

طراحی نانو حسگر زیستی رقابتی برای اکرآتوکسین بر پایه FRET با استفاده از کوانتوم دات

مهدی مظفری^۱، منصور بیات^{۱*}، افشین محسنی فر^۲، سیدجمال هاشمی هزاوه^۳

چکیده

در این پژوهش، ایمونواسی رقابتی حساس، با استفاده از پدیده Fluorescence resonance energy transfer (FRET) (انتقال انرژی رزونانسی فلورسانس) از کوانتوم دات کادمیوم/تلوریت (آنتی اکرآتوکسین آنتی‌بادی قرار گرفته بر روی سطح خارجی کوانتوم دات) به رودامین (Rho123) (اکراتوکسین نشاندار شده با رودامین کوئزوگه شده با آلبومین) برای اندازه‌گیری اکرآتوکسین ارائه شده است. واکنش بسیار اختصاصی رخ داده بین آنتی اکرآتوکسین آنتی‌بادی استقرار یافته بر روی سطح خارجی کوانتوم دات و اکرآتوکسین نشاندار شده با رودامین کوئزوگه شده با آلبومین، منجر به نزدیکی کروموفور رودامین به کوانتوم دات شده که متعاقب تحریک نوری کوانتوم دات باعث رخ داد انتقال انرژی رزونانسی، از کوانتوم دات (به عنوان دهنده) به کروموفور رودامین (به عنوان گیرنده) می‌گردد. در فقدان اکرآتوکسین آزاد، واکنش یعنی رخ داده بین اکرآتوکسین نشاندار شده با رودامین و آنتی اکرآتوکسین آنتی‌بادی قرار گرفته بر روی سطح کوانتوم دات، باعث نشر و وقوع پدیده FRET، بدنبال تحریک نوری کوانتوم دات می‌گردد.

در صورت حضور اکرآتوکسین آزاد، با اکرآتوکسین نشاندار شده با رودامین در نانو حسگر زیستی، بصورت رقابتی جایگزین شده که این امر باعث کاهش نشر رودامین، بعد از وقوع پدیده FRET می‌گردد. کاهش در فلورسانس گیرنده رودامین، ارتباط مستقیمی با غلظت اکرآتوکسین آزاد در نمونه دارد. این روش دارای حد تشخیص ۲۲۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر، و برای اندازه‌گیری اکرآتوکسین نمونه‌های سرمی انسان هم بکار برده شد. وابستگی خطی بین افزایش شدت فلورسانس رودامین در ۵۸۰ نانومتر، و غلظت اکرآتوکسین در نمونه سرمی، در گستره غلظت ۱۰۰ تا ۸۰۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر یافت شد. شمای تشخیص رقابتی بسیار ساده، حساس، هموزن، سریع و کارا می‌باشد و نیازمند مراحل جداسازی و شستشوی زیاد نیز نمی‌باشد.

واژگان کلیدی: اکرآتوکسین، نانو بیوسنسور، انتقال انرژی رزونانسی فلورسانس، کوانتوم دات

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳

مقدمه

اکراتوکسین یکی از مهمترین متابولیت‌های سمی دنیای قارچ‌ها می‌باشد و برای اولین بار در سال ۱۹۶۵ به عنوان متابولیت ثانویه

آسپرژیلوس اکرآتوس گزارش گردید. گرچه در سال‌های بعد دیگر گونه‌های آسپرژیلوس (آ. نیجر، آ. کربوناریوس) و جنس‌های نئوپترومایسس، پترومایسس و گونه‌های پنی سلیموم (پ. نوردیکوم، پ. وروکوزوم) هم به‌عنوان گونه‌های تولید کننده این مایکوتوکسین مطرح شدند. هرچند که امروزه گونه غالب را آ. اکرآتوس، آ. کربوناریوس) می‌دانند (۹ و ۵). فرم‌های اصلی آن اکرآتوکسین A, B, C می‌باشد. که مهمترین و شایع‌ترین فرم مربوط به این گروه اکرآتوکسین (OTA)A می‌باشد. علاوه بر غلات و محصولات مشتق از آن که از مهمترین منابع غذایی مسئول آلودگی اکرآتوکسین در جوامع انسانی می‌باشد (۵)، دیگر مواد غذایی آلوده شامل شراب، آبجو، قهوه، کشمش، آب انگور، گوشت خوک، ماکیان، مواد لبنی، ادویه‌جات و شکلات می‌باشد (۹). با توجه به اینکه اکرآتوکسین از معدود مایکوتوکسین‌هایی می‌باشد که تقریباً از ۱۰٪ مناطق مختلف جغرافیایی دنیا از خون انسان‌ها قابل ایزوله می‌باشد (۱). و سمیت آن هم در جوامع انسانی به اندازه کافی جدی است که تقریباً در بین ۲۰ مایکوتوکسین کنترل شده در غذا در نظر گرفته شده است (۵). دارای خاصیت‌های نفروتوکسیستی، هپاتوتوکسیستی، تراتوژنی، کارسینوژنی، ایمونوساپرسیو و احتمالاً موتاژن و اثر افزایش‌دهی بر روی افلاتوکسین می‌باشد (۱۰). و در سال ۱۹۹۳ آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC from WHO) اکرآتوکسین را به‌عنوان عامل احتمالی کارسینوژن گروه 2B برای انسان‌ها اعلام کرده است. بدین ترتیب مقرراتی برای اکرآتوکسین در خواربار تنظیم شده است

* گروه باتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران (dr_mansour_bayat@yahoo.com)

۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، نانوزیست تهران، تهران، ایران

۳- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت و علوم بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

