

پوشش‌دهی نانوذرات نقره به روش اسپاترینگ (کندوپاش) بر روی بسترهای شیشه‌ای به عنوان حسگر زیستی رامان بهبودیافته سطحی (SERS) در جهت شناسایی پروتئین وی (Whey protein)

چکیده

مقدمه: پروتئین وی نیز یکی از پرمصرف‌ترین مواد پروتئینی کلونیدی در صنایع غذایی، دارویی و پزشکی است و یک مکمل غذایی محبوب برای بهبود قدرت عضلانی بدن و جهت پیشگیری از انواع بیماری‌های قلبی، دیابت و پوکی استخوان مصرف می‌شود. پراکندگی رامان بهبودیافته سطحی (SERS) یکی از ابزارهای تحلیلی بسیار حساس شناخته شده در حال حاضر است؛ در برخی موارد، می‌توان طیف SERS با کیفیت بالا که حتی یک تک مولکول در آن سهم است را ثبت کرد. که در این مقاله، برای شناسایی پروتئین وی از بسترهای پلاسمونیک نقره که سیگنال رامان را افزایش داده‌اند؛ استفاده شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، به هدف ساخت حسگر زیستی SERS، نانوذرات نقره به روش اسپاترینگ (کندوپاش) بر روی شیشه لایه‌نشانی شدند و با استفاده از طیف‌سنجی رامان که تکنیکی غیرمخرب است، آشکارسازی پروتئین وی انجام شد.

یافته‌ها: مشاهده ساختار FCC در مشخصه‌یابی XRD آن، تشکیل نانوذرات نقره را تایید کرد. قله پلاسمونی طیف خاموشی بسترهای پلاسمونیک نقره حدود ۴۳۹ نانومتر مشاهده شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FE-SEM) بسترهای پلاسمونیک نقره نشان می‌دهد که تعداد زیادی از ذرات نقره اندازه بین ۲۰ تا ۴۰ نانومتر دارند. زبری بسترهای پلاسمونیک که حاصل از یکنواخت نبودن پوشش نقره است منجر به پراکندگی نور از نقاط مشاهده شده در تصویر میکروسکوپ الکترونی می‌شود. زبری که برای بسترهای پلاسمونیک در تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) مشاهده می‌شود به پراکندگی نور از نقاط زبر کمک می‌کند. با حکاکی مولکول پروتئین وی روی بسترهای پلاسمونیک، ارتعاشات مولکولی آن شناسایی شدند. در ادامه نمودار کالیبراسیون غلظت‌های مختلف پروتئین وی، اندازه‌گیری شد.

نتیجه‌گیری: طیف‌سنجی رامان روشی مهم جهت شناسایی مولکول‌ها است که کاربرد زیادی در تعیین ویژگی‌های شیمیایی و ساختاری مواد مختلف دارد. بسیاری از مواد دارای طیف رامان ویژه‌ای می‌باشند به‌طوری‌که این پدیده دستگاه رامان را به ابزار کارآمدی برای مطالعه ویژگی‌های ساختاری و شیمیایی مولکول‌ها تبدیل نموده است. با استفاده از این بسترهای پلاسمونیک نقره و پدیده SERS شناسایی، آشکارسازی سریع و راحت پروتئین وی تا غلظت ۷-۱۰ مولار قابل انجام است. در ضمن، با کالیبراسیون، استفاده از بسترهای پلاسمونیک نقره، و طیف‌سنجی رامان، می‌وان غلظت پروتئین وی، را به‌دست آورد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین وی، روش اسپاترینگ (کندوپاش)، بسترهای پلاسمونیک نقره، حسگر زیستی طیف‌سنجی رامان بهبودیافته سطحی (SERS).

راضیه مرعشی پور^۱
عباس شیرمردی^{۲*}

۱- فارغ‌التحصیل، کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه کاشان ۸۷۳۱۷۵۳۱۵۳ کاشان، ایران
۲- استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد مسجدسلیمان، ۶۱۴۳۲۶۰۰۹۳، مسجد سلیمان، ایران

نویسنده مسئول: عباس شیرمردی
پست الکترونیکی:

ashirmardi.abbas@gmail.com

شماره تماس: ۰۶۱۴۳۲۶۰۰۹۳

مقدمه

پروتئین وی (Whey protein)، بخشی از پروتئین شیر محسوب می‌شود. این پروتئین شامل غلظت زیادی از اسیدآمین‌های ضروری به‌ویژه لوسین است [۱]. این پروتئین باعث افزایش سیستم ایمنی بدن می‌شود [۲، ۳]. گفته شده است پروتئین وی می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، ضدفشارخون، ضدتومور، کاهش‌دهنده چربی خون، ضدویروس و ضدباکتری عمل کند [۴، ۵]. پروتئین وی یک منبع غنی از کلسیم و دیگر مواد معدنی است [۶]. محصولات گوناگون پروتئین وی از نظر مقدار پروتئین، کربوهیدرات، ایمونوگلوبولین، لاکتوز، مواد معدنی و چربی تفاوت دارند. این متغیرها در انتخاب محصولات مختلف پروتئین وی برای کاربردهای تغذیه‌ای ویژه مهم هستند [۳]. پروتئین وی، منبع پروتئینی با کیفیت بالا و مکمل رایج در جامعه ورزشی است [۷]. پروتئین وی و مکمل‌های اسیدآمین به دلیل کیفیت ساخت پروتئین و اسیدآمین در محصولات یکی از پرمصرف‌ترین مواد پروتئینی کلونیدی در صنایع غذایی، دارویی و پزشکی است و یک مکمل غذایی محبوب برای بهبود قدرت عضلانی بدن و جهت پیشگیری از انواع بیماری‌های قلبی، دیابت و پوکی استخوان مصرف می‌شود و نیز موقعیت خوبی در بازار تغذیه ورزش دارد. در حال حاضر، برای تعیین مقدار پروتئین وی روش‌های متعددی مانند کروماتوگرافی گازی^۱ و اسپکترومتری جرم^۲ [۸، ۹]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [HPLC^۳] [۱۰] و طیف‌سنجی تبدیل فوری رامان (FT-Raman^۴) [۱۱، ۱۲، ۱۳] به کار برده می‌شود. این روش‌ها، روش‌هایی مخرب، دشوار، آلاینده، درون آزمایشگاهی، و نیازمند آماده‌سازی نمونه، نیروی متخصص آموزش‌دیده، آزمایشگاه‌های مجهز و صرف وقت و هزینه بسیار هستند. از این‌رو، توسعه یک روش غیرمخرب، با کاربری ساده، سریع، کم‌هزینه، ناآلاینده، با قابلیت حمل و کاربرد خارج از محیط آزمایشگاه و نیاز به آماده‌سازی کمتر نمونه بسیار ضروری است. از

