دانش بیماری‌شناسی گیاهی
سال ۱۳، جلد ۱، پاییز و زمستان ۱۴۰۲
Plant Pathology Science
Vol. 13(1), 2024
(eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Website: http://yujs.yu.ac.ir/pps/

Review Article

New technologies for detecting mycotoxins in plant yields and products

Maryam Mousivand✉
Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

Mousivand, M. (2024). New technologies for detecting mycotoxins in plant yields and products. *Plant Pathology Science, 13(1),* 89-103.

Abstract

Mycotoxins are fungal secondary metabolites known as global concerns on humans and livestock health regarding to their toxicity and carcinogenicity. Increasing demand for fast, simple and low-cost detection of these compounds, especially on-site, have been lead to develop various biosensors. Although antibodies have been the most widely used diagnostic probes in biosensors for several decades but monoclonal antibody production is difficult for mycotoxins as small and non-immunogenic molecules. Therefore, aptameric probes have been emerged as a new technology for mycotoxin monitoring. Aptamers are single-stranded oligonucleotides that detect target molecule by folding into a three-dimensional conformation, with a binding affinity equal to that of monoclonal antibodies. Aptamers have been considered as the most important competitors of antibodies for biosensor development regarding to their significant advantages in terms of no limiting in target type, smaller size, higher stability, synthetic nature and low cost. Exploiting aptameric probes in biosensor designing have been led to aptasensors development for specific and sensitive tracking of target molecules, and mycotoxins. The aptameric probes, experimental screening methodology, various aptasensors and their applications in detecting mycotoxins has been described, and discussed in this article.

Key words: Aptasensor, Aflatoxin, Ochratoxin, Food safety

✉m.mousivand@abrii.ac.ir, Received: 2024.03.04, Revised: 2024.07.26, Accepted: 2024.08.08

مقاله مروری

فنآوری‌های نوین تشخیص زهرقارچ‌ها در محصول‌ها و فرآورده‌های گیاهی

مریم موسیوند✉
بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی گیاهی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج گیاهی، کرج، ایران

موسیوند، م. (۱۴۰۲). فنآوری‌های نوین تشخیص زهرقارچ‌ها در محصول‌ها و فرآورده‌های گیاهی. *دانش بیماری‌شناسی گیاهی، ۱۳ (۱)*، ۱۰۳-۸۹.

چکیده

زهرقارچ‌ها متابولیت‌های ثانویه قارچ‌ها هستند که به دلیل سمیت و سرطانزایی تهدیدی جهانی برای سلامت انسان و دام به شمار می‌آیند. افزایش تقاضا برای ردیابی سریع، ساده و کم هزینه این ترکیب‌ها، به‌ویژه در محل، منجر به توسعه حسگرهای زیستی متنوعی شده است. اگر چه آنتی‌بادی‌ها برای چندین دهه پرکاربردترین پروب تشخیصی در طراحی حسگرهای زیستی بوده‌اند اما دشواری تولید آنتی‌بادی منوکلونال برای زهرقارچ‌ها به دلیل قرارگیری آنها در گروه مولکولهای کوچک و غیر ایمنوژن، منجر به ابداع فنآوری نوین پروب‌های آپتامری برای ردیابی این مولکول‌های خطرناک شده است. آپتامرها توالی‌های تک رشته الیگونوکلئوتیدی هستند که با تبدیل شدن به ساختار سه بعدی خود، مولکول هدف را با اختصاصیتی در حد آنتی‌بادی‌های منوکلونال ردیابی می‌نمایند. مزایای بسیار زیاد آپتامرها از جمله نداشتن محدویت در نوع مولکول هدف، اندازه کوچک، پایداری بالا، قابلیت تولید کم هزینه و آسان، این پروب‌های تشخیصی را به یکی از مهترین رقبای آنتی‌بادی‌ها در طراحی حسگرها تبدیل کرده است. به کارگیری پروب‌های آپتامری در طراحی حسگرهای زیستی منجر به توسعه آپتاحسگرهایی که از حساسیت و اختصاصیت بالایی در ردیابی مولکولهای هدف برخوردارند، شده است. پروب‌های آپتامری، روش آزمایشگاهی غربال آنها ، انواع آپتاحسگرها و کاربرد آنها در تشخیص زهرقارچ‌های مهم در این مقاله شرح و بحث شده است.

واژگان کلیدی: آپتاحسگر، آفلاتوکسین، اکراتوکسین، امنیت غذایی

مقدمه

تخمین آلودگی ۲۵ درصد از محصول‌ها و فرآورده‌های گیاهی به زهرقارچ‌ها(Mycotoxins) و قرارگیری این گروه از ترکیبهای خطرناک به عنوان جزیی از زنجیره غذایی می‌تواند در دراز مدت تاثیر جبران‌ناپذیری بر سلامت انسانها داشته باشد. گروههای مهم زهرقارچ‌ها که طیف وسیعی از محصولهای گیاهی و فرآورده‌های غذایی را آلوده می‌کنند: اکراتوکسین‌ها (Ochratoxins)، آفلاتوکسین‌ها (Aflatoxins)، تریکوتسن‌ها (Trichothecenes)، فومونیزین (Fumonisin)، داکسی

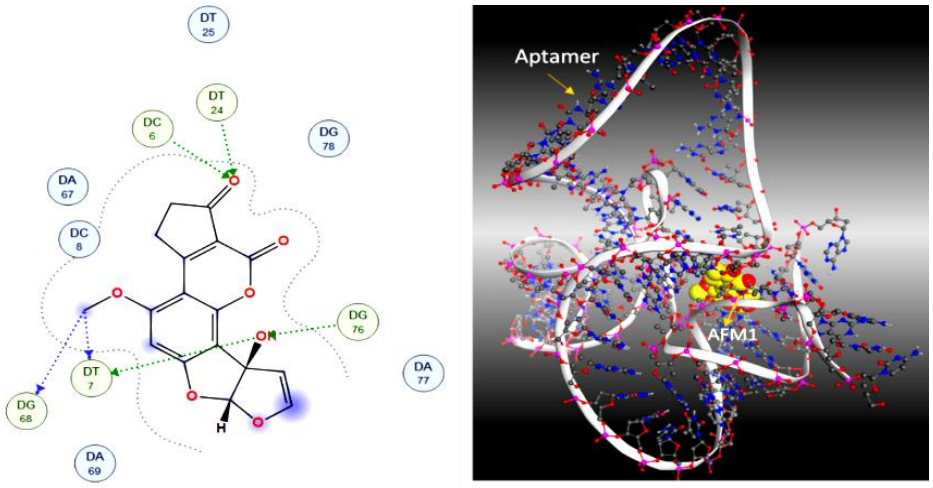
✉ دریافت: ۱۴/ ۱۲/ ۱۴۰۲ ، بازنگری: ۱۴۰۳/۰۵/۰۵ ، پذیرش: ۱۸/ ۰۵/ ۱۴۰۳

