مجله پژوهش علف‌های هرز
جلد ۶، شماره ۱، ۱۳۹۳
صفحات ۲۲- ۱

حسگرهای زیستی، ابزاری قدرتمند در ردیابی باقی‌مانده علف‌کش‌ها

Biosensors, a powerful tool in herbicides residue detection

هادی مهدیخانی[1*]، ابراهیم ایزدی دربندی[2]

چکیده:

ردیابی باقی‌مانده‌های علف‌کش، شامل طیف گسترده‌ای از روش‌ها، از جمله که حسگرهای زیستی است که برای آنالیز باقی‌مانده علف‌کش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. حسگرهای زیستی، سیستمی با اندازه کوچک، بسیار دقیق، *حساس*، اختصاصی و قابل حمل بوده که می‌تواند ملکول هدف را در غلظت‌های بسیار کم در نمونه-های زیستی اندازه‌گیری کند لذا امروزه از آن‌ها در علوم مختلف پزشکی، صنایع شیمیایی، تولید مواد دارویی، بهداشتی و غذایی و پایش محیط زیست بهره می‌گیرند. حسگرهای زیستی متشکل از سه جزء گیرنده زیستی، آشکارساز و پردازنده می‌باشند. اهمیت این روش در واکنش بسیار انتخابی نسبت به ملکول هدف خاصی است که بدین وسیله از مداخله مواد مزاحم که موجب عدم کارایی بسیاری از روش‌های اندازه‌گیری است، جلوگیری می‌کند. این حسگرها به گونه‌ای طراحی می‌شوند که تنها به یک ماده‌ی خاص واکنش نشان دهند. نتیجه این واکنش به صورت پیام‌هایی در می‌آید که یک ریزپردازنده، می‌تواند آن‌ها را تحلیل کند. از آنجایی که مبنای کار این حسگرها بر اساس سیستم زیستی تعبیه شده در آن‌هاست که با مطالعات زیستی سازگاری دارند، بنابراین بر بافت‌های زنده مورد مطالعه اثرات منفی جانبی ندارند. از سوی دیگر در سال‌های اخیر با طراحی نانو زیست‌حسگرها، حساسیت روش‌های مورد اندازه‌گیری افزایش چشم‌گیری پیدا کرده است.

واژه‌های کلیدی: بقایای علف‌کش، ردیابی، حسگر زیستی، محیط زیست

مقدمه

آفت‌کش‌ها طیف گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی مصنوعی یا طبیعی هستند که برای کنترل حشرات، قارچ‌ها، باکتری‌ها، علف‌های هرز، نماتدها، جوندگان و دیگر آفات محصولات کشاورزی به کار می‌روند. پس از فراهم شدن امکان سنتز آفت‌کش‌ها در دهه ۱۹۴۰، نقش مهمی را در افزایش کیفیت و کمیت محصولات کشاورزی به ارمغان آورده‌اند. از این‌رو و علی‌رغم همه مزیت‌های ناشی از کاربرد آفت‌کش‌ها در کشاورزی، تهدید سلامت انسان و مخاطرات زیست محیطی از مهم‌ترین تبعات ناشی از کاربرد این دسته از مواد شیمیایی می‌باشند (Swanton *et al.*,

تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۱۷

۱- دانشجوی دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
*- نویسنده مسئول Email: hmehdikhani@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

(2011. در اغلب موارد، بقایا و گاهی متابولیت‌های حاصل از تجزیه آفت‌کش‌ها تهدیدی برای سلامت انسان و سایر موجودات زنده هستند (Delorenzo *et al.*, 2001). مقدار مواد شیمیایی مصرفی کشاورزی به ویژه علف‌کش‌ها در سال‌های اخیر توسعه بسیار زیادی داشته است که می‌توانند پس از ورود به زیست بوم‌های غیر هدف، اثرات سوئی بر موجودات زنده و انسان به دنبال داشته باشند. اثرات زیان‌بار و مخرب زیست محیطی علف‌کش‌ها در درجه اول ناشی از ماندگاری آن‌ها در محیط است که به طور غیرمستقیم سلامت مواد غذایی و انسان را نیز در معرض تهدید قرار خواهند داد. این سموم ممکن است به طور مستقیم توسط انسان از طریق مصرف مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد یا اینکه با تجمع در زنجیره‌های غذایی وارد بدن انسان شوند. بر اساس آمار موجود در حال حاضر بیش از ۱۰۰۰ نوع آفت‌کش در سراسر جهان به فروش می‌رسد (Alavanja & Bonner, 2005) که مطالعات بیماری شناختی نشان می‌دهد بیش از ۸۰ درصد از باقی‌مانده این آفت‌کش‌ها در طبیعت برای انسان مخاطرات جدی ایجاد می‌کند. این در حالی است که تقریباً ۴۵ درصد کل مصرف آفت‌کش‌ها در دنیا به کاربرد علف‌کش‌ها اختصاص داده شده است. تعداد قابل ملاحظه‌ای از این سموم از قابلیت دوام قابل توجه در محیط و در محصولات گیاهی برخوردارند که سنجش باقی‌مانده آن‌ها در محصولات گیاهی، مواد غذایی و محیط زیست، از مهم‌ترین راهکارهای کاهش احتمال خطر آن‌ها برای سلامت انسان است (Dankwardt, 2000). در این ارتباط دست‌یابی به روش‌های سریع، آسان، حساس و برخوردار از قابلیت آنالیز تعداد زیادی ماده شیمیایی در یک نمونه، مورد توجه بسیاری از محققین در سراسر دنیا بوده است و هدف نهایی این تحقیقات ارائه روش‌هایی جدید با کارایی بالاتر به آژانس‌های نظارتی به منظور حفظ سلامت انسان و محیط و اطلاع از وضعیت بقایای این مواد شیمیایی در غذا و اکوسیستم می‌باشد (Servos *et al.*, 2007).

در سال‌های اخیر افزایش نگرانی‌های عمومی در رابطه با مخاطرات بهداشتی باقی‌مانده سموم در مواد غذایی و توجه به وضعیت ایمنی و کیفیت مواد غذایی و بهداشت جامعه، منجر به ایجاد روش‌های مختلفی برای سنجش بقایای مواد شیمیایی مورد استفاده در کشاورزی شده است. روش‌های ردیابی باقی‌مانده علف‌کش‌ها، شامل طیف گسترده‌ای از روش‌هاست که حسگرهای زیستی[1] از جمله روش‌های زیستی آنالیز باقی‌مانده علف‌کش‌ها می‌باشد. در این مقاله، مروری بر کاربرد و کارایی حسگرهای زیستی در تشخیص باقی‌مانده علف‌کش‌ها خواهیم داشت.

مواد و روش‌ها

توسعه روش‌های ردیابی آفت‌کش‌ها

در سال‌های اخیر آژانس‌های نظارتی تاکید هر چه بیشتری بر ضرورت توسعه و استفاده از روش‌های آنالیز باقی‌مانده آفت‌کش‌ها در مواد غذایی دارند. توسعه روش‌های ردیابی آفت‌کش‌ها به ویژه علف‌کش‌ها و دیگر آلاینده‌های محیطی و غذایی اساساً در سه محور صورت گرفته است:

1. Biosensors

Archive of SID

www.SID.ir

۱. روش‌های آنالیز مطمئن و پیچیده‌ای که قادر به شناسایی دقیق و آشکار طیف گسترده‌ای از آلاینده‌ها در مقادیر حداقل باشند که در این ارتباط می‌توان به روش‌های آنالیز دستگاهی اشاره کرد. امروزه این روش‌ها توانایی تشخیص و تعیین هم‌زمان باقی‌مانده چندین آفت‌کش در غلظت‌های بسیار اندک را دارند.

۲. روش‌های غربال سریع، اختصاصی و بسیار حساس که به راحتی قابل استفاده در شرایط مزرعه‌ای می‌باشند. این روش‌ها معمولاً از حساسیت و اختصاصی بودن سیستم‌های زیستی بهره می‌گیرند. مجموعه این روش‌ها را تست‌های ایمنی سنجی[1] می‌نامند.

۳. روش‌هایی که ترکیبی از مزایای روش‌های قبلی را داشته باشند که حسگرهای زیستی در این گروه قرار می‌گیرند (Marco and Barcelo, 1998).

نحوه پیدایش حسگرهای زیستی

فناوری حسگر زیستی نشان دهنده ترکیبی از علوم بیوشیمی، زیست‌شناسی مولکولی، شیمی، فیزیک، الکترونیک و کامپیوتر است. از آنجا که حسگرهای زیستی ابزاری توانمند جهت شناسایی مولکول‌های زیستی می‌باشند، امروزه از آن‌ها در علوم مختلف پزشکی، صنایع شیمیایی، صنایع غذایی، پایش محیط زیست، تولید محصولات دارویی، بهداشتی و غیره بهره می‌گیرند. حواس بویایی و چشایی انسان که به شناسایی بوها و طعم‌های مختلف می‌پردازد و یا سیستم ایمنی بدن که میلیون‌ها نوع مولکول مختلف را شناسایی می‌کند، نمونه‌هایی از حسگرهای زیستی طبیعی می‌باشند.