طرفی شناسایی و تشخیص مقادیر بسیار اندک از پروتئین وی نیز مورد توجه است. با استفاده از طیف‌سنجی زیرقرمز و طیف‌سنجی رامان که هر دو طیف‌سنجی اثرانگشتی محسوب می‌شوند و ارتعاش‌های مولکولی ماده را بررسی می‌کنند؛ می‌توان مواد و آنالیت‌های بیولوژیکی را شناسایی کرد [۱۴، ۱۵]. در طیف‌سنجی زیر قرمز به دلیل فعال‌بودن ارتعاش‌های مولکولی آب، شناسایی گونه‌های زیستی دشوار است و حساسیت آشکارسازهای آن نیز پایین است. در طیف‌سنجی رامان نیز به دلیل ضعیف بودن ذاتی سیگنال حاصل از پراکندگی رامان، مطالعه مولکول‌ها با غلظت‌های اندک، عملاً امکان‌پذیر نیست [۱۶]. یکی از روش‌هایی که می‌توان سیگنال رامان را بهبود داد استفاده از نانوساختارهای فلزی است که به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی می‌توانند میدان الکتریکی قوی را در نزدیک نانوساختارها ایجاد کنند یا با افزایش میزان پراکندگی نور از این نانوساختارها، سیگنال پراکندگی را به‌طور موثر بهبود می‌دهند که به دنبال آن ارتعاش‌های مولکولی با سیگنال بهتر و بیشتری مشاهده خواهند شد. این روش طیف‌سنجی رامان بهبودیافته سطحی (SERS) نام دارد که یک روش حساس و انتخابی است که نتیجه آن بهبود پراکندگی رامان مولکول‌هایی است که بر روی ساختارهای فلزی جذب سطحی شده‌اند [۱۷]. در حسگر تشدید پلاسمون سطحی (SPR^۵)، پلاریتون‌های پلاسمون سطحی، در سطح مشترک یک فیلم نازک فلزی مانند طلا، نقره و یک دی‌الکتریک، برانگیخته می‌شوند. ازجمله عواملی که بر نوسان پلاسمون سطحی نانوذرات طلا یا نانوذرات نقره اثرگذار ضریب شکست محیطی است که نانوذره در آن قرار دارد. تغییر ضریب شکست نانوذره، ثابت انتشار پلاسمون‌های سطحی را تغییر داده و باعث تغییراتی در جفت‌شدگی بین نور و پلاسمون سطحی می‌شود، که به صورت مشخصه‌های نوری در خروجی قابل مشاهده است [۱۸ و ۱۹]. از این خاصیت برای ساخت بسیاری از حسگرها در پزشکی و صنعت استفاده می‌شود. اولین حسگر SPR با حساسیت بسیار بالا در سال ۱۹۹۹ توسط هومولا و همکارانش [۲۰] بدون

¹ Gas Chromatography² Mass Spectroscopy³ High-performance Liquid Chromatography (HPLC)⁴ Fourier transform Raman methods (FT-Raman)⁵ Surface Plasmon Resonance (SPR)

پلاسمونیک نقره برای تشخیص و تعیین غیرمخرب پروتئین وی در غلظت‌های مختلف استفاده شود.

مواد و روش‌ها

۱. روش‌های ساخت و شناسایی

برای ساخت این بستر پلاسمونیک نقره، لایه‌های نازکی از نقره بر روی سطوح لام شیشه‌ای (با ضریب شکست $1/5$) به روش اسپاترینگ (کندوپاش) لایه‌نشانی شدند. ابتدا، قطعات شیشه‌ای با ابعاد $2\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ پس از شستشو با شوینده و آب، با استون شستشو داده شدند که هم‌زمان از امواج فراصوت نیز استفاده شد. پس از خشک شدن این قطعات شیشه‌ای، در دمای 400°C به مدت ۳۰ دقیقه در کوره حرارت‌دهی داده شدند تا آلودگی‌های آلی نیز از سطح شیشه حذف شوند. سپس زیرلایه شیشه‌ای در دستگاه DC magnetron sputtering تخت در زمان تعیین شده 60 ثانیه روی دستگاه لایه‌نشانی شدند. دستگاه اسپاترینگ به وسیله دو پمپ روتاری و توربو به خلاء لازم رسید. در این آزمایش تارگت نقره و گاز حامل آرگون است. تمام نمونه‌ها در فشار اولیه از مرتبه 10^{-5} و فشار کاری (با ورود گاز آرگون) $0/05$ تور لایه‌نشانی شد. مدت زمان فرآیند لایه‌نشانی برای این پژوهش 60 ثانیه در نظر گرفته شد [۳۱]. پس از آماده شدن زیرلایه‌های پوشش داده شده با نانوذرات نقره به روش اسپاترینگ بسترهای پلاسمونیک نقره به عنوان حسگر زیستی تهیه شد و سپس به عنوان بستر پلاسمونیک برای تشخیص و تعیین غیرمخرب پروتئین وی در غلظت‌های مختلف استفاده شدند. برای آشکارسازی مولکول پروتئین وی، ابتدا غلظت $0/1\text{ M}$ از آن با حلال آب بدون یون (DI) ساخته شد و غلظت‌های 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} ، 10^{-6} و 10^{-7} مولار آنها تهیه شد. در ادامه، 10 میکرولیتر از هرکدام از غلظت‌های تهیه شده به صورت جداگانه و به روش قطره افشان بر روی بستر پلاسمونیک نقره به طور معجزا قرار گرفت و پس از خشک شدن، طیف رامان پروتئین وی قرار داده شده روی شیشه و طیف SERS پروتئین وی قرار داده شده روی بستر پلاسمونیک نقره اندازه‌گیری شد.

