۸۷/۱/۱۰۶۷۰۵
۸۷/۱۲/۲۶

بسم الله الرحمن الرحیم

حق طبع و نشر از این پایاننامه برای دانشگاه ارومیه محفوظ است.

۱۱۰۶۷۳

۸۷/۱/۱۰۹۷۰۵
۸۷_۱۲_۲۶

دانشگاه ارومیه

دانشکده علوم

گروه شیمی

موضوع:

ساخت بیوسنسور الکتروشیمیایی DNA برای شناسایی ویروس Human Papilloma Virus (HPV)

پایاننامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

ارائه دهنده:

بهارک صحت نیا

اساتید راهنما :

دکتر رضا امامعلی سبزی

دکتر محمدسعید حجازی

دکتر محمدحسین پورنقی آذر

زمستان ۱۳۸۶

۱۳۸۷ /۱۲/۱۲ ۱۱

۱۱۰۶۷۳

پایان نامه : بهارک صحت‌نیا به تاریخ : ۸۹/۱۱/۱۷ شماره : ۸۲۹ - ۲ هوره پذیرش هیات محترم داوران با رتبه عالی و نمره بیست قرار گرفت.

۱- استاد راهنما و رئیس هیئت داوران : دکتر محمدحسین رکن‌الدین لنگرانی
دکتر رضا (ماسلی) سبزی
دکتر محمد سعید حجازی

۲- استاد مشاور :

۳- داور خارجی : دکتر علی حسن زاده

۴- داور داخلی : دکتر هدایت راهی

۵- نماینده تحصیلات تکمیلی : دکتر هوشنگ رحیم‌نژاد

همراه با یک دنیا سپاس ، خضوع و عشق تقدیم به :

کسی که نگاهش بی همتاترین است در عشق ورزیدن و ترنم صدایش از دوردستها آرامش بخش روح پرتلاطمم، بوسه بر دستانش می نهم.

مادر عزیزم

آنکه قامت جوان و برافراشته اش را برای قدکشیدنم هدیه کرد، بوسه بر دستانش می نهم.

پدر بزرگوارم

آنانکه بهار زندگیم به ترنم محبتشان آکنده است

برادران خوبم آرش و آرمان و لیلای عزیزم

و تقدیم به :

تمامی کسانی که دوستشان دارم

تقدیر و تشکر

« الحمدالله الذی هدینا لهذا و کنا لنهتدی لو لا ان هدینا الله»

سپاس بی کران خدا را که توفیق تحصیل و کسب معرفت را به من عطا فرمود. با نثار عمیق ترین سپاس ها برآنان که کاستی ها را هنرمندانه بیاگاهاندند و لغزشها را صمیمانه درگذشتند. به ویژه :
از خانواده عزیزم که همیشه یارو یاور من بوده اند و هرچه دارم به خاطر محبت ها و حمایت های بی دریغ ایشان بوده است، تشکر می کنم.
از اساتید راهنمای بزرگوارم جناب آقایان دکتر رضا امامعلی سبزی و دکتر محمد سعید حجازی که با راهنمایی های علمی بی دریغ و صادقانه خویش همواره مرا مورد لطف و محبت قرار دادند، نهایت سپاس را داشته و قدردانی می نمایم.
از استاد گرانمایه جناب آقای دکتر محمد حسین پورنقی آذر
به خاطر راهنمایی های ارزشمندشان که با سخاوت و گشاده رویی از هیچ گونه یاری دریغ ننمودند، قدردانی می نمایم.
از دوستان و همکاران خوبم : سرکار خانم ها: نرمین ساعی، سهیلا عطابخش، سمانه نیک ور، نعیمه فریدی اقدم، فاطمه ابراهیم زاده، مریم اسکویی، الناز مینایی و آقایان یوسفی، رضاپور، علیپور و تک تک افرادی که در مراحل اجرایی پایاننامه مرا به وجهی مرهون مهر خود ساخته اند و نامشان از قلم افتاده کمال تشکر را دارم.