با پیشرفت جوانب مولکولی علوم مختلف، نیاز به اندازه‌گیری روزانه بسیاری از ملکول‌های هدف احساس می‌شد، اما روش‌های آنالیز دستگاهی برای این امر محدودیت‌هایی داشتند. از جمله این محدودیت‌ها می‌توان به هزینه بالای خرید دستگاه‌ها، هزینه بالای مواد مصرفی و نگهداری دستگاه، نیاز به تخصص کافی کاربر، زمان طولانی سنجش و محدودیت تعداد اندازه‌گیری روزانه اشاره کرد. توسعه حسگرهای زیستی از سال ۱۹۵۰ با ساخت الکترود اکسیژن برای اندازه‌گیری غلظت اکسیژن حل شده در خون آغاز شد. بعداً با پوشاندن سطح الکترود با آنزیمی که به اکسیده شدن گلوکز کمک می‌کرد از این حسگر برای اندازه‌گیری قند خون استفاده شد. به طور مشابه با پوشاندن الکترود توسط آنزیمی که قابلیت تبدیل اوره به کربنات آمونیوم را داراست در کنار الکترودی از جنس یون NH_4^+ حسگر زیستی ساخته شده که می‌توانست میزان اوره در خون یا ادرار را اندازه‌گیری کند. هر کدام از این دو حسگر اولیه از آشکارساز متفاوتی در بخش تبدیل سیگنال خویش استفاده می‌کردند. در نوع اول میزان قند خون با اندازه گیری جریان الکتریکی تولید شده اندازه‌گیری می‌شد، در حالی‌که در حسگر اوره اندازه‌گیری غلظت اوره بر اساس میزان بار الکتریکی ایجاد شده در الکترودهای حسگر صورت می‌پذیرفت. امروزه از حسگرهای زیستی برای ردیابی ویروس، باکتری و بقایای آفت‌کش‌ها، کنترل آلودگی و ردیابی

1. Immunoassay

Archive of SID

www.SID.ir

ملکول‌های سمی هوا، ردیابی داروهای غیرقانونی مانند کوکائین و هروئین، ردیابی گازهای صنعتی و سمی و سلاح‌های بیوشیمیایی استفاده می‌شود (Ivnitski *et al.*, 1999; Nayak *et al.*, 2009).

قسمت‌های مختلف و نحوه عمل حسگرهای زیستی

حسگرهای زیستی یک گروه از سیستم‌های تجزیه و اندازه‌گیری می‌باشند که طراحی آن‌ها بر مبنای شناسایی انتخابی ملکول هدف بر اساس اجزای زیستی و آشکارسازهای فیزیکوکمیکال صورت می‌پذیرد. این حسگرها به گونه‌ای طراحی می‌شوند که تنها به یک ماده‌ی خاص واکنش نشان دهند. نتیجه‌ی این واکنش به صورت پیام‌هایی در می‌آید که یک ریزپردازنده، می‌تواند آن‌ها را تحلیل کند (Chaplin, 2004).

این حسگرها از سه بخش تشکیل شده‌اند:

۱. **گیرنده زیستی[1] یا عنصر زیستی:** عبارت است از یک ماده زیستی که می‌تواند تنها با ماده خاصی به صورت انتخابی واکنش نشان دهد. عناصر زیستی که در حسگرهای زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها، اسیدهای نوکلئیک (DNA یا RNA)، میکروارگانیسم یا سلول کامل و بافت می‌باشند.

۲. **آشکارساز یا مبدل[2]:** که پس از واکنش ماده‌ای خاص با گیرنده زیستی، وارد عمل می‌شوند و می‌توانند نوع واکنش را با روش‌های مختلف فیزیکوکمیکال تشخیص داده (مثلاً با بررسی تغییرهای قبل و بعد از واکنش) و به وسیله‌ی سیگنال‌های مناسب به پردازنده ارسال کنند. در واقع مبدل، تغییر فیزیکی یا شیمیایی قابل مشاهده را به یک پیغام قابل اندازه‌گیری، که اندازه آن متناسب با غلظت ماده مورد سنجش است، تبدیل می‌کند.

۳. **بخش پردازنده[3]** : که مسئولیت نمایش نتیجه فعالیت حسگر را بر عهده دارد (Chaplin, 2004).

به عبارتی دیگر حسگر زیستی شامل یک سیستم زیستی تثبیت شده می‌باشد که در حضور ملکول هدف مورد اندازه‌گیری باعث تغییر خواص محیط اطراف می‌شود. وسیله اندازه‌گیری که به این تغییرات حساس است، سیگنالی متناسب با میزان و یا نوع تغییرات تولید می‌نماید که متعاقباً به سیگنالی قابل فهم برای دستگاه‌های الکترونیکی تبدیل می‌گردد (شکل ۱). اختصاصی بودن و قدرت شناسایی ملکول هدف[4] از میان دیگر ملکول‌های موجود در نمونه مورد آزمایش از ویژگی‌های یک حسگر زیستی می‌باشد. قابلیت انتخاب یک حسگر زیستی توسط بخش گیرنده تعیین می‌شود (Serra, 2010).

مزایای حسگرهای زیستی بر سایر سیستم‌های اندازه‌گیری موجود را می‌توان در سه مورد زیر خلاصه نمود:

۱. سیستم‌های اندازه‌گیری موجود توانایی سنجش مولکول‌های غیرقطبی که در بافت‌های حیاتی تشکیل می‌گردند را ندارند، در حالی که حسگرهای زیستی می‌توانند این ترکیبات را شناسایی و سنجش کنند. مولکول‌های غیرقطبی

[1] . Bioreceptor
[2] . Transducer
[3] . Microprocessor
[4] . Analyte

Archive of SID
www.SID.ir

زیادی در اندام‌های موجود زنده شکل می‌گیرند که به بیشتر سیستم‌های موجود اندازه‌گیری پاسخ نمی‌دهند.

۲. از آنجایی که مبنای کار حسگرهای زیستی بر اساس سیستم زیستی تثبیت و تعبیه شده در خود آن‌هاست، بنابراین آن‌ها اثرات جانبی بر سایر بافت‌ها ندارند.

۳. کنترل پیوسته و بسیار سریع فعالیت‌های متابولیسمی توسط این حسگرها امکان‌پذیر است (Serra, 2010).

دو عامل در طراحی یک حسگر زیستی مناسب نقش ایفا می‌کند:

۱. روش مناسب تثبیت گیرنده زیستی در سطح جامد که موجب افزایش طول عمر، حساسیت و پایداری آن می‌شود. به منظور ساخت یک حسگر زیستی پایدار، باید گیرنده زیستی به طرز خاصی به مبدل متصل گردد، چنین فرآیندی را تثبیت گویند. معمولاً گیرنده زیستی در سطح ترانسفرماتور تثبیت می‌شود و ترانسفرماتور را از قابلیت ردیابی واکنش با یک مولکول هدف برخوردار می‌نماید. از پنج روش جذب سطحی، ریز پوشینه‌سازی، محبوس‌سازی، پیوند عرضی و پیوند کووالانسی برای عمل تثبیت استفاده می‌شود.

۲. انتخاب مبدل مناسب

انواع متداول مبدل‌های مورد استفاده در حسگرهای زیستی شامل:

۱. **مبدل‌های الکتروشیمیایی:** بیشتر حسگرهای زیستی از مبدل‌های الکتروشیمیایی ساخته شده‌اند. ابزارهای آنالیزی ارزانی برای سنجش می‌باشند. در نوع الکتروشیمیایی عمل تبدیل واکنش به یک سیگنال الکتریکی به یکی از صورت‌های آمپرومتری، پتانسیومتری و ولتامتری صورت می‌گیرد. این روش‌ها مبتنی بر اندازه‌گیری پتانسیل یک پیل در جریان صفر است که یک پتانسیل به پیل اعمال می‌شود تا اکسایش یا کاهش ماده مورد سنجش اتفاق افتد و یک افزایش یا کاهش در جریان پیل ایجاد شود. این پتانسیل با لگاریتم غلظت ماده مورد سنجش متناسب است (Freire *et al.*, 2003).

۲. **مبدل‌های نوری:** جذب یا تابش یک طیف نورانی یا فلورسنس را اندازه می‌گیرند.

۳. **مبدل‌های پیزوالکتریک:** این ابزارها مبتنی بر تولید جریان در اثر ارتعاش در یک بلورند. فرکانس ارتعاش توسط جرم جذب شده بر روی سطح تحت تاثیر قرار می گیرد. از یک میدان الکتریکی متناوب خارجی برای سنجش مستقیم واکنش استفاده می‌نمایند (Kumar, 2000).

۴. **مبدل‌های حرارتی:** تمام فرآیندهای شیمیایی با تولید یا جذب انرژی همراه هستند. این حرارت را می‌توان با یک وسیله حساس اندازه گیری کرد و آن را به میزان واکنش نسبت داد (Ivnitski *et al.*, 1999).

حسگرهای زیستی بر اساس نحوه شناسایی ملکول هدف به دو دسته تقسیم می‌شوند:

۱. **حسگرهای زیستی با توانایی شناسایی مستقیم آنتی‌ژن:** که واکنش گیرنده با ملکول هدف مستقیماً توسط حسگر شناسایی می‌شود. عناصر زیستی مورد استفاده در این گروه، گیرنده‌های سلولی و آنتی‌بادی‌ها می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

۲. **حسگرهای زیستی دارای خاصیت شناسایی غیر مستقیم آنتی‌ژن:** واکنش گیرنده با ملکول هدف به طور غیر مستقیم توسط حسگر شناسایی می‌شود. عناصر زیستی مورد استفاده در این گروه ترکیبات نشاندار مثل آنتی‌بادی‌های نشاندار شده و یا ترکیباتی با خاصیت کاتالیتیکی مانند آنزیم‌ها می‌باشند (Ivnitski *et al.*, 1999).

