sina-pub.ir

فراتر از برچسب ها: بررسی استفاده از نقاط کوانتومی به عنوان اجزای تلفیقی سنجش ها، بیوپروب ها و بیوسنسور ها با استفاده از ترارسانی نوری

چکیده

یک بررسی جامع از توسعه سنجشگر ها، بیو پروب ها و بیو سنسورها با استفاده از نقاط کوانتومی (QDها) به عنوان اجزای تلفیقی ارائه شده است. در مقایسه با یک QD که به صورت انتخابی به عنوان یک برچسب معرفی می شود، یک QD تلفیقی در طول آنالیز بیولوژیکی یک سیستم به طور همزمان در ترارسانی نقش دارد و به عنوان یک داربست برای شناسایی زیستی شناخته می شود. استفاده از QD ها به عنوان یک داربست به کمک طیف وسیعی از پوشش ها و روشهای بیوکانجوگیشن، رویدادهای شناخت زیستی را امکان پذیر می سازد.

تعدیل لومینسانس QD، امکان ترارسانی را از طریق انتقال انرژی رزونانس فلورسانس (FRET)، انتقال انرژی رزونانس بیولوژیکی (BRET)، کوئنچر انتقال بار و الکتروشیمی لومینسانس (ECL) فراهم می کند. یک مرور کلی از مفاهیم و اصول اساسی استفاده از QD ها توسط هر یک از این روش های انتقال، همراه با نمونه های بسیار کاربردی آنها در سنجش زیستی ارائه شده است.

این موارد عبارتند از: شناسایی مولکول های کوچک با استفاده از روش های مرتبط با آنزیم، و یا استفاده از آپتامرها به عنوان پروب های متمایل؛ تشخیص پروتئین از طریق ایمنی سنجی ها یا آپتامرها؛ تست های هیبریداسیون اسید نوکلئیک؛ و آزمایشات برای فعالیت پروتئاز یا نوکلئاز. استراتژی های تشخیص چند بخشی در میان این مثال ها برجسته می شوند.

اگرچه اکثر تحولات تا به امروز در شرایط آزمایشگاهی بوده است، روش های مبتنی بر QD برای سنجش بیولوژیکی درون بدن در حال ظهور است. توجه خاصی به توسعه آزمونهای فاز جامد ارائه شده است که مزایای خاصی نسبت به همتایان فاز محلول آنها را ارائه می دهند.

sina-pub.ir

اختصارات:

Alexa Fluor 647: A647

APTES : آمینو پروپیل تری اتوکسی سیلان

ATP : آدنوزین تری فسفات

Au NPs : نانو ذرات طلا

CD-: سیکلودکسترین

BRET : انتقال انرژی رزونانس بیولومینسانس

BSA, : آلبومین سرم گاوی

CB : باند هدایت

CNTs: نانوتیوب های کربنی

ConA: کانکاوالین A

CRET: انتقال انرژی رزونانس لومینسانس شیمیایی

CT: انتقال بار cTnI، cardiac troponin انسانی

DHLA: دی هیدرو لیپوفیلیک اسید

ECL: الکتروشیمی لومینسانس

EDTA: اتیلن دی آمین تترا استیک اسید

ELISA: بررسی های ایمنی مرتبط با آنزیم

EPR: پاسخ پارامغناطیسی الکترون

ER : گیرنده استروژن

GSH : گلوتاسیون

GOX : گلوگز اکسیداز

مؤسسه سینا sina-pub.ir

sina-pub.ir

HIV : ویروس نقص ایمنی انسان

FRET : انتقال انرژی رزونانس فلورسانس

FWHM : پهنای کامل در ماکزیمم

Pacific Blue; PB

PCR : واکنش زنجیری فلورسانس

PDDA : پلی (دی آلیل دیامین اتیل آمونیوم کلرید)

PEG : پلی اتیلن گلیکول

PET : انتقال الکترون با القای نوری

PIGE : الکترود گرافیت آغشته شده با پارافین

PL : لومینسانس نوری

L-Cys : l- سیستئین

LOD: حد تشخیص

MAA : مرکاپتو استیک اسید

MBP : اتصال پروتئینی به مالتوز

MB : شعاع نور ملکولی

MPA: مرکاپتو پروپیونیک اسید

MMP: متالو پروتئیناز ماتریکس

MSP: واکنش اختصاصی متیلاسیون زنجیره پلیمراز

NAD: نوکلوئوتید آدنین نیکوتینامید

XQDw: نقاط کوانتومی (پیک PL atwnm، اولین پیک تهییج atxnm)

RhR : رودامین قرمز

مؤسسه سینا sina-pub.ir

sina-pub.ir

Rluc,; : رنیلا لوسیفراز

RRE: عنصر پاسخگوی rev

SA: استرپتاویدین

SCE : الکترود کالومل استاندارد

SMD: تشخیص مولکول تنها

SNP : چند شکلی نوکلئوتید تنها

TAMRA : کربوکسی تترا متیل رودامین

TBA: آپتامر متصل به ترومبین

VB : نوار ظرفیت

1. مقدمه

نقاط کوانتومی (QD ها) یکی از انواع مختلف نانومواد هستند که تأثیر قابل توجهی بر تحقیقات در بسیاری از زمینه های علوم فیزیکی، شیمیایی و زیست شناختی داشته است.QD ها نانوبلورهای نیمه هادی هستند که عموما دارای ابعاد در محدوده 2 تا 6 نانومتر می باشند. منافع QD های چند بخشی تا حد زیادی توسط خواص الکترو نوری منحصر به فرد آنها که بین نیمه هادی مولکولی و نیمه رساناها قرار دارند بروز داده می شود. اگر چه تحقیقات QD در اوائل دهه 1990 احتمالا پذیرش بیوکانجوگه های QD به عنوان برچسب های فلورسنت برای تصویربرداری بیولوژیکی به دست آمد علاقه ی قابل ملاحظه به استفاده از آنها در جوامع تحقیقاتی بیو تجزیه ای، بیو فیزیکی و بیوپزشکی تشدید شد. QD ها اغلب با فراهم آوری شفافیت و پایداری نوری بهتر نسبت به رنگ های فلورسنت متداول شناخته می شوند در حالی که اغلب برای کاربردهای چند رنگی مناسب تر هستند. در حال حاضر، QD ها تصویربرداری سلول، بافت یا کل بدن و توسعه پروب های نوری برای سنجش بیولوژیکی را تحت تاثیر قرار می دهد. این بررسی با استفاده از QD ها به عنوان یک جزء تلفیقی در تجزیه و تحلیل به توسعه آزمایشات زیستی، بیوپروب ها و بیوسنسورها می

sina-pub.ir

پردازد. ما براساس یک طراحی بین QD های "غیر تلفیقی" و "تلفیقی" تفاوت قائل می شویم. QD غیر تلفیقی آنی است که به صورت انتخابی به یک بیو آنالیز در نتیجه تشخیص زیستی معرفی می شود. نمونه هایی از به کارگیری QD ها شامل استفاده به عنوان برچسب های فلورسنت در میکرو آرایه ها و یا برچسب های الکترو اکتیو در آزمون های مبتنی بر ولتامتری تخلیه آنودی می باشند. در مقابل، QD تلفیقی آنی است که در یک سیستم در سراسر یک آنالیز زیستی وجود دارد و در انتقال همزمان نقش دارد و به عنوان یک داربست برای شناخت زیستی عمل می کند که در بسیاری از موارد نیاز به اتصال مستقیم پروب های تمایلی یا عناصر شناخت بیولوژیکی به QD یا تجمع همزمان آنها در یک رابط دارد. نکته کلیدی این است که انتقال از طریق تعدیل تابش لومینسانس QD بین حالتهای بالا / پایین و یا روشن / خاموش اتفاق می افتد. در اینجا آزمایشات زیستی، بیوپروب ها و بیوسنسورهای مورد بحث در درجه اول به آزمایشات با QD های تلفیقی و انتقال نوری محدود می شود. تعدیل لومینسانس QD به عنوان یک پاسخ انتخابی برای حضور آنالیت هدف می تواند به روش های مختلفی به دست آید. این شامل این موارد است اما لزوما محدود نمی شوند به: انتقال انرژی رزونانس فلورسانس (FRET)، انتقال انرژی بیو لومینسانس (BRET)، انتقال بار فرونشانی (CT) و الکتروشیمی لومینسانس (ECL). لومینسانس نوری QD (PL) به شدت تحت تأثیر واکنش های CT قرار می گیرد، در حالی که QD ها دهندگان عالی در FRET و گیرندگان در BRET هستند. وابستگی جدی به این فرآیندها، مبنای بسیاری از استراتژی های تشخیص است. فرآیندهای شناخت زیستی برای تعدیل فاصله بین گونه های فعال مجتمع پروکسیمال، رنگساز ها یا فلوئورسانس ساز استفاده می شوند. تغییرات همزمان در طیف و شدت PL یک سیگنال تحلیلی ارائه می دهد. تعدیل شدت ECL QD ها توسط واکنش پذیری آنالیت، گردش آنزیم یا تغییرات در انتقال جرم هم واکنشگر همچنین برای ارائه یک سیگنال تحلیلی استفاده شده است. اصول اساسی این استراتژی های تشخیصی در این بررسی، همراه با یک مرور کلی از کاربردهای آنها در تشخیص انتخابی مولکول های کوچک، یون ها، اسیدهای نوکلئیک، پروتئین، آنزیم ها و دیگر اهداف زیست شناختی مهم ارائه شده است. به پیشرفت های اخیر در آزمون های فاز جامد توجه خاصی شده است که می تواند مزایای منحصر به فردی را نسبت به

sina-pub.ir

همتایان فاز محلول را به طور گسترده ای مورد استفاده قرار دهند. بررسی تحلیلی کاربردها به وسیله بررسی کلی QD ها، با تاکید بر شیمی بین وجهی و بیوکانجوگیشن آن ها نوشته می شود.

2. نقاط کوانتومی: شیمی سطح و کانجوگه ها

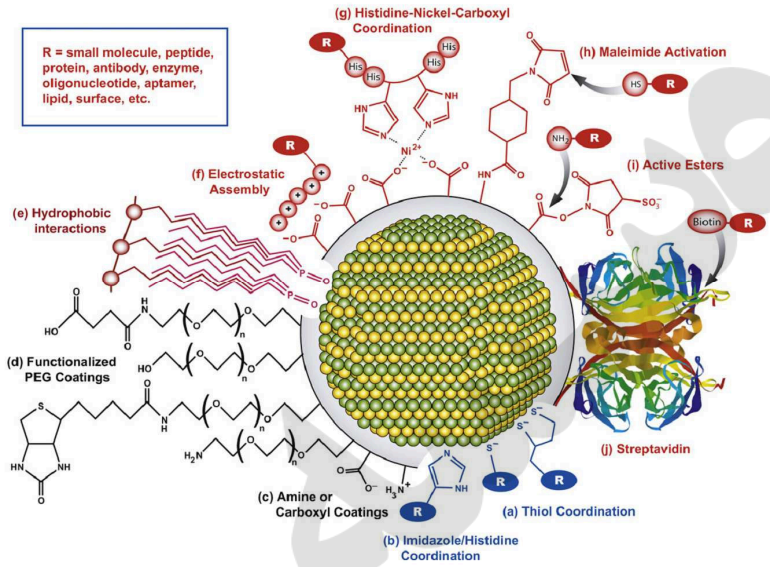
2.1 نقاط کوانتومی

خواص الکترونوری منحصر به فرد QD ها از ترکیبی از مواد و ابعاد بوجود می آیند که به عنوان "محدودیت کوانتومی" شناخته می شود. علیرغم ظهور مواد دیگر، رایج ترین مواد باقی مانده، CdSe و CdTe می باشند. روش های سنتزی و شناسایی QD های با کیفیت بالا به طور گسترده ای در دسترس هستند و PL در مناطق مرئی و IR نزدیک از طیف به دست آمده است. به طور معمول، ساختارهای هسته-پوسته با یک لایه پوشاننده ZnS در اطراف هسته نانوکریستال برای بهبود خواص لومینسانس (به عنوان مثال CdSe / ZnS) مورد استفاده قرار می گیرند.

خواص نوری مطلوب QD ها عبارتند از: جذب قوی، گسترده، یک فوتونی و دو فوتونی؛ باریک، متقارن، با اندازه قابل تنظیم PL (عرض کامل در نیمه حداکثر، FWHM، حدود 25-35 نانومتر)؛ عملکرد کوانتومی بالا (> 20٪)؛ و به طور کلی مدت های زمان انحطاط PL (اغلب> 10 ns). دیگر ویژگی های با مطلوبیت کمتر، خصوصیات نوری QD هاست که شامل: انحطاط چند نمایی PL، آبی شدن، روش شدن و چشمک زدن در سطح QD تنها. با توجه به نسبت های بزرگ مساحت سطح به حجم در QD ها، کیفیت و ویژگی های سطح نانوبلور معادل کیفیت هسته در تعیین خواص PL مشاهده شده است.

کاهش عملکرد کوانتومی، تغییرات در فروپاشی PL، تغییرات طیفی و ظاهر نامطلوب گاف نواری PL می تواند با کیفیت سطح همراه باشد. رشد یک پوسته معدنی با کیفیت بالا در اطراف هسته نانوکریستال، کیفیت سطح را در PL کاهش می دهد. با این حال، تاثیر سطح QD را نمی توان حذف کرد؛ جاذب ها، لیگاندها، یا سایر پوشش ها می توانند خواص PL را تحت تأثیر قرار دهند. این لزوما به معنای از دست دادن نیست - توانایی حاملهای هسته (به عنوان مثال الکترون ها و حفره ها) برای برهمکنش با حالت ها در ماتریکس مجاور در بسیاری از کاربردهای مربوط به CT ضروری است. شیمی سطح برای انواع سنجشگرها، بیوپروب ها و بیوسنسورها بر پایه نقاط کوانتومی بسیار مهم می باشد.

sina-pub.ir



عکس. 1. یک تصویر از برخی از استراتژی های شیمی سطح منتخب و کانجوگیشن برای QD ها استفاده می شود. محیط خاکستری اطراف QD نشان دهنده پوشش عمومی. این پوشش دهی می تواند با سطح QD همراه باشد (e) برهمکنش های هیدروفوبی یا کئوردیناسیون لیگاند. نمونه هایی از این موارد عبارتند از: (a) تیول های تک دندانه یا دو دندانه، (b) گروههای ایمیدازول، پلی ایمیدازول (مثلا پلی هیستیدین)، یا گروه دی تیو کربامات (نشان داده نمی شود). قسمت بیرونی پوشش با نمایش (c) گروههای آمین یا گروه کربوکسیل، یا (d) PEG عامل دار شده در حلالیت آبی وساطت می کند.

استراتژی های متداول برای بیوکانجوگیشن عبارتند از: (a) تغییرات تیول یا (b) فلوتونیئین پلی هیستیدین (نشان داده نمی شود) برچسب هایی که به پوشش نفوذ می کنند و با سطح QD برهمکنش می کند؛ (f) تجمع الکترواستاتیکی با پوشش؛ (g) تجمع پلی هیستیدین روی پوشش های کربوکسیل با وساطت نیکل؛ (h) فعال سازی و جفت شدن ملایمید (i) تشکیل و جفت شدن استر فعال؛ (j) نشان دار کردن با بیوتین و کانجوگه های استرپتاویدین-QD.

علاوه بر حفظ خواص نوری مطلوب QD ها، شیمی سطح انتخابی اجازه بیوکانجوگیشن را می دهد که در حلالیت آبی سهم دارد و از به کارگیری موثر از FRET، BRET، CT یا ECL به عنوان یک روش انتقال جلوگیری نمی کند. با توجه به انتقال مؤثر، ضخامت پوشش بسیار مهم است. در بسیاری از مطالعاتی که در این بررسی توصیف شده است،

sina-pub.ir

پوششهای فشرده لیگاند بر پایه QD برای به حداقل رساندن ضخامت مورد استفاده قرار گرفته است، هرچند که QD های پوشش داده شده با پلیمر و پلیمر-پروتئین نیز با موفقیت در روش FRET و BRET مورد استفاده قرار گرفته است.

QD ها با مولکول های آلی و ماکرومولکول ها برای ارائه حلالیت آبی و فرصت هایی برای بیوکانجوگه شدن پوشش داده می شوند. این پوشش ها را می توان به طور گسترده ای بر پایه لیگاند و یا بر پایه پلیمر و خنثی یا باردار طبقه بندی کرد. برخی از این استراتژی های کلی در شکل 1 نشان داده شده است. پوشش های لیگاند شامل مولکول های کوچک است که مستقیما به سطح غیر معدنی QD متصل می شوند. متداول ترین لیگاندهای تک دندانه (مانند مرکاپتو پروپیونیک اسید، MPA) یا دو دندانه (مانند دی هیدرولیپوفیلیک اسید، DHLA)، تیول ها با گروه های کربوکسیلات انتهایی بوده اند. این لیگاندها فشرده، باردار و دارای ثبات کلوئیدی هستند که توسط دفع الکترواستاتیکی نگهداری می شود. تجمع اغلب باعث پایین آمدن pH و یا محلولهایی با قدرت یونی بالا می شود، که اخیرا در ماتریس های بیولوژیکی خاص و ویژگی های پیشین لیزوزوم های سلولی متداول است. لیگاندهای ختم شده به تیول های زویتریون مانند پنیسیل آمین یا سیستئین می توانند پایداری را در طیفی از مقادیر pH بهبود دهند. علاوه بر این، آرایه های متنوعی از لیگاند های الحاق شده به پلی اتیلن گلیکول (PEG) برای پوشش QD ها استفاده شده اند. این لیگاندها برای حلالیت به بار بستگی ندارد و پایداری کلوئیدی بالاتری را در محدوده وسیعی از pH و قدرت یونی، اتصال غیر اختصاصی پایین و سازگاری زیستی به همراه می آورد. همچنین لیگاندهای دی تیو کربامات مشابه با تیول ها به سطح QD متصل می شوند اما استفاده از آنها محدودتر شده است.

پوشش های پلیمری به طور سنتی پایه پلیمرهای آمفیفیلی دارند، که در آن سوار شدن بر روی QD بوسیله برهمکنش های هیدروفوبی زنجیره های آویزان آلکیل با لیگاند های محلی QD (به عنوان مثال TOPO از سنتز) هدایت می شود. با این حال، به تازگی یک پوشش پلیمری با گروه های آویزان ایمیدازول ساخته شده است که به طور مستقیم به سطح QD کئوردینه شده ولیگاندهای اصلی را (تا حداقل حدی) جایگزین می کند. با مصرف اندازه هیدرودینامیکی و ضخامت پوشش بزرگتر، پوشش های پلیمری اغلب QD های روشن تری را نسبت به پوشش های لیگاند دارند.

sina-pub.ir

گروه های کربوکسیل، گروه های آمین، گروه های PEG یا ترکیبی از آنها به عنوان جزء هیدروفیلی پلیمرهای آمفیفیل استفاده می شوند. QD های پوشانده شده با پلیمر دارای گروههای آمین، کربوکسیل یا اصلاحات Streptavidin (SA) در دسترس هستند. که به خصوص آخری به دلیل سهولت در بیوکانجوگیشن، محبوب است.

2.2. بیو کانجوگیشن

آماده سازی بیو کانجوگه های QD برای توسعه سنجشگر ها، بیو پروب ها و بیوسنسورها ضروری است. شکل 1 چند استراتژی متداول را نشان می دهد. آنزیم ها، آنتی بادی ها، پروتئین های متصل به مولکول های کوچک و الیگونوکلئوتید ها یکی از عوامل شناخته شده ی بیوکانجوگیشن هستند که می توانند به QD متصل شوند. به عنوان مثال، کاهش پل های دی سولفید آنتی بادی ها مسیر مناسبی را برای گروه های تیول موجود فراهم می کند. اینها و همچنین مانده های سستئین در پروتئین های دیگر (اغلب توسط جهش های ناشی هدایت شده به محل معرفی می شود) می توانند با QD های فعال شده با ملایمید متصل شوند.

همچنین باقی مانده های لیزین پروتئین ها می توانند با QD های فعال شده با کاربو ایمید یا استر سوکسی ایمید استر همراه شوند. الیگونوکلئوتیدهای مصنوعی با اصلاحات تیول و آمین به طور گسترده ای در دسترس هستند و می توانند به طور مشابهی به QD متصل شوند. با وجود بسیاری از کاربردهای موفقیت آمیز، اتصال از طریق اتصال متقاطع دارای نقایص بالقوه است. جهت گیری پروتئین در سطح QD اغلب کنترل نمی شود و اتصال متقاطع نامطلوب پروتئین-پروتئین یا اتصال متقاطع با میانجی QD-QD نیز می تواند رخ دهد. علاوه بر این، واکنش های هیدرولیز در حال رقابت هستند و نیاز به مقدار بیش از حد اتصال دهنده متقاطع دارد که می تواند کنترل ضعیف ظرفیت کانجوگه نمودن (به عنوان مثال تعداد بیومولکول در QD) را به همراه داشته باشد. علاوه بر این، اگر فعالسازی با بار تثبیت شده بر روی QD ها با یک اتصال دهنده متقاطع خنثی کننده با بار بیش از حد امکان پذیر باشد، ممکن است به دلیل از دست دادن گروه های عاملی پایدار، تجمع رخ دهد. علاوه بر این، ترکیبات خاص بافر و مقادیر pH با برخی از عوامل اتصال سازگار نیستند یا ممکن است کارایی دیگران را کاهش دهند. به عنوان مثال، اتصال کربو ایمیدی با بافر های آمین یا حاوی فسفات سازگاری ضعیفی دارند و واکنش پذیری نوری در $pH < 6$ به دست می آید که در آن پایداری

sina-pub.ir

کلوئیدی QD های پوشش داده شده با کربوکسیل بهینه نیست. یک جایگزین برای استراتژی های اتصال متقاطع، خودآرایی بیو کانجوگه های QD است. به عنوان مثال، پروتئین هایی که با برچسب های پلی هیستیدین یا متالوتیونئین اضافه می شوند به طور پیوسته با سطح غیر آلی QD ها کئوردینه می شوند و کانجوگیشن پایدار با ثابت های تفکیک نانومولار را فراهم می کنند. این روش کنترل بهتری نسبت به جهت گیری پروتئین را فراهم می کند و از اتصال نامطلوب پروتئین-پروتئین یا اتصال متقاطع QD-QD جلوگیری می کند و محدودیت های بافر کمتری دارد. روش پلی هستیدین نیز برای تهیه کانجوگه های QD-الیگو نوکلئوتید گسترش یافته است. به همین ترتیب، الیگونوکلئوتیدها با انتهای تیول می توانند کانجوگه های QD-الیگونوکلئوتید خود تجمع را مورد استفاده قرار دهد. QD های پوشش داده شده با لیگاند برای این روش ها بهترین هستند زیرا آنها اجازه دسترسی به سطح غیر آلی QD را می دهند و برخی از قابلیت ها را دارند. دندانپزشکی در آزمایشهایی که از پوشش های لیگاند و بیوکنجوگه ها در تجمع بیوکانجوگیشن استفاده می کند، اهمیت زیادی دارد.

در حالیکه برچسب های پلی هیستیدین برای جمع آوری QD های پوشش داده شده با DHLA، جابه جایی لیگاندهای تیول تک دندانه توسط الیگونوکلئونیدهای اصلاح شده مورد توجه نیست. با این وجود، دمی با لیگاند تیول تک دندانه (مانند MPA) پوشش داده شده با QD ها سازگار است. علاوه بر این، برچسب های پلی هیستیدین نیز با پوشش های کربوکسی-پلیمر سازگار است. اگر چه سطح QD در دسترس نیست، یونهای نیکل (II) می توانند به وسیله کی لیت نمودن متقابل گروههای کربوکسیلات و بخش های هیستیدین به عنوان پل به کار روند. خود تجمعی الکترواستاتیکی نیز با هر دو پوشش های لیگاند و پلیمر سازگار است. از طریق کنترل pH، یا PI محلی یک پروتئین، یا بار همراه با یک برچسب مهندسی شده، می تواند تجمع با یکQD با بار مخالف را هدایت کند. پلیمرهای کاتیونی نیز برای وساطت در قرار گرفتن الیگونوکلئوتید در اطراف QD های با بار منفی استفاده شده اند. با این حال، استراتژی های الکترواستاتیکی توسط وابستگی به PH و توانایی تفکیک در قدرت یونی قوی محدود می شود. به طور کلی، شاید بزرگترین مزیت روشهای خودتجمعی، سطح بالاتر کنترل ظرفیت کانجوگه است. QDها و بیومولکولها می توانند در مقادیر استوکیومتری با هم مخلوط شوند تا ظرفیت مطلوب کانجوگه شدن به دست آید هرچند موضوع به طور متوسط

sina-pub.ir

توزیع پواسون است. برهمکنش اتصالی شناخته شده بیوتین-SA احتمالا متداول ترین روش برای تهیه بیوکانجوگه های QD می باشد.

این شامل: آنتی بادی ها، پپتیدها، پروتئین ها، الیگونوکلئوتید ها، و آپتامر ها است. با در نظر گرفتن یک توزیع نسبتا باریک از سایت های اتصال در سرتاسر جمعیت کانجوگه های QD-SA، این روش همچنین کنترل خوبی از ظرفیت کانجوگه را فراهم می کند. اگر بیوتینیلاسیون در مکان اختصاصی باشد، یک درجه کنترل بر جهت گیری بیوکانجوگه ها همچنین وجود دارد. در دسترس پذیری تجاری کانجوگه های QD-SA و بیو مولکول های بیوتینیل شده (یا کیت های بیوتینیلاسیون)، به محبوبیت این روش کمک می کند. برعکس، لیگاندهای بیوتینیل شده برای QD ها توسعه داده شده و کانجوگیشن با استفاده از پل های آویدین یا با پروتئین های متصل به آویدین تقویت می شود. دیگر استراتژی های کانجوگیشن، مانند روش های انعقاد، همچنان با QD ها توسعه می یابد. این نوآوری لزوما در شیمی نیست بلکه در کاربرد نانوذرات نیز هست.

