



Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

h t t p s : / / z i s t i . i a u v a r a m i n . a c . i r



Detection of tetanus toxoid with iron magnetic nanobioprobe

Farzaneh Karkhaneh¹, Ahmad Molai Rad^{1*}, Ziba Karimi Sadr¹
Adele Divsalar², Parvaneh Maghami¹

¹Institute for Convergence Science & Technology, Islamic Azad University Science and Research Branch, Tehran, Iran

²Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran

Article Info

Abstract

Article History:

Recived 2024.05.04

Revised 2025.03.05

Accepted 2025.03.08

KeyWords:

Iron Oxide Nanoparticles
Tetra Ethoxysilane -3
Aminopropyl Tetra Ethoxysilane
Silanization
Tetanus toxoid monoclonal antibody

*Corresponding author:

E-mail address:

molaeirad@gmail.com

Introduction: Iron oxide nanoparticle-based bioprobes are highly suitable platforms for the early diagnosis of fatal infectious diseases like tetanus, due to their exceptional reactivity, biocompatibility, cost-effective production, and straightforward isolation under a magnetic field. This research focused on employing magnetic iron nanobiosensors to detect tetanus toxoid.

Materials and Methods: The initial step involved coating iron oxide nanoparticles with silane groups through the hydrolysis of tetraethoxysilane (TEOS). This was followed by the introduction of amine (NH₂) groups onto the silanized surface using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES). Antibodies were subsequently immobilized onto the modified nanoparticles. The success of the silanization and antibody conjugation procedures was analyzed using Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy, Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), Vibrating-sample magnetometry (VSM), and the Sulforhodamine B (SRB) test. The biosensor's performance and specificity were ultimately assessed through UV/Vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy, an agglutination assay, and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: FT-IR spectroscopy verified the successful formation of Si-O-Si and Si-O-Fe bonds, alongside the presence of TCT chloride and amine groups originating from the anti-tetanus toxin antibodies on the nanoparticle surface. EDX analysis corroborated the silanization process by identifying the existence of silicon (Si), nitrogen (N), and carbon (C) elements. VSM results confirmed that the magnetic saturation value of the nanoparticles remained adequately high for biological uses post-conjugation. Antibody immobilization resulted in an increased absorption intensity observed via UV/Vis spectroscopy. Fluorescence data indicated a rise in the signal intensity of the nanobioprobe when exposed to an antigen concentration of 10 ng/mL. Furthermore, the nanobioprobes exhibited agglomeration in the presence of the tetanus toxoid antigen. The specific formation of an antigen-antibody-nanoprobe complex was confirmed by detection with an HRP-conjugated antibody, validating the high specificity of the nanobioprobe.

Conclusion: The developed magnetic nanobioprobe for tetanus detection, which has a detection limit of 10 ng/mL for the target antigen, presents an efficient solution for integration into Lab-on-a-Chip (LOC) devices and microfluidic chips, enabling rapid diagnostics.

Cite this article: F Karkhaneh , A MolaiRad , Z Karimi Sadr , A Divsalar, P Maghami. Detection of tetanus toxoid with iron magnetic nanobioprobe. Iranian Journal of Biological Sciences. 2025; 20 (1): 1-19



Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



شناسایی توکسوئید کزاز با نانو زیست حسگر مغناطیسی آهن

فرزانه کارخانه^۱، احمد مولایی راد^{۱*}، زیبا کریمی صدر^۱، عادلہ دیو سالار^۲، پروانه مقامی^۱^۱ پژوهشکده جامع علوم و فناوریهای همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
^۲ گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

مقدمه: بیوپروب ها یا کاوشگرهای زیستی مبتنی بر نانوذرات اکسید آهن به دلیل واکنش پذیری بالا، زیست سازگاری، هزینه تولید پایین و جداسازی نمونه تحت میدان مغناطیسی، گزینه خوبی برای تشخیص زودهنگام بیماری های کشنده و عفونی مانند کزاز هستند. هدف از این پژوهش شناسایی توکسوئیدهای کزاز با نانو زیست حسگرهای مغناطیسی آهن است

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۳/۰۲/۱۵
بازنگری ۱۴۰۳/۱۲/۱۵
پذیرش ۱۴۰۳/۱۲/۱۸

مواد و روش: ابتدا گروه های سیلان، با استفاده از هیدرولیز تتراتوکسی سیلان (TEOS) بر روی سطح نانوذرات اکسید آهن پوشش داده شده و گروه های NH₂ با استفاده از ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES) بر روی سطح نانوذرات سیلانی شده، تولید شدند و آنتی بادی بر روی سطح نانوذرات سیلانی شده تثبیت شد. در ادامه، سیلانیزاسیون و آنتی بادی تثبیت شده با استفاده از تکنیک SRB، VSM، EDX، FT-IR، مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، طیف سنجی UV/vis، فلورسانس، آزمایش آگلوتیناسیون و ELISA برای عملکرد و ویژگی حسگر زیستی به کار گرفته شد

کلمات کلیدی

نانوذرات اکسید آهن
تترا اتوکسی سیلان
۳-آمینوپروپیل تتر اتوکسی سیلان
سیلانیزاسیون، سل-ژل
آنتی بادی مونوکلونال توکسوئید کزاز

یافته ها: نتایج طیف سنجی FT-IR نشان داد که پیوندهای Si-O-Si و Si-O-Fe و گروه های کلر TCT و آمین آنتی بادی های ضد سم کزاز روی سطح نانوذرات اکسید آهن تشکیل شده اند. وجود عناصر Si، N و C در آنالیز EDX، سیلانیزاسیون نانوذرات اکسید آهن را تایید می کند. از طرفی، نتایج VSM نشان داد که مقدار نانوذرات مغناطیسی پس از کونزوگه شدن برای کاربردهای بیولوژیکی کافی است. تثبیت آنتی بادی بر روی نانوذرات باعث افزایش شدت جذب در طیف سنج UV/vis شد. نتایج نشان داد که شدت فلورسانس این نانوپروب زیستی در حضور ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر افزایش می یابد. همچنین نانوبیوپروب ها در حضور آنتی ژن توکسوئید کزاز به صورت آگلومرا مشاهده شدند. وجود آنتی ژن کزاز باعث تشکیل کمپلکس آنتی ژن-نانوبیوپروب شد. شناسایی این کمپلکس توسط آنتی بادی متصل به HRP، ویژگی نانوبیوپروب را تایید می کند

* مسئول مکاتبات:

molaeirad@gmail.com

نتیجه گیری: نانوبیوپروب مغناطیسی کزاز با محدودیت تشخیصی ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر آنتی ژن کزاز، در مدت زمان کوتاهی می تواند ابزار خوبی را برای دستگاه های LOC و تراشه های میکروسیال فراهم کند.

شیوه آدرس دهی این مقاله: ف کارخانه، ا مولایی راد، ز کریمی صدر، ع دیو سالار، پ مقامی. شناسایی توکسوئید کزاز با نانو زیست حسگر مغناطیسی آهن. مجله دانش زیستی ایران. ۲۰:۱۴۰۴ (۱): ۱۹-۱



مقدمه

نانوذرات به دلیل اندازه ی کوچک و در نتیجه بالا بودن نسبت سطح به حجم، سطح تماس بالایی با محیط و میکروارگانیسم ها پیدا می کند که این امر می تواند منجر به افزایش فعالیت بیولوژیک و شیمیایی آنها شود. روش های فیزیکی تولید نانووذرات نیازمند صرف انرژی بالایی بوده و روش های شیمیایی نیز معمولاً منجر به باقی ماندن مقداری از واکنشگرهای سمی و عدم استفاده از نانووذرات حاصل در کاربردهای زیستی میشوند. به همین دلیل در سال های اخیر بیوسنتز نانووذرات به وسیله گیاهان و میکروارگانیسم ها، به عنوان روش زیست سازگار و سبز مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. استفاده از عصاره برگ و میوه گیاهان میتواند جایگزینی برای روش های فیزیکی و شیمیایی تولید نانووذرات باشد و امکان تولید در مقیاس وسیع و با هزینه کمتر را فراهم کند و مواردی مانند گیاهان، جلبک ها، قارچ ها، مخمر ها، باکتری ها و ویروس ها در بیوسنتز نانووذرات کاربرد دارند (۱)

داشتن یک ابزار قدرتمند برای تشخیص زودهنگام بیماری ها نیازمند زیرساخت های پیشرفته، تجهیزات گران قیمت و افراد بسیار ماهر است (۲، ۳). طولانی بودن مدت زمان تست، افزایش خطا، کمبود امکانات در مناطق محروم، می تواند روند درمان را مختل کند. نانوتکنولوژی علاوه بر رفع این کاستی ها، ابزارهای تشخیصی سریع و دقیقی را در زمینه پزشکی فراهم می کند (۴، ۵). نانووذرات اکسید آهن به دلیل خواص مغناطیسی، تولید با هزینه کم، سازگاری با محیط زیست و پایداری گزینه مناسبی محسوب می شود (۶). از این نانووذرات در فرآیندهایی مانند سیستم دارورسانی (۷) تصویربرداری رزونانس مغناطیسی MRI (۸) هایپرترمی (۹، ۱۰) جداسازی پروتئین (۱۱، ۱۲) DNA و RNA (۱۳، ۱۴)، ایمونوزیس (۱۵، ۱۶)، حسگرهای زیستی (۱۷، ۱۸) استفاده می شود. حسگرهای زیستی مبتنی بر نانووذرات اکسید آهن به دلیل پایداری، واکنش پذیری بالا، سطح بسیار فعال، سهولت اصلاح سطح، جداسازی مغناطیسی و زیست سازگاری مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۲۰، ۱۹). مهم ترین چالش بیوسنسورها، تشخیص دقیق و توأم با حساسیت آنالیت ها در خون و سرم است (۲۲، ۲۱). اولین قدم در این مسیر، اصلاح سطح نانووذرات برای جلوگیری از اکسیداسیون و تجمع است (۲۳). این نانووذرات به دلیل انرژی سطحی

