اصول اساسی ساخت زیست حسگرهای الکتروشیمیایی

متین محمودی فرد*[۱]، الهه اسماعیلی[۱]، منوچهر وثوقی[۱،۲]، مسعود سلیمانی[۳]، سارا صعودی[۴]

۱- پژوهشکده علوم و فناوری نانو، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

۲- دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

۳- هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

چکیده

امروزه زیست¬حسگرهای الکتروشیمیایی به دلیل خصوصیات ذاتی خود همانند حساسیت بالا، کاربرد آسان ، تکنولوژی ساده و ارزان، امکان اتوماسیون آسان و ادغام در دستگاه¬های آزمایشگاهی در مقایسه با سایر زیست¬حسگر توجه بسیاری از محققان را به خود جلب نموده است. از این¬رو زیست¬حسگرهای الکتروشیمیایی پتانسیل زیادی برای تبدیل شدن به حسگرهای تشخیص در محل (point of care) برای تشخیص زودهنگام بیماری¬های صعب¬العلاج را دارند. طی دهه اخیر، تلاش های زیادی برای توسعه و بهبود عملکرد این نوع از زیست¬حسگرهای شده است. امروزه نانوتکنولوژی کمک شایانی به ساخت و تقویت سیگنال حسگرهای الکتروشیمیایی نموده است. علاوه بر موارد ذکر شده آرایه¬های الکتروشیمیایی توانایی آنالیز چند بیومارکر به طور همزمان را نیز دارند. تاکنون تعدادی از این نوع زیست¬حسگرهای الکتروشیمیایی با موفقیت روانه بازار شده¬اند. این مقاله قصد دارد تا به طور مختصر به دستاوردها و موفقیت های اخیر در این حوزه یعنی سیستم های تشخیصی بر پایه الکتروشیمیایی تشخیص در محل بپردازد.

واژه‌های کلیدی: *زیست¬حسگر، الکتروشیمیایی، نانو، ریز سیال*

ایمیل نویسنده مسئول: mahmodifard@mehr.sharif.ir

۱- مقدمه

شناسایی سریع، حساس و گزینش پذیر بیومارکرها به منظور تشخیص زودهنگام بیماری‌های صعب العلاجی مانند سرطان، حیاتی است. اخیراً تلاش‌های زیادی برای ساخت زیست حسگرهای تشخیص در محل بکار بسته شده است که در هر مکانی امکان استفاده از آنها وجود داشته باشد. اینگونه حسگرها نه تنها باید سریع، حساس و گزینش پذیر باشند بلکه باید کوچک و ارزان نیز باشند. زیست حسگرهای الکتروشیمیایی، ذاتاً دارای حساسیت بالا، قیمت ارزان، مصرف انرژی کم و با قابلیت عملکرد خودکار هستند که این توانایی-ها آنها را یکی از گزینه های برتر تولید انبوه حسگرهای تشخیص در محل مبدل نموده است[۱].

به منظور ساخت حسگرهای تشخیص در محل، چند نکته باید مد نظر قرار گیرد که از جمله ی آنها می توان به حساسیت بالا، قدرت تشخیص چندین بیومارکر به طور همزمان و ادغام با سایر سیستم ها را اشاره نمود. دو گزینه اساسی برای بهبود حساسیت حسگر وجود دارد:

۱) بهینه نمودن تثبیت لایه شناساگر بر روی الکترود

۲) تقویت سیگنال الکتروشیمیایی که بر اثر اتصال بیومارکر به شناساگر ایجاد می گردد.

در این بخش به روش های تثبیت لایه شناساگر بر روی الکترود پرداخته خواهد شد .

تثبیت لایه شناساگر پیشنیاز اساسی برای ساخت زیست-حسگرهای الکتروشیمیایی محسوب می گردد. در بیشتر زیست حسگرهای الکتروشیمیایی لایه ی شناساگر پروتئین‌ها (آنتی‌بادی ها و یا آنتی‌ژن‌ها) هستند و مبدل‌گرها از فلزاتی مانند طلا و پلاتین، مواد نیمه هادی مانند ایندیوم قلع اکسید یا ایریدوم اکسید و یا مواد کربنی مانند چسب کربن، گلاسی کربن و گرافیت ساخته می‌شود. بر اساس خواص فیزیکی و شیمیایی الکترود و پروتئین، روش های مختلفی برای تثبیت پیشنهاد شده است. مشکل اصلی در طی فرایند تثبیت پروتئین‌ها

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۱۴ تاریخ چاپ: ۹۶/۰۲/۳۰

اینست که چطور می توان ساختار اصلی و فعالیت پروتئین را به طور کامل حفظ نمود.

۱-۱- تثبیت فیزیکی

تثبیت فیزیکی بر پایه جذب سطحی پروتئین‌ها بر روی سطح الکترود و بر اساس نیروی الکترواستاتیک، پیوند یونی و فعل و انفعالات هیدروفوبیکی می باشد. در هر حال اغلب اوقات تثبیت های فیزیکی منجر به آرایش یافتگی‌ها رندوم و اتصال ضعیف پروتئین‌ها می گردد. به منظور بهبود اتصال پروتئین‌ها به سطح الکترود روش های مختلفی مانند حبس پروتئین داخل بستر پلیمری[۲] پیشنهاد شده است و یا تکنیک دیگر که پیشنهاد شده است اینست که هنگامی که فیلم لایه نازک ایریدوم اکسید به روش الکتروشیمیایی در حال رشد است، آنتی بادی ها به صورت فیزیکی در داخل بستر آن حبس شده و اینگونه برای اتصال زیستلوژیکی در دسترس هستند[۳]. گرچه حبس فیزیکی پروتئین‌ها اتصال را بهبود می دهد، ولی بازدهی تشخیص به دلیل دفن سایت‌ها فعال پروتئین‌ها در داخل بستر اینگونه مواد هنوز پایین است. بنابراین تکنیک‌های غیرفیزیکی دیگری توسعه یافته است.

۱-۲- تثبیت کووالانسی

پیوندهای کوالانسی اکثر اوقات بین گروه‌های عاملی در دسترس پروتئین‌ها با سطح اصلاح شده الکترودها ایجاد می گردد که این امر منجر به اتصالی برگشت‌ناپذیر می‌گردد و پوشش سطحی بسیار بالایی ایجاد می نماید. به عنوان مثال اصلاح سطحی الکترود کربن به روش الکتروشیمیایی امکان پذیر است که در نتیجه‌ی آن گروه‌های کربوکسیل برای پیوند با گروه‌های آمین پروتئین‌ها ایجاد خواهد شد[۴] . روش مهم دیگری برای اصلاح سطح الکترودها استفاده از کراس‌لینگرهای دارای دو گروه عاملی می باشد. در جدول ۱ برخی از کراس-لینکرها با دو گروه عاملی لیست شده است که عبارتند از: گلوتارآلدئید [۵] ۳- آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان [۶]، دی آزونیوم کاتیون [۷]، ۳- گلایسی دوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان (GPTMS) [۸] مشتقات تیول[۹] و چندین نوع پلیمر[۱۰].

