شبیه‌سازی سنسور زیستی جهت تشخیص *سالمونلا تایفی* به روش میکروکانتکت پلیمر قالب مولکولی

سید امیرعلی انوار[a*]، ودود رضویلر[b]، بهروز اکبری آدرگانی[c]، عباسعلی مطلبی مغانجوقی[b]، حامد اهری[d]

[a] استادیارگروه بهداشت، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[b] استاد گروه بهداشت، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[c] دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
[d] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۷/۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۸

چکیده

مقدمه: تشخیص جرم باکتری در مواد غذایی با استفاده از روش‌های سنتی در محدوده زمانی طولانی حدود چهار تا ده روز امکان‌پذیر است. با پیشرفت تکنولوژی نانو و طراحی سنسورهای انتخابی و هوشمند در زمانی کوتاه و با دقتی بسیار بالا می‌توان تشخیص جرم باکتری را در کمتر از چند دقیقه انجام داد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، از روش MIP (تکنیک پلیمر قالب مولکولی) استفاده شد. در ابتدا مونومرهای متااکریلیک اسید برای تهیه قالب مولکولی و پلیمر به کار گرفته شد. با پیوند کووالانسی بین مونومرهای متااکریلیک اسید (MAA) پلیمری سفید تشکیل گردید، همچنین پیوند هیدروژنی بین آنتی‌بادی و متااکریلیک اسید تشکیل شد. به کمک مبدل فلوئورسانس و اتصال آن با آنتی‌بادی باکتری *سالمونلا تایفی*، آنتی‌ژن *سالمونلا تایفی* تشخیص داده شد. به کمک دستگاه اسپکتروفلوریمتر میزان نشر فلورسانس پس از مجاورسازی قرائت گردید.

یافته‌ها: بر اساس نتایج، حداقل غلظت *سالمونلا تایفی* در محیط آب آلوده به جرم باکتری از غلظت $۱۰^{۱}$ سلول باکتری در هر میلی لیتر به بالا تشخیص داده شد. از طرفی از جهت ویژگی، سنسور طراحی شده مورد ارزیابی قرار گرفت و باکتری Ecoli نیز در محیط آب حاوی *سالمونلا تایفی* تلقیح شد و مشخص گردید که تداخلی در عملکرد سنسور طراحی شده ایجاد نمی گردد. همچنین حساسیت سنسور تا ۶۰ روزگی مورد آزمون قرار گرفت که عملکرد سنسور تا ۵۲ روزگی مورد تأیید بوده و بعد از زمان مذکور، کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: کاربری بایوسنسورها در تشخیص آلاینده‌های میکروبی روز به روز در حال افزایش می‌باشد. چرا که با لوله‌های حاوی غلظت‌های $۱۰^{-۱}$ الی $۱۰^{+۹}$ از سلول باکتری در هر میلی لیتر آنتی ژن *سالمونلا تایفی* که در محیط آب مقطر می‌باشد مجاورسازی انجام گردید. در نهایت زمان تشخیص را با حفظ ویژگی و حساسیت لازم از چند ساعت به چند دقیقه تقلیل داد.

واژه‌های کلیدی: *جرم باکتری، سالمونلا تایفی، شبیه سازی، میکروکانتکت، نانو بیوسنسور*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: saaa4824@gmail.com

مقدمه

سالانه معادل میلیاردها دلار هزینه دور ریز و خروج مواد غذایی فساد یافته از چرخه صنعت غذا می‌باشد، که به دلایل متعددی همچون نقل و انتقالات طولانی جاده‌ای، هوائی و یا دیرکرد جواب غیرقطعی آزمون‌های کنترل کیفی آزمایشگاه‌های همکار و مرجع بدلیل استفاده از روش‌های استاندارد مرسوم و نیز جواب‌های منفی کاذب نیاز به طراحی و جایگزینی روشهای نوین تشخیصی می‌باشد. که این مهم در مواردی همچون بلایای طبیعی، ورود و صادرات تناژ محصولات لبنی و فرآورده‌های گوشتی به کشورها در شرایط طبیعی و یا در شرایط غیرطبیعی همچون جنگ‌های انسانی و در برخی موارد در جنگ‌های بیوتروریسم بصورت عمد میلیون‌ها نفر از انسانهای بی گناه گریبان گیر و قربانی مقاصد شوم این عوامل گردیده و حجم انبوهی از مواد غذایی وارد شده به یک کشور به دلایل کمبود و یا نبود امکانات آزمون و حتی در برخی موارد نبود زمان کافی برای انتظار مورد مصرف قرار گرفته و سبب عفونت و مسمومیت جمعیتی بی‌گناه و مرگ و میری با برنامه می‌گردد، لذا با پیشرفت تکنولوژی و کاربری نانو در صنعت غذا علی‌الخصوص مبحث کنترل کیفی فرآورده‌های غذایی جای آن دارد که با نتایج حاصل از تحقیقات مستخرجه به تولید انبوه تجاری رسد چرا که هم از لحاظ زمان که فاکتوری بسیار سرنوشت‌ساز در محصولات غذایی که بصورت محموله در بندر یا گمرک رد و بدل می گردد، می باشد (در مواردی ناخواسته زمانی برای تشخیص و بررسی کنترل کیفی نداریم همچون بلایائی چون زلزله سیل و غیره) و هم از لحاظ مالی قابل قیاس با متشابهات تجاری تولید شده در خارج از کشور نبوده و از همه مهمتر میزان دقت و حساسیت که دو شاخص ایمنی و ضریب اطمینان در بحث کنترل نقاط بحران استاندارد می‌باشد حائز اهمیت است.

در بررسی انجام شده توسط liu و همکاران در سال ۲۰۱۳ با روش پلیمر قالب مولکولی به اندازه‌گیری اورانیوم در آب‌های شهری و آب دریا جهت ارزیابی آلاینده‌های زیستی پرداخته شد. نتایج در خصوص حد تشخیص و محدوده خطی به ترتیب 10^{-8} و 10^{-2} و 2×10^{-8} مولار بود.

در سال ۲۰۰۷ lin و همکاران با طراحی حسگر غشائی بر روی بستر پلیمری اصلاح شده با قالب مولکولی به اندازه‌گیری میزان ملامین در شیر پرداختند حد تشخیص و محدودهٔ خطی این تحقیق به ترتیب 10^{-6}، 10^{-2} و 5×10^{-6} مولار محاسبه گردید (Lin *et al*., 2007).

درسال ۲۰۱۲ Kryscio و همکاران حسگر اصلاح شده با قالب مولکولی برای اندازه‌گیری سرم آلبومین گاو در سرم خون ساختند، محدودهٔ خطی این کار به ترتیب 10^{-3} و 10^{-5} $4/93\times10$ مولار حاصل شد.

در سال ۲۰۱۴ اهری و همکاران به تشخیص مولکولی اگزوتوکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به روش پلیمر قالب مولکولی توسط روش پتانسیومتری پرداختند که نتایج به دست آمده حاکی از آن است که تا رقت 10^{-3} مولار توسط حسگر قابل تشخیص بود و حساسیت تا ۶۰ روز ارزیابی گردید و تا ۲۸ روزگی مورد تأیید بود.

هدف از این پژوهش کاهش زمان تشخیص جرم باکتری سالمونلا تایفی در محیط آبی با حساسیت و ویژگی بالاتر نسبت به روش‌های مرسوم، به کمک طراحی کیت نانوبایوسنسور به روش پلیمر قالب مولکولی (میکروکانتکت) می‌باشد.

مواد و روش ها

در ساخت نانوبایوسنسور این پژوهش باکتری شناسنامه‌دار سالمونلا تایفی با شماره ۱۶۰۹، آنتی بادی پلی کلونال ضد سالمونلا تایفی، اسید استیک خریداری شده از شرکت مرک، محیط Broth BHI، بافر PBS (Phosphat bafer salin)، Stop Solution، skim milk ۵٪، پوشش‌های شیشه‌ای (cover glass)، شیشه محافظ (support glass)، ماده شیمیایی ۳- تری متوکسی پروپیل سیلیل متاکریلات خریداری شده از شرکت سیگما، تترا متیل بنزالدئید (TMB)، واکنشگر APTES تهیه شده از شرکت سیگما،۴-الیل اکسی کومارین، شبکه‌ای ساز EGDMA، آغازگر AIBN، سدیم دودسیل سولفات $5^{w}/_{w}$٪ (SDS) خریداری شده از شرکت سیگما، تری اتیل آمین و سرم آلبومین گاو مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است کلیه مواد کاربردی در این تحقیق دارای درجه خلوص تجزیه‌ای بوده و در تهیه محلول‌ها از آب دوبار تقطیر استفاده گردید.