محققان در این زمینه متوجه شده اند که از توانایی جعبه ابزارهای شیمیایی و بیوشیمیایی بهره برداری کامل نشده است. به طور خاص، توسعه شیمی ساده و کارآمد کانجوگیشن که برای توابع بیولوژیکی (مانند $-NH_2$، -COOH، -SH) متداول است برای تهیه کانجوگه های QD با الیگو نوکلئوتید های مصنوعی یا پپتیدهای نیز بسیار سودمند خواهد بود. علم شیمی همچنین آماده سازی مخلوط کانجوگه را برای نمایش کنترل شده بیش از یک بیومولکول منحصر به فرد تسهیل می کند. این به عنوان مثال، دو توالی متفاوت پپتیدی یا الیگو نوکلئوتیدی یا یک پپتید و یک الیگو نوکلئوتید در ترکیب است. پیشرفت های مداوم در پوشش های QD و بیوکانجوگیشن، پیشرفت های مداوم در توسعه تجزیه و تحلیل های بیولوژیکی مبتنی بر QD را امکان پذیر می سازد.

3. مکانیزم های انتقال

3.1 انتقال انرژی رزونانس فلورسانس

تئوری و کاربرد های FRET در جای دیگر به طور کامل مورد بررسی قرار گرفته و به طور کلی شناخته شده است. این بخش بر جنبه های FRET تأکید دارد که برای QD ها منحصر به فرد یا مهم هستند. کاربردهای انتخاب شده

sina-pub.ir

QD ها و FRET در حس کردن بیولوژیکی نیز ارائه شده است و نمونه های بیشتری در بررسی های قبلی در مورد موضوع یافت می شود. اساس اکثریت توسعه سنجش ها و بیوپروب ها، وابستگی فاصله FRET است. به طور کلی، QD ها به عنوان اهداکنندگان انرژی خدمت می کنند، و زیست مولکول ها با یک پذیرنده رنگ نشان دار می شوند. پدیده های بیوکانجوگیشن در سطح QD ها برای تحریک اتصال یا تفکیک پذیرنده ها یا تغییر فاصله جدایی QD – گیرنده مورد استفاده قرار می گیرند. مدولاسیون حاصل از تولید FRET یک سیگنال تحلیلی را فراهم می کند.

3.1.1 FRET و QD ها

QD ها اهدا کنندگان عالی در FRET هستند و دارای چندین مزیت منحصر به فرد نسبت به اهداکنندگان فلوئورسان ساز های مولکولی می باشند. این آموزنده این مزایا را در زمینه دو نتیجه کلیدی فرمایسم فارستر در نظر می گیرد: رابطه کارایی-فاصله (معادله (1)) و فاصله فورستر (معادله (2)).

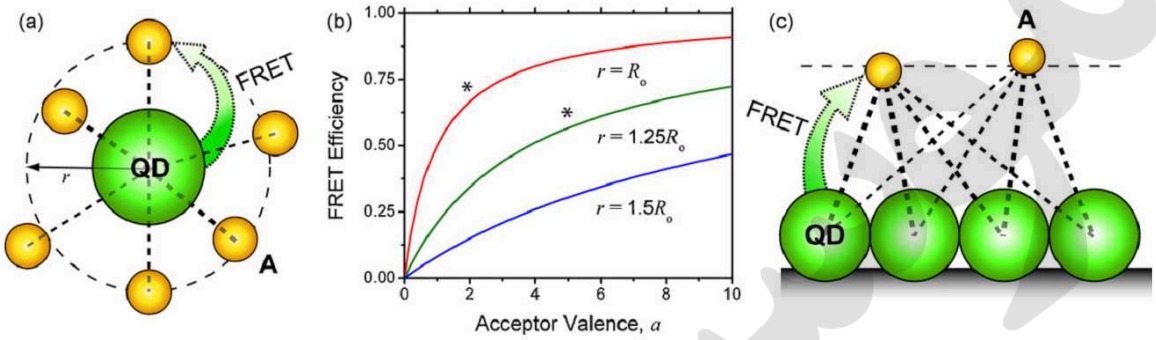
دیده می شود که دهندگان QD مزایای بالقوه ای را در FRET ارائه می دهند. در معادله (1)، E بازده انتقال انرژی، R_o برابر فاصله Förster، r_i فاصله بین اهدا کننده و i امین گیرنده و a تعداد کل گیرندگان است. فاصله فورستر مشخصه ی یک زوج گیرنده –دهنده است و فاصله ای که در آن بازده FRET برابر ٪50 است. در معادله (2) K^2 عامل جهت گیری، Φ_D بازده کوانتومی اهدا کننده، J انتگرال همپوشانی طیفی، n ضریب شکست محیط، N عدد آووگادرو، FD (λ) اهدا کننده فلورسانس، ε (λ) ضریب جذب مولی پذیرنده و λ نشان دهنده طول موج است.

$$E = \frac{\sum_i^a (R_\circ/r_i)^6}{1+\sum_i^a (R_\circ/r_i)^6} \approx \frac{aR_\circ^6}{r^6 + aR_\circ^6} \qquad (1)$$

$$R_\circ^6 = \frac{9(\ln 10)\kappa^2 \Phi_D J}{128\pi^5 n^4 N} = 8.79\times 10^{-28}\ \mathrm{mol}^{-1}\cdot \kappa^2 \Phi_D n^{-4} \frac{\int F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda} \qquad (2)$$

ابتدا، رابطه کارایی-فاصله را در معادله (1) در نظر بگیرید. QD ها از طریق سوار شدن بر سطح QD موقعیت را برای برهمکنش یک اهداکننده تنها با گیرندگان چندبخشی فراهم می کند (مانند بیومولکولهای نشان دار). در چنین سیستمی، اغلب توانایی منحصر به فرد هر گیرنده در فاصله اندکی از اهدا کننده وجود دارد و یا جهت گیری های کمی متفاوت است.

sina-pub.ir



شکل 2. پیکربندی های متفاوت FRET: (a) آرایش تقریبا متقارن مرکزی پذیرنده ها در اطراف اهدا کننده کلوئیدی QD تنها؛

(b) بهره وری FRET در فاصله بین اهداکننده ها-پذیرنده های مختلف، r، به عنوان تابعی از ولتاژ کانجوگه، *a*، جایی که R_o فاصله Förster است؛

(c) برهمکنش چندین دهنده-گیرنده در یک توزیع فاصله با استفاده از یک فیلم بی حرکت QD ها.

با این حال، معمولا از این تفاوت ها صرف نظر می شوند و تقارن کروی فرض می شود، همانطور که در شکل 2a نشان داده شده است. این نتایج نهایی در معادله (1) حاصل می شود که در آن هر گیرنده معادل در نظر گرفته می شود. مزیت کلیدی استفاده از چندین گیرنده این است که FRET بتواند کارآیی بیشتری داشته باشد. علاوه بر این، کنترل ظرفیت گیرنده در اطراف QD، امکان تنظیم کارایی FRET را بدون تغییر دهنده -گیرنده یا فاصله جدایی فراهم می کند. به عنوان مثال، همانطور که در شکل 2b نشان داده شده است، جمع آوری 1، 2، 3، یا 6 گیرنده در اطراف QD در فاصله Förster به ترتیب 50٪، 67٪، 75٪ و 86٪ FRET است. سپس، معادله (2) را در نظر بگیرید، که در آن بازده کوانتومی اهدا کننده بالاست انتگرال همپوشانی طیف اهدا کننده و پذیرنده مهم است. به عنوان مثال، تغییرات 2، 4 یا 10 بار در در نتیجه در فاصله فورستر هر دو مقدار 12٪، 26٪ و 47٪ افزایش می یابد. از آنجا که بازدهی کوانتومی QD ها به طور کلی بالا است، فاصله بزرگ Förster مورد توجه قرار گرفته است. علاوه بر این، سایز قابل تنظیمPL مربوط به QD ها با تنظیم انتگرال همپوشانی طیفی به طور مداوم در یک محدوده از مقادیر می تواند فرصتی برای به حداکثر رسانی فاصله Förster فراهم کند (به استثنای مراحل گسسته با فلوئورسان ساز های مولکولی مختلف).

sina-pub.ir

علاوه بر این، طیف باریک PL مربوط به QD ها اجازه همپوشانی طیفی را بدون نیاز به درجه بالایی از همپوشانی بین طیف های نشری دهنده و گیرنده فلورسنت (به معنی دم قرمز از فلوروفورهای اهداکننده مولکولی) را داده و در نتیجه وضوح بهتر دو سیگنال حاصل می شود. یکی دیگر از مزایای استفاده از طیف گسترده جذب QD ها است. در آزمایش ایده آل FRET، هیچ یک از مولکول های پذیرنده رنگ به طور مستقیم از منبع نور برانگیخته نمی شود. با این حال، در عمل درصد کوچک اما فزاینده گیرنده ها به طور مستقیم با تهییج در طول موج نزدیک به اولین یا دومین حالت انتقالی برانگیخته می شود. از آنجایی که تنها یک رنگ پذیرنده در حالت پایه می تواند در FRET شرکت کند، این بدان معنی است که مقدار موثر a در معادله (1) می تواند کمتر از مقدار اسمی a باشد. تحریک مستقیم پذیرنده ها می تواند با اهداکنندگان QD به حداقل برسد، زیرا تهییج اهدا کننده در محدوده وسیع طول موج کارایی دارد و باعث می شود تا کار در طول موج های دورر تر از پذیرنده انتقالات رنگ آسانتر باشد. ضرایب بالای جذب مولی و تولید بالقوه کوانتمی QD ها، امکان استفاده از تهییج با شدت پایین تر را نیز فراهم می سازد، که موجب حداقل سازی برانگیختگی مستقیم پذیرنده ها می شود و اغلب سرعت های سفید کردن نوری را حداقل می سازد.

در بحث بالا به طور ضمنی فرض شده است که فرمالیسم Förster- برای دو نقطه دو قطبی - برای QD قابل اجرا است. بر اساس محاسبات نظری، آلن و دلر، و Curutchet و همکاران فرمالیسم Förster را تعیین نمودند که برای هدایت کردن نانوبلورهای نیمه هادی با شکاف باند قابل استفاده است. یک نتیجه جالب از مطالعه اخیر تقریب یک مدل دو قطبی خوب حتی در فاصله های تماس بین QD و یک گیرنده است. این با رنگ های مولکولی مغایرت دارد که در آن تقریب نقطه دو قطبی در فاصله های جدایی شبیه به ابعاد مولکولی شکست می خورد. به طور مشابه، روشن نیست که فرمالیسم Förster با توجه به اندازه بزرگ QD ها در مقایسه با مولکول های رنگی معتبر است و اندازه آن با فاصله معمولی جدایی اهداکننده-گیرنده یا 2 تا 6 نانومتر در آزمایشات FRET قابل مقایسه است.

با این حال، چگالی انتقال CdSe QD به طور موثری به عنوان یک بار مثبت و بار منفی در مرکز نانوبلور متمرکز شده و با فاصله 0.7 نانومتر، یعنی دوقطبی، جدا شده است. بنابراین، علیرغم حجم QD که یک کره با قطر چندین نانومتر را اشغال می کند، فاصله های بین گیرنده و دهنده باید از مرکز آن محاسبه شود. به این ترتیب، شعاع QD، حداقل

sina-pub.ir

فاصله مرکز-مرکز را با یک گیرنده به وجود می آورد، که کاربرد فرمالیسم Förster را برای گیرنده های رنگی قرار گرفته در خارج سطح QD تضمین می کند. مطمئنا این گیرنده ها از احتمال فرآیندهای انتقال انرژی با برد کم (مثلا CT) رقابتی با FRET جلوگیری نمی کند.

نتایج بسیاری از مطالعات تجربی مطابق با انتظارات حاصل از تحلیل های نظری است. راندمان FRET با مقدار انتگرال همپوشانی طیفی، تعداد گیرنده های نزدیک مبدا و حداقل جداسازی دهنده –گیرنده اعمال شده توسط QD (به عنوان مثال) به دست می آید. علاوه بر این، راندمان های FRET از هر دو روش حالت پایدار و تابعی از زمان PL به طور کلی توافق خوبی با پیش بینی های حاصل از برآوردهای هندسی و وابستگی با معکوس توان ششم (r^{-6}) فرمالیسم Förster دارد (معادلات (1) و (2)). به عنوان مثال، با استفاده از پلی پپتید سفت و سخت به عنوان یک جداکننده طول متغیر ، Pons و همکاران و Medintz و همکاران توافق عالی بین اثربخشی FRET اندازه گیری شده و پیش بینی شده را به صورت تابعی از تغییرات در جدایی رنگ گیرنده-دهنده QD مشاهده کرده اند. تناظر خوب بین اندازه گیری های انسامبل و فاصله تک جفتی مشتق شده از FRET نشان دهنده کاربرد فرمالیسم Förster است. با این حال، گسترش غیرهمگن طیف QDPL (به عنوان مثال توزیع اندازه نانوکریستال) ویژگی تا حدی منحصر را به QD معرفی می کند. QD های منحصر به فرد همراه با لبه های هیپسوکرومی و باثوکرومی طیف گسترده ای از PL با سرعت های متفاوت انتقال انرژی را به می تواند صورت تابعی از شیب طیف جذبی پذیرنده داشته باشند. این می تواند در طیف گروه به صورت یک تغییر ظاهری در موقعیت پیک PL ظاهر شود. اصلاحات انتگرال همپوشانی طیفی برای رفع ناهماهنگی توسعه داده شد اما محاسبه J در معادله (2) باید در بسیاری از موارد تقریب خوبی باشد و توزیعهای باریکتر اندازه خطا را به حداقل برساند. در اکثریت قریب به اتفاق مطالعات تجربی، مقدار فاکتور جهت گیری به صورت $k^2 = 2/3$ فرض می شود. برای اینکه این فرض کاملا معتبر باشد دوقطبی های انتقال اهداکننده و گیرنده باید یک توزیع ایزوتوپی را در طول زمان عمر حالت برانگیخته اهدا کننده نمونه برداری کند (مثلا چرخش سریع و یک جهت گیری تصادفی نسبت به یکدیگر).

sina-pub.ir

جدول 1 : خلاصه ای از استفاده از QD ها به عنوان اجزای تلفیقی آزمایشات زیستی، بیو پروب ها و یا بیوسنسورها با استفاده از شماره و شماره مرجع.

Biorecognition	Transduction			
	FRET	BRET	CT Quench.	ECL
DNA/RNA hybridization	64, 65, 77, 119–123, 125–131, 208–211, 234–237	149	–	205
Aptamer–protein/peptide complex	66, 108, 112–114, 118	–	177	–
Aptamer-small molecule complex	109, 110, 115, 116	–	–	–
Protein-small molecule binding	60, 95, 238	–	163, 174–176, 178	–
Immunocomplex	56, 57, 144, 145, 231	–	–	201–204
Protease or nuclease activity	79, 136–143	80, 87	161, 179, 180	–
Enzyme–substrate reaction	–	–	180, 239	197, 200, 207
Small molecule/ion complexes/reactivity	104–106	–	158, 159, 164, 181	193, 196, 198, 206, 207
Macromolecular complexes	132–135	–	–	–

با این حال، QD هایCdSe یک محور تاریک (محور C آنها) را با یک دو قطبی انتقال رو به انحطاط (به عنوان مثال نشر کننده دایره ای) در صفحه اورتوگونال نشان داده است. بنابراین فرضیه ای که $k^2 = 2/3$ به طور دقیق معتبر نیست و مقادیر مختلف k^2 ممکن است به پذیرش های پروکسیمال در موقعیت های مختلف نسبت به محور c اعمال شود. با این وجود خطای معرفی شده توسط این فرض، در اغلب آزمایشها، کوچک است. جهت گیری تقریبا تصادفی دو قطبی انتقال QD، با جهت گیری تصادفی و پویای (معمولا) دوقطبی انتقال گیرنده و همچنین توزیع موقعیت های پذیرنده پروکسیمال در یک گروه، امکان پذیر است که اجازه می دهد $k^2 = 2/3$ اولین تقریب مفید باشد. در حالی که برای QD ها که مزایایی فراوانی را به عنوان دهندگان در FRET ارائه می دهند هشدارهایی وجود دارد. شعاع QD یک مقدار ثابت را به فاصله های اهدا کننده-گیرنده اضافه می کند. بنابراین، تا حد زیادی اندازه QD می تواند انتگرال همپوشانی طیف و راندمان FRET را تنظیم کند و همچنین به علت شعاع QD حداقل فاصله ذاتی اهدا کننده- پذیرنده وجود دارد. اشتقاق QD ها از پوشش ها نیاز به فاصله بیشتری دارد. متاسفانه، پوشش های ضخیم تر که برای FRET نامطلوب هستند معمولا با بازده کوانتومی QD بالاتر همراه هستندکه برای FRET و بالعکس مناسب می باشند. به طور کلی نیاز هست که بهترین مصالحه برای هر سیستم منحصر به فرد تعیین شود. در نهایت، علیرغم مزایای آنها به عنوان اهداکنندگان، QD ها در هنگام ترکیب با رنگهای مولکولی به عنوان اهدا کنندگان در FRET، پذیرندگان ضعیف هستند. در حالی که جذب وسیع آنها می تواند منجر به یک انتگرال بسیار بزرگ همپوشانی

sina-pub.ir

طیفی شود، همچنین منجر به تحریک مستقیم بسیار موثر و اجتناب ناپذیر بدون در نظر گرفتن طول موج تحریک می شود.

این با ناسازگاری معمولی بین QD ها (اغلب بیشتر از 10 نانوثانیه) و اهدا کنندگان رنگ (معمولا کمتر از 10 نانوثانیه) همراه است.

به عنوان یک نتیجه، QD ها به ندرت در حالت پایه قرار دارند در حالی که یک رنگ در یک حالت برانگیخته قرار دارد و در نتیجه تعداد پذیرندگان قابل دسترس برای QD ناچیز است. با این وجود، استفاده از QD ها به عنوان گیرنده با استفاده از QD های دیگر به عنوان اهدا کننده و استفاده از اهدا کنندگان لانتانیدی نشان داده شده است. در این سیستم ها، طول عمر اهداکننده قابل مقایسه یا طولانی تر از طول عمر گیرنده QD است. در این مورد با عمر طولانی (~ms) اهداکنندگان لانتانیدی، زمانی معین برای جداسازی QD PL حساس شده به FRET از PL با عمر کوتاه از تهییج مستقیم به کار گرفته شده است. این روش برای توسعه ایمنی سنجی مورد استفاده قرار گرفته است. ما پیش بینی می کنیم که اهدا کنندگان لانتانیدی با آپکانورژن کارآمد فلوئورسانس می توانند بر نیاز به زمان بندی غلبه کند و اندازه گیری های حالت پایدار را با حداقل تحرک مستقیم QD ها مجاز می کند. همانطور که در بخش 3.2 توضیح داده شده است، QD ها همچنین در آزمایشات BRET پذیرفته شده که در آن اهدا کنندگان به صورت نوری برانگیخته نمی شوند.

3.1.2 کاربردها

آزمایشات بیولوژیکی و بیوپروب هایی که از QD ها به عنوان اهدا کنندگان در FRET استفاده می کنند از پیشرفته ترین و وسیع ترین روش ها برای تلفیق QD ها در تجزیه و تحلیل های زیستی هستند. این بخش مثالهای انتخاب شده از تشخیص مولکول های کوچک، استفاده از آپتامر ها به عنوان پروب های متمایل، آزمایش های هیبریداسیون، تشخیص نوکلئاز و پروتئاز و ایمنی سنجی است. یک لیست طبقه بندی شده از مراجع ذکر شده در جدول 1 آمده است. نمونه هایی از طرح های حساس در شکل 3 نشان داده شده است و فرمت های عمومی ترارسانی در شکل 4 نشان داده شده است. نماد QD_w برای نشان دادن موقعیت QD PL در w نانومتر به کار گرفته می شود. علاوه بر

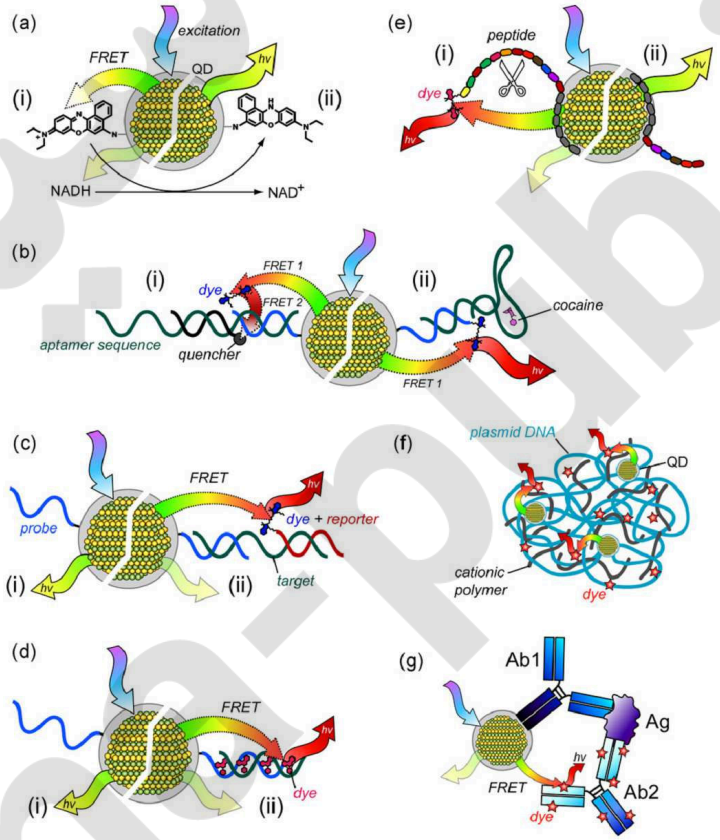
sina-pub.ir

این، خواننده باید فرض کند که ماده QD CdSe/ZnS است مگر اینکه خلاف آن ذکر شود. بازبینی سنجش زیستی با استفاده از QD ها و FRET بدون اشاره به سهم های اولیه در زمینه ای که توسط تیم تحقیقاتی Medintz و Mattoussi ساخته شده کامل نیست. یکی از تحقیقات آنها بر استفاده از کانجوگه نشان دار شده پروتئین- QD متمرکز شده است تا خصوصیات طیفی بنیادین QD ها را به عنوان اهداکنندگان یا دهندگان در FRET را مورد بررسی قرار دهد. بسیاری از این مطالعات در بخش 3.1.1 ذکر شده است. یکی دیگر از اهداف مهم تحقیق آنها، توسعه QD ها به عنوان اهدا کنندگان در FRET برای سنجش بیولوژیکی بود. کانجوگه های خود جمع آوری شده QD-مالتوز متصل به پروتئین که در آن مالتوز آنالیت هدف بود مبنایی برای توسعه چندین استراتژی انتقال بر مبنای FRET را فراهم کرد. خواننده به بسیاری از بررسی های دیگر برای خلاصه های این نقش های مهم علاقه مند است و برخی از مراجع اصلی در جدول 1 ذکر شده است. بیوپروب گلوکز که توسط Tangو همکاران از QD_{530} CdTe اصلاح شده با کانکاوالین A (ConA) و نانوذرات طلا (Au NPs) اصلاح شده با بتا-سیکلوکودکسترین (β-CD) استفاده می کنند. در غیاب گلوکز، ConA ، β-CD محدود می شوند و نزدیکی ایجاد شده بین QD ها و نانوذرات طلا موجب فروکش فلورسنت می شود. اضافه شدن گلوکز منجر به رقابت برای سایت های اتصال ConA گردید که در آن برخی از β-CD جابجا شده بودند. از دست رفتن نزدیکی بین QD و نانوذرات طلا، شدت QD PL را تا درجه ای که با غلظت گلوکز متناسب بود، بازگرداند. حد تشخیص (LOD) برای این روش 50 نانومتر بود و عملکرد بیو پروب در سرم انسان حفظ کرد. استراتژی اتصال رقابتی مشابه آنی بود که در کارهای اصلی توسط Medintz و همکاران برای تشخیص مالتوز با استفاده از کانجوگه های QD-MBP و FRET استفاده شده است. Freeman و همکاران با استفاده از QD های پوشش داده شده با لیگاندهای اسید بورانیک، یک روش را برای تشخیص مونوساکاریدها یا دوپامین توسعه دادند. این لیگاندها به همراه گلوکز، گالاکتوز و دوپامین تشکیل می شوند. آزمون اتصال پذیری رقابتی با استفاده از گالاکتوز یا دوپامین با برچسب Atto-590 توسعه داده شد. آنالیت هدف گیری شده غیر نشاندار در نمونه برای سایت های اتصال با آنالیت نشاندار رقابت می کند. نسبت نشر QD_{570} به Atto-590 سیگنال تجزیه ای را فراهم کرد و با افزایش گلوکز، گالاکتوز یا دوپامین در نمونه کاهش یافت. LOD های مربوطه به ترتیب 1، 50

sina-pub.ir

و 100 میکرومتر بودند. با این حال، گزینش پذیری این تست ها با توجه به پاسخ بالقوه به هر گونه anycisdiol در یک نمونه ضعیف بود.

همان گروه تحقیقاتی همچنین یک پروب QD-FRET را برای بررسی متابولیسم درون سلولی ایجاد کردند. CdSe/CdS/ZnS چند لایه QD_{635} عامل دار شده با رنگ نیل آبی به عنوان یک خنثی کننده تیره استفاده شد. لایه پروتئینی بین رنگ و QD برای جلوگیری از خنثی شدن CT در اولویت FRET ضروری بود. متابولیسم ترارسانی (شکل 3a) بر کاهش Nile آبی توسط نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NADH) متکی بود در نتیجه کاهش آن، جذب Nile آبی تغییر کرد و همپوشانی طیفی با اهدا کننده QD از بین رفت و از کارایی FRET و بازگردانی QD PL جلوگیری شد (شکل 4a,ii).



