Journal of Police Medicine

Fall 2016; Vol. 5, No. 3: 177-186

Original Article

Colorimetric Detection of TNT Using Aptasensor based on Gold-nanoparticle

Received: 14 August 2016 **Revised:** 26 September 2016 **Accepted:** 3 October 2016

Hossein Barkheh[1]
Mehdi Zeinoddini[2]
Bijan Ranjbar[1*]

[1]Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[2]Department of Bioscience and Biotechnology, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Background: Current study is aimed at designing and producing gold-nanoparticle based aptasensor for colorimetric detection of trinitro toluene (TNT).

Materials and Methods: Gold-nanoparticles have a wide range of application in designing biosensors for their special and highly sensitive plasmonic characteristics. In the present study, TNT molecule has been detected by designing and producing gold nanoparticle based aptasensor. After synthesizing gold nanoparticles and functionalizing them by ssDNA aptamer having 52 nucleotides, aptasensor performance for detecting target molecule was evaluated. Techniques such as dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscope and UV-Vis spectrophotometer were used to characterize the size and shape of nanoparticles, functionalizing them by aptamer, and also their sensitivity to detect target.

Results: UV-Vis spectrophotometer, DLS, and TEM microscopy tests indicated that gold nanoparticles were synthesized with excellent quality and average size of 40 nm. TNT molecule was colorimetric detected with sensitivity of 15 nanomolar using gold nanoparticle based aptasensor.

Conclusion: According to the results it can argue that the strategy promises a novel method in detection due to wide range of such aptasensors detection. .

Keywords: aptasensor, TNT, gold nanoparticles, colorimetric detection.

[*]**Corresponding Author:**
Bijan Ranjbar
Tel: (+98)2182883418
email: ranjbarb@modares.ac.ir

پاییز ۱۳۹۵- دوره ۵- شماره ۳- صفحات ۱۸۶-۱۷۷

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

تشخیص کالریمتریک TNT با استفاده از آپتاسنسور بر پایه نانو ذرات کروی طلا

تاریخ دریافت: ۲۴ مرداد ۱۳۹۵ **تاریخ اصلاح:** ۵ مهر ۱۳۹۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۲ مهر ۱۳۹۵

چکیده

مقدمه: تحقیق حاضر با هدف طراحی و ساخت آپتاسنسور بر پایه نانو ذرات کروی شکل طلا به‌منظور تشخیص TNTبه صورت کالریمتریک صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها: نانو ذرات کروی شکل طلا با دارا بودن خواص پلاسمونیک ویژه و بسیار حساس کاربردهای زیادی در طراحی زیست‌حس‌گرها دارا می‌باشند. در تحقیق حاضر با طراحی و ساخت آپتاسنسور بر پایه نانو ذرات کروی شکل طلا به شناسایی مولکول TNT پرداخته شده است. پس از سنتز نانو ذرات طلا و فعال نمودن سطح آن‌ها با استفاده از توالی آپتامری از جنس DNA تک رشته و ۵۲ نوکلئوتیدی کارایی آپتاسنسور ساخته‌شده جهت تشخیص مولکول هدف مورد ارزیابی قرار گرفت.

اندازه نانو ذرات کروی شکل طلا، شکل آن‌ها، فعال‌سازی سطح آن‌ها با آپتامر، حساسیت و اختصاصیت تشخیص TNT با استفاده از تکنیک‌های پراکندگی نور دینامیک (DLS)، میکروسکوپ الکترونی عبوری و طیف‌سنج مرئی- فرابنفش مورد بررسی قرار گرفته است.

یافته‌ها: آزمون‌های طیف‌سنج مریی- فرابنفش، DLS و میکروسکوپ الکترونی TEM همگی نشان‌دهنده سنتز این نانو ذرات با کیفیت سنتز عالی و در اندازه میانگین ۴۰ نانومتری بودند. با استفاده از آپتاسنسور طراحی شده بر پایه نانو ذرات کروی شکل طلا، مولکول TNT با حساسیت در حد ۱۵ نانومولار و نیز اختصاصیت تشخیص بالا به صورت کالریمتریک تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق مذکور می‌توان گفت به دلیل دامنه وسیع تشخیصی این‌گونه از آپتاسنسورها استراتژی بکار گرفته شده نویدبخش راهی نوین در روش های تشخیصی خواهد بود.

کلید واژه‌ها: آپتاسنسور، TNT، نانو ذرات کروی شکل طلا، تشخیص کالریمتریک

حسین برخه[۱]

مهدی زین‌الدینی[۲]

بیژن رنجبر[۱*]

[۱]گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

[۲]پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول:

بیژن رنجبر

تلفن: ۲۱۸۲۸۸۳۴۱۸(۹۸+)

پست الکترونیک:

ranjbarb@modares.ac.ir

مقدمه

با وجود این‌که مولکول TNT جزو اولین مواد منفجره نیتروآروماتیک تولید شده می‌باشد، هنوز نقش آن به عنوان مهم‌ترین ماده منفجره مورد استفاده و نیز عاملی کلیدی در آلودگی منابع آبی پررنگ می‌باشد [۱-۵]. شناسایی این ماده منفجره کاری بسیار خطرناک و پیچیده می‌باشد که به دلیل عدم استفاده از سنسورهای ارزان و با دقت بالا کمبود سیگنال‌های با قابلیت ردیابی آسان و نیز استفاده گسترده از ترکیبات منفجره با مشکلاتی مواجه می‌باشد. از سوی دیگر به دلیل سادگی و نیز تنوع روش های مختلفی که می‌توان از TNT مواد منفجره ساخت طی سال های اخیر عملیات تروریسمی بر پایه آن به‌طور گسترده رخداده است که موجب آسیب‌های وسیع به امنیت عمومی و نیز آلودگی محیط زیستی گردیده است [۶].

