

## سنجش الکتروشیمیایی آنتی‌بادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز توسط تقویت نقره نانوذرات طلا بر الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی

سلیمه رئیسی، احمد مولایی‌راد، مینو صدری و حمیده روحانی‌نژاد

پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: احمد مولایی‌راد، molaeirad@mut.ac.ir

چکیده. کزاز توسط توکسین حاصل از باکتری کلستری‌دیوم تتانی ایجاد می‌شود. به‌دلیل آلودگی سریع و آسان با این باکتری، تشخیص وضعیت ایمنی افراد نسبت به این عامل حائز اهمیت است. از این‌رو بیوسنسورهای الکتروشیمیایی یکی از ابزارهای سودمند در این رابطه بوده و دارای ویژگی‌هایی مانند سرعت، سادگی، تجهیزات ارزان و قابل حمل هستند، با این‌وجود حساسیت شناسایی آنها کافی نیست. بنابراین، تقویت نقره در ارتباط با نانوذرات-طلا برای بهبود شناسایی آنالیت‌ها پیشنهاد شده است. از این‌رو در بررسی اخیر با کاربرد نانوذرات-طلا به‌عنوان برچسب و پس از آن تقویت نقره، حضور آنتی‌بادی ضدتوکسوئید کزاز به صورت "آری یا نه" به روش الکتروشیمیایی با قالب سنجش‌های ایمنی غیر مستقیم بر روی الکتروودهای کربن-شیشه‌ای اصلاح‌شده با نانولوله کربنی مورد ارزیابی قرار گرفت. روش آنالیتیکال شامل برهمکنش سم کزاز و آنتی‌بادی بر روی الکتروود است که توسط اتصال آنتی‌بادی ثانویه کانجوگه شده با نانوذرات-طلا و پس از آن تقویت نقره دنبال گردید. تغییر ولتامتری-چرخه‌ای و تغییرات سیگنال طلا نسبت به نقره بر اساس تغییرات یون  $Ag^{+1}$  بر روی سطح الکتروود بررسی شد. نتایج نشان داد که  $\Delta E_p$  از ۰/۲۴ ولت پیش از واکنش تقویت نقره به ۰/۵۷ ولت پس از آن افزایش یافت. همچنین، پس از تقویت نقره، جریان به میزان چشم‌گیری افزایش یافت و نمودار جریان در  $E_p^c$  به سمت پتانسیل‌های مثبت و در  $E_p^a$  به سمت پتانسیل‌های منفی انتقال یافت. در مجموع این روش باعث افزایش حساسیت شناسایی شده و می‌تواند به راحتی برای شناسایی سایر مولکول‌های زیستی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی. بیوسنسور، تقویت سیگنال، سنجش ایمنی، نانوذرات، ولتامتری-چرخه‌ای

## Electrochemical assay of anti-tetanus toxoid monoclonal antibody by silver enhancement of gold nanoparticles at carbon nanotubes modified glassy carbon electrode

Salimeh Raesi, Ahmad Molaei Rad, Mino Sadri & Hamideh Rouhani Nejad

Faculty of Biological Science and Technology, Department of Chemistry and Chemical Engineering, Malek-e-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

Correspondent author: Ahmad Molaei Rad, molaeirad@mut.ac.ir

**Abstract.** Tetanus is caused by the toxin secreted by *Clostridium tetani*. Due to the rapid infection with this bacterium, it is so important to investigate the tetanus immunity of people. Therefore, electrochemical biosensors, as one of the most effective tools in this regard, have demanded characteristics such as being fast, simple, cost-effective and portable. However, their detection sensitivity is not sufficient. Hereon, silver enhancement of gold-nanoparticles was proposed for the improvement of detection. Hence, the current study applied gold-nanoparticles as label, following with silver enhancement, to investigate the yes/no electrochemical detection of anti-tetanus toxoid antibodies in the indirect immunoassay utilizing glassy-carbon electrodes modified by carbon nanotubes. The analytical procedure consists of the reactions of the tetanus toxoid with the antibody at electrode, so that followed by the interaction of gold-labeled secondary antibody and then silver enhancement process. In this study, the cyclic-voltammeter variation and difference of gold to silver signal based on silver ions fluctuations were also investigated. The results indicated that  $\Delta E_p$  increased from 0.24 V before silver enhancement reaction to 0.57 V after the silver enhancement. The results also demonstrated that after silver enhancement, current significantly increased and current plot at  $E_p^c$  transferred to positive potentials and at  $E_p^a$  moved to negative potentials. In conclusion, this method increases the detection sensitivity and can simply use to other bio-molecules detection.

**Key words.** biosensor, cyclic voltammeter, immunoassay, nanoparticles, signal enhancement

## مقدمه

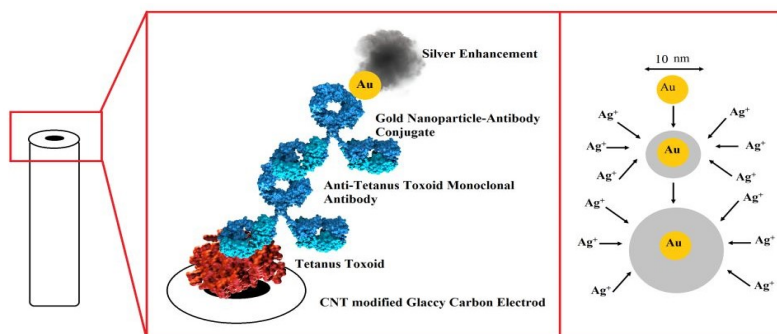
تقویت نقره در ارتباط با نانوذرات طلا در سنجش‌های ایمنی به-کار گرفته می‌شود. حساسیت شناسایی، زمانی که ویژگی‌های کاتالیتیک نانوذرات طلا به کاهش یون‌های نقره ( $Ag^+$ ) به فلز نقره ( $Ag^0$ ) منجر می‌شود، افزایش می‌یابد و سیگنال را تقویت می‌کند (Gupta et al., 2007; Liu et al., 2014). از این‌رو، در بررسی اخیر با کاربرد نانوذرات کلوتیدی طلا با قطر ۱۰ نانومتر به‌منابۀ برچسب و پس از آن تقویت نقره، حضور آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضدتوکسوئید کزاز به‌صورت yes or no به‌روش الکتروشیمیایی با قالب سنجش‌های ایمنی غیرمستقیم روی الکترودهای کربن-شیشه‌ای اصلاح‌شده با نانولوله‌های کربنی تحت ارزیابی قرار گرفت. روش آنالیتیکال شامل برهم‌کنش آنتی‌ژن توکسوئید کزاز و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز (آنالیت) است که توسط اتصال آنتی‌بادی ثانویه کانجوگه‌شده با نانوذرات طلا و پس از آن تقویت نقره نانوذرات طلا روی الکترودهای کربن-شیشه‌ای اصلاح‌شده با نانولوله کربنی دنبال شد (شکل ۱).

## مواد و روش‌ها

## اصلاح سطح الکترودهای کربن شیشه‌ای توسط نانولوله‌های کربنی

الکترودهای کربن شیشه‌ای، تا زمانی که سطح الکترودها کاملاً شفاف شود، با محلول ۰/۰۵ میکرومولار آلومینیوم پولیش داده شد و به مدت ۵ دقیقه سونیکه شد. برای اطمینان از تمیزی سطح الکترودها و فقدان ناخالصی روی آن، در ابتدا، نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکترودها در حضور آب مقطر بررسی شد. پس از آن، دوباره نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکترودها در حضور محلول کنترل ۵ میلی‌مولار پتاسیم هگزا-سیانوفرات و ۵ میلی‌مولار پتاسیم نیترات بررسی شد و از ایجاد واکنش در محلول الکترولیت اطمینان حاصل شد (Musameh et al., 2002). برای اصلاح الکترودهای کربن شیشه‌ای از نانولوله‌های کربنی با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محلول ۱ درصد وزن به حجم نافین در اتانول استفاده شد. نانولوله‌های کربنی با ساختارهای چندلایه با طول ۷-۱۵ نانومتر و قطر ۰/۵ تا ۱۰ میکرومتر به صورت دست‌ساز از پژوهشگاه ملی نفت تهیه شدند. این محلول به مدت ۱۰ دقیقه سونیکه شد و حجم ۱۰ میکرولیتر از این محلول روی سطح الکترودها به روش نقطه‌گذاری ریخته شد. الکترودها به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت تا کاملاً خشک شود (Grieshaber et al., 2008; Thvenot et al., 2008; Wang & Li 2007).

