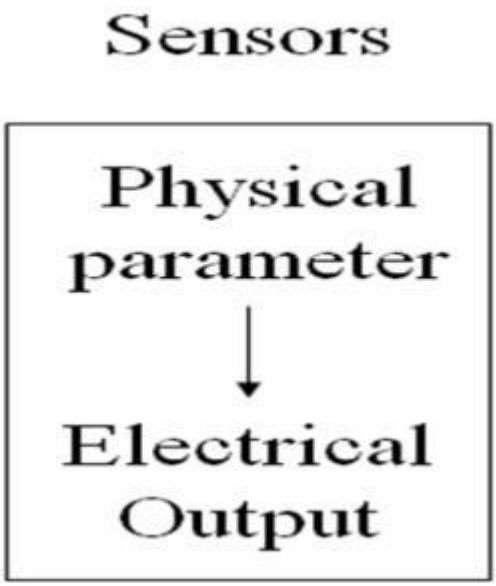
تشخیص سریع عوامل میکروبی با بیوسنسور ها (قسمت اول)

فاطمه صابری (دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی)
دکتر رضا میرنژاد (دانشیار دانشگاه)

در سلسله مقالات بیوسنسور قصد داریم آشنائی کوچکی با این تکنیک تشخیصی سریع ارائه نمائیم. انشاا... که مورد استفاده عزیزان خواننده قرار گیرد.
امروزه استفاده از تکنیک‌های سریع و حساس تشخیص از اهمیت خاصی برخوردارند. از آنجا که در مورد بسیاری از مواد و عناصر با غلظت‌های بسیار کم آلودگی مواجه هستیم، بنابراین برای اطمینان از سلامت به روش‌های سریع و حساس تشخیص نیازمندیم.
از مزایای بسیار مهم روش‌های تشخیص جدید می‌توان به مانیتور مستقیم نتیجه بصورت آنلاین اشاره نمود، لذا مدت زمان لازم برای تشخیص بسیار کلیدی و حائز اهمیت در بحث سیستم‌های کنترل کیفیت و نیز برگشت سرمایه برای تولید کننده می‌باشد .
یکی از مخاطبان اصلی این مباحث آزمایشگاه‌ها و سیستم‌های مدیریت ایمنی و کیفیت غذایی می‌باشند، زیرا در بسیاری از کارخانجات مواد غذایی در بخش تحقیقات و توسعه و نیز بخش کنترل کیفی زمان لازم برای نگهداری مواد و اعلام نتایج آزمون جهت عدم تأیید و یا تأیید محصول برای عرضه به مصرف کننده بسیار طولانی است. این موضوع سبب کاهش زمان ماندگاری و از طرفی بصورت غیرمستقیم سبب خسارت وارده به تولید کننده می‌گردد.
در بسیاری از موارد جرم باکتری که به وسیله روش‌های قدیمی قابل تشخیص است، به علت رقابت پاتوژن‌های دیگر و یا عوامل محیطی همچون دما و محیط اسیدی و غیره از بین می‌رود و توکسین باکتری که ممکن است به دما مقاوم باشد باقی می‌ماند که سنسور توانایی تشخیص در این موارد را به تنهایی داشته و کمک بسزایی به محققین و متخصصین کنترل کیفیت در سیستم‌های مدیریت ایمنی غذا می‌نماید.
امروزه در زمینه‌های مختلفی از جمله پزشکی، صنایع شیمیایی، صنایع غذایی، مانیتورینگ محیط زیست و تولید محصولات دارویی و بهداشتی از بیوسنسورها بهره می‌گیرند. این سنسورها ابزاری توانمند جهت شناسایی مولکول‌های زیستی می‌باشند. در حقیقت 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.

سنسور و بیوسنسور چیست؟

سنسور وسیله‌ای است که جهت اهداف گوناگون از جمله تشخیص کلینیکی، آلودگی‌های غذایی و محیطی و تشخیص دارویی استفاده می‌شود.
سنسورهایی که بخش تشخیص دهنده (Recognizing Part) آنها ماهیت زیستی داشته باشند بیوسنسور شناخته می‌شوند که به دلیل دارا بودن اندازه نانومتری می‌توانند سنجش در محیط‌های زیستی را آسان‌تر، حساس‌تر و سریع‌تر انجام دهند. بیوسنسورها اطلاعاتی از آنالیت را توسط ترانسدیوسر فراهم می‌کنند. نانوساختارهای مختلفی در ساخت نانوبیوسنسور استفاده می‌شوند که بعضی از آنها عبارتند از: نانوذرات، نقاط کوانتومی، نانولوله‌ها، نانوفیبرها و نانوسیم‌ها.



