

عامل دار کردن اکسید گرافن با زنجیره سنگین آنتی بادی و برهم کنش آن با زنجیره سبک نشان دار شده برای تشخیص پروتئین استخوانی گالا

جواد غلامی^{۱*}، مهرداد منطقیان^۲

۱. گروه شیمی کاربردی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

۲. دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده



واژه‌های کلیدی:

اکسید گرافن، فلورسانس، ایمنوساندویچ، پروتئین استخوانی گالا، زنجیره آنتی بادی

Keywords:

Graphene Oxide,
Fluorescence,
Immunosandwich,
Bone Gla Protein,
Antibody Chain

دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۷

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۰

نوع مقاله: علمی - پژوهشی

بایومارکرها ساختارهای زیستی مانند پروتئین می‌باشند که اندازه گیری آن‌ها در تشخیص زود هنگام بیماری‌های خطرناکی مثل سرطان بسیار مورد توجه می‌باشد. اکسید گرافن به دلیل ویژگی‌های خاصی که دارد در سال‌های اخیر برای تشخیص نمونه‌های زیستی خاص بر اساس اسپکتروسکوپی لومینسانس بسیار مورد توجه بوده است. در این پژوهش اکسید گرافن سنتز شده و با استفاده از اسپکتروسکوپی فوتوالکترون اشعه ایکس آنالیز شده است. در ادامه اکسید گرافن در فاز محلولی در حضور معرف‌های شیمیایی با استفاده از زنجیره سنگین آنتی بادی پروتئین استخوانی گالا عامل دار شده و به صورت زیستی شناسایی شد. در ادامه برهم کنش اکسید گرافن عامل دار شده توسط زنجیره سنگین آنتی بادی با زنجیره سبک آنتی بادی نشان‌دار شده، منجر به کاهش نشر فلورسانس شد. با اضافه کردن پروتئین استخوانی گالا که یک بایومارکر بافت استخوان می‌باشد، به محلول حاوی اکسید گرافن عامل دار شده و زنجیره سبک نشان دار شده بر اساس مکانیسم ایمنوساندویچ، شدت نشر فلورسانس بازیابی شده و از آن برای شناسایی پروتئین استخوانی گالا استفاده شد، که این سیگنال منجر به شناسایی بایومارکر در محدوده غلظت‌های نانومولار شد.

مقدمه

طراحی شده‌اند. در این سیستم‌ها ابتدا قطعه‌ای از آنتی بادی با استفاده از فلوفور عامل دار می‌شود. آنتی بادی از قطعات مختلف تشکیل شده است.

کوینچ بادی سیستم‌های نوین بایو سنسوری می‌باشند که بر اساس وابستگی نشر فلورسانس سیستم ساخته شده به غلظت آنتی ژن مربوطه

* عهده‌دار مکاتبات

+E-mail: j.gholami@malayeru.ac.ir

رجاع: جواد غلامی، مهرداد منطقیان، عامل دار کردن اکسید گرافن با زنجیره سنگین آنتی بادی و برهم کنش آن با زنجیره سبک نشان‌دار شده برای تشخیص پروتئین استخوانی گالا،

نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۳) ۴۴: ۲۳ تا ۳۰ (۱۴۰۴).

برای اکسید گرافن اثر خاموش سازی فلورسانس بسیار بالا می‌باشد. بنابراین برهم کنش سطح اکسید گرافن با DNA منجر به کاهش شدت فلورسانس DNA نشان دار شده و در ادامه برهم کنش رشته‌های DNA با رشته‌های متناظر خود و جدایش از سطح اکسید گرافن منجر به افزایش شدت فلورسانس می‌شود. این افزایش شدت فلورسانس به عنوان سیگنال تشخیصی مورد استفاده قرار می‌گیرد. تغییرات حاصل در نشر فلورسانس معمولا ناشی از برهم کنش‌های پیوندهای π و گروه‌های عاملی اکسیدی و هیدروکسیلی سطح اکسید گرافن با عامل فلورسانس دهنده می‌باشد، که منجر به خاموش شوندگی فلورسانس می‌شود [۱۲]. در سال‌های اخیر تحقیقات در این زمینه ادامه یافته است، به عنوان مثال به فرایندی مخالف مکانیسم گفته شده در بالا، برای تشخیص آنزیم هلیکاز می‌توان اشاره کرد [۱۳]. از آیتامرها نیز در حضور اکسید گرافن در تشخیص نمونه‌های زیستی با فرایندهای متفاوت‌تری نیز استفاده شده است [۱۴-۱۵]. همچنین در تشخیص پروتئین‌ها و دیگر گونه‌های زیستی نیز از جمله عامل‌های پاتوزنیک و رشته‌های RNA از قابلیت خاموش سازی فلورسانس اکسید گرافن بر اساس روش‌های فلورسانسی استفاده شده است [۱۶-۱۷]. در کنار استفاده از اثر خاموش سازی، اکسید گرافن به عنوان عامل نشر دهنده فلورسانس نیز در تشخیص نمونه‌های زیستی استفاده شده است. با توجه به اینکه اکسید گرافن دارای نشر فلورسانس می‌باشد از این خاصیت اکسید گرافن در جهت تشخیص نمونه‌ای زیستی مانند دوپامین و ویتامین B12 استفاده شده است. [۱۸-۱۹]. در سال‌های اخیر با توجه به نشر فلورسانس اکسید گرافن، افزایش شدت نشر نانولایه‌های گرافنی به منظور بالا بردن قابلیت‌های فلورسانسی مورد توجه قرار گرفته است. از جمله مهم‌ترین روش‌ها در این زمینه می‌توان به عامل دار نمودن لایه‌های اکسید گرافن با استفاده از مولکول‌های آلی برای تشخیص گونه‌های مختلف مانند آهن اشاره نمود [۲۰].