جدول۱. مقایسه تکنیک های مختلف تثبیت کووالانسی پروتئین‌ها بروی سطح

Electrode		Functional groups in capture probe	Cross linker	References
Metal	Gold	Amine	11-Mercaptoundecanoic acid	Ahmad and Moore (2012)
	Gold	Amine	22-(3,5-bis((6-mercaptohexyl)oxy)phenyl)-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxadocosanoic acid; 1,2-dithiolane-3-pentanoic acid	Nassef et al. (2008)
	Gold	Amine	Thiourea; thioctic acid; 3-mercaptopropionic acid	Limbut et al. (2006)
	Gold	Amine	Glutaraldehyde	Jiang et al. (2003)
	Gold	Amine	Carboxymethyldextran	Darain et al. (2005)
Semiconductor	Iridium oxide	Amine	(3-aminopropyl)triethoxysi-lane and glutaraldehyde	Salam and Tothill (2009)
	ITO	Amine	(3-glycidoxypropyl)-trimet-hoxysilane	Wei et al. (2009)
Carbon	Graphite		4-carboxymethylaniline	Wilson (2005)
	Graphite	Amine	Poly-terthiophene carboxylic acid	Corgier et al. (2005)
	Glassy carbon	Amine	Pyrrolepropylic acid	Dong et al. (2006)
	Boro-doped diamondn	Amine	o-Aminobenzoic acid	Preechaworapun et al. (2008)
	Carbon paste	Carboxylic	4-Carboxyphenyl diazonium	Hayat et al. (2011)

ITO: Indium–tin oxide.

در یک بررسی، تثبیت فیزیکی و کوالانسی از طریق اتصال بین گروه‌های آمین و کربوکسی متیل دکستران موجود بر روی سطح الکترود کاری طلا برای شناسایی پروتئین مورد نظر استفاده گردید. گزارش شده است که به وسیله تثبیت کووالانسی آنتی بادی حدود ۲۵۰ برابر افزایش در حد تشخیص زیست‌حسگر به دست خواهد آمد [۷]. مشکلی که ممکن است بر اثر استفاده از کراس‌لینکر بر روی سطح الکترود پیش آید اینست که سینتیک انتقال الکترون بین شناساگرهای ردوکس و الکترود کند گردد چون کراس لینکرها هادی الکترون نیستند. اما با ایجاد تعادل بین مقدار آنتی‌بادی تثبیت شده بروی سطح و سینتیک الکتروشیمیایی شناساگرهای ردوکس می توان این محدودیت را از بین برد. تثبیت کووالانسی مزایای زیادی را برای ساخت زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی فراهم می کند. در هر حال، همیشه جا برای پیشرفت در این حوزه وجود دارد. دو روش اصلی برای بهبود بازده افینیته‌ی پروتئین-های تثبیت شده، تثبیت آرایش یافته و استفاده از نانومواد است.

۱-۳- تثبیت آرایش یافته

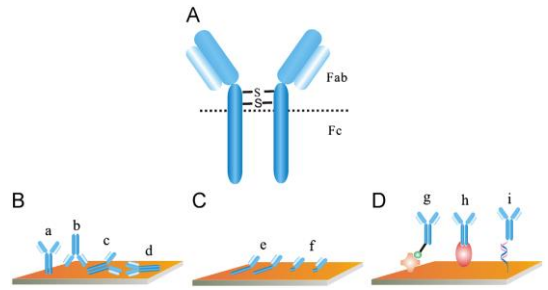
در بعضی موارد، آرایش‌یافتگی رندوم و تغییر ساختار پروتئین در اثر تثبیت، منجر به از دست رفتن تمام یا قسمتی از فعالیت آن‌ها می گردد. بنابراین تثبیت آرایش‌یافته می تواند باعث بهبود عملکرد ایمنوحسگرهای الکتروشیمیایی می گردد. تثبیت آرایش‌یافته بدین معناست که پروتئین تثبیت شده به نحوی بروی سطح قرار گیرد که سایت‌های شناساگر آن به طور یکنواخت در معرض محلول آنالیت مورد نظر باشند.

۱-۳-۱- تثبیت آرایش یافته آنتی‌ژن

مطالعات کمی در مورد تثبیت آرایش‌یافته آنتی‌ژن‌ها گزارش شده است و این شاید به دلیل تنوع فراوان ساختار آنتی‌ژن‌ها باشد. در گزارشی آمده است که به وسیله‌ی ماده دوقطبی آلکان تیول که دارای گروه‌های عاملی کربوکسیلیک اسید است و می تواند به صورت کووالانسی با گروههای آمین آنتی‌ژن پیوند برقرار کند، می‌توان آنتیژن‌ها را به صورت آرایش یافته بر روی سطح الکترود تثبیت نمود[۱۱].

۱-۳-۲- تثبیت آرایش یافته‌ی آنتی‌بادی

برخلاف تثبیت آرایش‌یافته آنتی‌ژن‌ها، تثبیت آرایش یافته آنتی-بادی نقش اساسی را در ساخت زیست حسگرهای الکتروشیمیایی بازی می کند. آنتی‌بادی‌ها دارای ۴ زنجیره هستند: دو زنجیره پلی‌پتیدی شبیه به هم سنگین و دو زنجیره‌ی پلی‌پتیدی مشابه سبک که با هم یک ساختار Y شکل را به وجود می آورند (شکل ۱A). بازوهای این مولکول Y شکل قسمت اتصال به آنتیژن هستند که به آن Fab گفته می شود و به قسمت عمودی که قابلیت کریستاله شدن را دارد Fcگفته می شود. اگر مولکول آنتی‌بادی به صورت رندوم بر روی سطح بچسبد، امکان ۴ آرایش مختلف وجود خواهد داشت (شکل ۱B): end-on که در این حالت قسمت Fc به سطح چسبیده است، head-on که در این حالت قسمت Fab به سطح چسبیده است، sideway-on در این حالت مولکول آنتی‌بادی از یک سمت Fc و یک بازوی Fab به سطح متصل شده است و در حالت flat-on تمام سه قسمت به سطح چسبیده اند . در بسیاری از موارد، در صورتی که هیچ تدبیری به منظور کنترل آرایش اندیشه نشده باشد، آرایش‌یافتگی واقعی آنتی‌بادی ترکیبی از تمامی حالت‌های ذکر شده می باشد که این امر منجر به اتصال کنترل نشده آنتی‌ژن می گردد و بازده آن به شدت کاهش می‌یابد. از آنجایی که قسمت فعال آنتی‌بادی در قسمت Fab می باشد، آرایش ایده‌آل برای تثبیت آنتی‌بادی آرایش end-on می باشد. هنگامی که Fc بروی لایه جاذب متصل گردد، آنگاه Fabها به سمت محلول آنالیت آرایش خواهند یافت. روش‌های گوناگونی برای کنترل آرایش یافتگی آنتی‌بادی ها به منظور بهبود خواص حسگری زیست حسگرها بکاربسته شده است.



