

طراحی نانو بیوسنسور پلیمر قالب ملکولی مبتنی بر پتانسیومتری جهت تشخیص اگزوتوکسین باکتری استافیلوکوکوس ارتوس

حامد اهری^{a*}، ودود رضویلر^b، بهروز اکبری آدرگانی^c، عباسعلی مطلبی^b

^a مربی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، تهران، ایران

^b استاد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، تهران، ایران

^c دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۹/۶

۸۹

چکیده

مقدمه: باتوجه به رشد روزافزون جمعیت و صنعتی شدن سیرتکاملی حیات بشر، تشخیص سموم تولید شده در مواد غذایی با استفاده از روش‌های سنتی دشوار بوده چرا که از لحاظ زمانی، مدت بررسی کیفیت طولانی شده و مقرون به صرفه نبوده و حتی در بسیاری از موارد دقت روش‌های کاربردی همچون محیط کشت باکتریائی و غیره دارای خطای آزمایشگاهی می‌باشد، لذا با پیشرفت تکنولوژی نانو، طراحی سنسورهای انتخابی و هوشمند، تحولی بزرگ در صنعت کنترل کیفی مواد غذایی محسوب می‌شود که هم در زمانی کوتاه و هم با دقتی بسیار بالا می‌تواند تشخیص توکسین باکتری‌ها را انجام دهد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از مونومرهای متااکریلیک اسید برای تهیه قالب ملکولی و تهیه پلیمر استفاده گردیده شد که با پیوند کووالانسی بین مونومرهای متااکریلیک اسید (MAA) پلیمری سفید تشکیل شده، همچنین پیوند هیدروژنی بین اسید آمینه اگزوتوکسین و متااکریلیک اسید بوجود می‌آید که عامل جذب انتخابی آن خواهد بود.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده حاکی از آن است که تا رقت 10^{-3} مولار از رقت توکسین باکتری مذکور توسط سنسور پلیمر قالب ملکولی قابل تشخیص می‌باشد و رقت‌های رقیق‌تر قابل ردیابی نمی‌باشد، همچنین حساسیت سنسور تا ۶۰ روز مورد آزمون قرار گرفت که سنسور مبتنی بر پلیمر قالب ملکولی تا ۲۸ روز مورد تأیید بوده و بعد از زمان مذکور رو به کاهش قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: اگرچه حساسیت تکنیک پائین بوده ولی دقت مراحل عالی بوده برنامه‌ریزی می‌شود تا جهت افزایش حساسیت تست روش دیگری طراحی گردد.

واژه‌های کلیدی: اگزوتوکسین استافیلوکوکوس ارتوس، سنسور پلیمر قالب ملکولی، نانوحسگر

مقدمه

سالانه معادل میلیاردها دلار هزینه دور ریز و خروج مواد غذایی فساد یافته از چرخه صنعت غذا می باشد که به دلایل متعددی همچون نقل و انتقالات طولانی جاده ای و هوایی و یا دیرکرد جواب غیرقطعی آزمون های کنترل کیفی آزمایشگاه های همکار و مرجع صورت می گیرد، این دیرکرد خود بدلیل استفاده از روش های استاندارد مرسوم و نیز جواب های منفی کاذب که در بسیاری از موارد توکسین باکتری در نمونه باقی است ایجاد می گردد (Ravetz et al., 2013; Murakami, 2013).

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 پاتوژن ها که نیاز به پیش غنی سازی و غنی سازی دارند همچون سالمونلا به یک هفته هم نیازمند می باشیم تا در نهایت نتایج تشخیص اولیه حاصل گردد. استفاده از بیوسنسورها و نانوبیوسنسورها بسیار ارزشمند می باشد، زیرا در بسیاری از کارخانجات مواد غذایی در بخش تحقیقات و توسعه و نیز بخش کنترل کیفی زمان لازم برای نگهداری مواد و اعلام نتایج آزمون جهت عدم تأیید و یا تأیید محصول برای عرضه به مصرف کننده بسیار طولانی است. این موضوع سبب کاهش زمان ماندگاری و از طرفی بصورت غیر مستقیم سبب خسارت وارده به تولید کننده می گردد. این مهم در حالی است که در گرایش های متعدد صنایع غذایی همچون صنایع لبنی و یا صنایع گوشتی بسیار متفاوت تر از صنایعی همچون غلات و حبوبات و روغن و کنسرو و غیره می باشد لذا زمان در امر تشخیص بسیار کلیدی و حائز اهمیت در بحث سیستم های کنترل کیفیت و نیز برگشت سرمایه برای تولید کننده می باشد (Santana Porben, 2012).

تولید ماده غذایی سالم یکی از مهمترین دغدغه های موجود در صنعت غذاست. امروزه مصرف کنندگان خواهان غذایی هستند که حداقل فرآوری روی آن انجام شده باشد و عاری از انواع میکروارگانیسم، ماده افزودنی و مواد نگهدارنده بوده و در عین حال زمان ماندگاری بیشتری را داشته باشد که این مهم به کمک بیوسنسورها ممکن گردیده است (Hamrin and Hoeft, 2012).

از مهمترین بخش های صنعت تمام کشورها که با صنایع

غذایی در ارتباط است امنیت غذایی می باشد. استفاده از فناوری های نوین در این بخش رویکرد جدیدی است که بسیار مورد توجه قرار می گیرد. همگرایی فناوری نانو و علم غذا منجر به بروز قابلیت های فراوانی می شود که همین امر باعث شده که حدود ۲۰۰ شرکت بزرگ در سراسر دنیا در این زمینه سرمایه گذاری کلان نموده و محصولاتی را نیز به بازار عرضه کنند. با توجه به پتانسیل فوق العاده کار برد فناوری نانو در صنایع غذایی انتظار می رود طی دو دهه آینده انقلاب بزرگی در زمینه محصولات غذایی و کشاورزی پدید آید، به گونه ای که اثرات آن بسیار فراتر از کشاورزی مکانیزه و انقلاب سبز خواهد بود (Chilton et al., 2009).