بیماری کزاز نوعی عفونت است که عامل ایجاد کننده آن توکسین حاصل از باکتری بی‌هوازی کلسترییدیوم تتانی است. این باکتری نوعی سم عصبی به نام تتانوس ترشح می‌کند که به انقباض شدید عضلات و در نهایت مرگ بیمار منجر می‌شود. تتانوس، اگرچه توکسینی قوی است که مسئول بروز علائم ویژه بیماری کزاز است (Burkin et al., 2004; Jain et al., 2010; Van Hoesven et al., 2008). کزاز یک بیماری کاملاً قابل کنترل است، به طوری که با تزریق واکسن کزاز (توکسوئید کزاز)، بدن انسان در برابر سم میکروب ایمن می‌شود. ایمنی‌زایی در برابر کزاز به میزان زیادی توسط بررسی سطوح آنتی‌بادی علیه توکسوئید ارزیابی می‌شود (Burkin et al., 2004; Reder et al., 2008; Schauer et al., 2003; Van Hoesven et al., 2008). ارزیابی سطوح آنتی‌بادی IgG طی ایمنی‌زایی با توکسوئید کزاز، شاخص مفیدی در پاسخ ایمنی است. بررسی وضعیت ایمنی افراد در برابر کزاز دارای اهمیت بسیاری است و به‌منظور افزایش فعالیت سیستم ایمنی علیه این بیماری به تزریق‌های یادآور نیاز مبرم دارد (Schauer et al., 2003). متداول‌ترین روش برای ارزیابی ایمنی‌زایی توکسین کزاز در آزمایشگاه، سنجش جذب ایمنی متصل به آنزیم است (Burkin et al., 2004; Van Hoesven et al., 2008). شناسایی با حساسیت بالا و تحلیل صحیح بیومارکرها در نمونه‌های زیستی برای تشخیص زودهنگام، درمان و مدیریت بیماری‌ها حائز اهمیت است. با توجه به ماهیت مولکول برچسب واکنش اختصاصی میان آنتی‌بادی و آنتی‌ژن به منزله سیگنال با روش‌های مختلف نوری، مغناطیسی، الکتروشیمیایی، رادیواکتیو، پیژوالکتریک، مکانیکی و اسپکتروسکوپی جرمی توسط مبدل ارائه می‌شود (Arruebo et al., 2009; Dobosz et al., 2015). از زمانی که سنجش‌های ایمنی مبتنی بر برچسب‌های فلزی توسعه یافته است، پیشرفت‌های گسترده‌ای با کاربرد انواع نانوذرات کلوتیدی فلزی ایجاد شده است (Jazayeri et al., 2016). اگرچه روش‌های آنالیتیکال بسیاری، از جمله روش‌های طیف‌سنجی برای تعیین کمی سنجش‌های ایمنی مبتنی بر نانوذرات فلزی وجود دارد، اما با این وجود، شناسایی‌های الکتروشیمیایی با توجه به سرعت، سادگی، کاربرد تجهیزات ارزان و قابل حمل امیدوار کننده هستند. حساسیت شناسایی این روش‌ها در مقایسه با روش‌های واجد برچسب‌های فلورسانس کافی نیست (Chu et al., 2005; Gupta et al., 2007). تقویت نقره برای بهبود حساسیت شناسایی پیشنهاد شده است.



شکل ۱- طرح کلی شناسایی آنتی‌بادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز با کاربرد تقویت نقره نانوذرات طلا روی الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی.  
**Figure 1.** The outline for the detection of anti-tetanus toxoid monoclonal antibody by using silver enhancement of gold nanoparticles at carbon nanotubes modified glassy-carbon electrode.

کروی طلا با قطر ۱۰ نانومتر از شرکت نانو سلامت آروین خریداری شد. در بررسی حاضر، در ابتدا، نانوذرات طلا توسط اسپکتروفوتومتر در UV-Vis (4300 Pro UV-vis, Amersham Biosciences) طول موج ۴۰۰-۷۰۰ نانومتر و همچنین توسط تصاویر میکروسکوپ الکترون عبوری (TE 2000 Zeiss TEM) تحت ارزیابی قرار گرفتند. پیش از تصویربرداری توسط TEM، نانوذرات طلا در ۱۵۰۰ rpm برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و پس از آن برای چند دقیقه سونیکه شدند. نمونه نانوذرات طلا که از هر نوع ماده‌ای خالص‌سازی شده‌اند روی یک شبکه کربن پوشیده شده با مس تهنشین شدند، تا این که به وسیله TEM تصویربرداری و ویژگی‌های آن‌ها مشخص شود (Jana et al., 2001).

برهم‌کنش‌های فیزیکی (برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک) برای ایجاد کانون‌های آنتی‌بادی با نانوذرات طلا استفاده شد. روش اخیر مبتنی بر روش (Hall et al., 2011) است. از آنجا که آنتی‌بادی IgG انسانی دارای  $pI=6.6-7.2$  و دارای بار مثبت است، در ابتدا  $pH$  محلول نانوذرات از ۳ به ۹ تغییر کرد تا  $pH$  محلول به بالاتر از  $pI$  پروتئین منتقل شود و نانوذرات به صورت الکترواستاتیک به آنتی‌بادی اتصال یابند. سپس، به ۳۰۰ میکرولیتر از محلول نانوذره با  $pH=9$  میزان ۲۴ میکرولیتر آنتی‌بادی (۰.۰۸ IU/ml) اضافه شد. این محلول به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد و پس از گذشت زمان انکوباسیون برای خارج کردن آنتی‌بادی‌های اتصال نیافته محلول به مدت ۱۵ دقیقه و با دور (۱۴۰۰ rpm) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. کانون‌های آنتی‌بادی نانوذرات تهنشین شده، در نهایت برای رسیدن به حجم قبلی با آب مقطر استریل رقیق‌سازی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Hall et al., 2011). پس از آن ۴ میکرولیتر از کانون‌های نانوذرات طلا آنتی‌بادی، روی الکتروود کربن شیشه‌ای منتقل شدند و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق روی الکتروود انکوبه شدند تا با آنتی‌بادی اولیه برهم‌کنش

### ایجاد سنجش‌های زیستی غیر مستقیم روی الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده

پس از اصلاح سطح الکتروود، آنتی‌ژن توکسوئید کزاز با غلظت (۵۰  $\mu g/ml$ ) در بافر فسفات با  $pH=7.4$  منتقل شد و به میزان ۴ میکرولیتر روی الکتروود اصلاح شده توسط میکروپیپت چکانده شد و پس از آن به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Dutta et al., 2017; Qu et al., 2011; Zhang et al., 2016). استوک آنتی‌ژن توکسوئید کزاز (۵۰  $\mu g/ml$ )، استوک آنتی‌بادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز (۱.۲۴  $mg/ml$ ) از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد که توسط بافر PBS رقیق‌سازی شد و به غلظت نهایی (۵۰  $\mu g/ml$ ) رسید. در مرحله بعد الکتروود کربن شیشه‌ای که واجد آنتی‌ژن تثبیت شده است توسط بافر بلوکه کننده به مدت ۲ ساعت به منظور کاهش برهم‌کنش‌های غیر-اختصاصی انکوبه شد. بافر بلوکه کننده شامل ۲۰ میلی‌مولار سدیم فسفات، ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم کلراید، ۴ درصد آلبومین سرم گاوی و ۲ میلی‌مولار سدیم آزید در  $pH=7.4$  بود. در ادامه، آنتی‌بادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز روی الکتروود منتقل شدند و اجازه داده شد تا به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با سطح الکتروود واکنش دهند. استوک اولیه آنتی‌بادی از نمونه‌های استاندارد کیت ELISA برای شناسایی آنتی‌بادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز با غلظت اولیه (۱ IU/ml) استفاده شد. برای سنجش زیستی آنتی‌بادی با غلظت مشخص (۰.۰۸ IU/ml) در بافر فسفات تهیه شد (Qu et al., 2011; Xu et al., 2016).

