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

بهروز شجاعی سعدی[۱]، منصور بیات[۲*]، پرویز تاجیک[۳]، سید جمال هاشمی[٤]

چکیده

سیترینین 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 سیترینین با بکار بردن سیستم FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)، برای تعیین میزان سموم سیترینین 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 سیترینین-آلبومین نیز به ترکیب فلورسانس رودامین۱۲۳ متصل شد که این واکنش ایمنولوژیکی با میل ترکیبی بالا بین آنتی‌بادی ضدسیترینین-کوانتوم‌دات(دهنده) و لیبل سیترینین-رودامین۱۲۳(گیرنده) به‌عنوان فلوروفوراستفاده می‌شود. بعد از اضافه کردن محلول نانوبیوکونژوگه به داخل کووت که حاوی مقدار معینی بافر فسفات است، سیترینین با غلظت‌های مختلف به آن اضافه شد و بعد از چند دقیقه تغییرات درشدت فلورسانس کوانتوم دات مشاهده گردید. کاهش منظم شدت فلورسانس با افزایش غلظت سیترینین به دست آمد. با توجه به آثار جمعی که مایکوتوکسین‌ها بر سلامتی انسان و حیوان دارند تعیین میزان آلودگی مواد غذایی به مایکوتوکسین‌ها ازجمله سیترینین با استفاده از نانوبیوسنسورها به‌عنوان یک روش اختصاصی که ناشی از بکار بردن آنتی‌بادی مونوکلونال در آن است، عملکرد بهتری دارد. این نانوبیوسنسور طراحی‌شده برخلاف روش‌های معمولی مثل ELISA و HPLC به‌صورت هموژن، ساده، سریع، و ارزان‌اند و نیاز به مراحل جداسازی یا شستشوی زیاد ندارد.

واژگان کلیدی: نانو حسگر زیستی، رودامین، سیترینین، کوانتوم دات.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/٦/۲۷

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 ارگانیسم‌ها، ممکن است که تولید سموم قارچی را متوقف کند، اما قادر به حذف توکسین‌هایی که از قبل در مواد غذایی تولیدشده‌اند نیست (۲). به بیماری ایجادشده توسط سموم قارچی، مایکوتوکسیکوزیس گویند (۳). مسمومیت با مایکوتوکسین-های 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 (٤). شناسایی مایکوتوکسین ها شامل روش‌های سریع و مطمئن شیمیایی، ایمونولوژیکی و بیولوژیکی است و که اثرات پاتولوژیکی و کلینیکی آن‌ها را نیز تعیین می‌کند (۵). سیترینین یک هیدروکسی اسید است که اولین بار از قارچ پنی سیلیوم سیترینوم جداسازی شد ولی امروزه توسط چندین قارچ رشته‌ای دیگر از جنس پنی سیلیوم، آسپرژیلوس و موناسکوس نیز تولیدشده است (٦). 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

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 بیماری های تولید مثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

٤- استاد تمام گروه قارچ شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

به سیترینین ازجمله کروماتوگرافی مایع با کارآیی، گاز کروماتوگرافی، کروماتوگرافی لایه‌نازک و الایزا وجود دارند (۸). بااین‌وجود امروزه یافتن اختصاصی توکسین ها با استفاده از نانو حسگرهای زیستی موردتوجه است. در این حسگرهای زیستی از آنتی‌بادی اختصاصی علیه سیترینین 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 سیترینین می‌شود (۹).

وجود ویژگی‌های بی‌نظیر نوری، شیمیایی، و فیزیکی کوانتوم دات‌ها بسیار موردتوجه 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 به‌عنوان 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 می‌باشد (۱۱). ازآنجایی‌که تعداد اتم‌های روی سطح برابر یا حتی بیشتر از قسمت داخلی نانوذره است، منجر به تغییراتی در ساختار الکترونیکی می‌شود. بنابراین، ذرات نیمه‌هادی ازلحاظ شیمیایی به‌ویژه وقتی‌که اندازه آن تا حد کوانتوم (چندین نانومتر) کاهش می‌یابد فعال می‌شوند (۱۲). کوانتوم دات‌ها می‌توانند با استفاده از یک منبع برانگیختگی با طول‌موج 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 (۱٤). 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، برچسب‌های زیستی، حسگرهای نوری، تشخیص کاتیون‌ها و آنیون‌ها و پایداری نوری قابل‌قبول می‌باشند (۱۵). کوانتوم دات‌ها با اندازه کوچک خود به‌راحتی می‌توانند به داخل سلول‌ها نفوذ کرده و به نقطه هدف برچسب شوند. تغییرات در شعاع کوانتوم دات‌ها به‌صورت تغییر رنگ کوانتوم دات‌ها در محلول آشکار می‌شود (۱۰). این ویژگی باعث می‌شود که بتوان به‌طور هم‌زمان از کوانتوم دات‌ها به‌عنوان برچسب‌های رنگی در شناسایی استفاده کرد. با توجه به خصوصیات ذکرشده، هدف از انجام مطالعه حاضر طراحی یک نانو حسگر زیستی با استفاده از آنتی‌بادی تثبیت‌شده روی نقاط کوانتومی و رودامین متصل به سیترینین جهت شناسایی سیترینین می‌باشد.