نانو ذرات طلا با داشتن خواص نوری و الکترونیک منحصربه فرد توانسته‌اند در سال‌های اخیر توجه دانشمندان را در زمینه های مختلف زیست حسگر به خود جلب نمایند. این نانو ذرات با داشتن

Journal of Police Medicine
Fall 2016; Vol. 5, No. 3: 177-186

خاصیت نوسان پلاسمون سطحی (SPR) قوی قادرند کوچک‌ترین تغییرات رخ داده در محیط اطراف خود را شناسایی نمایند [۷]. درواقع خاصیت SPR برخورد نور با نانو ذره و به نوسان درآمدن الکترون‌های لایه هدایتی نانو ذرات طلا می‌باشد که همین امر موجب حساسیت بسیار بالای نانو ذرات کروی شکل طلا به محیط اطراف آن‌ها شده است [۸]. نانو ذرات کروی شکل طلا به دلیل داشتن سطح یکنواخت دارای توزیع همگونی از الکترون ها روی سطح خود می‌باشند. به همین دلیل، این نانو ذرات دارای یک طیف SPR مخصوص به خود در طول موج‌های ناحیه مریی می‌باشند. این باند SPR متأثر از اندازه ذره می‌باشد و با افزایش اندازه ذره به سمت طول موج‌های بلندتر جابجا می‌گردد [۹]. هرگونه تغییر در محیط اطراف موجب تأثیرگذاری بر روی طیف SPR این نانو ذرات می‌شود. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی در زمینه نانو ذرات طلا انجام شده است که منجر به پیدایش کاربردهای جدیدی برای آن‌ها شده است. ازجمله این کاربردها می‌توان به ژنومیک، طراحی حسگرهای زیستی، ایمونوآنالیز، تشخیص و فوتوترمولیز میکروارگانیسم‌ها، تشخیص سلول‌های سرطانی، حمل هدفمند داروها[1]، DNA و آنتی‌ژن‌ها و تصویربرداری زیستی سلول ها و بافت‌ها اشاره نمود [۱۰-۱۵]. به‌منظور استفاده از نانو ذرات طلا به‌عنوان حسگر زیستی، معمولاً آن‌ها را به یک مولکول خاص متصل می‌کنند که می‌تواند از جنس پروتئین (آنزیم، آنتی بادی و گیرنده‌های سلولی) و یا قطعه‌ای اسید نوکلئیک باشد [۱۶].

آپتامرها مولکول‌های تک‌رشته‌ای از جنس DNA یا RNA می‌باشند که می‌توانند به دلیل داشتن ساختار سه بعدی ویژه به مولکول‌های هدف با تمایل و اختصاصیت بسیار بالایی اتصال یابند [۱۷]. این مولکول‌های از جنس اسید نوکلئیک طی یک فرایند انتخابی به نام تکامل سیستمیک لیگاندها با استفاده از غنی سازی نمایی (سلکس[2])، با قرار گرفتن در کنار مولکول هدف به صورت InVitro به دست می‌آیند [۱۸]. آپتامرها قابلیت اتصال به طیف وسیعی از مولکول‌ها را دارند که از آن جمله می توان یون های معدنی، مولکول‌های آلی کوچک، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، ویروس‌ها، باکتری‌ها و حتی سلول‌ها و بافت‌ها را نام برد [۱۹-۲۴]. از جمله کاربردهایی که تاکنون برای این مولکول‌های نوظهور بیان شده می‌توان به استفاده در تصویربرداری زیستی، عوامل درمانی، سامانه دارورسانی، تشخیص بیماری‌ها، بررسی‌های غذایی، داروهای جدید و نیز عوامل تشخیص دهنده مواد خطرناک اشاره نمود [۲۴-۲۷].

آپتامرها را اغلب به عنوان یک جایگزین برای آنتی بادی ها می‌شناسند زیرا این مولکول‌ها بر بسیاری از ضعف‌های آنتی‌بادی‌ها فائق آمده‌اند [۲۸]. آپتامرها از جنس اسید نوکلئیک می‌باشند و نسبت به آنتی‌بادی‌هایی که از جنس پروتئین می‌باشند دارای پایداری دمایی بسیار بالاتری می‌باشند. این مولکول‌ها با استفاده از روش شیمیایی سلکس به صورت In Vitro سنتز می‌شوند. این روش نسبت به روش‌های تولید آنتی‌بادی بسیار ارزان‌تر و نیز آسان تر می‌باشد. معمولاً آپتامرها به دلیل ماهیت اسید نوکلئوتیدی‌شان دارای خواص ایمنی‌زایی و سمیت بسیار پایین‌تری نسبت به آنتی‌بادی ها می‌باشند. در موارد سموم و یا مولکول‌های دارای پاسخ ایمنی بسیار پایین آپتامرها می‌توانند به راحتی و باکیفیت بسیار بالایی به تشخیص بپردازند [۲۸].

در تحقیق حاضر با بهره جستن از خواص پلاسمونیک نانو ذرات کروی شکل طلا و با تثبیت آپتامر مخصوص مولکول TNT بر روی سطح آن‌ها به شناسایی ماده منفجره TNT پرداخته شده است. نتایج حاصل از آزمایش با طیف‌سنج مریی- فرابنفش، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و پراکندگی نور دینامیک (DLS) مورد بررسی قرار گرفتند. این گزارش آپتاسنسور بر پایه نانو ذرات کروی شکل طلا را به عنوان روشی با دقت بالا و مناسب جهت تشخیص مولکول TNT معرفی می‌نماید.

مواد و روش‌ها

توالی آپتام (
5'GGGACAGTCGATGGGACGGCAAACGGA
] (CCAGTGTGTGGCGGTAGATAGTAAG 3'
۲۹] باکیفیت سنتز HPLC از شرکت BIOBASIC کانادا خریداری شد. TNP-BSA، سدیم سیترات ($NaBH_4$)، HEPES، بنزوئیک اسید از سیگما خریداری شدند. نمک NaCl و نمک طلا ($HAuCl_4$) از شرکت MERCK خریداری شد. همه مواد مورد استفاده در این پژوهش دارای کیفیت حداقل molecular biology grade می‌باشند. به دلیل حلالیت ناچیز مولکول TNT در محلول‌های آبی، این مولکول به صورت تثبیت شده بر روی آلبومین سرم گاوی[3] (TNP-BSA) در تمامی آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در تمامی آزمایش‌ها آب دیونیزه مورد استفاده قرار گرفت. قبل از شروع هر گونه آزمایش تمامی ظروف و شیشه‌ها با اسید شست‌وشو و سپس با استفاده از آب دیونیزه کاملاً تمیز شدند.