در این پژوهش عامل دار کردن اکسید گرافن با استفاده از زنجیره‌های سنگین (Vh) آنتی بادی BGP و برهم کنش آن با زنجیره سبک آنتی بادی (VI) نشان دار شده با رنگدانه برای شناسایی BGP استفاده شده است. در صورتی که در فرایندهای استفاده از اکسید گرافن در تشخیص نمونه‌های زیستی، معمولا صرفا از اثر خاموش کنندگی اکسید گرافن استفاده می‌شود اما در این پژوهش اکسید گرافن با زنجیره سنگین آنتی بادی عامل دار شده و برهم کنش آن با زنجیره سبک آنتی بادی نشان دار در ابتدا باعث کاهش شدت فلورسانس شده و در ادامه حضور BGP شدت نشر فلورسانس افزایش داده که به عنوان سیگنال تشخیص استفاده شد، که منجر به شناسایی پروتئین با دقت مناسبی شد.

قسمت Y شکل آنتی بادی از چهار زنجیره پلی پپتیدی تشکیل شده است که شامل دو زنجیره سنگین و دو زنجیره سبک می‌باشد که با استفاده از گروه‌های دی سولفیدی بهم اتصال دارند. هر زنجیره از دو قسمت متغییر (V) و ثابت (C) تشکیل شده است. در سیستم‌های کوینچ بادی، قطعات آنتی بادی با فلورفورهای آلی مانند مشتقات رودامین از جمله کربوکسی تترامتیل رودامین (TMARA) و همچنین اتصال دهنده پلی پپتیدی عامل دار می‌شوند. با توجه به برهم کنش بین فلورفور و قطعه آنتی بادی برای کاربردهای تشخیصی استفاده می‌شود [۱].

بایومارکرها ساختارهای زیستی مانند پروتئین‌ها می‌باشند که در بدن نشانگر فعالیت ویژه‌ای در بافت‌ها می‌باشند. در سال‌های اخیر اندازه‌گیری بایومارکرها در تشخیص زود هنگام ناهنجاری‌های بدن بسیار مورد توجه بوده است، زیرا میزان بعضی از بایومارکرها نشان دهنده بیماری‌های خطرناکی مانند سرطان در بافت می‌باشد [۳-۲]. پروتئین استخوانی گالا (BGP)^۲ از جمله بایومارکرها می‌باشد که نشان دهنده فعالیت‌های استخوان می‌باشد. این پروتئین حدود ۲۵ درصد از پروتئین‌های غیر کلاژنی استخوان را تشکیل می‌دهد [۴-۵]. این پروتئین بایومارکر مناسبی برای بررسی متابولیسم استخوان می‌باشد [۶]. بنابراین میزان پروتئین استخوانی گالا در حین فرایندهای درمانی استخوان یا بیماری‌های مانند سرطان در استخوان دچار تغییر می‌شود [۷]. برای اندازه‌گیری میزان پروتئین استخوانی گالا بعد از کشف آن از رادیوایمونوآرایه‌ها استفاده شده است که روشی بسیار پیچیده می‌باشد [۶]. در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های فلورسانسی برای تشخیص و اندازه‌گیری پروتئین استخوانی گالا مورد توجه بوده است. از جمله این روش‌ها استفاده از کوینچ بادی‌ها می‌باشد [۸-۹].

در سال‌های اخیر نانومواد کربنی در طیف سنجی فلورسانس برای فرایندهای سنسوری مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از نانومواد کربنی به دو صورت عامل خاموش کننده و عامل فلورسانس کننده می‌باشد. در نانومواد خاموش کننده از نانومواد کربنی به عنوان عامل خاموش ساز استفاده می‌شود، به این ترتیب که در حضور گونه مورد شناسایی، تغییر شدت فلورسانس اندازه‌گیری می‌شود. در نانو مواد کربنی که عامل فلورسانس کننده باشند، با استفاده از عامل دار نمودن سطح نانوماده بازده فلورسانسی و برهم کنش آن با آنالیت افزایش داده می‌شود [۱۰].

اکسید گرافن از جمله نانومواد کربنی می‌باشد که در زمینه استفاده از روش طیف سنجی فلورسانس برای تشخیص نمونه‌های زیستی مورد استفاده قرار گرفته است. اکسید گرافن بدلیل خواصی مانند راحت تر عامل دار شدن، و سنتز در محیط محلولی، همچنین پایداری مناسب در فاز محلول در زمینه‌های مختلف کاربرد دارد [۱۱]. تقریبا اولین کارهای تحقیقاتی در حوزه استفاده از اکسید گرافن در زمینه تشخیص نمونه‌های زیستی بر اساس برهم کنش سطح اکسید گرافن با DNA تک رشته و واکنش متقابل آن با تک رشته مکمل می‌باشد.