شکل۱. A) ساختار اصلی آنتی‌بادیB) جهت‌گیری رندوم آنتی بادی‌های تثبیت شده به طرق مختلف -on a)end-on,(b)head-,(c)sideways on,(d) flat-on; (C) تثبیت قطعات آنتی‌بادی با جهت‌گیری یکسان (e) Fab half-antibody, and (f) (D تثبیت آنتی‌بادی‌ها از طریق سیستم-های بیوافینیته‌ی مختلف g) بیوتین- اویدین h) پروتئین A,G,L i) تثبیت هدایت شده با DNA [۱۲]

۱-۳-۲-۱- تثبیت آنتی‌بادی به صورت site-oriented

اساساً در این تکنیک Fabهای آنتی‌بادی تهیه می‌شود و به واسطه‌ی گروه‌های عاملی موجود در سطح لایه الکترودی مانند طلا به سطح حسگر متصل می‌گردد. در حالی که گروه‌های عاملی به سطح حسگر چسبیده اند، سایت‌های فعال آنتی‌بادی از سطح مبدلگر حسگر دور هستند(آرایش یافتگی end-on) که این امر منجر به در دسترس بودن بیشتر و فعالیت بالاتر آنتی بادی‌های تثبیت شده می گردد. همانطور که در شکل ۱C مشاهده می گردد با استفاده از آنتی‌بادی نیمه و یا Fabهای آن، سایت‌های اتصال آنتی‌ژنی در دسترس محلول آنالیت خواهد بود که این امر باعث افزایش بازده افینیته‌ی آنتی‌ژن خواهد شد. Fabها با استفاده از تکنیک‌های مهندسی آنتی-بادی می توانند جدا شده و بروی سطح الکترود آرایش بیابند[۱۲]. در چندین مطالعه بین تثبیت آرایش‌یافته و رندوم قطعات آنتی‌بادی مقایسه صورت پذیرفته است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای اینطور بیان شده است که در صورت تثبیت آرایش‌یافته‌ی Fabها، سیگنال حسگری که در اثر اتصال آنتی‌ژن به وجود خواهد آمد، دو برابر حالتی است که آنتی‌بادی کامل به صورت رندوم و کوالانسی تثبیت می‌گردد [۱۳]. به طور مشابه در کار دیگری کارایی آنتی‌بادی، Fabها و یک Fab تنها در شناسایی آنتی‌ژن مورد بررسی قرار گرفته شده است [۱۴]. گزارش شده است که یک Fab تنها می تواند به صورت

مستقیم آرایش یابد و در پاسخ به هدف پنج برابر بهتر از لایه آنتی‌بادی و یا Fabهای رندوم آرایش یافته عمل نماید.

۱-۴- تثبیت بیوافینیته

روش دیگر برای بدست آوردن تثبیت آرایش یافته‌ی آنتی‌بادی-ها استفاده از فعل و انفعالات بیوافینیته می باشد. استفاده از تعدادی سیستم‌های بیوافینیته در ساخت زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی گزارش شده است، مثل سیستم‌های لکتین-شکر [۱۵]، پروتئین A و G و L [۱۶] His-Tag [۱۷]، تثبیت به کمک رشته‌های DNA [۱۸] سیستم های لیگاندی و غیره (شکل ۱D). در مطالعه‌ای دو روش برای تثبیت آرایش‌یافته‌ی آنتی‌بادی با هم مقایسه شده است: در روش اول از تکه های Fab و در تکنیک دیگر از افینیته‌ی بورونیک اسید به ذرات شکر استفاده شده است. گزارش شده است که استفاده از افینیته‌ی بورونیک اسید حساسیت بیوحسگر الکتروشیمیایی تا ۲۵۰ برابر افزایش می دهد، که این امر می تواند به دلیل حفظ ساختار پروتئین و افینیته‌ی آن برای اتصال به آنالیت باشد.

پروتئین‌های A و G و L می توانند به صورت انتخابی و بازده بالا به قسمت Fc گونه‌های مختلف IgG متصل گردند، و بدین ترتیب تثبیت آرایش یافته‌ی آنتی‌بادی‌ها با سایت های فعال برای اتصال به آنتی‌ژن را بروی سطح به ارمغان بیاورند و این امر به نوبه‌ی خود باعث افزایش حساسیت و پایداری حسگر می گردد. در مطالعه ای سطح سیلانه شده‌ی الکترودها به کمک ۴ روش از آنتی‌بادی پوشانده شده و خواص حسگری آنها با هم مقایسه شده است: ۱- جذب فیزیکی۲- اتصال کووالانسی به کمک کراس‌لینکر گلوتارآلدئید۳- اتصال کووالانسی به کمک کراس‌لینکر گلوتارآلدئید در ترکیب با-anti human IgG ۴- اتصال کووالانسی به کمک کراس‌لینکر گلوتارآلدئید در ترکیب با بیوافینیته‌ی پروتئین A [۱۹] نتایج نشان داده است که استفاده از پروتئین A بالاترین حد تشخیص آنالیت را فراهم می آورد.

امروزه تلاش‌های زیادی برای تبدیل کردن آرایه‌های دی ان ای به آرایه های پروتئینی به کمک هیبریداسیون دی ان ای انجام شده است. یک تکنیک جالب برای تثبیت بهینه‌ی آنتی‌بادی به کمک اتصال اختصاصی پروتئین G به الیگونوکلئوتیک دی ان ای می باشد [۲۰]. در این روش تک رشته‌ی دی ان ای عامل‌دار شده با پروتئین G به صورت اختصاصی با تک رشته مکمل خود که بروی سطح تثبیت شده است، هیبرید می گردد و در نتیجه‌ی این هیبریداسیون پروتئین G بروی سطح دی ان ای قرار می گیرد. سپس آنتی‌بادی‌ها می‌توانند به صورت آرایش یافته و با بازده بالا به پروتئین G متصل گردند[۲۱].

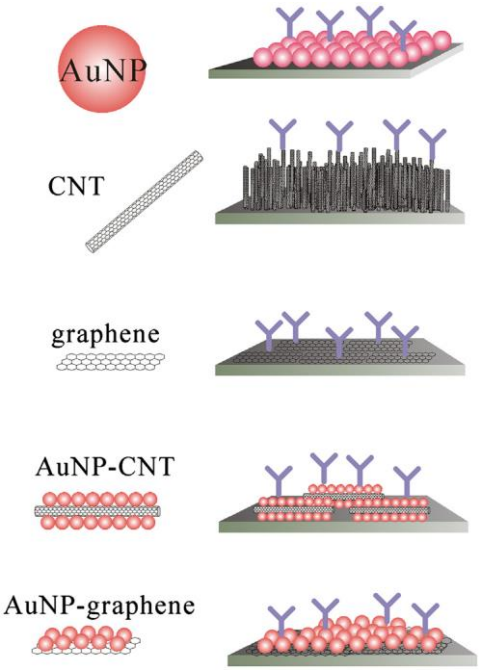
۲- کاربرد نانوتکنولوژی در ساخت زیست حسگرهای الکتروشیمیایی

به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی منحصربه‌فرد نانومواد، نانومواد زیست‌سازگار مختلفی به طور موفقیت آمیزی در تکنیک‌های تشخیصی بکار گرفته شده است. نانومواد که دارای نسبت سطح به حجم زیاد، آزادی فضایی بیشتر برای تثبیت پروتئین و فعالیت سطحی زیاد هستند درساخت سیستم‌های حسگری الکتروشیمیایی به خوبی به کارگرفته شده اند. علاوه-براین بعضی از نانومواد (معمولا نانوذرات فلزی و نیمه‌هادی) می‌توانند به طور موثر انتقال الکترون بین الکترود و بیومولکول تثبیت شده بروی سطح را بهبود بخشند. که این امر کارایی زیست‌حسگر الکتروشیمیایی را جهت شناسایی مولکول هدف افزایش می‌دهد [۲۲].