سنتز نانو ذرات کروی شکل طلا:

نانو ذرات کروی شکل طلا با استفاده از روش کاهش سیترات[4] سنتز شدند [۳۰, ۳۱]. در این روش که به‌وسیله چاد میرکین ابداع شد ابتدا ۲۰ میلی‌لیتر محلول نمک طلا یک میلی‌مولار را در یک ارلن تا رسیدن به نزدیک دمای جوش حرارت داده و در همین حین نیز بر

[1:] Targeted drug delivery, [2:] Systemic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX), [3:] Bovine serum albumin, [4:] Citrate reduction method, [5:] Hot plate stirrer

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۵- دوره ۵- شماره ۳- صفحات ۱۸۶-۱۷۷

روی دستگاه همزن مغناطیسی[5] به‌صورت پیوسته هم زده می‌شود [۳۲, ۳۳]. سپس به آهستگی دو میلی‌لیتر محلول چهار صدم مولار سدیم سیترات به آن افزوده تا رنگ آن به صورت ارغوانی در بیاید. سپس برای تشکیل نانو ذرات کروی شکل طلا محلول به‌دست‌آمده را در دمای اتاق و در محیطی آرام قرار داده تا نانو ذرات طلا به آرامی تشکیل شوند. قبل از هرگونه استفاده از نانو ذرات کروی شکل طلا باید محلول را از هرگونه آلودگی و محصول جانبی احتمالی عاری نمود. برای این کار محلول مورد نظر در سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ محلول رویی را دور ریخته و به رسوب موجود در ته ویال (نانو ذرات کروی شکل طلا) آب milliQ افزوده شد تا به حجم برسد. سپس برای پراکندگی یکنواخت نانو ذرات به مدت پنج دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شدند. با انجام این عمل محلول حاوی نانو ذرات کروی شکل طلا به صورت کاملاً یکنواخت و بدون هرگونه آلودگی قابل استفاده می‌باشد.

پراکندگی نور دینامیک:

DLS یکی از تکنیک‌هایی می‌باشد که به‌طور گسترده برای تعیین اندازه نانو ذرات براونی در سوسپانسیون‌های کلوئیدی در دامنه‌های نانو و زیر میکرو مورداستفاده قرار می‌گیرد. در تکنیک پراکندگی نور دینامیک نحوه توزیع اندازه ذرات به‌طور میانگین بررسی خواهد شد [۳۴]. این تکنیک تنها برای نانو ذرات کروی شکل میانگین اندازه دقیق را خواهد داد و برای نانو ذرات دیگر مانند نانومیله طلا به صورت دقیق نخواهد بود. در واقع در تکنیک DLS با تابیدن نور لیزر به نمونه موجود در سل و جمع‌آوری سیگنال نوری پراکنده شده به بررسی متوسط اندازه نانو ذرات پرداخته می‌شود. در این مطالعه اندازه‌گیری‌های DLS با استفاده از دستگاه Malvern ZetasizerNano series ZS مجهز به یک لیزر HeNe در ۶۳۲/۸ نانومتر و دتکتور پراکندگی در ۱۷۳ °C صورت گرفت. قبل از هرگونه اندازه‌گیری نانو ذرات طلا به مدت پنج دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفتند تا سوسپانسیون نانو ذرات کاملاً یکنواخت شود [۳۴].

تهیه آپتاسنسور:

به منظور تهیه آپتاسنسور ابتدا نانو ذرات کروی شکل طلا در کنار نمک NaCl بررسی شدند. در مدت زمان ۹۰ دقیقه پس از انکوباسیون آن‌ها به صورت چشمی و نیز طیف SPR نانو ذرات طلا مورد بررسی قرار گرفت. پس از بررسی نانو ذرات کروی طلا در کنار نمک NaCl به‌منظور تهیه آپتاسنسور TNT، توالی آپتامری تک رشته DNA دارای ۵۲ نوکلئوتید و بدون هیچ‌گونه اعمال تغییرات مورد استفاده قرار گرفت. به ۵۰ میکرولیتر محلول حاوی نانو ذره طلا ۴۵ میکرولیتر توالی آپتامری با غلظت نهایی ۲۰۰ نانومولار و سپس پنج میکرولیتر نمک NaCl افزوده شد. در ادامه محلول تهیه‌شده به مدت شش ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. به منظور بررسی تهیه آپتاسنسور طیف SPR آن‌ها و نیز DLS آن ها مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی مولکول TNT و بررسی حساسیت آپتاسنسور:

به‌طورمعمول در این تحقیق با اتصال آپتامر به صورت فیزیکی بر روی سطح نانو ذرات طلا به شناسایی مولکول TNT پرداخته شده است. به ۵۰ میکرولیتر محلول، ۲۰ میکرولیتر بافر (HEPES با ۷/۵ = pH) ۱۰ میلی‌مولار و محلول $MgCl_2$ با غلظت یک میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر نانو ذره طلا و به طور هم زمان مولکول TNP-BSA با غلظت‌های نهایی ۱۵، ۳۵، ۵۵ و ۹۵ نانومولار افزوده شد. سپس به مدت یک دقیقه کلیه مخلوط ورتکس شد تا نمونه‌ها کاملاً یکنواخت گردند. سرانجام نمونه‌ها به مدت شش ساعت همراه با تکان دادن ملایم در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون، طیف SPR نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل با استفاده از دستگاه طیف سنج مریی- فرابنفش[1] ثبت گردید.

آزمون اختصاصیت:

به‌منظور بررسی اختصاصیت این روش تشخیصی از مولکول بنزوئیک اسید به‌جای TNT استفاده گردید. برای این کار طبق پروتکل آزمون شناسایی TNT عمل شد ولی به جای TNT از بنزوئیک اسید استفاده گردید. پس از شش ساعت انکوباسیون نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای اتاق نتایج آزمون با دستگاه طیف‌سنج UV-Vis مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمون غلظت آپتامر ۴۰۰ نانومولار بود.