نیوالنول (Deoxynivalenol)، T-2، HT-2 و زیرالنون(Zearalenone)، پاتولین (Patulin)، سیترینین (Citrinin) و آلکالوییدهای ارگوتی(Ergot alkaloids) هستند (Dors et al. 2011). وجود خطرآفرین مقادیر بسیار کم زهرقارچها در محصول‌های گیاهی و فرآوردههای غذایی، ضرورت ردیابی و تعیین غلظت آنها به‌ویژه در محل ورود محصول‌های گیاهی و تولید فرآوردههای غذایی، منجر به افزایش تقاضا برای توسعه روشهای ردیابی ساده و بسیارحساس این ترکیبهای خطرناک در سالهای اخیر شده است (Kensler et al. 2011). از روشهای معمول و شناخته شده در ردیابی و تعیین غلظت زهرقارچها می‌توان به روشهای کروماتوگرافی(TLC،HPLC وGC) اشاره نمود که علیرغم حساسیت بالا، به دلیل نیاز به پیش تیمارهای بسیار زیاد نمونه‌ها، تکنسینهای ماهر و تجهیزات بسیار گران قیمت، استفاده از آنها محدود می‌باشد (Cigić & Prosen 2009). بنابراین فنآوریهای جدید مبتنی بر اصول ایمنولوژی مانند الایز (ELISA) و ایمنوحسگرها (Immunosensors) به عنوان روشهای ساده و سریع تشخیص زهرقارچها در سه‌دهه اخیر ابداع شده‌اند (Wang et al. 2011).

علیرغم سادگی و کاربرد گسترده‌تر روش‌های ایمنولوژیکی در مقایسه با روشهای کروماتوگرافی، مزایای روشهای مذکور به شدت تحت تاثیر پیچیدگی فرآیند تولید آنتی‌بادیهای اختصاصی برای هر زهرقارچ قرار دارد. نیاز به سیستم زنده برای تولید آنتی‌بادی‌ها، تفاوت کیفیت آنتی‌بادی‌های تولیدی در زمانهای مختلف تولید، پایداری کم در محیط، هزینه بالای تولید، حساسیت به حلالهای مورد استفاده در استخراج زهرقارچها و دشواری نشاندار نمودن جهت طراحی حسگرهای زیستی از جمله محدودیتهای توسعه روشهای ایمنولوژیکی محسوب می‌شوند (Castillo et al. 2015). تمام محدودیتهای مذکور باعث شده تا فنآوری جدید مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک که تحت عنوان آپتامر(Aptamer) شناخته می‌شوند به عنوان یک ابزار تشخیصی جدید و جایگزین روشهای قبلی ردیابی زهرقارچ ها مورد توجه ویژه قرار گیرد. ماهیت سنتزی آپتامرها، خلوص بالا، پایین بودن قیمت تولید، سهولت نشاندار نمودن با مواد شیمیایی مختلف و مقاومت بالا به شرایط محیطی به‌ویژه حلالهای مورد استفاده در استخراج زهرقارچها باعث شده تا این پروبهای تشخیصی به منظور توسعه حسگرهای زیستی ارزان قیمت، قابل کاربرد در محیط و سریع مورد توجه ویژه محققین و شرکتهای فعال این حوزه قرار گیرند (Chauhan et al. 2016).

پروب‌های تشخیصی آپتامری

در سالهای اخیر از آپتامرها به عنوان جایگزین آنتی‌بادی‌ها در توسعه بسیاری از روشهای تشخیصی با هدف ردیابی طیف وسیعی از مولکولهای زیستی از جمله زهرقارچ ها استفاده شده است. توالیهای تک رشته DNA یا RNA (۲۰ تا ۹۰ نوکلئوتید) که تحت عنوان آپتامر شناخته می‌شوند در حضور مولکول هدف اختصاصی خود، ساختار سه بعدی ویژه‌ای به خود گرفته و کمپلکس قدرتمندی با آن تشکیل می‌دهند(شکل ۱) و به این ترتیب قادر به شناسایی مولکول مورد نظر با اختصاصیتی در حد آنتی‌بادی‌های منوکلونال می‌گردند (Ruscito & DeRosa 2016). مهمترین مزیت آپتامرها در مقایسه



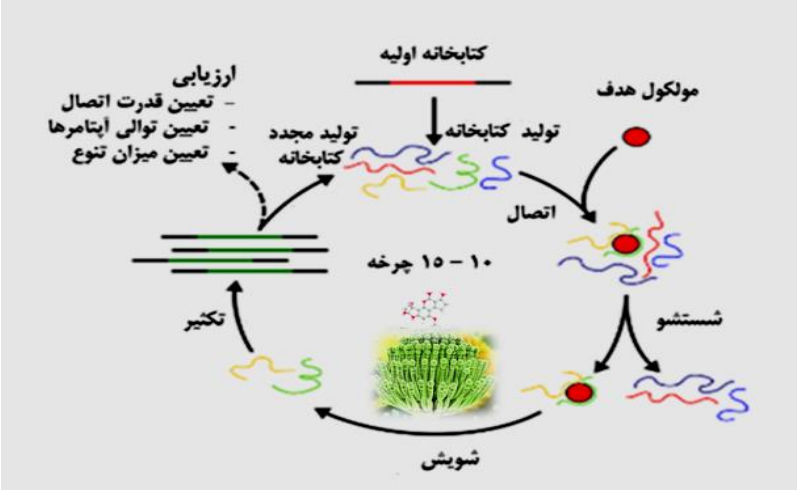
شکل ۱. شمای سه بعدی (تصویر سمت راست) و دو بعدی (تصویر سمت چپ) از پروب آپتامری در تعامل با مولکول آفلاتوکسین M1 (Mousivand et al. 2021).

Figure1. 3D (left) and 2D (right) representation of aptameric probe interacting with aflatoxin M1 molecule (Mousivand et al. 2021)

با آنتی‌بادی‌ها نداشتن محدودیت در ردیابی مولکول هدف است. توالی‌های آپتامری فراوانی در برابر طیف وسیعی از مولکولهای هدف مانند ماکرومولکولهای پروتیینی، پپتیدها، سلول یا بخشی از آن، زهرقارچها، آفت‌کش‌ها و حتی یونها، تا به امروز شناسایی و در قالب روشهای تشخیصی و حسگرهای مختلف به کار گرفته شده‌اند. نداشتن محدودیت در ردیابی مولکول هدف، کوچکی اندازه، تولید سریع، ساده و ارزانی قیمت تولید و قابلیت نگهداری طولانی مدت از جمله مزایایی به شمار می‌روند که باعث شده آپتامرها در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها به عنوان پروبهای کارآمدتری در ردیابی مولکولهای کوچکی چون زهرقارچها، به شمار آیند (McKeague et al. 2015).

