

Arsenic Calorimetric Sensor Design Using Aptasensor Based on Gold Nanoparticles

Masumeh Brati¹, Kamal Yavari^{2*}, Mustafa Aghazadeh², Haniyeh Jafari¹

1- Department of Biology, SRC, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background: Nowadays, the presence of heavy metal contamination, including arsenic, in water resources and the environment seriously threatens human health. Numerous methods have been developed for the detection of arsenic; however, they are time-consuming and expensive. The use of aptasensors attached to gold nanoparticles suspended in water is a rapid and specific method that is performed using a probe with a high degree of selectivity. In this study, a colorimetric sensor based on an aptamer–nanoparticle system was presented for the rapid and in-situ detection of arsenic in aqueous solutions.

Materials and Methods: The arsenic-specific aptamer was designed using special software's. First, the gold nanoparticle-arsenic ion-specific aptamer complex was incubated for a specified time and room temperature. Then, arsenic samples were added to the complex at different concentrations and their sensitivity and specificity were determined using the naked eye and spectrophotometry.

Results: The sensitivity of the designed method for arsenic using the naked eye (colorimetric detection) was obtained as 0.1mM. No such color change was observed for other investigated heavy metals, indicating that this aptamer is not sensitive to structural changes induced by the other tested heavy metals and is specific only to arsenic.

Conclusion: The approaches evaluated in this study represent a rapid, inexpensive, and efficient method and have the potential to serve as a foundation for future biosensors.

Keywords: Aptasensors, Gold Nanoparticles, Arsenic, Colorimetric Detection.

Corresponding Author:

Kamal Yavari; Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran;

Email: kyavari@aeoi.org.ir

طراحی حسگر رنگ‌سنجی آرسنیک با استفاده از آپتاسنسور بر پایه نانوذرات طلا

معصومه براتی^۱، کمال یآوری^{۲*}، مصطفی آفازاده^۲، هانیه جعفری^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۲- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه وجود آلودگی‌های فلزات سنگین از جمله آرسنیک در منابع آبی و محیط زیست، سلامت انسان را به شدت تهدید می‌کند. روش‌های زیادی برای شناسایی آرسنیک ایجاد شده است که زمان‌بر بوده و پرهزینه می‌باشند. استفاده از آپتاسنسورهای متصل به نانوذرات طلای سوسپانسیون شده در آب، روشی سریع و اختصاصی می‌باشد که با استفاده از یک پروپ با درجه انتخاب‌پذیری بالا انجام می‌شود. در این پژوهش یک حسگر رنگ‌سنجی بر پایه آپتامر-نانوذرات جهت شناسایی سریع و درجای آرسنیک در محلول‌های آبی ارائه گردیده است.

مواد و روش‌ها: آپتامر ویژه آرسنیک با استفاده از نرم‌افزارهای خاص طراحی شد. ابتدا کمپلکس نانوذرات طلا-آپتامر ویژه یون آرسنیک در زمان مشخص و دمای اتاق انکوبه شد. سپس نمونه‌های آرسنیک در غلظت‌های مختلف به کمپلکس اضافه و حساسیت و گزینش‌پذیری آن‌ها با استفاده از چشم غیرمسلح و اسپکتروفتومتری مشخص گردید.

یافته‌ها: حساسیت روش طراحی شده برای آرسنیک با استفاده از چشم غیرمسلح (رنگ‌سنجی) ۰/۱ میلی‌مولار به دست آمد. چنین تغییر رنگی برای سایر فلزات سنگین مورد بررسی مشاهده نشد که نشان می‌دهد این آپتامر به تغییرهای ساختاری سایر فلزات سنگین مورد بررسی حساس نیست و فقط برای آرسنیک اختصاصی است.

نتیجه‌گیری: رویکردهای ارزیابی شده در این تحقیق، روشی سریع، ارزان و با کیفیت بوده و قابلیت تبدیل شدن به پایه‌ای برای حسگرهای زیستی آینده را دارند.

واژگان کلیدی: آپتاسنسور، نانوذرات طلا، آرسنیک، تشخیص رنگ‌سنجی.

۱- مقدمه

در حال حاضر وجود آلودگی های فلزات سنگین در منابع آبی و محیط زیست، سلامت انسان ها را به شدت تهدید می کند؛ چراکه تجمع و عدم متابولیزه شدن این فلزات در بدن باعث بروز بیماری های مختلفی مانند آسیب سیستم عصبی، ناراحتی های گوارشی، دردهای عضلانی و سرطان می شوند. آلودگی های ناشی از سم فلزات سنگین در آب های آشامیدنی، سالیانه باعث مرگ ۳/۵ میلیون نفر در جهان می شود. فعالیت های انسانی، کودها و سموم شیمیایی، پیشرفت و توسعه صنعت و عوامل طبیعی مانند آتشفشان ها از منابع ورود فلزات سنگین به محیط زیست به شمار می روند. سرب، جیوه، کادمیم، آرسنیک، مس و روی شایع ترین آلاینده های زیست محیطی می باشند (۱، ۲).