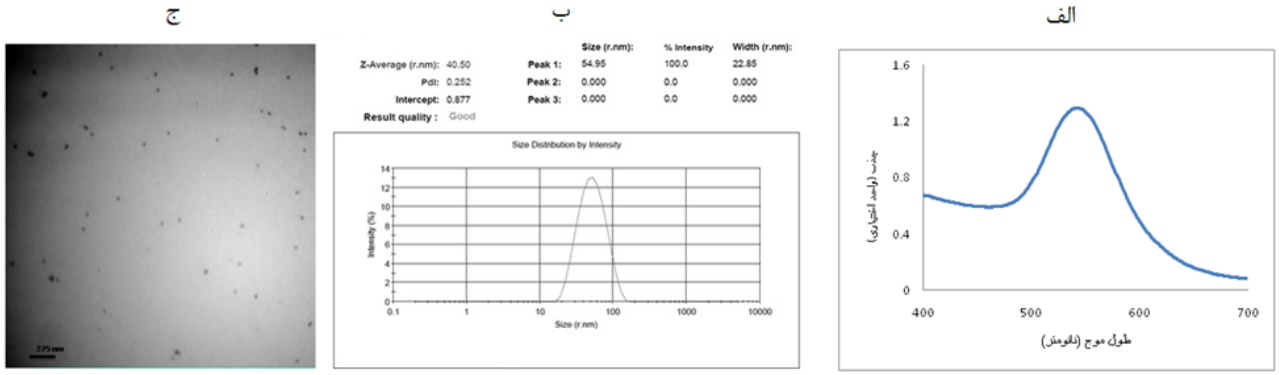
یافته‌ها

سنتز نانو ذرات کروی شکل طلا:

نانو ذرات کلوئیدی و کروی شکل طلا با استفاده از روش های مختلفی قابل سنتز می‌باشند. جهت سنتز نانو ذرات کروی طلا لازم است که یون $Au^{3+}(HAuCl_4)$ را به Au تبدیل نمود. استفاده از ترکیب سدیم سیترات $(Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O)$ یک روش کاملاً ساده، راحت و به‌صرفه جهت احیای این یون و تولید نانو ذرات کروی شکل طلای یکنواخت و یک‌دست می‌باشد. همان‌گونه که پیش‌تر توضیح داده شد، نانو ذرات کروی شکل طلا با استفاده از روش کاهش به‌واسطه سیترات سنتز گردیدند. این نانو ذرات دارای طیف SPR فوق‌العاده قوی و حساس در ناحیه مریی می‌باشند که با دستگاه طیف‌سنج مریی- فرابنفش قابل ردیابی می‌باشد.

[1]: UV-Visible spectrophotometer

Journal of Police Medicine
Fall 2016; Vol. 5, No. 3: 177-186



شکل ۱: طیف SPR, طیف DLS و عکس میکروسکوپ الکترونی TEM نانو ذرات کروی شکل طلا (از راست به چپ)

برای اثبات سنتز نانو ذرات کروی شکل طلا ابتدا طیف جذبی آن‌ها در دامنه طول موج ۳۵۰–۸۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. همان‌گونه که در شکل ۱ (الف) نشان داده شده است این نانو ذرات در طول موج ۵۴۴ نانومتر دارای یک قله جذبی[1] می‌باشند. بسته به غلظت نانو ذرات کروی شکل طلا این شدت جذبی می‌تواند کمتر و یا زیادتر شود. درصورتی‌که اندازه نانو ذرات سنتز شده کوچک‌تر از اندازه این نانو ذرات باشد قله جذبی آن‌ها در طول موج‌های کمتر از ۵۴۴ نانومتر قرار می‌گیرد. اگر اندازه نانو ذرات سنتز شده بزرگ‌تر از این نانو ذرات باشد قله جذبی آن‌ها در طول موج بیشتر از ۵۴۴ نانومتر قرار خواهد گرفت.

روش دیگر که جهت بررسی سنتز نانو ذرات کروی شکل طلا مورد استفاده قرار گرفت DLS می‌باشد. تکنیک DLS قادر است میانگین اندازه نانو ذرات کروی طلا و نیز یکنواختی سنتز آن‌ها را نمایان سازد. در واقع تکنیک DLS می‌تواند به بررسی تغییرات قطر هیدرودینامیک[2] و بار نانو ذرات کروی شکل طلا در حالت محلول بپردازد.

همان‌گونه که در شکل ۱ (ب) قابل مشاهده می‌باشد طیف DLS نانو ذرات کروی شکل طلا نشان می‌دهد که اندازه آن‌ها به طور میانگین ۴۰/۵۰ نانومتر می‌باشد. این اندازه از نانو ذرات دارای حساسیت و دقت کافی جهت استفاده به‌عنوان زیست حسگر خواهد بود.

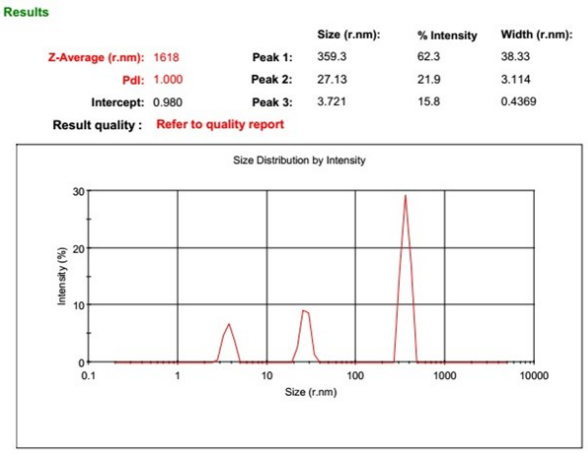
روش سوم که معتبرترین روش اندازه‌گیری اندازه نانو ذرات می‌باشد، استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)[3] می‌باشد. در این روش اندازه نانو ذرات، شکل و نحوه توزیع آن‌ها مشخص می‌شود. در تأیید داده‌های به‌دست‌آمده از طیف‌سنج مریی- فرابنفش و DLS، شکل ۱ (ج) نیز بیان‌گر آن است که اندازه نانو ذرات کروی شکل طلا حدود ۴۰ نانومتر می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

تشخیص TNT با استفاده از آپتاسنسور طلا:

