Нүүрстөрөгч агуулсан наноматериал ашиглаж Альфафетопротейн тодорхойлох электроиммунологийн оношлуур боловсруулах нь

*Г.Хишигжаргал[1,2], Панг Дэн[1], Чен КайЯанг[2], Нинг ЖэнЧианг[1], Жанг ЮуанЖан[2] and Шэн ЯанФэй[1]**
Анагаах ухааны сургууль, Зүүн Өмнөдийн Их Сургууль, БНХАУ[1,2],
АШУҮИС-ийн Монгол Японы эмнэлэг[2]
khishigjargal.g@mnums.edu.mn

Түлхүүр үг
Электроиммуно сенсор, электрополимержүүлэх процесс, альфафетопротейн

Товч утга
Нүүрстөрөгч агуулсан нано материал, тэр дундаа олон ханат нүүрстөрөгч агуулсан цилиндр хэлбэртэй нано материал (ОХНЦХН)[1] нь электрон дамжуулах, гэрлийн, дулааны, механик өндөр идэвхтэй бөгөөд судлаачдын анхаарлыг ихээхэн татаж байна[2]. Гэвч химийн хувиралд муу ордог тул электрон дамжуулагч гадаргуу болгон нэг алхамт урвалаар полимержүүлж иммуносенсор бэлтгэх боломжгүй байсан. Энэ удаад бид электрон пробоор винилферроцин (ВФ)[3] болон биомаркер холбогч материалаар н-гидроксисуксинал акрилатыг (НГА) сонгож, бүтэц дэх ижил винил бүлгийг ашиглаж чөлөөт радикалаар полимержүүлж боловсруулаа. Цаашлаад электрон дамжуулагч гадаргуу дээр электрон проб болон эсрэг бие холбогч материалыг полимержүүлж, эсрэг бие (ЭБ) холбосныг (ОХНЦХН/ВФ-НГА /ЭБ$_1$) электроиммуно сенсор гэх ба эсрэг бие холбосны дараа болон anti-AFP той холбогдсоны дараах хүчдэлийн зөрүүнд үндэслэж тооны тодорхойлолтыг хийсэн. Тус биосенсор нь 10 ng•mL^{-1} to 50 μg•mL^{-1} шугаман муруйд АФП-ийг тодорхойлох чадвартай ба хамгийн бага тодорхойлох цэг (LOD) нь 1.14 ng•mL^{-1} байлаа.

Үндэслэл

Альфафетопротейн (АФП) нь ургийн элгэнд нийлэгждэг бөгөөд төрөх үед цусанд хамгийн өндөр концентрацаар агуулагдаж, амьдралын эхний нэг жилд эрчимтэй бууран насанд хүрэхэд маш бага боловч цусанд агуулагдаж байдаг элэгний эсийн хавдар тодорхойлох ач холбогдол бүхий ураг юм[4]. Эмнэлгийн практик альфафетопротейн уургийг фермент холбоот иммуносорбент (ELISA) аргаар тодорхойлдог ба нанометрийн түвшинд шинжилж байгаа боловч аргын хамгийн дээд тодорхойлох боломжтой концентраци харьцангуй бага, урвалж, цаг хугацаа их шаардаж байна[5]. Электроиммунологийн арга нь нэг талаас цахилгаан дамжуулагч материалд электрон проб болон биомаркертай холбогдох чадвар бүхий амин бүлэгтэй нэгдлийг гүйдлийн хүч ашиглаж полимержүүлж биосенсор бэлтгэх, нөгөө талаас эсрэг бие эсрэг төрөгчтэй түлхүүр цоожны зарчмаар холбогдох дархлал судлалын аргуудын нийлбэрт үндэслэн бий болсон шинэ төрлийн эмнэлзүйн лабораторийн оношлуур бэлтгэх арга юм. Олон ханат нүүрстөрөгч агуулсан цилиндр хэлбэртэй нано материал (ОХНЦХН) нь анх 1985 онд фуллерен хэмээх дан нүүрстөрөгчөөс бүрдсэн бөмбөлөг бүтэц бүхий электрохимийн өндөр идэвхтэй нэгдлийг гаргаж авсан үеэс эхлэн одоогийн байдлаар гурван хэмжээст цилиндр бүтэц бүхий олон хэлбэрээр нийлэгжүүлэн гаргаж авсан[6-8]. Түүний цахилгаан дамжуулах, дулаан тусгаарлах, оптик өндөр идэвх зэргийг ашиглаж эмийн бодис тээвэрлэгч, эдийн зураг авах болон оношлуурын бүрдэл хэсэг болгон ашиглагдаж байна. Электроиммунологийн сенсор бэлтгэхэд электрон дамжуулах чадвар өндөр, гадаргуугийн хэмжээ том, нано бүтэц нь бидний сенсорын суурь болгоход нэн тохиромжтой материал юм[9]. Гэвч нүүрстөрөгчөөс бүрдсэн материал тул химийн идэвх маш сул байв. Бидний хийсэн өмнө судалгаанд ОХНЦХН-ыг хүчлийн орчинд карбоксилжүүлж, амин бүлэг агуулсан н-гидроксисуксинал акрилатыг (НГА) нэгдэлтэй электрохимийн орчинд холбож чадсанаар цаашид электроиммуносенсор бэлтгэх боломжийг олгосон билээ.