آرسنیک، یک عنصر بسیار سمی است که در محیط به وفور یافت می شود و مشخص شده است که بیماری های متعددی مانند آسیب های پوستی و مشکلات مربوط به سیستم گردش خون و خطر بالای ابتلا به سرطان در اثر سمیت با آرسنیک وجود دارد (۳، ۴). گرچه روش هایی مثل طیف سنجی جذب اتمی، کروماتوگرافی و طیف سنج جرمی پلازما ابزارهایی بسیار حساس و دقیق برای سنجش مقادیر آلاینده های فلزات سنگین مثل آرسنیک در محیط هستند (۵، ۶). اما به دلیل هزینه بالا، نیاز به تجهیزات پیشرفته، مراحل انجام خاص و پیچیده، وابستگی به پرسنل ماهر و زمان آنالیز نسبتاً طولانی آن ها، نیاز به طراحی روش های شناسایی ساده، ارزان، سریع، حساس و انتخابی برای آرسنیک وجود دارد (۲).

در سال های اخیر، بیوسنسورهایی جهت شناسایی فلزات سنگین در محیط زیست طراحی و ساخته شده اند. این بیوسنسورها از توانمندی نانوذرات فلزی به عنوان پروب یا شناساگر رنگی استفاده می کنند. نانوذرات فلزی نظیر نانوذرات نقره، طلا و پلاتین به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی به عنوان پروب حسگر بسیار مورد توجه می باشند (۷-۱۲).

خواص نوری و الکترونیکی نانوذرات طلا با تغییر اندازه و شکل قابل تنظیم می باشد. محلول کلئیدی نانوذرات به دلیل جذب پلاسمون سطحی رنگ قرمز شدیدی را از خود نشان می دهد و قادر به تشخیص و شناسایی

کوچک ترین تغییر در محیط اطراف خود می باشد. نانوذرات کروی شکل طلا به دلیل خواص نوری و الکترونیکی منحصر به فرد، آسانی روش سنتز و هزینه پایین سنتز، از اهمیت ویژه ای در ساخت در طراحی حسگرهای زیستی مختلف برخوردارند (۱۹-۱۳).

نانوذرات طلا به دلیل توانایی اتصال به انواع بیومولکول ها و خاصیت کاتالیتیکی، در بسیاری از حسگرها از جمله حسگرهای آنزیمی، DNA و ایمونوسنسورها مورد استفاده قرار گرفته اند. ترکیب نانوذرات طلا در ساختار آپتامر، یکی از مهم ترین و جدیدترین حسگرهای زیستی است که در حوزه های کاری مختلف از جمله تصویربرداری زیستی، انتقال دارو، صنایع غذایی، بیوتروریسم و تشخیص مواد خطرناک مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۱۴-۱۹).

آپتامرها، الیگونوکلئوتیدهای کوتاه دو یا تک رشته ای از جنس DNA و یا RNA هستند که مشابه آنتی بادی ها توانایی اتصال اختصاصی به هدفشان را دارند. پایه و اساس شناسایی هدف توسط آپتامرها، تشکیل ساختار دوم و سوم القاشده توسط آنالیت می باشد. آپتامرها بسیار اختصاصی عمل می کنند و قدرت تمایز تغییرهای حتی جزئی در ساختار دو هدف مرتبط و نزدیک به هم را دارند. در سنجش های امروزی بسیاری از محققان آپتامرها را جایگزین آنتی بادی نموده اند، چون که آپتامرها مزایای زیادی نسبت به آنتی بادی ها دارند، از جمله این که آپتامرها نسبت به آنتی بادی ها پایدار بوده، ایمنی زایی و سمیت پایین داشته و روش سنتز آسان و کم هزینه ای دارند (روش شیمیایی SELEX^۱ در محیط آزمایشگاه) و نتیجه حاصل از روش شناسایی آنالیت با آپتامر نسبت به آنتی بادی ها ساده و کم هزینه می باشد (۲۰-۳۲).

در این پژوهش با استفاده از خاصیت پلاسمون سطحی نانوذرات طلا و تشکیل ساختارهای دوم و سوم آپتامر در حضور آرسنیک، آپتامر مخصوص آرسنیک با نانوذرات طلا کونژوگه گردید و از آن برای شناسایی آرسنیک محلول استفاده شد. نتایج حاصل توسط مشاهده چشمی و اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفتند.

¹ Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد شیمیایی

آپتامر ویژه آرسنیک بعد از طراحی با کیفیت HPLC در کمپانی Generay^۱ سنتز شد. نانوذرات طلا استفاده شده به قطر ۱۵ نانومتر کروی و سیترا ته به دلیل کاهش خطای احتمالی سنتز در این پژوهش از دو شرکت پیشگام نانومواد و نانومبنا (ایران) خریداری شد. سنتز نانوذره کروی طلا توسط این دو شرکت به روش ترکوویچ می باشد. بافر TE Buffer 1X و DEPC^۲ از شرکت سیناکلون، سدیم نیترات، پتاسیم نیترات، نمک NaCl و سایر مواد مورد استفاده با خلوص ۹۹ درصد از شرکت Merck^۳ تهیه گردید.