- روش کار

هدف از اجرای این تحقیق تشخیص جرم باکتری *سالمونلا تایفی* به عنوان یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های غذایی و عامل بیماری تب روده به روش طراحی کیت نانوبایوسنسور بر اساس واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی مبتنی بر فلوروسانس می‌باشد، طراحی و ساخت کیت نانوبایوسنسور به روش میکروکانتکت پلی‌مر قالب مولکولی که روش بسیار جدیدی بوده و از سال ۲۰۱۰ به بعد رایج گردید که طراحی سنسوری با کاربری فناوری نانو بوده تا با حساسیت و دقت زیادی بتواند جرم باکتری *سالمونلا تایفی* را که یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های غذایی و عامل ایجاد بیماری تب روده در تمام نقاط جهان و به خصوص ایران می‌باشد، را شناسائی نماید. سپس کیت طراحی شده از نظر حساسیت و ویژگی بر اساس شدت نشر فلورسانس ارزیابی گردید.

آنتی سرم *سالمونلا تایفی* جز دسته آنتی‌بادی‌های IgG است. این گروه از آنتی‌بادی‌ها به شکل Y با وزن مولکولی تقریبا ۱۵۰ کیلودالتون می‌باشند. در ساختار IgG گروههای کربوکسیلی و آمینی فراوان مشاهده می‌شود. آمینو اسیدهای انتهایی این پروتئین از جمله تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین دارای خاصیت فلوئورسانسی هستند اما زمانی که در ساختار پروتئین قرار می‌گیرند به دلیل تغییر کنفورماسیون و ساختار پیچیده آنتی‌بادی شدت فلوئورسانس به شدت کاهش می‌یابد. در این پروژه به کمک تکنیک قالب‌گیری مولکولی (MIP[1]) و مبدل فلوئورسانس آنتی‌ژن باکتری سالمونلا تایفی شناسایی گردید.

در نهایت بعد از انجام واکنش، پیوند کووالانسی بین مونومرهای متااکریلیک اسید (MAA[2]) تشکیل گردید و ذرات پلیمری سفیدالطیف حاصل شد. همچنین پیوند هیدروژنی بین اسید آمینه آن و متااکریلیک اسید ایجاد شد، که عامل جذب انتخابی آن نیز بود.

- شبیه سازی سنسور

اساس ساخت این حسگر تهیه فیلم نازک پلیمر قالب مولکولی به همراه یک فلوئورفور به عنوان مونومر فلوئورسانس، بر روی لام شیشه‌ای بود.

ساخت حسگر شامل مراحل ذیل بود:

۱- آماده سازی سطح لام‌های شیشه‌ای (cover glass, support glass) انجام گردید.

۲- فعال سازی سطح شیشه بستر (support glass) صورت گرفت.

۳- شیشه cover در محلول آنتی‌بادی قرار گرفت.

۴- محلول MIP شامل مونومر عاملی MMA، مونومر فلوئورسانس تهیه گردید.

۵- الیل اکسی کومارین، شبکه‌ای ساز EGDMA و آغازگر AIBN تهیه شد.

۶- ریختن محلول MIP روی سطح لام بستر و لام حاوی آنتی‌بادی بر روی آن قرار داده شد، سپس واکنش پلیمریزاسیون تحت UV انجام گرفت.

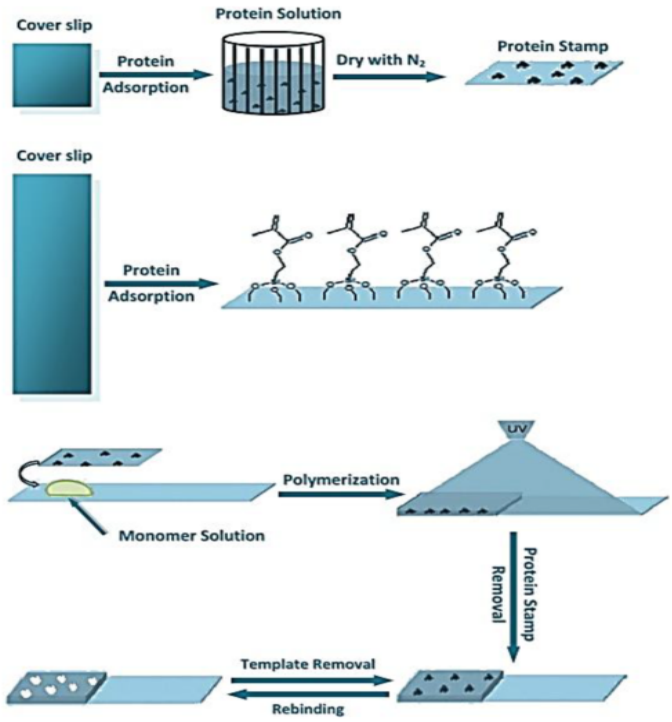
برای آماده‌سازی لام بستر، محلول piranha شامل (H_2SO_4: H_2O_2, 3:1 $^{v}/_{v}$) تهیه و لام‌ها درون این محلول خوابانده شد و سپس با آب شسته و خشک گردید. دقیقاً قبل از تهیه فیلم MIP باید شیشه بستر با مشتقات سیلان، سیلان‌دار شود. برای سیلان‌دارکردن سطح از ml ۰/۵-۳ تری‌متوکسی پروپیل سیلیل متاکریلات در۲۰ml اتانول، ۱/۵ میلی‌لیتر آب و ۰/۲ میلی‌لیتر استیک اسید استفاده شد. سپس لام‌ها با گاز نیتروژن خشک شدند (Kryscio and Peppas, 2012).

برای آماده‌سازی لام cover باید لام‌ها به ترتیب در سدیم دودسیل سولفات(SDS) ٪۵ $^{w}/_{w}$، آب مقطر، پروپانول، آب مقطر، اتانول و آب مقطر(هر مرحله ۳۰ دقیقه) سونیکیت و سپس با گاز نیتروژن خشک شوند. در ادامه لام‌ها در محلول آنتی‌بادی به مدت ۲ ساعت در دمای محیط قرار گرفتند و سپس با گاز نیتروژن خشک شدند.

محلول MIP حاوی متیل متاکریلات، ۵۰٪ مولتی اتیلن گلیکول دی متاکریلات EGDMA ، ۱۰٪ مولتی آغازگر AIBN ، ۴-آلیل اکسی کومارین تهیه شد و به مقدار تقریبا ۱۰ تا ۲۰ میکرولیتر روی لام بستر قرار داده شد و لام حاوی آنتی‌بادی روی لام بستر پرس (stamp) شد و در کابین UV تحت نور ۳۶۵nm پلیمریزاسیون به مدت ۲۰ ساعت صورت گرفت. بعد از این مدت دو لام از یکدیگر جدا شدند. برای ساخت شاهد (NIP) تمام مراحل بالا در نبود محلول آنتی‌بادی انجام شد.

[1] Molecularly Imprinted Polymer

[2] Meta Acrylic Acid



شکل ۱- مراحل ساخت نانوحسگر زیستی برپایه فلورسانس مولکولی برای آنتی‌سرم *سالمونلا تایفی*

- **حذف آنتی‌بادی**

برای حذف آنتی‌بادی، فیلم MIP در محلول حاوی $SDS^{w}/_{w}$ ۵٪ و $NaOH^{w}/_{w}$ ۰/۶٪ در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه و سپس در محلول یک مولار NaCl به مدت ۲ ساعت و در آخر با آب مقطر شستشو گردید. برای اطمینان از حذف کامل آنتی‌بادی از فیلم، جذب محلول شستشو با اسپکتروفتومتر در طول موج۲۸۰nmبررسی شد و هیچ‌گونه جذبی حاصل نگردید.

تهیه کشت میکروبی: ابتدا سوش باکتری *سالمونلا تایفی* تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران دارای PTCC[1] با شماره ۱۶۰۹ مورد استفاده قرار گرفت. سپس از محیط جامد به محیط مایع BrothBHI انتقال داده شد و مدت یک شبانه روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید تا غلظت نیم مک فارلند آن به کمک دستگاه اسپکتروفتومتری که بیانگر 10^{8} عدد سلول باکتری در هر میلی‌لیتر می‌باشد حاصل گردید. سپس محیط مایع حاوی جرم باکتری با دور ۳۳۰۰ به مدت ۹ دقیقه سانتریوفوژ شد. پس از طی این مدت مایع روئی دور ریخته شد و با سرم فیزیولوژی جرم باکتری شستشو داده شد، سپس عمل فوق تا ۳ بار تکرار شد تا شستشو هر چه بهتر انجام شود. در انتها لوله فالکون با سرم فیزیولوژی مخلوط گردید. دوباره با شرایط مذکور سانتریوفوژ شده و این شستشو سه بار انجام شد. سپس داخل بن‌ماری جوش به مدت ۲۰ دقیقه قرارداده شد. تا چنانچه کپسول موجود باشد غیر فعال گردد تا اختلالی در تشخیص رخ ندهد.

- **تهیه غلظت‌های میکروبی**

۱- ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر کالیبر گردید. طول موج مناسب توسط دستگاه ۶۲۰nm قرائت شد. ابتدا در کوت دستگاه، آب مقطر قرار داده شد، OD حاصله جهت کالیبریشن عدد صفر قرائت گردید.

