

Synthesis, characterization, and application of gold nanostars for the identification of 2-Arachidonoyl glycerol

Fereshteh Kohansal¹, Ahmad Mobed², Mohammad Hasanzadeh^{1*}, Ali Ahmadelipour³, Nasrin Shadjou⁴¹Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran²Aging Research Institute, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran³Research Center of Psychiatry and Behavioral Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran⁴Department of Nano Chemistry, Nanotechnology Research Center, Faculty of Science and Chemistry, Urmia University, Urmia, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 7 May 2022

Accepted: 29 Aug 2022

ePublished: 16 Oct 2022

Keywords:

- Advanced nanomaterial
- Biotechnology Biosensor
- Endocannabinoid
- Immunoanalysis

Abstract

Background. The endocannabinoid system (ECS) is a complex of neurotransmitters in the central nervous system (CNS) and plays a key role in regulating cognitive and physiological processes. Also, 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) is one of the imperative endocannabinoids with key roles in the CNS. It acts as a signaling lipid and activates the cannabinoid CB1 receptor. In addition, 2-AG is involved in a variety of physiological functions such as energy balance, emotion, pain sensation, cognition, and neuroinflammation. Hence, rapid and specific diagnosis of 2-AG is of great importance in medical neuroscience. Routine methods used in detection of 2-AG are not sensitive and specific. Therefore, the development of new methods in this area has been one of the most important research areas in recent years.

Methods. Herein, an innovative immunosensor was developed for quantification of 2-AG. To this end, gold nanostars (GNSs) were synthesized and conjugated with a specific biotinylated antibody activated by EDC/NHS against 2-AG. The resultant bio-conjugate was immobilized on the gold electrode surface and used to detect and analyze 2-arachidonoylglycerol antigen by cyclic voltammetry (CV), square wave voltammetry (SWV), differential pulse voltammetry (DPV), and electrochemical impedance spectroscopy techniques.

Results. For the first time, 2-AG protein was measured with an excellent linear range of 0.00048-1 ng/L and lower limit of quantification of 0.00048 ng/L by electroanalysis method. The designed immunosensor showed high sensitivity and specificity in the presence of interfering antigens, which proved its appropriate use in the diagnosis of neurological disorders.

Conclusion. The remarkable achievement of the present study is the development of a new immunosensor for the sensitive and accurate detection of 2-AG. The fabricated sensor substrate showed good analytical results for the target analyte. Regardless of the appropriate sensitivity and selectivity of the designed biosensor, the stability of the sensor is low and it is recommended to use it immediately after preparation. Also, the immunosensor engineered in this research was very economical and had a very fast and good performance compared to the usual and traditional methods for detecting 2-AG.

Practical Implications. For the first time, 2-AG protein was measured with an excellent linear range of 0.00048-1 ng/L and lower limit of quantification of 0.00048 ng/L by electroanalysis method. The designed immunosensor showed high sensitivity and specificity in the presence of interfering antigens, which proved its appropriate use in the diagnosis of neurological disorders.

How to cite this article: Kohansal F, Mobed A, Hasanzadeh M, Ahmadelipour A, Shadjou N. Synthesis, characterization, and application of gold nanostars for the identification of 2-Arachidonoyl glycerol. 2022;44(4):290-304. doi: 10.34172/mj.2022.036. Persian.

*Corresponding author; Email: hasanzadehm@tbzmed.ac.ir

© 2022 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

Extended Abstract

Background

The endocannabinoid system (ECS) is a complex of neurotransmitters in the central nervous system (CNS) and plays a key role in regulating cognitive and physiological processes. ECS basically binds to cannabinoid receptor (CBRs), and enzymes that are expressed through the CNS, as well as the peripheral nervous system and brain. Also, 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) is one of the imperative endocannabinoids with key roles in the CNS. It acts as a signaling lipid and activates the cannabinoid CB1 receptor. In addition, 2-AG is involved in a variety of physiological functions such as energy balance, emotion, pain sensation, cognition, and neuroinflammation. Hence, rapid and specific recognition of 2-AG in real samples is of great importance in neuroscience. Traditional methods used in detection of 2-AG are not sensitive and specific. Therefore, the development of new methods in this area has been one of the most important research areas in recent years.

Methods

Herein, an innovative immunosensor was developed for quantification of 2-AG. To this end, gold nanostars (GNSs) were synthesized and conjugated with a specific biotinylated antibody activated by EDC/NHS against 2-AG. GNSs were synthesized and conjugated with a specific biotinylated antibody against 2-AG (antigen). The obtained mixture was immobilized on the surface of a gold electrode and used for the detection of the target protein based on the immunocomplex formation followed by analysis using different electrochemical techniques. The resultant bio-conjugate was immobilized on the gold electrode surface and used to detect and analyze 2-AG antigen by cyclic voltammetry (CV), square wave voltammetry (SWV), differential pulse voltammetry (DPV), and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques. Also, field emission electron microscopy (FESEM) and atomic force microscopy (AFM) were utilized for the characterization of synthesis nanoparticles and

investigation of electrode surface. The engineered immunosensor showed high sensitivity and specificity in the presence of interfering antigens, proving its utility in neurological disorders detection. This immunosensor is the first immunosensor for monitoring 2-AG in real samples.

Results

In summary, we designed a novel immunosensor for the detection of 2-Ag. For the first time, 2-AG protein was measured with an excellent linear range of 0.00048-1 ng/L and lower limit of quantification of 0.00048 ng/L by electro analysis method. The designed immunosensor showed high sensitivity and specificity in the presence of interfering antigens, which proved its appropriate use in the diagnosis of neurological disorders. The analytical results obtained in this study are evaluated in comparison with other methods. In spite of the simple and inexpensive structure of the created platform, it has suitable sensitivity and specificity. The routine methods of 2-AG detection are difficult and require advanced and expensive tools. On the other hand, interpreting the results of routine methods requires experienced people, while the results obtained in methods based on biosensors are simple and fast. The created sensor has suitable analytical features including acceptable analytical results. Based on the results, the reproducibility (RSD= 2.11%) and repeatability (RSD = 2.45%) of the developed system is significant. The system designed in this study has a simple and low-cost structure and its development can be considered as a suitable alternative to routine and expensive methods such as high-performance liquid chromatography (HPLC). Also, based on the performance of immuno-platform rat plasma samples, sleep deprivation significantly increased 2-AG in bio fluids. As a result, this immunosensor can be utilized in the diagnosis of depression and sleep disorders. The engineered immunosensor showed high sensitivity and specificity in the presence of interfering antigens, proving its utility

in the detection of neurological disorders. This immunosensor is the first type of nanosensor for the detection of 2-AG in real samples. So, the first innovation is designing a novel sandwich type immunosensor for this analyte. Excellent analytical results are other advantages of this biosensor for the detection of 2-Ag in human plasma samples and serum samples of rat under sleep deprivation. This is the first report in the immunosensor of 2-AG by sandwich type immunosensor.

Conclusion

The remarkable achievement of the present study is the development of a new immunosensor for the sensitive and accurate detection of 2-AG.

The fabricated sensor substrate showed good analytical results for the target analyte. Regardless of the appropriate sensitivity and selectivity of the designed biosensor, the stability of the sensor is low and is recommended to be used immediately after preparation. We aimed to establish a platform to detect 2-AG as one of the most important biomarkers in neuroscience. In this study, in addition to electrochemical methods, AFM and FE-SEM were used to analyze the nanostructures and conjugates to design the immunosensor efficiently. The results showed that the engineered immunosensor was economical and had a very fast and good performance compared to the usual and traditional methods of detecting 2-AG.

