

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد زراعت

طراحی بیوسنسور الکتروشیمیایی بر پایه نانو ذرات طلا جهت تشخیص غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین

نگارنده: مریم نوروزی یدک

اساتید راهنما:

دکتر شاهرخ قرنجیک

دکتر مهدی آدابی

بهمن ۱۳۹۹

تقدیم اثر

بہ روح پاک مادرم

کہ عالمانہ بہ من آموخت تا چگونہ در

عرصہ زندگی

ایستادگی را تجربہ کنم

که او که تیرتود از بی سرامی ر ر نرا و ا ات که در ا را
کتا ر کربه ا آورم

و د زم می دام مرا ا و ردای و در ا آ بی کنم که ا ام
ان پا ا مر و سرا لذ روچک بی ا آ ات
آ ا دکتر اک و دکتر آدان ا را نا محترم پا که مراد
ا ام ان امر را نا و بی کردند و در پا از او م که ا مر
که و ان مرا بی و مرا بی کردند ا نرا م

تعهد نامه

اینجانب مریم نوروزی یدک دانشجوی دوره کارشناسی ارشد (دکتری) رشته بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه طراحی بیوسنسور الکتروشیمیایی برپایه نانو ذرات طلا جهت تشخیص آفلاتکسین. تحت راهنمایی جناب آقای دکتر شاهرخ قرنچیک وجناب آقای دکتر مهدی آدابی متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

ک پ ر

آفلاتوکسین‌ها سموم موجود بر روی مواد غذایی هستند که به دلیل فراوانی قابل ملاحظه‌ای آن‌ها در محیط زیست و امکان وجود آنها در بسیاری از محصولات کشاورزی و خاصیت سمی و سرطان‌زا بودن، به عنوان سردسته‌ی مایکوتوکسین‌ها شناخته شده‌اند. فناوری نانو پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه شناسایی عوامل بیماری‌زا داشته است. استفاده از نانو ذرات به عنوان نشانگر در اتصالات و با روش‌های نوین شناسایی، عامل پیشرفت‌هایی در افزایش حساسیت شناسایی و ظرفیت‌های شناسایی میکروب‌ها شده است از این رو این آزمایش با هدف طراحی بیوسنسور الکتروشیمیایی بر پایه نانو ذرات طلا جهت تشخیص افلاتوکسین B1 انجام شد. در این آزمایش ابتدا الکترودهای کربنی شسته شد و پس از آن با نانوذرات طلا به آن اضافه شد و در مرحله بعد اپتامر روی الکتروده نشانده شد، پس از آن انتخاب پذیری و پایداری الکتروده ارزیابی شد. نتایج این آزمایش نشان داد، در حضور افلاتوکسین اپتامر اختصاصی افلاتوکسین B1 به آن متصل شد و با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که بیوسنسور طراحی شده به خوبی توانسته افلاتوکسین را تشخیص داده و با استفاده از نانوذرات طلا حساسیت بیوسنسور نسبت به افلاتوکسین افزایش پیدا کند. به طوری که نتایج این آزمایش در گام اول پخش هماهنگ ذرات طلا در سطح الکترودها نشان داد ولتا مترچرخه‌ای به خوبی تشخیص افلاتوکسین توسط الکتروده را نشان داد. همچنین بر اساس نتایج این آزمایش پایداری الکتروده اصلاح شده نیز در حد مطلوب و قابل قبول تا ۲۲ روز بود. در نهایت نتایج این تحقیق نشان داد که الکتروده طراحی شده دارای انتخاب پذیری مناسب و تکرار پذیری مطلوب می باشد.

کلمات کلیدی: نانوذرات طلا، اپتامر، افلاتوکسین.

فهرست

صفحه	عنوان
۱	فصل اول مقدمه و کلیات
۱ - ۱	مقدمه
۲	۱-۲-۱ نانو سنسورها
۳	۱-۲-۱-۱ نانو بیو سنسور (نانوحسگر زیستی)
۴	۱-۲-۱-۲ اجزای بیوحسگرها
۶	۱-۲-۱-۳ انواع بیوحسگرها
۷	۳-۱ نانو ذرات طلا و اهمیت آنها
۹	۴-۱ آپتامر
۱۱	۵-۱ آفلاتوکسین و اهمیت آن
۱۳	۶-۱ اهداف
۱۵	فصل دوم بررسی منابع
۱۷	۱-۲ مروری بر کاربرد بیوسنسورها
۱۸	فصل سوم مواد و روشها
۳۱	۱-۳ نوع مطالعه
۳۲	۲-۳ مواد مورد استفاده در این پژوهش
۳۲	۱-۲-۳ توالی الیگونوکلوئیدی مورد استفاده
۳۲	۲-۲-۳ مواد شیمیایی مورد استفاده
۳۳	۳-۳ دستگاه و تجهیزات
۳۳	۴-۳ مراحل اجرایی طراحی بیوسنسور الکتروشیمیایی بر پایه نانو ذرات طلا
۳۳	۱-۴-۳ ساخت محلول بافر
۳۳	۲-۴-۳ تهیه محلول فری سیانید پتاسیم
۳۴	۳-۴-۳ تهیه محلول طلا
۳۴	۴-۴-۳ بررسی الکتروود کربنی
۳۴	۵-۴-۳ اصلاح الکتروود کربنی توسط نانوذرات طلا

۳-۵	بهبود کردن زمان نشانیدن طلا بر روی الکتروود	۳۴
۳-۶	نشانیدن آیتامر بر روی الکتروود	۳۵
۳-۶-۱	تهیه استوک آیتامر	۳۵
۳-۶-۲	ساخت غلظت های مختلف آیتامر و به دست آوردن غلظت بهینه آن	۳۵
۳-۶-۳	به دست آوردن غلظت بهینه آیتامر	۳۵
۳-۷	تهیه محلول آفلاتوکسین [7]	۳۵
۳-۷-۱	تشخیص آفلاتوکسین B1 توسط زیست حسگر الکتروشیمیایی اصلاح شده توسط نانوذرات طلا	۳۶
۳-۸	تعیین تکرارپذیری بیوسنسور	۳۶
۳-۹	بررسی انتخاب پذیری بیوسنسور	۳۶

فصل چهارم نتایج ۳۷

۴-۱	نتایج بررسی الکتروشیمیایی	۳۸
۴-۱-۱	بررسی الکتروشیمیایی الکتروود خام	۳۸
۴-۱-۲	بررسی الکتروشیمیایی الکتروود های حاوی نانو ذرات طلا	۳۸
۴-۱-۳	بررسی قرار گرفتن نانوذرات طلا بر روی الکتروود توسط میکروسکوپ الکترونی رویش مجهز به ایدکس	۳۸
۴-۱-۴	بررسی الکتروشیمیایی مراحل ساخت بیوسنسور (نشانیدن آیتامر به روی الکتروود)	۴۰
۴-۱-۵	تشخیص آفلاتوکسین	۴۲
۴-۲	ولتاژمتری چرخه ای	۴۲
۴-۳	منحنی کالبراسیون غلظتهای مختلف آیتامر	۴۳
۴-۴	پایداری الکتروود اصلاح شده	۴۵
۴-۵	منحنی کالبراسیون غلظتهای مختلف آفلاتوکسین	۴۶
۴-۶	انتخاب پذیری بیوسنسور	۴۷
۴-۷	تکرارپذیری	۴۸

فصل پنجم بحث و نتیجه گیری ۵۱

۵-۱	بحث	۵۲
۵-۲	نتیجه گیری	۶۰

منابع ۶۳

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- اجزای تشکیل دهنده حسگر زیستی شامل عنصر زیستی یا پذیرنده زیستی، آشکار ساز، مبدل و پردازنده .. ۷	
شکل ۱-۲- بیه حسگر پیزو الکتریک - ته نشست جرم بر روی سطح، فرکانس رزونانس کریستال را تغییر می دهد. ۹	
شکل ۴-۱ تصویر FESEM. (a) و (b) الکتروود کربنی خام. (c) و (d) الکتروود اصلاح شده با نانوذرات طلا..... ۴۰	
شکل ۴-۲ الکترودهای کربنی SPCE در محلول بافر فری سیانید پتاسیم ۰/۱ مولار، Au/SPCE در محلول ۰/۱ مولار سیانید پتاسیم، Aptamer/Au/ SPCE در محلول ۰/۱ مولار فری سیانید پتاسیم، ۴۳	
۴-۳- مقادیر جریان الکتروود کربنی اصلاح شده با نانوذرات طلا نسبت به غلظتهای مختلف آپتامر ۴۵	
شکل ۴-۴- میزان پایداری الکتروود بعد از ۲۲ روز ۴۶	
شکل ۴-۵- مقادیر جریان الکتروود کربنی اصلاح شده با نانوذرات طلا نسبت به غلظتهای مختلف آفلاتوکسین ۴۷	
شکل ۴-۶- انتخاب پذیری الکتروود اصلاح شده در حضور افلاتوکسین B1, B2, M1 و اپتامتر ۴۸	

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه

بیوسنسورها از دستاوردهای دهه ۶۰ میلادی می‌باشند، که با پیشرفت علوم زیستی، شیمی و مهندسی طی سال‌های گذشته بسیار توسعه یافته‌اند. به خصوص طی چند سال اخیر با جهش فناوری نانو شاهد ادغام بیوسنسورها با نانو مواد بوده‌ایم که موجب تولید نسل جدیدی از بیوسنسورها با خاصیت انتخابی و حساسیت بالا شده‌اند. در حقیقت بیوسنسورها ابزارهای آنالیتیکی هستند که می‌توانند با بهره‌گیری هوشمند مواد بیولوژیکی، ترکیب یا ترکیباتی را شناسایی نموده و با آنها واکنش دهند. محصول این واکنش می‌تواند یک پیغام شیمیایی نوری و یا الکتریکی باشد (ترنر، ۲۰۱۳).

در طی سال‌های اخیر حسگرهای زیستی پیشرفت‌های زیادی در عرصه‌های گوناگون داشته‌اند. امروزه در زمینه‌های مختلفی از جمله مانیتورینگ (پایش) محیط زیست، پزشکی و تولید محصولات دارویی و صنایع غذایی و غیره از بیوسنسورها بهره می‌گیرند (ایان و همکاران، ۲۰۱۱). این سنسورها ابزاری توانمند جهت شناسایی مولکول‌های زیستی می‌باشند، به عنوان مثال حواس بویایی و چشایی انسان نمونه‌ای از یک زیست حسگر طبیعی است که به شناسایی بوها و طعم‌های مختلف می‌پردازد، سیستم ایمنی بدن نیز یک زیست حسگر طبیعی است که می‌تواند میلیون‌ها نوع مولکول و ترکیبات مختلف را شناسایی کند (ایوانوو و همکاران، ۲۰۱۱). در واقع زیست حسگرها ابزارهای آنالیتیکی هستند که می‌توانند با بهره‌گیری از هوشمندی مواد بیولوژیکی، ترکیب یا ترکیباتی را شناسایی نموده و با آنها واکنش دهند، محصول این واکنش می‌تواند یک پیغام شیمیایی، نوری و یا الکتریکی باشد، همچنین بیان شده است زیست حسگرها می‌توانند به شدت انتخابی عمل کرده و برای هر ترکیب خاص زیست حسگر خاص وجود داشته باشد (کریس و مورگان، ۲۰۰۹). بسیاری از بیوسنسورها که برای کاربردها بیولوژیکی استفاده می‌شوند قادر به تشخیص پارامترهایی از قبیل دما، فشار، pH، یون کلسیم

و غیره می‌باشند. به علاوه به عنوان یک سیستم تشخیص زیستی برای موادی همچون میکروارگانیسیم‌ها، آنزیم، آنتی‌بادی، آنتی‌ژن، و سموم طبیعی در مواد غذایی از جمله آفلاتوکسین‌ها قابل استفاده می‌باشند (ترنر، ۲۰۱۳).

بیماری‌های عفونی، حساسیت‌ها و مسمومیت‌های غذایی از مسائل بسیار مهم بهداشتی هستند. عوامل عفونی از آلودگی مواد غذایی و آلودگی آب گرفته تا بیماری‌های واگیر و بیمارستانی، توان ایجاد بیماری دارند (تابس، ۲۰۰۸). علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در زمینه شناسایی عوامل بیماری‌زاها، بسیاری از روش‌های مورد استفاده با محدودیت‌هایی مواجه‌اند که شامل سختی تهیه نمونه اولیه، استفاده از تجهیزات زیاد و زمانبر بودن هستند. امروزه از سنسورهای مختلف به منظور حل مشکلات سایر روش‌ها از جمله زمانبر بودن و نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی فراوان استفاده می‌گردد. سنسورهایی که به منظور شناسایی بیماری‌زاها استفاده می‌شوند، علاوه بر ساختار متراکم و فشرده باید حساس، اختصاصی و سریع باشند تا حتی در مناطق دور افتاده و روستایی هم بتوان شناسایی بیماری‌زاها را تسهیل نمود (بات، ۲۰۰۷؛ مارتینز، ۲۰۰۸).

۱-۲- نانو سنسورها

فناوری نانو در سرتاسر جهان در مواجهه با افزایش اجتناب ناپذیر تقاضای ناشی از رشد جمعیت و افزایش درآمد در کشورهای در حال توسعه، در حال کسب قوا و تبدیل شدن به ابزار مهمی برای پیشرفت صنعت غذا و زیست فناوری است، در این خصوص با توسعه روزافزون فناوری نانو، نانو مواد برای دستیابی به حسگرهای زیستی با قابلیت انتخاب و اعتماد بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است (دای و چوی، ۲۰۱۳؛ رحمان و همکاران، ۲۰۱۰). یک سامانه حسگر، مجموعه‌ای از حسگرها همراه با فرایندها و اطلاعات پردازش شده برای عملیات خاص است که از داده‌های حس شده استخراج شده‌اند. نیاز به حسگرها در بسیاری بخش‌های

صنعتی، تجاری و خدماتی وجود داشته و زمینه‌های زیادی برای تولید و استفاده از حسگرها و سامانه‌های حسگر وجود دارد، امروزه امکان ایجاد ساختارهای کوچک در مقیاس میکرو و نانو با استفاده از فناوری مواد جدید مانند نانوذرات طلا راه را به سوی ظهور فناوری‌های نوین در ساخت حسگرها گشوده است، روند فعلی بازار حسگرها و تجهیزات مرتبط به سوی افزایش کارایی و استفاده همزمان از حسگرهای مختلف، در کنار کاهش اندازه، وزن و هزینه و توان مصرفی به همراه توسعه استفاده از ارتباطات بی سیم است (ترنر و همکاران، ۲۰۰۹).

محققین با توجه به ویژگی‌های مطلوب مواد نانو از روش‌های جدیدی با استفاده از خواص منحصر به فرد مواد نانو در طراحی سنسورهای مختلف، به منظور شناسایی عوامل آلوده کننده حتی در محیط‌های پیچیده مانند خون بهره می‌برند (جاین، ۲۰۰۵؛ روسی و مارکین، ۲۰۰۵).

۱-۲-۱- نانو بیوسنسور (نانوحسگر زیستی)

طبق تعریف، اتحادیه بین المللی شیمی کاربردی و محض حسگر زیستی عبارت است از مجموعه ابزارهایی که با استفاده از واکنش‌های بیوشیمیایی خاص، به واسطه آنزیم‌های ایزوله سیستم‌های ایمنی، بافت‌ها، اندام‌ها، سلول‌های کامل یا هر عنصر شیمیایی ماده موردنظر را معمولاً بصورت الکتریکی، اپتیکی یا گرمایی آشکارسازی می‌کنند. (ساروش و پراوش، ۲۰۱۳). سایر محققان نیز بیان کرده‌اند حسگر زیستی یا بیوسنسور نام گروهی از حسگرها است که بر مبنای مواد زیستی پایه گذاری شده و طراحی آن‌ها بر اساس شناسایی انتخابی مواد زیستی مورد آزمون و به کمک آشکارسازهای فیزیکوشیمیایی صورت می‌پذیرد (استوبیکا، ۲۰۱۳).

بیشترین کاربرد حسگرهای زیستی در تشخیص‌های پزشکی و علوم آزمایشگاهی است در عین حال، حسگرهای زیستی به منظور ردیابی و شناسایی ترکیبات مختلف، در خدمت صنعت غذا قرار گرفته‌اند. نانو حسگرهای زیستی، حسگرهایی در ابعاد نانومتری هستند که به دلیل

کوچکی ابعادشان از دقت و واکنش پذیری بسیار بالایی برخوردارند (مالیک و همکاران، ۲۰۱۳). پیشرفتهای گسترده فناوری نانو باعث شده است که از نانو مواد برای تثبیت اجزا در بیوسنسور استفاده شود. موادی نظیر نانوذرات، نانولوله ها، لایه های نازکی که از مواد نانوکریستال ساخته شده اند و فیبر های نوری، که اعتمادپذیری و پایداری بیشتری نسبت به اجزای زیستی در بیوسنسورها دارد. در زمره این مواد نانو ذرات تاکنون بیشترین پژوهش و استفاده را به خود اختصاص داده اند (مالیک و همکاران، ۲۰۱۳).

علاوه بر این موارد، با تکیه بر روش های نانو می توان مقاومت و یا حساسیت یک باکتری خاص را به مواد دارویی و آنتی بیوتیک ها، توسط روش های نوین مبتنی بر نانو مانند آمپرومتری و سکون مغناطیسی تعیین کرد (کایتانیس و همکاران، ۲۰۱۰؛ سوناوان و همکاران، ۲۰۱۴). علم نانو پیشرفت های زیادی در رابطه با تشخیص بیمارگرها داشته و در این زمینه بسیار به علم پزشکی کمک کرده است. استفاده از نانو ذرات به عنوان نشانگر در اتصالات و با روش های نوین شناسایی، عامل پیشرفت هایی در افزایش حساسیت شناسایی و ظرفیت های شناسایی میکروب ها شده است (روسی و مارکین، ۲۰۰۵). اساس کار یک حسگر زیستی تبدیل پاسخ زیستی به یک پیام است. این حسگرها طی تلفیق فناوری زیستی با فرایندهای الکترونیک به گونه ای طراحی می شوند تا تنها با یک ماده ی خاص واکنش نشان داده و با بهره گیری از قدرت فتوالکترون و میکروالکترودها و بر اثر واکنش اختصاصی با یک ماده ی خاص در غلظت های کمتر از میلیونیم (ppm) ابزار ردیابی و تحلیل گر دقیقی را ارائه دهند، نتیجه ی این واکنش اختصاصی به صورت پیام هایی نمود می یابد که توسط یک ریزپردازنده تحلیل می شود (ساروش و پراوش، ۲۰۱۳).

خصوصیات مواد نانو که برای شناسایی بیماریزاها به کار گرفته می شوند را می توان با تغییر در اندازه، شکل، ترکیب و تغییر در سطح آنها طراحی کرد. خواص الکترونی، طیف سنجی

(جذب، نشر)، پراکنش نور و رسانایی مواد نانو را می‌توان توسط ابزارهای مهندسی یاد شده تغییر داد و یا اصلاح کرد (کین و همکاران، ۲۰۰۸).

۱-۲-۲- اجزای بیوحسگرها

الف- پذیرنده‌ی زیستی یا عنصر زیستی حساس

یک ماده‌ی زیستی که می‌تواند به صورت انتخابی تنها با ماده‌ی خاصی واکنش نشان دهد، این عناصر عامل اصلی گزینش در حسگرهای زیستی محسوب می‌شوند که بیشتر در گروه‌های آنزیم، آنتی بادی، گیرنده‌های سلولی، اسیدهای نوکلئیک (دی.ان.ای و آر.ان.ای)، میکروارگانیسم یا سلول کامل، بافت، گیرنده‌های سنتتیک تقسیم بندی می‌شوند (دای و چوی، ۲۰۱۳).

اهمیت این اجزا در عملکرد بسیار اختصاصی آن‌ها نسبت به ترکیب مورد آزمون خاصی (آنالیت) است. که بدین وسیله از مداخله‌ی مواد مزاحم که موجب عدم کارایی بسیاری از روش‌های اندازه‌گیری است، جلوگیری می‌کند. برای تثبیت جز زیستی روی مبدل‌ها روش‌های جذب سطحی، ریزپوشینه سازی، محبوس سازی، پیوند عرضی و پیوند کووالانسی گزارش شده‌اند (دای و چوی، ۲۰۱۳).

