

بیوسنسور حساس DNA تولید شده با نانوذرات طلا/پلی (پی-آمینو بنزوئیک

اسید) / الکتروود اصلاح شده با نانولوله های کربنی

چکیده

در این مطالعه، ما اقدام به تولید بیوسنسور دی ان ای الکتروشیمیایی حساس برای تشخیص دی ان ای هدف کردیم. اسید آمینو بنزوئیک بر روی سطح الکتروود کربن شیشه ای اصلاح شده با نانولوله های کربن چند دیواره با گروه های اپوکسی توسط ولتامتری سیکلیک، تحت الکتروپلیمریزاسیون قرار گرفت. نانوذرات طلا به درون سطح فیلم کامپوزیت PABA-MWNT با حالت رسوب الکتروشیمیایی قرار گرفت. دی ان ای پروب بر روی سطح AUNP از طریق پیوند Au-S تثبیت شد. میکروسکوپ الکترونی نگاره، ولتامتری سیکلیک و طیف های امپدانس الکتروشیمیایی برای بررسی فرایند مونتاژ فیلم استفاده شد. ولتامتری پالس دیتفرانسیل برای پایش رویداد هیبریداسیون دی ان ای با اندازه گیری ادریامیسین استفاده شد. تحت شرایط بهینه، افزایش جریان پیک ادریاماسین با لگاریتم غلظت الیگو نوکلئوتید مکمل از 1.0×10^{-12} تا 5.0×10^{-9} M با حد تشخیص 3.5×10^{-13} مول، به صورت خطی بود. این بیوسنسور دی ان ای، دارای قابلیت و صحت خوبی است.

لغات کلیدی: بیوسنسور دی ان ای، نانولوله های کربن چند دیواره، نانوذرات طلا، الکتروپلیمریزاسیون، رسوب الکتروشیمیایی

1- مقدمه

تشخیص ویژه توالی اهداف اسید نوکلئیک در تشخیص بیماری، فیلتر دارویی، پیش گیری از بیماری و حفاظت زیست محیطی اهمیتی روز افزون دارد (1.2). روش های مختلفی برای تشخیص دی ان ای هدف گزارش شده اند از جمله، روش الکتروشیمیایی، میکروبالانس بلور کوارتز، رادیویی و شیمیایی. در این میان، سنسور های دی ان ای به دلیل حساسیت بالا، ابعاد کم و هزینه کم، توجه زیادی را به خود جلب کرده اند. تا به امروز، روش های زیادی در تشخیص الکتروشیمیایی هیبریداسیون دی ان ای (3-6) گزارش شده است. این سنسور ها با استفاده

از شاخص های الکترواکتیو (7-11)، از طریق تشخیص آنزیمی (12)، تگ های ردوکس با پیوند کوالان به الیگومر های دی ان ای تک رشته ای (13-17)، نانوذرات (18-20) و سیگنال های تقویت شده مهره های الکترو اکتیو (21) تشکیل شده اند. فناوری تشخیص این سنسور ها به طور کلی DPV (22)، EIS (23 و 24)، ولتامتری آندی (25، 26)، و کرنوکولومتری (CC) است (27). اخیراً، ارزیابی های زیادی در مورد این رشته گزارش شده است (28-34).

همان طور که می دانیم، تثبیت پروب های دی ان ای بر روی سطوح الکتروود، یکی از مراحل کلیدی در توسعه دی ان ای است. اثبات شده است که عملکرد سنسور دی ان ای (حساسیت، انتخاب گرای و پایداری) وابسته به خصوصیات پروب های دی ان ای تثبیت شده است. چندین روش برای تثبیت پروب های دی ان ای بر روی سطح الکتروود گزارش شده است از جمله جذب فیزیکی، کراس لینک، و پلی مریزاسیون الکتروشیمیایی. چون پلیمریزاسیون الکتروشیمیایی می تواند ضخامت، تراوایی و خصوصیات انتقال بار با تعدیل پارامتر های الکتروشیمیایی کنترل کند. از این روی، پلیمریزاسیون الکتروشیمیایی یکی از رویکردهای تثبیت پروب های دی ان ای نظیر پلی پیرول (24) بوده و پلیمر ها، برای بیوسنسور های با زمان پاسخ سریع، حساسیت بالا و چند کاره بودن ماتریکس بسیار مناسبی هستند (35 و 36).

