

Gold Nanoparticle Synthesis by Apoferritin Conjugated-antibody in Detecting *Vibrio Cholera*

Naimeh Mahheidari¹,

Jamal Rashidiani²,

Khadijeh Eskandari³

¹Phd Candidate of Tissue Engineering, Student Research Committee, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran

²PhD of Nanobiotechnology, Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Assistant Professor, Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received February 2, 2019 ; Accepted September 7, 2019)

Abstract

Background and purpose: Synthesis of homogeneous and equally important nanoparticles is very popular in various sciences. Preparation and use of gold nanoparticles is very important according to their applications in biotechnology. For synthesizing homogeneous gold nanoparticles many substrates and nanostructures have been used. This study aimed at synthesis of gold nanoparticles by apoferritin to be conjugated to antibody for detection of *vibrio cholera*.

Materials and methods: In this study, gold nanoparticles were prepared in apoferritin and compared with apoferritin free gold nanoparticles. Data were characterized by UV-Vis, DLS, and FE-SEM spectroscopy.

Results: Findings showed that the synthesized gold nanoparticles in apoferritin are more homogeneous.

Conclusion: The distribution of synthesizing gold nanoparticle in presence of apoferritin was so homogenous. In the following step, gold nanoparticles were separated from apoferritin and conjugated to recombinant antibody for detecting *vibrio cholera*. By bacteria attachment on gold nanoparticles, red shift occurred on wavelength, which was also visible to naked eyes. So, gold nanoparticles could be considered as a colored biosensor for detection of *vibrio cholera*.

Keywords: gold nanoparticles, apoferritin, antibody, spectroscopy

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (179): 40-48 (Persian).

* Corresponding Author: Khadijeh Eskandari - Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E- mail: kheskandari@ut.ac.ir)

سنتر نانوذرات طلا در آپوفریتین جهت اتصال به آنتی بادی برای تشخیص باکتری ویبریوکلرا

نعیمه ماه حیدری¹

جمال رشیدیانی²

خدیجه اسکندری³

چکیده

سابقه و هدف: سنتر نانوذرات همگن و هم اندازه در بخش های مختلف علوم بسیار پر کاربرد است. در این میان تهیه و استفاده از نانوذرات طلا به لحاظ وسعت کاربرد در علوم زیستی حائز اهمیت ویژه ای می باشد. برای ساخت نانوذرات همگن و هم اندازه از بسترها و نانوساختارهای بسیاری بهره برده شده است. این مطالعه با هدف سنتر نانوذرات طلا در آپوفریتین جهت اتصال به آنتی بادی برای تشخیص باکتری ویبریوکلرا، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، نانوذرات طلا در آپوفریتین تهیه شد و تفاوت آن در حالت آزاد (بدون آپوفریتین) مقایسه گردید و نتایج مطالعه با اسپکتروسکوپی UV-Vis، DLS و FE-SEM بررسی شد.

یافته ها: سنتر نانوذره در آپوفریتین نتایج بهتری از نظر توزیع هم اندازه نانوذرات را در پی دارد و نانوذرات تهیه شده دارای یکنواختی و توزیع یکسان تری نسبت به دیگر روش ها می باشد.

استنتاج: با توجه به تایید یکنواختی و توزیع نانوذرات با روش جدید سنتر شد و در ادامه کار نانوذرات طلای تهیه شده از قالب آپوفریتین استخراج گشته و به آنتی بادی نو ترکیب ویبریوکلرا جهت تشخیص باکتری ویبریوکلرا استفاده شد. با اتصال باکتری تغییر طول موج نانوذرات طلا به سمت قرمز اتفاق می افتد که با چشم غیر مسلح نیز مشهود است بنابراین نانوذرات طلا زیست حسگری رنگی برای تشخیص باکتری ویبریوکلرا محسوب می شود.