تست‌های ایمنی سنجی

در ابتدای نیمه دوم قرن بیستم، محصول سیستم ایمنی هومورال یعنی آنتی‌بادی‌ها یکی از نقاط عطف را در اندازه‌گیری ملکول‌های هدف به وجود آورد. آنتی‌بادی‌ها با اتصال ویژه به ملکول هدفی که بر ضد آن تهیه شده است به عنوان ابزاری مناسب برای سنجش‌های ویژه و سریع در اختیار محققان قرار گرفت. روشی که از آنتی‌بادی‌ها به عنوان گیرنده زیستی و عامل شناساگر بهره می‌گیرد، روش ایمنی سنجی نام دارد (Dankwardt, 2000; Fan and He, 2011). روش ایمنی‌سنجی اولین‌بار در سال ۱۹۴۵ توسط لاندستینر[1] توصیف شد. وی گزارش کرد که آنتی‌بادی‌ها می‌توانند به طور انتخابی به مولکول‌های کوچک[2] متصل شوند. این اصل توسط یالو و برسون[3] در اواخر دهه ۱۹۵۰ بسط داده شد و منجر به گزارش یک ایمنی‌سنجی شد که برای سنجش انسولین در انسان به کار گرفته شد. آن‌ها که در سنجش خود از سیستم ایمنی و رادیواکتیویته استفاده کرده بودند، روش مذکور را ایمنی سنجی رادیواکتیو نام نهادند (Dankwardt, 2000; Fan & He, 2011).

اولین کاربرد تکنولوژی مبتنی بر استفاده از آنتی‌بادی‌ها به عنوان گیرنده زیستی برای آفت‌کش‌ها در سال ۱۹۷۰ توسط سنتنو و جانسون با تولید آنتی‌بادی‌هایی که به طور انتخابی به مالاتیون متصل می‌شدند، گزارش شد. چند سال بعد تست‌های ایمنی سنجی برای آلدرین، دی‌آلدرین و پاراتیون ایجاد شدند. در سال ۱۹۷۲، انگوال و پرمان، استفاده از آنزیم‌ها در ایمنی سنجی را شرح داده و واژه الایزا را معرفی نمودند. در سال ۱۹۸۰، هاموک و موما، پتانسیل الایزا برای آنالیز مواد شیمیایی کشاورزی و مواد آلاینده محیط را توصیف نمودند. از آن به بعد، استفاده از تست‌های ایمنی برای آنالیز باقی‌مانده آفت‌کش‌ها به شدت افزایش یافت (Kim *et al.*, 2007). مزیت‌های روش ایمنی‌سنجی در قیاس با دیگر روش‌های آنالیتیکی در بررسی‌های متعددی مورد بحث قرار گرفته است که می‌توان به موارد زیر اشاره نمود: محدودیت کم در ردیابی، انتخاب‌گری زیاد آنالیت، آماده‌سازی سریع و ساده نمونه، حساسیت به آنالیت‌های هدف، هزینه کم برای نمونه‌های بزرگ و قابلیت به کارگیری در شرایط مزرعه. با این وجود این روش نیز مانند هر روش آنالیتیکی دیگر دارای معایب و محدودیت‌های خاص خود است که می‌توان به مواردی از قبیل مداخله احتمالی مواد شیمیایی طبیعی موجود در نمونه در روند سنجش ماده شیمیایی مورد نظر، واکنش متقاطع آنتی‌بادی‌ها با ملکول‌های هدف مشابه، عدم قابلیت آنالیز هم‌زمان چند ملکول هدف، دسترسی

1. Landsteiner
2. Haptens
3. Yalow and Berson

Archive of SID

www.SID.ir

کم به واکنش‌گرها و صرف زمان بیشتر در مقایسه با بعضی از روش‌های کلاسیک اشاره نمود (Dankwardt, 2000; Fan & He, 2011).

حد تشخیص اکثر روش‌های ایمنی‌سنجی برای آفت‌کش‌ها در حدود یک قسمت در میلیون تا یک قسمت در بیلیون می‌باشد. به عنوان مثال برای علف‌کش‌های گروه ترای آزین و اوره تست‌های ایمنی سنجی رقابتی با محدوده آشکارسازی ۵۰-۱ نانوگرم بر لیتر ابداع گردیده است (Shan *et al.*, 2002). این روش‌ها قابلیت آنالیز تعداد فراوانی نمونه با حجم کم را در مدت زمان اندک دارند. تست‌های ایمنی سنجی برای آنالیز مولکول‌های کوچک شامل مواد دارویی و آفت‌کش‌ها، شناسایی گونه‌های آفت و مفید، شناسایی بیماری، ردیابی موجودات تراریخت و ردیابی بیوتروریسم قابل استفاده می‌باشند.

اصول روش‌های ایمنی سنجی

ایمنی سنجی، روش تجزیه و تحلیل کمی و کیفی ماده است که به یک یا ترکیبی از آنتی‌بادی-ها متکی است. آنتی‌بادی گروهی از پروتئین‌ها هستند که توانایی منحصر به فرد برای اتصال بسیار اختصاصی به یک ملکول را دارند و توسط سیستم ایمنی موجود زنده بر علیه مواد خارجی مانند عوامل بیماری‌زا تولید می‌شود. ساختمان اصلی ملکول آنتی‌بادی در شکل ۲ نشان داده شده است که شامل دو زنجیره سبک و دو زنجیره سنگین است که اتصال قطعات به وسیله پیوندهای دی‌سولفیدی انجام می‌شود. بر روی هر زنجیره ناحیه تنظیمی و ناحیه تعیین آنتی‌ژن مکمل وجود دارد و محل اتصال آنتی‌ژن نیز در اسید آمینه انتهایی زنجیره‌ها قرار دارد (Fan & He, 2011). ملکولی که به آنتی‌بادی متصل می‌شود و می‌تواند توسط سیستم ایمنی موجود زنده شناسایی شود، آنتی‌ژن نامیده می‌شود. ایمنی سنجی مبتنی بر واکنش ملکول هدف یا آنتی‌ژن با ملکول مکمل‌اش یعنی آنتی‌بادی برای تولید یک محصول قابل اندازه‌گیری و در نهایت شناسایی ملکول هدف می‌باشد (Shan *et al.*, 2002).

روش‌های مختلف ایمنی سنجی، مزایا و معایب آن‌هابسته به نشانگر مورد استفاده، تست‌های ایمنی به گروه‌های مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند که از آن جمله می‌توان به رادیوایزوتوپ‌ها در ایمنی سنجی رادیواکتیو[1]، آنزیم‌ها در ایمنی سنجی آنزیمی[2] و فلوروفورها در ایمنی سنجی فلوئورسانس[3] اشاره کرد.

ایمنی سنجی رادیواکتیو: در واکنش میان آنتی‌ژن و آنتی‌بادی هر کدام از این دو جزء را می‌توان با ماده رادیواکتیو نشاندار ساخت و از لحاظ ردیابی ترکیب ایجاد شده، تفاوتی میان جایگاه اتصال ماده رادیواکتیو وجود ندارد هر چند که با همین تغییر جایگاه نشاندارسازی برخی از پارامترهای متدولوژیک دچار تغییر خواهند شد. چنانچه آنتی‌ژن با ماده رادیواکتیو نشاندار شود، سنجش را رادیو ایمنی سنجی می‌نامند. اساس روش رادیو ایمنی سنجی رقابت میان آنتی‌ژن نشاندار و آنتی ژن موجود در نمونه مورد سنجش بر سر اتصال به آنتی‌بادی است. از آنجایی که هر قدر میزان آنتی‌ژن موجود در نمونه سنجش بیشتر

1. Radio Immuno Assays (RIA)
2. Enzyme Immuno Assays (ELISA یا EIA)
3. Fluoro Immuno Assays (FIA)

Archive of SID

www.SID.ir

باشد، آنتی‌ژن رادیواکتیودار کمتری به آنتی‌بادی متصل می‌شود، میزان ترکیب آنتی‌ژن رادیواکتیو با آنتی‌ژن غیر رادیواکتیو رابطه معکوس دارد. از آنجایی که تماس ماده رادیواکتیو با سطح پوست بدن گرما و سوزش ایجاد می‌کند، لذا برخی محققان آنتی‌ژن رادیواکتیودار را آنتی‌ژن گرم و آنتی‌ژن غیررادیواکتیو را آنتی‌ژن سرد نامیده، اساس رادیو ایمنی سنجی را رقابت بین آنتی‌ژن سرد و گرم می‌دانند. از این‌رو این روش سه جزء اصلی دارد: آنتی‌بادی، آنتی‌ژن سرد و آنتی ژن گرم (Shan *et al.*, 2002).