بالایی که دارند واکنش پذیر هستند. در نتیجه ممکن است در آنها مشکلاتی مانند تجمع، اکسیداسیون و کاهش خواص مغناطیسی دیده شود (۲۴). پوشش ارگانیک با کاهش جاذبه دوقطبی از تجمع و اکسیداسیون نانووذرات جلوگیری می کند (۲۵). مشتقات سیلان به دلیل جذب قوی به سطح نانووذرات، جلوگیری از تجمع، افزایش پایداری، کاهش اثرات سیتوتوکسیک، تشکیل گروه های عامل NH_2 ، سطح را برای اتصال به ماکرومولکول های بیولوژیکی آماده می کنند (۲۵-۲۸). اتصال آنتی بادی ها به نانووذرات اکسید آهن به دلیل نوع پیوند بین آنها، به شدت محدود شده است (۲۹). به این ترتیب، یک زیست حسگر ارزان، ساده و کارآمد به عنوان آشکارساز در تراشه های میکروسیال ساخته می شود (۳۰). با وجود واکنش سیون عمومی علیه کزاز، افراد زیادی دچار این بیماری می شوند. باکتری عامل این بیماری، کلتزیدیوم تتانی است که از طریق زخم وارد بدن می شود و با ایجاد انقباضات شدید عضلانی فرد را می کشد (۳۲). (۳۱). تشخیص فعلی با الیزا، علیرغم حساسیت بالای آن، نیازمند آماده سازی یک نمونه بزرگ، تجهیزات گران قیمت بوده و فرایندی زمان بر است (۳۴، ۳۳). برای کاربردهای بیومدیkal، نانوپارٹیکل های اکسید آهن دارای خاصیت مغناطیسی و اندازه کوچکتر از 100 nm به کار می رود. به علاوه، نانووذرات مغناطیسی سازش پذیر، غیرسمی و قابل انتقال به محل های هدف یابی شده در سیستم های دارورسانی میباشند. اکسید آهن از طریق متد هم رسوبی محلول آبدار نمکهای Fe^{+2} و Fe^{+3} با افزودن باز، سنتز میشوند. کنترل ترکیب نانووذرات، اندازه و شکل به انواع نمکهای مورد استفاده (مثل کلریدها، سولفات ها و...) و نسبت Fe^{+2} و Fe^{+3} و pH و قدرت یونی محیط بستگی دارد. محدوده های بین ۱۰ تا ۱۰۰ اندازه های مطلوب برای این نانووذرات هستند، چون در اندازه های بزرگتر از این، ذرات تمایل به آگلومره شدن دارند و پروتئین های پلاسما را جذب میکنند (۳۵) هدف از این مطالعه طراحی و ساخت یک نانوبیوپروب مناسب برای تشخیص توکسوئید کزاز بر اساس نانووذرات مغناطیسی است که می تواند در کیت های تشخیصی یا تراشه های تشخیصی کزاز استفاده شود

مواد و روش ها

مواد

نانوپودر اکسید آهن (Fe_3O_4) توسط شرکت یو اس ریسرچ نانومتریال تولید شده است. آنتی بادی مونوکلونال توکسوئید ضد کزاز از شرکت ایمونو-بیولوژی کال لابراتوریز و IBL-America Toxoid Tetanus IgG تهیه شده است. آنتی ژن توکسوئید کزاز (مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی)، سدیم هیدروژن فسفات Na_2HPO_4 ، سدیم دی هیدروژن فسفات Na_2HPO_4 ، اتانول $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ۹۶٪، ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان $\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$ ، تترا اتوکسی سیلان $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$ ، آمونیا NH_3 ، تری کلروتیازین یا سیانوریک کلرید $\text{C}_3\text{Cl}_3\text{N}_3$ ، سولفورودامین $\text{B C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$ ، اسید تری کلرواستیک $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ ، تتراهیدروفوران $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ، اسید استیک $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ، آلبومین سرم گاوی (BSA)، آمبیون، سدیم بی کربنات Na_2HPO_3 ، تریس HCl ۳۰، $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})$ ، آنتی بادی مونوکلونال کونژوگه به آنزیم پراکسیداز، همگی از سیگما تهیه شده اند

پوشش سیلیکا از نانوذرات اکسید آهن

۰/۱۵ گرم نانوذرات Fe_3O_4 با ۴۵ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۰ دقیقه با امواج صوتی همگن سازی شدند. ۶/۸ میلی لیتر آب و ۳/۴ میلی لیتر آمونیاک ۲۸ درصد (نسبت وزن به حجم) و ۴۵ میلی لیتر تترا اتوکسی سیلان به نانوذرات اضافه شد و به مدت ۵ ساعت در دمای اتاق تکان داده شدند. نانوذرات توسط میدان مغناطیسی جدا شده و چندین بار با اتانول شسته شدند. در نهایت، نمونه تحت خلاء خشک شد (۳۶-۳۹)

آمینیزاسیون نانوذرات مغناطیسی سیلیکات

۰/۱ گرم از نانوذرات سیلیس را با ۱/۵ میلی لیتر اتانول مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه با امواج صوتی همگن سازی شدند. ۱ میلی لیتر ۳-آمینو پروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES) به نانوذرات اضافه شد و به مدت ۲ ساعت تکان داده شدند. بعد از ۱ ساعت تا دمای ۵۰ درجه سانتیگراد گرم شد. پس از رسیدن به دمای اتاق، محلول، چندین بار با تتراهیدروفوران شسته شد و توسط میدان مغناطیسی جداسازی انجام گردید (۲۶، ۴۰) اصلاح سطح نانوذرات مغناطیسی با پوشش آمین نانوذرات آمین با ۱/۵ میلی لیتر تتراهیدروفوران مخلوط و

به مدت ۵ دقیقه تحت همگن سازی توسط امواج صوتی قرار گرفتند. سپس ۰/۱ گرم تری کلروتیازین (TCT) اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق تکان داده شدند. نانوذرات تحت یک میدان مغناطیسی جداسازی شده و با اتانول، تتراهیدروفوران، بافر فسفات شسته شدند (۴۱).

تثبیت آنتی بادی مونوکلونال ضد سم کزاز بر روی سطح نانوذرات اکسید آهن سطح اصلاح شده

۰/۱ گرم از نانوذرات اصلاح شده روی PH برابر با ۷/۴ تنظیم شد. سپس به آن ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار اضافه شد و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تحت همگن سازی صوتی قرار گرفت. ۱۵ میکرولیتر آنتی بادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز با غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر به نانوذرات اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق تکان داده شدند. نانوذرات توسط میدان مغناطیسی جداسازی شده و سه بار با بافر ۱۰ میلی مولار فسفات شسته شدند. مابع رویی برای تعیین غلظت آنتی بادی های تثبیت شده، کنار گذاشته شد. مراحل مختلف اصلاح سطح نانوذرات و کونژوگه با آنتی بادی با استفاده از مدل طیف سنجی (FTIR (NEXUS 870 و آنالیز عنصری EDX مدل آتمت SEM مورد بررسی قرار گرفت. نیروی مغناطیسی نانوذرات اکسید آهن پس از کونژوگه با آنتی بادی، با استفاده از یک مغناطیس سنج نمونه ارتعاشی VSM اندازه گیری شد

بررسی میزان غلظت آنتی بادی تثبیت شده بر روی سطح نانوذرات اکسید آهن با استفاده از

سولفورودامین B

سولفورودامین B یک آمینوگزانتنیونی با دو گروه سولفونیک است (۴۰). این ماده توسط اسقان برای تشخیص میزان داروهای ضد سرطان استفاده شد (۴۱)، (۴۲). آزمایش SRB بر اساس بررسی اتصال الکترواستاتیکی این معرف به اسیدهای آمینه اساسی پروتئین ها در شرایط اسیدی است. شرایط اسیدی توسط اسید تری کلرواستیک (TCA) ایجاد می شود (۴۲). در این آزمایش،

دمای اتاق با دور ۳۰۰ دور بر دقیقه تکان داده شدند و چندین بار با بافر فسفات شسته شدند. ۱۰ میکروگرم آنتی بادی ثانویه IgG با غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر به ۲ میکرولوله حاوی آنتی بادی ضد توکسوئید ضد کزاز اضافه گردید. ۱۰ میکرولیتر آنتی ژن توکسوئید کزاز با غلظت ۹۰۰ نانوگرم در میلی لیتر به ۱ میکرولوله حاوی آنتی بادی ضد سم کزاز اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه تکان داده شد. پس از شستشو با بافر فسفات و جداسازی با میدان مغناطیسی، نمونه ها در زیر میکروسکوپ نوری میکروسکوپ موتیک BA ۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند

اندازه گیری عملکرد و ویژگی نانوبیوپروب تشخیصی توکسوئید کزاز با استفاده از واکنش آنزیمی HRP و TMB

در این فرآیند از بافر پوششی با غلظت ۵۰ میلی مولار (۰/۷۹٪ کربنات سدیم (NaCO₃) و ۰/۱۴٪ گرم بی کربنات سدیم (NaHCO₃)، ۹/۶=H، بافر مسدود کننده (BSA) یک درصد تهیه شده در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار با PH برابر با ۷/۴، بافر شستشو (تهیه شده با ۲۵ میکرولیتر تویین ۲۰ در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار با pH برابر با ۷/۴)، بافر توقف (۲/۷۳ میلی لیتر اسید سولفوریک) استفاده گردید.