شکل 3(a) یک آزمایش مبتنی بر FRET برای بررسی فعالیت آنزیم هایی که به کوفاکتور NAD^+ بستگی دارد. در (i) رنگ نیل آبی دارای همپوشانی طیفی با QD است و FRET رخ می دهد. در (ii) شکل کاهش یافته ی نیل آبی (NADH به عنوان عامل کاهش دهنده) همپوشانی طیفی با QD ندارد و FRET خاموش می شود، QD PL

sina-pub.ir

بازسازی می شود. (ب) یک پروب مبتنی بر آپتامر سه جزئی برای تشخیص کوکائین. در (i) FRET دو مرحله ای از QD تا یک پذیرنده رنگ فلورسنت و سپس به یک کوئنچر تیره اتفاق می افتد. این برچسب ها در الیگونوکلئوتید با توالی آپتامر جفت می شوند.

(ii) هنگامی که آپتامر به کوکائین متصل می شود، الیگونوکلئوتیدهای نشان دار شده با یک کوئنچر تاریک جایگزین می شود و مرحله ی تکی FRET را بازیابی می کند. پذیرنده رنگ PL حساس به FRET بازسازی می شود. (c) یک شکل ساندویچی برای آزمایش هیبریداسیون اسید نوکلئیک. هیبریداسیون هدف نشان دار نشده با (i) یک پروب الیگونوکلئوتید و (ii) یک الیگونوکلئوتید گزارشگر نشان دار شده با پذیرنده رنگ، نزدیکی برای FRET را فراهم می کند، QD PL را خاموش می کند.

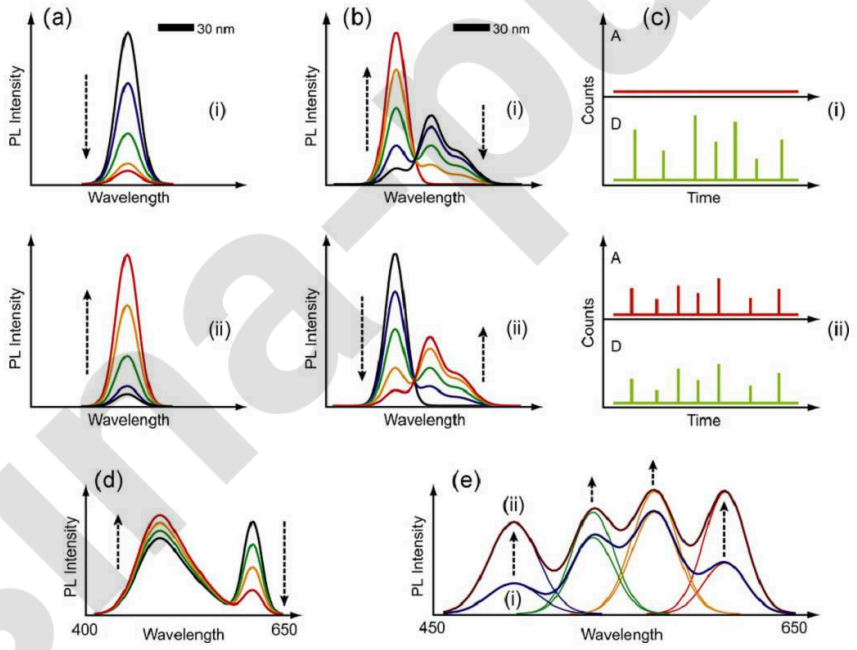
(d) یک آزمایش هیبریداسیون اسید نوکلئیک با استفاده از یک رنگ تقویت کننده به عنوان یک گیرنده. ترکیبی از هدف غیر نشان دار (i) یک پروب الیگونوکلئوتید باعث ایجاد ((ii) DNA دو رشته ای می شود که با آن رنگ درج شده اتصال می یابد این امر نزدیکی برای FRET را فراهم می کند و QD PL را خاموش می کند.

(e) یک آزمایش پروتئاز که در آن (i) یک پپتید نشان دار شده با رنگ پذیرنده روی یک دهنده QD از طریق برچسب پلی هیستیدین گرد آمده است. نزدیکی رنگ-QD در این بیوکانجوگه برای FRET کافی است. (ii) فعالیت پروتئاز (قیچی) پپتید را می شکافد و FRET را کوئنچ می کند و QD PL را احیا می کند. (f) مجموعه چند بخشی حاوی پلیمری کاتیونی نشان دار شده با رنگ و DNA پلاسمید نشان دار شده با QD. نزدیکی چند بخشی برای FRET کافی است. باز کردن DNA این نزدیکی را حذف می کند و FRET را کوئنچ می کند (نشان داده نشده). (g) یک ایمنی سنجی ساندویچی با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال نشان دار شده با QD و آنتی بادی پلی کلونال نشان دار شده با پذیرنده رنگ. نزدیکی پذیرنده-اهداکننده در ایمونوکمبخشی برای FRET کافی است.

برای نشان دادن توانایی برای نظارت بر فعالیت هر آنزیم های وابسته به $NAD^+/NADH$، فعالیت الکل دهیدروژناز در درون بدن اندازه گیری شد. سپس کانجوگه های آبی QD-Nile توسط عملکرد الکترونی به سلولهای سرطانی متصل شدند و برای نظارت بر تغییرات متابولیسم از طریق معرفی D-glucose و Taxol مورد استفاده قرار گرفتند.

sina-pub.ir

افزایش در QD PL نشان دهنده افزایش متابولیسم در مورد قبلی است؛ کاهش QD PL نشان دهنده کاهش سوخت و ساز بدن در مورد دوم است. Snee و همکاران از مفهوم تعویض جذب رنگ گیرنده در داخل و خارج رزونانس با نشر QD برای اندازه گیری pH استفاده می شود. استفاده از آپتامرها در تجزیه و تحلیل به رشد خود ادامه داده است و این مقاله شامل گزارشاتی از کانجوگه های QD-آپتامر به عنوان بیوپروب ها می باشد. انتخاب درون آزمایشگاهی، سنتز شیمیایی، وابستگی های بالای اتصال، استحکام و خواص تعویض- کنفورماسیون آپتامرها برای توسعه بیوپروب ها و بیوسنسورها بسیار جذاب است. Levy و همکاران اولین بیوپروب آپتامر-QD را برای سنجش ترومبین مبتنی بر FRET توسعه داد. انتقال بر اساس مکانیزم علامت دهی تعویض ساختار توسط Nutiu و Li معرفی شد، که در آن الیگونوکلئوتید باز جفت شده واتسون-کریک با ترجیح بر اتصال هدف با ساختار ثانویه از آپتامر جایگرین شد. Levy و همکاران نشان دادند که بر مبنای انتقال ترومبین یک الیگونوکلئوتید مکمل نشان دار شده با کوئنچر تاریک کوتاه می تواند با یک کانجوگه آپتامر متصل به QD_{525}–ترومبین (TBA) جایگزین شود، PL ، QD را بازیابی کند و یک سیگنال تحلیل را فراهم نماید. این استراتژی با استفاده از آپتامرهای مختلف توسط تعدادی از گروه های تحقیقاتی دیگر به تصویب رسید. به عنوان مثال، Kim و همکاران کانجوگه های QD_{600}-آپتامر با کوئنچر تاریک را برای تشخیص عامل رشد رشد پلاکت استفاده کردند.



sina-pub.ir

شکل 4 اشکال اولیه داده های تجربی همراه با انتقال از رویدادهای شناخت زیستی با استفاده از QD و انتقال انرژی رزونانس.

(a) انتقال مبتنی بر FRET در سطح مجموعه با استفاده از یک اهدا کننده QD و یک کوئنچر تیره به عنوان یک گیرنده: (i) کوئنچ کردن PL یا (ii) بازیابی PL با افزایش مقدار آنالیت هدف. (b) انتقال مبتنی بر FRET در سطح گروه با استفاده از یک اهدا کننده QD و یک گیرنده فلورسنت: (i) از دست دادن گیرنده PL حساس به FRET یا (ii) تکامل گیرنده PL با حساسیت بالا به FRET با افزایش مقدار آنالیت هدف. (c) ترارسانی مبتنی بر FRET با استفاده از اهداکننده QD و گیرنده فلورسنت در سطح مولکول تنها از طریق تجزیه و تحلیل پشت سر هم: (i) هیچ برهمکنش FRET یا (ii) برهمکنش FRET. (d) انتقال مبتنی بر BRET با استفاده از گیرنده QD با کمک دهنده سلنترامید (از فعالیت لوسیفراز). کاهش BRET با افزایش مقدار آنالیت هدف نشان داده شده است.

(e) پیکربندی چندگانه از اهدا کنندگان QD و فروکش کنندگان تیره به عنوان اهدا کنندگان. مقادیر مختلف بازسازی PL برای هر اهداکننده QD بین (i) و (ii) نشان داده می شود. خواننده به یک مرجع برای نشان دادن فرونشانی چندگانه FRET ارجاع داده شد. در قسمت های (a) - (e)، فلش خط چین روند را با افزایش مقدار آنالیت هدف نشان می دهد.

محدوده دینامیکی این بیوپروب از 0.4 تا 1.6 نانومولار است. به همین ترتیب، Chen و همکاران یک جفت FRET QD_{605}-Cy5 با یک آدنوزین تری فسفات (ATP) اتصال آپتامر را مورد استفاده قرار دادند. کاهش نسبت FRET حساس شده به Cy5 PL تا QD PL سیگنال تحلیلی با پاسخ خطی 0.1 تا 1.0 میلی مولار و LOD تا 24 میکرومولار را ارائه داد. به همین ترتیب، Zhang و Johnson الیگونونوکلئوتیدهای نشان دار شده با Cy5 را به عنوان یک گیرنده برای کانجوگه های QD_{605}-کوکائین استفاده کردند. از دست دادن FRET حساس شده به Cy5 PL تا غلظت LOD 0/5 میکرو مولار کوکائین متناسب بود.

با این وجود، به جای اینکه تنها کار با یک پیکربندی "Cy5-off" برای تولید سیگنال تجزیه ای، این محققان پیکربندی "Cy5-on" (شکل 3b) را به وسیله سوار کردن یک سیستم سه جزئی FRET با یک اهدا کننده QD و

sina-pub.ir

هم "Cy5-on" و هم گیرنده های کوئنچر تاریک توسعه دادند. دومین بار QD و Cy5 PL از طریق FRET فرونشانده شد که در آن هر دو فرونشانی QD مستقیم بود و فرونشانی Cy5 حساس به FRET امکان پذیر شد (البته با احتمال های مختلف).

اتصال کوکائین به کوئنچز تاریک که به صورت سیگنال تحلیلی Cy5 PL حساس به FRET جایگزین شد. مطالعه فوق توسط ژانگ و جانسون نیز به علت ابزار دقیق مرتبط با روش شناخته شده است: تشخیص مولکولی تنها (SMD) و استفاده از جریان مویرگی. در مقایسه با اندازه گیری های مجموعه، کارایی پایین و بالای FRET می تواند در آزمایشات FRET با جفت تنها از طریق SMD و تجزیه و تحلیل شمارش پشت سر هم حل شوند (شکل 4c). علاوه بر این، این نویسندگان دریافتند که کارایی FRET با تغییر شکل اسیدهای نوکلئیک در یک محلول جریان در داخل ستون میکرومویرگی افزایش می یابد. بنابراین، ترکیبی از جریان مویرگی و طیف سنجی مولکول تنها، امکان تشخیص با حساسیت بیشتر را فراهم می آورد. این می تواند برخی از محدودیت های هندسی را در طراحی کانجوگه های- QD برای بیوپروب ها بر پایهFRET را از بین ببرد و LOD ها را بهبود بخشد. Zhang و Johnson همچنین یک تست مدل را برای اندازه گیری برهمکنش بین ویروس نقص ایمنی بدن (HIV) و پروتئین تنظیم کننده Rev و ev و عنصر واکنش دهنده Rev (RRE) درون envgene ژنوم HIV-1 RNA توسعه دادند. مدل در آزمایشگاه شامل یک توالی پپتیدی نشان دار شده با Cy5 بود که از پروتئین Rev مشتق شده است و توالی ریبونوکلئوتید IIB حلقه بنیادی بیوتینیل شده RRE بر روی QD_{605} پوشش داده شده با استروپتاویدین سوار شد. این توالی های پپتیدی و ریبونوکلئوتیدی مسئول ساختار ثانویه ناشی از برهمکنش اتصالی بین بیومولکولهای محلی می باشد. Cy5 PL حساس شده به FRET یک سیگنال تحلیلی متناسب با اتصال پپتیدی به Rev را فراهم نمود و اندازه گیری ثابت های تفکیک از جمله مهار پیوند Rev-RRE با پروفلاوین یا نئومیسین B را فعال می کند. اندازه گیری از طریق یک FRET تک جفتی، امکان تفیکیک فرآیند QD-Cy5 FRET را در برابر پس زمینه بزرگ فلورسانس پروفلاوین را بدون دکانوولیشن طیفی که در اندازه گیری های گروه ضروری بود، امکان پذیر می سازد.

sina-pub.ir

تجزیه اسید نوکلئیک دوبخشی نشان دار شده با گیرنده بر پدیده های اتصال آپتامر، تنها استراتژی برای ترارسانی مبتنی بر FRET نیست. محققان تعدادی دیگر از استراتژی های مبتنی بر آپتامر را برای تعویض FRET بین حالت های "on" و "off" از طریق تجمع یا تفکیک و بدون نشان دار کردن ملکول کوچک یا هدف گیری پروتئین توسعه داده اند. به عنوان مثال، Cheng و همکاران یک پروب آپتامتری QD-FRET را برای تشخیص موسین 1-پلیکوپروتئین در سطح یک سلول اپی تلیال توسعه دادند که برای تشخیص زودهنگام چندین سرطان مفید است. طراحی پروب شامل یک الیگو نوکلئوتید گزارشگر نشان دار شده با QD530، یک الیگونوکلئوتید نشان دار شده با کوئنچر تاریک و توالی سوم از یک الیگونوکلئوتید همراه با یک منطقه آپتامری است که به موسین 1 متصل می شود. ترابری بر مبنای تغییر در ساختار ثانویه به علت اتصال موسین 1 آپتامر می باشد. این اجازه داد تا الیگونوکلئوتید گزارشگر برای هیبریداسیون با یک بخش از توالی آپتامر مجاور منطقه ای که الیگونوکلئوتید با کوئنچر نشان دار شده توسط QD نشان دار شود. نزدیکی حاصل فرونشانی QD PL مبتنی بر FRET را باعث شد تا تشخیص بصری غلظت های مربوطه موسیون 1 و از 250 نانومولار تا 10 میکرومولار از طریق اسپکتروفتومتری انجام شود. به همین ترتیب Freeman و همکاران یک استراتژی مبتنی بر تجمع چندین رشته اسید نوکلئیک را برای تشخیص کوکائین با استفاده از مجمع سوپرمولکولی آپتامر پذیرفتند. آپتامر از دو الیگونوکلئوتید تشکیل شده بود که همراه با تشکیل جک اتصال در حضور کوکائین است. اگر چه این ساختار توسط جفت شدن پایه واتسون-کریک پایدار شده بود، مکمل برای اتصال دو الیگونوکلئوتید در غیاب کوکائین کافی نبود. یک الیگونوکلئوتید با QD_{570} و دیگری با رنگ Atto-590 نشان دار گردید. در حضور کوکائین، مجمع سوپر مولکولی در نزدیکی FRET را فراهم کرد. کاهش در QD PL به عنوان سیگنال تحلیلی و LOD برای کوکائین 1 μM بود. Liu و همکاران با استفاده از آپتامرها به عنوان اتصال دهندگان متقاطع بین نانوذرات طلا و QD یک روش تجمعی/ پراکندگی را برای تشخیص کوکائین و آدنوزین توسعه دادند. نانوذرات طلا و QD با یک پروب الیگونوکلئوتید که به بخش های مختلف توالی آپتامر متصل می شود، کانجوگه می شوند. مجموعه حاصل و نزدیکی بین QD ها و نانو ذرات طلا منجر به فروکش موثر QD PL و همچنین

sina-pub.ir

جابه جایی در رزونانس پلاسمون نانو ذرات طلا شد. آنالیت هدف بعدی وارد شده و اتصال با آپتامر، جفت باز واتسون و کریک بین آپتامر و الیگونوکلئوتیدها را شکست.

توده پراکنده شد، رزونانس پلاسمون QD PL و نانو ذرات طلا را احیا کرد. هر دو تغییر در خواص نوری برای تشخیص استفاده شد. کار بعدی مشابه کارهای Elghanian و همکاران بود. با این حال، مزیت استفاده از QD ها رنگ های نشری مختلف است که می تواند با اتصالات مختلف آپتامر مرتبط باشد. سوار کردن مجموعه های مختلف و مستقل QD-آپتامر-نانوذرات طلا توسط "برنامه ریزی شیمیایی" از جفت گیری پایه واتسون-کریک تسهیل شد. تشخیص چندتایی آدنوزین و کوکائین با استفاده از QD_{525} و QD_{585} به ترتیب در مجموعه های نانو ذرات طلا که به وسیله آپتامرهای متناظر انجام شده را نشان می دهد. LOD ها برای کوکائین و آدنوزین 120 و 50 میکرومولار بودند. اگر چه بیشترین پروب های زیستی استفاده شده تا به امروز برای تشخیص درون بدن QD-FRET بوده اند کاربردهای داخل سلولی آن به اثبات رسیده است. علاوه بر کار Freeman و دیگران با Nile آبی، Bagalkot و همکاران بیوپروبی را توسعه دادند که قادر به هدف قرار دادن سلول های سرطانی و علامت دهی تحویل سیگنال دارو می باشد. QD490 توسط پروتئاز با غشاء اختصاصی آنتی ژن متصل به آپتامر اصلاح گردید. انکوباسیون بعدی با کانجوگه های دوکسوروبین QD -آپتامر- دوکسوروبیسین از طریق تداخل دوکسوروبیسین در آپتامر به دست اورد. انتقال کارآمد انرژی از QD ها به دوکسوروبیسین به طور عمده QD PL را فروکش داد. به نوبه خود، نشر دکسوربین به دلیل تعلیق با آپتامر فروکش می شد. نتیجه یک بیوپروب تاریک بود که به طور انتخابی پروتئاز سلولهای سرطانی پروستات را هدف گیری می کرد و از طریق آندوسیتوز جذب می شد. QD PL بعد از 1.5 ساعت به دلیل انتشار دوکسوروبیسین درون سلول ها (احتمالا با تجزیه زیستی) بازسازی شد. سمیت سلولی دکسوروبیسین نسبت به سلولهای سرطانی پروستات به واسطه تحویل آن به صورت یک مجموعه QD –دکسوربین تحت تأثیر قرار نگرفت. در مقابل، سمیت سلولی نسبت به سلول های سالم کاهش قابل ملاحظه ای نشان داد که نشان دهنده کارایی هدف گیری و انتشار است. QD ها به عنوان اهدا کنندگان در beacon های مولکولی (MBs) پذیرفته شدند و مشابه MBs با گزارشگران رنگ فلورسنت بر باز و بسته شدن هرپین برای تعدیل FRET متکی هستند.

sina-pub.ir

مطالعات Kim و همکاران نشان داد که QD-MBs می تواند نسبت های پایین تری از سیگنال نسبت به پس زمینه را نسبت به MB های معمولی داشته باشند، آنها پایداری نوری را بهبود می بخشند و قادر به تشخیص چند شکلی در نوکلئوتید تنها هستند (SNPs). علاوه بر QD همپوشانی طیفی خنثی کننده متوجه شدند که استراتژی اتصال QD-الیگو نوکلئوتید روی نسبت سیگنال به پس زمینهمربوط به QD-MBs تاثیر می گذارد. جالب توجه است، Chen و همکاران متوجه شد که کانجوگه های QD-MB حساسیت بسیار کمتری به تخریب نوکلئاز داخل سلولی دارد. تخریب بالقوه نوکلئاز MBs یا برهمکنش های غیر اختصاصی که منجر به سیگنال های مثبت کاذب می شود در هسته تشخیص داده شد. در مقایسه با MBs معمولی، کانجوگه های QD-MB در سیتوپلاسم حفظ شدند و حداقل سیگنال های کاذب مثبت مشاهده شد. این اجازه اندازه گیری بیان انکوژن در سلول های سرطانی پستان را می دهد. اگر چه مطالعات فوق استفاده از خنثی کنندگان تیره را به عنوان پذیرنده، QD-MBs با گیرنده فلورسنت همچنین نشان داده شده است. علاوه بر MB ها، آزمایشات ترکیبی بر اساس FRET استفاده از هدف گیری مستقیم و غیر مستقیم نشان دار شده با کانجوگه های پروب-QD را توسعه دادند. نشان دار کردن مستقیم شامل اتصال کووالانسی یک رنگ فلورسنت یا خنثی کننده تاریک برای توالی هدف است. نشان دار کردن غیر مستقیم را می توان از طریق یک آزمایش ساندویچ یا استفاده از رنگ های افزایش دهنده حساس به اسیدهای نوکلئیک دو رشته ای بدست آورد. در تحقیق حاضر، گروه تحقیقاتی Wang استفاده از QD ها را به عنوان اهدا کنندگان در طیف سنجی FRET جفت تنها را برای تجزیه و تحلیل ژنتیک توسعه دادند.

همانطور که در شکل 3c نشان داده شده است، یک فرمت ساندویچ برای جلوگیری از نشان دار کردن مستقیم هدف استفاده شده است. کانجوگه پروب QD_{605}–الیگونوکلئوتید و الیگونوکلئوتیدهای گزارشگر نشان دار شده با Cy5 را برای ترکیب کردن با مناطق مجاور تولی هدف طراحی نمودند. فلورسانس Cy5 حساس شده به FRET به عنوان سیگنال تحلیلی مورد استفاده قرار گرفت. 4.8 fmlod 100 برابر بهتر از MBs مبتنی بر رنگ بود و استفاده از بیوپروب نیز در آزمایش انعقاد الیگونوکلئوتید برای تشخیص جهش های نقطه ای در نمونه های بالینی نشان داده شده است. این گروه بعدها از بیوکانجوگه های پروب QD و FRET به عنوان یک استراتژی تشخیص کمی برای

sina-pub.ir

واکنش متیل دار کردن زنجیره ای پلیمراز (MSP) استفاده کردند. در این مورد، آغازگرهای نشان دار شده با Cy5 برای تولید مستقیم هدف های نشان دار شده با MSP مورد استفاده قرار گرفت. در مقایسه با روش های متداول تجزیه و تحلیل، تشخیص بیوپروب QD-FRET تنها تک مرحله ای بود و فقط هشت دوره ای از MSP مورد نیاز بود (به ترتیب 40 سیکل). تشخیص همزمان دو توالی متیله با استفاده از جفتهای QD_{585}-Alexa Fluor 594 و QD_{585}-Cy5FRET امکان پذیر شد، که در آن هر رنگ پذیرنده با توالی های مختلف پروب و آغازگر همراه بود. گروه ما در ابتدا به بررسی آزمایشات ترکیبی چندگانه با استفاده از جفت های FRET با QD_{526}-Cy3 و QD_{606}-Alexa Fluor 647 (A674) پرداخت. الیگونوکلئوتیدهای هدف به طور مستقیم با رنگ های پذیرنده نشان دار شد و پروب های مختلف با هر اهدا کننده QD همراه بود. هیبریداسیون، نزدیکی مورد نیاز را برای FRET تولید کرد و نسبت های نشر اهداکننده-گیرنده برای هر جفت FRET به عنوان سیگنال های تجزیه ای مورد استفاده قرار گرفت. LOD های مربوطه 40 و 12 نانومولار بودند.

این استراتژی فرصتی برای تشخیص همزمان دو توالی هدف در یک گروه با استفاده از اسپکتروفتومتری ساده (cf. طیف سنجی تک مولکولی) و بدون استفاده از منابع چندگانه تهییج، ثبت مکانی (از جمله میکرو آرایه) و یا تکنولوژی مرتب کردن را فراهم نمود (به تصویر صفحه مراجعه شود). (آرایه های تعلیق)

علاوه بر این، استفاده از گیرنده های فلورسنت اجازه تجزیه و تحلیل نسبت سنجی را می دهد که نسبت به تغییرات در ترکیب و آماده سازی نمونه ها قوی تر است. ما این استراتژی را به آزمایشات ترکیبی فاز جامد چندگانه توسعه دادیم که به طور بالقوه توانایی تشخیص تا چهار برابر را داشت. این مطالعات در بخش 4 ذکر و شرح داده شده است. چالش در QD های پوشش داده شده با مرکاپتوئیک اسید (MAA) در فاز محلول جذب غیر اختصاصی قوی الیگونوکلئوتیدها در بیوپروب اصلی بود. این منجر به یک سیگنال بالای پس زمینه از توالی های غیر تکمیلی، زمانهای هیبریداسیون طولانی و تغییر در ثبات ترمودینامیکی هیبریدی های هدف پروب شد. با استفاده از اتیدیم برمید (EB) به عنوان یک رنگ پذیرنده توانایی سیگنال های مثبت کاذب از جذب توالی های غیر مکمل پیروز شد. از آنجایی که فلورسانس EB به اسید نوکلئیک دو رشته ای حساس است، جذب به شدت روی سیگنال مشاهده شده تأثیری ندارد.

sina-pub.ir

ناکارآمدی این روش، فلورسانس بالای پس زمینه EB غیر درج شده است که در آن LOD مربوط 80 نانومولار بود. با این حال، این توانایی برای تشخیص هدف حتی در حضور شش برابر الیگونوکلئوتید غیر مکمل اضافی و یا ده برابر DNA اسپرم سالمون اضافی آغاز شد.

