نانومقیاس
سال دوم | شماره‌ی اول | بهار ۱۳۹۴
www.nanomeghyas.ir

بررسی قابلیت نانوبیوحسگر تشدید پلاسمون سطح (SPR) در تشخیص باکتری ویبریو کلرا(عامل وبا)

رمضانعلی طاهری[۱و۲] | علی حسین رضایان[۱*]
فرشته رحیمی[۱] | جواد محمدنژاد[۱] | مهدی کمالی[۲] | فاطمه صابری[۲]

۱. دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران
۲. مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی- دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله (عج)، تهران

چکیده

فناوری‌های نوین حسگر زیستی می توانند به طور دقیق و سریع شناسایی ترکیبات زیستی را انجام دهد. یکی از این فناوریها، حسگری مرز دانشی بر پایه تشدید پلاسمون سطح (SPR) است که بر اساس خواص نوری خود قادر به اندازه‌گیری بسیار حساس و اختصاصی میانکش های بیوملکول‌ها بدون تاخیر زمانی می باشند. این فناوری بدون نیاز به برچسب گذاری و در زمان واقعی می‌تواند ویژگی‌های میانکش‌های بیوملکولی (مثل الیگونوکلئوتیدها، پروتئین‌ها، باکتری‌ها) بر روی سطح، از جمله سرعت واکنش، تمایل و غلظت میانکش های سطحی را کمّی نماید. در این مقاله قابلیت نانوبیوحسگر تشدید پلاسمون سطح در تشخیص باکتری ویبریو کلرا(عامل وبا) با استفاده از یک دستگاه تشدید پلاسمون سطح دوکاناله مورد بررسی قرار گرفته است. ابتدا تراشه حسگر پس از تشکیل تک لایه خود آرا (SAM)۱۱- مرکاپتوآندکانوئیک اسید بر روی سطح طلای تراشه حسگر به صورت کوالان با آنتی بادی اختصاصی علیه ویبریو کلرا تثبیت شده و سپس رقت‌های معین این باکتری با آنتی‌بادی تثبیت شده میانکنش کرده و از روی پاسخ‌های دریافت شده نمودار استاندارد ارتباط بین تعداد باکتری و حداکثر پاسخ ترسیم گردید. اختصاصیت تشخیص با برهم کنش چند باکتری غیر ویبروکلرا با سطح تراشه نیز مطالعه گردید. نتایج تحقیق نشان داد که حسگر ایمنی طراحی شده دارای حساسیت و اختصاصیت لازم برای تشخیص باکتری ویبریو کلرا با سرعت مطلوب بوده و می تواند به عنوان یکی از گزینه های تشخیصی برای این باکتری مطرح گردد.

