

تشخیص اگزوتوکسین باکتری استافیلوکوکوس ارئوس توسط روش پتانسیومتری در مقایسه با طیف سنجی مبتنی بر نانوذرات اصلاح شده (متصل به پادتن)

حامد اهری¹، ودود رضویله²، بهروز اکبری³، عباسعلی مطلبی²، امیرعلی انوار⁴، نیما محمدی⁵

- 1- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: Dr.H.Ahari@gmail.com
- 2- استاد گروه بهداشت، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- 3- دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
- 4- مربی گروه بهداشت، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- 5- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/4/7

تاریخ پذیرش: 92/7/25

چکیده

سابقه و هدف: با پیشرفت تکنولوژی نانو، طراحی حسگرهای انتخابی و هوشمند یکی از بزرگترین انقلاب‌های صنعت کنترل کیفی مواد غذایی محسوب می‌شود که هم در زمانی کوتاه و هم با دقتی بسیار بالا می‌تواند تشخیص سم باکتری را انجام دهد، در این تحقیق با طراحی حسگرزیستی به تشخیص اگزوتوکسین باکتری استافیلوکوکوس ارئوس پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از مونومرهای متاگرلیک اسید برای تهیه قالب ملکولی و تهیه پلیمر استفاده گردیده و در مرحله دوم حسگری بر پایه اتصال آنتی بادی باکتری به نانو ذره استفاده شد، سوسپانسیون حاصل از نانوسیلیکای عامل دار متصل به آنتی بادی باکتری را در مجاورت نمونه‌های آب مقطر آلوده به سم باکتری استافیلوکوکوس ارئوس با غلظت 10^{-3} مولار قرار داده شد تا در صورت وجود سم باکتری در نمونه، اتصال بین آنتی‌ژن سم با آنتی بادی انجام گیرد.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده حاکی از آن است که تا رقت 10^{-3} مولار توسط حسگر پلی مر قالب ملکولی قابل تشخیص بوده و رقت‌های رقیق‌تر قابل ردیابی نمی‌باشد اما در حسگر طراحی شده به روش نانو سیلیکا، تا رقت 10^{-4} قابل ردیابی می‌باشد، حساسیت تا 60 روز ارزیابی شد، حسگر مبتنی بر پلیمر قالب ملکولی تا 28 روز و حسگر نانوسیلیکا تا 56 روز مورد تایید بوده و بعد از زمان مذکور رو به کاهش قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: نانوحسگرهای زیستی کاربردی در مقایسه با روش‌های بیوتکنولوژیک مرسوم همچون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و حتی روش‌های کشت میکروبی، از دقت و حساسیت منحصر به فردی برخوردار بوده و به عبارتی دیگر زمان تشخیص را از چند ساعت به چند دقیقه تقلیل می‌دهد.

واژگان کلیدی: نانوبیو حسگر، اگزوتوکسین استافیلوکوکوس ارئوس، پتانسیومتری، طیف سنجی

• مقدمه

موارد از جمله زمانی که جرم میکروب از بین رفته و سم باکتری در نمونه باقی است، در مواردی همچون بلایای طبیعی و واردات و صادرات در حجم انبوه فرآورده‌های شیری و گوشتی به کشورها در شرایط طبیعی و یا در شرایط غیرطبیعی همچون جنگ‌های انسانی و در برخی موارد در جنگ‌های بیوتروریسم بصورت عمد میلیون‌ها نفر از انسانهای

سالانه معادل میلیاردها دلار هزینه دور ریز و خروج مواد غذایی فساد یافته از چرخه صنعت غذا می‌باشد که به دلایل متعددی همچون نقل و انتقالات طولانی جاده ای و هوایی و یا دیرکرد جواب غیرقطعی آزمون‌های کنترل کیفی آزمایشگاه‌های همکار و مرجع صورت می‌گیرد (1)، این دیرکرد خود به دلیل استفاده از روش‌های استاندارد مرسوم و نیز جواب‌های منفی کاذب ایجاد می‌شود. در بسیاری از

براساس مطالعات و مرورمتون انجام یافته در خصوص سم باکتری مورد نظر نانوحسگری طراحی نشده ولی حسگرهای متعددی از نانوذرات طلا و گرافیت و کربن شبیه سازی شده که بر اساس بررسی Campbell و همکاران در سال 2011 و Ghosh و همکاران در سال 2006 سنسورها زمان تشخیص بیشتر و حساسیت کمتری در مقایسه با نانو حسگرها دارا می‌باشند.

هدف از اجرای این تحقیق تشخیص اگزوتوکسین باکتری استافیلوکوکوس ارئوس به عنوان یکی از شایع‌ترین عوامل مسمومیت‌های غذایی به دوروش پتانسیومتری و طیف‌سنجی به کمک نانوذرات اصلاح شده هدفمند می‌باشد. هدف اختصاصی طراحی حسگری با کاربری فن آوری نانو بوده تا با حساسیت و دقت زیادی بتواند در زمانی کمتر از 30 دقیقه سم حاصل از استافیلوکوکوس ارئوس که یکی از شایع‌ترین عوامل مسمومیت‌های غذایی می‌باشد را شناسایی نماید.

• مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده عبارتند از: سم باکتری استافیلوکوکوس از سیگما، آنتی‌بادی سم استافیلوکوکوس ارئوس، ذرات نانوسیلکا- برند نوترینو وبا سایز 10 نانومتر، استیک اسید تهیه شده از کمپانی مرک، حلال DMF تهیه شده از کمپانی مرک،

تترااتوکسی سیلان تهیه شده از کمپانی سیگما، هیدروکسید آمونیوم تهیه شده از کمپانی مرک، واکنشگر APTES تهیه شده از کمپانی سیگما، سوکسینیک انیدرید، تری اتیل آمین.

کلیه مواد کاربردی در این تحقیق دارای درجه خلوص تجزیه ای بوده و در تهیه محلول‌ها از آب دوبار تقطیر استفاده شده است).

پتانسیومتری مبتنی بر پلیمر قالب ملکولی: به منظور ساخت الگوی‌های مقاوم از نظر فیزیکی و شیمیایی برای اگزوتوکسین استافیلوکوک ابتدا باید محلول مناسبی از این حسگر از محلول خالص آن تهیه شود. برای این منظور از محلول خالص عرضه شده توسط کمپانی سیگما با رقیق سازی مناسب با آب مقطر خالص محلول با غلظت 1×10^{-5} مولار از آن تهیه گردید و در تمام مراحل کار با سم شرایط دمایی استاندارد رعایت گردید و محلول‌ها به صورت روزانه تهیه شدند و در مراحل مختلف آزمایش در دمای 25°C انجام یافت (7).

بی گناه گریبان گیر و قربانی مقاصد شوم این عوامل می‌گردند(3).

با توجه به زمان مورد نیاز جهت رویت نتایج حاصل از کشت میکروبی در مبحث کنترل کیفی مواد غذایی قطع بر یقین مدت زمان معادل 48 ساعت و در خصوص برخی از سوش‌ها که نیاز به پیش غنی‌سازی و غنی‌سازی دارند همچون سالمونلا به یک هفته هم نیازمند می‌باشد تا در نهایت نتایج تشخیص اولیه حاصل گردد. استفاده از بیوسنسورها و نانوبیو حسگرها بسیار ارزشمند می‌باشد، زیرا در بسیاری از کارخانجات مواد غذایی در بخش تحقیقات و توسعه و نیز بخش کنترل کیفی زمان لازم برای نگهداری مواد و اعلام نتایج آزمون جهت عدم تأیید یا تأیید محصول برای عرضه به مصرف کننده بسیار طولانی است. این موضوع سبب کاهش زمان ماندگاری و از طرفی بصورت غیر مستقیم سبب خسارت وارده به تولید کننده می‌گردد (3، 1).