سنتز، بررسی خصوصیات و کاربرد نانوذرات ستاره‌ای طلا جهت شناسایی ۲-آراشیدونیل گلیسرول

فرشته کهنسال^۱، احمد موبد^۲، محمد حسن زاده^{۳*}، علی احمد علیپور^۳، نسرين شادجو^۴

^۱مرکز تحقیقات آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۲پژوهشکده سالمندی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۳مرکز تحقیقات روانپزشکی و علوم رفتاری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۴گروه نانو شیمی، پژوهشکده نانو فناوری، دانشکده شیمی و علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

زمینه. سیستم اندوکannabinoid (ECS) مجموعه‌ای از انتقال‌دهنده‌های عصبی در سیستم عصبی مرکزی است و نقش کلیدی در تنظیم فرآیندهای عصبی و فیزیولوژیکی دارد. ۲-آراشیدونیل گلیسرول (AG-2) یکی از اندوکannabinoidهای ضروری است که نقش کلیدی در سیستم عصبی مرکزی دارد. AG-2 به عنوان یک لیپید سیگنال دهنده عمل کرده و گیرنده cannabinoid CB1 را فعال می‌کند. علاوه بر این، AG-2 در انواع عملکردهای فیزیولوژیکی مانند تعادل انرژی، احساسات، احساس درد، شناخت و التهاب عصبی نقش دارد. بنابراین تشخیص سریع و اختصاصی AG-2 در علوم اعصاب پزشکی اهمیت زیادی دارد. با توجه به این که روش‌های معمول مورد استفاده در تشخیص AG-2 حساس و اختصاصی نیستند، توسعه روش‌های نوین در این زمینه یکی از مهم‌ترین حوزه‌های تحقیقاتی در سال‌های اخیر است. **روش کار.** در این مطالعه، یک حسگر ایمنی جدید برای تعیین مقدار AG-2 تهیه شده است. برای این منظور نانوذرات طلا با مورفولوژی ستاره‌ای (GNSs) سنتز شده و با آنتی‌بادی بیوتین‌دار که با EDC/NHS فعال شده است، کانژوگ شدند. بیوکونژوگ حاصل روی سطح الکتروود طلا تثبیت شد و برای تشخیص و آنالیز آنتی‌ژن ۲-آراشیدونیل گلیسرول به وسیله روش‌های ولتامتری چرخه‌ای (CV)، موجی مربعی (SWV)، پالس تفاضلی (DPV) و همچنین طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی استفاده شد.

یافته‌ها. برای اولین بار، پروتئین AG-2 با دامنه آنالیتیکال خطی مناسب در حدود ۱-۰۰۰۴۸ نانوگرم بر لیتر و کم‌ترین حد تشخیص ۰۰۰۴۸ نانوگرم بر لیتر به وسیله زیست‌حسگر توسعه یافته اندازه‌گیری شد. حسگر ایمنی طراحی شده حساسیت و اختصاصیت بالایی را در حضور آنتی‌ژن‌های مداخله‌گر نشان داد که کاربرد مناسب آن در تشخیص اختلالات عصبی را اثبات کرد.

نتیجه‌گیری. دستاورد قابل توجه مطالعه حاضر ساخت یک حسگر ایمنی جدید برای تشخیص حساس و دقیق AG-2 است. بستر حسگر ساخته شده نتایج تجزیه‌ای مناسبی را برای آنالیت هدف نشان داد. صرف نظر از حساسیت و گزینش‌پذیری مناسب زیست‌حسگر طراحی شده، پایداری حسگر پایین بوده و توصیه می‌شود که بلافاصله پس از تهیه از آن استفاده شود. نتایج نشان دادند که حسگر ایمنی ساخته شده در این پژوهش در مقایسه با روش‌های معمول و سنتی تشخیص AG-2 بسیار مقرون به صرفه بوده و عملکرد بسیار سریع و خوبی دارد.

پیامدهای عملی. برای اولین بار، پروتئین AG-2 با دامنه آنالیتیکال خطی مناسب در حدود ۱-۰۰۰۴۸ نانوگرم بر لیتر و کم‌ترین حد تشخیص ۰۰۰۴۸ نانوگرم بر لیتر به وسیله زیست‌حسگر توسعه یافته اندازه‌گیری شد. حسگر ایمنی طراحی شده حساسیت و اختصاصیت بالایی را در حضور آنتی‌ژن‌های مداخله‌گر نشان داد که کاربرد مناسب آن در تشخیص اختلالات عصبی را اثبات کرد.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۷

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۷

انتشار برخط: ۱۴۰۱/۰۷/۲۴

کلید واژه‌ها:

- نانومواد پیشرفته
- زیست حسگر
- بیوتکنولوژی
- اندوکannabinoid
- ایمونوآنالیز

مقدمه

می‌دهد. برای برخی از افراد دیگر نیز مشکلات مربوط به خواب در ابتدا ظاهر می‌شود. مشکلات خواب و افسردگی همچنین ممکن است در عوامل خطر و ویژگی‌های بیولوژیکی مشترک بوده و این دو شرایط ممکن است به برخی از استراتژی‌های درمانی پاسخی

رابطه خواب و افسردگی پیچیده است. افسردگی می‌تواند باعث مشکلات خواب شده و مشکلات خواب ممکن است به اختلالات افسردگی منجر شده و یا به تشدید آن کمک کند. برای برخی از افراد، علایم افسردگی قبل از شروع مشکلات خواب رخ

*نویسنده‌های مسؤول: ایمیل: hasanzadehm@tbzmed.ac.ir

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

توسط روش‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدان (Field Emission Scanning Electron Microscopes)، پراکندگی نور پویا (Dynamic Light Scattering) و روش‌های پتانسیل زتا شناسایی شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که حسگر ایمنی ساخته شده بستر مناسبی برای بررسی 2-AG در تنظیم سیستم ایمنی و سیستم محافظتی-عصبی، است.

روش کار

کیت 2-AG شامل آنتی‌بادی بیوتین‌دار و غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن استاندارد از شرکت ZellBio GmbH (آلمان) توسط شرکت پادگین طب، فروسیناید، فری‌سانید و پتاسیم کلراید از شرکت مرک آلمان (Merck)، هیدروژن تتراکلروآورات (III) هیدراته ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)، تری‌سدیم سیترات ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)، نیترات نقره (AgNO_3)، بوروهیدرید سدیم (NaBH_4)، اسید اسکوربیک و ستیل تری متیل آمونیوم برمید (CTAB) همه از سیگما آلدریج (Ontario, Canada)، نمونه‌های پلاسمای منجمد تازه از سازمان انتقال خون ایران (تبریز، ایران) خریداری شدند. اهداکنندگان نمونه فرم رضایت‌نامه کتبی مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز (IR.TBZMED.VCR.REC.1398.295) را امضا کردند. نمونه سرم خون موش تازه تهیه شده نیز از پژوهشکده سالمندی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه شد. اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی در یک سل استاندارد سه الکترودی (ساخت شرکت Metrohm)، حاوی الکترود پلاتین به عنوان الکترود کمکی، الکترود طلا به عنوان الکترود کار (با قطر ۲ میلی‌متر) و نقره/نقره کلرید به عنوان الکترود مرجع متصل به یک سیستم اندازه‌گیری پتانسیواستات PalmSens، انجام گرفت. سیستم توسط کامپیوتر با نرم‌افزار PSTrace نسخه ۵/۳ راه اندازی شد. در این مطالعه از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای (CV) برای تمیز کردن الکترود طلا و همچنین برای آنالیز اولیه مراحل ساخت حسگر استفاده شد که داده‌های ورودی تکنیک CV به صورت ($E_{\text{begin}}: -1.0 \text{ V}$, $E_{\text{end}}: 1.0 \text{ V}$, $E_{\text{step}}: 0.01 \text{ V}$, $\text{scan rate}: 0.1 \text{ V/s}$) تنظیم شد. دو تکنیک دیگر که برای کمی‌سازی استفاده شدند، شامل ولتامتری موج مربعی (SWV) (با داده‌های: $T_{\text{equilibration}}: 2 \text{ s}$, $E_{\text{begin}}: -1.0 \text{ V}$, $E_{\text{end}}: 1.0 \text{ V}$, $E_{\text{step}}: 0.005 \text{ V}$, $\text{amplitude}: 0.02 \text{ V}$, $\text{frequency}: 10 \text{ Hz}$) و تکنیک ولتامتری پالس تفاضلی (DPV) (با داده‌های: $T_{\text{equilibration}}: 2 \text{ s}$, $E_{\text{begin}}: -1.0 \text{ V}$, $E_{\text{end}}: 1.0 \text{ V}$, $E_{\text{step}}: 0.05 \text{ V}$, $E_{\text{pulse}}: 0.1 \text{ V}$, $t_{\text{pulse}}: 0.01 \text{ s}$, $\text{scan rate}: 0.1 \text{ V/s}$) بودند. طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (با داده‌های: $T_{\text{equilibration}}: 0 \text{ s}$, $\text{Scan type}: \text{Fixed Potential}$, $E_{\text{dc}}: 0.25 \text{ V}$, $E_{\text{ac}}: 0.01 \text{ V}$, $\text{Max frequency}: 1000 \text{ Hz}$)