بهارک صحت نیا
بهمن ۱۳۸۶

فهرست:

فصل اول : مقدمه

۱- اطلاعاتی در مورد ساختار DNA ۱
۱-۱- نوکلئوزیدها ۲
۱-۲- نوکلئوتیدها ۳
۱-۳- خواص فیزیکی DNA ٤
۲- تاریخچه بیوسنسورها ٥
۲-۱- پروب های DNA ٦
۲-۱-۱- ساختار PNA ۷
۲-۲- ساختار کلی بیوسنسورها ۸
۲-۲-۱- تعریف بیوسنسور ۸
۲-۲-۱-۱- اجزای بیولوژیکی ۹
۲-۲-۱-۲- مبدل ها ۱۰
۲-۲-۲- اهمیت بررسی های الکتروشیمیایی بر همکنش های DNA ۱۰
۲-۲-۳- شناساگرهای الکتروفعال و نشان ها ۱۱
۲-۲-۳-۱- مکانیسم عملکرد شناساگرهای DNA ۱۱
۲-۳- روشهای تثبیت پروب بر سطح الکترود ۱۳
۲-۳-۱- جذب سطحی ۱۳
۲-۳-۱-الف - جذب سطحی فیزیکی ۱۳
۲-۳-۱- ب - جذب سطحی در پتانسیل کنترل شده ۱۳
۲-۳-۲- تثبیت DNA بوسیله اتصال کووالانسی ۱٤
۲-۳-۲-۱- اتصال کووالانسی به سطح کربن ۱٥
۲-۳-۲-۱- الف ـ اتصال کووالانسی بر روی الکترودهای کربن شیشه ای ۱٥
۲-۳-۲-۱- ب - اتصال کووالانس بر روی الکترودهای خمیر کربن ۱٥
۲-۳-۲-۲- اتصال کووالانسی به سطح طلا ۱٥
۲-۳-۲-۲- الف - خود انباشتگی مستقیم با استفاده از پروبهای عامل دار شده آلکان تیولی ۱۷
۲-۳-۲-۲- ب- عوامل موثر در خود انباشتگی مستقیم پروب های عامل دار شده ۱۷
۲-۳-۲-۲- ج- تهیه تک لایه مختلط دو مرحله ای ۱۸
۲-۳-۲-۳- اتصال کووالانسی توسط تشکیل کمپلکس آویدین - بیوتین ۱۸

۲-۳-۲-٤ - اتصال کووالانسی به سطوح پلاتین ۱۹
۲-۳-۲-٥- اتصال DNA به سطوح پوشیده شده با پلیمر ۲۰
۲-۳-۲-٦- اتصال DNA به سطوح پلی پیرولی ۲۰
۲-٤- هیبریداسیون DNA ۲۱
۲-٤-۱- تشخیص الکترو شیمیایی هیبریداسیون DNA ۲۲
۲-٤-۲- عوامل موثر بر هیبریداسیون ۲۲
۲-٤-۳- تشخیص تک باز اشتباه در زنجیر دوتایی ۲۳
۲-٤-٤- مشکلات تشخیص هیبریداسیون ۲۳
۲-٤-٤-۱- تقویت نمونه ۲٤
۲-٤-٤-۲- تقویت سیگنال ۲٤
۲-٤-٥- روشهای شناسایی هیبریداسیون ۲٥
۲-٤-٥-۱- تشخیص هیبریداسیون با استفاده از نشان ۲٥
۲-٤-٥-۱-۱- استفاده از مولکول های الکترو فعال بعنوان نشان ۲٥
۲-٤-٥-۱-۱- الف) از شناساگرهای هیبریداسیون الکترو فعال ۲٦
۲-٤-٥-۱-۱- ب) استفاده از ترکیبات intercalative یا پیوند دهنده شیاری (groove binder) ۲٦
۲-٤-٥-۱-۱-ج) نشاندار کردن با آنزیم ۲٦
۲-٤-٥-۲- تشخیص الکترو شیمیایی DNA بدون استفاده از نشان ۲۷
۲-٤-٥-۲-الف) سیگنال های ذاتی DNA برای تشخیص هیبریداسیون ۲۷
۲-٤-٥-۲- ب) استفاده از عبور بار الکتریکی از DNA ۲۷
۲-٤-٥-۲- ج) الکترو شیمی غیر مستقیم ۲۷
۲-٤-٥-۲- د) الکتروشیمی انتقال بار با میانجیگری DNA ۲۸
۲-٥- معرفی ویروس HPV ۲۹

فصل دوم :