در یک ردیف چاهک آنتی ژن توکسوئید کزاز با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر و در ردیف دیگر با غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر در بافر پوشش تهیه شده و در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر تثبیت گردید. میکروپلیت برای اجرای نانو پروب زیستی، آنتی ژن در غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر در چاهک دیگری تثبیت شد. از بافر فسفات به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد و با بافر شستشو، شسته شد. ۲۰۰ میکرولیتر بافر مسدود کننده به چاهک ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از شستشوی چاهک ها، غلظت های مختلف آنتی بادی مونوکلونال بر توکسوئید کزاز (۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۱، ۳، ۵ نانوگرم بر میلی لیتر) به چاهک حاوی ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر آنتی ژن توکسوئید کزاز اضافه شد. ۱ نانوگرم در میلی لیتر آنتی بادی سموم ضد کزاز به چاهک های حاوی غلظت های مختلف آنتی ژن توکسوئید کزاز اضافه گردید

نانوذرات اکسید آهن، نانوذرات کونژوگه شده با آنتی بادی سموم ضد کزاز و مایع رویی آنها حاوی آنتی بادی های غیر متصل با استفاده از بافر بی کربنات روی میکروپلیت ۹۶ تثبیت شدند. برای تهیه منحنی استاندارد از مجموعه رقت های BSA در یک ردیف چاهک استفاده شد. نمونه ها با ۵۰ میکرولیتر بافر بی کربنات با غلظت ۵۰ میلی مولار تثبیت شدند و برای یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. ۵۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (TCA) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. چاهک ها با ۲۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه، شسته شدند. ۵۰ میکرولیتر سولفورودامین B با غلظت ۰/۴ درصد تهیه شده با اسید استیک، به چاهک ها اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه با محلول اسید استیک ۰/۱ درصد و آب، شسته شدند. ۵۰ میکرولیتر محلول تریس با غلظت ۵۰ میلی مولار به هر چاهک اضافه شد. میکروپلیت توسط ریدرهای ELISA PLATE مدل LQ1170 با طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانده شد (۴۵، ۴۶)

پایداری نانوبیوپروب مغناطیسی اکسید آهن

نانوبیوپروبها به مدت ۳۰ روز در بافر فسفات در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند، سپس توسط میدان مغناطیسی جداسازی شده و با بافر فسفات به حجم اولیه بازگردانده شدند. غلظت محلول رویی با استفاده از روش برادفورد تعیین گردید. برای تهیه معرف برادفورد، ۱۰ میلی گرم رنگ کوماسی بلو G-۲۵۰ در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد حل شده و سپس ۱۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد به آن اضافه گردید و در نهایت با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس محلول بدست آمده توسط کاغذ واتمن ۱ فیلتر گردید

تهیه نانوذرات اکسید آهن کونژوگه با آنتی بادی برای آزمایش آگلوتیناسیون

۲ میلی گرم از نانوذرات آمینه شده با ۲ میلی لیتر بافر فسفات به مدت ۱۰ دقیقه همگن سازی صوتی شد و ۳۰۰ میکرولیتر از آن به طور جداگانه به ۷ میکرولوله اضافه گردید. ۱۳ میکرولیتر آنتی بادی سموم ضد کزاز با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ۴ میکرولوله حاوی نانوذرات اضافه شد. در ۲ میکرولوله ۱۳ میکرولیتر BSA یک درصد و در یک میکرولوله، ۱۳ میکرولیتر بافر فسفات به عنوان کنترل منفی اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در

گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر بستر رنگی (TMB) اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. پس از ایجاد رنگ آبی برای توقف واکنش آنزیمی، ۵۰ میلی مولار اسید سولفوریک به چاهک ها اضافه شد تا رنگ زرد ایجاد شود و در نهایت میکروپلیت، با استفاده از میکروپلیت ریدر مدل اپسون با طول موج ۴۵۰ نانومتر و یک فیلتر دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر قرائت شد

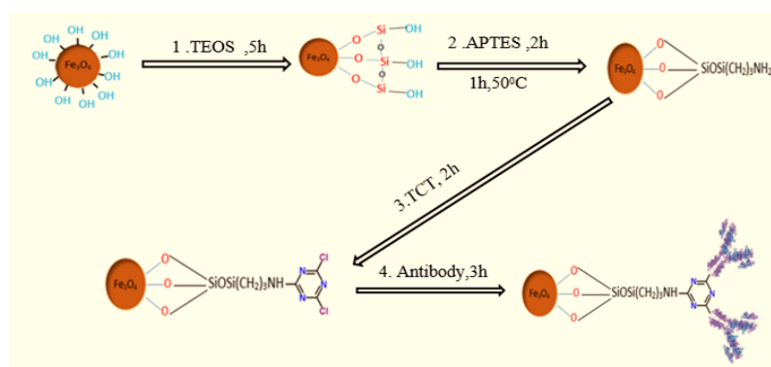
در چاهک‌های حاوی ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌ژن برای اجرای نانوبیوپروب، نانوذرات اکسید آهن، نانوزیست‌پروب و مایع رویی حاوی آنتی‌بادی غیر متصل در فرآیند کونژوگه اضافه شدند. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد و سپس شسته شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به آنزیم HRP پراکسیداز به چاهک ها اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه

نتایج و بحث

مکانیسم سیلانیزاسیون نانوذرات اکسید آهن

در این آزمایش، مطابق شکل ۱، با افزودن TEOS مرحله ۱ و هیدرولیز آن، پیوند هیدروژنی بین گروه های سیلانول و هیدروکسیل بر روی سطح نانوذرات اکسید آهن

تشکیل می شود. این فرآیند منجر به تشکیل یک لایه سل-ژل در اطراف نانوذرات می گردد و با دی هیدراته کردن، پیوند کووالانسی جایگزین پیوند هیدروژنی می شود (۴۷، ۴۸)



شکل ۱. مکانیسم سیلیسی کردن نانوذرات اکسید آهن و تثبیت آنتی بادی سموم ضد کزاز

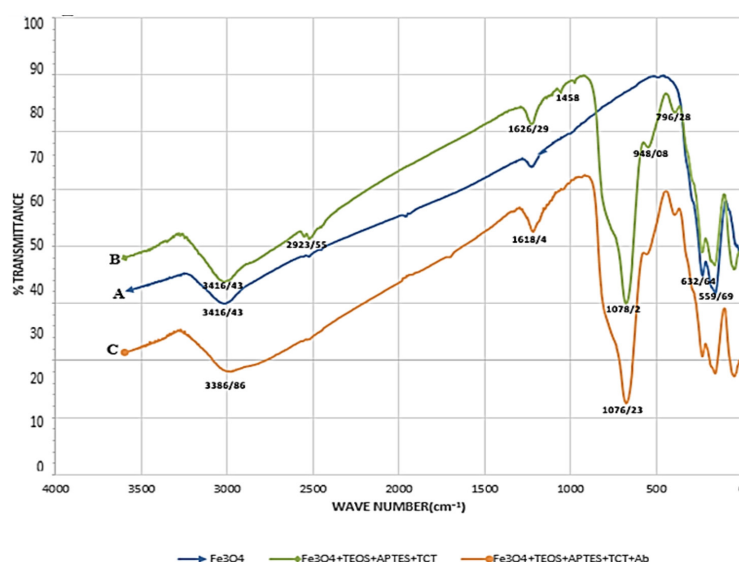
تجزیه و تحلیل طیف FTIR

مراحل مختلف اصلاح سطح نانوذرات اکسید آهن و کونژوگاسیون آنها با آنتی بادی سموم ضد کزاز با استفاده از طیف سنجی FTIR مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در شکل ۲ قابل مشاهده است. طیف A در شکل ۲ متعلق به نانوذرات اکسید آهن است که باندهای جذبی در ناحیه 509 cm^{-1} و 632 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی پیوندهای Fe-O و نوار جذبی در ناحیه 3416 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی و خمشی گروه های هیدروکسیل (OH-) در شبکه کریستالی نانوذرات است (۵۰-۵۶). در طیف B با افزودن TEOS به نانوذرات اکسید آهن، باند جذب در محدوده بین 948 cm^{-1} تا 1078 cm^{-1} و 796 cm^{-1} مشاهده می شود

در مرحله ۲، با افزودن ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان APTES به نانوذرات سیلیکا، گروه های سیانول روی سطح نانوذرات، با این ترکیب پیوند داده شده و سطح نانوذرات، آمینه می شود (۴۹). در مرحله ۳، با افزودن تری کلروتریازین (TCT) به نانوذرات، گروه های آمین ایجاد شده در سطح نانوذرات، با این ترکیب پیوند کووالانسی برقرار می کنند. در مرحله ۴، با افزودن آنتی بادی مونوکلونال علیه سم کزاز به نانوذرات اصلاح سطح شده، گروه های کلر در TCT با آنتی بادی های آمین مرتبط می شوند.

1618 cm^{-1} نشان‌دهنده ارتعاشات کششی گروه‌های NH_2 آنتی‌بادی است که به کلر موجود در ترکیب تری کلر تریازین متصل است (۵۶). بر اساس گزارش لوری و همکارانش، بین غلظت تترااتوکسی سیلان و شدت پیک حاصله در طیف FT-IR رابطه مستقیم وجود دارد. با افزایش غلظت، شدت پیک افزایش می‌یابد (۵۴). در این آزمایش، شدت پیک ایجاد شده متناسب با غلظت ماده است. محققانی مانند هی و همکارانش، وانگ و همکارانش، بیش از ۴۸ ساعت را صرف فرآیند سیلانیزاسیون برای اصلاح سطح نانوذرات اکسید آهن کردند (۳۷، ۳۹). این در حالی است که در این تحقیق، تنها ۱۳ ساعت زمان صرف شده است.