سنسورهای مبتنی به روش پلیمر قالب ملکولی از نوین ترین متدهای طراحی و ساخت زیستگرهای حسی در تشخیص میکروبی مواد غذایی می باشند ولیکن بیشتر در بعد شیمی مواد غذایی (پیگیری آنزیمی، خواص ارگانولپتیک و غیره) کاربری گردیده و کمتر در تشخیص میکروبی استفاده شده است (Mashhadizadeh and Talemi, 2011).

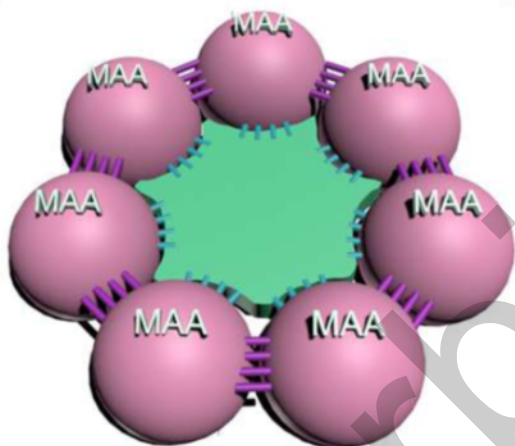
براساس مطالعات و مرور متون انجام یافته در خصوص سم باکتری مورد نظر نانوحسگری طراحی نشده ولی حسگرهای متعددی از نانوذرات طلا و گرافیت و کربن شبیه سازی شده که براساس بررسی BABU و همکاران در سال ۲۰۱۳ و FERRO و همکاران در سال ۲۰۱۲ سنسورها زمان تشخیص بیشتر و حساسیت کمتری در مقایسه با نانو حسگرها دارا می باشند و از طرفی ویژگی و دقت نانوسنسورها با توجه به افزایش خاصیت رسانش و هدایت الکتریکی بسیار بالاتر می باشد که این امر به خاطر نانوذره بکاربرده شده در سنسور شبیه سازی شده می باشد.

هدف از اجرای این تحقیق تشخیص آگزوتوکسین باکتری استفیلوکوکوس ارئوس به عنوان یکی از شایع ترین عوامل مسمومیت های غذایی به روش پتانسیومتری می باشد. طراحی سنسوری با کاربری فن آوری نانو بوده تا با حساسیت و دقت زیادی بتواند توکسین حاصل از استفیلوکوکوس ارئوس که یکی از شایع ترین عوامل مسمومیت های غذایی می باشد را شناسائی نماید.

مواد و روش ها

مواد

این روش معادل ۳۸ میلی‌لیتر استفاده گردید) و سپس محلول به آرامی هم زده شد و از عامل پیوند دهنده عرضی اتیلن گلايکول متا کریلات به مقدار ۱۱,۳۲ ml استفاده شد و همچنین به عنوان آغازگر واکنش از پلیمرزاسیون از آزوبیس ایزو بوتیرو نتیریل به مقدار ۱۰ میلی‌گرم استفاده شد. بلافاصله بعد از افزودن آغازگر از پرتو دهی ماورابنفش برای تسریع واکنش پلی مرزاسیون استفاده شد. استفاده از اشعه ماورا بنفش تشکیل رادیکال‌های آزاد و شروع پلیمرزاسیون را به دنبال داشت، در نهایت بعد از انجام واکنش، پیوند کوالانسی بین مونومرهای متا کریلیک اسید (Meta Acrylic Acid MAA) تشکیل شده و ذرات پلیمری سفید رنگ حاصل گردید. همچنین پیوند هیدرونی بین اسید آمینه اگزوتوکسین و متا کریلیک اسید بوجود می‌آید که عامل جذب انتخابی آن بود.



شکل ۱- نمایش پیوندهای کووالانسی بین مونومرهای متا کریلیک اسید و برهمکنش اگزوتوکسین با قالب ملکولی

الگوی پلیمری تشکیل شده در اطراف مولکول‌های اگزوتوکسین با پیوندهای هیدروژنی به عوامل اسیدهای آمینه موجود در ساختار توکسین پیوند داده شده و از اینرو برای خارج کردن مولکول توکسین از محلول رقیق اسید استفاده گردیده شد و الگوی پلیمری بجا مانده جهت بکارگیری در سنسور پتانسیومتری وارد مرحله بعدی آزمایش شد (Ferro et al., 2012; Wu et al., 2011; Murphy-Perez et al., 2011).

از محلول ۱ به ۱۰ از متانول و اسید استیک به عنوان محلول اسیدی الکل استفاده شد تا مولکول اگزوتوکسین را از درون پلیمر تشکیل شده خارج نماید. مکانسیم این عمل از طریق حذف پیوندهای هیدروژنی بین اسید آمینه‌ها و

توکسین باکتری استافیلوکوکوس ارتوس از کمپانی سیگما، استیک اسید تهیه شده از کمپانی مرک، حلال DMF (دی متیل فوران) تهیه شده از کمپانی مرک، تترا اتوکسی سیلان تهیه شده از کمپانی سیگما، هیدروکسید آمونیم تهیه شده از کمپانی مرک، واکنشگر APTES تهیه شده از کمپانی سیگما، سوکسینیک انیدرید، تری اتیل آمین. کلیه مواد کاربردی در این تحقیق دارای درجه خلوص تجزیه ای بوده و در تهیه محلول‌ها از آب دوبار تقطیر استفاده شده است.

روش

- پتانسیومتری مبتنی بر پلیمر قالب ملکولی

به منظور ساخت الگوی‌های مقاوم از نظر فیزیکی و شیمیایی برای اگزوتوکسین استاف ابتدا بایستی محلول مناسبی از این حسگر از محلول خالص آن تهیه شود. برای این منظور از محلول خالص عرضه شده توسط کمپانی سیگما با رقیق سازی مناسب با آب مقطر خالص محلول با غلظت $10^{-5} \times 1$ از آن تهیه گردید و کار در شرایط دمایی استاندارد در تمام مراحل کار با توکسین رعایت گردید و محلول‌ها به صورت روزانه تهیه و در مراحل مختلف آزمایش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام یافت (Xu et al., 2009).