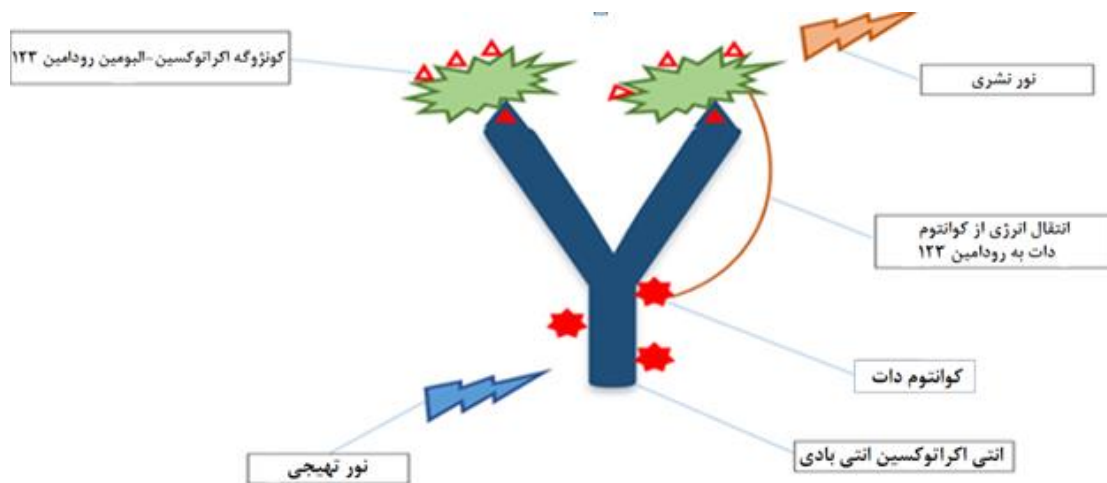
نانوبیوکونژوگه کوآتوم داتی را بدهند یک مثال برای این حالت گروه‌های کروبوکسیلی انتهایی تیوگلیکولیک اسید متصل به مولکول‌های زیستی گوناگون می‌باشد(۴). کوآتوم دات‌ها به دلیل اندازه قابل تنظیم، طیف فلورسانس ظریف، باندهای جذبی وسیع، بازده کوآتومی بالا، پایداری نوری و توانایی کونژوگه شدن با مولکول‌های متعدد و پروتئین می‌توانند به‌عنوان دهنده‌های عالی در انتقال انرژی رزونانس فلورسانس (FRET) عمل کنند(۸). پدیده FRET تکنیکی قدرتمند می‌باشد که در طی آن انتقال انرژی غیرتشنعی انرژی فلورسانس رزونانس از فلئوروفور دهنده برانگیخته شده به فلئوروفور گیرنده در حالت حداقل انرژی رخ می‌دهد(۷). برای اینکه پدیده انتقال انرژی فلورسانس رخ دهد چندین مشخصه باید فراهم گردد که این مشخصات شامل: ۱- وجود بازده کوآتومی بالای دهنده ۲- همپوشانی مناسب طیف جذبی گیرنده با طیف نشری دهنده ۳- فاصله مناسب کروموفور دهنده با گیرنده (۱ تا ۱۰ میکرون) ۴- سوی نسبی گشتاور دو قطبی جهشی دهنده و گیرنده(۴)

در این مطالعه ایمونواسی رقابتی حساس برای اندازه‌گیری اکرآتوکسین با استفاده از سیستم انتقال انرژی رزونانس (FRET) از کوآتوم دات کادمیوم - تلوریت (آنتی اکرآتوکسین آنتی‌بادی ساکن شده بر روی سطح کوآتوم دات) به رودامین (قرار گرفته بر روی سطح آلبومین - اکرآتوکسین) طراحی شده است. واکنش ایمنی اختصاصی بین آنتی اکرآتوکسین آنتی‌بادی کوآتوم دات و اکرآتوکسین نشاندار شده موجب فلئوروفور رودامین (عمل کننده به‌عنوان گیرنده) و کوآتوم دات (عمل کننده به‌عنوان دهنده) در مجاورت فضایی یکدیگر قرار گرفته شده و باعث رخداد پدیده FRET و شدت فلورسانس متعاقب تحریک نوری کوآتوم دات می‌شود. و در صورت حضور اکرآتوکسین آزاد در نمونه اکرآتوکسین نشاندار شده با رودامین بطور رقابتی با اکرآتوکسین آزاد جایگزین شده که منجر به کاهش شدت فلورسانس رودامین می‌گردد.

(EC 105/2010 amending regulation EC 1881/2006 and)
(EC2006/576/EC, European Commission Regulation
(۱۱ و ۳،۱۰).