این باند به دلیل ارتعاش کششی گروه Si-O است که در تشکیل پیوندهای Si-O-Si و Si-O-Fe شرکت می‌کند (۳۸، ۵۳). با افزودن ترکیب APTES به نانوذرات، نوار جذب e در ناحیه 1-cm ۲۹۲۳ مشاهده می‌شود که مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های C-H در APTES است (۲۶، ۵۸، ۵۶). نوار جذبی در ناحیه 1626 cm^{-1} و 1458 cm^{-1} ، نشان‌دهنده حضور گروه‌های (HN-) مربوط به APTES در کنار گروه‌های OH- نانوذرات اکسید آهن است (۵۸). نوار جذبی در ناحیه 1458 cm^{-1} متعلق به حلقه آروماتیک موجود در تری کلروتیازین است (۵۷). طیف C متعلق به تثبیت آنتی‌بادی مونوکلونال ضد توکسوئید کزاز بر روی سطح نانوذرات است. وجود یک نوار جذبی در ناحیه

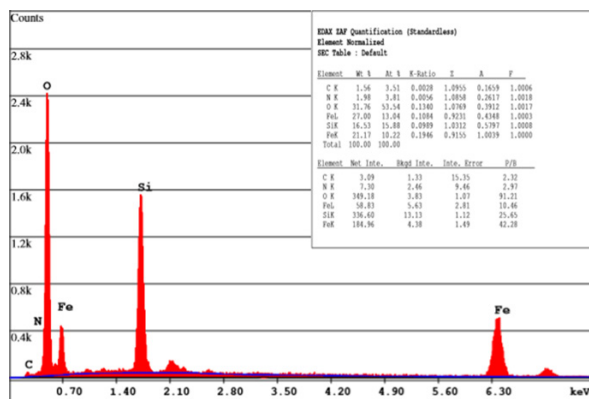


شکل ۲. الف) طیف FT-IR نانوذرات Fe_3O_4 (ب) سطح نانوذرات اصلاح شده با TEOS و APTES (ج) نانوذرات سیلیس کونژوگه شده با آنتی‌بادی مونوکلونال توکسوئید ضد کزاز

پیوند کووالانسی بین هیدروکسیل‌های سطحی نانوذرات و سیانول‌های TEOS است (۵۹)

تجزیه و تحلیل عنصری EDX

با توجه به نتایج آنالیز عنصری EDX در شکل ۳، وجود عناصر Fe و O متعلق به نانوذرات اکسید آهن است و وجود Si، N و C با اجرای TEOS و APTES بر روی سطح نانوذرات مرتبط است. نسبت اتمی نشان‌دهنده

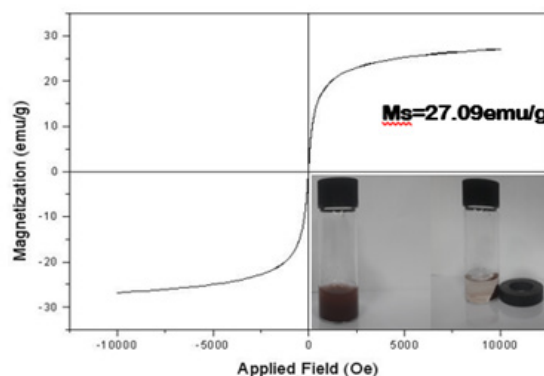


شکل ۳. آنالیز عنصری EDX نانوذرات اکسید آهن با پوشش سیلیسی

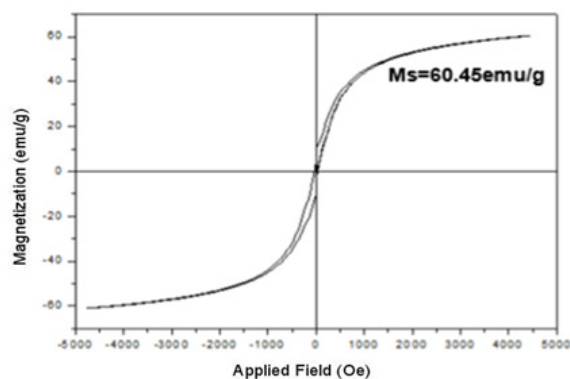
نانوذرات پس از کونژوگه با آنتی بادی وجود سه ترکیب TEOS، APTES و TCT برای اصلاح سطح و پیوند آنتی بادی است. علیرغم کاهش مقدار مغناطیس نانوذرات در مقایسه با نانوذرات اکسید آهن اصلی، نانوذرات مزدوج به راحتی با اعمال میدان مغناطیسی جداسازی می‌شوند (۶۰-۶۳).

تجزیه و تحلیل خواص مغناطیسی نانوذرات اکسید آهن

نتایج تحلیل VSM نشان می‌دهد که مقدار مغناطیس اشباع (Ms) مطابق شکل ۴ برای نانوذرات اکسید آهن اولیه برابر با $Ms=60\text{emu/g}$ است. پس از کونژوگاسیون با آنتی بادی سموم ضد کزاز مطابق شکل ۵ این مقدار برابر با $Ms=27.09\text{emu/g}$ است. دلیل کاهش مغناطیس



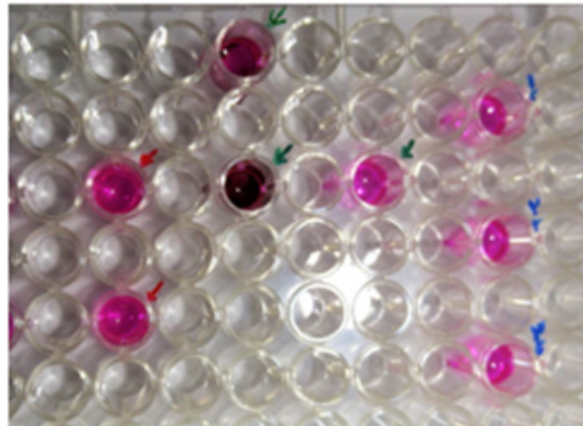
شکل ۴. حلقه هیستریزس نانوذرات اکسید آهن پس از تثبیت آنتی بادی سموم ضد کزاز

شکل ۵. منحنی مغناطیسی VSM نانوذرات Fe_3O_4

تعیین غلظت آنتی بادی متصل به نانوذرات اکسید آهن با استفاده از تکنیک SRB

مزیت این آزمایش، پایداری، غیرمخرب بودن و نقطه پایانی ثابت در رنگ آمیزی است که می‌تواند نمونه را

برای هفته‌ها حفظ کند. سرعت بالا، قابلیت اطمینان و تکرارپذیری، این روش را نسبت به روش برادفورد و بیور برای اندازه‌گیری پروتئین کل، برتری می‌دهد (۶۴، ۴۲)



شکل ۶. واکنش رنگی معرف سولفورودامین B با آنتی بادی های سموم ضد کزاز

فرمول:

$100 \times (\text{غلظت آنتی بادی قبل از تثبیت}) / (\text{غلظت آنتی بادی بعد از تثبیت})$

$$100 = 13.91 \times 100 \div 2.44 \times 0.33$$

$$100 - 13.91 = 86.08$$

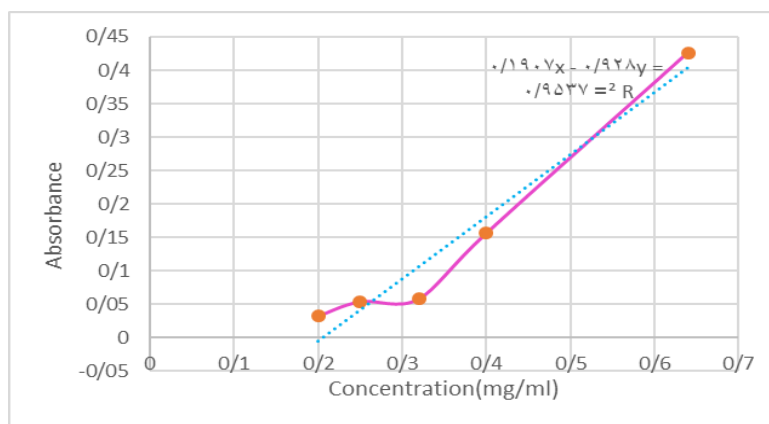
سیف و همکارانش تنها از یک ترکیب ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان برای بارگیری مورین که یک داروی ضد سرطان است بر روی نانوذرات اکسید آهن استفاده کردند و مقدار تثبیت انجام شده ۴۸ درصد با غلظت ۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود، در حالی که مقدار تثبیت در نانوذرات این تحقیق به دلیل استفاده از TCT که نقش افزایش اتصال را داشت، با غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر به ۸۶ درصد رسید (۴۰)

با توجه به نتایج جذب به دست آمده از واکنش SRB در جدول ۱، جذب نانوذرات اکسید آهن برابر با ۰,۲۳۷ نانومتر و نانوذرات کونژوگه با آنتی بادی برابر با ۰,۷۶۶ نانومتر است، تفاوت جذب نشان دهنده اتصال آنتی بادی مونوکلونال توکسوئید ضد کزاز به نانو ذرات اکسید آهن است. رقت های مختلفی از پروتئین BSA وجود دارد که بر اساس غلظت استفاده شده باعث کاهش جذب، شده است. هدف از استفاده از پروتئین BSA ترسیم منحنی استاندارد غلظت آن از نظر جذب است تا بر اساس شیب نمودار، مقدار غلظت آنتی بادی تثبیت شده بر روی سطح نانوذرات اکسید آهن به دست آورده شود با توجه به منحنی استاندارد به دست آمده از تکنیک SRB، مقدار آنتی بادی کونژوگه با نانوذرات اکسید آهن ۸۶ درصد است. میزان جذب محلول شسته شده نانوذرات اکسید آهن $ABS = 0.125$ است که بر اساس فرمول غلظت، معادل ۰,۳۳ میلی گرم بر میلی لیتر می باشد.