واژگان کلیدی: تشخیص باکتری، تشدید پلاسمون سطحی، نانوبیوحسگر، ویبریو کلرا

۱.مقدمه

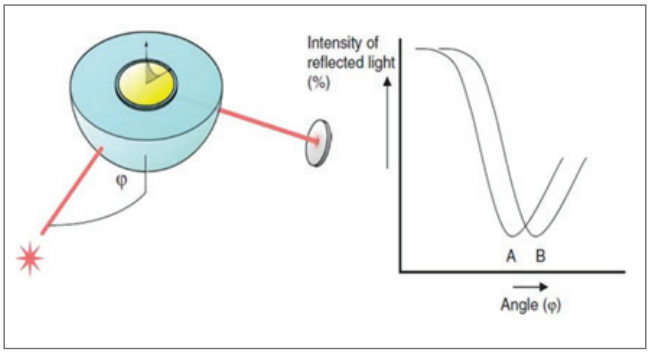
اساس کار دستگاه حسگر تشدید پلاسمون سطح (SPR)، انعکاس کلی داخلی نور در یک منشور شیشه‌ای است که روی آن یک لایه نازک فیلم فلزی قرار گرفته است. در شرایطی که تحت آن انعکاس کلی داخلی اتفاق می‌افتد، بخشی از نور که میدان محو شونده نامیده می‌شود به خارج از منشور نفوذ می‌کند. هنگامی که لایه فلز به اندازه کافی نازک باشد (مثلاً ۵۰ نانومتر)، میدان محو شونده[۱] می‌تواند به لایه فیلم نفوذ کند و در سطح فلز پلاسمون سطحی ایجاد نماید[۱]. پلاسمون سطحی می‌تواند توسط الکترونها و فتونها تحریک گردد. اتصال فتونها با پلاسمون سطحی می‌تواند با استفاده از یک واسطه اتصال مثل منشور بدست آید تا فتون و بردار موج پلاسمون سطحی با هم تلاقی نمایند[۲, ۳]. اندازه حرکت پرتو تابشی باید با پلاسمون مطابقت داشته باشد. در مواردی که از نور P-پلاریزه (پلاریزاسیون موازی صفحه تابش صورت گیرد)، با گذراندن نور از طریق یک بلوک شیشه‌ای به منظور افزایش عدد موج[۲] (و اندازه حرکت) استفاده شود، می‌توان در طول موج و زاویه خاص به حالت تشدید یا تشدید دست پیدا کرد. فتون های نور p- پلاریزه می‌تواند با الکترون‌های آزاد لایه فلزی میانکنش دهد و نوسانات موج مانند الکترون‌های آزاد را باعث شود و بنابراین شدت نور بازگشتی کاهش می‌یابد[۴]. زاویه‌ای که در آن ماکزیمم افت شدت نور بازتابشی رخ می‌دهد، زاویه تشدید یا زاویه SPR نامیده می‌شود. زاویه SPR به خواص اپتیکی سیستم وابسته می‌باشد، مثلاً به ضریب شکست محیط در هر دو طرف فلز، که معمولاً طلا می‌باشد. در حالی که ضریب شکست در طرف منشور تغییر نمی‌کند، ضریب شکست در مجاورت نزدیک سطح فلز هنگامی که جرمی (مثل پروتئین یا میکروارگانیسم) روی آن جذب شود تغییر می‌نماید [۵, ۶]. حسگرهای تشدید

1. Evanescent Field 2. Wavenumber

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۶ | تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۲

* ایمیل مسئول مکاتبات: ahrezayan@ut.ac.ir

پلاسمون سطح با مبانی اپتیکی خود قادر به اندازه‌گیری بسیار حساس و اختصاصی میانکش‌های بیوملکول‌ها بدون تاخیر زمانی می‌باشند. این فناوری بدون نیاز به برچسب گذاری[3] و به صورت زمان واقعی[4] می‌تواند ویژگی‌های میانکش‌های بیوملکولی (مثل الیگونوکلئوتیدها، پروتئین‌ها، باکتری‌ها) بر روی سطح، از جمله سرعت واکنش، تمایل و غلظت میانکش



شکل ۱ شماتیک چیدمان آزمایشگاهی تحریک پلاسمون رزونانسی سطح. یک تراشه سنسور با پوشش طلا روی نیم‌کره (یا منشور) قرار می‌گیرد. نور پلاریزه از منبع نور (ستاره) به سنسور تابش می‌شود. شدت نور بازتابشی در اشارساز اندازه‌گیری می‌شود. در یک زاویه معین تابش (Æ)، تحریک پلاسمون سطح اتفاق می‌افتد که نتیجه آن کاهش شدت نور بازتابشی است (A). تغییر در ضریب شکست در سطح فیلم طلا موجب جابه‌جایی زاویه از A به B می‌شود.

های سطحی را کمّی نماید[۱]. نانوبیوحسگر تشدید پلاسمون سطح (SPR) از یک سیستم نوری که در آن امواج پلاسمون سطحی برانگیخته شده و مورد بررسی واقع می‌گردند، یک پوشش که بر روی آن عناصر زیست تشخیصی تثبیت شده‌اند و با یک آنالیت در نمونه مایع میانکنش می‌دهد، یک سیستم فلوئیدیک حاوی سلول جریانی یا کووت برای حبس نمونه روی سطح حسگر SPR و یک سیستم جابجایی مایع تشکیل شده است[۷].