بسیاری از تکنیک‌های آشکارسازی کلاسیک و رایج همانند (HPLC, TLC, GC, ELISA) که برای آشکارسازی این مایکوتوکسین در نوع‌های مختلفی از نمونه‌ها بکار می‌رود نیازمند ابزارهای گران، پیچیده، زمان‌بر بودن مراحل تصفیه و ملالت بار بودن زمان تست‌ها می‌باشد(۶). بنابراین دلایل قابل قبول اقتصادی و ایمنی برای برقراری روش‌های آنالیتیکی سریع و موثر، اختصاصی و بسیار حساس برای غربالگری این مایکوتوکسین در گستره‌ای از نمونه‌ها وجود دارد (۱۹). در سالیان اخیر با تکامل سریع مواد نانوساختار این نانو ذرات توجه قابل ملاحظه‌ای را برای خصوصیات منحصر به فردشان به خود جلب کرده‌اند. اخیراً تعدادی از نانوبیوسنسور با استفاده از نانو ذرات با سیستم‌های میکروآرایه‌ای برای آشکار سازی مایکوتوکسین‌ها طراحی شده است (۱۹). در طی سالیان اخیر استفاده از کوآتوم دات به علت ویژگی منحصر به فردشان سادگی انتقال، حساسیت بالا و سریع و نانوبیوسنسورهایی بر پایه FRET بطور وسیعی جهت آشکارسازی و تشخیص انواع مختلفی از مولکول‌ها و بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹ و ۷). ویژگی منحصر به فرد نوری کوآتوم دات‌ها آنها را به‌عنوان نشانگرهای بیولوژیکی مهم در کاربردهای پزشکی و بیولوژی تبدیل کرده است (نگاره ۱). از دیگر ویژگی‌های کوآتوم دات این است که می‌توان بوسیله تغییر در اندازه ذره و تغییر در نوع و ترکیبات نانو ذره (سنتز ترکیبات دوتایی یا سه تایی از اتم‌ها) طول موج نشر آن را در گستره وسیع ۴۰۰ تا ۲۰۰۰ نانومتر (from the UV to the IR regions) تنظیم کرد(۷).

کوآتوم دات‌ها غالباً نانوکریستال‌های گرد می‌باشند که سطح خارجی آنها توسط گروه‌های عامل محلول در آب پوشیده شده و به سادگی در آب پخش می‌شوند(۸). این گروه‌های عامل سطحی می‌توانند به مولکول‌های زیستی متصل شده و تشکیل



نگاره ۱- شمای نانویی و سنسور طراحی شده برای تشخیص اکرآتوکسین براساس پدیده FRET با استفاده از کوانتوم دات حاوی آنتی اکرآتوکسین آنتی بادی به عنوان دهنده، و رودامین ۱۲۳ نشاندار شده با آلبومین اکرآتوکسین به عنوان گیرنده، فلورسانس کوانتوم دات در طول موج ۵۰۵ نانومتر زمانی مشاهده می شود که با نور ۳۷۵ نانومتر القا گردد، و در صورت حضور اکرآتوکسین در نانو بیوسنسور موجب کاهش قابل ملاحظه در شدت نشر آن می شود.

مواد و روش کار

مواد لازم

تصاویر میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) تهیه شده از کوانتوم دات از (NetherLands, H-600; Philips <http://Philips.com>) به دست آمد. جهت مشخص کردن اندازه و پخش کوانتوم دات سنتز شده Malvern dynamic light scattering (DLS) apparatus (UK, <http://www.malvern.com>) مورد استفاده قرار گرفت. و همه آزمایشات در سه دفعه پیاپی تکرار گردید.

وسایل لازم

کیسه دیالیز یک رول (ایران)، نوک سمپلر زرد (ایران)، نوک سمپلر آبی (ایران)، میکروتیوب ۵ میلی لیتر (ایران)، لوله فالكون ۵۰ میلی لیتر، لوله فالكون ۱۲ میلی لیتر (ایران)

دستگاه های لازم

بن ماری جوش، استیرر، فلوریمتر، سانتریفیوژ، شیکر، اسپکترو فلوریمتر، ظرف ریفلاکس

روش کار

ساخت نانو ذره نقاط کوانتومکادمیوم - تلوریت پوشیده شده با تیوگلیکولیک اسید (TGA)

اکراتوکسین A، کونژوگه البومین اکرآتوکسین A، آنتی اکرآتوکسین A آنتی بادی، کلرید کادمیوم ($cdcl_2$)، بروهیدرید سدیم ($NaBH_4$)، پودر تلوریم (Te)، ۱-اتیل-۳-(۳ دی متیل امینوپروپیل) کربودی آمید هیدروکلرید (EDC)، N-هیدروکسی سوکسینامید (NHS)، از کمپانی سیگما (St.Louis, <http://www.sigmaldrich.com>) تهیه گردید. تیوگلیکولیک اسید (TGA) و همه مواد شیمیایی دیگر از شرکت شیمیایی مرک (Darmstadt, Germany. <http://www.merck.de>) خریداری شد. همه موارد فوق بدون خالص سازی و همه محلول ها هم با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر شده تهیه شدند.

همه طیف های فلورسانس در Shimadzu fluorescence spectrometer (japan://www.shimadzu.com) ثبت شدند. همه اندازه گیری های نوری فوق در تحت شرایط استاندارد معمول انجام شد.

دقیقه سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ g در دمای ۴°C در اسپکتروفتومتر محاسبه می‌گردد. محلول ذخیره در دمای ۴°C تا زمان مصرف می‌توان نگهداری کرد (۱۹ و ۱۲).

نشانداز کردن آلبومین - اکرآتوکسین با رودامین

ابتدا ۱ میلی‌گرم از رودامین را در ۱ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با PH ۶ حل و سپس سرد گردید. محلول تهیه شده به ۲ میلی‌لیتر از بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار با PH ۶ حاوی ۱ میلی‌گرم از اکرآتوکسین آلبومین خنک شده با یخ اضافه شد. مخلوط هموژنیزه بوسیله پی پت کردن آرام و مکرر تهیه گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول EDC (۱ میلی‌گرم در ۲/۵ میلی‌لیتر) و NHS (۱ میلی‌گرم در ۲/۵ میلی‌لیتر) در PH ۶ به مخلوط تهیه شده اضافه، و برای یک ساعت در ۴°C در شرایط تاریک انکوبه گردید. متعاقباً آلبومین کونژوگه شده با اکرآتوکسین رودامین در برابر ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات با PH ۷/۴ برای حذف ماده اضافی دیالیز گردید. برای مشخص کردن نشانداز شدن آلبومین - اکرآتوکسین با رد امین، شدت نوری مخلوط دیالیز شده در اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. محلول اکرآتوکسین - آلبومین به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به خاطر حساسیت نوری رودامین محلول ذخیره را در یخچال ۴°C در شرایط تاریک برای استفاده‌های بعدی نگهداری شد (۱۹ و ۱۲).

