

شناسایی ساده و سریع آفلاتوکسین B1 با استفاده از آپتاسنسور رنگ سنجی مبتنی بر نانوذرات طلا

مهدی زین الدینی^{۱*}، ابوالفضل دانش^۲، جواد فدایی کاخکی^۳، نور محمد دانش^{۴،۵*}

۱- دانشیار، مجتمع شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

۲- مربی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران.

۳- استادیار، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی فراجا- گروه رصد فناوری، تهران، ایران.

۴- استادیار، مجتمع پدافند غیرعامل، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

۵- استادیار، دانشکده دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

* صندوق پستی ۱۵۸۷۵۱۷۷۴، تهران، ایران

zeinoddini@modares.ac.ir, daneshnm46@yahoo.com

پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰

دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۶

چکیده

آفلاتوکسین B1 نوعی میکوتوکسین است که توسط قارچ‌هایی از جنس *آسپرژیلوس* در حین تولید و نگهداری مواد غذایی ساخته می‌شوند. آفلاتوکسین‌ها دارای اثرات سمی متعدد بر روی بدن هستند که باعث موتاژن، تراژن و دارای خاصیت سرطان‌زایی بالایی هستند که باعث ایجاد سرطان در کبد و سایر اندام‌ها می‌شود. اگرچه روش‌های مرسوم دستگاهی جهت اندازه‌گیری آفلاتوکسین B1 در مواد غذایی، حساس و دقیق هستند، ولی دارای معایبی همچون زمان تشخیصی بالا، گران قیمت، نیاز به یک کاربر آموزش دیده و ایجاد جواب مثبت کاذب می‌باشد. بنابراین، توسعه روش‌های نوین سنجشی در اولویت پژوهشگران قرار گرفته است. از جمله این روش‌های سنجشی، استفاده از زیست حسگرها است که سریع، ساده و مقرون به صرفه‌تر بوده و امروزه مورد استفاده در صنایع غذایی است. در پژوهش حاضر از یک آپتاسنسور نوری رنگ‌سنجی با استفاده از نانوذرات طلا با حساسیت مناسب و انتخابیت بالا برای تشخیص آفلاتوکسین B1 در سرم و بافر استفاده شده است. برای این کار، نانوذرات طلا به روش احیا HAuCl_4 توسط سدیم سیترات (با اندازه ۱۴،۴۰ نانومتر و پتانسیل زتا ۲۷،۵-)، سنتز شد. در این روش از اثر محافظتی توالی DNA در سطح نانوذرات طلا در حضور یا عدم حضور آفلاتوکسین با دخالت نمک با ویژگی تغییر چشمی رنگ استفاده شده است. حد تشخیص این روش ۵۰ نانوگرم بر لیتر و محدوده خطی آن ۲۸۰۰۰-۲۰۰ نانوگرم بر لیتر تخمین زده شد. در نتیجه از آپتاسنسور طراحی شده می‌توان برای شناسایی و غربالگری سریع این توکسین در مواد غذایی آلوده استفاده کرد.

کلید واژگان: آفلاتوکسین B1، تشخیص، آپتامر، رنگ‌سنجی، نانوذرات طلا، حسگر زیستی.

۱-مقدمه

آفاتوکسین ها گروهی از ترکیبات سمی از دسته مایکوتوکسین ها هستند که توسط قارچ هایی از جنس *آسپرژیلوس*^۱ به خصوص، *آسپرژیلوس فلاووس*^۲، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*^۳ و به مقدار خیلی کمتر توسط *آسپرژیلوس نومیوس*^۴ حین تولید و نگهداری مواد غذایی ساخته می شوند. قارچ های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* می توانند بر روی خاک، سبزیجات در حال فساد، یونجه و دانه های خوراکی مخصوصا در مناطقی با آب و هوای استوایی و یا نیمه استوایی رشد کنند. علاوه بر این، این قارچ ها می توانند در انبارهایی که مواد غذایی در شرایط نامناسب نگهداری می شوند، نیز کلونی ایجاد کنند [۱]. امروزه بیش از ۲۰ نوع آفاتوکسین شناسایی شده اند که مهمترین آنها شامل آفاتوکسین های B₁، B₂، G₁، G₂، M₁ و M₂ هستند. اکثر این آفاتوکسین ها بر روی مواد غذایی نظیر غلات، انواع فلفل ها و میوه های خشک شده یافت می شوند. در حالی که، وجود متابولیت ها نظیر آفاتوکسین های M₁ و M₂ در گوشت و شیر دام ها و طیوری که با غذای آلوده به آفاتوکسین ها تغذیه شده اند، نیز گزارش شده اند [۲]. تاریخچه آلودگی آفاتوکسین در مواد غذایی در ایران به سال ۱۹۷۶ باز می گردد که مسمومیت به علت مصرف نان آلوده در تهران گزارش شده است و امروزه از روش آنالیزی دستگاهی جهت شناسایی این توکسین ها در ترکیبات خوراک دام و طیور استفاده شده است [۳]. بسیاری از کمیته ها و موسسات استاندارد بین المللی، برای مقدار قابل قبول مایکوتوکسین در مواد غذایی حد تعیین کرده اند. به عنوان مثال کمیته اروپایی کدکس حداکثر سطح قابل قبول آفاتوکسین کل در برنج را ۴ نانوگرم بر گرم و میزان ۲ نانوگرم بر گرم را برای آفاتوکسین B₁ در

اتحادیه اروپا تعیین کرده است. این میزان در ایالات متحده آمریکا ۲۰ نانوگرم بر گرم برای کل آفاتوکسین تعیین شده است. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (ISIRI) مقدار آفاتوکسین B₁ را ۵ نانوگرم بر گرم و آفاتوکسین کل را ۳۰ نانوگرم بر گرم در برنج تعیین کرده است [۷-۴]. آفاتوکسین ها می توانند به صورت مستقیم و غیرمستقیم محصولات لبنی را آلوده کنند. عوامل غیرمستقیم شامل مواردی است که دام ها غذای آلوده به آفاتوکسین B₁ را مصرف می کنند و در اثر متابولیزه شدن این سم در بدن حیوانات به آفاتوکسین M₁ تبدیل شده و وارد شیر آنها می شود. آلودگی مستقیم محصولات لبنی با مایکوتوکسین ها ممکن است به دلیل رشد قارچی ناشی از قارچ های مورد استفاده برای عمل تخمیر و یا رشد قارچی غیر عمدی باشد [۸]. در سال ۲۰۰۶ آفاتوکسین B₁ و مخلوط آفاتوکسین های B، G و M توسط سازمان بین المللی تحقیقات بر روی سرطان (IARC^۵) در گروه ۱ مواد سرطانزا طبقه بندی شدند. در واقع مخرب ترین اثر آفاتوکسین ها بروز سرطان کبد (HCC^۶) در انسان ها می باشد. هر ساله بالغ بر ۳۲۰ هزار مورد جدید از HCC در دنیا گزارش می شود. این سرطان نسبت به سایر سرطان ها نرخ مرگ و میر بالاتری دارد [۹]. در نتیجه شناسایی و غربالگری ساده و سریع این توکسین در مواد غذایی بسیار ضروری است.

