

ردیابی باکتری/شریشیا کلی و سموم آن در مواد غذایی با واسطه‌ی نانو ذرات کوانتومی کربن کنژوگه به آنتی‌بادی

مسعود ویسی^۱، سیاوش مکتبی^۲، زهرا رضانی^۳ و محمد خسروی^{۴*}

^۱ دانشجوی دکتری بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ استاد، گروه شیمی دارویی و مرکز تحقیقات سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

^۴ دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

دریافت: ۱۳۹۹/۲/۲۷

پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۱۱

چکیده

در این تحقیق، امکان استفاده از ذرات کوانتوم کربن برای تشخیص و تعیین مقدار آنتی‌ژن با هدف تشخیص باکتری و سموم در مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفت. ذرات کوانتوم کربن با استفاده از اسید سیتریک و اتیلن آمین‌دی‌آمین تولید شدند. تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد باکتری/شریشیا کلی با ایمن‌سازی خرگوش و جداسازی آنتی‌بادی‌های IgG از سرم‌هیپرایم با روش کروماتوگرافی تعویض یونی انجام شد. تولید نانوذرات کوانتوم دات با روش‌های FTIR و میکروسکوپ نیروی اتمی با راندمان ۶۷ درصد تأیید شد. اتصال ذرات کوانتوم کربن به آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد/شریشیا کلی با استفاده از EDC-NHS انجام شد؛ شکل‌گیری مناسب و پایداری مجتمع حداقل به مدت ۶ ماه، به ترتیب با روش‌های الیزا و فلئورومتري تأیید شد. افزودن غلظت‌های افزایشی باکتری/شریشیا کلی به کمپلکس مذکور، باعث کاهش نشر فلوروسنس ذرات کوانتوم کربن وابسته به غلظت آنتی‌ژن در طول موج ۴۴۰ نانومتر با تحریک در طول موج ۲۵۰ نانومتر گردید. افزایش غلظت باکتری/شریشیا کلی سبب کاهش بیشتر شدت نشر و به عبارت دیگر منجر به افزایش اختلاف نشر نمونه کنژوگه با نمونه‌ی شاهد با حد تشخیص برابر با ۳۰ CFU/mL باکتری شد. بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان از ترکیب کنژوگه ذرات کوانتوم کربن با آنتی‌بادی ضد یک باکتری، آنتی‌ژن‌های ذره‌ای و یا محلول، برای تشخیص و تعیین مقدار آن باکتری یا آنتی‌ژن استفاده نمود.

کلمات کلیدی: آنتی‌ژن، آنتی‌بادی، ذرات کوانتوم کربن، فلئوروسنس

مقدمه

عوامل بیماری‌زای غذازاد می‌توانند منجر به شیوع بیماری‌های مختلف به ویژه در نوزادان و افراد مسن شوند. بنابراین شناسایی سریع این پاتوژن‌ها قبل از شیوع بیماری

حائز اهمیت است. تکنیک‌های مختلفی برای شناسایی پاتوژن‌های غذازاد ارائه شده است. تلاش برای بهبود روش‌های تشخیص یک روند مداوم و پیوسته در بهداشت

* نویسنده مسئول: محمد خسروی، دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: m.khosravi@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

به نظر می‌رسد که تا کنون مطالعه‌ای در خصوص کوانتوم‌های کربن (CQDs) با آنتی‌بادی و استفاده از آن برای تشخیص کیفی و کمی آنتی‌ژن صورت نگرفته است. در این مطالعه پس از بهینه‌سازی تولید کوانتوم‌های کربن (CQD)-آنتی-بادی اختصاصی باکتری *اشریشیا کلی* به ردیابی کمی این باکتری در طول موج مناسب دستگاه اسپکتروفلوریمتری پرداخته شده است. هدف نهایی چنین مطالعاتی ردیابی و شناسایی سموم و عوامل بیماری‌زا در مواد غذایی مختلف است.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی

پودر DEAE سلولوز (سیگما؛ به شماره‌ی D3764)، اسیدسیتریک، اتیلن دی آمین، (بافر MES مورفولینواتان سولفوریک اسید)، EDC (اتیل دی آمینو پروپیل کاربودیماید)، NHC (ان-هیدروکسی سوکسینامید) و کیسه دیالیز KD 4 از کمپانی مرک آلمان تهیه گردید. کلیه‌ی مواد کاربردی در این تحقیق دارای درجه‌ی خلوص تجزیه‌ای و در تهیه‌ی محلول‌ها از آب دیونیزه استفاده گردید.

دستگاه‌ها

طیف گروه‌های عاملی توسط دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) مدل ورتکس ۷۰ VERTEX (Bruker آلمان) و مورفولوژی (اندازه‌ی ذرات و خواص ساختاری سطوح مواد) ذرات کوانتومی کربن با میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) مدل Nanowizard شرکت JPK آلمان انجام گرفت. شدت نشر فلورسانس، توسط دستگاه اسپکتروفلوریمتری (اسپکتروفلورسانس) Thermo Lumina کمپانی آمریکا صورت گرفت. ثبت طیف UV توسط اسپکتروفتومتر-Vis UV شرکت ۲۰۱ Ar X ایران انجام شد. جذب نوری گوده‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر (AccuReader, Taiwan) خوانش شد.