شکل ۲ نانومواد‌ی را که تاکنون در حوزه زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی بکارگرفته شده است، نمایش می‌دهد. در یک پروسه معمول، نانومواد در ابتدا به سطح الکترود متصل می-گردد و سپس پروتئین شناساگر بروی سطح الکترود اصلاح شده با نانومواد تثبیت می گردد. آرایش یافتگی پروتئین شناساگر که بروی سطح تثبیت شده است، به صورت رندوم است. در هرحال سطح نانومواد سطح نسبتاً بزرگی برای تثبیت آنتی بادی‌ها می‌باشد و همچنین این مواد آزادی بیشتری دارند که این امر باعث می شود که افینیته‌ی اتصال پروتئین به مولکول هدف بیشتر گردد. معمولترین نانومواد استفاده شده در این حوزه، نانوذرات طلا است که در قسمت بعدی به آن پرداخته می شود.

۲-۱- زیست‌حسگرهای بر پایه نانوذرات طلا

نانوذرات طلا یکی از معمول‌ترین نانومواد‌ی است که در حوزه بیوحسگرهای الکتروشیمیایی استفاده می گردد [۲۳] در این قسمت به روش مرجع ساخت زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی بر پایه نانوذرات طلا پرداخته می شود. مرحله نخست اینست که چطور الکترودها را با نانوذرات طلا اصلاح نماییم. در چندین مطالعه گزارش شده است که بهترین روش برای اتصال نانوذرات طلا به سطح الکترود استفاده از کراس‌لینکرهای دارای دو گروه عاملی است مانند ۴- تیوفنول[۲۴] ۱،۶-هگزان دی تیول[۲۵]، و تیواوره[۲۶].



شکل۲. گونه‌های مختلف نانومواد که در ساخت زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی بکار گرفته شده اند[۱۲]

در مرحله بعدی باید پروتئین شناساگر بروی سطح نانوذرات طلا تثبیت گردد. تکنیک‌های مختلفی برای این مورد پیشنهاد شده از جمله جذب فیزیکی[۲۷] و یا گلوتاتیون(glutathione) به عنوان بازوی جداکننده[۲۶]. برخی از محققان پیشنهاد کردند که در ابتدا نانوذرات طلا با آنتی‌بادی کانژوکه گردد و سپس بروی الکترود طلا تثبیت گردند[۲۸] برای بهبود عملکرد زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی، بعضی از محققان تلاش نمودند که نانوذرات طلا را به صورت آرایش‌یافته بروی سطح الکترود لایه نشانی نمایند[۲۹].

۲-۲- زیست حسگرهای بر پایه نانومواد کربنی

نانومواد کربنی دسته‌ای از نانومواد هستند که در شکل‌های مختلف وجود دارند و بطور گسترده در ساخت زیست حسگرهای بکار بسته شده اند. نانولوله‌های کربنی گونه‌ی منحصربه‌فردی از نانومواد کربنی است که نسبت طول به قطر آن تا ده میلیون بار می باشد. در تحقیقی آنتی‌بادی‌ها بروی بستری از نانولوله‌های کربنی تک دیواره تثبیت شد [۳۰]. در این تحقیق نانولوله‌های تک دیواره دارای گروه‌های عاملی کربوکسیل به وسیله‌ی مواد نفیونی و یون آهن بروی سطح الکترود لایه نشانی شد که این امر منجر به لایه‌نشانی نانولوله‌های کربنی به شکل عمودی بر سطح الکترود گردید. این لایه نانولوله‌های کربنی دارای گروه‌های عاملی کربوکسیل، لایه‌ای رسانا با سطح مخصوص بالا را برای تثبیت جمعیت زیادی از آنتی‌بادی به صورت کووالانسی را فراهم می‌سازد. در چند تحقیق دیگر نیز از نانولوله‌های کربنی چند دیواره نیز برای تثبیت آنتی‌بادی به منظور ساخت زیست حسگرهای الکتروشیمیایی با حساسیت بالا استفاده شده است [۳۱]. در تحقیقی از نانوالیاف کربنی حاوی گروه‌های کربوکسیلیک اسید برای ساخت زیست حسگر استفاده گردید. این نانوالیاف پروس، سایت‌های فعال بیشتری برای اتصال کووالانسی آنتی-بادی به وجود آوردند، که این امر منجر به دقت و حساسیت بالا، پایداری قابل قبول و قابلیت بازتولید زیست‌حسگر شد. اخیراً گرافن (ساخته شده از تک‌لایه‌ی کربن) توجه محققان زیادی را در طراحی زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی به خود جلب نموده است. در تحقیقی از نانو صفحات گرافنی که می تواند سطح مخصوص زیادی را برای تثبیت جمعیت بیشتری از آنتی‌بادی برای تقویت سیگنال حسگر در اختیار قرار دهد،استفاده شده است[۳۲]. صفحات گرافن کاهش‌یافته نیز در ساخت زیست حسگرها بکار گرفته شده‌اند[۳۳]. به عنوان نمونه در تحقیقی از گرافن که روش الکتروشیمیایی اکسید شده که با پلیمر N- acryloxysuccinimide برای تثبیت آنتی‌بادی به منظور ساخت زیست حسگر استفاده شده است[۳۴]. از نانومواد دیگری مانند اکسید زیرکونیم و آهن نیز برای ساخت زیست حسگرهایی با حساسیت بالا استفاده شده است[۳۵].اکثر زیست‌حسگرها بر پایه نانومواد رنج خطی گسترده، حد تشخیص پایین و پایداری طولانی مدت را به ارمغان می آورند.

۲-۳- زیست حسگر بر پایه‌ی نانوکامپوزیت

نانوکامپوزیت‌هایی به منظور بهبود کارایی نانومواد خالص برای تثبیت آنتی‌بادی طراحی شده است که به نسبت نانومواد خالص سطح مخصوص بالاتر و نرخ انتقال الکترون بیشتری دارند. در تحقیقی از کامپوزیت نانوذرات طلا/ نانولوله‌های کربنی چند دیواره/ کیتوزان برای ساخت زیست حسگرهای یک بار مصرف استفاده شده است [۳۶]. از نانوکامپوزیت‌های دیگری نظیر Ag–Ag2O/SiO2 و گرافن/ نانوذرات طلا نیز به منظور ساخت زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی استفاده شده است. گرچه تکنیک‌های مختلفی برای تثبیت لایه شناساگر بروی سطح الکترود پیشنهاد شده اما بهترین آن هنوز معرفی نشده است . به طورکلی تثبیت آرایش یافته، بیوافینیته‌ی لایه شناساگر را بهبود می بخشد و نانوتکنولوژی می تواند بازده تثبیت را افزایش دهد. یکی از بهترین روش‌ها برای تثبیت پروتئین ترکیب دو تکنیک با یکدیگر است.