۲- فالکون حاوی جرم باکتری پس از ورتکس شدن به کوت انتقال داده شد. در طول موج حدود ۶۰۰ بایستی بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ توسط دستگاه قرائت گردد که در مورد این تحقیق چون خیلی غلیظ بود بالاتر قرائت گردید، لذا رقت‌سازی انجام شد تا عدد ۰/۰۹ قرائت شود. در نتیجه غلظت10^{8}عدد باکتری در هر میلی‌لیتر حاصل گردید. سپس از غلظت مذکور سایر غلظت‌ها حاصل شد.

۳- در لوله‌های فالکون دیگر ۲۰ میلی‌لیتر از سرم فیزیولوژی داخل شد. طبق فرمول $C1\times V1=C2\times V2$

[1] Persian Type Culture Collection

محاسبه انجام گردید. C1 10^8عدد باکتری در هر میلی‌لیتر بود. برای ساخت غلظت 10^5عدد باکتری در هر میلی‌لیتر طرف دیگر معادله C2 10^5عدد باکتری در هر میلی‌لیتر بوده که در ۲۰ میلی‌لیتر ضرب گردید.

$V1\times10^8=10^5\times20V1=0/02ml=20microlitre$

لذا از فالکون حاوی ۲۰ میلی‌لیتر سرم، ۲۰ میکرولیتر از آن برداشته شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از فالکون 10^8عدد باکتری در هر میلی‌لیتر به فالکون بعدی که از آن ۲۰ میکرولیتر برداشته شده بود داخل گردید. لذا غلظت حاصله 10^5عدد باکتری در هر میلی‌لیتر حاصل شد.

۴- برای ساخت غلظت 10^3 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر ابتدا فالکون حاوی غلظت 10^5عدد باکتری در هر میلی‌لیتر ورتکس شد، سپس طبق فرمول بند ۳

$V1\times10^5=10^3\times20V1=0/2ml=200MICROLITRE$

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از فالکونی که مختص غلظت 10^3 سلول باکتری در هر میلی لیتر بود، برداشت شد. به جای آن ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت 10^5 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر به آن وارد شد و غلظت 10^3 سلول باکتری در هر میلی لیتر حاصل گردید.

۵- برای ساخت غلظت 10^1 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر فالکون 10^3 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر ورتکس و دقیقاً مثل بند ۴ صورت گرفت. بدین‌صورت غلظت‌های لازم برای مواجه کیت نانوی طراحی شده حاصل گردید.

- مطالعه تغییر شدت فلوئورسانس حسگر

مطالعه اولیه نشر فلوئورسانس بر حسگرMIP و NIP در حضور و نبود آنتی‌بادی مورد بررسی قرار گرفت. حسگرهایMIP و NIPشسته شده در محلول 10 ppm آنتی‌بادی (در بافر فسفات PH=7.4) به مدت ۱ ساعت قرار گرفت. طیف‌های نشر فلوئورسانس حسگر MIP در مقایسه با NIP افزایش شدت فلوئورسانس را در حضور آنالیت نشان داد.

- طول عمرالکترود سنسور

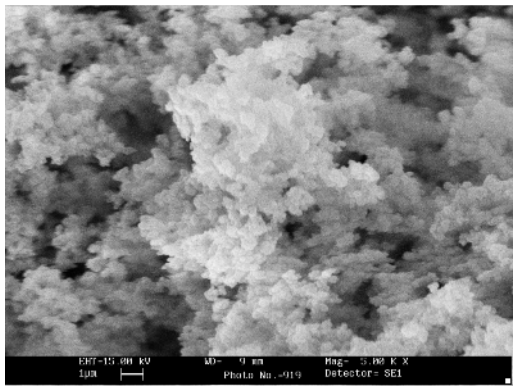
میزان طول عمر الکترود سنسور طراحی شده بررسی شد. بدین معنی که سنسور مبتنی بر پلیمر قالب ملکولی با اتصال آنتی‌بادی باکتری تا چه محدوده‌ای از زمان توانائی تشخیص جرم را داشت که این مهم در روزهای ۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۲۸، ۳۲، ۳۶، ۴۰، ، ۴۸، ۵۲ و ۶۰ روزگی از طراحی سنسور انجام گرفت.

یافته‌ها

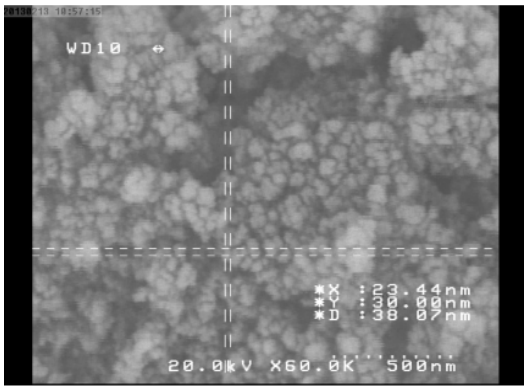
- نتایج تصاویر بزرگنمائی حاصل از میکروسکوپ الکترونی

همانگونه که در تصاویر میکروسکوپ الکترونی مشاهده می‌گردد (شکل ۲)، پراکنش ذرات با ۱۵ کیلو ولت و باKX ۱/۰۰ در محدوده مشخص شده معادل ۱-۱۰ میکرومتر می‌باشد، که بیانگر آنست که متوسط ذرات پلیمر قالب مولکولی ۲۰-۴۵ نانومتر بوده و ذرات NIP معادل ۸۰-۱۰۰ نانومتر می‌باشد.

در خصوص انباشتگی‌های تیره رنگ در تصاویر به علت عدم انحلال نمونه‌هایNIP، MIP در حلال استونیتریل می‌باشد.



الف- با بزرگنمائی ۵/۰۰ KX با قطر ذرات ۱میکرومتر

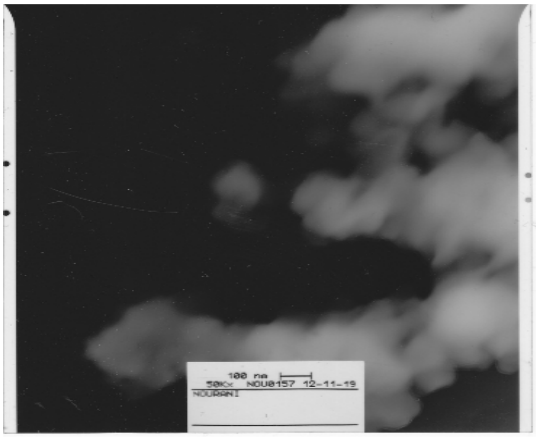


ب- با قطر ذرات ۵۰۰ نانومتر

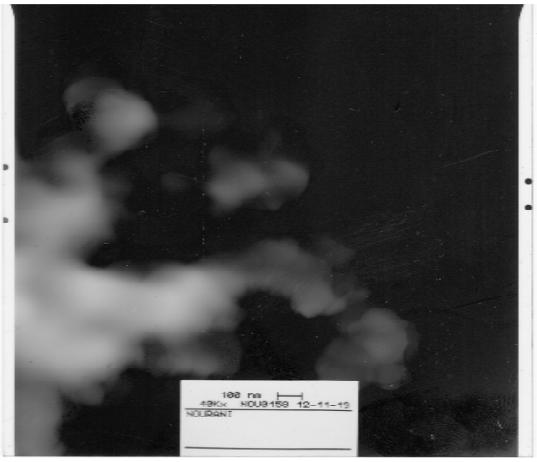
شکل ۲- MIP: Molecularly imprinted polymer

- نتایج میکروسکوپ TEM

همانگونه که در تصویربرداری الکترونی با میکروسکوپ TEM مشاهده می‌گردد (شکل‌های ۳ و ۴)، پراکنش ذرات نانو بصورت کاملاً همگن بوده است.



شکل ۳- تصویر TEM با بزرگنمایی KX ۵۰ و پراکنش ذرات ۱۰۰ نانومتر



شکل ٤- تصویر TEM با بزرگنمایی KX٤٠ و پراکنش ذرات ۱۰۰ نانومتر

- نتایج حساسیت سنسور در مواجه با غلظت‌های میکروبی

همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد اتصال آنتی‌بادی به MIP در غیاب آنتی‌ژن دارای شدت نشر معادل ۲۷۳ نانومتر می‌باشد. این در حالی است که اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^{1} آنتی‌ژن معادل ۳۲۵ نانومتر بوده و در غلظت 10^{3} معادل ۳۵۰ نانومتر و اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^{5} آنتی‌ژن معادل ۴۴۸ نانومتر می‌باشد، در غلظت 10^{8} برابر ۷۴۵ نانومتر می‌باشد، لذا با افزایش غلظت میزان نشر فلورسانس افزایش می‌یابد.

