[آسان داک](http://www.asandoc.com/) (www.Asandoc.com)

**بیو سنسورهای بهم پیوسته میکرو الکترود برای شناسایی هورمون تحریک کننده تیروئید**

***چکیده*** – شناسایی هورمون های تحریک کننده تیروئید (TSH) برای مداخله زود هنگام در بیماری و بازداری از همه گیری آن ضرورت دارد. هر چند حساسیت پایین شناسایی و محدودیت مربوط نیز هزینه بالای آن موجب محدود شدن کاربرد هر چه بیشتر بیوسنسورها (حسگرهای بیو) TSH می شود. به منظور ارتقای حساسیت و نیز کاهش هزینه، بیو سنسورهای میکروالکترود بهم پیوسته (IDμE) برای شناسایی حساس با هزینه پایین TSH آماده شده است. در واقع IDμE به عنوان ساختار حسّی بکار رفته و بیوسنسورها با فنآوری سیستم های میکرو – الکترومکانیکی (MEMS) تولید شده است که در تولیدات مقیاس بالا نیز قابل استفاده می باشد. در بیوسنسورهای IDμE از آزمایش های سنجش جاذب ایمنی مربوط به آنزیم (ELISA) و واکنش رسوب نقره آنزیمی برای رسیدن به حساسیت بالا استفاده می شود. لازم به ذکر است که بیو سنسورهای مبتنی بر IDμE قادر به شناسایی TSH تا mIU/L 014/0 بوده و از mIU/L 02/0 تا mIU/L 100 متغیر بوده و نیز از دقت بالایی در مورد TSH برخوردار می باشند. لازم به ذکر است که بیوسنسور پیشنهادی IDμE همچنین در شناسایی هورمون های دیگر نیز بکار می رود که برای تشخیص زودهنگام بیماری لازم می باشد.

**کلیدواژه ها:** بیوسنسور؛ میکرو الکترودهای بهم پیوسته؛ هورمون تحریک کننده تیروئید؛ شناسایی هورمون؛ رسوب نقره

**1. مقدّمه**

شناسایی حسّاس هورمون تحریک کننده تیروئید (TSH) بطور متداول و از دیرباز برای مداخله گری اولیه و به موقع بیماری و نیز جلوگیری از همه گیر شدن آن کاربرد داشته است. تغییر جزئی محتوای هورمون در بدن انسان می تواند بازتابی از وضعیت متابولیسم یک فرد بوده، و نیز پایه و اساس اصلی تشخیص این بیماری تلقی می شود. غلظت هورمون تحریک کننده تیروئید در خون عبارت از شاخص کلیدی پی بردن به نقش تیروئید می باشد. همچنین باید گفت که این عامل برای تشخیص بالینی و ارزیابی درمانی نی زاهمیت بسزائی دارد. از این رو در سال های اخیر، شناسایی حساس TSH در تحقیقات صورت گرفته در مورد درمان بالینی بسیار مهم شمرده می شود. تحقیق و بررسی در مورد بیوسنسورهای حساس جهت شناسایی TSH یکی از نکات کاملاً کلیدی می باشد که باید مورد توجه قرار گیرد.

امروزه، اغلب عیارسنجی های ایمنی TSH از فنآوری شناسایی نسل سوم استفاده می کنند یعنی که دارای حساسیت  می باشند که این میزان از سوی آکادمی ملّی بیوشیمی بالینی توصیه شده است. در اکثر این عیارسنجی های ایمنی نیز از شیوه شناسایی نورتابی شیمیایی یا روش الکترو نورتابی شیمیایی استفاده می شود. سونگا لی از تراشه عیارسنجی ایمنی تک مولکولی و طلا با الگوی نانوی ساندویچ برای انجام کیمت بندی وسیعی از TSH انسان استفاده نموده و به محدوده شناسایی zM 360 دست یافت. البته باید گفت فنونی که می توانند به محدوده پایین شناسایی برسند هزینه های بالایی را طلبیده و نیز آن دسته از فنونی که دارای هزینه پایین هستند نمی توانند به محدوده پایین شناسایی دست یابند. از این رو ارزیابی TSH نیاز به روشی متشکل از هزینه پایین و نیز محدوده پایین شناسایی دارد.

