب N-MIP با استفاده از الکتروپلیمریزاسیون آنیلین با حضور cTnT یا HbA1c به عنوان یک مولکول قالب و سپس حذف الگو ساخته شد. غلظت آنالیز هدف در نمونه های خون به روش الکتروشیمیایی از طریق اندازه گیری جریان مجدد در پروب واکنش مورد بررسی قرار گرفت.

میکروگرافی SEM نشان دهنده وجود تجمع گرافیت (۱۰۰ نانومتر) در جوهر کربن بر روی سطح SPE بود (شکل ۲ الف)، در حالی که SPE اصلاح شده با RGO یک سطح چین دار را به دلیل توزیع تصادفی صفحات گرافن در اختیار می گذاشت (شکل ۲ ب).

۳-۲- آنالیز پراش اشعه X

پلی آنیلین تولید شده و نانو کامپوزیت اکسید گرافن کاهیده و پلی آنیلین به منظور بررسی ساختار کریستالی و فاصله میان صفحات مورد بررسی قرار گرفتند. شکل های زیر ساختار کریستالی نانو کامپوزیت پلی آنیلین-اکسید گرافن کاهیده و پلی آنیلین را نشان می دهد. پلی آنیلین دارای ساختار نیمه بلوری می باشد که ساختار بلوری آن ناشی از زنجیر های پلیمری می باشد که بطور تناوبی موازی و عمودی قرار گرفته اند نواحی بلوری آن نیز توسط نواحی آمورف احاطه شده است. با توجه به شکل ۴ در مورد پلی آنیلین، چند پیک تیز در درجه های ۲۵/۳ و ۲۰/۴ و ۳۵ درجه مشاهده می شود که ساختار کریستالی (۲۰۰) و (۰۲۰) و (۰۱۱) را نشان می دهد. پیک مشاهده شده در شکل ۳ پلی آنیلین-اکسید گرافن کاهیده پهن تر بوده و در محدوده گرافن کاهیده و پلی آنیلین قرار دارد. همان گونه که از نمودار ۴-۴ مشخص است در الگوی پراش اشعه ایکس برای نانو کامپوزیت پلی آنیلین-اکسید گرافن کاهیده، پیک ۱۴/۱ مشخصه صفحات (۰۰۱) اکسید گرافن کاهیده با ساختار لایه ای می باشد و نشان دهنده ی فاصله بین صفحه ای ۰.۳۲۸ نانومتری می باشد. بعد از نانو کامپوزیت



شکل ۳: اثر نسبت آنیلین و آنیلین کربوکسیله در الکتروپلیمریزاسیون N-MIP. مقادیر ΔI از آنالیز نمودارهای ولتامتری سیکلی در محلول نیم میلی مولار از محلول $K_3[Fe(CN)_6]$ از آنالیز نمودارهای ولتامتری سیکلی در محلول نیم میلی مولار از محلول $K_3[Fe(CN)_6]$ در ۰/۱ مولار KCl بدست آمد.

از چسب پلاستیکی به هم متصل شدند. فاصله بین دو الکتروود کار ۰/۷ سانتی متر است. برای بررسی کنترل، الکترودهای اصلاح شده با پلیمر با استفاده از الکتروود پلیمری بدون قالب مولکولی (N-NIP)، از طریق عدم وجود cTnT / HbA1c در فرایند الکتروپلیمریزاسیون تهیه شد.

۳-۳-۲- بکارگیری خون انسان

جدا کردن هموگلوبین از خون: اندازه گیری %HbA1c در نمونه خون، برای بررسی عملکرد روش درمانی دیابت بسیار حائز اهمیت است. برای تشخیص و اندازه گیری HbA1c، گلوکز خون و پروتئین های گلیکوزیله (به غیر از هموگلوبین) باید اول از خون جدا شود. برای این هدف، یک محلول همولیزات و یک محلول رسوب کننده آماده شدند.