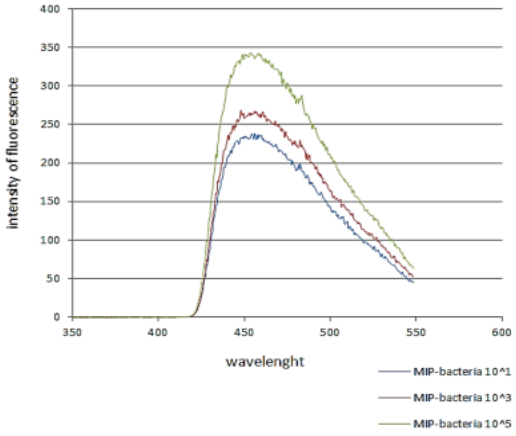
جدول ۱- تغییرات پاسخ سنسور به صورت شدت فلورسانس برحسب غلظت آنتی ژن در روز اول مواجه

نام نمونه	شدت نشر فلورسانس
اتصال آنتی‌بادی به MIP در غیاب آنتی‌ژن	۲۷۳
اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^{1} آنتی‌ژن	۳۲۵
اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^{3} آنتی‌ژن	۳۵۰
اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^{5} آنتی‌ژن	۴۴۸
اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^{8} آنتی‌ژن	۷۴۵

جدول ۲- تغییرات پاسخ سنسور به صورت شدت فلورسانس برحسب غلظت آنتی ژن در روز ۵۲

نام نمونه	شدت نشر فلورسانس
اتصال آنتی‌بادی به MIP در غیاب آنتی ژن	۱۸۲
اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^{1} آنتی ژن	۲۳۴
اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^{3} آنتی ژن	۲۶۳
اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^{5} آنتی ژن	۳۴۱
اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^{8} آنتی ژن	۶۵۸

جدول ۲ در ۵۲ روز بعد از عمر سنسور نیز موید افزایش شدت نشر فلورسانس با بالا رفتن میزان غلظت آنتی ژنی است. بطوریکه در غلظت 10^{1} سلول باکتری در هر میلی لیتر شدت نشر فلورسانس ۲۳۴ بوده و در غلظت 10^{3} سلول باکتری در هر میلی لیتر شدت نشر فلورسانس ۲۶۳ بوده و در غلظت 10^{5} سلول باکتری در هر میلی لیتر شدت نشر فلورسانس۳۴۱ بوده و در غلظت10^{8} سلول باکتری در هر میلی لیتر شدت نشر فلورسانس ۶۵۸ بوده است. نمودار پیوستی فوق نیز موید این امر است.



نمودار ۱- بررسی شدت نشر فلوروسانس براساس میزان جذب نوری

- بررسی حساسیت، ویژگی نانوسنسور

حساسیت سنسور از غلظت 10^1سلول باکتری در هر میلی لیتر به بالا می‌باشد و بالاترین حدی که قابل تشخیص است 10^8سلول باکتری در هر میلی لیتر است. باکتریEcoli با PTCC 2216 نیز در محیط آبی همراه با *سالمونلا تایفی* مخلوط شد که در کارائی کیت تغییری ایجاد ننمود. لازم بذکر است که مطابق نتایج حاصل شده از جداول ۱ و ۲ بیانگر آنست که در هر دو جدول از پایین‌ترین غلظت تا بالاترین غلظت آنتی ژنی در مواجهه با کیت نانوبیوسنسور طراحی شده با افزایش شدت فلورسانس مطابق می‌باشد ولیکن در جدول ۲ از شدت نشر فلورسانس نسبت به جدول ۱ کاسته شد که مربوط به روز ۵۲ از ساخت سنسور می‌باشد لذا کارائی سنسور مورد نظر از ۵۲ روزگی به بعد از حساسیت مطلوبی برخوردار نیست و تا ۵۲ روزگی نتایج تشخیصی مطلوب است.

- بررسی علت افت پاسخ شدت نشر فلورسانس سنسور

بر اساس نتایج جدول ۳ هر چقدر میزان غلظت باکتری در مواجه با کیت نانوبیوسنسور افزایش می‌یابد درصد شدت افت فلورسانس در مقایسه بین روز ۱ با روز ۵۲ کاهش یافته و این امر نشاندهنده عملکرد بهینه سنسور می‌باشد. زیرا از غلظت 10^3سلول باکتری در هر میلی‌لیتر به بالا که دوز عفونی خطرساز این باکتری در اغلب موارد است، هرچه به غلظت 10^8سلول باکتری در هر میلی‌لیتر نزدیک‌تر شویم شدت افت نشر فلورسانس کمتر کاهش می‌یابد.

بحث

امروزه تکنیک‌های تشخیص سریع با حفظ حساسیت و ویژگی بالا در علم میکروبیولوژی مواد غذایی از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار بوده و در پی آن پیش‌گیری از شیوع عوامل میکروبی با منشاء غذا، می‌باشد. بطور مثال در باکتری*سالمونلا تایفی* که عامل تب تیفوئید بوده یافتن تکنیکی برای تشخیص سریع و دقیق این میکروارگانیسم در آب و فراورده‌های غذایی بسیار حائز اهمیت است (Lopez D'Sola *et al*., 2012; Nandagopal *et al*., 2010).

روش‌های مرسوم فعلی برای تشخیص عامل *سالمونلا تایفی* به دلیل آماده‌سازی‌ها و ساخت محیط‌های گوناگون پیش غنی کننده، غنی کننده و جامد انتخابی هم بسیار وقت‌گیر (بطور مثال در مورد *سالمونلا تایفی* چهار تا ده روز زمان می‌خواهد) از طرفی مواد و هزینه زیادی را طلب می‌نماید لذا یک روش سنجش ایمنی لازم که بتواند در کوتاه‌ترین زمان تشخیص دهد، تحولی بزرگ محسوب می‌گردد (Meemken *et al*., 2014).

نکته بسیار مهم توانایی این روش‌های تشخیصی در اوایل شروع آلودگی است، که غلظت آنتی ژنی پایین و به دوز عفونی نرسیده است، درصورتی‌که کیت نانوبیوسنسور طراحی شده در این مقاله قادر است با دوزی بسیار پایین‌تر از دوز عفونی تشخیص دهد یکی از مزایای بسیار مهم این روش می‌توان به پایش مستقیم نتایج بصورت آنلاین در سیستم‌های مدیریت کنترل کیفی غذا اشاره نمود، لذا درزمان، به عنوان فاکتور تعیین کننده در کیفیت محصول صرفه‌جویی می‌گردد. در مجموع ساخت این ایمونوسنسورها دارای مزایای حساسیت بالا، قیمت پایین، رنج فرکانسی گسترده، سایز کوچک، تکرارپذیری، ضریب دمایی صفر و عملکرد خطی است (Meemken *et al*., 2014).

بر اساس مطالعه Lie و همکاران در سال ۲۰۰۷ برای تشخیص میزان ملامین در شیر با طراحی حسگر غشایی بر روی بستر پلیمری اصلاح شده با قالب مولکولی توانستند در مدت زمان ۱۶ ثانیه با شیب خطی 10^{-6} را تفکیک نمایند این در حالی است که سنسور مذکور دارای قدرت تفکیک 10^1 تا 10^8می‌باشد.

جدول ۳- تغییرات درصد افت پاسخ سنسور به صورت شدت نشر فلورسانس در مقایسه روز اول با روز ۵۲

نام نمونه	درصد افت شدت نشر فلورسانس
اتصال آنتی‌بادی به MIP در غیاب آنتی‌ژن	٪۳۳/۳۳
اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^1 آنتی‌ژن	٪۲۸
اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^3 آنتی‌ژن	٪۲۴/۸۵
اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^5 آنتی‌ژن	٪۲۳/۸۸
اتصال آنتی‌بادی به MIP درحضور غلظت 10^8 آنتی‌ژن	٪۱۱/۶۷

در مطالعه دیگری که توسط اهری و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد. از سنسور پلیمر قالب ملکولی جهت تشخیص اگزوتوکسین باکتری استافیلوکوکوس آرئوس طراحی شد طول عمر استفاده از این سنسور برابر ۴۶ روز بوده و تا رقت 10^{-4}مولار را تفکیک نموده است این در حالی می‌باشد که سنسور طراحی شده دارای طول عمر ۵۲ روز بوده و سنسور مذکور دارای قدرت تفکیک 10^{1} تا 10^{8} می‌باشد و زمان تشخیص بسیار کمتر است (Ahari *et al.*, 2014).

در مطالعه دیگری توسط Kryscio و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیوسنسور با پلیمر قالب مولکولی جهت اندازه‌گیری کلرتتراسایکلین در سرم خون ساخته شد. از نظر نوع سنسور با سنسور طراحی شده ما همخوانی داشت ولیکن مدت زمان تشخیص ۱۵ دقیقه بود و شیب خطی آن ۶۲/۵ میلی ولت بود که شیب خطی و مدت زمان تشخیص سنسور طراحی شده از حساسیت معنی دارتری برخوردار است.

