

طراحی یک نانوحسگر زیستی با استفاده از آنتی بادی تثبیت شده روی نقاط کوانتومی و رودامین متصل به سیتترین جهت شناسایی مایکوتوکسین

بهرز شجاعی سعدی^۱، منصور بیات^{۲*}، پرویز تاجیک^۳، سید جمال هاشمی^۴

مقدمه

براساس برخی تخمین‌ها، بیش از ۲۵ درصد کل غلات تولیدی سالیانه در جهان در معرض آلودگی به سموم قارچی (Mycotoxins) قرار دارند (۱). این مواد بسیار سمی، ترکیباتی هستند که به‌طور طبیعی از رشد قارچ‌ها و یا کپک‌ها حاصل می‌شوند. بنابراین از بین بردن این ارگانسیم‌ها، ممکن است که تولید سموم قارچی را متوقف کند، اما قادر به حذف توکسین‌هایی که از قبل در مواد غذایی تولید شده‌اند نیست (۲). به بیماری ایجاد شده توسط سموم قارچی، مایکوتوکسیکوزیس گویند (۳). مسمومیت با مایکوتوکسین‌های موجود در مواد غذایی یک مشکل بزرگ بهداشتی است که هزینه فراوانی را بر سیستم‌های بهداشتی و درمانی تحمیل می‌کند. لذا شناسایی مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی بسیار حائز اهمیت است (۴). شناسایی مایکوتوکسین‌ها شامل روش‌های سریع و مطمئن شیمیایی، ایمونولوژیکی و بیولوژیکی است و که اثرات پاتولوژیکی و کلینیکی آن‌ها را نیز تعیین می‌کند (۵). سیتترین یک هیدروکسی اسید است که اولین بار از قارچ پنی سیلیوم سیتترینوم جداسازی شد ولی امروزه توسط چندین قارچ رشته‌ای دیگر از جنس پنی سیلیوم، اسپرژیلوس و موناسکوس نیز تولید شده است (۶). این مایکوتوکسین یک هپاتونفروتوکسین است که به‌عنوان یک آلاینده طبیعی در دانه‌های غلات، حبوبات، غذاها، خوراک دام، میوه‌ها، گوشت، پنیر و غیره یافت می‌شود (۷). روش‌های مختلفی به‌منظور تعیین میزان آلودگی مواد غذایی

چکیده

سیتترین متابولیت نفروتوکسیکی است که در حیوانات به کلیه‌ها آسیب وارد می‌کند. لذا گسترش روش‌های سم‌زدایی طی فرآیند مواد غذایی اهمیت دارد. کوانتوم‌دات‌ها با استفاده از یک منبع برانگیختگی با طول‌موج منفرد تحریک‌شده و پیک‌های نشری متفاوتی را ارائه می‌دهند. در این تحقیق یک حسگر جدید بر اساس بیوکونژوگه شامل نانو کریستال‌های نیمه‌هادی کوانتوم دات و آنتی‌بادی ضد سیتترین با بکار بردن سیستم FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) برای تعیین میزان سموم سیتترین بکار گرفته شد. نانو کریستال‌های نیمه‌هادی یا کوانتوم‌دات‌ها (CdTe, CdTe/CdS)، با استفاده از روش رفلاکس با احیاء پودر تلوریوم و تحت جریان گاز ازت در آزمایشگاه سنتز شد. شدت فلورسانس کوانتوم دات‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوریمتری تعیین گردید. فعالیت آنتی‌بادی در نانوبیوکونژوگه نیز توسط دستگاه اسپکتروفلوریمتری سنجیده شد. سپس کونژوگه سیتترین-آلبومین نیز به ترکیب فلورسانس رودامین ۱۲۳ متصل شد که این واکنش ایمونولوژیکی با میل ترکیبی بالا بین آنتی‌بادی ضد سیتترین-کوانتوم‌دات (دهنده) و لیبل سیتترین-رودامین (گیرنده) به‌عنوان فلوروفور استفاده می‌شود. بعد از اضافه کردن محلول نانوبیوکونژوگه به داخل کوورت که حاوی مقدار معینی بافر فسفات است، سیتترین با غلظت‌های مختلف به آن اضافه شد و بعد از چند دقیقه تغییرات در شدت فلورسانس کوانتوم دات مشاهده گردید. کاهش منظم شدت فلورسانس با افزایش غلظت سیتترین به دست آمد. با توجه به آثار جمعی که مایکوتوکسین‌ها بر سلامتی انسان و حیوان دارند تعیین میزان آلودگی مواد غذایی به مایکوتوکسین‌ها از جمله سیتترین با استفاده از نانوبیوسنسورها به‌عنوان یک روش اختصاصی که ناشی از بکار بردن آنتی‌بادی مونوکلونال در آن است، عملکرد بهتری دارد. این نانوبیوسنسور طراحی شده برخلاف روش‌های معمولی مثل ELISA و HPLC به‌صورت هموزن، ساده، سریع، و ارزان‌اند و نیاز به مراحل جداسازی یا شستشوی زیاد ندارد.