(۱) Biomarkers

(۲) Bone gala protein

بخش تجربی**مواد و روش‌ها**

مواد پتاسیم پرمنگنات، سدیم نیترات، اسید سولفوریک غلیظ، پروکسید هیدروژن، اسید کلریدریک با خلوص بیش از ۹۹ درصد از شرکت مرک^۱ و گرافیت از شرکت دایجانگ^۲، کیت‌های کلون کننده PCR از شرکت تاکارا بیو^۳، کیت ی سولفیدی Ecoli از شرکت روچه^۴، پروتین استخوانی گالا (BGP) از شرکت جن-اسکرپیت^۵، هیستدین تگ نیکل از شرکت جی ای هلزکر^۶، نانوفیلترهای نانوسپ 10k از شرکت پال^۷، تترامیتیل رودامین ایزوتیوسیانات از شرکت بیوتیوم^۸، ایموبلاک از شرکت دی سی فارما^۹، آنتی هیستدین از شرکت کیاجن^{۱۰}، و تترامیتیل بنزیدین (TMBZ) و البومین سرم انسانی از شرکت سیگما-آلدريج^{۱۱} و پنی سیلین از شرکت تکنولوژی‌لایف^{۱۲} تهیه شده‌اند. طیف فوتوالکترون اشعه ایکس (XPS) نمونه‌ها با استفاده از دستگاه Shimadzu ESCA-3400 electron spectrometer با استفاده از استاندارد نقره و منبع (Mg K α (10 kV, 10 mA)) با آماده‌سازی نمونه‌ها به دو روش قطره‌ای بر روی ویفر سلیکونی و پودر بر روی چسب کربنی استفاده شده است. طیف فلورسانس نمونه‌ها با استفاده از دستگاه fluorescence spectrophotometer Model FP-8500 (JASCO) استفاده شده است.

سنتز اکسید گرافن

در این پروژه برای سنتز اکسید گرافن از روش هامر استفاده شده است [۲۱]. بدین صورت که حدود ۱ گرم پودر گرافیت را به همراه ۱ گرم نیترات سدیم به ۴۶ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ در حمام یخ اضافه نموده به مدت ۳۰ دقیقه هم‌زده می‌شود. در ادامه حدود ۶ گرم پرمنگنات پتاسیم به مخلوط به آرامی اضافه می‌شود و دمای مخلوط در زیر ۱۵ درجه سلسیوس در حمام یخ حفظ می‌شود. سپس دمای مخلوط به حدود ۴۰ درجه سلسیوس بالا رفته و برای مدت ۲ ساعت با استفاده از هیتر مگنت مغناطیسی هم‌زده می‌شود. سپس حدود ۸۰ میلی لیتر آب مقطر به مخلوط اضافه شده و در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت هم‌زده می‌شود. در ادامه ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر و ۲ میلی لیتر پروکسید هیدروژن (۳۰٪) در دمای زیر ۶۰ درجه سلسیوس به مخلوط اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه هم‌زده می‌شود. مخلوط حاصل را پس از سرد شدن، فیلتر نموده و با استفاده از اسید کلریدریک (۱٪) و آب مقطر شستشو داده می‌شود. محصول پودر در دمای اتاق خشک شده و با استفاده از اولتراسونیک

تحت شرایط معمولی به مدت ۳۰ دقیقه به صورت لایه‌های اکسید گرافن در آب مقطر پخش می‌شوند. سپس سوسپانسیون اکسید گرافن را با استفاده از چند مرتبه سانتریفیوژ در ۱۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه و جدا نمودن ذرات مریی موجود در سوسپانسیون، برای مراحل بعدی ذخیره می‌شود.

عامل دار نمودن اکسید گرافن با زنجیره سنگین آنتی بادی (Vh)

مقدار حدود ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون اکسید گرافن و ۱۵۰ میکرولیتر از محلول vh مربوط به آنتی بادی BGP به محلول حاوی ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات با pH حدود ۷ و محلول هیدروکسی سوکسین ایمیدو ۴ مولار و محلول ۱-اتیل-۳-(۳-دی متیل امینو پروپیل)کربودی ایمید ۲ مولار اضافه نموده، و در دمای محیط به مدت ۱ شبانه روز به آرامی هم‌زده شد. سپس با استفاده از نانوفیلترهای نانوسپ 10k به همراه سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس صاف شده و پس از شستشو با بافر فسفاتی دوباره نانولایه‌های عامل‌دار شده با استفاده از پیپتید در بافر فسفات پخش شده و در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس ذخیره می‌شود [۲۲].

استفاده از اکسید گرافن عامل‌دار شده با (Vh) برای تشخیص BGP

نشر فلورسانس مخلوط VI-TRITC (۱۵۰ $\mu\text{g/ml}$) و اکسید گرافن-Vh (۱۳۰ $\mu\text{g/ml}$) در حضور غلظت‌های مختلفی از بایومارکر BGP ($7/5 \times 10^{-9}$ M تا 2×10^{-7} M) در بافر PBS، زمان برهم‌کنش ۲۵ دقیقه، طول موج برانگیختن (λ_{ex}) ۵۴۴ نانومتر، و طول موج نشر (λ_{em}) ۵۸۰ نانومتر بررسی شده است.