نتایج نشان دهنده آن است که تثبیت پروتئین بر سطح جامد با پیوند کووالانسی در مقایسه با سایر روش‌ها معمولاً منجر به یک تثبیت پایدار با طول عمر مناسب می‌شود. از مزایای این روش تثبیت پروتئین با پیوند کووالانسی به دلیل پیوندقوی کووالانسیک تثبیت پروتئینی پایدار است که در محلول‌هایی حتی در غلظت یونی بالا، پروتئین را از دست نمی‌دهد و از اشکالات آن انتخاب شرایط تثبیت با پیوند کووالانسی در مقایسه با سایر روش‌ها دشوارتر است. شرایط برهم کنش مورد نیاز پیچیده‌تر می‌باشد، پلیمرهائی که به لحاظ مولکولی نشان‌دار شده‌اند (MIPs) شبکه‌های پلیمری با اتصال عرضی وسیع هستند که مهندسی می‌شوند تا بطور خاص مولکولهای مقصد را شناسائی کنند.MIPها از طریق پلیمریزاسیون مونومرهای ارگانیک و غیر ارگانیک و در حضور یک آنالیت دلخواه (مولکول نمونه) شکل می‌گیرند. این سیستم‌های سنتزی را می‌توان طراحی کرد، تا به طور ویژه بیومارکرهای ماکرومولکولی که به لحاظ فیزیولوژیکی مرتبط هستند را، شناسائی کند. که البته نسبت به رقبای بیولوژیکی خود ارجحیت دارند. زیرا آنها همان مسیرهای تشخیص بیولوژیکی را پیاده می‌کنند. و در عین حال ویژگی‌های غیر آلی را از خود نشان می‌دهند. این ویژگی‌های مطلوب عبارتند از پایداری در محیط‌های گوناگون، ماندگاری طولانی مدت بدون نقص در عملکرد، قابلیت استفاده مجدد، و قابلیت سازگاری تقریباً با هر بیومارکر مولکولی را دارند. براین اساس، این سیستم‌ها را می‌توان در محیط‌هائی که زیر ساخت‌های بهداشتی پائینی دارند. نظیر کشورهای در حال توسعه یا بعد از بلایای طبیعی به عنوان ابزار تشخیص جایگزین آنتی‌بادی‌های طبیعی ساخت.

به دلیل بزرگی و انعطاف پذیری ساختار پروتئین‌ها از جمله آنتی‌بادی‌ها ساخت پلیمرقالب مولکولی شان به صورت پلیمریزاسیون توده ای دارای بازده قالب‌گیری کم می‌باشد. روش‌های مختلف جدیدی برای ساخت پروتئین‌های قالب‌گیری شده بکارگرفته شده است. در این طرح از روش Micro Contact Imprinted Polymer استفاده شده است که به دلیل نبود حلال و تثبیت پروتئین بر روی سطح، بازده قالب‌گیری افزایش می‌یابد، در سال‌های اخیر روش‌های نوین در قالب‌گیری مولکولی برای پروتئین‌ها گسترش یافته‌اند. در روش‌های سنتی قالب‌گیری محلولی شامل مولکول الگو، مونومرعاملی، شبکه‌ای ساز، آغازگر و حلال تهیه و با پلیمریزاسیون توده‌ای، پلیمر تشکیل می‌شود (Frimat *et al.*, 2014).

روش‌های سنتی کار با محیط کشت برای تشخیص جرم باکتری‌ها بسیار وقت گیر و کسل کننده است. امروزه استفاده از تکنیک‌های سریع و حساس تشخیص پاتوژن‌های منتقله از طریق مواد غذایی از اهمیت خاصی برخوردارند. از آنجا که در مورد بسیاری از پاتوژن‌های منتقله از طریق مواد غذایی با غلظت‌های بسیار کم آلودگی مواجه هستیم، بنابراین برای اطمینان از سلامت مواد غذایی به روش‌های سریع و حساس تشخیص نیازمندیم. روش‌های متداول تشخیص باکتری‌ها و توکسین‌ها عموماً مبتنی بر استفاده از محیط‌های کشت و آزمون‌های بیوشیمی استوار است و این روش‌ها حداقل ۴ تا ۷ روز به طول می‌انجامد (Rani *et al.*, 2014).

با توجه به زمان مورد نیاز جهت رویت نتایج حاصل از کشت میکروبی در مبحث کنترل کیفی مواد غذایی قطع بر یقین مدت زمان معادل ۴۸ ساعت و در خصوص برخی از سوش‌ها که نیاز به پیش غنی سازی و غنی‌سازی دارند همچون سالمونلا به چهارتا ده روز هم نیازمند می‌باشد تا در نهایت نتایج تشخیص اولیه حاصل گردد، استفاده از بیوسنسورها و نانوبیوسنسورها بسیار ارزشمند می‌باشد چرا

کـه در بسـیاری از کارخانجـات مـواد غـذایی در بخـش تحقیقات و توسعه و نیـز بخـش کنتـرل کیفـی زمـان لازم برای نگهداری مواد و اعلام نتایج آزمون جهت عدم تائید و یا تائید محصـول بـرای عرضـه بـه مصـرف کننـده بسـیار طولانی و سبب کاهش زمان ماندگاری و از طرفی بصـورت غیر مستقیم سبب خسارت وارده به تولید کننده مـی‌گـردد، این امر در حالی است کـه در گـرایش‌هـای متعـدد صـنایع غذایی همچون صـنایع لبنـی و یـا صـنایع گوشـتی بسـیار متفاوت‌تـر از صـنایعی همچـون غـلات، حبوبـات، روغـن، کنسرو و غیره می‌باشد لـذا زمـان در امـر تشـخیص بسـیار کلیدی و حائز اهمیت در بحث سیستم‌های کنترل کیفیت و نیز برگشت سرمایه برای تولید کننده می‌باشد (Meemken *et al*., 2014).

سالانه معادل میلیاردهـا دلار هزینـه دور ریـز و خـروج مواد غذایی فساد یافته از چرخه صنعت غذا می‌باشد که بـه دلایل متعددی همچون نقل و انتقالات طولانی جاده ای و هوائی و یا دیرکرد جواب غیرقطعی آزمون‌های کنترل کیفی آزمایشگاههای همکار و مرجع بدلیل اسـتفاده از روش‌هـای استاندارد مرسـوم و نیـز جـواب‌هـای منفـی کـاذب کـه در بسیاری ازموارد ازجمله زمانی که جرم میکروب از بین رفتـه و توکسین باکتری در نمونه باقی است ایجاد می‌گـردد کـه ایـن مهـم در مـواردی همچـون بلایـای طبیعـی و ورود و صادرات تناژ محصولات لبنی و فـرآورده‌هـای گوشـتی بـه کشـورها در شـرایط طبیعـی و یـا در شـرایط غیرطبیعـی همچون جنگ‌های انسانی و در برخی موارد در جنـگ‌هـای بیوتروریسم بصورت عمد میلیون‌ها نفر از انسانهای بی گناه گریبان گیر و قربانی مقاصـد شـوم ایـن عوامـل گردیـده و حجم انبوهی از مواد غذایی وارد شـده بـه یـک کشـور بـه دلایل کمبود و یا نبـود امکانـات آزمـون و حتـی در برخـی موارد نبود زمان کافی برای انتظار مورد مصرف قرار گرفتـه و سبب مسمومیت جمعیتی بی‌گناه و مرگ و میری بابرنامه می‌گردد، لذا با پیشرفت تکنولوژی و کاربری نانو در صـنعت غذا علی‌الخصوص مبحث کنترل کیفی فرآورده‌های غـذایی جای آن دارد که با نتایج حاصل از تحقیقات مستخرجه بـه تولید انبوه تجاری رسد. چـرا کـه هـم از لحـاظ زمـان کـه فاکتوری بسیار سرنوشـت‌سـاز در محصـولات غـذایی کـه بصورت محموله در بندر یـا گمـرک رد و بـدل مـی‌گـردد، می‌باشد (در مـواردی ناخواسـته زمـانی بـرای تشـخیص و بررسی کنترل کیفی نداریم همچـون بلایـائی چـون زلزلـه سیل و غیره) و هم از لحاظ مالی قابل قیاس بـا متشـابهات تجاری تولید شده در خارج از کشور نبوده و از همـه مهمتـر میزان دقت و حساسیت کـه دو شـاخص ایمنـی و ضـریب اطمینان در بحث کنترل نقاط بحران استاندارد می‌باشد حائز اهمیت است .