غربال آزمایشگاهی و معرفی پروب‌های آپتامری

انتخاب آپتامرها برای مولکول هدف از جمله زهرقارچ های مهم بخش گیاهی به کمک فرایند آزمایشگاهی سلکس (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment=SELEX) انجام می شود (شکل ۲). در این فرایند ابتدا یک کتابخانه الیگونوکلئوتیدی شامل $۱۰^{۱۵}$ تا $۱۰^{۱۸}$ توالی الیگونوکلئوتیدی ساخته می‌شود. هر توالی در کتابخانه الیگونوکلئوتیدی در دو انتهای خود دارای دو جایگاه ثابت برای اتصال پرایمر و یک ناحیه تصادفی (شامل ۲۰ تا ۶۰ باز) بین دو جایگاه مذکور می‌باشد. توالیهای الیگونوکلئوتیدی تحت شرایط مناسب و در مدت زمان مشخص با مولکول هدف گرمخانه‌گذاری شده و توالیهای آپتامری با قدرت اتصال زیاد پس از جدا سازی و تکثیر به عنوان کتابخانه الیگونوکلئوتیدی در مرحله بعد مورد استفاده قرار می‌گیرند. مرحله انتخاب و تکثیر به کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز بین ۱۰ تا ۱۵ مرحله تکرار شده و در هر مرحله پروب های متصل به مولکول هدف جداسازی شده و پس از تکثیر به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مرحله بعد و با



شکل ۲. غربال توالی های آپتامری اختصاصی مولکول هدف طی فرایند آزمایشگاهی سلکس (Schütze et al. 2011).

Figure 2. Screening of target molecule-specific aptamer sequences via SELEX process (Schütze et al. 2011) .

شرایط سختتر در معرض مولکول هدف قرار گرفته و بهترین پروبها مجددا برای مرحله بعد انتخاب می‌شوند. نهایتا و پس از تکرار چرخه‌های متوالی تکثیر و انتخاب، توالی (های) آپتامری با قدرت اتصال و اختصاصیت بالا به مولکول هدف درمحدوده نانو و حتی پیکو مولار به دست می‌آید. پس از تعیین توالی و سنتز، پروبهای منتخب مولکول هدف معرفی می‌شوند (Tuerk & Gold 1990). با توجه به لزوم دستیابی به پروبهای آپتامری با قدرت اتصال و اختصاصیت بالا برای طراحی حسگرهای زیستی کارآمد و قابل رقابت با حسگرهای زیستی موجود، در سالهای اخیر تکنولوژی بهینه‌سازی توالیهای آپتامری حاصل از فرایند سلکس با هدف معرفی پروبهای کاربردی مورد توجه محققین قرار گرفته است. علیرغم مزایای متعدد پروب های آپتامری، راندمان فرایند سلکس در معرفی آپتامرهایی با قدرت اتصال بالا به‌ویژه برای مولکولهای کوچک به دلیل تنوع پایین کتابخانه الیگونوکلئوتیدی، تکثیر نامتوزان توالیها و دشواری جداسازی آپتامرهای باند شده از آپتامرهای باند نشده به مولکول کوچک هدف تا ٪۵۰ تخمین زده می‌شود (Ruscito & DeRosa 2016).

از جمله استراتژی های موفق به منظور بهبود قدرت اتصال پروبهای آپتامری می‌توان به روش بلوغ شبیه‌سازی شده و مبتنی بر الگوریتم ژنتیک (Genetic Algorithm (GA) based in silico maturation=ISM) اشاره نمود که نوعی فرایند پس از سلکس بوده و به کمک اپراتورهای الگوریتم ژنتیک شامل انتخاب بهترین توالیها و تغییر آنها به کمک کراسنیگ‌اوور و جهش، پروبهای آپتامری کارآمدتری را ایجاد و معرفی می‌کند (Ikebukuro et al. 2005). معرفی ۵ پروب آپتامری جدید برای مولکول آفلاتوکسین B1 به کمک روش بلوغ شبیه‌سازی شده مبتنی بر الگوریتم ژنتیک (Mousivand et al. 2020a, 2022) از جمله پژوهشهای موفق انجام شده در این زمینه است. از دیگر استراتژیهای موثر در افزایش

قدرت اتصال آپتامر به مولکول هدف، کوتاه‌سازی طول توالی با هدف کاهش تفاوت اندازه آپتامر با مولکول هدف است. معرفی پروب آپتامری جدید مبتنی بر استراتژی کوتاه‌سازی برای آفلاتوکسین B1 (Mousivand et al. 2020b) و آفلاتوکسین M1 (Pandy et al. 2018) از جمله پژوهشهای موفق انجام شده در این حوزه است.

معرفی پروب های آپتامری برای زهرقارچ ها

تاکنون و به کمک فرایند آزمایشگاهی سلکس برای مهمترین زهرقارچهای آلاینده محصولهای گیاهی و فرآوردههای غذایی چندین پروب آپتامری معرفی شده است. اولین پروب آپتامری در سال ۲۰۰۸ برای ردیابی اکراتوکسین A معرفی گردید که از جمله زهرقارچهای مهمی است که توسط گونه‌های *Aspergillus* و *Penicillium* تولید شده و قادر به آلودگی طیف وسیعی از مواد غذایی و محصولهای گیاهی می‌باشد (Cruz-Aguado & Penner 2008). تاکنون چندین پروب آپتامری اختصاصی برای اکراتوکسین معرفی شده است که از جمله آنها می‌توان به پروب آپتامری با کد ۱,۱۲ اشاره نمود که پس از ۱۳ مرحله در چرخه سلکس به دست آمد و تلاش برای کوتاه سازی طول این آپتامر منجر به معرفی دو پروب آپتامری دیگر با کدهای ۱,۱۲,۸ و ۱,۱۲,۲، گردید که ثابت اتصال (Dissociation constant=Kd) آنها در محدوده نانومولار قرار داشت. شایان ذکر است که ثابت اتصال شاخصی است که میزان تمایل دو مولکول زیستی را برای اتصال به یکدیگر و تشکیل کمپلکس اندازه‌گیری نموده و هر چه میزان آن کمتر باشد به منزله آن است که تمایل دو مولکول برای تشکیل کمپلکس بیشتر می‌باشد. پروب آپتامری H12 (Barthelmebs et al. 2011) و نیز پروبهای آپتامری A08 و نیز فرم کوتاه شده آن A08min، از دیگر پروبهای معرفی شده برای اکراتوکسین می‌باشند که قدرت اتصال آنها نیز در محدوده نانومولار تخمین زده شده است (McKeague et al. 2014).