۳- تکنیک‌های تقویت سیگنال الکتروشیمیایی به کمک نانومواد

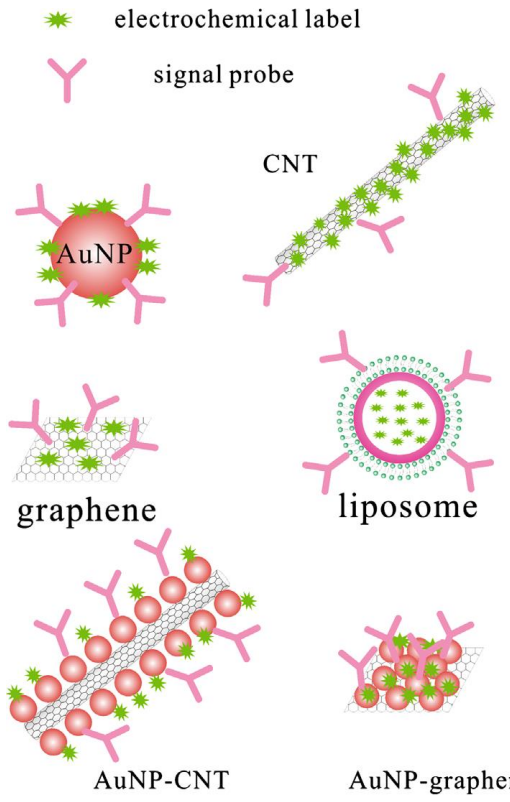
روش دیگر برای رسیدن به زیست حسگر با حساسیت بالا، توسعه روش‌هایی برای تقویت سیگنال الکتروشیمیایی است. تکنیک‌های تقویت سیگنال برپایه نانومواد به شدت توسعه یافته است. در بعضی موارد نانومواد به دلیل داشتن فعالیت های ردوکسی و آنزیمی می توانند نقش برچسب الکتروشیمیایی را بازی نمایند. در بعضی دیگر، نانومواد به عنوان نانوحاملی که آنتی بادی‌ها و مولکول‌های شناساگر بروی آن تثبیت می گردند، بکار گرفته می شوند.

۳-۱- نانومواد به عنوان برچسب های الکتروشیمیایی

گزارش شده است که نانومواد غیرآلی مانند طلا AuNPs و نقاط کوانتومی(QDs) می توانند واکنش‌های الکتروشیمیایی را تسریع کنند (یعنی از خود واکنش کاتالیزوری نشان می دهند)، که این امر می تواند باعث تقویت سیگنال الکتروشیمیایی گردد [۳۷]. در تحقیقی، از نانوذرات طلا به عنوان پروب الکتروشیمیایی استفاده شدکه سیگنال از اکسیداسیون نانوذرات طلا لایه نشانی شده بروی الکترود و احیا $AuCl_4^-$ به وسیله‌ی square wave voltammetry (SWV) بدست آمد. در تحقیق دیگری از نانولوله‌های کربنی که نانوذرات طلا بروی آن قرار گرفته بود به عنوان نانوکاتالیست برای تقویت سیگنال الکتروشیمیایی استفاده گردید[۳۸]. نانو ذرات طلا تثبیت شده بروی کامپوزیت نانولوله‌های کربنی- نانوذرات طلا فرآیند احیا p-nitrophenol را کاتالیز و بازگشت‌پذیری را بهبود و در نتیجه حساسیت بالا حسگر را به ارمغان می‌آورد. نقاط کوانتمی برای اولین بار به عنوان شناساگر برای شناسایی ۳ پروتئین به طور همزمان مورد استفاده قرارگرفت [۳۹]. ۴ گونه نقاط کوانتمی (ZnS, CdS, PbS, CuS) که با آنتی‌بادی‌های مختلف پوشش داده شده بودند استفاده شد تا بدینوسیله پیک‌های متمایز ولتامتری بدست آید که مکان و سایز این پیک‌ها نماینده هویت و غلظت آنتیژن مربوطه بود.

۳-۲- نانومواد به عنوان نانوحامل‌ها در زیست-حسگرهای الکتروشیمیایی

همانطور که در شکل۳ نشان داده شده است، نانومواد گوناگونی به عنوان نانوحامل استفاده شده است که از جمله‌ی آنها می توان به نانوذرات طلا، نانولوله‌های کربنی، گرافن، لیپوزوم و نانوکامپوزیت‌های آنها اشاره کرد. نمونه‌های گوناگونی در جدول ۲ آمده است . نانوحامل‌ها می توانند بر پایه‌ی نانوذرات طلا [۴۰] نانولوله‌های کربنی [۴۱]، گرافن اکسید[۴۲]، نانوذرات سیلیکا SiO_2 [۴۳] باشند که آنتی-بادی‌ها و برچسب‌های الکتروشیمیایی بروی این نانوحامل‌ها تثبیت می شوند و بدینوسیله حساسیت حسگر افزایش می یابد.



شکل۳. نانومواد گوناگون که به عنوان حامل‌های نانویی برای تقویت سیگنال در زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی بکار گرفته شده‌اند[۱۲].

جدول ۲- مثال‌هایی از نانومواد که به عنوان نانوحامل برای تقویت سیگنال زیست‌حسگر الکتروشیمیایی بکار بسته شده‌اند.