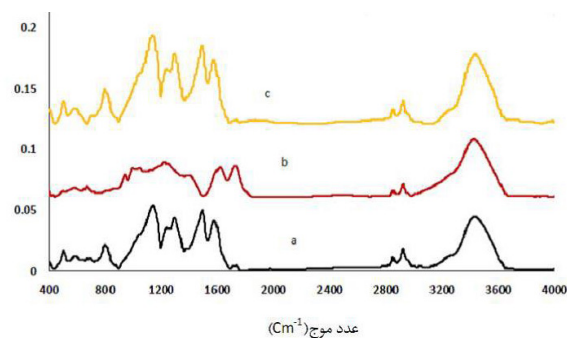
آماده سازی محلول ها:

تهیه محلول همولیزات: خون EDTA دار را ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی شستشو داده و در مرحله آخر به کمک یک نمونه گیر ۱۰۰۰λ تمامی سرم فیزیولوژی خارج شده به طوریکه پاکت سل ها حاصل شود. ۲۰ میکرولیتر از Packed Cell را به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول همولیز کننده در یک لوله اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در ۹۰۰۰ g سانتریفیوژ شده و در انتها محلول شفاف حاصل می شود.

تهیه محلول بافر Tris Glycine: یک بسته پودر بافر (۲۵ گرم) به ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. این محلول به مدت یک ماه در دمای یخچال پایدار می باشد.

تهیه محلول HPS: ۹ میلی مول $ZnCl_2$ به ۱۰۰ میلی لیتر محلول بافر Tris Glycine اضافه شد و در دمای اتاق روی همزن قرار گرفت تا کاملا همگن شوند.

در ادامه ۱۵ μl از مخلوط رسوبی هموگلوبین به محلول خون کافت تهیه شده اضافه گردید. محلول حاصل دوباره به مدت ۳ دقیقه در ۹۰۰۰ g سانتریفیوژ می شود. در انتها مایع شفاف روی لوله آزمایش توسط پیپت جمع آوری شده و دوباره عملیات سانتریفیوژ انجام می شود. رسوب نهایی درون لوله آزمایش هموگلوبین می باشد. رسوب حاصل توسط PBS جمع آوری شد. مقدار هموگلوبین جدا شده توسط روش براد فورد اندازه گیری شد.



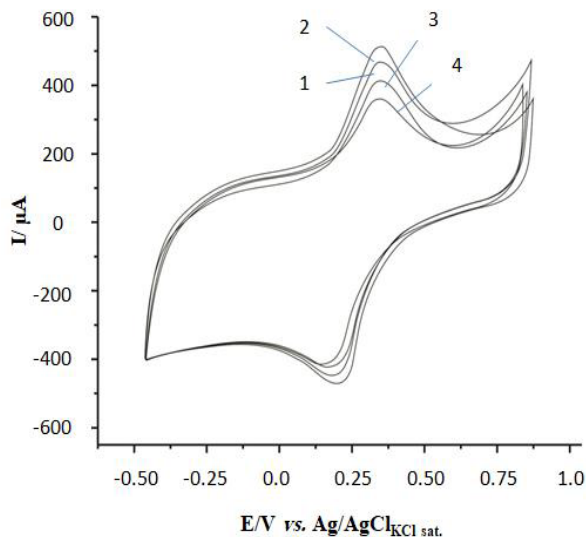
شکل ۴: نمودار FTIR پلیمرهای پلی آنیلین، اکسید گرافن کاهیده و کامپوزیت پلی آنیلین-اکسید گرافن کاهیده

۳-۴- اثر نسبت آنیلین به آنیلین کربوکسیله

برای بهبود قابلیت انتخاب پذیری و حساسیت حسگرهای MIP زیست تقلید، مهم است که از یک پلیمر رسانای مناسب برای به دست آوردن حداکثر انتقال الکترون استفاده شود. زیست تقلیدی می تواند با استفاده از یک پلیمر کربوکسیله شده بهبود یابد زیرا مکان های واکنشی فعال بیشتری برای پیوند cTnT و HbA1c از طریق گروه -COOH فراهم می کند. در این مطالعه، آنیلین به عنوان یک پلیمر رسانا انتخاب شد و با کوپلیمرزاسیون 3-COOH و آنیلین یک حسگر MIP با قابلیت انتخابی و حساسیت بالا ساخته شد. برای به دست آوردن نسبت مطلوب 3-COOH و آنیلین برای حداکثر اتصال cTnT و HbA1c، اختلاف جریان (ΔI) پس از اتصال مجدداً با cTnT یا HbA1c اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که در نسبت ۴:۱ برای کامپوزیت آنیلین: 3-COOH، مقدار حداکثر جریان به دست آمد. این نتیجه نشان داد که گروه های کربوکسیلیک کوپلیمر آنیلین: 3-COOH عمدتاً مسئول جذب cTnT یا HbA1c از طریق واکنش های غیر کووالانسی هستند، مانند تعاملات الکترواستاتیک و پیوند هیدروژنی [۲۲].