یک تست هیبرید سازی که از رنگ های بی لایه ای به عنوان گیرنده ها استفاده می کند در شکل 3d نشان داده شده و داده هایی شبیه به شکل 4b,ii را ارائه می دهد. همچنین Zhou و همکاران استفاده از EB را به عنوان یک پذیرنده رنگ با QD_{553} در یک آزمایش هیبریداسیون پذیرفتند. در این مورد جذب غیر اختصاصی مسئله ای نبود. در عوض، استفاده از EB از نشان دار کردن مستقیم هدف توسط Alexa Fluor 594 جلوگیری کرد. برای جلوگیری از جذب غیراختصاصی، این محققان QD ها را با لیگاندهای فشرده پلی اتیلن گلیکول با کربوکسیل انتهایی پوشش دادند. به طور مشابه Wu و همکاران همچنین در آزمون ترکیبی استفاده از پوشش های QD ختم شده به هیدروکسیل اتصال غیر اختصاصی پایین را گزارش کردند. این محققان از جفت های FRET، QD_{536}-رودامین قرمز (RhR) و QD_{589} –تگزاس قرمز استفاده نمودند اما فقط در آزمون تک بخشی با هدف به طور مستقیم نشان دار شد. LOD ها برای آزمایشات توسط Zhou و همکاران و Wu و همکاران هر دو در محدوده نانومولار بودند. علاوه بر این، Bakalova و همکاران یک آزمایش هیبریداسیون برای غربالگری توالی های بالقوه siRNA علیه mRNA هدف ایجاد کردند. این کار یکی از اولین اقدامات در این زمینه بود. mRNA هدف تقویت شد و با استفاده از نوکلئوتید نشان دار شده با Cy5 (PCR) توسط واکنش زنجیری پلیمراز نشان دار شد. هیبریداسیون با کانجوگه های پروب-QD_{580} یک سیگنال تحلیلی از طریق FRET ارائه داد. این مطالعه نشان داد که دسترسی به حس شدن mRNA توسط پروب کانجوگه QD غیر حساس به siRNA برای بازدهی هیبریداسیون مهم است.

بهینه سازی طول اتصال دهنده لازم بود زیرا اندازه QD مانع از هیبریداسیون mRNA در اتصال دهندگان با طول کوتاه می شود. به تازگی، چندین گزارش از ترکیبات کانجوگه QD- الیگو نوکلئوتید تهیه شده از طریق برهمکنش های الکترواستاتیک وجود دارد. به عنوان مثال، Peng و همکاران از پلی (دی آلیل دی متیل آمونیوم کلرید) (PDDA) برای وساطت در سر هم بندی پروب الیگو نوکلئوتید نشان دار شده با Cy3 روی $CdTe\ QD_{497}$ پوشش

sina-pub.ir

داده شده با MAA استفاده نمودند. به عنوان یک جایگزین برای یک پلیمر کاتیونی، Lee و همکاران QD530 اصلاح شده را با مخلوطی از لیگاندهای کاتیونی و خنثی PEG برای وساطت در سرهم بندی کربوکسی تترام-اتیل رودامین (TAMRA) نشان دار شده با الیگونوکلئوتید اصلاح نمودند. این امر به افزایش استحکام دوبخشی پروب هدف مربوط بود که در نتیجه افزایش فاصله بین اهدا کننده و گیرنده بود. Jiang و همکاران پلیمر کاتیونی فلورسنت آبی را برای میانجی گری در سرهم بندی دوبخشی ها با پروب نشان دار شده با رنگ روی MAAcoated CdTe QD_{615} استفاده نمودند. پلیمرهای فلورسنت برای افزایش PL در QD در طول موج های تهییج کوتاه تر از 400 نانومتر افزایش داد. در این مورد، اختلاف در قدرت برهمکنش الکترواستاتیک بین اسید نوکلئیک دو و تک رشته ای باعث ایجاد کنتراست بین توالی های هدف و غیر مکمل می شود، که اولین ارائه دهنده نشر رنگ مادون قرمز حساس به FRET بزرگتر است. یکی دیگر از رویکردهای "signal-on" توسعه داده شده توسط Li و همکاران بر جذب DNA روی نانو میله های طلا با بار مثبت، متکی بود. هیبریداسیون پروب های نشان دار QD_{655} با هدف روی نانومیله های طلا می شود که منجر به فروکش PL می گردد. محدودیت در همه این رویکردها پس زمینه قابل توجه از توالی های مکمل نیست. اگر چه چنین پس زمینه ای کمتر از سیگنال های مشاهده شده با هدف مکمل است، نسبت کنتراست به طور کلی کوچک است. به عنوان یک نتیجه، در صورتی که به طور بالقوه یک پس زمینه بزرگ توالی های غیر مکمل وجود داشته باشد این روش ها برای تجزیه و تحلیل نمونه ها مناسب نیستند. شاید در بیشتر تحقیقات ترکیبی مجمع الکترواستاتیکی اسیدهای نوکلئیک و پلیمرهای کاتیونی در توسعه روش های تحویل ژن اهمیت دارد. گروههای تحقیقاتی Wang و Leong روشهای QD-FRET را برای بررسی تراکم DNA ناشی از الکتروستاتیک توسط پلیمرهای کاتیونی توسعه داده اند. این چند بخشی ها یک بردار بالقوه برای ژن درمانی است و به منظور اجتناب از تفکیک زودرس کمبخشی و یا اتصال بیش از حد پایدار که مانع از تحویل موثر می شود، بهینه سازی ضروری است. برای کسب اطلاعات در مورد مجموعه های چند بخشی، DNA پلاسمید بیوتینیله شده و استرپتاویدین پوشش داده شده با QD_{605} کانجوگه شد. به نوبه خود، پلیمرهای کاتیونی با Cy5 نشان دار شدند و منجر به FRET کارآمد در داخل مجموعه های چند بخشی شد. این در شکل 3f نشان داده شده است. این سیستم

sina-pub.ir

برای توصیف چند بخشی هیا شامل کیتوزان، پلی اتیلن ایمین و پلی فسفورامیدات ها استفاده شد. از طریق طیف سنج نوری، میکروسکوپ و SMD امکان مشاهده و تحویل و آمد و شد درون سلولی و همچنین اندازه گیری کمی میزان پراکندگی چند بخشی را مشاهده کرد. این محققان همچنین سینتیک مجموعه چند بخشی را با استفاده از سنسور T-microfluidic مورد بررسی قرار دادند.

سیگنال تجزیه ای، تکمیل یافته Cy5 PL حساس به FRET در حد فاصل بین دو جریان آرام بود که به ترتیب در یک کانال میکروفلوئیدی حاوی DNA پلاسمید نشاندار شده با QD و کیتوزان نشان دار شده با Cy5 قرار داشت. در یک مطالعه دیگر، QD با DNA پلاسیمد نشان دار شده با Cy3 کانجوگه شد و با پلیمر کاتیونی نشان دار شده با Cy5 تجمع کرد. هنگامی که چند بخشی ها دست نخورده بودند مسیر ترارسانی انرژی از QD_{525} به Cy3 به Cy5 بود. به این ترتیب، امکان مطالعه دو مرحله ای با محدود کننده ی سرعت در تحویل ژن وجود داشت: باز کردن چند بخشی DNA، نشان دهنده ی از دست دادن Cy5 PL حساس به FRET و تخریب نوکلئاز بود که نشان دهنده از دست دادن FRET حساسیت Cy3 PL می باشد.

QD-FRET نیز برای توسعه آزمایشات در vitro برای فعالیت نوکلئاز استفاده شده است. اسید نوکلئیک اسید نشان دار شده با اهدا کننده به آسانی طراحی شد که برای تولید FRET با QD ها کانجوگه به طور مجزا پذیرفته شده بود که به QD ها برای تولید FRET متصل شد. فعالیت نوکلئاز کانجوگه را شکافت و از دست رفتن FRET به صورت سیگنال تجریه ای استفاده شد. Gill و همکاران و Suzuki و همکاران این فرمت را برای بررسی فعالیت DNase استفاده نمودند. در مورد دوم، می توان پروب DNase را با پروب دوم برای فعالیت ترپسین ترکیب شد. جفت FRET که با DNAase و تریپسین همراه بود طیفی حل شد و اجازه تشخیص همزمان فعالیت تک مرحله ای نوکلئاز و پروتئاز را ممکن ساخت. پروب QD مبتنی بر FRET برای تشخیص فعالیت پروتئاز در ابتدا توسط Chang و همکاران، Medintz و همکاران و Shi و همکاران در سال 2006 گزارش شده است. از نظر مفهومی، طراحی این پروب ها و جانشینان آنها، مشابه بود. توالی پپتیدها جدا شده بطور انتخابی توسط یک پروتئاز هدف با یک اهداذ کننده نشان دار شد و در اطراف دهنده مرکزی QD جمع شد که منجر به خنثی شدن QD PL حساس به

sina-pub.ir

FRET می شود. فعالیت پروتئین کافت نزدیکی لازم برای QD PL FRET را تخریب کرد و یک سیگنال تحلیلی ارائه داد. پروتئازهای هدف شامل: کاسپاز 1، کاسپاز 3، کیموتریپسین، کلاژناز، ماتریکس متالوپروتئیناز 7، ترومبین و تریپسین. علاوه بر آزمایش های اثبات تا مفهوم برای تشخیص درون آزمایشگاهی و یا فعالیت پروتئاز یا مهار بیوپروب های پروتئاز QD-FRET برای اندازه گیری فعالیت ماتریکس خارج سلولی متالوپروتئاز (کلاژناز) بین سلول های سالم و سرطانی و دستیابی به پتانسیل آنها در کشف دارو برای ارزیابی مهار آنزیم در آزمایش های غربالگری می شود. این آزمایش ها با LOD ها تا 20 pM (3.3 واحد) می تواند کمی باشد. علاوه بر این، تنها حجم های نمونه کوچک (به عنوان مثال 7 میکرو لیتر بر روی یک میکروتراشه) و مقادیر کوچک سوبسترا یا آنزیم برای تجزیه و تحلیل مورد نیاز بود.

علیرغم مفهوم اساسی مشابه، عملکرد تحلیلی مختلف بین طرح های مختلف بیوپروب پروتئاز QD-FRET به طور قابل توجهی متفاوت بود. به عنوان مثال، Chang و همکاران که از پپتید-نانوذره طلا به عنوان یک گیرنده استفاده نمودند، متوسط مجموعه شش پپتیدی- نانوذرات طلا در QD_{620} CdSe/CdS منجر به 71٪ فرونشانی QD PL شد و بعد از 47 ساعت 52٪ آن با پروتئاز انکوبه شدند. تعداد بیشتری از پپتید-نانو ذرات طلا در QD باعث افزایش کارایی رفع خنثی سازی شد اما بازیابی پلی اتیلن مشاهده نشد. این مشاهده و زمان طولانی آزمایش به اندازه نانوذرات طلا (قطر 1/4 نانومتر) مربوط می شود که مزاحم دسترسی پروتئاز به پپتید می گردد. در مقابل، Medintz و همکاران و Shi و همکاران استفاده از Cy3 (QD_{538} اهدا کننده) ، QSX-520 (اهداکننده QD_{522}) یا RhR (QD545 اهدا کننده) پپتیدها را به عنوان یک گیرنده نشان دار کردند و زمان های مورد نیاز آن تنها 10 تا 15 دقیقه است. یک بیوپروب پروتئاز با استفاده از یک پپتیده نشان دار شده با یک رنگ فلورسنت در شکل 3 نشان داده شده است و داده هایی شبیه به شکل 4b,i را تولید می کند. به تازگی، Boeneman و همکاران و Suzuki و همکاران تشخیص پروتئاز QD-FRET را به ترتیب با استفاده از mCherry (اهدا کننده QD_{550}) و پروتئین فلورسنت سبز (اهداکننده QD_{550}) نشان دادند و از طریق پیوند های پپتیدی در اطراف QD ها جمع آوری شدند. زمانهای آزمایش 30-90 دقیقه ای سرعت آهسته آنزیم با دهندگان نانو ذرات طلا را نشان داد که تنها به علت سایز هندسی نیست اما شاید

sina-pub.ir

توسط ترکیبی از اندازه و استحکام حاصل شود. سرعت آهسته پروتئین کافت با گیرنده های نانو ذرات طلا مشاهده شده اهمیت صورت بندی پروب های بیوولکولی کانجوگه شده با QD ها را برجسته می سازد. Medintz و همکاران این را در طراحی بیوپروب پروتئاز آنها به رسمیت شناختند.

برای کمک به اطمینان از توالی شکافت توالی QD-کانجوگه که برای پروتئاز قابل دسترس بود پپتید آنها را با توالی یک آلانین و α-آمینو ایزو بوتیریک اسید که به عنوان یک اتصال دهنده سخت مارپیچ بین توالی بستر و توالی پلی هیستیدین عمل می کند غنی کردند و آن را برای سوار شدن روی QD استفاده نمودند.

در اکثر مطالعات، پروب های پپتیدی تهیه شده اند و اغلب توسط سنتز شیمیایی با یک پذیرنده نشان دار می شود. با این حال، مزیت استفاده از گیرنده های پروتئینی فلورسنت این است که از طریق روش های بیولوژی مولکولی استاندارد، پروتئین ها می توانند در باکتری ها با پپتید بستر و توالی های پلی هیستیدین بیان شوند.

این سازه ها آماده خودتجمعی در QD ها هستند، سازگار با محیط زیست هستند و هیچ مراحل نشان دار کردن گیرنده لازم نیست. یکی دیگر از موارد مهم در طراحی بیوپروب های پروتئاز QD-FRET ظرفیت پذیرنده است. تشخیص پروتئاز بر روی یک فرآیند تفکیکی و فرونشانی QD PL متکی است. در عمل، پذیرنده های چندگانه (به عنوان مثال 2-6) معمولا در QD جمع آوری می شوند که کارایی فرونشانی را با توجه به معادله (1) افزایش دهند. همانطور که در شکل 2b نشان داده شده است، همینطور که ظرفیت پذیرندهa ، افزایش می یابد بهره وری FRET به قسمت مسطح می رسد. از نظر ریاضی، بزرگترین تغییر در بازده FRET بین $a = 0$ و $a = 1$ مشاهده می شود و پس از آن با افزایش گام به گام در a کاهش می یابد. با این حال، تعداد سایت های در دسترس، حد بالای دامنه دینامیکی را در هر آزمون تعیین می کند. یک آزمایش پروتئاز را می توان با شمارش مجموعه ای از کاهش های مجزا در تعداد گیرنده ها در مجموعه ای از اهدا کنندگان QD تصور کرد. بنابراین، ظرفیت جفت کردن اهدا کننده-پپتید می تواند منعکس کننده مصالحه بین میزان حساسیت تشخیص نوری همراه با مقادیر کوچک a و محدوده دینامیکی بزرگتر مرتبط با مقادیر a را نشان دهد. تیم تحقیقاتی Medintz نمودارهای کارایی FRET-ظرفیت گیرنده را به

sina-pub.ir

صورت آزمایشگاهی اندازه گیری کردند و این استراتژی را برای انتخاب یک مقدار از این نمودار قبل از رسیدن به قسمت مسطح همراه با کارایی FRET پذیرفتند.

شده با استفاده از منحنی ولز منفعل بهره وری FRET اندازه گیری شده استراتژی انتخاب ارزش را در نظر گرفته است که بازده FRET مرتبط با آن قبل از فلات، همانطور که توسط ستاره در شکل 2b نشان داده شده است.

ایمنی سنجی همگن با استفاده از QD-FRET توسعه داده شده و سه فرمت مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. Nikiforovو Beechem یک ایمنی سنجی رقابتی را برای اتصال به کورتیزول ایجاد کردند. QD_{605} با 12 تا 15 مولکول کورتیزول در QD تخمین زده شد. ضد کورتیزول با A647 به عنوان یک گیرنده نشان دار شد. حضور کورتیزول در نمونه، تشکیل کمبخشی های QD-کورتیزول / ضد کورتیزول A647 را کاهش داد. کاهش مربوط به FRET به عنوان سیگنال تحلیلی مورد استفاده قرار گرفت. به عنوان یک جایگزین برای آزمون اتصال رقابتی، Wei و همکاران یک تست ساندویچ (شکل g3) را برای گیرنده استروژن β (ER-β) توسعه دادند. برای ایجاد ساختار ساندویچی در حضور ER-β، و ایجاد نزدیکی لازم برای FRET، از anti-ER-β تک بنیایی نشان دار شده با QD_{565} و anti-ER-β چند بنیانی نشان دار شده با Alexa Fluor 568 را مورد استفاده قرار دادند. به طور متوسط هفت مولکول رنگی Alexa Fluor 568 در هر آنتی بادی پلی کلونال وجود داشت. از آنجاییکه اندازه بزرگ ایمونوگلوبولین ها به طور معمول منجر به در جداسازی های بزرگ گیرنده -دهنده می شود، حضور چندین برچسب رنگ بر روی آنتی بادی برای افزایش بهره وری FRET می تواند مهم باشد. داده ها در شکل 4b,ii نشان داده شده است و LOD آزمون ER-β برابر 0.05 nM بود. Stringer و همکاران سومین استراتژی ایمنی سنجی را به کار گرفتند که که تک مولکولی بود و بر تغییرات صورتبندی بر اتصال آنتی ژن متکی بود. آنالیت هدف تروپونین قلب انسان (cTnI)I بود. کانجوگه های QD_{544}-anti-cTnI با استفاده از یک پل پروتئین A تهیه شدند. پروتئین A از طریق خودتجمعی anti-cTnI از جهت گیری مناسب خود در منطقه F_c اطمینان حاصل کرد.

Anti-cTnI با رنگ Alexa Fluor 546 نشان دار شد تا FRET به وجود آید. پس از اتصال cTnI، یک تغییر بزرگ صورت بندی در ضد cTnI، جداسازی اهداکننده QD-گیرنده رنگ را کاهش داد. افزایش مربوطه در

sina-pub.ir

نشر Alexa Fluor 546 حساس به FRET سیگنال تحلیلی را ارائه داد که تشخیص در محدوده 32 تا 500 نانومتر را مقدور می سازد. LOD با پلاسمای خون به عنوان یک ماتریس نمونه تا 55 نانومتر افزایش یافت. لازم به ذکر است که Goldman و همکاران یک ایمنی سنجی به روش اتصال رقابتی را برای یک هدف غیر بیولوژیکی، تر نیترو تولوئن، با استفاده از QD ها به عنوان اهدا کنندگان در FRET، ایجاد کردند.

3.2 انتقال انرژی بیولومینسانس

3.2.1 BRET و QD ها

یک آزمایش معمول FRET از تهییج نوری برای ایجاد یک حالت برانگیخته استفاده می کند که قادر است انرژی را به گیرنده حالت پایه انتقال دهد. در مقابل، انتقال انرژی رزونانس لومینسانس شیمیایی و بیولومینسانس (CRET و BRET به ترتیب) یک حالت برانگیخته از دهنده را از طریق واکنش شیمیایی تولید می کند.

تمایز بین CRET و BRET این است که یک واکنش بیوشیمیایی اساس بعدی است. در هر دو مورد، هنگامی که یک اهدا کننده حالت برانگیخته با یک واکنش شیمیایی تولید می شود، کارایی انتقال انرژی می تواند با استفاده از فرمالیسم متداول FRET مدل بندی شود. مزیت CRET و BRET بیش از FRET حتی در نمونه های پیچیده پس زمینه بسیار کم است. فقدان تهییج نوری، از اتوفلورسانس نمونه، پراکندگی شدید نور منبع و نشر پذیرنده جعلی از تهییج مستقیم جلوگیری می کند. همانطور که در بخش 3.1.1 نشان داده شده است، چالش خاص بعدی با QD ها به علت عدم توانایی در اجتناب از تهییج مستقیم، کارآمد است.

در مقابل، QD ها به علت جذب وسیع آنها گیرندگان ایده آل انرژی هستند که به طور بالقوه انتگرال های بزرگ همپوشانی طیفی بالقوه را موجب می شود و جداسازی طیفی عالی بین نشر اهدا کننده و گیرنده وجود داشته باشد. تهیه کانجوگه های آنزیم-QD اجازه لومینسانس شیمیایی و واکنش های نور افشانی زیستی روی سطح QD مستقر شود و تقریبی برای CRET یا BRET فراهم کند. اگر چه QD ها به عنوان گیرنده های CRET مورد مطالعه قرار گرفته اند، پیشرفت های بیشتری در توسعه بیوپروب با استفاده از QD ها به عنوان پذیرندگان در BRET گزارش

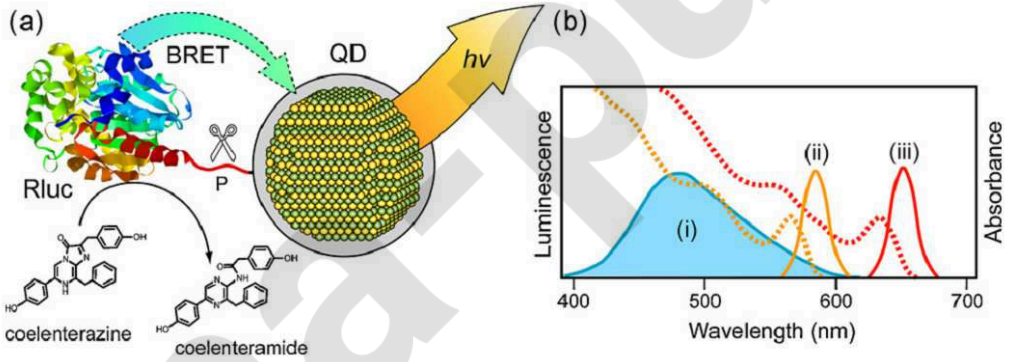
sina-pub.ir

شده است. تا به امروز، لومینسانس زیستی سیستم انتخابی آنزیم رنیلا لوسیفراز (Rluc) و سلنتزازین به عنوان بستر آن بوده است.

بیولومینسانس از تبدیل سلنترازین (لوسیفرین) بوسیله دکربوکسیلاسیون اکسایشی به حالت های برانگیخته کولنترامید تبدیل می شود. سینتیک نشر نور با طول عمر بالا و عدم حساسیت ATP از مزایای سیستم Rluc است. انتشار کولنترامید وسیع است و گسترده های قسمت آبی سبز طیف مرئی در حدود 480-485 نانومتر ماکزیمم است. همانطور که در شکل 5b نشان داده شده است، طیف نشری QD ها با پیک PL در طول موج های طولانی تر از تقریبا 625 نانومتر، به طور کامل از نشر Rluc تفکیک شد و همپوشانی طیفی خوب بین نشر Rluc و جذب QD بدست می آید.

3.2.2 کاربردها

این بخش پیشرفت آزمایشات و بیوپروب های مبتنی بر QD ها را به عنوان گیرندگان در BRET برجسته می کند. اگر چه هنوز به طور گسترده تحت عنوان روش FRET استفاده نمی شود، محبوبیت روش BRET همچنان افزایش می یابد. بررسی اخیر رشد و توسعه لوسیفرازها و پروتئین های بیولومینسنت در برنامه های تحلیلی بدون تاکید خاص بر QD ها را نشان داده است. جدول 1 نمونه هایی ذکر شده در زیر را فهرست و طبقه بندی می کند.



شکل 5

(الف) ساخت QD-BRET برای تشخیص فعالیت پروتئاز. تبدیل سلنترازین به سلنترامید توسط رنیلا لوسیفراز (Rluc) باعث انتقال انرژی به QD می شود، که به عنوان یک گیرنده عمل می کند. " پیکان BRET " از Rluc

sina-pub.ir

نشان دهنده مقاصد است. اهدا کننده در واقع حالت برانگیخته سلنترامید مستقر در Rluc است. Rluc با یک توالی پپتیدی (P) به QD متصل می شود که توسط پروتئاز هدف (قیچی) شکافته می شود. یک کانجوگه یک طرفه برای سادگی نشان داده شده است. فرم کلی داده های تجربی مربوط به این سیستم در شکل 4d نشان داده شده است. (b) همپوشانی طیفی کیفی بین (i) نشر سلنترامید و جذب (ii) زرد یا (iii) QD ها با نشر قرمز (خطوط خط چین). تقریبا طیف نشری کل سلنترامید با جذب QD (منطقه سایه دار آبی) همپوشانی دارد. طیف مربوط به نشر QD ها به صورت خطوط جامد نشان داده شده است.

Cissell و همکاران آزمون اتصال رقابتی را برای شناسایی انتخابی اسیدهای نوکلئیک با استفاده از Rluc به عنوان اهدا کننده BRET برای QD_{710} توسعه دادند. یک پروب مکمل توالی هدف به QD متصل شد. Rluc به یک رقیب با توالی مشابه به عنوان هدف متصل شد. در غیاب هدف، هیبریداسیون بین پروب و رقیب، نزدیکی لازم را برای BRET ایجاد کرد. هدف غیر نشان دار در نمونه همچنین اما بدون ارتباط با BRET با پروب هیبرید شد. پارامتر تحلیلی نسبت نشر اهدا کننده به گیرنده بود و به صورت مقدار افزایش یافته نسبت به رقیب افزایش یافت. LOD ، 20 نانومولار بود و آزمون در عصاره سلولی کاربردی بود. گروه تحقیقاتی Rao به توسعه آنها از QD های خود-منور برای تصویر برداری بیولوژیکی توجه زیادی نموده اند. خود روشن سازی نتیجه BRET بین Rluc و QD ها به صورت بیوکانجوگه ها بود. این گروه همچنین بیوکانجوگه های QD-Rluc را در توسعه بیو پروب ها برای فعالیت پروتئاز گسترش دادند.

در یک مطالعه، برای تهیه ماتریکس متالوپروتئیناز 2 (MMP-2)، یک بستر پپتیدی به پلی هیستیدین ملحق شد، از لحاظ ژنتیکی به C انتهایی یک Rluk جهش یافته متصل شد.