ب- آشکارساز و مبدل

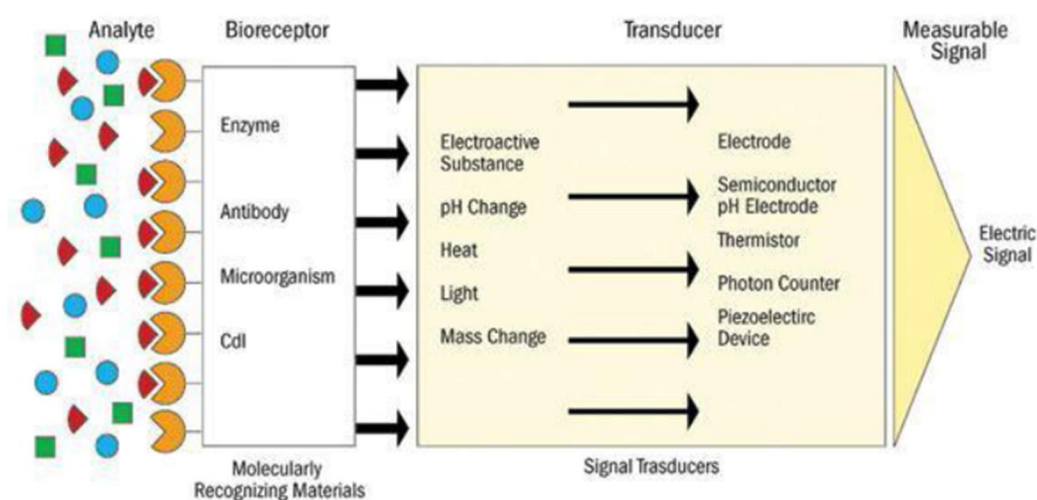
سیستم مبدل تغییر قابل مشاهده فیزیکی یا شیمیایی را به یک پیغام قابل اندازه‌گیری، که بزرگی آن متناسب با غلظت ماده یا مواد مورد سنجش است، تبدیل می‌کند. همچنین هدایت سیگنال‌های فرستاده شده از مبدل به میکروپروسسور، تقویت، تجزیه و در نهایت تبدیل آن به واحد غلظت توسط آشکارساز انجام می‌گیرد (ساروش و پراوش، ۲۰۱۳).

اختصاصیت و قدرت شناسایی یک آنالیت از میان دیگر آنالیت‌های موجود در نمونه مورد آزمایش از ویژگی‌های یک حسگر زیستی است که توسط بخش پذیرنده و مبدل آن تعیین

می‌شود، البته بیشتر حسگرهای زیستی از مبدل‌های الکتروشیمیایی ساخته شده‌اند (ساروش و پراوش، ۲۰۱۳).

- بخش پردازنده

که همچنین مسئولیت نمایش نتیجه‌ی فعالیت حسگر را نیز بر عهده دارد. شکل ۱-۱ شمایی از اجزای اصلی حسگر زیستی را در دو طرح مختلف ارائه می‌دهد.



شکل ۱-۱- اجزای تشکیل دهنده حسگر زیستی شامل عنصر زیستی یا پذیرنده زیستی، آشکار ساز، مبدل و پردازنده

۱-۲-۳- انواع بیوحسگرها

بیوحسگرهای نوری

افزایش رزونانس نانوخوشه‌های فلز، باعث پیوند سطحی با تداخل تشخیص زیستی شده، که به عنوان روش موثر برای استفاده در ابزارهای حسگری زیستی نوری می‌باشد. نانو ذرات طلا به عنوان کلاس جدیدی از مواد فلورسانس (فلورسانس نوعی خاصیت نورتابی (لومینسانس) است که در سیستم‌های شیمیایی گازی، مایع یا جامد بوقوع می‌پیوندد. فلورسانس در اثر جذب فوتون در حالت پایه و رسیدن به حالت برانگیخته بوجود می‌آید. در این حالت، اسپین الکترون همچنان با الکترون حالت پایه، جفت شده است. زمانی که مولکول برانگیخته، به حالت پایه

بازگردد، تابش فوتون‌هایی با انرژی کمتر و طول موج بلندتر را به همراه دارد. برای توسعه بیوحسگرهای نوری برای تشخیص و شناسایی توالی‌های منحصر به فرد دی‌ان‌ای (DNA) به کار می‌روند (جیانگرون و همکاران، ۲۰۰۴). حسگرهای نوری که دارای نقاط کوانتومی در ساختمان خود هستند، می‌توانند به منظور اندازه‌گیری عوامل بیماری‌زا مانند کلراتاکسین در آب به کار روند (ریو و همکاران، ۲۰۰۴).

بیو حسگرهای مغناطیسی

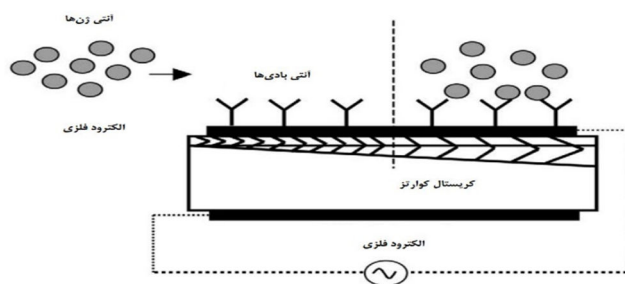
نانو ذرات مغناطیسی ابزارهای تشخیصی قدرتمندی در زمینه علوم زیستی و پزشکی می‌باشند. نانو ذرات مغناطیسی می‌توانند برای جدا ساختن آنالیت‌ها به کار روند، که این کار را با اتصال به عنصر زیستی در حسگر و تقویت سیگنال انجام می‌دهند (کوبیک و همکاران، ۲۰۰۵؛ جیانگرون و همکاران، ۲۰۰۴). نانو حسگرهای حاوی ذرات مغناطیسی جهت آشکارسازی سموم مصرفی کشاورزی، با به کار بردن نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با آنتی بادی‌ها به کار می‌روند (ریو و همکاران، ۲۰۰۴).

بیو حسگرهای الکتروشیمیایی

قدیمی‌ترین نسل از بیوحسگرها هستند که از نانو ذرات فلزی ساخته می‌شوند. بسیاری از مولکول‌های زیستی می‌توانند با نانو ذرات فلزی نشانه‌گذاری شوند بدون این که بر فعالیت زیستی شان تاثیر بگذارد مانند باکتری اشیریشیاکلی (جیانگرون و همکاران، ۲۰۰۴؛ کسینگر، ۲۰۰۵). ایمونو حسگر الکتروشیمیایی برای شناسایی سم کلرا (وبا) با استفاده از نانو لوله‌های کربنی پوشش داده شده با پلی (۳ و ۴ اتیلن دی اکسی تیوفن) ساخته شده است (پومرا و همکاران، ۲۰۰۷).

بیو حسگرهای پیزوالکتریک

این حسگرها بر پایه‌ی اندازه‌گیری تغییر فرکانس، استوار هستند (جیانگرون و همکاران، ۲۰۰۴). شکل ۱-۲ بیو حسگرهای پیزوالکتریک وسیله‌ی ایده آلی برای تشخیص بیماری‌های حیوانی می‌باشند. حس و همکاران (۲۰۰۲) ایمونوحسگر پیزوالکتریکی را گزارش کردند که به منظور تشخیص ویروس سندرم تنفسی و تناسلی خوک (PRRSV)، به کار می‌رود. سیستم‌های بیو حسگری برای تشخیص بیماری‌های عفونی در بنادر و موقعیت‌های صحرایی، بدون نیاز به پشتیبانی دامپزشکی به کار می‌روند (گارسیا و همکاران، ۲۰۰۳).



شکل ۱-۲- بیو حسگر پیزوالکتریک - ته نشست جرم بر روی سطح، فرکانس رزونانس کریستال را تغییر می‌دهد.

۱-۳ نانو ذرات طلا و اهمیت آنها

امروزه از نانو ذرات طلا و خاصیت تغییرات پلاسمونیک آنها، تا نانو ذرات اکسید آهن و تغییرات در خواص مغناطیسی، به منظور شناسایی بیماری‌ها، سم‌ها، آنتی‌ژن‌ها و نوکلئیک اسیدها به کار گرفته می‌شوند (کایتانیس و همکاران، ۲۰۱۰)، نانو ذرات فلزی که از طلا یا نقره تشکیل شده‌اند، از ویژگی‌های بصری و الکترونیکی بسیاری برخوردارند که بستگی به اندازه و ترکیب آنها دارد. از آنجایی که این مواد از میل جذبی بالا به منظور ایجاد پیوند با ملکول‌های زیستی برخوردارند، می‌توان از آنها به منظور ایجاد سنسورهای شیمیایی بهره برد. دیگر نانو

ذرات مانند نقاط کوانتومی فلتورسنت و نانو لوله‌های کربن به طور وسیعی بکار گرفته می‌شوند (مارتینز، ۲۰۰۸). شناسایی DNA و استفاده در روش‌های ایمونولوژیکی به منظور شناسایی باکتری‌ها و توکسین‌ها از موارد کاربرد آنها هستند (ادگار و همکاران، ۲۰۰۶).

نانو ذرات طلا را می‌توان در محیط آبی و آلی تولید کرد. از روش‌های متداول به منظور تولید این نانو ذرات در محیط آبی احیا کلرید طلا $AuCl_3$ با تری سدیم سیترات و در ادامه افزودن عوامل تثبیت کننده به منظور تثبیت نانو ذرات طلا توسط اعمال نیروی دافعه الکترواستاتیک مناسب بین هر یک از ذرات است که سبب پراکندگی مناسب ذرات در محیط می‌شود. کنترل فرایند در نانو ذرات تولید شده بر پایه مواد آلی بهتر و همچنین ذرات تولیدی اندازه یکنواخت‌تر دارند. مواد شیمیایی واقع در سطح نانو ذرات را می‌توان توسط عوامل آلی ایجاد کننده پیوند مانند ملکول‌های تیول یا پلیمرهای حاوی تیول کنترل نمود، که نتیجه این عمل میل ترکیبی بالای ذرات به ایجاد پیوند با گروه‌های سولفیدریل، که عامل تشکیل پیوندهای کوالانسی نسبتاً قوی هستند، می‌شود، اصلاح بیشتر سطح نانوذرات طلا می‌تواند توسط ملکول‌های دارای گروه‌های عاملی تیوله شده، اتصال با پروب‌های مختلف شامل آنتی-بادی‌ها و نوکلئیک اسیدها انجام داد (دانگ‌چای و همکاران، ۲۰۰۸).

تشکیل مناسب نانو ذرات طلا در ارتباط با وجود گروه پلاسمون سطحی با پروفایل جذب مرئی-فرابنفش است، گروه پلاسمون سطحی از تجمع الکترون‌های متصل شده به گروه رسانا با توجه به اندازه کوچک ذرات ناشی می‌شود. تغییر در گروه پلاسمون سطحی به اندازه ذرات، مواد شیمیایی اطراف آن، ظرفیت جذب سطح ذرات و ثابت دیالکتریک آنها بستگی دارد. تغییرات موضعی در جریان دی الکتريک نانو ذرات، توسط جذب بیومولکول‌ها و یا القای نشانگرهای زیستی نانو ذرات، سبب تغییرات در گروه‌های پلاسمونی می‌شود. این خصوصیات منحصر به فرد طلا و همچنین نقره، به نانو ذرات اجازه می‌دهد تا با استفاده از تغییرات در گروه پلاسمون سطحی، برای چند نوع مختلف فرآیند شناسایی به کار روند (فیلیپس و

همکاران، ۲۰۰۸). به این صورت که هر تغییر، سبب تغییر در جذب اسپکتروم حاصل از اشعه مرئی - فرابنفش می‌شود. بجز جذب، نانو ذرات طلا به عنوان شناساگر برای تشخیص و تعیین اهداف متعدد با استفاده از فلورسانس، پراکندگی رامان، هدایت الکتریکی، اتمی و تکنیک‌های نیروی مغناطیسی مورد استفاده قرار می‌گیرد (ترنر، ۲۰۱۴).

۴-۱ آپتامر

آپتامر، از دو بخش لاتین Aptus به معنای Fitting و کلمه یونانی Meros به معنای ذره تشکیل شده است؛ در واقع معنای دقیق‌تر آن ذره‌ی قابل تطبیق می‌باشد (استلونبرگ و همکاران، ۲۰۰۷) اگر بخواهیم به معنای گسترده‌تر آپتامر بنگریم، آپتامر در واقع قطعات کوچک از توالی‌های پپتیدی یا اسیدنوکلئیکی هستند که با تشکیل ساختارهای سه بعدی، توانایی اتصال اختصاصی به مولکول هدف را دارند (درست مانند آنتی بادی‌های بلندزنجیر)، اما این بار با اندازه‌ای ده‌ها بار کوچک‌تر از یک مولکول آنتی بادی، اگر چه در بیشتر مواقع، اصطلاح آپتامر به آپتامرهای اسیدنوکلئیکی اطلاق می‌گردد که از طریق فرآیند SELEX انتخاب شده‌اند (بلانک و بلیند، ۲۰۰۵).

بر اساس این تعریف، آپتامر در سال‌های اخیر به عرصه‌های گوناگونی ورود کرده است. بر اساس ساختارهای چند بعدی، آپتامر می‌تواند به مولکول‌های کوچک، کمپلکس‌ها و یا حتی ارگانیسم‌ها متصل شود. اتصال آپتامر به هدف، نتیجه مطابقت ساختاری این دو، تجمع حلقه‌های آروماتیک، میان کنش‌های الکتروستاتیک، واندروالس، باندهای هیدروژنی و یا حتی ترکیبی از اینهاست (هرمان و پاتل، ۲۰۰۰).

آپتامرها از نظر اقتصادی اهمیت بالایی دارند و پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۲۵، ارزش بازار آنها به حدود ۳ میلیارد دلار برسد، به دلیل خصوصیات جالبی که آپتامرها دارند، امروزه به طور گسترده‌ای در طراحی بیوسنسورها (آپتاسنسورها)، به عنوان عامل شناساگر، به کار رفته‌اند؛ از جمله: در طراحی سنسورهای رنگ سنجی، فلورسانس و الکتروشیمیایی برای طیف گسترده‌ای از اهداف مانند، داروها، سم‌ها و فلزات سنگین که در تمامی این موارد، نتایج مطلوبی به دست آمده است و سنسورهای ساخته

شده دارای حدّ تشخیصی در حد نانومولار و پیکومولار بوده و اختصاصیت بسیار خوبی برای اهدافشان نشان داده اند، همچنین از آپتامرها به طور گسترده در انتقال هدفمند عوامل شیمی درمانی به سلول‌های سرطانی استفاده شده است، برای این منظور، از آپتامرها به عنوان عامل شناساگر و وارد شونده و طیف وسیعی از نانو ذرات مانند: کربن نانوتیوبها، نانوذرات طلا، نانو ذرات سیلیکا، نانوساختارهای DNA کیتوسان و نانو پلیمروروم ها به عنوان حامل استفاده شده است (میتال و همکاران، ۲۰۱۷). در تمامی این مطالعات، سیستم های انتقال هدفمند طراحی شده، به خوبی توانسته اند سلول های سرطانی هدف را شناسایی کرده و وارد آنها شوند و در آنها سمیت ایجاد کنند؛ ولی بر خلاف داروهای شیمی درمانی توانسته اند میزان سمیت را در سلول های سالم و کنترل به طور چشمگیری کاهش دهند (میتال و همکاران، ۲۰۱۷).

آپتامر ها دارای مزیت هایی نسبت به آنتی بادی ها هستند از جمله: ۱- برخلاف آنتی بادی ها تولید آپتامرها در شرایط برون تنی و از طریق فرایند های شیمیایی است. ۲- برخلاف آنتی بادی ها دامنه وسیعی از مولکول های هدف مثل پروتئین ها، پپتید ها، توکسین ها، آمینو اسید ها، داروها، یون‌های فلزی و حتی سلول های کامل را شناسایی می کنند. ۳- تغییرات شیمیایی در آپتامر ها راحت تر از آنتی بادی ها انجام می شود. ۴- برخلاف آنتی بادی ها، دنا تورا سیون در اثر افزایش دما در آپتامرها برگشت پذیر است. ۵- به طور متراکم تری می توان آن ها را در سطح بیورسپتور در بیوسنسورها تثبیت کرد که باعث افزایش حساسیت در شناسایی و اندازه گیری مولکول هدف می شود. ۶- بسیاری از آپتامر ها با اتصال به مولکول هدف دچار تغییر کنفورماسیون می شوند که این ویژگی در برخی سیستم های بیوسنسوری به فرایند تولید سیگنال کمک می کند. آپتامر ها دو نوع مولکول هدف را شناسایی می کنند: ۱- مولکول های کوچک، آپتامر از لحاظ سه بعدی طوری فولد می شود که در سطح آن شکاف هایی برای اتصال مولکول هدف کوچک ایجاد می شود. ۲- مولکول های بزرگ مثل پروتئین ها: آپتامر طوری فولد می شود که در شکاف ها و شیار های سطحی مولکول هدف قرار می گیرند (پان و همکاران، ۲۰۰۹). به دلیل مزایایی که آپتامر ها نسبت به آنتی بادی ها دارند توجه روز افزونی به آنها در

بیوتکنولوژی معطوف است. از این مولکول ها می توان در طراحی بیوسنسور ها، انتقال دارو، به عنوان دارو برای مهار یک پروتئین یا آنزیم خاص و غیره استفاده کرد (پان و همکاران، ۲۰۰۹).

۵-۱ اهمیت آن

آفلاتوکسین یکی از سموم قارچی خطرناک است که توسط قارچ‌های آسپرژیلوس تولید می‌شود، مهم‌ترین گونه‌های قارچ آسپرژیلوس که تولید آفلاتوکسین می‌کنند، *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* هستند که گونه‌های مختلفی از آفلاتوکسین‌ها را تولید می‌کنند، مهم‌ترین آفلاتوکسین‌ها B1، B2، G1 و G2 هستند، وجود آفلاتوکسین‌ها در محصولات کشاورزی، خوراک دام و طیور و آجیل‌ها اهمیت دارد. البته تمام گونه‌های قارچ‌ها قادر به تولید سم آفلاتوکسین نیستند (تانگ و همکاران، ۲۰۰۹).

امروزه مشخص شده است که آفلاتوکسین‌ها از قوی‌ترین سم‌های موجود در طبیعت بوده که توسط قارچ‌های آسپرژیلوس تولید می‌شوند و روی انواع مختلف مواد غذایی و در محیط‌های مختلف رشد می‌کنند و همچنین مشخص شده است آفلاتوکسین‌ها جزء مواد درجه اول سرطانزا بشمار می‌رود (بن و همکاران، ۲۰۰۹)، تشخیص آفلاتوکسین‌ها در طبیعت می‌تواند برای موجودات زنده محیط زیست از جمله انسان‌ها و حیوانات مفید باشد. از میان انواع آفلاتوکسین‌ها، نوع B1، سمیت بیشتری را نسبت به سایرین داشته و تقریباً در تمامی موجودات، تاثیرگذار می‌باشد (اگبونیک و ایکونو، ۱۹۸۴). آفلاتوکسین B1 می‌تواند از طریق مصرف مواد غذایی به طور مستقیم وارد بدن انسان و حیوانات شود (بوسبی و وگان، ۱۹۸۴). مصرف آفلاتوکسین در یک دوره طولانی و حتی با غلظت بسیار کم نیز می‌تواند بسیار خطرناک باشد (کیمبروغ و همکاران، ۲۰۰۴). از آنجا که آفلاتوکسین‌ها با توجه به خطرات بالایشان به طور گسترده می‌توانند در مواد غذایی انسان و حیوانات دیده شوند در سال‌های اخیر چندین روش برای شناسایی آنها توسعه داده شده است، که از مهم‌ترین آنها می‌توان به کروماتوگرافی

مایع با کیفیت بالا (^۱HPLC) (لیهوج و همکاران، ۱۹۷۴) و کروماتوگرافی لایه نازک و هم چنین روش جایگزین امیدوار کننده شامل روش ایمنی سنجی متصل به آنزیم یا روش (^۲ELISA) اشاره کرد (فرانسیسکا و همکاران، ۲۰۰۵). این تکنیک‌ها در عین حال نیاز به آنتی بادی‌های خاص و بسیاری از مراحل از جمله انکوباسیون پوشش و غیره دارند که زمان سنس (زمان حس شدن) را افزایش می‌دهند. نیاز به روش‌های ساده و در دسترس و قابل اعتماد به منظور ارائه روش‌های غربالگری برای نظارت در تمام مراحل تولید غذا و تغذیه در رابطه با افلاتوکسین‌ها احساس می‌شود (چاندرا و همکاران، ۲۰۱۲).