واژگان کلیدی: نانوحسگر زیستی، رودامین، سیتترین، کوانتوم دات.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۲۷

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
 ۲* - استاد تمام گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران (dr_mansour_bayat@yahoo.com).
 ۳ - استاد تمام گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
 ۴ - استاد تمام گروه قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

برچسب‌های زیستی، حسگرهای نوری، تشخیص کاتیون‌ها و آنیون‌ها و پایداری نوری قابل قبول می‌باشند (۱۵). کوانتوم دات‌ها با اندازه کوچک خود به راحتی می‌توانند به داخل سلول‌ها نفوذ کرده و به نقطه هدف برچسب شوند. تغییرات در شعاع کوانتوم دات‌ها به صورت تغییر رنگ کوانتوم دات‌ها در محلول آشکار می‌شود (۱۰). این ویژگی باعث می‌شود که بتوان به طور هم‌زمان از کوانتوم دات‌ها به عنوان برچسب‌های رنگی در شناسایی استفاده کرد. با توجه به خصوصیات ذکر شده، هدف از انجام مطالعه حاضر طراحی یک نانو حسگر زیستی با استفاده از آنتی‌بادی تثبیت‌شده روی نقاط کوانتومی و رودامین متصل به سیتترین جهت شناسایی سیتترین می‌باشد.

مواد و روش کار

سنتز نانو کریستال‌های نیمه‌هادی کوانتوم دات CdTe /cds

پس از توزین ۲۶ میلی‌گرم از پودر تلوریوم، آن را با ۲ ml آب مقطر استریل حل کرده و سپس ۱۰۰ میلی‌گرم سدیم برویدرید (NaBH_4) روی آن اضافه و با کپسول گاز ازت به مدت نیم ساعت دگاز نمودیم. این محلول را در بن ماری ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱-۲ ساعت قرار داده تا پودر تلوریوم به طور کامل حل شود. در مرحله بعدی در یک بشر ۲۹ میلی‌گرم پودر کادمیوم کلراید ریخته شد و سپس ۲۷ میکرو لیتر تیوگلیکولیک اسید نیز اضافه شد. به دلیل ناپایداری نانو ذرات pH محلول با استفاده از هیدروکسید سدیم ۱ مولار روی ۱۱ تنظیم شد. بعد از استریل کردن، محتوای بشر را به ظرف مخصوص رفلاکس منتقل کرده و نیم ساعت تحت جریان گاز ازت قرار می‌دهیم. درحالی‌که محلول بر روی یک هم زن مغناطیسی بر هم زده می‌شد (استیرر)، بلافاصله تلوریوم احیاء شده از دهانه دیگر ظرف رفلاکس اضافه گردید. در نتیجه کادمیوم تلوریوم ایجاد شد. تغییر رنگ محلول نشان‌دهنده تشکیل کوانتوم دات بود.

به سیتترین از جمله کروماتوگرافی مایع با کارایی، گاز کروماتوگرافی، کروماتوگرافی لایه‌نازک و الیزا وجود دارند (۸). با این وجود امروزه یافتن اختصاصی توکسین‌ها با استفاده از نانو حسگرهای زیستی مورد توجه است. در این حسگرهای زیستی از آنتی‌بادی اختصاصی علیه سیتترین استفاده می‌شود که بر روی نانو ذرات کوانتومی تثبیت خواهند شد. این ثبات موجب حساس‌تر شدن نانوبیوسنسور نسبت به روش‌های مشابه و یا سنتی در تشخیص سیتترین می‌شود (۹).

وجود ویژگی‌های بی‌نظیر نوری، شیمیایی، و فیزیکی کوانتوم دات‌ها بسیار مورد توجه محققین است (۱۰). فوتو لومینسنس، طیف نشری باریک، طیف برانگیختگی پهن و پایداری نوری بالا از خصوصیات بی‌نظیر کوانتوم دات‌ها می‌باشد. اخیراً توجه زیادی برای استفاده از کوانتوم دات‌ها به عنوان برچسب‌های فلورسانس در کاربردهای زیستی شده است. به خاطر اندازه بسیار کوچک کوانتوم دات‌ها و ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی بی‌نظیری که دارند، از جامدات متمایز می‌باشند (۱۱). از آنجایی که تعداد اتم‌های روی سطح برابر یا حتی بیشتر از قسمت داخلی نانوذره است، منجر به تغییراتی در ساختار الکترونیکی می‌شود. بنابراین، ذرات نیمه‌هادی از لحاظ شیمیایی به ویژه وقتی که اندازه آن تا حد کوانتوم (چندین نانومتر) کاهش می‌یابد فعال می‌شوند (۱۲). کوانتوم دات‌ها می‌توانند با استفاده از یک منبع برانگیختگی با طول موج منفرد تحریک‌شده، پیک‌های نشری متفاوتی را ایجاد کنند (۱۳). فلوروفورهای شیمیایی استفاده‌شده، معمولاً دارای اشکالاتی مثل حساسیت به تغییرات شیمیایی، سفید شدن نوری و طیف نشری باریک می‌باشند (۱۴). درحالی‌که کوانتوم دات‌ها نسبت به این تغییرات مقاوم هستند. ویژگی‌های بی‌نظیر کوانتوم دات‌ها، آن‌ها را جایگزین مناسبی برای فلوروفورهای آلی در محدوده وسیعی از کاربردها شامل آنالیزهای زیستی،