مواد غذایی است. اخیراً ذرات کوانتومی کربن (CQDs) به دلیل خواص ویژه‌ی خود از جمله خاصیت فلورسانس، بازدهی کوانتومی بالا، پایداری نوری و انتشار وابسته به تحریک به عنوان یک نانو ماده‌ی مهم برای کاربردهای سنسج، فوتوکاتالیستی و الکترونیکی مطرح و معرفی شده است (Liu et al. 2018). CQDs به طور کلی به نانو ذرات کربن با اندازه‌ی کمتر از ۱۰ نانومتر گفته می‌شود که با تبلور مناسب در هسته و تغییر سطح توسط مولکول‌های آلی تهیه شده و دارای نشر فلورسانس با شدت بالا و پایدار می‌باشند (Ramezani et al. 2018, Sonawane et al. 2014). علاوه بر این CQDs پایداری شیمیایی و نوری نسبتاً بالا، حلالیت بالا در آب، سازگاری زیستی خوب و سمیت سلولی کمی از خود بروز می‌دهند. این ویژگی‌های منحصر به فرد استفاده از نانو ذرات CQDs را به عنوان نانو پروب‌های نوری، در موارد تصویربرداری زیستی نیز امکان‌پذیر می‌سازد (Ramezani et al. 2018, Liu et al. 2018, Weng et al. 2015, Mandal and Parvin 2011). چندین منبع کربن طبیعی و شیمیایی برای تهیه C و با توجه به کاربردهای خاص از طریق پروتکل‌های مصنوعی مختلف در دسترس هستند. اسیدسیتریک به دلیل کم‌هزینه بودن و در دسترس بودن یک منبع کربن شیمیایی قابل اعتماد است که امکان تولید CQD با فلورسانس بالا و پایدار و عملکرد سطح قابل کنترل را فراهم می‌آورد (Ramezani et al. 2018, Liu et al. 2018, Weng et al. 2015, Zhang et al. 2015).

دو روش اصلی پیوند کووالانسی و غیر کووالانسی برای اتصال مولکول‌های زیستی بر روی سطح ذرات کوانتوم وجود دارد. اتصال غیر کووالانسی از طریق برهمکنش‌های آب‌گریز، واندروالسی، الکترواستاتیک و هیدروژنی مولکول‌ها با سطح QD ایجاد می‌شود. در پیوند کووالانسی از گروه‌های عملکردی فعال شده نظیر EDC و NHS برای مزدوج شدن در سطح QD ها استفاده می‌شود (Foubert et al. 2013, Bilan et al. 2015, Sapsford et al. 2016).

تهیه باکتری اشریشیا کلی

باکتری اشریشیا کلی با کد ۱۳۹۹: PTCC از آرشیو بخش میکروبیولوژی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه گردید. این باکتری در محیط بلاد آگار کشت و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه گردید. پس از رشد کلونی‌های باکتری، تعیین هویت اشریشیا کلی با آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شد. در ادامه تعدادی از کلونی‌های رشد یافته در لوله فالکن محتوی بافر فسفات نمکی استریل به صورت یکنواخت درآمد. باکتری‌ها با روش حرارتی با نگهداری نمونه در حمام آبگرم 95°C به مدت ۲ ساعت غیرفعال شدند. جهت اطمینان از غیرفعال شدن باکتری، نمونه‌ی غیرفعال شده مجدد در محیط بلاد آگار کشت داده شد.

تهیه آنتی‌بادی پلی‌کلونال

تعداد ۲ سر خرگوش در قسمت مراقبت از حیوانات بخش میکروبی‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی نگهداری شدند. دسترسی آزاد به آب، غذا و دمای 22°C درجه‌ی سانتی‌گراد در طول مدت نگهداری برای حیوانات در نظر گرفته شد. جهت ایمن‌سازی، میزان 0.5 میلی‌لیتر از نمونه باکتری غیرفعال تهیه شده با کدورت معادل با ۴ مک فارلند با ادجوانت کامل فروند به خوبی مخلوط و پس از مقید نمودن خرگوش، آنتی‌ژن به صورت زیر جلدی در پوست ناحیه‌ی پشت و نیز در عضله‌ی ناحیه‌ی ران خرگوش تزریق گردید. تزریق یادآور با ۴ تکرار جهت افزایش عیار آنتی‌بادی علیه باکتری با فواصل زمانی ۲ هفته‌ای با به کار بردن ادجوانت ناقص فروند انجام شد. برای ارزیابی عیار آنتی‌بادی سرم از آزمون میکروآگلوتیناسیون استفاده شد. پس از اطمینان از سطح مناسب آنتی‌بادی، پس از انعقاد خون در دمای آزمایشگاه و ۲ ساعت نگهداری نمونه‌های خون در دمای 4°C درجه‌ی سانتی‌گراد، باز کردن لخته‌ها از دیواره‌ی لوله‌ی محتوی خون انجام شد و با سانتریفیوژ با دور 3000RPM به مدت ۱۰ دقیقه سرم جداسازی گردید (Cooper and Patterson, 2008) جداسازی آنتی‌بادی‌های IgG با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی مطابق با

دستورالعمل کتاب ایمنی‌شناسی کاربردی انجام شد (Hay and Westwood 2002). غلظت آنتی‌بادی پلی‌کلونال خالص‌شده، با روش لوری سنجیده شد و میزان آن 1mg/mL تنظیم گردید. خلوص آنتی‌بادی تهیه شده با روش الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید (SDS-PAGE) تأیید گردید.

سنتز ذرات کوانتومی کربن CQDs

ذرات کوانتومی کربن CQDs بر اساس روش Wang و همکاران در سال ۲۰۱۵ تهیه گردید. به طور خلاصه 0.42 گرم اسیدسیتریک و 530 میکرولیتر اتیلن دی‌آمین به 10 میلی‌لیتر آب یونیزه اضافه و در اتوکلاو تفلون دار مخصوص سنتز قرار گرفتند و به مدت ۵ ساعت در 200°C درجه حرارت داده شد. پس از سرد شدن نمونه در درجه‌ی حرارت اتاق، ذرات تولید شده در فالکن استریل در دمای 4°C درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه محلول اتصال‌دهنده‌های EDC-NHS

محلول 60mM EDC با مخلوط نمودن $5/75$ میلی‌گرم EDC در غلظت 10 میلی‌مولار MES در حجم 1 میلی‌لیتر تهیه شد. همچنین محلول 10mM NHS با مخلوط نمودن $1/73$ میلی‌گرم NHS در یک میلی‌لیتر MES با غلظت 10 میلی‌مولار تهیه شد (Wang et al. 2014).