اولین روش ثابت کردن آنزیم روی الکترود، به صورت نگهداری فیزیکی بود. سپس از پیوندهای کووالان برای اتصال آنزیم بر روی الکترود استفاده شد، اتصال کووالان ماندگاری آنزیم روی الکترود را افزایش می‌دهد. نشاندن آنزیم روی الکترود بسیار مهم است چون آنزیم فعال باقی می‌ماند و از این رو تشخیص چندباره و تکرار پذیری بیوسنسور افزایش می‌یابد و این مسأله از لحاظ اقتصادی بسیار مهم است، زیرا آنزیم‌ها به جهت استخراج و خالص سازی مراحل مختلفی را طی می‌کنند و گران هستند.
برای اولین بار، کلارک و لیون قابلیت استفاده از غشاهای دربرگیرنده آنزیم را مطرح کردند که می‌تواند گلوکز یا اوره را به محصولی تبدیل کند که توسط الکترود اکسیژن و یا الکترود pH قابل تشخیص باشد.
سپس آپدیک و هیکس ژل دربرگیرنده آنزیم گلوکز اکسیداز را بر روی الکترود اکسیژن به کار بردند و الکترود آنزیمی ساختند .وقتی این الکترود در تماس با گلوکز و اکسیژن قرار می‌گیرد، این دو ترکیب به داخل غشای آنزیمی نفوذ می‌کنند که گامی مهم در آنالیز بیولوژیکی بود.
گام بعدی در توسط بیوسنسورها، نشاندن بیشتر از یک آنزیم بر روی الکترود بود. یک آنزیم منفرد همیشه نمی‌تواند ماده اولیه را به محصولی تبدیل کند که توسط ترانسدیوسر قابل تشخیص باشد، از این رو نیاز است که یک واکنش را به چند مرحله تقسیم کرد که هر مرحله یک سری از تبدیلات را انجام دهد، به این معنا که محصول اولین واکنش به عنوان سوبسترای دوم تلقی گردد.
همچنین در برخی از نمونه‌ها، کوفاکتور آنزیم همراه آنزیم وجود ندارد به عبارت دیگر آنزیم بدون کوفاکتور روی الکترود نشانده شده است. در این موارد می‌بایستی واکنشی طراحی شود که کوفاکتور را روی الکترود قرار دهد و بتواند خود را به جایگاه فعال آنزیم برساند.

مشخصه‌های بیوسنسور:

از مشخصه‌های بیوسنسور می‌توان به موارد زیر اشاره داشت:

- حساسیت

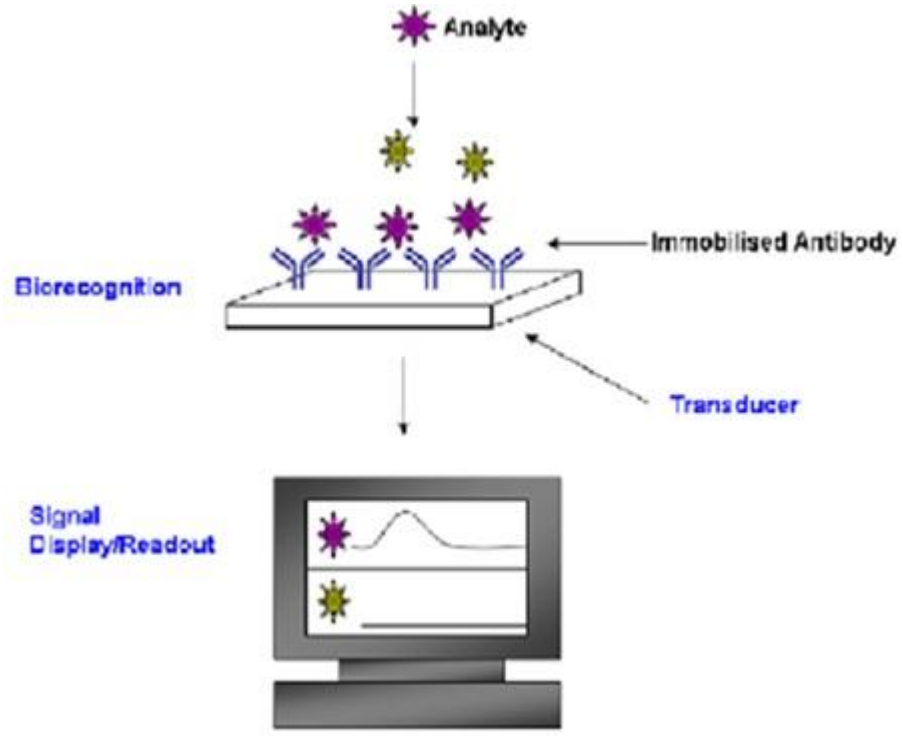
- قابلیت انتخاب :به این معنا که بتواند یک ماده خاص را از میان مواد دیگر تشخیص دهد.
- زمان واکنش
- قابلیت تکرار پذیری: بیوسنسور بایستی قابلیت تکرار پذیری داشته باشد؛ به این معنا که دو آزمایش کاملاً یکسان توسط یک بیوسنسور، جواب مشابه بدهد.
- محدوده تشخیص
- نیمه عمر
- ثبات