نتیجه‌ها و بحث**شناسایی اکسید گرافن عامل دار شده با استفاده از VH**

برای شناسایی اکسید گرافن از طیف‌های XPS با دستگاه با منبع Mg K α استفاده شده است که دارای خط طیفی ۱۲۵۶ eV می‌باشد. بر اساس طیف XPS و فیت نمودن نمودار با استفاده از تابع لورنتزین که در زیر آمده است:

$$L(x) = 1/\pi (1/2 \Gamma) / ((x - x_0)^2 + (\frac{1}{2} \Gamma)^2) \quad (1)$$

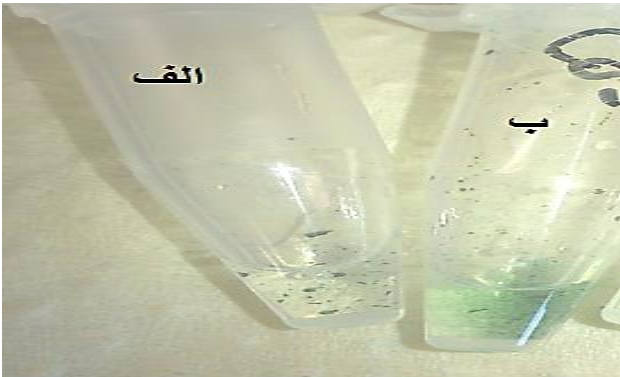
در تابع (۱) x_0 موقعیت مرکز پیک و Γ پارامتر ویژه پهنای پیک می‌باشد. طیف XPS فیت شده با استفاده از تابع لورنتزین برای اوربیتال 1 s مربوط به عناصر کربن و اکسیژن که عناصر اصلی

(۱) Merck
(۳) Bio takara
(۵) Genscript
(۷) Pall
(۹) Dee Sun Pharma
(۱۱) Sigma-aldrich

(۲) Daejung
(۴) Roche
(۶) GE Healthcare
(۸) Biotium
(۱۰) Qiagen
(۱۲) Technolife

جدول ۱ - درصد گروه‌های عاملی روی سطح اکسید گرافن براساس طیف فیت شده اوربیتال 1s کربن با استفاده از معادله ۲.

درصد	گروه عاملی متناظر	موقعیت پیک (eV)
۳۸%	کربن (C-C, C=C)	۲۸۵/۲eV
۶%	هیدروکسی و اپوکسی (C-OH)	۲۸۶eV
۴۰%	کربونیل (C=O)	۲۸۷/۶eV
۱۶%	کربوکسیل و استر (COO)	۲۸۹/۳eV

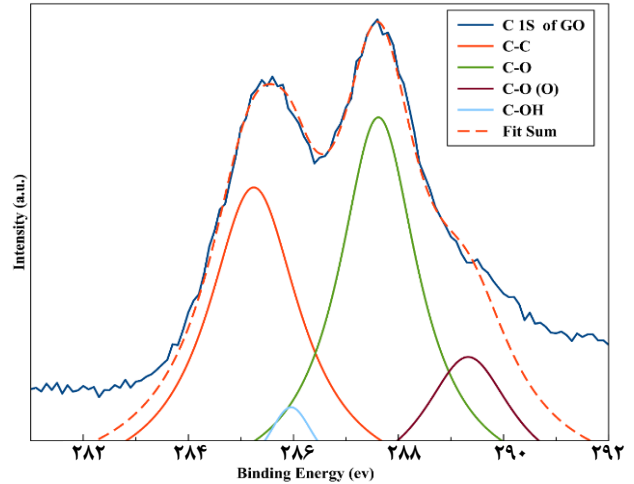


شکل ۲ - الف) اکسید گرافن شاهد، ب) اکسید گرافن عامل‌دار شده با Vh

اضافه شد. با توجه به برهم کنش معرف کانجوگه با پروتئین و در ادامه برهم کنش آن با تترا متیل بنزیدین در حضور پراکسید هیدروژن، تغییر رنگی به سمت رنگ سبز از خود نشان می‌دهند، بنابراین در صورت عامل دار شدن سطح اکسید گرافن با پروتئین باید در مخلوط نهایی رنگ سبز مشاهده شود. با توجه به شکل (۲-ب) مشاهده می‌شود که در ساختار عامل‌دار شده رنگ سبز که نشان دهنده عامل دار شدن سطح اکسید گرافن است، دیده می‌شود و اکسید گرافن شاهد در شکل (۲-الف) تغییر رنگی از خود نشان نداده است. در نتیجه عامل‌دار شدن سطح اکسید گرافن با استفاده از vh با موفقیت صورت گرفته است.

بررسی نشر فلورسانسی برهم کنش اکسید گرافن عامل‌دار شده و BGP

در ادامه بررسی برهم کنش‌های موجود بین اکسید گرافن عامل‌دار شده با vh و VI-TRITC (۱۵۰ μg/ml) در حضور BGP مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا طیف نشر فلورسانس VI-TRITC همان گونه که در شکل (۳-الف) مشاهده می‌شود ثبت شد، سپس به محلول مورد نظر غلظت یکسانی نسبت به VI از محلول اکسید گرافن عامل‌دار شده با VH (۱۳۰ μg/ml) اضافه می‌شود. همان گونه که در شکل (۳-ب) مشاهده می‌شود، خاموش سازی فلورسانس با افزایش اکسید گرافن عامل‌دار شده با vh اتفاق می‌افتد که مورد انتظار نیز می‌باشد. اثر خاموش سازی اکسید گرافن با استفاده از مکانیسم انتقال انرژی رزونانسی و برهم کنش‌های غیر کووالانسی ناشی از عواملی مانند برهم کنش‌های پیوندهای π-π بین ناحیه ای با اوربیتال هیبریدی sp² اکسید گرافن و حلقه‌های آروماتیک TRITC، پیوندهای هیدروژنی اسیدهای آمینه