۳-۵- آنالیز الکتروشیمیایی مراحل شکل گیری الکتروود N-MIP به وسیله ولتامتری چرخه ای

شکل ۷ تا ۸ نمودارهای CV مراحل مختلف ساخت الکتروود پلیمر نانو قالب مولکولی را به صورت گام به گام نشان می دهد. در شکل ۷ و ۸ نمودار CV از مراحل مختلف تهیه الکترودهای تروپونین و هموگلوبین

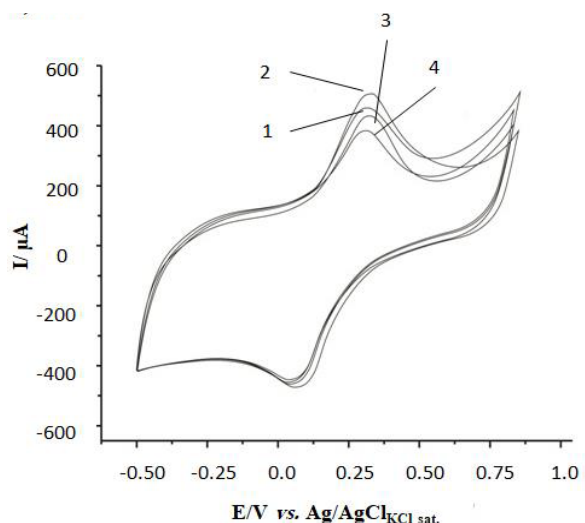


شکل ۸: مشخصات CV الکتروشیمیایی ثبت شده برای مراحل مختلف ساخت الکتروود پلیمر نانوقالب مولکولی HbA1c: (۱) پروب اصلاح شده RGO: (۲) آنیلین، 3-COOH-آنیلین و پروب الکتروپلیمریزه شده آنالیت؛ (۳) پروب الکتروپلیمر پس از حذف مولکول قالب و (۴) پروب الکتروپلیمریزه شده پس از rebinding با تجزیه (۰/۵ ng/mL). تجزیه و تحلیل در محلول نیم میلی مولار از محلول $[K_4(Fe(CN)_6)]$ / [K₃[Fe(CN)₆]] در ۰/۱ مولار KCl انجام شد.

شده با پلی آنیلین پیک مشخصه صفحات (۰۰۱) به زوایای کوچکتر شیفته داده می شود که نشان دهنده افزایش فواصل بین صفحه‌ای به ۱،۱۱ نانومتر می باشد که این تفاوت به جا به جایی په لایه از ملکول ای آب در ساختار (۰،۲۸ نانومتری) با لایه ای از کامپوزیت اکسید گرافن کاهیده - پلی آنیلین نسبت داده می شود.

۳-۳- آنالیز ساختاری حسگر

طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه در شکل ۵ بر روی پلیمرهای پلی آنیلین، اکسید گرافن کاهیده و کامپوزیت پلی آنیلین-اکسید گرافن کاهیده انجام گرفت. باندهای مربوط به زنجیره پلیمر کاملاً در طیف مربوط به نانو کامپوزیت نشان داده شده است. در طیف مادون قرمز مربوط اکسید گرافن کاهیده (b) باند جذب در ۱۵۸۰ مرتبط با کشش C=C می باشد، پیک ۱۲۰۰ مربوط به کشش C=O است. با توجه به نمودار FTIR پلی آنیلین (a) پیک مشاهده شده در حدود ۳۴۰۰ مربوط به ارتعاش کششی N-H میباشد. همچنین پیک مشاهده شده در ۲۹۲۴ مربوط به ارتعاش کششی C-H آروماتیک می باشد. پیک در موقعیت ۱۳۰۰ مربوط به ارتعاش کششی C-N آمین آروماتیک است. پیک در ۱۵۸۰ و ۱۴۶۰ به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی C=C حلقه کینوئید و بنزوئیدی می باشد. در طیف مربوط به نانو کامپوزیت پلی آنیلین-اکسید گرافن کاهیده (c) تمامی پیک های پلیمر دیده می شود اما در پیک مربوط به خمش C-H به سمت اعداد موج بالاتر تغییر پیدا کرده است (۷۸۹ به ۷۹۲) که نشان دهنده واکنش بین پیوند پای و پیوند هیدروژنی در پلی آنیلین و صفحات اکسید گرافن کاهیده می باشد. این نتایج، ایجاد این نانو کامپوزیت را تایید می کند.