۲-۲- طراحی آپتامر ویژه آرسنیک

آپتامر کل آرسنیک طی فرایندی به نام SELEX انتخاب و تعیین شده است. در این پژوهش یک آپتامر ۲۱ نوکلئوتیدی از توالی کل آرسنیک، طبق روش زیر طراحی شد:

توالی DNA کل آپتامر اختصاصی آرسنیک در پایگاه NCBI شناسایی و با استفاده از نرم افزارهای اختصاصی از قبیل Oligo7 و OligoAnalyzer^۴ قطعه ای از آپتامر بلندرشته، طبق پروتکل طراحی آپتامر ایده آل جدا و انتخاب گردید. آپتامر طراحی شده از نظر ایجاد ساختارهای دوم سنجاق سری، انرژی، برهم کنش نوکلئوتیدها با یکدیگر و مکمل آپتامر با استفاده از وب سرورهای اختصاصی BLAST (NCBI, USA) mFold Web Server (University at Albany, USA) و RNA structure Software (University of Rochester, USA) مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۳- تعیین مشخصات کیفی نانوذرات طلا

نانوذرات طلا از شرکت پیشگام نانومواد و نانومبنا (ایران) خریداری شد. جهت اطمینان از خواص نانوذرات خریداری شده، میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM^۴ برای مشاهده تصاویر و اندازه کروی نانوذرات طلا استفاده شد. ساختار بلوری نانوذرات طلا با استفاده از پراش اشعه ایکس^۵

ارزیابی شد. همچنین حداکثر جذب طول موج نانوذرات توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-260^۶ سنجیده شد.

۲-۴- آماده سازی آپتامر و تهیه کمپلس آپتامر-نانوذرات طلا به آپتامر لیوفیلیزه طراحی شده، مطابق پروتکل شرکت، بافر TE به ویال اضافه شد تا غلظت ۱۰۰ میکرومول محلول استوک حاصل گردد. حال به منظور حفظ و جلوگیری از آلودگی محلول استوک، آلیکوت های آن در میکروتیوب های کوچک تقسیم کرده و سپس در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

با توجه به آزمایشی که قرار است انجام شود، لوله های میکروتیوب RNase-DNase Free، را آماده کرده و از آپتامری که در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می شود در زیر هود لامینار، ۱ میکرولیتر به داخل هر میکروتیوب افزوده شد. سپس به مقدار ۴۰ میکرولیتر از نانوذرات طلا به هر ویال اضافه کرده و پس از مخلوط ملایم به مدت ۱ ساعت در جای تاریک و دمای اتاق انکوبه شدند.

۲-۵- شناسایی آرسنیک و بررسی حساسیت آپتاسنسور ابتدا غلظت های مورد نیاز از آرسنیک تهیه گردیدند. و در میکروتیوب های مختلف، طبق پروتکل تهیه نانوپتاسنسور گفته شده در بالا، نانوذرات طلا با آپتامر کمپلکس شده و به مدت ۱ ساعت در تاریکی و دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی گراد) انکوبه گردیدند. سپس، از محلول های آرسنیک با غلظت های مختلف به میکروتیوب ها اضافه نموده و دوباره به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. در آخر، به داخل میکروتیوب ها، ۱۰ میکرولیتر از نمک NaCl ۰/۲۵ میلی مولار سرد اضافه شد و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه نتایج حاصل (تغییر رنگ یا تغییر طیف جذب نوری) با چشم غیر مسلح و همچنین با استفاده از اسپکتروفوتومتر طیف سنج مرئی-فرا بنفش مشاهده و آنالیز گردید.

۲-۶- بررسی گزینش پذیری آپتاسنسور

در این مرحله جهت اثبات گزینش پذیری آپتاسنسور ساخته شده، از عناصر دیگر کادمیم، کروم و سرب، روی، مس،

¹ Generay Biotech Co., Shanghai, China, HPLC purified

² Diethylpyrocarbonate

³ Darmstadt, Germany

⁴ Scanning Electron Microscope (SEM), Model: Sigma 300, ZEISS, ZEISS, Germany

⁵ X-Ray Diffraction Model: X'Pert PRO, PANalytical, Netherlands XRD

⁶ UV-Visible Spectrophotometer, Model: UV-2600, Shimadzu, Japan

عدم حضور آرسنیک فاقد ساختار خاصی است درحالی که در حضور آرسنیک، ساختاری تغییر شکل یافته و منظم را ایجاد می کند. در این صورت تمایل آپتامر به سطح نانوذرات طلا متفاوت می شود.

در این تست، طیف جذب نانوذرات طلا-آپتامر در عدم حضور نمونه (آرسنیک) با اضافه شدن NaCl تغییری پیدا نکرد و در طول موج جذب ۵۲۰ نانومتر بیشترین جذب را داشت که معرف نانوذرات طلا جدا از هم می باشد. در مقابل، شدت جذب نانوذرات طلا در حضور غلظت های مختلف آرسنیک، در ۵۲۰ کاهش یافته و با افزودن نمک شدت جذب در ناحیه ۶۲۰ نانومتر افزایش پیدا کرد که متعلق به نانوذرات تجمع یافته می باشد. با توجه به اینکه ذرات طلا جدا از هم در ۵۲۰ نانومتر بیشترین جذب را دارند، اما هنگامی که ذرات طلا تجمع پیدا می کنند، در ۶۲۰ نانومتر بیشترین جذب را دارند (شکل ۲). بنابراین می توان نتیجه گرفت که آرسنیک با این آپتامر اتصال برقرار کرده است. به عبارت دیگر، آپتامر که در ابتدا با نانوذرات طلا اتصال برقرار کرده بود پس از اضافه کردن آرسنیک از نانوذرات طلا جدا گردیده و با آرسنیک کمپلکس شده است. نانوذرات طلا در تجمع یافته شده از رنگ قرمز به بنفش کم رنگ تا غلیظ تغییر رنگ می دهند که با چشم نیز قابل مشاهده است (شکل ۱).

پتاسیم، سدیم، نیکل و کبالت در شرایط و غلظت یکسان با آرسنیک طبق پروتکل بالا توسط آپتاسنسور مورد آنالیز قرار گرفتند. گزینش پذیری کیفی تغییر رنگ محلول ها، با چشم غیرمسلح و گزینش پذیری کمی نیز توسط اسپکتروفوتومتر طیف سنج مرئی-فرابنفش آنالیز گردید.