به طور کلی در روش رادیو ایمنی سنجی، آنتی‌ژن سرد و آنتی‌ژن گرم بر سر اتصال به مقدار معین و محدودی از آنتی‌بادی با هم رقابت می‌کنند. با توجه به این‌که اساس این روش رقابت است و رقابت در محدودیت معنا می‌یابد، لذا به این روش، معرف محدود نیز می‌گویند. در این روش ابتدا رقابت میان مقادیر متفاوت و معینی از آنتی‌ژن سرد با مقدار معین و ثابتی از آنتی‌ژن گرم بر سر اتصال مقدار معین و محدودی از آنتی‌بادی ایجاد می‌شود که ماحصل آن به دست آمدن منحنی استاندارد است. با توجه به رابطه معکوس میان کمپلکس رادیواکتیو و میزان آنتی‌ژن سرد، همواره منحنی‌های استاندارد شکلی نزولی دارند. در منحنی استاندارد همیشه محور x ها نشان‌دهنده غلظت آنتی‌ژن سرد و محور y ها نشان‌دهنده میزان ترکیب رادیواکتیو بر حسب تعداد در دقیقه است. از آنجائی‌که رادیواکتیویته و ناپایداری هسته برخی از ایزوتوپ‌های اتمی یک پارامتر ثابت فیزیکی است و از طرفی میزان آنتی‌ژن گرم، همواره ثابت و معین است بنابراین میزان رادیواکتیویته تمام غلظت‌های استاندارد با هم برابر بوده، همواره منحنی استاندارد به صورت خطی موازی محور x ها خواهد بود. یعنی به‌رغم اینکه میزان کمپلکس رادیواکتیو در هر غلظت استاندارد متفاوت است اما میزان رادیواکتیویته کل هر نقطه استاندارد با سایر نقاط برابر است، لذا در این مرحله نیاز به جداسازی آنتی‌ژن گرم از ترکیب رادیواکتیو وجود دارد. مرحله جداسازی با روش‌های متفاوتی امکان‌پذیر است که از آن جمله می‌توان به استفاده از آنتی‌بادی دوم، استفاده از محلول‌های پلیمری مانند پلی‌اتیلن گلیکول، استفاده از تثبیت آنتی‌بادی‌ها و استفاده از ذرات مغناطیس اشاره کرد (Dankwardt, 2000; Fan & He, 2011).

پس از مرحله جداسازی، رابطه معکوس بین غلظت آنتی‌ژن سرد و ترکیب رادیواکتیو می‌تواند مبنای سنجش آنتی‌ژن موجود در نمونه مورد بررسی باشد. با استفاده از منحنی استاندارد از میزان ترکیب رادیواکتیوی که در مجاورت آنتی‌ژن سرد مجهول تشکیل می‌گردد می‌توان به میزان آنتی‌ژن سرد پی برد. در هر حال، امروزه اغلب روش‌های رادیو ایمنی سنجی به صورت غیر رقابتی و ساندویچی اجرا می‌گردند. یعنی ملکول هدف توسط دو آنتی‌بادی ساندویچ می‌گردد که یکی از این آنتی‌بادی‌ها توسط ماده رادیواکتیو نشاندار شده است. در این روش به ازای هر ملکول هدف یک ساندویچ نشاندار تشکیل می‌گردد، لذا رابطه مستقیم میان ملکول هدف و کمپلکس رادیواکتیو برقرار است. در عمل، ابتدا به ازای مقادیر معین ملکول هدف، کمپلکس‌های رادیواکتیو تشکیل

Archive of SID

www.SID.ir

می‌گردد. غلظت ملکول هدف روی محور x ها و میزان کمپلکس رادیواکتیو روی محور y ها قرار گرفته و بدین ترتیب منحنی صعودی که نشانه رابطه مستقیم غلظت ملکول هدف با کمپلکس رادیواکتیو است، تشکیل می‌گردد. بر اساس میزان کمپلکس رادیواکتیو در نمونه‌های مجهول و استفاده از منحنی فوق، غلظت ملکول هدف مجهول محاسبه می‌گردد (Dankwardt, 2000; Fan & He, 2011).

از محدودیت‌ها و معایب روش‌های ایمنی سنجی رادیواکتیو می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱. خطر تشعشع
۲. نیاز به امکانات حفاظتی در برابر پرتوها
۳. تولید زباله‌های رادیواکتیو
۴. محدود بودن زمان انقضاء کیت‌ها به دلیل نیمه‌عمر کوتاه
۵. محدودیت اتوماسیون

ایمنی سنجی آنزیمی: اساس این روش‌ها مانند ایمنی سنجی رادیواکتیو همان واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی است، با این تفاوت که جهت ردیابی واکنش مذکور به جای رادیواکتیویته از آنزیم‌ها و واکنش‌های آنزیمی استفاده می‌شود. در این روش نیز می‌توان جهت ردیابی واکنش، آنتی‌ژن و یا آنتی‌بادی را با آنزیم نشاندار ساخت. به عمل نشاندارسازی، کانژوگاسیون[1] و به مولکول آنزیم‌دار، کانژوگه آنزیمی[2] می‌گویند. اساس سنجش‌های ایمنی آنزیمی، رقابت میان آنتی‌ژن کونژوگه و آنتی‌ژن آزاد در نمونه مورد سنجش بر سر اتصال به آنتی‌بادی مشترک است. پس از جداسازی کمپلکس آنزیم‌دار از کانژوگه آزاد، فعالیت آنزیمی مبنای سنجش قرار می‌گیرد. در اینجا نیز رابطه معکوس میان کمپلکس آنزیمی و ملکول هدف وجود دارد. ابتدا واکنش آنزیمی مربوط به کمپلکس آنزیمی در حضور مقادیر معینی از ملکول هدف (استانداردها) بررسی شده، محور x ها نشان‌دهنده غلظت ملکول هدف و محور y ها مؤید فعالیت کمپلکس آنزیم‌دار بر حسب جذب نوری است. منحنی استاندارد نزولی رسم شده و بر اساس آن میزان آنالیت در نمونه‌های مجهول سنجیده می‌شود (شکل ۳) (Dankwardt, 2000; Fan & He, 2011).

ایمنی سنجی آنزیمی علاوه بر امکان ردیابی، امکان تقویت نیز دارد یعنی واکنش آنزیمی، هر آنالیت[3] را به یک کمپلکس آنزیم‌دار و هر آنزیم را به میلیون‌ها تغییر در ماده اولیه یا محصول مرتبط می‌سازد. از آنجایی که آنزیم‌های متفاوت، واکنش آنزیمی متفاوت و قابل ردیابی ایجاد می‌کنند در یک نمونه می‌توان با استفاده از دو یا چند کانژوگه آنزیمی و پی‌گیری چند فعالیت آنزیمی، چند آنالیت را به طور هم‌زمان مورد سنجش قرار داد. هر چند فراهم آوردن شرایط یکسان برای فعالیت مناسب چند نوع آنزیم کار پیچیده‌ای است اما امکان‌پذیر است و امکان سنجش هم‌زمان، زمان و هزینه‌ها را کاهش می‌دهد.

یکی از تفاوت‌های ایمنی سنجی رادیواکتیو با ایمنی سنجی آنزیمی در این است که اغلب، آنالیت رادیواکتیودار از لحاظ ساختمان شیمیایی و ابعاد فیزیکی با آنالیت سرد یکسان بوده یا تفاوت

[1] . Conjugation
[2] . Enzymatic conjugate
[3] . Analyte

Archive of SID

www.SID.ir

ناچیزی دارد اما در ایمنی سنجی آنزیمی، ملکول هدف کانژوگه شده به آنزیم (که اغلب مولکول‌های پروتئینی بزرگی است) متفاوت است، لذا نوع آنتی‌بادی به‌کار رفته و شرایط سنجش بخصوص زمان انکوباسیون به‌گونه‌ای طراحی می‌شود که این تفاوت ساختمان و ابعاد بر واکنش آنتی‌ژن- آنتی‌بادی اثر سوء به جای نگذارد.

از مزایای روش‌های ایمنی سنجی آنزیمی نسبت به روش‌های ایمنی سنجی رادیواکتیو می توان به مواردی از جمله عدم وجود خطر تشعشع، قیمت ارزان‌تر دستگاه‌ها، معرف‌های ارزان، نیمه‌عمر طولانی کیت‌های آنزیمی، امکان اتوماسیون، سرعت خوانش بالا و امکان افزایش حساسیت روش اشاره نمود.

ایمنی سنجی آنزیمی دارای برخی محدودیت‌ها نیز هست:

۱.فعالیت رادیواکتیو یک پارامتر ثابت فیزیکی است که میزان آن تحت تأثیر شرایط محیطی مانند نور، درجه حرارت، آلودگی و ... قرار نمی‌گیرد اما واکنش آنزیمی تحت تأثیر پارامترهای مختلف قرار می‌گیرد لذا ردیابی رادیواکتیو پایدارتر و آسان‌تر از اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی است.

۲.اجزاء مختلف موجود در نمونه می‌توانند واکنش آنزیمی را تحت تأثیر قرار دهند.

۳.سیستم‌های هوموژن آنزیمی در حال حاضر فاقد حساسیت کافی بوده، در ضمن کاربرد آن‌ها عمدتاً به ملکول‌های کوچک محدود شده است.