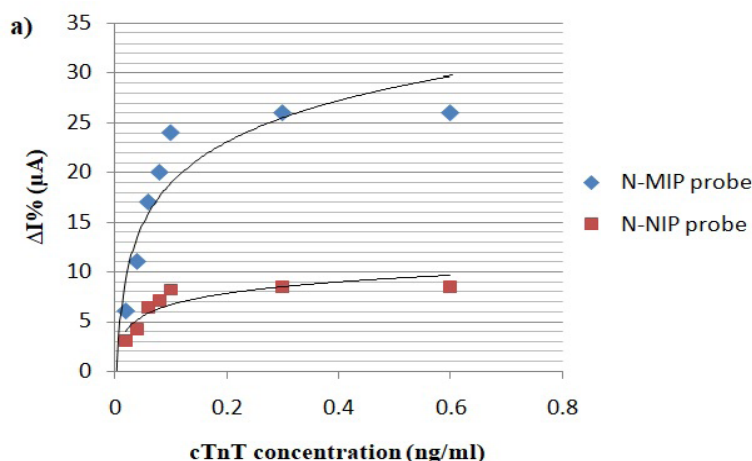
شکل ۷: مشخصات CV الکتروشیمیایی ثبت شده برای مراحل مختلف ساخت الکتروود پلیمر نانوقالب مولکولی cTnT: (۱) پروب اصلاح شده RGO: (۲) آنیلین، 3-COOH-آنیلین و پروب الکتروپلیمریزه شده آنالیت؛ (۳) پروب الکتروپلیمر پس از حذف مولکول قالب و (۴) پروب الکتروپلیمریزه شده پس از rebinding با تجزیه (۰/۵ ng/mL). تجزیه و تحلیل در محلول ۰/۵ mM $[K_4(Fe(CN)_6)]$ / [K₃[Fe(CN)₆]] در ۰/۱ مولار KCl انجام شد.

۳-۶- ارزیابی الکتروشیمیایی حسگر N-MIP

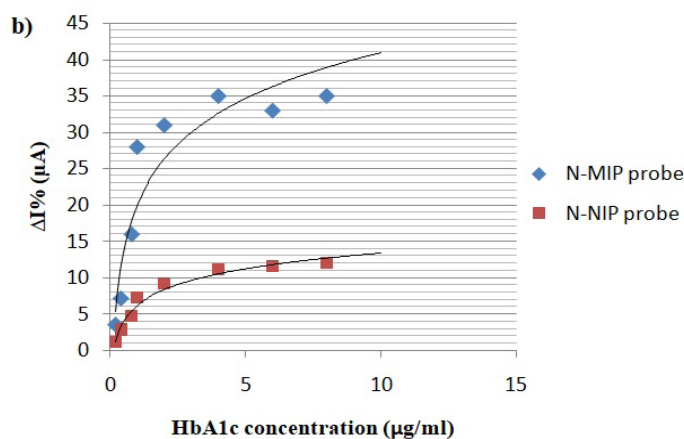
رفتار الکترو شیمیایی هر حسگر توسط ولتاژمتری سیکی از طریق بررسی تغییرات واکنش پروب فرو/ فریسیانید ناشی از اتصال مجدد TnT یا HbA1c به الکتروود N-MIP مورد بررسی قرار گرفت. الکترودهای اصلاح شده با MIP به مدت ۲۵ دقیقه در معرض غلظت های خاصی از محلول های بافر حاوی cTnT و pH ۷/۴ HbA1c قرار گرفتند. پس از شستشوی پروب ها، پاسخ حسگرها شناسایی شد. پاسخ پروب N-MIP با استفاده از اندازه گیری کاهش درصد جریان (ΔI) حاصل از تست DPV پس از انکوباسیون پروب با غلظت های مختلف cTnT و HbA1c بررسی شد. برای تست کنترل، از پروب N-MIP استفاده شد که بدون افزودن cTnT و HbA1c به ماتریس کوپلیمر ساخته شده بود.