مواد و روش‌کار

سنتز نانو کریستال‌های نیمه‌هادی کوانتوم دات cdTe /cds

پس از توزین ۲٦میلی‌گرم از پودر تلوریوم، آن را با ۲ml آب مقطر استریل حل کرده و سپس۱۰۰میلی‌گرم سدیم بروهیدرید ($NaBH_4$) 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 ۲-۱ ساعت قرار داده تا پودر تلوریوم به‌طور کامل حل شود. در مرحله بعدی در یک بشر ۲۹میلی‌گرم 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 سدیم۱ 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 احیاشده از دهانه دیگر ظرف رفلاکس اضافه گردید. درنتیجه کادمیوم تلوریوم ایجاد شد. تغییر رنگ محلول نشان‌دهنده تشکیل کوانتوم دات بود.

دمای محلول را به ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد رسانده و سپس رفلاکس برقرار شد. بعد از ۹۰ 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 رفلاکس را بسته و در شرایط استیرر شدید، حدود ۱/۵ میلی‌گرم تیواستامید به‌عنوان منبع گوگرد اضافه شد. سپس دمای محلول را به ۸۰ درجه سانتی‌گراد رسانده و بعد از نیم ساعت محلول به رنگ قرمز تغییر رنگ داد، که این نشان‌دهنده تشکیل هسته/ پوسته cds/ cd Te بود. با افزایش اندازه کوانتوم دات رنگ و پایداری آن تغییر یافت. برای بررسی فلورسانس کوانتوم دات‌ها هر نیم ساعت حدود ۱ 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 برداشت‌شده در هر دقیقه بررسی شدند.

آماده‌سازی آنتی‌بادی سیترینین

ایموبیلیزاسیون آنتی‌بادی سیترینین بر روی سطح کوانتوم دات cdTe

ابتدا ۱mL کوانتوم دات برداشت کرده، روی‌هم زن مغناطیسی قرار داده تا استیر شود. سپس به میزان ۲۰۰ λ از آنتی‌بادی رقیق‌شده سیترینین (تهیه‌شده از سیگما آلدریچ) را برداشت کرده و قطره‌قطره 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. به‌این‌ترتیب که به میزان ۵٪ محلول گلوتار آلدئید تهیه‌کرده و با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد.

آماده‌سازی کونژوگه آلبومین – رودامین

پس از تهیه سوسپانسیونی از آلبومین، $NaBH_4$ را به آن اضافه می‌کنیم و در شرایط یخ و با دور ۸۰rpm شیکر می‌کنیم. بعد محلول رودامین-۱۲۳را طبق دستورالعمل شرکت سازنده (سیگما آلدریچ) تهیه‌کرده و به‌صورت قطره‌قطره داخل آلبومینی که در حال استیر روی محیط یخ است، می‌ریزیم تا اتصالات برقرار و به‌صورت Over night محلول را از کیسه دیالیز عبور می‌دهیم تا $NaBH_4$ اضافی بیرون آید، سپس مقدار ٤ میلی‌گرم از NaBH4 را شود به ۲۰cc محلول گلوتارآلدهید ۵٪ اضافه می‌کنیم و درنهایت محلول آلبومین تهیه‌شده را قطره‌قطره به محلول بالایی درحالی‌که در محیط یخ و شیکر قرار دارد، اضافه می‌نماییم.