استفاده از برجسب مولکولی ایجاد شد. بعد از آن حسگرهای زیستی SPR کاربرد گسترده‌ای در تجزیه و تحلیل برهم‌کنش‌های بیومولکولی و آشکارسازی آنالیت‌های شیمیایی و بیولوژیکی پیدا کردند [۲۱-۲۳]. با پیشرفت صنعت، علاقه‌مندی ساخت حسگرها به سمت حسگرهایی متمایل شد که قادر بودند پاسخ‌های حسگری مشخص (ناشی از مولکول‌های آنالیت هدفمند شده) را از پاسخ‌های نامشخص، ناشی از نوسانات دما، ترکیب آنالیت‌ها و جذب مولکول‌های غیرهدفمند توسط سطح حسگر تشخیص دهند [۲۴-۲۵]. در سال‌های بعد ایجاد حسگرهای چندکاناله برای اندازه‌گیری هم‌زمان آنالیت‌های متفاوت، تحت بررسی قرار گرفت. از جمله این حسگرها، منشور جفت شده با ساختار SPR بود [۲۶]. SERS، بالغ بر پیشرفت سریع در چهار دهه گذشته و به عنوان کاربردهایی جهت تشخیص در زمینه‌های شیمی، علوم مواد، بیوشیمی و علوم زیستی به سرعت در حال گسترش هستند. پیشرفت در ساخت حسگرهای زیستی مبتنی بر SERS، تحول عظیمی در تشخیص آنالیت‌های بیولوژیکی و مواد شیمیایی محسوب می‌شود [۲۷]. در واقع با تابش نور (لیزر) به سطح ناصاف فلزی، در اثر تشدید پلاسمون‌های سطحی نانو ساختارهای فلزی به وسیله میدان الکترومغناطیسی لیزر، میدان‌های الکتریکی بهبود یافته در اطراف فلز ایجاد می‌شود [۲۸-۲۹]، گویی میدان الکتریکی حاصل از تابش نور لیزر تقویت شده است. بنابراین، مولکولی که در این میدان الکتریکی بهبود یافته قرار می‌گیرد؛ بیشتر قطبیده می‌شود و در نتیجه سیگنال رامان آن بهبود می‌یابد [۳۰]. در این روش، هنگامی که آنالیت‌های مورد مطالعه در نزدیک سطح فلز قرار می‌گیرند یا به طور فیزیکی جذب نانوذرات فلزی می‌شوند، به علت برهم‌کنش آنالیت‌ها و پلاسمون‌های سطحی فلز، شدت سیگنال رامان افزایش می‌یابد و بدین ترتیب SERS می‌تواند برای تشخیص سریع و دقیق آنالیت‌های میکروبیولوژیکی استفاده شود. در این مطالعه به هدف طراحی و ساخت حسگر ساده با سرعت تشخیص بالا، حساسیت، گزینش پذیری، تکرار پذیری و عدم نیاز به تجهیزات پیچیده، نانوذرات نقره با استفاده از روش اسپاترینگ (کندوپاش) بر روی زیرلایه شیشه‌ای قرار گرفتند تا بستر

۲-۱. مشخصه‌یابی

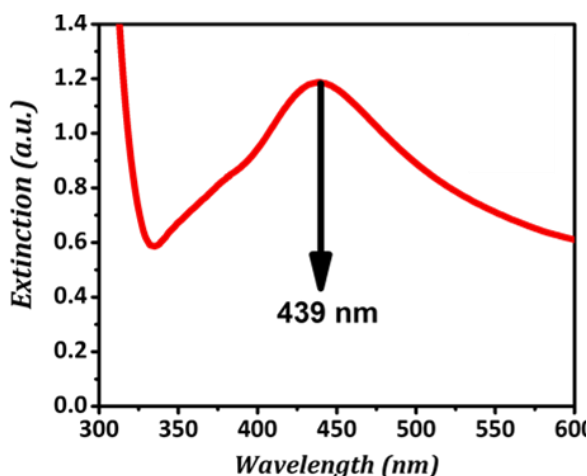
دستگاه طیف‌سنجی UV-Vis و الگوی پراش پرتو X، بستر پلاسمونیک نقره به‌ترتیب به‌وسیله دستگاه Perkin-Elmer مدل Lambda25 و دستگاه X Pert-Pro ساخت شرکت Panalytical کشور هلند، با پرتو تک‌فام Cu K α با طول موج ۰/۱۵۴ نانومتر، جریان ۴۰ میلی‌آمپر و با ولتاژ ۴۰ کیلوولت در دمای اتاق انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FE-SEM) به‌وسیله دستگاه Hitachi مدل S4160 و تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) نمونه‌ها نیز با استفاده از دستگاه شرکت نانو سیستم پارس ساخت ایران بررسی شد. دستگاه طیف‌سنجی رامان Takram مدل P50C0R10 ساخت شرکت تکسان با تابش نور لیزر Nd: YAG، با طول موج ۵۳۲ نانومتر و توان خروجی قابل تنظیم ۷۵ میلی‌وات برای اندازه‌گیری طیف رامان و طیف SERS نمونه‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

۱. طیف خاموشی بستر پلاسمونیک نقره

شکل-۱، طیف خاموشی بستر پلاسمونیک نقره نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بستر شیشه‌ای حسگر پلاسمونیک زیستی SERS را نشان می‌دهد. ظاهر شدن قله تشدید پلاسمونی در ۴۳۹ نانومتر، تشکیل نانوذرات نقره روی بستر شیشه‌ای را تأیید می‌کند [۳۲]. با تغییر محیط در بردارنده این ذرات که از آب به شیشه و هوا تغییر می‌کند؛ جابه‌جایی در طول موج قله پلاسمونی رخ می‌دهد و ارتفاع آن کاهش و پهنای قله‌ها نیز افزایش می‌یابد به این دلیل که موقعیت قله پلاسمونی به ضریب شکست محیط دربردارنده آنها وابسته است [۳۳]. با توجه به شکل-۱، بر خلاف محلول کلونیدی پایدار که نانوذرات نقره در داخل محلول آبی پراکنده هستند و به فاصله‌های مشخصی از یکدیگر قرار دارند؛ با قرار گرفتن نانوذرات نقره روی بستر شیشه‌ای، حین خشک‌شدن، ذرات در مجاورت یکدیگر قرار می‌گیرند و کلوخه‌هایی متشکل از چندین نانوذره روی بستر شکل می‌گیرد به‌گونه‌ای که می‌توان این کلوخه‌ها را ذرات بزرگتری در نظر

گرفت که منجر به افزایش پهنای طیف می‌شود [۳۳]، کاهش شدت قله نیز ناشی از پراکندگی نور از ذرات کلوخه شده است [۳۳]. این که زمینه طیف خاموشی (طیف جذب + طیف پراکندگی) بستر فعال در SERS، در مقایسه با طیف جذب در مقادیر بالاتری رخ داده است ناشی از بازتاب و پراکندگی نور از سطح شیشه است.