ابتدا غلظت 10^{-5} واحد از اگزوتوکسین استافیلوکوکوس ارتوس تیپ A تهیه شده از کمپانی سیگما را بوسیله آب مقطر دوبار تقطیر تهیه نموده، در روش پلیمر قالب ملکولی از مونومر متا کریلیک اسید در دوزهای متعدد استفاده گردیده شد بدین منظور در این بررسی از نسبت های مونومر به توکسین شامل نسبت‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ استفاده شد که در نهایت بعد از بررسی های انجام شده نسبت ده به یک از مونومر متا کریلیک اسید به اگزوتوکسین به عنوان نسبت بهینه برای تولید قالب انتخاب شد (Mashhadizadeh and Talemi, 2011). جهت تشکیل الگوی مناسب پلیمری در اطراف اگزوتوکسین و برای توزیع حلال پوشی مناسب از حجم حلال بیشتری استفاده گردید.

در روش پلیمرزاسیون رسوبی بر خلاف روش توده‌ای، از حجم حلال بیشتری استفاده می‌شود که با ایجاد فرصت هسته‌زائی منجر به تولید ذرات در ابعاد نانو می‌گردد. (در

سپس برش‌های نازکی از آن به کمک چاقوی الماس مربوطه دستگاه اولترا میکروتوم (برای ایجاد برش‌های بسیار ظریف) تهیه می‌شود که تنها ۵۰-۱۰۰ نانومتر ضخامت دارند. برش‌های تهیه شده روی یک توری مسی قرار داده می‌شوند و با کمک فلزات سنگین رنگ می‌شوند. حال نمونه بافت آماده مطالعه با کمک پرتویالکترونی TEM می‌باشد، سپس با بزرگنمایی $40 \times$ معادل ۴۰ هزار برابر بزرگتر تصویر نهائی رویت خواهد شد.

- اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات:

این آزمون تحت عنوان اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات و مقادیر سطح ویژه پودرهای شیمیایی توسط دستگاه پار تیكل سايز آنالایزر مدل Fritsch A22 انجام گرفته شد که چگونگی پراکنش متوسط ذرات موجود در نمونه MIP و NIP را نشان می‌دهد.

- ساخت میکروالکتروود غشائی با اصلاحگر پلیمر قالب ملکولی:

از دو جنس گرافیت و طلا جهت ساخت بدنه میکرو الکتروود می‌توان استفاده نمود که در این پروژه باتوجه به محدودیت‌های موجود از الکتروود گرافیت استفاده گردید. این میکرو الکتروود در غلافی از لوله کاپیلاری به شکل یک میکرووایر محبوس گردید و لوله شیشه‌ای کاپیلاری محتوی میکرو الکتروود گرافیت بصورت عمود بر سطح مقطع برش داده شد و بعد از برش سطح مقطع کوچکی از گرافیت رویت گردید که جهت تهیه غشا نازک پلیمری روی سرالکتروود برش داده شده استفاده گردید (Mashhadizadeh and Talemi, 2011).

- تهیه غشا نازک پلیمری روی سطح مقطع الکتروود:

مقدار 50mg پودر پلی ونیل کلراید را با مقدار 50mg از یونفور و مقدارمعینی از افزودنی KTPCIPB^۵ به همراه ۷۵ میلی گرم پلاستی سایزر مخلوط نموده و مخلوط حاصله را در حجم 5 ml حلال تترا هیدروفوران در بشر شیشه‌ای 25 ml حل نموده و درفضای آزمایشگاه جهت

متاکریلیک اسید بعنوان واحدهای مونومر پلیمر در شکل ۱ نشان داده شده است (Shimomura et al., 2012).

به منظور تعیین خصوصیت نانوذرات پلیمری تولیدی و تعیین مورفولوژی و اندازه این ذرات از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی SEM^۱ استفاده گردیده شد. بدین منظور ابتدا آماده سازی ذرات پلیمری MIP^۲ و NIP^۳ از طریق تهیه سوسپانسون در حلال استونیتریل در فالکون‌های آزمایشگاهی انجام شد و مقدار ۳ سی سی از محلول حاصله را روی پایه دارای چسب گذارده تا حلال تبخیر گردد و سپس در دستگاه اسپاترکوتر^۴ حاوی گاز آرگون جهت تثبیت روکش آب طلا به روی نمونه‌های موجود برپایه می‌باشد انتقال داده تا بعد از ۱۰ دقیقه نمونه‌های آماده شده دارای روکش طلا به محفظه دستگاه میکروسکوپ انتقال یابند و در نهایت بعد از تنظیم میکروسکوپ SEM به روی بزرگنمایی $10 \times$ تصاویر نمونه به روی مانیتور ظاهر گردیده شد.

- آماده‌سازی جهت تصویربرداری میکروسکوپ TEM:

در ادامه به نحوه آماده‌سازی نمونه برای مطالعه آن با TEM اشاره می‌گردد. در TEM، نمونه موردبررسی باید چگالی آن به حدی باشد که اجازه دهد تا الکترون‌ها تا حدی از آن عبور کنند. راه‌های مختلفی برای تهیه این نوع نمونه وجود دارد. برش‌های بسیارنازک از نمونه مد نظر تهیه و آن را در یک پلاستیک فیکس و ثابت گردیده شد. می‌توان نمونه را با روش‌های مختلف رنگ کرد و با استفاده از نشانه‌گذاری آنرا مطالعه نمود. برای مثال، فلزاتسنگین رنگ شده مانند اورانیوم و سرب الکترون‌های را به خوبی متفرق می‌کنند و کنتراست نمونه را در زیر میکروسکوپ بهبود می‌بخشند.