امروزه روش‌های مختلفی جهت تشخیص مولکول TNT موردبررسی قرار گرفته‌اند. ازجمله این روش‌ها می‌توان به روش‌های کالریمتری، فلوئورسانس، لومینسانس شیمیایی، الکترولومینسانس‌شیمیایی، الکتروشیمی و تست‌های آنزیمی برای تشخیص این ماده اشاره نمود [۵, ۲۹–۳۳]. رودا و همکارانش یک روش ایمونواسی بر پایه لومینسانس شیمیایی برای تشخیص TNT به‌کار بردند. مائو و همکارانش از یک روش ایمونواسی ساندویچی با دقت بسیار بالا برای تشخیص این ماده استفاده نمودند [۵]. متأسفانه محدودیت‌هایی مثل سختی کار در نشان‌دار کردن و زمان‌بر بودن، مانع استفاده در سطح وسیع این حس‌گرها شده است. به هرحال، جهت برطرف کردن مشکلات همراه با روش‌های تشخیصی امروز لازم است که روشی تشخیصی مناسب و مبتنی بر سانسورهای دارای حساسیت قابل‌قبول و نیز قابلیت استفاده راحت طراحی شود.

در حالت عادی یون‌های سیترات متصل بر روی سطح نانو ذرات کروی شکل طلا موجب ایجاد دافعه بین آن‌ها می‌شود. این دافعه موجب ایجاد نیرویی جهت حفظ فاصله آن‌ها می‌شود که از تجمع آن‌ها جلوگیری می‌کند. اگرچه غلظت بالای نمک NaCl موجب برهم زدن تعادل بارها بر روی سطح نانو ذرات خواهد شد و باعث



شکل ۲: طیف DLS نانو ذرات طلای تجمع یافته در حضور NaCl

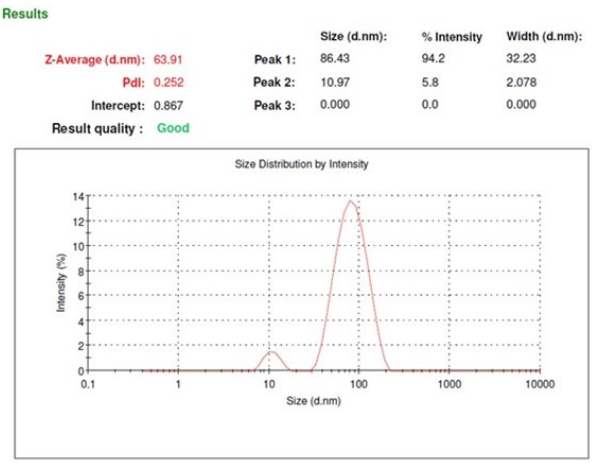
[1]: Absorption peak, [2]: Hydrodynamic Diameter, [3]: Transmission electron microscopy

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۵- دوره ۵- شماره ۳- صفحات ۱۸۶-۱۷۷

تجمع آن‌ها می‌شود (شکل ۲). توالی تک رشته DNA می تواند به‌راحتی بازهایش را در معرض بگذارد که موجب جذب راحت آن‌ها بر روی سطح نانو ذرات طلا خواهد شد [۳۵, ۳۶]. این ویژگی موجب طراحی یک تست کالریمتریک بر پایه نانو ذرات کروی شکل طلا برای شناسایی TNT گردید. گروه‌های نیتروژنی DNA با تمایل بسیار بالایی جذب سطح نانو ذرات طلا می‌شود و از تجمع رخ داده توسط نمک‌ها جلوگیری می‌کند [۳۴, ۳۷].

در این آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر نمک NaCl با غلظت ۲۰۰ میلی مولار به ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی نانو ذرات کروی شکل طلا افزوده شد؛ در مدت کمتر از دو ساعت مشاهده شد رنگ آن ها از حالت ارغوانی به رنگ آبی درآمده است. طیف SPR آن ها نیز گویای تجمع نانو ذرات طلا می‌باشد.

طی آزمایشی دیگر، ابتدا با افزودن ۵۰ میکرولیتر محلول آپتامر ۵۰۰ نانومولار و سپس افزودن نمک NaCl هیچ‌گونه تجمع و تغییر رنگی رخ نداد (شکل ۳). با افزودن توالی آپتامر به محلول نانو ذرات طلا، این توالی تک رشته DNA بر روی آن‌ها متصل شد و موجب ثبات در فاصله بین آن‌ها گردید. رنگ آن‌ها همان قرمز ماند و نیز



شکل ۳: طیف DLS نانو ذرات طلا در حضور آپتامر و نمک NaCl

طیف SPR آن‌ها نشان دهنده وجود نانو ذرات طلای بدون تجمع بود.

با افزودن همزمان مولکول TNP-BSA با غلظت ۵۰۰ نانومولار و آپتامر به محلول حاوی نانو ذرات کروی شکل طلا مشاهده شد که نانو ذرات کروی شکل طلا تغییر رنگ داده و به رنگ آبی تغییر یافتند. این امر نشان دهنده تجمع نانو ذرات کروی شکل طلا بود (شکل ۴). با رخ دادن این اتفاق، آپتامرها قادر نبودند از نانو ذرات طلا در برابر تجمع ایجاد شده با نمک جلوگیری نمایند در نتیجه تجمع نانو ذرات طلا رخ داد (شکل ۵). در واقع یک حالت رقابتی بین اتصال بر روی سطح نانو ذرات کروی طلا و نیز اتصال به مولکول TNT رخ داد. با اتصال آپتامر به مولکول TNT ساختار آن از حالت ساختار نامنظم[1] به حالت دارای ساختار معین تبدیل می‌گردد و قابلیت اتصال به سطح نانو ذرات طلا از طریق گروه‌های نیترات از بین خواهد رفت.