۲-۱- وسایل و تجهیزات ۳۱
۲-۲- الکترودها ۳۱
۲-۳- مواد شیمیایی ۳۱
۲-٤- تهیه محلول های مورد استفاده ۳۲
۲-٥- روش کار ۳۳

فصل سوم: بحث و نتایج

۳-۱- مطالعه تاثیر فعال سازی الکتروشیمیایی الکترود مغز مداد ۳۶
۳-۲- شرایط فعال سازی الکتروشیمیایی الکترود مغزمداد ۳۸
۳-۳- بررسی نحوه تعیین و تاثیر مدت زمان فعال سازی الکترود ۳۹
۳-۳-۱- تعیین بهینه زمان فعال سازی الکتروشیمیایی الکترود مغز مداد ۳۹
۳-۳-۲- بررسی تاثیر بهینه مدت زمان فعال سازی بر روی عملکرد الکترود ۴۰
۳-۴- تاثیر سابیدن سطح الکترود ۴۱
۳-۵- شرایط تثبیت پروب بر روی الکترود مغز مداد ۴۲
۳-۵-۱- تاثیر پتانسیل اعمالی برای تثبیت پروب بر روی الکترود مغز مداد ۴۲
۳-۵-۲- تاثیر مدت زمان اعمال پتانسیل به الکترود جهت تثبیت پروب DNA ۴۳
۳-۵-۳- نحوه تثبیت پروب بر روی الکترود ۴۴
۳-۶- تاثیر الکترولیت زمینه و غلظت نمک سدیم کلرید در مرحله تثبیت DNA ۴۴
۳-۷- نحوه تجمع شناساگر متیلن بلو بر روی الکترود مغز مداد ۴۶
۳-۸- شرایط ولتامتری موج مربعی برای تشخیص سیگنال شناساگر ۴۶
۳-۹- هیبریداسیون DNA ۴۷
۳-۹-۱- شرایط هیبریداسیون توالی مکمل با پروب تثبیت شده بر روی الکترود مغز مداد ۴۷
۳-۹-۲- اهمیت و نحوه تشخیص هیبریداسیون ۴۷
۳-۹-۳- روش تشخیص هیبریداسیون ۴۸
۳-۱۰- بررسی کارایی بیوسنسور ۵۱
۳-۱۰-۱- حد تشخیص ۵۱
۳-۱۱- تشخیص هیبریداسیون DNA در مخلوطی از توالی های غیر مکمل ۵۴
۳-۱۱-۱- شرایط هیبریداسیون ۵۴
۳-۱۱-۲- هیبریداسیون با مخلوط توالی های مکمل و غیرمکمل ۵۸
۳-۱۱-۲-۱- بررسی هیبریداسیون در دو مخلوط حاوی hIL- 2 + توالی مکمل و chIL -2 + توالی مکمل ۵۸
۳-۱۱-۲-۲ - بررسی هیبریداسیون در مخلوط hIL -2 + chIL-2 در حضور و عدم حضور توالی مکمل ۵۹
۳-۱۱-۲-۳- بررسی توانایی بیوسنسور در تشخیص HPVc در حضور ویروس هپاتیت C ۶۰
۳-۱۱-۲-۴- بررسی هیبریداسیون در دو مخلوط 18sr و Lb16s ۶۳
۳-۱۱-۲-۵- بررسی هیبریداسیون در مخلوطی از توالی های غیرمکمل و توالی مکمل ۶۵

فصل چهارم

نتیجه گیری ۶۷

فهرست اشکال

شکل (۱-۱)..... ۲
شکل (۱-۲)..... ۴
شکل (۱-۳)..... ۷
شکل (۱-۴)..... ۹
شکل (۱-۵)..... ۱۰
شکل (۱-۶)..... ۱۳
شکل (۱-۷)..... ۱۹
شکل (۱-۸)..... ۲۱
شکل (۳-۱)..... ۳۷
شکل (۳-۲)..... ۳۸
شکل (۳-۳)..... ۳۹
شکل (۳-۴)..... ۴۰
شکل (۳-۵)..... ۴۲
شکل (۳-۶)..... ۴۳
شکل (۳-۷)..... ۴۵
شکل (۳-۸)..... ۴۸
شکل (۳-۹)..... ۵۰
شکل (۳-۱۰-الف)..... ۵۲
شکل (۳-۱۰-ب)..... ۵۳
شکل (۳-۱۱-الف)..... ۵۵
شکل (۳-۱۱-ب)..... ۵۶
شکل (۳-۱۲)..... ۵۸
شکل (۳-۱۳)..... ۶۰
شکل (۳-۱۴-الف)..... ۶۱
شکل (۳-۱۴-ب)..... ۶۲
شکل (۳-۱۵)..... ۶۳
شکل (۳-۱۶)..... ۶۶