طراحی بیوسنسور

در طراحی بیوسنسور چندین فاکتور را باید در نظر داشت:

- انتخاب یک بیورسپتور مناسب
- انتخاب یک روش نشاندن مناسب
- انتخاب یک ترانسدیوسری که واکنش اتصالی را به سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل کند.

بیوسنسور از دو قسمت بیورسپتور و ترانسدیوسر تشکیل شده است:
بیورسپتور بیومولکولی است که آنالیت هدف را تشخیص می‌دهد و ترانسدیوسر رخداد تشخیص را به سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند.



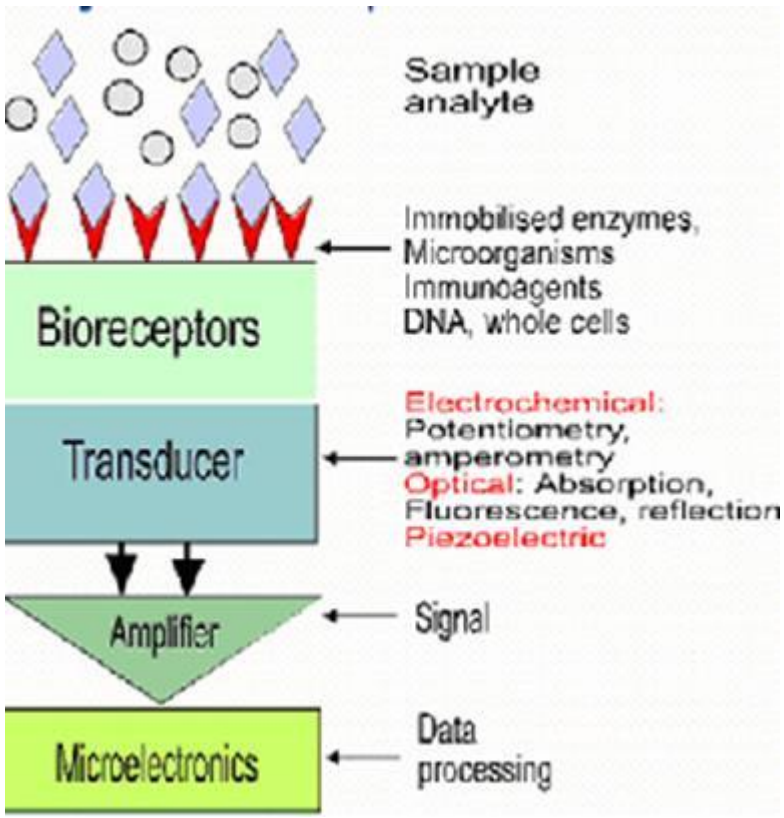
شکل 1: ارتباط دو جزء اصلی بیوسنسور و دریافت سیگنال

انتخاب بیورسپتور:

توسط بیورسپتور می‌توان یک مولکول را شناسایی کرد. از آنزیم‌ها می‌توان به عنوان بیورسپتور استفاده کرد. آنزیم‌ها می‌توانند به تنهایی و یا با کوفاکتورشان برای مثال NAD و NADPبه کار روند. از مزایای استفاده از آنزیم‌ها قابلیت تولیدشان است.
همچنین نیمه عمر و ویژگی‌های آنزیم‌ها شناخته شده است. از آنزیم‌ها می‌توان به گلوکزاکسیداز و اوره‌آز اشاره داشت که به طور معمول در بیوسنسورها استفاده می‌شوند. از معایب آنزیم‌ها این است که خیلی پایدار نیستند و اغلب نیاز به کوفاکتور دارند.