برای ارزیابی مراحل ساخت حسگر و همچنین برای کمی‌سازی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل پراکندگی نور دینامیکی (DLS) و ارزیابی پتانسیل زتا، از دستگاه زتاسایزر نسخه ۷/۱ (Malvern Instruments Ltd, England MAL1032660) استفاده شد. تایید تثبیت نانومواد و بیورسپتورها روی سطح و بررسی اندازه GNSs از طریق آنالیز میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) توسط نانوسرف ضربه‌ای، انجام گرفت. میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM, Hitachi-Su8020, Czech) برای بررسی مورفولوژی GNSs ترسیب شده روی سطح الکترود طلا استفاده شد و همچنین عناصر شیمیایی موجود روی سطح الکترود اصلاح شده، با استفاده از طیف‌سنجی پرتو ایکس (EDX) آنالیز شدند. جهت سنتز ذرات نقره (Ag-Seeds)، محلول‌های نیترات نقره ۰/۱۶۳ مولار به مقدار ۱۵۶ میکرولیتر و سدیم سیترات ۰/۰۰۵ مولار (به عنوان عامل مهار کننده) به مقدار ۲۵۰ میکرولیتر به ترتیب به آب دیونیزه اضافه شده و با سرعت متوسط به وسیله همزن مغناطیسی ترکیب شدند (محلول ۱). در مرحله بعد با اضافه کردن ۴۰۰ میکرولیتر سدیم بوروهیدرید ۰/۰۴ مولار (به عنوان عامل احیا کننده) به محلول بالا رنگ آن به زرد تغییر یافت. پس از ۵ دقیقه هم‌زدن ذرات Ag به دست آمده و در دمای اتاق در یک ویال پوشیده شده با ورقه آلومینیومی به مدت ۲ ساعت در یک مکان تاریک نگهداری شد تا دهیدراته شوند. برای سنتز نانوذرات طلا، ۳۶۴ گرم ستیل تری متیل آمونیوم برومید ۰/۰۵ مولار (CTAB) در ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه روی همزن مغناطیسی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد هم زده شد تا محلول شفاف به دست آید (محلول ۲). سپس در دمای آزمایشگاه میزان ۶۰ میکرولیتر نیترات نقره (AgNO_3) به محلول شماره ۲ اضافه شده، بعد از ۲۰ ثانیه ذرات نقره (محلول ۱) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در محیط تاریک و دمای آبی آسمانی به رنگ قهوه‌ای تغییر یافت. بعد از ۲۴ ساعت در دمای اتاق محلول کریستالیزه می‌شود که برای جداسازی کریستال‌ها، محلول روی همزن مغناطیسی ۳۰ درجه و با داخل آب گرم در سونیکاتور قرار داده شد و بعد از آن به مدت ۱۲ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) و بار دوم به مدت ۵ دقیقه دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شد. مایع رویی بی‌رنگ که حاوی مواد سورفاکتانت است به ویال پوشیده شده با ورقه آلومینیومی منتقل و استفاده شد.^{۲۳} تمیز کردن سطح الکترود یکی از مهم‌ترین مراحل در توسعه زیست حسگرهای الکتروشیمیایی است و می‌تواند بر کل فرآیند تاثیر بگذارد.

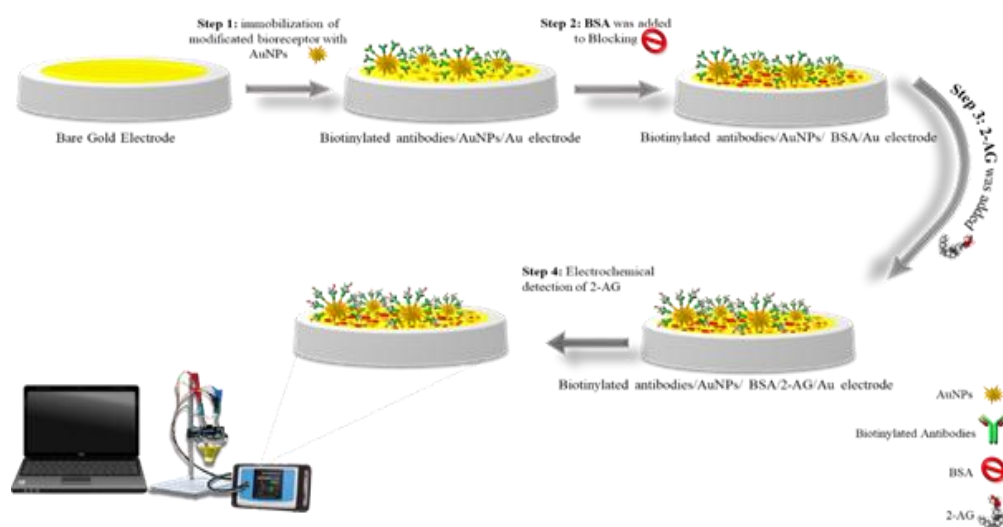
توسط روش‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدان (Field Emission Scanning Electron Microscopes)، پراکندگی نور پویا (Dynamic Light Scattering) و روش‌های پتانسیل زتا شناسایی شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که حسگر ایمنی ساخته شده بستر مناسبی برای بررسی 2-AG در تنظیم سیستم ایمنی و سیستم محافظتی-عصبی، است.

روش کار

کیت 2-AG شامل آنتی‌بادی بیوتین‌دار و غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن استاندارد از شرکت ZellBio GmbH (آلمان) توسط شرکت پادگین طب، فروسیناید، فری‌سانید و پتاسیم کلراید از شرکت مرک آلمان (Merck)، هیدروژن تتراکلروآورات (III) هیدراته ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)، تری‌سدیم سیترات ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)، نیترات نقره (AgNO_3)، بوروهیدرید سدیم (NaBH_4)، اسید اسکوربیک و ستیل تری متیل آمونیوم برمید (CTAB) همه از سیگما آلدریج (Ontario, Canada)، نمونه‌های پلاسمای منجمد تازه از سازمان انتقال خون ایران (تبریز، ایران) خریداری شدند. اهداکنندگان نمونه فرم رضایت‌نامه کتبی مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز (IR.TBZMED.VCR.REC.1398.295) را امضا کردند. نمونه سرم خون موش تازه تهیه شده نیز از پژوهشکده سالمندی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه شد. اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی در یک سل استاندارد سه الکترودی (ساخت شرکت Metrohm)، حاوی الکترود پلاتین به عنوان الکترود کمکی، الکترود طلا به عنوان الکترود کار (با قطر ۲ میلی‌متر) و نقره/نقره کلرید به عنوان الکترود مرجع متصل به یک سیستم اندازه‌گیری پتانسیواستات PalmSens، انجام گرفت. سیستم توسط کامپیوتر با نرم‌افزار PSTrace نسخه ۵/۳ راه اندازی شد. در این مطالعه از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای (CV) برای تمیز کردن الکترود طلا و همچنین برای آنالیز اولیه مراحل ساخت حسگر استفاده شد که داده‌های ورودی تکنیک CV به صورت ($E_{\text{begin}}: -1.0 \text{ V}$, $E_{\text{end}}: 1.0 \text{ V}$, $E_{\text{step}}: 0.01 \text{ V}$, $\text{scan rate}: 0.1 \text{ V/s}$) تنظیم شد. دو تکنیک دیگر که برای کمی‌سازی استفاده شدند، شامل ولتامتری موج مربعی (SWV) (با داده‌های: $T_{\text{equilibration}}: 2 \text{ s}$, $E_{\text{begin}}: -1.0 \text{ V}$, $E_{\text{end}}: 1.0 \text{ V}$, $E_{\text{step}}: 0.005 \text{ V}$, $\text{amplitude}: 0.02 \text{ V}$, $\text{frequency}: 10 \text{ Hz}$) و تکنیک ولتامتری پالس تفاضلی (DPV) (با داده‌های: $T_{\text{equilibration}}: 2 \text{ s}$, $E_{\text{begin}}: -1.0 \text{ V}$, $E_{\text{end}}: 1.0 \text{ V}$, $E_{\text{step}}: 0.05 \text{ V}$, $E_{\text{pulse}}: 0.1 \text{ V}$, $t_{\text{pulse}}: 0.01 \text{ s}$, $\text{scan rate}: 0.1 \text{ V/s}$) بودند. طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (با داده‌های: $T_{\text{equilibration}}: 0 \text{ s}$, $\text{Scan type}: \text{Fixed Potential}$, $E_{\text{dc}}: 0.25 \text{ V}$, $E_{\text{ac}}: 0.01 \text{ V}$, $\text{Max frequency}: 1000 \text{ Hz}$)