تهیه برش با کمک مواد در برگیرنده: مواد زیستی شامل مقادیر آب می‌باشند. به علت این برای استفاده از TEM باید کار درخلاء انجام شود لازم است تا آب به گونه ای تبخیر و یا جداسازی شود (با کمک الکل یا استون) و در نهایت نمونه ثابت می‌شود. حال نمونه در پلاستیکی محصور می‌شود (به شکل یک بلوک پلاستیکی سخت) و

¹ scanning electron microscope

³ Non-imprinted polymer

⁴ Spotter Coater

² Molecularly imprinted polymer

⁵ KTPCIPB: پتاسیم تتراکیس پاراکلروفنیل بورات

در حجم ویال ۲۰۰ میکرولیتری تهیه شده معادل ۴۰۰ میلی‌گرم وزن توکسین می‌باشد. جهت محاسبه جرم ملکولی توکسین تجاری براساس مندرجات برگ آنالیز هر ۱ میلی مول از توکسین دارای جرم ملکولی ۲۰۲ میلی گرم می باشد که در وزن محاسبه شده قبلی ویال، مقدار ۲ میلی مول وجود دارد. براساس تعریف مولار، (مول بر لیتر یا میلی‌مول در میلی‌لیتر) ۲ میلی‌مول محلول حاصله را در ۱ میلی لیتر حل کرده و بدین ترتیب توکسین ۱ مولار تهیه شده (Xu et al., 2009) توکسین ۱ مولار بدست آمده جهت حداقل رقتی که سنسور تفکیک می نماید بکار می‌رود.

با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر ۱ میلی لیتر از توکسین ۱ مولار را با ۰/۹ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر مخلوط شد و تا رقت ۱/ توکسین بدست می آید در ادامه مجدداً یک میلی لیتر از رقت قبلی را با ۹ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر ترکیب و رقت ۰/۱ بدست آمد و به همین ترتیب تا رقت ۰/۰۰۰۰۱ تهیه گردید. لازم به ذکر است که جهت سهولت در کاربری سنسور و ورود الکتروود به درون محفظه برای تهیه این رقت ها از پلیت الیزا استفاده شده است.

سپس با استفاده از پتانسیومتر و تست هر رقت توسط الکتروود طراحی شده، دستگاه اختلاف پتانسیل هر رقت را ثبت نمود بدین نحو که چنانچه با ورود میکروالکتروود از رقت اولیه به رقت بعدی میزان اختلاف پتانسیل ۵۹ میلی ولت باشد طبق تعریف از رابطه نرست تبعیت می کند و پاسخ الکتروود در رقت بعدی قابل قبول بوده و بیشتر می شود ولی اگر هر رقتی با رقت رقیق شده بعدی دارای اختلاف پتانسیل ۵۹ میلی ولت پر دیکید باشد طبق تعریف رابطه استاندارد شیب نرست یعنی سنسور به وجود آگزوتوکسین در آن رقت پاسخ داده است ولی اگر اختلاف پتانسیل هر رقتی با رقت قبلی یعنی رقت غلیظ تر خود کمتر از ۵۹ میلی ولت باشد یعنی سنسور به آن رقت حساس نبوده و به عبارتی نتوانسته آن رقت را تشخیص بدهد (Mashhadizadeh and Talemi, 2011).

- تعیین طول عمر سنسور:

منظور از تعیین طول عمر سنسور این است که هر یک از سنسورهای مبتنی بر پلیمر قالب ملکولی تا چه محدوده‌ای

تبخیر حلال به مدت ۲۰ دقیقه باقی می‌گذاریم تا محلول غلیظ روغنی همگن حاصل گردید برای تسریع در حصول این محلول از حرارت غیرمستقیم استفاده شد تا زمان کاهش یابد ولی نکته قابل توجه آن است که حرارت باید به نحوی باشد تا از بجوش آمدن محلول جلوگیری گردد (Babu et al., 2013).

برای ایجاد غشا نازک پلیمری روی سطح الکتروود: نوک غشا برش زده شده را در محلول غلیظ روغنی بالا بصورت لحظه ای فرو برده و خارج نموده در نهایت غشای تشکیل شده در سرالکتروود را به مدت ۲۴ ساعت در مجاور هوای آزمایشگاه خشک نموده و به مدت ۴۸ ساعت در محلول 10^{-3} مولار توکسین استافیلوکوکوس ارئوس گذارده تا آگزوتوکسین به جایگاه طراحی شده قبلی اتصال یابد و بعد گذشت این زمان و انجام اتصال به وسیله روش پتانسیومتری و بررسی شیب نرست به ادامه آزمون طراحی پرداخته شد (Shen et al., 2012).

اساس روش بر اساس مکانیسم الکتروشیمیایی می باشد که در این واکنش پلیمر قالب ملکولی بعنوان یک اصلاحگر جهت بهبود خواص الکتروشیمیایی غشائی پلی ونیل کلراید بکار رفته است تا توکسین باکتری مربوطه را شناسائی نماید. جهت تشخیص اختلاف پتانسیل حاصل از وجود و یا عدم وجود توکسین باکتری از دستگاه pH/mV مترمدل ۸۲۷ ساخت سوئیس استفاده شد، علت استفاده از این دستگاه، اندازه‌گیری پتانسیل الکتروود یون گزین طراحی شده می‌باشد این دستگاه دارای الکتروود مرجع Ag/AgCl اشباع شده با کلرید پتاسیم ۳ مولار است که این الکتروود خود دارای پتانسیل معادل ۲۲۲/ولت می‌باشد که این عدد هم تابعی از غلظت کلرید پتاسیم درون الکتروود می‌باشد که به عنوان اشباع کننده الکتروود هست، در نهایت اختلاف پتانسیل الکتروود Ag/AgCl با الکتروود PVC عددی می‌باشد که در نتایج بعنوان پاسخ سنسور ناشی از وجود یا عدم وجود آگزوتوکسین باکتری مطرح گردیده است (Li et al., 2012).

- بررسی حساسیت سنسور:

براساس مندرجات برگ آنالیز محلول آگزوتوکسین A باکتری استافیلوکوکوس ارئوس تهیه شده از کمپانی سیگما به ازای هر میکرولیتر حاوی ۲ میلی‌گرم توکسین است که

کروی هستند و نیز در حلال استونیتریل تولید گردیده شده‌اند.

پراکنش ذرات بصورت یکنواخت رویت می‌گردد و حالت اگلومره بعلت سونیکت صحیح و حلال استونیتریل اتفاق نیفتاده و بررسی انجام یافته با ۱۵ کیلوولت توسط میکروسکوپ الکترونی بیانگر آن است که سایز ذرات در مقیاس نانومتریکی می‌باشد، لازم به ذکر است که در تصاویر میکروسکوپ SEM برخلاف TEM چون نمونه ضخیم می‌باشند کلیه الکترون‌ها منعکس می‌گردد و الکترون‌های منعکس شده توسط دتکتور تفکیک و تصویر نهائی را ایجاد می‌نمایند.