واژه های کلیدی: نانوذرات طلا، آپوفریتین، اسپکتروسکوپی، آنتی بادی

مقدمه

بوده و هست (2-5). نانوذرات طلا دارای روش های سنتر مختلفی می باشند که هر کدام از این روش ها می توانند پیچیدگی ها و مزایای خود را داشته باشند. این روش ها شامل روش های سنتر شیمیایی، فیزیکی و یا سبز است که می توانند بر اساس اندازه و ریخت شناسی و کاربرد تنوع داشته باشند. یکی از روش های سنتر شیمیایی تر کوویج است

نانوذرات و روش های تهیه آن ها به واسطه کاربردهای گسترده شان در زمینه های مختلف شیمیایی، زیستی، الکترونیک، مکانیکی و ابزار آلات مغناطیسی مورد توجه می باشد (1). نانوذرات می توانند تنوع بسیار زیادی در اندازه، ترکیب و شکل داشته باشند. سنتر نانوذرات یکدست، یکنواخت و با کیفیت بالا همواره دغدغه پژوهشگران

E-mail: kheskandari@ut.ac.ir

مؤلف مسئول: خدیجه اسکندری؛ تهران: دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی

1. دانشجوی دکترای مهندسی بافت، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

2. دکترای نانو بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، تهران، ایران

3. استادیار، مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1397/11/13 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1397/11/16 تاریخ تصویب: 1398/6/17

کاتالیز واکنش‌های شیمیایی و کاربرد در علوم بیولوژی و مهندسی پزشکی، به منزله نانوذره‌هایی منحصر به فرد مطرح می‌شود (6، 13، 14). با توجه به موارد ذکر شده این مطالعه با هدف سنتز نانوذرات طلا در آپوفریتین جهت اتصال به آنتی‌بادی برای تشخیص باکتری ویبریوکلرا، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، آپوفریتین استخراج شده از طحال اسب (Equine Spleen Apoferritin) و هیدروژن تترا کلرو آتورات (HAuCl₄, Cas number 16961-25-4)، سدیم سیترات (CAS Number: 6132-04-3) از شرکت سیگما تهیه شد. پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH₂PO₄, CAS Number: 7778-77-0) و پتاسیم هیدروژن فسفات (K₂HPO₄, CAS Number: 7758-11-4)، NHS (CAS number: 6066-82-6) و EDAC (CAS number: 25952-53-8) از مرک آلمان تهیه شد. آنتی بادی نوترکیب OMPW و سوبه باکتری ویبریوکلرا از پژوهشگاه بقیه‌اله (عج) تهیه گردید.

در این مطالعه نانوذرات طلا در آپوفریتین به روش کاهش شیمیایی با موفقیت سنتز شد و برای اتصال به آنتی‌بادی نوترکیب OMPW جهت شناسایی و اندازه‌گیری باکتری ویبریوکلرا استفاده گردید. نتایج مطالعه با روش‌های اسپکتروسکوپی UV-Vis، DLS و FE-SEM بررسی شد. نانوذرات طلا بعد از عامل دار شدن با مرکاپتوآندکانوییک اسید به روش کوالانسی به آنتی بادی ویبریوکلرا متصل شد که صحت اتصال با اسپکتروسکوپی FT-IR و رامان ارزیابی شد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که نانوذرات طلای سنتز شده در آپوفریتین بسیار یکنواخت می‌باشد و در کاربردهای زیستی اطمینان بخش تر و تکرار پذیرترند.

هم چنین یو کمپلکس Au/OMP در بافر فسفات 0/1 مولار در دمای اتاق به مدت 15 دقیقه در معرض رقت‌های مختلف باکتری ویبریوکلرا (16، 25، 45، 65،

که در سال 1951 معرفی شد. در این روش از یون سیترات در جهت کاهیده شدن نمک طلا استفاده شده است. از روش‌های دیگر سنتز شیمیایی می‌توان به براست، میکروامولسیون، فراصوت، اولتراسوند اشاره کرد. روش‌های سبز شامل سنتز نانوذرات طلا به کمک باکتری‌ها از عصاره گیاهان می‌باشد. یکی از مهم‌ترین اصولی که در این روش‌ها مد نظر محققین بوده است، به‌دست آوردن یک توزیع یکدست و یکنواخت از نانوذرات می‌باشد تا بتوانند با دقت بیش‌تری، نتایج به دست آمده از تحقیقات را گزارش کنند. همچنین توزیع ساینز یکنواخت می‌تواند عملکرد نانوذرات را افزایش دهد (9-6). از آنجایی که ترازهای انرژی الکترونی نانوذرات رسانا و نیمه رسانا براساس اندازه نانوذره کوانتیزه شده است، دستیابی به نانوذرات همگن بسیار دشوار می‌باشد. لذا برای دستیابی به این موضوع، استفاده از پروتئین‌های قفس مانند آپوفریتین اجتناب ناپذیر است (10-12). آپوفریتین یک نانوساختار پروتئینی است که 24 سابوینیت پلی‌پپتیدی دارد که یک قفس با قطری 12/5 نانومتر را به وجود می‌آورد. حفره داخلی آپوفریتین تقریباً 8 نانومتر است که 4500 اتم آهن را به عنوان اکسید آهن - هیدروکسید در خود جای می‌دهد. آپوفریتین 14 کانال با ابعاد 3-4 آنگستروم دارد. 8 کانال هیدروفیل عبور یون‌های فلزی و مولکول‌های کوچک را به داخل کانال پروتئین تسهیل می‌کند. تاکنون نانوکامپوزیت‌های آلی - فلزی فراوانی در آپوفریتین سنتز شده‌اند که می‌توان از کبالت، منگنز، سولفید آهن، فسفات آهن، نیکل، آبی پروس، کروم و منگنز را نام برد.