به مدت ۲ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (شکل ۱). در این پژوهش نیز از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای (CV) جهت بررسی تحلیلی و تکتیرپذیری حسگر ایمنی ساخته شده در نمونه‌های سرم خونی موش آزمایشگاهی، تکتیرپذیری و پایداری بین روزی و درون روزی حسگر ایمنی طراحی شده در نمونه کیت استاندارد، با داده‌های ورودی: ($T_{\text{equilibration}}: 0 \text{ s}$, $E_{\text{begin}}: -$, $T_{\text{equilibration}}: 0 \text{ s}$, $E_{\text{begin}}: -$, $E_{\text{vertex1}}: 1.0 \text{ V}$, $E_{\text{vertex2}}: -1.0 \text{ V}$, $E_{\text{step}}: 0.01 \text{ V}$, $\text{scan rate}: 0.1 \text{ V/s}$)، استفاده شد. به دلیل حساسیت و دقت بالا جهت بررسی رفتار الکتروشیمیایی، بررسی آنالیتیکال در نمونه‌های پلاسما، پایداری بین روزی و انتخاب‌پذیری از تکنیک ولتامتری موج مربعی (SWV) با داده‌های ورودی: ($T_{\text{equilibration}}: 2 \text{ s}$, $E_{\text{begin}}: -1.0 \text{ V}$, $E_{\text{end}}: 1.0 \text{ V}$, $E_{\text{step}}:$)، استفاده شد. از تکنیک ولتامتری پالس تفاضلی (DPV) نیز جهت بررسی رفتار الکتروشیمیایی، بررسی آنالیتیکال غلظت‌های مختلف و نمونه‌های پلاسما، پایداری بین روزی و انتخاب‌پذیری با داده‌های ورودی: ($T_{\text{equilibration}}: 2 \text{ s}$, $E_{\text{begin}}: -1.0 \text{ V}$, $E_{\text{end}}: 1.0 \text{ V}$, $E_{\text{step}}: 0.05 \text{ V}$, E)، استفاده گردید. برای بررسی مقادیر مقاومت انتقال بار (R_{ct}) در غلظت‌های مختلف نمونه‌های استاندارد و همچنین پلاسما، تکنیک طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (EIS) با داده‌های ورودی: ($T_{\text{equilibration}}: 0 \text{ s}$, $\text{Scan type: Fixed Potential}$, $E_{\text{dc}}: 0.25 \text{ V}$, $E_{\text{ac}}: 0.01 \text{ V}$, $\text{Max frequency}: 100000.0 \text{ Hz}$, $\text{Min frequency}: 0.1 \text{ Hz}$)، استفاده شد.

طوری‌که هر گونه عوامل آلوده کننده محیطی روی سطح الکترودهای طلا در نتیجه واکنش‌های الکتروشیمیایی را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین، یک سطح تمیز و فعال قبل از اصلاح شیمیایی الکترودها و تشخیص الکتروشیمیایی مهم است. در این تحقیق، از یک تکنیک پاکسازی الکتروشیمیایی بسیار رایج برای فعال کردن و پولیش سطوح الکترودهای طلا استفاده شد. برای پاکسازی و فعال‌سازی الکتروشیمیایی از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای در بازه پتانسیل ۴۰۰- تا ۱۴۰۰ میلی‌ولت در مقابل الکتروکدکی Ag/AgCl با سرعت روبش ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه در محلول سولفوریک اسید ۵۰ میلی‌مولار توسط ۱۲ چرخه اکسایش-کاهش، استفاده شد. در مرحله اول فعال‌کننده و واسطه شیمیایی مرسوم و قدرتمند EDC/NHS برای اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات طلا (GNSs) اضافه شد. برای این کار ۱۰ میکرولیتر EDC/NHS با ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی بیوتین‌دار (نسبت ۲:۱) ترکیب گردید. سپس ۱۵ میکرولیتر از محلول نانوذرات طلای ستاره‌ای به ترکیب فوق افزوده شده (نسبت ۱:۱ با ترکیب فوق) و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه نگهداری شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌بادی روی سطح الکتروکد طلا تثبیت و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون آنتی‌بادی بیوتین‌دار، جهت جلوگیری از هر گونه آلودگی احتمالی سطح الکتروکد با آب دیونیزه شستشو داده شد. برای پوشش نواحی خالی از آنتی‌بادی، ۱۰ میکرولیتر آلبومین سرم گاوی ۱۰ درصد روی الکتروکد طلا تثبیت و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. در مرحله آخر، ۱۰ میکرولیتر آنتی‌ژن 2-AG به سطح الکتروکد اضافه شده و



شکل ۱. تصویر شماتیک ایمونوسنسور طراحی شده برای شناسایی 2-AG

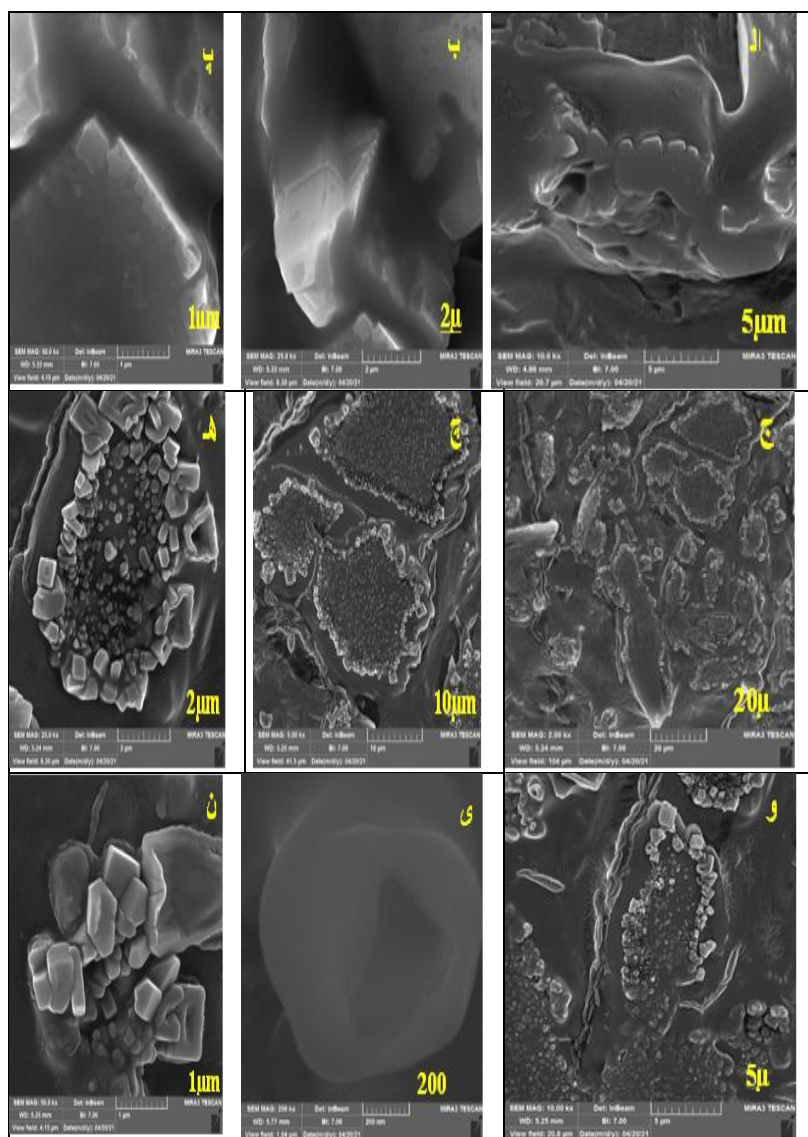
یافته‌ها

در این مطالعه از تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای، موجی مربعی، پالس تفاضلی و امپدانس الکتروشیمیایی برای بررسی مورفولوژیکی نانوکامپوزیت سنتز شده استفاده شد. میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) برای تشخیص مورفولوژی نانوکامپوزیت و توزیع اندازه در بزرگنمایی‌های مختلف استفاده شد. مطابق شکل پیوست (شماره پ ۱، فایل پیوست مقاله) در بزرگنمایی‌های مختلف، نانوذرات طلای سنتز شده گلبه‌هایی نشان می‌دهند که در یک حدود ۶۰ تا ۱۰۰ نانومتر را تشکیل می‌دهند. تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی (ATOMIC FORCE MICROSCOPY) نتایج به دست آمده توسط FESEM را تایید کردند (شکل شماره پ ۲، فایل پیوست مقاله).