دم پلی هیستیدین امکان اتصال به یک QD_{655} پوشش داده شده با کربوکسیلات را از طریق پل زدن یونهای Ni^{2+} را فراهم کرد، نزدیکی مورد نیاز برای BRET کارآمد را ایجاد کرد (شکل 5a). هیدرولیز بستر پپتیدی توسط MMP-2، نزدیکی را از بین برد و فعالیت پروتئاز از طریق کاهش نسبت نشر QD به Rluc اندازه گیری شد (شکل 4d). , LOD 24 ساعت انکوباسیون، 2 نانو گرم بر میلی لیتر بود. در هنگام آزمایش در برابر پروتئاز های MMP-7 و

sina-pub.ir

AcTEV این آزمایش گزینش پذیری خوبی داشت. در یک مطالعه دوم، برای آماده سازی بیوکانجوگه های QD-Rluc روش متفاوتی استفاده شد. QD_{655} عامل دار شده با هیدرازید به کمک انعقاد شیمیایی به واسطه اینتئین با پروتئین متصل به سوبسترای Rluc-MMP-7 کانجوگه شد. نسبت نشر QD به Rluc وابستگی خطی به غلظت MMP-7 داشت و LOD برای آزمایش 1 ساعته 5 نانوگرم بر میلی لیتر بود. این آزمایش همچنین در سرم انجام شد و بر روی ترشحات سلول سرطانی آزمایش شد. تشخیص چندتایی MMP-2 و فعال کننده پلاسمینوژن اورکیناز با تهیه پروتئین های متصل به Rluk با توالی های پپتیدی مربوطه برای مکانها شکافته امکان پذیر شد. اتصال پروتئین های Rluc به QD_{655} و QD_{705} به ترتیب دو کانال تشخیص مبتنی بر نشر پذیرنده QD حساس به BRET را فراهم کرد. نشر وسیع Rluc نشان می دهد که با اختلاط طیفی، حداکثر ظرفیت چند بخشی کردن آزمون های BRET، 3 تا 4 پذیرنده QD (و پروتئاز مرتبط) خواهد بود.

معایب مطرح کردن همپوشانی بین طیف نشری QD برای به دست آوردن چند بخشیینگ با مرتبه بالاتر این است که به علت عدم قطعیت در تغییرات کوچک در خارج شدن از حالت پیچشی LOD در QD PL افزایش می یابد. با این وجود، QD-BRET برای تشخیص پروتئاز vivo و یا در vivo بسیار امیدوار کننده است.

3.3. رفع انتقال بار

3.3.1 انتقال بار و QD ها

تهییج نوری QD ها موجب تشکیل یک جفت الکترون-حفره به نام اگزیتون می شود. برای تولید PL کارآمد، سرعت بازسازی تابش اگزیتون باید با سرعت فرآیندهای نوترکیب غیر تابشی رقابت کند. یکی از این فرایندهای غیر تابشی، بازسازی Auger است، که در آن انرژی حالت انگیخته که به یک حامل منتقل می شود بیشتر از یک فوتون منتشر شده از دست می رود. با توجه به محصور بودن درون نانوکریستال، یک برهمکنش کولمبیک بسیار قوی بین اگزیتون و حامل "اضافی" وجود دارد. در نتیجه، سرعت بازسازی Auger در QD های یونیزه، مقدار زیادی بزرگتر از نوترکیب تابشی است و PL خاموش می شود.

sina-pub.ir

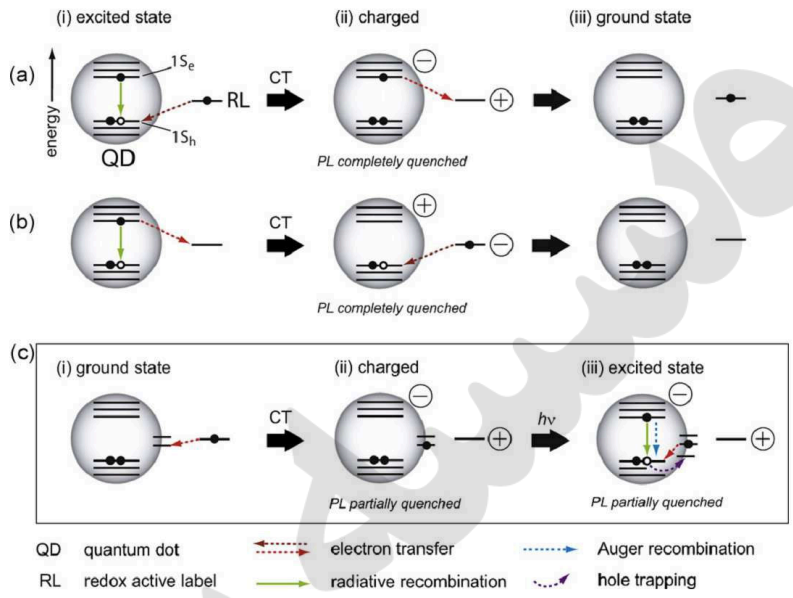
بنابراین، واکنش های CT بین QD ها و دیگر گونه های فعال ردوکس، مکانیسم را برای روشن / خاموش کردن PL فراهم می کند و بنابراین یک اساس برای طراحی بیوپروب ها و بیوسنسورها فراهم می کند.

توسعه اولیه حسگرهای مبتنی بر CT خنک کننده را می توان دهه ها بررسی کرد. در مراجع سنسورهای انتقال الکترون با القای نوری فلورسنت (PET) برای یون ها به طور گسترده ای گزارش شده است. این سنسورها با استفاده از یک معماری فلوئورسان ساز -گیرنده ساخته شده است. انتقال الکترونی گیرنده به درایوهای فلوئورسان ساز PL را توسط تهییج نوری خاموش نگه می دارد. اتصال یون در گیرنده انرژی اربیتال های مولکولی گیرنده را تغییر می دهد و PET دیگر از نظر انرژی مطلوب نیست و درنتیجه PL سیستم بازیابی می شود. بر طبق نظریه، سرعت انتقال الکترون، k_{et}، توسط معادله داده می شود. (3)، که در آن: V_o جفت شدگی الکترونی اهدا کننده- گیرنده در r_o، فاصله واندروالس است؛ r فاصله واقعی است؛ β یک پارامتر است که کاهش در جفت شدگی را با فاصله تعیین می کند؛ λ انرژی تجدید سازمان است؛ و ΔG^o تغییر انرژی آزاد استاندارد برای واکنش CT است.

$$k_{et} = \frac{2V_o^2}{h} \exp\left[-\beta(r - r_o)\right] \left(\frac{\pi^3}{4\lambda RT}\right)^{1/2} \exp\left[-\frac{(\Delta G^o + \lambda)^2}{4\lambda RT}\right] \quad (3)$$

بنابراین، در مورد سنسورهای PET، ترابری با تغییر عبارت انرژی آزاد در معادله (3) به دست می آید. این استراتژی برای سنجش یون با استفاده از مجموعه های اهدا کننده-گیرنده -QD به طور موفقیت آمیزی نشان داده شده است و جزئیات بیشتر در بخش 3.3.2 ارائه شده است. با این حال، انتقال از طریق اصلاح عبارت انرژی آزاد در معادله (3) در هنگام در نظر گرفتن اهداف مورد نظر بیومولکول مناسب نیست. با این حال، از معادله (3) مشاهده می شود که واکنش های CT به فاصله اهدا کننده-پذیرنده وابستگی دارند. در حقیقت، در یک سیستم با فروسن که از طریق افسار آلکیلی با طول های مختلف به QD_{605} متصل می شود بازدهی فرونشانی PL همراه با القای نوری CT با افزایش طول زنجیر آلکیل کاهش یافت.

sina-pub.ir



شکل 6 مکانیسم های بالقوه فرونشانی انتقال بار QD PL.

(a) انتقال حفره با القای نوری از (i) یک حالت برانگیخته QD به یک برچسب ردوکس پروکسیمال منجر به (ii) یک QD یونیزه شده غیر لومینسانس. انتقال الکترون بعدی به برچسب ردوکس می تواند از (iii) حالت خنثی، حالت پایه QD احیا شود.

(b) انتقال الکترونی با القای نوری از (i) یک حالت برانگیخته QD به یک برچسب ردوکس پروکسیمال منجر به (ii) یک QD یونیزه شده غیر لومینسانس می شود. انتقال بعدی حفره به برچسب ردوکس می تواند (iii) یک حالت خنثی، حالت پایه QD را احیا می کند.

مکانیسم های (a) و (b) مسیرهای ریلکسیشن غیر تابشی را فراهم می کنند که با نوترکیب تابشی اگزیتون رقابت می کنند.

با این حال، (a) و (b) تنها حالات هسته QD را در نظر می گیرند. (c) بار همچنین می تواند به طور بالقوه (i) انتقال از حالت پایه QD ها به حالت های سطحی به منظور تولید (ii) یک QD یونیزه شده که در آن PL به طور کامل فرونشانده نشده است.

پس از (iii) تهییج نوری، مسیرهای غیر تابشی که با ترکیب مجدد تابشی اگزیتون رقابت می کنند که به طور بالقوه عبارتند از: نوترکیب اوژه، تله اندازی حفره و انتقال الکترون به حالات هسته.

sina-pub.ir

تغییرات در اهدا کننده-گیرنده برای تعدیل کارایی فرونشانی PL برای انتقال وقایع زیست شناختی به دو روش انجام شده است: (1) تجمع و تفکیک برچسب های فعال ردوکس در سطح QD؛ و (2) تغییرات صورت بندی ناشی از اتصال در بیومولکولهای نشاندار شده با ردوکس. وابستگی شدید فاصله CT به ویژه برای دومی سودمند است و نسبت به تغییرات کوچک در فاصله نسبت به FRET حساسیت بیشتری دارد. در مقایسه با فلوئورسان های مولکولی مورد استفاده در حسگرهای PET، QD ها یک رابط بزرگ برای واکنش های CT فراهم می کنند.

گونه های فعال چندگانه ردوکس می توانند در اطراف QD برای بهبود کارایی CT منظم شوند. در ترکیب با خواص نوری منحصر به فرد آنها، توانایی QD ها به عنوان یک داربست خدمت کرده است و فرصت های جدیدی برای توسعه بیوپروب های نوری و بیوسنسورهای مبتنی بر CT فراهم کرده است. فرآیند واکنشهای CT که شامل QD ها نیستند، در تقریب اول به طور قابل توجهی متفاوت از آن چیزی است که فقط مولکول ها یا یون ها را شامل می شود. اکثر شیمیدانان با در نظر گرفتن واکنش های CT در یک چارچوب اربیتال مولکولی راحت هستند و این نیز یک رویکرد بصری خوب با QD می باشد. ساختار الکترونی QD توسط انتقال وابسته به اندازه باند هدایت توده (CB) و باند ظرفیت (VB) به حالت های گسسته یا "اربیتال های محدود کوانتومی" در ابعاد نانومتری شناسایی می شود. کمترین انرژی تحریک (اولین اوج اگزیتون) مربوط به یک الکترون در حالت $1S_e$ (CB) و حفره در حالت $1S_h$ (VB) است. واکنش های CT با القای نوری با معرفی یک حالت همراه است که در آن انرژی نسبت به حالتهای $1S_h$ و $1S_h$ QD حدواسط است. ایده آل که در انرژی نسبت به حالت $1S_h$ و $1S_e$ QD همراه است، همراه است. اوربیتال های مولکولی گونه های فعال ردوکس پروکسیمال قادر هستند به طور فیزیکی این حالات را از طریق همپوشانی با تابع موج الکترونی یا حفره QD اضافه کنند. در نتیجه CT با ترکیب مجدد تابشی اگزیتون ها به یک مسیر رقابتی تبدیل می شود. به عنوان مثال، همانطور که در شکل 6a نشان داده شده است، پس از تهییج نوری QD، یک الکترون می تواند از حالت $1S_e$ به حالت انرژی empty intermediate منتقل شود.

متناوبا، حفره می تواند از حالت $1S_h$ به حالت اشغالی با انرژی متوسط انتقال یابد همانطور که در شکل 6b نشان داده شده است. در هر دو حالت، این حالت های حدواسط در بیرون از هسته نانوکریستال قرار می گیرد و منجر به جداسازی

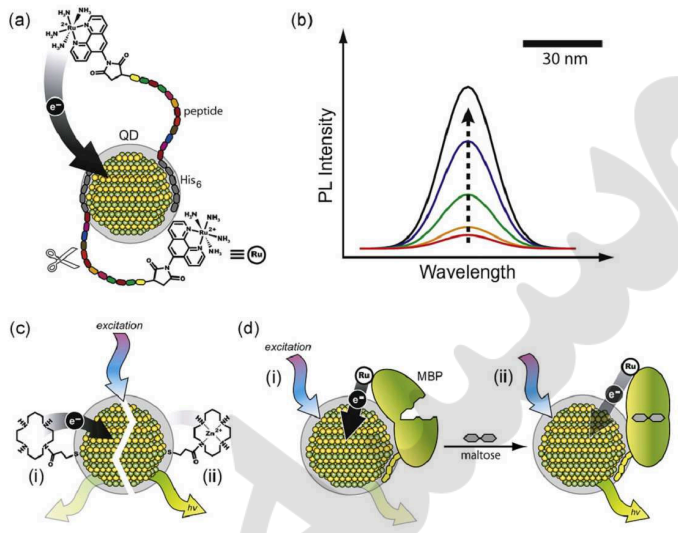
sina-pub.ir

حامل ها و یونیزاسیون QD می شود. QD PL باقی می ماند تا زمانی که بار QD خنثی شود. انرژی بازسازی همراه این فرآیندها هنوز تعیین نشده است، اما انتظار می رود که این امر به دلیل تغییر مکان حاملها در QD ها باشد. در بسیاری از موارد پیشنهاد شده است که برگشت گونه های فعال ردوکس پروکسیمال از CT به QD به سرعت می تواند رخ دهد و QD تنها به طور موقت یونیزه می شود. این برای توسعه سنسورها ایده آل است، که در آن بازیابی سریع QD PL مورد نظر است. با این حال، باید اشاره کرد که به دام اندازی حفره موجب زمانهای آهسته خنثی سازی (~μs) شده و به دنبال آن PET از یک $CdSe\ QD_{500}$ جذب یک مولکول رودامین B شده است.

خنثی سازی آهسته بار QD نیز با چشمک زدن QD های تنها بیان می شود. این بحث که حالات سطحی یکی از ویژگی های مهم این ساختار الکترونی QD ها است تاکنون نادیده گرفته شده است. اخیرا Medintz و همکاران نشان داده اند که کمبخشی های فناترولین روتنیم پروکسیمال قادر به انتقال بار در هر دو حالات هسته ای (به عنوان مثال VB) و حالات سطحی QD_{590} هستند. در مورد دوم، CT مستقل از تهییج نوری بود. به همین ترتیب، Shim و همکاران قبلا CT خود به خودی را در CB و حالات سطح CdSe یا $CdSe/ZnS\ QD_{590}$ با استفاده از یک عامل کاهش دهنده قوی مشاهده کردند.

علاوه بر این، همانطور که در ادامه در این بررسی توضیح داده شد، اهمیت حالات سطوح QD در واکنش های CT که در الکترودها رخ می دهد، در آزمایش های ECL شناخته شده است. Medintzو همکاران دریافتند که پوشش لیگاند در QD ها در تعیین اینکه آیا هسته و سطح موجود در CT درگیر بودند مهم بود.

sina-pub.ir



شکل 7

(a) ساخت QD-CT برای تشخیص فعالیت پروتئاز.

پپتیدهای نشان دار شده روتنیم فنانترولین از طریق برچسب پلی هیستیدین به QD متصل می شوند. نزدیکی پپتید QD-روتنیم در بیوکانجوگه برای خنثی کردن CT QD PL کافی است. فعالیت پروتئاز (قیچی) فنانترولین روتنیم را از QD جدا می کند و PL را بازسازی می کند (نشان داده نمی شود). (b) بازسازی QD PL در پاسخ به افزایش فعالیت پروتئاز (جهت فلش خط چین) در قسمت (a) شکل یک سیگنال تحلیلی را فراهم می کند. این فرم پایه ای از داده های تجربی نیز از سازه ها در بخش های (c) و (d) مشخص است. (c) شناسایی یونهای روی با استفاده از QD های کانجوگه با سیکلام. i)) در غیاب روی، CT کارآمد بین سیکلام و QD عمدتا QD PL را خاموش می کند. (ii) پس از اتصال روی، CT مهار می شود و QD PL بازسازی می شود. (d) یک سنسور QD-CT تک مولکولی برای تشخیص مالتوز. سایت نشان دار شده پروتئین متصل به مالتوز (MBP) به طور خاص با فنانترولین روتنیم، بر روی QD از طریق یک برچسب فنانترولین سوار می شود. (i) نزدیکی بین برچسب روتنیم و QD برای کوئنچینگ CT از PL کافی است.

(ii) تغییرات صورتبندی در MBP پس از اتصال مالتوز، باعث افزایش جداسازی QD-روتنیم می شود و تا حدی QD PL را بازسازی می کند.

sina-pub.ir

به طور خاص، بارگذاری لیگاند پیشنهاد شده است که نقش مهمی ایفا می کند، که در آن CT در هر دو حالات VB و سطح QD های پوشش داده شده با DHLA-PEG وجود دارد اما تنها در حالات سطح QD های پوشش داده شده با DHLA آنیونی روی می دهد.

صرف نظر از لیگاند، بازده کوئنچینگ با افزایش اندازه هسته کاهش می یابد-یک مشاهده که می تواند به علت تراکم بیش تر حالات سطوح در QD های کوچک تر باشد. در مقایسه با افزودن بار به حالتهای VB یا CB، افزودن بار به حالات سطوح لزوما باعث کوئنچینگ کامل PL نمی شود. برهمکنش یک اگزیتون با یک حامل مستقر در سطح QD بسیار کمتر از آن با یک حامل مستقر درون هسته است و ترکیب مجدد تابشی یک مسیر رقابتی برای ریلکسیشن باقی می گذارد. نتیجه فقط کوئنچینگ جزئی PL است. علاوه بر این، همپوشانی بزرگ تر حامل در QD های کوچکتر یکی دیگر از دلایل بالقوه برای راندمان بالاتر کوئنچر است که توسط Medintz و همکاران مشاهده شده است. از معادله (3) می توان فهمید که سرعت CT به اندازه QD بستگی دارد. انرژی حالات CB و VB با اندازه هسته قیاس می شود و بنابراین تغییر انرژی آزاد مرتبط با CT تغییر می کند. در واقع، Robel و همکاران اثر اندازه QD را بر سرعت های CT بین QD ها و ذرات TiO2 را مشاهده کردند. با این وجود، برای مطالعات بیشتر مشخص کردن فرونشانی CT وابسته به اندازه لازم است.

مهم است که بازده فرونشانی را در یک سری از اندازه های QD، در سراسر مواد مختلف QD و در ظرفیت های کنترل شده گونه های مختلف ردوکس پروگسیمال بررسی کنیم.

اهمیت حالات سطح، پیچیدگی بیشتری در سطوح را در درک مکانیسم های فرونشانی CT سیستم های کانجوگه با برچسب QD-ردوکس اضافه می کند.

همانطور که در شکل 6c نشان داده شده است، حالات سطح می تواند به طور بالقوه در CT بین حالات پروگسیمال و حالات هسته مداخله کند. اگر سطح سطوح نادیده گرفته شود، سرعت های نسبی ترکیب مجدد اگزیتون تابشی و CT به حالتهای هسته، کارایی فرونشانی PL تعیین می شود. در مقابل، اگر حالات سطوح مهم باشد، دو سرعت جدید به طور بالقوه درنظر گرفته می شود: افزایش سرعت های غیر تابش ناشی از بار اضافی سطحی (به عنوان مثال بازسازی

sina-pub.ir

غلاف یا حفره) و نرخ CT از حالات سطوح به حالات هسته. در هر صورت، خنثی سازی موثر QD ها و بازسازی برچسب ردوکس از نظر تحلیلی برای اندازه گیری های تعادلی قابل اعتماد در آزمایش های سنجش مهم هستند. واضح است که برای توضیح ماهیت فرآیندهای CT که حاوی کانجوگه های نشان دار QD-ردوکس هستند مطالعات بیشتری مورد نیاز است و چندین ابزار تحلیلی برای این تحقیق مناسب هستند. اشغال حالت های الکترونی می تواند با استفاده از طیف سنجی جذب حالت پایدار و حالت گذرا در مناطق مرئی (تغییر بین باند) و مناطق مادون قرمز (انتقال درون باند) مشخص شود. ترکیبی از طیف سنجی حالت پایدار و time-resolved ، PL می تواند مکانیسم های فرونشانی را توضیح دهد. ولتامتری چرخه ای در تشخیص حالت هایی که در آن انتقال الکترون وجود دارد مفید است و طیف سنجی الکترومغناطیسی رزونانس (EPR) می تواند برای شناسایی رادیکال ها استفاده شود. اگر چه مطالعات بیشتری در این زمینه مورد نیاز است، چندین بیو پروب و بیوسنسور با استفاده از فرونشانیPL ، QD ها و CT توسعه داده شده است. این ها در بخش بعدی خلاصه شده است در جدول 1 طبقه بندی شده اند و نمونه های انتخاب شده در شکل 7 نشان داده شده است.

3.3.2 کاربردها

گروه Benson چندین بیوسنسور تک سلولی را با استفاده از فرونشانی CT و کانجوگه های پروتئین- QD با نشان دار شده با رتنیم توسعه دادند. سنسورهای تک مولکولی واکنش ناپذیر هستند، به طور بالقوه امکان بازسازی و اندازه گیری های پیوسته بدون تثبیت را فراهم می کنند و در معرض از دست دادن یک کوئنچر هدایت شده با غلظت یا گونه های گزارشگر (به ترتیب ساختارهای بیومولکولی) نیستند. سازه های تک مولکولی برای سنجش مالتوز، سرب، ترومبین و اسیدهای چرب ضروری است.

نمونه بیوسنسورهای تک مولکولی CT در ابتدا با استفاده از QD های CdSe و CdSe/ZnS کانجوگه با پروتئین اتصالی به مالتوز توسعه داده شدند (MBP).

در ابتدا با استفاده از CdSe و QD های CdSe/ZnS که با پروتئین متصل شده به مالتوز (MBP) متصل شده بودند، نمونه های تک نفوذی سلول های بنیادی CT طراحی شدند. MBP با یک حوزه فلوتونیئین با C انتهایی برای

sina-pub.ir

سوار شدن بر روی QD استفاده می شود و بقایای سیستئین در سطح برای پیوند خاص یک کمبخشی روتنیم مورد استفاده قرار گرفت.

معرفی یک کمبخشی روتنیوم پروکسیمال از طریق MBP، QD_{565} CdSe/ZnS PL را تا 22٪ کاهش داد. اتصال مالتوز به MBP کنفورماسیون در پروتئین را موجب شد که فاصله بین کمبخشی روتنیم و QD را افزایش داد و عمدتا شدت فرونشانده شده QD PL را به حالت اول بازگرداند. شکل 7c این روش انتقال را نشان می دهد. گزینش پذیری سنسور ها بر روی چند قند آزمایش شد. پاسخ به مالتوز یک افزایش 22±3% در PL بود. از سایر قندها، تنها مانوز، PL را افزایش داد و با 3±2% کوچکتر افزایش می یابد. حسگری برگشت پذیر توسط افزودن α-گلوکوزید نشان داده شده است. یک ساختار مشابه برای تشخیص سرب در سطوح نانومولار در محلولهای گلبول قرمز توسعه داده شد. طراحی متالوپروتئین برای طراحی مجدد پروتئین متصل به فسفات جهت اتصال انتخابی سرب ($PBP-Pb^{2+}$) و سپس ترکیب آن با QD_{545} CdSe/ZnS یا QD_{660} InGaP/ZnS مورد استفاده قرار گرفت.

در مورد دوم، اتصال سرب موجب کاهش 45-75٪ در QD PL شد، که بیانگر کاهش در جداسازی روتنیوم -QD مبتنی بر تغییر در صورت بندی یک پروتئین است که اتصال انتخابی را القا نمود. برای هر دو ساختار MBP و -PBP Pb^{2+}، مکانیزم PET از کمبخشی روتنیم پروکسیمال به QD VB برای فرونشانی پیشنهاد شد. علاوه بر تغییرات صورتبندی پروتئینی، گروه بنسون توانایی ساخت یک حسگر بر اساس فرونشانی تعدیل یافته CT به وسیله پروتئین متصل به pocket اشغال حلال نشان دادند.

اتصال پالمیتات در یک pocket هیدروفوبی پروتئین متصل به اسید چرب روده باعث تغییر قابل توجهی در اشغال حلال در pocket اتصال می شود.

معرفی یک برچسب روتنیم در این pocket اجازه انتقال از طریق کوئنچینگ CT را داد. حلال زدایی پس از اتصال پالمیتات باعث افزایش سرعت CT بین QD565 و کمبخشی روتنیم شد و QD PL را با 32 تا 58٪ کاهش داد. این ممکن است به دلیل تغییرات در انرژی تجدید سازمان دهی مجدد و ترم های β در معادله (3) باشد. کارایی های

sina-pub.ir

فرونشانی خستگی با آنهایی که توسط تغییرات صورتبندی هدایت می شوند قابل مقایسه هستند که دو مسیر ممکن برای توسعه سازه های سنجش پیشنهاد می شود.