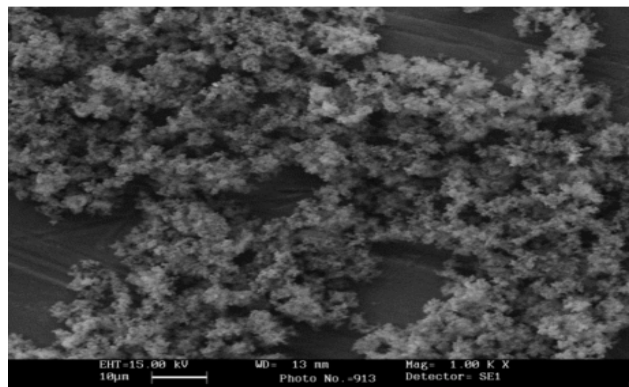
شرایط رقت بالای مونومر و میزان مناسب و بهینه توکسین به مونومر به پیوند دهنده عرضی ۱۰ به سبب تولید اینگونه ذرات با مورفولوژی کروی و یکسان شده است، همچنین طی پلیمرزاسیون رسوبی از اختلاط آرام محلول پلیمرزاسیون استفاده شده تا جاذب‌های یکنواخت‌تری تولید شود.

پراکنش ذرات نانو با استفاده از داده‌های دستگاه (Particle size analyzer)

همانگونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد متوسط پراکنش ذرات در نمونه بین ۱۰۰ تا ۱۸۰ نانومتر می‌باشد که تراکم ذرات ۱۶۸ نانومتر می‌باشد.

نتایج مربوط به پایداری حساسیت سنسورها:

نتایج حاصل از این بخش، در خصوص تحلیل میزان حفظ حساسیت سنسور براساس گذشت زمان حاکی از آن است که سنسور در روز ۲۸ به بعد نسبت به پاسخ نسبت به اتصال به آنتی ژن روبه کاهش رفته، لذا نتایج مذکور حاکی از آن است که سنسور دارای زمان مصرف معادل ۱ ماه می‌باشد.



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی ذرات پلیمر قالب ملکولی (MIP (Molecularly imprinted polymer) با بزرگنمایی ۱/۰۰ KX با قطر ذرات ۱۰ میکرومتر در مقیاس مشخص شده به روی تصویر

از زمان خصوصیات تشخیصی خود را حفظ می‌نمایند یا عبارتی بهتر توانائی تشخیص توکسین را دارند که این مهم در روزهای ۴ الی ۶۰ روزگی از طراحی سنسورها انجام یافت (Li et al., 2012).

یافته‌ها

حساسیت سنسور پلیمر قالب ملکولی:

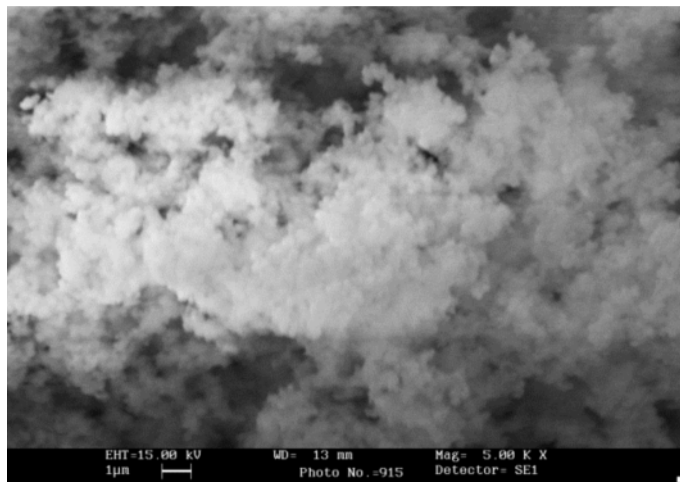
همانگونه که در جدول مشاهده می‌گردد در رقت‌های ۲- و ۳- اختلاف عددی ۵۹ میلی‌ولت مشهود بوده ولی از رقت ۳- به بعد تفاضل اختلاف پتانسیل معادل ۵۹ میلی‌ولت نمی‌باشد و سنسور قادر به تفکیک این رقت از رقت‌های رقیق‌تر نیست. لذا براساس نتایج حاصله رقت ۳- حداقل رقت می‌باشد که نانوبیوسنسور در آب مقطر قادر به تشخیص توکسین می‌باشد.

جدول ۱- اختلاف پتانسیل‌های حاصل در رقت‌های متعدد از توکسین باکتری استافیلوکوکوس ارنوس

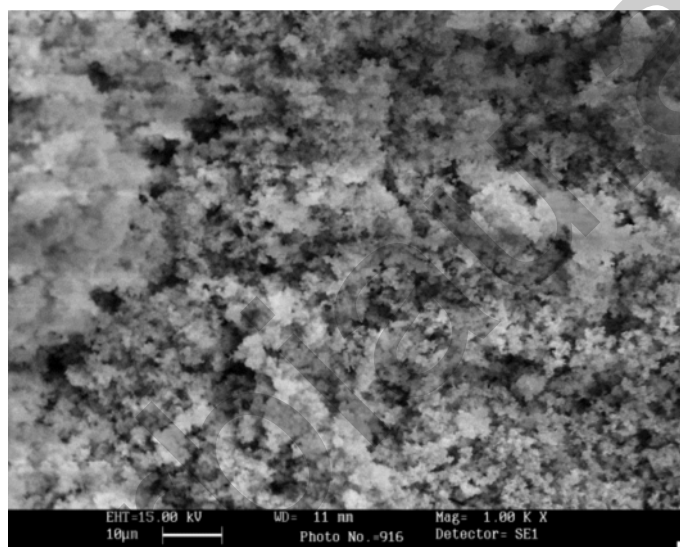
10^{-1}	۱۰۷mV
10^{-2}	۱۶۶mV
10^{-3}	۲۲۶mV
10^{-4}	۲۶۹mV
10^{-5}	۳۳۸mV
10^{-6}	۳۶۵ mV