ویبریوکلرا عامل وبای اپیدمیک و اندمیک است که به‌عنوان عامل بیماری و مرگ و میر در بسیاری از مناطق جهان خصوصاً آسیا و آفریقا محسوب می‌گردد. باکتری ویبریوکلرا عامل چندین نوع بیماری اسهالی در انسان با گسترش و مرگ و میر بالاست. هر از گاهی شیوع بیماری و با دست‌اندرکاران مسائل بهداشتی جامعه را به وحشت می‌اندازد. این بیماری با قابلیتی که دارد، در شرایط خاص محیطی از قبیل زمان وقوع حوادث، جنگ و یا بروز بلایای طبیعی که سطح بهداشت و مراقبت به حداقل می‌رسد می‌تواند بروز نماید؛ لذا به‌کارگیری روش‌های تشخیص سریع و اختصاصی این باکتری نقش مهمی در کنترل شیوع این بیماری دارد[۸]. تثبیت بیوملکول ها در بیوحسگر موجب استفاده مجدد از مواد شده و اجازه ساده سازی دستگاه آنالیتیکی را فراهم می‌کند. در حالی که نوع دستگاه حساسیت ذاتی حسگر را معین می‌نماید، شیمی سطح تعیین کننده کارایی کلی حسگر می‌باشد. یک سطح معمولی از عناصر تشخیص ملکولی (MRE)[5] تثبیت شده روی بستر تمیز تشکیل شده است. خصوصیات یک MRE خوب شامل اختصاصیت بالا (قدرت تفکیک آنالیت هدف از آنالیت‌های غیرهدف)، تمایل (قدرت اتصال قوی به آنالیت) و پایداری (قدرت ذخیره سازی طولانی مدت و تشخیص تحت شرایط گوناگون) می‌باشد. حسگرهای SPR با طیف وسیعی از ترکیبات تشخیص زیستی از جمله الیگونوکلئوتیدها، آپتامرها، آنتی بادی‌ها، پروتئین‌ها و سلول‌های کامل عاملدار شده‌اند. آنتی بادی ها به خاطر تمایل بالا، اختصاصی بودن و در دسترس بودن تجاری رایج‌ترین MRE می‌باشند[۸].

ساده‌ترین روش استفاده شده برای تثبیت MREها جذب مستقیم روی سطح فلز می‌باشد[۹]. به هر حال، این امر به کاهش در فعالیت و جابه‌جایی خارج از کنترل MRE ها روی سطح منجر خواهد شد. یک روش معمول‌تر استفاده شده شیمی سطح که به حفظ کانفورماسیون پروتئین کمک می‌کند شامل تک لایه های خود بازیابی شونده (SAM)[6] می‌باشد. SAM یک تک لایه به شدت توده ای شده می‌باشد که از جذب سطحی خود به خودی تیول‌ها یا دی سولفیدها روی سطح فلز ایجاد می‌گردد. روش‌های بر پایه پیوند کوالان معمولاً موجب می‌شوند پروتئین‌های فعال ایمنی با پایداری و تکرارپذیری بالا تثبیت گردند[۱۰]. در گذشته از تثبیت ساده فیزیکی ملکول های زیستی بر روی مبدل حسگر استفاده می‌کردند که به علت عدم قوی نبودن اتصال و حذف شدن از روی سطح در مراحل شستشو توسط بافر، در حال حاضر کم‌تر استفاده می‌شود. در تحقیق حاضر از اتصال پایدار پیوند کوالان آنتی بادی بر روی لینکر آلکان تیول برای تثبیت آنتی بادی بر روی تراشه حسگر دستگاه استفاده شد.