از طرفی نانوذره‌های طلا و فلزات نجیب به سبب خواص مطلوبی که از خود بروز داده‌اند، مورد بررسی خاص قرار می‌گیرند. نانوذره‌های طلا از پایدارترین نانوذره‌های موجود هستند که با ویژگی‌هایی از جمله اثر اندازه کوانتومی، خواص الکتریکی وابسته به اندازه و خواص مغناطیسی و همچنین داشتن کاربردهایی همچون

85، 100، 125، 150*10⁴ cell/ml باکتری ویبریوکلرا) قرار داده شد و سپس با سانتریفیوژ 10000 دور بر دقیقه سه بار شستشو داده تا باکتری‌های اتصال نیافته حذف شوند.

روش تهیه نانوذرات طلا با آپوفریتین

ابتدا 3 میلی لیتر محلول آپوفریتین با غلظت 1/5 میکرو مولار تهیه شد. سپس 50 میکرو لیتر هیدروژن تتراکلو آتورات 0/01 مولار به آن اضافه شد و به مدت 5 ساعت انکوبه گردید. در حالی که محلول توسط همزن مغناطیسی به شدت هم زده می شد، سدیم بورهیدرات 1 درصد w/v به آن اضافه گردید. تغییر رنگ محلول به قرمز نشان دهنده ذرات طلا بوده است (15). به منظور حذف نانو ذرات طلا احتمالی تشکیل شده روی سطح آپوفریتین محلول با 10000 دور بر دقیقه به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ گردید. این محلول به ظرف تیره تمیز که قبلاً شسته شده منتقل، و در یخچال در دمای حدود 4 درجه سانتی گراد نگهداری شد (15، 16).

عامل دار کردن نانو ذره طلا برای اتصال به آنتی بادی

برای اتصال آنتی بادی بر روی نانوذرات طلا بایستی ابتدا سطح آن را با ماده شیمیایی فعال کرد که در این مطالعه از 11- مرکاپتودکانوئیک اسید استفاده شد (17). مقدار 11- مرکاپتودکانوئیک اسید با استفاده از غلظت معادل OD 0/456 طبق فرمول شماره 1 محاسبه گردید.

$$M_1 V_1 = M_2 V_2 \quad \text{فرمول شماره 1}$$

بر خلاف گروه تیول که به راحتی با طلا اتصال برقرار می کند، گروه کربوکسیلی آن به حدی از نظر آنتالپی پایدار است که برای انجام واکنش با گروه‌های آمیدی نیاز به افزایش دما و یا استفاده از کاتالیزور دارد. EDC در حضور NHS باعث فعال شدن 11- مرکاپتودکانوئیک و آنتی بادی می شود و پس از انجام واکنش مانند یک آنزیم از واکنش خارج می شود.