تولید ماده غذایی سالم یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های موجود در صنعت غذاست. امروزه مصرف کنندگان خواهان غذایی هستند که حداقل فرآوری روی آن انجام شده باشد و عاری از انواع میکروارگانیسم، ماده افزودنی و مواد نگهدارنده بوده و در عین حال زمان ماندگاری بیشتری را داشته باشد که این مهم به کمک بیو حسگرها ممکن گردیده است(4).

از مهم‌ترین بخش‌های صنعت تمام کشورها که با صنایع غذایی در ارتباط است امنیت غذایی می‌باشد. استفاده از فناوری‌های نوین در این بخش رویکرد جدیدی است که بسیار مورد توجه قرار می‌گیرد. همگرایی فناوری نانو و علم غذا منجر به بروز قابلیت‌های فراوانی می‌شود که همین امر باعث شده که حدود 200 شرکت بزرگ در سراسر دنیا در این زمینه سرمایه‌گذاری کلان نموده و محصولاتی را نیز به بازار عرضه کنند. با توجه به پتانسیل فوق‌العاده کار برد فناوری نانو در صنایع غذایی انتظار می‌رود طی دو دهه آینده انقلاب بزرگی در زمینه محصولات غذایی و کشاورزی پدید آید، به گونه‌ای که اثرات آن بسیار فراتر از کشاورزی مکانیزه و انقلاب Green Revolution خواهد بود (5).

حسگرهای مبتنی به روش پلیمر قالب ملکولی از نوین ترین روش‌های طراحی و ساخت زیستگرهای حسی در تشخیص میکروبی مواد غذایی می‌باشند ولیکن بیشتر در بعد شیمی مواد غذایی (پیگیری آنزیمی، خواص حسی و غیره) کاربری داشته و کمتر در تشخیص میکروبی استفاده شده است(6).

الگوی پلیمری تشکیل شده در اطراف مولکول‌های اگزوتوکسین با پیوندهای هیدروژنی به عوامل اسیدهای آمینه موجود در ساختار سم پیوند داده و از اینرو برای خارج کردن مولکول سم از محلول رقیق اسید استفاده شد و الگوی پلیمری بجا مانده جهت بکارگیری در حسگر پتانسیومتری وارد مرحله بعدی آزمایش گردید.

(10-8).

از محلول 1 به 10 از متانول و اسید استیک به عنوان محلول اسیدی الکل استفاده شد تا مولکول اگزوتوکسین را از درون پلی‌مر تشکیل شده خارج نماید. مکانسیم این عمل از طریق حذف پیوندهای هیدروژنی بین اسید آمینه‌ها و متاکریلیک اسید به عنوان واحدهای مونومر در پلی‌مر نشان داده شده است (11).

به منظور تعیین خصوصیت نانوذرات پلیمری تولیدی و تعیین مورفولوژی و اندازه این ذرات از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی SEM استفاده گردید.

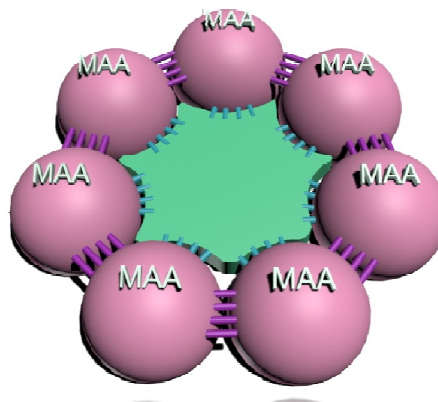
جهت آماده‌سازی نمونه‌های میکروسکوپ الکترونی، ابتدا آماده‌سازی ذرات پلیمری (MIP (Molecularly imprinted polymer) و (NIP (Non-imprinted polymer) از طریق تهیه سوسپانسیون در حلال استونیتریل درون فاکون‌های آزمایشگاهی انجام گردیده و مقدار 3 ml از محلول حاصله را روی پایه دارای چسب گذارده تا حلال تبخیر گردد و سپس در دستگاه اسپاترکوتر (Spotter Coater) که حاوی گاز آرگون می‌باشد به منظور تثبیت روکش آب طلا (به روی نمونه‌های موجود بر پایه) انتقال داده تا بعد از 10 دقیقه نمونه‌ها به محفظه دستگاه میکروسکوپ انتقال یابند و در نهایت بعد از تنظیم میکروسکوپ (SEM (scanning electron microscope) به روی بزرگنمایی 10 X تصاویر نمونه بر روی مانیتور ظاهر گردیده که در بخش نتایج رویت می‌گردد.

ساخت میکروالکتروکود غشایی با اصلاحگر پلیمر قالب ملکولی: از دو جنس گرافیت و طلا جهت ساخت بدنه میکروالکتروکود می‌توان استفاده نمود که در این پروژه باتوجه به محدودیت‌های موجود از الکتروکود گرافیت استفاده گردید. این میکروالکتروکود در غلافی از لوله کاپیلاری به شکل یک میکرووایر محبوس گردید و لوله شیشه ای کاپیلاری محتوی میکروالکتروکود گرافیت بصورت عمود بر سطح مقطع برش داده شد و بعد از برش سطح مقطع کوچکی از گرافیت رویت

ابتدا غلظت 10^{-5} مولار از اگزوتوکسین/استافیلوکوکوس/ارئوس تیپ A تهیه شده از کمپانی سیگما را بوسیله آب مقطر دوبار تقطیر تهیه شد. در روش پلیمر قالب ملکولی از مونومر متا اکریلیک اسید در دوزهای متعدد استفاده گردید. در این بررسی از نسبت‌های مونومر به سم مختلف شامل نسبت‌های 2، 4، 6، 8، 10 و 12 استفاده شد که در نهایت بعد از بررسی‌های انجام شده نسبت ده به یک از مونومر متا اکریلیک اسید به اگزوتوکسین به عنوان نسبت مناسب برای تولید قالب انتخاب شد (6). جهت تشکیل الگوی مناسب پلی مری در اطراف اگزوتوکسین و برای توزیع حلال پوشی مناسب از حجم حلال بیشتری استفاده گردید.

در روش پلی‌مراسیون رسوبی بر خلاف روش توده‌ای، از حجم حلال بیشتری استفاده می‌شود که با ایجاد فرصت هسته زایی منجر به تولید ذرات در ابعاد نانو می‌گردد. (در این روش معادل 38ml استفاده گردید) و سپس محلول به آرامی هم زده شد و از عامل پیوند دهنده عرضی اتیلن گلیکول متا کریلات به مقدار 11.32ml استفاده شد و همچنین به عنوان آغازگر واکنش پلی‌مراسیون، از آزوبیس ایزو بوتیرو نتریل به مقدار 10 میلی‌گرم استفاده شد. بلافاصله بعد از افزودن آغازگر از پرتودهی ماورابنفش برای تسریع واکنش پلی‌مراسیون استفاده شد. استفاده از اشعه ماورابنفش تشکیل رادیکال‌های آزاد و شروع پلی‌مراسیون را به دنبال دارد.