بحث

برای مطالعه رفتار الکتروشیمیایی حسگر ایمنی تهیه شده در مراحل مختلف، از تکنیک ولتامتری موجی مربعی و پالس تفاضلی استفاده گردید. همه ولتاموگرام‌ها در محیط فروسیانید/فری‌سیانید/پتاسیم کلرید ۵/۵ میلی‌مولار به عنوان حد واسط الکتروشیمیایی ثبت شدند. در ابتدا، طیف ولتامتری موج مربعی (SWV) و پالس تفاضلی (DPV) از الکترود طلای اصلاح نشده ثبت شد که مطابق شکل به ترتیب پیک SWV در ۷ V و $E_p = 0.25$ و $I_p = 11 \mu A$ و پیک DPV در $V = 0.29$ و $E_p = 0.41/98 \mu A$ مشاهده شد. سپس ولتاموگرام موج مربعی و پالس تفاضلی نانوذرات طلای کانژوگه شده با آنتی‌بادی بیوتین دار ثبت شد. E_p و I_p به ترتیب در ۱۶/۰ ولت و ۲۰ میکروآمپر در طیف SWV و ۹۹/۰ ولت و ۵۵ میکروآمپر در طیف DPV ظاهر شدند. پس از تثبیت آنتی‌ژن 2-AG روی الکترود اصلاح شده با نانوذرات طلای کانژوگه شده با آنتی‌بادی، شدت جریان تغییر کرده و به ۱۶/۱۴ میکروآمپر و ۳۳/۱۱ میکروآمپر (به ترتیب برای SWV و DPV) کاهش می‌یابد که این به معنی شناسایی حساس آنالیت مورد نظر است (شکل شماره پ ۳-الف و ب، فایل پیوست). برای بررسی مقاومت الکتروشیمیایی هر یک از الکترودهای اصلاح شده با نانوذرات طلای کانژوگه شده با آنتی‌بادی بیوتین دار و آنتی‌ژن 2-AG از تکنیک طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی استفاده گردید. برای این کار نیز الکترودها در محیط فروسیانید/فری‌سیانید/پتاسیم کلرید ۵/۵

میلی‌مولار سنجش شدند. شکل شماره پ ۳ ((ه-و، فایل پیوست)) نشان می‌دهد که شدت جریان الکترود طلای اصلاح نشده ۱۱ میکروآمپر و مقاومت آن ۱۵۳۵۰۰ اهم، الکترود اصلاح شده با ۲۰ GNS-AB ۴۲۵۹۰ اهم، الکترود اصلاح شده با ۱۶/۱۴ GNS-AB-BSA-AG ۱۶/۱۴ میکروآمپر و مقاومت ۸۸۴۲ اهم است. این اعداد نشان می‌دهند که الکترودهای اصلاح شده نسبت به الکترود طلای خالی مقاومت کمتری دارند و این نسبت عکس مقاومت الکتریکی و شدت جریان در رابطه با الکترودهای اصلاح شده در مقایسه با الکترود طلای خالی را به اثبات می‌رساند. برای بررسی ریخت‌شناسی نانوکامپوزیت ساخته شده تکنیک میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) در بزرگنمایی‌های مختلف به کار برده شد. امروزه این تکنیک به‌طور رایج برای تصویربرداری نانوکامپوزیت‌ها استفاده می‌شود. در این مطالعه نیز برای اثبات دقیق‌تر مورفولوژی نانوکامپوزیت در مراحل مختلف، تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی برای الکترودهای طلای اصلاح شده با نانوذرات طلای کانژوگه شده با آنتی‌بادی بیوتین دار و آنتی‌ژن 2-AG ثبت گردید (شکل ۲-الف-پ). آنتی‌بادی بیوتینه شده مورفولوژی ستاره‌ای شکل نانوذرات طلا را تغییر داده است. همچنین از FE-SEM برای تصویربرداری سطح اصلاح شده با AU-GNSS-BIOTINYLATED-BSA-AG در بزرگنمایی‌های مختلف استفاده شد. مطابق نتایج، پس از برهم‌کنش بستر الکترود طلای اصلاح شده با آنتی‌ژن 2-AG مورفولوژی متفاوتی نسبت به مرحله قبل حاصل می‌شود که نشان‌دهنده ایمونوکمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن است (شکل ۲-ج-ن). به طور مشخص، مهم‌ترین بخش اندازه‌گیری کارکرد حسگر ایمنی‌ها عملکرد آنالیتیکال آن است. برای این کار، غلظت‌های مختلف (۰/۰۳۱۲، ۰/۰۶۲۵، ۰/۰۱۲۵، ۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ نانوگرم بر لیتر) آنتی‌ژن تهیه و روی سطح الکترود طلای اصلاح شده با نانوذرات طلا-آنتی‌بادی انکوبه شد. پس از آن، تکنیک‌های ولتامتری پالس تفاضلی و طیف‌سنجی امپدانس برای تشخیص 2-AG در غلظت‌های مختلف استفاده شد (شکل شماره پ ۴ (فایل پیوست)) طبق نمودار شکل پ ۴ (الف و ب، فایل پیوست)، رابطه معکوس و معنی‌داری بین شدت جریان و غلظت 2-AG به دست آمد، طوری‌که با افزایش غلظت، شدت جریان به تدریج کاهش یافته و این تغییر به صورت خطی است. یعنی حسگر ایمنی ساخته شده تا ۰/۰۳۱۲ نانوگرم بر لیتر، غلظت آنتی‌ژن هدف را به خوبی شناسایی کرده است.



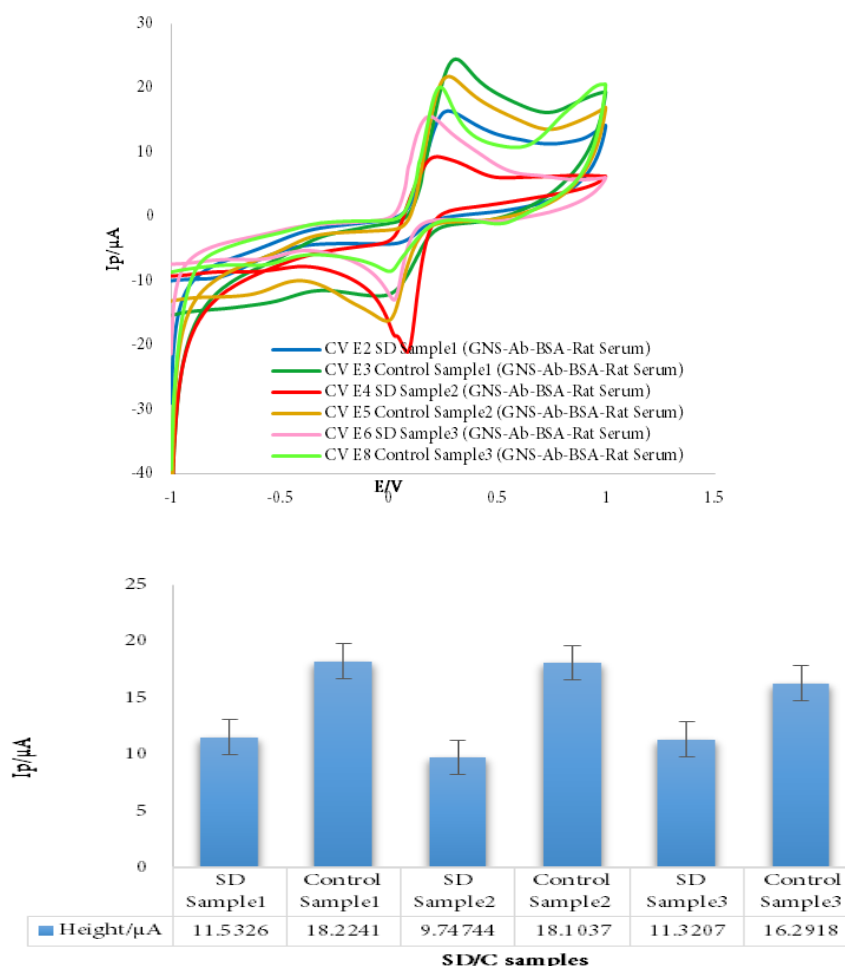
شکل ۲. (الف - پ) تصاویر میکروسکوپ الکترونی (FE-SEM) الکترود طلای اصلاح شده با نانوذرات طلای ستاره‌ای کائوچوگه شده با آنتی‌بادی بیوتین‌دار و (ج - ن) تصاویر میکروسکوپ الکترونی (FE-SEM) الکترود طلای اصلاح شده با نانوذرات طلای ستاره‌ای کائوچوگه شده با آنتی‌بادی بیوتین‌دار - آنتی‌ژن 2-AG با بزرگنمایی‌های متفاوت