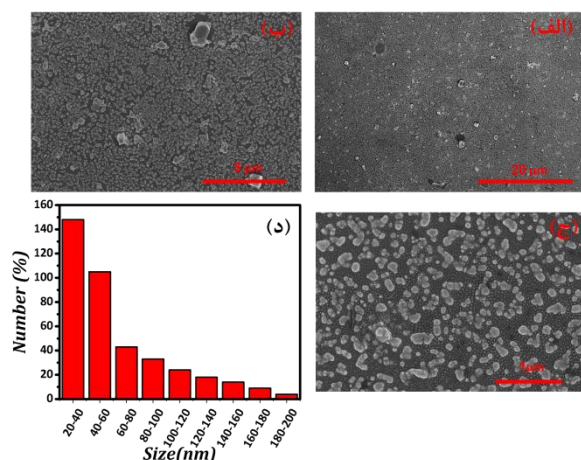


شکل ۱: طیف خاموشی بستر پلاسمونیک نقره با بیشینه جذب در طول موج ۴۳۹ نانومتر.

۲. طیف الگوی XRD، بستر پلاسمونیک نقره

شکل-۲ الگوی پراش اشعه ایکس بستر پلاسمونیک نقره است که با مشاهده بزرگترین و اصلی‌ترین قله‌ها در زاویه 2θ برابر با ۳۸/۲۱، ۴۴/۵۰، ۶۴/۶۴ و ۷۷/۵۳ درجه که به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) است؛ ساختار FCC نقره را تأیید می‌کند. (قله ظاهر شده در زاویه 2θ برابر با ۳۴/۰۴ درجه نقره اکسید است که به دلیل شرایط محیطی آزمایشگاه ظاهر شده است).

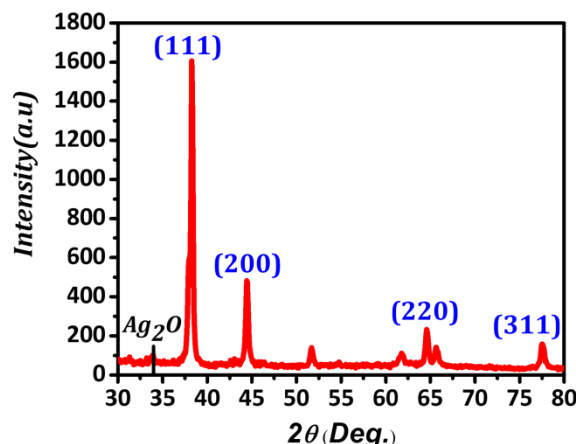
بزرگتر، میدان‌های الکتریکی نزدیک ناچیزی دارند و نور تابیده‌شده به آنها، از سطح آنها پراکنده می‌شود یا میدان الکتریکی دور را تقویت می‌کنند [۳۴]. بنابراین، با افزایش زمان لایه‌نشانی، به دلیل تشکیل ذرات بزرگتر اثر پراکندگی از سطح ذرات درشت‌تر در مقایسه با اثر میدان نزدیک، بیشتر است. شکل ۳- (د)، توزیع اندازه نانوذرات نقره برای شکل ۳- (ج) با استفاده از نرم‌افزار Digimizer (نسخه ۴/۲) اندازه‌گیری شده است، را نشان می‌دهد که اندازه‌های بین ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر دارند و تعداد ذرات با اندازه ۲۰ و ۴۰ نانومتر بیشتر از سایر اندازه‌های نانوذرات است.



شکل ۳: تصاویر FE-SEM، (الف)، (ب) و (ج) به ترتیب مربوط به بسترهای پلاسمونیک نقره لایه‌نشانی‌شده به روش اسپاترینگ در اسکیل بار ۲۰ میکرومتر، اسکیل بار ۵ میکرومتر و اسکیل بار ۱ میکرومتر و توزیع اندازه نانوذرات نقره برای شکل (د)، با استفاده از نرم‌افزار Digimizer (نسخه ۴/۲) اندازه‌گیری شده است، را نشان می‌دهد.

۴. تصاویر AFM، نانوذرات نقره پوشش داده‌شده بر روی شیشه به‌عنوان نانوحسگرهای پلاسمونیک فعال SERS

از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)، برای تشخیص رافنس (زبری) سطح استفاده شد. از جمله مزیت‌های استفاده از AFM در تعیین ویژگی‌های نانوساختارهای جامد، عدم نیاز به فرایندهای آماده‌سازی نمونه و همچنین عدم نیاز به خلاء در زمان تصویربرداری است. از سوی دیگر میکروسکوپ نیروی اتمی که بررسی سه‌بعدی نانوساختارها را ممکن ساخته، می‌تواند مکمل مناسبی برای میکروسکوپ الکترونی باشد [۳۵]. تصاویر از قسمت‌های مختلف



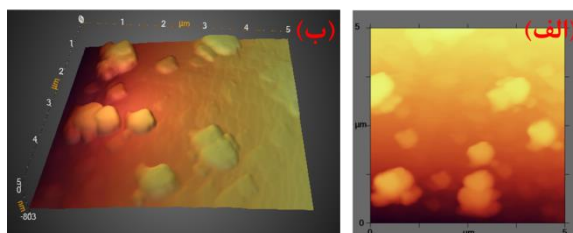
شکل ۲: الگوی پراش اشعه ایکس بستر پلاسمونیک نقره.

۳. تصاویر FE-SEM نانوذرات نقره پوشش داده‌شده بر روی بستر شیشه‌ای و توزیع اندازه نانوحسگرهای زیستی SERS

تصاویر FE-SEM، شکل ۳- (الف)، شکل ۳- (ب) و شکل ۳- (ج) به ترتیب مربوط به بسترهای پلاسمونیک نقره لایه‌نشانی‌شده به روش اسپاترینگ در اسکیل بار ۲۰ میکرومتر، اسکیل بار ۵ میکرومتر و اسکیل بار ۱ میکرومتر، نشان می‌دهد. در نمونه شکل ۳- (الف)، شکل ۳- (ب) و شکل ۳- (ج) سطح بستر شیشه با نانوذرات و ذرات بزرگتر پوشیده شده است. ذرات ریزتر به رنگ تیره‌تر، در پس‌زمینه تصاویر مشاهده می‌شوند که اندازه تقریبی ۲۰۰ نانومتر دارند. پوشش حاوی نانوذرات نقره تقریباً به طور همگن و یکنواخت سطح شیشه را پوشانده‌اند. ذرات درشت‌تر به رنگ روشن‌تر و سفیدتر دیده می‌شوند. در ضمن، در محلول کلونیدی نقره، یون‌های نقره که در طی فرایند ساخت کلونید هنوز کاهیده نشده‌اند؛ نیز می‌توانند با اعمال روش اسپاترینگ بر روی زیرلایه شیشه‌ای قرار گیرند و منجر به شکل‌گیری ذرات درشت‌تر شوند و یا خود منشأ جوانه‌زنی و تشکیل نانوذرات جدید باشند. نانوذرات کوچک‌تر نقره، میدان‌های الکتریکی نزدیک قابل‌توجهی در اطراف خود ایجاد می‌کنند که حاصل تشدید پلاسمون‌های سطحی نقره است و چنانچه گونه‌های زیستی در این موقعیت‌ها قرار بگیرند؛ در معرض تابش میدان‌های الکتریکی نزدیک قرار می‌گیرند. ذرات