در سال های اخیر، برخی روش های آزمایشگاهی مانند کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع (LC)، کروماتوگرافی ایمنووافینییتی (IAC)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، کروماتوگرافی مایع - طیف سنجی جرمی (LC-MS)، LC-MS/MS، سنجش الایزا، ایمنوسنسور الکتروشیمیایی و نانوفناوری برای تشخیص و سنجش آفاتوکسین B₁ در مواد غذایی مختلف مطالعه شده است [۱۰، ۱۱]. اگرچه این روش ها حساس و دقیق

^۱ *Aspergillus*^۲ *A. flavus*^۳ *A. parasiticus*^۴ *A. nomius*^۵ International Agency for Research on Cancer^۶ Hepatocellular carcinoma

هستند، ولی معایبی نیز دارند. از جمله این معایب می‌توان به وجود یک کاربر آموزش دیده، گران قیمت بودن روش، زمان بر بودن آزمون و جواب مثبت کاذب با این دستگاه‌ها و همین‌طور هزینه بالای تهیه آنتی‌بادی‌ها اشاره کرد. بنابراین، توسعه روش‌های آنالیتیکال جدید که علاوه بر دقیق و صحیح بودن بتوانند نقص‌های روش‌های موجود را هم بپوشانند، ضروری است. از جمله این روش‌های جایگزین، استفاده از زیست حسگرها است. بنابراین، تقاضای زیادی برای این روش‌های سریع‌تر، ساده‌تر و مقرون به صرفه‌تر مورد استفاده در صنعت غذایی به وجود آمده است. اخیراً، حسگرهای زیستی نوری همراه با نانوذرات طلا (GNPs) یک پلتفرم امیدوارکننده برای این منظور و بر اساس ضریب جذب فوق‌العاده بالا و ویژگی‌های نوری به شدت وابسته به فاصله آنها فراهم کرده‌اند. تغییر رنگ در این مورد، که از جفت شدن پلاسمون بین ذرات در طول تجمع GNP یا پراکندگی مجدد یک دانه GNP ناشی می‌شود، شاید یکی از قوی‌ترین و ساده‌ترین روش‌های نانوحسگر موجود باشد. روش‌ها نشان دادند که تشخیص حساس اهداف خاص را می‌توان به سادگی و به سرعت بدون ابزار دقیق پیچیده انجام داد [۱۲، ۱۳].

از سوی دیگر، آپتامرها به عنوان الیگونوکلوئیدهای کوتاه تک رشته‌ای با قابلیت فضایی این توانایی را دارند که بطور اختصاصی به هدفشان متصل شوند. هدف آپتامرها می‌تواند از یک تک مولکول گرفته تا اهداف پیچیده حتی یک ارگانیسم کامل را شامل می‌شود و پایه و اساس شناسایی توسط آپتامرها، ساختار سوم تشکیل شده توسط آن‌ها است. در ساده‌ترین شکل، آپتامرهای تک رشته‌ای از جنس DNA (ssDNA) به شکل فیزیکی بر سطح نانوذرات طلا جذب می‌شوند. این امر، اثری پایدارکننده بر نانوذرات طلا دارد و منجر به کاهش اثر تجمع ناشی از

نمک می‌شود. این در حالی است که مولکول‌های DNA دو رشته‌ای و یا تک رشته‌ای متصل به لیگاند چنین قابلیت ندارند [۱۶-۱۴]. به دلیل خصوصیات جالبی که آپتامرها دارند، امروزه به‌طور گسترده‌ای در طراحی حسگرهای زیستی (آپتاسنسورها)، به عنوان عامل شناساگر، به کار رفته‌اند. تاکنون از آپتامرها در طراحی حسگرهای رنگ سنجی، فلورسانس و الکتروشیمیایی برای طیف گسترده‌ای از اهداف همچون داروها، سم‌ها و فلزات سنگین استفاده شده است، که در تمامی این موارد، نتایج مطلوبی به دست آمده است و حسگرهای ساخته شده دارای حد تشخیصی در حد نانومولار و پیکومولار بوده و اختصاصیت مناسبی نیز داشته‌اند [۲۰-۱۷]. در پژوهش حاضر تلاش شده است یک آپتاسنسور حساس و انتخابی به منظور شناسایی و غربالگری آفلاتوکسین B1 در نمونه‌ها آلوده ارائه شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

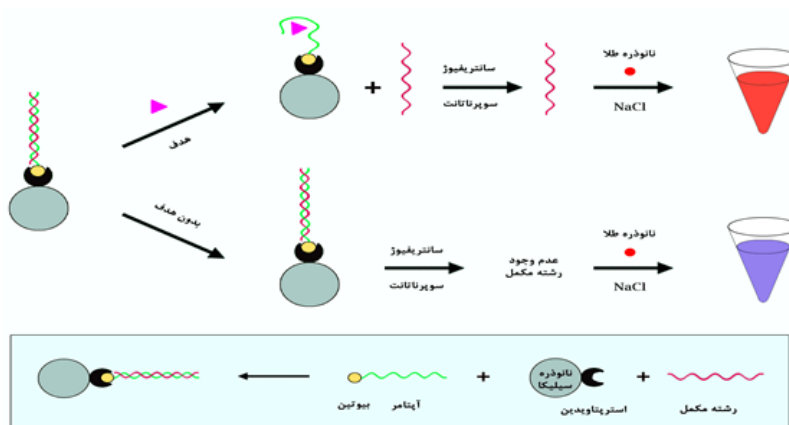
آپتامر اختصاصی سم آفلاتوکسین B1 و مکمل آن بر مبنای مقاله ارائه شده توسط کاستیلو و همکارانش [۲۱]، از شرکت Bioneer کره جنوبی خریداری شد. سموم آفلاتوکسین B1، M1، اخراتوکسین A (OTA)، زراننون (ZEN)، وومیتوکسین (DON)، آلبومین سرم گاوی (BSA)، سدیم سیترات، پودر طلا [Gold (III) chloride trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)] از شرکت سیگما، نانوذرات سیلیکا (SNP) پوشش داده شده با استرپتاویدین از شرکت Micromod آلمان، خریداری شد. پلیت ۹۶ خانه سیاه مخصوص فلورسانس از شرکت بتاژن تهیه شد.

۲-۲ سنتز نانو ذرات طلا

نانوذرات طلا (GNPs) بر اساس روش پیشنهادی ژانگ و همکاران مبنی بر احیا HAuCl_4 توسط سدیم سیترات، تهیه شده است.

جدول ۱ آپتامر اختصاصی آفلاتوکسین و مکمل آن [۲۱]

الیگونوکلئوتید	ترادف (5' - 3')
AFB₁ aptamer (Apt)	GTTGGGCACGTGTTGTCTCTCTGTGTCTCGTGCCCTTCGCTAGGCCACACA-Biotin
Complementary strand (CS)	CAACCCGTGCACAACAGAGAGACACAGAGCACGGGAAGCGATCCGGGTGT



شکل ۱ تصویری از استراتژی تشخیصی با کمپلکس SNP-dsDNA و نانوذرات طلا. در حضور آفلاتوکسین (هدف) رشته مکمل از کمپلکس SNP-dsDNA جدا شده و با اتصال به سطح GNPs، در برابر تجمع نمکی مقاومت کرده و به رنگ قرمز باقی می ماند. اما در عدم حضور هدف، کمپلکس SNP-dsDNA به صورت دو رشته باقی مانده و رشته مکمل از آن جدا نشده و در نتیجه نانوذرات طلا در حضور نمک تجمع یافته و به رنگ بنفش در می آید.

نانوذرات طلا با استفاده از قانون بیر-لامبرت^۱ تعیین شد [۲۲]. در نهایت ویژگی های GNPs با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و DLS بررسی شد.

۳-۲ طراحی و تهیه نانو بیوپروب شناساگر

در استراتژی تشخیصی به کار گرفته شده در این پژوهش، ابتدا کمپلکس SNP-dsDNA مطابق شکل ۱، طراحی و تهیه شد. برای تشکیل کمپلکس SNP-dsDNA، حجم ۱۳٫۲ میکرولیتر از SNP پوشش داده شده با استرپتاویدین با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر به ۵ میکرولیتر آپتامر بیوتینیل شده با غلظت ۷۵ میکرومولار اضافه شد (غلظت نهایی SNP معادل ۶۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر است). پس

به طور خلاصه، یک میلی لیتر از محلول HAuCl₄ با غلظت ۵۰ میلی مولار به ۴۹ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شد. به این محلول مقدار ۵ میلی لیتر از محلول سدیم سیترات با غلظت ۳۸/۸ میلی مولار اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه هم زده شد. پس از تهیه نانوذرات، در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور ۱۴۰۰۰ g و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و در انتها محلول رویی جدا شد. سپس، سوسپانسیون نانوذرات طلا با آب دیونیزه به نسبت های ۱۰:۹۰، ۸۰:۲۰، ۷۰:۳۰ تهیه شد و جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر بررسی شد و نمونه دارای جذب در محدوده ۰/۵ تا ۰/۶ برای ادامه کار انتخاب شد. با مشخص شدن جذب، غلظت

^۱ Beer-Lambert law

از گذشت یک ساعت از زمان انکوباسیون، مقدار ۵ میکرولیتر از رشته مکمل (CS) با غلظت ۷۵ میکرومولار نیز به مجموعه بالا اضافه شد و کل نمونه برای یک ساعت دیگر در دمای اتاق انکوبه شدند. در نهایت برای تایید اتصال SNP به آپتامر از ژل آگارز ۲/۵ درصد استفاده شد و غلظت‌های ۲۲۰ و ۴۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از SNP نیز بررسی شدند. همچنین، برای بررسی اتصال رشته مکمل به GNPs، ۴۰۰ نانومولار از رشته مکمل به ۷ نانومولار از GNPs اضافه شده و برای بررسی و تایید اتصال رشته مکمل به نانوذرات طلا نیز از ژل آگارز ۲/۵ درصد استفاده شد.

