sina-pub.ir

بیوسنسور DNA الکتروشیمیایی برای شناسایی ژن E6 ویروس پاپیلوم انسانی داخل پلاسمید نوترکیب

1-مقدمه

بیش از 160 نوع ویروس پاپیلومای انسانی شناخته شده(HPV) وجود دارد(بارک و همکاران 2013) که از این تعداد 40 مورد از آن ها می توانند اپیتلیوم آنوژنیتال را عفونی کنندو از این تعداد 15 ویروس به صورت سرطانی در نظر گرفته می شوند(لین و همکاران 2010). HPV 16-18 که به صورت انواع با ریسک بالا (HR) طبقه بندی می شوند، عامل تقریبا 60-80 درصد وقوع سرطان دهانه رحم در سرتاسر دنیا می باشند(کارتر و همکاران 2011، هندری و همکاران 2013).

چندین مطالعه نشان داده است که HPV دو آنکوژن قوی E6 و E7 را رمز گذاری می کند. این انکوژن ها به طور پیوسته در HR-HPV بیان شده و عامل ترانسفورماسیون بدخیم سرطان دهانه رحم می باشند(عظم و شمس الاسلام 2010، باکاردو و همکاران 2010، کارتر و همکاران 2011، استانلی 2010، ویکی و همکاران 2014). از این روی ژن های E6 و E7 بیانگر اهداف ایده ال برای تولید واکسن های درمانی بوده و به طور بالقوه موجب حذف زخم های قبلی و تومور های بدخیم با تولید ایمنی سلولی در برابر سلول های آلوده به HPV می شود(هوانگو همکاران 2010، کاوانا و همکاران 2012، نیتو و سالوتی 2014).

پیشرفت در زمینه فنون کلونینگ مولکولی، امکان تولید سریع، آسان و ارزان واکسن های وکتور نوترکیب را فراهم کرده است(هوانگ و همکاران 2010، هوانگ و همکاران 2008). واکسن های وکتور نوترکیب دارای مزیت های بسیاری نسبت به واکسن های سنتی هستند و یک راه حل تکنولوژیک برای میکرو ارگانیسم هایی هستند که به سختی در کشت بافت سلولی و یا مدل های حیوانی نظیر HPV رشد می کنند(فرارو و همکاران 2011، لین و همکاران 2010، ما و همکاران 2010).

رایج ترین روش مورد استفاده برای تحلیل کلونینگ مولکولی،روش الکتروفورز در ژل های آگاروز است. با این حال، این روش مستلزم پرسنل آموزش دیده بوده و زمان بر می باشد(چانگ و همکاران 2013، تلس و فونکسا 2008). بیوسنسور های DNA به فراوانی برای تشخیص توالی DNA ویژه استفاده می شوند(پی وهمکاران 2013،

sina-pub.ir

توسار و همکاران 2010)، با این حال کم تر در خصوص تحلیل کلونینگ بررسی شده است. در این مطالعه، ما به توصیف یک بیوسنسور جدید، ساده،ارزان، پایدار و بدون برچسب الکتروشیمیایی DNA برای تشخیص ژن HPV 16 E6 کلونشده در وکتور بیان کننده می پردازیم.

2- مواد و روش ها

2-1 مواد

DH5a اشریشیا کولای (اینویتروژن-آمریکا) و pGEM-T Easy (pGEM-T)(پرومگا-آمریکا) به ترتیب به عنوان وکتور های میزبان و کلونینگ استفاده شدند. کشت باکتری در یک محیط (LB) لوریا برتانی (تریپتون 10 گرم بر لیتر، عصاره مخمر 5 گرم بر لیتر، سدیم کلرید 10 گرم بر یتر، اسیدیته 7) مکمل سازی شده با 100 میلی گرم بر لیتر امپی سیلین، 160 میکرو گرم بر میلی لیتر X-gal و 0.5 میلی مول IPTG(ایزوپروپیل b-D-1—تیوگلاکتوپیرانوزید) انجام شد.لیگاز T4 DNA، نشانگر اندازه DNA و آنزیم های محدود کننده EcoRI, XbaI و ApaI از اینویتروژن- ایالات متحده خریداری شدند. کیت تخلیص QIAquick PCR و DNA پلیمراز از شرکت کلونتک آمریکا و QIAgen آلمان خریداری شد.