در نهایت بعد از انجام واکنش، پیوند کووالانسی بین مونومرهای متا اکریلیک اسید تشکیل شده و ذرات پلیمری سفید طیف حاصل گردید. همچنین پیوند هیدرونی بین اسید آمینه اگزوتوکسین و متا اکریلیک اسید بوجود می‌آید که عامل جذب انتخابی آن خواهد بود (شکل 1).



شکل 1. نمایش پیوندهای کووالانسی بین مونومرهای متا اکریلیک اسید و برهمکنش اگزوتوکسین با قالب ملکولی

وجود یا عدم وجود اگزوتوکسین باکتری مطرح گردیده است (14).

بررسی حساسیت حسگر: براساس مندرجات برگه آنالیز محلول اگزوتوکسین A باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* تهیه شده از کمپانی سیگما به ازای هر میکرولیتر حاوی 2 میلی گرم سم که در حجم ویال 200 میکرولیتری تهیه شده معادل 400 میلی گرم وزن سم می باشد. جهت محاسبه جرم ملکولی سم تجاری براساس مندرجات برگه آنالیز، هر یک میلی مول از سم دارای جرم ملکولی 202 میلی گرم بوده که در وزن محاسبه شده قبلی ویال، مقدار 2 میلی مول وجود دارد. براساس تعریف مولار، 2 میلی مول محلول حاصله را در 1 ml حل کرده و بدین ترتیب سم 1 مولار تهیه شده (7)، سم 1 مولار به دست آمده جهت حداقل رقتی که حسگر تفکیک می نماید به کار می رود.

با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر 1 ml از سم 1 مولار را با 9 ml آب مقطر دوبار تقطیر مخلوط شد و تا رقت 0/1 سم به دست می آید در ادامه مجدداً 1 ml از رقت قبلی را با 9 ml آب مقطر دوبار تقطیر ترکیب و رقت 0/01 به دست آمد و به همین ترتیب تا رقت 0/000001 تهیه گردید. لازم به ذکر است که جهت سهولت در کاربری حسگر و ورود الکتروود به درون محفظه برای تهیه این رقت ها از پلیت الیزا استفاده شده است.

سپس با استفاده از پتانسیومتر هر رقت توسط الکتروود دستگاه سنجیده، سپس در دستگاه اختلاف پتانسیل هر رقت ثبت گردید چنانچه با ورود میکروالکتروود از رقت اولیه به رقت بعدی میزان اختلاف پتانسیل 59 میلی ولت باشد طبق تعریف از رابطه نرست تبعیت می کند و پاسخ الکتروود در رقت بعدی قابل قبول بوده و بیشتر می شود ولی اگر هر رقتی با رقت رقیق شده بعدی دارای اختلاف پتانسیل 59 میلی ولت پر دیکید باشد طبق تعریف رابطه استاندارد شیب نرست یعنی حسگر به وجود اگزوتوکسین در آن رقت پاسخ داده است ولی اگر اختلاف پتانسیل هر رقتی با رقت قبلی یعنی رقت غلیظ تر خود کمتر از 59 میلی ولت باشد یعنی حسگر به آن رقت حساس نبوده و به عبارتی نتوانسته آن رقت را تشخیص بدهد (6).

طراحی نانوبیو حسگر مبتنی بر روش طیف سنجی: در این تحقیق از نانو ذرات سیلیکای با سایز متوسط 10 نانومتر (براساس برگه راهنمای کمپانی نوترینو) برای تشخیص سم باکتری استفاده شده است. به منظور تشخیص اگزوتوکسین

گردید که جهت تهیه غشا نازک پلی مری متصل روی سرالکتروود، استفاده گردیده شد (6).

تهیه غشا نازک پلی مری روی سطح مقطع الکتروود: مقدار 50mg پودر پلی ونیل کلراید را با مقدار 50 mg از یونوفور و مقدار معینی از افزودنی KTPCIPB (پتاسیم تتراکسیس پاراکلروفنیل بورات) به همراه 75 میلی گرم پلاستی سایزر مخلوط نموده و مخلوط حاصله را در حجم 5 ml حلال تتراهیدروفوران در بشر شیشه ای 25 ml حل نموده و در فضای آزمایشگاه جهت تبخیر حلال به مدت 20 دقیقه باقی می گذاریم تا محلول غلیظ روغنی همگن حاصل گردید برای تسریع در حصول این محلول از حرارت غیرمستقیم استفاده شد تا زمان کاهش یابد ولی نکته قابل توجه آن است که حرارت باید به نحوی باشد تا از به جوش آمدن محلول جلوگیری گردد (12).

برای ایجاد غشا نازک پلی مری روی سطح الکتروود: نوک غشا برش زده شده را در محلول غلیظ روغنی بالا به صورت لحظه ای فرو برده و خارج نموده در نهایت غشای تشکیل شده در سرالکتروود را به مدت 24 ساعت در مجاور هوای آزمایشگاه خشک نموده و به مدت 48 ساعت در محلول³⁻ 10 مولار سم *استافیلوکوکوس ارئوس* گذارده تا اگزوتوکسین به جایگاه طراحی شده قبلی اتصال یابد و بعد از گذشت این زمان و انجام اتصال به وسیله روش پتانسیومتری و بررسی شیب نرست به ادامه آزمون طراحی پرداخته شد (13).

اساس روش بر اساس سازوکار الکتروشیمیایی می باشد که در این واکنش پلیمر قابل ملکولی به عنوان یک اصلاحگر جهت بهبود خواص الکتروشیمیایی غشایی پلی ونیل کلراید بکار رفته است تا سم باکتری مربوطه را شناسایی نماید. جهت تشخیص اختلاف پتانسیل حاصل از وجود و یا عدم وجود سم باکتری از دستگاه pH/mV مترمدل 827 ساخت سوئیس استفاده شد، علت استفاده از این دستگاه، پتانسیم تتراکسیس پاراکلروفنیل بورات اندازه گیری پتانسیل الکتروود یون گزین طراحی شده می باشد این دستگاه دارای الکتروود مرجع Ag/AgCl اشباع شده با کلرید پتاسیم 3 مولار است که این الکتروود خود دارای پتانسیل معادل 0/222 ولت می باشد که این عدد هم تابعی از غلظت کلرید پتاسیم درون الکتروود می باشد که به عنوان اشباع کننده الکتروود هست، در نهایت اختلاف پتانسیل الکتروود Ag/AgCl با الکتروود PVC عددی می باشد که در نتایج به عنوان پاسخ حسگر ناشی از

(TEOS) (4 ml) + mixture [ammonium hydroxide (3.3 ml) + ethanol (47 ml)] Stirring reaction was continued 24 h silica colloidal dispersion vigorously stirring +APTES (0.3 ml) mixture was stirred overnight. nanoparticle was purified by centrifugation and redispersion in ethanol. (repeated three times).