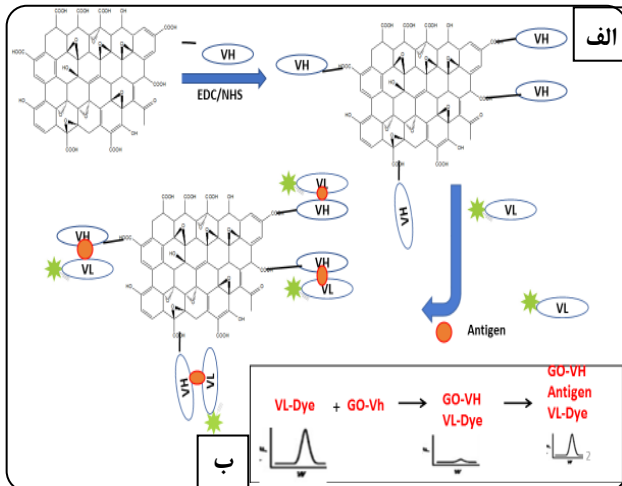
شکل ۱ - طیف Deconvolution اوربیتال 1s کربن اکسید گرافن رنگ آبی، رنگ قرمز پیوند C-C، رنگ سبز پیوند C=O، رنگ بنفش گروه COOH، رنگ آبی گروه C-OH، نقطه چین قرمز مجموع طیف‌های فیت شده

موجود در ساختار شیمیایی اکسید گرافن می‌باشند در شکل ۱ آمده است. همان گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، در طیف 1s (Deconvolution) کربن گروه‌های عاملی مختلف بر روی سطح اکسید گرافن پیک‌های مشخصه مختلفی از خود نشان داده‌اند که به صورت خلاصه در جدول ۱ آمده‌اند. در طیف کربن 1s ناحیه‌های با اوربیتال هیبریدی sp² که حلقه‌های اکسیژنه نشده کربنی (c-c و c=c) می‌باشند در ناحیه ۲۸۵/۲eV با پهنای پیک نیمه ماکزیمم (FWHM=۰/۹۹)، کربن مربوط به گروه‌های هیدروکسیل و اپوکسی ناحیه ۲۸۶/۱eV با پهنای پیک نیمه ماکزیمم (FWHM=۰/۶)، گروه‌های کربونیل در ۲۸۷/۵eV (FWHM=۰/۸۵) و گروه‌های کربوکسیل و استری در ناحیه ۲۸۹/۱eV (FWHM=۰/۷) مشخص می‌باشند. با استفاده از میزان سطح زیر نمودار پیک‌های هر کدام از گروه‌های عاملی و براساس تابع ۲ میزان درصد گروه‌های عاملی مورد نظر در جدول ۱ آمده است [۲۴، ۲۳، ۱۹].

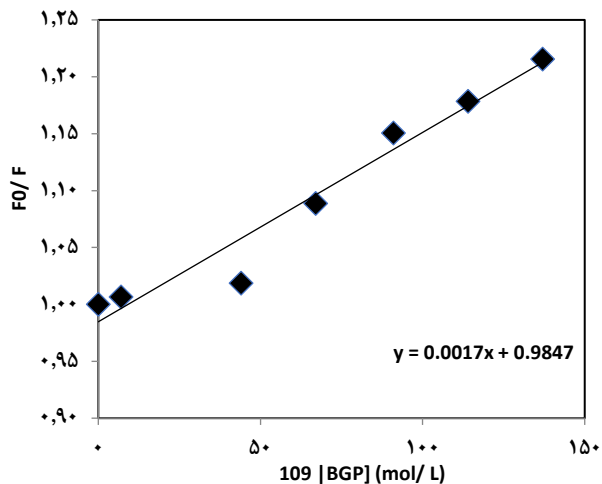
$$Y(x) = a / (\pi dx (1 + (x - x_0)^2 / dx^2)) \quad (2)$$

در تابع ۲ پارامترهای a، dx و x₀ به ترتیب سطح پیک، نصف عرض در نیمه ارتفاع ماکزیمم و موقعیت پیک می‌باشند.

برای تایید عامل‌دار شدن اکسید گرافن با استفاده از vh از روش زیستی استفاده شده است. برای این فرایند به محلول عامل‌دار شده اکسید گرافن و همچنین سوسپانسیون اکسید گرافن به عنوان شاهد معرف کانجوگه (His-HRP conjugate) و محلول ۵٪ ایمنو بلاک اضافه شد. در ادامه بعد از یک ساعت هر دو مخلوط اکسید گرافن عامل‌دار شده (۱۳۰ μg/ml) و اکسید گرافن (۱۳۰ μg/ml) شاهد سانتی‌فیوژ شده و به خوبی شستشو شده است. سپس به هر دو سوسپانسیون تترا متیل بنزیدین (TMBZ) (۱ mg/ml) و پروکسید هیدروژن (۰/۰۲٪)



شکل ۴ - الف) شماتیک برهم کنش اکسید گرافن -Vh با VL-TRITC در حضور BGP، ب) شماتیک تغییرات شدت نشر فلورسانس در هر مرحله از برهم کنش.