۳- نتایج

۳-۱- تشخیص آرسنیک با استفاده از آپتاسنسور طلا

۳-۱-۱- آزمون حساسیت به صورت کیفی و کمی

حساسیت آپتاسنسور برای غلظت های ۰/۱ mM تا ۱۰ mM مورد بررسی قرار گرفت. بسته به غلظت آرسنیک، رنگ محلول از قرمز روشن تا بنفش تیره تغییر یافت. تشکیل رنگ بنفش تیره بیانگر حساسیت کیت طراحی شده به صورت چشمی با حد تشخیص ۰/۱ میلی مولار و حد تشخیص پایین تر در اسپکتروفوتومتری به دست آمد. در غلظت های بالاتر آرسنیک، نانوذرات طلا به سرعت تجمع می یابند، چون که در غلظت های بالای آرسنیک، تمامی آپتامرها از نانوذرات طلا جدا شده و به آرسنیک متصل می شوند و در نتیجه نانوذرات طلا به راحتی توسط NaCl تجمع می یابند. این تجمع در حدی بود که با چشم غیرمسلح قابل مشاهده است. نتایج حاصل از تغییر رنگ حاصل به صورت کمی، با استفاده از بررسی طیف مرئی-فرابنفش قابل اندازه گیری است. آپتامر خاص آرسنیک موجود در واکنش، در صورت

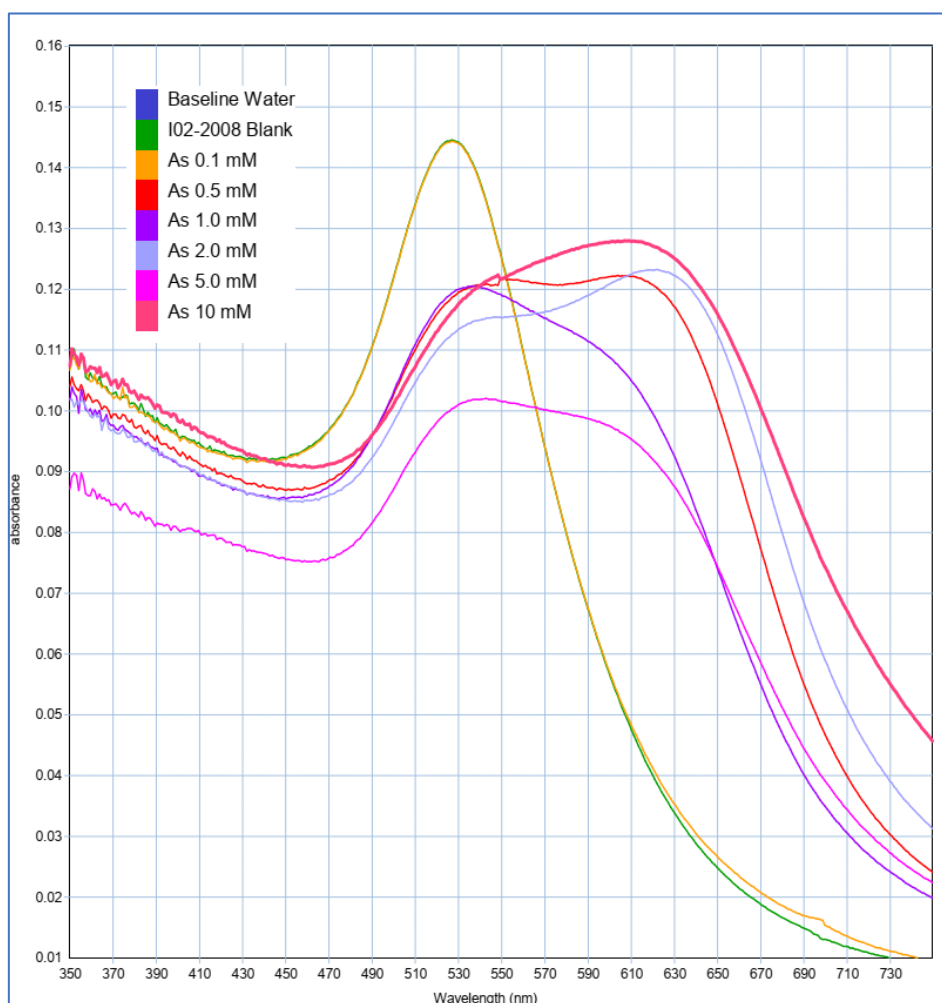


شکل ۱- بررسی نتایج آزمون حساسیت آپتاسنسور ویژه آرسنیک به صورت کیفی.

مربوط به نانوذرات طلا یعنی ۵۲۰ نانومتر باقی مانده است. در صورتی که در سایر طول موج ها یک شیفت یا انحراف طول موجی دیده می شود که مربوط به حضور یون

شکل ۲ طیف مربوط به UV-Vis را نشان می دهد، رنگ لیمویی متعلق به تست بلانک (کمپلکس آپتامر-نانوذرات بدون آرسنیک) می باشد که طول موج در همان جایگاه

آرسنیک است که طول موج جذب را تغییر داده که علت آن نیز تجمع نانوذرات طلا می باشد (۶۲۰ نانومتر).



شکل ۲- بررسی نتایج آزمون حساسیت آپتاسنسور ویژه آرسنیک به صورت کمی.