ارزیابی بیوسنسور

برای ارزیابی توانایی و حساسیت نانوبیوسنسور طراحی شده جهت تشخیص اکرآتوکسین، مخلوط واکنش حاوی بیوکونژوگه آلبومین اکرآتوکسین نشانداز شده با رودامین و کوانتوم دات نشانداز شده با آنتی‌بادی اکرآتوکسین در بافر فسفات سدیم (۵۰ میلی‌مولار در لیتر با PH ۷/۴ و کلرید سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار در لیتر تهیه گردید.

بعد از انکوباسیون واکنش به مدت ۳ دقیقه جهت اطمینان از تشکیل کمپلکس ایمنی بیوکونژوگه اکرآتوکسین و کوانتوم دات نشانداز شده با آنتی‌بادی، مخلوط واکنش فوق در طول

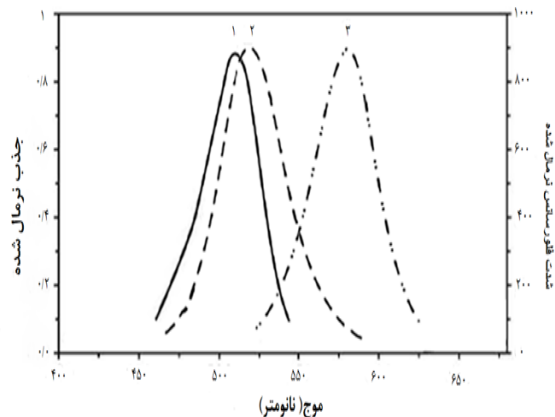
۰/۱ گرم از پودر تلوریم (Te) بوسیله ۰/۲۸۰ گرم NaBH₄ در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر شده با حباب‌های N₂ و استیرر کردن شدید احیاء می‌گردد. بعد از پنج ساعت، رنگ محلول از بنفش به سفید تغییر رنگ داد. محلول حاصل تحت شرایط اتمسفر نیتروژن جهت حذف رسوب سفید تترابورات سدیم (بوراکس) اولترا فیلتر شد.

سپس محلول آبی بدون اکسیژن تازه تهیه شده از NaHTe را به ۲۰۰ میلی‌لیتر در ۰/۳۵۸ گرم CdCl₂ 2.5H₂O از آب مقطر دوبار تقطیر شده اشباع از نیتروژن در PH ۱۰ در حضور ۰/۲ میلی‌لیتر TGA به‌عنوان پایدار کننده و عامل پوشش‌ساز اضافه شد. این ترکیب تحت شرایط اتمسفر نیتروژن (همزمان با استیرر شدید) رفلکس گردید و بوسیله تغییر زمان رفلکس می‌توان کوانتوم دات‌ها را در اندازه متفاوت برداشت کرد. برای حذف پیش ماده اضافی محلول خام سه مرتبه با اتانول شستشو داده شد. و برای ۱۵ دقیقه در 10000g سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل دوباره در ۲۵۰ میلی‌لیتر از آب پخش شد و در شرایط تاریک و دمای ۴°C نگهداری گردید. ماکزیمم القا و نشر آن به ترتیب ۵۳۵ و ۳۷۵ نانومتر بود (۱۹ و ۱۶).

تهیه نانوبیوکونژوگه کوانتوم دات آنتی اکرآتوکسین آنتی‌بادی
۱ میلی‌لیتر از محلول کوانتوم دات تهیه شده با ۵ میلی‌لیتر محلول EDC ۰/۴ گرم در لیتر، و ۵ میلی‌لیتر محلول NHS ۰/۴ گرم در لیتر در PH ۶ مخلوط، و برای یک ساعت در دمای اتاق در محیط تاریک انکوبه می‌گردد.

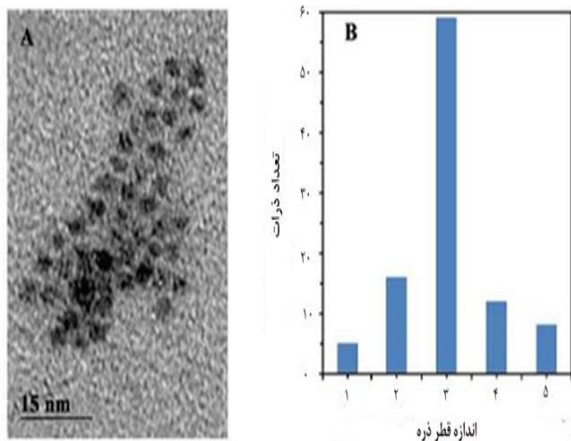
متعاقباً محلول در یخ نگهداری شده آنتی اکرآتوکسین آنتی‌بادی قطره قطره به محلول کوانتوم دات با گروه کربوکسیل فعال شده با EDC/NHS همراه با استیرر کردن ملایم اضافه، و برای یک ساعت در شرایط تاریک نگهداری می‌شود. برای اینکه تشکیل آنتی اکرآتوکسین آنتی‌بادی کونژوگه شده با کوانتوم دات را مشخص کنیم. شدت جذب نمونه آنتی اکرآتوکسین آنتی‌بادی و کوانتوم دات آنتی اکرآتوکسین آنتی‌بادی را در طول موج ۲۸۰ نانومتر (ماکزیمم طول موج جذب پروتئین) قبل و بعد از ۲۰

رودامین ماکزیمم طیف هم پوشانی را نشان می‌دهند که برای بدست آوردن ایده‌آل پدیده FRET ضروری می‌باشد.