سرب مداد(نوع 4B)، که متشکل از گرافیت طبیعی، یک بایندر(سیمان) پلیمری و رس با درصد های متفاوت است، به عنوان الکترود گرافیت مدادی استفاده شد(PGE).

الیگنوکلوئوتید عاری از گرانیت 23-mer (, 50-ATI CAC CAA AAI AIA ACT ICA AT-30) خریداری شده از فناوری های DNA یکپارچه-USA) متناظر با رشته سنز ژن HPV 16 E6 به عنوان پروب HPV استفاده شد.

محلول های الیگونوکلوئوتید و محلول های رقیق پلازمید ها برای بافر استات 0.5 مول (اسیدیته 5) تهیه شده و به منجمد شدند.

2-2 ساخت باکتری های نوترکیب

وکتور pBR322 حاوی ژن HPV 16 به عنوان بستر اصلی برای ساخت pGEM-T استفاده شد.تکثیر E6 با استفاده از 20 ng DNA انجام شد: 10 pmol از پرایمر ویژه: FE6EcoRI (5-GCT GAA TTC ATG CAC CAA-30) و RE6XbaI (50CGT TCT AGA ATC AGC TGG GT-30) 2.5 میکرو لیتر بافر تگ پلاتینوم

sina-pub.ir

*10، 0.5 میکرو لیتر (5 U/lL) Platinum TaqPol ، 0.5 lL MgCl2 (50 mM)، 0.5 lL dNTP (40 lM)

.

تکثیر در Rotor Gene 6.0(بیوسیستم های کاربردی- آمریکا) با شرایط زیر انجام شد: 95 درجه به مدت 1 دقیقه و پس از آن 40 دور در 95 درجه به مدت 30 ثانیه، 68 درجه به مدت 20 ثانیه(تاچ داون در 5 دور) و 72 درجه به مدت 1 دقیقه و با 72 درجه به مدت 1 دقیقه انجام شد. محصولات تکثیر شده در معرض الکتروفورز در ژل قرار گرفتند(سامبروک 1989) و با کیت تکثیر QIAquick PCR تخلیص شدند.

آمپلیکون E6 به pGEM-T بر اساس دستور العمل های تولید کننده کلون شد. وکتور در سلول های DH5a اکولای با شوک حرارتی ترانسفورم شده و در 37 درجه به مدت 16 ساعت انکوبات شد(سامبروک و همکاران 1989). کلنی های نوترکیب حاوی pGEM-T از طریق محیط مقاومت به آمپی سیلین شناسایی شدند. پلازمید از کلنی های نوترکیب مثبت با لیز قلیایی استخراج شده و سپس با الکتروفورز در ژل اگاروز(سامبروک و همکاران 1989) تحلیل شد. آنزیم های محدود کننده XbaIوEcoRI برای آزاد سازی ژن E6 از pGEM-T/E6 استفاده شده وApaI برای خطی سازی وکتور نوترکیب استفاده شد.

توالی ژن E6 با استفاده از DYEnamic ET Dye Terminators در یک سیستم توالی یابی DNA خودکار (MegaBACE 750, GE, Life Science – USA) تایید شد. الکتروفورگرام با استفاده از الگوریتم بیس کالینگ با نرم افزار آنالیزور توالی (GE, Life Science – USA) تجزیه تحلیل شد. توالی بدست آمده به BLASTN(مرکز ملی NCBI اطلاعات بیوتکنولوژی) برای مقایسه با توالی ژنی E6 موجود در دیتابانک NCBI ارسال شد.

3-2 لوازم و دستگاه ها

آزمایشات الکتروشیمیایی با استفاده ازAUTOLAB PGSTAT 30 (METROHM AUTOLAB(هلند) و بسته نرم افزاری GPES 4.9 انجام شد. سیگنال های ولتامتریک با استفاده از یک سیستم متشکل از دو الکترود اندازه گیری شدند(رانکیانن و همکاران 2010، وانگ و همکاران 2008). گرافیت مداد به عنوان یک الکترود کاری استفاده شد و Ag/AgCl به عنوان یک الکترود مرجع استفاده شد. الکترود کاری دارای سطح مقطع 28 میلی متر مربع بود که برابر با سطح الکتروشیمیایی است. الکترود کاری با یک دیسک اشباع شده با سنگ سنباده

sina-pub.ir

برای ایجاد یک سطح هموار، صیقل داده شد.الکترود مرجع با چاپ اسکرین در مرکب نقره – (ELECTRODAG Acheson – USA) بر روی سیم طلا تولید شده و سپس در دمای 60 دقیقه خشک شد.