Зорилго, зорилт

Уламжлалт шинжилгээний аргыг хялбарчлах, ялган дүйх чанар болон хүрээг нэмэгдүүлэх зорилгоор элекроиммуно сенсор бэлтгэж оношлуур боловсруулах хүрээнд дараах зорилтыг дэвшүүллээ. Үүнд:

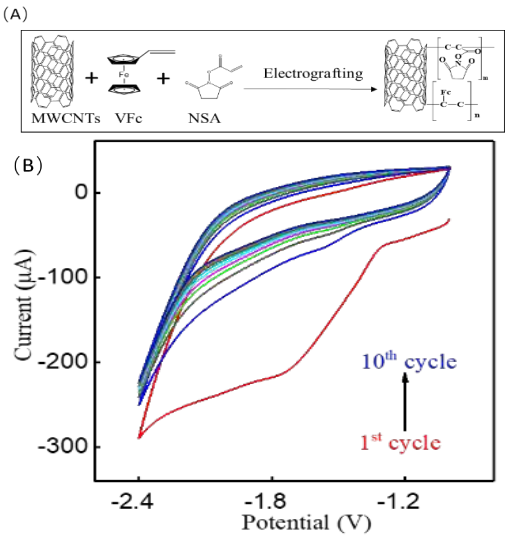
1. Нэг алхамт электрополимержүүлэх процесс ашиглаж электроиммуносенсор бэлтгэх
2. Электроиммуносенсорыг ашиглаж альфафетопротейныг ялган дүйх

Арга аргачлал

ОХНЦХН электрон дамжуулагч гадаргуу болгон электрон пробоор ВФ болон биомаркер холбогч бодисоор НГА сонгож, бүтэц дэх ижил винил бүлгийг ашиглаж 3 электродын систем (шилэн электрод- ажлын электрод, Ag/AgCl-лавлах электрод, хар тугалганы электрод-тоологч электрод) бүхий CHI660e электрохимийн станцаар нэг алхамт полимержүүлэх урвалыг химийн орчин бүрдүүлэн явууллаа. Цаашлаад электрон дамжуулагч гадаргуу дээр электрон проб болон эсрэг бие холбогч материалыг полимержүүлж, эсрэг бие холбосныг (ОХНЦХН/ВФ-НГА /ЭБ$_1$) электроиммунохимийн сенсор гэж тодорхойлж цаашид альфафетопротейн агуулсан сийвэнд иммуносенсорын үзүүлэх хүчдэлийн өөрчлөлтийг хэмжиж тооны тодорхойлолтыг хийв. Мөн тус сенсорын өвөрмөц, мэдрэг чанарыг нэмэгдүүлэх, бусад орчны харилцан нөлөөллийг буулгах, тогтворжуулах зорилгоор зохих тестийг хийсэн.