با توجه به اینکه تغییرات در صورتبندی و تغییرات در حلالپوشی اغلب با اتصال پروتئین-لیگاند همراه است و انطباق این دو اثر را تنظیم می سازد وسیله ای برای بهینه سازی سیگنال فراهم کند. یک سازه QD-CT برای سنجش ترومبین نیز توسط گروه بنسون توسعه داده شده است. به جای تغییرات صورت بندی پروتئین، ما یک دیک الیگونوکلئوتید دو رشته ای شامل توالی TBA را برای تعدیل فاصله بین QD_{545} و برچسب های روتنیم فنانترولین طراحی کردیم. ساختار دو رشته ای با یک اصلاح یک تیول با QD هماهنگ شد. پایانه های مخالف با یک کمبخشی روتنیم نشان دار شدند. پس از اتصال ترومبین، قسمت های دورتر ازمارپیچ دوگانه مربوط به توالی TBA باز شد. این جداسازی کمبخشی QD-روتنیم را کاهش داد و کارایی کوئنچینگ CT را افزایش داد، که انتقال را امکان پذیر می سازد. تنظیم پوشش QD برای جلوگیری از برهمکنش های غیر اختصاصی و تجمع لازم بود، در حالیکه کنترل ظرفیت در هم آمیختن در تعیین مسیر و اندازه تغییرات مشاهده شده PL اهمیت داشت. با توجه به اثرات استری، کانجوگه روتنیم-الیگو نوکلئوتید QD 1:5 افزایش 50٪ در غلظت های بالای ترومبین داشت در حالی که 1: 1 کانجوگه کاهش 30٪ را نشان داد. اختلاف ها در ایزوترمهای اتصال ترومبین در سیستم های مختلف مشاهده شد. کار گروه بنسون و بویژه این مطالعه نشان می دهد که اگرچه مدولاسیون فرونشانی CT بوسیله تغییرات صورت بندی بیومولکول به طور گسترده ای در توسعه بیوسنسورها کاربرد دارد، اما الزاما سرراست نیست. قبل از اینکه سنجش موثر تشخیص داده شود پیش طراحی یک ساختار ممکن است متعاقبا به یک آزمایش برای بهینه سازی گسترده نیاز داشته باشد.

در مقایسه با سنسورهای توسعه یافته گروه بنسون، که به تغییرات کوچک در جداسازی برچسب QD-ردوکس اعتماد کردند و چندین بیوپروب را با استفاده از اتصال یا جدا شدن برچسب های فعال ردوکس در سطح QD توسعه دادند. برای مثال Yildiz و همکاران یکی از اولین نمونه های این رویکرد را با توسعه یک آزمایش مدل بر مبنای برهمکنش بیوتین- استرپتاویدین ارائه داد. مجموعه الکترواستاتیکی بیوتینیله اشتقاقی متیل ویلوژن روی QD_{563} پوشش داده شده روی MAA مهار قابل توجه QD PL را موجب می شود. این به PET از QD به متیل ویولوژن مربوط است.

sina-pub.ir

QD PL با وارد کردن استرپتاویدین احیا شد که بتدریج متیل ویولوژن بیوتینیله را محدود کرد و برهمکنش آن با QD را مختل کرد.

Medintz و همکاران فعالیت پروتئاز را با استفاده از پپتیدهای پیوست شده به فنانترولین روتنیم کشف کردند. توالی های پپتیدی که توسط آنزیمهای کیموتریپسین و ترومبین شناخته شده بودند از طریق تگ هگزاهیستیدین انتهایی به ترتیب به QD_{540} و QD_{590} متصل شدند. یک برچسب روتنیم فنانترولین ملایمید با استفاده از یک باقیمانده سستئین در انتهای هر پپتید وارد شد (شکل 7a). فرونشانی PL وابستگی شدید به تعداد کمبخشی های روتنیم را نشان داد که به QD متصل هستند.

تلفات 80٪ و 70٪ در غلظت PL به ترتیب با بسترهای 1/5 ترومبن در هر QD_{540} و 0/4کوتریپزین در هر ,QD_{590} مطابقت دارد.

تفاوت در ظرفیت کنجوگیشن برای رسیدن به مقادیر مشابه از کوئنچینگPL به کوئنچینگ موثر QD های کوچکتر مرتبط با پپتید ترومبین نسبت داده شد. معرفی غلظت های افزایشی ترومبین و کیموتریپسین به تدریج PL QD مربوطه را از طریق شکست افسارهای پپتیدی ترمیم نمود و از نزدیکی مورد نیاز برای CT رفع کرد.

سرعت های واکنش آنزیم و ثابت های Michaelis-Menten اندازه گیری شده و شبیه به آنهایی بود که در سنسورهای مبتنی بر FRET مشابه به دست آمده است. اندازه گیری مهار آنزیم نیز امکان پذیر بود. در مطالعه دوم، این محققان همچنان نشان دادند که کانجوگه های QD-پپتید-روتنیم به خوبی برای تجزیه و تحلیل چندگانه شده مناسب هستند. گروه های مخلوط چهار، شش و هشت رنگ از $QD_{510/537/555/565/581/590/610/635}$ تهیه شدند، که در آن رنگهای انتخابی QD با پپتیدهای نشان دار شده با روتنیم کانجوگه شد تا فرونشانی PL را هدایت کند. طیف PL مخلوط ها (شبیه به شکل e4) با استفاده از شکل های پیک گاوسی ابررسانا به منظور رفع فرونشانی رنگ های منحصر به فرد QD دکانوولوله شد. این امر توسعه آینده آرایه معلق نانو مقیاس را تقویت می کند که در آن هر رنگ QD به یک بستر پپتیدی متفاوت متصل می شود تا به طور همزمان فعالیت تا هشت پروتئاز را کنترل کند. مزیت استفاده از این روش نسبت به FRET ظرفیت چند بخشیینگ بزرگتر است. FRET توسط تعداد جفت ها محدود

sina-pub.ir

می شود که می تواند در یک محدوده طول موج مشخص مناسب باشد و از الزامات برای همپوشانی است. این بیشتر در سیستم های QD که در آن از گیرنده های فلورسنت استفاده می شود ترکیب می شود که نیاز به دکانواله کردن بیشتر برای سطوح مشابه چندگانه دارد.

در مقابل، به نظر می رسد روتنیم دارای توانایی عمل کردن به عنوان "پهنای باند" یا "جهانی" است که QD PL را در آزمایش های چند بخشی انجام می دهد. شکل پیک گوسی همراه با QD PL نیز اجازه دکانولیشن مستقیم و اطمینان بهتر در تجزیه و تحلیل را می دهد.

Gillو همکاران بیوپروب QD-CT را برای شناسایی مناسب فعالیت های تیروزیناز و ترومبین توسعه دادند.

QD_{600} چند لایه با CdSe/CdS/ZnS با تیروزین متیل استر یا یک پپتید منتهی به باقیمانده تیروزین کانجوگه شدند. در مورد بعدی، توالی پپتیدی به صورت انتخابی توسط ترومبین شکافته شد. در هر دو مورد، فعالیت تیروزیناز، تیروزین را به یک مشتق از اورتو کینون تبدیل کرد که QD PL توسط CT فرونشانده شد و سیگنال تحلیلی را فراهم کرد. در مورد کانجوگه پپتید، فعالیت ترمبین پپتید نشان دار شده با کینون- theo از QD را شکافت و PL آن را احیا نمود (.cf مالیمید روتنیم فنانترولین).

علاوه بر تشخیص فعالیت تیروسیناز، این روش همچنین ممکن است برای معرفی آنزیمی برچسب های فعال ردوکس بر روی بیومولکول ها مفید باشد (cf. روتنیم فناترولین ملایمید).

توسعه بیوپروب های QD-CT و بیوسنسورها محدود به استفاده از مولکول های بیولوژیکی به عنوان پروب های افینتی نیست. علاوه بر کار بر روی Benson، Ruedas-Rama و Hall، پروبهای QD را با استفاده از CT برای شناسایی انتخابی یون های مرتبط با زیست شناختی تهیه کرده اند. اتصال انتخابی یون ها توسط ماکروسیکل ها یا سایر عوامل کیلیت کننده برای تغییر فرونشانیQD با القای نوری CT مورد استفاده قرار گرفت.

باید تأکید کرد که در این کاربردها، CT بین QD و یون آنالیت محدود می شود مبنایی برای انتقال فراهم نمی کند. در عوض، اتصال این یون مسیر فرونشانی CT را بین عامل ماکروسیکل/کلات کننده و QD تغییر داد که در آن former به QD متصل شد. به عنوان مثال، یک سنسور روی از QD_{620} توسط اتصال به آزا ماکروسیکل به کمک

sina-pub.ir

یک پیوند آمیدی ساخته شد. در غیاب روی، آزاماکروسیکلهای کانجوگه شده، QD PL (تقریبا 80-97٪) را با انتقال حفره توسط القای نوری (به عنوان مثال PET به باند ظرفیت QD) خاموش شدند. اضافه کردن روی و اتصال بعدی مسیر فرونشانی CT را با قفل کردن الکترون مربوط به کئوردیناسیون در یون فلز مسدود کرد. افزایش حاصل شده در QD PL متناسب با غلظت روی بود. شکل 7b این روش انتقال را نشان می دهد. آزاماکروسیکل سیکلام و سیکلن LOD های .ca را در 1 تا 2 میکرو مولار، پاسخ خطی بالاتر بیش از دو مرتبه و انحرافات نسبی استاندارد حدود 3 درصد را فراهم کرد. گزینش پذیری خوب در برابر سایر کاتیون های متداول از نظر فیزیولوژیکی مشاهده شد و بازسازی سنسور روی با افزودن اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) امکان پذیر بود. علاوه بر این، تشخیص روی در حضور سرم جنین گوساله و Dulbecco محیط اصلاح شده Eagle امکان پذیر است. سپس محیط های داخل سلولی ساختگی مورد استفاده قرار می گیرد.

در یک استراتژی مشابه، تشخیص منگنز با استفاده از روی (2-کربوکسیل-2-هیدروکسی-5-سولفو فورمازیل بنزن) سوار شده بر روی $QD_{500/540/620}$ پوشش داده شده با MPA باردار شده با بار منفی توسط روش لایه به لایه امکان پذیر شد. پلیمر (مثلا هیدروکلراید آلیل آمین) برای وساطت در سوار شدن استفاده شد. فرونشانی QD PL (حدود 75٪) به انتقال حفره از QD با القای نوری توسط زینکون نسبت داده شد. اختلال در مسیر CT با برهمکنش زینکون-منگنز مبنایی برای انتقال به کمک بازیابی QD PL قابل قیاس با حسگر بالا روی آزاماکروسیکل را فراهم کرد. یکی از مهمترین جنبه های این مطالعه، مشاهده کردن این بود که مسیرهای متعدد ریلکسیشن ممکن است روی سیستم مشابه قرار گیرند. بسیاری از یونهای کمبخشی فلز-لیگاند می توانند جذب داشته باشند و کوانتوم جزئی فلورسانس را تولید کنند. بنابراین برهمکنش های پروکسیمال ممکن است به طور بالقوه هم شامل CT و هم FRET باشد. در مقایسه با منگنز، PL کانجوگه زینکون-QD با افزودن یون روی خاموش می شود. این امر به همپوشانی شدید طیفی بین QD PL و جذب کمبخشی روی -زینکون مربوط بود و و منجر به FRET شد. در مقابل، زینکون جدا شده و کمبخشی منگنز-زینکون، همپوشانی طیفی قابل توجهی با QD ها نداشتند. Ruedas-Rama و Hall نیز سیستمی را مطالعه کردند که در آن CT و جفت شدن اسپین -اوربیت مکانیسمهای بالقوه فرونشانی QD PL بوده است.

sina-pub.ir

Lucigenin، یک رنگ acridinium dication حساس به کلرید است که به QD ها متصل شد و پایه ای برای سنسور کلرید از طریق تغییر در QD PL ارائه کرد. گرچه اهمیت نسبی این دو مکانیسم فرونشانی ممکن است مشخص نباشد مطالعات بیشتر برهمکنش خالص بین QD و کروموفورهای پروگسیمال، فلوئورسان ساز ها یا گونه های فعال ردوکس ممکن است به طور بالقوه برهم نهی چندین برهمکنش باشد.

علاوه بر این استفاده از آنها در بدن گربه نر توسط Clarke و همکاران پتانسیل بیوپروبهای QD مبتنی بر فرونشانی CT را برای استفاده درون سلولی نشان داد. کانجوگه های دوپامین-QD_{560} تهیه شدند و به عنوان یک لکه لومینسانسی حساس به ردوکس برای تصویربرداری سلولی مورد استفاده قرار گرفتند. در شرایط کاهش، QD PL در مناطق محیطی سلول و درون لیزوزوم ها مشاهده شد. در شرایط اکسیداسیون بسیار شدید، QD PL در سراسر سلول قابل مشاهده بود. در شرایط اکسید شدن ضعیف تر، میتوکندری و ناحیه پری نوکلئاز سلول نشان دار شدند. شرایط ردوکس سلولی به وسیله تقویت یا مهار سنتز گلوتاسیون ایجاد شد و پیشنهاد گردید که این کانجوگه ها به عنوان به عنوان بیوپروب برای گلوتاسیون استفاده شود.

3.4. الکترو شیمی لومینسانس

یک آزمایش الکتروشیمی لومینسانس (ECL) به طور معمول با پیش ماده های پایدار در سطح یک الکترود تحت یک پتانسیل کاربردی به گونه های واکنش پذیر تبدیل می شود. واسطه های حاصل می توانند واکنش های CT را متحمل شوند تا یک محصول حالت برانگیخته را تولید کنند که از طریق لومینسانس آرام می شود. با ترکیب الکتروشیمی و طیف سنجی نوری، ECL چندین مزیت بالقوه را ارائه می دهد. آغاز الکتروشیمی لومینسانس، کنترل زمانی و مکانی (مستقر در سطح الکترود) را عرضه می کند در حالی که عدم تهییج نوری پس زمینه از نور منبع پراکنده یا اتوفلورسانس نمونه جلوگیری می کند. با این حال، به دلیل اینکه لومینسانس پارامتر تحلیلی است (جریان الکتریکی نیست)، این روش استعداد بسیار کمتر نسبت به بسیاری از مداخله گر های مربوط به روش های ولتامتری دارد. تجزیه و تحلیل چند پارامتری با استفاده از شروع ECL یا ولتاژهای پیک، شدت ECL و طول موج امکان پذیر است. خواننده علاقه مند می تواند جزئیات بیشتری را در ECL و کاربردهای آن در دو بررسی عالی پیدا کند.

sina-pub.ir

3.4.1 الکترو شیمی لومینسانس و QD ها

ECL چندین مواد مختلف QD مورد مطالعه قرار گرفته است

اگر چه جزئیات آن برای بررسی در اینجا بسیار گسترده است مشاهدات متعددی برای بهره تحلیل وجود دارد.

در ابتدا، QD ها ECL را با یا بدون هم واکنشگر پشتیبانی می کنند. در مورد قبلی پتانسیل های آنودی و کاتدی در یک الکترود به منظور تولید گونه های اکسید شده QD (حفره تزریقی) و کاهش یافته QD (الکترون تزریق شده) وارد چرخه شدند. همانطور که در معادلات (4) - (6) نشان داده شده است، گونه های اکسید شده و کاهش یافته QD می توانند در لایه انتشار الکترود واکنش دهند و موجب ایجاد حالت تهییج شده (QD*) می شود که می تواند از طریق لومینسانس آسایش یابد. گونه های اکسید شده و کاهش یافته QD لزوما پایدار نیستند و سرعت روبش برای بهینه سازی شدت ECL مهم است. بسته به مواد QD، گونه های اکسید شده (به عنوان مثال Si، CdSe) یا کاهش یافته (به عنوان مثال Ge) ممکن است از همتای خود پایدارتر باشند.

$$QD + e^- \rightarrow QD^- \quad (4)$$

$$QD + h^+ \rightarrow QD^+ \quad (5)$$

$$QD^- + QD^+ \rightarrow QD^* + QD \quad (6)$$

در مکانیسم هم واکنشگر، و با توجه به ECL کاتدی، هر دو QD (معادله (7)) و یک گونه مولکولی دوم (یعنی هسته واکنش) در الکترود کار کاهش می یابد. هم واکنشگر به یک عامل اکسید کننده قوی (معادله (8)) کاهش می یابد که می تواند یک سوراخ را به یک گونه QD تزریق کند (معادله (9)). همانند معادله (6) یک حالت برانگیخته QD می تواند توسط هم واکنشگر از واکنش بین QD کاهش یافته و QD اکسید شده یا بوسیله تزریق مستقیم یک سوراخ به QD کاهش یافته توسط هم واکنشگر تهیه شود (معادله (10)). یک مثال معمول از یک هم واکنشگر برای ECL کاتدی، آنیون پراکسی دی سولفات است که از طریق معادلات (8) - (10) واکنش می دهد. شکل a8 معادلات (7)، (8) و (10) را نشان می دهد.

sina-pub.ir

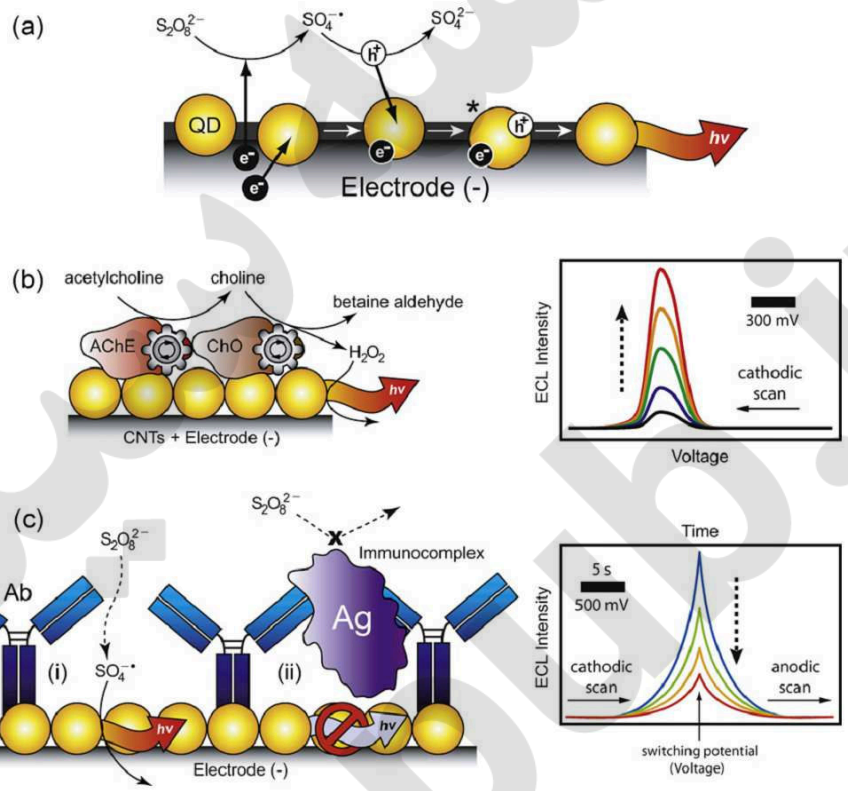
$$QD + e^- \rightarrow QD^- \quad (7)$$

$$S_2O_8^{2-} + e^- \rightarrow SO_4^{2-} + SO_4^{\bullet -} \quad (8)$$

$$SO_4^{\bullet -} + QD \rightarrow SO_4^{2-} + QD^+ \quad (9)$$

$$QD^- + SO_4^{\bullet -} \rightarrow QD^* + SO_4^{2-} \quad (10)$$

Poznyak و همکاران بارگیری کاتدی پایین ترین حالت کوانتومی اشغال نشده ($1S_e$) از طریق سفید کردن اولین جذب اگزیتون مشاهده کردند.



شکل 8

(a) تصویر مکانیزم ECL کاتدی با استفاده از پراکسی دی سولفات به عنوان یک هم واکنش دهنده.

(b) تشخیص استیل کولین با استفاده از QD ها و ECL کاتدی (CNTs نشان داده نشده). فعالیت کاتالیزوری ترکیبی استیل کولین استراز و کولین اکسیداز باعث تولید پراکسید هیدروژن به عنوان یک محصول جانبی می شود. پراکسید هیدروژن یک هم واکنشگر کارآمد ECL است و شدت ECL متناسب با مقدار استیل کولین است. شکل پایه داده های تجربی نشان داده شده است و بیانگر افزایش شدت ECL با افزایش استیل کولین یا غلظت کولین

sina-pub.ir

(جهت فلش قطعی شده) است.(c) یک استراتژی کلی برای ایمنی سنجی با استفاده از QD ها، آنتی بادی ها (Ab) و ECL کاتدی. در مقایسه با عدم وجود آنتی ژن (Ag) در (i)، حضور آنتی ژن و تشکیل یک سیستم ایمنی در (ii) افزایش مقاومت CT و کاهش شدت ECL.

مقاومت CT در اثر انسداد سطح الکترود توسط ایمونو کمبخشی افزایش می یابد. شکل پایه داده های تجربی نشان داده شده است و کاهش در شدت ELC با افزایش غلظت آنتی ژن (جهت فلش قطعی) را نشان می دهد. اشکال در مقیاس نیست. جزئیات بیشتر در متن اصلی یافت می شود.

در آزمایشات به کمک پراکسی دی سولفات به عنوان هم واکنشگر این نویسندگان همچنین واژه "حفاظت کاتدی با محدودیت کوانتومی"را پس از تزریق حفره توسط آنیون رادیکال سولفات به حالت متناظر VB با ترجیح بالاتر برای خوردگی اکسایشی برای توصیف ترکیب مجدد موثر تابشی $1S_e–1S_h$ استفاده کردند.

همچنین لازم به ذکر است که QD-ECL به حالت های سطحی بسیار حساس است. به عنوان مثال، در ابتدا QD-ECL را از سیلیسیم و QD های CdSeمشاهده کردند که ناشی از حالتهای گاف نواری بود. در مقابل، ECL در یک آزمایش مشابه با CdSe/ZnS مشاهده شد که به طور عمده با لومینسانس لبه باند مرتبط بود.

در این حالت، تغییر در گاف نواری غالب تا لبه نوار لومینسانس به اثرناپذیر بودن ZnS در حالت تله های سطحی نسبت داده شد. با این حال، لبه باند ECL نیز با ساختارهای فاقد لایه CdSe، CdTe و GeQD ها مشاهده شده است. مشارکت در لبه نواری و گاف نواری لومینسانس در ECL کلی احتمالا تابعی از تراکم حالات سطحی و عمق پر انرژی آنهاست.

کیفیت هسته نانوبلورها و اثر ناپذیری آن (به عنوان مثال پوسته معدنی یا پوشش لیگاند) به وضوح مهم است، اما لزوما تنها ملاحظات نیست. مطالعات بیشتر برای ارزیابی نقش (در صورت وجود) هم واکنشگرها در ایجاد حالتهای سطحی مورد نیاز است. تأثیر محیط محلی روی ECL نیز ممکن است مهم باشد، به ویژه هنگامی که QD ها در الکترودهای تثبیت می شوند. شدت ECL در یک آزمایش تابعی از سرعت انتقال الکترون است و بنابراین می تواند تابعی از اندازه QD باشد. Jiangو Ju مشاهده کردند که شدت ECL کاتدی QD هایCdSe در محدوده اندازه 1.5 تا 3.5

sina-pub.ir

نانومتر به شدت افزایش یافته و قبل از کاهش با افزایش سایز در در 2.5 نانومتر به ماکزیمم می رسد. با افزایش اندازه و کاهش همزمان انرژی در حالات سطح افزایش شدت ECL به کاهش انرژی CB QD مربوط می شود. اساس فرضیه بعدی آزمایشات ولتامتری چرخه ای بود پایه ای برای فرضیه دوم آزمایشات انجام شده ولتامتری چرخه ای توسط Poznyak و همکاران بود که یک تغییر مثبت در پتانسیل اکسیداسیون حالات سطوح را با افزایش اندازه QD نشان دادند. کاهش شدت ECL به کاهش نسبت سطح به حجم در اندازه های QD بزرگتر مربوط است. مشاهدات اضافی Poznyak و همکاران اهمیت بیشتر اندازه QD و حالات سطح را نشان می دهد. لبه باند کاتدی قوی ECL با فیلم های زرد و قرمز QD هایCdSe مشاهده شد.

با این حال، ترکیبی از لبه نواری و گاف نواری ECL با شدت ضعیف در فیلم های QD با نشر سبز مشاهده شد. پارامتر دیگری که سرعت انتقال الکترون را تحت تأثیر قرار می دهد، هدایت است و در هنگام کار با الکترود-فیلم های پشتیبانی شده با QD ها مهم است. در یک مطالعه، پیشنهاد شد که تفاوت هدایت الکتریکی بین QDهای CdSe و CdSe / ZnS منجر به یک تفاوت 100 برابری در شدت ECL بین فیلم های دیگر با ترکیب مشابه می شود. همان طور که در بخش 3.4.2 توضیح داده شده است، تغییر ترکیب فیلم های QD می تواند هدایت الکتریکی و شدت ECL را افزایش دهد.

3.4.2 کاربردها

چندین گروه تحقیقاتی در زمینه توسعه بیوسنسورهای ECL مبتنی بر QD ها مشارکت داشته اند. بعضی از این نمونه ها به طور کامل تعریف مقدماتی دقیق از QD ها را به عنوان اجزاء تلفیقی ارائه نمی دهد در حالی که دیگر نمونه هذا به دلایل عدم وجود بیوکنجوگه QD تا حدودی کشش می یابند.