اندازه گیری رسانایی الکتریکی با استفاده از الکترودهای بهم پیوسته تولید شده در مقیاس میکرو یکی از شیوه های شناسایی الکتروشیمیایی محسوب شده و دارای مزایای متعددی از قبیل سرعت، سادگی و حساسیت بالا می باشد. محققان متعددی در این راستا گزارش نموده اند که برخی بیو سنسورهای الکتروشیمیایی مبتنی بر میکروالکترودهای بهم پیوسته (IDμE) برای شناسایی هورمون ها کاربرد دارد. برای مثال می توان به یک بیو سنسور ایمپدیمتری مبتنی بر میکرو الکترودهای بهم پیوسته اشاره نمود که برای تعیین پسماندهای آترازین توسعه یافته، و محدوده شناسایی آنها به μg/L 19/0 می رسد. بیو سنسور دارای آرایه الکترود میکرو گراف نیز برای شناسایی آنتی ژن ویژه پروستات بکار رفته و محدوده شناسایی آن معادل μg/L 9/0 بوده است. در واقع باید گفت که همگام با توسعه فنآوری تولید میکرو، خلأ میکرو الکترودهای بهم پیوسته به حداقل رسیده و بیو سنسورهای مبتنی بر میکروالکترودهای بهم پیوسته قابل ارتقاء می باشد.

به این منظور بیو سنسور TSH مبتنی بر IDμE را در این مقاله ارائه می کنیم. در این راستا از فنون تولید میکرو برای ساخت IDμE بهره برده، آنتی بادی روی انگشتان طلا را اصلاح نموده و در نتیجه بیو سنسور کامل شده است. همچنین حصر TSH با تکنیک عیارسنجی ایمنی جاذب و متصل به آنزیم (ELISA) صورت گرفته و توسط واکنش آنزیمی نقره شناسایی شده است. بیو سنسور TSH مبتنی بر IDμE قادر به تحقق حساسیت بالای مورد نیاز برای شناسایی TSH بوده و هزینه های کمتری را می طلبد.

**2. آزمایش**

***الف. معرّف و مواد بکار رفته***

کیت همراه آنتی بادی مونوکلونی TSH5E8 (mAb)، TSH10C7 mAb، آنتی ژن TSH و ایزی لینک (EL) فسفات آلکالین (ALP) از شرکت آبکام (هنگ کنگ، چین) تهیه شده است. گلوتارالدهیل، گلیسین و آلبومین سرم بووین (BSA) نیز از شرکت محصولات بیولوژیکی دینگو (بیجینگ، چین) خریداری شده است. اسید اسکوربیک 2 – فسفات (AAP) و 2 – مرکاپتواتانول از سیگما – آلدریچ (شانگهای، چین) بدست آمده است. آب خاصل میلی پر نیز با پایداری ویژه  18 تصفیه شده از سیستم تصفیه میلی کیو برای آماده سازی محلول ها در طول آزمایش های مختلف کاربرد داشته است. معرف ها و مواد شیمیایی بکار رفته در این آزمایش ها همگی از درجه تحلیلی معرف می باشد. همچنین تمامی مواد شیمیای بکار رفته بدون هیچ روند تصفیه دیگری مورد استفاده قرار گرفته اند.

از دون نوع بافر در آزمایش های الکتروشیمیایی استفاده شد: 0/01 mpL/ PBS (0/1 mol/L NaCl, pH 7/4) و بافر گلیسین – NaOH 0/1 mol/L (pH 9). آماده سازی عامل همراه شناسایی mAb-ALP طبق شیوه ساخت EL از آبکام انجام شده است. محلول شناسایی همراه mAb-ALP بعد از آماده سازی یا ذخیره سازی در دمای 4 درجه سانتیگراد قبل از بکارگیری نیز قابل استفاده می باشد.

***ب. ابزارهای بکار رفته***

تمامی روندهای اندازه گیری در دمای اطاق (25 درجه سانتیگراد) و با یک ایستگاه کاری الکتروشیمیایی اتولب PGSTAT100 انجام شده است (متروهم، سوئیس). بیوسنسور IDμE در هوا قرار داده شده و دو قطب به هر دو طرف IDμE اتصال یافته است.