آفلاتوکسین‌ها گروهی از ترکیبهای خطرناک و سمی خانوده دی فوران-کومارین‌ها بوده که توسط ۱۳ گونه از جنس *Aspergillus* بویژه گونه‌های *A.flavus*، *A.parasiticus* و *A. nomius* تولید می‌شوند (Moradi & Fani 2018). نخستین پروب آپتامری برای مولکول آفلاتوکسین B1 توسط شرکت نئوونچر در سال ۲۰۱۱ معرفی گردید. این پروب آپتامری پس از انجام ۱۷ چرخه تکثیر و انتخاب در فرایند سلکس بدست آمد و ثابت اتصال آن به مولکول آفلاتوکسینB1 درمحدوده نانومولار تعیین گردید. این پروب آپتامری مبنای طراحی بسیاری از آپتاحسگرهای طراحی شده برای ردیابی مولکول آفلاتوکسین می‌باشد (Neo Venture 2011). پروب آپتامری AFB1.seq.1 از دیگر پروبهای آپتامری معرفی شده برای آفلاتوکسین B1 است که پس از طی ۱۰ چرخه در فرایند سلکس با ثابت اتصال 11 nM معرفی شده است (Ma et al. 2014).

نخستین پروب آپتامری برای مولکول آفلاتوکسین M1 که فرم هیدرکسیله شده آفلاتوکسین B1 و عامل اصلی آلودگی شیر و سایر فراودههای لبنی محسوب می‌شود در سال ۲۰۱۴ معرفی گردید. این

پروب آپتامری (AFAS3) پس از ۱۱ چرخه انتخاب و تکثیر به کمک فرایند سلکس با ثابت اتصال ۳۶ نانومولار معرفی شده است (Malhotra et al. 2014).

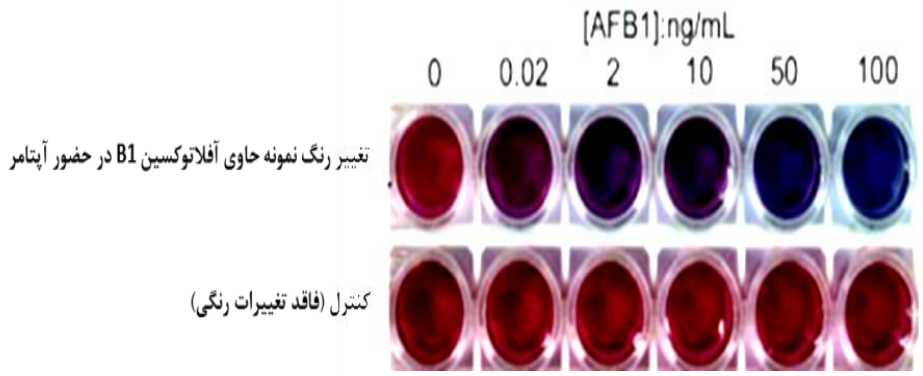
فومونیزین‌ها گروه مهم و خطرناکی از زهرقارچهای تولیدی توسط بعضی گونه‌های *Fusarium* بویژه *F. verticillioides* و *F. proliferatum* می‌باشند. پروب FB139، نخستین پروب آپتامری معرفی شده برای فومونیزین B1 در سال ۲۰۱۰ می باشد که پس از انجام فرایند آزمایشگاهی سلکس و با ثابت اتصال ۱۰۰nM بدست آمد (McKeague et al. 2010). ایجاد فرمهای کوتاه شده از این پروب آپتامری و ارزیابی توان اتصال آنها به مولکول فومونیزین B1 نشان داد که ثابت اتصال این پروبهای کوتاه شده در محدوده نانومولار قرار دارد (Frost et al. 2015).

معرفی پروب آپتامری seq.16 برای زهرقارچ T-2 به کمک فرایند سلکس با ثابت اتصال ۲۱nM از دیگر پروبهای موفق معرفی شده در حوزه ردیابی زهرقارچهای مهم به شمار می آید که تمایل بسیار پایینی در اتصال به زهرقارچهایی با ساختار مشابه نشان داده است (Chen et al. 2014). آپتامر 8Z31 از دیگر پروبهای معرفی شده به کمک فرایند سلکس می‌باشد که قادر به ردیابی اختصاصی زیرالنون با ثابت اتصال ۴۰nM بود (Chen et al. 2013). غربال پروب آپتامری M3.2 به کمک فرایند سلکس با ثابت اتصال در محدوده نانومولار از دیگر پروبهای معرفی شده برای زهرقارچ ارگوت پس از طی ۹ چرخه انتخاب و تکثیر می‌باشد (Rouah-Martin et al. 2012).

آپتاحسگرها و انواع آنها

حسگرهای زیستی ابزارهای تشخیصی حساس و دقیقی هستند که امکان ردیابی سریع، ساده و ارزان قیمت مولکول هدف را به‌ویژه در محل و به صورت کیفی یا نیمه کمی فراهم می‌نمایند. هر حسگر از دو بخش اصلی شامل "مولکول تشخیص دهنده زیستی" و "سیستم مبدل" تشکیل شده است. پروب مولکولی یک مولکول زیستی یا سنتتیک مانند آنتی‌بادی، آپتامر و آنزیم است که به طور اختصاصی با مولکول هدف واکنش می‌دهد. سیستم مبدل نیز واکنش اتصالی بین مولکول هدف و پروب مولکولی را به سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند (Lim et al. 2010). نخستین بار در سال ۱۹۹۸ از آپتامرها به عنوان پروب تشخیصی در ساخت حسگرها استفاده شد که منجر به توسعه گروه جدیدی از ابزارهای تشخیصی تحت عنوان آپتاحسگر گردید (Potyrailo et al. 1998). آپتاحسگرها بر اساس سیستم مبدل به کار رفته در ساخت آنها به انواع مختلفی تقسیم می شوند که از جمله مهمترین آنها آپتاحسگرهای رنگ سنجی، فلئورسنت، الکتروشیمیایی، آپتاحسگرهای مبتنی بر تشدید پلاسمون سطحی(Surface Plasmon Resonance (SPR)-based aptasensors) و آپتاحسگرهای نواری هستند (Lim et al. 2010).

آپتاحسگرهای مبتنی بر رنگ سنجی به دلیل سادگی و نیز هزینه کم از جمله ابزارهای تشخیصی به شمار می آیند که محبوبیت بالایی دارند. در این حسگرها تغییر رنگ محلول پس از تشخیص مولکول هدف توسط پروب مولکولی با چشم غیر مسلح یا دستگاههایی چون اسپکتروفوتومتر قابل مشاهده



شکل ۳. آپتاحسگر نوری برای ردیابی غلظت های مختلف آفلاتوکسین B1 (Luan et al. 2015).

Figure3. Colorimetric aptasensor for different concentrations of aflatoxin B1 (Luan et al. 2015).