آماده سازی کونژوگه آلبومین - رودامین

پس از تهیه سوسپانسیونی از آلبومین، NaBH_4 را به آن اضافه می‌کنیم و در شرایط یخ و با دور 80rpm شیکر می‌کنیم. بعد محلول رودامین- 123 را طبق دستورالعمل شرکت سازنده (سیگما آلد ریچ) تهیه کرده و به صورت قطره قطره داخل آلبومینی که در حال استیر روی محیط یخ است، می‌ریزیم تا اتصالات برقرار و به صورت *Over night* محلول را از کیسه دیالیز عبور می‌دهیم تا NaBH_4 اضافی بیرون آید، سپس مقدار 4 میلی‌گرم از NaBH_4 را شود به 20°C محلول گلو تار آلدهید 5% اضافه می‌کنیم و در نهایت محلول آلبومین تهیه شده را قطره قطره به محلول بالای درحالی که در محیط یخ و شیکر قرار دارد، اضافه می‌نماییم.

آماده سازی کونژوگه سیتترین - رودامین

به منظور تهیه کونژوگه سیتترین - آلبومین با رودامین- 123 ، ابتدا 360 میکرو لیتر از محلول گلو تار آلدهید (10%) را به 140 میکرو لیتر کونژوگه سیتترین - آلبومین اضافه می‌کنیم. مخلوط حاصل به صورت 24 ساعته در 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. سپس مخلوط حاصل را از کیسه دیالیز 1lit 2×1 توسط 50 میلی‌مول بافر فسفات با $\text{pH}=4$ عبور می‌دهیم. در مرحله بعدی حدود 100 میکرو لیتر از محلول آماده NaBH_4 را به مخلوط سیتترین - آلبومین سرم گاوی - رودامین 123 اضافه می‌کنیم. محلول حاصل در دمای اتاق جهت کامل شدن کاهش واکنش انکوبه می‌شود.

آزمون فلورو متریک

خواص اپتیکی کوانتوم دات سنتز شده و نانو بیوسنسور طراحی شده در دستگاه اسپکتروفلوریمتری مطالعه شد. طول موج تهییج کوانتوم دات cdTe در 320 نانومتر تنظیم شد و طیف نشری رودامین 123 در طول موج‌های بین $640 - 400$ نانومتر یادداشت گردید.

ساختار و ارزیابی نانوبیوسنسور

دمای محلول را به 100 درجه سانتی‌گراد رسانده و سپس رفلکس برقرار شد. بعد از 90 دقیقه محلول از رنگ زرد به نارنجی تغییر رنگ داد که حاکی از بزرگ شدن اندازه کوانتوم دات بود. در این مرحله هسته cdTe تشکیل شد. برای تهیه کوانتوم دات هسته - پوسته (*core/shell*) دما را به دمای اتاق رسانده، دوباره محلول تحت جریان گاز ازت قرار داده شد و رفلکس را بسته و در شرایط استیر شدید، حدود $1/5$ میلی‌گرم تیواستامید به عنوان منبع گوگرد اضافه شد. سپس دمای محلول را به 80 درجه سانتی‌گراد رسانده و بعد از نیم ساعت محلول به رنگ قرمز تغییر رنگ داد، که این نشان‌دهنده تشکیل هسته/پوسته cd Te /cde بود. با افزایش اندازه کوانتوم دات رنگ و پایداری آن تغییر یافت. برای بررسی فلورسانس کوانتوم دات‌ها هر نیم ساعت حدود 1 میلی‌لیتر از محلول برداشته شد.

ارزیابی و تأیید تشکیل کوانتوم دات‌ها

برای تأیید کوانتوم دات‌های سنتز شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوریمتری فلورسانس و طیف نشری کوانتوم دات‌های برداشت شده در هر دقیقه بررسی شدند.