فایل پیوست)، کاهش غلظت منجر به افزایش شدت جریان می‌شود. بنابراین یک رابطه خطی مناسب بین غلظت و شدت جریان به وجود آمده است و حسگر ایمنی ساخته شده قادر است 2-AG را در غلظت‌های بسیار پایین به درستی تشخیص دهد. نتایج مشابهی توسط تکنیک EIS به دست آمد (شکل پ-۵، ج، فایل پیوست). در این نمودار بیشترین مقاومت (۵۷۸۷۰ اهم) مربوط به پایین‌ترین غلظت (۰/۰۰۹۷٪ نانوگرم بر لیتر) ثبت گردید. نمودار کالبراسیون خطی در شکل ۶-د، نتایج به دست آمده در شناسایی 2-AG در غلظت‌های مختلف را تایید می‌کند. پس از ارزیابی عملکرد حسگر ایمنی در نمونه‌های استاندارد موجود در

در شکل پ ۴ (ج، فایل پیوست) برای حسگر ایمنی ساخته شده، مقادیر مقاومت انتقال بار (R_a) با افزایش غلظت آنتی‌ژن هدف کاهش یافته است. غلظت بالا به معنای ضخامت بالای آنتی‌ژن تثبیت شده روی الکترود طلای اصلاح شده است. این مقدار مقاومت الکتریکی بالاتر میزان عبور بار را دشوار می‌کند و در نتیجه تبدیل در فرکانس‌های پایین رخ می‌دهد. شکل شماره پ ۵ (فایل پیوست) نشان دهنده ولتاموگرام پالس تفاضلی و طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی حسگر ایمنی طراحی شده و همچنین منحنی کالبراسیون 2-AG در غلظت‌های پایین‌تر از ۰/۰۳۱۲٪ نانوگرم بر لیتر را نشان می‌دهد. طبق شکل شماره پ ۵ (الف و ب،

نمونه استاندارد است (شکل پ-۵- فایل پیوست مقاله). همچنین پس از ارزیابی و تعیین مقدار 2-AG در نمونه‌های استاندارد موجود در کیت و در پلاسمای خون انسانی، شرایط مشابه با تکنیک ولتامتری چرخه‌ای برای مطالعه نشانگر یاد شده در نمونه‌های سرم خونی موش آزمایشگاهی نیز فراهم شد. این سرم‌ها از خون موش‌های گروه محرومیت از خواب و گروه کنترل گرفته شده و روی سطح الکتروود اصلاح شده با آنتی‌بادی-نانوذرات طلا تثبیت شدند. نتایج به دست آمده بسیار شگفت‌انگیز بود و حضور 2-AG در سرم موش‌های گروه محرومیت از خواب را به اثبات می‌رساند (شکل ۳). این نتایج نشان‌دهنده حساسیت و اختصاصیت مناسب پلتفرم توسعه یافته است.

کیت و کسب نتایج قابل قبول، شرایط و همچنین تکنیک‌ها و غلظت‌های مشابه برای مطالعه تحلیلی در نمونه‌های پلاسمای خون تنظیم شدند. ولتامتری موج مربعی حسگر ایمنی در حضور 2-AG با غلظت‌های مختلف اسپایک شده در پلاسمای خون ثبت شد که نتایج آن در شکل پ ۶ (فایل پیوست مقاله) درج شده است. در ادامه، سری دیگری از غلظت‌های مختلف (شامل ۰/۰۱۵۶ تا ۰/۰۰۹۷ نانوگرم بر لیتر) تهیه شد (شکل شماره پ ۷). همانند مرحله قبل، از تکنیک‌های DPV، SWV و EIS استفاده شد. همچنین در این مرحله کمترین غلظت آنتی‌ژن، ۰/۰۰۴۸۸ نانوگرم بر لیتر نیز در این آزمایش وارد شد. تمامی نتایج کالیبراسیون خطی مربوط به تست الکتروشیمیایی حسگر ایمنی تهیه شده با پلازما مشابه نتایج بررسی تحلیلی حسگر ایمنی در غلظت‌های مختلف



شکل ۳. الف) ولتاموگرام چرخه‌ای حسگر ایمنی طراحی شده برای تشخیص و تعیین مقدار 2-AG در سرم خونی گروه‌های محرومیت از خواب و کنترل موش‌های آزمایشگاهی، در محلول $(K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6)KCl$ (0.5Mm). ب) منحنی کالیبراسیون تغییرات شدت جریان حسگر ایمنی جهت شناسایی 2-AG در نمونه‌های سرم خونی موش‌های آزمایشگاهی.

جدول ۱. مقایسه تحلیلی روش‌های رایج برای شناسایی 2-AG

انواع روش‌ها	نمونه	محدوده تشخیص / کمترین حد تشخیص	محدوده خطی	محدودیت‌ها/مزایا	منابع
UHPLC-MS/ MS	پلاسما	ng/ mL	۰.۰۴-۱۰ ng/ml	گران قیمت، عملیات سخت	(۲۴)
LC-MS/MS	پلاسما	۱۹۰ ng/mL	۰.۰۴-۱۲/۳ ng/ml	نیازمند ابزار پیشرفته	(۲۰)
LC-MS/MS	سلولهای انسانی	۱/۷ ng/mL	۵ ng/ml	عملیات سخت	(۲۵)
LC-MS/MS	پلاسما	۲ ng/mL	۵۰ ng/mL	نیازمند ابزار پیشرفته	(۲۱)
LC-MS/MS	مغز موش	۷/۵ ng/mL	-	پیش تیماری، اتلاف وقت	(۲۶)
HPLC	بیولوژیکی	۵۰ fmol	۱- ۵۰۰ pmol/ml	گران قیمت، نیازمند فرد متخصص	(۲۷)
EC immunosensing	بیولوژیکی پلاسمای انسانی، سرم خونی موش	۰/۰۰۰۲۴ ng/L	۰/۰۰۷۸-۰/۰۰۰۲۴ ng/L	انجام عملیات آسان و سریع، حساسیت بسیار خوب، دامنه خطی گسترده، انتخاب پذیری قابل قبول	(۲۸)
EC immunosensing	بیولوژیکی، پلاسمای انسانی، سرم خونی موش	۰/۰۰۰۴۸ ng/L	۱۰-۰/۰۰۰۴۸ ng/L	حساسیت و پایداری قابل قبول، دامنه خطی گسترده، قابل استفاده برای نمونه‌های واقعی	این پژوهش

تشخیص 2-AG دشوار بوده و به ابزارهای پیشرفته و گران قیمت نیاز دارند. از سوی دیگر، تفسیر نتایج روش‌های قدیمی نیازمند افراد مجرب است، در حالی که نتایج به دست آمده در روش‌های مبتنی بر حسگرهای زیستی، ساده و سریع بوده و تفسیر ساده‌ای دارند. جدول ۱ نتایج تجزیه‌ای روش‌های رایج (قدیمی) تشخیصی ۲-آراشیدونیل گلیسرول با روش کنونی توسعه یافته را مقایسه می‌کند. طبق نتایج مندرج در جدول ۱، روش‌هایی همچون کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و طیف‌سنجی جرمی، روش‌هایی رایج در تشخیص 2-AG هستند و با وجود محدودیت‌های بسیار و عملیات سخت، محدوده تشخیص و دامنه خطی نامناسبی نسبت به روش حسگر ایمنی نشان می‌دهند. در حالی که محدوده تشخیص در مطالعه حاضر ۰/۰۰۰۴۸ نانوگرم بر لیتر است. مطابق نتایج جدول ۱ مشخص گردید که در بین روش‌های کروماتوگرافی (روش‌های قدیمی)، مناسب‌ترین حد تشخیص ۱/۷ نانوگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است. در این راستا، پایداری بین روزی ترکیب نانوذرات طلا-آنتی‌بادی تثبیت شده روی سطح الکتروده طلا با استفاده از تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای، موج مربعی، پالس تفاضلی و طیف سنجی امپدانس در طی سه روز ارزیابی شد. طبق شکل پ ۱۰ (فایل پیوست مقاله)، پایداری حسگر زیستی ساخته شده در روز اول قابل قبول است اما در روز دوم و سوم کاهش قابل توجهی را نشان می‌دهد. روند کاهشی پایداری در سه روز متوالی در تمامی تکنیک‌های استفاده شده کاملاً مشهود است. طوری که روز اول شدت جریان CV، SWV و DPV به ترتیب ۲۰، ۲۱ و ۵۴ میکروآمپر بود. همچنین در روز دوم، مقدار شدت جریان مربوط به هر تکنیک به ۴ میکروآمپر کاهش یافت. این مقادیر در روز سوم مجدد به ۲/۹، ۳/۲ و ۸/۲ میکروآمپر مربوط