برخی از بیو سپتورها

میکروارگانیسم‌ها را نیز می‌توان به عنوان بیورسپتور به کار برد. از مزایای استفاده از میکروارگانیسم‌ها در بیوسنسور این است که همه آنزیم‌های ضروری را دارند و این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند آنزیمی را که فعالیت خود را از دست داده باشد، به مرور زمان تولید کنند. همچنین بافت یا ارگانل‌ها را می‌توان به عنوان بیورسپتور استفاده کرد. از موارد دیگری که می‌توان به عنوان بیورسپتور به کار برد ایمونورسپتورها هستند. کمورسپتورها را نیز می‌توان به عنوان بیورسپتور به کار برد، برای مثال نورورسپتورها را می‌توان جهت تشخیص داروها استفاده کرد.



شکل 2: انواع بیورسپتوهای متصل بر روی بیوسنسور

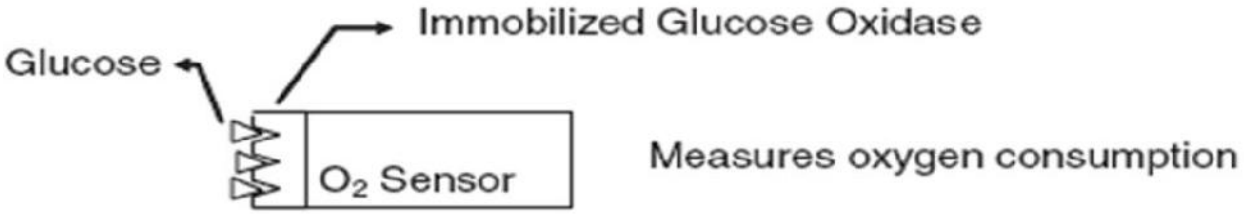
انتخاب ترانسدیوسر :

ترانسدیوسر، مبدل و یا الکترود با توجه به نوع بیورسپتور و واکنش و اتصالی که در بیورسپتور رخ می‌دهد انتخاب می‌شود. از ترانسدیوسرهای مختلفی می‌توان استفاده کرد، برای مثال می‌توان از الکترودهای حساس به pH و یا الکترودهای حساس به کاتیون‌ها یا آنیون‌ها و یا الکترودهای حساس به گازها استفاده کرد.

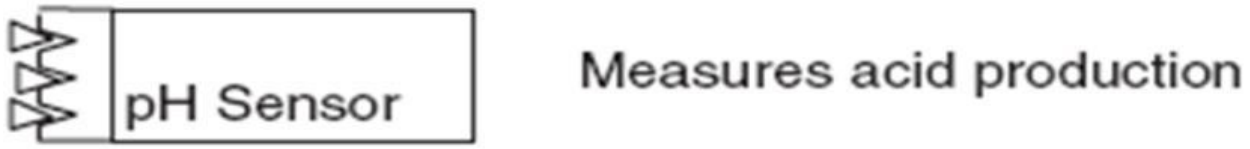
همچنین از دیگر ترانسدیوسرها می‌توان به فیبرهای اپتیکی اشاره داشت. ترانسدیوسر بایستی بتواند یک رخداد تشخیصی را به سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل کند، برای مثال آنزیم گلوکز اکسیداز به عنوان یک بیورسپتور در بیوسنسور گلوکز استفاده می‌شود که گلوکز را به صورت زیر کاتالیز می‌کند.

غلظت گلوکز در محلول می‌تواند با سه ترانسدیوسر متفاوت اندازه‌گیری شود:

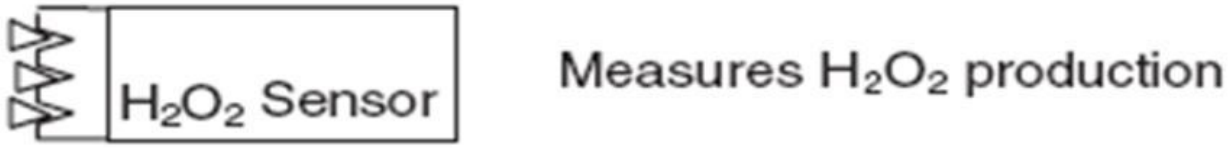
الف- یک سنسور O_2 که غلظت اکسیژن را اندازه گیری می‌کند.



ب- یک سنسور pH که غلظت اسید (اسید گلوکونیک) را اندازه‌گیری کند.