***ج. تولید*** IDμE

فرآیند تولید زیرلایه IDμE در تصویر 1 نشان داده شده است. تمامی این روندها عبارت از فنآوری MEMS بوده و در تولید در مقیاس بزرگ نیز قابل استفاده می باشد. تمامی مراحل فوق باید تحت شرایط محیطی اطاق پاک انجام شود. در وهله نخست، لایه Au با ضخامت 200 نانومتر در ظرف شیشه ای تبخیر شده است. بعد از تبخیر از فتولیتوگرافی برای ایجاد الگوی الکترود روی سطح فیلم Au استفاده شده است. این لایه با محافت از ماسک فتورزیست توسط عامل لایه بردار Au (محلول ترکیبی I2 و KI) لایه برداری شده است. در نهایت فتورزیست بر روی الکترودهای Au کشش یافته و تولید زیرلایه IDμE کامل شده است.

***د. آماده سازی بیوسنسور*** IDμE

ابتدا به منظور بیحرکت نمودن بیومولکول ها روی انگشت طلای آرایه های IDμE ، شستشوی زیرلایه به ترتیب با استون، اتانول خاصل، محلول پیرانها (ترکیب 3 : 7 H2SO4 و H2O2) محلول NaOH و آب دیونیزه انجام شد. زیرلایه تمیز شده در محلول آب حاوی محلول 5 درصد 2 – مرکاپتواتانول به مدت 12 ساعت غوطه ور شد.

زیرلایه بعد از بررسی با آب DI تحت جریان نیتروژن خشک شده و در دمای 4 درجه به مدت 1 ساعت ذخیره شد. سپس این زیرلایه در محلول 5 درصد گلوتارالدهید به مدت 1 ساعت غوطه ور شده و با آب DI شستشو داده شد (تصویر 2 الف).

سپس بیحرکت سازی mAb حاصل روی زیرلایه انجام شده و بیوسنسور کامل شد (تصویر 2ب). انکوباته نمودن زیرلایه در mAb حاوی PBS در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 1 ساعت انجام شد و سپس با بافر PBS برای انتقال پروتئین اضافی و ضعیف شستشو داده شد. در مرحله بعد انکوباسیون زیرلایه در BSA یک درصد در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت جهت بلوکه نمودن محل های جذب روی زیرلایه صورت گرفت. زیرلایه اصلاح یافته mAb با آب شستشو شده و در دمای 4 درجه برای کاربرد آتی ذخیره می شود.

***ه. پروتکل تحلیلی بیوسنسور*** IDμE

بعد از اتصال mAb به انگشتان طلا به عنوان یک گیرنده، پروتئین STH و شناسایی همراه mAb-ALP به سطح بیوسنسور افزوده شده و بعد در دمای 37 درجه به مدت 30 دقیقه انکوباته شد. بعد از شستشو با بیوسنسور بطور کامل با بافر PBS، محلول رسوب نقره (0/1 mol/L گلیسین- NaOH حاوی 0/001 mol/L AAP و 0/005 mol/L AgNO3 ، pH 9) افزوده شده و در دمای 37 درجه به مدت 10 دقیقه در تاریکی مورد انکوباسیون قرار گرفت. سپس شستشوی زیرلایه با آب ID انجام شده و با جریان نیتروژن خشک شد.

اندازه گیری الکتریکی بیوسنسورهای IDμE با سیستم الکتروشیمیایی در دمای اطاق (25 درجه) انجام می شود. از روش ولتامتری با رویش خطی پتانسیل (LSV) در طیف پتانسیل 0 تا 50 mV در وقفه mV 1 و میزان اسکن 1 mV/s بکار رفته است. منحنی جریان در برابر پتانسیل ثبت شده، بگونه ای که رسانایی بین دو الکترود برای تحلیل کمّی TSH قابل محاسبه می باشد.

**تصویر 1.** شماتیک فرآیند تولید IDμE. (الف) تبخیر Au، (ب) لیتوگرافی، (ج) لایه برداری تر Au، (د) کشش فتورزیست



کشش فتورزیست

لایه برداری تر Au

فتولیتوگرافی

تبخیر Au

**تصویر 2.** آماده سازی و عیارسنجی بیو سنسور TSH . (الف) عملکرد 2 – مرکاپتواتانول و همراه گلوتارالدهید، (ب) حصر بی حرکت سازی آنتی بادی و جایگاه های جذب غیر ویژه بلوک، (ج) حصر آنتی بادی/ ترکیب ساختار ساندویچ آنتی بادی شناسایی TSH/ALP (د) رسوب نقره با AA حاصل از AAp