۲. بخش تجربی

۲ .۱. مواد و تجهیزات

۱۱-مرکاپتو آندکانوئیک اسید، ۱-اتیل-۳-(۳-دی متیل آمینوپروپیل) کربودی‌ایمید (EDC)، N-هیدروکسی سوکسینیمید (NHS) و بافر هِپِس (HEPES) از شرکت سیگما، استات سدیم

3. label free
4. real time
5. Molecular recognition element (MRE)
6. Self-Assembled Monolayers (SAMs)

و اتانول آمین از شرکت مرک آلمان، آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه جسم کامل باکتری ویبریو کلرا از شرکت KPL آمریکا و تراشه حسگر دستگاه پوشانده شده با ۵۰ نانومتر طلا از شرکت Ssens هلند تهیه گردید. از دستگاه تشدید پلاسمون سطحی مدل ESPRITAutolab دوکاناله ساخت شرکت Eco Chemie B.V. هلند برای انجام تستهای حسگری استفاده گردید. کنترل کاربری دستگاه و دریافت اطلاعات انجام آزمایشات با استفاده از نرم‌افزار Data Acquisition (Version 4.3) و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار kinetic evaluation (version 5.4) صورت گرفت.

۳. روش کار

۳ .۱. تثبیت آنتی‌بادی بر سطح تراشه حسگر

به منظور تثبیت آنتی‌بادی علیه ویبریو کلرا بر روی تراشه حسگر، در ابتدا تراشه حسگر به منظور هرگونه چربی زدایی و تمیز شدن سطح به مدت ۵ دقیقه در محلول پیرانا[7] (نسبت حجمی ۳:۱ اسید سولفوریک غلیظ و آب اکسیژنه ۳۰٪) قرار گرفته و سپس با مقدار زیاد آب مقطر دیونیزه و اتانول شستشو گردید. پس از آن برای تشکیل تک لایه خودآرا آلکان تیول، به مدت ۲۴ ساعت درون محلول یک میلی مولار ۱۱- مرکاپتو آندکانوئیک اسید[8] قرار گرفت. پس از آن تراشه حسگر سه بار با اتانول مطلق به منظور زدودن آلکان تیول های اضافی شستشو شده و سپس سه بار با آب مقطر دیونیزه شسته شده و پس از خشک کردن با گاز نیتروژن درون محفظه مخصوص تراشه دستگاه ESPRITAutolab قرار داده شد. پایدار سازی سطح تراشه با بافر استات که به عنوان بافر اتصال[9] نیز عمل می‌کند صورت گرفت. برای تثبیت کووالان آنتی‌بادی ضد باکتری ویبریو کلرا با ایجاد پیوند آمیدی بین گروه‌های کربوکسیل آلکان تیول تشکیل شده به صورت تک لایه خودآرا بر روی تراشه حسگر و گروه آمینی موجود بر روی آنتی‌بادی، ابتدا گروه کربوکسیل با تزریق ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط مساوی EDC (۴۰۰ میلی‌مولار) و NHS (۱۰۰ میلی‌مولار) به مدت ۳۰۰ ثانیه فعال شده و پس از شستشو با بافر، غلظت ۱۰۰ µg /mL از آنتی‌بادی به مدت ۹۰۰ ثانیه در کووت دستگاه در کانال ۱ (کانال نمونه) تثبیت گردید. به منظور حذف اثر زمینه‌ای، تثبیت آنتی‌بادی در کانال ۲ (کانال رفرانس) انجام نشد. سپس شستشو با بافر استات انجام شده و گروه‌های هیدروکسیل فعال شده که در تشکیل پیوند آمیدی شرکت نکرده‌اند توسط محلول اتانول آمین غیرفعال و بلاک شدند، تا از اتصال غیر اختصاصی در مراحل بعدی جلوگیری شود.