ج- یک سنسور پراکسیداز که غلظت H_2O_2 را اندازه‌گیری کند.



نشاندن بیورسپتور:

از جمله موارد بسیار مهم در بیوسنسورها نشاندن بیورسپتورها در مجاورت ترانسدیوسر است. در اتصالات شیمیایی اغلب بیورسپتورها با یک گروه عاملی مناسب به سطح ترانسدیوسر متصل می‌شوند، بنابراین بیورسپتور قادر است که آنالیت هدف را تشخیص دهد. در نشاندن بیورسپتور روی ترانسدیوسر عواملی نظیرpH ، دما و زمان نقش دارند.

بیورسپتورها می‌توانند به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم بر روی ترانسدیوسر نشانده شوند.

نشاندن آنزیم‌ها:

به روش‌های مختلفی می‌توان آنزیم‌ها را بر روی ترانسدیوسر نشاند.

الف- تله فیزیکی :

آنزیم‌ها در واقع پروتئین‌هایی هستند که دارای وزن مولکولی بالا و اندازه بزرگ می‌باشند، به همین دلیل به راحتی ژل‌های پلی‌آکریلامید را به الکترود اکسیژن متصل می‌کنند.

ب- می‌توان بین بیورسپتور و ترانسدیوسر از لینکر استفاده کرد.
برای مثال می‌توان از گلوتارآلدهید به عنوان یک کراس‌لینکر نام برد. عملکرد گلوتارآلدهید به این صورت است که روی ترانسدیوسر گروه‌های آمین نشانده شده است. گلوتارآلدهید هم دو گروه آلدهیدی دارد و پروتئین‌ها هم گروه آمینی دارند. از طریق گلوتارآلدهید می‌توان بین دو گروه آمین اتصال برقرار کرد.

چند روش برای کراس لینک وجود دارد:

- **روش غوطه‌وری**:

به این صورت که الکترود در مخلوطی که دارای آنزیم و کراس‌لینک است داخل می‌شود، سپس الکترود شسته می‌شود تا ترکیبات اضافی جدا شود.

- **روش اتصال مستقیم**:

این روش بیشتر در زمان‌هایی استفاده می‌شود که یک آنزیم خیلی گران است. در این حالت حدود 10 میکرولیتر از آنزیم بر روی الکترود ریخته می‌شود و سپس کراس‌لینک را به آن اضافه می‌کنند.

- **استفاده از غشاء:**

به این نحو که آنزیم را روی غشاء می‌نشانیم و سپس غشاء به آنزیم متصل می‌شود. می‌توان از Reinforced membrane و یا Prefunctionalized membrane استفاده کرد.
در Prefunctionalized membrane یک سری گروه‌های عامل‌دار هستند که قادرند با گروه‌های آزاد آنزیم‌ها واکنش دهند. این غشاها را در محلولی که شامل آنزیم است داخل می‌کنند و در نهایت یک غشای آنزیمی بدست می‌آید.
در Reinforced membrane آنزیم روی یک سطح بزرگ از شبکه نایلونی نشانده می‌شود و سپس این شبکه به قطعات کوچک‌تر بریده می‌شود که تقریباً به اندازه ترانسدیوسر باشد و سپس آن را به ترانسدیوسر متصل می‌کنند.

- **استفاده از الکترومگنتیک:**

به این نحو که آنزیم در یک پایه مگنتیک قرار می‌گیرد و سپس با استفاده از خاصیت مگنتیک بر روی ترانسدیوسر نشانده می‌شود، سپس با قطع جریان مغناطیسی آنزیم از ذرات جدا می‌شود. البته نشاندن آنزیم بر روی ذرات مگنتیک بسیار مشکل است.
ج- نشاندن چند آنزیمی:
به این صورت که چندین آنزیم بر روی یک الکترود یا سطح نشانده می‌شود، مثلاً گلوکز اکسیداز و کاتالاز بر روی الکترود اکسیژن نشانده می‌شود.
برای مثال لاکتوز توسط بتاگالاکتوزیداز به گلوکز و گالاکتوز تبدیل می‌شود و گلوکز هم توسط آنزیم گلوکز اکسیداز به گلوکونیک

اسید و پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود و به این صورت از طریق دو آنزیم می‌توان پراکسید هیدروژن را تشخیص داد.