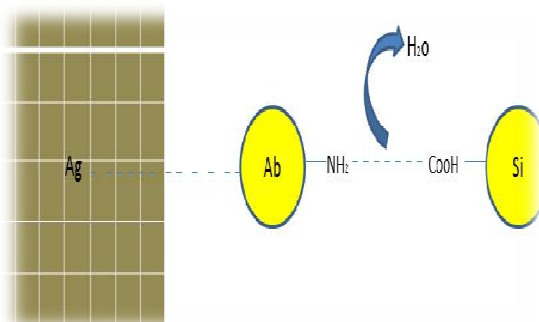
شکل 3. فرمولاسیون روش استوربر جهت اصلاح کردن نانوسیلیکای مصرفی در حسگر

روش اصلاح شده استوربر: مطابق شکل شماتیک 3، ابتدا 4ml از تترااتوکسی سیلان به مخلوطی شامل 3/3ml هیدروکسید آمونیم و 47ml اتانول افزوده شده و محیط واکنش در دمای آزمایشگاه طی 24 ساعت روی یک همزن مغناطیسی بهم زده شد به طوری که مخلوط کلوئیدی سیلیکا در پایان قابل مشاهده است. سپس 0/3 ml واکنشگر APTES به محیط واکنش افزوده شد و به مدت یک شبانه روز عمل اختلاط روی همزن در دمای 25°C انجام شد. بدین ترتیب سطح نانو ذرات سیلیکای تولیدی به گروه آمین تغییر می یابد و اصطلاحاً آمین دار می شود. برای تغییر گروه آمینی به گروه اسید کربوکسیلیک، یک گرم از نانوذرات سیلیکای آمین دار شده در حلال 50 ml از حلال دی متیل فرم آمید در داخل فلاسک دیسپرس گردید. سپس نیم گرم سوکسینیک انیدرید و 5 ml تری اتیل آمین به فلاسک مذکور افزوده شد. این مخلوط در داخل یک همزن تحت دمای 70°C به مدت 20 ساعت بهم زده شد. بدین ترتیب سطح نانو ذرات تولیدی به شکل اصلاح شده با عامل کربوکسیلیک اسید در خواهد آمد. این ذرات بایستی طی چند مرتبه دیسپرس شدن (در معرض سونیکیتور باکمک امواج ماوراصوت) در حلال دی متیل فرمامید و سانتریفیوژ شدن به طور کامل شسته شوند (11-18-19).

بررسی حساسیت حسگر: جهت بررسی حساسیت حسگر مقدار گرم نانوسیلیکا و نیز غلظت آنتی بادی و در نهایت آنتی ژن تغییر یافته و به بررسی افزایش و یا کاهش حساسیت حسگر در هر یک از مراحل مذکور پرداخته شد در ابتدا نانوذرات عامل دار شده تولیدی در مرحله قبل که مستعد اتصال به آنتی بادی هستند، در معرض رقت های متفاوت آنتی بادی قرار گرفتند. اتصال گروه کربوکسیلیک از نانوذرات به گروه آمینی از پایانه آمینی آنتی بادی در این مرحله مدنظر است. بدین منظور 5 میلی گرم از نانوذرات

از پیوند دهی نانو ذرات با آنتی بادی به عنوان مبنای عامل تشخیصی استفاده گردید. علت استفاده از ذرات نانوسیلیکا، عوامل هیدروکسیل در سطح ذرات این پارسیکل می باشند (به عبارتی بهتر به علت سطح اصلاح شونده ای که دارا هستند). بعد از اصلاح به روش استوربر می توان، عامل هیدروکسیل را به عامل آمین و متعاقب آن به کربوکسیل تبدیل کرد که پودر جامد نانوسیلیکا بعد از اصلاح به صورت مایع تبدیل می شود و بعد خشک گردیده و جهت اتصال به آنتی بادی استفاده می گردد (8).

برای پیوند نانو ذرات با آنتی بادی از روش اصلاح سطح نانو ذرات سیلیکا استفاده شده است. بدین ترتیب که از تثبیت مستقیم آنتی بادی روی نانو ذرات سیلیکای عامل دار شده با کربوکسیلیک اسید استفاده شده و در واقع مجموعه ای از اتصال نانو ذره اصلاح شده به آنتی بادی ارائه شده است. این بیو حسگر از مزایایی همچون کوتاه بودن زمان آنالیز و حساسیت در تشخیص سم برخوردار است، همچنین از روش اصلاح شده استوربر (10-15-17) برای تهیه نانو ذرات سیلیکای اصلاح شده استفاده شده است. براساس این روش نانو ذرات سیلیکای حاوی عامل آمین به عنوان پیش ماده استفاده شده و تولید نانو ذرات مورد نظر با گروه عاملی کربوکسیلیک اسید در بستری از حلال DMF (دی متیل فرمامید) انجام گرفته است. بررسی ها نشان می دهد که نانو ذرات از ویژگی های منحصر به فردی در کاربردهای بیوانالیز و بیوتکنولوژی برخوردارند. روش نوین اصلاح نانو ذرات توصیف شده در این تحقیق به تشکیل یک پیوند آمیدی بین نانو ذره و پروتئین آنتی بادی منجر شده است. این پیوند از طریق یک واکنش فعال استری بین گروه آمینی زنجیره آنتی بادی و عامل کربوکسیلیک اسید صورت می گیرد، مراحل مربوطه در شکل 3 و 2 نمایش داده شده است (12).



شکل 2. نمای شماتیک اتصال آنتی بادی متصل شده به نانوسیلیکای اصلاح شده

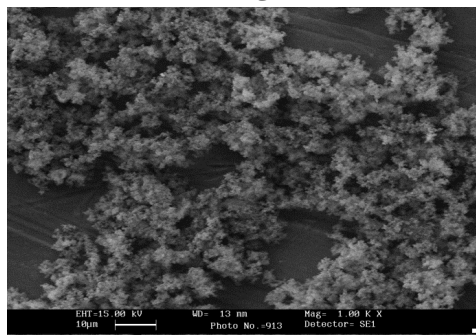
مولار، اختلاف عددی 59 میلی ولت مشهود بوده ولی از رقت 3- به بعد تفاضل اختلاف پتانسیل معادل 59 میلی ولت نمی باشد و حسگر قادر به تفکیک این رقت از رقت‌های رقیق تر نیست. لذا براساس نتایج حاصله رقت 3- حداقل رقت می باشد که نانو حسگر در آب مقطر قادر به تشخیص سم می باشد.

جدول 1. اختلاف پتانسیل‌های حاصل در رقت‌های متعدد از سم باکتری

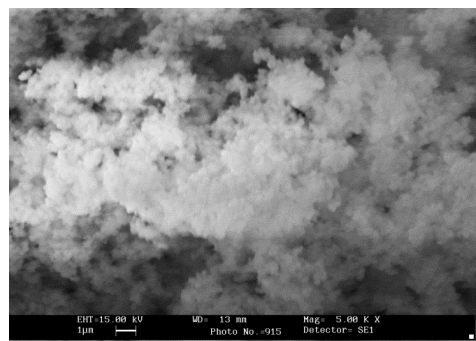
استافیلوکوکوس ارئوس		
رقت ها 10^{-1}	ولتاژ 107mV	ردیف
10^{-2}	166mV	1
10^{-3}	226mV	2
10^{-4}	269mV	3
10^{-5}	338mV	4
10^{-6}	365 mV	5

نتایج تصاویر بزرگنمایی حاصل از میکروسکوپ:

تصاویر میکروسکوپ الکترونی ذرات پلیمر قالب ملکولی در شکل‌های 4 تا 7 مشاهده می شود.