2-4 فعال سازی PGE

فعال سازی الکتروشیمیایی PGE صیقلی شده با استفاده از پتانسیل ثابت +1.8 ولت در محلول بافر استات 0.5 مول، بدون هم زنی به مدت 5 دقیقه(حجازی و همکاران 2007، پورنقی اذر و همکاران 2006، سوزا و همکاران 2011) انجام شد.

2-5 تثبیت پروب بر روی PGE

تثبیت پروب بر روی PGE فعال سازی شده با استفاده از پتانسیل ثابت +0.5 ولت به مدت 5 دقیقه در محلول بافر استات 0.5 مول، بدون هم زنی انجام شد(حجازی و همکاران 2007، پورنقی –اذر و همکاران 2006، سوزا و همکاران 2011).

2-6 هیبریدیزاسیون

محلول های رقیق pGEM-T/E6 هضم نشده در 95 درجه به مدت 5 دقیقه دناتوره شده و سپس در حمام یخ به مدت 1 دقیقه غوطه ور شد(حجازی و همکاران 2008).هیبریدیزاسیون با غوطه ور سازی PGE اصلاح شده با پروب در لوله اپندورف حاوی 70 میکلو لیتر محلول های رقیق سازی شده pGEM-T/E6 هضم نشده در دمای 55 درجه به مدت 5 دقیقه انجام شد. پروتوکل مشابه برای هیبریدیزاسیون پروب با هدف غیر تکمیلی(pGEM-T/E7 هضم نشده)، هدف ترکیب(pGEM-T/E6 هضم نشده و pGEM-T/E7 هضم نشده)و در محلول بلانک که متشکل از استات بافر 0.5 مول بود(اسیدیته5) استفاده شد.

2-7 اندازه گیری های الکتروشیمیایی

رفتار الکتروشیمیایی سطح PGE با استفاده از روش ولتامتری پالس تفاضلی(DPV) در بافر 20 mM Tris– HCl(PH 7) (حجازی و همکاران 2007، پورنقی-اذر و همکاران 2006، پورنقی اذر و همکاران 2009، سوزا و همکاران 2011) مطالعه شد. اسکن پتانسیل الکترود بین 0.3 V+ و 1.2 V+ در بزرگی پالس 50 Mv و نرخ اسکن 20 mV s نگه داشته شد. نتایج با استفاده از نرم افزار GPES و اصلاح معیار میانگین متحرک با استفاده از عرض پیک 0.01 پردازش شد. همه آزمایشات در سه تکرار در دمای اتاق(23 درجه) انجام شدند.

sina-pub.ir

8-2 تحلیل آماری

داده های آزمایشی با استفاده از نرم افزار STATISTICA 8 تحلیل شدند. تحلیل واریانس یک سویه ANOVA برای تعیین وجود تفاوت های اماری بین نمونه ها و سپس تست پارامتریک پاست هاک توکی انجام شد(چان 2003، موناگومی 2000، توکی 1991). مقدار P کم تر از 0.05 به صورت معنی دار در نظر گرفته شد.

3-نتایج و بحث

1-3 ساخت پلازمید نوترکیب pGEM-T/E6

وکتور pBR322 حاوی ژنوم کامل HPV16 به عنوان DNA الگو برای تکثیر ژن E6 استفاده شد. پرایمر های مورد استفاده برای تکثیر حاوی مکان های محدود کننده اندو نوکلئاز مناسب برای کلونینگ پسین در وگتور FE6EcoRI)و(RE6XbaI) بود. محصول PCR(آمپلیکون E6) با استفاده از الکتروفورز در ژل قطعه بندی شد. حضور باندDNA 477 bp تکثیر ژن E6(شکل S1-A در اطلاعات تکمیلی) را تایید کرد. آمپلیکون E6 برای تایید صحت تکثیر توالی یابی شد. توالی یابی نوکلئوتید به برنامه BLAST(NCBI) ارسال شده و تشابه 100 درصدی را با توالی E6 16 HPV در ژن بانک داشت.