نانولوله های کربنی نانومواد نوینی هستند که یک بستر و پشتیبان ایده آل برای تولید حسگر های الکتروشیمیایی است. حسگر های مبنی بر نانولوله های کربنی حساسیت و انتخاب پذیری خوبی را نشان داده اند. اخیراً، مواد کامپوزیت بر اساس ترکیب نانولوله های کربنی و پلیمر ها، توجه زیادی را به خود جلب کرده اند زیرا آن ها دارای خصوصیات هر جز با یک اثر هم افزایی است. جیائو و همکاران، چندین بیوسنسور دی ان ای الکتروشیمیایی مبتنی بر الکتروود اصلاح شده با فیلم کامپوزیت نانولوله کربنی-پلیمر، از جمله، PDDA/poly (2,6-pyridinedicarboxylic acid)-MWCNTs (37)، فیلم Poly(l-lysine)/SWCNT (38) گزارش کردند. قبلاً، ما بیوسنسور دی ان ای مبتنی بر الکتروود اصلاح شده با فیلم Agnano/PPAA/CNT تولید کردیم (39). این بیوسنسور های دی ان ای، انتخاب و حساسیت خوبی را نشان می دهند.

پی-آمینوبنزویک اسید حاوی اتم N غنی از الکترون و تراکم الکترون بالای گروه کربونیل می باشد و به آسانی بر روی الکتروود کربن شیشه ای توسط CV پلیمریزه می شود. جین و همکاران، از الکتروود اصلاح شده poly (p- ABA) برای بررسی مدل جانوری پارکینسون آزمایشی استفاده کردند. این الکتروود اصلاح شده با فیلم پلیمری برای تشخیص دوپامین در حضور اسید اسکوربیک استفاده شده است(41)/

در مطالعه ی گذشته ما یک بیوسنسور DNA حساس مبتنی بر الکتروود اصلاح شده با فیلم کامپوزیت PABA/MWCNT تولید کردیم. در ابتدا ابسیسیک اسید بر روی سطح GCE اصلاح شده با MWCNT توسط CV الکترو پلیزه شد. AuNPs ها بر روی سطح پلیمر MWCNT توسط فرایند رسوب دهی الکترو شیمیایی قرار داده شدند. سوما DNA پروب بر روی سطح AuNPs از طریق پیوند Au-S تثبیت شد. DVP برای تشخیص رویداد های هیبریداسیون با استفاده از ادیراماسین به عنوان یک ساخص الکترو اکتیو استفاده شد. نتایج آزمایش افزایش پیک ادیراماسین را به صورت خطی با لگاریتم غلظت الکترونوکلئوتید های مکمل از 1.0×10^{-12} تا 5.0×10^{-9} با حد تشخیص 3.5×10^{-13} M نشان داد. روش پروب تثبیت DNA و هیبریدیزاسیون با الیگو نوکلئوتید هدف در طرح های 1 و 2 نشان داده شده است.

2. آزمایش

2.1 معرف ها

ادیروماسین هیدروکلرید از موسسه ی ملی کنترل محصولات دارویی و بیولوژیکی به دست آمد اسید p- Aminobenzoic از شرکت تولید معرف های شیمیایی گویایو خریداری شد و سولفات دودسیل سدیم از شرکت الفا اسار چین خریداری شد. الیگو نوکلئوتید های شامل موارد زیر بودند:

الیگونوکلئوتید های پروب: 5'-AAG CGG AGG ATT GAC GAC TA-3' SH-(CH₂)₆-

الیگونوکلئوتید های مکمل: 5'-TAG TCG TCA ATC CTC CGC TT-3'

الیگونوکلئوتید های غیر مکمل: 5'-AAG CGG AGG ATT GAC GAC TA-3'

الیگونوکلوئوتید های غیر منطبق 3 بازی: 5'-TAG ACG TCA TTC CTC CCC TT-3'.