200 میکرو لیتر از بافر MES (pH=6/1) با 0/11 گرم از NHS و 0/09 گرم از EDC را به طور جداگانه تهیه کرده و هر کدام جداگانه در 10 میلی لیتر بافر MES حل گردید و تحت شرایط همزدن شدید نانو ذره به آن اضافه گردید. سپس در دمای اتاق به مدت 45 دقیقه عمل همزدن محلول بی وقفه دنبال گشت. 1 میلی لیتر از 11- مرکاپتودکانوئیک اسید با غلظت 2 میلی مولار به نانو ذره طلا به حجم 4 میلی لیتر اضافه شد و حجم کل به 5 میلی لیتر رسانده شد. غلظت کل نانوذرات طلا معادل 0/4 در نظر گرفته شد و طبق فرمول شماره 1 بر حسب میکرو لیتر حجم آنتی بادی مورد نظر حساب گردید (18). حجم نهایی آنتی بادی با توجه به محاسبه زیر انجام شد.

$$10 \text{ ng/ml} * X = 0.4 \text{ ng/ml} * 5000 \quad X=200 \mu\text{l}$$

غلظت آنتی بادی = 10 میلی گرم بر میلی لیتر،

حجم آنتی بادی = 200 میکرو لیتر

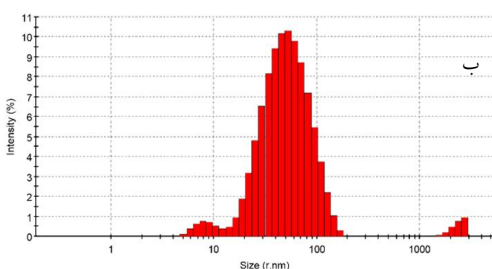
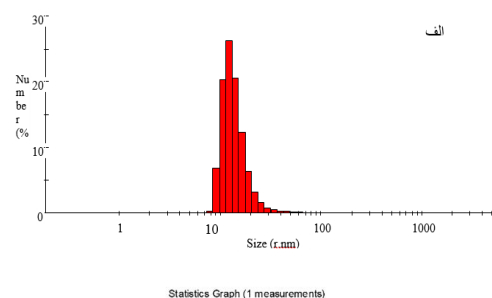
آنتی بادی به حجم 200 میکرو لیتر به 5 میلی لیتر از نانوذرات طلا اضافه گردید. در نهایت به محلول نهایی به مدت 4 ساعت در دمای اتاق و بر روی استیرر قرار داده و به آن زمان داده شد تا به آنتی بادی متصل شود. 11- مرکاپتودکانوئیک اسید از ناحیه تیول خود بر سطح نانوذرات طلا به صورت کوالان متصل، و از ناحیه کربوکسیلیک خود به سطح آنتی بادی متصل می شود.

یافته ها

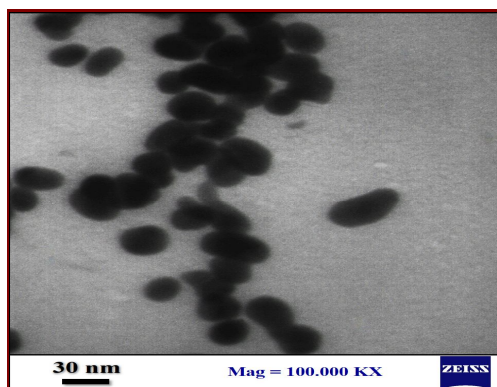
بررسی اندازه نانوذره طلا با دستگاه های زتا سائزر

نانوذرات طلا به دلیل پدیده پلاسمون رزونانس الکترون های سطحی شان در طول موج ناحیه مرئی ماکزیمم جذبی دارند که در ناحیه قرمز واقع شده است. همان طور که در نمودار شماره 1 مشاهده می شود نانوذرات طلا در اسپکتروسکوپی UV-Vis دارای ماکزیمم جذب 528 نانومتر می باشند که منحنی (الف) مربوط به نانوذرات طلای تهیه شده در آپوفریتین و منحنی (ب)

دهنده طلا اصلاح شد. پیک جذب‌ی گروه تیول (S-H) مرکاپتو اتانول در ناحیه 2600 cm^{-1} است. همان‌گونه در نمودار شماره 3- ب مشاهده می‌شود، پیک 2559 cm^{-1} مربوط به گروه تیول حذف شده و نشان‌دهنده اتصال مرکاپتو اتانول بر ساختار نانوذره طلا می‌باشد. هم‌چنین نمودار شماره 3- ب نشان می‌دهد که پیک‌های 2851 cm^{-1} و 2923 cm^{-1} مربوط به گروه‌های اتصالی پروتئینی و COOH مرکاپتو اتانول و آنتی‌بادی می‌باشد (19-21).