### ایجاد کانون‌های نانوذرات طلا-آنتی بادی ثانویه به روش الکترواستاتیک

در این مرحله، از نانوذرات طلا با ویژگی‌های قطر ۱۰ نانومتر، میزان نانوذره در میلی‌لیتر  $1.2 \times 10^8$ ، پیک رزونانس پلاسمون سطحی ۵۲۵-۵۲۰ نانومتر، چگالی نوری ۱/۵ در ۵۲۰ نانومتر و جذب مولی  $108 \times 01/1$  (M-1cm-1) استفاده شد. نانوذرات

نشان دادند که باند جذب پلاسمون سطحی نانوذرات طلا در ناحیه مرئی در طول موج ۵۲۴ نانومتر دیده شد. همچنین، با توجه به تصویر TEM میانگین قطر نانوذرات طلا ۱۰ نانومتر تخمین زده شد.

پس از ایجاد کانجوه‌های آنتی‌بادی-نانوذرات طلا، به منظور بررسی تأیید کانجوه شدن نانوذرات طلا به آنتی‌بادی‌های ثانویه، تغییرات طیف رزونانس پلاسمون سطحی موضعی برای نانوذرات طلا قبل از کانجوه شدن با آنتی‌بادی و پس از کانجوه شدن با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز توسط بررسی طیف‌های جذبی حاصل از طیف سنجی UV/Vis در محدوده طول موج ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر تحت ارزیابی قرار گرفت. شکل ۳ مبین نتایج کانجوه‌گاسیون است. نانوذرات طلای کلئیدی به‌تنهایی یک طول‌موج در بیشینه جذب ( $\lambda_{max}$ ) در ۵۲۴ نانومتر نشان می‌دهد. پس از کانجوه شدن و اتصال نانوذرات به آنتی‌بادی  $\lambda_{max}$  به میزان ۷ نانومتر به ۵۳۱ نانومتر به سمت طول‌موج‌های بالاتر منتقل شد. همچنین، جذب به میزان ۰/۳۰۳ (از ۰/۵۸۰ پیش از اتصال به ۰/۲۷۷ پس از اتصال) کاهش یافت. این تغییرات تأیید کننده اتصال نانوذرات طلا به آنتی‌بادی مونوکلونال است. به منظور ارزیابی کانجوه‌های نانوذرات طلا-آنتی‌بادی ثانویه، طیف LSPR این کانجوه‌ها طی یک هفته توسط طیف سنجی UV/Vis ارزیابی شد. نتایج به‌وضوح نشان دادند که بیشینه جذب کانجوه‌های نانوذرات طلا-آنتی‌بادی ثانویه طی یک هفته با میانگین  $2 \pm 531$  نانومتر ثابت باقی مانده که حاکی از پایداری این کانجوه‌ها به مدت یک هفته است. ولی با وجود این، میزان جذب طی یک هفته از ۰/۵۹ به میزان ۰/۴۴ کاهش یافت.

شکل ۶ نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکتروکود کربن شیشه‌ای در آب مقطر (نمودار  $\blacklozenge$  شکل ۵) را نشان می‌دهد. تصویر مبین یک خط صاف که هیچ‌گونه جریانی را در هیچ پتانسیلی نشان نمی‌دهد و حاکی از فقدان هر نوع واکنش دهنده‌ای روی سطح الکتروکود است. شکل ۶ همچنین، نمودار جریان در برابر پتانسیل را برای الکتروکود کربن شیشه‌ای در محلول الکترولیت (نمودار  $\blacksquare$  شکل ۵) نشان می‌دهد، با بررسی نمودار کاتدی و آندی، از ایجاد واکنش در محلول الکترولیت اطمینان حاصل شد. پس از اصلاح الکتروکود کربن شیشه‌ای توسط نانولوله‌های کربنی، با توجه به نمودار مندرج در شکل ۵ پتانسیل کاتدی در بیشینه جریانی ( $E_p^c$ ) برابر با ۰/۳۷ و پتانسیل آندی در کمینه جریانی ( $E_p^a$ ) برابر با ۰/۱۴ است. کاهش  $\Delta E_p$  تا میزان ۰/۲۳ ولت به این علت است که نانولوله‌های کربنی سبب افزایش جریان در سطح الکتروکود شده‌اند. این افزایش جریان مرتبط با هدایت پذیری الکتروکودی خوب نانولوله‌های کربنی چند دیواره و تسهیل انتقال الکترون میان یون-های پتاسیم هگزانوسیانوفرات و الکتروکود می‌شود.

دهند ( Ashworth-Sharpe et al., 2016; Lange et al., 2006; Li et al., 2014). در این بررسی، همچنین پایداری کانجوه‌های نانوذرات طلا آنتی‌بادی طی یک هفته با بررسی تغییرات طیف رزونانس پلاسمون سطحی موضعی ارزیابی شدند.

#### تقویت نقره نانوذرات طلا

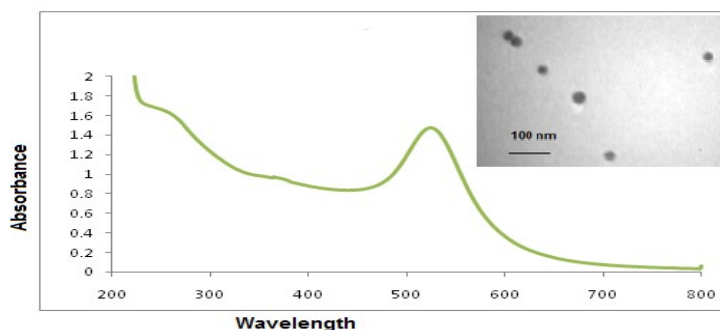
برای انجام اتومتالوگرافی و یا تقویت نقره نانوذرات طلا، از یک کیت واکنشی، که به ترتیب حاوی دو محلول نیترات نقره و عامل کاهشی (هیدروکوئینون) است ( Silver Enhancer Kit, Li Silver, Abcam)، برای واکنش کاهشی نقره استفاده شد. برای بررسی تقویت نقره در انتهای مراحل سنجش زیستی مخلوطی از حجم‌های مساوی از محلول‌های آغازگر (نیترات نقره) و تقویت کننده (هیدروکوئینون) روی سطح الکتروکود کربن شیشه‌ای ریخته شد تا با کانجوه‌های نانوذرات طلا آنتی‌بادی روی سطح الکتروکود برهم‌کنش نشان دهند و یک واکنش کاهشی برای رسوب نقره انجام پذیرد (Gupta Shalini et al., 2007; Liu et al., 2014). پس از ۴۰ دقیقه، نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکتروکود در حضور محلول الکترولیت ۵ میلی‌مولار پتاسیم هگزانوسیانوفرات و ۵ میلی‌مولار پتاسیم نیترات ارزیابی شد (Musameh et al., 2002).

#### اندازه‌گیری الکتروشیمیایی توسط ولتامتری چرخه‌ای

برای بررسی‌های الکتروشیمیایی از آزمایش‌های ولتامتری چرخه‌ای با دستگاه Drop Sens, Microstate 200 و از یک سلول با حجم ۲۰ میلی‌لیتر واجد سه الکتروکود استفاده شد. الکتروکود کربن شیشه‌ای اصلاح شده به‌عنوان الکتروکود کار، الکتروکود  $Ag/AgCl$  به منزله الکتروکود مرجع و الکتروکود پلاتین به منزله الکتروکود شمارنده استفاده شد. اندازه‌گیری الکتروشیمیایی بر مبنای تغییر در سیگنال الکتروکودی جریان در برابر پتانسیل پس از برهم‌کنش میان آنتی‌ژن-آنتی‌بادی و همچنین آنتی‌بادی اولیه-آنتی‌بادی ثانویه است. در پایان، سنجش‌های ایمنی سیگنال حاصل از نانوذرات طلا پس از قرارگیری در معرض محلول تقویت نقره ارزیابی شد. برای بررسی ولتامتری چرخه‌ای از پتانسیل‌های ۸۰۰- تا ۱۰۰۰ میلی‌ولت و سرعت اسکن ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه استفاده شد. اندازه‌گیری‌ها در محلول الکترولیت حاوی ۵ میلی‌مولار  $KNO_3$  و ۵ میلی‌مولار  $K_3Fe(CN)_6$  و تمامی اندازه‌گیری‌ها دردمای اتاق انجام شد ( Brun et al., 2013; Xu et al., 2016; Zhang Songbai et al., 2016).