حساسیت و اختصاصیت تشخیص TNT:

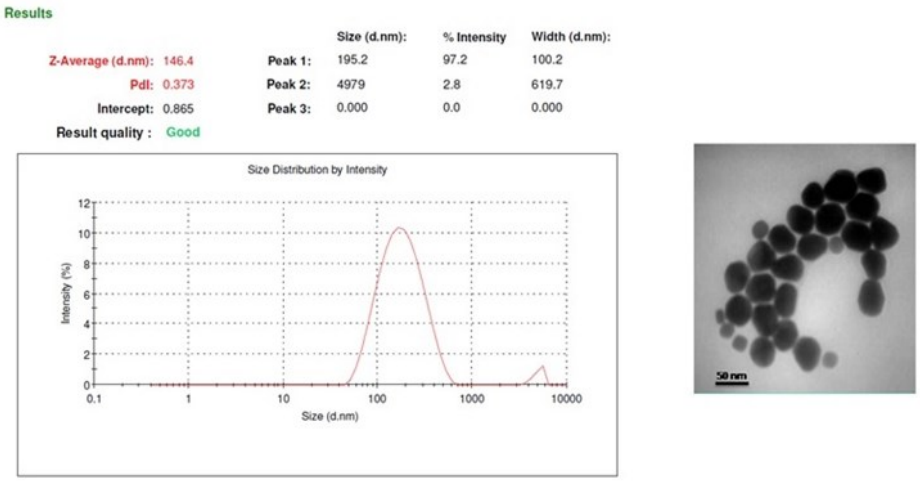
شکل ۶ طیف‌های جذب آپتاسنسور برحسب طول موج در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف TNT را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل مشخص است در اثر اتصال TNT به آپتاسنسور کاهش جذب نانو ذرات طلا مشاهده می‌شود که توانایی آپتاسنسور را در تشخیص مولکول TNT با حساسیت ۱۵ نانومولار نشان می‌دهد. در غلظت‌های در حد نانومولار مولکول هدف، نانو ذرات طلا نیز با شدت کمتر تجمع می‌یابند (شکل ۶). با افزایش مقدار مولکول هدف در محیط، بر میزان تجمع آن‌ها افزوده خواهد شد. نهایتاً در غلظت‌های بسیار بالا این تجمع از حالت جزئی به حالت فراگیر در خواهد آمد. در واقع با افزایش غلظت مولکول TNT در محیط میزان آپتامرهای اتصال یافته به مولکول هدف بیشتر خواهد شد و به طبع آن پایداری نانو ذرات کروی شکل طلا در برابر نمک NaCl کمتر می‌شود. این امر موجب تجمع نانو ذرات طلا خواهد شد. تجمع نانو ذرات طلا موجب تغییر رنگ آن‌ها، کاهش چشم‌گیر طیف SPR آن‌ها و همچنین تغییر این طیف به سمت طول موج‌های بلندتر خواهد شد.

به منظور بررسی اختصاصیت این روش تشخیصی از مولکول بنزوئیک اسید که دارای ساختاری نزدیک به TNT می‌باشد، استفاده شد. همان‌گونه که در شکل ۷ مشاهده می‌شود در حضور بنزوئیک اسید کاهش بسیار کم طیف جذبی نسبت به مولکول TNT مشاهده شده است. در واقع می‌توان این کاهش ناچیز طیف SPR نانو ذرات کروی را به عدم اتصال توالی آپتامری به مولکول بنزوئیک اسید و تثبیت نمودن سطح نانو ذرات کروی شکل طلا جهت محافظت در برابر نمک NaCl نسبت داد. این در حالی است که در حضور TNT نوسانات پلاسمونیک نانو ذرات کروی شکل طلا به‌گونه‌ای تحت تأثیر قرار گرفته است که می‌توان گفت نانو ذرات طلا تجمع نموده‌اند. در واقع می‌توان این‌گونه برداشت کرد که با اتصال توالی آپتامری بر روی سطح نانو ذرات کروی شکل طلا آن‌ها را در برابر تجمع به‌وسیله نمک NaCl حفظ می‌نماید. روش تشخیصی مورد استفاده در این تحقیق با دارا بودن ویژگی سادگی و قابلیت تشخیص سریع به‌صورت چشمی و بدون نیاز به هرگونه ابزار دیگر دارای مزیت می‌باشد.

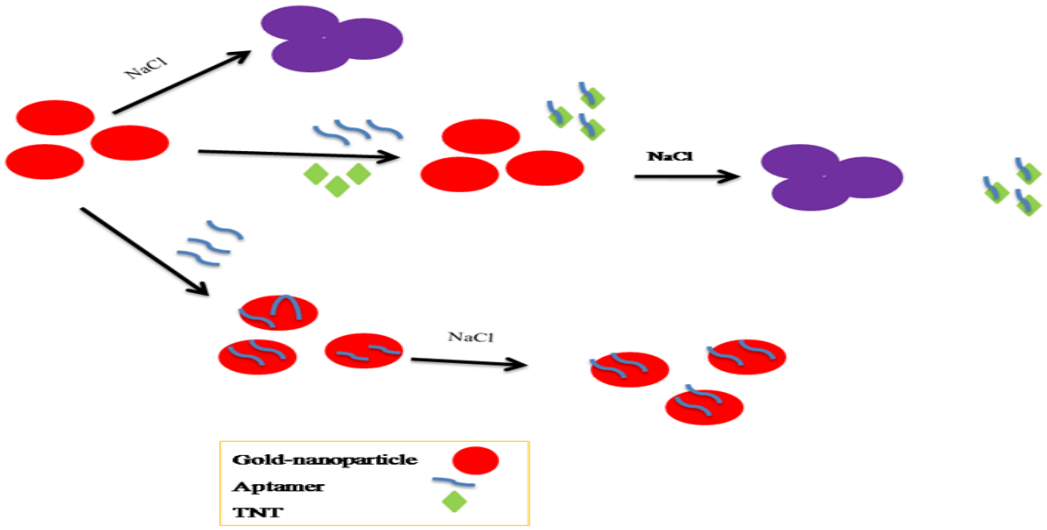
نانو ذرات کروی شکل طلا با خواص پلاسمونیک منحصربه‌فرد خود دارای حساسیت فوق‌العاده زیادی نسبت به کوچک‌ترین تغییرات