ایمنی سنجی آنزیمی متداول‌ترین تست‌های ایمنی مورد استفاده برای آنالیز آفت‌کش‌ها بخصوص علف‌کش‌ها می‌باشند، زیرا امکان دسترسی به محدوده‌های آشکارسازی پایین بدون نیاز به استفاده از رادیوایزوتوپ‌ها را فراهم می‌نماید. برای استفاده از یک آنزیم به عنوان نشانگر در ایمنی سنجی آنزیمی بایستی آن آنزیم از خصوصیات زیر برخوردار باشد:

۱.فعالیت اختصاصی زیاد

۲.در دسترس بودن محلول آنزیم خالص با قیمت کم و کیفیت تکرارپذیر

۳.ثبات زیاد در شکل آزاد و کانژوگه در شرایط ذخیره و آزمایش

۴.برخورداری از گروه‌های واکنش دهنده برای برقراری پیوند کووالانسی با ملکول کوچک

۵.روش کانژوگاسیون ساده

۶.سوبستراهای (زیرلایه ها) غیر سمی ارزان و با ثبات با قدرت تشکیل محصولات رنگ‌زا پایدار

استفاده از آنتی‌بادی‌ها به عنوان گیرنده زیستی برای آنالیز باقی‌مانده آفت‌کش‌ها در مورد تعداد زیادی از آفت‌کش‌ها بخصوص علف‌کش‌ها بهینه گردیده و در بسترهای مختلفی همچون آب‌های سطحی، آب‌های زیرزمینی، آب‌های جاری، خاک، رسوبات، گیاهان زراعی، شیر، گوشت، تخم‌مرغ، دانه غلات و خون به کار گرفته شده‌اند. جدول ۱ فهرست مواردی از تست‌های ایمنی انجام شده برای آنالیز باقی‌مانده آفت‌کش‌ها از سال ۱۹۹۵ با تأکید بر نوع روش و نوع آنتی‌بادی مورد استفاده را ارائه می‌دهد.

کاربردهای حسگرهای زیستی در آنالیز باقی‌مانده آفت‌کش‌ها در مواد گیاهی و غذایی

استفاده از حسگرهای زیستی برای آنالیز بقایای آفت‌کش‌ها در محیط در سال‌های اخیر رو به

Archive of SID

www.SID.ir

گسترش بوده است. کابرد این ابزارها در سطوح کلینیکی، جلوتر از کاربرد آن‌ها در ردیابی محیطی است. از سوی دیگر، این روش رقابت شدیدی را با روش‌های تثبیت شده و پرکاربرد آنالیز دستگاهی برای ردیابی پیوسته آفت‌کش‌ها در محیط، آغاز نموده است. در زمینه آنالیز آفت‌کش‌ها، آنزیم‌های استیل کولین استراز[1] و بوتیریل کولین استراز[2] که تعیین کننده غلظت آفت‌کش‌ها در نمونه مورد آزمایش می‌باشد به طور گسترده‌ای استفاده شده است. سایر آنزیم‌ها مانند تیروزیناز[3] و آلکالین فسفاتاز[4] نیز برای آنالیز بقایای آفت‌کش‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. هم‌چنین از فعالیت هیدرولیتیکی آنزیم پاراتیون فسفاتاز برای تعیین غلظت پاراتیون استفاده شده است. روش‌هایی بر اساس گیرنده‌های زیستی مختلف از قبیل غشاهای کلروپلاستی و تیلاکوئیدی، جلبک‌های تک سلولی و باکتری‌های ارغوانی برای آنالیز بقایای علف‌کش‌های فنیل اوره، ترای آزین، پروپانیل، دایورون و آیزوپروتورون توسعه یافته‌اند. محدودیت اصلی این روش‌ها که مانع از استفاده گسترده آنهاست، پیچیدگی آماده‌سازی نمونه و بی‌ثباتی گیرنده‌های زیستی است (Patel, 2002). در سال‌های اخیر حسگرهای زیستی مبتنی بر آنتی‌بادی مختلف و متعددی برای ردیابی گروه‌های مهم آفت‌کش‌ها نظیر علف‌کش‌های گروه ترای آزین و اترازین در محیط و نمونه‌های محیطی طراحی گردیده است. یکی از این حسگرهای زیستی قادر است تربوترین را در دامنه ۶۰-۱۵ نانو مولار شناسایی نماید و تعدادی حسگر زیستی برای تشخیص آترازین تا محدوده ۱۰ قسمت در بیلیون توسعه یافته است. توسعه حسگرهای زیستی مبتنی بر آنتی‌بادی یکی از فعال‌ترین عرصه‌های تحقیق در زمینه تشخیص مواد شیمیایی کم‌خطر است (Shan *et al.*, 2002). تعدادی از آفت‌کش‌ها که تاکنون توسط حسگرهای زیستی شناسایی شده‌اند همراه با نوع حسگر زیستی مورد استفاده، روش تشخیص به کار رفته در حسگر زیستی و حد تشخیص آفت‌کش توسط حسگر زیستی در جدول ۲ خلاصه شده است.

کاربردهای منحصر به فرد زیادی برای تشخیص مواد شیمیایی کم‌خطر در شیمی آفت‌کش‌ها وجود دارد که می‌توان به مواردی از جمله ردیابی مواجه با انسان، ردیابی مزرعه‌ای، آنالیز مولکول‌های پیچیده و ارزیابی باقی‌مانده مواد آلوده کننده مضر در نمونه‌های مختلف اعم از خوراکی، غیر خوراکی، گیاهی، حیوانی و محیطی اشاره کرد. هم‌زمان با ظهور تعداد بیشتری از مولکول‌های آفت‌کش غیر فرار و پیچیده و نیاز به ردیابی متابولیت‌های قطبی، فرآورده‌های حاصل از تجزیه محیطی و موجودات تراریخته می‌باشیم، این کاربردها نیز توسعه می‌یابند. تحقیقات جدید در زمینه ابداع شکل‌های جدید و کاربردهای جدید تست‌های تشخیص مواد شیمیایی کم‌خطر حاکی از تداوم اهمیت این تکنولوژی از دیدگاه شیمی‌دان‌های علوم محیطی است. تکنیک‌های تلفیقی حاصل از روش‌های آنالیز دستگاهی و حسگرهای زیستی و موفقیت آن‌ها در ارزیابی مواد

[1] . Acetyl choline esterase
[2] . Butyryl choline esterase
[3] . Tyrosinase
[4] . Alkaline phosphatase

Archive of SID

www.SID.ir

شیمیایی مورد نظر در نمونه‌های مختلف، شاهدی بر این ادعا می‌باشد (Ivnitski *et al.*, 1999).

آفت‌کش‌های متعددی با استفاده از آزمایشات ایمیونولوژیکی در نمونه‌های غذایی شناسایی شده‌اند. عمدتاً از آنتی بادی‌های پلی‌کلونال[1] (مخلوطی از آنتی‌بادی‌های مختلف) استفاده می‌شود، لیکن آنتی‌بادی‌های مونوکلونال[2] (استفاده از یک آنتی‌بادی خاص) نیز برای تشخیص آترازین، بنزیمیدازول‌ها، تیابندازول‌ها و کاربارایل تولید شده‌اند. براندون و همکاران (Brandon *et al.*, 1995) نمونه‌هایی از پوست سیب‌درختی، سیب‌زمینی، پرتقال، گریپ فروت و موز را برای تشخیص باقی‌مانده تیابندازول با استفاده از یک تست ایمنی با آنتی‌بادی مونوکلونال مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش کردند که حد تشخیص غلظت تیابندازول در نمونه‌های مورد مطالعه توسط ایمنی سنجی آنزیمی، ۱ قسمت در میلیون می‌باشد. نتایج این تحقیق در مقایسه با آنالیز HPLC تایید گردیده است.

ون‌امون و همکاران (Van Emon *et al.*, 1987) پاراکوات را در نمونه‌های شیر، گوشت گاو و سیب‌زمینی توسط آزمایش ایمنی سنجی آنزیمی با آنتی بادی پلی‌کلونال تعیین نمودند و گزارش نمودند که مقادیر کمتر از ۱ قسمت در بیلیون در شیر و کمتر از ۲/۵ قسمت در بیلیون در گوشت تشخیص داده شده است. نیوسام (Newsome, 1986) قارچ کش تریادمیفون را به نمونه‌های مختلفی از سیب درختی، گلابی، آناناس و انگور اضافه نمود و سپس باقی‌مانده قارچ‌کش‌ها را توسط ایمنی سنجی آنزیمی و دستگاه GC پس از عصاره‌گیری با اتیل استات یا متانول تعیین نمود. در این تحقیق بازیابی‌های صورت گرفته توسط ایمنی سنجی آنزیمی به خوبی با داده‌های بدست آمده از طریق GC، همبستگی نشان داده است.

آباد و مونتویا (Abad & Montoya, 1995) از یک آزمون ایمنی سنجی آنزیمی مبتنی بر آنتی‌بادی مونوکلونال برای تعیین کاربارایل در نمونه‌های آب گریپ‌فروت و سیب استفاده نمودند. این نمونه‌ها بدون هیچ‌گونه پیش تیماری مورد آنالیز قرار گرفتند و تاثیر رقیق سازی ماتریکس با استفاده از رقت‌های مختلف نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای یک آنالیز مناسب بایستی نمونه‌ها حداقل به نسبت ۱ به ۵ تا ۱ به ۱۰ رقیق شوند. با رقت ۱ به ۱۰۰ دقیق‌ترین نتایج بدست آمده‌اند. در این تحقیق، حداقل غلظت کاربارایل موجود در آب میوه‌ها که با استفاده از ایمنی سنجی آنزیمی با اطمینان قابل تشخیص است، غلظت ۵-۱ میکروگرم بر لیتر گزارش گردیده است.