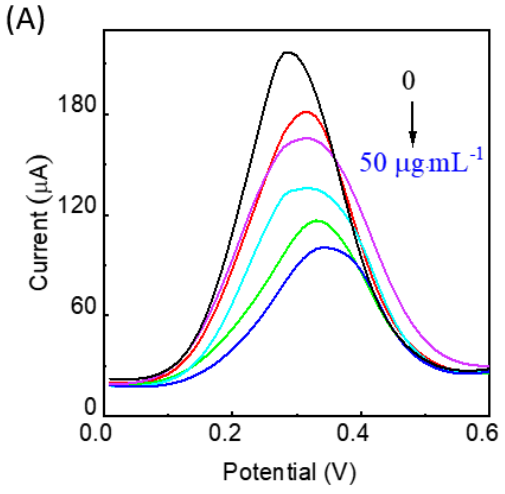
Үр дүн

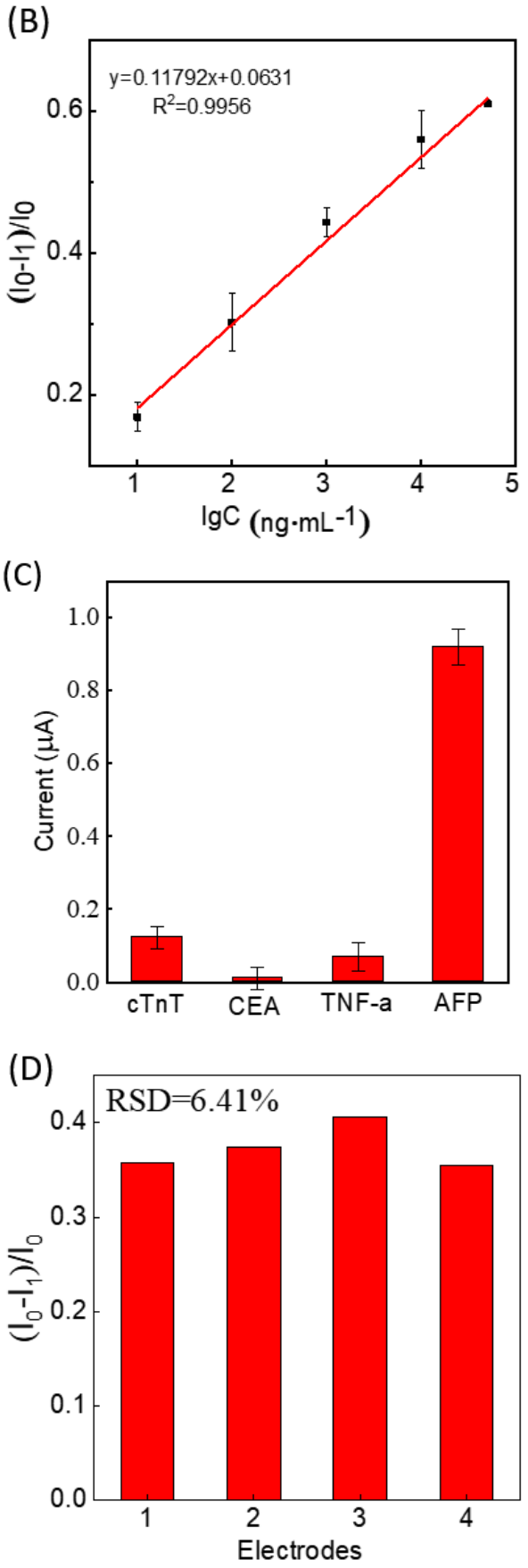
Нэг алхамт электрополимержүүлэх процесс ашиглаж электроиммуносенсор бэлтгэх: ОХНЦХН-ВФ-НГА бүтцийг химийн тодорхой орчны дор мөчлөгт вольтамметрийн аргаар -1.0 V- 2.4 V-д тасалгааны температурт шингэн төлөвт орших ионы уусмалд, чөлөөт радикалаар полимержүүлж үзэхэд 10 дах мөчлөгт ОХНЦХН гадаргуу дээр ВФ ба НГА-ээр бүрэн полимержиж дуусав.



Зураг 1. Электросенсор полимержих процесс

Оношлуурын ялган дүйх чанар: Эсрэг бие болон эсрэгтөрөгч нь электрон дамжуулах чанаргүй бөгөөд электрон пробд эсрэг бие холбосны дараа цахилгаан гүйдлийн хэмжээ буурна. Цаашлаад АФП буюу эсрэг төрөгч холбогдсоны дараа концентрацитай шууд хамааралтай хүчдэл буурах ба $(I_0-I_1)/I_0$ томьёогоор хүчдэлийг хэмжихэд $\Delta I/I_0$=0.11792 lgC АФП (ng·mL^{-1})+0.0631 регрецтэй гарлаа. Регрецийн тэгшитгэлд үндэслэж 10 ng·mL^{-1} to 50 μg·mL^{-1} шугаман муруйд АФП -ийг тодорхойлох чадвартай ба хамгийн бага тодорхойлох цэг LOD=3σ/S томьёогоор 1.14 ng·mL^{-1} байлаа. Сенсорын өвөрмөц чанарыг өрсөлдөж болохуйц бусад уургуудтай харьцуулан үзэхэд бусад уургуудаас АФП -д 10 дахин өвөрмөц байлаа. Аргын стандарт хазайлт 6,41%. АФП тодорхойлох санал болгож буй аргыг ELISA аргатай харьцуулахад 91,47%-105.92% -тай нийцэж байна.





Зураг 2. Оношлуурын ялган дүйх чадвар

Хэлцэмж

Электроиммуносенсор бэлтгэх аргыг хялбаршуулах зорилгоор ижил бүлэг агуулсан материал сонгож нэг алхамт электрополимержүүлэх аргаар полимержүүлэн уламжлалт электроиммуносенсор бэлтгэх шат дараалалтай аргатай харьцуулахад энэхүү арга нь электрохимийн өндөр идэвх үзүүлж байлаа. Цаашлаад электрон дамжуулагчийн гадаргуу дээр -ферроцин болон -суксинимид бүлгүүдийг холбосноор электрон сигналыг хүчжүүлээд зогсохгүй эсрэг бие -эсрэг төрөгчийг хангалттай түвшинд холбох чадварыг нь нэмэгдүүлсэн. Энэхүү шинж чанар нь оношлуурын ялган дүйх чанарт шууд нөлөөлж байв.