[1]: Random structure

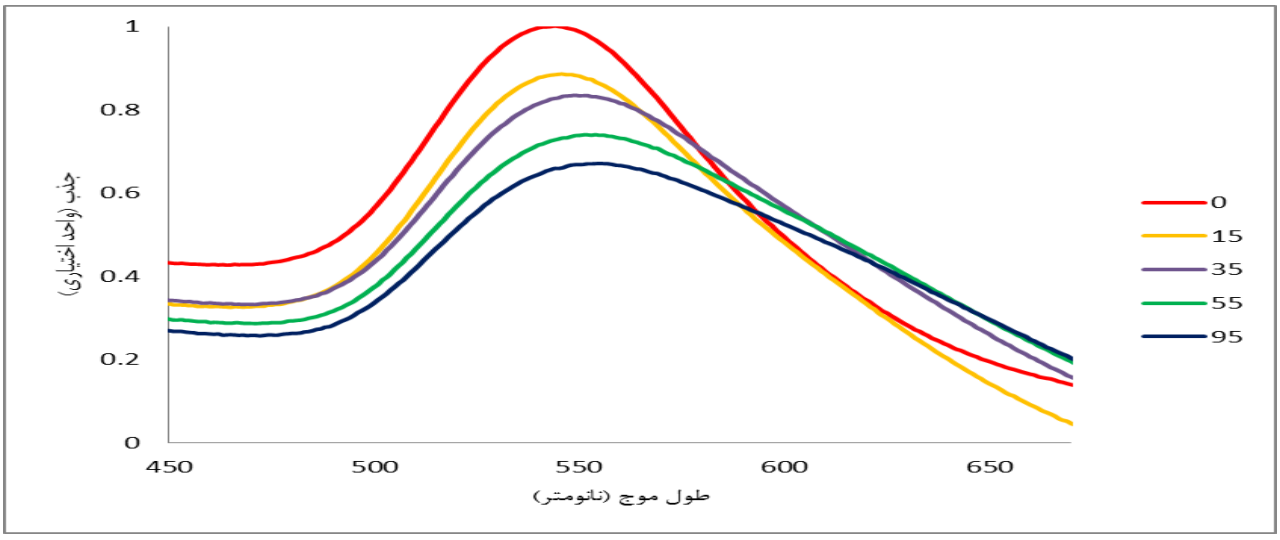
Journal of Police Medicine
Fall 2016; Vol. 5, No. 3: 177-186



شکل ۴: طیف DLS و عکس TEM نانو ذرات طلا در حضور مولکول TNT (از چپ به راست)

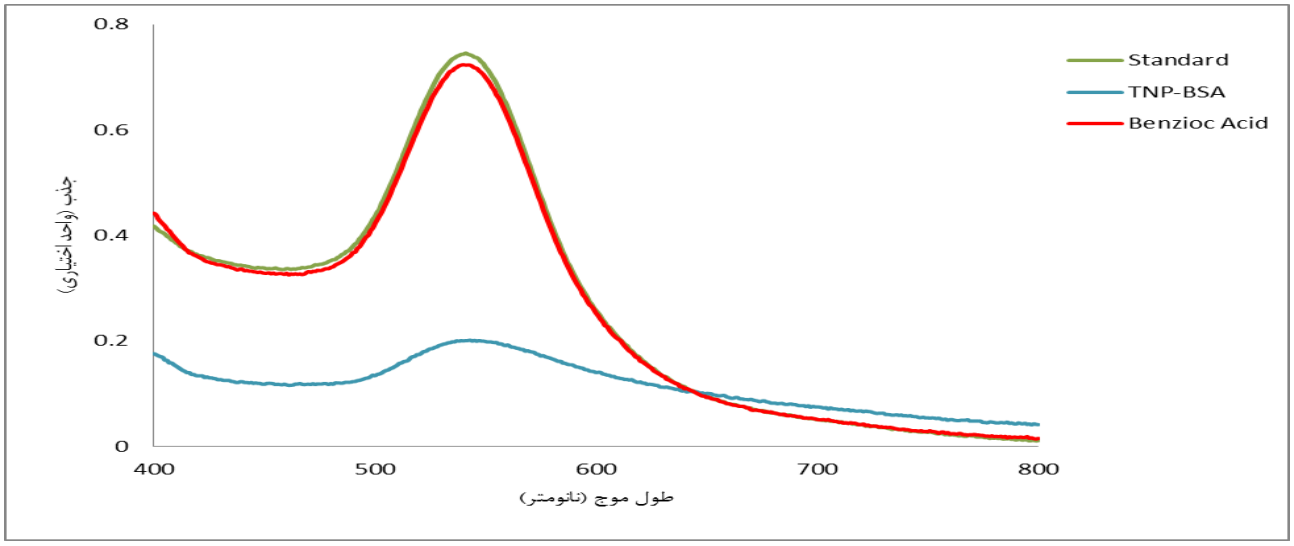


شکل ۵: شماتیک آزمون کالریمتریک بر پایه نانو ذرات کروی شکل طلا برای شناسایی TNT با استفاده از آپتامر تک رشته DNA



شکل ۶: تشخیص غلظت‌های مختلف مولکول TNT (نانومولار)

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۵- دوره ۵- شماره ۳- صفحات ۱۸۶-۱۷۷



شکل ۷: آزمون اختصاصیت تشخیص TNT

رخداده در محیط اطراف خود می‌باشند. با اتصال آپتامر بر روی سطح نانو ذرات کروی شکل طلا آپتاسنسور طلا ساخته می‌شود که موجب تثبیت این نانو ساختارها و ممانعت از تجمع آن‌ها در برابر نمک NaCl می‌شود. آپتاسنسور طلا قادر است با دقت و اختصاصیت بالایی مولکول TNT موجود در محیط را شناسایی نماید. این روش تشخیصی قادر است به صورت کالریمتریک به شناسایی مولکول TNT بپردازد. با توجه به موضوع تشخیص چشمی مولکول TNT آپتاسنسور ساخته شده نویدبخش روشی ساده، سریع و با دقت و حساسیت بالا جهت تشخیص مولکول TNT در آینده نه‌چندان دور خواهد بود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفته است. نویسنده از کلیه حمایت‌های صورت گرفته توسط این دانشگاه کمال تشکر و قدردانی را دارد.