آماده‌سازی کونژوگه سیترینین – رودامین

به‌منظور تهیه کونژوگه سیترینین – آلبومین با ردوامین- ۱۲۳، ابتدا ۳٦۰ میکرو لیتر از محلول گلوتار آلدئید (۱۰٪) را به ۱٤۰ میکرو لیتر کونژوگه سیترینین - آلبومین اضافه می‌کنیم. مخلوط حاصل به‌صورت ۲٤ ساعته در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. سپس مخلوط حاصل را از کیسه دیالیز lit ۲×۱ توسط ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات با pH= 4 عبور می-دهیم. در مرحله بعدی حدود ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آماده NaBH4 را به مخلوط سیترینین – آلبومین سرم گاوی – رودامین ۱۲۳ 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 طراحی‌شده در دستگاه اسپکتروفلوریمتری مطالعه شد. طول‌موج تهییج کوانتوم دات cdTe در ۳۲۰ نانومتر تنظیم شد و طیف نشری رودامین ۱۲۳ در طول‌موج‌های بین ٦٤۰ – ٤۰۰ نانومتر یادداشت گردید.

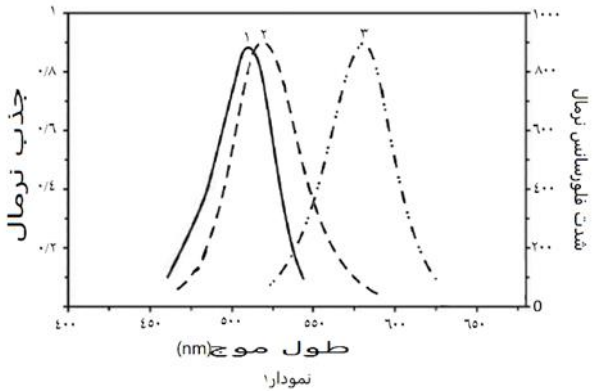
ساختار و ارزیابی نانوبیوسنسور

به‌منظور ارزیابی بیوسنسور طراحی‌شده، میزان ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات با pH = ۷/٤ به کووت فلوریمتری ریخته می‌شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول سیترینین – آلبومین سرم گاوی – رودامین(citrinin – BSA – Rhodamine) به بافر اضافه می‌گردد. در مرحله بعد، حدود ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌بادی سیترینین – کوانتوم دات (citrinin antibody - QDS) به مخلوط قبلی اضافه‌شده و بعد از ۵ دقیقه انکوبه شدن واکنش مابین آنتی‌ژن – آنتی‌بادی انجام می‌گیرد و طیف نشری یادداشت می‌گردد. سپس محلول سیترینین – آلبومین سرم گاوی –رودامین ۱۲۳ به‌طور مرتب به کووت اضافه شدند و میزان ماکزیمم طیف نشری به دست آمد. سپس یکسری از محلول سیترینین به‌طور مرتب به کوت اضافه شد و طول‌موج نشری یادداشت گردید. اختلاف بین طیف نشری با میزان غلظت به‌صورت سیگنال و خط منحنی کالیبره شد.

نتایج

کوانتوم دات‌ها در آزمایشگاه از طریق روش رفلاکس 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 باگذشت زمان و افزایش دما رنگ محلول به زرد، سپس نارنجی و در آخر قرمز تیره که ناشی از تشکیل پوسته بود، ایجاد گردید و باگذشت زمان اندازه کوانتوم دات و درنتیجه 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.

کوانتوم دات‌های سنتز شده با طول‌موج ۳۲۵ نانومتر برانگیخته شد و با تغییر اندازه کوانتوم دات‌ها طیف نشری آن از ۵۱۰ نانومتر تا ٦٨٠ نانومتر افزایش یافت. میزان جذب و طیف نشری محلول خالص به‌دست‌آمده از کوانتوم دات CdTe و رودامین- ۱۲۳ در نمودار۱ نشان داده‌شده است. همان‌طوری که ملاحظه می‌شود زمانی که ماکزیمم جذب و پیک نشری رودامین- ۱۲۳به ترتیب حدود ۵۱۰ و ۵۸۰ نانومتراست ماکزیمم پیک نشری کوانتوم دات در طول‌موج حدود ۵۰۵ نانومتر می‌باشد. طیف نشری تمام پهنای نصف ماکزیمم (FWHM) کوانتوم دات حدود ۳۵ نانومتر است.