DNA تکثیر شده(آمپلیکون E6) به Pgemt متصل شده و محصولات واکنش لیگشن(پیوند) (pGEM-T/E6) برای تبدیل سلول های E. coli DH5a استفاده شد.pGEM-T پلازمید حاوی ژن هایی است که مقاومت را به امپلیکون ارایه می کند.(باری مون و همکاران 2009). از این روی، باکتری ها بر روی محیط LB جامد مکمل سازی شده با آمپیسیلین برای فراهم اوردن امکان رشد، پلیت شدند. کلونی های باکتریایی رشد یافته نشان داد که این باکتری ها درون پلازمید قرار کرفته اند. پلازمید استخراج شده از کلونی های مثبت در معرض هضم آنزیمی قرار گرفتند. هضم پلازمید با XbaIوEcoRI ، حضور DNA افزوده شده(477 bp) در pGEM-T/E6 را تایید کرد. بر طبق الکتروفورز در ژل، pGEM-T/E6 حاوی افزایش مطلوب (3495 bp) بود زیرا قطعه ژن E6 مشاهده شده بر روی ژل تقریبا 477bp بود و وکتورpGEM-T دارای طول تقریبا 3,018 bp بود(شکل S1-B در اطلاعات تکمیلی).

2-3 تشخیص الکتروشیمیایی pGEM-T/E6

1-2-3 اثر پیش تیمار بر روی سطح PGE

sina-pub.ir

شکل S2(اطلاعات تکمیلی) ولتاموگرام های DPV موجود در 20 میلی مول بافر Tris–HCl برای PGE غیر فعال، پروب تثبیت شده E6 بر روی PGE غیر فعال، PGE فعال و پروبE6 تثبیت شده بر رویPGE فعال را نشان می دهد.

سطح الکترود با استفاده از پتانسیل 1.8 V+ به مدت 5 دقیقه برای دست یابی به سیگنال تحلیلی پایدار و حساس تر پیش تیمار شد(حجازی و همکاران 2007، پورنقی اذر و همکاران 2006، سوزا و همکارا 2011). سپس، پروب اصلاح شده با اینوزین(بدون گوانین) بر روی PGE فعال و غیر فعال تثبیت شد. تثبیت پروب بر روی سطح الکترود با جذب انجام شد که به صورت ساده ترین روش برای تثبیت DNA در نظر گرفته می شود زیرا نیازمند معرف های خاص یا تغییرات اسید نوکلئیک نیست(پیویدوری و همکاران 2000، سوزا و همکاران 2011).

سیگنال اکسیداسیون اینوزین حدود 0.7 V+ بود که از گوانین (0.9 to +1.07 V+) تفکیک شد(برتی و همکاران 2009، پالکک 1960، توزار و همکاران 2010، وانگ و همکاران 1998، 2001، وانگ و زو 2002). اینوزین یک باز است که به طور طبیعی در دی ان ای یافت نمی شود با این حال می تواند با سیتوزین همانند گوانین، یک جفت باز را تشکیل دهد(توزار همکاران 2010). این واقعیت را باید در زمان انجام تشخیص بر اساس سیگنال اکسیداسیون گوانین در نمونه های واقعی در نظر گرفت(توزار و همکاران 2010).

همان طور که در شکل S2 نشان داده شده است، تفاوت معنی داری در میان پیک های فعلی الکترود لخت غیر فعال، الکترود لخت فعال و الکترود غیر فعال اصلاح شده با پروب مشاهده شد. اگرچه سیگنال الکترود فعال اصلاح شده با پروب به طور معنی داری بزرگ تر از سیگنال های سه الکترود دیگر بودند واین نشان می دهد که پروب به طور موفق بر روی سطح الکترود فعال تثبیت شد.

این نتایج به وضوح نشان می دهد که کاربرد پتانسیل (1.8 V+) بر روی سطح PGE یک اثر مثبت را بر روی جذب الیگو نوکلوتید ها اعمال می کند(سوزا و همکاران 2011). پیش تیمار سطح کربن موجب افزایش زبری و آب دوستی آن شده و به این ترتیب موجب تسهیل جذب الکترود ها به DNA می شود(پیویدوری و همکاران 2000، سبزی و همکاران 2008، سوزا و همکاران 2011، وانگ و همکاران 1996). به این ترتیب همه آزمایشات بر روی PGE فعال انجام شدند.

sina-pub.ir

3-2-2 اثر غلظت پروب

اثر غلظت پروب در شکل 1 نشان داده شده است. غلظت های مختلف پروب E6 (125–2,000 nM) بر روی سطح الکترود کاری فعال با استفاده از پتانسیل ثابت 0.5 V+ در بافر استات(اسیدیته 5) به مدت 5 دقیقه تثبیت شد(حجازی و همکاران 2007، پورنقی اذر و همکاران 2006، سوزا و همکاران 2011). این پتانسیل موجب بهبود پایداری پروب تثبیت شده بر روی سطح کربن می شود زیرا موجب افزایش جذب الکترواستاتیک بین سطح کربن با بار ثابت و بستر پروب فسفات-قند آب دوست با بار منفی می شود.(پالک و همکاران 1998، سوزا و همکاران 2011).