چکیده:

امروزه از بیوسنسورهای DNA به منظور تشخیص سریع و ارزان ژنتیکی در بیماری های واگیردار به صورت گسترده ای استفاده می شود. در بسیاری از تحقیقات برای تشخیص پدیده هیبریداسیون از مبدل های الکتروشیمیایی به دلیل حساسیت بالا، ابعاد کوچک، قیمت پایین و توانایی ادغام با تکنولوژی میکرو استفاده می شود. در تحقیق حاضر، برای اولین بار قسمتی از ژنوم ویروس HPV به عنوان DNAی هدف به تنهایی و در مخلوطی از توالی های غیرمکمل به کمک روش های الکتروشیمیایی با حساسیت بالا، توسط بیوسنسور ساخته شده به کمک الکترود مغز مداد (PGE) و شناساگر الکتروفعال متیلن بلو (MB) تشخیص داده شد. DNA به کار رفته در این بیوسنسور شامل توالی مشترک این ژن در فنوتیپ های مختلف آن است.

در این بیوسنسور توالی ۲۰ مری تک زنجیره از این ژن برروی الکترود مغز مداد تثبیت شده و توالی مکمل این زنجیره به عنوان هدف مکمل مورداستفاده قرار گرفت. هیبریداسیون بین پروب و توالی مکمل آن توسط کاهش سیگنال مربوط به شناساگر تجمع یافته برروی الکترود با روش ولتامتری موج مربعی (SWV) دنبال شد. توانایی و حساسیت بیوسنسور ساخته شده و تاثیر فاکتورهای مختلفی مانند پتانسیل و زمان برفعال سازی الکترود و تثبیت پروب و غلظت توالی مکمل بر کارایی آن مورد مطالعه قرار گرفتند. علاوه بر این توانایی بیوسنسور در تشخیص توالی مکمل در حضور توالی های غیرمکمل نیز بررسی شد. برای این منظور الیگونوکلئوتیدهای مختلفی مربوط به ویروس هپاتیت C (HCV)، قارچ (18sr)، ژنوم انسانی (hIL -2 و chIL-2) و باکتریایی (Lb16s) به عنوان توالی های غیر مکمل مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور مخلوط های مختلفی از توالی های غیرمکمل فوق با حضور یا بدون حضور توالی مکمل HPVc تهیه شدند و میزان حساسیت بیوسنسور در شناسایی توالی مکمل در حضور این توالی ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دادند که بیوسنسور ساخته شده توانایی تشخیص توالی مکمل خود را به تنهایی و حتی در حضور قطعه های متعددی از DNA با حساسیت بالا را دارد.

مقدمه

در سالهای اخیر تشخیص توالی خاصی از DNA به کمک روشهای مختلف، در فهرست کاری بسیاری از محققان در سراسر جهان قرار دارد که هدف آن تعیین آرایش و ترتیب ژنومی تمامی موجودات به کمک ابزار و روشهای ساده، دقیق و ارزان است. بعد از یک سری توضیحات پیرامون DNA و ساختار آن به توضیح روش های تشخیص آن خواهیم پرداخت.

تمامی اطلاعات توارثی موجودات زنده در داخل سلولهایی به نام داکسی ریبو نوکلئیک اسید (DNA) که وزن آن در حدود 6×10^{-12} gr می‌باشد متراکم شده است.