2.2 ابزار و روش ها

ازمایش های CV و DVP در یک ایستگاه الکترو شیمیایی CHI 660A صورت گرفت. پیکر بندی 3 الکترودی سنتی از طریق آزمایش صورت گرفت طوری که در بر گیرنده ی یک الکترو د کاری، الکترو د کمکی سیم پلاتینوم و الکترو د کالومل اشباع بود. همه ی اندازه گیری در 10 میلی لیتر سلول الکترو لیت با 5 میلی لیتر محلول انجام شد که از اکسیژن با نیتروژن خلوص بالا به مدت 20 دقیقه تخلیص شد. همه ی اندازه گیری ها در دمای اتاق انجام شدند. مه ی پتانسیل های موجود در مقاله اشاره به SEC دارند. ریخت شناسی MWCNTs، PABA/MWCNT، AuNPs/PABA/MWCNT ها با (SEM, JEOLJSM-6700F) انجام شدند.

اندازه گیری های EIS در حضور ترکیب $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6] (1:1)$ به صورت پروب ردوکس در فرکانس بین 1 تا 10 به توان 5 هرتز در پتانسیل +0.15 V انجام شدند. دامنه ی ولتاژ 5 میلی ولت بود.

2.3 تهیه ی الکترو د اصلاح شده با ssDNA /Au_{nano}/PABA/MWCNTs

قبل از اصلاح GCE خالی (با قطر 3 میلی متر) با سوسپانسیون الومنیوم گاما صیقل دهی شد سپس با اب مقطر دو بار اب کشی شده و در اتانول و اب به مدت 3 دقیقه باقی ماند. در نهایت الکترو د به طور الکترو شیمیایی از -1.2 V in pH 7.0 PBS to +1.2 V به مدت 10 بار برای هر 3 ناخالصی ها پاک سازی شد.

در 10 میلی لیتر اتانول اندروز با کمک محلول اولتراسونیک منتشر شد. سپس یک نمونه ی 10 میکرو لیتری از پوسپانسیون بر روی سطح GCE قرار گرفت و سپس در دمای اتاق برای تشکیل فیلم MWCNT خشک شد. سپس در اب به مدت 5 دقیقه برای خارج کردن MWCNT جذب شده غوطه ور شد. الکترو پلیمریزاسیون اسیلیک اسید توسط اسکن پتانسیل سایکلک از -1.5 تا 2.5 V به مدت 10 بار با نرخ اسکن 100 mV s

-1 در pH 7.0 PBS قرار داده شد. الکترو حاصله به صورت PABA/MWCNTs/GCE نامیده شد.

رسوب الکترو شیمیایی طلا در $3.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ محلول $\text{HAuCl}_4/0.1 \text{ M NaNO}_3$ و PABA/MWCNTs/GCE و زمان رسوب دهی الکتروشیمیایی 25 ثانیه در -200 mV انجام شد (42). الکتروود حاصله به صورت $\text{Au}_{\text{nano}}/\text{PABA}/\text{MWCNTs}/\text{GCE}$ نام گذاری شد.

تثبیت پروب DNA به صورت زیر بود: پروب DNA $4 \mu\text{l of } 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ قرار داده شد و سپس در دمای 4 درجه خشک شد. بعد از آن الکتروود اصلاح شده با پروب در محلول $0.1\% \text{ SDS}$ به مدت 10 دقیقه. برای خارج کردن DNA پروب تثبیت شده اضافه شد. الکتروود اصلاح شده با پروب به صورت $\text{ssDNA}/\text{Au}_{\text{nano}}/\text{PABA}/\text{MWCNTs}/\text{GCE}$ معرفی شد.