است. تا کنون آپتاحسگرهای مختلفی با استفاده از ویژگیهای منحصر به‌فرد نوری و تشدید پلاسمون سطحی نانوذرات طلا طراحی شده است. نانوذرات طلا با قطر تقریبی ۱۳ نانومتر و حداکثر جذب در ۵۲۰ نانومتر در حالت پراکنده دارای رنگ قرمز و در حالت تجمع یافته دارای رنگ ارغوانی می باشند. طراحی آپتاحسگر نوری و مبتنی بر نانوذرات طلا برای ردیابی آفلاتوکسین B1 (شکل ۳) از جمله آپتاحسگرهای نوری است که با موفقیت در ردیابی زهرقارچ هدف مورد استفاده قرار گرفته است (Luan et al. 2015).

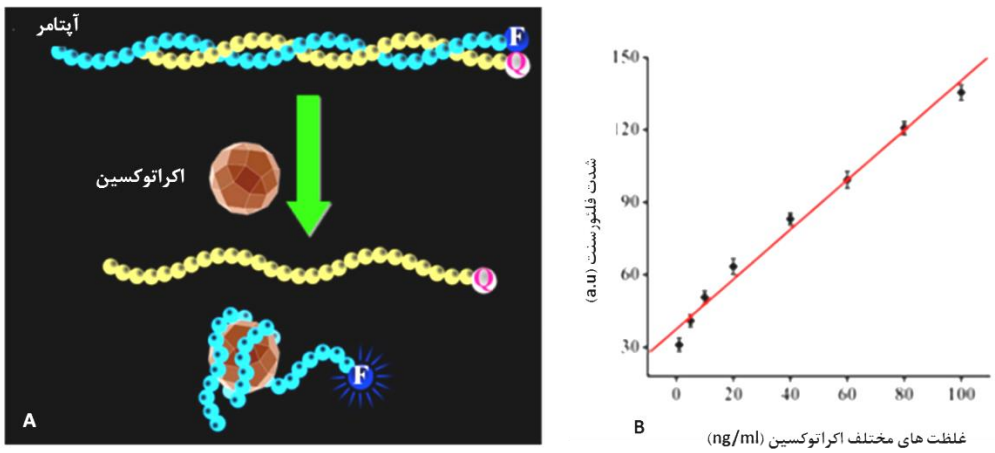
مبنای طراحی آپتاحسگرهای فلئورسنت تحریک یا غیر فعال سازی انتشار سیگنال فلئورسنت در رنگها یا نانومواد با ماهیت فلئورسنت پس از واکنش آپتامر با مولکول هدف می‌باشد. قابلیت ردیابی مقادیر بسیار کم مولکول هدف از مزایای این گروه از حسگرها در مقایسه با آپتاحسگرهای رنگ سنجی به شمار می آید (Liu et al. 2014).

کارکرد آپتاحسگرهای پلاسمونیک مبتنی بر پدیده فیزیکی تشدید پلاسمون سطحی می باشد. تشدید الکترونهای آزاد لایه ظرفیت با جذب نور مبنای طراحی این گروه از حسگرها بوده و با تابش نور بر سطح نانوذرات پلاسمونیک مانند نانو ذرات طلا و نقره تقویت می‌گردد (Wang & Zhou 2008). آپتاحسگرهای نواری مبتنی بر کاغذ بوده و از اصولی مشابه ایمنوکروماتوگرافی بهره می برند. در این حسگرها آنالیت مورد نظر در طول یک غشا سلولزی جریان یافته و واکنشی از نوع آپتامر – مولکول هدف در طول مسیر روی خط واکنش اتفاق می‌افتد (Costa et al. 2014). با اکتشاف و توسعه نانو مواد، حسگرهای کاغذی نیز از مزایای این مواد به منظور بهبود عملکردشان بهره گرفته‌اند. درمیان نانو مواد، نانو ذرات طلا به دلیل سادگی سنتز، پایداری بالا، سازگاری با مواد زیستی، تنظیم اندازه و دارا بودن رنگ قرمز شدید به عنوان پرکاربردترین برچسب در آپتاحسگرهای نواری شناخته شده‌اند (Quesada-González & Merkoçi 2015).

ردیابی زهرقارچ‌ها با استفاده از آپتاحسگرها

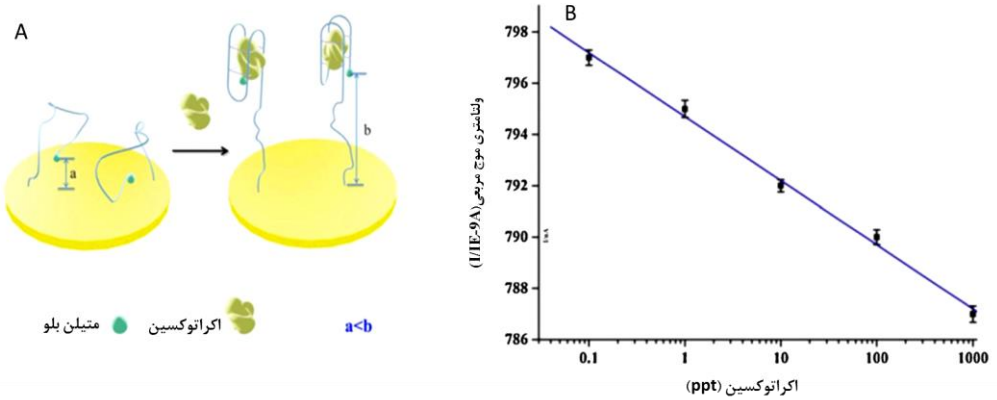
پس از غربال و تعیین ویژگی های پروبهای آپتامری، بهترین پروبها با قدرت اتصال بالا به مولکول زهرقارچ مبنای طراحی آپتاحسگرهای متنوعی از قبیل رنگ‌سنجی، الکتروشیمیایی، فلئورسنت، نواری و ... قرار می‌گیرند (Mousivand et al. 2023). اکراتوکسین نخستین زهرقارچی است که برای توسعه آپتاحسگر مورد بررسی قرار گرفته است. از سال ۲۰۰۸ تاکنون آپتاحسگرهای فراوانی مبتنی بر رنگ سنجی، الکتروشیمیایی، فلئورسنت و نانومواد برای ردیابی و آنالیز آلودگیهای اکراتوکسینی در فرآوردههای غذایی و محصولهای گیاهی طراحی و مورد استفاده قرار گرفته است. طراحی آپتاحسگر فلئورسنت مبتنی بر نانو تیوپ کربن تک جداره برای خاموش سازی فلئورسنت تولید شده توسط آپتامر نشاندار شده با کربوکسی فلئورسین نمونه‌ای از آپتاحسگرهای طراحی شده برای ردیابی اکراتوکسین می‌باشد که از حساسیت و اختصاصیت لازم در شرایط آزمایشگاهی و نیز در نمونه محصول واقعی برخوردار بود (Guo et al. 2011). طراحی حسگر فلئورسنت مبتنی بر آپتامر نشاندار شده با مولکول فلئوفور و رشته مکمل آن که با واحد خاموش کننده فلئورسنت نشاندار شده بود از جمله آپتاحسگرهای ساده و حساس در ردیابی اکراتوکسین به شمار می‌آید (شکل۴). در حضور مولکول اکراتوکسین آپتامر از رشته مکمل جدا و به مولکول زهرقارچ متصل می‌گردد و منجر به افزایش نشر فلئورسنت می‌شود (Chen et al. 2012).