تعیین ویژگی‌های CQDs

منحنی‌های FTIR، طیف‌های UV/Vis، تحریک/نشر و شدت فلورسانس CQDs مورد سنجش قرار گرفت. سپس با میکروسکوپ نیروی اتمی AFM تصاویری از CQDs تهیه گردید.

پایداری نوری CQDs

برای سنجش پایداری نوری CQDs، ذرات CQDs در طول موج برانگیختگی 350 نانومتر به مدت 60 دقیقه قرار گرفته و شدت نشر در 440 نانومتر در هر ده دقیقه ثبت گردید.

اندازه‌گیری بازده ذرات کوانتومی

از سولفات کوینین (Quinine Sulfate) در اسیدسولفوریک ۰/۱ مولار که در طول موج ۳۵۰nm، ۵۴ درصد بازدهی کوانتومی دارد، به عنوان استاندارد استفاده گردید. جذب زیر ۰/۰۵ محلول‌های سولفات کوینین و CQD در طول موج برانگیختگی (تحریکی) ۳۵۰nm خوانده شد، سپس فلورسانس هر کدام در طول موج برانگیختگی (تحریکی) ۳۵۰nm و نشری ۴۴۰nm با اسپکتروفلوریمتری تعیین گردید. از طریق معادله:

$$\phi_u = \phi_s \frac{F_u}{F_s} \times \frac{A_s n_u}{A_u n_s}$$

که در آن ϕ_u : بازدهی کوانتومی CQDs، ϕ_s : بازدهی کوانتومی استاندارد، Fu: شدت نشر فلورسانس CQDs، Fs: شدت نشر فلورسانس استاندارد، Au: جذب CQD در طول موج تحریکی، As: جذب استاندارد در طول موج، nu: ضریب شکست CQDs، ns: ضریب شکست استاندارد؛ بازدهی کوانتومی محاسبه گردید (Wang et al. 2014).

الحاق CQDs به آنتی‌بادی

بدین منظور از مقادیر مختلف و ترتیب‌های مختلف ترکیب نمودن CQDs، آنتی‌بادی و اتصال‌دهنده‌های EDC و NHC جهت اتصال گروه‌های آمین و کربوکسیل بر اساس روش (Wang و همکاران، ۲۰۱۵) استفاده شد. بر این اساس جهت بهینه نمودن اتصال ارزیابی‌های زیر صورت گرفتند. ابتدا مقادیر ۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میکرو لیتر از CQDs با غلظت اولیه ۲۲mg/ml در فالکن‌های ۵ میلی‌لیتری ریخته شد. به هرکدام از نمونه‌ها ۴۰۰ میکرو لیتر از EDC (غلظت ۶۰ میلی‌مولار در بافر MES) اضافه شد و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر مخلوط شدند. در ادامه ۴۰۰ میکرو لیتر از NHC با غلظت ۱۰ میلی‌مولار به ترکیب اضافه شد و نیم ساعت دیگر در شرایط قبلی قرار داده شد. سپس ۵۰ میکرو لیتر آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد/شیرشیا کلی به هرکدام از نمونه‌ها اضافه و پس از ۲ ساعت مخلوط شدن در شرایط قبلی، به مدت یک

شب در یخچال نگهداری گردید. برای خروج CQDs اضافی، سوسپانسیون در کیسه دیالیز ۴KD قرار داده شد و در بافر فسفات نمکی در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت دیالیز شد. شدت نشر CQDs نمونه‌ی دیالیز شده با دستگاه اسپکتروفلوریمتری در ۴۴۰nm اندازه‌گیری شد. این آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند.

آزمون اتصال آنتی‌بادی به CQD

برای تأیید واکنش آنتی‌بادی-آنتی‌ژن یک آزمون الیزای خانگی به شرح ذیل انجام شد. کف گوده‌های میکرو پلیت ۹۶ خانه الیزا با ۱۰۰ میکرو لیتر از آنتی‌ژن سونیکه باکتری/شیرشیا کلی با غلظت ۱۰ μgr/mL مفروش شد. گوده‌های مفروش شده به مدت یک شب در دمای ۴ درجه‌ی سانتی-گراد قرار داده شد. پس از ۳ مرتبه شست‌وشوی گوده‌ها با بافر فسفات نمکی محتوی میزان ۰/۰۵ درصد توئین، بلاکینگ با استفاده از شیر خشک بدون چربی ۴ درصد انجام شد. پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفته و در سپس شست‌وشوی گوده‌ها مشابه با روش بالا انجام شد. رقت‌های ۱/۵ و ۱/۱۰۰ از نمونه بهینه مجموعه [CQD - آنتی‌بادی] در ۳ تکرار به گوده‌ها اضافه شد. پس از انکوباسیون و شست‌وشوی مشابه مراحل قبل، میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از آنتی‌بادی ضد IgG خرگوش و نشان‌دار با آنزیم پراکسیداز ترب کوهی (HRP) (Immuno Chemistry Technologies company, USA, HRP Catalog : ۶۲۹۳۱) AffiPure Goat anti-Rabbit IgG Fc, Number (۱ mg/ml ; ۱/۱۰۰۰۰) به گوده‌ها اضافه شده و مشابه مراحل قبل پس از یک ساعت قرارگیری در دمای اتاق، شست‌وشو انجام شد. سوبسترای تترامیتیل بنزیدین (TMB) به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر به گوده‌ها اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه واکنش با استفاده از اسید کلریک ۲ HCl مولار متوقف شد. جذب نوری گوده‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (AccuReader, Taiwan) خوانش شد.