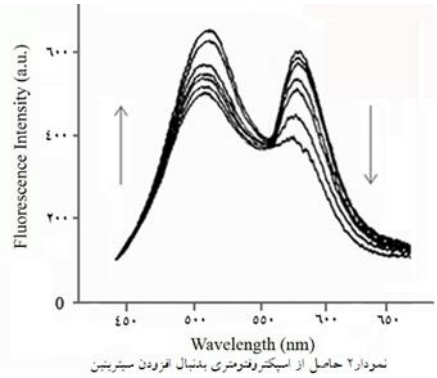


شکل ۱- میزان جذب و طیف نشری محلول خالص به‌دست‌آمده از کوانتوم دات و رودامین- ۱۲۳

طبق نتایج مربوط به تثبیت آنتی‌بادی سیترینین بر روی کوانتوم دات‌ها، مقدار مشخصی از آنتی‌بادی سیترینین 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 طول‌موج ۳۲۰ نانومتر دامنه از ٤٠٠-٦٤٠ نانومتر سنجیده شد. کاهش شدت نوری محلول نانوبیوکونژوگه کوانتوم دات-آنتی بادی ضد سیترینین در طول‌موج۲۸۰ نانومتر بعد از قرارگرفته در سانتریفیوژ با

سرعت‌بالا وجود پیوند کووالانسی بین آنتی‌بادی ضد سیترینین B1 و کوانتوم دات را تائید کرد. ایموبیلیزاسیون آنتی‌بادی ضد سیترینین روی پوسته کوانتوم دات حاصله در طیف نشری آن‌ها تغییری ایجاد نکرد. برای اثبات لیبل سیترینین –آلبومین با رودامین۱۲۳، چگالی نوری دیالیز مخلوط سیترینین –آلبومین رودامین۱۲۳با دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. در رودامین– ۱۲۳ماکزیمم طول‌موج جذب در۵۱۰ نانومتر بود. یک جذب قوی در ۵۱۰ نانومتر حضور رودامین۱۲۳ را در نمونه نشان داد.

یک سیستم FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) به‌طور واضح می‌تواند زمانی که یک واکنش ایمنولوژیکی بین کوانتوم دات لیبل شده با آنتی‌بادی سیترینین و رودامین–۱۲۳ لیبل شده با سیترینین –آلبومین اتفاق می‌افتد را نشان دهد. شدت فلورسانس رودامین–۱۲۳ در۵۸۰ نانومتر به‌طور متوالی با افزودن محلولی که شامل رودامین–۱۲۳ لیبل شده با سیترینین –آلبومین بود از میزان ۰/۱ میکرومول در میلی‌لیتر تا ۰/٦ میکرومول در میلی‌لیتر، در مدت‌زمان مخصوصی افزایش یافت. تغییرات مشاهده‌شده درشدت نشر رودامین– ۱۲۳ به‌طور مستقیم متناسب با غلظت نهایی رودامین– ۱۲۳ لیبل شده با سیترینین –آلبومین بود تا زمانی که تمام ظرفیت‌های آنتی‌بادی ضد سیترینین اشغال‌شده بارودامین–۱۲۳ لیبل شده با سیترینین–آلبومین توسط آنتی‌ژن‌ها پر شد، شدت فلورسانس افزایش یافت. ولی با افزایش بیشتر غلظت رودامین– ۱۲۳ لیبل شده با سیترینین –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، سیترینین با غلظت‌های مختلف به کووت اضافه گردید. بعد از چند دقیقه، تغییرات در شدت فلورسانس کوانتوم دات مشاهده شد. کاهش منظم شدت فلورسانس با افزایش غلظت سیترینین به دست آمد. نتایج حاصل از اسپکتروفلوریمتری در ارتباط با نانوحسگر زیستی: نتایج نشان داد که با افزودن غلظت سیترینین کاهش شدت فلورسانس کوانتوم دات مشاهده شد.



شکل۲– طیف جذبی اسپکتروفتومتری به دنبال افزودن سیترینین

بحث

مایکوتوکسین ها اهمیت زیادی ازنظر ایمنی و سلامت مصرف‌کنندگان و مسائل اقتصادی و صادرات محصولات کشاورزی دارند. ازجمله این مایکوتوکسین ها، آفلاتوکسین B1 بوده که از عوامل تراتوژنیک، موتاژنیک و سرطان‌زای انسانی است (۲). روش‌هایی که به‌طورمعمول در تعیین مایکوتوکسین ها مورداستفاده قرار می‌گیرند بر پایه کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC - High performance liquid chromatography) و آزمون الایزا (ELISA) استوار هستند (١٦). روش TLC دارای ضریب تغییرات نسبتاً بالا می‌باشد و تنها درجایی که سطوح آلودگی مایکوتوکسین بالاتر از حدود کنترل فعلی (cut of) باشد، کاربرد دارد. سایر روش‌های کروماتوگرافی مانند HPLC، تکنیک‌های بسیار گران‌قیمت و وقت‌گیری هستند که برای انجام نیز به افراد باتجربه نیاز دارد. از طرف دیگر در روش‌های TLC و