۳ .۲. میانکنش باکتری ویبریو کلرا با ایمونوحسگر و رسم منحنی استاندارد

جذب سوسپانسیون باکتری برابر ۰/۲۵۷ (استاندارد ۱ مک فارلند 3×10^{8} باکتری در میلی‌لیتر) اندازه‌گیری شد و از روی آن رقتهای 10^{1} تا 10^{8} باکتری در میلی‌لیتر از باکتری در بافر PBS تهیه و برهم کنش آن‌ها با آنتی بادی تثبیت شده روی تراشه‌ی حسگر، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت و از روی پاسخ دریافت شده هر رقت، منحنی استاندارد مربوطه رسم شد. ضمناً برای مشخص شدن اختصاصیت تشخیص، میانکنش رقت های مختلف باکتری‌های غیر از ویبریو کلرا از جمله اشریشیا، سالمونلا، شیگلا و استافیلوکوکوس نیز با حسگر ایمنی بررسی گردید.

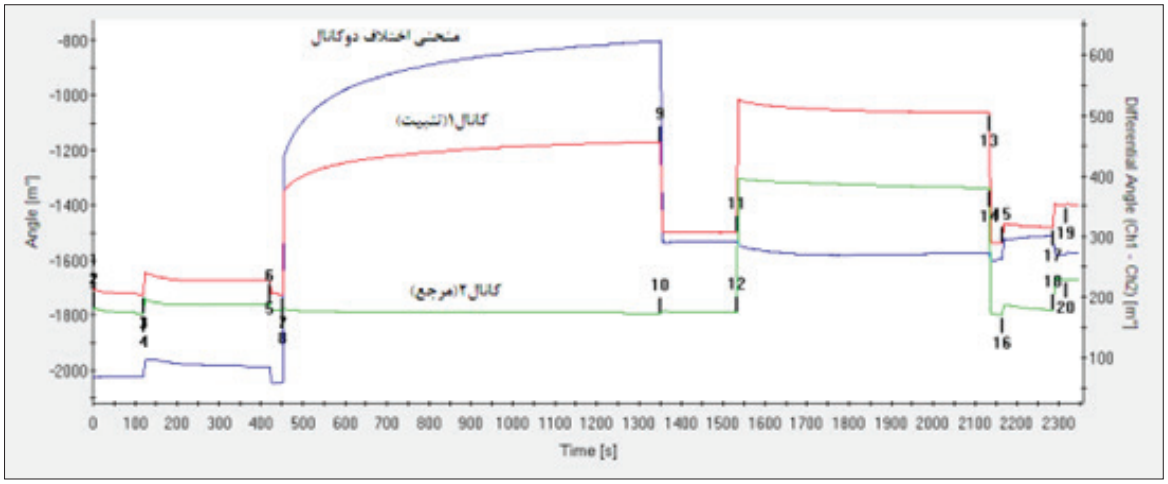
۴. نتایج و بحث

حسگرهای ایمنی مبتنی بر SPR که با واکنش‌های ویژه آنتی ژن-آنتی بادی همراه هستند تبدیل به ابزاری نویدبخش جهت تعیین خواص باکتری‌ها شده‌اند زیرا شناسایی حساس، ویژه، سریع و بدون برچسبی را ممکن می‌سازند. حسگرهای ایمنی SPR، متشکل از آنتی‌بادی‌هایی که به مبدل حسگر متصل‌اند، برای شناسایی چندین باکتری بکار رفته‌اند. جهت شناسایی مستقیم باکتری، حسگرهای ایمنی SPR از طریق تثبیت آنتی‌بادی‌هایی که مختص باکتری هدف‌اند، روی سطح یک لایه نازک طلا ساخته می‌شوند. واکنش SPR پس از ثابت کردن آنتی‌بادی‌ها به عنوان یک مرجع ثبت می‌شود.