آپتامر اختصاصی آرسنیک به فلز آرسنیک می باشد. بنابراین آرسنیک در کیت طراحی شده بدون نیاز به چشم مسلح و براساس تکنیک رنگ سنجی به آسانی قابل تشخیص می باشد (شکل ۳). در شکل ۴ مشاهده می شود که فلزات غیر آرسنیک به کاررفته در این مطالعه فقط در ۵۲۰ نانومتر جذب دارند، به عبارت دیگر جذب در ۵۲۰ در این آزمایش مربوط به نانوذرات طلا می باشد که نتوانسته اند تجمع پیدا کنند. به عبارت دقیق تر آنالیت های غیر از آرسنیک نتوانسته اند به این آپتامر اتصال پیدا کنند و این آپتامر اختصاصی برای آنها نیست، بلکه برای آرسنیک اختصاصی می باشد. در شکل ۴ مشخص است که فقط آرسنیک به آپتامر متصل شده است و طیف جذب از ۵۲۰ نانومتر به ۶۲۰ نانومتر شیفیت پیدا کرده است،

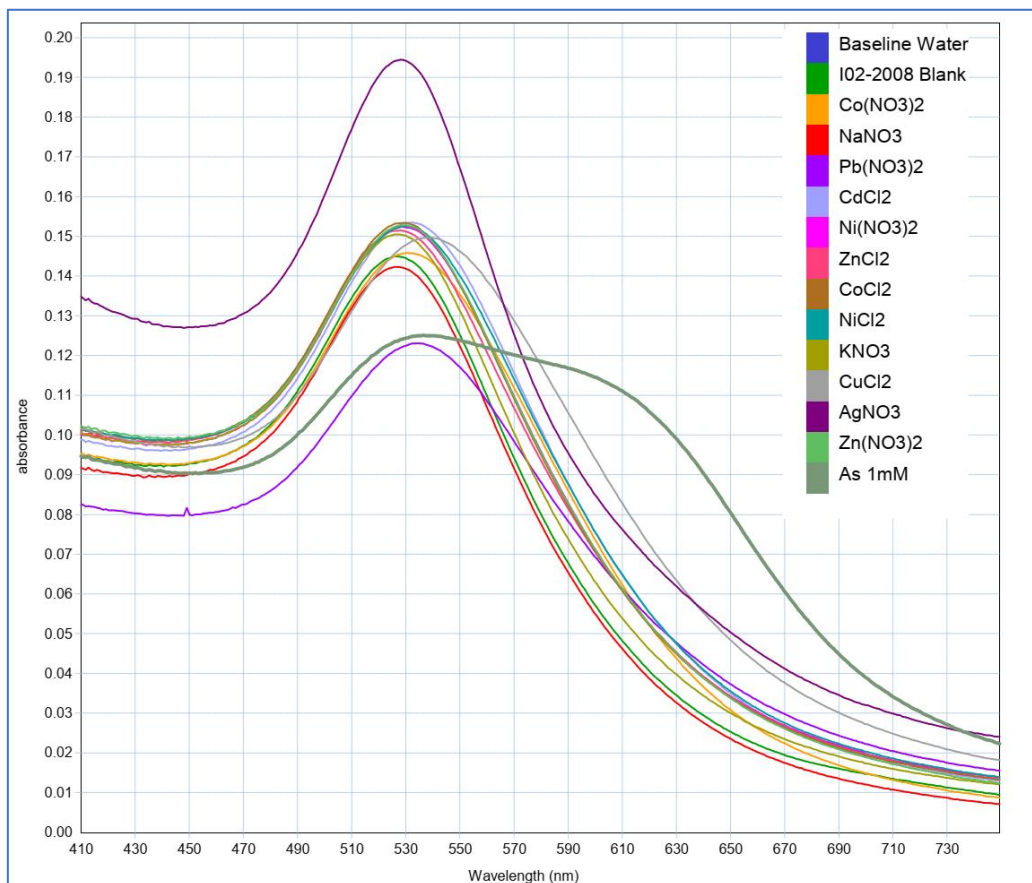
۳-۱-۲- تست گزینش پذیری آپتاسنسور ویژه آرسنیک به صورت کیفی و کمی

گزینش پذیری یکی از مهم ترین مؤلفه ها برای طراحی کیت می باشد. شکل های زیر نشان دهنده گزینش پذیری آپتاسنسور طراحی شده برای آرسنیک به صورت کیفی (شکل ۳) و کمی (شکل ۴) می باشد. همان طور که ملاحظه می شود در نانوذرات موجود در آپتاسنسور در حضور عناصر دیگری غیر از آرسنیک از قبیل کادمیم، کروم، مس، سرب، پتاسیم، سدیم، نیکل و کبالت با استفاده از این آپتاسنسور ویژه آرسنیک تغییر رنگ دیده نشد و همانند بلانک قرمز باقی مانده است. اما محلول حاوی آرسنیک (آنالیت هدف) از قرمز روشن به بنفش تیره تر تغییر رنگ داده است. این تغییر رنگ به دلیل تجمع نانوذرات طلا، شناسایی و اتصال

در حالی که جذب برای بقیه آنالیت ها در همان محدوده جذب نانوذره آزاد طلا یعنی ۵۲۰ نانومتر باقی مانده است.



شکل ۳- بررسی نتایج آزمون گزینش پذیری اپتاسنسور ویژه آرسنیک به صورت کیفی.