همان طور که در شکل 1 نشان داده شده است، جریان پیک به طور معنی داری با افزایش در غلظت پروب افزایش می یابد. نتایج نشان می دهد که جریان پیک اکسیداسیون از(71 ± 1 nA) 125 nM تا 1,000 nM (500 ± 8 nA) افزایش یافت.در غلظت 2000 نانومول، یک کاهش در این جریان پیک دیده شد (271 ± 7 nA). این را می توان با انباشت پروب بر روی الکترود گرافیت توجیه کرد که می تواند منجر به توسعه پروب های هم پوشان شود(پورنقی اذر و همکاران 2006) و کاهش قابلیت دسترسی باز های اینوزین را درپی خواهد داشت.

آزمون پارامتریک ANOVA و پس از آن آزمون توکی برای مقایسه داده ها با سطح معنی داری $p < 0.05$(چان 2003، مونتگومی 2000، توکی 1991) انجام شد. نتایج نشان داد که تفاوت های معنی دار آماری بین غلظت 500 و 1000 نانومول وجود نداشت. از این روی غلظت 500 نانومول به صورت یک غلظت بهینه برای تثبیت بر روی الکترود های فعال انتخاب شد.

3-2-3 تشخیص هیبریدیزاسیون

بیوسنسور های هیبریدیزاسیون الکتروشیمیایی را می توان به طور بالقوه در تشخیص DNA استفاده کرد(توزار و همکاران 2010). آن ها موجب کاهش مقدار زمان و ساده سازی پروتوکل های تست های مختلف شده و در نهایت تسهیل توالی یابی اسید نوکلئیک خاص را در پی دارد(کامپوس فریرا و همکاران 2013، گیروسی و کینیگپولو 2010، ناسیمنتو و همکاران 2012، تانگ و همکاران 2009). هیبریدیزاسیون DNA بر اساس توانایی

sina-pub.ir

ssDNA برای تشخیص توالی DNA مکمل آن بوده و تشکیل هیبرید DNA می دهد(کامپوس فریرا و همکاران 2013، ناسیمنتو و همکاران 2012، وانگ و همکاران 2008).

شکل 2 تشخیص الکتروشیمیایی هیبریدیزاسیون DNA بدون برچسب را با روش DPV نشان می دهد. پس از تثبیت پروب بر روی PGE فعال، الکترود اصلاح شده در یک میکروتیوب حاوی DNA هدف دناتوره(pGEM-T/E6 هضم نشده) غوطه ور شد. هیبریدیزاسیون به طور مستقیم از طریق سیگنال های اکسیداسیون گوانین موجود در توالی پلازمید شناسایی شد. تشخیص بدون برچسب یک روش جذاب برای تشخیص واکنش هیبریدیزاسیون است زیرا موجب حذف مرحله افزایش اندیکاتور شده و پروتکل سنجش را تسهیل می کند(لابودا و همکاران 2010، واگین و همکاران 2003، 2008، وانگ و همکاران 1999).

ولتاموگرام برای PGE اصلاح شده با پروب پس از هیبریدیزاسیون با هدف DNA دناتوره نشان داد که افزایش معنی دار 15 برابری در جریان پیک اکسیداسیون گوانین وجود دارد. این افزایش جریان پیک بیانگر رویداد هیبریدیزاسیون بر روی سطح الکترود است.

3-2-4 عملکرد تحلیلی سنسور

در ابتدا، آزمایشات کالیبراسیون برای ارزیابی عملکرد تحلیلی سنسور انجام شد. تاثیر غلظت پلازمید بر روی سطح PGE با سیگنال های اکسیداسیون گوانین مشاهده شد.

غلظت های مختلف (40–15,000 pg/lL) pGEM-T/E6 هضم نشده بر روی سطح الکترود اصلاح شده هیبرید شده و سپس سیگنال اکسیداسیون گوانین با استفاده از DPV(شکل 3) بدست آمد.