۲-۴ ارزیابی عملکرد آپتاسنسور در بافر و سرم

در روش‌های رنگ‌سنجی برای بررسی شدت رنگ، غلظت‌های مختلف از هدف در مجاورت آپتاسنسور قرار می‌گیرد. در اینجا غلظت‌های ۲۵۰۰۰ و ۱۲۰۰۰، ۲۰۰۰، نانوگرم بر لیتر از AFB₁ را طبق مراحل گفته شده در بخش‌های قبل، در مجاورت آپتاسنسور تهیه شده قرار داده شد و تغییر رنگ از آبی (غلظت ۰ نانوگرم بر لیتر) تا قرمز در بررسی شد. همچنین، برای شناخت توانایی و قابلیت عملکرد آپتاسنسور در نمونه‌های زیستی از سرم استفاده شد. ابتدا نمونه سرم به نسبت ۱ به ۵۰ توسط PBS ۱۰ میلی‌مولار رقیق شد. سپس با استفاده از این سرم، نمونه‌های متعددی با غلظت‌های افزاینده از AFB₁ (۰-۶۰۰۰ نانوگرم بر لیتر) آماده و با غلظتی ثابت از آپتاسنسور برای اندازه‌گیری مخلوط شد. مشخص است که با افزایش غلظت AFB₁، مقدار (A₀-A)/A نیز افزایش می‌یابد. سپس، مشابه آنچه که در بخش‌های پیشین گفته شد منحنی استاندارد برای اندازه‌گیری حد تشخیص (LOD) در سرم رسم می‌شود.

۲-۵ تعیین حد تشخیص آپتاسنسور

برای بررسی کارکرد و عملکرد آپتاسنسور در بافر PBS، غلظت‌های ۵۰۰۰۰-۰ نانوگرم بر لیتر از آفلاتوکسین B1

(AFB₁) انتخاب شد. براین اساس حجم ۵۰ میکرولیتر از کمپلکس SNP-dsDNA به حجم ۵۰ میکرولیتر از AFB₁ با غلظت‌های مختلف ۵۰۰۰۰-۰ نانوگرم بر لیتر اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق هر یک از مخلوط‌ها با دور ۱۱۰۰۰ g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، ۵۰ میکرولیتر GNPs با غلظت ۱۸ نانومولار به سوپرناتانت‌ها اضافه شد. پس از ۱ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، ۴ میکرولیتر از NaCl با غلظت ۱ میکرومولار به مخلوط‌ها اضافه شد و جذب خوانده شد. A عدد اگریگاسیون بعد از اضافه کردن هدف و A₀ عدد اگریگاسیون قبل از اضافه کردن هدف محاسبه می‌شود. عدد اگریگاسیون نسبت جذب نمونه‌ها را در طول موج ۶۵۰ نانومتر نشان می‌دهد. GNPs در حالت اگریگاسیون این طول موج را جذب می‌کنند. در نتیجه نموداری ترسیم می‌شود که محور عمودی آن (A₀-A)/A و محور افقی آن لگاریتم غلظت AFB₁ بر حسب نانوگرم بر لیتر است. از این نمودار حد تشخیصی آپتاسنسور محاسبه شد.

۲-۶ بررسی انتخابی بودن آپتاسنسور

میزان عملکرد انتخابی آپتاسنسور پارامتر مهمی برای ارزیابی آن است. برای این کار، آپتاسنسور در مجاورت غلظت ۷۵۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از AFB₁، AFM₁، DON، ZEN و OTA قرار گرفته و عملکرد اختصاصی آپتاسنسور بین نمونه‌های مشابه با آفلاتوکسین مقایسه شد.

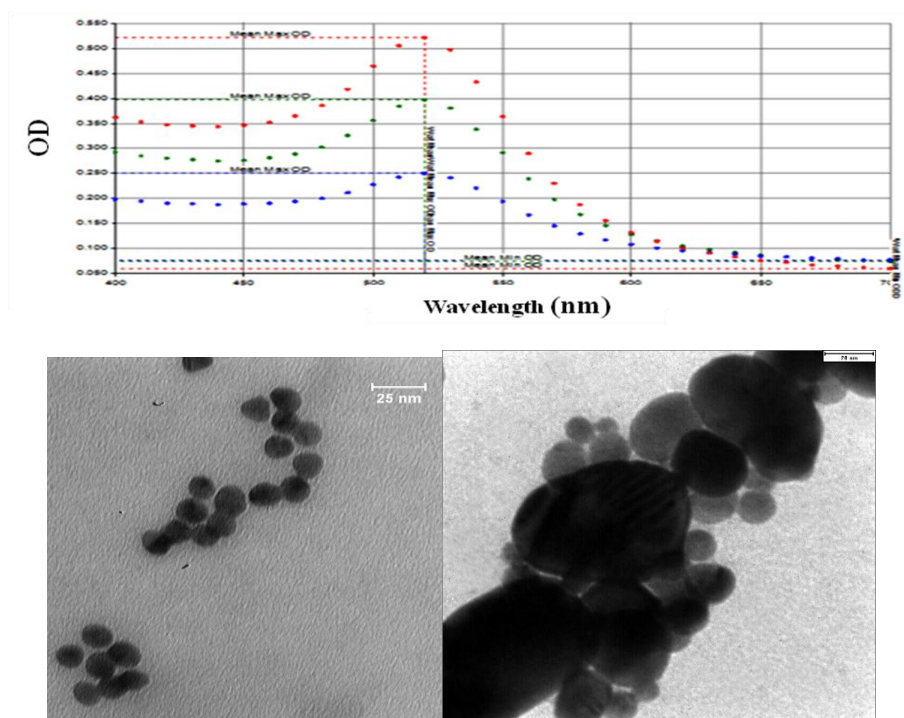
۳- نتایج

۳-۱ تعیین ویژگی‌های نانوذرات طلا

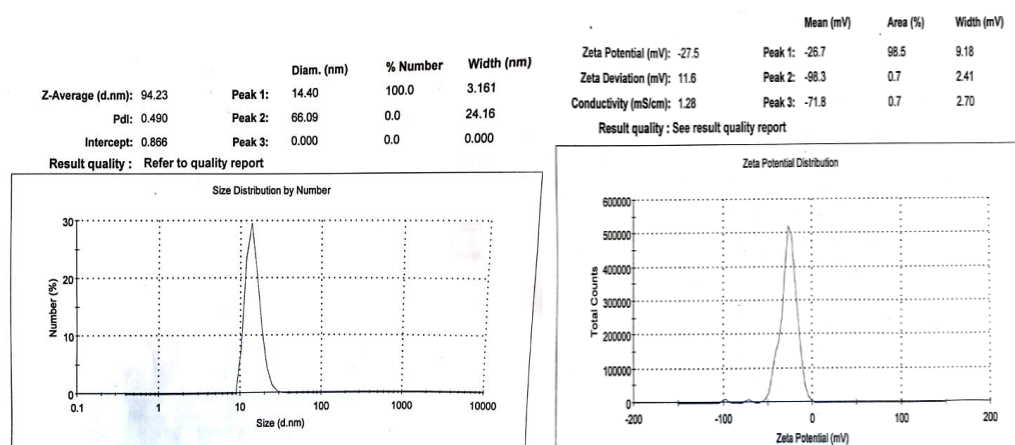
پس از سنتز نانوذرات طلا (GNPs) براساس روش‌های مطرح شده در بخش مواد و روش‌ها، نانوذرات طلا تولیدی با استفاده از یک اسپکتروفتومتر UV-vis در محدوده ۴۰۰-۷۰۰ نانومتر بررسی شد. ماکزیمم پیک جذبی در محدوده ۵۲۰ نانومتر بیانگر، سنتز و غلظت مناسب GNPs است (شکل ۲-ب). همچنین، تصاویر

سنتز شده با استفاده از دستگاه DLS، ۱۴،۴۰ نانومتر و پتانسیل زتای آن در حدود ۲۷،۵- میلی‌ولت، محاسبه شد و به دست آمد (شکل ۳).

تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی گذاره، مقایسه مناسبی از پراکندگی GNPs نسبت به حالت آگریگه شده را نشان داد که بیانگر شکل مناسب نانوذره در عملکرد با نمک می‌باشد (شکل ۲-پایین). از سوی دیگر اندازه GNPs



شکل ۲ مشخصات نانوذرات طلا. بالا- طیف جذبی نانوذرات طلا در غلظت‌های مختلف. پایین- مرفولوژی نانوذرات تولیدی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره، (راست) نانوذرات طلا آگریگه شده و (چپ) پراکنده، مقیاس در این تصاویر ۲۵ نانومتر است.



شکل ۳ منحنی DLS مربوط به تعیین اندازه و پتانسیل زتای GNPs. (چپ) منحنی میانگین اندازه نانوذره، (راست) بار سطحی نانوذره.

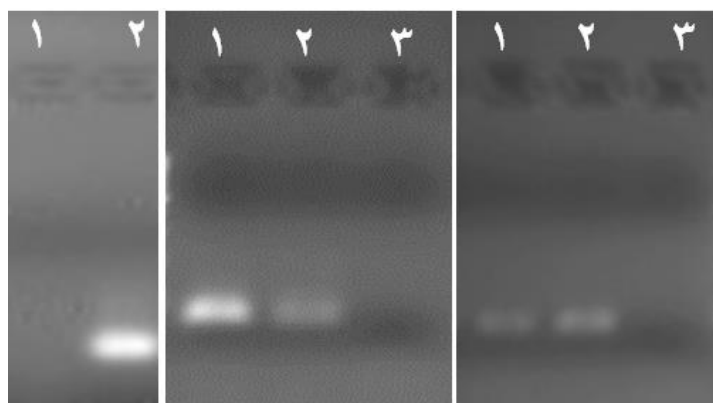
۳-۲ ارزیابی عملکرد آپتاسنسور طراحی شده

پس از سنتز GNPs و تایید اتصال رشته مکمل به آن، برای ارزیابی عملکرد آپتاسنسور طراحی شده، ابتدا کمپلکس SNP-dsDNA مطابق شکل ۱، طراحی و تهیه شد. برای تایید اتصال SNP به آپتامر از ژل آگارز ۲/۵ درصد استفاده شد و غلظت‌های ۲۲۰ و ۴۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از SNP نیز بررسی شد. همان طور که در شکل ۴ مشخص است در غلظت ۶۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیچ باندهی از آپتامر آزاد بر روی ژل مشاهده نشد.

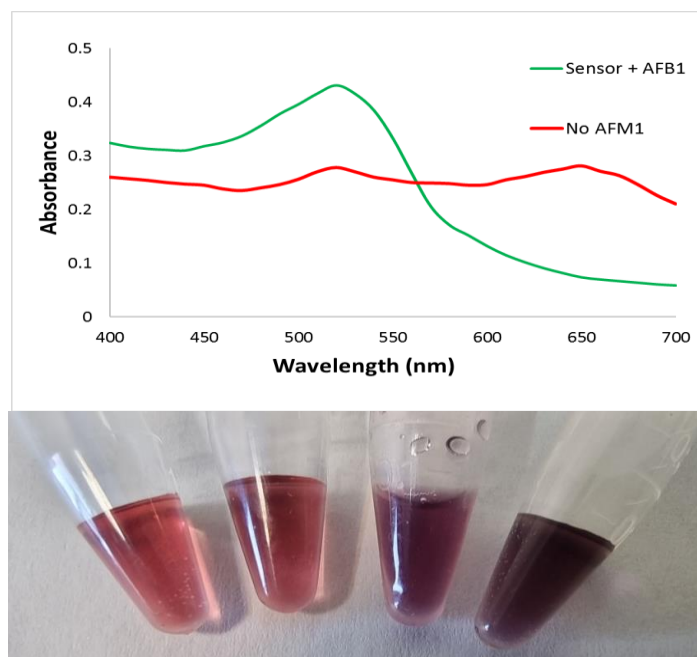
۳-۳ ارزیابی عملکرد آپتاسنسور

برای تایید عملکرد آپتاسنسور، میزان جذب در طول موج های مختلف اندازه‌گیری شد (شکل ۵-بالا). همان طور که در این شکل مشخص است در صورت وجود هدف در محیط، به علت اتصال آپتاسنسور به هدف، رشته مکمل از کمپلکس dsDNA-SNP جدا شده و پس از

سانتریفیوژ در سوپرناتانت باقی می‌ماند. حال، چنانچه این محلول به نانوذرات طلا اضافه شود، رشته‌های مکمل می‌توانند دور این نانوذرات قرار گرفته و از تجمع یافتن این ذرات در مواجهه با NaCl جلوگیری کنند. به این ترتیب محیط به رنگ قرمز در آمده و در طول موج ۵۲۰ نانومتر پیک مشاهده می‌شود. حال، اگر در محیط، هدفی وجود نداشته باشد، کمپلکس dsDNA-SNP بدون تغییر باقی می‌ماند و در نهایت پس از سانتریفیوژ رشته مکملی به‌صورت آزاد وجود ندارد. بنابراین، نانوذرات طلا در مجاورت NaCl تجمع پیدا می‌کنند و رنگ محیط به سمت آبی تیره پیش می‌رود و هیچ پیکی مشاهده نمی‌شود. در نتیجه از غلظت ۰ نانوگرم (بدون هدف، آبی)، تا ۲۵۰۰۰ نانوگرم (قرمز)، تغییر رنگ به‌صورت چشمی نیز قابل تفکیک است (شکل ۵-پایین).



شکل ۴ ارزیابی نانوذرات طراحی شده با استفاده از ژل آگارز ۲/۵ درصد. (چپ) بررسی و ارزیابی اتصال رشته توالی مکمل به GNPs با استفاده از روش ژل الکتروفورز. چاهک ۱: نانوذره طلا متصل به رشته مکمل. چاهک ۲: رشته مکمل (غلظت). (وسط) بررسی تشکیل کمپلکس SNP-dsDNA بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد. چاهک ۱: آپتامر آزاد، چاهک ۲: آپتامر به‌علاوه ۴۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از SNP، چاهک ۳: آپتامر به‌علاوه ۶۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از SNP. (راست) چاهک ۱: آپتامر، چاهک ۲: رشته مکمل، چاهک ۳: کمپلکس dsDNA-SNP.

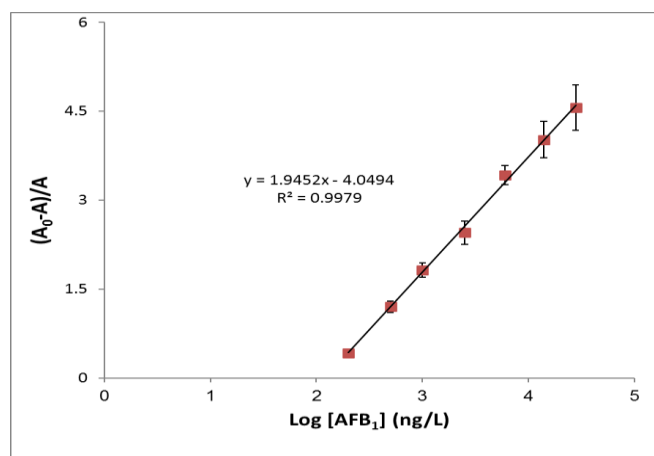


شکل ۵ بالا- بررسی عملکرد آبتاسنسور در مجاورت AFB₁. در صورتی که در محیط هدف وجود داشته باشد، به علت آزاد شدن رشته مکمل از کمپلکس dsDNA-SNP و باقی ماندن در سوپرناتانت، با اضافه کردن نمک (NaCl)، GNPs تجمع نمی یابند. حال اگر در محیط، AFB₁ حضور نداشته باشد، رشته مکمل در سوپرناتانت حضور ندارد و نمی تواند از GNPs در مقابل تجمع یافتن در مواجهه با نمک محافظت کند. پایین- تغییر رنگ نانوذرات طلا در مجاورت غلظت های مختلف از AFB₁. از راست به چپ، غلظت های ۰، ۲۰۰۰، ۱۲۰۰۰ و ۲۵۰۰۰ نانوگرم بر لیتر AFB₁ استفاده شده است.