HPLC نیاز به یک مرحله استخراج با فاز جامد یا ستون ایمونو افینیتی می‌باشد. بنابراین در مطالعات و آزمون‌های معمول، روش‌های ایمونولوژنیک کنونی به روش‌های کروماتوگرافی ترجیح داده می‌شود(۱۷). در حال حاضر علاقه به استفاده از کیت‌های ELISA به دلیل نیاز به حجم کم و روش ساده‌تر تخلیص نمونه نسبت به روش‌های مرسوم مانند TLC و HPLC بیشتر می‌باشد. این روش‌ها قابل‌استفاده در بسیاری از موارد بوده و از متداول‌ترین روش‌های سریع (rapid tests) برای تشخیص مایکوتوکسین ها در محصولات غذایی شناخته‌شده‌اند (۱۸). بااین‌حال ازآنجاکه آنتی‌بادی‌های تولیدشده اغلب با ترکیبات مشابه مایکوتوکسین ها واکنش متقاطع نشان می‌دهند و ممکن است در مقایسه با روش کروماتوگرافی، مقادیر بالاتری را نشان دهند، درنتیجه مطالعات گسترده‌ای در مورد صحت و دقت روش ELISA و طراحی روش‌های اختصاصی ضروری است (۱۹).

در همین راستا نانوتکنولوژی و بیوسنسورها می‌توانند راه‌حل خوبی را ارائه کنند. علت اینکه مواد در ساختار نانو توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند، خواص فیزیکی و شیمیائی منحصربه‌فرد آن‌ها و کاربردهای مهمی است که دارند. اندازه نانو ذرات تقریباً مشابه اندازه بسیاری از مولکول‌ها و ساختارهای زیستی است و در این میان ذرات با اندازه ۱۰۰– ۱ نانومتر بسیار مورد استقبال می‌باشند (۲۰).

حسگرهای ایمنی بر اساس آنتی‌بادی، انتخاب و ابزاری با هزینه نسبتاً پایین برای آنالیز سموم ازجمله آفلاتوکسین B1 را ارائه می‌دهند و به دست آوردن آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، به‌طور شگفت‌انگیزی گسترش تکنیک حسگرهای زیستی را توضیح می‌دهد. به دلیل مزیت عدم محدودیت در تهیه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و هموژنه، اکثر ابزارهای حسگر ایمنو بر اساس اندازه‌گیری و ارزیابی غیرمستقیم لیبل های اتصال یافته مثل مواد شیمیایی فلورسانس یا ایزوتوپ‌های رادیواکتیو در آنالیز سموم مانند مایکوتوکسین ها استفاده می‌شود (۱۵). اکثر پیشرفت‌های تکنولوژی باعث افزایش حساسیت، انتخابی بودن و قابلیت اطمینان ابزار حسگر زیستی مایکوتوکسین ها می‌شود و اندازه بسیار کوچک کوانتوم دات CdTe، نسبت سطح به حجم بیشتر، منجر به بارگیری بیشتر و افزایش حساسیت فضای داخلی آن می‌شود (۱٤).

در این مطالعه از کوانتوم دات‌ها در متدFRET – based استفاده شد و به‌عنوان یک تکنیک دقیق، سریع و مؤثر برای تعیین آفلاتوکسین ها بکار رفت. کوانتوم دات اپتیکی مورداستفاده در این پروژه دارای قطری بین ۲ تا ۱۰ نانومتر و حاوی ۲۰۰ تا ۱۰۰۰۰ اتم که قابل‌مقایسه با یک پروتئین بزرگ است، می‌باشد. در مقایسه بارنگ‌های آلی، کوانتوم دات‌ها جایگزین مناسب‌تری برای آنالیز سموم می‌باشند.

علت استفاده از کوانتوم دات CdTe، ویژگی‌های بی‌نظیر نوری، شیمیایی و فیزیکی این نانو کریستال است که در سال‌های اخیر توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. این نانو ذرات نسبت سطح به حجم بیشتری دارند و همین امر موجب می‌شود که توانایی اتصال بیشتری را از خود نشان دهند (۲۱). همچنان که اندازه این ذرات کاهش می‌یابد، تعداد بیشتری از اتم‌ها در سطح قرار خواهند گرفت و درنتیجه مواد نانو با ذرات کوچک‌تر در مقایسه با مواد ذرات بزرگ‌تر 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 آن‌ها می‌شود و این عمل منجر به تغییرات عمده در شرایط اپتیکی، فلورسنتی، مکانیکی و الکترونیکی این مواد خواهد شد. کوانتوم دات‌هایی تحقیق حاضر با روش ساده رفلاکس و در محیط آبی سنتز شد. ماده احیاء کننده‌ی سدیم بور هیدرید بود. هر چه غلظت ماده احیاء کننده بیشتر باشد اندازه نانوذره تشکیل‌شده کوچک‌تر می‌شود (۲۲).