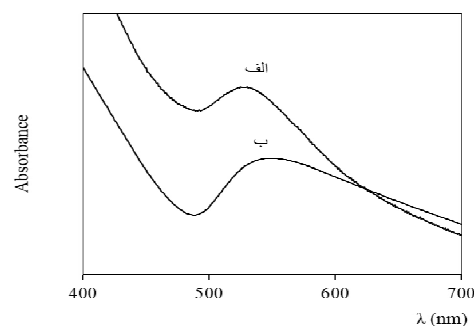


تصویر شماره 2: الف: توزیع نانوذرات طلا در حضور آپوفریتین، ب: بدون حضور آپوفریتین



تصویر شماره 1: تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات طلا

طیف نانوذرات طلا بدون حضور آپوفریتین است. همان‌طور که مشهود است منحنی ب پهن‌تر است و جابه‌جایی به سمت طول موج قرمز را دارد. این مطلب ثابت می‌کند حضور آپوفریتین موجب سنتز نانوذرات همگن و هم اندازه می‌شود و نیز احتمال آگریگه شدن را کم‌تر می‌کند. هم‌چنین توزیع اندازه این نانوذرات با دستگاه DLS اندازه‌گیری گردید. همان‌طور که در نمودار شماره 2- الف مشاهده می‌شود توزیع نانوذرات طلای سنتز شده در آپوفریتین باریک‌تر بوده و میانگین اندازه 30 نانومتر را دارند. تصویر شماره 2- ب توزیع نانوذرات طلا بدون حضور آپوفریتین است. پتانسیل بار سطحی نانوذرات طلا نیز با $32/2\text{ ELS}$ - میلی ولت مشاهده شد که نشانه پایداری نانوذرات می‌باشد. هم‌چنین تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات طلا با TEM گرفته شده است که نشان می‌دهد نانوذرات طلا کروی همگن و هم‌اندازه می‌باشند (تصویر شماره 1).

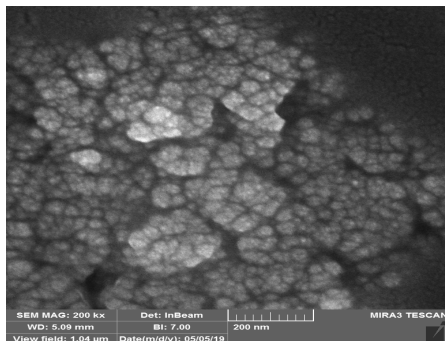


نمودار شماره 1: الف: اسپکتروسکوپی UV-Vis نانوذرات طلا در حضور آپوفریتین، ب: بدون حضور آپوفریتین

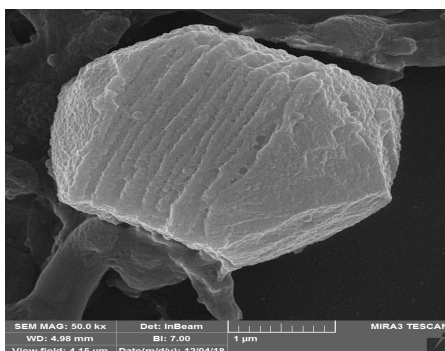
اتصال طلا به آنتی بادی ثانویه و تایید این کمپلکس توسط دستگاه FT-IR

نمودار شماره 3، طیف تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) نانوذرات طلا قبل از اتصال به آنتی‌بادی (الف) و پس از اتصال به آنتی بادی (ب) را نشان می‌دهد. نانوذرات طلا قبل از اتصال به آنتی‌بادی با مرکاپتو اتانول به عنوان تثبیت کننده طلا و مولکول اتصال

می‌کند، لذا با افزایش باکتری شدت رنگ بیش‌تری مشاهده می‌شود که ارتباط مستقیمی با افزایش جذب دارد. بنابراین در مرحله بعد OD (میزان جذب)، نمونه‌ها با غلظت‌های مختلف باکتری توسط دستگاه فوتومتر قرائت شد و منحنی کالیبراسیون رسم گردید. منحنی اندازه‌گیری باکتری ویبریوکلرا در نمودار شماره 5 دیده می‌شود.