گلوتارالدهید 2 – مرکاپتواتانول الکترود Au



**3. نتایج و بحث و بررسی**

***الف. اصول تحلیلی بیوسنسور*** IDμE

بیوسنسور IDμE مبتنی بر فرمت عیارسنجی ایمنی ساندویچ شده با رسوب نقره آنزیمی برای شناسایی الکتریکی TSH می باشد. اصول تحلیلی بیوسنسور IDμE در تصویر شماره 2 نشان داده شده است. همچنین بی حرکت سازی کووالانسی TSH10C7 روی انگشت های Au مربوط به IDμE از راه پیوند سولفیدریل جهت حصر پروتئین TSH انجام شده است. معرفی یک نمونه TSH همراه با TSH5E8 mAb-ALP منجر به شکل گیری یک مجموعه ساندویچ شده TSH با mAb حصر شده و نیز شناسایی mAb همراه با ALP روی سطح انگشتان در نتیجه عیارسنجی ایمنی ویژه می شود (تصویر 2 ج). سپس ALP روی سطح الکترودهای Au موجب کاتالیز هیدرولیسیز AAP شده و یون های Ag را در محلول رسوب نقره به نقره متالیک در میکروگراف انجام می دهد (تصویر 2 د). رسوب Ag موجب اتصال الکتریکی ریزنمودار IDμE شده و افزایش رسانایی الکتریکی IDμE برای تحلیل کمّی غلظت TSH بکار می رود. طبق قانون اهم، جریان دو قطب IDμE دارای وضعیت نسبی به رسانایی الکتریکی می باشد. پس امکان محاسبه رسانایی الکتریکی IDμE بصورت فوری از منحنی 1-V بدست آمده در اندازه گیری LSV حاصل از ایستگاه کاری الکتروشیمیایی اتولب وجود دارد.

***ب. تعیین بیوسنسور*** IDμE

بسیاری از مواد بیولوژی شامل TSH5E8 mAb، TSH10C7 و پروتئین TSH در آزمایش های مربوط به شناسایی TSH کاربرد داشته است. آزمایش های متعدد کنترل نیز برای اندازه گیری منحنی های 1-V IDμE انجام شده تا امکان مطالعه عملکرد معرف های بیولوژی فوق الذکر وجود داشته باشد. منحنی های LSV بیوسنسور در طیف پتانسیل mV 0 تا 50 در شناسایی نمونه TSH آزمایش های کنترل در تصویر 3 وجود دارد. منحنی های LSV بیوسنسور IDμE در واکنش تا 20 mIU/L TSH دارای وضعیت خطی در شناسایی طیف پتانسیل بوده که نشان داد IDμE پر شده با رسوب نقره به عنوان یک رزیستور فیزیکی اندازه گیری شده توسط ایستگاه کاری الکتروشیمیایی عمل می کند.

در عین حال که محلول TSH جای خود را به محلول 1 درصد BSA داده است، همراه شناسایی mAb-ALP نیز بدون شناسایی آن جای خود را به ALP داده و یا mAb حصر شده به آزمایش کنترل اضافه نشده است، منحنی LSV بدست آمده دارای شیب پایین در مقایسه با منحنی تست عادی TSH می باشد. رسانایی الکتریکی بیو سنسور IDμE پایین بوده و نشان می دهد که ALP نمی تواند روی الکترودهای Au بیحرکت شود. همچنین TSH5E8 mAb، TSH10C7 و پروتئین TSH از جمله شرایط لازم برای بی حرکت نمودن ALP به شمار می رود. اگر یکی از آنها به واکنش اضافه نشود شناسایی ساختار ساندویچ mAb/TSH ، mAb-ALP حاصل نخواهد شد.

در مقابل منحنی LSV بیوسنسور در پاسخ به 20 mIU/L TSH دارای دامنه بالایی با رسانایی الکتریکی در حدود 2700 pS بوده است که به مراتب بیشتر از مقدار تقریبی 40 pS برای آزمایش کنترل می باشد. بیوسنسور مبتنی بر IDμE دارای محدوده پایین شناسایی با سیگنال بهینه به نسبت زمینه می باشد.

***ج. عملکرد تحلیلی بیوسنسور*** IDμE

طبق پروتکل تحلیلی بیوسنسور IDμE نمونه های متعدد TSH در غلظت های متفاوت با بیوسنسور IDμE تست شده است و منحنی های LSV برای IDμE مبنای بیوسنسور در پاسخ به پروتئین های TSH با غلظت متفاوت در تصویر 4 نشان داده شده است. منحنی های ویژگیهای خطی ولت – آمپر برای نمونه های TSH بدست آمده و نشان از رفتار ایده آل برای بیوسنسورهای مبتنی بر IDμE به عنوان یک رزیستور الکتریکی دارد. شیب منحنی برای مثال رسانایی الکتریکی بیوسنسور با افزایش غلظت نمونه های TSH بیشتر می شود.