همانطور که در شکل ۹ و ۱۰ نشان داده شده، با افزایش غلظت cTnT یا HbA1c، جریان پیک آنودیک کاهش مییابد. این امر می تواند به دلیل افزایش نرخ اتصال مجدد cTnT یا HbA1c با حفره های چاپ شده باشد. همانطور که میزان اتصال آنالیت با پروب MIP افزایش مییابد، واکنش الکتروود ferro / ferricyanid probe / سرکوب می

گلایکولیزه مشاهده میگردد. در ابتدا الکتروود SPE پوشش داده شده با RGO (منحنی ۱) نشان داده شده است. به علت وجود هدایت الکتربیکی و فعالیت الکترواستاتیکی بالای پوشش RGO تشکیل شده بر روی الکتروود SPE است. پس از الکتروپلیمریزاسیون پلی آنیلین به همراه تروپونین و هموگلوبین گلایکولیزه روی سطح، افزایشی در پیک کاهش مشاهده میشود (منحنی ۲) که به علت پوشش پلیمر هادی پلی آنیلین بر روی سطح RGO میباشد و نشاندهنده این موضوع است که پلی آنیلین اطراف ملکولهای تروپونین و هموگلوبین گلایکولیزه را در بر گرفته است. در مرحله بعدی، با اضافه کردن اکسالیکی اسید (منحنی ۳) از شدت پیک کاهش کاسته میشود. علت این موضوع، هیدرولیز باندهای ایمین و آمید تشکیل شده بین تروپونین / هموگلوبین گلایکولیزه با پلیمر مانریکس است که در واقع محل های مناسبی برای چسبیدن مجدد مولکول هدف (تروپونین و هموگلوبین گلایکولیزه) میباشد. نهایتاً با به دام افتادن ملکول هدف در سطح الکتروود، به دلیل پر شدن حفرات سطح الکترودهای N-MIP، انتقال الکترون از روی سطح به درون آن کاهش پیدا میکند که منجر به کاسته شدن مجدد از شدت پیک کاهش می شود. [۲۳ و ۲۵].



شکل ۹: منحنی جریان برای N-MIP و N-NIP برای غلظت های مختلف cTnT، cTnT (۰/۱، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۷۵، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵) آنالیز در محلول نیم میلی مولار از محلول [K3[Fe(CN)6]/K4[Fe(CN)6] در ۰/۱ مولار KCl انجام شد.



شکل ۱۰: منحنی جریان برای N-MIP و N-NIP برای درصدهای مختلف HbA1c. آنالیز در محلول نیم میلی مولار از محلول [K3[Fe(CN)6]/K4[Fe(CN)6] در ۰/۱ مولار KCl انجام شد.

شود که باعث ایجاد یک سیگنال می شود.

منحنی کالیبراسیون از طریق اندازه گیری جریان پیک آنودیک در محتوای متفاوت اتصال مجدد آنالیت با الکترودهای N-MIP ترسیم شد. با افزایش غلظت آنالیت در بافر اتصال مجدد، جریان پیک آنودیک به تدریج کاهش مییابد، اما پس از یک حد مشخص، ثابت می شود، زیرا محل های اتصال در پروب N-MIP اشباع شده اند. پاسخ خطی الکترودهای N-MIP برای آنالیت های cTnT و HbA1c به ترتیب در محدوده 0/02 تا 0/09 و 0/04 تا 0/81 میکروگرم در میلی لیتر بود که محدودیت تشخیص هر یک به ترتیب برابر با 0/008 نانوگرم در میلی لیتر و 4/3 نانوگرم در میلی لیتر بود. پروب کنترل که مولکولی با پلیمر رسانایی در غیاب پروتئین (NIP) ثبت شده بود، پاسخی به آنالیت ها نداشت. این نتیجه نشان داد که اثر متقابل آنالیت ها با فیلم کopolymer هدایت شده توسط سایت های چاپ شده کنترل می شود.