آبتاسنسور میزان جذب اندازه گیری شد. با قرار دادن مقادیر جذب در معادله خط به دست آمده از نمونه های سرم، میزان غلظتی از AFB₁ که آبتاسنسور قادر به اندازه گیری آن است، محاسبه شد. بر اساس جدول ۲ آبتاسنسور قادر به تشخیص میزان ۹۷ تا ۱۰۶ درصد می باشد که مقادیر قابل قبولی است. انحراف از معیار نسبی کمتر از ۵/۸ درصد می باشد که نشان دهنده صحت انجام کار است. با توجه به تکرارپذیری کار می توان گفت که دقت انجام کار نیز مطلوب بوده است.

همچنین، برای بررسی عملکرد آبتاسنسور در نمونه های زیستی، از سرم آلوده شده به آفلاتوکسین (به صورت مصنوعی و در غلظت های مختلف) استفاده شد. سپس، مشابه آنچه که در بخش ۲-۴ بیان شد، منحنی استاندارد برای اندازه گیری حد تشخیص (LOD) در سرم، رسم شد (شکل ۶). به این ترتیب مقدار حد تشخیص این روش، ۵۰ نانوگرم بر لیتر و محدوده خطی آن ۲۰۰-۲۸۰۰۰ نانوگرم بر لیتر محاسبه و تخمین زده شد.

از سوی دیگر برای بررسی بازیابی، ابتدا غلظت های مشخص از AFB₁ در سرم تهیه و سپس با استفاده از



شکل ۶ بررسی عملکرد آپتاسنسور در نمونه سرم. حرف A عدد اگریگاسیون بعد از اضافه کردن AFB₁ و A₀ عدد اگریگاسیون قبل از اضافه کردن AFB₁ می باشد.

جدول ۲ آزمون بازیابی برای ماده AFB₁ در نمونه های سرم.

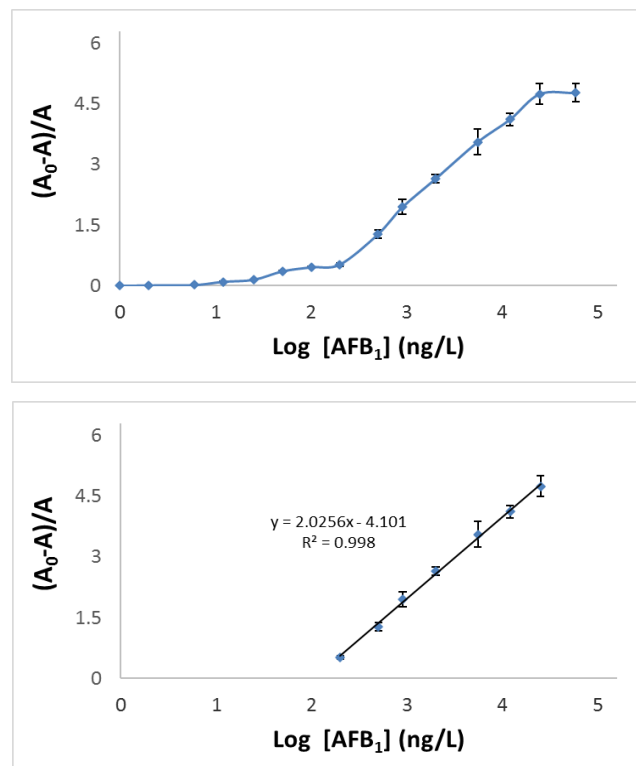
نمونه سرم	مقدار AFB ₁ اضافه شده (ng/L)	مقدار AFB ₁ یافت شده (ng/L)	میزان بازیابی (%)	میزان انحراف از استاندارد نسبی (%، n=4)
۱	۱۰۰۰	۹۷۵	۹۷٫۵	۴٫۸
۲	۵۰۰۰	۴۸۵۰	۹۷	۳٫۶
۳	۱۵۰۰۰	۱۵۹۰۰	۱۰۶	۵٫۸

۳-۳ ارزیابی حساسیت و اختصاصیت آپتاسنسور

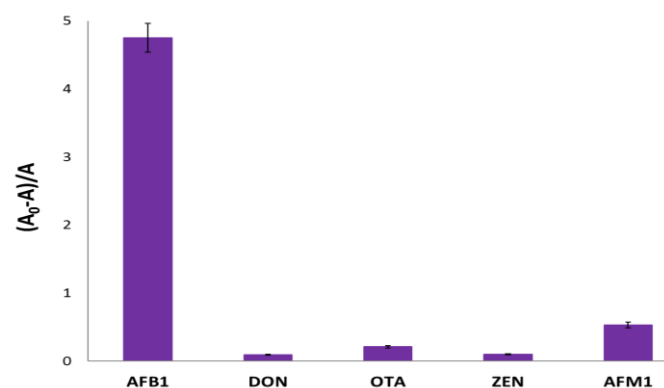
طراحی شده

برای ارزیابی و محاسبه حد تشخیص (حساسیت) آپتاسنسور ساخته شده، براساس موارد مطرح شده در بخش ۲-۴، نمودار ترسیم شد (شکل ۷-بالا). براین اساس همچنین، ناحیه خطی نمودار شکل رسم شد و معادله $y = 2.0256x - 4.101$ با $R^2 = 0.998$ به دست آمد (شکل ۷-پایین). از تقسیم سه برابر انحراف استاندارد بر شیب این خط حد تشخیص (LOD) ۳۰ نانوگرم بر لیتر محاسبه و

به دست می آید. محدوده خطی حد تشخیص آن ۲۵۰۰۰-۲۰۰ نانوگرم بر لیتر محاسبه و تخمین زده شد. از سوی دیگر برای بررسی انتخابیت آپتاسنسور، این حسگر در مجاورت غلظت ۷۵۰۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر از AFB₁، AFM₁، DON، ZEN و OTA قرار گرفت. شکل ۸ نشان می دهد جذب نسبی آپتاسنسور در مواجهه با AFB₁، DON، ZEN و OTA کمی افزایش داشته است. در حالی که، این مقدار در مواجهه با AFB₁ به طور معناداری بسیار بیشتر بوده است. این نتایج نشان می دهد آپتاسنسور به صورت اختصاصی علیه AFB₁ عمل می کند.



شکل ۷ بالا- بررسی کارکرد آبتاسنسور در مجاورت غلظت‌های مختلف از AFB_1 . پایین- نمودار استاندارد AFB_1 . حرف A عدد اگریگاسیون بعد از اضافه کردن هدف و A_0 عدد اگریگاسیون قبل از اضافه کردن هدف می‌باشد.



شکل ۸ بررسی میزان انتخابی بودن آبتاسنسور طراحی شده در برابر مواد مختلف با ساختار شیمیایی نزدیک به AFB_1 .

۵-بحث

تغییر سطح پلاسمونیک این نانوذرات سبب شده است که با استفاده از مولکول‌های تشخیصی، همچون، آنتی‌بادی و آپتامر، بتوان یک روش رنگ‌سنجی ساده و سریع را برای

در سالیان اخیر استفاده از سیستم‌های رنگ‌سنجی مبتنی بر GNPs مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است.

تشخیص مولکول‌های زیستی نظیر توکسین یا باکتری، توسعه داد[۲۳-۲۵]. از مزیت‌های این سیستم‌ها می‌توان به ساده بودن و عدم نیاز به دستگاه‌های پیچیده اشاره کرد. همچنین، این حسگرها نیازی به نشان‌دار کردن آنتی‌بادی

یا آپتامر توسط ترکیبات فلورسانس یا رادیواکتیو ندارند. البته مزیت روش‌های دستگاهی شناسایی آفلاتوکسین‌ها در مقایسه با زیست حسگرها بر کسی پوشیده نیست.