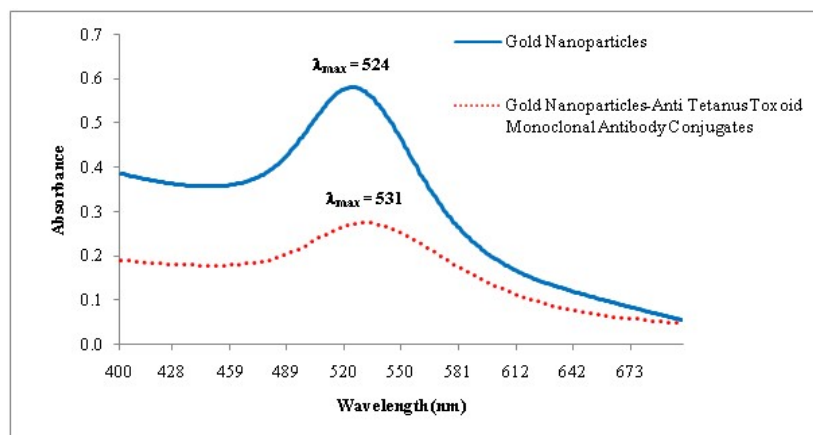
#### نتایج

ویژگی‌های نانوذرات طلا توسط اسپکتروفوتومتر UV-Vis در طول موج ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر و همچنین تصویر TEM تحت ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی ویژگی‌های نانوذرات طلا توسط اسپکتروسکوپی UV-Vis و تصویر TEM در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج



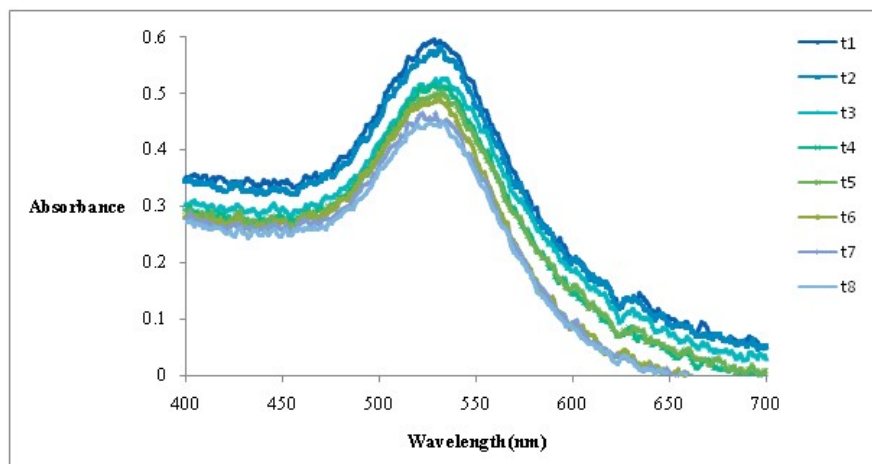
شکل ۲- طیف UV-Vis و تصویر TEM نانوذرات ۱۰ نانومتری به کار رفته در مطالعه اخیر.

**Figure 2.** UV-Vis spectrum and TEM image of employed 10 nm gold nanoparticles in this study



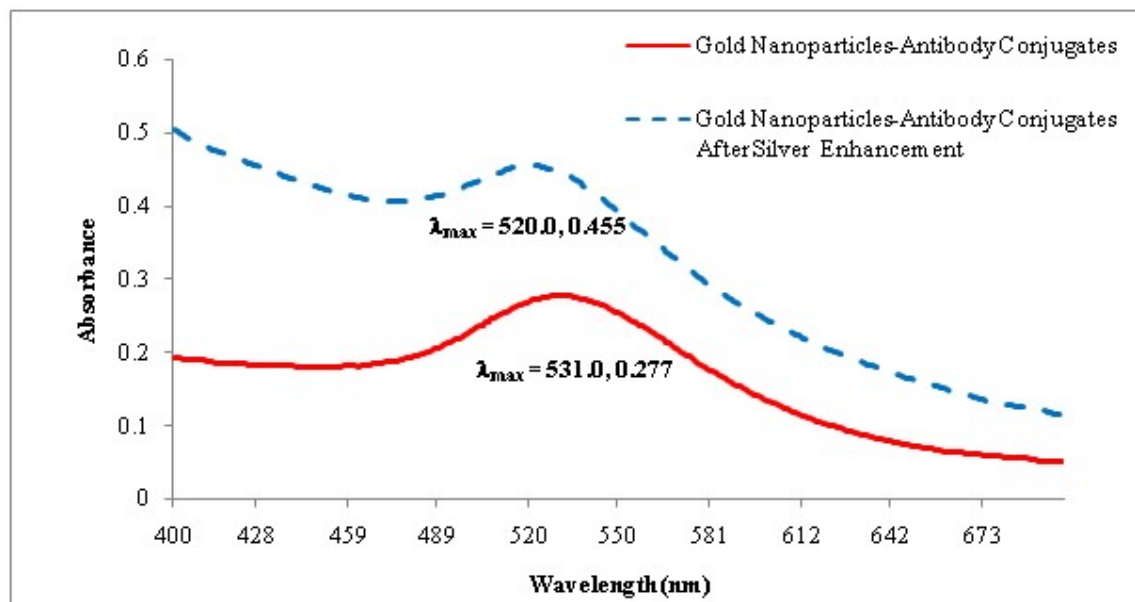
شکل ۳- طیف LSPR تأیید کننده کانجوگاسیون نانوذرات طلا-آنتی بادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز؛ طیف LSPR نانوذرات کلونیدی ۱۰ نانومتر یک  $\lambda_{max}$  برابر با ۵۲۴ نانومتر (خط ممتد آبی) نشان می‌دهد و پس از کانجوگه شدن با آنتی بادی  $\lambda_{max}$  به میزان ۷ نانومتر به سمت راست جابه‌جا می‌شود (خط نقطه‌چین قرمز).

**Figure 3.** LSPR spectra confirming of gold nanoparticles-anti tetanus toxoid antibody conjugation; the LSPR spectrum of bare 10 nm gold colloids shows a  $\lambda_{max}$  of 524 nm (solid blue), after conjugation with the monoclonal antibody, the  $\lambda_{max}$  shifts 7 nm to the red (dashed red).



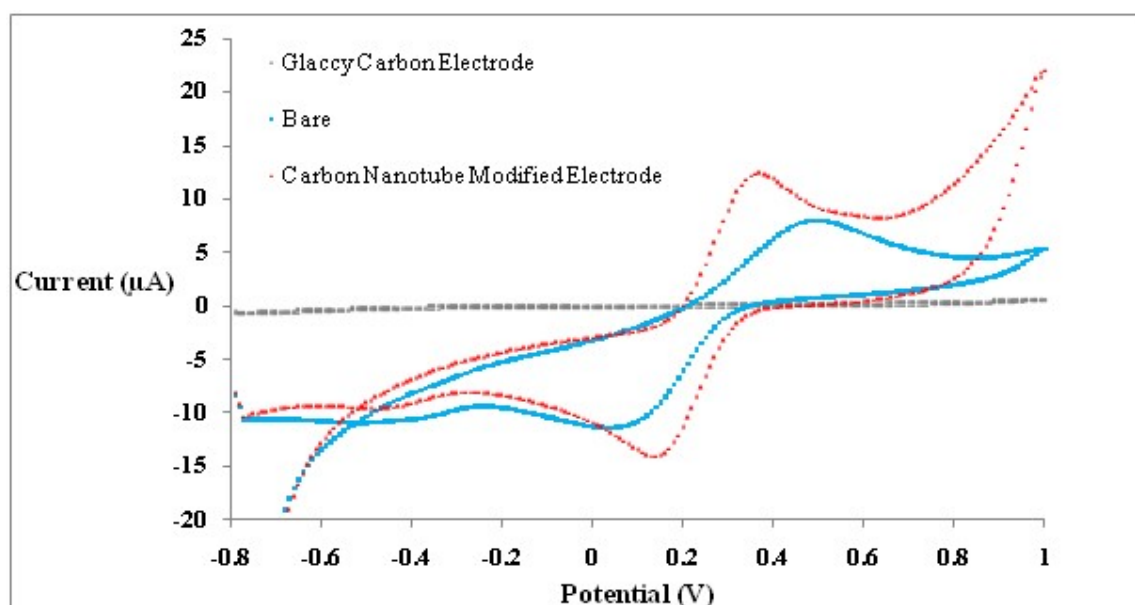
شکل ۴- ارزیابی پایداری کانجوگه‌های نانوذرات طلا-آنتی بادی ثانویه طی یک هفته.