نتایج تصاویر بزرگنمایی حاصل از میکروسکوپ الکترونی SEM:

همانگونه که در تصاویر ذیل رویت می‌گردد به ترتیب تصاویر SEM ذرات MIP و NIP بهینه سنتز شده و سپس تصاویر میکروسکوپ TEM برای قالب‌گیری توکسین نشان داده شده است. همانطور که در تصاویر مربوط به MIP مشاهده می‌شود این ذرات هموزن و

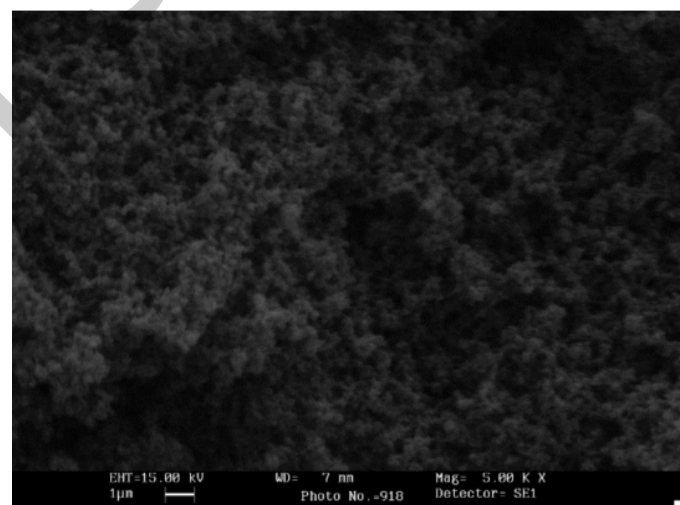


شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی ذرات پلیمر قالب ملکولی (MIP) Molecularly imprinted polymer با بزرگنمایی KX ۵/۰۰ با قطر ذرات ۱ میکرومتر در مقیاس مشخص شده به روی تصویر



شکل ۴- Non-imprinted polymer (NIP)

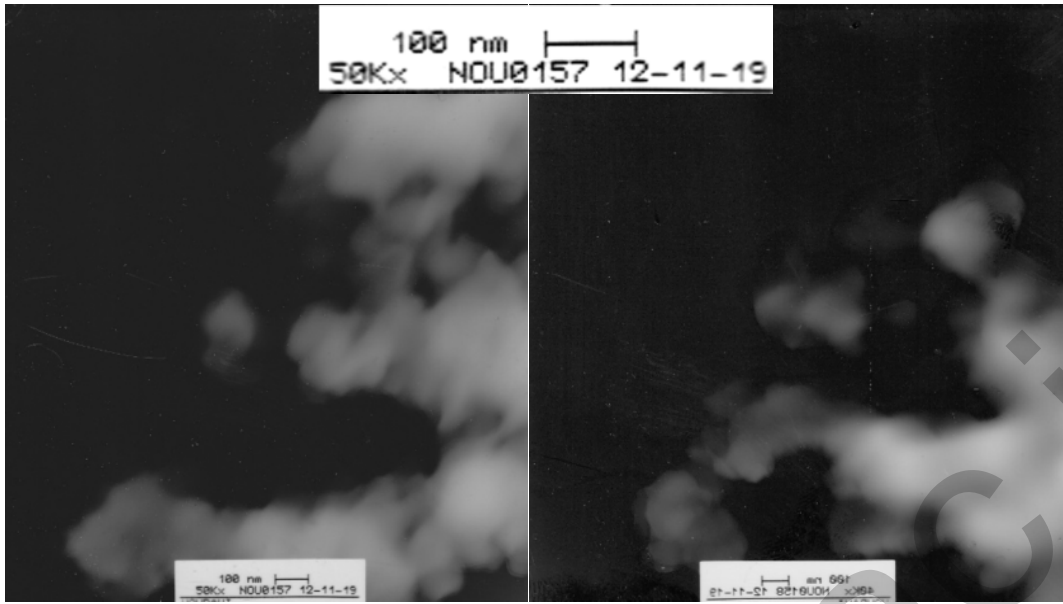
با بزرگنمایی KX ۱/۰۰ با قطر ذرات ۱۰ میکرومتر



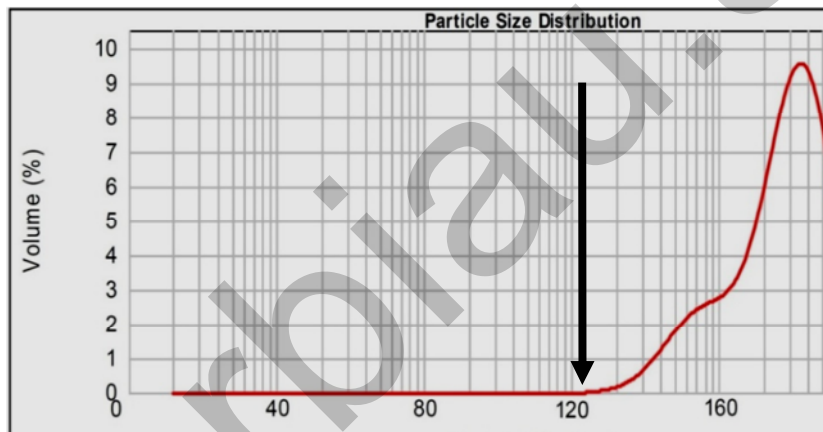
شکل ۵- تصاویر میکروسکوپ الکترونی ذرات پلیمر قالب ملکولی (NIP) Non-imprinted polymer با بزرگنمایی KX ۵/۰۰ با قطر ذرات ۱