2.4 تشخیص الکترو شیمیایی هیبریدزاسیون DNA

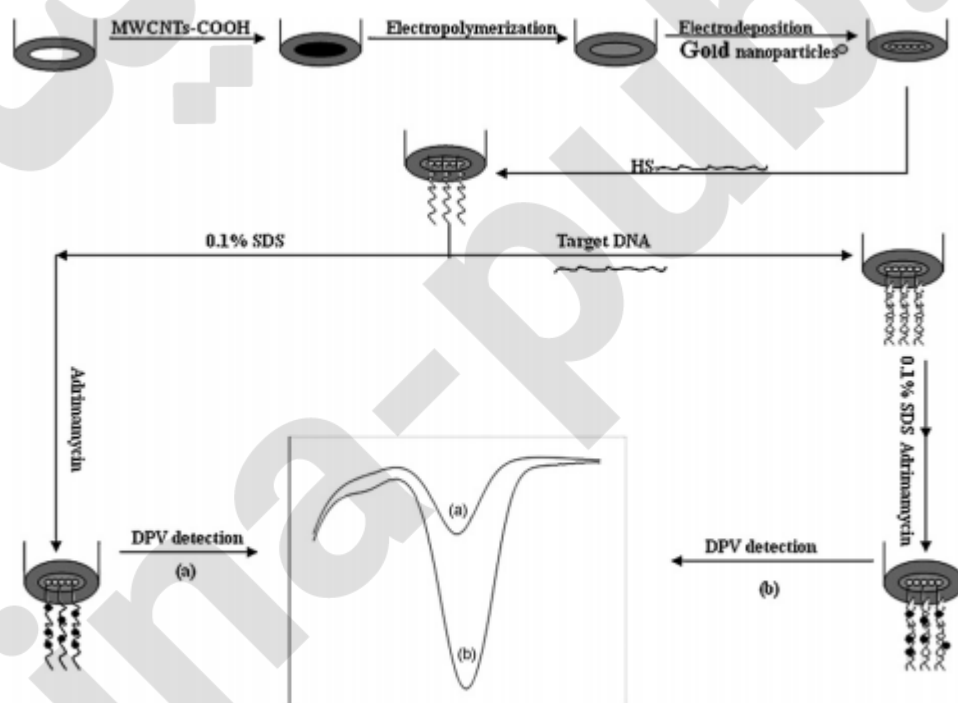
واکش هیبریدزاسیون با غوطه ور کردن الکترون اصلاح شده با DNA پروب در محلول 0.1 PBS مول حاوی غلظت های مختلف DNA هدف به مدت 40 دقیقه در 37 درجه انجام شد. الکتروود هیبرید شده در 0.1 درصد Sds به مدت 10 دقیقه برای حذف ssDNA غیر هیبرید شده غوطه ور شد. سپس در محلول 0.1 pbs ادریاماسین $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ به مدت 35 دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و سپس با اب 7 PBS به مدت 3 بار برای حذف ادریاماسین جذب شده ی فیزیکی غوطه ور شد.

هیبریدزاسیون DNA با جریان پیک DPV ادریاماسین در $\text{pH } 7.0 \text{ PBS}$ انجام شد. غلظت DNA هدف با جریان پیک ادریاماسین کمی شد که از جریان پیک تولید شده در الکتروود اصلاح شده با $\text{ssDNA}/\text{Au}_{\text{nano}}/\text{PABA}/\text{MWCNT}$ تفریق شد. پارامتر های DVP به صورت زیر بودند: بازه ی پتانسیل از 0.3 تا 0.9 V دامنه ی 100 mV و عرض پالس: 50 ms عرض نمونه برداری 0.0167 V دوره ی پالس $S0.2$ و زمان استراحت $S2$.