پیشرفت‌های جدید و چشم‌انداز آینده

طراحی حسگرهای زیستی در زمینه های مختلف علوم زیست‌شناسی و پزشکی در دو دهه گذشته گسترش چشم‌گیری داشته است. هم‌چنین در سال‌های اخیر با طراحی نانو زیست‌حسگرها حساسیت روش‌های مورد اندازه‌گیری افزایش چشم‌گیری پیدا کرده است. تداوم پیشرفت حسگرهای زیستی در آینده مستلزم همکاری دانشمندان علوم مختلف است. بهبود تکنولوژی

[1] . Polyclonal
[2] . Monoclonal

Archive of SID

www.SID.ir

ترانسفورماتور به منظور امکان تشخیص مستقیم نمونه‌های محیطی، افزایش تعداد ملکول‌های هدف که با تکنولوژی حسگر زیستی قابل آنالیز هستند و تولید حسگرهای زیستی ترکیبی قادر به آنالیز همزمان چند ملکول هدف، رئوس محورهای تحقیق در زمینه حسگرهای زیستی و کاربرد آن‌ها در آنالیز باقیمانده آفت‌کش‌ها است (Marco & Barcelo, 1998). تراشه‌های[1] آزمایشگاهی و فناوری نانو دو دستاورد علمی هستند که انتظار می‌رود تأثیر قابل ملاحظه‌ای در حسگرهای زیستی داشته باشند. کاربرد تراشه‌ها مستلزم کوچک‌سازی اجزای ضروری تکنیک حسگرهای زیستی یعنی آماده‌سازی نمونه، واکنش با معرف‌های مناسب و تشخیص در مقیاس قابل کاربرد بر روی تراشه می‌باشد. فناوری نانو به بهره‌برداری کلیه فرآیندهای شیمیایی، فیزیکی، مکانیکی و زیستی از طریق کنترل در سطح اتم، ملکول یا ماکروملکول برای تولید ساختارها و قطعات در اندازه ۰/۱ نانومتر تا حدود ۱۰۰ نانومتر و گاهی بیشتر اشاره دارد. پیش‌بینی شده است که حسگرهای در مقیاس نانو که در بررسی متابولیسم سلول زنده مورد استفاده قرار می‌گیرد و حسگرهای فوق‌العاده کوچک که برای ارزیابی طیف وسیعی از مواد شیمیایی به کار می‌رود می‌تواند به تولید نسل جدیدی از حسگرهای زیستی که مبتنی بر بیوتکنولوژی است منجر شود (Wilson & Nie, 2006; Patel, 2002)

در کاربردهای متعدد حسگرهای زیستی در پزشکی، تحلیل محیطی و صنایع شیمیایی نیاز به روش‌هایی جهت حس کردن مولکول‌های زیستی کوچک وجود دارد. از آنتی‌بادی‌ها به صورت گسترده به عنوان حسگر زیستی استفاده می‌شود. آنتی‌بادی‌ها، حسگرهای زیستی پیشتاز در طبیعت هستند، به همین دلیل توسعه تست‌های تشخیصی با استفاده از آنتی‌بادی‌ها یکی از زمینه‌های بسیار موفق در فناوری زیستی است. از آنجائی‌که زمان و هزینه از فاکتورهای مهم در ارزیابی و نظارت محیط زیست می‌باشند، این احتمال وجود دارد که حسگرهای زیستی مبتنی بر آنتی‌بادی دارای کاوشگر کوچک و دارای قدرت بازخوانی مستمر نتایج آنالیز ملکول هدف به سرعت توسعه یابند (Patel, 2002).

نتیجه گیری

مقوله روش‌های مختلف سنجش مواد یکی از مهم‌ترین شاخه‌های تحقیقاتی به‌شمار می‌آید که گاه نقاط عطفی در این میان پدید آمده و روش جدیدی مطرح می‌گردد و تا رسیدن به روشی تازه، تحقیقات در جهت اصلاح و بهبود روش قبلی ادامه می‌یابد. بدیهی است که هر روش معایب و محاسن خود را داشته و با توجه به این ویژگی‌ها، گسترش یافته یا محدود می‌شود. گاهی نیز روش‌های جدید جایگزین روش‌های قبلی نیست، بلکه به موازات آن‌ها از محدودیت‌های موجود می‌کاهند. حسگر زیستی، سیستمی با اندازه کوچک، قابل اعتماد، حساسیت بالا و قابل حمل بوده که می‌تواند ملکول مورد نظر را در غلظت‌های بسیار کم در نمونه‌های زنده اندازه‌گیری کند. استفاده از حسگرهای زیستی به دلیل دقت و حساسیت روش و هم‌چنین در مواردی به دلیل عدم نیاز به وسایل پیشرفته و صرف

www.SID.ir

زمان و هزینه زیاد برای تشخیص ملکول‌های هدف در مراکز کوچک و در مراکز با امکانات کم و حتی در منزل نیز کاربرد دارد.

با پیشرفت جوانب مولکولی علوم مختلف، نیاز به اندازه‌گیری روزانه بسیاری از ملکول‌های هدف احساس می‌شد، اما روش‌های دستگاهی برای این امر محدودیت‌هایی داشتند. از جمله این محدودیت‌ها می‌توان به هزینه بالای خرید دستگاه مذکور، هزینه بالای مواد مصرفی و نگهداری دستگاه، نیاز به تخصص کافی کاربر، زمان طولانی سنجش و محدودیت تعداد اندازه‌گیری روزانه اشاره کرد. تا نیمه اول قرن بیستم به کمک روش‌های آنالیز دستگاهی، سنجش‌های دقیق و حساسی جهت اندازه‌گیری ملکول‌های هدف به کار می‌رفت. از آنجایی که خواص فیزیکوشیمیایی مورد استفاده در تشخیص و اندازه‌گیری ملکول‌های هدف اغلب از ویژگی لازم برخوردار نبودند، لذا روش‌های جدیدی ایجاد شدند که از آن جمله به حسگرهای زیستی می‌توان اشاره کرد که جهت سنجش‌های ویژه و حساس ملکول‌های هدف طراحی و در دسترس محققان قرار گرفته‌اند. آفت‌کش‌ها بایستی به مقادیر پایه قابل تشخیص در یک ماده غذایی وجود داشته باشند، تا بتوان آن‌ها را شناسایی و کمیت‌سنجی نمود. تشخیص این مقادیر اندک آفت‌کش در حضور مقادیر عظیمی از دیگر مواد شیمیایی که به طور طبیعی در مواد غذایی وجود دارند، یک دغدغه مهم دارد که عبارت است از مداخله احتمالی این مواد شیمیایی طبیعی در روند سنجش ماده شیمیایی مورد نظر.

به طور کلی حسگرهای زیستی دارای مزایای زیر می‌باشند:

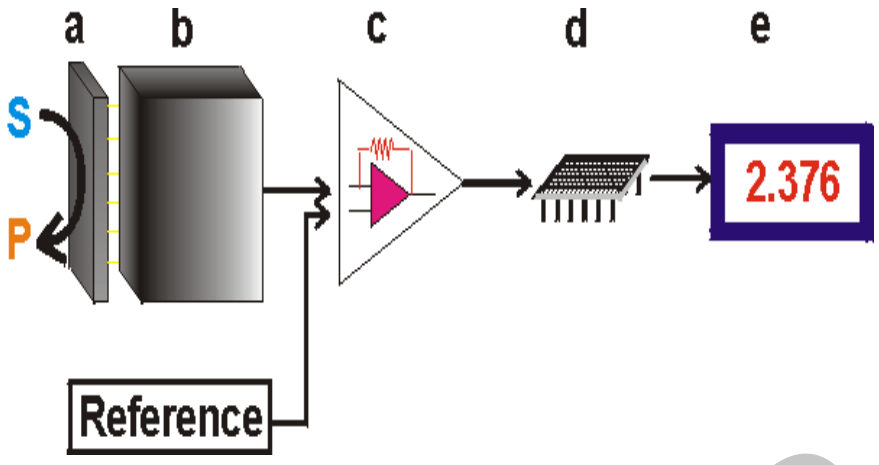
۱. اختصاصی بودن: مانند تمامی روش‌های زیستی آنالیز، از ترکیبات زیستی به عنوان گیرنده استفاده می‌کنند. عناصر زیستی توانایی نشاندار شدن و تشخیص ملکول هدف از سایر مواد مشابه را دارند.

۲. سرعت و سادگی روش: ویژگی منحصر به فرد حسگرهای زیستی این است که آنالیز ملکول هدف به طور مستقیم و سریع قابل انجام است و نیازی به کاربرد معرف و انجام مراحل طولانی در آزمایشگاه نمی‌باشد.

۳. قابلیت آنالیز و ردیابی مداوم: عناصر زیستی مورد استفاده می‌توانند دوباره مورد استفاده قرار گیرند. به طور مثال آنزیم مورد استفاده برای چندین مرحله و در آنالیزهای متعدد به کار می‌رود در حالی‌که در روش‌های ایمنی سنجی، آنزیم مورد استفاده فقط یک بار کاربرد دارد.