با این حال، تمام نمونه ها معیار بودن وجود در نمونه را در طول تجزیه و تحلیل برآورد می کند. خواننده علاقه مند می تواند برای نمونه هایی از QD ها به صورت برچسب های غیر تلفیقی ECL در تحلیل زیستی به مراجع مراجعه کند. در این بخش ما نشانه QD_x را معرفی میکنیم که در آن x در طیف جذبی به موقعیت پیک اگزیتون در x نانومتر اشاره می کند (cf. QD_w برای پیک PL). مراجع ذکر شده در جدول 1 طبقه بندی شده اند. در یکی از اولین

sina-pub.ir

تحقیقات در این زمینه، گروه Ju یک محلول CdSe QD_{574} را بر روی یک سطح الکترود گرافیتی آغشته به پارافین (PIGE) قالب گیری کردند. این سیستم برای تشخیص پراکسید هیدروژن در محلول های کاهش یافته تا سطح 0/1 میکرو مولار استفاده شد. توانایی پراکسید هیدروژن به عنوان یک هم واکنشگر کاتدی ECL اساس انتقال بود. این بدان معنی است که توانایی تشخیص پراکسید هیدروژن باعث توسعه یک سنسور گلوکز شد. مخلوطی از گلوکز اکسیداز (GOX) و QD های پوشش داده شده با MAA به طور پیوسته بر روی PIGE ریخته می شود. یکی از جنبه های جالب این روش این بود که مقاومت CT در مقایسه با یک فیلم بیوکانجوگه QD-GOX پایین تر از فیلم QDهای و GOX بود. سینتیک سریع انتقال الکترون در دستیابی به ECL بهینه بود. با توجه به ترارسانی گلوکز، فعالیت GOX در حضور گلوکز، اکسیژن محلول را به پراکسید هیدروژن تبدیل می کند. اگرچه هر دو این گونه ها قادر هستند به عنوان هم واکنشگر های ECL عمل کنند اکسیژن بسیار کارآمد تر بود. ECL در (vs. Ag/AgCl) 1.1 V– مشاهده شد. در حضور گلوکز، تبدیل اکسیژن محلول به پراکسید هیدروژن سبب کاهش شدت QD ECL شد. پاسخ با افزایش غلظت گلوکز در محدوده 25 تا 3000 میکرومولار به صورت خطی افزایش می یابد و حد تشخیص آن 4 میکرومولار بود.

سیستم QD-PIGE از طریق ECL کاتدی با استفاده از پراکسید هیدروژن به عنوان هم واکنشگر به تشخیص انتخابی گلوتاسیون (GSH) و L-تیروزین (L-Cys) گسترش یافت. گونه های$CdSe\ QD_{570}$ کاهش یافته با MAA با پراکسید هیدروژن واکنش داده تا رادیکالهای هیدروکسید تشکیل شود.

رادیکال هیدروکسید در معادلات (9) و (10) ب مشابه با آنیون رادیکال سولفات رفتار کرد و نقش آن به عنوان یک حدواسط توسط طیف سنجی EPR تایید شد. ECL در 1.1 V–(در مقابل Ag / AgCl) مشاهده شد و مربوط به لبه باند PL بود. در مولکول های بیولوژیکی، تیول ها به طور خاص اکسیژن زدا های خوبی برای رادیکال هیدروکسید هستند که به دی سولفید متناظر اکسید می شود. بنابراین ممکن است GSH یا L-Cys را از طریق کاهش در شدت ELC مشاهده کنیم. هرچند که در مقایسه با سایر آمینواسیدها، گزینش پذیری خوب بود، هر گونه ای که بتواند رادیکال هیدروکسید را از بین ببرد یک مداخله گر بالقوه است. LOD ها برای GSH و L-Cys حدودا 1–2 μM

sina-pub.ir

بودند و کاهش خطی در شدت ECL تا حدود 50–60 μM مشاهده شد. جالب توجه است که اشاره کنیم که به نظر نمی رسد پوشش MAA روی QD واکنش بین QD ها و رادیکال هیدروکسید را تحت تاثیر قرار دهد. این امر به واکنش پذیری متفاوت گروه های تیولات کئوردینه شده با سطح QD (RS–QD) در مقایسه با تیول ها در محلول بالک (RSH) نسبت داده شد. Wang و همکاران روش بعدی QD-ECL را برای تشخیص GSH، اما با گزینش پذیری در برابر L-Cys، توسعه دادند.

علاوه بر این، اکسید گرافن به محلول نمونه ECL برای به دست آوردن این گزینش پذیری مورد استفاده قرار گرفت و همچنین برای جلوگیری از اکسنده ها با پتانسیل تند که معمولا به عنوان هم واکنشگر استفاده می شود. اکسید گرافن باعث افزایش تقریبا 5 برابری شدت ECL با تسهیل تولید آنیون سوپراکسید تولید شده از اکسیژن حل شده و همچنین تشکیل CdTe543QD پوشش داده شده با MAA و حفره تزریقی در پتانسیل آنودی گردید.

حداکثر شدت ECL با استفاده از $1.2\ \mu gmL^{-1}$ گرافن در pH 9.5 مشاهده شد. حضور GSH در نمونه، شدت ECL را به صورت خطی در محدوده 40-430 نانوگرم در میلی لیتر کاهش داد.

گزینش پذیری بیشتر برای GSH نسبت به L-Cys به تفاوت در تمایل به اکسید گرافن مربوط شد و روش برای اندازه گیری GSH در یک نمونه دارویی استفاده شد.

علاوه بر اکسید گرافن، نانولوله‌های کربنی (CNTs) برای افزایش میزان شدت ECL کاتدی با استفاده از QD ها مورد استفاده قرار گرفته اند. این افزایش به یک مانع کاهش یافته برای تزریق الکترون نسبت داده می شود که منجر به پتانسیل شروع پایین تر و شدت افزایش یافته ECL می شود. این افزایش مهم است، زیرا QD ها معمولا ناشران ECL ضعیف تر از کمبخشی های معمول روتنیم یا لومینول هستند. Wang و همکاران یک بیوسنسور را برای استیل کولین و کولین با استفاده از کانجوگه های QD -نانوتیوب های کربنی چند دیواره آمیخته با PIGE توسعه دادند. $CdS_{480}QD$ بر روی CNTs در محل سنتز شد و کانجوگه های QD-CNT افزایش پنج برابری در شدت ECL را در مقایسه با QD های تنها افزایش فراهم کرد. آنزیم های استیل کولین استراز و کولین اکسیداز بر روی PIGE اصلاح شده- QD-CNT بی حرکت شد. یک محصول جانبی چرخه های کاتالیزوری این آنزیم ها عبارت بود

sina-pub.ir

از پراکسید هیدروژن - یک هم واکنشگر برای QD ECD کاتدی. افزایش غلظت نمونه استیل کولین یا کولین ECL را به ترتیب با LOD های 0.8 و 1.7 میکرو مولار تقریبا به صورت خطی افزایش داد. شروع ECL و پتانسیل های پیک در مقادیر 0.58– و 1.02 V– (در مقابل Ag/AgCl) تقریبا 0.40 و 0.28 ولتنسبت به غیر CNTs کمتر منفی است. انتقال به پتانسیل مثبت بیشتر احتمال دخالت الکتروشیمیایی را کاهش داد و تجزیه کاتدی پراکسید هیدروژن را کاهش داد (که از واکنش ECL جلوگیری می کند). در مقایسه با سنسور گلوکز توسعه یافته توسط جیانگ و جو، این روش برای اکسیژن محلول حساس نبود. به عنوان یک نتیجه، تولید پراکسید هیدروژن باعث تشخیص سیگنال شد. CNT ها نیز در توسعه ایمونوسنسور برای افزایش QD ECL مورد استفاده قرار گرفته اند. به عنوان مثال، Jie و همکاران یک الکترود طلایی را با یک فیلم کامپوزیتی از CNT های چند دیواره اصلاح شده با کیتوزان، $CdSe_{496}QD$ و 3-آمینوپروپیل تری اتواکسی سیلان (APTES) را تهیه کردند. در این مورد، CNT ها شدت ECL را 2.5 برابر افزایش دادند و APTES، ECL را تا 20 برابر بیشتر برای افزایش 50 برابری افزایش داد. این افزایش به یک اثر کاتالیزوری APTES نسبت به کاهش هم واکنشگر، پراکسی دی سولفات منجر شد. یک لایه تشخیص زیستی توسط تثبیت IgG ضد انسانی و قرار گرفتن در معرض آلبومین سرم گاوی (BSA) برای انسداد سایت های جذب تشکیل شد.

اضافه کردن پروتئین ها مقاومت CT را افزایش داد و در نتیجه شدت ECL کاهش یافت. شکل گیری بیشتر ایمونوکمپلکس باعث افزایش مقاومت CT شد و کاهش خطی در شدت ECL (در 1.37 V– در مقابل Ag/AgCl) با افزایش غلظت IgG هدف مشاهده شد.

LOD 1 پیکوگرم بر میلی لیتر بود و ایمنی سنجی جاذب بیوسنسور در برابر یک آنزیم (ELISA) تأیید شد.

Jie و همکاران با استفاده از روش لایه به لایه ی مشابه، یک ایمنی سنجی مشابه را انجام دادند. CNT های چند جداره قبل از اصلاح نهایی با IgG ضد انسانی با PDDA، $CdSe_{480}QD$ پوشش داده شده با MAA، یک لایه بعدی PDDA و نانو ذرات طلا (نانوذرات طلا) پوشانده شدند. شدت ECL کاتدی CNT ها با استفاده از پراکسی دی سولفات به عنوان یک هم واکنشگر با افزایش سه برابر افزایش یافت.

sina-pub.ir

تشخیص دوباره بر اساس کاهش در شدت ECL به علت تشکیل ایمونوکمبخشی ها است.

LOD , 0.6 پیکو گرم بر میلی لیتر بود. شکل 8c مکانیزم انتقال کامل برای ایمونوسنسورهای ECL را نشان می دهد که بر تغییرات مقاومت CT تکیه می کنند. الحاق نانو ذرات طلا در طراحی بیوسنسور QD-ECL اثر افزایشی بر شدت ECL داشت. به عنوان مثال، Jie و همکاران افزایش ca. 1.7 درجات در ECL $_{451}$QD CdSe را با ترکیب یک لایه نانو ذره طلا در یک الکترود گزارش کردند. این افزایش به کاهش مقاومت CT مربوط می شد که ناشی از مساحت سطح افزایش یافته و هدایت سهم برده شده از نانوذرات طلا می باشد.

این سیستم برای توسعه یک ایمنی سنجی ECL برای پریلبومین انسان با LOD $10\ pg\ mL^{-1}$ استفاده شد.

در یک طراحی برای توسعه ایمنی سنجی $_{374}$QD-ECL CdS از لیپوپروتئین با چگالی کم با پیکو گرم بر میلی لیتر LOD استفاده شد. در هر دو مورد، یک الکترود با لایه های متوالی از نانوذرات طلا، QD ها و آنتی بادی ها اصلاح شد. کاهش در شدت ECL ناشی از تشکیل ایمونو کمبخشی، اساس تشخیص بود. بسیاری از بیوسنسورهای QD-ECL که در این بخش توضیح داده شده اند، قوی است و قابل تکثیر می باشند. انحراف استاندارد نسبی بین آنالیز با یک الکترود در آماده سازی های الکترودهای مختلف تنها حدودا 1 تا -10٪ و کمتر از 10٪ می باشد. بسیاری از سنسورها برای مدت 30 روز یا بیشتر بدون افت عملکرد قابل ذخیره قابل توجه نگهداری شدند. آزمایشات ایمونولوژی QD-ECL با استفاده از بافر گلایسین-HCl با pH 2.8 با انحراف استاندارد نسبی ≥ 10٪ بین دوره مصرف تجدید شد. در مقایسه با نمونه آزمایشات ایمنی، Shan و همکاران نانوذرات طلا را به عنوان تابع هدف هیبریداسیون اسید نوکلئیک برای تغییر بین شدت کم و بالای ECL استفاده نمودند. QD های CdSدوپ شده با منگنز بر روی یک کاتد کربن شیشه ای پوشش داده شد و با پروب های اسید نوکلئیک هرپیرین متصل شده به نانو ذرات طلا اصلاح شد. پراکسی دی سولفات به عنوان هم واکنشگر استفاده شد. ECL (در 1.3 V– در مقابل الکترودهای کالومل استاندارد، SCE) با استفاده از هرپیرین در صورت بندی بسته، 25٪ خنثی شد. پس از هیبریداسیون هدف و باز شدن هرپین، افزایش 55 درصدی در ECL مشاهده شد. اساس تغییر توانایی NPU Au برای خاموش کردن یا افزایش لومینسانس به صورت تابعی از مجاورت بود. اسید نوکلئیک هدف را می توان در غلظت های پایین تر از 50 aM آمینو اسید با

sina-pub.ir

تمایزگذاری چندشکلی های نوکلئوتید تنها (SNP) تشخیص داد. جنبه جالب این کار این بود که دوپینگ منگنز باعث افزایش پایدار ی QD های کاهش یافته می شود. تیم تحقیقاتی Ju همچنین بیوپروب را با استفاده از آند QD ECL توسعه دادند. در یک مطالعه، یک روش برای تشخیص دوپامین با استفاده از CdSe 424QD پوشش داده شده با MAA و سولفیت به عنوان یک عامل هم واکنشگر توسعه یافت.

QD ها و سولفیت در آند به ترتیب در QD های با حفره تزریقی و آنیون های رادیکال سولفیت اکسید شدند.

رادیکال سولفیت با اکسیژن محلول واکنش داد تا آنیون سوپر اکسید را تشکیل دهد. آنیون سوپر اکسید یک الکترون را به یک QD تزریق کرد و QD های حالت برانگیخته از طریق واکنش در معادله (6) تولید شدند. گرچه سولفیت اکیدا ضروری نبود، اما شدت ECL (در +0.93 V در مقابل Ag/AgCl) 14 برابر بیشتر افزایش یافت.

علاوه بر این دوپامین، ECL مشاهده شده را با وابستگی غلظت استرن و ولمر فرونشاند.

محدوده دینامیکی پاسخ دوپامین 0.5 تا 70 میکرومولار بود. دوپامین مستقیما به عنوان محرک عمل نمی کند. در عوض، محصول اکسید شده آن، بنزوکینون، در پتانسیل آنودی شکل گرفت و حالت برانگیخته QD ها را از طریق انتقال انرژی تصادفی برخورد فرونشانده شد. فرونشانی در حضور دوپامین تقریبا شانزده و هفت برابر قویتر از اسید های اسکوربیک و اسید اوریک بود. در مطالعه بعدی، CdTe QD_{590} پوشش داده شده با MPA با سولفیت به عنوان یک هم واکنشگر در ECLآندی برای تشخیص تیروزین استفاده شد. ECL از لبه باند آغاز شد. در مقایسه با روش دوپامین، محصول اکسیدازو –کینون از تیروزین ECL (at +0.90 V vs. Ag/AgCl) را به طور بهینه کوئنچ کرد. اگر چه اکسیداسیون آنودی تیروزین امکان پذیر است، افزودن تیروزین سرعت اکسیداسیون را افزایش داد و باعث کوئنچینگ قوی تر می شود. LOD بدون تیروزین 46 نانومولار بود؛ با تیروزین، LOD به 0.1 pM کاهش یافت. مداخله گرهای بالقوه مانند اسید اوریک، اسید اسکوربیک، L-فنیل آلانین و L-تریپتوفان می توانند غلظت های 1000 و 200 هزار برابری را نسبت به تیروزین متحمل شوند. با این حال، همانطور که انتظار می رود دوپامین و دیگر ترکیبات که محصولات اکسیداسیون کینون را به ارمغان آورد که در تجزیه و تحلیل مداخله کرد.

طبق بهترین دانش ما در سنجش چندبخشی با استفاده از QD-ECL توسعه داده نشده است.

sina-pub.ir

آرایه های الکترودهای ساخته شده به صورت جداگانه یک رویکرد بالقوه را برای چند بخشی کردن نشان می دهند و به خوبی برای اندازه گیری وابستگی مناسب هستند. مدولاسیون شدت ECL با تغییرات در مقاومت سیگنال اجازه می دهد تا یک هم واکنشگر در یک آرایه الکترود در یک محلول تنها مورد استفاده قرار گیرد. با این وجود، استراتژی های دیگر به علت احتمال واکنش پذیری متقابل با هم واکنشگرها ممکن است نیاز به جداسازی محفظه های واکنش (مثلا onchip) باشد. رویکرد دیگر چند بخشیینگ، اطلاعات مربوط به اتصال هدف را به عنوان یک تابع از طول موج نشری QD (یعنی رنگ) رمزگذاری کرد.

در اصل، این می تواند اجازه چند بخشی کردن را با استفاده از یک الکترود تنها بدهد. با این حال، مراجع حاضر چندین چالش را در این زمینه، به ویژه کیفیت نشر QD ECL پیشنهاد می کند.

اگر چه ECL ناشی از لبه نواری به دست آمده و در سنجش مورد استفاده قرار گرفته است، نمونه های زیادی وجود دارد که ECL ناشی از گاف نواری (به عنوان مثال حالات سطح) یا مخلوطی از نشر لبه نواری و گاف نواری برای سنجش استفاده می شود. نشر گاف نواری برای چند بخشی کردن مفید نیست، زیرا آن گسترده است و به راحتی قابل تنظیم نیست. علاوه بر این، QD هایی که در آزمایشات ECL مورد استفاده قرار گرفته اند عمدتا از طریق روش های آبی ساخته شده اند.

در مقایسه با QD هایی که در حلال گرم کئوردینه کننده سنتز شده اند (به عنوان مثال [26،27])، این QD ها دارای نشر گسترده ای هستند. FWHM معمولی اغلب> 70 نانومتر است و بنابراین برای چند بخشی کردن مناسب نیست. اگرچه QD ها به طور واضح پتانسیل قابل توجهی برای بیوسنسورهایی دارند که از ECL برای انتقال استفاده می کنند، پیشرفت بیشتر برای حداکثر سازی اثر QD ها در این زمینه مورد نیاز هست.

4. آزمایشات فاز جامد

4.1 تثبیت QD ها

تثبیت QD ها برای آزمون های بین فازی، دارای مزایای متعددی نسبت به آزمایشات فاز محلول همگن است. بیوکانجوگه ها را می توان بدون روش های تصفیه با صرف وقت مانند الکتروفورز، ستون های اندازه طردی و یا دیالیز

sina-pub.ir

شستشو از سطح مشترک جامد می تواند برای حذف بیو موادهای اضافی کافی باشد. تثبیت همچنین می تواند انعطاف پذیری بیشتری را با شیمی سطح QD فراهم کند. در مقایسه با QD ها در محلول بالک، QD ها در یک سطح مشترک ثابت شدند که شرایط سخت تری برای تثبیت و حلالیت کلوئیدها دارند. بنابراین قابلیت بیشتری در انتخاب پوشش ها، شیمی جفت کردن و سیستم های حلال وجود دارد که می تواند برای سر هم بندی بیوسنسورها و بیو پروب های مبتنی بر QD استفاده شود. تثبیت QD همچنین ممکن است مزایایی را برای تشخیص فراهم سازد. نمونه های واقعی می توانند ماتریس های بیولوژیکی پیچیده باشند. پس از اتصال هدف به ماتریکس پیچیده، حذف بستر جامد و شستشوی بعدی می تواند پس زمینه نامطلوب همراه با اتوفلورسانس نمونه یا پراکندگی را حذف کند که در آزمایشات فاز محلول به طور عمده اجتناب ناپذیر است.

در حالی که QD های فاز محلول و تثبیت شده میتوانند با تکنیکهای خطی و غیر خطی میدان دور مورد بررسی نوری قرار گیرند، QD های تثبیت شده نیز می توانند توسط تکنیک های میدان نزدیک از جمله امواج محو شونده و حالت های نجوا، فلورسانس افزایش یافته پلاسمون سطحی، فلورسانس افزایش یافته سطوح فلزی ساختار یافته و فلورسانس افزایش یافته بلوری فوتونی مورد بررسی قرار گیرد. اگر چه این تکنیک ها برای آزمایش های فاز جامد استفاده از QD ها به عنوان برچسب های غیر تلفیقی مناسب هستند، تثبیت مستقیم بیوکانجوگه های QD ها در یک سطح مشترک جامد، امکان استفاده مجدد را افزایش می دهد که یکی از ویژگی های اساسی یک سنسور واقعی مبتنی بر QD است. تثبیت QD ها برای آزمایش و توسعه بیوسنسور، بی اهمیت نیست، و معیار برای استراتژی موفقیت آمیز تثبیت، به نوع تحلیل بستگی دارد. به دام اندازی فیزیکی، اتصال کووالانسی، پیوندهای کئوردیناسیون/ داتیو ، جاذبه الکترواستاتیک، سایر برهمکنش های متقابل یا ترکیبی از آنها، می تواند پایه ای برای تثبیت QD باشد. نمونه های منتخب از مراجع عبارتند از: لیگاندهای کئوردیناسیون دو عاملی ناهمگن با QD و سطح جامد برهمکنش دارند؛ اتصال کووالانسی بین گروه های عاملی محدود و پوشش QD؛ برهمکنش بیوتین-آویدین؛ ریخته گری فیلم های لنگمویر-بلوچت؛ ساخت سازه های لایه لایه؛ ترکیب با سل ژل ها، هترو ژل ها، یا میکرو ژل ها؛ و رشته های بیومولکولی

sina-pub.ir

نمونه های اضافی در این بخش تحت عنوان نمونه هایی از آزمون های فاز جامد شرح داده شده و ذکر شده اند. روش انتخاب شده تثبیت باید معیارهایی مانند روش های در دسترس بیوکانجوگیشن، نزدیکی مورد نیاز بین QD ها و پروب های وابسته (مثلا FRET) و اندازه و تحرک آنالیت مورد نظر را در بر بگیرد.در بعضی از کاربردها، میزان بارگذاری QD در وجه مشترک و پایداری تثبیت نیز ممکن است مهم باشد. علاوه بر این، ایمونو سنسورهای ECL در بخش 3.3.2 یک نمونه هست که در آن مقاومت سیگنال مهم است و نزدیکی بین QD ها و پروب با متمایل زیستی کمتر است. به طور کلی، اکثر مجموعه های زیستی فاز جامد و بیوسنسور برای هدف های بزرگتر (به عنوان مثال، اسید های نوکلئیک، پروتئین ها) به تثبیت QD ها به عنوان فیلم های نازکنسبت به ماتریکس های جا سازی شده در سه بعد روی بسترها نیاز دارد.

به جای قرار دادن در یک ماتریس سه بعدی، از بین بردن QD ها به عنوان فیلم های نازک روی یک بستر نیاز دارند. با الهام از موفقیت تیولات های دو دندانه به عنوان لیگاند ها برای QD های کلوئیدی، گروه ما لیگاند تبادل با سطح چند دندانه را برای تثبیت QD ها به عنوان فیلم های نازگ توسعه دادند. با استفاده از سنتز فاز جامد، سولفات سدیم با یک آمینوسیلان اصلاح شد تا افسارهای سطحی با تراکم بالا با دو تیول آویزان دو دندانه ساخته شود.

تعدادی از این لیگاندهای سطح برای تثبیت بین سطحی به صورت فیلم نازک قادر به اتصال با سطح QD های CdSe / ZnS بودند. سطوح بالای QD ها برای بیوکانجوگیشن بیشتر قابل دسترسی بوده و پایه ای برای توسعه آزمون های ترکیبی فاز جامد فراهم می کنند.

4.2 کاربردها

یکی از نخستین نمونه های تثبیت QD ها برای توسعه آزمایش مبتنی بر FRET توسط Tran و همکاران بود. QD های پوشش داده شده با DHLA با بار منفی بر روی اسلایدهای شیشه ای پوشش داده شده با پلی L-لیزین تثبیت شدند.

sina-pub.ir

آنتی بادی های نشان دار شده با کوئنچر تاریک بر روی QD ها به عنوان یک لایه بعدی سوار شده از طریق برهمکنش الکترواستاتیک پروتئین دیمری دو عاملی وفق دهنده مولکولی با zipper بر پایه G با جذب بالا برای منطقه IgG, F_c تثبیت شدند.

QD PL تثبیت شده با با افزایش تثبیت IgG نشان دار شده با کوئنچر کاهش یافت. با این حال، این کار فراتر از یک مدل برای مجموعه سطحی بیوکانجوگه های QD فراتر نرفت و یک ایمنی سنجی کامل انجام نشد. دو مطالعه اولیه دیگر تثبیت کانجوگه هایQD-MBP برای تشخیص مالتوز مورد بررسی قرار گرفت. در یک مطالعه، $QD_{555/570}$ با هر دو MBP و آویدین اصلاح شد. دومی اجازه اتصال به یک سطح پوشش داده شده با نوتراویدین را با استفاده از یک پل MBP بیوتینیله یا یک پل IgG به وجود آورد.

در مطالعه دوم، $QD_{510/530/590}$ پوشش داده شده با DHLA از طریق یک پپتید طراح سفت و محکم تثبیت شد. پپتید با پایانه C با توالی هگزاهیستیدین برای کئوردینه شدن با سطح QD برای اتصال به یک بستر پوشیده از نوتراویدین بوتینیل شده اصلاح شد.