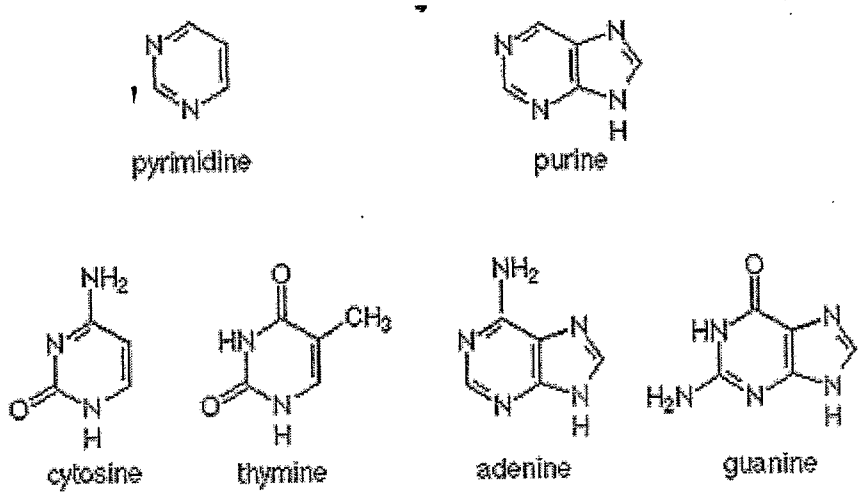
این اطلاعات ژنتیکی از DNA توسط ماده واسطی بنام اسید ریبو نوکلئیک (RNA) بر روی ذراتی بنام ریبوزوم انتقال یافته و ملکولهای پروتئینی اسید آمینه را می سازد که در فضا شکل سه بعدی به خود می‌گیرد.

۱- اطلاعاتی در مورد ساختار DNA

در ساختار DNA مشتقات دو باز هترو سیکلیک و آروماتیک به نام پورین[1] و پیریمیدین[2] مشارکت دارند که این ترکیبات علاوه بر تأمین واحدهای منومری، عملکردهای متنوعی را که برای حیات ضروری است بر عهده دارند. از جمله میتوان به واکنش‌های متعدد انتقال فسفات ATP[3] و سایر نوکلئوزیدهای فسفاتها که واکنش‌های داخلی را به جریان در می‌آورند، اشاره کرد.

1 - Pourines
2 - Pyrimidine
3 - Adenosine triphosphate

ساختمان شیمیایی پورین و پیریمدین و بازهای مشتق شده از آنهاکه در ساختار **DNA** وجود دارند، در شکل ۱-۱ نشان داده شده است :



شکل ۱-۱- ساختمانشیمیایی بازهای تشکیل دهنده **DNA**

فراوانترین بازهای هتروسیکلیک اسیدهای نوکلئیک در مورد پورینها، آدنین(**A**) و گوانین (**G**) و در مورد پیریمیدینها، سیتوزین(**C**)، تیمین(**T**) و اوراسیل (**U**) است.تمامی اسیدهای نوکلئیک حاوی آدنین، گوانین وسیتوزین هستند. **DNA** تیمین هم دارد. درصورتیکه **RNA** به جای تیمین حاوی اوراسیل است (۱).

۱-۱- نوکلئوزیدها [1] :

این ترکیبات از اتصال یکی از بازهای پورین یا پیریمیدین با یک قند پنج کربنی به نام ریبوز در (**RNA**) و یا داکسی ریبوز در (**DNA**) ساخته می‌شوند. پیوند آزیدی بین بازآلی و قند توسط کربن شماره یک قند و ازت شماره یک باز پیریمیدین یا ازت شماره نه باز پورین صورت می‌گیرد. نوکلئوزیدها در محیط های قلیایی نسبتاً پایدارند و در صورت حرارت دادن در محیط های اسیدی هیدرولیز شده و به اجزاء سازنده خود تبدیل می شوند (۲).

1 - Nucleoside

۱-۲- نوکلئوتیدها [1]:

این اجسام استراسید فسفریک با نوکلئوزیدها می باشند که آنها را نوکلئوزید مونو فسفات نیز می نامند.