طیف ۱-b طیف نشری در ماکزیمم جذب و همچنین جذبی در ماکزیمم نشر می‌باشند که دارای تقارن بوده و نشان از نوع انتقالات می‌باشد. تصویر جای گذاری شده در داخل این شکل، کربن دات سنتز شده زیر نور معمولی و UV با طول موج ۳۶۰ نانومتر است که تحت اشعه UV نشر رنگ آبی از خود نشان می‌دهد که موید فلوروسانس گونه ساخته شده است. شکل C طیف نشری در طول موج‌های برانگیختگی مختلف را نشان می‌دهد که چنانچه از شکل مشخص است با تغییر طول موج برانگیختگی، طول موج ماکزیمم نشر ثابت است و فقط شدت آن افزایش می‌یابد. این پدیده تأیید می‌کند که کربن دات ساخته شده دارای گروه‌های عاملی یکسانی در سطح خود می‌باشد. حداکثر نشر در طول موج نشر در ۴۴۰ نانومتر با طول موج برانگیختگی ۳۵۰nm اتفاق می‌افتد. حداکثر طول موج تحریک با طیف UV/Vis CQDs در شکل a-1 همبستگی (۳۵۰nm) نشان می‌دهد. در منحنی FTIR (شکل d-1) باندهای بین 2800 cm^{-1} و 3400 cm^{-1} به ترتیب مربوط به کششی OH، ارتعاشات باندهای C=C حلقه پلی‌سیکلیک آروماتیک CQDs و CH_2 و CH_3 است (Liu et al., 2018, Wang et al., 2015, Xu et al., 2015). باندهای ارتعاشی C=C اسکلت کربنی آروماتیک CQDs و ارتعاشی C=O در 1737 cm^{-1} و 1680 cm^{-1} می‌باشند. باندهای $1385/96\text{ cm}^{-1}$ به دلیل C-N و C-O گروه‌های آمین متصل به سطح CQDs است. شکل e-1 و f طیف میکروسکوپی نیروی اتمی (AFM) ذرات کربن دات ساخته شده را نشان می‌دهند. در Figure 1. e ارتفاع مشخص شده است که ذرات زیر ۱۰nm با مرفولوژی یکسان هستند و تصویر سه بعدی Figure 1. f نشان می‌دهد که ضخامت کربن دات قرار گرفته روی صفحات میکا کمتر از ۲nm می‌باشد که تأیید می‌کند نقاط کوانتومی کربنی تشکیل شده‌اند. راندمان CQDs بر اساس محلول استاندارد اسیدسولفوریک و توئین ۸۰/۱، در طول موج ۴۴۰ نانومتر، ۶۷ درصد تعیین گردید. در Figure 2 نتایج پایداری نوری CQDs به مدت ۶۰ دقیقه نشان داده شده است.

ردیابی باکتری اشریشیا کلی با استفاده از مجموعه [CQD-آنتی‌بادی]

رقتهای $\frac{1}{1}$ ، $\frac{1}{5}$ ، $\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{100}$ و $\frac{1}{1000}$ از باکتری اشریشیا کلی از میزان اولیه 3×10^6 CFU/mL (رقت ۱/۱۰۰) از غلظت اولیه با کدورت معادل ۱ مک‌فارلند) تهیه گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از هرکدام از رقت‌ها به ۹۹۰ میکرولیتر از مجموعه [CQD-آنتی‌بادی] تهیه‌شده ($1000\ \mu\text{L}$) از $50\ \mu\text{L} + \text{CQDs}$ آنتی‌بادی (در سه تکرار) اضافه گشت؛ نشر و اختلاف نشر هر نمونه با دستگاه اسپکتروفلوریمتری در طول موج ۴۴۰ نانومتر خوانش شد.

تأثیر گلو تار آلدهید بر واکنش مجموعه [CQD-آنتی‌بادی]

در این قسمت دو روش اتصال آنتی‌بادی به CQD مقایسه شده است. روش اول مشابه روش ذکر شده در مراحل قبل از اتصال‌دهنده‌های EDC و NHC جهت اتصال CQD به آنتی‌بادی استفاده گردید. در روش دوم کلیه‌ی مقادیر مشابه روش اول بود ولی علاوه بر EDC و NHC از غلظت ۱٪ گلو تار آلدهید (GTA) جهت پایداری اتصال CQD به آنتی‌بادی به مجموعه استفاده شد. پس از افزودن $10\ \mu\text{L}$ از غلظت 3×10^7 CFU/mL از باکتری اشریشیا کلی به هرکدام از مجموعه‌های تهیه شده به دو روش فوق، شدت نشر و اختلاف نشر آن‌ها خوانده شدند. آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت.

نتایج

Figure 1. a . b. c. بیانگر طیف‌های UV/Vis، تحریک/نشر و فلوروسانس CQDs می‌باشند. طیف UV/Vis مربوط به کربن کوانتوم سنتز شده در شکل ۱-a با طیف کربن کوانتوم دات هم‌خوانایی دارد. جذب شدید در ناحیه‌ی ۲۴۰ نانومتر مربوط به انتقالات $\pi-\pi^*$ و پیک ناحیه ۳۵۰ نانومتر مربوط به انتقالات $\pi-\pi^*$ می‌باشند که نشان‌دهنده‌ی ویژگی‌های گروه‌های عاملی متصل به سطح کربن دات و اسکلت کربنی با هیبرید SP^2 برای کربن‌ها می‌باشد. در