شکل 4. تصویر میکروسکوپ الکترونی ذرات پلیمر قالب ملکولی (MIP Molecularly imprinted polymer) با بزرگنمایی 1/00 KX با قطر ذرات 10 میکرومتر در مقیاس نشان داده شده



شکل 5. تصویر میکروسکوپ الکترونی ذرات پلیمر قالب ملکولی (NIP Molecularly imprinted polymer) با بزرگنمایی 1/00 KX با قطر ذرات 10 میکرومتر در مقیاس نشان داده شده

اصلاح شده در داخل 5 ml از رقت‌های مختلف آنتی بادی قرار گرفت و عملیات اختلاط آرام به مدت 10 دقیقه انجام شد. از رقت‌های 1/5 ، 1/10 ، 1/20 و 1/40 آنتی بادی استفاده گردید. پس از پایان عملیات اتصال، به هر کدام از محلول‌های فوق، محلول 10^{-3} مولار سم افزوده شد و پس از یک اختلاط آرام یک دقیقه ای در داخل لوله آزمایش، محلول کروموزن به آن افزوده شد و شدت تغییر طیف هر یک در طول موج 520 نانومتر (باتوجه به طیف رنگی قرمز و نارنجی از طیف هفت رنگ در این طول موج بررسی گردید) دنبال گردید.

به منظور افزایش میزان حساسیت حسگر، مقدار گرم پودر نانوسیلیکای مصرفی افزایش داده شد بدین ترتیب که مقدار 6 و 8 و 10 میلی گرم نانوسیلیکای عامل دار به روش استوربر تهیه و مطابق مراحل بالا آماده اتصال به آنتی بادی گردید سپس سوسپانسیون حاصل از نانوسیلیکای عامل دار متصل به آنتی بادی باکتری را در مجاورت نمونه‌های آب مقطر آلوده به سم باکتری / استافیلوکوکوس ارئوس با غلظت 10^{-3} قرار داده تا در صورت وجود سم در نمونه، اتصال بین آنتی ژن سم با آنتی بادی انجام گیرد در نهایت در مرحله بعد بوسیله اسپکتروفتومتری نتایج حاصل از جذب نوری ناشی از ماده کروموزن در حسگرهای حاوی گرم‌های متفاوت از نانوسیلیکا بررسی گردید (13).

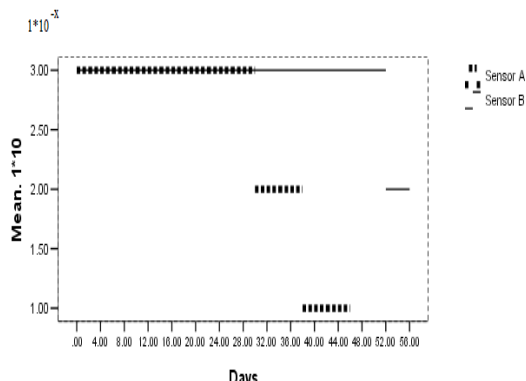
در پایان به منظور بررسی آخرین پارامتر احتمالی در طراحی این حسگر به بررسی رقت‌های متفاوت سم پرداخته شد یعنی در این بخش مقدار گرم معین از نانوسیلیکا که متصل شده با مقدار ایده آل به دست آمده از آنتی بادی در مرحله قبل می باشد در معرض رقت‌های متفاوت سم باکتری قرار داده شد تا حداقل مقدار قابل تشخیص این حسگر با مقدار نانوسیلیکا و آنتی بادی به دست آمده تعیین گردد.

تعیین طول عمر حسگر: منظور از تعیین طول عمر حسگر این است که هر یک از حسگرهای مبتنی بر پلیمر قالب ملکولی و یا حسگر حاصل از اتصال آنتی بادی باکتری به نانوسیلیکا تا طول عمر حسگر (Life Time) چه محدوده‌ای از زمان خصوصیات تشخیصی خود را حفظ می نمایند یا به عبارتی بهتر توانایی تشخیص سم را دارند که این مهم به مدت 2 ماه هر 4 روز یکبار انجام یافت (14).

• یافته‌ها

نتایج حساسیت حسگر پلیمر قالب ملکولی: همان گونه که در جدول 1 مشاهده می گردد در رقت‌های 2- و 3-

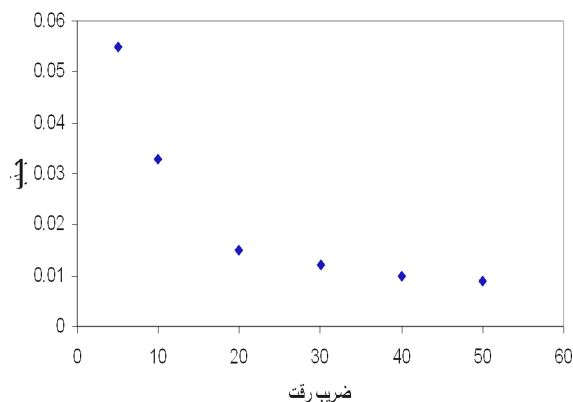
بیانگر این رخداد می‌باشد لذا براساس 8 سی سی از آب به دست آمده از واکنش، مقدار پودر مصرفی 8 گرم بوده و بیشتر از این مقدار تاثیری در واکنش استری فی ما بین نخواهد داشت.



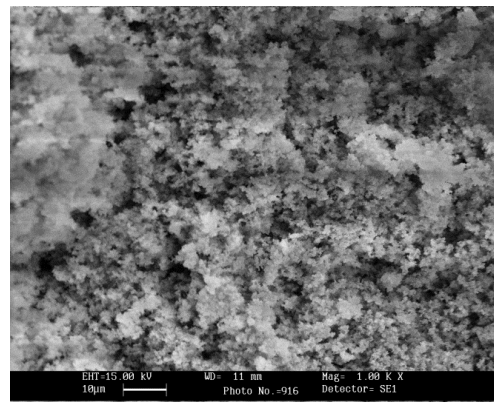
شکل 8. مقایسه کمترین حد جداسازی شده در حسگر بر اساس گذشت زمان طول عمر

نتایج حاصل از حساسیت حسگر دوم بر اساس پارامتر آنتی‌بادی: نتایج حاکی از آن است که مقدار جذب نوری در محور عمودی از رقت 1/20 به بعد کاهش داشته و از 0/01 تقلیل می‌یابد و کاهش مقدار جذب حاکی از عدم اتصال آنتی‌بادی در رقت‌های رقیق‌تر می‌باشد.

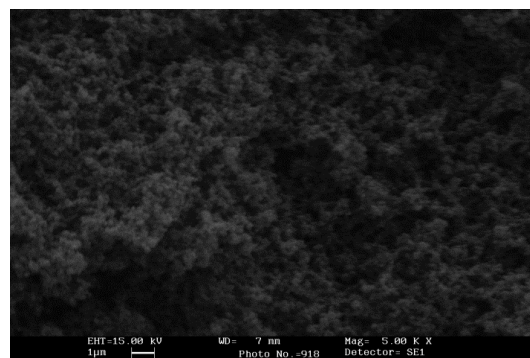
شکل 9 زیر تغییرات شدت جذب را بر حسب رقت‌های مختلف آنتی‌بادی نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل ملاحظه می‌شود تا رقت 1/20 منحنی جذب به صورت خطی است و حداکثر ظرفیت نانوذرات اصلاحی برای اتصال به آنتی‌بادی در رقت 1/20 دیده می‌شود (شکل 9).