شکل ۴- بررسی نتایج گزینش پذیری اپتاسنسور ویژه آرسنیک توسط UV-Vis.

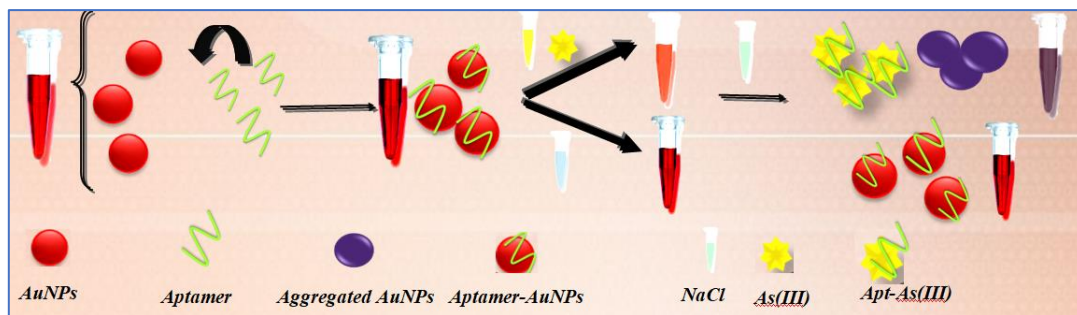
۴- بحث

بودن و سختی انجام واکنش‌ها، محققان را برای پیدا کردن روش‌های ساده‌تر و کم هزینه‌تر، حساس‌تر و اختصاصی‌تر تشویق کرده است (۵، ۶ و ۳۲). از جمله این روش‌های

در سال‌های اخیر روش‌های مختلفی از جمله روش‌های فلورسانسی، الکتروشیمی و آنزیمی جهت شناسایی آرسنیک مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اما محدودیت‌هایی مثل زمان‌بر

چشم غیرمسلح به راحتی قابل مشاهده است. حساسیت کیت طراحی شده در این مطالعه به صورت چشمی با حد تشخیص ۰/۱ میلی مولار و حد تشخیص پایین تر در اسپکتروفتومتری به دست آمد. مطالعه های مشابهی توسط چن و همکارانشان روی پتاسیم انجام شده و تغییر رنگ ایجاد شده در نانوذرات طلا با اضافه کردن پتاسیم مشاهده شده است (۲۴). همچنین اپتاسنسور و نانوذرات طلا حتی برای اندازه گیری و تشخیص بیومولکول هایی مثل P53 مورد استفاده قرار گرفته (۳۶) و تغییر رنگ نانوذرات طلا از قرمز به بنفش به واسطه حضور تومورمارکر مشاهده گردیده است. نتایج آزمایش های اختصاصی این مطالعه نشان دادند که اپتامر به طور اختصاصی توانایی تشخیص آرسنیک را دارد، به طوری که هنگام اضافه شدن آرسنیک محلول به کمپلکس اپتامر-نانوذرات طلا، اپتامر دچار تغییر ساختار دوم شده و از نانوذرات طلا جدا می شود و جذب آرسنیک می گردد. پس از جدا شدن اپتامر، نانوذرات طلا ناپایدار شده و با افزودن نمک بلافاصله تجمع پیدا کردند و این امر منجر به تغییر رنگ نانوذرات طلا از قرمز به رنگ بنفش گردید. در مورد سایر فلزات سنگین مورد بررسی چنین تغییر رنگی مشاهده نشد، که نشان دهنده آن است که این اپتامر در برابر آن ها به تغییر ساختار حساس نیست و فقط اختصاصی آرسنیک می باشد.

شناسایی اپتامرها می باشد. در شکل ۵ شمای آزمون رنگ سنجی بر پایه نانوذرات کروی طلا برای شناسایی آرسنیک با استفاده از اپتامر DNA تک رشته ای به کاررفته در این پژوهش را نشان می دهد. در حالت عادی نانوذرات طلا به دلیل وجود یون های سیترات و دافعه حاصل تجمع نمی کنند و در حالت آزاد باقی می مانند. توالی های تک رشته ای اپتامر آرسنیک به راحتی توسط بازه های جذب سطح نانوذرات طلا می شود. افزودن مولکول اپتامر موجب اتصال DNA تک رشته ای اپتامر از طریق برهم کنش های واندروالسی و الکترواستاتیکی بر روی سطح نانوذرات طلا و ایجاد حالت محافظتی در برابر تجمع نانوذرات به واسطه نمک NaCl ۰/۲۵ میلی مولار می شود (۳۳، ۳۴). در صورتی که علاوه بر اپتامر، عنصر آرسنیک نیز به کمپلکس مورد نظر اضافه گردد، این مولکول تمایل به ایجاد ساختار ساقه و حلقه دو رشته ای دارد. در اپتامر به صورت دو رشته ای بازه های نیتروژن حاوی بار مثبت در داخل و گروه های فسفات در بیرون ساختار قرار می گیرند (۳۴، ۳۵). در واقع در طی این فرایند همان طور که قبلاً اشاره شد در حضور آنالیت (در اینجا آرسنیک) اپتامر از نانوذرات طلا جدا شده و با تشکیل ساختار منحصر به فرد دوم و سوم و تشکیل ساقه-حلقه به آنالیت متصل می شود، تفاوت بین بار سطحی نانوذرات طلا و توالی اپتامر به حداقل می رسد و این امر موجب جلوگیری از محافظت نانوذرات به وسیله اپتامر شده و نمک NaCl به راحتی موجب تجمع آن ها می شود که با