منابع

۱. Wang J, Thongngamdee S. On-line electrochemical monitoring of (TNT) 2, 4, 6-trinitrotoluene in natural waters. Analytica Chimica Acta. 2003;485 (2):139-44.
۲. Anderson GP, Moreira SC, Charles PT, Medintz IL, Goldman ER, Zeinali M, et al. TNT detection using multiplexed liquid array displacement immunoassays. Analytical chemistry. 2006;78(7):2279-85.
۳. Wang J, Bhada RK, Lu J, MacDonald D. Remote electrochemical sensor for monitoring TNT in natural waters. Analytica Chimica Acta. 1998;361(1):85 -91.
۴. Kanekar P, Dautpure P, Sarnaik S. Biodegradation of nitro-explosives. Indian journal of experimental biology. 2003;41(9):991-1001.
۵. Pittman TL, Thomson B, Miao W. Ultrasensitive detection of TNT in soil, water, using enhanced electrogenerated chemiluminescence. Analytica Chimica Acta. 2009;632(2):197-202.
۶. Shriver-Lake LC, Charles PT, Kusterbeck AW. Non -aerosol detection of explosives with a continuous flow immunosensor. Analytical and bioanalytical chemistry. 2003;377(3):550-5.
۷. Yuan Z, Hu C-C, Chang H-T, Lu C. Gold nanoparticles as sensitive optical probes. Analyst. 2016;141 (5):1611-26.
۸. Hu M, Chen J, Li Z-Y, Au L, Hartland GV, Li X, et al. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. Chemical Society Reviews. 2006;35(11):1084-94.
۹. Hao F, Nehl CL, Hafner JH, Nordlander P. Plasmon resonances of a gold nanostar. Nano letters. 2007;7 (3):729-32.
۱۰. Storhoff JJ, Marla SS, Bao P, Hagenow S, Mehta H, Lucas A, et al. Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system. Biosensors and Bioelectronics. 2004;19(8):875-83.
۱۱. Tiwari PM, Vig K, Dennis VA, Singh SR. Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications. Nanomaterials. 2011;1(1):31-63.
۱۲. Pissuwan D, Valenzuela SM, Cortie MB. Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. TRENDS in Biotechnology. 2006;24 (2):62-7.
۱۳. Zhang L, Gu F, Chan J, Wang A, Langer R, Farokhzad O. Nanoparticles in medicine: therapeu-

Journal of Police Medicine
Fall 2016; Vol. 5, No. 3: 177-186

tic applications and developments. Clinical pharmacology and therapeutics. 2008;83(5):761-9.
۱۴. Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. Advanced drug delivery reviews. 2008;60(11):1307-15.
۱۵. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. 2007.
۱۶. Luo X, Morrin A, Killard AJ, Smyth MR. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. Electroanalysis. 2006;18(4):319-26.
۱۷. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. nature. 1990;346(6287):818-22.
۱۸. Famulok M, Szostak JW. In Vitro Selection of Specific Ligand□binding Nucleic Acids. Angewandte Chemie International Edition in English. 1992;31 (8):979-88.
۱۹. Peyrin E. Nucleic acid aptamer molecular recognition principles and application in liquid chromatography and capillary electrophoresis. Journal of separation science. 2009;32(10):1531-6.
۲۰. Radi AE, O'Sullivan CK. Aptamer conformational switch as sensitive electrochemical biosensor for potassium ion recognition. Chemical communications. 2006(32):3432-4.
۲۱. Tang Z, Parekh P, Turner P, Moyer RW, Tan W. Generating aptamers for recognition of virus-infected cells. Clinical chemistry. 2009;55(4):813-22.
۲۲. Chen HW, Medley CD, Sefah K, Shangguan D, Tang Z, Meng L, et al. Molecular Recognition of Small□Cell Lung Cancer Cells Using Aptamers. ChemMedChem. 2008;3(6):991-1001.
۲۳. Zhen SJ, Huang CZ, Wang J, Li YF. End-to-End Assembly of Gold Nanorods on the Basis of Aptamer− Protein Recognition. The Journal of Physical Chemistry C. 2009;113(52):21543-7.
۲۴. Li X, Zhang W, Liu L, Zhu Z, Ouyang G, An Y, et al. In vitro selection of DNA aptamers for metastatic breast cancer cell recognition and tissue imaging. Analytical chemistry. 2014;86(13):6596-603.
۲۵. Brody EN, Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. Reviews in Molecular Biotechnology. 2000;74(1):5-13.
۲۶. Wu X, Hu J, Zhu B, Lu L, Huang X, Pang D. Aptamer-targeted magnetic nanospheres as a solid-phase extraction sorbent for determination of ochratoxin A in food samples. Journal of Chromatography A. 2011;1218(41):7341-6.
۲۷. Bouchard P, Hutabarat R, Thompson K. Discovery and development of therapeutic aptamers. Annual review of pharmacology and toxicology. 2010;50:237-57.
۲۸. Jayasena SD. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. Clinical chemistry. 1999;45(9):1628-50.
۲۹. Shorie M, Bhalla V, Pathania P, Suri CR. Nanobioprobe mediated DNA aptamers for explosive detection. Chemical Communications. 2014;50 (9):1080-2.
۳۰. Mucic RC, Storhoff JJ, Mirkin CA, Letsinger RL. DNA-directed synthesis of binary nanoparticle network materials. Journal of the American Chemical Society. 1998;120(48):12674-5.
۳۱. Zhou J, Ralston J, Sedev R, Beattie DA. Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability. Journal of Colloid and Interface Science. 2009;331(2):251-62.
۳۲. Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. Nature. 1996;382(6592):607-9.
۳۳. Azizi A, Ranjbar B, Moghadam TT, Bagheri Z. Plasmonic Circular Dichroism Study of DNA–Gold Nanoparticles Bioconjugates. Plasmonics. 2014;9 (2):273-81.
۳۴. Carrot G, Valmalette J, Plummer C, Scholz S, Dutta J, Hofmann H, et al. Gold nanoparticle synthesis in graft copolymer micelles. Colloid and polymer science. 1998;276(10):853-9.
۳۵. Yang C, Wang Y, Marty J-L, Yang X. Aptamer-based colorimetric biosensing of Ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles indicator. Biosensors and Bioelectronics. 2011;26(5):2724-7.
۳۶. Li H, Rothberg L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(39):14036-9.

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۵- دوره ۵- شماره ۳- صفحات ۱۸۶-۱۷۷