**Figure 4.** Consideration of gold nanoparticles-secondary antibody stability during one week



شکل ۵- طیف LSPR تأیید کننده تقویت نقره کانجوگه‌های نانوذرات طلا-آنتی بادی؛ طیف LSPR کانجوگه‌های نانوذرات طلا-آنتی بادی یک  $\lambda_{max}$  ۵۳۱ نانومتر با جذب ۰/۲۷۷ (خط پر رنگ قرمز) را نشان می‌دهد، پس از تقویت نقره این کانجوگه‌ها طیف LSPR یک  $\lambda_{max}$  ۵۲۰ نانومتر با جذب ۰/۴۵۵ (خط چین آبی) را نشان می‌دهد.

**Figure 5.** LSPR spectra confirming of silver enhancement of gold nanoparticles- antibody conjugates; the LSPR spectrum of gold nanoparticles-monoclonal antibody conjugates shows a  $\lambda_{max}$  of 531 nm with absorbance of 0.277 (solid red), after silver enhancement of gold nanoparticles-monoclonal antibody conjugates, the absorbance increase to 0.455 and LSPR spectra shows a  $\lambda_{max}$  of 520 nm (dashed blue).

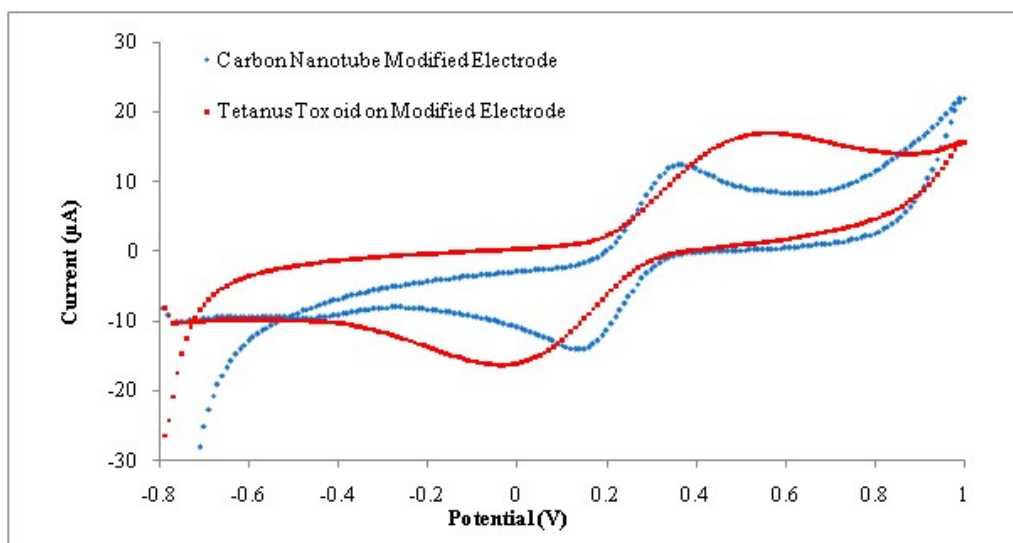


شکل ۶- نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکتروود کربن شیشه‌ای در آب مقطر (نمودار خاکستری  $\blacklozenge$ )، الکتروود کربن شیشه‌ای در محلول الکترولیت (نمودار آبی  $\blacksquare$ ) و الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی (نمودار قرمز  $\blacktriangle$ ).

**Figure 6.** The plot of current versus potential for GCE in mili-Q water (gray plot  $\blacklozenge$ ), GCE in electrolyte solution (blue plot  $\blacksquare$ ) and CNT modified GCE (red plot  $\blacktriangle$ ).

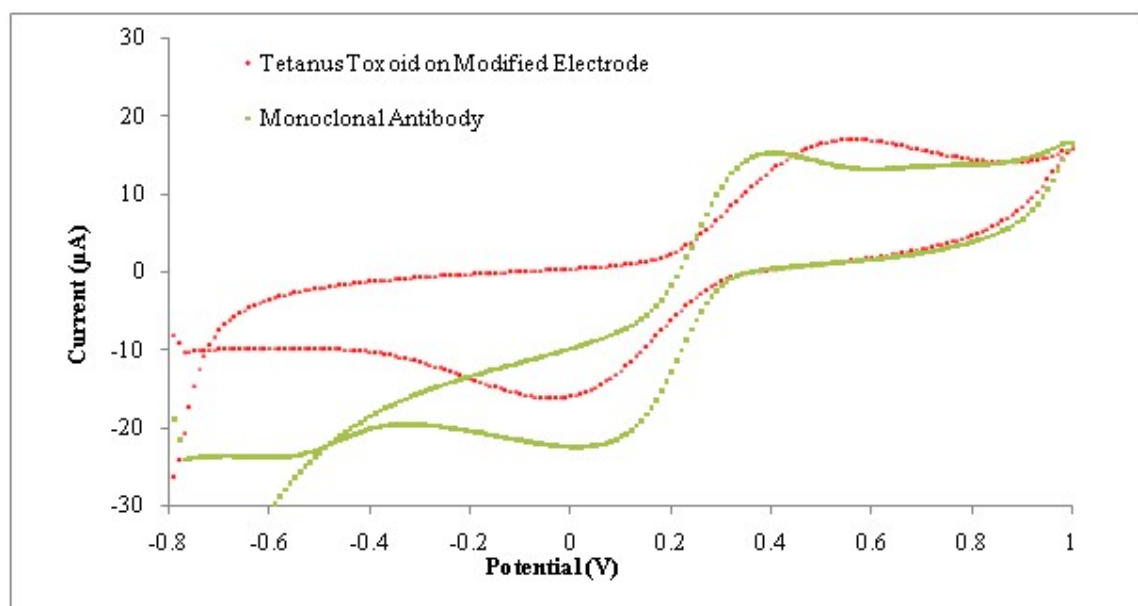
انتقال بهتر الکترون و افزایش جریان پس از قرارگیری آنتی‌ژن روی آن می‌شود. از طرفی، از آنجایی که با ارائه آنتی‌بادی مونوکلونال یا همان مولکول هدف سبب برهم‌کنش با آنتی‌ژن شده، بنابراین، انتقال الکترون از محلول الکترولت به سمت الکتروود با تأخیر صورت می‌گیرد. اصول کلی تقویت نقره در کاندوگه‌های نانوذرات طلا-آنتی‌بادی ثانویه برای شناسایی آنتی‌بادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز، در شکل ۱ نشان داده شده است. در اینجا شناسایی ولتامتری چرخه‌ای بر اساس تغییرات یون  $Ag^{+1}$  روی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای است. فرایند تقویت نقره به تنه‌شین شدن میزان زیادی نقره به علت کاهش کاتالیتیک یون‌های نقره توسط برچسب‌های نانوذرات طلا منجر می‌شود. با توجه به نمودار مندرج در شکل ۹، کاملاً مشخص است که پس از تقویت نقره در کاندوگه‌های نانوذرات-آنتی‌بادی ثانویه، جریان به‌میزان چشمگیری افزایش می‌یابد و نمودار جریان در بیشینه پتانسیل کاتدی ( $E_p^c$ ) به سمت پتانسیل‌های مثبت و در کمینه پتانسیل آندی ( $E_p^a$ ) به سمت پتانسیل‌های منفی انتقال یافت. همچنین، نتایج نشان دادند که  $\Delta E_p$  از  $0.24$  ولت پیش از واکنش تقویت نقره به  $0.57$  ولت پس از واکنش تقویت نقره افزایش یافت. این پاسخ ناشی از واکنش کاهشی تبدیل یون نقره ( $Ag^+$ ) به فلز نقره ( $Ag^0$ ) و رسوب نقره فلزی بر روی سطح الکتروود است که سبب تقویت سیگنال نانو ذرات طلا و افزایش جریان می‌شود.