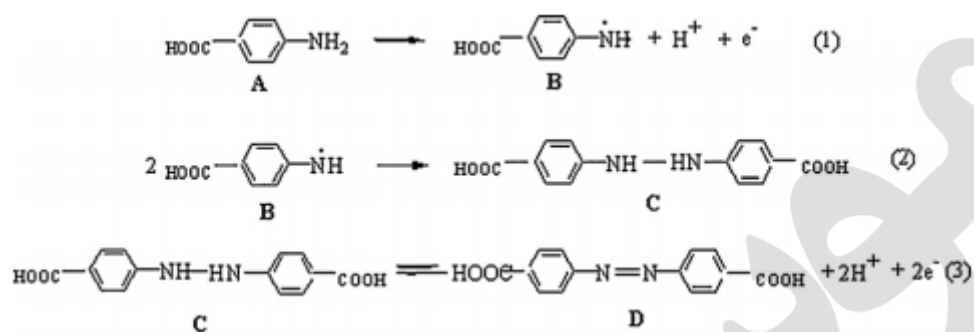
3. نتایج و بحث

3.1 الکتروپلیمریزاسیون p-ABA در MWCNTs/GCE

شکل 1 ولتاموگرام تکراری p -ABA $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ را در $\text{pH } 7.0 \text{ PBS}$ در الکتروود اصلاح شده ی MWCNT : نشان می دهد. در اولین اسکن پیک اندی و پیک کاتدی با مقدار پتانسیل در $+1.47 \text{ and } -0.80 \text{ V}$ نشان داده می شود. از دومین چرخه به بعد پیک اندی با پتانسیل $+0.24 \text{ V}$ دیده می شود. پیک های بزرگ تر در $1.47 \text{ or } -0.80 \text{ V}$ با اسکن پیوسته نشان داده می شود که نشان دهنده ی رشد پیوسته فیلم است. این حقایق بیانگر این هستند که p -PABA بر روی سطح MWCNT : با روش الکتروپلیمریزاسیون رسوب شده اند. فیلم پلیمری جاذب غیر یکنواخت بر روی GCE قرار گرفت. بعد از اصلاح الکترو فیلم پلی (p -PABA) با اب مقطر دو بار اب کشی شد و سپس در معرض هوا قرار گرفت. رفتار الکترو شیمیایی (p -PABA) در MWCNT مشابه با مطالعات گذشته بود (40،41). مکانیسم واکنش را می توان به صورت زیر توصیف کرد. (p -PABA (A): (Eq. (1)–(3)) به رادیکال ازاد اکسید شد سپس رادیکال ازاد به اسید هیدروبنزیک تبدیل شد و سپس اسید هیدروبنزیک به اسید ازوبنزیک و اسید ازوبنزیک به هیدروبنزیک اسید تبدیل شد.

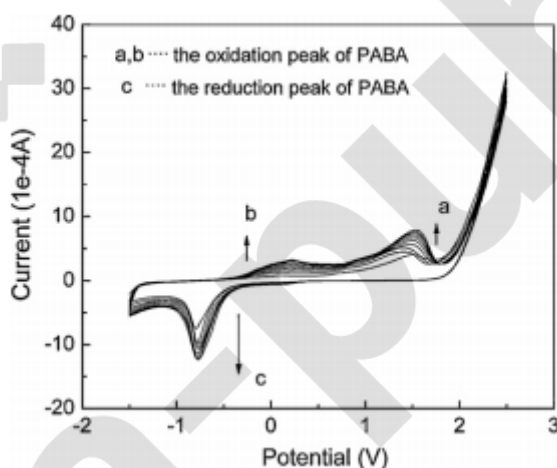


طرح 1



طرح 2

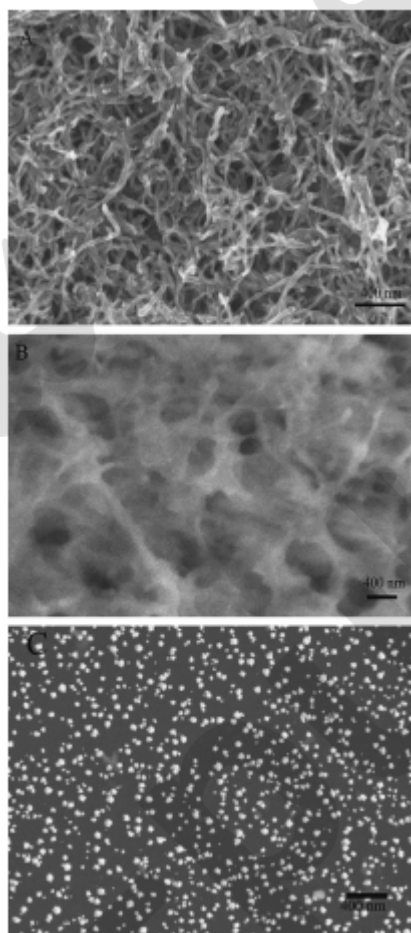
تصاویر SEM ، PABA/MWCNTs ، MWCNTs ، و Aunano/PABA MWCNTs در شکل 2 نشان داده شد. از شکل A2 می توان مشاهده کرد که MWCNTs به شکل یکنواختی بر روی GCE قرار گرفتند. بعد از این ابسیزیک اسید بر روی سطح MWCNTs/GCE الکترو پلیمریزه شد مقدار MWCNTs کاهش یافته و تصاویر به صورت ابرناک شدند زیرا با فیلم نازک PABA پوشیده شد. بعد از این AuNPs به سطح PABA/MWCNTs وارد شد AuNPs ها را می توان از شکل 2C مشاهده کرد.