طراحی آپتاحسگر الکتروشیمایی برای ردیابی اکراتوکسین مبتنی بر آپتامر نشان دار شده با گروه تیول و تثبیت شده بر سطح الکترود نمونه دیگری از حسگرهای مبتنی بر آپتامر می باشد (شکل ۵). در این



شکل ۴. آپتاحسگر فلئورسنت برای ردیابی اکراتوکسین A. شماتیک مکانیسم عملکرد حسگر فلئورسنت (A) و منحنی استاندارد ترسیم شده توسط آپتاحسگر طراحی شده مبتنی بر غلظت های مختلف اکراتوکسین (B) (Chen et al. 2012).

Figure 4. Fluorescent aptasensor for ochratoxin A detection. Schematic illustration of sensing mechanism of fluorescent aptasensor (A) and Standard curve for different concentrations of OTA with designed fluorescent aptasensor (B) (Chen et al. 2012).



شکل ۵. (A) آپتاحسگر الکتروشیمیایی برای ردیابی اکراتوکسین A. شماتیک مکانیسم عملکرد حسگر الکتروشیمیایی، (B) نمودار استاندارد ترسیم شده توسط آپتاحسگر طراحی شده مبتنی بر غلظتهای مختلف اکراتوکسین (Wu et al. 2012).

Figure 5. (A)-Electrochemical aptasensor for ochratoxin A detection. Schematic illustration of sensing mechanism of electrochemical aptasensor and (B) Standard curve for different concentrations of OTA with designed electrochemical aptasensor (Wu et al. 2012).

حسگر، آپتامر تثبیت شده در سمت آزاد خود با متیلن بلو نشان دار شده است. این پروب در حالت آزاد اجازه انتقال الکترون را فراهم می کند اما پس از ردیابی اکراتوکسین و تغییرات ساختاری آپتامر، انتقال الکترون بسته به غلظت اکراتوکسین موجود در محیط کاهش می یابد (Wu et al. 2012).

طراحی آپتاحسگر مبتنی بر روش فلئورسنت پولاریزاسیون با فرمت مستقیم برای ردیابی آفلاتوکسین B1 نمونه دیگری از حسگرهای طراحی شده مبتنی بر خاصیت فلئورسنت آفلاتوکسین می باشد. میزان فلئورسنت پولاریزاسیون مولکول آفلاتوکسین در حالت عادی بالا بوده و پس از ردیابی توسط آپتامر اختصاصی، میزان فلئورسنت پولاریزاسیون شروع به کاهش می نماید که با غلظت آفلاتوکسین موجود در نمونه رابطه مستقیم دارد (Mousivand et al. 2020a).

ردیابی مولکول آفلاتوکسین B1 با آپتاحسگر رنگ‌سنجی مبتنی بر نانوذرات تغییر نیافته طلا نمونه دیگری از حسگرهای طراحی شده است که با تغییر رنگ نانوذرات طلا از قرمز به ارغوانی متناسب با غلظت آفلاتوکسین در محیط امکان ردیابی سریع و چشمی نمونه آلوده را فراهم می نمایند (Mousivand et al. 2020a; Luan et al. 2015).

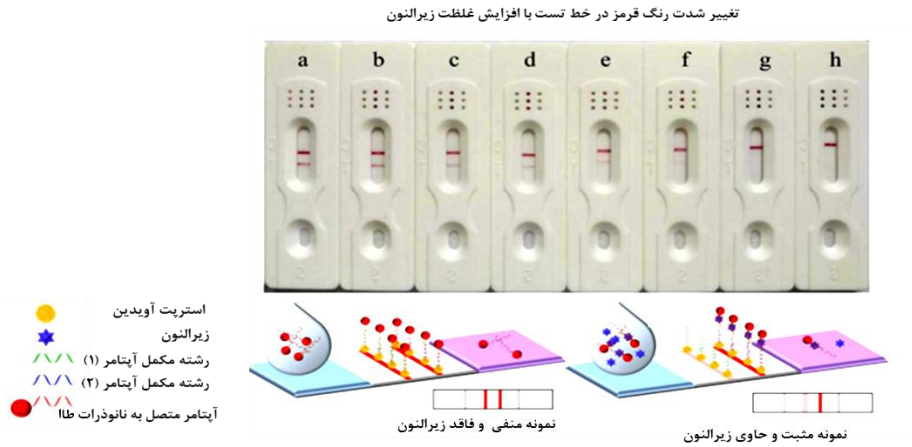
از این نوع آپتاحسگر با موفقیت برای ردیابی انواع مخلتفی از زهرقارچ ها از جمله آفلاتوکسین B1 (Mousivand et al. 2023)، اکراتوکسین (Zhou et al. 2016) و زیرالنون (Wu et al. 2018) بهره‌برداری شده است. علیرغم تعداد نسبتا کم پروبهای آپتامری معرفی شده برای زهرقارچها، آپتاحسگرهای متنوع و فراوانی برای ردیابی و تعیین غلظت زهرقارچها توسط محققین و شرکتهای فعال توسعه یافته و این روند با سرعت بالایی رو به رشد می‌باشد(جدول ۱).

جدول۱. برخی از آپتاحسگرهای توسعه یافته برای اکراتوکسین، آفلاتوکسین، زیرالنون و فومونیزین (Shkembi et al. 2022)

Table 1. Some developed aptasensors for ochratoxin, aflatoxin, zearalenone and fumonisin (Shkembi et al. 2022).