تصویر شماره 2: میکروسکوپ الکترون روبشی از بیو کمپلکس نانوذرات طلای متصل به آنتی بادی OMPW



تصویر شماره 3: میکروسکوپ الکترون روبشی از باکتری ویبریوکلرا متصل به بیو کمپلکس Au/OMPW



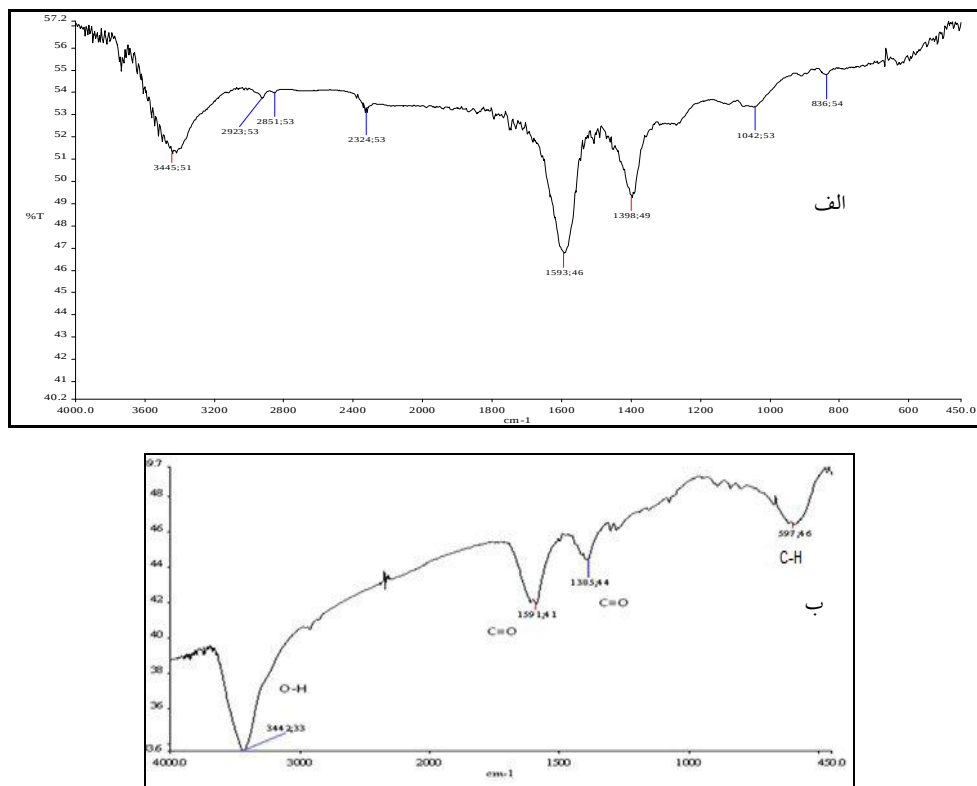
تصویر شماره 4: تغییرات چشمی رنگ نانوذرات طلا با افزایش باکتری ویبریوکلرا (از بالا به پایین)

تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوذرات طلای اصلاح شده با آنتی بادی OMPW و متصل شده با باکتری ویبریوکلرا

سطح نانوذرات طلا سنتز شده با مرکاپتوآندکانویک اسید عامل دار شد. آنتی بادی OMPW به روش کوالانسی به سطح نانوذرات طلا متصل شد. از بیو کمپلکس Au/OMPW تصویر SEM تهیه شد (تصویر شماره 2). همان‌طور که مشهود است مورفولوژی سطحی نانوذرات طلای متصل به آنتی بادی OMPW کاملاً متفاوت از نانوذرات طلای خالی می‌باشد که نشان از تثبیت موفق آنتی بادی دارد هم‌چنین لازم به ذکر است که با اصلاح سطح نانوذرات طلا با آنتی بادی میزان پایداری نانوذره افزایش می‌یابد و امکان اگرینگ شدن آن کم‌تر می‌گردد، زیرا دسترسی اتم‌های سطحی فلز طلا برای تجمع و کلوخه شدن کم‌تر می‌شود. هم‌چنین این بیو کمپلکس در معرض باکتری قرار داده شد و بعد از اتصال باکتری و شستشو تصویری دیگر تهیه شد که در تصویر شماره 3 دیده می‌شود و اتصال باکتری به بیو کمپلکس Au/OMPW کاملاً نمایان است.