شکل 1

شکل 3 نمودار پاسخ الکتروود را در مراحل مختلف در فرایند مونتاژ نشان می دهد اختلاف معنی دارد در طیف های امپدانس طی اصلاح گام به گام الکترون دیده می شود. به خصوص زمانی که MWCNTs بر روی چیزی مونتاژ شد. مقاومت انتقال الکترون به شدت در مقایسه با GCE کاهش پیدا کرد. این را می توان به عملکرد MWCNTs در انتقال الکترون بین الکتروود و الکتروولیت نسبت داد. وقتی که ابسیک اسید بر روی سطح

MWCNTs/GCE الکتروپلیزده شد Ret, افزایش شپیدا می کند. بعد از وارد شدن AuNPs به سطح الکتروود Ret کاهش می یابد. وقتی که پروب DNA بر روی سطح الکترو نصب می شود Ret افزایش می یابد. دلیل این است که DNA به طور منفی باردار شده و دفع الکترو استاتیک به طور منفی باردار می شود بنابراین می توان تایید کرد که گونه های مختلف بر روی سطح الکتروود اصلاح شده از تغییر مقاومت انتقال الکترون تحت تاثیر قرار می گیرد

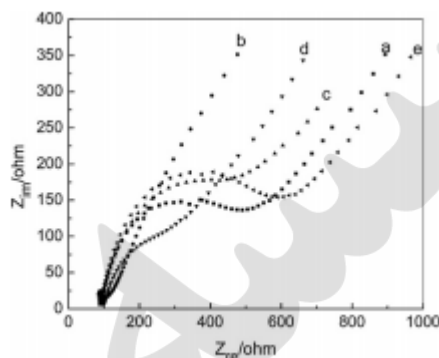


شکل 2

3.3 خصوصیات الکتروشیمیایی ادریاماسین در الکتروود های شیمیایی مختلف

شکل 4A ، DPVs را در الکتروود های اصلاح شده نشان می دهد. شکل 4B سیستم گرام های متناظر جریان پیک کاهش را نشان می دهد. از شکل 4A می توان گفت که جریان پیک ادریاماسین در GSE لخت یا Aunano/GCE کمتر است و در Aunano/PABA بیشتر افزایش می یابد. از همه مهم تر ایم که وقتی

MWCNTs وجود دارد جریان پیک ادریاماسین به شدت بهبود داده می شود. بعلاوه وقتی پروب DNA بر روی سطح Aunano/PABA/MWCNT/GCE تثبیت می شود جریان پیک ادریاماسین افزایش می یابد. دلیل این است که فسفات بار منفی DNA می تواند ادریاماسین بار مثبت را جذب کند.



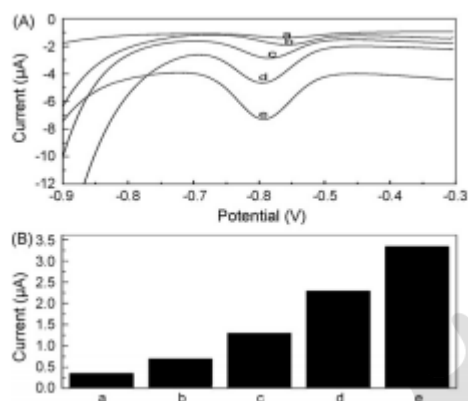
شکل 3

3.4 بهینه سازی شرایط سنجش DNA

به منظور دستیابی به سطوح الکتروکاتود کارآمد تر و ایجاد یک محیط بهتر برای تثبیت DNA و هیبریداسیون زمان رسوب دهی الکتروشیمیایی طلا با DVP بهینه سازی می شود. شکل 5A تاثیر زمان رسوب را بر روی جریان ادریاماسین نشان می دهد. می توان گفت که جریان پیک با افزایش زمان رسوب دهی افزایش می یابد.