در سال‌های اخیر پژوهش‌های بسیاری در زمینه طراحی مواد در مقیاس نانو به منظور شناسایی عوامل ایجاد کننده بیماری، توکسین‌ها و آفلاتوکسین‌های تولید شده توسط باکتری-ها و کپک‌ها (قارچ‌ها) صورت گرفته است. باید یادآور شد که یک سیستم نانو خاص به عنوان مثال نانوذرات با اندازه ۱۰۰ nm (شامل قسمت پوشاننده و لیگاند) را می‌توان به منظور حساسیت نسبت به اهداف با اندازه کوچکتر (مثلا لیپیدها)، بزرگتر (مثلا باکتری‌ها) و حتی برابر ویروس‌ها با اندازه نانو ذرات طراحی کرد. بنابراین انتظار می‌رود که این نانو ذرات که با سیستم‌های مهندسی و مواد اولیه مختلف شکل گرفته‌اند، توانایی برهمکنش با اهداف مختلف دارای اندازه مختلف را داشته باشند که نتیجه آن الگوهایی با پاسخ متفاوت است. هر کدام از این پاسخ‌های خاص محصول برهمکنش نانو ذرات مختلف است که در معرض باکتری‌های بیماریزا قرار گرفته‌اند (کایال و چاربیث، ۲۰۰۶). از این رو محققان استفاد از بیو سنسورها را یک راه حل مناسب، قابل اعتماد، سریع و کم هزینه پیشنهاد کرده‌اند (چاندرا و همکاران، ۲۰۱۲).

¹ High Performance Liquid Chromatography

² Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

۱-۶-اهداف

تمامی موارد یاد شده اشاره به سازگاری روش‌های مبتنی بر نانو جهت شناسایی عوامل ایجاد کننده بیماری، توکسین‌ها و آفلاتوکسین‌های تولید شده توسط باکتری‌ها و کپک‌ها دارد که بسیاری از آنها با مواد غذایی در ارتباط هستند. با توجه به مطالب بیان شده هدف از این مطالعه موارد زیر می‌باشد.

✓ بررسی امکان طراحی بیوسنسور الکتروشیمیایی بر پایه نانو ذرات طلا جهت

تشخیص افلاتوکسین B1.

✓ ارزیابی کارایی بیوسنسور طراحی شد برای تشخیص افلاتوکسین B1.

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱ مروری بر کاربرد بیوسنسورها

کالیل و همکاران (۲۰۰۶) از آنتی‌بادی ایمونوگلوبولین نوع G(IgG) خرگوش که به نانوذرات نقره متصل بود به منظور شناسایی این سویه از باکتری اشرشیا کلی استفاده کردند، که حد تشخیص برای شناسایی این باکتری‌های توسط این روش ۸۲/۶ CFU/mL گزارش شد.

دانگ‌چای و همکاران (۲۰۰۸) از روش ایمونولوژیکی-الکتروشیمیایی به منظور شناسایی باکتری سالمونلا تایفی موریوم استفاده کردند. آنها با تثبیت آنتی‌بادی مونوکلونال بر روی پلی-استایرن به منظور جذب (گرفتن) باکتری‌ها و به دنبال آن افزودن آنتی‌بادی پلیکلونال-نانو ذرات طلا به منظور اتصال با باکتری‌ها در حضور محلول بهبود دهنده مس و آسکوربیک اسید، زمینه را برای شناسایی باکتری سالمونلا تایفیموریوم فراهم کردند، دقت این روش به منظور شناسایی ۹۸/۹ CFU/mL گزارش شد.

در مطالعه دیگر به بررسی ایمونوسنسور خازنی قابل استفاده مجدد شامل اتیلن دی آمید و نانو ذرات طلا متصل شده به الکتروود کربن شیشه‌ای به منظور تشخیص و شناسایی گونه‌های مختلف سالمونلا در گوشت خوک پرداخته شد. واکنش بین آنتی‌بادی مونوکلونال-نانو ذرات طلا با گونه‌های مختلف سالمونلا را می‌توان مستقیماً توسط اسپکتروسکوپی مقاومت الکتروشیمیایی با حد تشخیص 10^2 CFU/mL *۱ محاسبه کرد (یانگ و همکاران، ۲۰۰۹).

استفاده از نانو ذرات و پروبهای نانوکریستال نوری به منظور شناسایی باکتری سالمونلا در شیر توسط جو و همکاران (۲۰۱۲) مطالعه شد. به این صورت که باکتری در شیر توسط آنتی-بادی-نانو ذرات مغناطیسی جذب شده و در ادامه به منظور جداسازی باکتری متصل به پروب از یک میدان مغناطیسی خارجی استفاده شده است. در ادامه آنتی‌بادی تثبیت شده، به منظور جذب اشعه فرابنفش، بر روی نانوکریستال‌های اکسید تیتانیوم قرار داده شده و سپس

جداسازی نانو ذرات مغناطیسی سالمونلا-اکسید تیتانیوم، توسط میدان مغناطیسی از محلول به منظور آنالیز نانو کریستال های اکسید تیتانیوم که اتصال برقرار نکرده اند، توسط اسپکترومتری مرئی-فرابنفش صورت گرفت، حد تشخیص توسط این روش ۱۰۰ CFU/mL سالمونلا در شیر گزارش شد.

به منظور شناسایی باکتری لیستریا مونوسایتوژنز (*Listeria monocytogenes*) گروسمن و همکاران (۲۰۰۴) در پژوهش خود روش جالبی مبتنی بر مشاهده اتصال بین آنتی-بادی متصل به نانو ذرات مغناطیسی و باکتری ها با استفاده از اعمال درجه حرارت با انتقال بالا توسط دستگاه SQUID به کار بردند. نانو ذرات سوپر پارامغناطیس با اندازه ۵۰ نانومتر که توسط آنتی بادی پوشش داده شده اند، به نمونه های حاوی لیستریا مونوسایتوژنز افزوده و در ادامه میدان مغناطیسی پالسی اعمال می شود. تحت اثر این میدان با چرخش براونی نانو ذرات مغناطیسی آزاد سریعاً به باکتری *Listeria monocytogenes* اتصال می یابد، این اتصالات شار مغناطیسی پدید می آورند که توسط دستگاه SQUID قابل تشخیص است، محدودیت شناسایی در این روش $10^6 \times 5/6$ سلول لیستریا مونوسایتوژنز در ۲۰ میکرولیتر نمونه تعیین شد.

کایتانیس و همکاران (۲۰۰۷) روش یک مرحله ای بر اساس نانو ذرات به منظور شناسایی باکتری در شیروخون توسط نانوذرات سوپر مغناطیسی اکسید آهن معرفی کردند. به منظور شناسایی مایکوباکتریوم آویوم (*Mycobacterium avium*) زیرگونه پاراتوبرکلوسی (*paratuberculosis*) نانو ذرات سوپر مغناطیسی اکسید هن، با آنتی بادی آنتی-مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوسی توسط پروتئین G متصل شده که این نانو ذرات بر اساس غلظت باکتری پاسخ می دهند. این محققین بهترین غلظت اولیه از نانو ذرات مغناطیسی برای شناسایی این گونه از باکتری را $2 \mu\text{g Fe}/\mu\text{L}$ تشخیص دادند. حد تشخیص توسط این روش ۱۵/۷۷ CFU باکتری گزارش شد.

ژائو و همکاران (۲۰۰۷) یک ایمنوسنسور آنزیمی یکبار مصرف طراحی کردند که مبتنی بر یک الکتروود قرار گرفته بر روی یک صفحه بود. این الکتروود توسط نانو ذرات طلا متصل به آگاروز پوشانده شده بود و به منظور شناسایی باکتری یاد شده به کار رفت. نانو ذرات طلا یک مسیر رسانای کوتاه را برای هدایت انتقال الکترون که به دلیل احیاء شدید در فاصله بین جایگاه فعال و الکتروود ایجاد می‌شود، را فراهم می‌آورند، این محققان توان انتخابی بالا این سنسور در شناسایی ویبریو پاراهمولیتیکوس در بین باکتری‌های اشریشیا کلا (*Escherichia*)، سالمونلا پولوروم (*Salmonella pullorum*) و استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) اثبات کردند، اما متأسفانه در رابطه با تایید این باکتری در نمونه‌های واقعی غذا ناکام ماندند.

در مطالعه‌ای از نانو ذرات طلا متصل به پلیمر پلی پارا-فنیلین اتیلن به منظور مثبت تشخیص دادن ۱۲ سویه مختلف باکتریایی در عرض چند دقیقه استفاده شد. با واکنش بین نانو ذرات-باکتری ترکیب فلئورسنت موجود در پلیمر، در اثر اتصال از خود نور فلئورسنت ساطع می‌کند. بار منفی موجود در غشای باکتریایی می‌تواند با پیوند بین نانو ذرات طلا و پلیمر جایگزین شود و سبب تشدید ساطع شدن نورهای فلئورسنت گردد (فیلیپس و همکاران، ۲۰۰۸).

در رابطه با شناسایی باکتری اشریشیاکلی سویه O157:H7 توسط روشهای مبتنی بر نانو ذرات مائو و همکاران (۲۰۰۶) از سنسورهای QCM DNA متصل به نانوذرات مغناطیسی به منظور افزایش قدرت سیگنال تولیدی در زمان اتصال با ژن *eaeA* باکتری اشریشیاکلی استفاده کردند. حد تشخیص توسط روش آنها $10^2 \times 2/67$ CFU/mL گزارش شد.

ژائو و همکاران (۲۰۰۴) برای تشخیص اشیریشیا کلی سویه، O157:H 7 سالمونلا تایفی موریوم و باسیلوس سرئوس از آنتی‌بادی متصل با رنگ‌های تثبیت شده بر روی نانو ذرات سیلیس استفاده کردند. به این صورت که باکتری‌ها در حضور این نانو ذرات گرمخانه گذاری شده، در ادامه نانو ذراتی که اتصال برقرار نکرده‌اند توسط سانتریفوژ حذف شدند. در نهایت شناسایی باکتری‌ها توسط روش شمارش صفحه‌ای صورت گرفت. این روش فقط ۲۰ دقیقه زمان برد و به علاوه توانایی تشخیص ۴۰۰-۱ سلول باکتری اشیریشیا کلی سویه O157:H 7 در نمونه‌های گوشت گاو را داراست.

در مطالعه‌ای مشابه از نانوذرات طلا متصل به پلیمر پلی پارا-فنیل اتیلن به منظور مثبت تشخیص دادن ۱۲ سویه مختلف باکتریایی در عرض چند دقیقه استفاده شد. با واکنش بین نانو ذرات-باکتری ترکیب فلئورسنت موجود در پلیمر، در اثر اتصال از خود نور فلئورسنت ساطع می‌کند. بار منفی موجود در غشای باکتریایی می‌تواند با پیوند بین نانو ذرات طلا و پلیمر جایگزین شود و سبب تشدید ساطع شدن نورهای فلورسنت گردد (فیلیپس و همکاران، ۲۰۰۸).

هانگ و همکاران (۲۰۱۰) نانو ذرات مغناطیسی دارای گروه عاملی آمین را ساخته‌اند که تمایل برقراری اتصال بالا با باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در مواد غذایی، آب و اوره را از خود نشان داده‌است. میل جذبی بالا در ۸ باکتری سارسینا لوتِه (*Sarcina luttea*)، آستافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، اشیریشیا کلی (*Escherichia coli*)، باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*)، باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)، سالمونلا (*Salmonella*)، سودوموناس وُلگاریس (*pseudomonas vulgaris*) و سودوموناس آئروجینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) مشاهده شد. دلیل این آفینیت

(ثابت تمایل) جذبی بالا برهمکنش الکترواستاتیک بین بار مثبت نانو ذرات مغناطیسی دارای گروه عاملی آمین در نتیجه بار مثبت گروه آمین و بار منفی بخش‌هایی از سطح این باکتری‌ها گزارش شد، مقدار این نانو ذرات pH بافر فسفات و تعادل یونی از عوامل موثر بر این اتصال‌ها ذکر شدند.

ویسوانتان و همکاران (۲۰۰۶) ایمونوسنسور الکتروشیمیایی توسط اتصال آنتی بادی مونوکلونال آنتی- کلرا توکسین-واحد B با پلی ۳ و ۴ اتیلن دی اکسی تیوفن که بر روی الکتروود کربن شیشه‌ای تثبیت شده بود را به منظور شناسایی کلرا توکسین طراحی کردند. شناسایی توکسین بر اساس نوع برقرای اتصال از نوع ساندویچی بود که شامل اتصال آنتی بادی آنتی-کلراتوکسین با لیپوزوم دارای گروه عاملی گانگلوئید صورت می‌گرفت، شناسایی بر اساس جذب فروسیانات پتاسیم آزاد شده لیپوزوم‌ها توسط الکتروود ساخته شده انجام گرفت که با سنجش اختلاف پتانسیل ایجاد شده توسط الکتروود در اثر اتصال صورت می‌پذیرد. حد تشخیص کلرا توکسین توسط این روش 10^{-16} g/mL محاسبه شد.

در مطالعه دیگر از نانوذرات طلا که در دو طرف گانگلوئید حاوی لیپید متصل شده بود، به منظور شناسایی کلرا توکسین بکار رفت. این روش با حد تشخیص 10^{-10} pM، حدود 100 برابر حساسیت بالاتر از روش‌های ایمنی سنجی فلئورسنت معمولی با حد تشخیص 5 nM دارد (ماینکی و همکاران، ۱۹۹۹).

به منظور شناسایی انتروتوکسین استافیلوکوکی یانگ و همکاران (۲۰۰۹) ایمونوسنسورهای نوری بکار بردند. به این صورت که آنتی-آنتی بادی اولیه انتروتوکسین استافیلوکوکی و آنتی بادی ثانویه نشان‌دار شده انتروتوکسین استافیلوکوکی که به آنزیم پراکسیداز ترب کوهی متصل شده بود را بر روی نانو لوله‌های کربن تثبیت کردند. در نهایت با استفاده از سنجش فلئورسنس

ایجاد شده حاصل از فعالیت پراکسیداز ترب کوهی، شناسایی را انجام دادند. در این ایمنوسنسور، حالت ساندویچی به منظور تقویت سیگنال ایجاد شده به کار گرفته شد، که حدود ۶ تا ۸ برابر سیگنال قویتر نسبت به روش‌های معمول ایمنولوژیکی ایجاد می‌کنند. حد تشخیص انتروتوکسین استافیلوکوکی توسط این روش $1/10^4 \text{ ng/mL}$ تعیین شد. البته باید یادآور شد کاربرد این روش در نمونه‌های واقعی مواد غذایی مانند شیر سویا، آب سیب، گوشت و غذای کودک، نیازمند مراحل اضافی خالص‌سازی می‌باشد.

در مطالعه‌ای دیگر از نانو ذرات طلا که آنتی با دی آنتی-انتروتوکسین استافیلوکوکوی بر سطح آنها قرار گرفته بود استفاده شد. حساسیت این روش هم $1/10^4 \text{ ng/mL}$ گزارش شد. حساسیت روشهای مذکور نسبت به روش الیزا ۱۰ برابر بیشتر است (یانگ و همکاران، ۲۰۰۹).

چیین و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند شیگاتوکسین و توکسین مشابه شیگاتوکسین که توسط اشیریشیاکلی مخصوصا سویه غذازاد O157:H7 تولید می‌شود، این توکسین‌ها دارای زیر واحد B هستند که به طور خاص گلوبوتریوز مربوط به آنتی ژن‌های گروه‌های خونی که از تری ساکارید متشکل از دو واحد گالاکتوز و یک واحد گلوکز است را شناسایی می‌کند. هر زیر واحد B دارای ۳ جایگاه اتصال به این واحدهای قندی است. با استفاده از این اطلاعات محققان ذکر شده آزمون رقابت رزونانس پلاسمون سطحی را به منظور شناسایی توکسین مشابه شیگاتوکسین طراحی کردند. برای این منظور از نانو ذرات قندی به منظور اتصال، گلوبوتریوز به نانو ذرات طلا با اندازه‌های متفاوت ۴، ۱۳ و ۲۰ نانومتر استفاده شد. نتایج نشان داد که نانوذرات با اندازه بزرگتر دارای آفینیتة (ثابت تمایل) بیشتر به منظور اتصال بخش گلوبوتریوز بود که نتیجه آن اتصال بهتر به توکسین مشابه شیگاتوکسین شد، نتیجه پژوهش آن شد که بهترین

شناسایی توسط نانو ذرات با اندازه بزرگتر متصل به گلوبوتریوز حاصل شد که از حساسیت بالاتری به منظور تشخیص توکسین برخوردار بود

ناگی و همکاران (۲۰۰۸) سنسور رنگی بر پایه گلوبوتریوز تثبیت شده بر روی نانو ذرات گلیکوپلیدی استیلن طراحی کردند که در حضور توکسین در عرض ۵ دقیقه از بنفش به رنگ قهوه‌ای تغییر رنگ می‌داد و در صورت عدم وجود توکسین بنفش باقی می‌ماند. این روش از حساسیت و انتخابی بودن بسیار بالا و سرعت تشخیص مناسب برخوردار است. محدودیت شناسایی توسط این روش $1200 \text{ U}/\mu\text{L}$ گزارش شد.

در پژوهشی که توسط پان و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد از سنسور زیستی طلا/گرافن در تشخیص بیسفنول A استفاده گردید. نتایج حاکی از حساسیت و پایداری بالای زیست حسگر ساخته شده است.

در مطالعه و صورت گرفته توسط وانگ و همکاران (۲۰۱۱)، نانوکلاسترهای طلا بر روی صفحات گرافن اکساید کاهش یافته شده قرار گرفتند، زیست حسگر ساخته شده علاوه بر خاصیت تشخیصی به دلیل بارگذاری داروی دوکسوروبیسین هیدروکلراید دارای خاصیت درمانی علیه سلول‌های کبدی نیز بود.

در مطالعه دیگری توسط ماجی و همکاران (۲۰۱۴) نانو ذرات طلا بر روی سیلیکای متخلخل و گرافن کنژوگه شد و از آن در کاربردهای الکترولیتیکی و تشخیص سرطان استفاده شده است. بررسی‌ها نشان داد زیست حسگر ساخته شده توانایی بالایی در تشخیص مقادیر کم و با حساسیت بالایی از هیدروژن پراکساید را دارد.

ورکی و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی اندازه‌گیری آفلاتوکسین B1 در نمونه‌های آبی با بیوسنسور الکتروشیمیایی و اندازه‌گیری ترکیبات آلی در محصولات آرایشی و بهداشتی با ریز استخراج فاز جامد - کروماتوگرافی گازی بیان داشتند در سنسور اول که با مدل ساندویچی طراحی شد، از نانو ذرات Fe_3O_4 با لایه‌ای از طلا که با کتکول نشان دار شده استفاده شد. محدوده خطی غلظت $0.6-110 \text{ ng mL}$ و حد تشخیص 0.2 ng mL در این سنسور به دست آمد. سنسور دوم با نشانیدن کتکول که گونه الکترو فعال است بر روی سطح الکتروود و با استفاده از نانو ذرات طلا سنسور غیر آنزیمی جدیدی طراحی شد، محدوده خطی غلظت $0.9-120 \text{ ng mL}$ و حد تشخیص 0.3 ng mL نیز برای این سنسور به دست آمد. ایشان گزارش کردند هر دو سنسور دقت و حساسیت مناسبی برای شناسایی آفلاتوکسین B1 در مقادیر بسیار ناچیز دارند.