کاهش نقص‌های سطحی کوانتوم دات‌ها ازجمله 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 واکنش‌پذیری سطح کوانتوم دات‌ها، نقش مهمی دارد (۲۳). برای افزایش حلالیت کوانتوم دات‌ها می‌توان از لیگاندهای هیدروفیلیک استفاده کرد. فرآیند انتقال انرژی رزونانس سطح وقتی اتفاق می‌افتد که انرژی برانگیختگی الکترونی یک کروموفور دهنده به یک مولکول پذیرنده منتقل می‌شود که از طریق پیوند دوقطبی – دوقطبی بین جفت دهنده و پذیرنده تشکیل می‌شود. میزان انرژی انتقالی به فاصله بین دهنده و پذیرنده الکترون بستگی دارد. وقتی‌که کوانتوم دات‌ها به‌جای کروموفور به‌عنوان دهنده FRET عمل می‌کنند، می‌توانند در تشخیص میکروآنالیت ها مفید واقع شوند (۲٤).

به دلیل ویژگی‌های نوری و مغناطیسی کوانتوم دات‌ها، کاربرد آن‌ها در سیستم‌های بیوسنسوری دارای اهمیت زیادی می‌باشد. روش‌های متنوعی برای تثبیت آنتی‌بادی‌ها و سایر ماکرومولکول‌ها بر روی کوانتوم دات‌ها وجود دارد. معمولاً اتصال بین کوانتوم دات‌ها و آنتی‌بادی‌ها از طریق پیوندهای کووالانسی بین گروه‌های آمین آنتی‌بادی‌ها و عوامل گوگردی انتهای نانو کریستال‌ها تشکیل می‌شود. Zhong و همکاران (۲۰۲۰) (۲۵)، Peng و همکاران (۲۰۰۱) (۲٦)، Wang و همکاران (۲۰۰۱) (۲۷) و Miao و همکاران (۲۰۱٤) (۲۸) گزارش‌هایی 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 آنتی‌بادی‌ها در دمای اتاق تشکیل شد. رودامین از طریق پیوند کووالانسی بین بار مثبت موجود در عامل آمین انتهایی آنتی‌بادی و بار منفی مربوط به سطح کوانتوم دات با نانوذره مربوطه جفت می‌شود. نانو بیوکونژوگه تشکیل‌شده در آزمایشگاه برای مدت زیادی از هرگونه تراکم به دور بود، همچنین آنتی‌بادی برای مدت زیای فعالیت خود را حفظ کرد که این دلیلی بر تشکیل نانوبیوکونژوگه می‌باشد.

ردیابی فلورسانس به‌صورت انتقالی می‌تواند حساسیت بالاتر و محدوده ردیابی بیشتری را فراهم کند. همچنین تحقیقات وسیعی بر روی تشخیص اولیه سرطان با استفاده از کوانتوم دات‌ها انجام‌شده است. Lodhi و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که کوانتوم دات‌های سبز و نارنجی می‌توانند به‌عنوان کاوشگر فلورسانس حساس به pH استفاده شوند و به‌صورت مستقل انواع مختلف واکنش‌های آنتی‌ژن – آنتی‌بادی را تشخیص دهند (۲۹). کوانتوم دات‌ها در حسگر یونی به علت فلورسانس بالای خود نقش مهمی دارند. همچنین، از فواید دیگر کوانتوم دات‌ها به‌عنوان کاوشگر یونی پوشاندن (ماسکه کردن) آنها با معرف‌های پوشاننده مثل سرم آلبومین گاوی می‌باشد.

Chen و همکاران (۲۰۱۹) نوعی بیوسنسور براساس نانو ذره طلا را که توسط تکنیک چند مرحله با نانوتیوبهای کربن، از قبل روی الکترود کربن ساکن برای تثبیت از طریق پیوند کووالانسی با کوانتوم دات استقرار داده شده بود را معرفی کند (۳۰). نانو ذرات طلا و نانوتیوپهای 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.

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. Oplatowska-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.