QD های تثبیت شده با پنتا هیستیدین پیوسته به MBP اصلاح شدند که مشتق سازی فاز جامد QD ها را نشان داد. برای تولید یک سیگنال تحلیلی، MBP در یک محل کاملا حساس با یک گیرنده Cy3 نشان دار شد. تغییر کنفورماسیون مرتبط با اتصال مالتوز، Cy3 PL با حساسیت به FRET را خنثی کرد. یک نتیجه مهم از این مطالعه این بود که LOD و محدوده دینامیکی سازه تثبیت شده نسبت به فاز محلول آنالوگ کمتر مطلوب بودند. تغییر در محیط موضعی و از دست دادن درجه آزادی ناشی از تثبیت سطح بی اهمیت است و این مطالعه می استراتژی تثبیت را به اندازه استراتژی انتقال برجسته می سازد. گروه ما یک رویکرد غیر سنتی برای آزمایشات مبتنی بر FRET توسعه دادند که از فیلم های مخلوط تثبیت شده QD ها و پروب های الیگونوکلئوتید برای تشخیص اسید نوکلیک استفاده می کنند. در مقایسه با مدل کلوئیدی اهدا کننده –گیرنده (s) با تقارن مرکزی (شکل 2a)، معماری فیلم آمیخته که در یک آرایه بین وجهی دو بعدی دهنده های QD مورد بررسی قرار گرفته است، یک آرایه دو طرفه ای از اهداکنندگان QD است که گیرنده ها را می توانند از طریق هیبریداسیون اسید نوکلئیک به آن مربوط کرد.

sina-pub.ir

دو تفاوت مهم بین این معماری ها وجود دارد: (1) استوکیومتری اهداکننده-گیرنده؛ و (2) فاصله اهداکننده-گیرنده. در فیلم تثبیت شده (شکل 2c)، چندین اهدا کننده می توانند با چندین گیرنده در طی فواصل توزیع های اهداکننده-گیرنده برهمکنش کند. تعداد مسیرهای انتقال انرژی پتانسیل (از جمله احتمال برهمکنش اهداکنندگان و اهداکنندگان) و راندمان های مربوط به وضوح بین دو سیستم متفاوت است. توانایی یک گیرنده که به طور بالقوه با چندین اهداکننده برهمکنش می کند برای تثبیت QD ها بین فازی منحصر به فرد است. در آزمایشگاه، ما در حال بررسی توسعه هیبریداسیون آزمون فاز جامد بر این اساس هستیم. تبادل لیگاند سطحی چند دندانه برای تهیه فیلم های QD ها استفاده شده است و انتقال براساس ترکیبی از FRET میان گیرنده های QD و گیرنده های فلورسنت مشابه کار قبلی ما در بخش 3.1.2 است. تشخیص میان فازی انتخاب شده اسیدهای نوکلئیک با استفاده از QD و FRET ابتدا توسط QD_{538} پوشش داده شده با MPA با استفاده از فیبر نوری نشان داده شد. QD های تثبیت شده با پروب های الیگونوکلئوتید خاتمه یافته به تیول اصلاح شد و سطح باقی مانده با BSA دندانه دار پوشش داده شد. BSA دندانه دار برای جلوگیری از جذب غیر اختصاصی و دستیابی به گزینش پذیری ضروری بود. هیبریداسیون بین فازی، نزدیکی FRET را فراهم می کند و اجازه تشخیص الیگونوکلئوتید های هدف را در غلظت های 5 نانومولار را می دهد. بازسازی و استفاده مجدد بیش از هفت دور ممکن بود، هرچند سطح سیگنال و میزان بازسازی در هر مرحله کاهش یافت. کار در درجه حرارت اتاق، گزینش پذیری آزمون را افزایش داد.

در 40 درجه سانتیگراد، کنتراست 10:3 بین توالی های هدف کاملا مکمل و توالی هدف نامتناسب حدود سه جفت پایه (به ترتیب 1.0: 1.4 در دمای اتاق) به دست آمد.

با این حال، تمایز SNP به دست نیامد. بهبود عملکرد تحلیلی با اصلاح شیمی بین فازی مورد استفاده در آزمایش هیبریداسیون QD-FRET امکان پذیر شد. MPA-QD های تثبیت شده با یک لایه از پروب های نوتراویدین و پروب اتیل الیگونوکلئوتید بیوتینیل شده پوشش داده شدند. قرار گرفتن ثانویه در معرض BSA برای جلوگیری از هر گونه سایت های جذب باقی مانده استفاده می شود. تشخیص یک هدف تنها با استفاده از QD_{530} تثبیت شده با یک گیرنده Cy3 یا QD_{622} با گیرنده A647 امکان پذیر بود. در مقایسه با مطالعه قبلی، سیگنال های به دست آمده

sina-pub.ir

بزرگتر FRET، امکان محدود کردن تشخیص تا 1 نانومولار را فراهم می کند. این آزمون سیگنال و گزینش پذیری در سرم و در برابر یک پس زمینه بزرگ DNA ژنوم اضافی غیر مکمل حفظ شد.

زمان های آزمایش از 1 تا 3 ساعت متغیر بود و الیاف اصلاح شده می توانست حداقل یک هفته ذخیره شود.

با استفاده از یک آزمایش ساندویچ با الیگونوکلئوتید گزارشگر نشان دار شده با یک پذیرنده رنگ، افزایش قابل توجه در LOD و امکان جلوگیری از نشان دار کردن هدف وجود داشت.

تشخیص SNP در هر دو فرمت، با کنتراست به اندازه 31:1، با ترکیب فرمامید در نمونه ها در دمای اتاق امکان پذیر شد. در مقایسه با مطالعات قبلی، این آزمایش توانایی کمتری برای بازسازی و استفاده مجدد از آن داشت. مطالعات اضافی پایداری محدود لایه پروتئین را مشخص کرد که تا حد زیادی مسئول بازسازی ناقص مشاهده شده است. بهبودی با اتصال متقاطع لایه پروتئین امکان پذیر بود، هرچند که هنوز برای چندین دوره استفاده بدون هیچ گونه افت عملکردی کافی است. علیرغم این محدودیت، شیمی درون فازی در این آزمایش، برای کاوش در توسعه تست های چندگانه براساس QD و FRET ایده آل بود.

یک آزمایش هیبریداسیون تثبیت همزمان QD_{530} و QD_{622} و تثبیت همزمان دو توالی متفاوت الیگونوکلئوتید به صورت فیلم های آمیخته روی الیاف نوری امکان پذیرفت. رویکرد فیلم آمیخته سهولت در آماده سازی آزمایش را تقویت کرد. دو کانال تشخیصی با استفاده از گیرنده های Cy3 و A647 ایجاد شد، که در آن هیبریداسیون پروب-هدف، نزدیکی FRET را فراهم کرد. نسبتPL مربوط به گیرنده به QD با غلظت هدف در هر کانال متناسب بود که در آن مشارکت های منحصر به فرد هر QD و رنگ در PL کلی از طریق دکانوولوشن استخراج شد. LOD های تخمین زده شده در کانال های Cy3 و A647 به ترتیب 3 و 1 نانومتر بودند. قالب آزمون در شکل 9a نشان داده شده است.

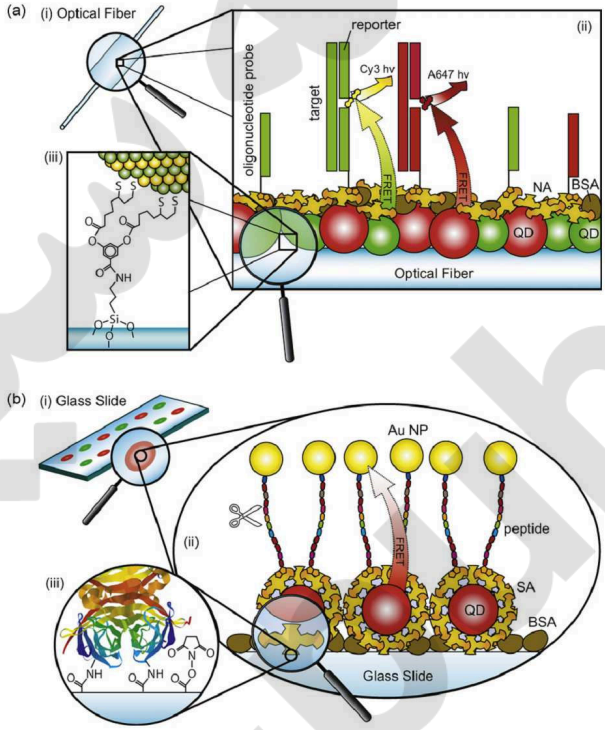
تشخیص SNP نیز در فرمت دوبخشی از طریق افزودن فرمامید امکان پذیر شد. علاوه بر این، امکان پاسخگویی در هر کانال تشخیص از طریق تغییرات نسبت پروبهای تثبیت شده مربوطه (مانند رقت پروب) امکان پذیر شد. آزمایش بعدی

sina-pub.ir

دوبخشی با استفاده از یک رنگ تنهای QD تثبیت شده توسعه داده شد. QD_{528} با Cy3 و RhR به عنوان پذیرنده رنگ ترکیب شدند.

هر دو رنگ همپوشانی طیفی با اهدا کننده QD داشتند و دکانواله کردن طیف های نشری آنها برای به دست آوردن دو کانال تشخیصی امکان پذیر شد.

LOD آزمایش 10نانومتر بود. از دیدگاه مواد، مزیت این استراتژی این بود که تشخیص انتخابی دوبخشی تنها با استفاده از یک نوع اهداکننده QD امکانپذیر بود.



شکل 9 آزمونهای FRET فاز جامد با استفاده از QD های تثبیت شده.

(a) یک تست هیبریداسیون اسید نوکلئیک چندتایی شده در سه مقیاس بزرگ نشان داده شده است: (i) بستر فیبر نوری متصل به سیلیکا؛ (ii؛ بیوکانجوگه های بین وجهی QD (iii) و تثبیت QD از طریق تبادل لیگاند سطحی چند دندانه. در (ii)، انتقال انرژی از QD ها به الیگونوکلئوتیدهای گزارشگر نشان دار شده با پذیرنده رنگ در فرمت ساندویچ اجازه تشخیص انتخابی را فراهم می سازد. سیگنال تجزیه ای انتشار پذیرنده است. (b) بیوکانجوگه های بین

sina-pub.ir

سطحی QD و (iii) تثبیت QD از طریق تشکیل پیوند آمید بین یک پوشش استرپتاویدین و یک سطح فعال شده با استر سوکسینامید.

در (ii)، QD ها به وسیله کانجوگه های نانوذرات طلا-پپتید فرونشانی می شوند. فعالیت پروتئاز (قیچی) پپتید را تجزیه می کند، در نتیجه PL را بازسازی می کند و یک سیگنال تحلیلی را فراهم می کند. دو رنگ نقاط بر روی بستر در (i) توانایی چند بخشی کردم را نشان می دهد. جزئیات بیشتر در مورد آزمونهای فاز جامد در (a) و (b) در متن اصلی یافت می شود. اعداد به مقیاس نیست از دیدگاه تحلیلی، پهنای باند طیفی حدودا 125 نانومتر، در مقایسه با 250 نانومتر با دو استراتژی قبلی دو بعدی QD –دهنده.

علاوه بر این، این مطالعه همچنین به بررسی جنبه های مهمی از آزمون های ترکیبی چندتایی بر اساس فیلم های آمیخته QD ها و پروب های الیگونوکلئوتیدی کمک کرد. به عنوان مثال، زمان رسیدن به پاسخ تعادلی تقریبا مستقل از رقت پروب بود، و بنابراین مولتی پلکسینگ نیازی به زمان طولانی هیبریداسیون ندارد. همچنین ممکن است منشاء کاهش در سیگنال FRET در هنگام حرکت از آزمونهای تک بخشی به دوبخشی، یا هنگامی که مقدار نسبی یک پروب در یک آزمون دوبخشی کاهش می یابد، امکان پذیر شود.

تشکیل دهنده ابتدا به ترکیب رقت پروب و رقت QD نسبت داده شد.

رقت QD به مقادیر نسبی QD_{530} و QD_{622} اشاره دارد که انتظار می رود فاصله متوسط دریافت کننده-اهداکننده برای هر جفت FRET در یک فیلم آمیخته تغییر کند. تغییرات خطی در سیگنال FRET با تغییرات در نسبت پروب در آزمایشهای دوبخشی با یک و دو اهدا کنندگان QD مشاهده شد. این نشان داد که میانگین فاصله اهدا کننده-گیرنده در فیلم های آمیخته با دو QD تثبیت شده با تغییرات در نسبت پروب به طور قابل توجهی تغییر نکرد.

بنابراین به نظر می رسد تراکم تعداد پذیرنده نیروی محرکه برای تغییرات سیگنال به عنوان تابعی از نسبت پروب و در هنگام حرکت از تک بخشی به یک دوبخشی ظاهر شود (اگر چه نسبت QD_{530} تا QD_{622} نیز ممکن است مهم باشد). بنابراین، یک مسیر بالقوه برای تقویت سیگنال در طرح های سنجش در آینده، شرکت چندین رنگ پذیرنده با یک رویداد ترکیبی تنها است.

sina-pub.ir

اخیرا ما دریافتیم که افزایش سیگنال های> 70٪ و> 40٪ به ترتیب در آزمایشات ساندویچ تک بخشی و دو بخشی بدست آمده است که از الیگونوکلئوتیدهای گزارشگر نشان دار شده با یک پذیرنده رنگ A647 (با یک اصطلاح) استفاده کردند.

پتانسیل روش های چند بخشی QD-FRET در مقایسه با بارکد های نوری مبتنی بر QD محدود است. با این وجود، همان طور که قبلا شرح داده شد، ترکیبی از QD های تثبیت شده و استفاده آنها به عنوان اهدا کنندگان در FRET مجموعه ای از مزایای منحصر به فرد را فراهم می کند. توسعه استراتژی های چند بخشی با مرتبه بالاتر که این مزایا را حفظ می کنند برای موفقیت آنها در کاربردهای واقعی بسیار مهم است.

در آزمایشگاه ما، ما همچنین توسعه هیبریداسیون سه بخشی و چهار بخشی را بدون نیاز به بیش از دو رنگ تثبیت شده QD، و بدون به خطر انداختن مزایای یک آزمون دوتایی فاز جامد به کار گرفتند. اضافه کردن کانال تشخیص دیگر از طریق تثبیت همزمان سومین اهدا کننده QD لزوما بهترین روش نیست. انتقال به طول موج های کوتاه تر یا طولانی تر مواد جدید QD مورد نیاز (مثلا CdS، CdTe) ممکن است چالش هایی را در کارآیی دتکتورهای نوری وابسته به طول موج یا راندمان تهییج ایجاد کند و باعث رقت بیشتر QD شود.

در عوض، یک کانال تشخیص سوم در آزمایش های ساندویچ با استفاده از تهییج مستقیم الیگونوکلئوتیدهای گزارشگر نشان دار شده با اقیانوس آبی (PB) ثبت شد.

تهییج موثر هر دو PB و QD ممکن بود و نشر PB به راحتی تنها با گسترش متوسط منطقه طیف مرئی مورد استفاده در تجزیه و تحلیل برطرف شد. دو روش برای تشخیص انتخابی سه تایی امکان پذیر است: ترکیبی از PB، Cy3 و A647 با هر دو اهدا QD_{528} و QD_{618}؛ یا ترکیبی از PB، Cy3 و RhR، تنها با یک گیرنده QD_{528}. استوکیومتری پروب برای تعادل سیگنالهای FRET در هر کانال تشخیص داده شد که تفاوتها در کارایی مستقیم برانگیختگی (PB) و کارایی FRET (Cy3, RhR, A647) را جبران می کند.

sina-pub.ir

تشخیص SNP در فرمت سه بخشی امکان پذیر بود؛ با این حال، بهینه سازی طول پروب لازم بود تا اطمینان حاصل شود که هیبریداسیون SNP را می توان در یک کانال بدون سرکوب هیبریداسیون مکمل در کانال های دیگر سرکوب کرد.

رویکرد سوم به هیبریداسیون سه بخشی نیز مورد بررسی قرار گرفت و PB را در بر نمی گیرد. اهدا کنندگان تثبیت شده QD_{528} و QD_{618} با Cy3، RhR و A647 ترکیب شد که شامل استراتژی FRET دو دریافت کننده-سه گیرنده می باشد. به طور تحلیلی، تست های تری بخشی با تکیه بر یک کانال PB، بهتر است برای تشخیص غلظت های پایین تر هدف مورد استفاده قرار گیرند. این به دلیل عدم قطعیت بالقوه در دکانوالیشن همپوشانی طیف های نشری Cy3، RhR و QD_{618} در دو استراتژی پذیرنده - اهدا کننده می باشد.

با این وجود، مزایای این استراتژی اضافه کردن یک کانال PB بود که باعث افزایش تست هیبریداسیون چهار بخشی شد. اگر چه اثبات مفهوم نشان داده شده است، سیگنالهای کم FRET از سطح بالای رقت پروب در یک فیلم آمیخته از چهار پروب مختلف الیگونوکلئوتیدی و دو اهدا کننده QD نتیجه شد. از دست دادن حساسیت مانع کاربرد عملی شد و نیاز به افزایش سیگنال های FRET را نشان داد.

اگر این رضایت بخشی بتواند به دست آید، آزمون های چهارگانه که هم با استفاده از تثبیت QD ها و استفاده آنها به عنوان اهدا کنندگان در FRET چندگانه، به دست می آید عملی است. لازم به ذکر است که Zhang و Hu نیز ترکیبی از تهییج مستقیم فلورسانس و استفاده از QD در FRET برای تشخیص اسید نوکلئیک چند بخشی شده پذیرفتند. Alexa Fluor 488 (تهییج مستقیم)، Cy5 (گیرنده) و QD_{605} (اهدا کننده) در یک آزمایش هیبریداسیون همگن دوبخشی (به عنوان مثال فاز محلول) مورد استفاده قرار گرفت. QD ها با دو پروب الیگونوکلئوتیدی متفاوت اصلاح شدند و برای ترکیب رنگ ها با QD با استفاده از روش ترکیبی از روش تحلیل ساندویچ استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از جریان میکرومویرگی و تشخیص همزمان بر روی یک مولکول تنها استفاده شد. علاوه بر کار ما، Feng و همکاران همچنین از تثبیت همزمان چندین رنگ QD برای توسعه یک آزمایش هیبریداسیون فاز جامد استفاده کردند. با این حال در این مورد، رنگهای چندگانه QD برای چند بخشیینگ استفاده

sina-pub.ir

نشد. در عوض، تجمع لایه به لایه QD_{561}، QD_{594} و QD_{614} در داخل یک الگوی متخلخل اکسید آلومینیوم به منظور ایجاد یک relay انتقال انرژی مورد استفاده قرار گرفت. تحریک لایه بیرونی QD_{561} در امتداد گرادیان گاف نواری به لایه داخلی QD_{614} منتقل می شود. این لایه داخلی با پروب های الیگونوکلئوتیدی عامل دار شد و هیبریداسیون با توالی های هدف نشاندار شده با Cy5 یک مرحله اضافی را در انتقال اضافه کرد. Cy5 PL با حساسیت به FRET یک سیگنال تحلیلی را با یک LOD زیر نانو مولار فراهم می کند. اگر چه به طور کامل به یک آزمایش توسعه داده نشد، Qi و همکاران یک استراتژی انتقال را طراحی کردند که از پاسخهای FRET و فتوولتائی برای تشخیص هیبریداسیون اسید نوکلئیک استفاده می کرد. QD های پوشش داده شده با کربوکسیل به صورت کووالانسی به فیلم APTES متصل شد که بین دو الکترود روی یک سوبسترای دی اکسید سیلیکون قرار داشتند. QD_{590} تثبیت شده با DNA دو رشته ای به طور متقاطع متصل شد که که دارای یک برچسب Cy5 بود. این دو سیگنال تحلیلی را تولید کرد: Cy5 PL با حساسیت به FRET و یک جریان فوتونی قابل توجه بین دو الکترود. افزایش جریان فوتونی مشخصه دوبخشی های کاملا مکمل بود و هیچ جریان قابل توجهی برای دوبخشی ناسازگار مشاهده نشد.

این مطالعه، مزیت تشخیص چندجمله ای را در شناسایی سیگنال های مثبت کاذب از جذب غیر خاص و یا تمایز بین توالی های هدف و ناسازگاری بدون نیاز به بی ثباتی حرارتی یا شیمیایی نشان می دهد.

آزمایشات فاز جامد QD-FRET برای فعالیت پروتئاز نیز توسعه یافته است. Kimو همکاران لکه های QD پوشش داده شده با SA روی یک اسلاید شیشه ای هیدروژل فعال شده با N-هیدروکسی سوکسینامید را تثبیت کردند. BSA برای جلوگیری از باقی مانده سطح استفاده شد. تثبیت بعدی پپتیدهای بیوتینیل شده که با نانوذرات طلا نشان دار شده بود، موجب خنثی شدن QD PL بالاتر از 80٪ شد. شکافت خاص توالی پپتیدی با فعالیت پروتئاز هدف، QD PL را با آزادسازی نانوذرات طلا بازسازی شد. این شکل آزمون در شکل 9b نشان داده شده است. تشخیص تری بخشی با سه سری از نقاط مربوط به QD_{525}، QD_{605} و QD_{655} امکان پذیر است. هر رنگ QD به توالی خاص متفاوت یک پپتید به ترتیب MMP-7 ، کاسپاز-3 یا ترومبین متصل شد.

sina-pub.ir

LOD های مربوطه به ترتیب 10 نانوگرم بر میلی لیتر، 1 $1UmL^{-1}$ و 20 نانوگرم بر میلی لیتر بود.

ساخت هر سه کانجوگه QD-پپتید از طریق برهمکنشSA -بیوتین و استفاده از کوئنچر معمولی برای هر سه کانال مستلزم ثبت فضایی (به عنوان مثال نقاط) بود. با این حال، استفاده از نشر دهندگان مختلف QD، تجزیه و تحلیل را از طریق یک طیف ساده PL بدون تصویربرداری را برای حل و فصل ثبت فضایی تقویت می کند.

همان گروه تحقیقاتی یک آزمایش تلفیقی مشابه را برای فعالیت MMP-7 ایجاد کردند. QD_{525} پوشش داده شده با SA با استفاده از پپتیدهای بیوتینیل شده که با TAMRA به عنوان یک گیرنده نشان دار شده بود تثبیت شد. پارامتر تحلیلی نسبت QD به TAMRA PL بود و با فعالیت پروتئین کافت افزایش یافت. LOD , 100 نانوگرم بر میلی لیتر بود.

LOD پایین تر با پپتید نشان دار شده با نانو ذرات طلا احتمالا به علت کارایی بالاتر فرونشانی نانو ذرات طلا بوده است. در هر دو مطالعه، محدوده های دینامیکی تقریبا سه مرتبه بزرگ تر بودند و زمان آنالیز آنها 1 تا 2 ساعت بود.

5. خلاصه و نتایج

این مقاله مروری استفاده از QD ها به عنوان اجزای تلفیقی در سنجش ها، بیو پروب ها و بیوسنسورها مورد بررسی قرار می دهد. QD های تلفیقی به عنوان یک داربست برای هر دو بیوکانجوگیشن و تشخیص زیستی خدمت می کنند و در یک سیستم در سراسر یک تجزیه و تحلیل بیولوژیکی وجود دارد. در مقایسه با استفاده از QD ها به عنوان برچسب های ساده، که در آن QD های غیر مرتبط برای حذف سیگنال شسته می شوند، استفاده از QD های تلفیقی در پاسخ به رویدادهای تشخیص زیستی به تعدیل لومینسانسQD نیاز دارد.

در این راستا مکانیسم های کوئنچینگ مانند FRET، BRET و CT استفاده شده است. وابستگی شدید آنها به فاصله مبنایی برای رویدادهای تشخیص زیستی انتقال است که به صورت تجمعی (مثلا هیبریداسیون)، تفکیکی (مثلا پروتئاز) یا تغییرات صورتبندی (مثلا در برهمکنش های لیگاند- گیرنده) می باشند.

در حالی که فرآیندهای FRET و BRET با QD ها به طور کلی بهتر درک شده است، بسیاری از جنبه های CT خاموشی QD ها نیاز به مطالعه بیشتر دارد. ECL همچنین در QD های تلفیقی برای آزمایش و توسعه بیوسنسور

sina-pub.ir

استفاده شده است. در این حالت، به دلیل فعالیت آنزیم یا تغییرات در مقاومت CT انتقال اغلب بر مبنای تغییرات در غلظت هم واکنشگر است که به علت اتفاقات اتصال در یک الکترود اصلاح شده QD است. با این حال، با توجه به تمایل به نشر گاف نواری در روش های ECL، هنوز در این منطقه تأثیر QD های به حداکثر رسانده نشده است. پوششها و استراتژی های بیوکانجوگیشن که از در آنها QD ها استفاده می شود در توسعه تجزیه و تحلیل های زیستی توجه ویژه ای به آنها شده است. هر دو پوشش های QD مبتنی بر لیگاند و پوشش های QD پلیمری ضخیم تر با روش FRET و BRET سازگار بوده اند. در مقایسه با فرونشانیCT یا ECL، FRET و BRET به دلیل برهمکنش قطبی-قطبی از طریق فاصله آنها به کمترین فاصله وابسته است و به پوشش QD حساسیت دارند. در مقابل، CT و ECL نیاز به انتقال الکترون از طریق همپوشانی اربیتال در مدار کوتاه دارد. تا به امروز، با استفاده از این روش های انتقال، تنها برای پوشش های QD مبتنی بر لیگاند استفاده شده است.

علاوه بر این، حالات سطح QD نقش مهمی در فرونشانی CT و ECL باز می کند. اگر چه این نقش هنوز به طور کامل مشخص نشده است، انتظار می رود که پوششهای QD تأثیر داشته باشند. روش بیوکانجوگیشن QD مهم است، زیرا به طور بالقوه می تواند جهت گیری و تحرک صورتبندی بیومولکول های کنجوگه، ظرفیت سلول هایQD - بیوکانجوگه را دیکته کند و ضخامت را به پوشش کلی QD اضافه کند، که می تواند بر کارایی FRET، BRET و CT تاثیر بگذارد. توسعه تجزیه و تحلیل های زیستی QD را با کوئنچر FRET، BRET، CT تلفیقی می سازد و انتقال مبتنی بر ECL را ادامه می دهد.

در حال حاضر، روش های مبتنی بر FRET بیشتر توسعه یافته اند و انواع مختلفی از هر دو روش همگن سنجش فاز محلول و سنجش فاز جامد ناهمگن در مراجع گزارش شده است. اگر چه اکثریت کار سابقا در آزمایشگاه بوده است، هر دو بیو پروب مبتنی بر FRET و مبتنی بر CT در خارج از بدن استفاده شده است. توسعه مستمر در خارج از بدن و بیو آنالیز ها در درون بدن محور اصلی این تحقیق در چندین سال آینده، خواهد بود.