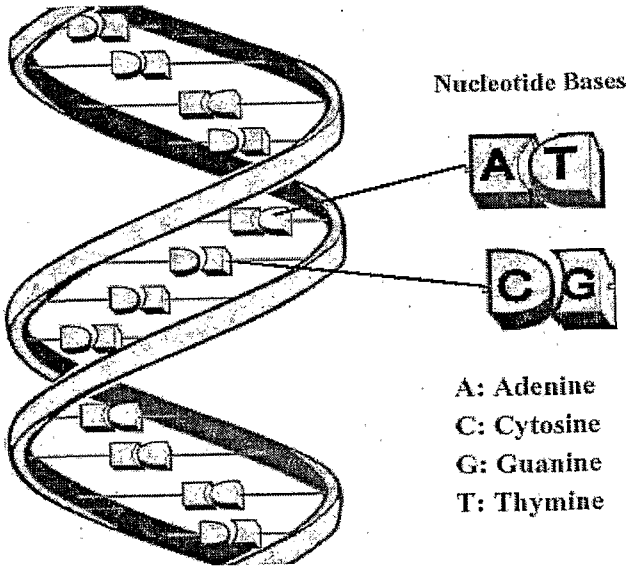
پیوند استری بین عامل هیدروکسیل کربن ' ۵ قند و اسید فسفریک صورت می گیرد. استر حاصل بر حسب نوع قند ریبونوکلئوتید یا داکسی ریبو نوکلئوتید نامیده می شود. هنگامی که مقدار زیادی مونو نوکلئوتید به یکدیگر متصل شوند پلیمرحاصل پلی نوکلئوتید نام دارد. اگر نوکلئوتیدها از جنس داکسی ریبونوکلئیک باشند پلیمرحاصل را اسید داکسی ریبونوکلئیک (**DNA**) می نامند.

ضمنا چنانچه گفته شد **DNA** از اتصال مقدار زیادی مولکول های داکسی ریبونوکلئوتید بدست آمده که حاوی بازهای **G** و **C** و **T** و **A** می باشد. پیوند بین این نوکلئوتیدها از نوع پیوند دی استر است که بین ریشه فسفات متصل به کربن ' ۵ از یک نوکلئوتید و کربن ' ۳ نوکلئوتید بعدی یا قبلی ایجاد می شود یعنی پیوند بین تمامی نوکلئوتیدها پیوند دی استری است به استثنای اولین و آخرین نوکلئوتید که آنها را با شماره کربن ' ۳ یا ' ۵ مشخص می کنند.

DNA از لحاظ ساختاری همیشه دارای ساختمانی ثابت برای هر موجود، از نظر ترکیب بازهای تشکیل دهنده آن است. یعنی در تمام **DNA** ها مجموع بازهای پورین مساوی مجموع بازهای پیریمیدین است. ترکیب بازهای **DNA** در گونه های مختلف جانداران متفاوت می باشد و معمولا برای نشان دادن اختلاف ساختمانی **DNA** در جانداران مختلف از نسبت $\frac{A+T}{C+G}$ استفاده می شود (۳). اتصال بازهای مکمل در دو زنجیره **DNA** که در مقابل هم قرار می گیرند از طریق پیوندهای هیدروژنی بین بازهای مکمل است. **A** و **T** بوسیله دو پیوند هیدروژنی و **C** و **G** بوسیله سه پیوند هیدروژنی یکدیگر متصل می شوند. **DNA** دارای چندین ساختمان مارپیچ می باشد. در بین مارپیچ دوتایی [2] و در محل پیچ ها دو نوع فرو رفتگی وجود دارد که مواد مختلف از جمله آنزیم ها ، آنتی بیوتیکها و هیستون ها [3] می توانند با توجه به میل ترکیبی خود در یکی از فرو رفتگی ها قرار گیرند.

1- Nucleotide
2- Douplex
3- Histones

شکل (۱-۲) ساختار دوتایی DNA و بازهای تشکیل دهنده آن را نشان می دهد.



شکل ۱-۲- ساختار مارپیچ DNA

۱-۳- خواص فیزیکی DNA

حداکثر جذب نوری DNA در طول موج ۲٦۰ nm می باشد. اگر محلول DNA را حرارت دهیم در یک درجه حرارت معین یعنی ۸۲/۵°C جذب نور بطور ناگهانی افزایش می یابد، این درجه حرارت را به علت شباهت با درجه حرارت ذوب کریستال ها نقطه ذوب DNA نامیده و با علامت T_m [1] نشان می دهند. در این درجه حرارت پیوندهای هیدروژن بین دو مارپیچ DNA گسسته شده و DNA تغییر ماهیت می دهد زیرا زنجیرهای مکمل از یکدیگر جدا شده و DNA ساختمان مارپیچی خود را از دست می دهد. از آنجائیکه پیوندهای G و C با مقایسه با پیوند A و T دارای استحکام بیشتری هستند بنابراین نقطه ذوب DNA های مختلف متناسب با مقدار G + C می باشد. برای مثال اگر در یک DNA فقط A + T وجود داشته باشد $T_m = 70^\circ C$ و اگر DNA فقط حاوی G + C باشد $T_m = 110^\circ C$ خواهد بود به این ترتیب با اندازه گیری نقطه ذوب یک DNA می توان نسبت $\frac{A+T}{G+C}$ را تعیین کرد (٤).