شکل 9. تغییرات جذب سیستم تشخیصی سم در حضور نانوذرات اصلاح شده بر حسب ضریب رقت آنتی‌بادی



شکل 6. تصویر میکروسکوپ الکترونی ذرات پلیمر قالب ملکولی (MIP: Molecularly imprinted polymer) با بزرگنمایی 1/00 KX با قطر ذرات 10 میکرومتر در مقیاس نشان داده شده



شکل 7. تصویر میکروسکوپ الکترونی ذرات پلیمر غیر قالب ملکولی NIP: Non-imprinted polymer با بزرگنمایی 5/00 KX با قطر ذرات 2 میکرومتر

نتایج مربوط به پایداری حساسیت حسگرها: نتایج حاصل از بخش دوم پروژه در خصوص تحلیل میزان حساسیت حسگر براساس گذشت زمان حاکی از آن است که حسگر در روز 30 به بعد نسبت به پاسخ نسبت به اتصال به آنتی‌ژن رو به کاهش رفته در حالی که حسگر دوم (با درصد بالاتر از مونومرهای متاکریلیک اسید) تا 52 روزگی نسبت به تشخیص سم پاسخ مثبت داده و بعد از این زمان به مرور رو به کاهش رفته است، لذا نتایج مذکور حاکی از آن است که حسگر دوم دارای زمان مصرف بیشتری نسبت به حسگر نوع اول می‌باشد (شکل 8).

نتایج حاصل از حساسیت حسگر طیف‌سنجی بر اساس مقدار پارامتر نانوسیلیکا: براساس نتایج به دست آمده مقدار 8 میلی‌گرم از پودر نانوسیلیکا دارای اتصال بیشتر با عامل آمین آنتی‌بادی بوده که خروج ملکول‌های آب به دست آمده از واکنش استری بین گروه آمین و کربوکسیل

بر اساس جدول شماره 2 چنین بنظر می‌رسد که احتمال شناسایی سم توسط حسگر پتانسیومتری به میزان $84/38 \pm 36/89$ برابر به مراتب کمتر از حسگر طیف سنجی به میزان $93/75 \pm 24/59$ برابر بر اساس (انحراف از معیار \pm میانگین) می‌باشد (6).

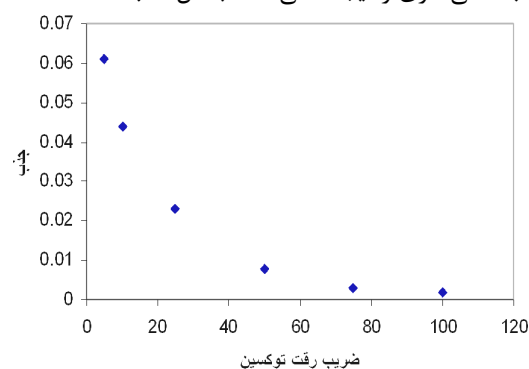
بر اساس نتایج جدول شماره 3 و از آنجایی که تعداد نمونه‌های مثبت جدا شده سم در حسگر پتانسیومتری و طیف‌سنجی به ترتیب 27 و 30 از 32 نمونه کل بوده است، مقدار حد معنی داری برای حسگر اول $P=0/211$ و موید آن است که احتمال شناسایی سم توسط حسگر پتانسیومتری از مقدار مفروض 90% کمتر است و فرض صفر دلالت بر کوچک بودن این نسبت از مقدار 0/9 دارد.

از طرفی حد معنی داری برای حسگر طیف سنجی $P=0/0$ بوده و فرض صفر دلالت بر بزرگ یا حداقل مساوی بودن این نسبت از مقدار 0/9 دارد. لذا چنین نتیجه‌گیری می‌کنیم که حسگر طیف‌سنجی احتمال جداسازی سم را در حداقل 90% موارد خواهد داشت.

نتایج حاصل از حساسیت حسگر دوم بر اساس پارامتر

آنتی‌ژن: باتوجه به نتایج به دست آمده در مرحله قبل، آزمایشات تشخیص سم در رقت 1/20 ثابت اتصال آنتی بادی به نانوذره ادامه یافت و رقت‌های مختلف سم شامل 1/5، 1/10، 1/25، 1/50، 1/75 و 1/100 در تماس با محیط ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت.

به عبارتی با حفظ مقدار 8 گرم نانوسیلیکای اصلاح شده و متصل به رقت 1/20 آنتی بادی، رقت‌های متفاوت اگزوتوکسین تحلیل گردید، همان طور که در این شکل ملاحظه می‌شود سامانه تشخیصی حسگر قادر به ردیابی سم تا رقت 1/78 با دقت بالا می‌باشد و رقت‌های بیشتر پاسخ جذب معنی داری را ایجاد نمی‌کند (شکل 10).



شکل 10. تغییرات جذب سیستم تشخیصی سم در حضور نانوذرات اصلاح شده بر حسب ضریب رقت سم

جدول 2. آماره‌های توصیفی در خصوص مقایسه دو حسگر پتانسیومتری و طیف‌سنجی

GROUP	Mean	Standard deviation	minimum	maximum	N
Sensor A	.8438	.36890	.00	1.00	32
Sensor B	.9375	.24593	00	1.00	32

جدول 3. بررسی نتایج آزمون Binominal در دو حسگر پتانسیومتری و طیف‌سنجی

GROUP		Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Asymp. Sig. (1-tailed)
Sensor A	S	Group 1	YES	27	.8	.211 ^a
		Group 2	NO	5	.2	
		Total		32	1.0	
Sensor B	S	Group 1	NO	2	.1	.000 ^a
		Group 2	YES	30	.9	
		Total		32	1.0	

• بحث

استافیلوکوکوس ارئوس طراحی شد که از نظر نوع سنسور متفاوت با سنسورهای کاربردی در این تحقیق می‌باشد ولیکن از لحاظ جرم باکتری استاف متشابه تحقیق انجام شده می‌باشد و لازم به ذکر است که مدت زمان تشخیص کمتر از 30 دقیقه بوده که در مقایسه با نتایج حاصله زمان تشخیص هر دوسنسر یکسان می‌باشد ولیکن طول عمر سنسور دوماه بوده که در مقایسه با سنسور پلیمر قالب ملکولی زمان بیشتری قابل استفاده بوده ولی در مقایسه با سنور نانوسیلیکا برابر می‌باشد.

در کل در خصوص تعداد 32 نمونه آب مقطر آلوده به سم باکتری استافیلوکوکوس ارئوس تیپ A بوسیله حسگر پلیمر قالب ملکولی تعداد 27 نمونه تشخیص کیفی داده شد ولی در خصوص حسگر مبتنی بر اتصال آنتی‌بادی به نانوسیلیکا از تعداد 32 نمونه مذکور تعداد 30 نمونه با حداقل غلظت قابل تشخیص معادل 10^{-3} مولار تشخیص کمی و کیفی داده شد.