جدول ۳ مقایسه حد تشخیص و دامنه خطی آپتاسنسورهای نوری.

Detection technique	Recognition probe	Limit of detection	Dynamic detection range	Ref.
Chemiluminescence (CL)	Aptamer	0.11 ng/mL	0.1-10 ng/mL	33
Electrochemiluminescence (ECL)	Aptamer	0.02 pg/mL	0.05-100 pg/mL	34
Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)	Aptamer	25 fg/mL	5.0×10 ⁻⁵ - 5.0 ng/mL	35
Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)	Aptamer	0.03 ng/ L	1.0 × 10 ⁻⁴ - 1.0 μg/L	36
Surface-enhanced Raman scattering (SERS)	Aptamer	0.03 ng /L	0.03-100 ng/mL	37
Surface-enhanced Raman scattering (SERS)	Aptamer	0.48 pg /mL	1 to 1000 pg/mL	38
Surface plasmon resonance (SPR)	Aptamer	0.4 nM	0.4- 200 nM	39
Microring resonator	Aptamer	5 nM		40
Fluorescence	Aptamer	0.1ng/mL	0.1 - 0.00001 ng/mL	41
Fluorescence	Aptamer	1.6 ng/mL	5-100 ng/mL	42
Fluorescence	Aptamer	3.4 nM	10-400 nM	43
Fluorescence	Aptamer	0.3 ng/g ng/g	0.1-10 ng/g	27
Fluorescence	Aptamer	5 pg/mL	5 pg/mL to 2.00 ng/mL	44
Fluorescence	Aptamer	1.4 nM	1.6 nM to 160 μM	45
Fluorescence	Aptamer	0.2pg/mL pg/mL	0.001-0.05ng/mL	46
FRET	Aptamer	0.34 pg /mL	0.005–100 ng mL ⁻¹	47
Colorimetry and Chemiluminescence (CL)	Aptamer	7 nM and 0.5 nM	80-270 nM	17
Colorimetry	Aptamer	0.025 ng/mL	0.025-100 ng/mL	30
Colorimetry	Aptamer	50 ng/L		This work

جدول ۴ مقایسه روش‌های شناسایی آفلاتوکسین B1.

Detection Method	Recognition probe	Limit of detection	Ref.
Instrumental Methods	UHPLC-FLD	2 ng/mL (6.4 nM)	48
Antibody based methods	Immunochromatography assay	2.5 ng/mL (8 nM)	49
	Clean-up tandem immunoassay column	5 ng/mL (16 nM)	50
	Enzyme immunoassay	2 ng/mL (6.4 nM)	51
Aptamer based methods	RT-qPCR	25 fg/mL (80 fM)	35
	Electrochemical Aptasensor based on electropolymerized Neutral red	0.016 ng/mL (0.05 nM)	52
	Electrochemical aptasensor based on Cys-PAMAM dendrimers	0.12 ng/mL (0.4 nM)	53
	Aptamer-based dipstick assay	0.1 ng/mL (0.32 nM)	27
	Colorimetric sensor based on aptamer/split DNAzyme	0.1 ng/mL (0.3 nM)	54
	Enzymatic method based on AChE inhibition	10 ng/mL (32 nM)	55
	FRET based aptasensor	0.34 pg mL ⁻¹	47
	SERS aptasensor	0.48 pg mL ⁻¹	39
	Aptamer-based fluorescent assay	50 pg mL ⁻¹ (50 ng/L)	This work
Fluorescence	Aptamer	50 ng/L	This work

اما، زیست حسگرها می‌توانند به‌عنوان یک روش سریع و ارزان شناسایی پیش از به‌کار بردن روش‌های دستگاهی مطرح باشند. آنتی‌بادی‌ها و آپتامرها پرکاربردترین گیرنده های زیستی در شناسایی آفلاتوکسین‌ها هستند. با این حال، اسیدهای نوکلئیک (آپتامرها) نسبت به آنتی‌بادی‌ها عمر مفید بالاتری دارند. علاوه بر این اندازه کوچکتر، تولید توسط یک روش برون‌تنی (SELEX) و توانایی ایجاد اصلاحات بر روی ساختار، باعث شده است آپتامرها نسبت به آنتی‌بادی‌ها بیشتر مورد توجه پژوهشگران قرار بگیرند [۲۸-۲۶]. با توجه به مشخصات سم شناسی آفلاتوکسین B1 (AFB1)، در ارزیابی کیفیت منابع غذایی، شناسایی متابولیت اصلی آن نظیر آفلاتوکسین M1 (AFM1)، بسیار مهم است. از سوی دیگر، به دلیل سطوح پایین این متابولیت‌های سمی، توسعه روش‌های قابل اعتماد و حساس ضروری می‌باشد. امروزه روش‌های الکتروشیمیایی و نوری به شدت برای توسعه آپتاسنسورها استفاده می‌شود [۲۹]. آپتاسنسورهای مختلفی برای تشخیص AFB1 و متابولیت اصلی آن AFM1 توسعه یافته‌اند، از جمله، رنگ‌سنجی [۳۰]، فلورسانس [۳۱]، الکتروشیمیایی [۳۲] و نورتابی شیمیایی [۳۳]. در جدول ۳ ویژگی‌های روش تشخیصی در این مطالعه با روش‌های تشخیصی نوری دیگر مقایسه شده است. اگرچه این روش نسبت به برخی روش‌های اشاره شده، دارای حد تشخیص کمتری می‌باشد، اما سادگی روش، سهولت استفاده، قیمت مناسب و قابلیت روش برای استفاده در محیط، باعث شده تا به‌عنوان یک روش تشخیصی مناسب برای سنجش آفلاتوکسین B1 معرفی شود. همچنین در جدول ۴ روش مبتنی بر آپتامر با سایر روش‌های سنجشی دستگاهی و مبتنی بر آنتی‌بادی مقایسه شده است.

۶- نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر یک آپتاسنسور چشمی با استفاده از نانوذرات طلا (GNPs) طراحی شد. آپتامر AFB1 حاوی

گروه بیوتین از طریق پیوند با استرپتاویدین موجود در سطح نانوذرات سیلیکا به این نانو ذرات متصل شده، سپس با تایید اتصال، رشته مکمل آپتامر را به محیط اضافه کرده و این رشته به آپتامر وصل می‌شود. اگر در محیط AFB1 حضور داشته باشد، آپتامر که میل پیوندی بیشتری به AFB1 دارد از رشته مکمل جدا شده و به AFB1 متصل می‌شود. حال با سانتریفیوژ کردن، سوپرناتانت که حاوی رشته مکمل است، جدا شده و با اضافه کردن به GNPs، این رشته‌های مکمل دور GNPs قرار گرفته و مانع تجمع آنها در مجاورت محلول یک مولار از NaCl می‌شوند. بنابراین رنگ محیط قرمز رنگ می‌باشد و هر چه غلظت AFB1 بیشتر باشد رنگ قرمزتر خواهد بود (شکل ۱). برعکس اگر در محیط AFB1 وجود نداشته باشد، رشته مکمل از آپتامر جدا نشده و بنابراین پس از مرحله سانتریفیوژ، رشته مکملی برای ممانعت از تجمع GNPs در مجاورت نمک وجود ندارد. بنابراین، رنگ محیط آبی تیره می‌شود. مکانیسم عملکرد آپتاسنسور در شکل ۱ ارائه شده است. در نتیجه این آپتاسنسور تشخیصی می‌تواند در برای شناسایی ساده، سریع و دقیق AFB1 مورد استفاده و توسعه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر در پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر انجام گرفته است و بودجه آزمایشات فوق از سوی این دانشگاه تامین شده است. بنابراین از زحمات مسئولین این دانشگاه، سپاسگذاری می‌شود.