Дүгнэлт

Санал болгож буй уг аргыг цахилгаан химилюминесцент дархлаа шинжилгээ зэрэгтэй харьцуулан үзэхэд тухайн аргын хамгийн бага тодорхойлох цэг нь бусад аргаас өндөр боловч 10 ng•mL^{-1} to 50 μg•mL^{-1} хүрээнд тодорхойлж чадаж байгаа нь элэгний хавдрын оношилгоонд (АФП>500 ng•mL^{-1}) хэрэглэхэд тохиромжтой байна.

Ном зүй

1. *Eguilaz M, Gutierrez F, Gonzalez-Dominguez JM, Martinez MT, Rivas G. Single-walled carbon nanotubes covalently functionalized with polytyrosine: A new material for the development of NADH-based biosensors. Biosens Bioelectron. 2016;86:308-314.*
2. *Lee J, Lee YJ, Eun YG, Lee G-J. An ultrasensitive electrochemical detection of tryptase using 3D macroporous reduced graphene oxide nanocomposites by one-pot electrochemical synthesis. Analytica Chimica Acta. 2019;1069:47-56.*
3. *Zhao D, Li J, Peng C, Zhu S, Sun J, Yang X. Fluorescence Immunoassay Based on the Alkaline Phosphatase Triggered in Situ Fluorogenic Reaction of o-Phenylenediamine and Ascorbic Acid. Anal Chem. 2019;91(4):2978-2984.*
4. *Sharifi M, Avadi MR, Attar F, et al. Cancer diagnosis using nanomaterials based electrochemical nanobiosensors. Biosens Bioelectron. 2019;126:773-784.*
5. *Prasad KS, Cao X, Gao N, et al. A low-cost nanomaterial-based electrochemical immunosensor on paper for high-sensitivity early detection of pancreatic cancer. Sensors and Actuators B: Chemical. 2020;305.*
6. *Alim S, Vejayan J, Yusoff MM, Kafi AKM. Recent uses of carbon nanotubes & gold nanoparticles in electrochemistry with application in biosensing: A review. Biosens Bioelectron. 2018;121:125-136.*

7. *Menezes BRCd, Rodrigues KF, Fonseca BCdS, Ribas RG, Montanheiro TLdA, Thim GP. Recent advances in the use of carbon nanotubes as smart biomaterials. Journal of Materials Chemistry B. 2019;7(9):1343-1360.*
8. *Kolahalam LA, Kasi Viswanath IV, Diwakar BS, Govindh B, Reddy V, Murthy YLN. Review on nanomaterials: Synthesis and applications. Materials Today: Proceedings. 2019;18:2182-2190.*
9. *Eguilaz M, Villalonga R, Rivas G. Electrochemical biointerfaces based on carbon nanotubes-mesoporous silica hybrid material: Bioelectrocatalysis of hemoglobin and biosensing applications. Biosens Bioelectron. 2018;111:144-151.*

One–Pot electrografting preparation of bifunctionalized carbon nanotubes for sensitive electrochemical immunosensing

*Khishigjargal Ganbat[1], Deng Pan[2], Kaiyang Chen[2], Zhenqiang Ning[2], Yuanjian Zhang[2] and Yanfei Shen[1]**
Medical School, Southeast University[1,2], Nanjing, China
Mongol-Japan Hospital, MNUMS[1]
khishigjargal.g@mnums.edu.mn

ABSTRACT

Carbon nanomaterials such as multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) have received intense interest in the field of electrochemical biosensing due to their unique electrical, optical, thermal, and mechanical properties. In general, biomolecule conjugation and attachment of an electrochemical probe are two key elements for preparing an electrochemical sensor. The above tasks are often achieved by a step-by-step reaction due to different reaction conditions. However, because of the low reactivity of MWCNT, it is challenging to precisely control the amount of the two modifiers on the CNT surface with sequential reactions. Herein, we report a one-pot electrografting procedure based on free-radical polymerization to attach both an electrochemical probe and a biomolecular coupling agent on MWCNT in a highly controlled manner. The ratio of the two modifiers was facilely regulated to balance the electrochemical signal intensity and the biomolecule conjugation, which played an important role in enhancing sensor performance. By taking alpha-fetoprotein (AFP) as a model analyte, the immunosensor based on bifunctionalized MWCNT showed a wide linear range from 10 ng•mL^{-1} to 50 μg•mL^{-1}, which could greatly meet the actual requirement for liver cancer diagnosis. This work provides a new avenue for the construction of electrochemical biosensors with enhanced signal amplification for the field of biosensing and clinical diagnosis.