پس از ایجاد سنجش‌های زیستی روی الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده، پتانسیل‌های آندی و کاتدی نسبت به الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی سنجیده شد. با توجه به نمودار شکل ۷، نمودارها به ترتیب مبین، نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانو لوله‌های کربنی در محلول الکترولیت (نمودار  $\blacklozenge$ ) و الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی پس از قرار گرفتن توکسوئید کزاز روی آن (نمودار  $\blacksquare$ ) هستند. با توجه به نمودار شکل ۷ پتانسیل کاتدی در بیشینه جریان ( $E_p^c$ ) برای آنتی‌ژن توکسوئید کزاز برابر با  $0.56$  ولت و پتانسیل آندی در کمینه جریان ( $E_p^a$ ) برابر با  $-0.04$  ولت است. همچنین، نمودارها در شکل ۸ به‌ترتیب مبین، نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانو لوله‌های کربنی پس از قرارگیری توکسوئید کزاز روی آن (نمودار  $\blacklozenge$ ) و الکتروود کربن شیشه‌ای تغییر یافته با نانولوله‌های کربنی پس از ارائه آنتی‌بادی مونوکلونال هستند. پتانسیل کاتدی در بیشینه جریان ( $E_p^c$ ) برای آنتی‌بادی مونوکلونال پس از واکنش با آنتی‌ژن توکسوئید کزاز برابر با  $0.4$  ولت و پتانسیل آندی در کمینه جریان ( $E_p^a$ ) برابر با صفر است. پتانسیل کاتدی در بیشینه جریان ( $E_p^c$ ) برای آنتی‌بادی کاندوگه شده با نانوذرات طلا پس از واکنش با آنتی‌بادی اولیه-آنتی‌ژن توکسوئید کزاز  $0.34$  ولت و پتانسیل آندی در کمینه جریان ( $E_p^a$ ) برابر  $0.1$  ولت است. کاملاً مشخص است که حضور نانو لوله‌های کربنی سبب



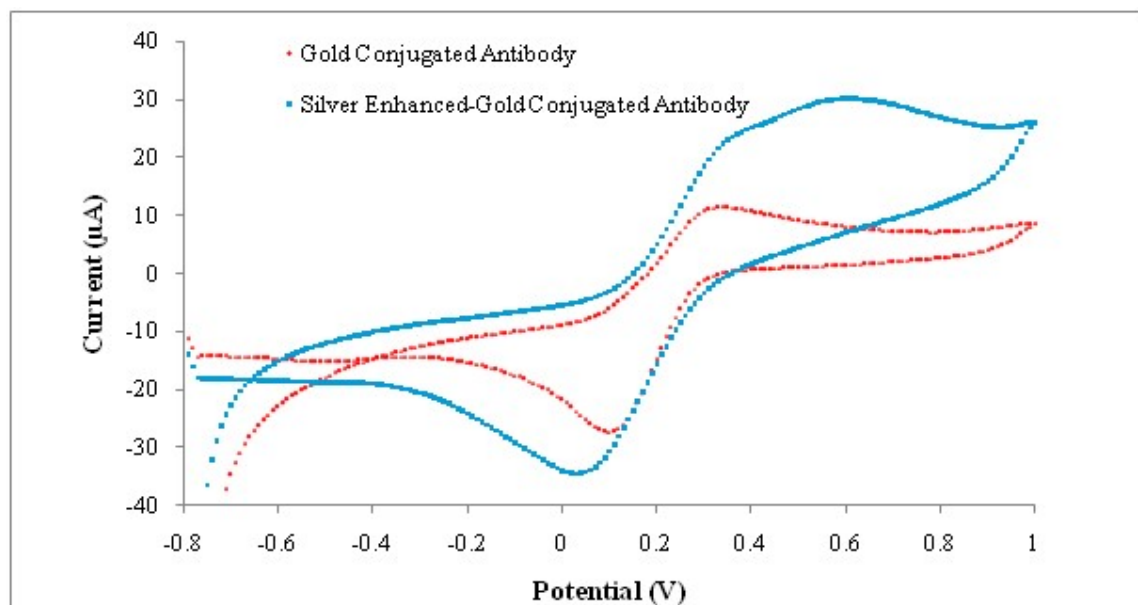
شکل ۷- نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی در محلول الکترولیت (نمودار آبی  $\blacklozenge$ ) و الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی پس از قرارگیری توکسوئید کزاز روی آن (نمودار قرمز  $\blacksquare$ ).

**Figure 7.** The plot of current versus potential for CNT modified GCE (blue plot  $\blacklozenge$ ) and CNT modified GCE with tetanus toxoid antigen (red plot  $\blacksquare$ ).



شکل ۸- نمودار جریان در برابر پتانسیل برای الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی پس از قرارگیری توکسوئید کزاز روی آن (نمودار قرمز ♦) و الکتروود کربن شیشه‌ای تغییر یافته با نانولوله‌های کربنی پس از ارائه آنتی‌بادی مونوکلونال (نمودار سبز ■).

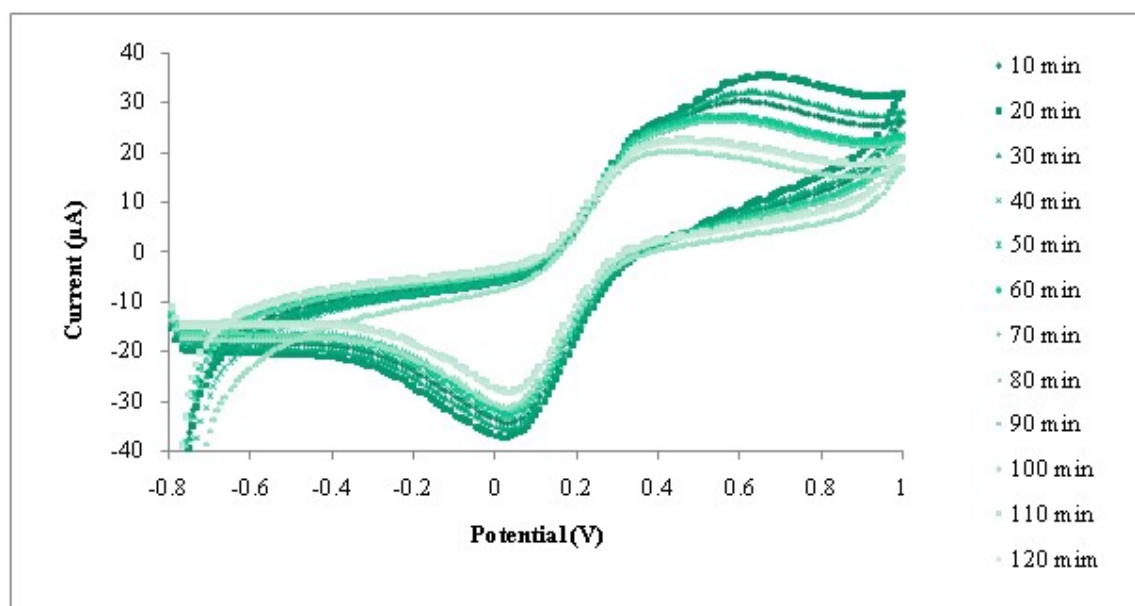
**Figure 8.** The plot of current versus potential for CNT modified GCE with tetanus toxoid antigen (red plot ♦) and monoclonal antibody after reaction with tetanus toxoid (green plot ■).



شکل ۹- نمودار جریان در برابر پتانسیل برای بادی کانچوگه شده با نانوذرات طلا پس از واکنش با آنتی‌بادی اولیه-آنتی ژن توکسوئید کزاز (نمودار قرمز ♦) و پس از واکنش تقویت نقره آنتی‌بادی کانچوگه شده با نانوذرات طلا-آنتی‌بادی اولیه-آنتی ژن توکسوئید کزاز روی الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی (نمودار آبی ■).

**Figure 9.** The plot of current versus potential for gold nanoparticle secondary antibody conjugates after reaction with tetanus toxoid- monoclonal antibody (red plot ♦) and after silver enhancement of gold nanoparticle secondary antibody conjugates at CNT modified GCE (blue plot ■).





شکل ۱۰- بررسی تکرارپذیری واکنش تقویت نقره کانجوگه‌های نانوذرات طلا-آنتی بادی ثانویه روی الکتروود.

**Figure 10.** Consideration of repetition for silver enhancement of gold nanoparticles-secondary antibody conjugates on electrode.