شکل ۵- شمای آزمون رنگ سنجی بر پایه نانوذرات کروی طلا برای شناسایی آرسنیک با استفاده از اپتامر DNA تک رشته ای

استفاده گردید و اتصال غیراختصاصی با دیگر فلزات مشاهده نشد. در توجیه این تفاوت نتیجه حاصل از دو مطالعه می توان گفت با اینکه روش های بیان شده از محدوده تشخیصی بالایی برخوردار می باشند اما تشکیل DNA دو رشته ای فرایندی زمان بر است و امکان دارد در طی فرایند آزمایش و عدم رعایت اصول، dsDNA به درستی

Zhan و همکارانشان نیز پژوهش مشابهی را برای شناسایی آرسنیک انجام داده اند. ایشان در تحقیق خویش از اپتامر DNA دو رشته ای طویل (۱۲۰ نوکلئوتید) استفاده کرده اند. در پژوهش مورد مطالعه Zhan و همکارانش اتصال غیراختصاصی جزیی اپتاسنسور با برخی فلزات مثل نقره و مس علاوه بر آرسنیک مشاهده می شود (۳۷). در این مطالعه از اپتامر کوتاه و DNA تک رشته ای

تشکیل نشده و حضور DNA تکرار شده ای متصل نشده، نتایج را به صورت کاذب نشان دهد.

۵- نتیجه گیری

در این مطالعه یک استراتژی رنگ سنجی مبتنی بر آپتامر- نانوذرات طلا برای شناسایی آرسنیک در محلول آبی استفاده شد. اساس تشخیص و شناسایی آرسنیک، تمایل بالای آپتامر برای اتصال به آرسنیک مناسب و در نتیجه جدا شدن از نانوذرات طلا بود که منجر به تجمع نانوذرات طلا و تغییر رنگ از قرمز به بنفش و شیفیت طول موج جذب از ۵۲۰ نانومتر متعلق به نانوذرات طلای آزاد به طول موج ۶۲۰ نانومتر متعلق به نانوذرات تجمع یافته در اثر حضور آرسنیک می باشد. پس از بهینه سازی شرایط سنجش، آرسنیک محلول می تواند در محدوده ۰/۱ میلی مولار به صورت چشمی و در غلظت های پایین تر توسط دستگاه UV-vis شناسایی شود. در مقایسه با سنسورهای قبلی، سنجش بر مبنای آپتامر رنگ سنجی آرسنیک سه مزیت را ارائه می دهد: اول، این سنجش ساده و راحت برای کار است، فرایندهای کار غیر پیچیده و معرف های رایج درگیر هستند. دوم، روش شناسایی به طور قابل توجهی کوتاه تر است، که این سنجش را برای پایش سریع آرسنیک در کاربردهای مرتبط با محیط زیست و سایر کاربردها بسیار امیدوارکننده می کند. سوم، آپتامر کوتاه تکرار شده ای طراحی شده در این پژوهش برای آرسنیک بسیار اختصاصی بوده، محدودیت های مربوط به آپتامرهای طویل دو رشته ای (تداخل با حضور یون های رقیب) را ندارد. در نهایت اینکه با توجه به قابلیت ردیابی نتایج به صورت چشمی، آپتامسور طراحی شده برای آرسنیک، نویدبخش روشی ساده، سریع، کم هزینه و با دقت

و حساسیت بالا جهت تشخیص آرسنیک در آینده نه چندان دور خواهد بود.

۶- تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری تخصصی می باشد و تمامی مراحل مطالعه در آزمایشگاه رادیوبیوشیمی پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای انجام شده است. بدین وسیله از همکاران محترم این پژوهشگاه صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

۷- تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

۸- سهم نویسندگان

کمال یوری: طراحی ایده پژوهش، نظارت علمی، طراحی آپتامر و آنالیزهای بیوانفورماتیکی، انجام آزمایش ها، جمع آوری و تحلیل داده ها و ویرایش نهایی مقاله.
مصطفی آقازاده: مشاوره در به کارگیری و تعیین مشخصات نانوذرات.

هانیه جعفری: مشاوره در تحلیل نتایج اسپکتروفتومتری.
معصومه براتی: انجام آزمایش ها، جمع آوری داده ها و نگارش اولیه مقاله.

۹- کد اخلاق

مقاله ملاحظه اخلاقی ندارد؛ مقاله فاقد مطالعات سلولی، حیوانی و انسانی می باشد.