جریان پیک با افزایش در غلظت پلازمید افزایش یافته و به مقدار ماکزیمم در یک غلظت 5,000 pg/Ll(158 ± 11 nA تا 480 ± 28 nA) رسید. با این حال وقتی که غلظت به 15,000 pg/lL رسید، کاهشی در سیگنال اکسیداسیون (204 ± 21 nA)) وجود داشت.این کاهش را می توان به اشباع مکان های سطحی هیبریدیزاسیون نسبت داد که ناشی از یک بازدارندگی استری و الکترواستاتیکی در باز های DNA بود(اردم و همکاران 2006، حجازی و همکاران 2010، وانگ و کاود 2001، وانگ و ملوش 2010). از این روی 5,000 pg/ lL pGEM-T/E6 ماکزیمم غلظت مجاز برای تشکیل هیبرید بر روی سطح الکترود اصلاح شده بر روی پروب است.

sina-pub.ir

همان طور که در شکل 3 نشان داده شده است، سیگنال تا 5,000 pg/Ll، با یک ضریب تبیین 0.99327 برای هدف مکمل خطی بود. معادله رگرسیون 171.58+ (pg/lL) 0.0616C = (nA) بود. آستانه تشخیص روش 16 pg/lL بود که با معادله $3\sigma/a$ براورد شد که در آن σ انحراف معیار محلول بلانک و a شیب رگرسیون خطی بود(اسکوگ و همکاران 1998). آستانه تشخیص به صورت کم ترین سطح غلظت آنالیت نوصیف شد که تولید یک پاسخ قابل تشخیص بالاتر از سطح نویز سیستم می شود(ارمبارستر وپری 2008).جدول 1 آستانه های تشخیص سنسور های DNA الکتروشیمیایی(بر اساس تشخیص با برچسب و بدون برچسب) را نشان می دهد. همان طور که در جدول 1 نشان داده شده است، سنسور پیشنهادی دارای آستانه تشخیص پایین مشابه با سایر سنسور های DNA است.

انحراف معیار نسبی RSD در سه الکترود اصلاح شده با پروب مستقل اندازه گیری شده در 300 pg/Ll هدف برابر با 3 پروب بود و نشان می دهد که این غلظت موجب افزایش صحت روش تشخیص می شود. از این روی، غلظت 300 pg/lL برای تحقق مطالعه رفتار انتخابی انتخاب شد.

3-2-5 مطالعه رفتار انتخابی در شرایط بهینه

آزمایشات شاهد با هدف غیر مکمل(pGEM-T/E7 هضم نشده) وترکیب اهداف مکمل و غیر مکمل برای ارزیابی این که آیا سنسور DNA پیشنهادی به طور انتخابی به هدف پاسخ می دهد یا خیر انجام شدند.

خمان طور که در شکل 4 دیده می شودف اثر متقابل بین پروب تثبیت شده و هدف غیر مکمل منجر به افزایش معنی داری در سیگنال اکسیداسیون گوانین نشد. این نتایج نشان می دهد که هیبریدیزاسیون هدف غیر مکمل بر روی پروب تثبیت شده بر روی PGE وجود نداشت.

از سوی دیگر، اثر متقابل بین هدف ترکیبی و پروب تثبیت شده منجر به افزایش معنی داری در سیگنال اکسیداسیون گوانین مشابه با pGEM-T/E6(هدف مکمل) می شود و این نشان می دهد که وقتی هدف مکمل در نمونه وجود داشته باشد، هیبریدیزاسیون رخ می دهد. با این حال، سیگنال گوانین به طور خفیفی به دلیل وقوع هیبریدیزاسیون جزیی بین هدف و هدف غیر مکمل در محلول ترکیب آن ها کاهش می یابد. این اثرات متقابل منجر به کاهش خفیفی در قابلیت دسترسی و هیبریدیزاسیون بین پروب تثبیت شده و هدف می شود(پورنقی اذر و همکاران 2006، رئوف و همکاران 2009).

sina-pub.ir

این داده نشان می دهد که این بیوسنسور قادر به تمایز بین هدف مکمل و غیر مکمل می باشد. حضور نمونه های غیر مکمل منجر به تداخل در خاص بودن بیوسنسور نشد.