محلول مشاهده نمی‌شود ارائه می‌کنند، به طوری که این پیک جذبی منحصرأ برای آن نانوذره اختصاصی است (Arruebo et al., 2009). همچنین، در مطالعات مشخص شد که با توجه به ویژگی‌های نوری منحصر به فرد نانوذرات، اتصال هر نوع آنالیت به مولکول‌های شناساگر کانجوگه شده با نانوذرات سبب تغییر ویژگی‌های نوری نانوذرات به- علت تغییر در ضریب شکست موضعی در محیط اطراف نانوذره می- شود، به طوری که این تغییر در بقیه اجزای محیط مشاهده نمی‌شود. نانوذرات طلا یکی از مناسب‌ترین ساختارها برای تعیین اثر موضعی اتصال پروتئین‌ها با استفاده از بیشینه جذب طیف رزونانس پلاسمون سطحی موضعی هستند (Hall et al., 2011). در مطالعه حاضر، بررسی تقویت سیگنال با استفاده از اتومولوگرافی (تقویت نقره) به- صورت بررسی پاسخ‌های رزونانس پلاسمون سطحی و بررسی بیشینه جذب در طیف‌های به دست آمده از طیف سنجی UV/Vis، گزارش شد. با توجه به نتایج به دست آمده از تقویت نقره در کانجوگه‌های نانوذرات طلا-آنتی بادی ثانویه، تغییر در محیط اطراف نانوذرات طلا می‌تواند در این مرحله نیز بیشینه جذب طیف LSPR را تغییر دهد، به طوری که  $\lambda_{max}$  را به طول موج‌های پایین‌تر و به سمت چپ منتقل می‌کند. نتایج به دست آمده با مطالعات محققان زیادی توافق دارد، به- طوری که این مطالعات نشان می‌دهند محلول تقویت نقره (نیترا نقره به علاوه هیدروکوئینون) به سرعت توسط نانوذرات طلا هسته تشکیل می‌دهد و به رسوب نقره فلزی و مشاهده تغییر رنگ تیره منجر می- شود (Liu et al., 2014).

با بررسی منابع مختلف مشخص شد که مواد کربنی به طور گسترده در تحلیل‌های الکتریکی به علت فعالیت الکتروکاتالیتیک چشمگیر آن‌ها

از طرفی تکرارپذیری یکی از ویژگی‌های مهم برای نشان دادن عملکرد الکتروود اصلاح شده است. به طوری که تکرارپذیری سیگنال- های آنالیتیکال طی یک هفته تحت ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی چند دیواره پایداری طولانی مدت و تکرارپذیری خوبی برای بررسی پاسخ‌های ولتامتری چرخه‌ای را دارند. همچنین، تکرارپذیری تقویت نقره نانوذرات طلا در کانجوگه‌های نانوذرات طلا-آنتی بادی ثانویه هر ۱۰ دقیقه یک بار ارزیابی شد. شکل ۱۰ نتایج تکرار پذیری تقویت نقره را نشان می‌دهد. با توجه به نمودارهای مندرج در شکل ۹ کاملاً مشخص شد که کانجوگه‌های نانوذرات طلا-آنتی بادی ثانویه کاملاً پایدار هستند و نمودارهای تقویت نقره این نانوذرات تغییرات بسیار اندکی را نشان داد که از تکرارپذیری بالای این سنجش حکایت دارد. با وجود این بعد از گذشت ۱۲۰ دقیقه از واکنش تقویت نقره و ارزیابی مکرر سیگنال‌های حاصل، مشخص شد که سیگنال‌های تقویت نقره به سیگنال نانوذرات طلا نزدیک شده است. این موضوع به علت بررسی‌های مکرر تقویت نقره برای ارزیابی تکرار پذیری است (شسته شدن محلول تقویت نقره به مرور زمان از روی سطح الکتروود).

## بحث

نتایج نشان دادند که نوسان‌های موجود در محیط اطراف نانوذرات طلا سبب تغییر در طیف LSPR این نانوذرات می‌شوند. بنابراین، با کانجوگه شدن نانوذرات به آنتی بادی سبب انتقال بیشینه جذب به سمت طول موج‌های بالاتر می‌شوند. در برخی مطالعات بیان شده است که نانوذرات یک پیک جذبی UV/Vis قوی که در بقیه اجزای

چشمگیری افزایش یافت. نتایج به دست آمده با پژوهش‌های محققان دیگر هماهنگ است (Chu et al., 2005; Qu et al., 2011). طی پژوهش‌های انجام شده درباره کاربرد تقویت نقره در بیوسنسورهای الکتروشیمیایی برای شناسایی بیومولکول‌های مختلف، از روش شناسایی ولتامتری رنگ‌گیری آندی روی الکترودهای کربن شیشه‌ای استفاده شده است (Chu et al., 2011). حال آنکه در مقاله حاضر از روش ولتامتری چرخه‌ای استفاده شد. با وجود این نتایج به دست آمده کاملاً هماهنگ و حاکی از تقویت چشمگیر سیگنال هستند. تقویت سیگنال ناشی از واکنش کاتالیتیک رسوب نقره روی نانوذرات طلا (مولکول برچسب) است که سبب افزایش حساسیت سنجش‌های ایمنی مبتنی بر نانوذرات فلزی می‌شود.

### نتیجه‌گیری

یک نمونه ایمونوسنسور الکتروشیمیایی برای ارزیابی شناسایی yes or no آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی ضد توکسوئید کزاز توسط الکتروده کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی چند دیواره توسعه یافت. در ایمونوسنسور ارائه شده در اینجا به منظور افزایش پاسخ‌های آنالیتیکال به صورت افزایش جریان، از تقویت نقره در نانوذرات طلا استفاده شده است. مشخص شد که سنجش‌های ایمنی مبتنی بر تقویت نقره در کاندیدهای نانوذرات طلا-آنتی‌بادی ثانویه برای شناسایی آنتی‌بادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز امکان‌پذیر است. روش توصیف شده در اینجا مزیت‌های بسیاری دارد از جمله اینکه این روش به دلیل کاربرد تقویت نقره، سبب افزایش و بهبود حساسیت شناسایی روش الکتروشیمیایی می‌شود. علاوه بر این، برچسب‌های نانوذرات کلونیدی طلا پایدارتر از برچسب‌های رادیویوتوبی یا آنزیمی هستند. همچنین، فرایند برچسب گذاری نانوذرات طلا بسیار ساده است و به طور کلی فعالیت بیوشیمیایی بیومولکول را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد. از طرفی روش‌های الکتروشیمیایی می‌توانند به راحتی به کار روند و دارای قابلیت تکرارپذیری هستند. نهایتاً روش توصیف شده در اینجا می‌تواند به راحتی برای شناسایی دیگر بیومولکول‌های مهم استفاده شود.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی کسانی که در انجام این مطالعه حمایت و کمک نمودند، ابراز می‌دارند. این مطالعه مربوط به نتایج حاصل از رساله دکتری تخصصی نویسنده اول است.

استفاده می‌شوند. داشتن مساحت بالا و هدایت پذیری الکتریکی عالی سبب می‌شود تا نانولوله‌های کربنی چند دیواره به طور گسترده برای ساخت سنسورهای الکتروشیمیایی به منظور تقویت پاسخ‌های آنالیتیکال استفاده شوند (Feldman et al., 2008; Gupta Rakesh K. et al., 2002; Musameh et al., 2016). نتایج به وضوح نشان دادند که چون توانایی نانولوله‌های کربنی برای توسعه واکنش‌های انتقال الکترون با ساختار الکترونیک و هدایت الکتریکی بالای آن‌ها مرتبط است، پس از اصلاح الکتروده کربن شیشه‌ای توسط نانولوله‌های کربنی، افزایش جریان مرتبط با هدایت‌پذیری الکتریکی خوب و تسهیل انتقال الکترون میان یون‌های پتاسیم هگزائوسیانوفرات و الکتروده می‌شود. ارزیابی پاسخ‌های ولتامتری به علت هم‌پوشانی نمودارهای جریان در این قسمت کمی پیچیده است. با وجود این، نتایج نشان دادند که، نمودارهای جریان نسبت به نمودار اولیه جریان در الکتروده کربن شیشه‌ای (Bare) افزایش یافته-اند که حاکی از اثر نانولوله‌های کربنی چند دیواره بر تقویت هدایت پذیری است. همچنین، نتایج به این موضوع اشاره دارند که با افزودن هریک از عناصر سنجش زیستی به الکتروده اصلاح شده، اعم از آنتی‌ژن، آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی ثانویه، کمینه جریان‌های آندی ( $i_{pa}$ ) کاهش می‌یابند. نتایج مبین این احتمال هستند که تعادل ایجاد شده در سطح الکتروده طولانی نیست و انتقال الکترون برگشت‌پذیر نیست. ولتامتری چرخه‌ای برای حالت‌های که انتقال الکترون برگشت‌پذیر نیست رفتار کاملاً متفاوتی نسبت به حالات برگشت‌پذیر نشان می‌دهد. در این حالت، پتانسیل کاتدی در بیشترین جریان و پتانسیل آندی در کمترین جریان با توجه به واکنش آنتی‌بادی-آنتی‌ژن موجود روی سطح الکتروده تغییر می‌یابد (Kissinger & Heineman 1983). از طرفی، کاملاً مشخص است که پس از قرارگیری آنتی‌ژن روی الکتروده، به علت حضور نانولوله‌های کربنی سبب افزایش جریان و هدایت پذیری آن می‌شود. با وجود این، در مرحله بعد، از آنجایی که با ارائه آنتی‌بادی مونوکلونال و یا همان مولکول هدف سبب برهم کنش با آنتی‌ژن شده، انتقال الکترون از محلول الکتروده به سمت الکتروده با تأخیر صورت می‌گیرد.