نمودار ۱- همپوشانی ایده‌آل بین نشر کوانتوم دات (اوج ۵۳۵ نانومتر) و جذب رودامین (اوج ۱: ۵۱۰ نانومتر) و نشر آن (اوج ۳: ۵۸۰ نانومتر)

جزئیات بدست آمده از تصاویر TEM و آنالیز DLS بدست آمده از کوانتوم دات پوشیده شده از TGA تأیید می‌کند که کوانتوم دات کروی با اندازه در حدود ۳ نانومتر و تک پاشندگی مناسب می‌باشد. پخش کوانتوم دات بدست آمده در بافر فسفات ۷/۴PH نشان از پایداری نوری بالا بدون کاهش قابل ملاحظه در شدت فلورسانس در اثنای سه ماه می‌باشد (نتایج نشان داده نشده است)



نگاره ۲- تصویر TEM تهیه شده از کوانتوم دات (A) و هیستوگرام چگونگی پخش اندازه کوانتوم دات کادمیوم - تلوریت (B)

موج ۳۷۰ نانومتر تهیج گردید. طیف تابشی و نشری را به ترتیب در گستره ۴۵۰ تا ۶۲۰ نانومتر اسپکتروفلوریمتر انتخاب گردید. پهنای باند تابشی و نشری به ترتیب در ۱۰ نانومتر و ۱۵ نانومتر انتخاب گردید (۱۹ و ۱۲).

برای ارزیابی توانایی سیستم غلظت‌های مختلفی از اکرآتوکسین را بصورت پیاپی به محیط فوق‌الذکر در غلظت‌های ۸۰۰-۱۰۰ میکوگرم در لیتر اضافه گردید. سپس نشر مخلوط‌ها همانند فوق مشخص گردید (۱۲).

برای ارزیابی توانایی سیستم در تشخیص اکرآتوکسین نمونه‌های واقعی محلول ذخیره از ۱ میکرومول در لیتر اکرآتوکسین در سرم‌های سالم انسانی تهیه و سپس بصورت ترتیبی به مخلوط واکنش اضافه گردید. طیف نشری نمونه‌ها بعد از انکوبه کردن واکنش به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق در 1cm pass-length quartz cell در شرایط ذکر شده فوق گزارش گردید (۱۲).

نتایج

ارزیابی کوانتوم دات کادمیوم تلوریت تهیه شده

در نمودار ۱ طیف جذبی و نشری محلول خالص کوانتوم دات کادمیوم تلوریت تهیه شده و رودامین نشان داده شده است. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که ماکزیمم اوج نشر کوانتوم دات در طول موج ۵۳۵ نانومتر و ماکزیمم اوج جذب نشر رودامین به ترتیب در طول موج ۵۱۰ و ۵۸۰ نانومتر می‌باشد.

مقدار بیشینه، کمیته بیانگر گستردگی یک تابع است بصورتی که اختلاف بین دو مقدار متغیر مستقل است که در آن متغیر وابسته، نصف مقدار بیشینه خود را داشته باشد و در طیف‌سنجی کاربرد دارد. هرچه کوچکتر باشد نشان از طیف نشری ظریف و متقارن می‌باشد).

طیف جذبی کوانتوم دات ۳۵ نانومتر می‌باشد. که نشان از طیف نشری ظریف و متقارن کوانتوم دات می‌باشد. ضمناً (با توجه به نمودار ۱) طول موج نشری کوانتوم دات و طول موج جذبی

ارزیابی نانوبیوکونژوگه کوانتوم دات آنتی اکراتوکسین

آنتی بادی

کاهش در چگالی نوری نانوبیوکونژوگه محلول کوانتوم دات آنتی اکراتوکسین آنتی بادی بعد از سانتریفیوژ با سرعت بالادرت طول موج ۲۸۰ نانومتر دلالت بر اتصال محکم بین آنتی اکراتوکسین آنتی بادی و کوانتوم دات را می کند. ضمناً قرار گرفتن آنتی اکراتوکسین آنتی بادی بر روی کوانتوم دات تغییری در طیف نشری آن ایجاد نمی کند.

ارزیابی نشاندار شدن کونژوگه آلبومین اکراتوکسین با

رودامین ۱۲۳

برای تأیید نشاندار شدن آلبومین - اکراتوکسین با رودامین چگالی نوری مخلوط دیالیز شده فوق در اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. ماکزیمم جذب طول موج رودامین ۵۱۰ نانومتر می باشد. جذب قوی در ۵۱۰ نانومتر نشان از حضور رودامین در نمونه دارد.

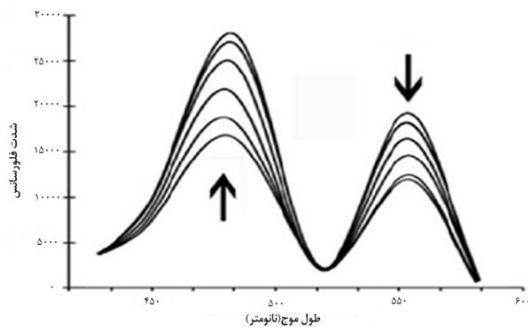
ارزیابی انتقال انرژی رزونانسی بین کوانتوم دات و