وی با غلظت 10^{-2} مولار بر روی بستر پلاسمونیک، ارتعاشات مولکولی پروتئین وی (شکل ۵) ظاهر می‌شوند. ارتعاشات مولکولی مولکول پروتئین وی [۳۷] به صورت خط‌چین‌هایی بر روی طیف‌های مولکول پروتئین وی در شکل ۵- نمایش داده شده است. در مورد مولکول پروتئین وی قرار داده شده روی بستر پلاسمونیک نقره، ارتعاشات کششی S-S، ارتعاشات Tryptophan، ارتعاشات Amid II و کششی CH_2 و خمشی CH_3 ، ارتعاشات پروتئین و $CO-NH_2$ ، ارتعاشات خمشی $RCOOH$ ، ارتعاشات خمشی CH_2 ، ارتعاشات کششی CH_2 ، ارتعاشات کششی O-H و ارتعاشات کششی N-H-N، به ترتیب در ۶۶۰، ۷۳۰، ۱۴۱۴، ۱۵۴۶، ۲۰۶۵، ۲۲۳۳، ۲۶۶۹، ۳۰۰۲، ۳۴۸۱ و 3623 cm^{-1} ظاهر می‌شوند. بهبود سیگنال رامان در اثر استفاده از بسترهای پلاسمونیک، به دلیل پراکندگی نور از نقاط زیر روی سطح شیشه است. نقاط زیری که با نقره‌اندود کردن شیشه ایجاد شده است. ذرات بزرگتر نقره که در شکل ۳- (ج) مشاهده می‌شوند؛ با پراکنده کردن نور لیزر فرودی و رسیدن نور پراکنده شده به مولکول پروتئین وی، سیگنال رامان آنها را بهبود می‌دهند. در کنار پراکندگی نور از ذرات بزرگتر نقره یکی دیگر از دلایل بهبود سیگنال رامان، تشدید پلاسمون‌های سطحی ذرات کوچکتر نقره یا همان میدان‌های الکتریکی قوی اطراف این نانوذرات است. نانوذرات نقره مشاهده شده در شکل ۳- (ج) به مانند لنز اپتیکی عمل می‌کنند و نور لیزر فرودی را در اطراف خود متمرکز می‌کنند. بنابراین شدت میدان الکتریکی در نزدیکی نانوذرات افزایش می‌یابد و با قرارگیری مولکول پروتئین وی، در اطراف نانوذرات، شدت میدان الکتریکی قوی را تجربه می‌کنند و قطبیده‌تر می‌شوند و در نتیجه ارتعاش‌های مولکولی آنها تقویت می‌شود و سیگنال‌های پرشدت‌تری را نشان می‌دهند [۳۸-۳۹].

یک نمونه در نظر گرفته شد و اندازه ضخامت صفحات به صورت میانگین در نظر گرفته شده است. نمودار سه بعدی مورفولوژی هر زیرلایه نانوحسگرهای پلاسمونیک فعال SERS نیز برای به دست آوردن زبری سطح مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۳۶]. شکل ۴- (الف) و (ب)، به ترتیب تصویر AFM دوبعدی و سه بعدی را نشان می‌دهد. با کشیدن خط از قطر شکل ۴- (الف)، مشخصات مربوط به رافنس سطح با استفاده از نرم افزار Image Plus (نسخه ۹/۲)، میانگین زبری $42/4$ نانومتر، میانگین مرتفع‌ترین زبری $184/9$ نانومتر و میانگین عمیق‌ترین زبری $119/3$ به دست آمد. زبری سطحی نانوحسگرهای پلاسمونیک فعال SERS ایجاد شده است؛ می‌تواند مراکزی برای پراکندگی نور باشد و باعث تقویت سیگنال رامان شود [۳۶].

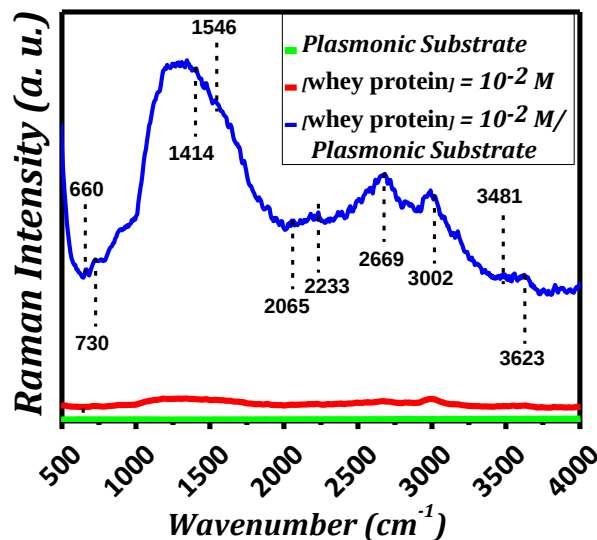


شکل-۴: تصاویر AFM، (الف) و (ب)، به ترتیب تصویر AFM دوبعدی و سه بعدی بسترهای شیشه‌ای حسگرهای پلاسمونیک زیستی SERS ساخته شده از نانوذرات نقره را نشان می‌دهد.