اندازه‌گیری باکتری ویبریوکلرا توسط نانوذره طلای متصل به آنتی بادی OMPW

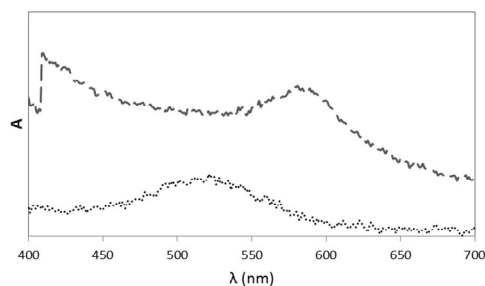
همان‌طور که در تصویر شماره 4 مشاهده می‌شود با افزایش باکتری رنگ نمونه‌ها تغییر می‌یابد. این افزایش شدت رنگ ناشی از افزایش غلظت باکتری، به این دلیل است که نانوذرات طلا رزونانس پلاسمون جذب را در طول موج 500-600 نانومتر نشان می‌دهند که این طول موج با اندازه و خواص سطح نانوذرات طلا نسبت مستقیم دارد. هر چقدر نانو اندازه نانوذرات طلا بزرگ‌تر شود شدت پیک جذب به سمت طول موج‌های بالاتر شیف‌ت می‌کند. همان‌طور که در نمودار شماره 4 دیده می‌شود با اتصال باکتری به نانوذرات طلای اصلاح شده با آنتی بادی OMPW پیک نانوذرات طلا به سمت قرمز جابه‌جا می‌شود و از طول موج 530 به 580 نانومتر شیف‌ت پیدا



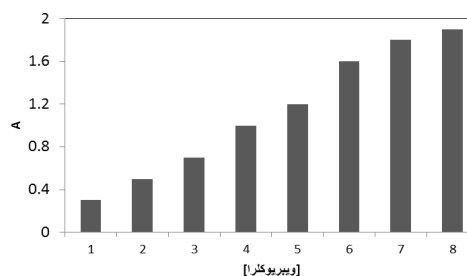
تصویر شماره 3: الف: نمودار FTIR نانوذره طلا، ب: نانوذرات طلا/ آنتی بادی

بحث

نانوذره طلا به واسطه خصوصیات ساختاری، اپتیکی، الکترونیکی و کاتالیستی منحصر به فردشان بسیار حائز اهمیت در حوزه نانو می باشد. آن‌ها نانوذراتی زیست سازگاری هستند که در مقایسه با بسیاری از نانوذرات دیگر تغییرات ساختاری و عملکردی کمتری در پروتئین‌ها ایجاد می کنند همچنین به لحاظ رنگی بودن و داشتن پیک شاکسی در ناحیه مرئی 500 تا 600 نانومتر، کاندید بسیار خوبی به عنوان شناساگر در حسگرها می باشند. تاکنون روش‌های متعددی برای سنتز نانوذرات طلا گزارش شده است که می توان از جمله آن به روش‌های کاهش شیمیایی، میکروامولسیون، روش‌های فیزیکی و سنتزهای گیاهی اشاره کرد. در این مطالعه نانوذرات طلا در قفس طبیعی آپوفریتین سنتز شد و سپس با تغییرات pH نانوذرات رهاسازی گردید که روشی ساده و کم هزینه می باشد و نیاز به تجهیزات



نمودار شماره 4: اسپکتروسکوپی UV-Vis نانوذرات طلا در حضور باکتری (---) و بدون حضور باکتری (....)



نمودار شماره 5: منحنی اندازه گیری باکتری ویبریوکلرا توسط نانوذره طلای متصل به آنتی بادی OMPW

در آپوفریتین تثبیت شده است و پیک‌های کششی پیوندهای پتیدی دیده می‌شود. در مرحله بعد باکتری ویبریوکلرا بر روی نانوذره طلای کونژوگه با آنتی‌بادی دیده می‌شود با افزایش غلظت باکتری رنگ نمونه‌ها تغییر می‌یابد که با چشم نیز مشهود می‌باشد. سپس OD نمونه‌های به دست آمده در تصویر شماره 2 توسط دستگاه فتومتر قرائت شد و منحنی کالبراسیون اندازه‌گیری باکتری ویبریوکلرا در شکل شماره 5 رسم گردید که غلظت‌های در گستره $10^4 \times 16-150$ cell/ml از باکتری ویبریوکلرا قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

سپاسگزاری

از تمام کسانی که در انجام این مطالعه ما را حمایت و راهنمایی کردند از جمله گروه نانوبیوتکنولوژی علوم پزشکی بقیه‌الله نهایت سپاس و قدر داری را دارم.