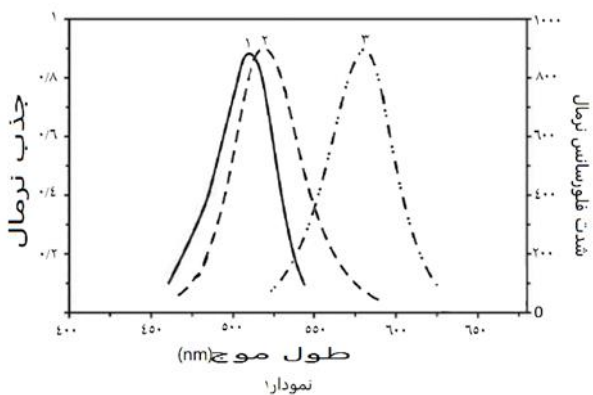
آماده سازی آنتی بادی سیتترین

ایموبیلیزاسیون آنتی بادی سیتترین بر روی سطح کوانتوم

دات cdTe

ابتدا 1mL کوانتوم دات برداشت کرده، روی هم زن مغناطیسی قرار داده تا استیر شود. سپس به میزان 200ng از آنتی بادی رقیق شده سیتترین (تهیه شده از سیگما آلد ریچ) را برداشت کرده و قطره قطره به کوانتوم دات اضافه شد و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید تا واکنش انجام گیرد. سپس برای جدا کردن کونژوگه یا کوانتوم دات آزاد از دستگاه سانتریفیوژ استفاده شد. به این ترتیب که به میزان 5% محلول گلو تار آلدهید تهیه کرده و با دور 3000 سانتریفیوژ شد.

کوانتوم دات‌های سنتز شده با طول موج ۳۲۵ نانومتر برانگیخته شد و با تغییر اندازه کوانتوم دات‌ها طیف نشری آن از ۵۱۰ نانومتر تا ۶۸۰ نانومتر افزایش یافت. میزان جذب و طیف نشری محلول خالص به دست آمده از کوانتوم دات CdTe و رودامین-۱۲۳ در نمودار ۱ نشان داده شده است. همان طوری که ملاحظه می‌شود زمانی که ماکزیمم جذب و پیک نشری رودامین-۱۲۳ به ترتیب حدود ۵۱۰ و ۵۸۰ نانومتر است ماکزیمم پیک نشری کوانتوم دات در طول موج حدود ۵۰۵ نانومتر می‌باشد. طیف نشری تمام پهنای نصف ماکزیمم (FWHM) کوانتوم دات حدود ۳۵ نانومتر است.



شکل ۱- میزان جذب و طیف نشری محلول خالص به دست آمده از کوانتوم دات و رودامین-۱۲۳

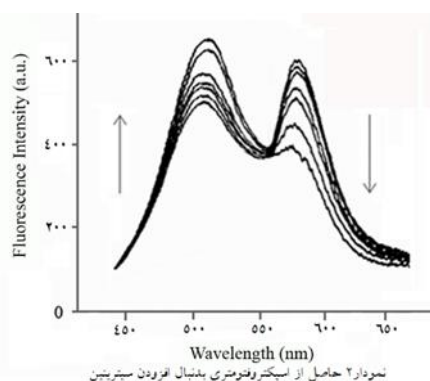
طبق نتایج مربوط به تثبیت آنتی‌بادی سیتیرینین بر روی کوانتوم دات‌ها، مقدار مشخصی از آنتی‌بادی سیتیرینین به کوانتوم دات‌های سنتز شده اضافه شد. با توجه به اینکه اندازه کوانتوم دات‌ها بسیار کوچک بوده و احتمال اتصال آنتی‌بادی به کوانتوم دات‌ها از طریق پیوند کووالانسی افزایش می‌یابد، فعالیت آنتی‌بادی در نانوبیوکونژوگه توسط دستگاه اسپکتروفلوریمتری با طول موج ۳۲۰ نانومتر دامنه از ۴۰۰-۶۴۰ نانومتر سنجیده شد. کاهش شدت نوری محلول نانوبیوکونژوگه کوانتوم دات-آنتی‌بادی ضد سیتیرینین در طول موج ۲۸۰ نانومتر بعد از قرار گرفته در سانتریفیوژ با

به منظور ارزیابی بیوسنسور طراحی شده، میزان ۲/۵ میلی لیتر از بافر فسفات با $\text{pH} = 7/4$ به کووت فلوریمتری ریخته می‌شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول سیتیرینین - آلبومین سرم گاوی - رودامین (citritin - BSA - Rhodamine) به بافر اضافه می‌گردد. در مرحله بعد، حدود ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌بادی سیتیرینین - کوانتوم دات (citritin antibody - QDS) به مخلوط قبلی اضافه شده و بعد از ۵ دقیقه انکوبه شدن واکنش مابین آنتی‌ژن - آنتی‌بادی انجام می‌گیرد و طیف نشری یادداشت می‌گردد. سپس محلول سیتیرینین - آلبومین سرم گاوی - رودامین ۱۲۳ به طور مرتب به کووت اضافه شدند و میزان ماکزیمم طیف نشری به دست آمد. سپس یکسری از محلول سیتیرینین به طور مرتب به کووت اضافه شد و طول موج نشری یادداشت گردید. اختلاف بین طیف نشری با میزان غلظت به صورت سیگنال و خط منحنی کالیبره شد.