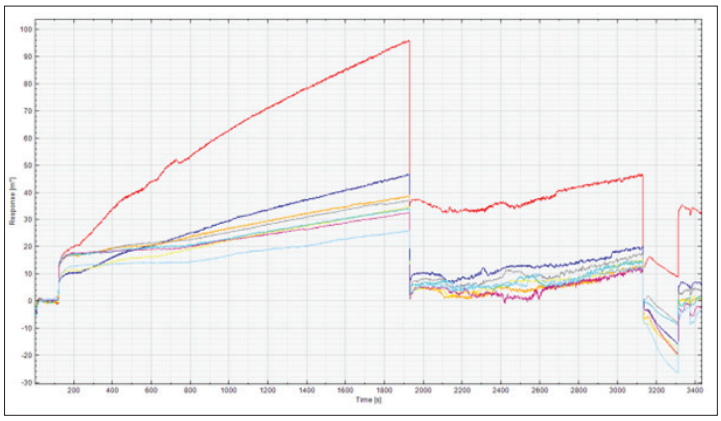
هنگامی که یک محلول حاوی باکتری با سطح حسگر پوشیده شده توسط آنتی بادی تماس پیدا می‌کند، باکتریهای هدف به آنتی بادی می‌چسبند. پس از شست و شوی سطح و حذف باکتریهای آزاد، تغییری در واکنش SPR مشاهده می‌شود که ناشی از پیوند باکتری به سطح حسگر است.

برای تهیه یک منحنی درجه بندی می‌توان از رابطه خطی بین تعداد باکتریهای چسبیده به سطح و واکنش زیست حسگر SPR استفاده نمود.

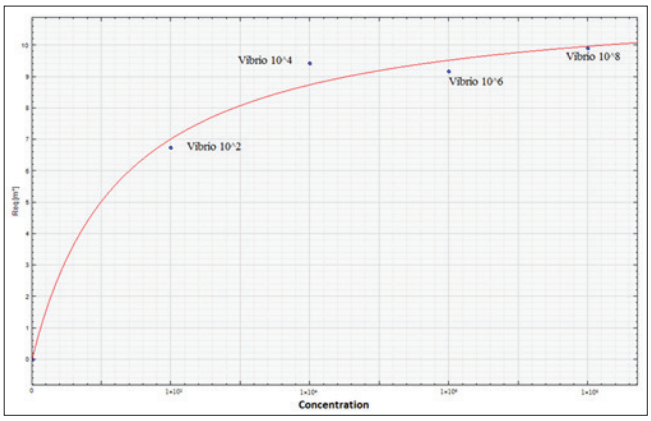
7. Piranha solution
8. Mercaptoundecanoic Acid (-11MUA)
9. Coupling buffer



شکل ۲ منحنی تثبیت آنتی‌بادی روی سطح تراشه‌ی حسگر: ۱و۲ – خط پایه[1]؛ ۳و۴– فعال‌سازی سطح با مخلوط EDC /NHS؛ ۵و۶– شست‌وشو با بافر پیوند؛ ۷و۸– اتصال آنتی بادی به سطح؛ ۹و۱۰– شست‌وشو با بافر پیوند؛ ۱۱و۱۲– غیرفعال‌سازی گروه‌های فعال توسط اتانول آمین؛ ۱۳و۱۴– شست و شو با بافر پیوند؛ ۱۵و۱۶– باززایی سطح[1]؛ ۱۷و۱۸– بازگشت به خط پایه



شکل ۳ سنسوگرام میانکنش رقت‌های مختلف باکتری ویبریو کلرا با آنتی‌بادی تثبیت شده



شکل ۴ منحنی کالیبراسیون تعداد باکتری ویبریو کلرا در برابر پاسخ دستگاه SPR

۵.نتیجه گیری

با توجه به حساسیت و اختصاصیت مناسب ایمونوحسگر طراحی شده، پس از رسم منحنی کالیبراسیون می‌توان با عبور نمونه‌های حاوی تعداد نامشخص باکتری ویبریو کلرا که آنتی‌بادی علیه آن بر سطح تراشه حسگر تثبیت شده است، شناسایی این باکتری (یا هرباکتری بیماری‌زای دیگر به روش مشابه)را با حساسیت، اختصاصیت و سرعت بالا توسط حسگر تشدید پلاسمون سطح تشخیص داد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله(عج) به خاطر حمایت مالی از انجام طرح تحقیقاتی (به شماره ۱۱۲۷-۹۱)تشکر می‌نمایند.