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد نانوذرات سبب شده است که آن‌ها گزینه مناسبی برای طراحی ابزارهای سنجش خصوصاً سنسورها و بیوسنسورهای الکتروشیمیایی باشند. یکی از عملکردهای مهم نانوذرات برچسب‌گذاری بیومولکول و تقویت انتقال الکترون میان محلول الکتروده و سطح الکتروده است (Luo et al., 2006; Qu et al., 2011; Zhang Jingjing et al., 2008). در مطالعه حاضر، از نانوذرات طلا برای برچسب‌گذاری آنتی‌بادی استفاده شد. پس از آن، سیگنال ایجاد شده از سوی نانوذرات طلا، توسط واکنش تقویت نقره، افزایش یافت. نتایج به وضوح نشان دادند که پس از تقویت نقره در کاندیدهای نانوذرات طلا-آنتی‌بادی ثانویه، جریان به میزان

## REFERENCES

- Arruebo, M., Valladares, M.N. & Gonzalez-Fernandez, A.F.** 2009. Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Nanomaterials* 2009.1: 37.
- Ashworth-Sharpe, J., Yun, C.S., Zhilina, Z., Murillo, A.E. & Johnson, D.D. et al.** 2016. Antibody-nanoparticle conjugates and methods for making and using such conjugates. Google Patents.
- Brun, E.M., Puchades, R. & Maquieira, A.** 2013. Gold, Carbon, and Aluminum Low-Reflectivity Compact Discs as Microassaying Platforms. *Analytical Chemistry* 85: 4178-86.
- Burkin, M.A., Sviridov, V.V. & Perelygina, O.V.** 2004. Determination of tetanus toxin and toxoid by ELISA using monoclonal antibodies. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40: 409-14.
- Chu, X., Fu, X., Chen, K., Shen, G.L. & Yu, R.Q.** 2005. An electrochemical stripping metalloimmunoassay based on silver-enhanced gold nanoparticle label. *Biosensors and Bioelectronics* 20: 1805-12.
- Dobosz, P., Morais, S., Puchades, R. & Maquieira, A.** 2015. Nanogold bioconjugates for direct and sensitive multiplexed immunosensing. *Biosensors and Bioelectronics* 69: 294-300.
- Dutta, G., Nagarajan, S., Lapidus, L.J. & Lillehoj, P.B.** 2017. Enzyme-free electrochemical immunosensor based on methylene blue and the electro-oxidation of hydrazine on Pt nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* 92: 372-77.
- Feldman, A.K., Steigerwald, M.L., Guo, X. & Nuckolls, C.** 2008. Molecular electronic devices based on single-walled carbon nanotube electrodes. *Accounts of Chemical Research* 41: 1731-41.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voeroes, J. & Reimhult, E.** 2008. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors* 8: 1400-1458.
- Gupta, R.K., Pandya, R., Sieffert, T., Meyyappan, M. & Koehne, J.E.** 2016. Multiplexed electrochemical immunosensor for label-free detection of cardiac markers using a carbon nanofiber array chip. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 773: 53-62.
- Gupta, S., Huda, S., Kilpatrick, P.K. & Velez, O.D.** 2007. Characterization and optimization of gold nanoparticle-based silver-enhanced immunoassays. *Analytical Chemistry* 79: 3810-3820.
- Hall, W.P., Ngatia, S.N. & Van Duyne, R.P.** 2011. LSPR Biosensor Signal Enhancement Using Nanoparticle Antibody Conjugates. *The Journal of Physical Chemistry* 115: 1410-1414.
- Jain, S., Chattopadhyay, S., Jackeray, R., Abid, C.K.V.Z., Kumar, M. & Singh, H.** 2010. Detection of anti-tetanus toxoid antibody on modified polyacrylonitrile fibers. *Talanta* 82: 1876-1883.
- Jana, N.R., Gearheart, L. & Murphy, C.J.** 2001. Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir* 17: 6782-6786.
- Jazayeri, M.H., Amani, H., Pourfatollah, A.A., Pazoki-Toroudi, H. & Sedighimoghaddam, B.** 2016. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-Sensing Research* 9: 17-22.
- Kissinger, P.T. & Heineman, W.R.** 1983. Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* 60: 702.
- Lange, S.A., Roth, G., Wittmann, S., Lacoste, T. & Vetter, A.** 2006. Measuring biomolecular binding events with a compact disc player device. *Angewandte Chemie* 118: 276-79.
- Li, X., Weng, S., Ge, B., Yao, Z. & Yu, H.Z.** 2014. DVD technology-based molecular diagnosis platform: quantitative pregnancy test on a disc. *Lab on a Chip* 14: 1686-1694.
- Liu, R., Zhang, Y., Zhang, S., Qiu, W. & Gao, Y.** 2014. Silver enhancement of gold nanoparticles for biosensing: from qualitative to quantitative. *Applied Spectroscopy Reviews* 49: 121-138.
- Luo, X., Morrin, A., Killard, A.J. & Smyth, M.R.** 2006. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. *Electroanalysis* 18: 319-326.
- Musameh, M., Wang, J., Merkoci, A. & Lin, Y.** 2002. Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. *Electrochemistry Communications* 4: 743-746.
- Qu, F., Lu, H., Yang, M. & Deng, C.** 2011. Electrochemical immunosensor based on electron transfer mediated by graphene oxide initiated silver enhancement. *Biosensors and Bioelectronics* 26: 4810-4814.
- Reder, S., Riffelmann, M., Becker, C. & Von Knig, C.H.W.** 2008. Measuring immunoglobulin G antibodies to tetanus toxin, diphtheria toxin, and pertussis toxin with single-antigen enzyme-linked immunosorbent assays and a bead-based multiplex assay. *Clinical and Vaccine Immunology* 15: 744-749.
- Schauer, U., Stemberg, F., Rieger, C.H.L., Battner, W. & Borte, M.** 2003. Levels of antibodies specific to tetanus toxoid, Haemophilus influenzae type b, and pneumococcal capsular polysaccharide in healthy children and adults. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10: 202-207.
- Thvenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A. & Wilson, G.S.** 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics* 16: 121-131.
- Van Hoeven, K.H., Dale, C., Foster, P. & Body, B.** 2008. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of immunoglobulin g antibodies to tetanus toxoid with reference standards and the impact on clinical practice. *Clinical and Vaccine Immunology* 15: 1751-1754.
- Wang, Z. & Li, R.X.** 2007. Fabrication of DNA micropatterns on the polycarbonate surface of compact discs. *Nanoscale Research Letters* 2: 69-74.
- Xu, M., Wang, R. & Li, Y.** 2016. Rapid detection of Escherichia coli O157: H7 and Salmonella Typhimurium in foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation. *Talanta* 148: 200-08.
- Zhang, J., Wang, J., Zhu, J., Xu, J., Chen, H. & Xu, D.** 2008. An electrochemical impedimetric arrayed immunosensor based on indium tin oxide electrodes

and silver-enhanced gold nanoparticles. *Microchimica Acta* 163: 63-70.  
**Zhang, S., Shen, Y., Shen, G., Wang, S., Shen, G. & Yu, R.** 2016. Electrochemical immunosensor based

on Pd-Au nanoparticles supported on functionalized PDPA-MWCNT nanocomposites for aflatoxin B1 detection. *Analytical Biochemistry* 494: 10-15.

\*\*\*\*\*

**How to cite this article:**

**Raeisi, S., Molaei Rad, A., Sadri, M. & Rouhani Nejad, H.** 2021. Electrochemical assay of anti-tetanus toxoid monoclonal antibody by silver enhancement of gold nanoparticles at carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Nova Biologica Reperta* 8: 1-12. (In Persian).

رئسی، س.، مولایی‌راد، ا.، صدری، م. و روحانی‌نژاد، ح. ۱۴۰۰. سنجش الکتروشیمیایی آنتی‌بادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز توسط تقویت نقره نانوذرات طلا بر الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۸: ۱-۱۲.