در طی سال‌های اخیر قـالبگیری مولکـولی بـه عنـوان روش تجزیه‌ای مفیدی در تولید عناصرتشخیصی، با تقلیدی از گیرنده‌های بیولوژیکی به کـار رفتـه اسـت. پلیمـر قالـب مولکولی به علت هزینـه پـائین در مـواد اولیـه نسـبت بـه آنـزیم‌هـا و پایـداری گرمـایی و مکـانیکی بـالا در درجـه حرارت‌های بالا و مقاومت نسبت به محیط‌هایی با اسـیدیته بالا یا پایین و عمـر طـولانی آن کاربردهـای گونـاگونی در حلال‌های آلی دارد. یکی از مزایای پلیمر قالب مولکولی آن است که پلیمر نقش شده می‌تواند از ترکیبات متضاد ساخته شود که برای استفاده از آنتی‌بادی‌ها به کار می‌رود. در طـی دو دهه گذشته پلیمرهای قالب مولکولی توجه دانشمندان را در زمینه پیشرفت حسگرهای شیمیایی و بیولـوژیکی جلـب نموده است (Shin *et al*., 2012).

تحقیقات نشان داده که خواص تشخیصی پلیمـر قالـب مولکولی بعد از ۵ سال یا بیشتر بدون از دست دادن گزینش پذیری و ظرفیت‌شان باقی می‌ماند. در نتیجه آن‌ها مزایـای بیشـتری از سیسـتم‌هـای بیولـوژیکی تـرد و شـکننده در مولکـول‌هـای تشخیصـی دارد. حسـگرهای شـیمیایی و بیوشیمیایی در شیمی تجزیه مدرن جایگاه خاصی را به خود اختصاص داده است. امروزه استفاده از حسگرهای شیمیایی و بیوشیمیایی در تشخیص طبـی، آنـالیز محیطـی، آنـالیز و ارزیابی محصولات غذایی، شناسایی و آشکارسـازی عوامـل سمی و عوامل شیمیایی جنگـی کـاربرد پیـدا کـرده اسـت (Warwick *et al*., 2014).

قسـمت اصـلی و عمـده یـک حسـگر شـیمیایی یـا بیوشیمیایی عنصر تشخیص دهنـده آن اسـت. ایـن عنصـر تشخیص دهنـده مسـؤول تشـخیص و اتصـال گزینشـی و اختصاصی مولکول هدف در یک بافـت پیچیـده مـی‌باشـد. دومین قسمت مهم یک حسگر، مبدل اسـت کـه سـیگنال شیمیایی به وجود آمده در اثر اتصال آنالیت شـیمیایی را بـه یک سیگنال خروجی قابـل انـدازه‌گیـری ترجمـه و تبـدیل می‌کند.

بیو حسگرها از عناصر بیولوژیکی مثل آنتی‌بادی‌ها، آنزیم‌ها، پذیرنده‌ها یا یک بافت کامل به عنوان عنصر تشخیص دهنده استفاده می‌کند. با تولید آنتی‌بادی‌های مصنوعی که بتواند به طور برگشت پذیر با آنالیت‌های شیمیایی اتصالات اختصاصی ایجاد کند، می‌توان عناصر تشخیصی مناسبی را برای آنالیت‌هایی که برای آن‌ها پذیرنده‌های طبیعی بیولوژیکی وجود ندارد ایجاد کرد. بنابراین تلاش‌های بسیار زیادی برای تولید پذیرنده‌های سنتزی و مصنوعی برای جایگزینی آنتی‌بادی‌ها و پذیرنده‌های طبیعی ایجاد شده است. امروزه از طریق بیومهندسی قطعه‌های آنتی‌بادی که در بیوحسگرها قابل استفاده می‌باشد توسعه داده شده است و از این طریق پذیرنده‌هایی تولید می‌شود که می‌تواند در ساخت بیوحسگرها مورد استفاده قرار گیرد. متاسفانه پایداری بسیار پایین شیمیایی و بیوشیمیایی این پذیرنده‌ها استفاده از آن‌ها را در محیط‌های خشن شیمیایی و بیوشیمیایی با مشکلات جدی مواجه می‌سازد.

برای گونه‌های شیمیایی کوچک مثل یون‌های فلزی و معدنی سنتز پذیرنده‌های شیمیایی یک روش معمول و ساده می‌باشد، ولی برای گونه‌های شیمیایی بزرگ و با ساختار شیمیایی پیچیده تولید و سنتز چنین پذیرنده‌ای شیمیایی مصنوعی از طریق روش‌های شیمیایی، کاری بسیار سخت وگاهی اوقات امکان ناپذیر می‌باشد (Moradi *et al*., 2014).

از پلیمرهای قالب مولکولی در طراحی و ساخت انواع حسگرهای شیمیایی و بیوشیمیایی بر پایه ترانس دیوسرهای مختلف الکتروشیمیایی، نوری پیزوالکتریک و غیره استفاده می‌شود. در روش‌های الکتروشیمیایی انواع حسگرهای ولتامتری، هدایت‌سنجی، ظرفیت سنجی، آمپرومتری بر پایه پلیمر قالب مولکولی ساخته شده است. در روش هدایت سنجی یک غشا با قالب مولکولی تهیه می‌شود که در واقع بین دو محلول الکترولیت حایل می‌شود. بلورهای پیزوالکتریک دسته دیگری از مبدل‌ها است که قالب مولکولی به عنوان حد فاصل شیمیایی کاربرد دارد، که قالب مولکولی ساخته شده، و به صورت لایه نازک در سطح بلور پیزو الکتریک قرار داده می‌شود. انواع بسیار زیادی از اینگونه حسگرها به صورت اتصال پلیمر قالب مولکولی با دسته متنوع از وسایل پیزو برای آنالیز در فاز گازی و مایع ساخته شده است. حسگر اپتیکی نیز امروزه برای افزایش گزینش‌پذیری از مزایای ویژه پلیمر قالب مولکولی بهره برده است. در این میان می‌توان به حسگرهای فلورسانس، کمی لومینسانس و حسگرهای مبتنی بر جذب مادون قرمز اشاره کرد. در سنتز پلیمر قالب مولکولی در روش فلورسانس از مونومر عاملی یا شبکه کننده دارای خواص فلورسانس استفاده می‌شود و در صورتیکه مولکول هدف دارای خواص فلورسانس باشد می‌توان حسگر نوری بر پایه پلیمر قالب مولکولی نیز ساخت (Dadzie *et al*., 2014).

تعدادی زیادی از مقالات پلیمر قالب مولکولی بر اساس حسگرهای شیمیایی با ترانسدیوسر ظرفیت سنجی، هدایت‌سنجی، آمپرومتری و ولتامتری وجود دارد. با اینکه هدایت سیگنال پتانسیومتری ساده است،اما تعداد کمی مقالات برای طراحی حسگر پتانسیومتری بر پایه پلیمر قالب مولکولی گزارش شده است. در این گزارشات، ذرات پلیمر قالب مولکولی در بافت غشاء وینیل کلراید، به فرم غشاء شیشه‌ای، مولکول هدف جمع شده است.عواملی مانند پایداری کم و قیمت بالای آنزیم‌ها و گیرنده‌ها، عملکرد ضعیف بیومولکول‌ها در حلال‌های آلی، اسیدیته‌ی کم یا زیاد، دمای بالا و فقدان آنزیم‌هایی که قادر باشد آنالیت هدف را تشخیص دهد، از جمله علل پیشرفت کاربرد پلیمرهای قالب مولکولی محسوب می‌گردد.

- محدودیت‌های حسگر پلیمر نقش پذیر مولکولی

نبودن روش تهیه عمومی برای تهیه پلیمر نقش پذیر مولکولی، مشکل انتخاب و جمع‌آوری انتقال دهنده‌ها، انتقال سیگنال‌های نتیجه شده به سیگنال الکتریکی کاربردی از جمله محدودیت‌های این نوع حسگر است. همچنین آن‌ها عملکرد خوبی در محلول آبی ندارد. بنابراین، پیشرفت‌هایی در روش تهیه عمومی برای طراحی حسگر پلیمر نقش پذیر مولکولی به وجود آمده است. محاسبات ترمودینامیکی به طور موفقیت آمیزی برای تشخیص بهترین مونومرها برای نقش زدن به کار می‌رود. یک راه حل بالقوه برای حل این مسائل استفاده از نرم‌افزار مدل‌سازی و الگوریتم جستجو و بررسی است که به طور قراردادی در طراحی پلیمرها و اخیراً در طراحی داروها به کار می‌رود. پلیمرهایی که با استفاده از این روش

کامپیوتری طراحی شده است، اغلب با گیرنده‌های طبیعی قابل مقایسه‌اند. پیشرفت‌های سریع در الکترونیک به میکرو پروسسورهایی منتهی شده است که به عنوان ابزاری مناسب در حسگرشیمیایی به کار می‌رود. چنین میکرو پروسسورهایی عملکرد حسگر را بهتر می‌نماید. یکی دیگر از مشکلات در اندازه‌گیری با حسگر پلیمر قالب مولکولی زمان طولانی پاسخ دهی در حدود ۶۰-۱۵ دقیقه است. این تأخیر با بهینه نمودن سینتیک و گزینش پذیری حسگر کاهش می‌یابد (Yola *et al*., 2014).