رودامین ۱۲

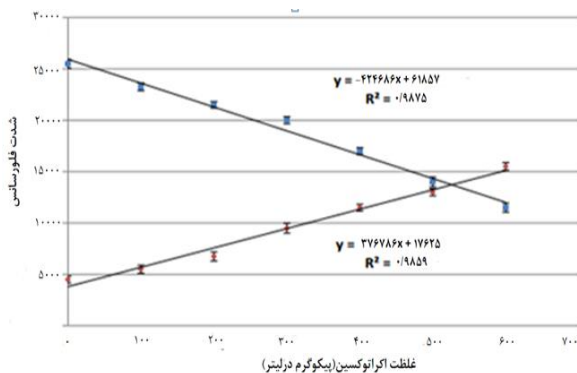
با بروز واکنش ایمنی بین کوانتوم دات نشاندار شده با آنتی اکراتوکسین آنتی بادی (دهنده) و آلبومین - اکراتوکسین نشاندار شده با رودامین (گیرنده) پدیده FRET مشاهده می شود. شدت فلورسانس رودامین در طول موج ۵۸۰ نانومتر به دنبال اضافه کردن پیاپی محلول حاوی آلبومین کونژوگه شده با اکراتوکسین نشاندار شده با رودامین از غلظت ۰/۱ میکرومول در لیتر تا ۰/۰۶ میکرومول در لیتر در دوره های خاص افزایش می یابد.

تغییرات مشاهده شده در نشر رودامین به طور وضوحی به غلظت نهایی آلبومین - اکراتوکسین نشاندار شده با رودامین نسبت مستقیم دارد مگر اینکه همه جایگاه های اتصال آنتی ژنی آنتی اکراتوکسین آنتی بادی با آلبومین - اکراتوکسین نشاندار شده با رودامین اشغال گردد. در این صورت است که افزایش غلظت آلبومین اکراتوکسین نشاندار شده با رودامین هیچ افزایش قابل ملاحظه ای در اوج نشر رودامین را ندارد.

اگر نمونه حاوی اکراتوکسین به محیط فوق اضافه گردد اکراتوکسین آزاد بطور رقابتی با آلبومین - اکراتوکسین نشاندار شده با رودامین برای بدست آوردن جایگاه آنتی ژنی آنتی اکراتوکسین آنتی بادی رقابت می کند که این امر منجر به کاهش شدت فلورسانس رودامین و یا افزایش فلورسانس کوانتوم دات سیستم می گردد. (نمودار ۲)



نمودار ۲- افزایش و کاهش در نشر کوانتوم دات (چپ) و رودامین (راست) به ترتیب به دنبال افزایش غلظت های مختلف از اکراتوکسین آزاد در مخلوط واکنش



نمودار ۳- وابستگی بین شدت فلورسانس کوانتوم دات و رودامین و افزایش غلظت اکراتوکسین در سرم انسانی

نمودار ۳ بطور وضوح مشخص می کند که ارتباط خوبی بین کاهش شدت فلورسانس رودامین در طول موج ۵۸۰ نانومتر با افزایش غلظت اکراتوکسین در نمونه در محدوده غلظت ۰/۰۱ میکرومول در لیتر تا ۰/۰۶ میکرومول در لیتر وجود دارد. حد تشخیص $LOD=2 \times 10^{-12}$ که براساس معادله $LOD=3S_0.K^{-1}$ تخمین زده می شود در حالی که S_0 انحراف معیار اندازه گیری (شاهد $n=7$) و K شیب منحنی کالیبراسیون می باشد.

بحث

در نسبت های مولار پایتتر افزایش آلبومین اکرآتوکسین نشاندار شده با رودامین در تشکیل کمپلکس ایمنی اکرآتوکسین آنتی بادی دخالتی ندارد که این امر منجر به کاهش سیگنال FRET می شود.

در این شرایط بخاطر حضور آنتی بادی آزاد که به اکرآتوکسین در نمونه متصل می شوند این منجر به تخمین کم مقدار غلظت اکرآتوکسین در نمونه می گردد. در غلظت های مولار بالاتر افزایش اکرآتوکسین نشاندار، منجر به کاهش دقت و حساسیت نانو حسگر زیستی می شود. در این شرایط به خاطر حضور زیادی آلبومین اکرآتوکسین نشاندار شده با رودامین در نانو حسگر تهیه شده اکرآتوکسین بیشتری باید اضافه شود تا در جایگزینی رقابتی کسب مکان های اتصال آنتی اکرآتوکسین آنتی بادی غلبه کند که این امر منجر به کاهش دقت و حساسیت نانو حسگر زیستی بخصوص در کشف غلظت های پایین اکرآتوکسین در نمونه می گردد.

از یک طرف بیومولکول های آنتی اکرآتوکسین آنتی بادی و آلبومین کونژوگه شده با اکرآتوکسین وقتی که به ترتیب با کوانتوم دات و رودامین نشاندار می شوند منجر به انتقال قابل توجه انرژی بین کوانتوم دات و رودامین می شوند بنابراین بر اساس نتایج فوق وبا آزمایشات تکمیلی بیشتر این امکان وجود دارد که بتوانیم غلظت اکرآتوکسین را در نمونه بیمار یا محصولات کشاورزی بوسیله مقایسه کردن سیگنال بدست آمده با منحنی استاندارد تخمین زده شود.

نهایتا گرچه فلوروفورهای همانند رودامین می توانند در نشاندار کردن آنتی ژن ها و آنتی بادی ها در ایمونواسی های هتروژن بر پایه فلورسانس مورد استفاده قرار گیرند. اما برخلاف ایمونواسی های بر پایه نانوفلورسانس چنین سیستم هایی زمان بر و مشکل حمل و نقل دارند. ضمنا نیازمند چندین محلول اضافی و مراحل متعدد شستشو می باشند. علاوه بر آن نانوبیوسنسورها به سادگی خود تنظیم می شوند.