مرادی و همکاران (۱۳۹۴) در بررسی طراحی و ساخت بیوسنسور آفلاتوکسین مبتنی بر تثبیت آنزیم استیل کولین استراز روی الکتروود کربن بیان نمودند که آفلاتوکسین‌ها سمومی هستند که روی مواد غذایی وجود دارند و به علت امکان رشد آنها در بسیاری از محصولات غذایی و خاصیت سمی و سرطان زا بودن، به عنوان سردسته‌ی مایکوتوکسین‌ها شناخته شده‌اند. آژانس بین المللی تحقیقات روی سرطان IARC ترکیبات آفلاتوکسین را سرطانزا اعلام کرده است، از مهار آنزیم استیل کولین استراز با آفلاتوکسین B1 می‌توان برای طراحی و ساخت یک بیوپروب استفاده کرده و آن را برای ساخت یک بیوسنسور برای شناسایی آفلاتوکسین تعمیم داد. این محققان در پژوهش خود بیوپروبی مبتنی بر تثبیت آنزیم استیل کولین استراز روی الکتروود اصلاح شده با نانولوله کربنی طراحی کردند، بدین ترتیب که نانو لوله کربنی روی الکتروود قلمی لایه نشانی و سپس آنزیم روی الکتروود قلمی کربن به صورت کووالانسی تثبیت گردید.

بررسی نتیجه حاصل از انتخاب الکتروودکربن نشان می‌دهد که الکتروود کربن سینیتیک انتقال الکترون مناسب و محدوده پتانسیل بالایی را فراهم می‌کند، که برای ساخت یک زیست حسگر کوچک مناسب می‌باشد و همچنین در میان نانو مواد گوناگون، نانولوله کربنی، هدایت الکتریکی، پایداری خوب و سطح وسیعی را برای تثبیت آنزیم فراهم کرده و نانولوله کربنی فعال شده، از طریق گروه کربوکسیل خود با آنزیم پیوند کووالانسی برقرار می‌کند. تثبیت آنزیم استیل کولین استراز بر روی الکتروود اصلاح شده با نانولوله کربنی چند دیواره و سنجش فعالیت آن با روش ولتامتری چرخه‌ای به دلیل ایجاد جریان نسبتاً زیاد، ایجاد یک پاسخ سریع و قابل تشخیص، پایداری در دمای بالا، حد تشخیص در میزان نانومولار، زمان انکوباسیون مطلوب، هزینه کم و کاربرد در مقیاس صنعتی میکرو (در صورت استفاده از الکتروود قلمی) به منظور ساخت بیوپروب جهت استفاده در بیوسنسور ماده آفلاتوکسین B1 روشی بسیار مناسب است.

جعفری و همکاران (۱۳۹۴) در پژوهشی به طراحی بیوسنسور آپتامتری جهت تعیین مقدار آفلاتوکسین B1 پرداختند. نتایج تحقیق این پژوهشگران نشان داد در حضور آفلاتوکسین آپتامتر اختصاصی آفلاتوکسین B1 به آن متصل شده و در نتیجه توالی بلوک کننده که مکمل ا قسمتی از توالی آپتامتری می‌باشد، قادر به جفت شدن با آپتامر نخواهد بود، در نتیجه قسمت آنزیمی آپتامتر ساختار فضایی لازم جهت فعالیت آنزیمی را تشکیل داده و سوبسترا تحت تاثیر فعالیت پراکسیدازی آن، تبدیل به محصول آبی رنگی می‌شود که جذب نوری متناسب با غلظت آفلاتوکسین دارد، استفاده از بیوسنسور آپتامتری در تعیین مقدار آفلاتوکسین B1 به عنوان یک روش غربالگری می‌تواند امکان کنترل روتین این سموم را در مقیاس وسیع فراهم نماید.

مسینی (۲۰۰۱) گروهی از آفت کش‌های مختلف، شامل آتارازین، پاراکوات، گلو فوزینات آمونیم، ۴، ۲- دی چیدروفنوکسی استات (2,4- D) و سایر آلاینده ها نظیر آفلاتوکسین B1، هیدرازین و بی فنیل‌های پلی کلرینه را با استفاده از حسگرهای زیستی الکتروشیمیایی مبتنی بر دی.ان.ای مورد آزمون و اندازه گیری قرار داد. این محققان بیان کردند در مورد سموم نظیر

B1 کارکرد این حسگرها بسیار دقیق بود و می‌توان از این حسگرها برای تشخیص سریع و دقیق آفلاتوکسین B1 استفاده کرد و در ترکیبات غذایی مختلف آن را به کار برد.

در تحقیقی به بررسی طراحی بیوسنسور ویژه برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین B1 متصل به آلبومین در سرم رات به روش Direct SPR Immunoassay و مقایسه آن با روش مرجع پرداخته شد (فرجی و همکاران، ۱۳۸۹)، نتایج این تحقیق نشان داد، پس از جداسازی آلبومین از نمونه سرم رات‌ها، با روش الکتروفورز، نشان داده شد آلبومین جدا شده کاملاً خالص می‌باشد، کمترین حد شناسایی برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین متصل به آلبومین به روش Direct SPR Immunoassay ۲۰ درصد و حساسیت ۹۲ درصد تعیین شد. کمترین حد شناسایی برای اندازه‌گیری این شاخص به روش Direct SPR Immunoassay ۳۰ درصد و حساسیت ۱۰۰ درصد و حساسیت آن نیز ۱۰۰ درصد محاسبه شد، همچنین همبستگی خوبی بین نتایج حاصل از دو روش مشاهده گردید، در نهایت این محققان نتیجه گرفتند روش Direct SPR Immunoassay به عنوان یک روش سریع، ساده، بدون نیاز به نشانگذاری، با حساسیت و اختصاصیت بسیار خوب، قابلیت تکرار پذیری و همچنین امکان استفاده مکرر از یک تراشه و حداقل حجم نمونه برای آنالیز، می‌تواند برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین متصل به آلبومین شاخص مهم میزان قرار گرفتن در معرض آفلاتوکسین مورد استفاده قرار گیرد.

ثابت و همکاران (۲۰۱۷) در تحقیقی به بررسی کارایی بیوسنسور مبتنی بر FRET (انتقال انرژی رزونانس فلورسانس) برای تشخیص انتخابی آفلاتوکسین B1 در بادام زمینی و برنج پرداختند، این محققان بیان کردند نقاط کوانتومی متصل به آپتامر (QD) به دلیل برهم کنش آپتامرها با نانوذرات طلا که منجر به اثر خاموش شدن در فلورسانس QD می‌شوند و به نانوذرات طلا (AuNPs) جذب می‌شوند. با افزودن AFB1 (آفلاتوکسین B1) آپتامرهای خاص جذب AFB1 می‌شوند واز نانوذرات طلا (AuNPs) که منجر به بازیابی فلورسانس می‌شود فاصله می‌

گیرند. در شرایط بهینه سازی شده، حد تشخیص نانوبیوسنسور پیشنهادی ۳.۴ نانومتر با دامنه خطی ۱۰-۴۰۰ نانومتر بود. ایشان در نهایت بیان کردند حسگر نانوبیوسنسور می تواند ابزاری امیدوار کننده برای ارزیابی خاص مواد غذایی باشد. این روش با موفقیت برای تجزیه و تحلیل AFB1 در نمونه های برنج و بادام زمینی استفاده شد.

بهارداج و همکاران (۲۰۲۰) در تحقیقی با استفاده از نانو ذرات طلا اقدام به ساخت بیوسنسور بسیار حساس به آفلاتوکسین B1 کردند، این پژوهشگران بیان کردند استفاده از نانو ذرات طلا می تواند تا حد بسیار زیادی حساسیت بیوسنسور را افزایش دهد به خصوص زمانی که سطح تراشه چند لایه باشد.

وو و همکاران (۲۰۱۹) در پژوهشی روی بیوسنسور رنگ سنجی به منظور تشخیص آفلاتوکسین B1 با چشم غیر مصلح بیان کردند، با ادغام پروب رشته DNA و تقویت سیگنال با اگزونوکلئاز (Exo III) می توان بیوسنسور رنگ سنجی برای تشخیص آفلاتوکسین B1 ساخت. این پژوهشگران بیان کردند با اکسیداسیون ۳،۳ ؛ ۵،۵ تترا متیل بنزیدین (TMB) توسط پراکسید هیدروژن (آب اکسیژنه) یک پاسخ رنگ سنجی می توان دریافت کرد که می تواند مقادیر بسیار کم آفلاتوکسین B1 را تشخیص داده و با چشم غیر مصلح وجود آفلاتوکسین B1 را تایید کرد.

مو و همکاران (۲۰۱۸) در تحقیقی به ارزیابی بیوسنسور آفلاتوکسین B1 جدید مبتنی بر غشای آلومینای آنودایز متخلخل اصلاح شده با اکسید گرافن و آپتامر آفلاتوکسین B1 پرداختند، این پژوهشگران گزارش کردند بیوسنسور آفلاتوکسین B1 جدید از غشای آلومینای آنودایز متخلخل اصلاح شده با اکسید گرافن و آپتامر آفلاتوکسین B1 ساخته شده است. به طور خلاصه، این محققان بیان کردند آپتامر با اتصال کووالانسی بر روی سطح نانو کانال های آلومینای آنودایز متخلخل بی حرکت می شود. سپس اکسید گرافن با انباشته شدن $\pi-\pi$ با آپتامر به سطح آن اضافه می شود. بار منفی نانو کانال ها با ورود اکسید گرافن با بار منفی و

آپتامر افزایش می یابد که باعث ایجاد مانع فضایی (سه بعدی) نیز می شود. با افزودن آفلاتوکسین B1، به دلیل اتصال خاص آفلاتوکسین B1 به آپتامر، اکسید گرافن از سطح نانو کانال ها جدا می شود. شار آهن Fe(CN)_6^{3-} از طریق کانال های نانو افزایش می یابد زیرا تراکم بار و مانع فضایی (سه بعدی) کاهش می یابد و در نتیجه پاسخ جریان بیشتری می یابد. افزایش جریان متناسب با غلظت آفلاتوکسین B1 است.

اوداگ و همکاران (۲۰۱۶) در پژوهشی به ساخت بیوسنسور آفلاتوکسین B1 در محیط آزمایشگاه پرداختند. ساخت بیوسنسور تشخیص آفلاتوکسین توسط یک روش سنجش ایمنی رقابتی حاصل شد که با استفاده از بیوچیپ (biochips) جدید و دستگاه بیوسنسور الکتروشیمیایی MiSens خودکار انجام شد. در نهایت بیوسنسور ساخته شده با نتایج با روش HPLC مقایسه شد. حسگر زیستی جدید امکان تشخیص آفلاتوکسین B1 در زمان بسیار کم و خطای حداقلی را داشت، از این رو این محققان بیان کردند این بیوسنسور انتظار می رود تأثیر اقتصادی زیادی برای صنایع غذایی داشته باشد.

ژو و همکاران (۲۰۲۰) در تحقیقی به ساخت بیوسنسور رنگ سنج برای تشخیص همزمان اوکراتوکسین A و آفلاتوکسین B1 در محصولات کشاورزی پرداختند. ایشان بیان کردند حسگرهای زیستی رنگی به طور گسترده ای برای آزمایش مایکوتوکسین ها استفاده شده است. با این حال، روش رنگ سنجی که قبلاً گزارش شده بود، از یک رنگ برای تشخیص یک مایکوتوکسین استفاده می کند و گزارشات کمی در مورد تشخیص همزمان چندین مایکوتوکسین وجود دارد. در این پژوهش یک حسگر زیستی رنگی برای تشخیص مایکوتوکسین های دوتایی ساخته شده است. در این تحقیق یک پلت فرم مبتنی بر Fe_3O_4 / GO برای تشخیص آفلاتوکسین B1 (AFB_1) و یک پلت فرم مبتنی بر Fe_3O_4 @ Au برای تشخیص اوکراتوکسین A (OTA) ساخته شد. ایشان گزارش کردند دو روش سنجش با یکدیگر تداخل ندارند اما می توانند بازدهی بالاتری برای تشخیص داشته باشند. دامنه تشخیص

آفلاتوکسین B1 بین ۵-۲۵۰ نانو گرم در میلی لیتر بود و برای تشخیص اوکراتوکسین A ۵/۰ - ۸۰ نانو گرم در میلی لیتر بود. این حسگر زیستی با موفقیت در شناسایی نمونه واقعی که کاربرد گسترده ای در زمینه های ایمنی غذا دارد، استفاده شد.

دiaz نیتو و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیقی به تولید حسگر زیستی نسل سوم برای تعیین مایکروسوم استریگماتوسیستین: سیستم هشدار سریع برای تشخیص آفلاتوکسین B1 پرداختند. بیوسنسور آنزیمی نسل سوم برای تعیین کمیت استریگماتوسیستین (STEH) ساخته شد. این بیو سنسور بر اساس یک الکتروود کربنی شیشه ای اصلاح شده با کامپوزیتی از آنزیم پراکسیداز سویا (SPE) و اکسید گرافن شیمیایی بود. بیوسنسور ساخته شده دارای حساسیت ۰/۱ مول در لیتر بود. این محققان بیان کردند غلظت STEH تعیین شده با استفاده از حسگر زیستی با آنچه توسط HPLC تعیین شده مطابقت بسیار خوبی داشت.

استپورسکا و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی به ساخت بیوسنسور آنزیمی پتانسیومتری برای تشخیص آفلاتوکسین B1 پرداختند. ایشان از عملکرد یک حسگر بیولوژیکی پتانسیومتری بر اساس مهار استیل کولین استراز برگشت پذیر برای تعیین آفلاتوکسین B1 استفاده کردند، بر اساس گزارش آنها بیوسنسور ساخته شده دارای دقت بالا برای تشخیص آفلاتوکسین B1 بود. پاک علی و همکاران (۲۰۱۸) در تحقیقی به تعیین همزمان آفلاتوکسین B1، فومونیسین B1 و دیوکسی زینوالنول در نمونه های آبجو با بیوسنسور یکپارچه پرداختند. ایشان به منظور ساخت این بیو سنسور از ده تداخل سنج به صورت یک پارچه استفاده کردند. بر اساس نتایج ایشان بیوسنسور طراحی شده با دقت بسیار بالا سه مایکوتوکسین، آفلاتوکسین B1 (AFB1)، فومونیسین B1 (FB1) و داکی نیوالنول (DON)، در نمونه های آبجو را سریع و همزمان تعیین کند.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳- ۱ نوع مطالعه

این یک مطالعه تجربی است

۳- ۲ مواد مورد استفاده در این پژوهش

۳-۲-۱ توالی الیگونوکلئوتیدی مورد استفاده

در این مطالعه از توالی الیگونوکلئوتیدی بدون گروه آمین به عنوان اپتامر استفاده شد. که توسط شرکت فزایژه از کشور کانادا خریداری شد.

نام شرکت	توالی الیگو نوکلئوتیدی	نام توالی
فزایژه	5'-GTT GGG CAC GTG TTG TCT CTC TGT GTC TCG TGC CCT TCG CTA GGC CCA CA-3'	آپتامر

۳-۲-۲ مواد شیمیایی مورد استفاده

مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه شامل

نام شرکت / کشور	فرمول شیمیایی	نام ماده
سیگما	$K_3Fe(CN)_6$	فری سیانید پتاسیم
سیگما	Na_2HPO_4	دی سدیم هیدروژن مونو فسفات
سیگما	$KH_2(PO_4)$	مونوپتاسیم فسفات

۳-۳ دستگاه و تجهیزات

در این تحقیق اندازه گیری ولتاژمتری چرخه ای با استفاده از دستگاه Dropsens ساخت کشور اسپانیا انجام شد که توسط رایانه همراه با استفاده از نرم افزار DropView 8400 کنترل می شود.

- میکروسکوپ الکترونی FE-SEM

۳-۴ مراحل اجرایی طراحی بیوسنسور الکتروشیمیایی بر پایه نانو ذرات

طلا

۳-۴-۱- ساخت محلول بافر

برای تهیه محلول فسفات بافر ابتدا ۰/۱۴ گرم از مونوپتاسیم فسفات (۲) (۲) (۲) را با وزن ملکولی ۱۳۶/۰۸۶ گرم بر مول در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و سپس ۰/۱۴ گرم دی سدیم دی هیدروژن مونوفسفات (۲) (۲) (۲) با وزن ملکولی ۱۳۷/۹۹ گرم بر مول در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و محلول و سپس دو محلول فوق با هم ترکیب گردید.

۳-۴-۲- تهیه محلول فری سیانید پتاسیم

سپس ۰/۰۳ گرم از فری سیانید پتاسیم $(\text{Fe}(\text{CN})_6)_3$ را با وزن ملکولی ۳۲۹.۲۴ گرم بر مول در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و سپس محلول فوق را با محلولی که ترکیبی از مونوفسفات پتاسیم و دی سدیم دی هیدروژن مونوفسفات می باشد ترکیب کرده و محلول ۰/۱ مولار فری سیانید پتاسیم را تهیه می کنیم.

۳-۴-۳- تهیه محلول طلا

در این مرحله ۱۰۰ میکرولیتر از محلول طلای ۱۰۰۰ PPm در ۵ میلی لیتر آب دیوینزه رقیق کردیم.

۳-۴-۴- بررسی الکتروود کربنی

در ابتدا الکتروود خام را در محلول $K_3Fe(CN)_6$ قرار داده و از آن -0.4 تا $+0.7$ CV گرفتیم سپس با آب شستشو داده شد. ولتامتری چرخه ای ۱۰ مرتبه صورت گرفت.

۳-۴-۵- اصلاح الکتروود کربنی توسط نانوذرات طلا

الکتروود را در محلول طلا قرار داده و الکتروودپوزیت گرفته شد در -0.4 به مدت سی ثانیه. سپس با آب شستشو داده شد سپس جهت حصول اطمینان از اینکه نانوذرات طلا بر روی الکتروود کربنی نشسته باشد دوباره الکتروود را در محلول $K_3Fe(CN)_6$ قرار داده و از آن دوباره -0.4 تا $+0.7$ CV (سیکل ولتامتری) گرفته شد.

۳-۵- بهینه کردن زمان نشان دادن طلا بر روی الکتروود

در این مرحله سه الکتروود کربن خام را بعد از اینکه در محلول فری سیانید پتاسیم قرار دادیم و سیکل ولتامتری آن را گرفتیم الکتروودها را در سه زمان متفاوت داخل محلول طلا قرار می دهیم. زمان های ۳۰ ثانیه و ۶۰ ثانیه و ۱۲۰ ثانیه در نظر گرفته شد که با توجه عکس های گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی مجهز به ایدکس زمان ۳۰ ثانیه زمان بهینه انتخاب شد. در زمان ۳۰ ثانیه جریان افزایش بیشتری را نسبت به ۶۰ ثانیه و ۱۲۰ ثانیه نشان داد که اندازه ذرات در ۳۰ ثانیه حدود کمتر از یک میکرون بود.

۳-۶ نشاندن آیتامر برروی الکترو

۳-۶-۱ -تهیه استوک آیتامر

در این مرحله ایتامری با غلظت ۱۰۰۰ پیکومول بر میکرولیتر تهیه گردید.

۳-۶-۲ -ساخت غلظت های مختلف آیتامر و به دست آوردن غلظت

بهینه آن

درابتدا ۱۰ میکرولیتر از استوک اولیه برداشته و غلظتهای ذیل برحسب مولار تهیه شد.

$$(10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}, 10^{-13})$$

۳-۶-۳ -به دست آوردن غلظت بهینه آیتامر

دراین مرحله ۱۰ میکرولیتر (یک قطره) غلظتهای مختلف آیتامرا برروی الکترو های اصلاح شده قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت الکترو حاوی آیتامر در داخل یخچال قرار داده سپس بعد از طی شدن این زمان الکتروها در محلول بافر حاوی فری سیانید پتاسیم قرار داده و رفتار الکتروشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت و غلظت بهینه آن را به دست آمد .

۳ - ۷ تهیه محلول آفلاتوکسین^[۱]

در این مرحله غلظت های مختلف افلاتوکسین^[۱] را که شامل (۱،۲،۴،۶،۸،۱۰،۱۲) برحسب نانو مولار تهیه گردید.