از تکثیرپذیری (Reproducibility) برای توصیف نزدیکی نتایج به دست آمده با یک روش در شرایط مختلف استفاده می‌شود. در این مرحله، رفتار الکتروشیمیایی الکترودهای اصلاح شده با Au/GNS-Ab-BSA-SD (نمونه‌های سرم موش محرومیت از خواب) و Au/GNS-Ab-BSA-Ctrl (سرم خونی موش‌های گروه کنترل) در شرایط یکسان ارزیابی شد. همان طور که انتظار می‌رفت الکترودهای با گروه‌های یکسان رفتار الکتروشیمیایی مشابهی از خود نشان دادند (شکل پ ۸- فایل پیوست مقاله). حسگر ایمنی ساخته شده، 2-AG را در سرم گروه محرومیت از خواب به خوبی تشخیص داد. بر این اساس پیک شدت جریان در این گروه به ۱۵ میکروآمپر و E_p به ۰/۲ ولت رسیده، اما در گروه کنترل شدت جریان به ۲۴ میکروآمپر و E_p به ۰/۳۴ ولت افزایش یافته است بنابراین دی-آراشیدونیل گلیسرول در این گروه شناسایی نشده است. به نظر می‌رسد که این شرایط در تمام الکترودها تقریباً یکسان بود که نشان‌دهنده تکثیرپذیری عالی بستر تهیه شده است. برای ارزیابی تکثیرپذیری حسگر ایمنی تهیه شده، از تکنیک CV استفاده شد. تکثیرپذیری حسگر ایمنی با تهیه پنج حسگر ایمنی تحت شرایط آزمایشگاهی و غلظت آنتی‌ژن یکسان (۱ نانوگرم بر لیتر) بررسی شد. مطابق شکل پ ۹ (فایل پیوست مقاله)، شدت جریان پیک هر ۵ الکترودها تقریباً برابر است (شدت جریان = ۲۱، ۱۹، ۱۸/۶، ۱۸/۴، ۱۸/۲ میکروآمپر). این نتایج تکثیرپذیری مناسب و رضایت‌بخش حسگر ایمنی را تایید می‌کند. نتایج تحلیلی به دست آمده در این مطالعه در مقایسه با روش‌های دیگر (جدول ۱) ارزیابی شده است. با وجود ساختار ساده و مقرون به صرفه، بستر طراحی شده، حساسیت و ویژگی مناسبی داشت. همانطور که در قسمت‌های قبلی توضیح داده شد، روش‌های معمول

شناسایی 2-AG، هنوز پیشرفت‌های زیادی به خصوص در زمینه بهبود پایداری حسگر ایمنی، نیاز است. پیش‌بینی می‌شود که این کار افق‌های جدیدی را در زمینه طراحی بستر حسگر ایمنی برای بررسی 2-AG در مایعات بیولوژیکی انسان و غربالگری سریع جهت تشخیص حساس بیماری‌های عصب‌شناختی باز کند.

قدردانی‌ها

نویسندگان این مقاله از مرکز تحقیقات آنالیز دارویی و همچنین پژوهشکده سالمندی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به دلیل حمایت‌های مالی و علمی و از تمام دست‌اندرکاران این مقاله که در بخش تجربی و نوشتن مقاله مشارکت داشتند تشکر و قدردانی می‌کنند.

مشارکت پدیدآوران

فرشته کهنسال (اجرا مطالعه)، احمد موبد (تحلیل نتایج)، محمد حسن‌زاده (طراحی مطالعه)، علی احمد علیپور (طراحی مطالعه)، نسرين شادجو (تحلیل و تفسیر داده‌ها)، همه نویسندگان تهیه دست نوشته، تنظیم مطالعه و همچنین تالیف مقاله و تایید نسخه نهایی را برعهده داشتند.

منابع مالی

از این طرح تحقیقاتی از طرف مرکز تحقیقات آنالیز دارویی و موسسه نیماد حمایت مالی شده است.

دسترس‌پذیری داده‌ها

همه داده‌های ایجاد شده در این مطالعه در این مقاله گنجانده شده‌اند. همچنین داده‌های ارایه شده در مطالعه فعلی در صورت درخواست طبق موازین از نویسندگان مستول، قابل ارایه هستند.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاق IR.NIMAD.REC.1400.059 در تاریخ ۱۴۰۰/۰۶/۲۱ تصویب شده است.

تعارض منافع

مولفان اظهار می‌کنند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارند.

به CV، SWV و DPV کاهش یافت. پس از بررسی پایداری بین روزی، پایداری درون روزی حسگر ایمنی نیز ارزیابی شد (شکل پ ۱۱- فایل پیوست مقاله). پایداری حسگرهای زیستی در زمان‌های مختلف پس از آماده‌سازی (۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت) سنجیده شد. با توجه به نتایج، زیست‌حسگر توسعه یافته پایداری مناسب در ساعت اول داشته و روند پایداری در ساعات بعد کاهشی است. در مطالعه حاضر برای ارزیابی انتخاب‌پذیری، از سه آنتی‌ژن متفاوت دیگر (پرستات (PSA)، آنتی‌ژن کارسینوآمبریونیک (CEA) و آنتی‌ژن آلفا-سینوکلئین (SNCA)) استفاده شد و ولتاموگرام چرخه‌ای، موج مربعی، پالس تفاضلی و طیف سنجی امپدانس حسگر ایمنی ثبت شد (شکل پ ۱۲- فایل پیوست مقاله). مطابق نمودار شکل پ ۱۲ (فایل پیوست مقاله)، الکترواد اصلاح شده با نانوذرات طلا-آنتی‌بادی-آنتی‌ژن 2-AG+PSA، 2-AG+CEA و 2-AG+SNCA بیشترین پیک شدت جریان (در هر سه تکنیک) را نسبت به حسگر کانتروگه شده با آنتی‌ژن 2-AG نشان داده‌اند. یعنی این ابزار زیستی برای تعیین مقدار 2-AG در حضور برخی مداخله‌گرها (PSA، SNCA و CEA) قابل استفاده بوده و بنابراین انتخاب‌پذیری بالا و قابل اطمینانی دارد.