۱۰- منابع

1. Kumar P, Gacem A, Ahmad MT, Yadav VK, Singh S, Yadav KK, Alam MM, Dawane V, Piplole S, Maurya P, Ahn Y. Environmental and human health implications of metal(loid)s: source identification, contamination, toxicity, and sustainable clean-up technologies. *Front Environ Sci.* 2022; 10:949581.
2. Karthik V, Selvakumar P, Senthil K, et al. Biosensor for heavy metals detection in wastewater: a review. *Food Chem Toxicol.* 2022; 168:113307.
3. Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol Sci.* 2011;120(1):305-32.
4. Francisco A, Greta D, Marco G. Arsenic speciation analysis of environmental samples. *J Anal at Spectrom.* 2020;35(2):215-37.
5. Alispahic A, Krivohlavek A, Galic N. Novel preservation methods for inorganic arsenic speciation in model and natural water samples by stripping voltammetric method. *Appl Sci.* 2021;11(19):8811.
6. Ammann AA. Arsenic speciation analysis by ion chromatography: a critical review of principles and applications. *Am J Anal Chem.* 2011;2(1):27-36.
7. Li Y, Liao Q, Hou W, Qin L. Silver-based surface plasmon sensors: fabrication and applications. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4):4142.
8. Luo X, Morrin A, Killard AJ, Smyth MR. Nanoparticles in electrochemical biosensors. *Encycl Nanoscience Nanotechnol.* 2011; 47:3-501.
9. Ramesh M, Janani R, Deepa C, Rajeshkumar L. Nanotechnology-enabled biosensors: a review of fundamentals, design principles, materials, and applications. *Biosens Bioelectron.* 2022;13(1):40.
10. Malhotra BD, Ali MA. Nanomaterials in biosensors: fundamentals and applications. *Nanomaterials for Biosensors.* 2017; 1:1-20.
11. Holzinger M, Le Goff A, Cosnier S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Front Chem.* 2014; 2:63.
12. Yu L, Song Z, Peng J, Yang M, Zhi H, He H. Progress of gold nanomaterials for colorimetric sensing based on different strategies. *TrAC Trends Anal Chem.* 2020; 127:115880.
13. Hao F, Nehl CL, Hafner JH, Nordlander P. Plasmon resonances of a gold nanostar. *Nano Lett.* 2007;7(3):729-32.
14. Roya A, Zeinab SA, Soham M. The application of DNA-functionalized gold nanoparticles for detection of metabolites and nucleic acids in personalized medicine. *Pers Med J.* 2021;6(21):23-29.
15. Tiwari PM, Vig K, Dennis VA, Singh SR. Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomaterials.* 2011;1(1):31-63.
16. Alexa G, Filippo P, Nelson T, Cesare U, Timothy JB, Luciano DS. Thermoplasmonics with gold nanoparticles: a new weapon in modern optics and biomedicine. *Adv Photonics Res.* 2021;2(8):1-17.
17. Farah R, Manije Z, Jun F, Khaled G. Therapeutic applications of nanomedicine: recent developments and future perspectives. *Molecules.* 2024;29(9):2073-2080.
18. Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(11):1307-15.
19. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine.* 2007;2(5):681-93.
20. Chen Z, Chengwei Z, Haoquan L, et al. Advances and mechanisms of RNA-ligand interaction predictions. *Life.* 2025;15(1):104-120.
21. Katherine G, Marissa L, Xiaoting Z. RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications. *Int J Biochem Mol Biol.* 2013;4(1):27-40.
22. Kowalczyk MS, Douglas R, Gingeras TR. Molecular biology: RNA discrimination. *Nature.* 2012;482(7385):310-11.
23. Peyrin E. Nucleic acid aptamer molecular recognition principles and application in liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Sep Sci.* 2009;32(10):1531-6.
24. Radi AE, O'Sullivan CK. Aptamer conformational switch as sensitive electrochemical biosensor for potassium ion recognition. *Chem Commun.* 2006; 32:3432-4.
25. Tang Z, Parekh P, Turner P, Moyer RW, Tan W. Generating aptamers for recognition of virus-infected cells. *Clin Chem.* 2009;55(4):813-22.

26. Chen HW, Medley CD, Sefah K, Shangguan D, Tang Z, Meng L, Smith JE, Tan W. Molecular recognition of small-cell lung cancer cells using aptamers. *ChemMedChem*. 2008;3(6):991-1001.
27. Zhen SJ, Huang CZ, Wang J, Li YF. End-to-end assembly of gold nanorods on the basis of aptamer-protein recognition. *J Phys Chem C*. 2009;113(52):21543-7.
28. Li X, Zhang W, Liu L, Zhu Z, Ouyang G, A Y, Zhao C, Yang CJ. In vitro selection of DNA aptamers for metastatic breast cancer cell recognition and tissue imaging. *Anal Chem*. 2014;86(13):6596-603.
29. Brody EN, Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *Rev Mol Biotechnol*. 2000;74(1):5-13.
30. Varatharasa T, David GG. Aptamers and the next generation of diagnostic reagents. *Proteomics Clin Appl*. 2012; 6:563-73.
31. Liu J, Guan Z, Lv Z, Jiang X, Yang S, Chen A. Improving sensitivity of gold nanoparticle-based fluorescence quenching and colorimetric aptasensor by using water resuspended gold nanoparticle. *Biosens Bioelectron*. 2014; 52:265-70.
32. Hashemnia A, Hakimzadeh V. Proprietary diagnosis of aflatoxin G1 based on aptasensor colorimetry using gold nanoparticles suspension. *Iran Food Sci Technol Res J*. 2019;15(4):433-439.
33. Yang C, Wang Y, Marty JL, Yang X. Aptamer-based colorimetric biosensing of ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles indicator. *Biosens Bioelectron*. 2011;26(5):2724-7.
34. Li H, Rothberg L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(39):14036-9.
35. Ikram UK. Synthesis and characterization gold nanoparticles using polymeric micelles to induce block copolymer composition. *Biosens Nanotheranostics*. 2022;1(1):1-8.
36. Thakur MS, Shwetha N, Selvakumar LS. Aptamer-nanoparticle-based chemiluminescence for p53. *Anal Biochem*. 2013;437(2):137-56.
37. Zhan S, Yu M, Lv J, Wang L, Zhou P. Colorimetric detection of trace arsenic (III) in aqueous solution using arsenic aptamer and gold nanoparticles. *Aust J Chem*. 2014;67(5):813-8.