۳-۷- بررسی آنالیت در نمونه سرم

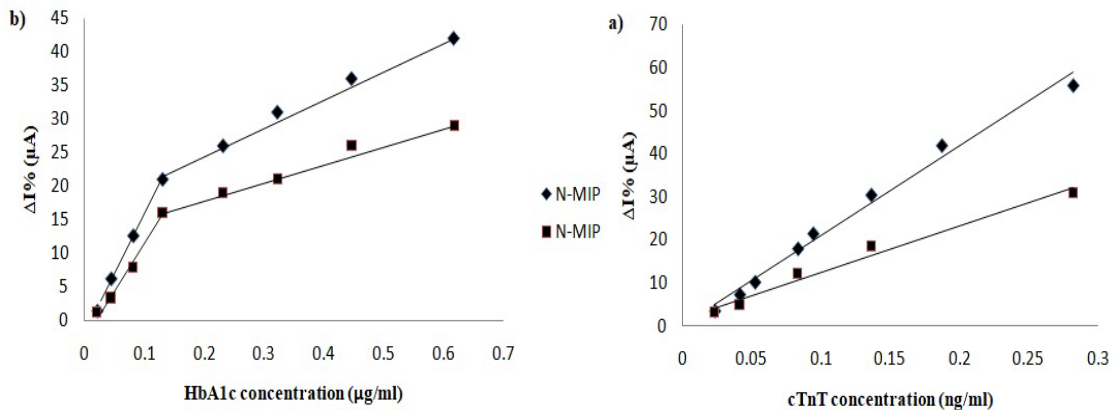
عملکرد حسگر N-MIP در حضور سایر اجزای خون با استفاده از سرم انسانی مورد بررسی قرار گرفت. حسگر N-MIP با نمونه های مختلف رقیق شده سرم 0/01 مولار به مدت 30 دقیقه در pH 7/4 داخل انکوباتور قرار گرفتند. جهت بررسی تکرار پذیری این آزمایش ها

هر آزمایش حداقل سه مرتبه انجام گردید.

همانطور که در شکل 11 مشاهده می گردد، با استفاده از تست DPV سیگنال کاهشی پروب در طی اتصال مجدد پروتئین اندازه گیری شد. با توجه به داده های بدست آمده با الکترودهای N-MIP، غلظت cTnT با HbA1c / پس از اتصال مجدد به طور مستقیم با کاهش پاسخ پروب متناسب بود، در حالیکه سیگنال های بدست آمده از پروب بدون تاثیر از دیگر پروتئین های درون سرم بود. این رفتار نشان داد که کاهش پاسخ پروب در نتیجه خاصیت اتصال مجدد بازاریابی آنالیت با پروب N-MIP بود.

به منظور بررسی قابلیت اطمینان پروب های N-MIP اختصاصی cTnT و HbA1c، غلظت cTnT و HbA1c در نمونه های خون برای 8 فرد سالم و بیمار با استفاده از پروب N-MIP با نتایج HPLC مقایسه شد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (جدول 2).

غلظت بدست آمده برای cTnT و HbA1c با استفاده از حسگرهای N-MIP دارای دقت بالا بوده و تغییرات کمی را نسبت به داده های HPLC نشان می دهد. انحراف معیار بدست آمده در این حسگر برای تشخیص تروپونین به طور میانگین 0/04 نانوگرم بر میلی لیتر بود که در مقایسه با پژوهش مشابه که توسط Oleksiy Krupin و همکاران انجام پذیرفت (با میانگین انحراف معیار 0/061 نانوگرم بر میلی لیتر) از دقت بالاتری برخوردار بود [26]. همچنین انحراف معیار این حسگر



شکل 11: الف) غلظت cTnT و ب) HbA1c در نمونه های سرمی اندازه گیری شده توسط حسگر های N-MIP (ng/ml)

جدول 2: غلظت cTnT و HbA1c در نمونه های خون حاصل از حسگر N-MIP و HPLC (ng/ml)

Sample	N-MIP sensor (cTnT)	HPLC (cTnT)	N-MIP sensor (HbA1c)	HPLC (HbA1c)
1	0.023+/-0.002	0.020	112+/-1.528	115
2	0.041+/-0.002	0.037	208+/-2.517	213
3	0.052+/-0.003	0.051	315+/-2.517	320
4	0.083+/-0.003	0.087	406+/-2.082	408
5	0.094+/-0.002	0.088	509+/-1.528	514
6	0.136+/-0.006	0.141	607+/-2.517	612
7	0.187+/-0.009	0.183	708+/-2.082	711
8	0.282+/-0.009	0.276	801+/-2.517	809