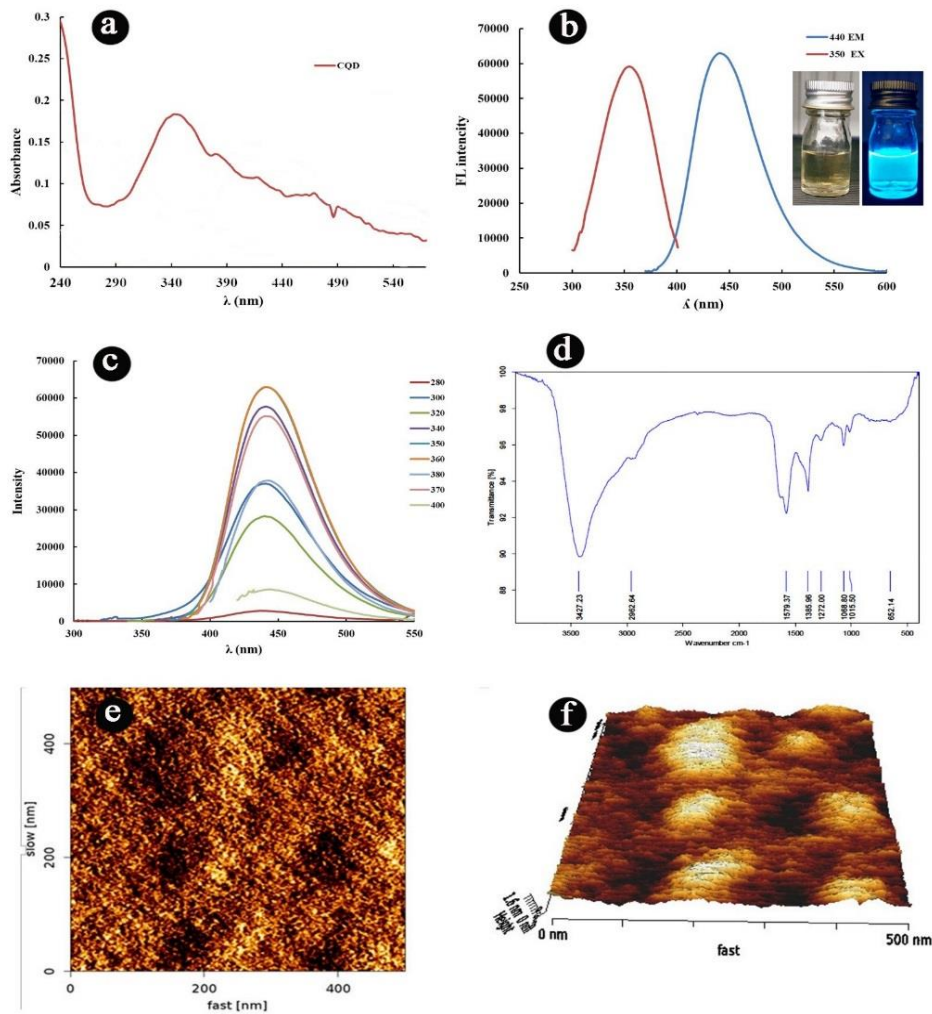


Figure 1. Curves of the UV/Vis spectra (a), (b) excitation/emission, (c) fluorescence intensity, (d) FTIR of CQDs particles and (e and f) AFM. The UV/Vis spectrum of the synthesized particles in figure (a) was matched with the carbon quantum dot spectrum. In Figure (b) the absorption and emission spectrum at maximum level have symmetry range. Figure (c) shows the maximum emission in the wavelength of 440 nm with the excitation wavelength of 350 nm. The FTIR (figure d) curve shows the functional groups of the carbon quantum dots. The figures of (e) and (f) of the atomic force microscopic spectrum (AFM) confirmed synthesis of the carbon quantum dots.

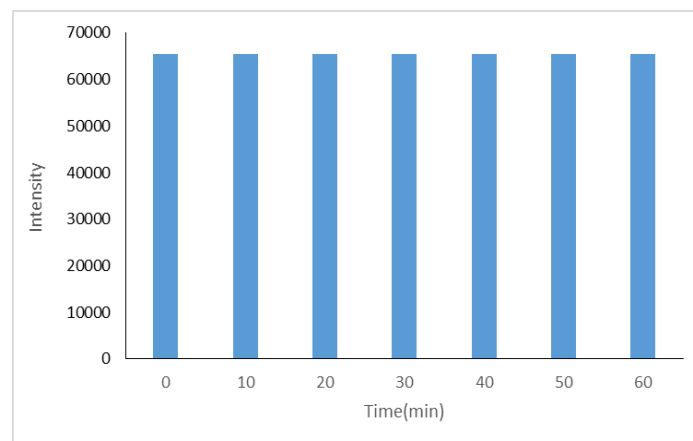


Figure 2. Stability of the mission intensity of CQDs for 60 minutes. The CQDs particles with a stable emission intensity during the excitation at wave 350 nm for 60 minutes.

میانگین نتایج ردیابی باکتری اشریشیا کلی در Figure 4 ذکر شده است. این نتایج نشان می‌دهد که با مواجهه مجموعه [CQDs+آنتی‌بادی] با آنتی‌ژن شدت نشر فلئوروسنس CQDs کاهش می‌یابد. با افزایش غلظت آنتی‌ژن میزان شدت نشر کمتر و اختلاف شدت نشر با کنترل افزایش می‌یابد.

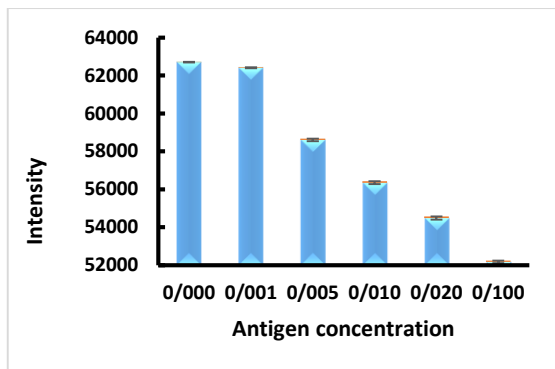


Diagram 3. The emission intensity of the [CQD-polyclonal anti-*E. coli* antibody] complex in detection of the various *E. coli* concentrations. Increasing the bacteria concentration resulted in a decreasing trend in the emission intensity and increasing the mission intensity intervals between of the test and control sample.

میانگین و انحراف معیار نتایج شدت نشر مجموعه [CQDs+آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد *E. coli*] در استفاده توأم از اتصال‌دهنده دیگر در نمودار ۴ ذکر شده است. بر اساس این نتایج در استفاده از اتصال‌دهنده‌های EDC و NHS نشر و اختلاف نشر مناسب‌تری حاصل می‌شود.