۳-۷-۱- تشخیص افلاتوکسین B1 توسط زیست حسگرالکتروشیمیایی

اصلاح شده توسط نانوذرات طلا

غلظت‌های مختلف AFB1 بر روی الکتروود ریخته شد و به مدت دوساعت دردمای محیط قرار داده شد تا خشک شود و سپس آن را در محلول فسفات بافر حاوی فری سیانید پتاسیم قرارداده شد و رفتار الکتروشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۸ تعیین تکرارپذیری بیوسنسور

در این مطالعه جهت بررسی تکرارپذیری از دو روش استفاده کردیم. در مرحله اول سه تا الکتروود مستقل طراحی کردیم و ۱۰ میکرولیتر آپتامر بر روی الکتروود های اصلاح شده با نانوذرات طلا ریخته و سپس رفتار الکتروشیمیایی آنها را بررسی کردیم. در روش دوم یک الکتروود طراحی شد و رفتار الکتروشیمیایی آن برای سه بار متوالی مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۹ بررسی انتخاب پذیری بیوسنسور

برای بررسی انتخاب پذیری بیو سنسور دو الکتروود را با نانوذرات طلا اصلاح کردیم سپس به اندازه ۱۰ میکرولیتر از سموم AFB2/AFM1/ به روی الکتروودها ریخته و پس از دو ساعت رفتار الکتروشیمیای الکتروودها مورد بررسی قرار گرفت .

فصل چہارم

نتائج

۴-۱ نتایج بررسی الکتروشیمیایی

۴-۱-۱- بررسی الکتروشیمیایی الکتروود خام

در این مرحله رفتار الکتروشیمیایی الکتروودهای کربن خام مورد بررسی قرار گرفت، در این بررسی الکتروود کربنی داخل محلول فری سیانید پتاسیم قرار گرفت و در بازه پتانسیل ۰/۴- تا ۰/۷ CV آن ثبت شد. با استفاده از سیکل ولتامتری رفتار الکتروود بررسی شد. همانطور که در شکل ۴-۱ مشاهده می شود مقدار آن پایین تر از زمانی است که الکتروود حاوی نانوذرات طلا می باشد (برای الکتروود خام ۱۱/۱۱ و برای الکتروود حاوی طلا ۷۲/۲۴).

۴-۱-۲- بررسی الکتروشیمیایی الکتروودهای حاوی نانوذرات طلا

الکتروودهای حاوی نانوذرات طلا را در محلول فری سیانید پتاسیم قرار داده و (CV) سیکل ولتامتری آن در باز ۰/۴- تا ۰/۷ CV آن گرفته شد. همانطور که در شکل ۴-۱ مشاهده می شود سیکل ولتامتری آن بالاتر از الکتروود خام می باشد که این امر به دلیل خاصیت رسانایی نانوذرات طلا می باشد. نانوذرات طلا دارای ویژگی های فیزیکی و شیمیایی مشخصی هستند که از اندازه آنها ناشی می شود که به دلیل سطح وسیع و انرژی سطحی بالای آنها می باشد (کایتانیس و همکاران، ۲۰۱۰).

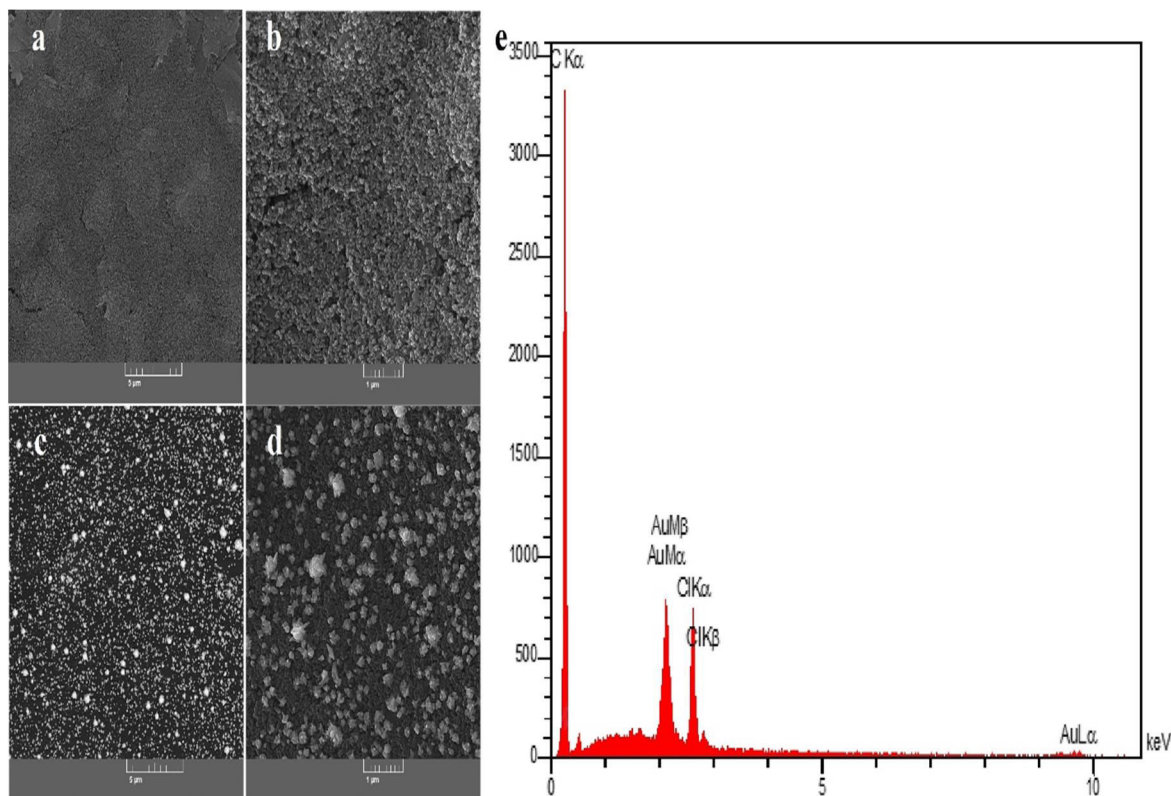
۴-۱-۳- بررسی قرار گرفتن نانوذرات طلا بر روی الکتروود توسط میکروسکوپ

الکترونی رویش مجهز به ایدکس

در این مرحله بعد از اینکه سیکل ولتامتری از الکتروودهایی که حاوی نانوذرات طلا هستند گرفته شد برای بررسی سطح الکتروود و دست یافتن به اندازه نانوذرات و اینکه نانوذراتی که بر روی سطح الکتروود قرار گرفته اند دارای چه اندازه و قطر می باشند توسط میکروسکوپ الکترونی مجهز به ایدکس تصویر آنها گرفته شد (شکل ۴-۱). نمونه های مورد مطالعه در

دستگاه باید ابعاد مشخصی داشته باشند. مهم ترین مراحل آماده سازی، تمیز کردن، ثابت کردن، برقراری اتصال الکتریکی و اچ (اچ کردن به خوردگی سطح نمونه آماده سازی شده به وسیله یک مایع خورنده که معمولاً نوعی اسید است گفته می شود. هدف از اچ کردن ظاهر کردن وقابل رویت ساختن ریزساختارها و فازهای مختلف ساختار نمونه می باشد.) کردن است. برقراری اتصال الکتریکی برای نمونه های نارسا با ایجاد یک لایه پوشش نازک رسانا بر روی آنها حاصل می شود. امروزه SEM با مزایای بسیاری که دارد به یکی از مهمترین و رایج ترین دستگاه های شناسایی مواد و ترکیبات تبدیل شده است.

برای کار با میکروسکوپ الکترونی به محیط خلأ نیاز است. به این دلیل پس از قرار دادن نمونه در محفظه، اتمسفر داخل ستون میکروسکوپ به کمک پمپ های موجود به خلأ مناسب می رسد. هنگامی که خلأ مورد نیاز حاصل شد، پرتوی الکترونی تولید و توسط لنزهای الکترومغناطیسی باریک و وی نمونه متمرکز می شود. در حقیقت پرتوی الکترونی بر روی نمونه اسکن می شود (scan) تا از نقاط متخلخل آن اطلاعات به دست آید. در نتیجه ی برخورد پرتوی الکترونی با نمونه، سیگنال های مناسب تولید می شوند که توسط آشکارسازها دریافت و در نهایت به تصویر یا دیگر اطلاعات مورد نظر تبدیل می شوند.



شکل ۴-۱ تصویر FESEM. (a) و (b) الکتروود کربنی خام. (c) و (d) الکتروود اصلاح شده با نانوذرات طلا. همانطور که در شکل ۴-۱، (a) و (b) مشاهده می‌شود در تصویر a الکتروود خام کربنی می‌باشد که با مقیاس ۵ میکرو می‌باشد و تصویر b همان الکتروود می‌باشد با مقیاس ۱ میکرو می‌باشد، همان طور که ملاحظه می‌شود، با بزرگنمایی ۱ میکرو ذرات کربن به صورت کروی مشاهده می‌شوند. در تصویر پایین سمت چپ c الکتروود کربنی که نانو ذرات طلا بر روی آن قرار گرفته است با بزرگ ذرات طلا به شکل نمایی ۵ میکرو می‌باشد، همانطور مشاهده می‌شود نانو ذرات طلا که در تصویر به صورت ذرات کروی و به رنگ سفید می‌باشد. در شکل ۴-۱ (تصویر پایین سمت راست d) مقیاس ۱ میکرو ذرات طلا به صورت تجمعی دیده می‌شوند. در شکل ۴-۱ سمت راست عناصر قرار گرفته بر روی الکتروود قابل مشاهده می‌باشد. (e)

۴-۱-۴- بررسی الکتروشیمیایی مراحل ساخت بیوسنسور (نشاندن آپتامر به

روی الکتروود)

در این مرحله بعد از اینکه رفتار الکتروشیمیایی الکترودهای کربنی اصلاح شده بررسی شد ۱۰ میکرو لیتر ایتامر بر روی الکتروود ریخته شدو به مدت ۲۴ ساعت داخل یخچال نگهداری شد. CV آنها در بازه ۰/۴- تا ۰/۷ گرفته شد. پس از آن به مدت دو هفته داخل یخچال نگهداری شد، بعد از مدت زمان دو هفته افلاتوکسین بر روی آن آنها ریخته شد، همانطور که در شکل ۴-۴

۲ مشاهده می‌شود. در این تحقیق اپتامر ثابت نگه داشته شد و بر روی آن افلاتوکسین های M1 و B2 و افلاتوکسین هدف که همان B1 می‌باشد بررسی کردیم. که پاسخ ولتامتری به دو افلاتوکسین M1 و B2 اختلاف معناداری با پاسخ ولتامتری افلاتوکسین هدف داشت که این امر بیانگر اختصاصی بودن اپتامر فوق می‌باشد. در این رابطه باید بیان کرد به دلیل ساخت برون‌تنی و آزمایشگاهی اپتامرها، اپتامرها دارای انتخاب پذیری بالای می‌باشند که به صورت اختصاصی به لیگاندهای مختلفی مثل پروتئین‌ها، پپتیدها، آنزیم‌ها، گیرنده‌های سطح سلول، ریزجانداران و غیره متصل شوند و جایگزین مناسبی برای لایه زیست‌تشخیصی آنتی‌ژن/ آنتی‌بادی باشند (لینگ و همکاران، ۲۰۱۱).

از مهم‌ترین مزیت اپتامرها نسبت به آنتی‌ژن/ آنتی‌بادی می‌توان به راحت بودن روش‌های اصلاح‌سازی و تثبیت آن‌ها (سونگ و همکاران، ۲۰۰۸)، اختصاصی بودن اتصال آن‌ها (ژو و همکاران، ۲۰۱۲). پایداری به گرما (گارسیا و میسالییدیس، ۲۰۰۹)، حساسیت فوق‌العاده به کوچک‌ترین تغییر در مولکول هدف، مقاومت در برابر تغییرات pH و غلظت نمک‌ها (لینگ و همکاران، ۲۰۱۱)، اندازه بسیار کوچک، سنتز بسیار آسان و امکان ذخیره‌سازی و نگهداری طولانی مدت آنها (دهار و همکاران، ۲۰۰۸) اشاره کرد. ویژگی‌های بارز اپتامرها باعث شده است که آن‌ها در زمینه‌های مختلف درمانی، تشخیصی و ساخت بیوسنسورها کاربرد داشته باشند (هونگ و لی، ۲۰۱۲).

آپتاسنسورها، بیوسنسورهای مبتنی بر اپتامرها می‌باشند که می‌توان به وسیله آن‌ها به شناسایی و اندازه‌گیری مولکول‌های هدف در غلظت‌های نانومولار پرداخت (هاینیک و وانگ، ۲۰۰۹) تاکنون به طور عمده آپتاسنسورها در دو دسته الکتروشیمیایی و نوری معرفی شده‌اند (لی و همکاران، ۲۰۰۸؛ هونگ و لی، ۲۰۱۲)، در ساخت آپتاسنسور الکتروشیمیایی معمولاً از یک سطح الکتروود به عنوان سطح هادی جهت تثبیت اپتامر حساس بیولوژیکی استفاده می‌شود.

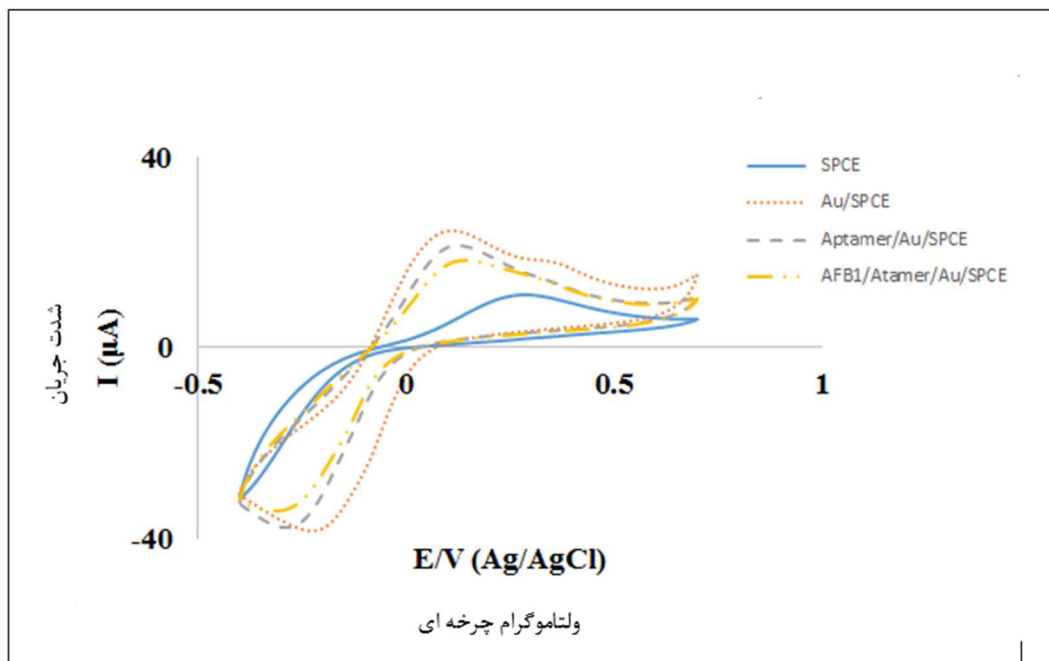
عملکرد آپتاسنسور الکتروشیمیایی برپایه تغییرات جریان الکتروشیمیایی می باشد که پس از برهم کنش مولکول هدف با آپتامر رخ می دهد (مرینهو و همکاران، ۲۰۱۶).

۴-۱-۵- تشخیص آفلاتوکسین

در این تحقیق از روش ولتامتری چرخه ای برای غلظتهای مختلف افلاتوکسین استفاده گردید. رفتار الکتروشیمیایی الکتروود در غلظتهای مختلف افلاتوکسین بررسی گردید. طبق بررسی های صورت گرفته مشاهده شد که با کاهش غلظت افلاتوکسین شدت پیک الکتروشیمیایی افزایش می یابد (شکل ۴-۵).

۴-۲ ولتامتری چرخه ای

از روش معمول ولتامترچرخه ای برای بررسی رفتار الکتروشیمیایی الکترودهای کربنی، SPCE درمحلول بافرفری سیانیدپتاسیم ۰/۱ مولار، Au/SPCE درمحلول ۰/۱ مولاربافرری سیانیدپتاسیم، SPCE Aptamer/Au/ درمحلول ۰/۱ مولاربافرری سیانیدپتاسیم، AFB1/Aptamer/au/SPCE درمحلول ۰/۱ مولار فری سیانید پتاسیم ورفتار الکتروشیمیایی استفاده شد. نتیجه نشان داد با استفاده از نانو ذرات طلا میزان جریان افزایش یافته و این امر نشان دهنده افزایش کارایی الکتروود می باشد.



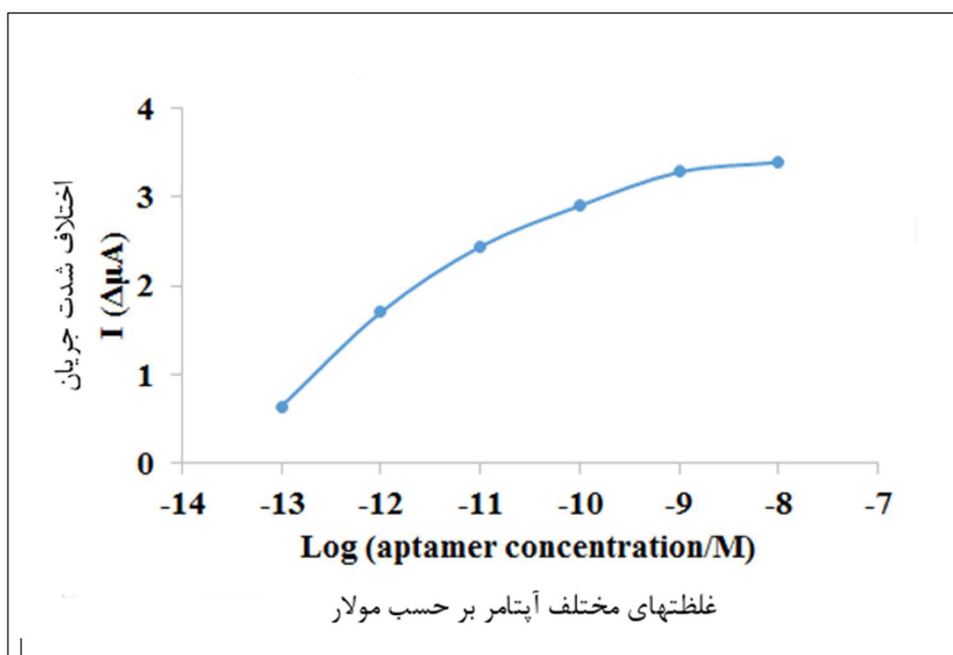
شکل ۴-۲- الکترودهای کربنی SPCE در محلول بافر فری سیانید پتاسیم ۰/۱ مولار، Au/SPCE در محلول ۰/۱ مولار بافر فری سیانید پتاسیم، Aptamer/Au/ SPCE در محلول ۰/۱ مولار فری سیانید پتاسیم، AFB1/Aptamer/au/SPCE در محلول ۰/۱ مولار فری سیانید پتاسیم.

۴-۳ منحنی کالیبراسیون غلظت‌های مختلف آپتامر

پاسخ بیوسنسور به غلظت‌های مختلف اپتامر مورد بررسی قرار گرفت که در شکل ۴-۳ مشاهده می‌شود. نتایج این شکل نشان دهنده آنست که اپتامتر به خوبی توانسته است در تشخیص افلاتوکسین مناسب عمل کند، زیرا با افزایش میزان اپتامتر میزان جریان نیز افزایش پیدا کرد. که این امر به دلیل تغییرات سازگاری آپتامر بی حرکت شده در هنگام تشکیل مجموعه آپتامر-آفلاتوکسین می باشد. تکنولوژی آپتامر به عنوان یک تکنولوژی معتبر و مؤثر گسترش یافته و مطالعات زیادی از کاربردهای آپتامرها انجام گرفته است و امروزه آپتامرها در جنبه‌های مختلف به عنوان یک ابزار تشخیصی و درمانی، در گسترش داروهای جدید و سیستم‌های تحویل دارو و غیره کار می‌روند (دولیناس، ۲۰۰۸). آپتامرها طی چرخه‌ای به نام SELEX به طور شیمیایی سنتز می‌شوند، در واقع این چرخه یک تکنیک قدرتمند در انتخاب آپتامر با

اختصاصیت بالا نسبت به هدف از میان کتابخانه‌ای از تعداد زیادی الیگونوکلئوتیدهای تصادفی می‌باشد. همانطور که نتایج این آزمایش نیز نشان داد اپتامر استفاده شده بسیار اختصاصی عمل کرد و توانست افلاتوکسین را به خوبی تشخیص دهد.