شکل 5B رابطه ی بین جریان ادریاماسین و زمان انباشت را نشان می دهد. جریان پیک با افزایش زمان انباشت از 15 تا 35 دقیقه افزایش می یابد و در دامنه ی 35 تا 40 ثابت بوده و سپس بعد از 40 دقیقه کاهش می یابد.

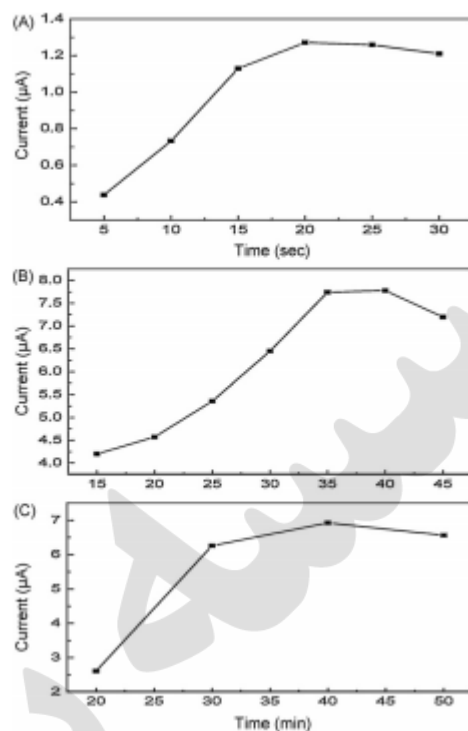
شکل 5C اثر زمان هیبریداسیون را بر روی جریان پیک ادریاماسین نشان می دهد از شکل 5C می توان گفت که جریان پیک با افزایش زمان هیبریداسیون از 20 تا 30 دقیقه افزایش از 30 تا 40 دقیقه افزایش کم و بعد از 40 دقیقه کاهش می یابد. این نتایج نشان می دهد که واکنش هیبریداسیون بعد از 40 دقیقه کامل می شود. با توجه به حساسیت و زمان ارزیابی 40 دقیقه به عنوان بهینه انتخاب شد.



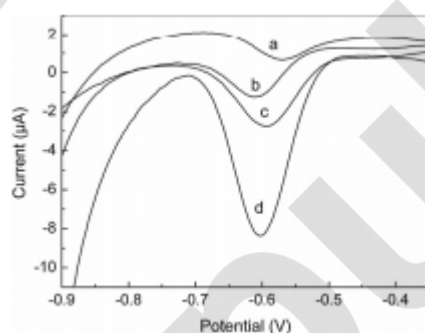
شکل 4

3.5 انتخاب پذیری بیوسنسور DNA

در یک بیوسنسور DNA انتخاب پذیری نقش بسیار مهمی دارد در این کار این انتخاب پذیری با توالی های Dna غیر مکمل و 3 بازی اندازه گیری شد. شکل 6 ادرياماسين DPVs of $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ را برای پروب Dna هیبرید شده با توالی مکمل، توالی 3 بازه و توالی مکمل نشان می دهد جریان های پیک ادرياماسين به ترتیب $2.247, 2.863, 4.375, \text{ and } 8.631 \times 10^{-6} \text{ A}$ است. جریان های پیک برای غیر مکمل 3 بازی تنها 9.65% and 33.33% جریان مکمل هستند. و IDS جریان پیک ادرياماسين برای توالی غیر مکمل و مکمل ISS پیک ادرياماسين برای پروب DNA، IC، جریان پیک ادرياماسين برای توالی مکمل است. این نتایج نشان می دهند که بیوسنسور DNA تولید شده می تواند برای سنجش اهداف توالی مختلف DNA استفاده شده است.



شکل 5



شکل 6

3.6 عملکرد تحلیلی

تحت شرایط بهینه عملکرد تحلیلی بیوسنسور DNA با استفاده از DNA پروب تثبیت شده برای هیبریداسیون با غلظت های مختلف توالی مکمل بررسی شد. شکل 7 اطلاعات DPV ادریاماسین را در الیگونوکلوئید های مکمل مختلف نشان می دهد. از شکل 7 می توان مشاهده کرد که جریان پیک با افزایش غلظت الیگونوکلوئید افزایش می یابد و به طور خطی با افزایش غلظت الیگونوکلوئید های مکمل از 5.0×10^{-9} to 1.0×10^{-12} M

افزایش می یابد. معادله ی رگرسیون $(\mu A) = 1.292 \log C_{DNA} + 16.50$ (unit of C is M), است و ضریب رگرسیون منحنی خطی به صورت 0.9979 است. استانه ی تشخیص $3.5 \times 10^{-13} M$ (S/N=3) است.