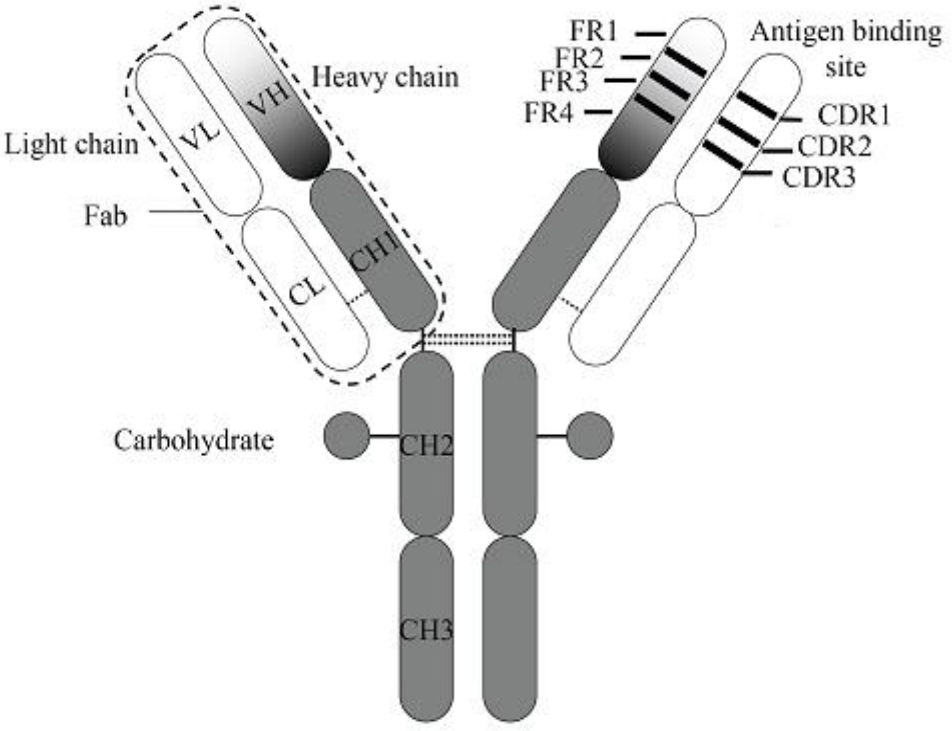
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- شمایی از اجزای اصلی یک حسگر زیستی. ماده مورد سنجش به محصول تبدیل می‌شود (a)، واکنش تو سط مبدل به سیگنال الکتریکی تبدیل می‌شود (b)، سیگنال خارج شده از مبدل، تقویت (c)، پردازش (d) و نمایش (e) داده می‌شود.

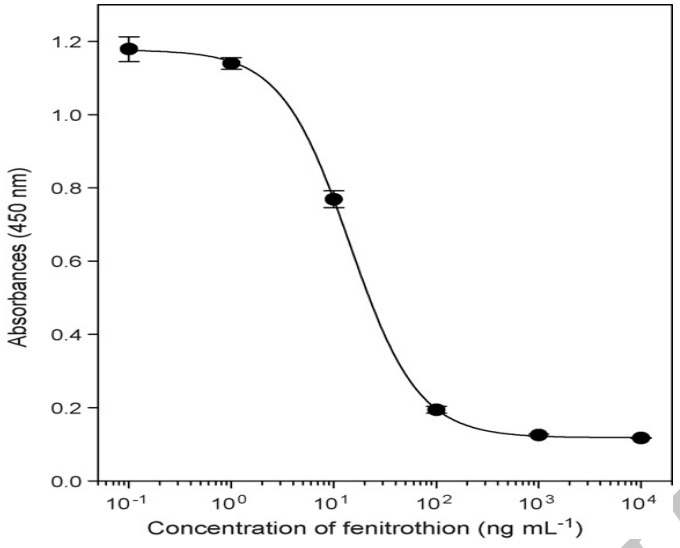
Figure 1- Schematic diagram of the main components of a biosensor. Measurement Matter is converted to product (a), Response by transducer converting the electrical signal (b), the signal coming out of the transducer amplify (c), processed (d) and displayed (e).



شکل ۲- ساختمان آنتی‌بادی و قطعات تشکیل دهنده آن (Fan and He, 2011)

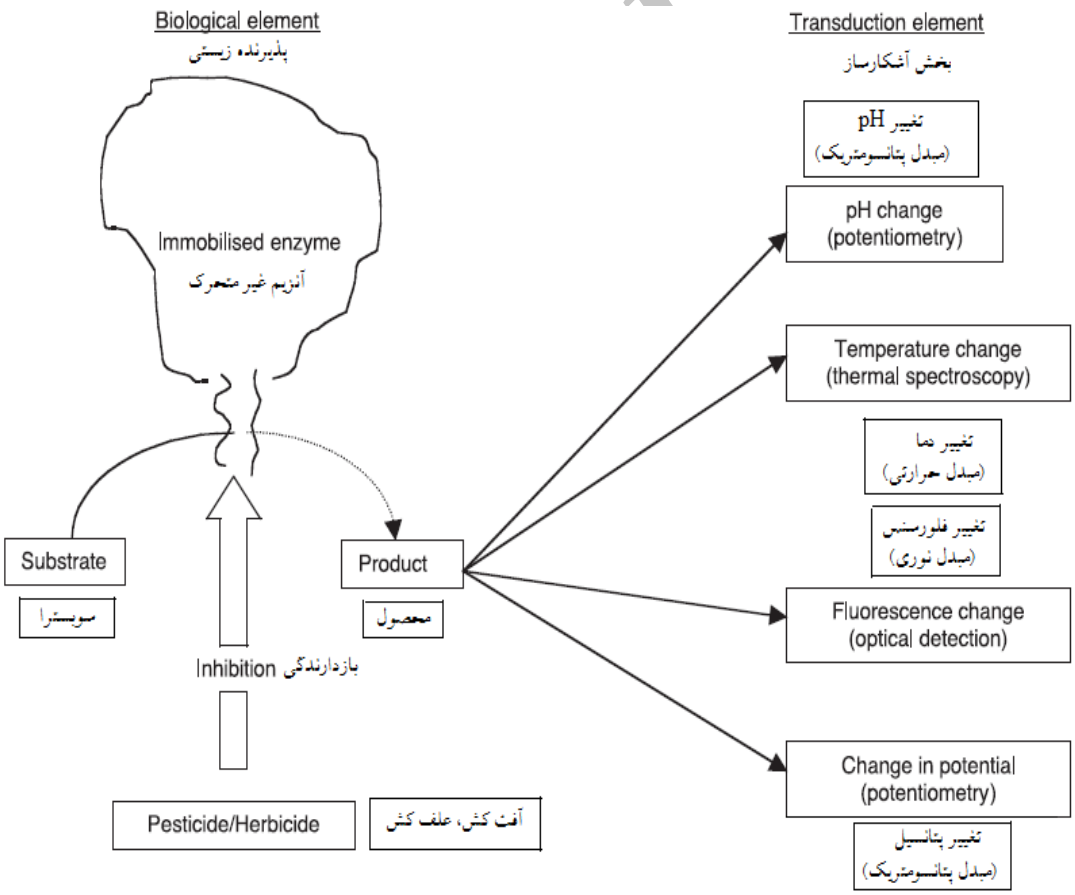
Figure 2- Structure of antibody and its fragments (Fan and He, 2011)

www.SID.ir



شکل ۳- منحنی استاندارد برای فنیتروتیون(حشره کش) در روش ایمنی سنجی آنزیمی رقابتی (Kim *et al.*, 2007)

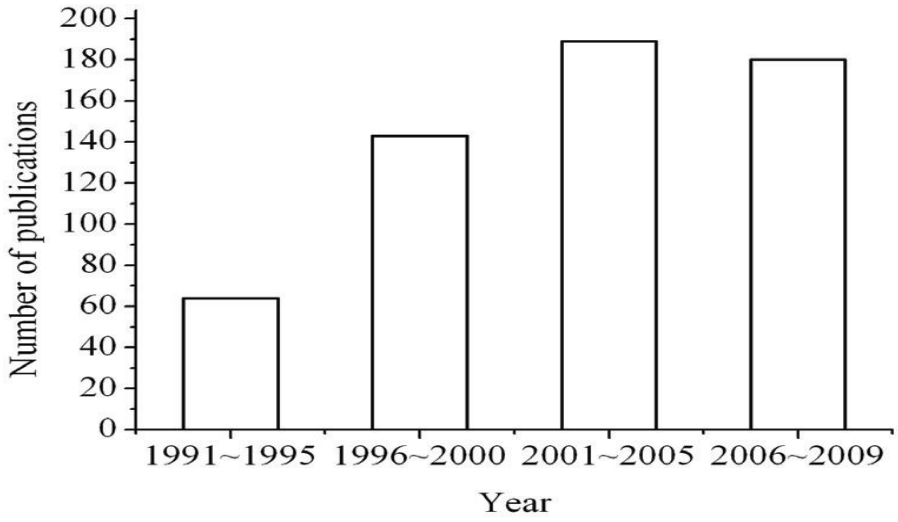
Figure 3- Standard curve for fenitrothion by competitive indirect ELISA (Kim *et al.*, 2007)



شکل ۴- شکل شماتیک از اساس حسگر زیستی آنزیمی برای تجزیه و تحلیل آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌ها (Patel, 2002)

Figure 4- Schematic diagram showing basis of enzymic biosensors for pesticide and herbicide analysis (Patel, 2002)

www.SID.ir



شکل ۵- تعداد مقالات منتشر شده با عنوان ایمنی سنجی آفت‌کش‌ها بین سال‌های ۲۰۰۹-۱۹۹۱ (Fan and He, 2011)

Figure 5- Number of publications in the topic of "pesticide immunoassay" from 1991 to 2009 (Fan and He, 2011)

جدول ۱- آزمایشات ایمنی سنجی آنزیمی و رادیواکتیو ابداع شده برای آنالیز آفت‌کش‌ها

Table 1- Enzyme and radioactive immuno assay tests devised for the analysis of pesticide