استفاده از پلیمرهای سخت‌تر گزینش پذیری را توجیه می‌کند، چرا که هر چه انرژی بیشتری برای جابجایی و تغییر آنالیت مصرف شده باشد، زمان پاسخ‌دهی بیشتر می‌شود. همچنین پلیمرهای متخلخل ظرفیت اتصال پلیمر را در زمان پاسخ‌دهی افزایش می‌دهد. می‌توان با استفاده از ذرات پلیمری کوچکتر یا پلیمر لایه نازک، سرعت نفوذ را بهبود بخشید.بنابراین با سینتیک اتصال مشخص، زمان پاسخدهی کمتر می‌شود (Frimat *et al*., 2014).

با توجه به افزایش کاربردهای بیوحسگرها در بسیاری از زمینه ها، ساختار بیوحسگرهای پایا هنوز بحث برانگیز است. گزینش‌پذیری و پایداری پلیمر قالب مولکولی نسبت به آنالیت‌های هدف آن‌ها را عناصر تشخیصی بی اثری برای حسگرها در این روش ساخته است.

گزینش‌پذیری حسگر بستگی به اختلاف بر هم کنش بین آنالیت و حسگر دارد. حساسیت حسگر به تمایل آنالیت یا لیگاند مشخص یا اصول اندازه‌گیری بستگی دارد. در نتیجه پلیمر قالب مولکولی به علت پایداری می‌تواند به آسانی در سطح یک حسگر شیمیایی استفاده شود. یک لایه نازک با دانسیته بالا از سطح نقش شده در حسگر حساس به کار می‌رود. حساسیت به طور عمده به برهم کنش آنالیت و در بعضی موارد به بر هم کنش لیگاند مخصوص نقش شده بستگی دارد. بر هم کنش آنالیت و سایر اجزای ماتریکس با قسمت‌های نقش نشده از پلیمر، سیگنال پلیمر را تغییر می‌دهد. به ویژه در بعضی از موارد که ترکیب ثابت است و آنالیت غلظت‌های متغیر خواهد داشت، دانسیته بالای قسمت نقش شده در پلیمر مزایایی در این تکنیک دارد، چرا که بر هم کنش‌های آنالیت با اجزای بافت یا قسمت‌های دیگر نقش نشده را کاهش می‌دهد. بنابراین گزینش پذیری و تمایل بالای پلیمر قالب مولکولی برای آنالیت هدف، آن‌ها را برای عنصر تشخیصی در حسگر مناسب ساخته است. لایه پلیمری باید شامل غلظت مشخص از اجزای تشخیصی که به اندازه کافی به سطح نزدیک است، باشد و با حفرات با اندازه ی مناسب در ارتباط باشد. اگر ضحامت لایه زیاد شود نقاط تشخیصی از سطح الکترود دور می‌ماند. از این نقطه نظر در پلیمر قالب مولکولی کنترل حفرات پلیمر نتیجه شده می‌توان به وسیله نوع و حجم حلال در مخلوط به دست آید (Moradi *et al*., 2014).

نتیجه‌گیری

ساخت سنسورهای پتانسیومتری مبتنی بر پلیمرهای قالب مولکولی هم از نظر دستگاهی کاملا مقرون به صرفه و ارزان است. پس از ساخت سنسور، به کمک یک دستگاه اسپکتوفلوریمتر ساده می‌توان آزمایش مورد نظر را انجام داد. در مجموع از تعداد ۴۰ نمونه در محیط آبی که با غلظت‌های متفاوت از باکتری سالمونلا تایفی آلوده بودند تعداد ۳۴ نمونه بطور دقیق مورد ارزیابی قرار گرفت. به کمک سنسور طراحی شده میزان حساسیت کیت نانوبایوسنسور طراحی شده از 10^{1} تا 10^{8} سلول در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید و نتایج حاصله توسط دستگاه اسپکتوفلوریمتر قرائت شد. از طرفی از جهت ویژگی، سنسور طراحی شده مورد بررسی قرار گرفت و باکتری Ecoli به عنوان باکتری نزدیک به سالمونلا (از نظر تشخیصی) نیز در محیط آب حاوی سالمونلا تایفی تلقیح شد و مشخص گردید که تداخلی در عملکرد سنسور ایجاد نشده است، همچنین حساسیت سنسور تا ۶۰ روزگی مورد آزمون قرارگرفت، که عملکرد سنسور تا ۵۲ روزگی مورد تایید قرار گرفت و بعد از زمان مذکور، رو به کاهش قرار گرفت بر اساس شدت نشر فلورسانس هم از نظر کیفی و هم از نظر کمی ارزیابی شدند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله کلیه نویسندگان کمال تشکر خود را از آزمایشگاه نانو سازمان غذا و داروی وزارت بهداشت، آزمایشگاه تخصصی مواد غذایی مبنا و آزمایشگاه مهندسی شیمی مواد دانشگاه امیرکبیر به جهت مساعدت‌های لازم در اجرای این پروژه اعلام می‌دارند.

منابع

Ahari, H., Razavilar, V., Akbari, B., Motallebi, A., Anvar, A. & Mohammadi, N. (2014). Comparison of potentiometry and spectroscopy-based modified nanoparticles linked to antibodies for detection of Staphylococcus aureus exotoxin. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 8, pp. 247-258.

Baran, E. T., Tuzlakoglu, K., Salgado, A. & Reis, R. L. (2011). Microchannel-patterned and heparin micro-contact-printed biodegradable composite membranes for tissue-engineering applications. J Tissue Eng Regen Med, 5, pp. 108-114.

Burk, L. M., Lee, Y. Z., Wait, J. M., Lu, J. & Zhou, O. Z. (2012). Non-contact respiration monitoring for in-vivo murine micro computed tomography: characterization and imaging applications. Phys Med Biol, 57, pp. 5749-5763.

Chen, X., Dunn, A. C., Sawyer, W. G. & Sarntinoranont, M. (2007). A biphasic model for micro-indentation of a hydrogel-based contact lens. J Biomech Eng, 129, pp. 156-163.

Chen, Y. W., Rick, J. & Chou, T. C. (2009). A systematic approach to forming micro-contact imprints of creatine kinase. Org Biomol Chem, 7, pp. 488-494.

Cho, J. & Ahn, H. (2010). Micron and submicron patterning of dicyanopyrazine-linked porphyrin molecules using micro-contact printing and Langmuir-Blodgett assembly. J Nanosci Nanotechnol, 10, pp.7459-7463.

Dadzie, I., Ni, B., Gong, M., Ying, Z., Zhang, H., Sheng, X., Xu, S. & Huang, X. (2014). Identification and characterization of a cis antisense RNA of the parC gene encoding DNA topoisomerase IV of Salmonella enterica serovar Typhi. Res Microbiol.

Eguro, T., Maeda, T., Ogawa, M., Yonemoto, K., Tanaka, H. & Katsumi, I. (2003). Electron probe micro-analysis of a contact probe after Er: YAG laser tooth ablation. Dent Mater J, 22, pp. 80-86.

Frimat, J. P., Bronkhorst, M., De Wagenaar, B., Bomer, J. G., Van Der Heijden, F., Van Den Berg, A. & Segerink, L. I. (2014). Make it spin: individual trapping of sperm for analysis and recovery using micro-contact printing. Lab Chip, 14, pp. 2635-2641.

Furber, G. V., Crago, A. E., Meehan, K., Sheppard, T. D., Hooper, K., Abbot, D. T., Allison, S. & Skene, C. (2011). How adolescents use SMS (short message service) to micro-coordinate contact with youth mental health outreach services. J Adolesc Health, 48, pp. 113-115.

Grigoriev, D. O., Kragel, J., Dutsck, V., Miller, R. & Mohwald, H. (2007). Contact angle determination of micro- and nanoparticles at fluid/fluid interfaces: the excluded area concept. Phys Chem Chem Phys, 9, pp. 6447-6454.

Hammiche, A., Walsh, M. J., Pollock, H. M., Martin-Hirsch, P. L. & Martin, F. L. (2007). Non-contact micro-cantilevers detect photothermally induced vibrations that can segregate different categories of exfoliative cervical cytology. J Biochem Biophys Methods, 70, pp. 675-677.

Hodgkinson, G. & Hlady, V. (2008). Relating material surface heterogeneity to protein adsorption: the effect of annealing of micro-contact-printed OTS patterns. J Adhes Sci Technol, 19, pp. 235-255.

Hsu, J. T., Huang, H. L., Tsai, M. T., Wu, A. Y., Tu, M. G. & Fuh, L. J. (2013). Effects of the 3D bone-to-implant contact and bone stiffness on the initial stability of a dental implant: micro-CT and resonance frequency analyses. Int J Oral Maxillofac Surg, 42, pp. 276-280.