وابستگی رسانایی بیوسنسور به غلظت TSH در تصویر 4 نشان داده شده است. رسانایی الکتریکی بیوسنسور دارای افزایش دینامیکی با افزایش غلظت TSH در طیف mIU/L 02/0 تا 100 mIU/L است. حساسیت بالای واکنش نیز در یک طیف خطی از 02/0 تا 100 بدست آمده است. محدوده شناسایی برای TSH توسط بیوسنسور IDμE معادل mIU/L 014/0 تعیین شده که بطور قابل توجهی برای شناسایی طیف غلظت TSH سرم انسانی پایین است. این نتایج به وضوح نشان می دهد که عیارسنجی ایمنی و الکتروشیمیایی بیو سنسور IDμE دارای دقت و ثبات قابل قبولی می باشد.

**تصویر 3.** منحنی های LSV بیوسنسور IDμE در پاسخ به (الف) 20 mIU/L TSH، (ب) BSA 1 درصد و در آزمایش کنترل (ج) با ALP بجای همراه شناسایی mAb-ALP، (د) بدون حصر اصلاح mAb



پتانسیل

جریان

**تصویر 4.** منحنی های LSV و کالیبراسیون رسانایی در نمونه های شناسایی TSH با غلظت های مختلف برای بیوسنسور IDμE



غلظت

رسانایی

***د. ویژگی اختصاص بیو سنسور*** IDμE

برای ارزیابی خاصیت گزینشی تکنیک بیوسنسور مبتنی بر IDμE جهت شناسایی همبودی احتمالی یا پروتئین های ماتریس مورد بررسی قرار گرفت. تصویر 5 سیگنال های رسانایی بیوسنسور را در پاسخ به پروتئین های متفاوت نشان می دهد. تصویر 5 نشان می دهد که برای غلظت ثابت mIU/L 20 TSH در محلول PBS مربوط به BSA و محلول های ترکیبی آزاد کننده هورمون تیروتروپین (TRH) و تیروگزین، واکنش های رسانایی دارای گوناگونی اندکی بوده و حاکی از آن است که ماتریس های پیچیده ای چون BSA مداخله اندکی با تعیین TSH با استفاده از این استراتژی دارد. همچنین در غیاب TSH، غلظت بالای پروتئین ها یا ماتریس های دیگر همچون BSA، TRH ، تیروگزین حاکی از واکنش قابل توجه رسانایی نبوده است. این مشاهدات از تعامل ویژه بالا بین TSH و آنتی بادی های مونوکلونی آن پشتیبانی نموده و نیز حاکی از آن است که رسوب آنزیمی نقره با واکنش ویژه بالا توسط ALP واسطه گری می شود.

**تصویر 5.** واکنش های رسانایی بیوسنسور IDμE به همبودی احتمالی پروتئین ها یا ماتریس ها



**4. نتیجه گیری**

در این مقاله IDμE حاصل از فنآوری MEMS در تعیین الکتروشیمیایی حساس TSH بکار رفته که نشان از یک پروتکل جدید عیارسنجی ایمنی با تلفیق هزینه پایین و حساسیت بالا دارد. در واقع IDμE بیوسنسور TSH با فرایند لیتوگرافی حاصل شده و در مقیاس های بزرگ نیز با هزینه پایین قابل تولید است. پروتئین TSH روی IDμE به عنوان نوع ساندویچی توسط ELISA بی حرکت شده و از این رو بیوسنسور دارای ویژگی بهینه در نتیجه تعامل آنتی ژن – آنتی بادی می باشد. محلول رسوب نقره برای تبدیل علامت بیوشیمیایی به الکتریکی کاربرد داشته و موجب ارتقای حساسیت بیو سنسورها می شود. بیو سنسور پیشنهادی IDμE ساده، حساس، ارزان و کارآمد می باشد. بیو سنسور مبتنی بر IDμE می تواند به شناسایی حساس و ارزان TSH نائل آمده و برای استراتژی های مداخله در بیماری الزامی می باشد. همچنین می توان از بیوسنسور IDμE در شناسایی هورمون های دیگر نیز بهره برد.