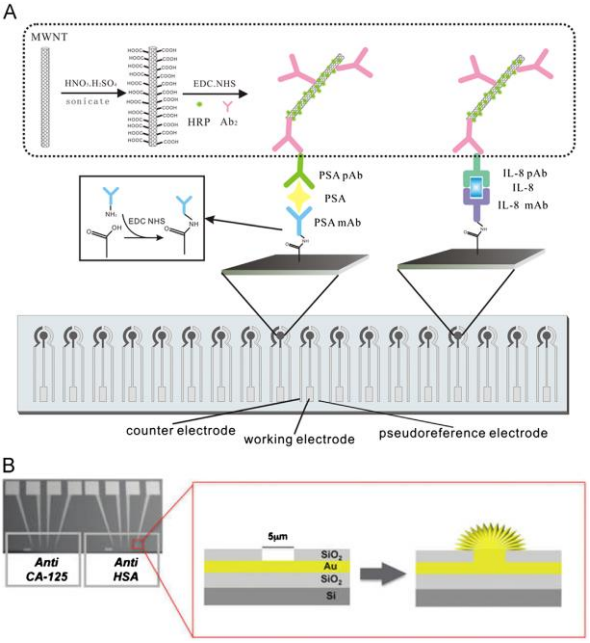
NM	Electrochemical label	Target	Sensitivity	References
ISNG	HRP	AFP	10 pg mL^{-1}	Tang et al. (2010a, 2010b)
CNT	HRP	PSA	4 pg mL^{-1}	Yu et al. (2006)
GS	HRP	PSA	1 pg mL^{-1}	Yang et al. (2010a, 2010b)
GO	HRP	phosphorylated p53	0.01 nM	Du et al. (2011a, 2011b)
Silica NP	Guanine residues	Phosphorylated p53	2.0 pM	Wang et al. (2006)
SiO_2	HRP	Human IgG	0.1 nM	Zhong et al. (2009)
NDA- Fe_3O_4	HRP	PSA	4 pg mL^{-1}	Li et al. (2011)
Lipsome	Ferrocene carboxylic acid	CEA	1 pg mL^{-1}	Viswanathan et al. (2009)
Lipsome	ALP	PSA	7 pg mL^{-1}	Qu et al. (2010)
AuNP/PSAN	ALP	TNF-α	10 pg mL^{-1}	Yin et al. (2011)
Au/SiO_2	HRP	Human IgG	35 pg mL^{-1}	Wang et al. (2010)
Au/GS	HRP	CEA	10 pg mL^{-1}	Zhong et al. (2010)
Au/Fe_3O_4	HRP	CEA	1 pg mL^{-1}	Li et al. (2010)
MSN-AuNP	HRP	Norethisterone	3.58 pg mL^{-1}	Wei et al. (2010a, 2010b)

ISNG: irregular-shaped gold nanoparticle; CNT: carbon nanotube; GS: graphene sheet; GO: graphene oxide; NDA-Fe_3O_4: nitrodopamine functionalized iron oxid nanoparticles; AuNP: gold nanoparticle; PSAN: poly (styrene-acrylic acid) nanospheres; MSN: mesoporous silica nanoparticles; HRP: horseradish peroxidase; ALP: alkalin phosphatase; AFP: α-fetoprotein; PSA: prostate specific antigen; CEA: carcinoembryonic antigen; TNF-α: tumor necrosis factor α.

۴- شناسایی چند بیومارکر به طور همزمان و ادغام سیستم حسگری

برای ساخت حسگرهای تشخیص در محل، باید چندین مانع را از پیش رو برداشت. اولین و مهمترین آن تشخیص چند بیومارکر به طور همزمان است. چراکه بیشتر بیماری‌ها بیشتر از یک مارکر دارند. چالش دیگر ادغام یا تجمیع سیستم حسگری است.

تشخیص همزمان تومور مارکرها می‌تواند دقت و تشخیص زودهنگام سرطان را فراهم آورد. در میان تکنیک‌های تشخیصی، زیست حسگرهای الکتروشیمیایی دارای مزایا ذاتی زیادی هستند چرا که الکترودهای آن می توانند به راحتی با سیستم‌های دیگر ادغام گردند. الکترودهای چند کاناله را می توان با کمک تکنولوژی اسکرین پرینتینگ با سرعت بالا و قیمت پایین تولید نمود [۴۴]. شکل ۴ زیست حسگر الکتروشیمیایی ۱۶ کاناله یک بار مصرفی مشاهده را نشان می‌دهد که برای تشخیص همزمان بیومارکر سرطانی مانند PSA و Interleukin 8 (IL-8) مورد استفاده قرار می گیرد[۴۵]. فضای آزاد بین الکترودها تشخیص همزمان چندین پروتئین را در یک آرایه و بدون تداخلات آمپرومتری با کانال بغلی را ممکن می‌سازد.

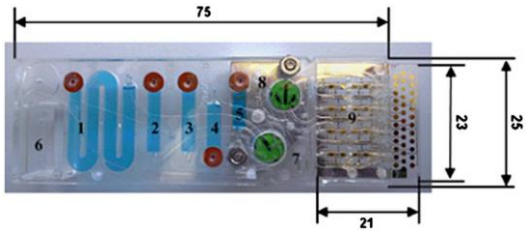


شکل ۴- A) آرایه‌های SPE برای شناسایی همزمان دو بیومارکر پروتئینی مختلف. B) چیپ میکرویی برای تشخیص چندگانه پروتئین‌ها (چپ) حفره ۵ میکرومتری برای ترسیب الکتروشیمیایی حسگرها (مرکز) و نسل حسگرهای بر پایه ترسیب الکتروشیمیایی طلا (راست) [۴۴].

در تحقیقی ساخت آرایه‌ای از ۸ الکترود حسگری متشکل از اریدیوم اکسید، یک الکترود اریدیومی به عنوان کانتر الکترود و Ag/AgCl به عنوان الکترود مرجع گزارش شده است [۴۶]. همچنین ساخت چیپ حسگری شامل ۱۲ عدد زیست‌حسگر که هر کدام ۸ سایت حسگری دارند تولید شد که در واقع مانند پلیت‌های ۹۶ خانه الایزا عمل می‌نمود نیز گزارش شده است [۴۷].

علاوه بر آرایه‌های SPE، تکنیک‌های ساخت میکرویی نیز در ساخت آرایه‌های الکتروشیمیایی بکار بسته شده اند. در مطالعه‌ای از میکروچیپ الکترونیکی برای دستیابی به زیست-حسگری برای تشخیص همزمان بیومارکرهای سرطان تخمدان استفاده گردید (شکل4B). این سیستم برپایه چیپ‌های میکروالکترونیکی است که سیگنال الکتروشیمیایی به سادگی بعد از انکوباسیون نمونه حاوی پروتئین بدون مراحل شستشوی طولانی که در سنجش‌های ساندویچی انجام می گردد، خوانده می شود[۴۸]. چالش پیشرو دیگر برای سیستم‌های تشخیص در محل، ادغام سیستم الکتروشیمی با سیستم تشخیصی است. تلاش‌های زیادی برای ادغام سیستم الکتروشیمی با تکنولوژی جریانی (Flow-through technology) به منظور ساخت سیستم‌های اتوماتیک، شده است. در تحقیقی زیست‌حسگر الکتروشیمیایی اتوماتیک و ادغام شده‌ای طراحی شده که به طور همزمان می تواند ۵ گونه آنتی‌ژن ویروس هپاتیت را شناسایی کند[۴۶]. یکی از معایب سیستم‌های ادغام شده حجیم بودن اینگونه سیستم-هاست. بنابراین ادغام سیستم الکتروشیمیایی با سیستم میکروفلوییدیک می تواند فرصتی نوین برای تشخیص دقیق، اتوماتیک و در حجمی کوچک را فراهم آورد. در مطالعه‌ای سیستم میکروفلوییدیکی بر پایه کامپوزیت PDMS-AuNP طراحی شد که در شناسایی بیومارکرها در حد اتم مول کارساز بود[۴۷]. در تحقیق دیگری سیستم میکروفلوییدیک ساخته شده از PDMS با غشای پروس آلومینا که آنتی‌بادی به خصوصی بروی آن تثبیت شده بود برای شناسایی پاتوژن‌های موجود در مواد غذایی مانند EscherichiacoliO157:H7 و Staphylococcusaureus به صورت الکتروشیمیایی استفاده شد[۴۸]. حساسیت این زیست حسگر در حدود ۱۰۲ CFU/ml و زمان حسگری در حدود ۱ تا ۲ ساعت بود.