در این طرح، بررسی‌ها به طور کلی نشان می‌دهد که نانو ذرات از ویژگی‌های منحصر به فردی در کاربردهای بیوانالیز و بیوتکنولوژی برخوردارند. روش نوین اصلاح نانو ذرات توصیف شده در روش اتصال آنتی‌بادی به نانو پارتیکل به تشکیل یک پیوند آمیدی بین نانو ذره و اگزوتوکسین پروتئین منجر شده است. این پیوند از طریق یک واکنش فعال استری بین گروه آمینی زنجیره اگزوتوکسین و عامل کربوکسیلیک اسید صورت می‌گیرد.

این نانوبیو حسگر از مزایایی همچون کوتاه بودن زمان آنالیز و حساسیت بیشتر در تشخیص سم برخوردار است. ولیکن از جمله معایب این متد طراحی می‌توان به مورد زیر اشاره نمود که در برخی مواقع که به دلیل از دست رفتن توانایی برخی آنتی‌بادی‌ها برای پیوند با آنتی‌ژن به دلیل درگیر بودن با نانو ذرات سیلیکا مقدار حساسیت سامانه تشخیصی با محدودیت مواجه است در اینجا فاکتور تعیین کننده در حساسیت حسگر خود آنتی‌بادی است نه غلظت اگزوتوکسین در شرایطی که آنتی‌بادی به میزان کمتر از مقدار ذکر شده در طراحی استفاده گردد با نانو سیلیکای اصلاح شده باند می‌شود ولی توانایی اتصال به آنتی‌ژن یا همان سم بعلت درگیری با نانو سیلیکا کاهش می‌یابد (12) که در این زمان سبب کاهش میزان حساسیت حسگر می‌گردد. در اکثر مواقع که مشکلی از لحاظ وجود آنتی‌بادی

امروزه استفاده از تکنیک‌های سریع و حساس تشخیص پاتوژن‌های منتقله از طریق مواد غذایی از اهمیت خاصی برخوردارند. از آنجا که در مورد بسیاری از عوامل بیماری‌زای منتقله از طریق مواد غذایی با غلظت‌های بسیار کم آلودگی مواجه هستیم، بنابراین برای اطمینان از سلامت مواد غذایی به روش‌های سریع و حساس تشخیص نیازمندیم (7).

روش‌های تشخیص سم در مواد غذایی نیاز به آماده سازی مقدماتی نمونه‌ها و استخراج سم بوده که بسیار خسته کننده و زمان بر هستند در حالی که استفاده از بیو حسگرها هم حساسیت آزمون را افزایش داده و هم زمان تشخیص را کاهش می‌دهد و این در حالی است که از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشند (12).

یکی از مزایای بسیار مهم این روش می‌توان به پایش مستقیم نتایج بصورت آنلاین در سیستم‌های مدیریت کنترل کیفیت غذا اشاره نمود، لذا در زمان به عنوان فاکتور تعیین کننده در کیفیت محصول صرفه جویی می‌گردد (8).

در بسیاری از موارد جرم باکتری که به وسیله روش‌های مذکور و قدیمی قابل تشخیص است. به علت رقابت پاتوژن‌های دیگر و یا عوامل محیطی همچون دما و محیط اسیدی و غیره از بین می‌رود و سم باکتری که ممکن است به دما مقاوم باشد باقی می‌ماند که حسگر توانایی تشخیص در این موارد را به تنهایی داشته و کمک بسزایی به محققین و متخصصان کنترل کیفیت در سیستم‌های مدیریت ایمنی غذا می‌نماید. در جمع بندی موارد مذکور سرعت و دقت و شرایط تشخیص از جمله عوامل مهم در برتری حسگرها نسبت به روش‌های پیشین و مرسوم در کنترل کیفیت صنایع غذایی می‌باشد (1، 2).

بر اساس مطالعه Wu S, Zhang L و همکاران در سال 2011 برای تشخیص سموم ارگانوفسفره در پساب فاضلاب‌های صنعتی با استفاده از سنسور مبتنی بر نانوذرات سیلیکا توانستند در مدت زمان کمتر از 8 دقیقه با شیب خطی 10^{-9} را تفکیک نمایند، این در حالی است که در مقایسه با سنسور دوم تحقیق مذکور از شیب معنی‌داری برخوردار بوده و زمان تشخیص نیز بسیار کمتر می‌باشد که می‌توان با استفاده از سایز پایین تر نانوذرات میزان سرعت رسانش را افزایش داد.

در مطالعه دیگری توسط Ghosh G در سال 2006 بیوسنسر نوری جهت تشخیص سم آلفا باکتری

دست رفتن حساسیت آنها اشاره نمود این امر در خصوص هر دو نوع حسگر صادق است ولی کاهش حساسیت در حسگر نوع پتانسیومتری به مراتب مشهود تر از نوع نانوسیلیکا براساس گذشت زمان می باشد لذا براساس تحقیقات انجام شده و مرور متون علمی معتبر حسگر طراحی شده براساس اتصال آنتی بادی به نانوذره دارای حساسیت بالاتر و قیمت تمام شده کمتر و طول عمر بیشتر و ترکیبات مخرب کمتر از لحاظ محیط زیست و سلامت انسان می باشد ولی مقدار و نوع خلوص آنتی بادی در تعیین حساسیت و طول مصرف حسگر بسیار حائز اهمیت می باشد (14، 13).

به طور کلی ساخت بیو حسگر هایی که مبتنی بر استفاده از اتصال آنتی بادی به نانوذره هستند نیاز به دانش فنی و نیروی متخصص برای اتصال هدفمند آنها به آنتی بادی است. تولید نانوذرات مصرفی هم بسیار فنی و تخصصی است که البته در این تحقیق بصورت آماده و تجاری استفاده گردیده شد و خرید آنها مستلزم صرف هزینه زیادی بر اساس نوع آن می باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان کمال تشکر و قدردانی را از بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و اداره کل آزمایشگاههای مرجع وزارت بهداشت (آزمایشگاه فرآورده های نانو)، آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات تهران به جهت مساعدت های لازم در جهت اجرای این پروژه اعلام می دارند.

نداشته باشیم میزان حساسیت این نوع حسگر در مقایسه با حسگر پلیمر قالب ملکولی بسیار بالاتر ودقیق تر می باشد، در بخش دوم مقایسه می توان به هزینه تمام شده حسگر با در نظر داشتن خصوصیات میکروبی حسگر اشاره نمود. حسگر پلیمر قالب ملکولی هزینه بسیار زیادی جهت طراحی اولیه نیاز دارد ولی در شبیه سازی آن و در نهایت تولید انبوه این نقیصه مرتفع می گردد. ولی هزینه تمام شده حسگر طراحی شده براساس اتصال آنتی بادی به نانو ذره به مراتب ایده آل تر بوده و تابعی از نوع نانو پارتیکل استفاده شده و نوع آنتی ژن و آنتی بادی مصرفی از باکتری و یا هر نوع سوش پاتوژن می باشد.