میانگین نتایج شدت نشر مجموعه [CQDs+آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد *E. coli*] در Figure 3 ذکر شده است. بر اساس این نتایج با افزایش غلظت CQDs، شدت نشر افزایش می‌یابد. این افزایش شدت نشر CQDs تا $1000 \mu\text{l}$ ادامه و بعد با افزایش $1200 \mu\text{l}$ CQDs تا حدودی میزان شدت نشر کاهش یافت. بر همین اساس میزان $1000 \mu\text{l}$ CQDs به عنوان مقدار بهینه برای ادامه‌ی آزمایش‌ها انتخاب گردید.

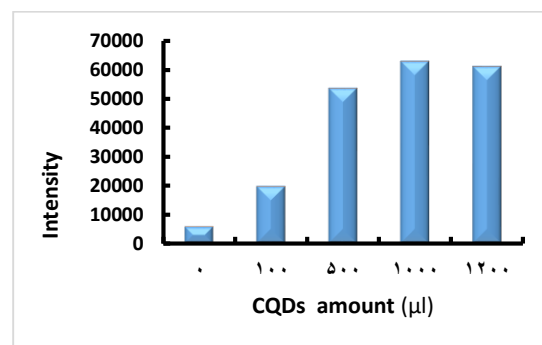


Diagram 2. The emission intensity of the various amount of [CQD-polyclonal anti-*E. coli* antibody] complex. Increasing the concentration of CQDs up to 1000 mL increased the emission intensity and there was no significant effect on the trend by using more concentrations.

نتایج آزمون الایزا (جدول ۱) دال بر تأیید واکنش آنتی‌بادی + آنتی‌ژن است که با افزایش غلظت [CQD-آنتی‌بادی]، جذب نوری اندازه‌گیری شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر افزایش می‌یابد.

Table 1. The confirmation and conjugation of antibody to CQD in [CQD-Antibody] complex using ELISA. The positive results of the two dilutions of 1/50 and 1/100 from [CQD-antibody] complex in three replications indicate a reaction of the antibody

(CQD-Antibody) dilution	Absorbance at 450 nm Samples			Absorbance Mean \pm SD
	1	2	3	
1/50	0.756	0.766	0.794	0.772 \pm 0.1969
1/100	0.332	0.337	0.366	0.345 \pm 0.1825
Negative control	0.066	0.064	0.061	0.0637 \pm 0.0025

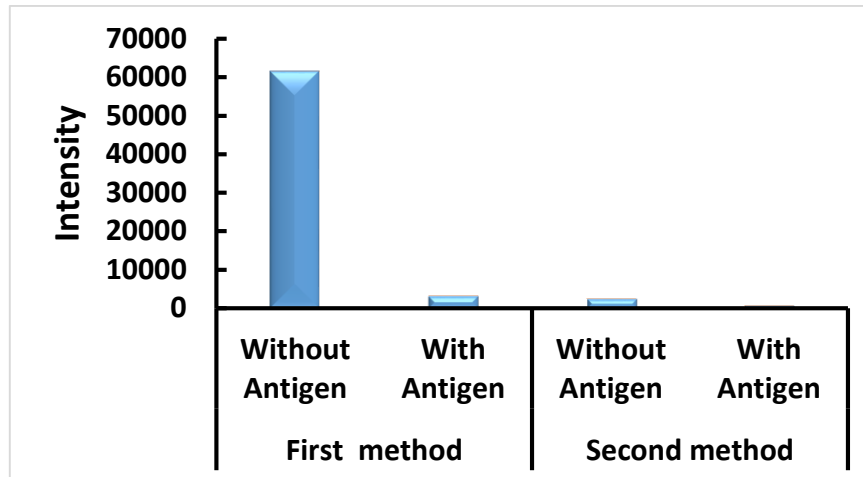


Diagram 4. The emission intensity of the [CQD-polyclonal anti- *E. coli* antibody] complex prepared according to two methods 1) using glutaraldehyde 2) without glutaraldehyde. The use of EDC and NHS linker alone caused higher emission intensity and the higher intervals of emission intensity than the use of EDC-NHS with guctaraldehyde.

بحث

دیگر محققین بیان گر این موضوع است. (Alarfaj et al. 2018, Wang et al. 2015, De et al. 2014). طبق بررسی های صورت گرفته تا کنون مطالعه ای منتشر شده ای از کونژوگه نمودن ذرات کوانتوم کربن با آنتی بادی یافت نشده است. در مطالعه ای حاضر، ابتدا از اتصال دهنده های EDC و NHS برای کونژوگه نمودن در سطح ذرات کوانتوم کربن استفاده شد (Foubert et al. 2013, Sapsford et al. 2015, Bilan et al. 2016). نتایج نشان داد که استفاده گلوتارآلدهید همراه با اتصال دهنده های EDC و NHS نسبت به زمانی که از اتصال دهنده های EDC و NHS به تنهایی استفاده می شود باعث کاهش چشم گیر نشر و اختلاف نشر می شود. از گلوتارآلدهید در جهت اتصال ذرات کوانتومی آمین دار به مولکول های زیستی دارای گروه آمین استفاده می شود. در مطالعه ای Zhong و همکاران در سال ۲۰۱۹، با اتصال آنتی بادی واکنش دهنده با باکتری / شیرشیا کلی به نانو ذرات کوانتومی CdS با واسطه ی گلوتارآلدهید موفق به ردیابی این باکتری در شیر شدند. در این روش قابلیت ردیابی 10^8 - 10^1 واحد تشکیل دهنده ی کلونی با حداقل حد تشخیصی ۳ CFU/mL گزارش شده است. از جمله دلایل تفاوت