زیست‌حسگری آمپرومتریکی به صورت یک میکروسیستم اتوماتیک طراحی شد که دارای مخازن واکنشگرها، میکرو دریچه‌های قابل کنترل و ناحیه تشخیص با الکترود آرایه‌ای بود (شکل ۵). این میکروسیستم توسط کامپیوتر قابل کنترل است و می‌تواند برای آنالیز نمونه‌ی سرم انسانی بکار گرفته شود. کارایی تشخیصی این دستگاه برای آنتی‌ژن سرطانی CA15-3 در حد عالی گزارش شده و کاملاً مطابق با نتایج الایزای تجاری است. این سیستم می تواند امیدی برای ساخت تست‌های تشخیص در محل با دقت بالا محسوب گردد.



شکل ۵- تصویر زیست حسگر ادغام شده در سیستم میکروفلوییدیک[۴۸].

۵- کاربرد زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی در سیستم‌های تشخیص در محل

سیستم‌های تشخیص در محل می‌توانند برای طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله سرطان، دیابت، بیماری‌های عفونی و قلبی بکار بسته شوند. در جدول ۳ چند مثال از بیومارکرهایی که در سیستم‌های تشخیص در محل بکاربسته شده‌اند و بصورت تجاری عرضه می‌گردند، ارائه شده است. از آنجائیکه بیشتر بیماری‌ها بیش از یک بیومارکر دارند، شناسایی همزمان آن‌ها می‌تواند دقت تشخیص را به شدت افزایش دهد.

جدول ۳- مثال‌هایی از بیومارکرهایی که به صورت تجاری در زیست‌حسگرهای تشخیص در محل تاکنون به کار گرفته شده اند

Type of disease	Biomarker
Cancer biomarker	AFP, CEA, PSA, PAP, p53, NSE, TNF-α
Pregnancy/ovulation	HCG, LH
Diabetes	HbA1c, urine albumin, creatinine
Cardiac diseases	CK-MB, troponins, BNP, Ddimers, cTnI/T, myoglobin
Infectious diseases	CRP, PCT
Viruses diseases	adenovirus, HIV, Hepatitis B, RSV, rotavirus, Influenza A and B

AFP: α-fetoprotein; CEA: carcinoembryonic antigen; PSA: prostate specific antigen; PAP: prostatic acid phosphatase; P53: tumor protein 53; NSE: Neuron specific enolase; TNF-α: tumor necrosis factor α; HCG: human chorionic gonadotropin; LH: luteinizing hormone; CK-MB: creatine kinase muscle and brain; BNP: B-type natriuretic peptide; CRP: C-reactive protein; PCT: procalcitonin; HIV: human immunodeficiency virus; RSV: respiratory syncytial virus.

۶- پتاسیل بازار زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی

همانطور که در قسمت اول این مقاله عنوان گردید، هدف نهایی توسعه زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی به صورت ادغام شده، دستیابی به سیستم‌های تشخیص در محل است. هم‌اکنون، چندین سیستم زیست حسگر الکتروشیمیایی برای تشخیص در محل در دسترس است که از جمله‌ی آن‌ها می توان به موارد ذیل اشاره نمود:

1) i-STAT (http://www.poct.co.uk/index. cfm)
interfaces Surface Immuno 2)Electro
Nanobiotechnology (ELISHA) system
(http://www.immunosensors.com/)

system 3)Ask-lepios
(http://genefluidics.com/products_asklepios.php#)

معمولاً زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی تجاری دارای دو قسمت می باشند: خوانش الکتروشیمیایی و بیوچیپ یکبار مصرف. آنالیت که در طیف وسیعی از مولکول‌های نمونه قرار گرفته است، توسط لایه شناساگر که بر روی سطح بیوچیپ تثبیت شده است، شناسایی می گردد. حتی بعضی از بیوچیپ های طراحی شده می توانند غلظت پروتئین‌های موجود در نمونه را به طور همزمان و به صورت کمی گزارش دهند. اینطور پیش‌بینی شده است که سیستم‌های تشخیص در محل در آینده به اندازه‌ی کامپیوترهای شخصی و یا موبایل رایج گردند و حتی در آیتم‌های کوچک شخصی ادغام خواهند شد تا به طور روزانه سلامتی افراد مورد بررسی قرار گیرد. بنابراین راه طولانی باید طی گردد و تحقیقات زیادی برای توسعه، ادغام، اتوماسیون و مینیاتوره کردن سیستم های تشخیص در محل باید انجام شود.

۷- نتیجه‌گیری

در این مقاله سعی شد تا توسعه‌ی زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی براساس ۴ نکته اساسی دنبال گردد: ۱) روش‌های تثبیت لایه شناساگر بروی الکترود ۲) روش‌های تقویت سیگنال الکتروشیمیایی ۳) تشخیص‌های چند بیومارکر به طور همزمان ۴) ادغام زیست حسگر الکتروشیمیایی با سیستم‌های با قابلیت بیشتر برای تبدیل شدن به سیستم‌های تشخیص در محل. به طورخلاصه محققان زیادی از خواص منحصربه فرد نانومواد در ساخت و تقویت سیگنال زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی برای بالا بردن حساسیت آن‌ها بهره جسته‌اند. اما هنوز جای زیادی برای پیشرفت وجود دارد. چراکه فرآیندهای پیچیده برای ساخت نانومواد کاربرد آن‌ها را محدود ساخته است. از سوی دیگر مطالعات خوبی در زمینه‌ی تشخیص همزمان چند آنالیت و ادغام سیستم‌های تشخیص در محل با سیستم‌های الکتروشیمیایی انجام شده است و به مثال‌هایی از نمونه‌های موفق تجاری شده در این زمینه اشاره گردید.

۸- منابع

[1] Centi, S., Laschi,S.,Mascini,M., Strategies1(7),1271–1291, 2009.

[2] Dai, Z.,Yan,F.,Chen,J.,Ju,H., Analytical Chemistry 75(20), 5429–5434, 2003.

[3]Wan,Y.,Deng,W.,Su,Y.,Zhu,X.,Peng,C.,Hu,H.,Peng,H.,Song,S., Fan,C., Biosensors and Bioelectronics 30(1), 93–99, 2011.

[4] Jiang, D.,Tang,J.,Liu,B.,Yang,P.,Shen,X.,Kong,J., Biosensors and Bioelectronics 18(9),1183–1191, 2003.

[5] Wilson, M.S., Analytical Chemistry 77(5),1496–1502, 2005.

[6] Corgier, B.P., Marquette, C.A., Blum, L. J., Journal of the American Chemical Society 127(51),18328–18332, 2005.

[7] Wei, M.Y.,Wen,S.D.,Yang,X.Q.,Guo,L.H., Biosensors and Bioelectronics 24 (9), 2909–2914, 2009.