ساخت حسگرهای پتانسیومتری مبتنی بر پلیمرهای قالب مولکولی از نظر دستگاهی کاملاً مقرون به صرفه و ارزان است ، پس از ساخت حسگر، به کمک یک دستگاه پتانسیومتر ساده می توان آزمایش مورد نظر را انجام داد به عبارتی دیگر ترکیبات لازم برای ساخت حسگر گران قیمت ولی دستگاه لازم جهت تشخیص و اعلام نتایج بسیار ساده و قابل دسترس می باشد ، اما مواد شیمیایی مورد استفاده در ساخت حسگر اغلب خطرناک بوده و آلاینده محیط زیست محسوب می شوند که از بعد سازمان جهانی محیط زیست EPA ترکیبات بکار رفته در حسگر آنتی بادی متصل به نانوذره برخلاف حسگر پلیمر قالب مولکولی دوستار محیط زیست بوده و ترکیبات شیمیایی کمتری مصرف می گردد در مقایسه با ترکیبات حسگر روش اول، ضمن این که مواد مورد استفاده در ساخت اجزای تشکیل دهنده حسگر اول بسیار گران قیمت بوده و هزینه ساخت آن را بالا می برند. از معایب دیگر این نوع بیو حسگر می توان به کوتاه بودن عمر آنها و از

References

- Campbell K, Rawn DF, Niedzwiadek B, Elliott CT. Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin binders for optical biosensor technology: problems and possibilities for the future: a review. Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. 2011;28(6):711-25.
- Chen H, Hu QY, Yue Z, Jiang JH, Shen GL, Yu RQ. Construction of supported lipid membrane modified piezoelectric biosensor for sensitive assay of cholera toxin based on surface-agglutination of ganglioside-bearing liposomes. Analytica chimica acta. 2010;657(2):204-9.
- Chen H, Zheng Y, Jiang JH, Wu HL, Shen GL, Yu RQ. An ultrasensitive chemiluminescence biosensor for cholera toxin based on ganglioside-functionalized supported lipid membrane and liposome. Biosensors & bioelectronics. 2008;24(4):684-9.
- Ghosh G, Bachas LG, Anderson KW. Biosensor incorporating cell barrier architectures for detecting Staphylococcus aureus alpha toxin. Analytical and bioanalytical chemistry. 2007;387(2):567-74.
- Chilton M, Black MM, Berkowitz C, Casey PH, Cook J, Cutts D, et al. Food insecurity and risk of poor health among US-born children of immigrants. American journal of public health. 2009;99(3):556-62.
- Mashhadizadeh MH, Talemi RP. Used gold nanoparticles as an on/off switch for response of a

- potentiometric sensor to Al(III) or Cu(II) metal ions. *Analytica chimica acta*. 2011;692(1-2):109-15.
7. Xu G, Xia JH, Zhou H, Yu CZ, Zhang Y, Zuo KJ, et al. Interleukin-6 is essential for Staphylococcal exotoxin B-induced T regulatory cell insufficiency in nasal polyps. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(6):829-37.
 8. Ferro Y, Perullini M, Jobbagy M, Bilmes SA, Durrieu C. Development of a biosensor for environmental monitoring based on microalgae immobilized in silica hydrogels. *Sensors*. 2012;12(12):16879-91.
 9. Wu S, Zhang L, Qi L, Tao S, Lan X, Liu Z, et al. Ultra-sensitive biosensor based on mesocellular silica foam for organophosphorous pesticide detection. *Biosensors & bioelectronics*. 2011;26(6):2864-9.
 10. Murphy-Perez E, Arya SK, Bhansali S. Vapor-liquid-solid grown silica nanowire based electrochemical glucose biosensor. *The Analyst*. 2011;136(8):1686-9.
 11. Shimomura T, Sumiya T, Ono M, Ito T, Hanaoka TA. Amperometric L-lactate biosensor based on screen-printed carbon electrode containing cobalt phthalocyanine, coated with lactate oxidase-mesoporous silica conjugate layer. *Analytica chimica acta*. 2012;714:114-20.
 12. Babu E, Mareeswaran PM, Rajagopal S. Highly sensitive optical biosensor for thrombin based on structure switching aptamer-luminescent silica nanoparticles. *Journal of fluorescence*. 2013;23(1):137-46. Epub 2012/09/12.
 13. Shen J, Yang X, Zhu Y, Kang H, Cao H, Li C. Gold-coated silica-fiber hybrid materials for application in a novel hydrogen peroxide biosensor. *Biosensors & bioelectronics*. 2012;34(1):132-6.
 14. Li Y, Zhang L, Li M, Pan Z, Li D. A disposable biosensor based on immobilization of laccase with silica spheres on the MWCNTs-doped screen-printed electrode. *Chemistry Central journal*. 2012;6(1):103.
 15. Shimomura T, Sumiya T, Ono M, Ito T, Hanaoka TA. A novel, disposable, screen-printed amperometric biosensor for ketone 3-beta-hydroxybutyrate fabricated using a 3-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase-mesoporous silica conjugate. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2013;405(1):297-305.
 16. Kell AJ, Page L, Tan S, Charlebois I, Boissinot M, Leclerc M, et al. The development of a silica nanoparticle-based label-free DNA biosensor. *Nanoscale*. 2011;3(9):3747-54.
 17. Chung SH, Son SJ, Min J. Nano barcoding cell-based biosensor using fluorophor-embedded silica nanotubes. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2011;11(5):4419-23.
 18. Choi O, Kim BC, An JH, Min K, Kim YH, Um Y, et al. A biosensor based on the self-entrapment of glucose oxidase within biomimetic silica nanoparticles induced by a fusion enzyme. *Enzyme and microbial technology*. 2011;49(5):441-5.
 19. Yu J, Ge L, Dai P, Ge S, Liu S. A novel enzyme biosensor for glucose based on rhodanine derivative chemiluminescence system and mesoporous hollow silica microspheres receptor. *Biosensors & bioelectronics*. 2010;25(9):2065-70.

Comparison of potentiometry and spectroscopy-based modified nanoparticles linked to antibodies for detection of *Staphylococcus aureus* exotoxin

Ahari H^{*1}, Razavilar V², Akbari B³, Motallebi AA², Anvar A⁴, Mohammadi N⁵

1- * Corresponding Author: Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Email: Dr.H.Ahari@gmail.com

2- Prof, Dept. of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Associate prof, Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Organization, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

4- Lecturer, Dept. of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

5- M.Sc in Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received 28 Jun, 2013

Accepted 17 Oct, 2013

Background and Objective: With the advent of nanotechnology, selective and smart sensors have revolutionized quality control of food products. They can identify the volume and toxicity of the bacteria in moments with very high precision. The present study designed a new nano-biosensor to detect *Staphylococcus aureus* exotoxin.

Material and Methods: In the new technique, a molecular framework and polymer were produced using meta-acrylic acid monomers. The sensor was then used based on the bacterial antibody connection to the nanoparticle. The suspension produced from agent-linked nanosilica connected to bacterial antibodies was positioned near samples of distilled water contaminated with *Staphylococcus aureus* bacterial toxin with a density of 10^{-3} . When toxin was detected in the sample, a connection formed between the toxin antigen and antibody.

Results: The results indicate that the molecular framework polymer sensor was capable of detecting a minimum density of 10^{-3} . The nano silica sensor was sensitive to a minimum sensitivity of 10^{-4} . The sensitivity of the sensors was examined for 60 d; the first sensor confirmed the results at 28 d and the second sensor at 56 d and began to decrease thereafter.

Conclusion: Compared to conventional methods, such as cultures, and biotechnical methods, such as polymerase chain reaction, practical nano-biosensory is accurate, sensitive and unique. It decreases detection time from hours to 30 min.

Keywords: Nanobiosensor, *Staphylococcus aureus* exotoxin, Potentiometry, Spectroscopy