نتیجه‌گیری

دست‌آورد قابل توجه مطالعه حاضر ساخت یک حسگر ایمنی جدید برای تشخیص حساس و دقیق 2-AG است. زیست حسگر ساخته شده دامنه آنالیتیکال خطی در بازه ۱ تا ۰/۰۰۰۴۸ نانوگرم بر لیتر را با کمترین حد تشخیص (LLOQ) ۰/۰۰۰۴۸ نانوگرم بر لیتر، نشان داد. حسگر ایمنی طراحی شده حساسیت بالا و انتخاب‌پذیری مناسبی را از خود نشان داد. بنابراین صرف نظر از حساسیت و گزینش‌پذیری مناسب آن، پایداری حسگر پایین بوده و توصیه می‌شود که بلافاصله پس از تهیه از آن استفاده شود. همچنین نتایج به دست آمده، تکتیرپذیری مناسب و رضایت بخش حسگر ایمنی ساخته شده در نمونه‌های سرم خونی موش آزمایشگاهی گروه کنترل و محروم از خواب و نیز نمونه انسانی را تایید می‌کند. نتایج نشان دادند که حسگر ایمنی ساخته شده در این پژوهش در مقایسه با روش‌های معمول و سنتی تشخیص 2-AG بسیار مقرون به صرفه بوده و عملکرد بسیار سریعی دارند. با توجه به ساختار ساده و تفسیر آسان نتایج، به نظر می‌رسد که حسگر ارایه شده می‌تواند به راحتی جایگزین روش‌های پیچیده و گران‌قیمت قدیمی شده و برای مصارف آزمایشگاهی و بالینی استفاده شود. با وجود موفقیت چشمگیر مطالعه حاضر در

References

1. Borbély AA, Wirz-Justice A. Sleep, sleep deprivation and depression. *Hum Neurobiol.* 1982;1(205):10.
2. Lubetkin EI, Jia H. Burden of disease due to sleep duration and sleep problems in the elderly. *Sleep Health.* 2018;4(2):182-7. doi: 10.1016/j.sleh.2017.11.007
3. Giedke H, Schwärzler F. Therapeutic use of sleep deprivation in depression. *Sleep medicine reviews.* 2002;6(5):361-77. doi: 10.1053/smr.2002.0235
4. Bishir M, Bhat A, Essa MM, Ekpo O, Ihunwo AO, Veeraraghavan VP, et al. Sleep deprivation and neurological disorders. *Bio Med Research International.* 2020;23:2020. doi: 10.1155/2020/5764017
5. Dopierała E, Rybakowski J. Sleep deprivation as a method of chronotherapy in the treatment of depression. *Psychiatr Pol.* 2015;49(3):423-33. doi: 10.12740/pp/30455
6. Bernabo N, Barboni B, Maccarrone M. Systems biology analysis of the endocannabinoid system reveals a scale-free network with distinct roles for anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *OMICS: A Journal of Integrative Biology.* 2013;17(12):646-54. doi: 10.1089/omi.2013.0071
7. Bermudez-Silva FJ, Cardinal P, Cota D. The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. *Journal of Psychopharmacology.* 2012;26(1):114-24. doi: 10.1177/0269881111408458
8. Toguri JT, Caldwell M, Kelly ME. Turning down the thermostat: modulating the endocannabinoid system in ocular inflammation and pain. *Frontiers in Pharmacology.* 2016;7:304. doi: 10.3389/fphar.2016.00304.
9. Ahmadalipour A, Fanid LM, Zeinalzadeh N, Alizadeh M, Vaezi H, Aydinlou ZH, et al. The first evidence of an association between a polymorphism in the endocannabinoid-degrading enzyme FAAH (FAAH rs2295633) with attention deficit hyperactivity disorder. *Genomics.* 2020;112(2):1330-4. doi: 10.1016/j.ygeno.2019.07.024
10. Amini M, Saboory E, Derafshpour L, Fakhari A, Wu JC, Bruggeman R, et al. The impact of sleep deprivation on sexual behaviors and FAAH expression in the prefrontal cortex of male rats. *Neuroscience Letters.* 2020;735:135254. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135254
11. Ghorbani M, Shahabi P, Karimi P, Soltani-Zangbar H, Morshedi M, Bani S, et al. Impacts of epidural electrical stimulation on Wnt signaling, FAAH, and BDNF following thoracic spinal cord injury in rat. *Journal of Cellular Physiology.* 2020;235(12):9795-805. doi: 10.1002/jcp.29793
12. Grimaldi P, Orlando P, Di Siena S, Lolicato F, Petrosino S, Bisogno T, et al. The endocannabinoid system and pivotal role of the CB2 receptor in mouse spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009;106(27):11131-6. doi: 10.1073/pnas.0812789106
13. Di Marzo V. The endocannabinoidome as a substrate for noneuphoric phytocannabinoid action and gut microbiome dysfunction in neuropsychiatric disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience.* 2020;22(3):259. doi: 10.31887/dcns.2020.22.3/vdimarzo
14. Fan Y, Zong X, Liu J, Ke X, Huang Z, Xu Y. Development of a fragmentation pattern of synthetic cannabinoids based on electrospray ionization mass spectrometry in positive ion mode to screen synthetic cannabinoids in illicit products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2021;193:113723. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113723
15. Martella A, Sepe RM, Silvestri C, Zang J, Fasano G, Carnevali O, et al. Important role of endocannabinoid signaling in the development of functional vision and locomotion in zebrafish. *The FASEB Journal.* 2016;30(12):4275-88. doi: 10.1096/fj.201600602r
16. Sharma C, Sadek B, Goyal SN, Sinha S, Kamal MA, Ojha S. Small molecules from nature targeting G-protein coupled cannabinoid receptors: potential leads for drug discovery and development.

- Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015;2015:25. doi: 10.1155/2015/238482
17. Mallat A, Lotersztajn S. Endocannabinoids and liver disease. I. Endocannabinoids and their receptors in the liver. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2008;294(1):G9-G12. doi: 10.1152/ajpgi.00467.2007
18. Jung YS, Kim Y-H, Radhakrishnan K, Kim D-K, Lee J-H, Oh H, et al. An inverse agonist of estrogen-related receptor γ regulates 2-arachidonoylglycerol synthesis by modulating diacylglycerol lipase expression in alcohol-intoxicated mice. Archives of Toxicology. 2020;94(2):427-38. doi: 10.1007/s00204-019-02648-7
19. Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. Chemistry & Biology. 2007;14(12):1347-56. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.11.006
20. Marchioni C, de Souza ID, Grecco CF, Crippa JA, Tumas V, Queiroz MEC. A column switching ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to determine anandamide and 2-arachidonoylglycerol in plasma samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2017;409(14):3587-96. doi: 10.1007/s00216-017-0300-3
21. Gachet MS, Rhyn P, Bosch OG, Quednow BB, Gertsch J. A quantitative LC-MS/MS method for the measurement of arachidonic acid, prostanoids, endocannabinoids, N-acylethanolamines and steroids in human plasma. Journal of Chromatography B. 2015;976:6-18. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.11.001
22. Bobrich M, Schwarz R, Ramer R, Borchert P, Hinz B. A simple LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of endocannabinoids in biological samples. Journal of Chromatography B. 2020;1161:122371. doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122371
23. Zhang MY, Gao Y, Btsh J, Kagan N, Kerns E, Samad TA, et al. Simultaneous determination of 2-arachidonoylglycerol, 1-arachidonoylglycerol and arachidonic acid in mouse brain tissue using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry. 2010;45(2):167-77. doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122371
24. Bahavarnia F, Mobed A, Hasanzadeh M, Saadati A, Hassanpour S, Mokhtarzadeh A. Bio-assay of *Acintobacter baumannii* using DNA conjugated with gold nano-star: A new platform for microorganism analysis. Enzyme and Microbial Technology. 2020;133:109466. doi: 10.1016/j.enzmictec.2019.109466
25. Lomillo MAA, Ruiz JG, Pascual FJM. Biosensor based on platinum chips for glucose determination. Analytica Chimica Acta. 2005;547(2):209-14. doi: 10.1016/j.aca.2005.05.037
26. Oliveira IGC, Queiroz MEC. A micro salting-out assisted liquid-liquid extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine anandamide and 2-arachidonoylglycerol in rat brain samples. Journal of Chromatography B. 2020;1158:122351. doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122351
27. Ivanov I, Borchert P, Hinz B. A simple method for simultaneous determination of N-arachidonylethanolamine, N-oleylethanolamine, N-palmitoylethanolamine and 2-arachidonoylglycerol in human cells. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2015;407(6):1781-7. doi: 10.1007/s00216-014-8384-5
28. Han B, Wright R, Kirchhoff AM, Chester JA, Cooper BR, Davisson VJ, et al. Quantitative LC-MS/MS analysis of arachidonoyl amino acids in mouse brain with treatment of FAAH inhibitor. Analytical Biochemistry. 2013;432(2):74-81. doi: 10.1016/j.ab.2012.09.031
29. Balvers MG, Verhoeckx KC, Witkamp RF. Development and validation of a quantitative method for the determination of 12 endocannabinoids and related compounds in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of

- Chromatography B. 2009;877(14-15):1583-90. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.04.010.
30. Mobed A, Kohansal F, Ahmadelipour A, Hasanzadeh M, Zargari F. Bioconjugation of 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) biotinylated antibody with gold nano-flowers toward immunosensing of 2-AG in human plasma samples: A novel immuno-platform for the screening of immunomodulation and neuroprotection using biosensing. *Analytical Methods*. 2021;13(3):311-21. doi: 10.1039/d0ay02135k