[8] Ahmad, A., Moore, E., Analyst 137, 5839–5844, 2012.

[9] Darain, F.,Park,D.S.,Park,J.S.,Chang,S.C.,Shim,Y.B., Biosensorsand Bioelectronics20(9),1780–1787, 2005.

[10] Salam, F., Tothill, I.E., Biosensors and Bioelectronics24(8),2630–2636, 2009.

[11]Rosales-Rivera,L.,Acero-Sánchez,J.,Lozano-Sánchez,P.,Katakis,I.,O'Sullivan,C., Biosensors and Bioelectronics26(11),4471–4476, 2011.

[12] Wan,W, Su,Y., Zhu,X. Liu, G., Fan,F., Biosensors andBioelectronics,47()1–11, 2013

[13] Bonroy,K., Frederix,F., Reekmans,G., Dewolf,E., DePalma,R., Borghs,G., Declerck,P., Goddeeris, B.,

[27] Ahirwal,G.K., Mitra,C.K., Biosensors and Bioelectronics25(9), 2016–2020, 2010.

[28] Malhotra,R., Patel,V., Vaqué, J.P., Gutkind,J.S., Rusling,J.F., Analytical Chemistry 82(8),3118–3123, 2010.

[29] Liu,G., Chen,H., Peng,H., Song,S., Gao,J., Lu,J., Ding,M., Li,L., Ren,S., Zou,Z., Biosensors and Bioelectronics28 (1),308–313, 2011.

[30] Du,D., Wang,J., Lu,D., Dohnalkova,A., Lin,Y., AnalyticalChemistry83(17), 6580–6585, 2011.

[31] Wan,Y., Lin,Z., Zhang,D., Wang,Y., Hou,B., Biosensors and Bioelectronics26 (5), 1959–1964, 2011.

[32] Haque,A.M.J., Park,H., Sung,D., Jon,S., Choi,S.Y., Kim,K., Analytical Chemistry 84(4),1871–1878, 2012.

[33] Liu,G., Chen,H., Peng,H., Song,S., Gao,J., Lu,J., Ding,M.,Li,L., Ren,S., Zou,Z., Biosensors and Bioelectronics 28(1), 308–313, 2011.

[34] Huang, K.J. ,Niu,D.J., Xie,W.Z., Wang,W., Analytica Chimica Acta 659(1-2), 102–108, 2010.

[35] Ho, J.A., Chang,H.C., Shih,N.Y., Wu,L.C., Chang,Y.F., Chen,C.C., Chou,C.,. Analytical Chemistry 82(14), 5944–5950, 2010.

[36] Tang,J., Tang,D., Su,B., Huang,J., Qiu,B., Chen,G., Biosensors and Bioelectronics 26(7),3219–3226, 2011.

[37] Yu,X., Munge,B., Patel,V., Jensen,G., Bhirde,A., Gong,J.D., Kim,S.N., Gillespie,J., Gutkind,J.S., Papadimitrakopoulos,F., Journal of the American Chemical Society 128(34),11199–11205, 2006.

[38] Du,D., Wang,L., Shao,Y., Wang,J., Engelhard, M.H., Lin,Y., Analytical Chemistry 83(3),746–752, 2011.

[39] Wang,J., Liu,G., Engelhard, M.H., Lin,Y., Analytical Chemistry 78(19), 6974–6979, 2006.

[40] Zhong,Z.,Li,M., Xiang,D., Dai,N., Qing,Y., Wang,D., Tang,D., Biosensors and Bioelectronics24(7),2246–2249, 2009.

[41] Renedo,O.D., Alonso-Lomillo, M., Martinez,M., Talanta 73(2),202–219, 2007.

Journal of Immunological Methods312(1),167–181, 2006.

[14] Vikholm-Lundin,I.,Albers,W.M., Biosensors and Bioelectronics21(7),1141–1148, 2006.

[15] Ho, J.A., Hsu,W.L., Liao,W.C., Chiu,J.K., Chen,M.L., Chang,H.C., Li,C.C., Biosensors and Bioelectronics26(3),1021–1027, 2010.

[16] Di Gao, McBean, Schultz,N., Yan,J.S., Mulchandani,Y., Chen,W.,A., Journal of the American Chemical Society128(3),676–677, 2006.

[17] Vallina-García, R.,delMarGarcía-Suárez, M.,Fernández-Abedul, M.T.,Méndez, F.J., Costa-García, A., Biosensors and Bioelectronics23(2),210–217, 2007.

[18] Jung, Y., Lee,J.M., Jung,H., Chung,B.H.,Analytical Chemistry79(17), 6534–6541, 2007.

[19] Pei, H., Wan,Y., Li,J., Hu,H., Su,Y., Huang,Q., Fan,C., Chemical Communications 47(22),6254–6256, 2011.

[20] He,S., Song,B., Li,D., Zhu,C., Qi,W., Wen,Y., Wang,L., Song,S., Fang,H., Fan,C., Advanced Functional Materials 20(3),453–459, 2010.

[21] Pingarrón,J.M., Yáñez-Sedeño,P., González-Cortés,A., Electrochimica Acta 53 (19),5848–5866, 2008.

[22] Li,J., Gao,H., Chen,Z., Wei,X., Yang,C.F., Analytica Chimica Acta665(1),98–104, 2010.

[23] Li,J., Song,S., Liu,X., Wang,L., Pan,D., Huang,Q., Zhao,Y., Fan,C., Advanced Materials20(3),497–500, 2008.

[24] Chullasat, K., Kanatharana,P., Limbut,W., Numnuam,A., Thavarungkul,P., Biosensors and Bioelectronics26(11),4571–4578, 2011.

[25] Munge,B.S., Fisher,J., Millord,L.N., Krause,C.E., Dowd,R.S., Rusling,J.F., Analyst 135(6),1345–1350, 2010.

[26] Mani,V., Chikkaveeraiah,B.V., Patel,V., Gutkind,J.S., Rusling,J.F., ACSNano3 (3), 585–594, 2009.

[42] Wan,Y., Deng,W., Su,Y., Zhu,X., Peng,C., Hu,H., Peng,H., Song,S., Fan,C., Biosensors and Bioelectronics 30(1), 93–99, 2011.

[43] Wilson, M.S., Nie,W., Analytical Chemistry78(8), 2507–2513, 2006.

[44] Wilson, M.S., Nie,W., Analytical Chemistry78(18),6476–6483, 2006.

[45] Das, J., Kelley,S.O., Analytical Chemistry 83(4), 1167–1172, 2011.

[46] Tang,D., Tang,J., Su,B., Ren,J., Chen,G., Biosensors and Bioelectronics25(7), 1658–1662, 2010.

[47] Zhou,F., Lu,M., Wang,W., Bian,Z.P., Zhang,J.R., Zhu,J.J., Clinical Chemistry56 (11), 1701–1707, 2010.

[48] Tan,F., Leung,P.H.M., Liu,Z., Zhang,Y., Xiao,L., Ye,W., Zhang, X., Yi,L., Yang,M., Sensors and ActuatorsB: Chemical 159(1), 328–335, 2011.