زهرقارچ Mycotoxins	نوع آپتاحسگر Aptasensors	دامنه ردیابی Linear range	نمونه مورد ارزیابی Real sample	منبع Ref.
Aflatoxin B1	Colorimetric	۰,۱-۱۰۰۰۰ ng/ml	Corn	Seok et al. 2015
Aflatoxin B1	Fluorescence	۳,۲nm-۳۲۰ µM	Peanut oil	Lu et al. 2014
Aflatoxin B1	Fluorescence	۰/۰۵-۱۰۰ ng/ml	Peanut	Lu et al. 2019
Aflatoxin B1	Lateral flow	۰,۱-۵۰ ng/ml	Corn	Mousivand et al. 2023
Aflatoxin M1	Electrochemical	۲-۱۵۰ ng/ml	Milk	Istamboulie et al.2016
Aflatoxin M1	Fluorescence	۰,۰۰۰۱-۱ µg/l	Rice	Guo et al. 2019
Ochratoxin	Colorimetric	۰,۱-۱۰۰۰۰ ng/ml	Milk	Song et al. 2018
Ochratoxin	Colorimetric	۱,۲۵-۲۵۰ ng/ml	juice	Tian et al. 2019
Ochratoxin	Fluorescence	۱۰-۲۰ pm	Corn	Wang et al. 2016b
Ochratoxin	Fluorescence	۰,۰۱-۳ ng/ml	Wheat	Chen et al. 2014
Ochratoxin	Fluorescence	۰,۱۵-۱۰۰ ng/ml	Peanut	Wang et al. 2015
Ochratoxin	Fluorescence	۱-۱۰۰ ng/ml	Corn	Chen et al. 2012
Ochratoxin	Electrochemical	۰,۱-۱ ng/ml	Oats/ Corn	Tan et al. 2015
Ochratoxin	Electrochemical	۰,۰۲-۳ ng/ml	Wheat	Wang et al. 2019
Ochratoxin	Electrochemical	۰,۰۰۵-۵۰ ng/ml	Corn	Gao et al. 2019
Ochratoxin	Electrochemical	۰,۱-۱۰۰ ng/ml	Coffee	Jo et al. 2016
Fumonisin B1	Electrochemical	1nM-۱۰۰ µM	Corn	Chen et al. 2015
Fumonisin B1	Fluorescence	۱۰-۲۵۰pg/ml	Corn	He et al. 2020
Fumonisin B1	Fluorescence	۰,۰۱-۱ ng/ml	Corn / Rice/ Wheat	Yue et al. 2014
T-2	Fluorescence	۰,۰۰۵-۵۰۰ ng/ml	Corn/ Wheat	Khan et al. 2018
Zearalenone	Colorimetric	۴-۱۲۸ ng/ml	Corn	Zhang et al. 2018
Zearalenone	Fluorescence	۰,۰۵-۱۰۰ µg/ml	Corn	Wu et al. 2017
Zearalenone	Lateral flow	5- 200 ng/mL	Corn	Wu et al. 2018

آپتانانوحسگرهای نواری امکان ردیابی زهرقارچ در نمونه را به صورت چشمی و با تغییر در شدت رنگ قرمز در خط تست فراهم می‌کنند (شکل۶). در صورت آلوده بودن نمونه به زهرقارچ، آپتامر اختصاصی در خط تست با مولکول زهرقارچ واکنش داده و امکان هیبریدیزاسیون با پروب مکمل و نشان دار شده خود را نمی‌یابد لذا شدت رنگ قرمز ناشی از تجمع نانوذرات طلا در خط تست، متناسب با غلظت زهرقارچ موجود در نمونه کمرنگ‌تر می‌گردد.



شکل۶. آپتانانوحسگر نواری برای ردیابی غلظتهای مختلف زیرالنون (Wu et al. 2018)

Figure 6. Aptamer- nanoparticle strip biosensor for different concentrations of zearalenone detection. (Wu et al. 2018)

نتیجه‌گیری

مزایای بسیار زیاد آپتامرها در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها ، تلاش برای توسعه پلت‌فرم‌های تشخیصی مبتنی بر آپتامر برای ردیابی مولکول‌های مختلف بویژه زهرقارچها را در طول دو دهه افزایش داده است. پایداری بالای پروبهای آپتامری در شرایط محیطی و عدم نیاز به نگهداری در یخچال و مقاومت به حلالهای مورد استفاده در استخراج زهرقارچها، برگ برنده آپتاحسگرها به شمار می‌آیند. تلاش برای توسعه آپتاحسگرهایی با قابلیت کاربرد در محل، قابلیت تشخیص همزمان چند زهرقارچ و حفظ اختصاصیت در ماتریکسهای پیچیده غذایی از جمله راهکارهایی است که در راستای تجاری‌سازی آپتاحسگرها مورد توجه محققین و شرکتهای فعال در این حوزه قرار دارند.

منابع

References

1. Barthelmebs, L., Jonca, J., Hayat, A., Prieto-Simon, B., & Marty, J.L. (2011). Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control*, 22(5),737-743.
2. 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.
3. Chauhan, R., Singh, J., Sachdev, T., Basu, T., & Malhotra, B.D. (2016). Recent advances in mycotoxins detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 81,532-545.
4. Chen, J., Fang, Z., Liu, J., & Zeng, L. (2012). A simple and rapid biosensor for ochratoxin A based on a structure-switching signaling aptamer. *Food Control*, 25, 555–560.
5. Chen, X., Huang, Y., Duan, N., Wu, S., Xia, Y., Ma, X., & Wang, Z. (2014). Screening and identification of DNA aptamers against T-2 toxin assisted by graphene oxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(42),10368-10374.

6. Chen, X., Huang, Y., Duan, N., Wu, S., Ma, X., Xia, Y., & Wang, Z. (2013). Selection and identification of ssDNA aptamers recognizing zearalenone. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405,6573-6581.

7. Chen, X., Huang, Y., Ma, X., Jia, F., Guo, X., & Wang, Z. (2015). Impedimetric aptamer-based determination of the mold toxin fumonisin B1. *Microchimica Acta*, 182,1709-1714.

8. Cigić, I.K., & Prosen, H. (2009). An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(1), 62-115.

9. Costa, M.N., Veigas, B., Jacob, J.M., Santos, D.S., Gomes, J., Baptista, P.V., & Fortunato, E. (2014). A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper. *Nanotechnology*, 25(9),094006.

10. Cruz-Aguado, J.A., & Penner, G. (2008). Fluorescence polarization based displacement assay for the determination of small molecules with aptamers. *Analytical Chemistry*, 80(22), 8853-8855.

11. Dors, G.C., Primel, E.G., Badiale-Furlong, E., Santos Hackbart, H.C., Garda-Buffon, J., Santos Oliveira, M., & Feddern, V. (2011). *Aflatoxins: contamination, analysis and control* (pp. 415-438). *INTECH Open Access Publisher.*

12. Frost, N. (2015). Fumonisin B1 aptamer optimization and progress towards mycotoxin nanoaptasensors (Doctoral dissertation, Carleton University).

13. Guo, Z., Ren, J., Wang, J., & Wang, E. (2011). Single-walled carbon nanotubes based quenching of free FAM-aptamer for selective determination of ochratoxin A. *Talanta*. 85(5), 2517-2521.