Iversen, L., Cherouti, N., Berthing, T., Stamou, D. & Martinez, K. L. (2008). Templated protein assembly on micro-contact-printed surface patterns. Use of the SNAP-tag protein functionality. Langmuir, 24, pp. 6375-6381.

Jeoung, S. C., Lee, H. S., Yahng, J. S., Lee, H. K., Moon, H. Y., Kim, K. J., Lee, D. G., Park, D. H., Yu, Y. S. & Ji, S. J. (2011). Micro-structuring of CIGS thin-film coated on Mo back contact by ultrafast laser 'rail-roading' patterning. Opt Express, 19, pp. 16730-16738.

Kryscio, D. R. & Peppans, N. A. (2012). Surface imprinted thin polymer film systems with selective recognition for bovine serum albumin. Anal Chim Acta, 718, pp. 109-115.

Lauer, L., Klein, C. & Offenhausser, A. (2001). Spot compliant neuronal networks by structure optimized micro-contact printing. Biomaterials, 22, pp. 1925-1932.

Lee, S. S., Kim, H. J., Sung, K., Lee, Y. K., Chung, T. M., Kim, C. G. & An, K. S. (2008). Self-catalytic and selective growth of ZnO nanoneedles by micro-contact printing and

CVD. J Nanosci Nanotechnol, 8, pp. 3561-3564.

Li, T. & Zeng, K. (2014). Nanoscale elasticity mappings of micro-constituents of abalone shell by band excitation-contact resonance force microscopy. Nanoscale, 6, pp. 2177-2185.

Lin, H. Y., Rick, J. & Chou, T. C. (2007). Optimizing the formulation of a myoglobin molecularly imprinted thin-film polymer--formed using a micro-contact imprinting method. Biosens Bioelectron, 22, pp. 3293-3301.

Liu, S., Broucek, J., Virdi, A. S. & Sumner, D. R. (2012). Limitations of using micro-computed tomography to predict bone-implant contact and mechanical fixation. J Microsc, 245, pp. 34-42.

Liu, Z., Jeong, Y. & Menq, C. H. (2013). Calibration of measurement sensitivities of multiple micro-cantilever dynamic modes in atomic force microscopy using a contact detection method. Rev Sci Instrum, 84, 023703.

Lopez D'sola, P., Sandia, M. G., Bou Rached, L. & Hernandez Serrano, P. (2012). [Design of an HACCP program for a cocoa processing facility]. Arch Latinoam Nutr, 62, pp. 355-362.

Martinez, E., Pla-Roca, M. & Samitier, J. (2012). Micro/nanopatterning of proteins using a nanoimprint-based contact printing technique. Methods Mol Biol, 811, pp. 79-87.

Mckeown, S., Cairns, E., Stringer, M. & Rae, G. (2012). Micro-ecological behavior and intergroup contact. J Soc Psychol, 152, pp. 340-358.

Meemken, D., Tangemann, A. H., Meermeier, D., Gundlach,S., Mischok, D., Greiner, M., Klein, G. & Blaha, T. (2014). Establishment of serological herd profiles for zoonoses and production diseases in pigs by "meat juice multi-serology". Prev Vet Med, 113, pp. 589-598.

Mendez-Vilas, A., Donoso, M. G., Ggnzalaezcarrasco, J. L. & Gonzalez-Martin, M. L. (2006). Looking at the micro-topography of polished and blasted Ti-based biomaterials using atomic force microscopy and contact angle goniometry. Colloids Surf B Biointerfaces, 52, pp. 157-166.

Moradi, S., Englezos, P. & Hatzikiriakos, S. G. (2014). Contact angle hysteresis of non-flattened-top micro/nanostructures. Langmuir, 30, pp. 3274-3284.

Moruzzi, R. B. & Reali, M. A. (2010). Characterization of micro-bubble size distribution and flow configuration in DAF contact zone by a non-intrusive image analysis system and tracer tests. Water Sci Technol, 61, pp. 253-262.

Nandagopal, B., Sankar, S., Lingesan, K., Appu, K. C., Padmini, B., Sridharan, G. & Gopinath, A. K. (2010). Prevalence of Salmonella typhi among patients with febrile illness in rural and peri-urban populations of Vellore district, as determined by nested PCR targeting the flagellingene. Mol Diagn Ther, 14, pp. 107-112.

Peerani, R.,Bauwens, C., Kumacheva, E. & Zandstra, P. W. (2009). Patterning mouse and human embryonic stem cells using micro-contact printing. Methods Mol Biol, 482, pp. 21-33.

Pla-Roca, M., Fernandez, J. G., Mills, C. A., Martinez, E. & Samitier, J. (2007). Micro/nanopatterning of proteins via contact printing using high aspect ratio PMMA stamps and nanoimprint apparatus. Langmuir, 23, pp. 8614-8618.

Ramazanzadeh, B. A., Fatemi, K., Dehghani, M., Mohtasham, N., Jahanbin, A. & Sadeghian, H. (2014). Effect of healing time on bone-implant contact of orthodontic micro-implants: a histologic study. ISRN Dent, 2014, 179037.

Rani, N., Vajpayee, P., Bhatti, S., Singh, S., Shanker, R. & Gupta, K. C. (2014). Quantification of Salmonella Typhi in water and sediments by molecular-beacon based qPCR. Ecotoxicol Environ Saf, 108C, pp. 64-58.

Sankaridurg, P. R., Markoulli, M., De La Jara, P. L., Harmis, N., Varghese, T., Willcox, M. D. & Holden, B. A. (2009). Lid and conjunctival micro biota during contact lens wear in children. Optom Vis Sci, 86, pp. 312-317.

Saravia, V., Kupcu, S., Nolte, M., Huber, C., Pum, D., Fery, A., Sleytr, U. B. & Toca-herrera, J. L. (2007). Bacterial protein patterning by micro-contact printing of PLL-g-PEG. J Biotechnol, 130, pp. 247-252.

Shin, H. S., Yun, H. J., Baek, K. H., Ham, Y. H., Park, K. S., Kim, D. P., Lee, G. W., Lee, H. D., Lee, K. & Do, L. M. (2012). The effect of thermal annealing on pentacene thin film transistor with micro contact printing. J Nanosci Nanotechnol, 12, pp. 5325-5329.

Stolov, A. A. & Simoff, D. A. (2006). Application of micro-attenuated total reflectance infrared spectroscopy to quantitative analysis of optical fiber coatings: effects of optical contact. Appl Spectrosc, 60, pp. 29-38.

Teixeira, A. I., Abrams, G. A., Bertics, P. J., Murphy, C. J. & Nealey, P. F. (2003). Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. J Cell Sci, 116, pp. 1881-1892.

Wang, L., Liu, X., Li, D., Liu, F. & JIN, Z. (2014). Contact mechanics studies of an ellipsoidal contact bearing surface of metal-on-metal hip prostheses under micro-lateralization. Med Eng Phys, 36, pp. 419-424.

Warwick, C., Guerreiro, A., Wood, E., Kitson, J., Robinson, J. & Soares, A. (2014). A molecular imprinted polymer based sensor for measuring phosphate in wastewater samples. Water Sci Technol, 69, pp. 48-54.

Watanabe, T. & Fujihira, M. (2009). Local work function control of indium tin oxide by micro-contact printing for electroluminescent devices. Ultramicroscopy, 109, pp. 1035-1039.

Wilkop, T., Wang, Z. & Cheng, Q. (2004). Analysis of micro-contact printed protein patterns by SPR imaging with a LED light source. Langmuir, 20, pp. 11141-11148.

Xiao, P., Gu, J., Chen, J., Zhang, J., Xing, R., Han, Y., Fu, J., Wang, W. & Chen, T. (2014). Micro-contact printing of graphene oxide nanosheets for fabricating patterned polymer brushes. Chem Commun (Camb), 50, pp. 7103-7106.

Xu, J., Zhu, L., Ding, W., Feng, L. J. & Xu, X. Y. (2011). [Effects of intermittent aeration on nitrogen-removal capability of biological contact oxidation remediation system for micro-polluted source water]. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao, 22, pp. 1027-1032.

Yang, Y. P., Xu, X. H. & Chen, H. F. (2004). Treatment of chitin-producing wastewater by micro-electrolysis-contact oxidization. J Zhejiang Univ Sci, 5, pp. 436-440.

Yin, T. I., Zhao, Y., Horak, J., Bakirich, H., Liao, H. H., Tsai, H. H., Juang, Y. Z. & Urban, G. (2013). A micro-cantilever sensor chip based on contact angle analysis for a label-free troponin I immunoassay. Lab Chip, 13, pp. 834-842.

Yola, M. L., Uzun, L., Ozaltin, N. & Denizli, A. (2014). Development of molecular imprinted nanosensor for determination of tobramycin in pharmaceuticals and foods. Talanta, 120, pp. 318-324.

Yu, S.,Kim, J. M. & Ahm, H. (2011). Micro-contact printing of polydiacetylene liposomes using hydrophilic stamps. J Nanosci Nanotechnol, 11, pp. 6034-6038.