د- نشاندن کوفاکتور:

قرارگیری کوفاکتورها می‌تواند بر روی آنزیم و یا بر روی پایه باشد که می‌تواند به فاصله انداز متصل شود که این فاصله انداز بایستی به اندازه کافی بلندی داشته باشد. از کوفاکتوزهایی مثل ATP،ADP، NADPو NADمی‌توان استفاده کرد.

ه- نشاندن مدیاتورها:

به این نحو که در واکنش‌های اکسیداسیون- احیا، آنزیم یک الکترون از کوفاکتور خود را به سوبسترا می‌دهد و سوبسترا احیا می‌شود و کوفاکتور اکسید می‌شود. وقتی که کوفاکتور اکسید شد واکنش بعدی نمی‌تواند احیا شود. حال نیاز به یک سری الکترون می‌باشد که این الکترون‌ها از یک سری موادی که بر روی سطح قرار دارند گرفته می‌شود و یک مدیاتور این الکترون‌ها را از سطح به کوفاکتور منتقل می‌کند.

و- نشاندن عوامل ایمنی:

به این معنا که می‌توان آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌ها را روی سطح نشاند. آنتی‌بادی‌ها را می‌توان به صورت مستقیم و یا از طریق یک کراس‌لینک و یا غشا بر روی ترانسدیوسر نشاند.

برهمکنش آنتی‌بادی و آنتی‌ژن نیز شاید در حال حاضر بیشترین جذابیت را برای طراحی یک سنسور زیستی ایجاد کرده است DNA .نیز معمولاً ابزار مناسبی به عنوان یک بیوسنسور می‌باشد زیرا واکنش جفت شدن بازها بین ترتیب‌های بازی مکمل هم اختصاصی و هم پایدار می‌باشد. در این حالتDNA پروب تک رشته بر روی لایه تشخیص ایموبولیزه می‌شود، اما اینکه چگونه این عمل تشخیصی اندازه‌گیری شود بستگی به روش سیگنال ترانسداکسیون دارد که ممکن است اپتیکال، مکانیکال یا الکتروشیمی باشد.

بیوسنسورها بر اساس نحوه شناسایی آنالیت به دو گروه می‌توانند تقسیم شوند:

1. بیوسنسورها با اساس شناسایی مستقیم آنتی‌ژن که واکنش پذیرنده با آنالیت مستقیماً توسط سنسور شناسایی می‌شود. عناصر بیولوژیک مورد استفاده در این گروه گیرنده‌های سلولی و آنتی‌بادی‌ها هستند.
2. بیوسنسورها با اساس شناسایی غیرمستقیم آنتی‌ژن که واکنش پذیرنده با آنالیت به طور مستقیم توسط سنسور شناسایی می‌شود. عناصر بیولوژیک مورد استفاده در این گروه ترکیبات نشاندار، مانند آنتی‌بادی‌های نشاندار شده و یا ترکیباتی با خاصیت کاتالیکی مانند آنزیم می‌باشند.

انواع بیوسنسور:

بیوسنسورها بر اساس ترانسدیوسر به انواع الکتروشیمیایی، صوتی، حرارتی، جرمی و نوری طبقه بندی می‌شوند.

- **ترانسدیوسرهای الکتروشیمیایی:**

ترانسدیوسرهای الکتروشیمیایی می‌توانند به سه نوع پتانسیومتریک، آمپرومتریک و امپدانس تقسیم شوند.