نتایج

کوانتوم دات‌ها در آزمایشگاه از طریق روش رفلکس در فاز آبی تحت جریان گاز ازت سنتز شدند. کوانتوم دات‌های سنتز شده دارای پایداری زیادی بودند. تغییر رنگ‌ها و پیک‌های نشری و شدت فلورسانس نانو ذرات، نشان‌دهنده تشکیل کوانتوم دات‌ها بود. کوانتوم دات‌های سنتز شده در لحظه اول سبز کم‌رنگ بودند ولی با گذشت زمان و افزایش دما رنگ محلول به زرد، سپس نارنجی و در آخر قرمز تیره که ناشی از تشکیل پوسته بود، ایجاد گردید و با گذشت زمان اندازه کوانتوم دات و در نتیجه احتمال تجمع نانو ذرات و ناپایداری آن نیز افزایش یافت. کوانتوم دات‌های سنتز شده شامل دو نوع هسته (CdTe) و هسته - پوسته (CdTe/CdS) و (CdTe/CdSe) بودند.

سیتترین به دست آمد. نتایج حاصل از اسپکتروفلوریمتری در ارتباط با نانوحسگر زیستی: نتایج نشان داد که با افزودن غلظت سیتترین کاهش شدت فلورسانس کوانتوم دات مشاهده شد.



شکل ۲- طیف جذبی اسپکتروفتومتری به دنبال افزودن سیتترین

بحث

مایکوتوکسین ها اهمیت زیادی از نظر ایمنی و سلامت مصرف کنندگان و مسائل اقتصادی و صادرات محصولات کشاورزی دارند. از جمله این مایکوتوکسین ها، آفلاتوکسین B1 بوده که از عوامل تراژونیک، موتاژنیک و سرطانزای انسانی است (۲). روش هایی که به طور معمول در تعیین مایکوتوکسین ها مورد استفاده قرار می گیرند بر پایه کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC - High performance liquid chromatography) و آزمون الیزا (ELISA) استوار هستند (۱۶). روش TLC دارای ضریب تغییرات نسبتاً بالا می باشد و تنها درجایی که سطوح آلودگی مایکوتوکسین بالاتر از حدود کنترل فعلی (cut of) باشد، کاربرد دارد. سایر روش های کروماتوگرافی مانند HPLC، تکنیک های بسیار گران قیمت و وقت گیری هستند که برای انجام نیز به افراد باتجربه نیاز دارد. از طرف دیگر در روش های TLC و

سرعت بالا وجود پیوند کووالانسی بین آنتی بادی ضد سیتترین B1 و کوانتوم دات را تأیید کرد. ایموبیلیزاسیون آنتی بادی ضد سیتترین روی پوسته کوانتوم دات حاصله در طیف نشری آن ها تغییری ایجاد نکرد. برای اثبات لیبیل سیتترین -آلبومین با رودامین ۱۲۳، چگالی نوری دیالیز مخلوط سیتترین -آلبومین رودامین ۱۲۳ با دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. در رودامین -۱۲۳ ماکزیمم طول موج جذب در ۵۱۰ نانومتر بود. یک جذب قوی در ۵۱۰ نانومتر حضور رودامین ۱۲۳ را در نمونه نشان داد.

یک سیستم FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) به طور واضح می تواند زمانی که یک واکنش ایمنولوژیکی بین کوانتوم دات لیبیل شده با آنتی بادی سیتترین و رودامین -۱۲۳ لیبیل شده با سیتترین -آلبومین اتفاق می افتد را نشان دهد. شدت فلورسانس رودامین -۱۲۳ در ۵۸۰ نانومتر به طور متوالی با افزودن محلولی که شامل رودامین -۱۲۳ لیبیل شده با سیتترین -آلبومین بود از میزان ۰/۱ میکرومول در میلی لیتر تا ۰/۶ میکرومول در میلی لیتر، در مدت زمان مخصوصی افزایش یافت. تغییرات مشاهده شده در شدت نشر رودامین -۱۲۳ به طور مستقیم متناسب با غلظت نهایی رودامین -۱۲۳ لیبیل شده با سیتترین -آلبومین بود تا زمانی که تمام ظرفیت های آنتی بادی ضد سیتترین اشغال شده بارودامین -۱۲۳ لیبیل شده با سیتترین -آلبومین توسط آنتی ژن ها پر شد، شدت فلورسانس افزایش یافت. ولی با افزایش بیشتر غلظت رودامین -۱۲۳ لیبیل شده با سیتترین -آلبومین، دیگر تغییر زیادی در پیک نشری رودامین -۱۲۳ مشاهده نشد (شکل ۲). بعد از اضافه کردن حدود ۲۰ میکرولیتر از محلول نانو بیوکونژوگه به داخل کووت که حاوی مقدار معینی فسفات بافر بود، سیتترین با غلظت های مختلف به کووت اضافه گردید. بعد از چند دقیقه، تغییرات در شدت فلورسانس کوانتوم دات مشاهده شد. کاهش منظم شدت فلورسانس با افزایش غلظت

راديوآکتیو در آنالیز سموم مانند مایکوتوکسین ها استفاده می شود (۱۵). اکثر پیشرفت های تکنولوژی باعث افزایش حساسیت، انتخابی بودن و قابلیت اطمینان ابزار حسگر زیستی مایکوتوکسین ها می شود و اندازه بسیار کوچک کوانتوم دات CdTe، نسبت سطح به حجم بیشتر، منجر به بارگیری بیشتر و افزایش حساسیت فضای داخلی آن می شود (۱۴).