14. Ikebukuro, K., Okumura, Y., Sumikura, K., & Karube, I. (2005). A novel method of screening thrombin-inhibiting DNA aptamers using an evolution-mimicking algorithm. *Nucleic Acids Research*. 33(12), e108-e108.

15. Kensler, T.W., Roebuck, B.D., Wogan, G.N., & Groopman, J.D. (2011). Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological Sciences*, 120(Suppl_1), S28-S48.

16. Lim, Y.C., Kouzani, A.Z., & Duan, W. (2010). Aptasensors: a review. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 6(2), 93-105.

17. Liu, J., Guan, Z., Lv, Z., Jiang, X., Yang, S., & Chen, A. (2014). Improving sensitivity of gold nanoparticle based fluorescence quenching and colorimetric aptasensor by using water resuspended gold nanoparticle. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 265-270.

18. Luan, Y., Chen, Z., Xie, G., Chen, J., Lu, A., Li, C., & Wang, J. (2015). Rapid visual detection of aflatoxin B1 by label-free aptasensor using unmodified gold nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(2),1357-1361.

19. Ma, X., Wang, W., Chen, X., Xia, Y., Wu, S., Duan, N., & Wang, Z. (2014).Selection, identification, and application of Aflatoxin B1 aptamer. *European Food Research and Technology*. 238, 919-925.

20. Malhotra, S., Pandey, A.K., Rajput, Y.S., & Sharma, R. (2014). Selection of aptamers for aflatoxin M1 and their characterization. *Journal of Molecular Recognition*, 27(8), 493-500.

21. McKeague, M., De Girolamo, A., Valenzano, S., Pascale, M., Ruscito, A., Velu, R., & DeRosa, M.C. (2015). Comprehensive analytical comparison of strategies used for small molecule aptamer evaluation. *Analytical Chemistry*, 87(17), 8608-8612.

22. McKeague, M., Velu, R., Hill, K., Bardóczy, V., Mészáros, T., & DeRosa, M.C. (2014). Selection and characterization of a novel DNA aptamer for label-free fluorescence biosensing of ochratoxin A. *Toxins*. 6(8), 2435-2452.

23. McKeague, M., Bradley, C.R., De Girolamo, A., Visconti, A., Miller, J.D., & DeRosa, M.C. (2010). Screening and initial binding assessment of fumonisin B1 aptamers. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 4864-4881.

24. Moradi, M., & Fani, S. R. (2018). A review of aflatoxin in pistachio and control strategies. *Plant Pathology Science*, 7(2), 22-33.(In Persian)

25. Mousivand, M., Anfossi, L., Bagherzadeh, K., Barbero, N., Mirzadi-Gohari, A., & Javan-Nikkhah, M. (2020a). In silico maturation of affinity and selectivity of DNA aptamers against aflatoxin B1 for biosensor development. *Analytica Chimica Acta*, 1105, 178-186.

26. Mousivand, M., Bagherzadeh, K., Anfossi, L., & Javan-Nikkhah, M. (2022). Key criteria for engineering mycotoxin binding aptamers via computational simulations: Aflatoxin B1 as a case study. *Biotechnology Journal*, 17(2), 2100280.

27. Mousivand, M., Javan-Nikkhah, M., Anfossi, L., Di Nardo, F., Salina, M., & Bagherzadeh, K. (2023). High performance aptasensing platform development through in silico aptamer engineering for aflatoxin B1 monitoring. *Food Control*, 145, 109418.

28. Mousivand, M., Javan-Nikkhah, M., Bagherzadeh, K., Anfossi, L., & Mirzadi Gohari, A. (2020b). Introducing truncated DNA aptamer as a new molecular probe for aflatoxin B1 detection using computational simulation techniques. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 56, 99-117.(In Persian)

29. Pandey, A.K., Rajput, Y.S., Singh, D., & Sharma, R. (2018). Prediction of shorter oligonucleotide sequences recognizing aflatoxin M1. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 65(3), 397-406.

30. Potyrailo, R.A., Conrad, R.C., Ellington, A.D., & Hieftje. G. M. (1998). Adapting selected nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors. *Analytical Chemistry*, 70(16), 3419-3425.

31. Quesada-González, D., & Merkoçi, A. (2015). Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 73, 47-63.

32. Rouah-Martin, E., Mehta, J., Van Dorst, B., De Saeger, S., Dubruel, P., Maes, B.U., & Robbens, J. (2012). Aptamer-based molecular recognition of lysergamine, metergoline and small ergot alkaloids. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 17138-17159.

33. Ruscito, A., & DeRosa, M.C.(2016). Small-molecule binding aptamers: Selection strategies, characterization, and applications. *Frontiers in Chemistry*, 4, 14.

34. Schütze, T., Wilhelm, B., Greiner, N., Braun, H., Peter, F., Mörl, M., & Glökler, J. (2011). Probing the SELEX process with next-generation sequencing. *PloS one*, 6(12), e29604.

35. Shkembi, X., Svobodova, M., Skouridou, V., Bashammakh, A.S., Alyoubi, A.O., & O'Sullivan, C.K. (2022). Aptasensors for mycotoxin detection: A review. *Analytical Biochemistry*. 644,114156.

36. Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968), 505-510.

37. Wang, L., Chen, W., Ma, W., Liu, L., Ma, W., Zhao, Y., & Xu, C. (2011). Fluorescent strip sensor for rapid determination of toxins. *Chemical Communications*, 47(5), 1574-1576.

38. Wang, J., & Zhou, H.S. (2008). Aptamer-based Au nanoparticles-enhanced surface plasmon resonance detection of small molecules. *Analytical Chemistry*, 80(18), 7174-7178.

39. Wu, S., Liu, L., Duan, N., Li, Q., Zhou, Y., & Wang, Z. (2018). Aptamer-based lateral flow test strip for rapid detection of zearalenone in corn samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(8), 1949-1954.

40. Wu, S., Liu, H., & Liu, Y. (2012). Deoxynivalenol nucleic acid aptamer and application thereof. Invention Patent, CN102559686.

41. Wu, Z., Xu, E., Chughtai, M.F., Jin, Z., & Irudayaraj, J. (2018). Highly sensitive fluorescence sensing of zearalenone using a novel aptasensor based on upconverting nanoparticles. *Food Chemistry*, 230, 673-680.

42. Yue, S., Jie, X., Wei, L., Bin, C., Dou, W., Yi, Y., & TieSong, Z. (2014). Simultaneous detection of Ochratoxin A and fumonisin B1 in cereal samples using an aptamer–photonic crystal encoded suspension Array. *Analytical Chemistry*, 86(23), 11797-11802.

43. Zhou, W., Kong, W., Dou, X., Zhao, M., Ouyang, Z., & Yang, M. (2016). An aptamer based lateral flow strip for on-site rapid detection of ochratoxin A in Astragalus membranaceus. *Journal of Chromatography B*, 1022, 102-108.