۵. طیف رامان، طیف SERS و آشکارسازی مولکول پروتئین وی با استفاده از بستر پلاسمونیک نقره

در شکل-۵، طیف رامان بستر پلاسمونیک نقره (منحنی سبز)، طیف رامان مولکول پروتئین وی قرار داده شده با غلظت 10^{-2} مولار بر روی زیرلایه شیشه‌ای (منحنی قرمز)، طیف SERS مولکول پروتئین وی قرار داده شده با غلظت 10^{-2} بر روی بستر پلاسمونیک نقره (منحنی آبی) مشاهده می‌شوند. در طیف رامان مولکول پروتئین وی که روی زیرلایه شیشه‌ای قرار داده شده‌اند (منحنی قرمز)؛ نشانی از ارتعاشات مولکولی مولکول پروتئین وی مشاهده نمی‌شود. بنابراین عملاً شناسایی این گونه حتی با غلظت 10^{-2} مولار و با استفاده از طیف‌سنجی رامان امکان‌پذیر نیست. با قراردادن پروتئین

این رابطه نمایی است و ضریب رگرسیون (R^2) آن برابر با ۰/۹۹ است. می‌توان با استفاده از این نمودار با مشاهده شدت قله ارتعاش‌های مولکولی Amid II و کششی CH_2 و خمشی CH_3 ، در طیف رامان، غلظت آن را به‌دست آورد. هدف از ساخت بستر پلاسمونیک، آشکارسازی غلظت‌های بسیار پایین پروتئین وی است، نمایی‌بودن منحنی کالیبراسیون غلظت‌های پایین از اهمیت بیشتری برخوردار است که در این مطالعه قابل مشاهده است. در اولین تحقیقات در مورد SERS، از کلونید طلا، نقره و مس یا سیم‌هایی از این فلزات استفاده می‌شد که به روش الکتروشیمیایی یا شیمیایی آن را خراش^۱ می‌دادند تا سطحی با زبری خاصی که بتواند آثار SERS، را نشان دهند ایجاد شود، امروزه روش‌های مختلفی برای تهیه بسترهای فعال SERS، از جمله: روش محلول‌های کلونیدی^۲ [۴۰-۴۱]، نانوذرات فلزی به صورت هسته-پوسته^۳ [۴۲-۴۳]، فناوری جوهرافشان حرارتی^۴ [۴۲-۴۳]، نانوذرات ساخته‌شده در شرایط خلاء^۵ [۴۲-۴۳]، روش نانولیتوگرافی^۶ [۴۲-۴۳] و فرسایش لیزری^۷ [۴۲-۴۳]، مورد استفاده قرار می‌گیرند. پژوهش‌های اخیر جهت شناسایی و تجزیه و تحلیل پروتئین وی با استفاده از روش تشدید پلاسمونیک SERS، مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۴۲-۴۳]. استفاده از هر کدام از روش‌های ذکر شده جهت تهیه بسترهای فعال SERS، در مقایسه با روش ارایه‌شده در این تحقیق نیاز به هزینه‌های زیاد دارند. در حال حاضر، برای تعیین مقدار پروتئین وی روش‌های متعددی مانند کروماتوگرافی گازی^۸ و اسپکترومتری جرم^۹ [۸، ۹]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [HPLC] (۱۰)^{۱۰} و طیف‌سنجی



شکل ۵: طیف رامان بستر پلاسمونیک نقره (منحنی سبز)، طیف رامان پروتئین وی با غلظت ۱۰^{-۲} قرار داده‌شده بر روی بستر شیشه‌ای (منحنی قرمز)، طیف SERS پروتئین وی قرار داده‌شده با غلظت ۱۰^{-۲} بر روی بستر پلاسمونیک نقره (منحنی آبی). ارتعاشات مولکولی که در طیف SERS ظاهر شده‌اند؛ با خط چین مشخص شده است.

شکل ۶- الف، طیف SERS پروتئین وی، با غلظت‌های ۱۰^{-۲} (منحنی سیاه)، ۱۰^{-۳} (منحنی قرمز)، ۱۰^{-۴} (منحنی آبی)، ۱۰^{-۵} (منحنی صورتی)، ۱۰^{-۶} (منحنی قهوه‌ای) و ۱۰^{-۷} (منحنی سبز) مولار قرار داده‌شده بر روی بستر پلاسمونیک نقره را نشان می‌دهد. با کاهش غلظت مولکول پروتئین وی، شدت قله‌های ارتعاش‌های مولکولی آن کاهش می‌یابد که به دلیل کاهش تعداد مولکول‌های پروتئین وی و در نتیجه کاهش تعداد ارتعاش‌های مولکولی آن است به گونه‌ای که در غلظت‌های کمتر از ۱۰^{-۷} مولار، ارتعاش‌های پروتئین وی به راحتی قابل مشاهده نیستند. بنابراین بستر پلاسمونیک نقره می‌تواند تا غلظت ۱۰^{-۷} مولار پروتئین وی را شناسایی کند. شکل ۶- ب، منحنی کالیبراسیون است که منحنی تغییرات شدت سیگنال SERS ارتعاش‌های مولکولی Amid II و کششی CH_2 و خمشی CH_3 ، در عدد موج ۱۴۱۴ cm^{-1} را بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت پروتئین وی، C، نشان می‌دهد که با برازش انجام‌شده از رابطه (۱) پیروی می‌کند.

$$I = 574/66 C^2 + 7166/63 C + 22239/87 \quad (R^2=0/99) \quad (1)$$

¹ Etch

² colloidal solution method

³ core shell metalnanoparticle

⁴ thermal inkjet technology

⁵ vacuum syn-thesized nanoparticles

⁶ Nano lithography

⁷ laser ablation

⁸ Gas Chromatography

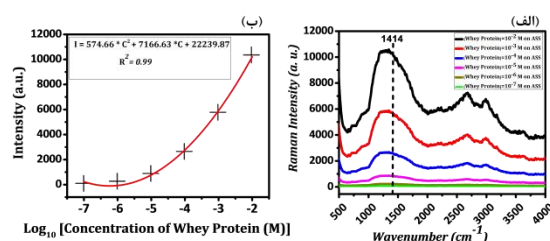
⁹ Mass Spectroscopy

¹⁰ High-performance Liquid Chromatography (HPLC)