۵- مراجع

- [1] A. Maqsood, K. A. Kaid, M. Cohen, *Int. J. Cardiovas. Res.*, 2007, 4:1-5.
- [2] B. Cummins, M. L. Auckland and P. Cummins, Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* (1987), 113:1333-44.
- [3] K. Matsuoka, M. Maeda, A. Tsuji, Fluorescence enzyme immunoassay for insulin using peroxidase-tyramine-hydrogen peroxide. *Chem. Pharm. Bull.* (1979), 27:2345-50.
- [4] P. Norouzi, B. Larijani, F. Faridbod, M. R. Ganjali, Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Hemoglobin Immobilization on Gold Nanoparticle in FFT Continuous Cyclic Voltammetry Flow Injection System. *Int. J. Electrochem. Sci.* 5(2010), 1550-62.
- [5] A.J. S. Ahammad, S. Sarker and J.-J. Lee, *J. Nanosci. Immobilization of Horseradish Peroxidase onto a Gold-Nanoparticle-Adsorbed Poly(thionine) Film for the Construction of a Hydrogen Peroxide Biosensor. Nanotechnol.* 11(2011), 5670-76.
- [6] A. J. Saleh Ahammad, Yo-Han Choi, Electrochemical Detection of Cardiac Biomarker Troponin I at Gold Nanoparticle-Modified ITO Electrode by Using Open Circuit Potential. *Int. J. Electrochem. Sci.* (2011), 1906-16.
- [7] B. I. Podlovchenko, T. D. Gladysheva, E. A. Kolyadko, Experimental check-up of the relationship between transients of current and open circuit potential for strong adsorption of neutral species and ions on a hydrogen electrode. *J. Electroanal. Chem.* 552(2003), 85-96.
- [8] J. P. Wilburn, M. Ciobanu, D. A. Lowy, Characterization of Acrylic Hydrogels by Open Circuit Potential Monitoring. *J. Appl. Electrochem.* 34(2004), 729-734.
- [9] Bárbara V.M. Silva, Igor T, Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. *Biosensors and Bioelectronics.* 26(2010), 1062-67.
- [10] S. Ko, et al. , Electrochemical detection of cardiac troponin I using a microchip with the surface-functionalized poly(dimethylsiloxane) channel. *Biosensors and Bioelectronics.* 23(2007), 51-9.
- [11] Allen B.L., Kichambare P.D., Star, A. Carbon nanotube field-effect-transistor-based biosensors. *Adv. Mater.* 19 (2007), 1439-51.
- [12] Y. Liu, M. Wei, Y. Hu, L. Zhu, J. Du, An electrochemical sensor based on a molecularly imprinted polymer for determination of anticancer drug Mitoxantrone, *Sens. Actuator B- Chem.* 255(2018), 544-551.
- [13] L. Uzun, A.P.F. Turner, Molecularly-imprinted polymer sensors: realising their potential. *Biosens. Bioelectron.* 76 (2016), 131-144.
- [14] W. Guo, F. Pi, H. Zhang, J. Sun, Y. Zhang, X. Sun, A novel molecularly imprinted electrochemical sensor modified with carbon dots, chitosan, gold nanoparticles for the determination of patulin. *Biosens. Bioelectron.* 98 (2017), 299-304.
- [15] Z.Z. Yin, S.W. Cheng, L.B. Xu, et al., Highly sensitive and

برای تشخیص هموگلوبین گلیکولیزه به طور متوسط ۲/۱۶۱ نانوگرم بر میلی لیتر بود که آن نیز نسبت به پژوهش که توسط Hua Lin و همکاران صورت گرفته است پذیرفت (با میانگین انحراف معیار ۵/۴۳ نانوگرم بر میلی لیتر) از دقت بهتری بهره می برد [۲۶ و ۲۷].

۴- نتیجه گیری

در این پروژه، حسگرهای دوگانه مبتنی بر گرافن N-MIP برای تشخیص همزمان cTnT و HbA1c به روش الکتروشیمیایی طراحی شده است. پوشش N-MIP رسانا بر روی سطح پروب گرافنی از طریق الکتروپلیمریزاسیون مستقیم مونومر آنیلین در حضور cTnT یا HbA1c به عنوان مولکول ساختار زیست تقلید ایجاد شد. در نهایت، با حذف مولکول های زمینه، سطح پروب N-MIP آماده گردید. پاسخ خطی حسگر برای cTnT در محلول در محدوده ۰/۰۲ تا ۰/۰۹ نانوگرم بر میلی لیتر با حد تشخیص با محدودیت تشخیص ۰/۰۰۸ نانوگرم در میلی لیتر و برای HbA1c در محدوده ۰/۰۰۴ تا ۰/۰۱ میکروگرم در میلی لیتر با حد تشخیص با محدودیت تشخیص ۴/۳ نانوگرم در میلی لیتر به دست آمد. حسگر زیست تقلید به دست آمده از مزایای حساسیت خوب، ثبات بالا، هزینه کم، زمان پاسخ کوتاه و بازدهی خوب برخوردار است که در نتیجه آن را مناسب برای بررسی های بالینی معرفی می کند.