References

1. La Spada L, Vegni L. Electromagnetic nanoparticles for sensing and medical diagnostic applications. *Materials* 2018; 11(4): 603.
2. Saratale RG, Saratale GD, Shin HS, Jacob JM, Pugazhendhi A, Bhaisare M, et al. New insights on the green synthesis of metallic nanoparticles using plant and waste biomaterials: current knowledge, their agricultural and environmental applications. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018; 25(11): 10164-10183.
3. Lue J-T. A review of characterization and physical property studies of metallic nanoparticles. *J Phys Chem Solids* 2001; 62(9-10): 1599-1612.
4. Mohanraj V, Chen Y. Nanoparticles-a review. *Trop J Pharm Res* 2006; 5(1): 561-573.
5. Raval N, Maheshwari R, Kalyane D, Youngren-Ortiz SR, Chougule MB, Tekade RK. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. *Basic Fundamentals of Drug Delivery*: Elsevier; 2019. p. 369-400.
6. Elahi N, Kamali M, Baghersad MH. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta* 2018; 184: 537-556.
7. Eustis S, El-Sayed MA. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Soc Rev* 2006; 35(3): 209-217.
8. Corti CW, Holliday RJ, Thompson DT. Developing new industrial applications for

- gold: gold nanotechnology. Gold Bulletin 2002; 35(4): 111-117.
9. Kawai T, Neivandt DJ, Davies PB. Sum frequency generation on surfactant-coated gold nanoparticles. J Am Chem Soc 2000; 122(48): 12031-12032.
 10. Ruozzi B, Veratti P, Vandelli MA, Tombesi A, Tonelli M, Forni F, et al. Apoferritin nanocage as streptomycin drug reservoir: Technological optimization of a new drug delivery system. Int J Pharm 2017; 518(1-2): 281-288.
 11. Belletti D, Pederzoli F, Forni F, Vandelli MA, Tosi G, Ruozzi B. Protein cage nanostructure as drug delivery system: magnifying glass on apoferritin. Expert Opin Drug Deliv 2017; 14(7): 825-840.
 12. Rafipour R, Kashanian S, Hashemi S, Omidfar K, Dolatabadi JEN. Apoferritin-templated biosynthesis of manganese nanoparticles and investigation of direct electron transfer of MnNPs-HsAFr at modified glassy carbon electrode. Biotechnology and applied biochemistry 2017; 64(1): 110-116.
 13. Banerjee K, Rai VR. A review on mycosynthesis, mechanism, and characterization of silver and gold nanoparticles. BioNanoScience. 2017;8(24).
 14. Navarrete J, Siefe C, Alcantar S, Belt M, Stucky GD, Moskovits M. Merely measuring the UV-visible spectrum of gold nanoparticles can change their charge state. Nano Letters 2018; 18(2): 669-674.
 15. Orner BP, Fan R, Chew SW, Cheong VV. Method for fabricating a gold nanoparticle. Google Patents; 2018.
 16. Dashtestani F, Ghourchian H, Najafi A. Silver-gold-apoferritin nanozyme for suppressing oxidative stress during cryopreservation. Mater Sci Eng C 2019; 94: 831-840.
 17. Alipour E, Ghourchian H, Boutorabi SM. Gold nanoparticle based capacitive immunosensor for detection of hepatitis B surface antigen. Analytical Methods 2013; 5(17): 4448-4453.
 18. Zarei H, Ghourchian H, Eskandari K, Zeinali M. Magnetic nanocomposite of anti-human IgG/COOH-multiwalled carbon nanotubes/Fe₃O₄ as a platform for electrochemical immunoassay. Anal Chem 2012; 421(2): 446-453.
 19. Saha K, Agasti SS, Kim C, Li X, Rotello VM. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. Chem Rev 2012; 112(5): 2739-2779.
 20. Nghiem THL, La TH, Vu XH, Chu VH, Nguyen TH, Le QH, et al. Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. Advances in Natural Sciences: nanoscience and Nanotechnology 2010; 1(2): 025009.
 21. Song J, Huang P-C, Wan Y-Q, Wu F-Y. Colorimetric detection of thiocyanate based on anti-aggregation of gold nanoparticles in the presence of cetyltrimethyl ammonium bromide. Sens Actuators B Chem 2016; 222: 790-796.