نتیجه‌گیری

به‌منظور شناسایی و کنترل بیماری‌های متعدد ناشی از مولکول پروتئین وی، تشخیص مولکول پروتئین وی در غلظت‌های کم دارای اهمیت است. روش طیف‌سنجی رامان روشی غیرمخرب برای شناسایی مولکول‌ها است اما به‌دلیل ضعیف بودن سیگنال رامان، عملاً شناسایی غلظت‌های اندک از مولکول‌ها امکان‌پذیر نیست. با قرار دادن مولکول پروتئین وی، در معرض تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات فلزی مانند نقره و همچنین نور پراکنده شده از ذرات بزرگ فلزی، می‌توان سیگنال رامان را بهبود داد. با به‌کارگیری روش اسپاترینگ که روشی ساده، سریع و ارزان است؛ نانوذرات نقره بر روی بسترهای شیشه‌ای لایه‌نشانی شدند و این بسترها به عنوان بسترهای حسگرهای پلاسمونیک زیستی SERS جهت آشکارسازی مولکول پروتئین وی استفاده شدند. با کاهش غلظت مولکول پروتئین وی سیگنال رامان آنها نیز کاهش می‌یابد که این بستر پلاسمونیک ساخته‌شده از نانوذرات نقره قادر به شناسایی مولکول پروتئین وی تا غلظت 10^{-7} مولار هست. بهبود سیگنال رامان مولکول پروتئین وی ناشی از تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات نقره که با دریافت نور لیزر فرودی، نور را در منطقه کوچکی در اطراف خود متمرکز می‌کنند و با قرارگیری مولکول پروتئین وی در این مناطق و در نتیجه به‌دلیل دریافت میدان الکتریکی قوی‌تر، و یا رسیدن نور حاصل از پراکندگی از نقاط زبر پوشش نقره، مولکول‌های سازنده پروتئین وی قطبیده‌تر می‌شوند و در نتیجه ارتعاش‌های شدیدتری ظاهر می‌شوند. از مزایای بسترهای حسگرهای پلاسمونیک زیستی SERS معرفی‌شده، استفاده آسان و توانایی تشخیص سریع غلظت‌های اندک است که برای ساخت آن نیز هزینه چندان صرف نمی‌شود و با آنها می‌توان انواع پاتوژن‌های موجود در مواد غذایی و مواد بیولوژیکی را شناسایی کرد.

تبدیل فوریه رامان (FT-Raman) [۱۱، ۱۲، ۱۳] به‌کار برده می‌شود. این روش‌ها، روش‌هایی مخرب، دشوار، آلاینده، درون آزمایشگاهی، و نیازمند آماده‌سازی نمونه، نیروی متخصص آموزش‌دیده، آزمایشگاه‌های مجهز و صرف وقت و هزینه بسیار هستند. از این‌رو، توسعه یک روش غیرمخرب، با کاربری ساده، سریع، کم‌هزینه، ناآلاینده، با قابلیت حمل و کاربرد خارج از محیط آزمایشگاه و نیاز به آماده‌سازی کمتر نمونه بسیار ضروری است. از طرفی شناسایی و تشخیص مقادیر بسیار اندک از پروتئین وی نیز مورد توجه است. محدودیت‌های پروژه جاری شناسایی تک مولکول از پروتئین، آفت‌کش‌ها، مواد شیمیایی و آنالیت‌های بیولوژیکی با استفاده از این حسگرهای رامان بهبود یافته سطحی در این مقاله کار دشواری است که برای حل این محدودیت‌ها و جهت شناسایی تک مولکول از پروتئین، مواد شیمیایی و آنالیت‌های بیولوژیکی از سوزن میکروسکوپ نیروی اتمی (TERS) مورد استفاده قرار گیرد که هزینه‌ها را افزایش می‌دهد پیشنهاد می‌شود. دقت و حساسیت حسگر ساخته‌شده در این پژوهش برای پروتئین وی تا غلظت 10^{-6} مولار است، بنابراین از نظر اجرایی ساخت چنین حسگرهایی جهت تشخیص پروتئین وی نیاز به حداقل هزینه را دارند و اجرای چنین ساختاری از نظری اقتصادی مقرون‌به‌صرفه است.



شکل ۶: (الف) طیف SERS پروتئین وی قرار داده‌شده با غلظت‌های ۲-۱۰ (منحنی سیاه)، ۳-۱۰ (منحنی قرمز)، ۴-۱۰ (منحنی آبی)، ۵-۱۰ (منحنی صورتی)، ۶-۱۰ (منحنی قهوه‌ای) و ۷-۱۰ (منحنی سبز) بر روی بستر پلاسمونیک نقره و شکل ۶-ب، منحنی کالبراسیون تغییرات شدت، I، سیگنال SERS مربوط به ارتعاش‌های مولکولی Amid II و کششی CH₂ و خمشی CH₃، در عدد موج ۱۴۱۴ cm⁻¹، بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت پروتئین وی، C برای بستر پلاسمونیک نقره نمایش داده شده است.

¹ Fourier transform Raman methods (FT-Raman)

References:

1. Traverso N, Balbis E, Sukkar S, Furfaro A, Sacchi- Nemours A, Ferrari C. Oxidative stress in the animal model: the possible protective role of milk serum protein. *Mediterr J NutrMetab*. 2010; 3: 173–8.
2. Haa E, Zemelb MB. Functional properties of Whey, Whey components, and essential amino acids. Mechanisms underlying health benefits for active people (Review). *J Nutr Biochem* .2003; 14(5): 251-8.
3. Marshall K. Therapeutic Application of Whey Protein. *Alternat Med Review* .2004; 9(2): 136-56.
4. Liam P, kilduff, P, Louise T, Jeff A, Paul H, Andrew D, et al. Effect of creatine on body composition and strength gains after 4 weeks of resistance training in previously nonresistance– trained humans. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2003; 13: 504-20.
5. Marshall K. Therapeutic Application of Whey Protein. *Altern Med Rev*. 2004; 9(2): 136-56.
6. Sinnott A, Maddela L, Nelson D, Bae P, Anderson JA. The modifying effects of a calcium-rich whey protein supplement (OsoLean Powder) on weight loss and waist circumference in overweight subjects: A Preliminary Study. *The Open Nutra ceuticals J*. 2009; 2: 36-41.
7. Denysschen C, Burton H, Horvath P, Leddy J, Browne R. Resistance training with soy vs whey protein supplements in hyperlipidemia males. *J Int Soc Sports Nutr*. 2009; 11(1): 6-8.
8. Patsias J, Papadopoulou-Mourkidou EJ. Rapid method for the analysis of a variety of chemical classes of pesticides in surface and ground waters by off-line solid-phase extraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1998; 740: 83-98.
9. Goncalves C, Alpendurada MF. Solid-phase micro-extraction–gas chromatography–(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities. *Journal of Chromatography*. 2004; 1020: 239-50.
10. Zavatski S, Khinevich N, Girel K, Redko S, Kovalchuk N, Komissarov I, Lukashevich V, Semak I, Mamatkulov K, Vorobyeva V, Arzumanyan G, Bandarenka H. Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Lactoferrin Adsorbed on Silvered Porous Silicon Covered with Graphene. *Biosensors*. 2019; 9(1): 34.
11. Skoulika SG, Georgiou CA .Univariate and Multivariate Calibration for the Quantitative Determination of Methyl-parathion in Pesticide Formulations by FT-Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*. 2000; 54: 747-52.
12. Sato-Berru RY, Medina-Valtierra J, Medina Gutierrez C, Frausto-Reyes C. Quantitative NIR– Raman analysis of methyl-parathion pesticide microdroplets on aluminum substrates. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2004; 60: 2231-4.
13. Alak-Ala M, Vo-Dinh T. Surface-enhanced Raman spectrometry of organo phosphorus chemical agents. *ACS Publication Analytical Chemistry*. 1987; 59: 2149-53.
14. Ivanov AN, Evtyugin GA, Brainina KZ, Budnikov GK, Stenina LE. Cholinesterase Sensors Based on Thick-Film Graphite Electrodes for the Flow-Injection Determination of Organophosphorus Pesticides. *Journal of Analytical Chemistry*. 2002; 57: 1042-8.
15. Alizadeh T. High Selective Parathion Voltammetric Sensor Development by Using an Acrylic Based Molecularly Imprinted Polymer–Carbon Paste Electrode. *Electroanalysis*. 2009; 21: 1490-8.