در این پژوهش، نانو حسگر حساس زیستی بر پایه FRET را برای کشف اکرآتوکسین، با استفاده از آنتی اکرآتوکسین آنتی بادی و کونژوگه آلبومین - اکرآتوکسین نشاندار شده با رودامین و کوانتوم دات کادمیوم - تلوریت ارائه داده ایم.

در این مطالعه کوانتوم دات کادمیوم - تلوریت بسیار تک پاشنده، پایدار و محلول در آب جهت ساخت نانو بیوسنسور سنتز شده است. ارزیابی نانو ذره سنتز شده بوسیله اسپکتروفوتومتر، اسپکتروفلوریمتر، TEM و DLS تأیید می کند که این ذرات جهت طراحی نانوبیوسنسور مناسب می باشند.

از آنجایی که طیف نشری کوانتوم دات و طول موج تابشی رودامین همپوشانی مناسبی را نشان می دهند آنها را می توان به ترتیب به عنوان (گیرنده) و (دهنده) مناسب انتخاب کرد. در حقیقت به علت طیف جذبی پهن کوانتوم دات حق انتخاب طول موج نشری گسترده ای وجود دارد. از آنجایی که کونژوگه آلبومین - اکرآتوکسین نشاندار شده با رودامین هیچ شدت فلورسانس قابل ملاحظه ای را در طول موج نشری ۳۷۵ نانومتر نشان نمی دهد این طول موج را به عنوان طول موج القایی برای سیستم FRET انتخاب گردید. ترکیب کوانتوم دات با آنتی اکرآتوکسین آنتی بادی از طریق اتصالات کووالانسی بین گروه کربوکسیلی (TGA-capped QDs) و گروه های آمینی آنتی بادی صورت گرفته است.

برای مشخص کردن ماکزیمم سیگنال FRET بین کوانتوم دات و رودامین غلظت های متفاوتی از کونژوگه آلبومین اکرآتوکسین نشاندار شده با رودامین و کوانتوم دات نشاندار شده با آنتی اکرآتوکسین آنتی بادی برای آماده سازی نانو حسگر زیستی مورد آزمایش قرار گرفت. واکنش ایمنی ایده آل بین کوانتوم دات نشاندار شده با آنتی اکرآتوکسین آنتی بادی و آلبومین اکرآتوکسین نشاندار شده با رودامین در نسبت مولار در حدود ۲ به ۱ فراهم شد. که در این نسبت واکنش ایمنی بین دو مولکول اکرآتوکسین با یک مولکول آنتی بادی قابل پیش بینی می باشد.

Lamberti و همکاران در سال ۲۰۰۹ زمان انجام آزمایش منفرد را ۴ ساعت و حد تشخیص را ۳ ng/ml (۱۳)، Xiulan و همکاران در سال ۲۰۰۶ زمان انجام آزمایش منفرد را ۱۰ دقیقه و حد تشخیص را ۱ ng/ml ۰۵-۰۱- ذکر کرده‌اند (۱۷). این مطلب کاملاً مشخص می‌باشد که روش ابداعی ما در مقایسه با اغلب روش‌های تحقیقاتی ذکر شده (جدول ۱) با زمان انجام آزمایش منفرد ۳ دقیقه و حد تشخیص ۲۲۰ pg/ml بسیار مطلوب‌تر می‌باشد (جدول ۱).

Bacher و همکاران در سال ۲۰۱۲ در روش ابداعی خود زمان انجام آزمایش منفرد را ۲۰ دقیقه و حد تشخیص را ۰/۱ pg/ml (۲)، در حالیکه Liao و همکاران در سال ۲۰۱۰ زمان انجام آزمایش منفرد را ۳ دقیقه و حد تشخیص را ۰/۱ ng/ml (۱۴)، Sapsford و همکاران در سال ۲۰۰۶ زمان انجام آزمایش منفرد ۲ ساعت و نیم و حد تشخیص را ۰/۳ ng/ml (۱۵)، Xiulan و همکاران در سال ۲۰۰۶ زمان انجام آزمایش منفرد را ۱۰ دقیقه و حد تشخیص را ۲/۵ ng/ml (۱۸)،

جدول ۱- انواع مختلف نانوبیوسنسورهای توسعه یافته برای تشخیص مایکوتوکسین

روش تشخیص	نوع ماده مورد استفاده به‌عنوان گیرنده	حد تشخیص	گستره حد تشخیص	منابع
۱- ایمونوکروماتوگرافی	آنتی‌بادی نشاندار شده با طلا	۲/۵ ng/ml	نامشخص	۱۷
۲- ایمونوکروماتوگرافی	آنتی‌بادی نشاندار شده با طلا	۰/۰-۰۵/۱ ng/ml	۵۰-۲ ppb	۱۸
۳- Lateral-flow	آنتی‌بادی نشاندار شده با هسته - پوسته نقره - طلا	۰/۱ ng/ml	نامشخص	۱۴
۴- ریزارایه	آنتی‌بادی	۳ ng/ml	نامشخص	۱۳
۵- ایمپدیمتریک	آنتی‌بادی مستقر شده بر روی سیم نقره	۰/۱ pg/ml	۱۸۰-۳۰ pg/ml	۲
۶- ریز ارایه (ایمونواسی رقابتی غیر مستقیم) Cys-Anti-AFB1		۰/۳ ng/ml	۵/۱-۶ ng/ml	۱۵
۷- سیستم بر پایه FRET	آنتی‌بادی مستقر شده بر روی کوانتوم دات	۲۲۰ pg/ml	۸۰۰-۱۰۰ pg/ml	مقاله حاضر