دامنه ی خطی و حد تشخیص سنسور های Dna الکترو شیمیایی در جدول 1 نشان داده شده اند. از جدول 1 خط تشخیص پایین و دامنه ی خطی گسترده تر با استفاده از بیوسنسور پیشنهادی به دست آمد سنسور dna پیشنهادی عملکرد تحلیلی خوبی را برای توالی های خاص DNA دارد.

Comparison of analytical performances of several electrochemical DNA sensors.

The DNA sensor	Detect technique	Linear detection range (nM)	Limit (nM)	Hybridization time (min)	Reference
DNA/Au _{100nm} /PPAAI					
MWCNTs-EDOH/GCE	DPV	0.009-9.0	3.2×10^{-3}	60	[39]
DNA/PICA/GCE	CV	3.34-10.6	0.094	45	[43]
DNA/Au _{100nm} /Cys/PGA	DPV	0.09-4.8	0.042	20	[44]
PolyPyriole/ssDNA/MCNTs paste electrode	DPV	0.1-1.0	8.5×10^{-3}	30	[45]
DNA/Au _{100nm} /PLL/GCE	CC	$25-10^{-4}$	3.2×10^{-3}	40	This work

جدول 1

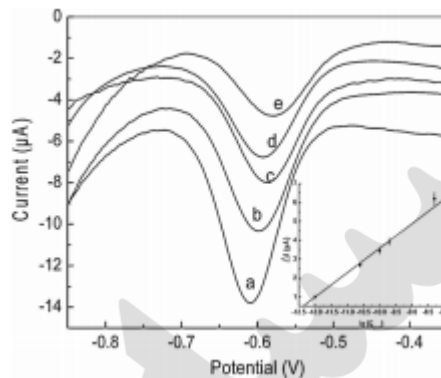
3.7 پایداری قابلیت استفاده ی مجدد و تکرار پذیری بیوسنسور DNA

قابلیت صحت و پایداری این سنسور Dna مطالعه شد در صورتی که ما آن را در یخچال در دمای 4 درجه بررسی کرده و بعد از 3 روز تست کنیم هیچ گونه تغییری در جریان پیک ادریاماسیون مشاهده نمی شود. نتایج نشان می دهد که سنسور DNA پایداری خوبی دارد.

قابلیت استفاده ی مجدد از بیوسنسور DNA نیز با غوطه ور کردن هیبرید در اب داغ به مدت 5 تا 8 دقیقه برای خارج کردن DNA هیبرید از طریق دنوراتیسیون حرارتی بررسی شد. سنسور جدید برای تست پاسخ DNA هدف 1.0×10^{-7} استفاده شد و این سنسور زمان پاسخ 93 درصد را نشان داد. این نتیجه نشان می دهد که بیوسنسور Dna پیشنهادی قابلیت استفاده ی مجدد خوبی را دارد.

تکرار پذیری و صحت سنسور DNA نیز به صورت زیر بررسی شد: 3 سنسور DNA به طور مستقل تحت شرایط یکسان ساخته شده و برای تشخیص الیگونوکلوئوتید های مکمل $1.0 \times 10^{-7} M$ استفاده شدند. جریان پیک

ادریاماسیون به ترتیب 9.007 , 8.635 , and 8.256×10^{-6} A بود. میانگین 8.633×10^{-6} A بود و انحراف معیار نسبی 4.35% بود.



شکل 7

4. نتیجه گیری

به طور کلی مطالعه ی حاضر یک راهبرد را برای تشخیص هیبریداسیون DNA با استفاده از الکتروود اصلاح شده با MWCNTs-COOH/AuNPs/PABA معرفی کرد. نتایج آزمایشی نشان می دهد که سنسور DNA سرعت بالا تولید اسان داشته و می تواند توالی DNA، 3، بازی را تشخیص دهد.