1 - Melting Temprature

۲- تاریخچه بیوسنسورها:

از زمانی که فعالیت الکترو شیمیایی اسیدهای نوکلئیک توسط پالسک[1] کشف شد مطالعات الکتروشیمیایی بر روی روشهای تشخیص **DNA** از اهمیت خاصی برخوردار شد (۵) و استفاده از بیوسنسورهای الکتروشیمیایی جایگاه خاصی در ایجاد روشهای سریع، مقرون به صرفه، ساده و دقیق برای تشخیص **DNA** پیدا کرد. در بیوسنسورهای الکترو شیمیایی چون واکنشهای الکترو شیمیایی در سطح بیوسنسور می تواند مستقیما به یک سیگنال الکترونیکی تبدیل شود نیازی به دستگاه های گرانقیمت مبدل وجود ندارد. علاوه بر این تشخیص هیبریداسیون توسط روش های الکتروشیمیایی به راحتی انجام می شود. روشهای تشخیص الکترو شیمیایی نه تنها بسیار ساده، سریع و ارزان هستند بلکه وسایل و دستگاههای مورد نیاز به طبع، سیستم های ساده ای هستند که قابلیت ترکیب شدن با تکنولوژی های میکرو را دارند بنابراین کاندیداهای بسیار خوبی برای تشخیص ارزان و دقیق بیماریهای ژنی هستند.

اساس عملکرد یک بیو سنسور الکترو شیمیایی که اولین بار در سال ۱۹۹۳ توسط میکلسون[2] و میلان[3] (٦) مطرح شد بر پایه تثبیت یک الیگو نوکلئوتید تک زنجیره (**ss-DNA**)[4] به عنوان پروب بر روی یک سطح الکترودی بود که عمل هیبریداسیون این پروب با مکمل خود در سطح الکترود باعث ایجاد یک سیگنال الکترو شیمیایی می شد.

از زمانی که تحقیقات وسیعی در این زمینه در سال ۱۹۹۰ آغاز شد (۸،۷) از الکترودهای متعددی جهت ایجاد بستر مناسب برای تثبیت پروب و انجام مراحل بعدی هیبریداسیون استفاده کرده اند که از آن جمله می توان به الکترودهای جیوه و ملقمه جیوه، الکترودهای کربنی شامل : خمیرکربن[5]، گرافیت، کربن شیشه ای[6] ، نانوتیوپ کربن، الکترودهای چاپ شبکه ای[7] و الکترودهایی با ساختار نانو اشاره کرد (۹- ۱۲).

علاوه بر این فلزات و اکسیدهای فلزی از جمله طلا (۱۳)، نقره (١٤)، پلاتین (١٥) و اکسید ایندیوم- قلع (١٦) برای این منظور مورد استفاده قرار گرفته اند.

1- Palecek
2- Mikkelsen
3- Millan
4- Single strand DNA
5- Carbon Paste
6- Glassy Carbon
7- Screen Printed

قابل ذکر است که هیبریداسیون قابل توجهی معمولا در سطح الکترودهای جیوه اتفاق نمی افتد شاید این امر به دلیل برهمکنش به شدت آبگریز میان بازهای پروب و سطح الکترود جیوه باشد. بنابراین بازهای پروب برای تشکیل زوج باز ویژه با DNA هدف در دسترس نیستند.

ساخت یک بیوسنسور الکترو شیمیایی شامل مراحل زیر می باشد :