در این مطالعه از کوانتوم دات ها در مبتد FRET - based استفاده شد و به عنوان یک تکنیک دقیق، سریع و مؤثر برای تعیین آفلاتوکسین ها بکار رفت. کوانتوم دات اپتیکی مورد استفاده در این پروژه دارای قطری بین ۲ تا ۱۰ نانومتر و حاوی ۲۰۰ تا ۱۰۰۰۰ اتم که قابل مقایسه با یک پروتئین بزرگ است، می باشد. در مقایسه بارنگ های آلی، کوانتوم دات ها جایگزین مناسب تری برای آنالیز سموم می باشند.

علت استفاده از کوانتوم دات CdTe، ویژگی های بی نظیر نوری، شیمیایی و فیزیکی این نانو کریستال است که در سال های اخیر توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. این نانو ذرات نسبت سطح به حجم بیشتری دارند و همین امر موجب می شود که توانایی اتصال بیشتری را از خود نشان دهند (۲۱). همچنان که اندازه این ذرات کاهش می یابد، تعداد بیشتری از اتم ها در سطح قرار خواهند گرفت و در نتیجه مواد نانو با ذرات کوچک تر در مقایسه با مواد ذرات بزرگ تر دارای سطح بیشتری در واحد جرم هستند که با توجه به ازدیاد سطح، تماس مواد با سایر عناصر محیط بیشتر شده و موجب افزایش واکنش با آن ها می شود و این عمل منجر به تغییرات عمده در شرایط اپتیکی، فلورسنتی، مکانیکی و الکترونیکی این مواد خواهد شد. کوانتوم دات هایی تحقیق حاضر با روش ساده رفلکس و در محیط آبی سنتز شد. ماده احیاء کننده سدیم بور هیدرید بود. هر چه غلظت ماده احیاء کننده بیشتر باشد اندازه نانو ذره تشکیل شده کوچک تر می شود (۲۲).

HPLC نیاز به یک مرحله استخراج با فاز جامد یا ستون ایمنو افینیتی می باشد. بنابراین در مطالعات و آزمون های معمول، روش های ایمنولوژیک کنونی به روش های کروماتوگرافی ترجیح داده می شود (۱۷). در حال حاضر علاقه به استفاده از کیت های ELISA به دلیل نیاز به حجم کم و روش ساده تر تخلیص نمونه نسبت به روش های مرسوم مانند TLC و HPLC بیشتر می باشد. این روش ها قابل استفاده در بسیاری از موارد بوده و از متداول ترین روش های سریع (rapid tests) برای تشخیص مایکوتوکسین ها در محصولات غذایی شناخته شده اند (۱۸). با این حال از آنجا که آنتی بادی های تولید شده اغلب با ترکیبات مشابه مایکوتوکسین ها واکنش متقاطع نشان می دهند و ممکن است در مقایسه با روش کروماتوگرافی، مقادیر بالاتری را نشان دهند، در نتیجه مطالعات گسترده ای در مورد صحت و دقت روش ELISA و طراحی روش های اختصاصی ضروری است (۱۹).

در همین راستا نانو تکنولوژی و بیوسنسورها می توانند راه حل خوبی را ارائه کنند. علت اینکه مواد در ساختار نانو توجه زیادی را به خود جلب کرده اند، خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد آن ها و کاربردهای مهمی است که دارند. اندازه نانو ذرات تقریباً مشابه اندازه بسیاری از مولکول ها و ساختارهای زیستی است و در این میان ذرات با اندازه ۱۰۰-۱ نانومتر بسیار مورد استقبال می باشند (۲۰).

حسگرهای ایمنی بر اساس آنتی بادی، انتخاب و ابزاری با هزینه نسبتاً پایین برای آنالیز سموم از جمله آفلاتوکسین B1 را ارائه می دهند و به دست آوردن آنتی بادی های مونوکلونال، به طور شگفت انگیزی گسترش تکنیک حسگرهای زیستی را توضیح می دهد. به دلیل مزیت عدم محدودیت در تهیه آنتی بادی های مونوکلونال و هموزنه، اکثر ابزارهای حسگر ایمنو بر اساس اندازه گیری و ارزیابی غیرمستقیم لیلل های اتصال یافته مثل مواد شیمیایی فلورسانس یا ایزوتوپ های

بیوکونژوگه تشکیل شده در آزمایشگاه برای مدت زیادی از هرگونه تراکم به دور بود، همچنین آنتی بادی برای مدت زیادی فعالیت خود را حفظ کرد که این دلیلی بر تشکیل نانوبیوکونژوگه می باشد.