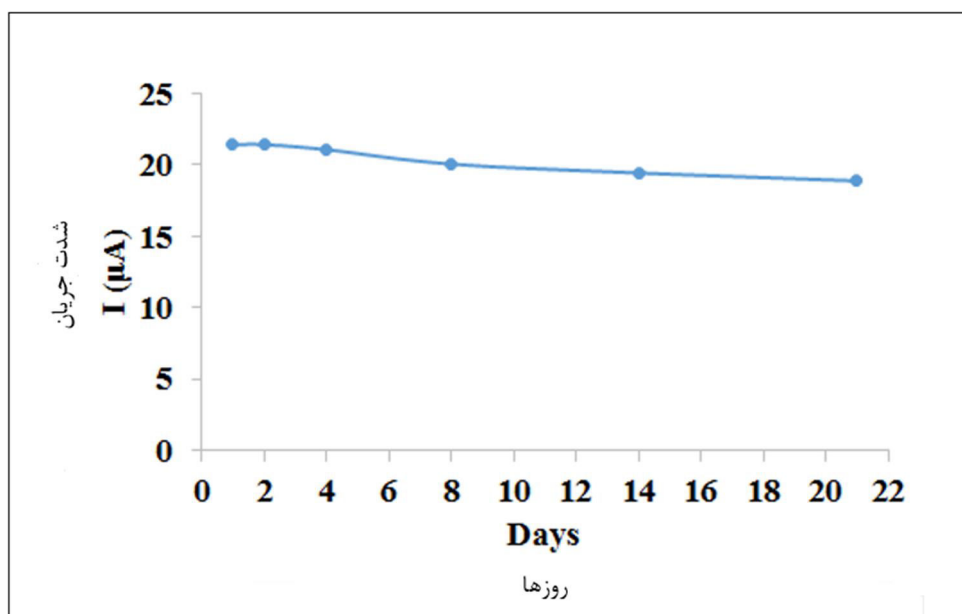
امروزه پژوهش‌های مبتنی بر کشت میکروبی و آزمایش های مولکولی (تکنولوژی های ایمونولوژیک یا اسید نوکلئیک) یکی از روش‌های رایج در تشخیص و شناسایی پاتوژن های میکروبی هستند این روش ها به دلیل شامل شدن تکنیک های مختلفی در فرآیند تهیه و تشخیص نمونه مانند استخراج نمونه، تصفیه، غنی سازی و جداسازی دارای پیچیدگی می باشد، که یکی از دلایل اصلی به دنبال روش جدید بودن می‌باشد، به همین دلیل در حال حاضر، روش تشخیص مبتنی بر اپتامر می‌تواند در سلامت عمومی و ایمنی مواد غذایی محدود شود. همچنین بیان شده است روش‌های معمول تشخیص و شناسایی مبتنی بر آزمایشگاه معمولاً زمان پردازش طولانی دارند، ممکن است حساسیت و ویژگی خاصی نداشته باشند و نیاز به تجهیزات تخصصی و کاربردهای آموزشی داشته باشند و در نتیجه هزینه زیادی در پی دارد. بنابراین یک تقاضای فوری برای آزمایش سریع تر، کارآمد و حساس وجود دارد که می‌تواند کل سموم را در حوزه و یا در حین مراقبت شناسایی کند و از پردازش چند مرحله ای جلوگیری کند، به ویژه برای تشخیص و درمان بالینی و همچنین تشخیص سریع سموم باکتری ها در مواد غذایی می‌تواند برای نتایج بالینی بسیار حیاتی باشد (احمد و همکاران، ۲۰۱۴).



۴-۳- مقادیر جریان الكترود كربنی اصلاح شده با نانوذرات طلا نسبت به غلظتهای مختلف آبتامر

۴-۴ پایداری الكترود اصلاح شده

به منظور بررسی پایداری بیوسنسور طراحی شده یک الكترود را طراحی کرده و این الكترود برای روزهای دوم و سوم تا روز بیست و دوم مورد بررسی قرار گرفت. الكترود طراحی شده نشان داد که دارای پایداری مناسب می باشد. همانطور که در شکل مشاهده می شود تقریباً خط صافی به دست آمده است که بیانگر آن است که آبتامر در طی ۲۲ روز محکم به نانوذرات طلا متصل بوده و این امر در واقع بیانگر این است آبتامر دارای پایداری خوبی است و دنا توره نشده است پایداری به دست آمده در این تحقیق ۰/۹۵ بود که پایداری مطلوبی به حساب می آید. میزان پایداری یک بیوسنسور به ماده بیولوژیکی آن بستگی دارد (دکتر هدایت ا...قورچیان). (۴-۴).

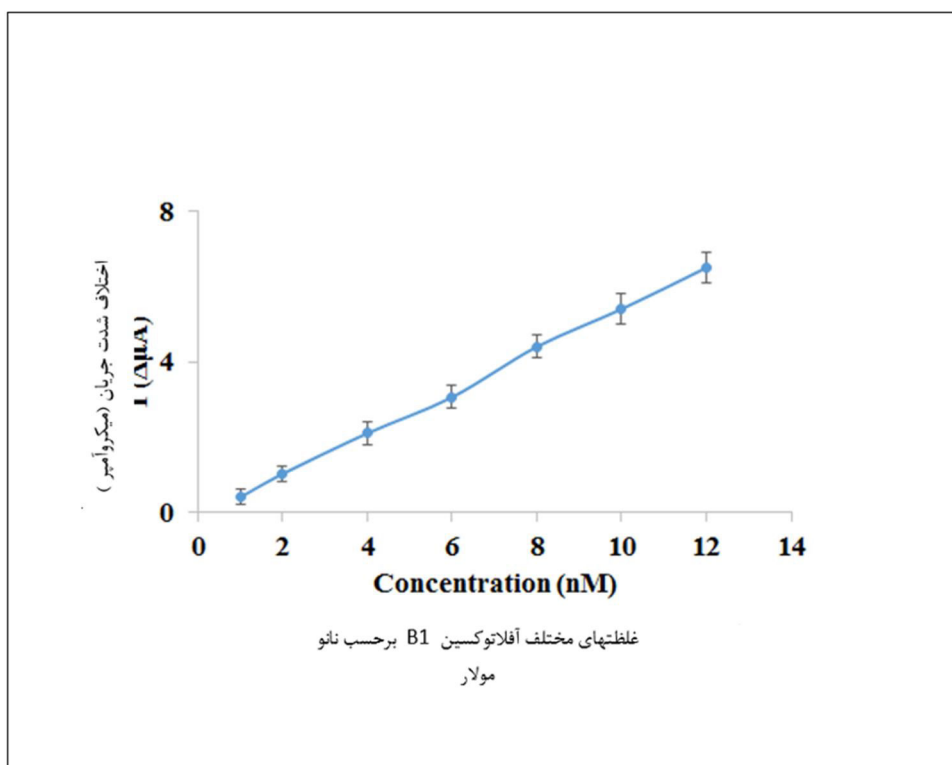


شکل ۴-۴- میزان پایداری الکتروود بعد از ۲۲ روز

۴-۵ منحنی کالیبراسیون غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین

پاسخ بیوسنسور نسبت به غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفت که در شکل ۴-۵ نشان داده شده است. نتایج این شکل نشان داد با کاهش غلظت آفلاتوکسین میزان جریان نیز افزایش پیدا می کند که این امر نشان از افزایش کارایی الکتروود با افزایش جریان می باشد معادله منحنی کالیبراسیون و خطی بودن آن تعیین گردید. معادله خط بصورت

$$y = 0.547x - 0.034 \quad R^2 = 0.995 \quad \text{به دست آمد. (شکل ۴-۵)}$$



شکل ۴-۵- مقادیر جریان الكترود كربنى اصلاح شده با نانوذرات طلا نسبت به غلظتهای مختلف آفلاتوکسین B1 (۱،۲،۴،۶،۸،۱۰،۱۲) نانومولار.

۶-۴ انتخاب پذیری بیوسنسور

انتخاب پذیری یک بیوسنسور عبارت است از توانایی بیوسنسور برای تشخیص دادن نمونه مورد نظرا از سایر نمونه های مشابه موجود در گروه مورد بررسی. بیوسنسور باید دارای انتخاب پذیری مناسبی باشد. بدین منظور سه الكترود را در شرایط کاملاً یکسان طراحی کردیم. به منظور بررسی انتخاب پذیری الكترود از سه نوع سم استفاده کردیم:

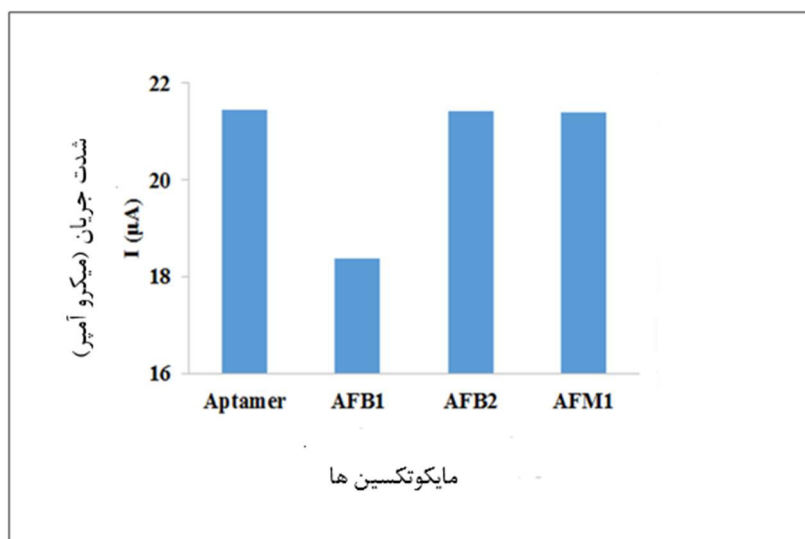
۱. الكترود اول شامل خود هدف یعنی افلاتوکسین AFB1 می باشد.

۲. الكترود شماره دو شامل افلاتوکسین AFB2 می باشد.

۳. الكترود شماره ۳ حاوی افلاتوکسین AFM1 می باشد.

این تحقیق نشان می دهد که الكترود طراحی شده دارای انتخاب پذیری مناسبی می باشد.

پیک الکتروود در حضور افلاتوکسین هدف کاهش می‌یابد (شکل ۴-۶) و در حضور افلاتوکسین B2, M1 پیک الکتروود در حضور آنها افزایش یافته است. افلاتوکسین M1 در واقع از هیدروکسیله شدن B1 حاصل می‌شود. افلاتوکسین M1 سمیت کمتری دارد. دلیل اینکه افلاتوکسین B1 دارای پیک کمتری نسبت به پیک‌های M1 و B2 می‌باشد به این خاطر است که پس از قرار گیری افلاتوکسین B1 بر روی اپتامر اختصاصی سطح الکتروود برای تبادل الکترونی با محلول فری سیانت کاهش می‌یابد (شکل ۴-۶).

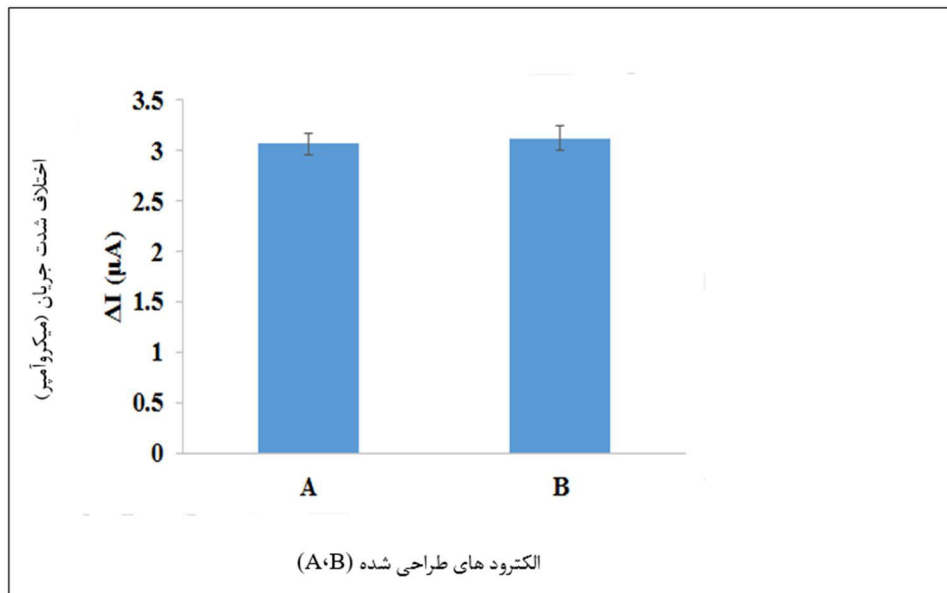


شکل ۴-۶- انتخاب پذیری الکتروود اصلاح شده در حضور افلاتوکسین B2, M1، B1 و اپتامتر

۴-۷ تکرار پذیری

تکرار پذیری بیوسنسور به دو روش مستقل بررسی شد. در روش اول سه الکتروود طراحی کرده و سیکل ولتامتری آنها مورد بررسی قرار گرفت. در روش دوم یک الکتروود طراحی کرده و سه بار از آن سیکل ولتامتری گرفته شد که در شکل ۴-۷ نمایش داده شده است. نتایج شکل

۴-۷ نشان داد تکرار پذیری بیوسنسور در حد عالی می باشد به طوری که اختلاف معنی داری از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد بین الکترودهای مورد استفاده وجود نداشت (شکل ۴-۷).



۴-۷ تکرارپذیری بیوسنسور (A) سه الکترودهای طراحی شده (B) سه بار اندازه گیری توسط یک الکتروده.

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

۵-۱ بحث

باتوجه اینکه آفلاتوکسین‌ها از قوی‌ترین سم‌های موجود در طبیعت بوده که توسط گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس که در روی انواع مختلف مواد غذایی و در طیف گسترده‌ای از محیط‌ها رشد می‌نمایند و همچنین به دلیل اینکه این توکسین‌ها جزء مواد درجه اول سرطانزا بشمار می‌رود (بن و همکاران، ۲۰۰۹). شناسایی این توکسین‌ها می‌تواند برای سلامت انسان و دیگر حیوانات و همچنین محیط زیست بسیار مفید باشد. از میان انواع آفلاتوکسین‌ها، نوع B1، سمیت بیشتری را نسبت به سایرین داشته و تقریباً در تمامی حیوانات، تاثیرگذار می‌باشد (اگبونیک و ایکونو، ۱۹۸۴). آفلاتوکسین B1 می‌تواند از طریق مصرف مواد غذایی به طور مستقیم وارد بدن انسان و حیوانات شود (بوسبی و وگان، ۱۹۸۴)، مصرف آفلاتوکسین در یک دوره طولانی و حتی با غلظت بسیار کم نیز می‌تواند بسیار خطرناک باشد (کیمبروغ و همکاران، ۲۰۰۴)، از آنجا که آفلاتوکسین‌ها با توجه به خطرات بالایشان به طور گسترده می‌توانند در مواد غذایی انسان و حیوانات دیده شوند در سال‌های اخیر چندین روش برای شناسایی آنها توسعه داده شده است، که از جمله روش‌های تشخیصی که توجه زیادی به آن‌ها معطوف است می‌توان به طراحی انواع زیست حسگرها اشاره کرد (سالاتا، ۲۰۰۴؛ نور و همکاران، ۲۰۱۲).

زیست حسگرهای تشخیصی دارای انواع مختلفی هستند و کاربردهای وسیعی را پوشش می‌دهند (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۶). استفاده از زیست حسگرها به دلیل دقت و حساسیت روش و همچنین در مواردی به دلیل عدم نیاز به وسایل پیشرفته و صرف زمان و هزینه زیاد برای تشخیص آنالیت‌ها در مراکز کوچک و در مراکز با امکانات کم و حتی در منزل نیز کاربرد دارد. این روش‌ها می‌توانند در امر تشخیص و درمان بیماری‌ها انواع سرطان، دیابت، تشخیص بیماری‌ها در سطح ژن، تشخیص عوامل بیماری‌زا، ارزیابی و اندازه‌گیری آنالیت‌های موجود در نمونه بیولوژیک مورد استفاده قرار گیرند (وان دام، ۲۰۰۴). تست‌هایی تحت عنوان تست‌های سریع

یا نقطه مراقبتی از دسته این زیست حسگرهای تشخیصی به شمار می آیند که در آن ها از تکنولوژی میکروفلوئیدیک استفاده شده است (جوانی و همکاران، ۲۰۱۷).

آپتامرها ابزارهایی برای تشخیص سموم از جمله مایکوتوکسین ها می باشند، زیرا اپتامرها مولکول هایی الیگونیو کلتوتیدی (ssDNA یا RNA) و پپتیدی هستند که با تمایل و اختصاصیت بالا به مولکول هدف خود (بیومولکول های کوچک، پروتئین ها و حتی سلول ها) متصل می شوند (وسولوسکی و همکاران، ۲۰۱۹). پایداری DNA آپتامرها از RNA آپتامرها بیشتر است، اما RNA آپتامرها انعطاف پذیری بیشتری دارند

آپتامرهای پپتیدی، از یک لوپ پپتیدی متغیر که در انتها به یک داربست پروتئینی متصل است، ساخته شده اند. لوپ متغیر دارای ۱۰ تا ۲۰ اسید آمینه و داربست پروتئینی دارای هر پروتئینی با حلالیت مناسب است. از آپتامرها همچنین می توان در سیستم های تحویل دارو استفاده کرد. تکنولوژی آپتامر به عنوان یک تکنولوژی معتبر و موثر گسترش یافته و مطالعات زیادی از کاربرهای آپتامرها انجام گرفته است و امروزه آپتامرها در جنبه های مختلف به عنوان یک ابزار تشخیصی و درمانی، علاوه بر کاربرد فراوان در ساخت بیوسنسور ها در گسترش داروهای جدید و سیستم های تحویل دارو بکار می روند. با این وجود آپتامرها هنوز جایگاه خود را در زمینه درمان و تشخیص پزشکی پیدا نکرده اند (حسینی و همکاران، ۲۰۱۳). در آزمایش حاضر نیز کارایی بالای اپتامر در تشخیص افلاتوکسی به اثبات رسید. *

گزارش شده است در آزمون های تشخیصی، آپتامرها می توانند به عنوان یک عامل تشخیصی جایگزین برای آنتی بادی ها باشند. آپتامرها از طریق فرآیندهایی در شرایط درون آزمایشگاه (in vivo) انتخاب می شوند که هزینه و تنوع کمتری نسبت به آنتی بادی های تولید شده در شرایط درون آزمایشگاه (in vivo) نشان می دهند. علاوه بر این توکسین ها و مولکول هایی که موجب پاسخ ایمنی خوبی نمی شوند، می توانند برای تولید آپتامر هایی با افینیتی بالا استفاده شوند (پروسکی و همکاران، ۲۰۰۵).

مطالعات معتبر فراوانی روی آپتامرها انجام گرفته است تا این که فرآیند انتخاب در محیط آزمایشگاه اولین بار در سال ۱۹۹۰ توسط گروه محققین Gold و گروه SELEX, Szostak نامیده شد (الینگتون و همکاران، ۱۹۹۰). با گسترش SELEX که امروزه یک تکنیک پایه‌ایی برای جدا سازی آپتامرهاست، بسیاری از آپتامرها مستقیماً به صورت برون تنی (in vitro) علیه اهداف مختلف از بیومولکول‌های کوچک گرفته تا پروتئین‌ها و حتی سلول‌ها انتخاب می‌گردند (هان و همکاران، ۲۰۱۰). اهداف SELEX شامل پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، آنتی بادی‌ها، آنتی بیوتیک‌ها و توکسین‌ها می‌باشند. همچنین اهداف کمپلکس شامل سلول کامل، مولکول‌های سطح سلولی، قطعات غشایی، لیزات باکتریایی و ذرات ویروس هستند که می‌توانند به عنوان هدف باشند (چو و همکاران، ۲۰۰۷).