جدول ۱. نتایج جذب به دست آمده از نمونه های حاوی پروتئین در نتیجه واکنش با معرف SRB

نمونه	دانسیته	حجم*	جذب (OD)
۱ آنتی بادی کونژوگه شده Fe3o4	-	۱۰۰ میکرولیتر	۰,۷۶۶
۲ بافر فسفات کنترل منفی	۱۰ mM	۱۰۰ میکرولیتر	۰,۰۲۶
۳ مایع رویی (آنتی بادی کونژوگه شده Fe3o4)	-	۱۰۰ میکرولیتر	۰,۱۲۵
			۰,۱۰۷
			۰,۰۹۸
			۰,۰۸۷
۴ BSA	۰,۶۴ میلیگرم بر میلی لیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۰,۴۲۶
BSA	۰,۴ میلیگرم بر میلی لیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۰,۱۵۶
BSA	۰,۳۲ میلیگرم بر میلی لیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۰,۵۸
BSA	۰,۲۵ میلیگرم بر میلی لیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۰,۵۴
BSA	۰,۲ میلیگرم بر میلی لیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۰,۳۲
۵ Fe3o4	-	۱۰۰ میکرولیتر	۰,۳۲۷

* به دلیل شستشوی مکرر نانوذرات کونژوگه شده آهن با محلول های مختلف در حین آماده سازی، به جای غلظت از واحد حجم استفاده شده است.



شکل ۷. منحنی استاندارد آلومین سرم گاوی با استفاده از نتایج جذب از روش SRB

جدول ۲. جذب محلول های شسته شده نانوبیوپروب اکسید آهن پس از ۳۰ روز با استفاده از بردفورد

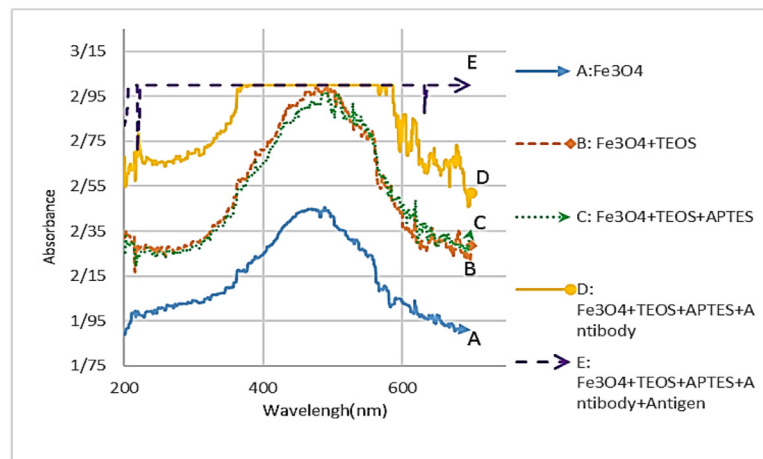
روز	OD	غلظت (میلیگرم بر میلی لیتر)
30	0.012	0.146
31	0.008	0.139
32	0.012	0.146
33	0.026	0.109

پایداری نانوپروب مغناطیسی اکسید آهن

در این روش نانوبیوپروب ها پس از یک ماه نگهداری با بافر فسفات شسته شدند و جذب محلول حاصل از شستشو که در آن احتمال وجود آنتی بادی جدا شده از نانوذرات اکسید آهن وجود داشت، توسط براندفورد (Bradford ml۱) و در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری شد.

نتایج uv/vis

با توجه به نتایج uv/vis در شکل ۸، نانوذرات اکسید آهن دارای یک اوج یا پیک جذبی در محدوده ۴۰۰ تا ۵۶۰



شکل ۸. A: طیف جذب نانوذرات اکسید آهن Fe_3O_4 ; B: طیف جذبی ناشی از اصلاح سطح نانوذرات اکسید آهن با TEOS; C: طیف جذبی ناشی از اصلاح سطح نانوذرات اکسید آهن با ترکیبات TEOS و APTES شده توسط ترکیبات TEOS و APTES; D: طیف جذب حاصل از کونژوگ کردن نانوذرات اکسید آهن سیلانی شده با آنتی بادی مونوکلونال علیه سم کزاز E: طیف جذب نانوبیوپروب مغناطیسی برای تشخیص کزاز در حضور ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر آنتی ژن توکسوئید کزاز

که می تواند نشان دهنده تشخیص سم کزاز توسط نانوبیوپروب باشد و از آنجایی که تشخیص آنتی ژن با تجمع نانوذرات مرتبط است، شدت فلورسانس نانوذرات افزایش یافته است (۷۱)

نتایج آزمایش آگلوتیناسیون

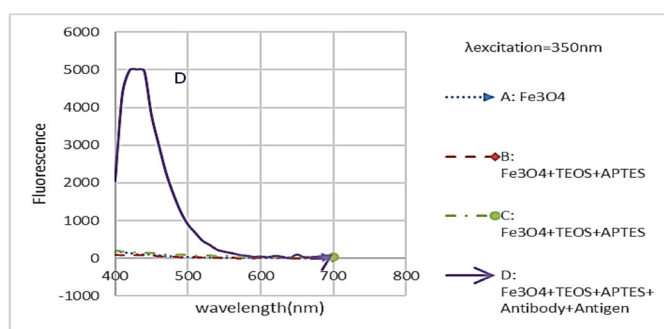
آگلوتیناسیون بر اساس مهره ها با اختراع آزمون (LAT) توسط سینگر و پلاتز (۷۲) پیشنهاد شد. در این تکنیک، شناسایی آنتی ژن بر اساس ایجاد یک ساختار آنتی ژن-آنتی بادی بزرگ صورت می گیرد. استفاده از نانوذرات با خواص مغناطیسی و براونی، حساسیت تشخیص را بهبود می بخشد. زمانی که نانوپروب مغناطیسی آنتی ژن را شناسایی کرد، با استفاده از میدان مغناطیسی، یک دوقطبی مغناطیسی در نانوذرات مجاور ایجاد می شود

نتایج طیف سنجی فلورسانس

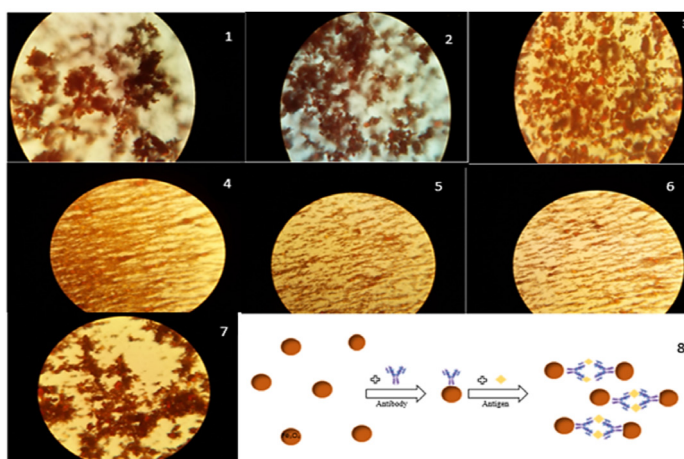
در شکل ۹، طیف A و B بترتیب شدت فلورسانس نانوذرات اکسید آهن و سطح اصلاح شده با TEOS و APTES را نشان می دهد. مشابه نتایج پائولا سی. پینهیرو و همکارانش که قصد داشتند نانوذرات آهن را با پلی اتیلن ایمین با سیلانیزه کردن نانوذرات اکسید آهن کونژوگ کنند، نانوذرات اکسید آهن با طول موج تحریک ۳۵۰ نانومتر دارای فلورسانس نیستند (۷۰). طیف C شدت فلورسانس نانوذرات کونژوگ شده با آنتی بادی سم ضد کزاز نشان می دهد که هیچ تغییر محسوسی در آن مشاهده نمی شود. با حضور ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر آنتی ژن توکسوئید کزاز در محلول حاوی نانوبیوپروب، شدت فلورسانس افزایش یافته است. این افزایش مربوط به فلورسانس ذاتی توکسوئید کزاز است

دهد که توسط آنتی بادی شناسایی کننده ناحیه Fc و ناحیه Fab آنتی بادی توکسوئید ضد کزاز تجمع یافته است. در بخش ۳، نانوبیوپروب به تنهایی تراکم را نشان نمی دهد. مقاطع ۴ و ۵ نانوذرات با BSA یک درصد و بخش ۶ با بافر فسفات (کنترل منفی) به دلیل عدم وجود آنتی بادی، در سطح خود تجمعی را نشان نمی دهند. بخش ۷، نانوبیوپروب را در حضور ۹۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر آنتی ژن توکسوئید کزاز نشان می دهد که نشان دهنده تجمع نانوذرات است که مشخص کننده تشکیل کمپلکس آنتی بادی-آنتی ژن است

که منجر به تشکیل شبکه یا زنجیره لحظه ای در محلول می شود. در نتیجه تمام نانوذراتی که آنتی ژن را گرفته اند به هم متصل می شوند و این ارتباط حتی پس از قطع میدان نیز بر اساس حرکت براونی باقی می ماند. این مجتمع نانوذره-آنتی ژن را می توان با استفاده از میکروسکوپ شناسایی کرد. وجود خاصیت مغناطیسی تعداد برخورد آنتی بادی با آنتی ژن را افزایش می دهد و این منجر به شناسایی کمترین غلظت آنتی ژن در محلول می شود (۷۳). شکل ۱۰ بخش های ۱ و ۲ نانوبیوپروب را در حضور آنتی بادی ثانویه IgG نشان می



شکل ۹. A: شدت فلورسانس نانوذرات اکسید آهن B: شدت فلورسانس نانوذرات اکسید آهن پس از اصلاح سطح توسط ترکیبات TEOS و APTES. C: شدت فلورسانس نانوذرات اکسید آهن پس از کونژوگ کردن آنتی بادی توکسوئید ضد کزاز D: شدت فلورسانس ناشی از حضور آنتی ژن توکسوئید کزاز در کنار نانوذرات اکسید آهن کونژوگ شده با آنتی بادی سموم ضد کزاز