- **پتانسیومتریک:**

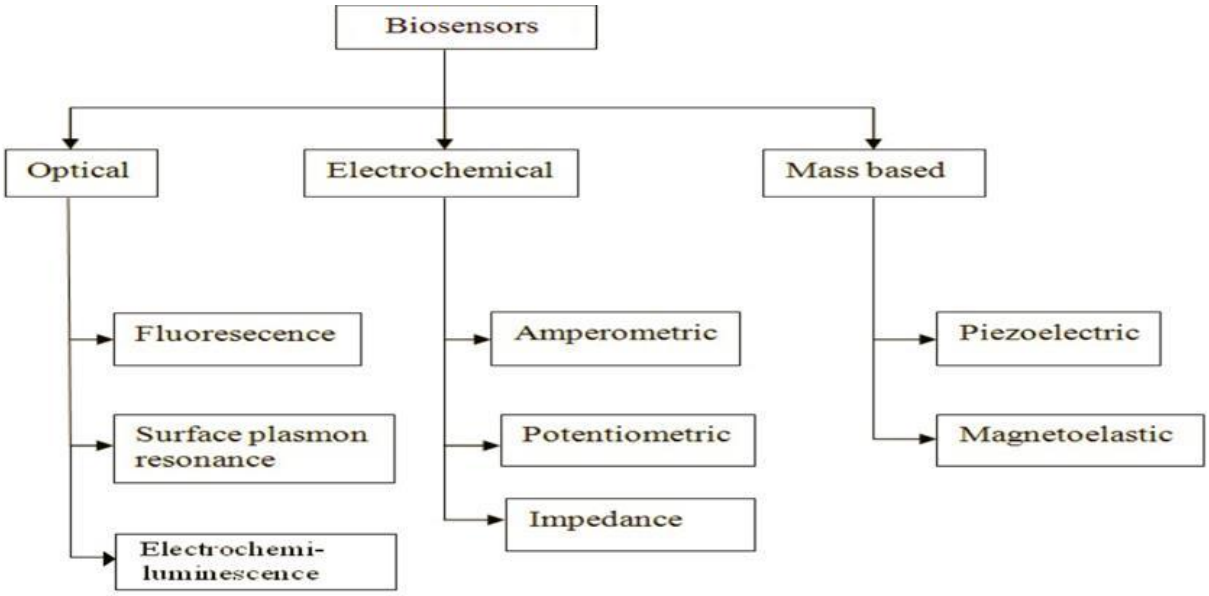
این نوع ترانسدیوسرها تغییرات پتانسیل را بر پایه معادله نرنست اندازه می‌گیرند. این روش مبتنی بر اندازه‌گیری پتانسیل یک پیل در جریان صفر است. متداول‌ترین الکترودهای مورد استفاده در نوع پتانسیومتریک شامل الکترود شیشه‌ای، الکترود انتخاب‌گر یونی و ترانزیستور اثر میدان حساس یونی است.

- **آمپرومتریک:**

این نوع ترانسدیوسرها تغییرات جریان را اندازه می‌گیرند. در این روش یک پتانسیل به پیل اعمال می‌شود تا اکسایش (یا کاهش) ماده مورد سنجش اتفاق افتد و یک افزایش یا کاهش در جریان پیل ایجاد شود.

- **امپدانس:**

این نوع ترانسدیوسرها تغییرات را در میدان الکتریکی تشخیص می‌دهند که به هدایت الکتریکی روی سطح الکترود نسبت داده می‌شود.

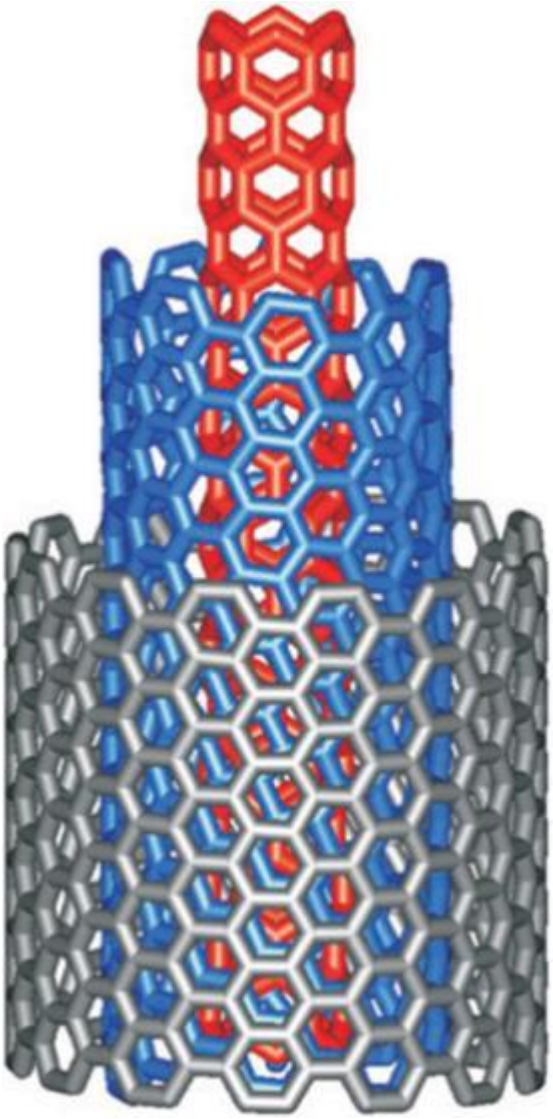


شکل 4: انواع سنسور بر اساس تفاوت در ترانسدیوسرها

الکترودهای نانولوله‌های کربنی و بیوسنسورها:

بیوسنسورها ابزارهایی هستند که تحت شرایط خاص واکنش‌های پیش‌بینی شده‌ای از خود نشان می‌دهند. با توجه به پیدایش تحولات عظیم در چند دهه اخیر امروزه نیاز به بیوسنسورهای دقیق‌تر کوچک‌تر و با قابلیت‌های بیشتر احساس می‌شود.