3-3 تحلیل بیوسنسور در برابر الکتروفورز برای تشخیص اسید نوکلئیک

عملکرد تشخیص DNA الکتروشیمیایی با روش استاندارد الکتروفورز مقایسه شد. نمونه های غلظت های مختلف پلازمید هضم نشده و پلازمید خطی برای 45 دقیقه در 80 ولت بر روی ژل اگاروز 1 درصد استاندارد با لکه گذاری بروید اتیدیوم الکتروفورز شد(شکل 5).

همان طور که می توان در شکل 5 دید، روش الکتروفورز قادر به تشخیص حضور ژن E6 در pGEM-T/ E6 هضم نشده نیست. با این حال، حتی با پلازمید خطی، تشخیص E6 تنها با غلظت پلازمید حداقل 60,000 pg/Ll امکان پذیر بود. به منظور تشخیص حشور ژن E6 در غلظت های پایین، انتقال نمونه ها به تکثیر با واکنش زنجیره پلی مراز(شکل S3 در اطلاعت مکمل) لازم بود که موجب پر هزینه تر شدن روش الکتروفورز می شود(سینگ و همکاران 2010). از سوی دیگر، بیوسنسور پیشنهادی قادر به تشخیص حضور ژن E6 در پلازمید هضم نشده با غلظت آغازین 40 pg/Ll بدون نیاز به تست تکثیر PCR(شکل 3) است.

الکتروفورز ژل آگاروز یک روش استاندارد برای تفکیک، شناسایی، مطالعه و تخلیص قطعات DNA می باشد. این روش مستلزم استفاده از دستگاه تخصصی و معرف های سمی و موتاژنیک نظیر برچسب گذاری برومید اتیدیوم می باشد(کرسانوف و همکاران 2010، سینگر وهمکاران 1999، زانگ و همکاران 2008).

محدودیت اصلی این روش، حساسیت پایین آن است. مطالعات نشان می دهند که تشخیص DNA با روش استاندارد الکتروفورز تنها در غلظت های آغازین از نانوگرم امکان پذیر است(گارمان و ویلیامسون 1989، یامائوچی و همکاران 2008). به علاوه، این روش امکان تایید توالی DNA را ارایه نمی کند(النیس و همکاران 2008). با این حال اندازه DNA می تواند منجر به نتایج خطا در قطعات بااندازه مشابه شود(پورنقی اذر و همکاران 2008). مشکل دیگر، تحلیل DNA پلازمید هضم نشده است. به دلیل انطباق پلازمید بایستی با انزیم خطی سازی قبل از قرار گیری بر روی ژل خطی سازی شود. با این حال این روش موجب افزایش هزینه روش می شود.

داده ها نشان می دهند که بیوسنسور نسبت به روش استاندارد الکتروفورز حساس تر بود. با این دستگاه الکتروشیمیایی، امکان تشخیص حضور DNA در غلظت 1500 برابر کم تر از روش الکتروفورز وجود داشت بدون

sina-pub.ir

این که نیازی به استفاده از انزیم های محدود کننده و تکثیر PCR برای تحلیل وجود داشته باشد. به علاوه با این بیوسنسور، امکان تایید توالی هدف کلون شده بر روی پلازمید وجود دارد زیرا از رویداد هیبریدیزاسیون برای تشخیص توالی DNA استفاده می کند.

4-نتیجه گیری

این مقاله، توسعه بیوسنور الکتروشیمیایی بدون برچسب را برای تشخیص ژن HPV E6 به pGEM-T پلازمید گزارش می کند. تحت شرایط بهینه، سیگنال الکتریک دارای رابطه خطی با غلظت DNA هدف متغیر از 40 تا 500 $pg/\mu L$ بود. آستانه تشخیص بیوسنسور 16 $pg/\mu L$ بودو آزمایشات با هدف غیر مکمل(ژن e7 در pGEM-T) رفتار انتخابی بیوسنسور را در تشخیص ژن E6 در pGEM-T تایید کرد.

روش الکتروشیمیایی حساسیت و رفتار تخصصی و گزینشی بالایی را در مقایسه با روش استاندارد الکتروفورز نشان داد. بیوسنسور قادر به تشخیص حضور DNA در یک غلظت 1500 برابر کم تر از الکتروفورز سنتی بود.

توسعه روش های جایگزین که دارای حساسیت زیادی برای تشخیص DNA است، مطلوب است. روش پیشنهادی، عملکرد خوبی را برای تشخیص حضور یک قطعه DNA کلون شده در وکتور های بیان کننده نشان داد.