۷- منابع

1. Ismail, A., Gonçalves, B.L., de Neeff, D.V., Ponzilacqua, B., Coppa, C.F.S.C., Hintzsche, H., Sajid, M., Cruz, A.G., Corassin, C.H., Oliveira, C.A.F. (2018) Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. *Food Res. Int.* 113, 74-85.
2. Akhtar, S., Shahzad, M.A., Yoo, S-H., Ismail, A., Hameed, A., Ismail, T., Riaz, M. (2017) Determination of Aflatoxin M 1 and Heavy Metals

- diagnosing Alzheimers disease: A review. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 135,112689.
16. Alipour, M., Zeinoddini, M., Saeedinia, A.R. (2018) Anti-Trinitrotoluene aptamer: Design, functional assessment and optimization. *Appl. Biochem. Microbio.* 54,677-681.
 17. Hosseini, M., Khabbaz, H., Dadmehr, M. Ganjali, MR., Mohamadnejad, J. (2015) Aptamer-based Colorimetric and Chemiluminescence Detection of Aflatoxin B1 in Foods Samples. *Acta. Chim. Slov.* 62, 721–728.
 18. Jalalian, S.H., M. Ramezani, N.M. Danesh, M. Alibolandi, K. Abnous, S.M. Taghdisi, (2018) A novel electrochemical aptasensor for detection of aflatoxin M1 based on target-induced immobilization of gold nanoparticles on the surface of electrode, *Biosens. Bioelectron.* 117 , 487-492.
 19. Barkheh, H., Zeinoddini, M., Ranjbar, B. Xodadadi, N. (2021) A novel strategy for trinitrotoluene detection using functionalized gold nanoparticles. *J. Anal. Chem.* 76,459–465.
 20. Hua, Z., Yu, T., Liu, D., Xianyu, Y. (2021) Recent advances in gold nanoparticles-based biosensors for food safety detection. *Biosens. Bioelectron.* 179, 113076. doi: 10.1016/j.bios.2021.113076.
 21. Castillo, G., Spinella, K., Poturnayov'a, A., ˇSnejd'arkov'a, M., Mosiello, L., Hianik, T. (2015) Detection of aflatoxin B1 by aptame rbased biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform. *Food Control.* 52, 9–18.
 22. Zhang, Y., Liu, W., Zhang, W., Yu, S., Yue, X., Zhu, W., Zhang, D., Wang, Y., Wang, J. (2015) DNA-mediated gold nanoparticle signal transducers for combinatorial logic operations and heavy metal ions sensing, *Biosens. Bioelectron.* 72 , 218-224.
 23. Faridfar, G., Zeinoddini, M., Akbarzedehkolahi, S., Faridfar, S., Nemati, A.S. (2021) Immunodiagnostic of *Vibrio cholerae* O1 using localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensor. *Int. Microbiol.* 24, 115-122.
 24. Yaghubi, F., Zeinoddini, M., Saeedinia, A.R., Azizi, A., Nemati, A.S. (2020) Design of localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensor for immunodiagnostic of *E. coli* O157: H7 using gold nanoparticles conjugated to the chicken antibody. *Plasmonics.* 15, 1481-1487.
 25. Zeinoddini, M., Azizi, A., Bayat, S., Tavasoli, Z. (2018) Localized surface plasmon resonance (LSPR) detection of diphtheria toxoid using gold nanoparticle-monoclonal antibody conjugates. *Plasmonics*, 13, 583-590.
 26. Jia, Y., Zhou, G., Liu, P., Li, Z., Yu, B. (2019) Recent development of aptamer sensor for the quantification of aflatoxin B1. *Appl. Sci.* 9, 2364.
 27. Shim, WB., Kim, MJ., Mun, H., Kim, MG. (2014) An aptamer-based dipstick assay for the in Infant Formula Milk Brands Available in Pakistani Markets. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 37 , 79-86.
 3. Khorrami, R., Pooyanmehr, M., Ebrahim M., Soroor, N., Gholami, S. (2022) Evaluation of some aflatoxins in feed ingredients of livestock and poultry by HPLC method, a local study in kermanshah province. *Iranian J. Veterinary Med.* 16, 228-310.
 4. Shabeer, S., Asad, S., Jamal, A., Ali, A. (2022) Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: An updated review. *Toxins*, 14: 307.
 5. Eskola, M.; Kos, G.; Elliott, C.T.; Hajšlová, J.; Mayar, S.; Krska, R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* (2020), 60, 2773–2789.
 6. Khoshpey, B., Farhud, D., Zaini, F. (2011) Aflatoxins in Iran: Nature, hazards and carcinogenicity. *Iranian J. Public Health.* 40, 1-30.
 7. Mohammadi, M., Mohebbi, G., Hajeb, P., Akbarzadeh, S., Shojaei, I. (2012) Aflatoxins in rice imported to Bushehr, a southern port of Iran. *Am. Eurasian J. Toxicol. Sci.* 4, 31-5.
 8. Mozaffari Nejad, A.S., Heshmati, A., Ghiasvand, T. (2020) The occurrence and risk assessment of aflatoxin M1 in cheeses samples from hamadan, Iran. *Iran J. Pharm. Res.* 19,44-50.
 9. Dhakal, A., Sbar, E. Aflatoxin Toxicity. StatPearls Publishing; 2022 , PMID: 32491713.
 10. Zhang, K., Banerjee K. (2020) A review: Sample preparation and chromatographic technology for detection of aflatoxins in foods. *Toxins (Basel)* 12 , 539.
 11. Xue, Z., Zhang, Y., Yu, W., Zhang, J., Wang, J., Wan, F., Kim, Y., Liu, Y., Kou, X. (2019) Recent advances in aflatoxin B1 detection based on nanotech.nology and nanomaterials-A review. *Anal. Chem. Acta.* 1069 ,1-27.
 12. Li, H., Wang, D., Tang, X., Zhang, W., Zhang, Q., Li, P. (2020) Time-resolved fluorescence immunochromatography assay (TRFICA) for aflatoxin: Aiming at increasing strip method sensitivity. *Front. Microbiol.* 11,676.
 13. Marin, M., Nikolic, M.V., Vidic, J. (2021) Rapid pont of need detection of bacteria and their toxins in food using gold nanoparticles. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20, 5880-5900.
 14. Nooranian, S., Mohammadinejad, A., Mohajeri, T., Aleyaghoob, G., Kazemi Oskuee, R. (2021) Biosensors based on aptamer-conjugated gold nanoparticles: A review. *Biotechnol. Appl. Biochem.* doi: 10.1002/bab.2224.
 15. Negahdary, M., Angnes, L. (2022) Electrochemical aptamer-based nanobiosensors for