ردیابی فلورسانس به صورت انتقالی می تواند حساسیت بالاتر و محدوده ردیابی بیشتری را فراهم کند. همچنین تحقیقات وسیعی بر روی تشخیص اولیه سرطان با استفاده از کوانتوم دات ها انجام شده است. Lodhi و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که کوانتوم دات های سبز و نارنجی می توانند به عنوان کاوشگر فلورسانس حساس به pH استفاده شوند و به صورت مستقل انواع مختلف واکنش های آنتی ژن - آنتی بادی را تشخیص دهند (۲۹). کوانتوم دات ها در حسگر یونی به علت فلورسانس بالای خود نقش مهمی دارند. همچنین، از فواید دیگر کوانتوم دات ها به عنوان کاوشگر یونی پوشاندن (ماسکه کردن) آنها با معرف های پوشاننده مثل سرم آلبومین گاوی می باشد.

Chen و همکاران (۲۰۱۹) نوعی بیوسنسور براساس نانو ذره طلا را که توسط تکنیک چند مرحله با نانوتیوب های کربن، از قبل روی الکتروود کربن ساکن برای تثبیت از طریق پیوند کووالانسی با کوانتوم دات استقرار داده شده بود را معرفی کند (۳۰). نانو ذرات طلا و نانوتیوب های کربن اثرات سینرژیک دارند. کوانتوم دات بیشتر به عنوان حامل برای بارگیری بیشتر آنزیم و سموم استفاده می شود و می تواند دوباره مورد استفاده قرار بگیرد. این سیستم از حساسیت بالایی برخوردار بوده و نسبت به حضور متیل پاریتون سریعاً پاسخ می دهد.

فهرست منابع

1. Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International journal of food microbiology*. 2007 Oct 20;119(1-2):3-10.

کاهش نقص های سطحی کوانتوم دات ها از جمله افزایش پایداری نوری و کاهش سمیت هسته با تشکیل پوسته تا حد زیادی در واکنش پذیری آنها نقش دارند. همچنین استفاده از ترکیباتی مانند مرکاپتو پروپیونیک اسید و تیوگلیکولیک اسید در واکنش پذیری سطح کوانتوم دات ها، نقش مهمی دارد (۲۳). برای افزایش حلالیت کوانتوم دات ها می توان از لیگاند های هیدروفیلیک استفاده کرد. فرآیند انتقال انرژی رزونانس سطح وقتی اتفاق می افتد که انرژی برانگیختگی الکترونی یک کروموفور دهنده به یک مولکول پذیرنده منتقل می شود که از طریق پیوند دوقطبی - دوقطبی بین جفت دهنده و پذیرنده تشکیل می شود. میزان انرژی انتقالی به فاصله بین دهنده و پذیرنده الکترون بستگی دارد. وقتی که کوانتوم دات ها به جای کروموفور به عنوان دهنده FRET عمل می کنند، می توانند در تشخیص میکروآنالیت ها مفید واقع شوند (۲۴).

به دلیل ویژگی های نوری و مغناطیسی کوانتوم دات ها، کاربرد آنها در سیستم های بیوسنسوری دارای اهمیت زیادی می باشد. روش های متنوعی برای تثبیت آنتی بادی ها و سایر ماکرومولکول ها بر روی کوانتوم دات ها وجود دارد. معمولاً اتصال بین کوانتوم دات ها و آنتی بادی ها از طریق پیوندهای کووالانسی بین گروه های آمین آنتی بادی ها و عوامل گوگردی انتهای نانو کریستال ها تشکیل می شود. Zhong و همکاران (۲۰۲۰) (۲۵)، Peng و همکاران (۲۰۰۱) (۲۶)، Wang و همکاران (۲۰۰۱) (۲۷) و Miao و همکاران (۲۰۱۴) (۲۸) گزارش هایی مبنی بر تشکیل بیوکونژوگه کوانتوم دات - پروتئین از طریق استراتژی خود تجمعی را ارائه دادند. در تحقیق حاضر کمپلکس نانوبیوکونژوگه یا مخلوط کردن ساده کوانتوم دات و آنتی بادی ها در دمای اتاق تشکیل شد. رودامین از طریق پیوند کووالانسی بین بار مثبت موجود در عامل آمین انتهایی آنتی بادی و بار منفی مربوط به سطح کوانتوم دات با نانوذره مربوطه جفت می شود. نانو

2. Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi chemical society*. 2011 Apr 1;15(2):129-44.
3. Corrier DE. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1991 Nov 1;30(1):73-87.
4. Hollinger K, Ekperigin HE. Mycotoxicosis in food producing animals. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1999 Mar 1;15(1):133-65.
5. Koukouvinos G, Karachaliou CE, Kanioura A, Tsougeni K, Livaniou E, Kakabakos SE, Petrou PS. Fluorescence Enhancement on Silver-Plated Plasma Micro-Nanostructured 3D Polymeric Microarray Substrates for Multiplex Mycotoxin Detection. *Processes*. 2021 Feb;9(2):392.
6. Flajs D, Peraica M. Toxicological properties of citrinin. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2009 Dec 1;60(4):457-64.
7. Föllmann W, Behm C, Degen GH. Toxicity of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone and of mixtures of citrinin and ochratoxin A in vitro. *Archives of Toxicology*. 2014 May 1;88(5):1097-107.
8. Xu Y, Xiong L, Li Y, Xiong Y, Tu Z, Fu J, Tang X. Citrinin detection using phage-displayed anti-idiotypic single-domain antibody for antigen mimicry. *Food chemistry*. 2015 Jun 15;177:97-101.
9. Oliveira IS, da Silva Junior AG, de Andrade CA, Oliveira MD. Biosensors for early detection of fungi spoilage and toxigenic and mycotoxins in food. *Current Opinion in Food Science*. 2019 Oct 1;29:64-79.
10. Jacak L, Hawrylak P, Wojs A. *Quantum dots*. Springer Science & Business Media; 2013 Jun 29.
11. Woggon U. *Optical properties of semiconductor quantum dots*. Berlin: Springer; 1997 Jan 1.
12. Wang Y, Hu A. Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications. *Journal of Materials Chemistry C*. 2014;2(34):6921-39.
13. Ding L, Fang Y. Chemically assembled monolayers of fluorophores as chemical sensing materials. *Chemical Society Reviews*. 2010;39(11):4258-73.
14. Li N, Lei F, Xu D, Li Y, Liu J, Shi Y. One-step synthesis of N, P Co-doped orange carbon quantum dots with novel optical properties for bio-imaging. *Optical Materials*. 2021 Jan 1;111:110618.
15. Zhu X, Li Z, Hu G, Li J, Xiang B. The effects of various molecular weight of passivator on the photoluminescence properties of graphene quantum dots. *Materials Chemistry and Physics*. 2021 Jan;258:123922.
16. Anfossi L, Giovannoli C, Baggiani C. Mycotoxin detection. *Current opinion in biotechnology*. 2016 Feb 1;37:120-6.
17. Oplatońska-Stachowiak M, Reiring C, Sajic N, Haasnoot W, Brabet C, Campbell K, Elliott CT, Salden M. Development and in-house validation of a rapid and simple to use ELISA for the detection and measurement of the mycotoxin sterigmatocystin. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2018 May;410(12):3017-23.
18. Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica chimica acta*. 2009 Jan 26;632(2):168-80.
19. Zhou S, Xu L, Kuang H, Xiao J, Xu C. Immunoassays for rapid mycotoxin detection: state of the art. *Analyst*. 2020;145(22):7088-102.
20. van der Gaag B, Spath S, Dietrich H, Stigter E, Boonzaaijer G, van Osenbruggen T, Koopal K. Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control*. 2003 Jun 1;14(4):251-4.
21. Safarpour H, Safarnejad MR, Tabatabaei M, Mohsenifar A, Rad F, Basirat M, Shahryari F, Hasanzadeh F. Development of a quantum dots FRET-based biosensor for efficient detection of *Polymyxa betae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2012 Oct 1;34(4):507-15.

22. Borghei YS, Hosseini M, Ganjali MR. Fluorometric determination of microRNA via FRET between silver nanoclusters and CdTe quantum dots. *Microchimica Acta*. 2017 Dec;184(12):4713-21.
23. Wang RY, Wu J, Wang LJ, Wang R, Dou HJ. Spectrofluorometric determination of iron II based on the fluorescence quenching of cadmium/tellurium quantum dots. *Spectroscopy Letters*. 2014 Jul 3;47(6):439-45.
24. Larson DR, Zipfel WR, Williams RM, Clark SW, Bruchez MP, Wise FW, Webb WW. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science*. 2003 May 30;300(5624):1434-6.
25. Zhong H, Zhu W, Yan Z, Xu C, Wei B, Wang H. A quantum dot-based fluorescence sensing platform for the efficient and sensitive monitoring of collagen self-assembly. *New Journal of Chemistry*. 2020;44(26):11304-9.
26. Peng X, Schlamp MC, Kadavanich AV, Alivisatos AP. Epitaxial growth of highly luminescent CdSe/CdS core/shell nanocrystals with photostability and electronic accessibility. *Journal of the American Chemical Society*. 1997 Jul 30;119(30):7019-29.
27. Rosenthal SJ, Chang JC, Kovtun O, McBride JR, Tomlinson ID. Biocompatible quantum dots for biological applications. *Chemistry & biology*. 2011 Jan 28;18(1):10-24.
28. Miao L, Han J, Zhang H, Zhao L, Si C, Zhang X, Hou C, Luo Q, Xu J, Liu J. Quantum-dot-induced self-assembly of cricoid protein for light harvesting. *ACS nano*. 2014 Apr 22;8(4):3743-51.
29. Lodhi MS, Samra ZQ. Engineering Quantum Dot (Cadmium Sulfide) on Antibodies for Fluoroimmunoassays. *Journal of Nanomaterials*. 2020 Apr 21;2020.
30. Chen W, Ahn S, Rangel C, Vazquez-Mena O. Implementation of Metallic Vertical Interconnect Access in Hybrid Intercalated Graphene/Quantum Dot Photodetector for Improved Charge Collection. *Frontiers in Materials*. 2019 Jul 15;6:159.