در دهه های اخیر، طراحی و سنتز سطوح هوشمندی که ظرفیت و قابلیت اتصال و تثبیت DNA عملکردی را جهت ساخت زیست حسگرها داشته باشد، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (هندلی و همکاران، ۲۰۱۰). از بسترهایی که تاکنون جهت تثبیت بیومولکول‌ها مورد استفاده قرار گرفته اند، می توان به کوانتوم دات های نیمه رسانا، نانوذره های مغناطیسی، ذره های پلیمری، نانو ساختارهای بر پایه کربن و نانوذره های فلزی از قبیل طلا، نقره و غیره اشاره کرد (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۲). ثابت شده است که در مقایسه با سایر نانو ساختارها، نانوذره های فلزی، بیشترین انعطاف پذیری را به دلیل امکان کنترل اندازه، شکل، ترکیب و ساختار در طی ساخت دارند (یانگ و همکاران، ۲۰۱۱؛ دمرس و همکاران، ۲۰۰۰؛ ماو و همکاران، ۲۰۰۹).

در یک مطالعه، آنا و همکاران الکترودی را به منظور تشخیص ژنوم هپاتیت B طراحی کردند. در این مطالعه آن ها از گرافن اصلاح شده با پلی آمینوفنول به عنوان الکترود کار استفاده کردند. آن ها توانستند بعد از هیبرید شدن DNA هدف هپاتیت B با DNA پروب، بیماری هپاتیت B را در محدوده تشخیص ۲/۶۱ نانو مولار تشخیص دهند. در این مطالعه همچنین آن ها میزان پایداری و انتخاب پذیری الکترود را بررسی کردند و نتایج به دست آمده

حاکمی از آن بود که الکتروود مورد نظر دارای پایداری و انتخاب پذیری مناسبی می باشد (کاسترو و همکاران، ۲۰۱۴).

از آنجایی که نانو ذرات طلا دارای خصوصیات فیزیکوشیمیایی منحصر به فردی می باشند و این ویژگی ها برای سیستم های تشخیصی بسیار مناسب و کارا است، در چند سال گذشته در طیف وسیعی از روش های بسیار خلاقانه، برای سنجش یون های فلزی، مولکول های کوچک، پروتئین ها و بیومارکرهای اسید نوکلئیک، در زیست حسگرها به کار گرفته شده اند (آگاستی و همکاران، ۲۰۱۰). با استفاده از نانو ذرات طلا در تشخیص، انتظار می رود تا حساسیت تست افزایش پیدا کند و زمان کمتری جهت به نتیجه رسیدن آزمایش صرف شود. مواد شیمیایی واقع در سطح نانو ذرات را می توان توسط عوامل آلی ایجاد کننده پیوند مانند ملکول های تیول یا پلیمرهای حاوی تیول کنترل نمود، که نتیجه این عمل میل ترکیبی بالای ذرات به ایجاد پیوند با گروه های سولفیدریل، که عامل تشکیل پیوندهای کوالانسی نسبتاً قوی هستند، می شود، اصلاح بیشتر سطح نانوذرات طلا می تواند توسط ملکول های دارای گروه های عاملی تیوله شده، اتصال با پروب های مختلف شامل آنتی بادی ها و نوکلئیک اسیدها انجام داد (دانگ چای و همکاران، ۲۰۰۸).

با توجه به اینکه سایر نانو ذرات طلا جهت اتصال به پروب در ساخت زیست حسگرها از اهمیت ویژه ای برخوردار است؛ بنابراین سائز به دست آمده از بررسی اندازه نانو ذرات در این پژوهش مطلوب به نظر می رسد (شکل ۴-۱)، چراکه نسبت به اندازه پروب به کار رفته در زیست حسگر مدنظر، سائز نانو ذرات طلا کوچک تر نمی باشد. در غیر این صورت به دلیل ایجاد دافعه میان نانو ذرات پوشیده شده با بار منفی زیست حسگر طراحی شده ناپایدار خواهد شد (کوتلر و همکاران، ۲۰۱۲).

در مطالعه ای، شکوری و همکاران (۲۰۱۰) از الکتروودهای طلا به منظور تشخیص ژنوم هیپاتیت B استفاده کردند. در این مطالعه، آن ها به منظور افزایش سطح الکتروود از نانوذرات

طلا که به صورت نانولوله های کوچک (nanorod) بودند استفاده کردند. نانوذرات طلا علاوه بر افزایش سطح، باعث افزایش میزان انتقال الکترون و در نتیجه افزایش جریان نیز می شوند، آن ها از تکنیک TEM برای بررسی نانوذرات طلا و از تکنیک SEM به منظور بررسی سطح اصلاح شده الکترون با نانوذرات طلا استفاده کردند و همچنین از میکروسکوپ AFM برای بررسی میزان قرارگیری DNA پروب هپاتیت B روی سطح الکترون استفاده کردند. در نهایت با استفاده از تکنیک الکتروشیمیایی ولتامتری چرخه ای میزان هیبرید شدن DNA هدف هپاتیت B با DNA پروب بررسی گردید و محدوده تشخیص ۲ پیکو مولار به دست آمد (شکوری و همکاران، ۲۰۱۵).

به طور کلی یک الکترون برای کارایی ایده ال نیاز به هدایت الکتریکی خوب و ناحیه سطحی بالا دارد و نانو مواد بر اساس کربن، رسانا و زیست سازگار هستند. از این رو نانو فیبر های کربنی به عنوان مواد کربنی در مقیاس نانو توجهات زیادی را به خود جلب کرده است. تا کنون از آنها به طور گسترده ای در بیوسنسورها و سنسور های الکتروشیمیایی استفاده شده است. استفاده از آنها مبتنی بر این حقیقت است که هم به عنوان ماتریکسی برای نشان دادن بیوملکول ها و هم به عنوان مبدل برای انتقال سیگنال الکتروشیمیایی استفاده شوند. نشان دادن مستقیم بیو مولکول ها بر روی سطح نانوفیبر های کربنی روشی موثر برای توسعه بیوسنسور های الکتروشیمیایی پایدار و حساس است. در یک مطالعه، هایا و گروهش (۲۰۱۲) یک الکترون را برای تشخیص ژنوم ویروس پاپیلوما طراحی کردند، در مطالعه، آن ها از الکترودهای گلاسی کربن اصلاح شده توسط گرافن، نانوذرات طلا و پلی تیونین استفاده کردند و توانستند بعد از قرارگیری DNA پروب روی الکترون، ژنوم ویروس را تشخیص دهند. آن ها از گرافن و نانوذرات طلا که باعث افزایش سطح الکترون و در نتیجه افزایش قرارگیری DNA پروب روی سطح الکترون می شود استفاده کردند. گرافن و نانوذرات طلا همچنین به دلیل رسانایی بالا باعث افزایش سرعت انتقال الکترون و در نتیجه افزایش انتقال جریان و در نهایت افزایش میزان

تشخیص نیز می شوند. همچنین این الکتروود دارای تشخیص مناسب در سرم خون انسان نیز می باشد (هانگ و همکاران، ۲۰۱۵).

نتایج این آزمایش نشان داد بیوسنسور طراحی شده به خوبی توانسته است افلاتوکسین را تشخیص داده و با استفاده از نانو ذرات طلا حساسیت این بیوسنسور افزایش پیدا کند، به طوری که نتایج این آزمایش در وهله اول پخش هماهنگ ذرات طلا در سطح الکتروود را نشان داد (شکل ۴-۱) و ولتا متر چرخه‌ای به خوبی تشخیص افلاتوکسین توسط الکتروود را نشان داد، همچنین بر اساس نتایج این آزمایش پایداری الکتروود اصلاح شده نیز در حد مطلوب و قابل قبول تا ۲۲ روز بود (شکل ۴-۴). نتایج این تحقیق همچنین نشان می دهد که الکتروود طراحی شده دارای انتخاب پذیری مناسب و تکرار پذیری مطلوب می‌باشد.

گانگ و همکاران (۲۰۱۷) با قرار دادن فیلم های حاوی نفیون و گرافن روی گلاسی کربن توانستند یک الکتروودی را طراحی کنند که توانایی این را داشت که ژنوم ویروس HIV را در محدوده تشخیص مناسبی تشخیص دهد. کارایی این الکتروود بدین صورت بود که بعد از قرارگیری DNA پروب روی سطح الکتروود به دلیل افزایش بار منفی ناشی از فسفات حاضر در DNA روی سطح الکتروود، میزان جریان الکتروود و در نتیجه میزان ارتفاع پیک های الکتروشیمیایی کاهش می یابد. بعد از قرارگیری الکتروود در معرض DNA هدف و هیبرید شدن DNA هدف و پروب و تشکیل ساختار مارپیچ دوتایی DNA به دلیل ضعیف بودن پیوند بین DNA پروب و سطح، این ساختارهای مار پیچ دوتایی از روی سطح جدا شده و در نتیجه میزان بار منفی سطح کاهش می یابد که باعث افزایش جریان و ارتفاع پیک الکتروشیمیایی می شود، گانگ و همکاران توانستند ژنوم ویروس HIV را در حد تشخیص ۲/۳ پیکومولار تشخیص دهند (گانگ و همکاران، ۲۰۱۷).

همان گونه که در شکل ۴-۱ مشخص شده است، صفحات گرافن به خوبی از یک دیگر تفکیک شده اند و با توجه به مقیاس نشان داده شده در شکل، صفحات گرافن طولی در حدود

۷۰ تا ۸۰ نانومتر و ضخامت آن ها حدود ۲ نانومتر می باشد. نتایج آنالیز TEM نشان دهنده توزیع یکنواخت نانو ذرات طلا با اندازه ذرات حدود ۵ تا ۱۰ نانومتر بر روی صفحات اکسید گرافن می باشد، هم چنین پراکندگی مناسب نانو ذرات طلا در این تصویر به خوبی نشان داده شده است به گونه ای که تمام نانو ذرات طلا بر روی صفحه اکسید گرافن نشانده شده است و نانو ذره به صورت آزاد وجود ندارد.

بررسی صحت اصلاح و آماده سازی سطح الکتروود توسط صفحات اکسید گرافن و نانو ذرات طلا توسط طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (Dielectric spectroscopy)^۳ بررسی شده است. نمودار نایکوئیست^۴ مربوط به الکتروود طلا گرافن- نانو ذرات طلا حاکی از نرخ بالای انتقال الکترون و پایین بودن مقاومت الکتریکی ذاتی کریستالها ی تشکیل دهنده نانو ذرات طلا می باشد (شکل ۴-۱) با توجه به شکل ۴-۲ مقاومت ذاتی الکتروود در حضور افلاتوکسین افزایش بیش تری داشته که این مهم حاکی از افزایش بیش تر مقاومت سیستم نسبت به حالت قبلی است که با منحنی به خوبی قابل تشخیص است. افزایش مقاومت در این مرحله نشان دهنده تغییر گام به گام یا مرحله به مرحله در میزان مقاومت سیستم به کمک طیف سنجی امپدانس ($\bar{S}$) می باشد. نتایج به دست آمده بیانگر صحت اصلاح سطح الکتروود طلا توسط آنتی بادی، افلاتوکسین و نانو ساختار ترکیبی اکسید گرافن و نانو ذرات طلا به صورت مرحله به مرحله می باشد.

بر اساس تئوری مارکوس (۱۹۵۶) فاصله ی انتقال الکترون یک فاکتور قطعی برای الکتروشیمی مستقیم اکسید و احیای بیومارکرها است که وابسته به مجموع فاصله های بین محل اکسید و احیا درون آنزیم پروتئین و سطح الکتروود و هم چنین نوع آرایش و استقرار آنزیم به پروتئین بر سطح الکتروود می باشد. لذا، بهترین حالت این است که فاصله ی انتقال الکترون تا حد امکان کوتاه باشد. به دلایل ذکر شده استفاده از نانومواد برای کوتاه کردن این فاصله و

³Dielectric spectroscopy

⁴ Nyquist chart

همین طور کاهش میزان انرژی انتقال الکترون مناسب می باشد. به عنوان مثال ترکیبات نانو ساختارهای کربنی نظیر گرافن، نانولوله های کربنی، فولرن و غیره با پلیمرها، نانوذرات فلزی و ترکیبات معدنی دارای اهمیت بسیاری در انتقال آسان تر و با انرژی کم تر الکترون در مواد بیولوژیکی در سطح الکتروود می باشند (آرتیلس و همکاران، ۲۰۱۱).

در حسگرهای الکتروشیمیایی نانوذرات طلا می توانند باعث افزایش حساسیت حسگر شود، نتایج این آزمایش نیز نشان داد استفاده از ذرات طلا برای بهینه کردن بيو سنسور جواب داده و باعث افزایش دقت بیوسنسور تشخیص افلاتوکسین می شود (شکل ۴-۳ و ۴-۲). نانوذرات طلا نقش کاتالیزور را در انتقال الکترون مابین آنالیت و سطح الکتروود انجام می دهد (امیدی و همکاران، ۲۰۱۵). بر اساس نتایج این آزمایش الکتروودهای حاوی نانو ذرات طلا سیکل ولتامتری آن بالاتر از الکتروود خام می باشد که این امر به دلیل خاصیت رسانایی نانوذرات طلا می باشد. نانوذرات طلا دارای ویژگی های فیزیکی و شیمیایی مشخصی هستند که از اندازه آنها ناشی می شود که به دلیل سطح وسیع و انرژی سطحی بالا آنها می باشد (شکل ۴-۱).

از طرفی خود گرافن نقش به سزایی در افزایش سرعت انتقال الکترون دارد. وجود گروه های اکسیژنی بر روی لایه های گرافنی تاثیر بسیار زیادی بر روی جذب و واجذب سطحی محصولات واکنش های شیمیایی از سطح الکتروودهای گرافنی می گذارد. محصولات جذب سطحی شده اغلب باعث کند شدن واکنش الکتروشیمیایی برای ترکیبات خیلی حساس به گروه های اکسیژن دار می شوند. لایه ی اکسید گرافن که دارای لبه های اکسیدی است به صورت عمودی یا مایل مابین سطح الکتروود و مرکز فعال بیومارکر قرار می گیرد بدون این که پروتئین ساختار خود را تغییر دهد. گرافن اکسیدی عمق بیومارکر را به الکتروود پیوند می دهد (بنی اسدی و همکاران، ۲۰۱۴). یکی دیگر از مزایای گرافن سطح بسیار بالای آن می باشد که از سطح موثر یک نانولوله ی کربنی تک لایه بسیار بیشتر است. به دلیل نا محدود نبودن ابعاد گرافن دو نوع سطح برای گرافن وجود دارند که می توانند در انتقال الکترون هتروژن شرکت

کنند. نوع اول " basal plane " یا همان طرف مسطح آن است و نوع دوم " edge plane " یا لبه های آن است.

سرعت انتقال الکترون هتروژن در گرافن به این صورت است که انتقال در لبه ها بسیار سریع تر از سطح آن است، نسبت سرعت انتقال الکترون در لبه ها به سطح تقریباً بیش از یک میلیون برابر است، انتقال سریع الکترون در نانو مواد بر پایه ی گرافن و استفاده ی آنها در سنسورها و بیوسنسورهای الکتروشیمیایی منجر به جداسازی موج های طیفی موادی که با هم تداخل دارند می شود (شنگ و همکاران، ۲۰۱۲). استفاده از گرافن در طراحی و ساخت بیوسنسورهای الکتروشیمیایی و نقش کاتالیتیکی آن ها باعث شد که استفاده از آن و ترکیب های آن با پلیمر هادی، نانوذرات فلزی و یا اکسیدهای فلزی و در نهایت عامل دار کردن هر کدام از اجزای ترکیب الکتروود به هم راه استفاده از بیومارکرها در ساختار بیوسنسور الکتروشیمیایی برای اندازه گیری ترکیبات بیولوژیکی و تشخیص توکسین ها مورد استفاده قرار گیرد.

۵ - ۲ نتیجه گیری

این آزمایش به منظور طراحی بیوسنسور الکتروشیمیایی بر پایه نانو ذرات طلا جهت تشخیص افلاتوکسین B1 انجام شد، بر اساس نتایج این آزمایش در حضور افلاتوکسین اپتامر اختصاصی افلاتوکسین B1 به آن متصل شده و نشان داده شد که بیوسنسور طراحی شده به خوبی توانسته است افلاتوکسین را تشخیص دهد، همچنین نتایج این آزمایش نشان داد در حضور نانوذرات طلا حساسیت بیوسنسور افزایش پیدا کرده است، به طوری که نتایج این آزمایش درگام اول پخش هماهنگ ذرات طلا در سطح الکتروود را نشان داد و ولتا متر چرخه ای به خوبی تشخیص افلاتوکسین توسط الکتروود را نشان داد. معادله منحنی کالبراسیون غلظتهای مختلف افلاتوکسین و خطی بودن آن تعیین گردید. معادله خط بصورت $y=0/547x$

0/034 و $\chi^2 = 0/995$ به دست آمد و حد تشخیص به دست آمده در این مطالعه $LOD=0/4nm$ بود که این امر به خوبی عنوان می کند که بیوسنسور طراحی شده کارایی مناسبی دارد. همچنین براساس نتایج این آزمایش پایداری الکتروود اصلاح شده نیز در حد مطلوب و قابل قبول تا ۲۲ روز بود. در نهایت نتایج این تحقیق نشان می دهد که الکتروود طراحی شده دارای انتخاب پذیری مناسب و تکرار پذیری مطلوب می باشد.

منابع

جعفری، م. ۱۳۹۴. در پژوهشی به طراحی بیوسنسور آپتامتری جهت تعیین مقدار افلاتوکسین B1. پایان نامه دکترا. دانشگاه جندی شاپور اهواز. ۲۰۵ ص.

فرجی، ف. ۱۳۸۹. بررسی طراحی بیوسنسور ویژه برای اندازه‌گیری افلاتوکسین B1 متصل به آلبومین در سرم رات به روش Direct SPR Immunoassay و مقایسه آن با روش مرجع. پایان نامه دکترا. دانشگاه تربیت مدرس. ۱۷۷ ص.

مرادی، ی.، مولایی، ا.، عبدی، ا.، حاجی لو، ف. ۱۳۹۴. بررسی طراحی و ساخت بیوسنسور افلاتوکسین مبتنی بر تثبیت آنزیم استیل کولین استراز روی الکتروود کربن. شانزدهمین همایش آموزش فیزیک ایران و ششمن کنفرانس فیزیک و آزمایشگاه. دانشگاه لرستان. ۷ ص.

معصومی، ل. ۱۳۹۲. اندازه‌گیری افلاتوکسین B1 در نمونه‌های آبی با بیوسنسور الکتروشیمیایی و اندازه‌گیری ترکیبات آلی در محصولات آرایشی و بهداشتی با ریز استخراج فاز جامد - کروماتوگرافی گازی. رساله دوره دکتری شیمی تجزیه. دانشگاه تبریز. ۲۶۴ ص.

برایان اگینس (۱۳۸۰) **دیباچه ای بر زیست حسگرها**، ترجمه دکتر هدایت ... قورچیان، انتشارات دانشگاه تهران ، ص ۲۰

Agasti SS, Rana S, Park MH, Kim CK, You CC, Rotello VM. 2010. Nanoparticles for detection and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev.*; 62(3): 316-28.

Ahmed A, Rushworth JV, Hirs t NA, Millner PA. 2014. Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clinical microbiology reviews.* 27(3):631-46.

Ana Clarissa dos SantosPiresa., Nilda de Fátima FerreiraSoaresa., Luis, Henrique. 2011. A colorimetric biosensor for the detection of foodborne bacteria. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 153: 17-23.

Artiles MS, Rout CS. Fisher TS. 2011. Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing. *Adv Drug Deliv Rev*; 63: 1352-1360.

Baniasadi L, Omid M, Amoabediny G, Yazdian F, Attar H, Heydarzadeh A, 2014. An inhibitory enzyme electrode for hydrogen sulfide detection. *Enzyme Microb Technol*; 63: 7-12.