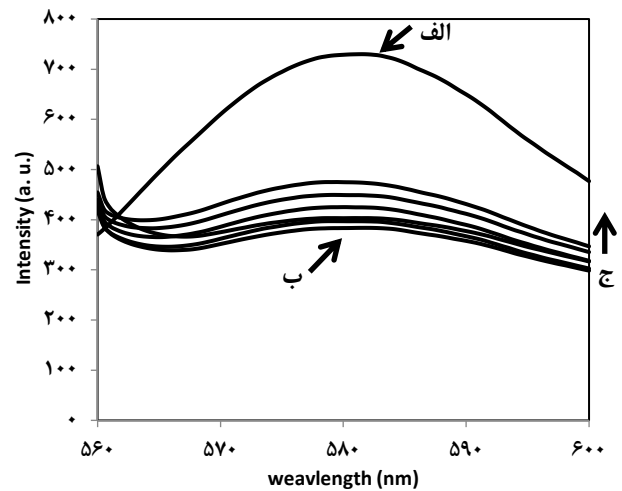


شکل ۵ - منحنی کالیبراسیون F/F_0 مخلوط VL-TRITC ($150 \mu\text{g/ml}$) و اکسید گرافن-Vh ($120 \mu\text{g/ml}$) در حضور غلظت‌های مختلفی از بایوکارکر BGP ($7/5 \times 10^{-9} \text{ M}$ تا $2 \times 10^{-7} \text{ M}$) در بافر PBS و زمان برهم کنش ۲۵ دقیقه ($\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$ ، $\lambda_{ex} = 544 \text{ nm}$).

$$\text{LOD} = 3 \text{ Sd/m} \quad (4)$$

$$\text{LOQ} = 10 \text{ Sd/m} \quad (5)$$

در نتیجه LOD و LOQ به ترتیب ۱۱ و ۳۵ نانومولار می‌باشند. برای بررسی فرایند با استفاده از اکسید گرافن -Vh و VL-TRITC در غیاب BGP و با افزایش حجم‌های مختلفی از بافر PBS مورد بررسی قرار گرفت، که نتایج سیگنال مشخصی از خود نشان نداد به گونه‌ای که در شکل ۶- الف نیز مشاهده می‌شود. همچنین فرایند در غیاب اکسید گرافن با استفاده از VL-TRITC و VH در حضور غلظت‌های مختلفی از BGP نیز مورد بررسی قرار گرفت، به گونه‌ای که در شکل (۶- ب)



شکل ۳ - الف) نشر فلورسانس VL-TRITC ($150 \mu\text{g/ml}$)، ب) نشر فلورسانس VL-TRITC ($150 \mu\text{g/ml}$) پس از افزایش اکسید گرافن-Vh ($130 \mu\text{g/ml}$) ج) نشر فلورسانس مخلوط VL-TRITC ($150 \mu\text{g/ml}$) و اکسید گرافن-Vh ($130 \mu\text{g/ml}$) در حضور غلظت‌های مختلفی از بایومارکر BGP ($7/5 \times 10^{-9} \text{ M}$ تا $2 \times 10^{-7} \text{ M}$) که با مکان نما افزایش غلظت مشخص شده است، در بافر PBS و زمان برهم کنش ۲۵ دقیقه ($\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$ ، $\lambda_{ex} = 544 \text{ nm}$).

و سطح اکسید گرافن، برهم کنش الکتروستاتیک بین بار منفی اکسید گرافن و وکتورهای نشاندار شده، و برهم کنش‌های هیدروفوب شدت نشر فلورسانس کاهش می‌یابد [۲۳]. در ادامه به گونه‌ای که در شکل (۳- ج) مشاهده می‌شود با افزایش غلظت‌های مختلف از بایومارکر آنتی ژنی BGP، افزایش شدت نشر فلورسانس اتفاق می‌افتد. البته هنگام افزایش BGP مخلوط هم‌زده شده و حدود ۲۵ دقیقه بعد طیف فلورسانس ثبت می‌شود.

در این فرایند افزایش شدت نشر فلورسانس بعد از خاموش سازی با اکسید گرافن عامل دار شده با Vh و در حضور غلظت‌های مختلف از BGP می‌تواند ناشی از مکانیسم‌های ایمنوساندویچی باز باشد. در مکانیسم‌های ایمنوساندویچی باز با استفاده از قطعات متغیر آنتی بادی مانند VH و VL، براساس برهم کنش قطعات آنتی بادی و آنتی ژن به صورت غیر رقابتی تشخیص نمونه صورت می‌گیرد [۲۵]. بر طبق این مکانیسم به گونه‌ای که در شکل ۴ به صورت شماتیک مشاهده می‌شود، BGP در بین VH و VL قرار گرفته، که این نوع از برهم کنش باعث جدایش VL-TRITC از سطح اکسید گرافن می‌شود و در نتیجه آن راندمان خاموش سازی انتقال انرژی رزونانسی کم می‌شود که منجر به افزایش شدت نشر فلورسانس می‌شود.

منحنی کالیبراسیون برای F/F_0 که F نشر فلورسانس در حضور BGP و F_0 نشر فلورسانس در غیاب BGP می‌باشد، نسبت به غلظت‌های نانومولار BGP در شکل ۵ آمده است که رابطه خطی با شیب 0.0017 دارا می‌باشد. بنابراین برای محاسبه حد تشخیص (LOD) و حد تعیین کمی (LOQ) از روابط ۴ و ۵ استفاده شده است که در این روابط انحراف از معیار بلانک (Sd) 0.006 می‌باشد [۲۰].