16. Duan N, Chang B, Zhang H, Wang Z, Wu S. Salmonella typhimurium detection using a surface-enhanced Raman scattering-based aptasensor. *International Journal Food Microbiology*. 2016; 218: 38-43.
17. Wang LR, Fang Y. IR-SERS study and theoretical analogue on the adsorption behavior of pyridine carboxylic acid on silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2006; 63: 614-8.
18. TR Jensen, *J Phys. Chem. B* 17, 23(1999)9846.
19. L Sunmook, "Surface Modification of Gold Nanoparticles and Their Application in Biomolecular Sensing", Institute of Technology, Chicago(2007).
20. J Homola, S Yee, and G Gauglitz, *Sens. Actuators B Chem.* 54, 1-2 (1999) 3.
21. A Nooke, U Beck, A Hertwig, A Krause, H Kruger, V Lohse, D Negendank, and J Steinbach, *Sens. Actuators B Chem.* 149, 1 (2010) 194.
22. J Homola, J Dostálek, S F Chen, A Rasooly, S Jiang, and S S Yee, *Int. J. Food Microbiol.* 75, 1-2 (2002) 61.
23. V V Koubova, E Bryndaa, L Karasova, J Škvor, J Homola, J Dostalek, P Tobiška, and J Rošický, *Sens. Actuators B Chem.* 74(2001) 100.
24. J Homola, H Vaisocherová, J Dostálek, and M Piliarik, *Methods* 37, 1 (2005) 26.
25. S Patskovsky, M Meunier, P N Prasad, and A V Kabashin, *Opt. Express* 18, 14 (2010) 14353.
26. X D Hoa, A G Kirk, and M Tabrizian, *Biosens. Bioelectron* 23, 2 (2007) 151.
27. Zong C, Xu M, Xu LJ, Wei T, Ma X, Zheng XS, Hu R, Ren B: Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis: reliability and challenges. *Chem Rev* 2018, 118: 4946–4980.
28. Ren B, Liu GK, Lian XB, Yang ZL, Tian ZQ. Raman spectroscopy on transition metals. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2007; 388: 29-45.
29. Matricardi C, Hanske C, Garcia-Pomar JL, Langer J, Mihi A, Liz-Marzan LM. Gold Nanoparticle Plasmonic Superlattices as Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates. *ACS Nano*. 2018; vol. 12: 8531-9.
30. LinKQ, YiJ, HuS, LiuBJ, LiuJY, WangX, RenB. Size effect on SERS of gold nanorods demonstrated via single nanoparticle spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2016; 120: 20806-3.
31. Zhu, Zicheng, Hiroyuki Yoshikawa, Masato Saito, Bin Fan, and Eiichi Tamiya. "Fabrication of Surface-enhanced Raman Spectroscopy (SERS)–Active Electrodes by Silver Sputtering Deposition for Electrochemical SERS Analysis." *Electroanalysis* 30, no. 7 (2018): 1432-1437.
32. Eskandari, Vahid, Azadeh Kordzadeh, Leila Zeinalizad, Hossein Sahbafar, Hossna Aghanouri, Amin Hadi, and Sajad Ghaderi. "Detection of molecular vibrations of atrazine by accumulation of silver nanoparticles on flexible glass fiber as a surface-enhanced Raman plasmonic nanosensor." *Optical Materials* 128 (2022): 112310.
33. Bohren CF, Huffman DR. Absorption and Scattering of Light by Small Particles. Wiley. New York. 1983; 306: 625.
34. S.Y. Ding, E.M. You, Z.Q. Tian, M. Moskovits. Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Chemical Society Reviews*. 2017; 46: 4042-76.

35. Zhang L, Liu J, Zhou G, Zhang Z. Controllable In-Situ Growth of Silver Nanoparticles on Filter Paper for Flexible and Highly Sensitive SERS Sensors for Malachite Green Residue Detection. *Nanomaterials*. 2020 May; 10(5):826.
36. Tarik Baytekin H, Baytekin B, Huda S, Yavuz Z, Grzybowski BA. Mechanochemical Activation and Patterning of an Adhesive Surface toward Nanoparticle Deposition. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 137: 1726-9.
37. Wang Q, He L, P.Labuza T, Ismail B. Structural characterisation of partially glycosylated whey protein as influenced by pH and heat using surface-enhanced Raman spectroscopy. *FOOD CHEMISTRY*. 2013; 139: 313-9.
38. Chen HY, Lin MH, Wang CY, Chang YM, Gwo S. Large-scale hot spot engineering for quantitative SERS at the single-molecule scale. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 42: 13698-705.
39. Granger JH, Schlotter NE, Crawford AC, Porter MD. Prospects for point-of-care pathogen diagnostics using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Chemical Society Reviews*. 2016; 45: 3865-82.
40. N. Biswas, S. Kapoor, H.S. Mahal, T. Mukherjee. Adsorption of CGA on colloidal silver particles: DFT and SERS study. *Chemical Physics Letters*. 2007; 444: 338-345.
41. S.S.R. Dasary, U.S. Rai, H. Yu, Y. Anjaneyulu, M. Dubey, P. C. Ray. Gold nanoparticle based surface enhanced fluorescence for detection of organophosphorus agents. *Chemical Physics Letters*. 2008; 460: 187-190.
42. R. Botta, A. Rajanikanth, C. Bansal. Surface Enhanced Raman Scattering studies of l-amino acids adsorbed on silver nanoclusters. *Chemical Physics Letters*. 2015; 618: 14-19.
43. Schong E, Famelart MH. Dry heating of whey proteins. *Food Research International*. 2017 Oct 1; 100:31-44.