فهرست منابع

- 1- Al-Anati, L., Petzinger, E. (2006): Immunotoxic activity of ochratoxin A. J. vet. Phar. Thera. 29 (2):79-90.
- 2- Bacher, G., Pal, S., Kanungo, L., Bhand, S. (2012): A label-free silver wire based impedimetric immunosensor for detection of AflatoxinM1 in milk. Sensors Actuators B Chem. 128:223.
- 3- Bazin, I., Nabais, E., Lopez-Ferber, M. (2010): Rapid Visual Tests: Fast and Reliable Detection of ochratoxin A. Toxins (Basel)2(9):2230-2241.
- 4- Ciruela, F., Vilardaga, J.P., Fernandez-Duenas, V. (2010): Lighting up multi protein complexes: lessons from GPCR oligomerization. Trends biotechnol. 28(8): 407-15.

کوانتوم دات نشاندار شده با آنتی اکراتوکسین آنتی‌بادی و آلبومین اکراتوکسین نشاندار شده با رودامین به‌عنوان نشانگرهای فلورسانسی تهیه شدند تا براساس پدیده FRET اکراتوکسین را شناسایی کنند. درحقیقت به محض تشکیل کمپلکس ایمنی بین آنتی‌بادی قرار گرفته بر روی کوانتوم دات و اکراتوکسین آلبومین نشاندار شده با رودامین پدیده FRET رخ می‌دهد. هنگام اضافه شدن نمونه حاوی اکراتوکسین، رودامین اکراتوکسین در آلبومین بوسیله اکراتوکسین جایگزین می‌شود و این باعث کاهش شدت فلورسانس رودامین و افزایش فلورسانس کوانتوم دات می‌شود.

- 5- El-Khoury, A., Atoui, A. (2010): Ochratoxin A: general Overview and Actual Molecular status. *Toxins*. 2(4):461-493.
- 6- Fernandez-Baldo, M.A., Bertolino, F.A., Messina, G.A., Sanz, M.I, Raba,J. (2010): Modified magnetic nanoparticles in an electrochemical method for the ochratoxin A determination in vitisvinifera red grapes tissues. *Talanta*.83 (2):651-657.
- 7- Francesc, A., Esteve,T., Antonio-Abad, F. (2013): Applications of quantum dots as probes in immune sensing of small-sized analytes, *Biosens Bioelectron* 41: 12–29.
- 8- Goldman, E., Balighian, E., Mattoussi, H., Kuno, M., Mauro, J., Tran, P.T., Anderson, G. (2002): Avidin: a natural bridge for quantum dot-antibody conjugates. *J Am Chem Soc.*; 124(22):6378-82.
- 9- Hope, J.H., Hope, B.E. (2012): a review of the diagnosis and treatment of Ochratoxin A inhalational exposure associated with human illness and kidney disease including focal segmental glomerulosclerosis. *J. Environ public Health*.2012. 835059.
- 10- Huff, W.E., Doerr,J.A. (1981): Synergism between aflatoxin and ochratoxin A in broiler chickens. *poult sci*.60 (3):550-5.
- 11- kamkar, A., JahedKhaniki , Gr.,alavi ,As.(2011)occurrence of aflatoxinM1 in raw milk produced in Ardabil of iran.*Iran J Environ Health SciEng* 8:123-128.
- 12- Kalarestaghi, A., Bayat, M., Hashemi, S.J, Razavilar.(2015) Highly Sensitive FRET-Based Fluorescence Immunoassay for Detecting of Aflatoxin B1 Using Magnetic/Silica Core-Shell as a Signal Intensifier. *Iran J Biotechnol sep*:13(3);25-31.
- 13- Lamberti, I., Tanzarella, C., Solinas, I.,Padula, C., Mosiello, L. (2009): An antibody-based microarray assay for the simultaneous detection of OTA and fumonisin B1. *Mycotoxin Res* 25:193.
- 14- Liao, J.Y., Li, H. (2010): Lateral flow immunodipstick for visual detection of OTA in food using immuno-nanoparticles composed of aSilver core and a gold shell. *Microchim Acta* 171:289.
- 15- Sapsford, K.E.,Taitt, C.R., Fertig, S., Moore, M.H., Lassman, M.E., Maragos, C.M., Shriver-Lake, L.C. (2006): Indirect competitive immunoassay for detection of Aflatoxin B1 in corn and nut products using the array biosensor. *Biosens Bioelectron* 21:2298-305.
- 16- Shanehsaz, M., Mohsenifar, A., Hasannia, S., Pirooznia, N., Samaei, Y., Shamsipur, M. (2013): Detection of Helicobacter pylori with a Nano biosensor based on fluorescence resonance energy transfer using CdTe quantum dots. *Microchim Acta*180:195.
- 17- Xiulan, S., Xiaolian, Z., Jian, T., Xiaohong, G., Jun, Z., Chu, FS. (2006): Development of an immune chromatographic assay for detection of OTA in foods. *Food Control* 17:256.
- 18- Xiulan, S., Xiaolian, Z., Jian, T., Xiaohong, G., Jun, Z., Chu, FS. (2006): Preparation of gold- labeled antibody probe and its use inimmue chromatography assay for detection of OTA. *Int J Food Microbiol* 99:185.
- 19- Zekavati, R., Safi, S., Hashemi, S., Rahmani, C. T., Tabatabaei, M., Mohsenifar, A., Bayat, M. (2013): Highly sensitive FRET – based fluorescence immunoassay for aflatoxin B1 using cadmium telluride quantum dots. *Microchim Acts*. 180 (13-14): 1217- 23.