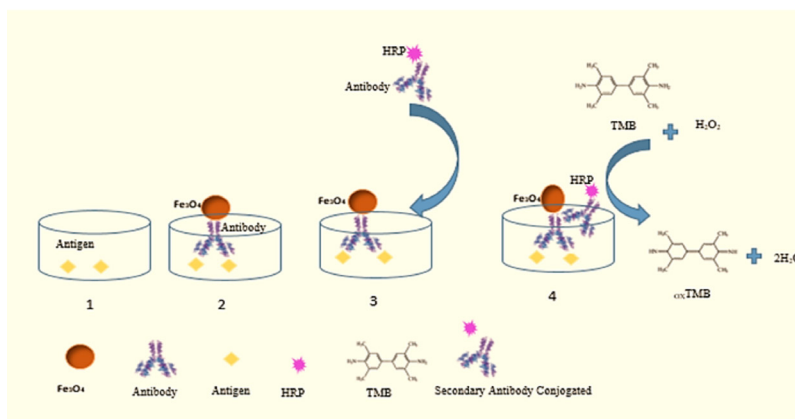


شکل ۱۰. قسمت ۱ و ۲: شامل نانوذرات اکسید آهن کونژوگ شده با آنتی بادی سموم ضد کزاز همراه با آنتی بادی ثانویه IgG. بخش ۳: نانوذرات اکسید آهن به تنهایی با آنتی بادی سموم ضد کزاز کونژوگ شده. بخش ۴ و ۵: نانوذرات اکسید آهن با BSA یک درصد. بخش ۶: نانوذرات اکسید آهن با بافر فسفات. بخش ۷: نانوذرات اکسید آهن کونژوگ شده به آنتی بادی سموم ضد کزاز در حضور ۹۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر آنتی ژن سم کزاز. بخش ۸: بررسی اجمالی آزمایش آگلوتیناسیون نانوذرات کونژوگ شده با آنتی بادی ضد توکسوئید کزاز و حضور آنتی ژن توکسوئید کزاز

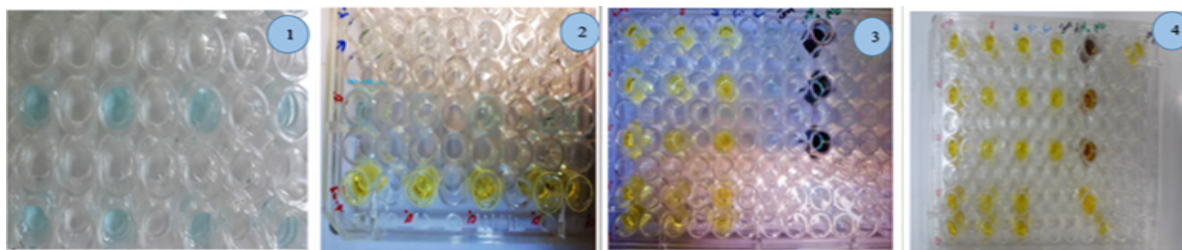
نتایج اندازه‌گیری ویژگی نانوپروب مغناطیسی کزاز با واکنش آنزیمی HRP و TMB

در این بررسی که برای اختصاصی بودن نانوپیروپ است، اگر آنتی ژن کزاز توسط نانوپیروپ تشخیص داده

شود، با افزودن یک آنتی بادی ثانویه کونژوگ به HRP، یک کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی تشکیل می‌شود، این کمپلکس تشخیص داده می‌شود و یک رنگ آبی رنگ در کنار بستر TMB ایجاد می‌شود (۷۴، ۷۵)



شکل ۱۱. مروری بر مراحل تشخیص آنتی ژن توکسوئید کزاز با استفاده از نانوپیروپ مغناطیسی کزاز با کمک آنتی بادی ثانویه کونژوگ شده به آنزیم HRP و بستر TMB



شکل ۱۲. بخش های ۱ و ۲. رنگ آبی ایجاد شده توسط واکنش آنزیمی HRP با TMB در چاهک های حاوی کمپلکس آنتی ژن کزاز. بخش ۳ و ۴: توقف واکنش آنزیمی بین HRP و TMB با استفاده از اسید سولفوریک و ایجاد رنگ زرد در چاهک های حاوی نانوذرات اکسید آهن کونژوگ شده به آنتی بادی و آنتی ژن سموم ضد کزاز

میزان جذب ۰,۴۴۱ و ۰,۶۱۲ نشان‌دهنده تشکیل کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن است. رنگ آبی در چاهک ها به علت واکنش TMB در حضور H_2O_2 است (۷۷-۷۵). در ردیف ۵، مایع رویی حاوی نانوپیروپ هایی است که حاوی آنتی بادی های غیر متصل در حین شستشو است. ردیف ۶، جایی که جذب مشاهده نمی‌شود، بافر فسفات (کنترل منفی) است.

نتایج جذب حاصل از واکنش HRP کونژوگه به آنتی بادی ثانویه با بستر TMB در جدول ۳ نشان داده شده است. کاهش جذب، متناسب با غلظت آنتی بادی مشاهده می‌شود. در ردیف ۳ نانوذرات اکسید آهن به تنهایی وجود دارد که به دلیل عدم وجود آنتی بادی در سطح آنها، قادر به شناسایی آنتی ژن و تشکیل کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی نبوده و در نتیجه واکنش رنگی مشاهده نمی‌شود. در ردیف چهارم، نانوپیروپ ها وجود دارند که

جدول ۳. نتایج جذب شناسایی آنتی ژن توکسوئید کزاز توسط نانوبیروپ مغناطیسی بر اساس واکنش tmb و hrp

نمونه	دافسسته	حجم	جذب OD
۱	Ab متغیر	۵ µg/ml	۰,۲۸۱
	Ag ثابت	۵۰ ng/ml	
	Ab متغیر	۳ µg/ml	۰,۲۰۲
	Ag ثابت	۵۰ ng/ml	
	Ab متغیر	۱ µg/ml	۰,۱۴۳
	Ag ثابت	۵۰ ng/ml	
	Ab متغیر	۰ µg/ml	۰,۱۳۳
	Ag ثابت	۵۰ ng/ml	
	Ab متغیر	۰ µg/ml	۰,۱۲۶
	Ag ثابت	۵۰ ng/ml	
۲	Ab ثابت	۱ µg/ml	۰,۲۷۰
	Ag متغیر	۲۰۰ ng/ml	
	Ab ثابت	۱ µg/ml	۰,۲۶۴
	Ag متغیر	۱۰۰ ng/ml	
	Ab ثابت	۱ µg/ml	۰,۲۶۳
	Ag متغیر	۵۰ ng/ml	
	Ab ثابت	۱ µg/ml	۰,۲۶۰
	Ag متغیر	۲۵ ng/ml	
	Ab ثابت	۱ µg/ml	۰,۲۵۹
	Ag متغیر	۱۰ ng/ml	
۳	نانوذرات Fe ₃ O ₄	۱۰۰ میکرولیتر	۰,۰۰۴
۴	آنتی بادی کونژوگه شده Fe ₃ O ₄	۱۰۰ میکرولیتر	۰,۶۱۲
		۱۰۰ میکرولیتر	۰,۴۴۱
۵	مایع رویی (آنتی بادی کونژوگه شده Fe ₃ O ₄)	۱۰۰ میکرولیتر	۰,۳۰۶
۶	کنترل منفی بافر فسفات	۱۰ mM	۰

از مواد ارزان قیمت ساخته شده است، مقرون به صرفه نخواهد بود (۷۸). الکساندر گلدبرگ و همکارانش در سال ۲۰۰۸ با ساخت یک تراشه میکروسیال، سم کزاز را بررسی و شناسایی کردند. با وجود فناوری بالایی که در ساخت این تراشه به کار رفته بود، حد تشخیص دستگاه ۰٫۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. این در حالی است که حد تشخیص نانوبیوپروب ساخته شده در این مطالعه ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر است (۷۹).

در مجموع با توجه به نتایج بدست آمده می توان گفت نانوحسگر ساخته شده در این مطالعه کارایی قابل قبولی دارد. در سال ۲۰۰۳، لیو و همکارانش یک حسگر زیستی تشخیص کزاز را با استفاده از ورقه های طلای حاوی آنتی بادی های تثبیت شده طراحی کردند که برای تشخیص آنتی ژن کزاز به لامپ های تنگستن جهت تابش نور نیاز داشت. این روش در مقایسه با نانوبیوپروب مغناطیسی ساخته شده در این پروژه که

نتیجه گیری

در کمترین غلظت، مدت زمان تشخیص، از مزایای این حسگر زیستی نسبت به الایزا می باشد. استفاده از TMB باعث می شود که نانوذرات اکسید آهن به یک نانوپروب رنگ سنجی تبدیل شود که به دلیل هزینه کم نانوذرات می تواند ابزاری ارزان برای تشخیص سم کزاز باشد.