39. Sun, L., Wu, L., Zhao, Q. (2017) Aptamer based surface plasmon resonance sensor for aflatoxin B1. *Microchimica. Acta.* 184 , 2605-2610.
40. Chalyan, T., Pasquardini, L., Gandolfi, D., Guider, R., Samusenko, A., Zanetti, M., Pucker, G., Pederzoli, C., Pavesi, L. (2017) Aptamer-and Fab'-functionalized microring resonators for aflatoxin M1 detection. *IEEE J Sel. Topics Quantum Electron.* 23 , 1-8.
41. Zhang, J., Li, Z., Zhao, S., Lu, Y. (2016) Size-dependent modulation of graphene oxide-aptamer interactions for an amplified fluorescence-based detection of aflatoxin B 1 with a tunable dynamic range, *Analyst*, 141 , 4029-4034.
42. Chen, L., Wen, F., Li, M., Guo, X., Li, S., Zheng, N., Wang, J. (2017) A simple aptamer-747 based fluorescent assay for the detection of Aflatoxin B 1 in infant rice cereal, *Food Chem.* 215 , 377-382.
43. Sabet, F.S., Hosseini, M., Khabbaz, H., Dadmehr, M., Ganjali, M.R. (2017) FRET-based aptamer biosensor for selective and sensitive detection of aflatoxin B1 in peanut and rice, *Food Chem.* 220 , 527-532.
44. Wang, B., Chen, Y., Wu, Y., Weng, B., Liu, Y., Lu, Z., Li, C.M., Yu, C. (2016) Aptamer induced assembly of fluorescent nitrogen-doped carbon dots on gold nanoparticles for sensitive detection of AFB 1. *Biosens. Bioelectron.* 78 , 23-30.
45. Lu, Z., Chen, X., Wang, Y., Zheng, X., Li, C.M. (2015) Aptamer based fluorescence recovery assay for aflatoxin B1 using a quencher system composed of quantum dots and graphene oxide. *Microchimica. Acta.* 182 , 571-578.
46. Zhang, J., Xia, Y.K., Chen, M., Wu, D.Z., Cai, S.X., Liu, M.M., He, W.H., Chen, J.H. (2016) A fluorescent aptasensor based on DNA-scaffolded silver nanoclusters coupling with Zn (II)-ion signal enhancement for simultaneous detection of OTA and AFB 1. *Sen. Act. B. Chemical.* 235 , 79-85.
47. Mahmood Khan, I., Niazi, S., Yu, Y., Mohsin, A., Mushtaq, BS. Iqbal, MW., Rehman, A., Akhtar, W., Wang, Z. (2019) Aptamer induced multicolored AuNCs-WS2 "Turn on" FRET nano platform for dual-color simultaneous detection of AflatoxinB1 and zearalenone. *Anal. Chem.* 91, 14085–14092
48. Corcuera, L.A., Ibanez-Vea, M., Vettorazzi, A., Gonzalez-Penas, E., & Cerain, A. L. (2011) Validation of a UHPLC-FLD analytical method for the simultaneous quantification of aflatoxin B1 and ochratoxin a in rat plasma, liver and kidney. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879, 2733–2740.
49. Xiulan, S., Xiaolian, Z., Jian, T., Zhou, J., & Chu, F. S. (2005) Preparation of goldlabeled antibody probe and its use in rapid and simple detection of aflatoxin B1. *Biosens. Bioelectron.* 62, 288–294.
28. Jafari, M., Rezaei, M., Kalantari, H., Tabarzad, M., Daraei, B. (2017) Optimization of aflatoxin B1 aptasensing. *J. Toxicol.* 2017,2461354
29. Danesh, N.M., Bostan, H.B., Abnous, K., Ramezani, M., Youssefi, K., Taghdisi, S.M., Karimi, G. (2018) Ultrasensitive Detection of Aflatoxin B1 and Its Major Metabolite Aflatoxin M1 Using Aptasensors: A Review, *Trends Anal. Chem.* doi: 10.1016/j.trac.2017.12.009.
30. Luan, Y., Chen, Z., Xie, G., Chen, J., Lu, A., Li, C., Fu, H., Ma, Z., Wang, J. (2015) Rapid visual 645 detection of aflatoxin b1 by label-free aptasensor using unmodified gold nanoparticles, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15 ,1357-1361.
31. Sun, W., Lu, Y., Mao, J., Chang, N., Yang, J., Liu, Y. (2015) Multidimensional sensor for pattern recognition of proteins based on DNA-gold nanoparticles conjugates, *Analytical chemistry*, 87 , 3354- 59.
32. Istamboulie, G., Paniel, N., Zara, L., Granados, L.R., Barthelmebs, L., Noguer, T. (2016) Development of an impedimetric aptasensor for the determination of aflatoxin M1 in milk, *Talanta*, 146 , 464-469.
33. Shim, W. B., Mun, H., Joung, H. A., Ofori, J.A., Chung, D. H., Kim, M.G. (2014) Chemiluminescence competitive aptamer assay for the detection of aflatoxin B1 in corn samples, *Food Control.* 36 ,658 30-35.
34. Liu, J.L., Zhao, M., Zhuo, Y., Chai, Y.Q., Yuan, R. (2017) Highly efficient intramolecular electrochemiluminescence energy transfer for ultrasensitive bioanalysis of aflatoxin M1. *Chemistry-A European J.* 23 , 1853-1859.
35. Guo, X., Wen, F., Zheng, N., Luo, Q., Wang, H., Wang, H., Li, S., Wang, J. (2014) Development of an ultrasensitive aptasensor for the detection of aflatoxin B 1. *Biosens. Bioelectron.* 56 , 340-344.
36. Guo, X. Wen, F. Zheng, N. Li, S., Fauconnier, M.L., Wang, J. (2016) A qPCR aptasensor for sensitive detection of aflatoxin M1, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 , 5577-5584.
37. Zhao, Y., Yang, Y., Luo, Y., Yang, X., Li, M., Song, Q., (2015) Double detection of mycotoxins based on SERS labels embedded Ag@ Au core-shell nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7 , 21780-21786.
38. Aike, L., Xu, C., Tang, L., Ma, W., Xu, L., Kuang, H., Liu, L., Wu, X., Song, S., Song D., Chen, X. (2015) A SERS-active sensor based on heterogeneous gold nanostar core-silver nanoparticle satellite assemblies for ultrasensitive detection of aflatoxinB1. *Nanoscale.* 4. DOI: 10.1039/C5NR08372A.

- polycarboxylic macrocycle modified with neutral red for aflatoxin B1 detection. *Electroanalysis*, 26, 2100–2109.
53. Castillo, G., Spinella, K., Poturnayová, A., Šnejdárková, M., Mosiello, L., & Hianik, T. (2015) Detection of aflatoxin B1 by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform. *Food Control* 52, 9–18.
54. Seok, Y., Byun, J. Y., Shim, W. B., & Kim, M. G. (2015) A structure-switchable aptasensor for aflatoxin B1 detection based on assembly of an aptamer/split DNzyme. *Analyt. Chimica. Acta*, 886, 182–187.
55. Moscone, D., Arduini, F., & Amine, A. (2011) A rapid enzymatic method for aflatoxin B detection. *Methods Mol. Biol.* 739, 217–235
- immunochromatography assay for Detection of aflatoxin B1. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 185–194.
50. Goryacheva, I. Y., De Saeger, S., Delmulle, B., Lobeau, M., Eremin, S. A., Barna-Vetro, I., Van Peteghem, C. (2007) Simultaneous non-instrumental detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A using a clean-up tandem immunoassay column. *Analyt. Chimica. Acta.* 590, 118–124.
51. Saha, D., Acharya, D., Roy, D., Shrestha, D., & Dhar, T. K. (2007) Simultaneous enzyme immunoassay for the screening of aflatoxin B1 and ochratoxin A in chili samples. *Analyt. Chimica. Acta.* 584, 343–349.
52. Evtugyn, G., Porfireva, A., Stepanova, V., Sitdikov, R., Stoikov, I., Nikolelis, D., & Hianik, T. (2014) Electrochemical aptasensor based on

Simple and rapid detection of aflatoxin B1 using a colorimetric aptasensor based on gold nanoparticles

Mehdi Zeiniddini¹, Abolfazl Danesh², Javad Fadaei Kakhki³, Noor Mohammad Danesh^{4,5}

1. Associate Professor, Chemistry and Chemical Engineering Faculty, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.
2. Instructor, Student Research Committee, Faculty of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnord, Iran.
3. Assistant Professor, Faraja Research Institute of Law Enforcement Sciences and Social Studies - Department of Technology Monitoring, Tehran, Iran.
4. Assistant Professor, Passive Defense Faculty, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.
5. Assistant Professor, Pharmacuetical Faculty, Mashhad University of Medical science, Mashhad, Iran.

zeinoddini@modares.ac.ir, daneshnm46@yahoo.com

Receipt: 2022/07/17

Accepted: 2023/03/11

Abstract

Aflatoxin B1 is a type of mycotoxin produced by *Aspergillus* fungi during food production and storage. Aflatoxins have many toxic effects on the body that cause mutagens, teratogens and have high carcinogenic properties that cause cancer in the liver and other organs. Although conventional device methods for measuring aflatoxin B1 in food are sensitive and accurate, they have disadvantages such as high diagnostic time, high cost, the need for a trained user, and the creation of false positive results. Therefore, the development of new measuring methods has been prioritized by researchers. Among these measurement methods is the use of biosensors, which are fast, simple and more affordable and are used in the food industry today. In this work, a colorimetric optical aptasensor using gold nanoparticles with appropriate sensitivity and high selectivity was used to detect aflatoxin B1 in serum and buffer. For this purpose, gold nanoparticles were synthesized by reducing HAuCl_4 by sodium citrate (with a size of 14.40 nm and a zeta potential of -27.5). In this method, the protective effect of DNA sequence on the surface of gold nanoparticles has been used in the presence or absence of aflatoxin with the intervention of salt and the characteristic of visual color change. The detection limit of this method was estimated to be 50 ng/L and its linear range was 200-28000 ng/L. As a result, the designed aptasensor can be used for quick identification and screening of this toxin in contaminated food.

Keywords: Aflatoxin B1, Detection, Aptamer, colorimetric, Gold nanoparticles, Biosensor.