میکرومتر در مقیاس مشخص شده

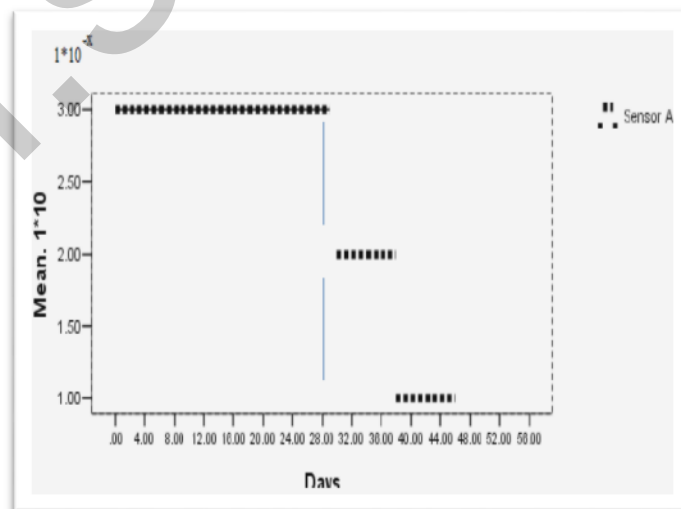
طراحی نانو بیوسنسور پلیمر قالب ملکولی مبتنی بر پتانسیومتری



شکل ۶- میکروسکوپ الکترونی: TEM با بزرگنمایی ۵۰ KX با مشخصه معین شده ۱۰۰ نانومتر X مقدار ضخامت صفحات می باشد که هر چه بیشتر باشد و چگالی بیشتری داشته باشد مقدار عبور الکترون را کاهش خواهد داد.



نمودار ۱- پراکنش ذرات نانو با استفاده از داده‌های دستگاه (Particle size analyzer)



نمودار ۲- طول عمر مفید سنسور بر اساس گذشت زمان: Life Time

بحث

روش‌های سنتی کار با محیط کشت برای تشخیص توکسین باکتری‌ها بسیار وقت‌گیر 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 عموماً ۴ تا ۷ روز به طول می‌انجامد (Anatolii, 1980).

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 پاتوژن‌ها که نیاز به پیش غنی‌سازی و غنی‌سازی دارند همچون سالمونلا به یک هفته هم نیازمند می‌باشد تا در نهایت نتایج تشخیص اولیه حاصل گردد، استفاده از بیوسنسورها و نانوبیوسنسورها بسیار ارزشمند می‌باشد چراکه در بسیاری از کارخانجات مواد غذایی در بخش تحقیقات و توسعه و نیز بخش کنترل کیفی زمان لازم برای نگهداری مواد و اعلام نتایج آزمون جهت عدم تأیید و یا تأیید محصول برای عرضه به مصرف کننده بسیار طولانی و سبب کاهش زمان ماندگاری و از طرفی بصورت غیر مستقیم سبب خسارت وارده به تولید کننده می‌گردد (Belokrylov, 1970)، این امر در حالی است که در گرایش‌های متعدد صنایع غذایی همچون صنایع لبنی و یا صنایع گوشتی بسیار متفاوت‌تر از صنایعی همچون غلات و حبوبات و روغن و کنسرو و غیره می‌باشد لذا زمان در امر تشخیص بسیار کلیدی و حائز اهمیت در بحث سیستم‌های کنترل کیفیت و نیز برگشت سرمایه برای تولید کننده می‌باشد.

نکته ارزنده دیگر در این خصوص آن است که در بسیاری از موارد توکسین باکتری که به وسیله روش‌های مذکور و قدیمی قابل تشخیص است بعلت رقابت پاتوژن‌های دیگر و یا عوامل محیطی همچون دما و محیط اسیدی و غیره از بین می‌رود و توکسین باکتری که ممکن

است به دما مقاوم باشد باقی می‌ماند که سنسور توانائی تشخیص در این موارد را به تهائی داشته و کمک بسزائی به محققین و متخصصین کنترل کیفیت در سیستم‌های مدیریت ایمنی غذا می‌نماید، لذا در جمع بندی موارد مذکور سرعت و دقت و شرایط تشخیص از جمله فاکتورهای مهم در برتری سنسورها نسبت به روش‌های پیشین و مرسوم در کنترل کیفیت صنایع غذایی می‌باشد (Xu et al., 2009).

بیوسنسور از مزایایی همچون کوتاه بودن زمان آنالیز و حساسیت بیشتر در تشخیص توکسین برخوردار است و نیز هزینه تمام شده سنسور با در نظر داشتن خصوصیات میکروبی سنسور اشاره نمود که سنسور پلیمر قالب ملکولی هزینه بسیار زیادی جهت طراحی اولیه نیاز دارد ولی در شبیه سازی آن و در نهایت تولید انبوه این نقیصه مرتفع می‌گردد (Mashhadizadeh and Shimomura et al., 2012; Talemi, 2011).

براساس مطالعه (Marques et al., 2009) نوع نانوذره مصرفی بسیار حائز اهمیت می‌باشد با توجه به استفاده از ذرات طلا میزان حساسیت سنسور تا 10^{-6} مولار افزایش یافته، این در حالی است که امروزه در بسیاری از تحقیقات از گرافیت بعلت قیمت ارزان‌تر آن در مقایسه با طلا و یا نقره استفاده می‌گردد.

در مطالعه‌ای که توسط MARQUES و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام گردید استفاده از نانو بیوسنسور مبتنی بر ذرات موثر طلا به روی ایمنی غذایی سنجیده شد و پایه این سنسور جز سنسورهای الکتروشیمیائی بوده که شیب خطی معادل 10^{-6} را داشته و طول عمر آن معادل ۶ ماه می‌باشد که کاربری ذرات طلا به جای گرافیت یا هر نانوذره دیگری در افزایش هدایت الکتریکی که بطور مستقیم در شیب خطی اثر دارد موثر بوده است.

ساخت سنسورهای پتانسیومتری مبتنی بر پلیمرهای قالب مولکولی از نظر دستگاهی کاملاً مقرون به صرفه و ارزان است. پس از ساخت سنسور، به کمک یک دستگاه پتانسیومتر ساده می‌توان آزمایش مورد نظر را انجام داد به عبارتی واضح تر ترکیبات لازم برای ساخت سنسور گران قیمت ولی دستگاه لازم جهت تشخیص و اعلام نتایج بسیار ساده و قابل دسترس می‌باشد، اما مواد شیمیایی مورد استفاده در ساخت سنسور اغلب خطرناک بوده و آلاینده محیط زیست محسوب می‌شوند که از بعد سازمان جهانی

بیوتکنولوژی انسیتو پاستور ایران و اداره آزمایشگاه‌های مرجع وزارت بهداشت (آزمایشگاه نانوبیوتکنولوژی)، آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات تهران بجهت مساعدت‌های لازم در جهت اجرای این پروژه اعلام می‌دارند.