بیوسنسورهایی که امروزه مورد استفاده قرا می‌گیرند دارای حساسیت بالایی هستند، به طوری که به مقادیر ناچیزی از هر گاز گرما یا تشعشع حساسند. بالا بردن حساسیت، بهره و دقت این بیوسنسورها نیاز به کشف مواد و ابزارهای جدید دارد. با آغاز عصر فناوری نانوبیوسنسورها تغییرات شگرفی خواهند داشت؛ یکی از نامزدهای ساخت بیوسنسورها نانولوله‌ها خواهند بود. با نانولوله‌ها می‌توان هم بیوسنسور شیمیایی و هم بیوسنسور مکانیکی ساخت. به خاطر کوچک بودن ابعاد این بیوسنسورها دقت و واکنش آنها بسیار زیاد خواهد بود به گونه‌ای که حتی به چند اتم از یک گاز نیز واکنش نشان خواهد داد.



شکل 3: نمایی از نانولوله کربنی چند لایه

نانولوله‌های کربنی به دلیل ساختار و خواص منحصر به فردی که در کاربردهای الکترونیکی و مکانیکی دارند برای ایجاد بیوسنسورها و الکترودهای در مقیاس نانو مناسب هستند. اخیراً متخصصان شیمی نانولوله‌های کربنی را به عنوان الکترود جهت انتقال سیگنال الکتریکی و یا به عنوان سنسور جهت تشخیص مواد بیولوژیکی و یا مواد شیمیایی استفاده می‌کنند.

بیوسنسورهای نوری:

روش‌های مورد استفاده در بیوسنسورهای نوری شامل طیف سنجی فلورسانس، طیف سنجی انعکاس داخلی و پراش نور است.

- **پیزوالکتریک:**

این وسایل بر پایه تولید جریان در اثر ارتعاش در یک بلورند و فرکانس ارتعاش توسط جرم جذب شده بر روی سطح تحت تأثیر قرار می‌گیرد.

- **بیوسنسورهای حرارتی:**

فرایندهای شیمیایی با تولید و یا جذب انرژی همراه هستند که این حرارت را می‌توان با یک ترمیستور حساس اندازه‌گیری کرد و آن را به میزان واکنش نسبت داد.

مزایای بیوسنسورها:

مزایای بیوسنسورها بر سایر سیستم‌های اندازه‌گیری موجود می‌تواند در موارد زیر خلاصه شود:

1. سیستم‌های اندازه‌گیری موجود توانایی سنجش مولکول‌های غیر قطبی که در بافت‌های حیاتی تشکیل می‌شوند را ندارند، در حالی که بیوسنسورها می‌توانند این ترکیبات را تشخیص دهند.
2. از آنجایی که اساس کار بیوسنسورها بر پایه سیستم بیولوژیکی تثبیت شده در خود آنهاست، بنابراین آنها اثرات جانبی بر دیگر بافت‌ها ندارند.
3. کنترل پیوسته و سریع فعالیت‌های متابولیسمی توسط این سنسورها امکان پذیر می‌باشد.

کاربردها:

بیوسنسورها کاربردهای مختلفی در پزشکی دارند که در زیر به آنها اشاره می‌شود:

- تشخیص و درمان بیماری‌ها (سرطان، دیابت و ...)
- تشخیص بیماری‌ها در سطح ژن

- تشخیص عوامل بیماریزا، اندازه‌گیری داروها و متابولیت‌های آنها
- کشف داروهای جدید و ارزیابی فعالیت آنها
- ارزیابی و اندازه‌گیری آنالیت‌های موجود در نمونه بیولوژیک
- تشخیص سریع بیماری‌ها با استفاده از تست‌های سریع

منابع:

- 1.Murphy-Perez E, Arya SK, Bhansali S. Vapor-liquid-solid grown silica nanowire based electrochemical glucose biosensor. Analyst. 2011; 136 (8): 1686-9.
- 2. Babu E, Mareeswaran PM, Rajagopal S. Highly sensitive optical biosensor for thrombin based on structure switching aptamer-luminescent silica nanoparticles. J Fluoresc 2013; 23 (1): 137-46.