مراجع

[1] R. B. M. Schasfoort and A. J. Tudos, *Handbook of surface plasmon resonance*. Royal Society of Chemistry, 2008.

[2] J. Homola, *Surface plasmon resonance based sensors*, vol. 4. Springer Science & Business Media, 2006.

[3] N. J. Mol and M. J. E. Fischer, *Surface plasmon resonance: methods and protocols*. Springer Science & Business Media, 2010.

[4] J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, "Surface plasmon resonance sensors: review," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 54, no. 1, pp. 3–15, 1999.

[5] J. X. J. Zhang and K. Hoshino, *Molecular Sensors and Nanodevices: Principles, Designs and Applications in Biomedical Engineering*. William Andrew, 2013.

[6] R. Charlermroj, M. Oplatowska, O. Gajanandana, O. Himananto, I. R. Grant, N. Karoonuthaisiri, and C. T. Elliott, "Strategies to improve the surface plasmon resonance-based immmunodetection of bacterial cells," *Microchim. Acta*, vol. 180, no. 7–8, pp. 643–650, 2013.

[7] P. N. Abadian, C. P. Kelley, and E. D. Goluch, "Cellular analysis and detection using surface plasmon resonance techniques," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 6, pp. 2799–2812, 2014.

[8] M. Zourob, S. Elwary, and A. P. F. Turner, *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems: Biosensors, Recognition Receptors, and Microsystems*. Springer Science & Business Media, 2008.

[9] Ö. Torun, İ. H. Boyacı, E. Temür, and U. Tamer, "Comparison of sensing strategies in SPR biosensor for rapid and sensitive enumeration of bacteria," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 37, no. 1, pp. 53–60, 2012.

[10] V. Perumal and U. Hashim, "Advances in biosensors: Principle, architecture and applications," *J. Appl. Biomed.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–15, 2014.

Nanoscale
| Vol 2 | No.1 | Spring 2015 |
www.nanomeghyas.ir

Application of Surface Plasmon Resonance (SPR)Sensors for Detectionof Vibrio cholerae

R.A. Taheri[1] | A.H. Rezayan[1*] | F.Rahimi[1] | J.Mohammadnejad[1] |M.Kamali[2] | F.Saberi[2]

1.Department Of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences & Technologies, University of Tehran, Tehran
2.Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran

Abstract

Surface plasmon resonance (SPR) sensors are an optical platform capable of highly sensitive and specific measuring of biomolecular interactions in real-time. This label-free technology can quantify the kinetics, affinity and concentration of surface interactions. SPR sensors have been used to detect bacterial pathogens in clinical and food-related samples. SPR-based immunosensors that coupled with a specific antigen-antibody reaction, have become a promising tool for the quantification of bacteria as it offers sensitive, specific, rapid, and label-free detection. In this paper, we evaluated application of a SPR-based immunosensor for detection of *Vibrio cholera* causative agent of cholera by a dual channel Surface plasmon resonance device. At first a Self Assembled Monolayer (SAM) of 11-Mercaptoundecanoic acid was formed on sensor chip and after that antibody against *Vibrio* cholera was immobilized on chip covalently. Then different dilutions of Vibrio *cholera* cultures was passed on immobilized antibody and the response of SPR was recorded. The specificity of this nanobiosensor was studied by interaction of some non *Vibrio* cholera bacteria.

Keywords

Bacterial detection, Surface plasmon resonance, Nanobiosensor, Vibrio cholerae.

*Correspondent Author Email: ahrezayan@ut.ac.ir