CQD ها از مواد کربنی لومینسنت (درخشان) هستند که به دلیل خاصیت نوری و شیمیایی خاص، مورد توجه محققان قرار گرفته اند (Mako et al. 2018, Wang et al. 2015). داده های این تحقیق بیان گر پایداری نوری بالای CQDs سنتز شده با این روش است. همچنین CQDs یخچال به مدت ۶ ماه پایداری نوری بالایی از خود نشان دادند. در بررسی دیگری مشابهت در پیک و محل سه طول موج ساطع از ذرات دلیل بر پایداری مناسب دانسته شده است (Zheng et al. 2018). در مطالعه ای Perikala و Bhardwaj در سال ۲۰۱۹ از جمله موارد دخیل در پایداری ذرات کوانتومی کربن را میزان مناسب گروه های عملکردی سطحی نسبت به منبع کربن ذکر شده است. وجود گروه های عملکردی سبب پراکنش مناسب ذرات در محلول های آبی گشته که سبب پایداری کلوئیدی ذرات در طولانی مدت می شود (Dager et al. 2019). خصوصیات فلورسنتی، پایداری در برابر نور و pH به دلیل خصوصیات قابل کنترل سبب به کارگیری محصولات پایدار کوانتومی در اهداف پزشکی می شود (Janus et al. 2020). نانو ذرات تولید شده در این مطالعه دارای خصوصیات مولکولی مشابهی با سایر مطالعات بوده اند که تشابه آزمون FTIR با

آن‌ها در این زمینه شده است (Priyanka and Dwarakanath 2016). برای غلبه بر این مشکلات، نیاز به یک روش ایده‌آل برای تشخیص سریع، حساس، قابل دسترس، ساده و کم‌هزینه برای مقادیر اندک باکتری در عملیات معمول بالینی و در مواد غذایی است.

با توجه به نتایج این تحقیق، می‌توان از کاهش شدت نشر (افزایش اختلاف نشر) اندازه‌گیری شده متعاقب افزودن نمونه به مجموعه [آنتی‌بادی-CQD-آنتی‌ژن را تشخیص و از میزان شدت کاهش نشر پی به میزان (غلظت) آنتی‌ژن مربوطه برد به طوری که این روش بدون به کارگیری انکوباسیون اولیه، قادر به ردیابی 30 CFU/mL باکتری در زمان کوتاه و مقرون به هزینه‌ای است که در مقایسه با سایر روش‌ها، دارای ویژگی‌هایی قابل قبول است. در این تحقیق، امکان استفاده از ذرات کوانتوم کربن برای تشخیص و تعیین مقدار آنتی‌ژن به اثبات رسید. کونژوگه نمودن آنتی‌بادی به CQD برای تشخیص و تعیین مقدار *E. coli* با موفقیت صورت گرفت. این روش را می‌توان به دیگر سیستم‌های Ab-Ag تعمیم داد. حتی می‌توان از این روش با انتخاب مناسب آنتی‌بادی یا هر مولکولی که بتواند با یک مولکول هدف خاص ارتباط برقرار کند در تشخیص سموم مختلف مواد غذایی استفاده نمود.

نتایج می‌توان به ریز پوشانی ذرات کوانتومی CdS با شبکه‌های ایمیدازول توسط Zhong و همکاران در سال ۲۰۱۹ اشاره نمود. در مطالعه‌ی دیگری از خصوصیات فلورسنتی ذرات کوانتومی کربنی به عنوان یک جایگزین بالقوه برای رنگ‌های ارگانیک مصنوعی در جهت ردیابی باکتری‌های گرم منفی استفاده شده است (Das et al. 2017). همچنین از روش انکوباسیون 30-40 دقیقه‌ای نمونه در محیط‌های کشت باکتریایی و در ادامه ارزیابی فلورسنتی با استفاده از ذرات CQD در جهت ردیابی باکتری‌ها استفاده شده است (Mandal and Parvin 2011). از روش‌های مختلفی نظیر محیط کشت‌های میکروبی، سنجش ایمنی الایزا، سنجش ایمنی رزونانس پلاسمای سطحی (SPR)، روش‌های مختلف بیولوژیکی مولکولی مانند PCR، روش‌های کروماتوگرافی مانند روش Lateral flow immuno chromatography، سنجش ایمنی فلورسانس، سنجش ایمنی الکتروشیمی لومینسانس ECL، سنجش زیستی بر پایه‌ی آپتامر و روش‌های دیگر برای ردیابی باکتری‌ها استفاده می‌شود. این تکنیک‌ها همگی دارای ویژگی و حساسیت بالا هستند ولی هزینه‌ی هنگفت معرف‌ها و تجهیزات، نیاز به کارکنان آموزش‌دیده، زمان نسبتاً طولانی‌تر برای انجام برخی از این تکنیک‌ها و نیز عملیات آنالیتیکی پیچیده باعث محدودیت در استفاده از

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات کارکنان آزمایشگاه مرکزی دانشکده داروسازی و سرکار خانم مژگان نوربهبهانی کارشناس گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز جهت همکاری در انجام برخی از آزمایش‌های تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ گونه تعارض منافی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این پژوهش در قالب پژوهانه با شماره SCU.VP99.12470 توسط دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده است.