نتیجه گیری

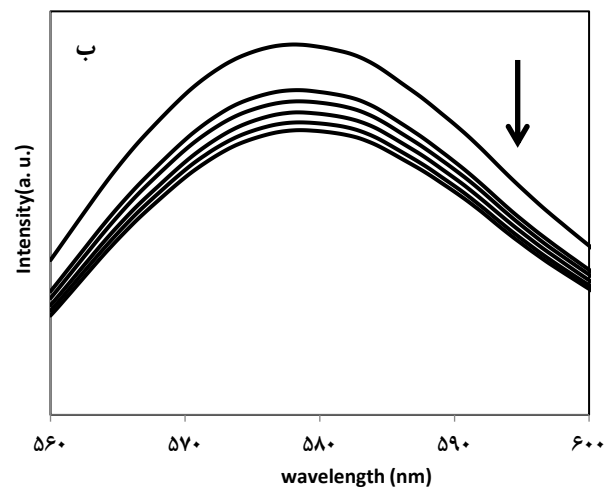
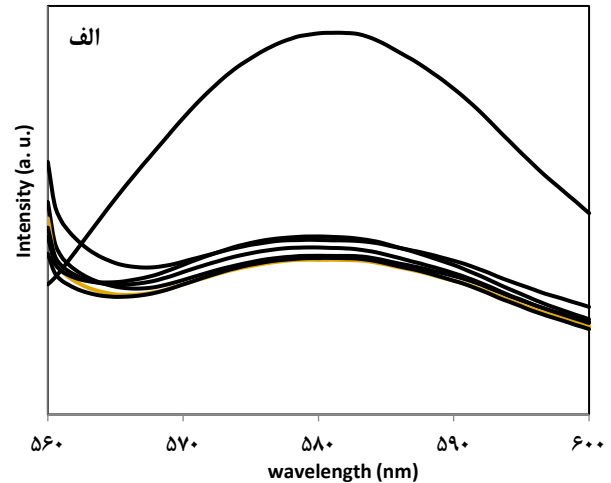
اکسید گرافن سنتز شده با استفاده از دستگاه XPS آنالیز شده سپس با زنجیره سنگین آنتی بادی پروتئین استخوانی گالا عامل دار شد. در مقایسه با دیگر روش های استفاده از اکسید گرافن در تشخیص نمونه های زیستی که معمولاً از اثر خاموش کنندگی اکسید گرافن استفاده می شود، در این پژوهش سطح اکسید گرافن در حضور معرف های شیمیایی با زنجیره سنگین آنتی بادی عامل دار شده است. سپس برهم کنش اکسید گرافن عامل دار شده با VI و vh نشان دار شده، به دلیل اثر خاموش کنندگی اکسید گرافن منجر به خاموش سازی فلورسانس رنگدانه متصل به VI شد. در ادامه در حضور بایومارکر پروتئین استخوانی گالا نشر فلورسانس بر اثر مکانیسم ایمنوساندویچ بازیابی شد، این افزایش شدت فلورسانس به عنوان سیگنال غلظت BGP منجر به شناسایی این بایومارکر با حد تشخیص ۱۱ نانومولار شد.

نمادها

Vh	: زنجیره سنگین آنتی بادی:
VI	: زنجیره سبک آنتی بادی:
TMARA	: کربوکسی تترامتیل رودامین:
BGP	: پروتئین استخوانی گالا:
TRITC	: تترامتیل رودامین ایزوتیوسیانات:
XPS	: طیف فوتوالکترون اشعه ایکس:
FWHM	: پهنای پیک در نیمه ماکزیمم:
TMBZ	: تترامتیل بنزیدین:
LOD	: حد تشخیص:
LOQ	: حد تعیین کمی:

قدردانی

از راهنمایی ها و تلاش های زنده یاد پرفسور یودا بدلیل راهنمایی های ایشان در طول انجام این پژوهش تشکر فراوان می شود. یاد ایشان همیشه جاودان خواهد ماند. همچنین از دانشگاه ملایر برای پشتیبانی این پژوهش تشکر می شود.



شکل ۶- الف) نشر فلورسانس VI-TRITC ($150 \mu\text{g/ml}$) خاموش سازی شده با اکسید گرافن ($130 \mu\text{g/ml}$) در حضور حجم های مختلفی از بافر PBS در غیاب بایومارکر BGP در زمان برهم کنش ۲۵ دقیقه ($\lambda_{em}=580 \text{ nm}$ ، $\lambda_{ex}=544 \text{ nm}$) ب) نشر فلورسانس VI-TRITC ($150 \mu\text{g/ml}$) و Vh ($130 \mu\text{g/ml}$) در غیاب اکسید گرافن در حضور غلظت های مختلفی از بایومارکر BGP ($7/5 \times 10^{-9} \text{ M}$ تا $7 \times 10^{-7} \text{ M}$) که با مکان نما افزایش غلظت نشان داده شده است، در بافر PBS و زمان برهم کنش ۲۵ دقیقه ($\lambda_{em}=580 \text{ nm}$ ، $\lambda_{ex}=544 \text{ nm}$)

مشاهده می شود، نتایج کاهش شدت فلورسانس را نشان داده است که می تواند ناشی از اثر افزایش حجم بافر می باشد. بنابراین در حضور اکسید گرافن افزایش شدت نشر فلورسانس وابسته به غلظت BGP براساس مکانیسم های ایمنوساندویچ منجر به شناسایی BGP با حد تشخیص ۱۱ نانومولار شد.

مراجع

- [1] Hee J.J., *Quenchbodies That Enable One-Pot Detection of Antigens. A Structural Perspective. Bioengineering*, 10: 1262 (2023).