در این مطالعه از مشتقات سیلان به دلیل جذب قوی به سطح نانوذرات، جلوگیری از تجمع، افزایش پایداری، کاهش اثرات سیتوتوکسیک، ایجاد گروه های عامل - NH₂ در سطح برای پیوند با آنتی بادی ها، برای تولید نانوپروب مغناطیسی کزاز استفاده شد. ظرفیت اتصال نیز با تری کلورتریازین TCT افزایش یافته است. پاسخ سریع، حساسیت بالا، تکرارپذیری، محدوده تشخیص

References

- Jafari M, Mahdavi Ortakand M, Safai Javan S. Optimization of the green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of black cumin fruit by Taguchi method. *Biological knowledge of Iran*. 2016 Nov 21;11(4):1-1.
- Cortina ME, Moya SE, Sinha S, Pividori MI. Electrochemical magnetic microbeads-based biosensor for point-of-care serodiagnosis of infectious diseases. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016;80:24-33. DOI:10.1016/j.bios.2016.01.021
- Ravalli A, Marrazza G. Gold and magnetic nanoparticles-based electrochemical biosensors for cancer biomarker determination. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2015;15(5):3307-19. DOI:10.1166/jnn.2015.10011
- Quesada-González D, Merkoçi A. Nanomaterial-based devices for point-of-care diagnostic applications. *Chemical Society Reviews*. 2018;47(13):4697-709. DOI:10.1039/c7cs00837f
- Andrews RJ. Nanotechnology: Managing Molecules for Modern Medicine. In: *The Modern Hospital*. Springer; 2019. p. 133-43. DOI:10.1007/978-3-030-01394-3_11
- Dodi G, Hritcu D, Dragan M, Popa MI. Hexagonal-shaped aminosilane magnetite nanoparticles: Preparation, characterization and hybrid film deposition. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2018;542:21-30. DOI:10.1016/j.colsurfa.2018.01.034
- Anirudhan TS, Divya PL, Nima J. Synthesis and characterization of silane coated magnetic nanoparticles/glycidylmethacrylate-grafted-maleated cyclodextrin composite hydrogel as a drug carrier for the controlled delivery of 5-fluorouracil. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;55:471-81. DOI:10.1016/j.msec.2015.05.065
- Henderson L, Chávez JL, Kim J, Yoon J, Kelly D, Kelley EG, et al. Routes to potentially safer T1 magnetic resonance imaging contrast in a compact plasmonic nanoparticle with enhanced fluorescence. *ACS nano*. 2018;12(8):8214-23. DOI:10.1021/acsnano.8b03326
- Evans BA, Ivantsiv V, Chiu-Lam A, Rinaldi C. Non-monotonicity in the influence of nanoparticle concentration on SAR in magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2018;465:559-65. DOI:10.1016/j.jmmm.2018.06.031
- GhutePatil P, Sawant S, Koli P, Patil M. APTES (3-aminopropyltriethoxy silane) functionalized MnFe₂O₄ nanoparticles: a potential material for magnetic fluid hyperthermia. *Chemical Papers*. 2019;73(9):2189-97. DOI:10.1007/s11696-019-00773-2
- Schwaminger SP, Blank-Shim SA, Scheifele I, Fraga-García P, Berensmeier S. Magnetic one-step purification

- of his-tagged protein by bare iron oxide nanoparticles. *ACS omega*. 2019;4(2):3790-9. DOI:10.1021/acsomega.8b03461
12. Zhou Y, Wang CY, Chen Y, Li Y, Liu Y. Selective binding, magnetic separation and purification of histidine-tagged protein using biopolymer magnetic core-shell nanoparticles. *Protein Expression and Purification*. 2018;144:5-11. DOI:10.1016/j.pep.2017.11.005
13. Ghahari S, Ghahari S, Nematzadeh GA. Magnetic nano fluids for isolation of genomic DNA and total RNA from various prokaryote and eukaryote cells. *Journal of Chromatography B*. 2018;1102:125-34. DOI:10.1016/j.jchromb.2018.10.022
14. Oberacker P, Stepper P, Bond DM, Höhn S, Focken J, Meyer V, et al. Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation. *PLoS biology*. 2019;17(1):e3000107. DOI:10.1371/journal.pbio.3000107
15. Wei X, Wang Y, Chen J, Liu Y, Tang J, Lan Q. Magnetic nanoparticle-based automatic chemiluminescent enzyme immunoassay for golgi protein 73 and the clinical assessment. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2019;19(4):1971-7. DOI:10.1166/jnn.2019.16294
16. Ivanov AV, Safenkova IV, Zherdev AV, Dzantiev BB. Recombinase polymerase amplification combined with a magnetic nanoparticle-based immunoassay for fluorometric determination of troponin T. *Microchimica Acta*. 2019;186(8):1-9. DOI:10.1007/s00604-019-3580-9
17. Nakhjavani SA, Afsharan H, Khalilzadeh B, Ghahremani MH, Carrara S, Omid Y. A highly sensitive and reliable detection of CA15-3 in patient plasma with electrochemical biosensor labeled with magnetic beads. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;122:8-15. DOI:10.1016/j.bios.2018.09.041
18. Sharma PP, Albisetti E, Massetti M, Scolari M, La Torre C, Monticelli M, et al. Integrated platform for detecting pathogenic DNA via magnetic tunneling junction-based biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017;242:280-7. DOI:10.1016/j.snb.2016.11.059
19. Xianyu Y, Wang Q, Chen Y. Magnetic particles-enabled biosensors for point-of-care testing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018;106:213-24. DOI:10.1016/j.trac.2018.07.009
20. Wang T, Zhou Y, Lei C, Lei J, Yang Z. Magnetic impedance biosensor: A review. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;90:418-35. DOI:10.1016/j.bios.2016.10.031
21. Peterson RD, Chen W, Cunningham BT, Andrade JE. Enhanced sandwich immunoassay using antibody-functionalized magnetic iron-oxide nanoparticles for extraction and detection of soluble transferrin receptor on a photonic crystal biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015;74:815-22. DOI:10.1016/j.bios.2015.07.050
22. Kyprianou D, Guerreiro AR, Nirwan VP, Al Lawati A, Piletsky SA, Canfarotta F. Development of optical immunosensors for detection of proteins in serum. *Talanta*. 2013;103:260-6. DOI:10.1016/j.talanta.2012.10.036
23. Sanaeifar N, Rabiee M, Abdolrahim M, Tahriri M, Vashaei D, Tayebi L. A novel electrochemical biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles-polyvinyl alcohol composite for sensitive detection of glucose. *Analytical Biochemistry*. 2017;519:19-26. DOI:10.1016/j.ab.2016.12.006
24. del Hierro I, Perez Y, Fajardo M. Silanization of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles with ionic liquids based on amino acids and its application as heterogeneous catalysts for Knoevenagel condensation reactions. *Molecular Catalysis*. 2018;450:112-20. DOI:10.1016/j.mcat.2018.03.011
25. Zhu N, Ji H, Yu P, Niu J, Farooq MU, Akram MW, et al. Surface modification of magnetic iron oxide nanoparticles. *Nanomaterials*. 2018;8(10):810. DOI:10.3390/nano8100810
26. Nikje MM, Sarchami L, Rahmani L. Fabrication of 2-chloropyridine-functionalized Fe₃O₄/amino-silane core-shell nanoparticles. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2015;11(1):39-44.
27. Maisanaba S, Pichardo S, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Cameán AM, Jos Á. Development, characterization and cytotoxicity of novel silane-modified clay minerals and nanocomposites intended for food packaging. *Applied Clay Science*. 2017;138:40-7. DOI:10.1016/j.clay.2016.12.038
28. Patra S, Roy E, Madhuri R, Sharma PK. Fast and selective preconcentration of europium from wastewater and coal soil by graphene oxide/silane@Fe₃O₄ dendritic nanostructure. *Environmental science & technology*. 2015;49(10):6117-26. DOI:10.1021/acs.est.5b01013
29. Villegas-Serralta E, Sánchez-Ramírez JF, Talavera-Pech WA, Reyes-López SY, Zavala-Padilla G, Pérez-Campos EL. Detection of HER2 through antibody immobilization is influenced by the properties of the magnetite nanoparticle coating. *Journal of*

Nanomaterials.2018;2018 DOI:10.1155/ 2018/908

2067

30. Jamshaid T, Neto ETT, Eissa MM, Zine N, Kunita MH, El-Salhi AE, et al. Magnetic particles: From preparation to lab-on-a-chip, biosensors, microsystems and microfluidics applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;79:344-62. DOI:10.1016/j.trac.2015.10.022

31. Finkelstein P, Teisch L, Allen CJ, Ruiz G. Tetanus: A potential public health threat in times of disaster. *Prehospital and Disaster Medicine*. 2017;32(3):339-42. DOI:10.1017/S1049023X17000061

32. Hassel B. Tetanus: pathophysiology, treatment, and the possibility of using botulinum toxin against tetanus-induced rigidity and spasms. *Toxins*. 2013;5(1):73-83. DOI:10.3390/toxins5010073

33. Melville-Smith ME, Seagroatt VA, Watkins JT. A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the toxin neutralization test in mice as a method for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. *Journal of biological standardization*. 1983;11(2):137-44. DOI:10.1016/s0092-1157(83)80034-7

34. Metz B, van den Dobbelen G, van der Pol L, van de Waterbeemd B, van der Ley P, Beuvery C, et al. Physicochemical and immunochemical assays for monitoring consistent production of tetanus toxoid. *Biologicals*. 2013;41(4):231-7. DOI:10.1016/j.biologicals.2013.03.001

35. Sovaran R, Rahimian M, Habiba A. Preparation of biodegradable magnetic nanoparticles containing insulin for use in oral drug delivery. *Biological knowledge of Iran*. 2010 Aug 23;5(2):1-1.