نوع آفت‌کش Pesticide Class	نام آفت‌کش Name of Pesticide	نوع آنتی‌بادی Type of antibody	نوع روش ایمنی سنجی Test Format	حد تشخیص ($\mu g\ L^{-1}$) Detection range ($\mu g\ L^{-1}$)
علف‌کش Herbicide	آلاکلر Alachlor	پلی‌کلونال Polyclonal	آنزیمی Enzyme (ELISA)	0.2-8
	آترازین Atrazine	مونوکلونال Monoclonal	ایمنی سنجی آنزیمی Enzyme (ELISA)	0.1-10
	بنتازون Bentazone	پلی‌کلونال Polyclonal	ایمنی سنجی آنزیمی Enzyme (ELISA)	2-24
	توفوردی 2,4-D	پلی‌کلونال Polyclonal	ایمنی سنجی رادیواکتیو Radio (RIA)	1-1000
	پاراکوات Paraquat	مونوکلونال Monoclonal	ایمنی سنجی رادیواکتیو Radio (RIA)	0.46-165
	تری‌فلورالین Trifluralin	پلی‌کلونال Polyclonal	ایمنی سنجی آنزیمی Enzyme (ELISA)	100-1000

Archive of SID

www.SID.ir

	پیکلورام Picloram	پلی‌کلونال Polyclonal	ایمنی سنجی رادیواکتیو Radio (RIA)	50-5000
حشره‌کش Insecticide	آلدرین Aldrin	پلی‌کلونال Polyclonal	ایمنی سنجی رادیواکتیو Radio (RIA)	0.0007-0.035
	پاراکسون Paraoxon	مونوکلونال Monoclonal	ایمنی سنجی آنزیمی Enzyme (ELISA)	10-100
	پاراتیون Parathion	پلی‌کلونال Polyclonal	ایمنی سنجی رادیواکتیو Radio (RIA)	100
	اندوسولفان Endosulfan	پلی‌کلونال Polyclonal	ایمنی سنجی آنزیمی Enzyme (ELISA)	3-500
قارچ‌کش Fungicide	بنومیل Benomyl	مونوکلونال Monoclonal	ایمنی سنجی آنزیمی Enzyme (ELISA)	0.1-1
	کاپتان Captan	پلی‌کلونال Polyclonal	ایمنی سنجی آنزیمی Enzyme (ELISA)	1-200
	بنزیمیدازول Bebzimidazole	مونوکلونال Monoclonal	ایمنی سنجی آنزیمی Enzyme (ELISA)	1-20

جدول ۲- مثال‌هایی از کاربرد حسگرهای زیستی در آنالیز بقایای آفت‌کش‌ها (Patel, 2002)

Table 2- Examples of biosensors applied for the analysis of pesticides (Patel, 2002)

نام آفت‌کش Pesticides	نوع حسگرزیستی Type of Biosensor	روش تشخیص Detection method	ماده آزمایشی Matrix	میزان حساسیت Sensitivity
پروپوکسور Propoxur	آنزیمی Enzyme	الکتروشیمیایی Electrochemical	کاهو و پیاز Lettuce, Onion	0.4 ng
کاربریل Carbaryl	آنزیمی Enzyme	الکتروشیمیایی Electrochemical	محلول آبی Aqueous solution	25 ng
پاراکسون Paraoxon	آنزیمی Enzyme	نوری- حرارتی Photothermal	آب آشامیدنی Drinking water	1.5 ng /ml

Archive of SID

www.SID.ir

پاراکسون Paraoxon	آنزیمی Enzyme	نوری- حرارتی Photothermal	آب پرتقال Orange juices	2.8 ng /ml
پاراکسون Paraoxon	آنزیمی Enzyme	نوری- حرارتی Photothermal	آب سیب Apple juices	4 µg/ml
آفت‌کش فسفره آلی Organophosphate	آنزیمی Enzyme	پیزوالکتریک Piezoelectric	آب Water	< 100 ppb
توفوردی 2,4-D	آنزیمی Enzyme	الکتروشیمیایی Electrochemical	محلول آلی/آبی Aqueous/ organic solution	0.1 µg/l
دیازینون Diazinon	آنزیمی Enzyme	الکتروشیمیایی Electrochemical	محلول آلی/آبی Aqueous/ organic solution	5 µM
پاراتیون Parathion	آنزیمی Enzyme	الکتروشیمیایی Electrochemical	آب رودخانه River water	10 ng / ml
پاراکسون Paraoxon	آنزیمی Enzyme	–	محلول آبی Aqueous solution	50 ppb
آترازین Atrazine	آنتی‌بادی Antibody	الکتروشیمیایی Electrochemical	آب آشامیدنی Tap water	0.03 µg /l
آترازین Atrazine	آنتی‌بادی Antibody	نوری Optical	آب دریا Lake water	1-10 µg /l
سیمازین Simazine	آنتی‌بادی Antibody	–	محلول آبی Aqueous solution	0.16 µg /l
تربوترین Terbutryn	آنتی‌بادی Antibody	–	محلول آبی Aqueous solution	0.11 µg /l
آترازین Atrazinr	میکروبی* Microbial	الکتروشیمیایی Electrochemical	محلول آبی Aqueous solution	2 µM
سوین Sevin	میکروبی Microbial	الکتروشیمیایی Electrochemical	محلول آبی Aqueous solution	2 µM
سوتان	میکروبی	الکتروشیمیایی Electrochemical	محلول آبی	2 µM

Archive of SID

www.SID.ir

	Aqueous solution		Microbial	Sutan
2 µM	محلول آبی Aqueous solution	الکتروشیمیایی Electrochemical	میکروبی Microbial	سیمازین Simazine

*در حسگر زیستی میکروبی از باکتری اشرشیاکلی نوترکیب به عنوان گیرنده زیستی استفاده شده است.

* In microbial biosensor, recombinant E. coli has been used as a biological receptor.

Reference فهرست منابع

Abad, A., and Montoya, A. 1995. Application of a monoclonal antibody-based ELISA to the determination of carbaryl in apple and grape juices. Analytica Chimica Acta, 311(3): 365-370

Alavanja, M., and Bonner, M. 2005. Pesticides and human cancers. Cancer Investigation, 23: 700–711.

Brandon, D. L., Binder, R. G., Bates, A. H., and Montague, W. C. 1995. Comparative ELISA for thiabendazole residue in produce using indirect immobilized monoclonal antibodies. Food and Agricultural Immunology, 7: 99-108.

Chaplin, M. 2004. What are biosensors? http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/ biosensors.html

Dankwardt, A. 2000. Immunochemical assays in pesticide analysis, pp. 1-27. In: Meyers, R. A. (Ed.), Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation, Wiley Chichester, UK.

Delorenzo, M. E., Scott, G. I., and Ross, P. E. 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. Environmental Toxicology and Chemistry, 20: 84–98.

Fan, M., and He, J. 2011. Pesticide Immunoassay, pp. 293-314. In: Stoytcheva, M. (Ed.), Pesticides- Strategies For Pesticides Analysis, InTech, India

Freire, R. S., Pessoa, C. A., Mello, L. D., and Kubota, L. T. 2003. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. J. Brazilian Chemical Society, 14(2): 230-243.

Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P., and Wilkins, E. 1999. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. Biosensors and Bioelectronics, 14: 599–624.

Kim, Y. J., Kim, Y. A., Lee, Y. T., and Lee, H. S. 2007. Enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide fenitrothion Influence of hapten conformation and sample matrix on assay performance. Analytica Chimica Acta, 591: 183–190

Kumar, A. 2000. Biosensors Based on Piezoelectric Crystal Detectors: Theory and Application. JOM-e, 52(10). http://www.tms.org/pubs/journals/JOM/0010/Kumar/ Kumar-0010.html

Marco, M. P., and Barcelo, D. 1998. Environmental applications of analytical biosensors. Measurment Science and Technology, 7: 1547-1562.

Nayak, M., Kotian, A., Marathe, S., and Chakravortty, D. 2009. Detection of microorganisms using biosensors—A smarter way towards detection techniques. Biosensors and Bioelectronics, 25: 661–667.

Newsome, W. H. 1986. Development of an ELISA for Triadimefon in Foods. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology, 36: 9-14.

Archive of SID

www.SID.ir

Patel, P. D. 2002. (Bio) sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. Trends in analytical chemistry, 21(2): 96-115.

Serra, P. A. 2010. Biosensors. Published by Intech, India, 302 pp.

Servos, M. R., Smith, M., Mc Innis, R., Burnison, K., Lee, B. H., Seto, P., *et al.* 2007. The presence of selected pharmaceuticals and the antimicrobial triclosan in drinking water in Ontario, Canada. Water Quality Research Journal of Canada, 42: 130–137.

Shan, G., Lipton, C., Gee, S. J., and Hammock, B. D. 2002. Immunoassau, biosensors and other non chromatographic methods, pp. 623-679. In: Lee, P. W. (Ed.). Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals, Wiley Chichester, UK.

Swanton, C. J., Mashhadi, H. R., Solomon, K. R., Afifi, M. M., and Duke, S. O. 2011. Similarities between the discovery and regulation of pharmaceuticals and pesticides: in support of a better understanding of the risks and benefits of each. Pest Management Science, 67: 790-797.

Van Emon, J., Seiber, J., and Hammock, B. 1987. Application of an ELISA to Determine Paraquat Residues in Milk, Beef and Potatoes. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology, 39:490–497.

Wilson, M. S., and Nie, W. 2006. Electrochemical multianalyte immunoassays using an array-based sensor. Analytical chemistry, 78(8): 2507-2513.

Archive of SID

www.SID.ir