منابع

Anatolii, S. A. (1980). Increasing the sensitivity of mice to substances of microbial origin following administration of staphylococcal exotoxin, *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 112-113.

Babu, E., Mareeswaran, P. M. & Rajagopal, S. (2013). Highly sensitive optical biosensor for thrombin based on structure switching aptamer-luminescent silica nanoparticles, *J Fluoresc*, 23, 137-146.

Belokrylov, G. A. (1970). The effect of thyroidectomy on the resistance of adult rats to Escherichia coli endotoxin and staphylococcal exotoxin, *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 47, 72-74.

Chilton, M., Black, M. M., Berkowitz, C., Casey, P. H., Cook, J., Cutts, D., Jacobs, R. R., Heeren, T., Decuba, S. E., Coleman, S., Meyers, A. & Frank, D. A. (2009). Food insecurity and risk of poor health among US-born children of immigrants, *Am J Public Health*, 99, 556-562.

Ferro, Y., Perullini, M., Jobbagy, M., Bilmes, S. A. & Durrieu, C. (2012). Development of a biosensor for environmental monitoring based on microalgae immobilized in silica hydrogels, *Sensors (Basel)*, 12, 16879-16891.

Hamrin, P. & Hoefl, B. (2012). Quality control throughout the production process of infant food, *Ann Nutr Metab*, 60, 208-210.

Li, Y., Zhang, L., Li, M., Pan, Z. & Li, D. (2012). A disposable biosensor based on immobilization of laccase with silica spheres on the MWCNTs-doped screen-printed electrode, *Chem Cent J*, 6, 103.

Marques, P. R., Lermo, A., Campoy, S., Yamanaka, H., Barbe, J., Alegret, S. & Pividori, M. I. (2009). Double-tagging polymerase chain reaction with a thiolated primer and electrochemical genosensing based on gold nanocomposite sensor for food safety, *Anal Chem*, 81, 1332-1339.

Mashhadizadeh, M. H. & Talemi, R. P. (2011). Used gold nano-particles as an on/off

محیط زیست EPA ترکیبات بکار رفته، از معایب دیگر این نوع بیوسنسور می‌توان به کوتاه بودن عمر آنها و از دست رفتن حساسیت آنها اشاره نمود (Shen et al., 2012; Li et al., 2012).

نبودن روش تهیه عمومی برای تهیه پلیمر نقش‌پذیر 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 نقش‌پذیر مولکولی به وجود آمده است. محاسبات ترمودینامیکی به طور موفقیت‌آمیزی برای تشخیص بهترین مونومرها برای نقش زدن به کار می‌رود. یک راه حل بالقوه برای حل این مسائل استفاده از نرم افزار مدل سازی و الگوریتم جستجو و بررسی است که به طور قراردادی در طراحی پلیمرها و اخیرا 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 پروسسورهای منتهی شده است که به عنوان ابزاری مناسب در حسگر شیمیایی به کار می‌رود. چنین میکرو پروسسورهایی نوفه را کم نموده و 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 تاخیر با بهینه نمودن سینتیک و گزینش پذیری حسگر کاهش می‌یابد (Li et al., 2012).

نتیجه‌گیری

استفاده از پلیمرهای سخت‌تر گزینش پذیری را توجیه می‌کند، چرا که هر چه انرژی بیشتری برای جابجایی و تغییر آنالیت مصرف شده باشد، زمان پاسخ دهی بیشتر می‌شود. همچنین پلیمرهای متخلخل ظرفیت اتصال پلیمر را در زمان پاسخ دهی افزایش می‌دهد. می‌توان با استفاده از ذرات پلیمری کوچک تر یا پلیمر لایه نازک، سرعت نفوذ را بهبود بخشید. بنابراین با سینتیک اتصال مشخص، زمان پاسخ دهی کمتر می‌شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان کمال تشکر و قدردانی را از بخش

hydrogen peroxide biosensor, *Biosens Bioelectron*, 34, 132-136.

Shimomura, T., Sumiya, T., Ono, M., Ito, T. & Hanaoka, T. A. (2012). Amperometric L-lactate biosensor based on screen-printed carbon electrode containing cobalt phthalocyanine, coated with lactate oxidase-mesoporous silica conjugate layer, *Anal Chim Acta*, 714, 114-120.

Wu, S., Zhang, L., Qi, L., Tao, S., Lan, X., Liu, Z. & Meng, C. (2011). Ultra-sensitive biosensor based on mesocellular silica foam for organophosphorous pesticide detection, *Biosens Bioelectron*, 26, 2864-2869.

Xu, G., Xia, J. H., Zhou, H., Yu, C. Z., Zhang, Y., Zuo, K. J., Shi, J. B. & Li, H. B. (2009). Interleukin-6 is essential for Staphylococcal exotoxin B-induced T regulatory cell insufficiency in nasal polyps, *Clin Exp Allergy*, 39, 829-837.

switch for response of a potentiometric sensor to Al(III) or Cu(II) metal ions, *Anal Chim Acta*, 692, 109-115.

Murakami, A. (2013). Modulation of protein quality control systems by food phytochemicals, *J Clin Biochem Nutr*, 52, 215-227.

Murphy-Perez, E., Arya, S. K. & Bhansali, S. (2011). Vapor-liquid-solid grown silica nanowire based electrochemical glucose biosensor, *Analyst*, 136, 1686-1689.

Ravetz, J. R., Healey, P. & Rayner, S. (2013). GM food: Rat reality show blurs quality control, *Nature*, 493, 304.

Santana Porben, S. (2012). Quality control an assessment system. Its location within a program for food, nutrition and metabolic intervention, *Nutr Hosp*, 27, 894-907.

Shen, J., Yang, X., Zhu, Y., Kang, H., Cao, H. & Li, C. (2012). Gold-coated silica-fiber hybrid materials for application in a novel

jstnar.srbiau.ac.ir