36. Hamidi F, Hadjmohammadi MR, Aghaie AB. Ultrasound-assisted dispersive magnetic solid phase extraction based on amino-functionalized Fe₃O₄ adsorbent for recovery of clomipramine from human plasma and its determination by high performance liquid chromatography: Optimization by experimental design. *Journal of Chromatography B*. 2017;1063:18-37. DOI:10.1016/j.jchromb.2017.08.018

37. He Y, Chen Q, Xu C, Zhang J, Hu X. Synthesis and characterization of functionalized silica-coated Fe₃O₄ superparamagnetic nanocrystals for biological applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2005;38(9):1342. DOI:10.1088/0022-3727/38/9/006

38. Bordbar A, Rismanchi M, Oveisi AR, Tangestaninejad S, Zare M. Characterization of modified magnetite nanoparticles for albumin

immobilization. *Biotechnology research international*. 2014;2014. DOI:10.1155/2014/705656

39. Wang P, Zhang G, Li W, Jiao H, Chen Y, Liu X. Entangled Pd complexes over Fe₃O₄@SiO₂ as supported catalysts for hydrogenation and Suzuki reactions. *Catalysis Science & Technology*. 2014;4(5):1333-9. DOI:10.1039/c3cy01071e

40. Saif B, Wang C, Chuan D, Shuang S. Synthesis and characterization of Fe₃O₄ coated on APTES as carriers for morin-anticancer drug. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2015;6(04):267. DOI:10.4236/jbnb.2015.64025

41. Ranjbakhsh E, Bordbar AK, Abbasi M, Khosropour AR, Shams E. Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*. 2012;179:272-6. DOI:10.1016/j.cej.2011.10.098

42. Voigt W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. In: *Chemosensitivity*. Springer; 2005. p. 39-48. DOI:10.1385/1-59259-889-7:039

43. Fricker SP. The application of sulforhodamine B as a colorimetric endpoint in a cytotoxicity assay. *Toxicology in vitro*. 1994;8(4):821-2. DOI:10.1016/0887-2333(94)90073-6

44. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1990;82(13):1107-12. DOI:10.1093/jnci/82.13.1107

45. Van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes*. 2015;8(1):1-10. DOI:10.1186/s13104-015-1000-8

46. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*. 2006;1(3):1112-6. DOI:10.1038/nprot.2006.179

47. Hatami R, Jafari AJ, Ebrahimi AA, Ghasemi A. Preparation of amino silane magnetic nanocomposite by the sol-gel process and investigation of its antibacterial activity. *Micro & Nano Letters*. 2019;14(2):196-201. DOI:10.1049/mnl.2018.5398

48. Xu L, Pan J, Li J, Zhang L, Liu Y. Immobilized *Aspergillus niger* lipase with SiO₂ nanoparticles in sol-gel materials. *Catalysts*. 2016;6(10):149. DOI:10.3390/catal6100149

and characterization of the first generation of polyamino-ester dendrimer-grafted magnetite nanoparticles from 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) via the convergent approach. *Silicon*. 2018;10(2):595-601. DOI:10.1007/s12633-016-9493-x

50. Waldron RD. Infrared spectra of ferrites. *Physicalreview*.1955;99(6):1727. DOI:10.1103/PhysRev.99.1727

51. Ma M, Zhang Y, Yu W, Shen HY, Zhang HQ, Gu N. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects*. 2003;212(2-3):219-26. DOI:10.1016/S0927-7757(02)00305-9

52. Mirzaei-Mosbat M, Ghorbani-Vaghei R, Sarmast N. One-pot Synthesis of 4-Aryl-NH-1, 2, 3-triazoles in Presence of Fe₃O₄@ SiO₂@ Propyl-HMTA as a New Basic Catalyst. *ChemistrySelect*. 2019;4(5):1731-7. DOI:10.1002/slct.201803461

53. Demin AM, Pershina AG, Minin AS, Brikunova OY, Murzakaev AM, Abakumov MA, et al. 3-Aminopropylsilane-modified iron oxide nanoparticles for contrast-enhanced magnetic resonance imaging of liver lesions induced by Opisthorchis felinus. *International Journal of Nanomedicine*. 2016;11:4451. DOI:10.2147/IJN.S113064

54. Nalbandian L, Patrikiadou E, Zaspalis V, Patrikidou A, Hatzidaki E, Papandreou CN. Magnetic nanoparticles in medical diagnostic applications: synthesis, characterization and proteins conjugation. *Current Nanoscience*. 2016;12(4):455-68. DOI:10.2174/1573413712666160215151548

55. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JA. Introduction to spectroscopy. Cengage learning; 2014.

56. Javidparvar AA, Ramezanzadeh B, Ghasemi E. The effect of surface morphology and treatment of Fe₃O₄ nanoparticles on the corrosion resistance of epoxy coating. *Journal of the Taiwan Institute of chemical engineers*. 2016;61:356-66. DOI:10.1016/j.jtice.2015.12.020

57. Rouessac F, Rouessac A. Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques. Wiley & Sons; 2007.

58. Mashhadizadeh MH, Amoli-Diva M. Drug-carrying amino silane coated magnetic nanoparticles as potential vehicles for delivery of antibiotics. *J. Nanomed. Nanotechnol*. 2012;3(4):1.

DOI:10.4172/2157-7439.1000135

59. Do Kim K, Kim SS, Choa YH, Kim HT. Formation and surface modification of Fe₃O₄ nanoparticles by co-precipitation and sol-gel method. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2007;13(7):1137-41.

60. Zhai Y, Wang Z, Wang G, Pei W, Zhang G, Zhang F. Magnetic, fluorescence and transition metal ion response properties of 2, 6-diaminopyridine modified silica-coated fe₃o₄ nanoparticles. *Molecules*. 2016;21(8):1066. DOI:10.3390/molecules21081066

61. Huang J, Li Y, Jia X, Song H. Preparation and tribological properties of core-shell Fe₃O₄@ C microspheres. *Tribology International*. 2019;129:427-35. DOI:10.1016/j.triboint.2018.08.037

62. Arsalani N, Fattahi H, Nazarpour M. Synthesis and characterization of PVP-functionalized superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as an MRI contrast agent. *Express Polym Lett*. 2010;4(6):329-38. DOI:10.3144/expresspolymlett.2010.42

63. Chen Y, Zhang HB, Yang Y, Wang M, Cao A, Yu ZZ. Enhanced electromagnetic interference shielding efficiency of polystyrene/graphene composites with magnetic Fe₃O₄ nanoparticles. *Carbon*. 2015;82:67-76. DOI:10.1016/j.carbon.2014.10.031

64. Silva FS, Pereira PM, Silva PA, Lopes-Nunes J, Carvalho J, Oliveira MC, et al. Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay. *Current protocols in toxicology*. 2016;68(1):2.24. 1-2.24. 15. DOI:10.1002/cptx.9

65. Chaki SH, Malek TJ, Chaudhary MD, Tailor JP, Deshpande MP. Magnetite Fe₃O₄ nanoparticles synthesis by wet chemical reduction and their characterization. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2015;6(3):035009. DOI:10.1088/2043-6262/6/3/035009

66. Villa S, Riani P, Locardi F, Canepa F. Functionalization of Fe₃O₄ NPs by silanization: use of amine (APTES) and thiol (MPTMS) silanes and their physical characterization. *Materials*. 2016;9(10):826. DOI:10.3390/ma9100826

67. Kulkarni SA, Sawadh PS, Palei PK. Synthesis and characterization of superparamagnetic Fe₃O₄@ SiO₂ nanoparticles. *Journal of the Korean Chemical Society*. 2014;58(1):100-4. DOI:10.5012/jkcs.2014.58.1.100

68. Cheng J, Wang X, Qiu L, Li Y, Marquez M, Ye M, et al. Facile synthesis of chitosan assisted multifunctional magnetic Fe₃O₄@ SiO₂@ CS@

photodynamic therapy. *New Journal of Chemistry*. 2016;40(10):8522-34. DOI:10.1039/c6nj01194e

69. Wang Y, Wang W, Yu L, Tu L, Feng Y, Klein T, et al. An immunomagnetic separation based fluorescence immunoassay for rapid myoglobin quantification in human blood. *Analytical Methods*. 2016;8(40):7324-30. DOI:10.1039/c6ay01982f

70. Pinheiro PC, Daniel-da-Silva AL, Tavares DS, Calatayud MP, Goya GF, Trindade T. Fluorescent magnetic bioprobes by surface modification of magnetite nanoparticles. *Materials*. 2013;6(8):3213-25. DOI:10.3390/ma6083213

71. Shi D, Sadat ME, Dunn AW, Mast DB. Photo-fluorescent and magnetic properties of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale*. 2015;7(18):8209-32. DOI:10.1039/c5nr01538c

72. Wiklund M, Hertz HM. Ultrasonic enhancement of bead-based bioaffinity assays. *Lab on a Chip*. 2006;6(10):1279-92. DOI:10.1039/b609223b

73. Baudry J, Rouzeau C, Goubault C, Robic C, Cohen-Tannoudji L, Koenig A, et al. Acceleration of the recognition rate between grafted ligands and receptors with magnetic forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(44):16076-8. DOI:10.1073/pnas.0602761103

74. Reverté L, Prieto-Simón B, Campàs M. New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: Nanomaterials, magnetic beads

and microfluidics systems. A review. *Analytica chimica acta*. 2016;908:8-21. DOI:10.1016/j.aca.2015.12.035

75. Wang Y, Wang W, Yu L, Wang Y, Zhang Q, Xu H, et al. A colorimetric biosensor using Fe₃O₄ nanoparticles for highly sensitive and selective detection of tetracyclines. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016;236:621-6. DOI:10.1016/j.snb.2016.06.029

76. Park JY, Jeong HY, Kim MI, Park TJ. Colorimetric detection system for *Salmonella typhimurium* based on peroxidase-like activity of magnetic nanoparticles with DNA aptamers. *Journal of Nanomaterials*. 2015;2015. DOI:10.1155/2015/527462

77. Lu N, Zhang M, Ding L, Zheng J, Zeng C, Wen Y, et al. Yolk-shell nanostructured Fe₃O₄@C magnetic nanoparticles with enhanced peroxidase-like activity for label-free colorimetric detection of H₂O₂ and glucose. *Nanoscale*. 2017;9(13):4508-15. DOI:10.1039/c7nr00865h

78. Liu X, Song D, Zhang Q, Tian Y, Zhang H. An optical surface plasmon resonance biosensor for determination of tetanus toxin. *Talanta*. 2004;62(4):773-9. DOI:10.1016/j.talanta.2003.09.028

79. Golberg A, Yarmush ML, Konry T. Picoliter droplet microfluidic immunosorbent platform for point-of-care diagnostics of tetanus. *Microchimica Acta*. 2013;180(9):855-60. DOI:10.1007/s00604-