- selective sensor for sunset yellow based on molecularly imprinted polydopamine-coated multi-walled carbon nanotubes, *Biosens. Bioelectron.* 100 (2018), 565-570
- [16] Jin Zhang, Chaoying Wang, Yanhui Niu, Shijie Li, Rongqin Luo, Electrochemical sensor based on molecularly imprinted composite membrane of poly(o-aminothiophenol) with gold nanoparticles for sensitive determination of herbicide simazine in environmental samples. *Sens. Actuator B-Chem.* 249 (2017), 747-755.
- [17] J. Bai, X. Zhang, Y. Peng, X. Hong, Y. Liu, S. Jiang, Z. Gao, Ultrasensitive sensing of diethylstilbestrol based on AuNPs/MW-CNTs-CS composites coupling with sol-gel molecularly imprinted polymer as a recognition element of an electrochemical sensor. *Sens. Actuator B- Chem.* 238 (2017), 420-426.
- [18] M. Soleimani, Ma. Ghahraman Afshar, A. Shafaat, G.A. Crespo, High-Selective Tramadol Sensor Based on Modified Molecularly Imprinted Polymer-Carbon Paste Electrode with Multiwalled Carbon Nanotubes. *ELECTROANAL.* 25 (2013), 1159–1168.
- [19] Y. Sun, H. Du, Y. Lan, W. Wang, Y. Liang, C. Feng, M. Yang, Preparation of hemoglobin (Hb) imprinted polymer by Hb catalyzed eATRP and its application in biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 77 (2016), 894-900.
- [20] N. Karimian, M. Vagin, M.H. Arbab Zavar, M. Chamsaz, A.P.F. Turner, A. Tiwari, An ultrasensitive molecularly-imprinted human cardiac troponin sensor. *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013), 492-498.
- [21] F.T.C. Moreira, M.J.M.S. Ferreira, J.R.T. Puga, M.G.F. Sales, Screen-printed electrode produced by printed-circuit board technology. Application to cancer biomarker detection by means of plastic antibody as sensing material. *Sens. Actuator B- Chem.* 223 (2016), 927-935.
- [22] M. Abdorahim, M. Rabiee, S. Naghavi Alhosseini, M.R. Tahriri, S. Yazdanpanah, S.H. Alavi, L. Tayebi, Nanomaterials-based electrochemical immunosensors for cardiac troponin recognition: An illustrated review. *Trends Analyt. Chem.* 82 (2016), 337-347.
- [23] S. Yazdanpanah, M. Rabiee, M.R. Tahriri, M. Abdolrahim, L. Tayebi, Glycated hemoglobin-detection methods based on electrochemical biosensors. *Trends Analyt. Chem.* 72 (2015), 53-67.
- [24] S. N. Alam, N. Sharma, L. Kumar, Synthesis of Graphene Oxide (GO) by Modified Hummers Method and Its Thermal Reduction to Obtain Reduced Graphene Oxide (rGO). *Graphene*, 6 (2017), 1-18.
- [25] B. V. M. Silva, B. A. G. Rodríguez, G. F. Sales, M. D. P. T. Sotomayor, R. F. Dutra, An ultrasensitive human cardiac troponin T graphene screen-printed electrode based on electro polymerized-molecularly imprinted conducting polymer, *Biosensors and Bioelectronics*, 77 (2016), 978–985.
- [26] O. Krupin, P. Berini, Long-Range Surface Plasmon-Polariton Waveguide Biosensors for Human Cardiac Troponin I Detection. *Sensors (Basel)*. 3 (2019), 631
- [27] H. Lin, J. Yi, Current Status of HbA1c Biosensors. *Sensors (Basel)*. 3 (2017), 1798