- [2] Fritzenschaft L., Boehm F., Rothenbacher D., Denking M., Dallmeier D., [Association of Blood Biomarkers with Frailty—A Mapping Review](#). *Ageing Research Reviews*, **109**: 102761 (2025).
- [3] Sarhadi V.K., Armengol G., Molecular Biomarkers in Cancer. *Biomolecules*, **12**: 1021(2022).
- [4] Jong P.K., Seon H.K., Ueda H., Hee J.J., Generation of Q-Bead Against Bone Gla Protein with Simplified Preparation Steps. *Journal of Immunological Methods*, **516**: 113471 (2023).
- [5] Price P., Parthemore J., Deftos L., New Biochemical Marker for Bone metabolism New Biochemical Marker for Bone Metabolism. Measurement by Radioimmunoassay of Bone GLA Protein in the Plasma of Normal Subjects and Patients with Bone Disease. *Journal of Clinical Investigation*, **66**: 878-887 (1980).
- [6] Idelevich A., Rais Y., Monsonego-Ornan E., Bone Gla Protein Increases HIF-1 α -Dependent Glucose Metabolism and Induces Cartilage and Vascular Calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **31**: 55-62 (2011).
- [7] Azria M., The Value of Biomarkers in Detecting Alterations in Bone Metabolism. *Calcified tissue international*, **45**: 7-13 (1989).
- [8] Deeksha N., Utkarsh J., Emerging Trends in Fluorescent and Quenching Nanomaterials for Viral Detection. *Innovations in Biological and Chemical sensing, Talanta*, **11**: 100430 (2025).
- [9] Cho Y., Choi Y., Jang Y., Seong H., [Nanomaterial-Enhanced Biosensing: Mechanisms and Emerging Applications](#). *Adv. Healthcare Mater*, 2500189 (2025).
- [10] He X., Zhang L., Qi H., Yu P., Fei J., Mao L., [Improving the Fluorescence Detection Limit with Positively Charged Carbon Nanostructures as a Low Background Signal Platform](#). *Analyst*, **139**: 2114-2120 (2014).
- [11] Norouzi F., Pourmadadi M., Yazdian F., Khoshmaram K., Mohammadnejad J., Sanati MH., Chogan F., Rahdar A., Bains F., [PVA-Based Nanofibers Containing Chitosan Modified with Graphene Oxide and Carbon Quantum Dot-Doped TiO₂ Enhance Wound Healing in a Rat Model](#). *Journal of Functional Biomaterials*, **13**: 300(2022).
- [12] Dong H., Gao W., Yan F., Ji H., . Ju H., [Fluorescence Resonance Energy Transfer Between Quantum Dots and Graphene Oxide for Sensing Biomolecules](#). *Analytical chemistry*, **82**: 5511-5517 (2010).
- [13] Jang H., Kim Y.K., Kwon H.M., Yeo W.S., Kim D.E., Min D.H., [A Graphene-Based Platform for the Assay of Duplex-DNA Unwinding by Helicase](#). *Angewandte Chemie*, **122**: 5703-5707 (2010).
- [14] Song Y., Yang X., Li Z., Zhao Y., Fan A., [Label-Free Chemiluminescent ATP Aptasensor Based on Graphene Oxide and an Instantaneous Derivatization of Guanine Bases](#). *Biosensors and Bioelectronics*, **51**: 232-237 (2014).
- [15] Zamani M., Pourmadadi M., Ebrahimi S. S., Yazdian F., Shayeh J. S., A Novel Labeled and Label-Free Dual Electrochemical Detection of Endotoxin Based on Aptamer-Conjugated Magnetic Reduced Graphene Oxide-Gold Nanocomposite. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **908**: 116116 (2022).

- [16] Jung J.H., Cheon D.S., Liu F., Lee K.B., Seo T.S., [A Graphene Oxide Based Immuno-Biosensor for Pathogen Detection](#). *Angewandte Chemie International Edition*, **49**: 5708-5711 (2010).
- [17] Chen J.L., Yan X.-P., Meng K., Wang S.F., [Graphene Oxide Based Photoinduced Charge Transfer Label-Free Near-Infrared Fluorescent Biosensor for Dopamine](#). *Analytical chemistry*, **83**: 8787–8793 (2011).
- [18] Astrid S., Helmut S., Roland K.O.S., *Interrelations Between Essential Metal Ions and Human Diseases*. Springer, (2013).
- [19] Gholami J., Manteghian M., Badiei A., Javanbakht M., Ueda H., [Label Free Detection of Vitamin B12 Based on Fluorescence Quenching of Graphene Oxide Nanolayer](#). *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructure*, **23**: 878-884 (2015).
- [20] Gholami J., Manteghian M., Badiei A., Ueda H., Javanbakht M., [N-Butylamine Functionalized Graphene Oxide for Detection of Iron\(III\) by Photoluminescence Quenching](#). *Luminescence*, **31**: 229–235 (2016).
- [21] Hummers W. S. J., Offeman R.E., [Preparation of Graphitic Oxide](#). *Journal of the American Chemical Society*, **80**: 1339 (1958).
- [22] Roy S., Soin N., Bajpai R., Misra D.S., McLaughlin J.A., Roy S.S., [Graphene Oxide for Electrochemical Sensing Applications](#). *Journal of Materials Chemistry*, **21**: 14725-14731 (2011).
- [23] Dreyer D.R., Park S., Bielawski C.W., Ruoff R.S., [The Chemistry of Graphene Oxide](#), *Chemical Society Reviews*, **39**: 228-240 (2010).
- [24] Tao C.a., Wang J., Qin S., Lv Y., Long Y., Zhu H., Jiang Z., [Fabrication of pH-Sensitive Graphene Oxide–Drug Supramolecular Hydrogels as Controlled Release Systems](#). *Journal of Materials Chemistry*, **22**: 24856-24861 (2012).
- [25] Hasan S., Dong J., Hara Y., Morizane Y., Shibasaki F., Ueda H., [Protein-Based Open Sandwich Immuno-PCR for Sensitive Detection of Small Biomarkers](#). *Analytical Sciences*, **29**: 871-876 (2013).