منابع

- Alarfaj, N. A., El-Tohamy, M. F., & Oraby, H. F. (2018). CA 19-9 pancreatic tumor marker fluorescence immunosensing detection via immobilized carbon quantum dots conjugated gold nanocomposite. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1162.
- Bilan, R., Fleury, F., Nabiev, I., & Sukhanova, A. (2015). Quantum dot surface chemistry and functionalization for cell targeting and imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 26(4), 609-624.
- Cooper, H. M., & Patterson, Y. (2008). Production of polyclonal antisera. *Current Protocols in Immunology*, 82(1), 2.4.1-2.4.10.
- Dager, A., Uchida, T., Maekawa, T., & Tachibana, M. (2019). Synthesis and characterization of Mono-disperse carbon Quantum Dots from fennel Seeds: photoluminescence analysis using Machine Learning. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12
- Das, P., Bose, M., Ganguly, S., Mondal, S., Das, A. K., Banerjee, S., & Das, N. C. (2017). Green approach to photoluminescent carbon dots for imaging of gram-negative bacteria *Escherichia coli*. *Nanotechnology*, 28(19), 195501.
- De, B., Voit, B., & Karak, N. (2014). Carbon dot reduced Cu₂O nanohybrid/hyperbranched epoxy nanocomposite: mechanical, thermal and photocatalytic activity. *RSC Advances*, 4(102), 58453-58459.
- Foubert, A., Beloglazova, N. V., Rajkovic, A., Sas, B., Madder, A., Goryacheva, I. Y., & De Saeger, S. (2016). Bioconjugation of quantum dots: Review & impact on future application. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 83, 31-48.
- Hay, F., & Westwood OMR. (2002). *Practical Immunology*. In (pp. 14-15): United Kingdom: Blackwell Publishing Company.
- Janus, L., Radwan-Pragłowska, J., Piątkowski, M., & Bogdał, D. (2020). Smart, Tunable CQDs with Antioxidant Properties for Biomedical Applications—Ecofriendly Synthesis and Characterization. *Molecules*, 25(3), 736.
- Liu, X., Hao, J., Liu, J., & Tao, H. (2018, February). Green synthesis of carbon quantum dots from lignite coal and the application in Fe³⁺ detection. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 113, No. 1, p. 012063). IOP Publishing.
- Mako, T. L., Racicot, J. M., & Levine, M. (2018). Supramolecular luminescent sensors. *Chemical Reviews*, 119(1), 322-477.
- Mandal, T. K., & Parvin, N. (2011). Rapid detection of bacteria by carbon quantum dots. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7(6), 846-848.
- Perikala, M., & Bhardwaj, A. (2019). Highly Stable White-Light-Emitting Carbon Dot Synthesis Using a Non-coordinating Solvent. *ACS Omega*.
- Priyanka, B., Patil, R. K., & Dwarakanath, S. (2016). A review on detection methods used for foodborne pathogens. *The Indian Journal of Medical Research*, 144(3), 327
- Ramezani, Z., Qorbanpour, M., & Rahbar, N. (2018). Green synthesis of carbon quantum dots using quince fruit (*Cydonia oblonga*) powder as carbon precursor: Application in cell imaging and As³⁺ determination. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 549, 58-66.
- Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B. J., Oh, E., ... & Medintz, I. L. (2013). Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical Reviews*, 113(3), 1904-2074.
- Sonawane, S. K., Arya, S. S., LeBlanc, J. G., & Jha, N. (2014). Use of nanomaterials in the detection of food contaminants. *European Journal of Nutrition & Food Safety*, 301-317.
- Wang, B., Huang, X., Ma, M., Shi, Q., & Cai, Z. (2014). A simple quantum dot-based fluoroimmunoassay method for selective capturing and rapid detection of *Salmonella* Enteritidis on eggs. *Food Control*, 35(1), 26-32.
- Wang, R., Xu, Y., Zhang, T., & Jiang, Y. (2015). Rapid and sensitive detection of *Salmonella* Typhimurium using aptamer-conjugated carbon dots as fluorescence probe. *Analytical Methods*, 7(5), 1701-1706.
- Weng, C. I., Chang, H. T., Lin, C. H., Shen, Y. W., Unnikrishnan, B., Li, Y. J., & Huang, C. C. (2015). One-step synthesis of biofunctional carbon quantum dots for bacterial labeling. *Biosensors and Bioelectronics*, 68, 1-6.
- Xu, Q., Pu, P., Zhao, J., Dong, C., Gao, C., Chen, Y., ... & Zhou, H. (2015). Preparation of highly photoluminescent sulfur-doped carbon dots for Fe (III) detection. *Journal of Materials Chemistry A*, 3(2), 542-546.

Zheng, Y., Zheng, J., Wang, J., Yang, Y., Lu, T., & Liu, X. (2020). Facile Preparation of Stable Solid-State Carbon Quantum Dots with Multi-Peak Emission. *Nanomaterials*, 10(2), 303.

Zhong, M., Yang, L., Yang, H., Cheng, C., Deng, W., Tan, Y., ... & Yao, S. (2019). An electrochemical immunobiosensor for

ultrasensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 using CdS quantum dots-encapsulated metal-organic frameworks as signal-amplifying tags. *Biosensors and Bioelectronics*, 126, 493-500.

Received:16.05.2020

Accepted: 01.07.2020

Detection of *Escherichia coli* and its toxins in food using carbon quantum dots conjugated antibody

Masoud Veisi¹, Siavash Maktabi², Zahra Ramezani³ and Mohammad Khosravi^{4*}

¹ PhD Student in Food Hygiene, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Professor, Department of Medicinal Chemistry and Toxicology Research Center, Faculty of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 16.05.2020

Accepted: 01.07.2020

Abstract

In this study, the possibility of using carbon quantum dots (CQD) to detect and determine the amount of antigen to finally quantify *E. coli* and its toxins in food stuffs. Carbon quantum particles were produced using citric acid and ethylenediamine. The production of the polyclonal anti- *Escherichia coli* antibody was carried out with immunization of the rabbits and purification of the IgG antibodies from the hyper immune serum using ion exchange chromatography. The production of the carbon quantum dot nanoparticles was confirmed using FTIR and atomic force microscopy with efficiency of 67%. The validation of the carbon quantum dot coupling to anti-bacterial antibodies was performed using EDC-NHS, the appropriate formation and stability of the complex for a period of 6 months, was confirmed by ELISA and fluorometry methods. The addition of high concentrations of *E. coli* bacteria to the complex reduced the diffusion of fluorescence emission of CQD at a wavelength of 440 nm by stimulating at a wavelength of 350 nm. Increasing the concentration of *E. coli* further reduced the intensity of emission which led to an increase in the difference between the emission of the conjugated and the control samples with a detection limit equal to 30 CFU/mL bacteria. Based on the results of this study, the conjugation of CQD with an antibody against a bacterium or a substance can be used to detect and determine the amount of that bacterium or substance.

Key words: Antibody, Antigen, Carbon quantum dots, Fluorescence

* **Corresponding Author:** Mohammad Khosravi, Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: m.khosravi@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).