Bhardwaj, Hema. Gajjala, Sumana., Christophe. A.Marquette.2020. A label-free ultrasensitive microfluidic surface Plasmon resonance biosensor for Aflatoxin

- B1 detection using nanoparticles integrated gold chip. *Food Chem.* 307: 20-39.
- Blank M, Blind M. 2005. Aptamers as tools for target validation. *Curr Opin Chem Biol.*; 9(4): 336-42.
- Busby, W. F. J., and Wogan, G. N. 1984. Aflatoxins. In *Chemical Carcinogens* (C. D. Searle, Ed.), pp. 947– 136. American Chemical Society, Washington, DC.
- Castro, A.C.H., França, G., Lucas, F. 2014. Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus. *App Sur Sci.* 314: p. 273-279.
- Jianrong, C.H., M Yuqing, He Nongyue, Wu Xiaohua, Li Sijiao, 2004. Nanotechnology and biosensors, *Biotech Adv*, 22:24-39.
- Chandra, Shekhar; Pundir, Nidhi Chauhan. 2012. Acetyl cholinesterase inhibiti on-based biosensors for pesticide determination. *Analy Biochem.* 21-27.
- Chien, Y. Y., Jan, M. D., Adak, A. K., Tzeng, H. C., Lin, Y. P., Chen, Y. J., & Lin, C. C. 2008. Globotriose-functionalized gold nanoparticles as multivalent probes for Shiga-like toxin. *ChemBioChem*, 9(7), 1100-1109.
- Chris, M. 2019. Fluorescence Polarization Immunoassay of Mycotoxins. *Toxins* 196-211.
- Chu T, Ebright J, Ellington AD. 2007. Using aptamers to identify and enter cells. *Current opinion in molecular therapeutics.* 9(2):137-44.
- Cutler JJ, Auyeung E, Mirkin CA. 2012. Spherical nucleic acids. *J Am Chem Soc.*; 134(3): 1376-91.
- Dhar, S., Gu, F.X., Langer, R., Farokhzad, O.C., Lippard, S.J. 2008. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt (IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. ***P Natl Acad Sci*; 105(45): 17356-61.**

- Dollins, C.M., Nair, S, Sullenger, B.A. 2008. Aptamers in immunotherapy. Human gene therapy. 19(5): 43-50.
- Dai C. and Choi S. 2013. Technology and Applications of Microbial Biosensor. Open Journal of Applied Biosensor, 2: 83-93.
- Demers, LM, Mirkin, CA, Mucic, RC, Reynolds, RA, 2012. Letsinger RL, Elghanian R, et al. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency. Journal of Nanobiotechnology. 10: 154-169.
- Dhar S, Gu FX, Langer R, Farokhzad OC, Lippard SJ. 2008. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt (IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. P Natl Acad Sci. 105(45): 17356-61.
- Dollins CM, Nair S, 2008. Sullenger BA. Aptamers in immunotherapy. Human gene therapy. 19(5):443-50.
- Dungchai, W., Siangproh, W., Chaicumpa, W., Tongtawe, P., & Chailapakul, O. 2008. *Salmonella typhi* determination using voltammetric amplification of nanoparticles: a highly sensitive strategy for metalloimmunoassay based on a copper-enhanced gold label. Talanta, 77(2): 727-732.
- Edgar, R., McKinstry, M., Hwang, J., Oppenheim, A. B., Fekete, R. A., Giulian, G., & Adhya, S. 2006. High-sensitivity bacterial detection using biotin-tagged phage and quantum-dot nanocomplexes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103(13): 4841-4845.
- Egbunike, G.N., Ikegwuonu, F.I., 1984. Effect of aflatoxicosis on acetylcholinesterase activity in the brain and adenohipophysis
- Ellington AD, Szostak JW. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. nature.;346(6287):818.
- Ge X, Asiri AM, Du D, Wen W, Wang S, Lin Y. 2014. Nanomaterial-enhanced paper-based biosensors. TrAC Trends Anal Chem.; 58: 31-9.
- Gong, Q., Y. Wang, and H. Yang. 2017. A sensitive impedimetric DNA biosensor for the determination of the HIV gene based on graphene-Nafion composite film. Biosensors and Bioelectronics,. 89: p. 565-569.

- Grossman, H. L., Myers, W. R., Vreeland, V. J., Bruehl, R., Alper, M. D., Bertozzi, C. R., & Clarke, J. 2004. Detection of bacteria in suspension by using a superconducting quantum interference device. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(1), 129-134.
- Haes, A J, R P Van Duyne, A .2002. nanoscale optical biosensor, *J.Am.che.Soc.* 52-21.
- Han K, Liang Z, Zhou N. Design 2010. strategies for aptamer-based biosensors. *Sensors*.;10(5):4541-57.
- Handali S, Klarman M, Gaspard AN, Dong XF, Laborde R, Noh J, 2010. Development and evaluation of a magnetic immunochromatographic test to detect *Taenia solium*, which causes taeniasis and neurocysticercosis in humans. *Clin Vaccine Immunol.*; 17(4): 631-7.
- Hermann T, Patel DJ. 2000. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science*.; 287(5454): 820-5.
- Hianik T, Wang J. 2009. Electrochemical aptasensors recent achievements and perspectives. *Electroanalysis*; 21(11): 1223-35.
- Hong P, Li W, Li J. 2012. Applications of aptasensors in clinical diagnostics. *Sensors*; 12(2): 1181-93.
- Hosseini Zijoud SM, Zarei S, 2013. Abbasalipourkabir Abbasalipourkabir R. Aptamers and their biological & therapeutic applications. *Pajouhan Scientific Journal*.;12(1):11-26.
- Huang, H., 2015. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics*., 68: p. 442-446.
- Huang, Y. F., Wang, Y. F., & Yan, X. P. 2010. Amine-functionalized magnetic nanoparticles for rapid capture and removal of bacterial pathogens. *Environmental science & technology*. 44(20): 7908-7913.
- Ines Ben, Rejeba; Fabiana, Arduinib; Adina, Arvinted; Aziz, Amine. 2019. Development of a bio-electrochemical assay for AFB1 detection in olive oil. *Biosensors and Bioelectronics*: 1962-1963.
- Ion, A.C., I. Ion, A. Culetu, D. Gherase, C.A. Moldovan, R. Iosub, A. Dinescu, 2011. Acetylcholinesterase voltammetric biosensors based on

carbon nanostructure chitosan composite material for organophosphate pesticides, Mater. Sci. Eng. C 31 815–821.

Ivanov, A.N., G.A. Evtugyn, R.E. Gyurcsányi, K. Tth, H.C. Budnikov. 2011. Comparative investigation of electrochemical cholinesterase biosensors for pesticide determination, Anal. Chim. Acta 414 () 77–67.

J Riu, A Maroto, F Xavier Rius, 2006. Nanosensors in environmental analysis, Talanta, 69-75.

Javani A, Javadi-Zarnaghi F, Rasaei MJ. 2017. A multiplex protein-free lateral flow assay for detection of microRNAs based on unmodified molecular beacons. Anal Biochem.; 537: 99-105.

Jayasena SD. 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. Clin Chem; 45(9): 1628-50.

Joo, J., Yim, C., Kwon, D., Lee, J., Shin, H. H., Cha, H. J., & Jeon, S. 2012. A facile and sensitive detection of pathogenic bacteria using magnetic nanoparticles and optical nanocrystal probes. Analyst, 137(16), 3609-3612.

Joo, J., Yim, C., Kwon, D., Lee, J., Shin, H. H., Cha, H. J., & Jeon, S. 2012. A facile and sensitive detection of pathogenic bacteria using magnetic nanoparticles and optical nanocrystal probes. Analyst. 137(16): 3609-3612.

Kaittanis, C., Santra, S., & Perez, J. M. 2010. Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis. Advanced drug delivery reviews, 62(4), 408-423.

Kalele, S. A., Kundu, A. A., Gosavi, S. W., Deobagkar, D. N., Deobagkar, D. D., & Kulkarni, S. K. 2006. Rapid detection of *escherichia coli* by using antibody-conjugated silver nanoshells. Small, 2(3): 335-338.

Kayal, S., & Charbit, A. 2006. Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. FEMS microbiology reviews, 30(4): 514-529.

Kimbrough, T.D., G.C. Llewellyn and L.B. Weekley, 1992. The effect of aflatoxin B1 exposure on serotonin metabolism: response to a tryptophan load. Metabolic Brain Disease, (2114): 157-182.

- Lee JO, So HM, Jeon EK, Chang H, Won K, Kim YH. 2008. Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. *Anal Bioanal Chem*; 390(4): 1023-32.
- Lillehoj EB, Garcia WJ, Lambrow M .1954. Aspergillus flavus infection and aflatoxin production in corn: influence of trace elements. *Appl Microbiol* 28: 563–565.
- Ling Z, Ming-Hua W, Jian-Ping W, Zhun- Zhong YE. 2011. Application of biosensor surface immobilization methods for aptamer. *Chinese J Anal Chem*; 39(3): 432-8.
- Pumera M Sanchez S, Ichinose I, Tang J. 2007. Electrochemical nanobiosensors, *Sens & Actua*. 123: 12-36.
- Maji, S.K., Sreejith, S., Mandal, A.K., Ma, X., Zhao, Y. 2014. Immobilizing gold nanoparticles in mesoporous silica covered reduced graphene oxide: a hybrid material for cancer cell detection through hydrogen peroxide sensing. *ACS Appl Mater Interfaces*; 6: 13648-13656.
- Malik, P., Katyal, V., Malik, V., Asatkar, A., Inwati, G., and Mukherjee, T.K. 2013. Nanobiosensors: Concepts and Variations. *ISRN Nanomaterials*, 20: 17-32.
- Mao, X., Ma, Y., Zhang, A., Zhang, L., Zeng, L., Liu, G. 2009. Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral flow strip. *Anal Chem*. 81(4): 1660-8.
- Mao, X., Yang, L., Su, X. L., & Li, Y. 2006. A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of Escherichia coli O157: H7. *Biosens and Bioelec*. 21(7): 1178-1185.
- Marcus, R.A. 1956. On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. I. *J Chem Phys*; 24: 966-978.
- Maria Francesca, C., Paola; L., Stefano, F. 2017. In vitro inhibitory effect of aflatoxin B1 on acetyl cholinesterase activity in mouse brain Toxicology. *Int. J. Environ. Res. Public Health* . (17)127-129.
- Martínez, J. L. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*. 321: 365-367.

- Meirinho, S.G, Dias, L.G, Peres, A.M., Rodrigues, L.R. 2016. Voltammetric aptasensors for protein disease biomarkers detection: A review. *Biotechnol Adv.* 34(5): 941-53.
- Minke, W. E., Roach, C., Hol, W. G., & Verlinde, C. L. 1999. Structure-based exploration of the ganglioside GM1 binding sites of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin for the discovery of receptor antagonists. *Biochemistry.* 38(18), 5684-5692.
- Mittal, S., Kaur, H., Gautam, N., Manth, A.K. 2017. Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. *Biosens Bioelectron.* 88: 21-31.
- Mo, Rijian ., Lei ,He. Xiemin, Yan. Tiantian, Su. 2018. A novel aflatoxin B1 biosensor based on a porous anodized alumina membrane modified with graphene oxide and an aflatoxin B1 aptamer. *Electrochemistry Communications.* 95: 9-13.
- Nagy, J. O., Zhang, Y., Yi, W., Liu, X., Motari, E., Song, J. C., and Wang, P. G. 2008. Glycopolymers as a chromatic biosensor to detect Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O157: H7. *Bioorg & med chem let*, 18(2): 700-703.
- Nieto, C.H.Díaz., A.M.Granero., D.García., A.Nescic., G.Barrosc., M.A.Zonb.,H.Fernándezb. 2019. Development of a third-generation biosensor to determine sterigmatocystin mycotoxin: An early warning system to detect aflatoxin B1. *Talanta.* 194: 253-259.
- Nor, N.M., Razak, K.A., Tan, S.C., Noordin, R. 2012. Properties of surface functionalized iron oxide nanoparticles (ferrofluid) conjugated antibody for lateral flow immunoassay application. *J Alloys Compound.* 538: 10-16.
- Omidi, M., Amoabediny, G., Yazdian, F., Habibi-Rezaei, M. 2015. Protein-based nanobiosensor for direct detection of hydrogen sulfide. *EPL .Euro Let.* 109: 18-25.
- Pagkali,Varvara.,Panagiota, S.Petrou, Eleni, Makarona, Jeroen, Peters. 2018. Simultaneous determination of aflatoxin B1, fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer samples with a label-free monolithically integrated optoelectronic biosensor. *Jou of Hazar Mat.* 359: 445-453.

- Pan, C., Guo, M., Nie, Z., Xiao, X., Yao, S. 2009. Aptamer-based electrochemical sensor for label-free recognition and detection of cancer cells. *Electroanalysis*. 21(11):13-21.
- Pan, D., Gu, Y., Lan, H., Sun, Y., Gao, H. 2015. Functional graphene-gold nano-composite fabricated electrochemical biosensor for direct and rapid detection of bisphenol A. *Anal Chim Acta*; 853: 297-302.
- Pérez-López, B., & Merkoçi, A. 2011. Nanomaterials based biosensors for food analysis applications. *Tren Food Sci & Tech*. 22(11): 625-639.
- Phillips, R. L., Miranda, O. R., You, C. C., Rotello, V. M., & Bunz, U. H. 2008. Rapid and Efficient Identification of Bacteria Using Gold-Nanoparticle–Poly (para-phenyleneethynylene) Constructs. *Angew Chem Inter Ed*. 47(14): 2590-2594.
- Proske, D., Blank, M., Buhmann, R., Resch, A. 2005. Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 69(4):367-74.
- Qin, D., He, X., Wang, K., & Tan, W. 2008. Using fluorescent nanoparticles and SYBR Green I based two-color flow cytometry to determine *Mycobacterium tuberculosis* avoiding false positives. *Biosen & Bioelec*. 24(4): 626-631.
- Rahman, M., Ahammad, A.J.S., Jin, J.H., Ahn, S.J. and Lee, J.J. 2010. A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metaloxides. *Sensors*. 10: 4855-4886.
- Riu, J., Maroto, A., Xavier, F. 2006. Nanosensors in environmental analysis, *Talanta*, 69 (20): 29-44.
- Rosi, N. L., & Mirkin, C. A. 2005. Nanostructures in biodiagnostics. *Chem rev*. 105(4): 1547-1562.
- Sadeghi, E., Almasi, A., Bohloli-Oskoi, S., Mohamadi, M. 2013. The Evaluation of Aflatoxin M1 Level in Collected Raw Milk for Pasteurized Dairy Factories of Kermanshah. *J Res Med Sci* 15 (3): 26-9.
- Salata, O. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology*. 2(1): 15-29.

- Sarvesh, R. and Pravesk, K. 2013. Biosensor and its application in food Industry. *Adv. Biores.* 4 (2): 168- 170.
- Shakoori, Z. 2015. Electrochemical DNA biosensor based on gold nanorods for detecting hepatitis B virus. *Analyti & bio chem.* 407(2): 455-461.
- Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C., Zhao, J. 2008. Aptamerbased biosensors. *TrAC-Trend Anal Chem*; 27(2): 108-17.
- Stepurska, K., Dzyadevych, S., Gridin, S. 2018. Potentiometric enzyme biosensor for aflatoxin B1 detection – Kinetic simulation. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 259: 580-586.
- Stobiecka, M. 2013. Novel DNA-biosensors for studies of GMO, pesticides and herbicides. *State of the Art in Biosensors - Environmental and Medical Applications.* 10: 201-222.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B. 2007. SELEX—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng.* 24(4):381-403.
- Tang, D., Saucedo, J.C., Lin, Z., Ott, S., Basova, E., Goryacheva, I., Biselli, S., Niessner, R., Knopp, D. 2009. Magnetic nanogold microspheres-based lateralflow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B2 in food. *Biosen & Bioelec*; 25: 514-518.
- Turner, A.P.F, 2013. Biosensors: sense and sensibility. *Chem Soci Rev.* 42: 3175-3648.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., and Piletsky, S.A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analy Chim Acta*, 632(2), 168-180.
- Uludag, Yıldız., Elif, Esen., Guzin, Kokturk., Hayrettin, Ozer., Turghun, Muhammad. 2016. Lab-on-a-chip based biosensor for the real-time detection of aflatoxin. *Talanta.* 160: 381-388.
- Velasco-Garcia, M, Missailidis, S. 2009. New trends in aptamer-based electrochemical biosensors. *Gene Ther Mol Biol*; 13(1): 1-9.
- Velasco-Garcia, M.N., Mottram, T. 2003. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems, *Biosys Engin.* 84: 63-78.

- Viswanathan, S., Wu, L. C., Huang, M. R., & Ho, J. A. A. 2006. Electrochemical immunosensor for cholera toxin using liposomes and poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)-coated carbon nanotubes. *Analy chem*, 78(4): 1115-1121.
- Wang, C., Li, J., Amatore, C., Chen, Y., Jiang, H., Wang, X.M. 2011. Gold nanoclusters and graphene nanocomposites for drug delivery and imaging of cancer cells. *Angew Chem Int Ed Engl*.50: 11644-11648.
- Wang, X., Ju, J., Li, J., Li, J., Qian, Q., Mao, C., Shen, J. 2014. Preparation of electrochemical cytosensor for sensitive detection of HeLa cells based on self-assembled monolayer. *Electrochimica Acta*. 123: 511-517.
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Koch-Nolte, F. 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Micro & Imm*. 198(3):157–174.
- Yang ,W., Li , X.B., Liu, G.W., Zhang, B.B., Zhang, Y., Kong, T. 2011. A colloidal gold probe-based silver enhancement immunochromatographic assay for the rapid detection of abrin-a. *Bios Bioelec*. 26(8): 3710-3.
- Yang, G. J., Huang, J. L., Meng, W. J., Shen, M., & Jiao, X. A. 2009. A reusable capacitive immunosensor for detection of *Salmonella* spp. based on grafted ethylene diamine and self-assembled gold nanoparticle monolayers. *Analytica chimica acta*, 647(2), 159-166.
- Yang, M., Kostov, Y., Bruck, H. A., & Rasooly, A. 2009. Gold nanoparticle-based enhanced chemiluminescence immunosensor for detection of Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) in food. *International journal of food microbiology*. 133(3): 265-271.
- Zhang, C., Zhang, Y., Wang, S. 2006. Development of multianalyte flow-through and lateral-flow assays using gold particles and horseradish peroxidase as tracers for the rapid determination of carbaryl and endosulfan in agricultural products. *J Agric Food Chem*. 54(7): 2502-7.
- Zhao, G., Xing, F., & Deng, S. 2007. A disposable amperometric enzyme immunosensor for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food based on agarose/nano-Au membrane and screen-printed electrode. *Electrochem communi*. 9(6): 1263-1268.

Zhou, L., Li, D.J., Gai, L., Wang, J.P., Li, Y.B. 2012. Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification. *Sens Actuat B*. 162(1): 20-38.

Abstract

Aflatoxins are toxins on food they are known as the leading mycotoxins due to their considerable abundance in the environment and the possibility of their growth in many agricultural products and their toxic and carcinogenic properties they are known as the mainstay of mycotoxins. Nanotechnology has made significant strides in identifying pathogens. The use of nanoparticles as markers in joints and with new detection methods has led to improvements in the detection sensitivity and microbial detection capacities. Therefore, this experiment was performed with the aim of designing an electrochemical biosensor based on gold nanoparticles to detect aflatoxin B1. In this experiment, carbon electrodes were first washed and then added with gold nanoparticles and in the next step, the aptamer was placed on the electrode, after which the selectivity and stability of the electrode were evaluated. The results of this experiment showed that in the presence of aflatoxin, a specific aptamer, aflatoxin B1, was attached to it and it was stated that a well-designed biosensor was able to detect aflatoxin. And increase the sensitivity of this biosensor by using gold nanoparticles, So that the results of this experiment in the first place showed the coordinated distribution of gold particles on the surface of the electrode and the cyclic voltmeter showed good detection of aflatoxin by the electrode. Also, according to the results of this test, the stability of the modified electrode was optimal and acceptable up to 22 days. Finally, the results of this study show that the designed electrode has good selectivity and optimal repeatability.

Keywords: Nanoparticles, Gold, Aptamer, Aflatoxin.



Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

Design of electrochemical biosensor based on gold nanoparticles to
detect different concentrations of aflatoxin

Maryam Norouzi Yadak

Supervisors :

Dr. Shahrokh Gharanjik

Dr. Mehdi Adabi

January 2021