۱) تثبیت پروب DNA روی سطح الکترود

۲) هیبریداسیون با توالی هدف

۳) بررسی تغییرات سطح الکترود

۲-۱- پروب های DNA

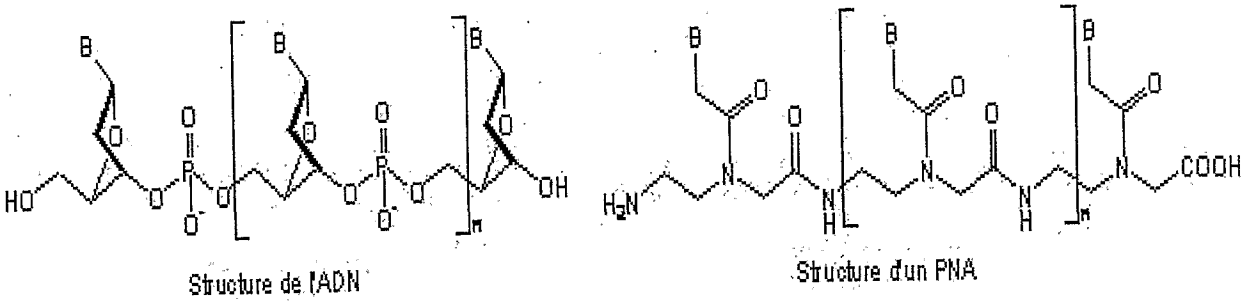
پروبهای DNA معمولا الیگونوکلئوتیدهای کوتاه (۱۸تا۴۰ مر) هستند که می توانند با توالی هدف خاص که مکمل خودشان است هیبرید شوند (۱۷). روش های مختلفی برای تثبیت پروب بر روی الکترود وجود دارد، که بستگی به سطح الکترود و کاربرد آن دارد. تعدادی از این روشها عبارتند از: جذب سطحی، اتصال کووالانسی به سطح عاملدار، روش تک لایه خودانباشته(SAM)[1] وجا دادن در سل- ژل یا پیکره پلیمری.

امروزه درساخت این پروبها می توانند از توالی الیگو نوکلئوتیدهای مربوط به عوامل بیماری زا و میکرو ارگانیسم ها نیز استفاده کنند. علاوه بر پروبهای DNA برای اولین بار ونگ[2] و همکارانش (۱۸) از پپتید نوکلئیک اسید (PNA)[3] بعنوان پروب استفاده کردند و به انتخابگری بالایی دست یافتند. بخاطر ساختار ویژه PNA ها این پروبها با تمایل بیشتری به مکمل خود متصل می شوند و امکان تشخیص توالیهای کاملاً مشابه را ساده تر می کنند. با استفاده از پپتید نوکلئیک اسید می توان به انتخابگری های بالایی در بیوسنسورها دست یافت چرا که اشتباه در دوتایی PNA/DNA بسیار ناپایدارتر از DNA/DNA است و می توان تک بازهای اشتباهی را که در تشخیص جهشهای بیماریزا مهم هستند را نیز شناسایی کرد.

1- Self Assembled Monolayer
2 - Wang
3 - Peptide Nucleic Acid

۲-۱-۱- ساختار PNA :

PNA ها برای اولین بار توسط نیلسون[1] در سال ۱۹۹۱ مطرح شدند (۱۹). PNA ها ساختاری شبیه DNA دارند که درآن کل پیکره با بار منفی فسفات واقع در DNA با پیکره پپتید مانند در PNA جایگزین شده است. این ساختار شامل واحدهای تکرار شده از N-(۲-آمینواتیل)- گلیسین است که توسط پیوندهای آمیدی بهم متصل شده اند. چهار باز آدنین، گوانین، سیتوزین و تیمین با همان فواصل در پیکره PNA قرار دارند با این تفاوت که بر خلاف DNA توسط اتصالات متیلن کربونیلی، بازها به آمین مرکزی پیکره متصل هستند(شکل۱-۳). به دلیل ساختار ویژه PNA وفواصل بین بازی مناسب در آن، آنها می توانند اختصاصی تر به الیگونوکلیوتیدهای رایج با پیروی از قانون مزدوج شدن بازی واتسون – کریک[2] متصل شوند. زنجیرهای DNA و PNA از طریق پیوندهای هیدروژنی به هم متصل می شوند.



شکل ۱-۳- تفاوتهای ساختاری DNA و PNA

PNA ها چون بی بار هستند پایداری حرارتی دو تایی PNA-DNA مستقل ازغلظت نمک در محلول هیبریداسیون است ودر دمای اتاق ودماهای بالاتر سریع تر هیبرید می شوند. چون دافعه الکترواستاتیکی بین زنجیرهای DNA و PNA وجود ندارد پس دوپلکس PNA -DNA از پایداری حرارتی بیشتری برخوردار است.پایداری حرارتی دوتایی PNA - DNA به شدت تحت تاثیر جفت نشدن کامل است. بنابراین وجود تک اشتباهات در این دوتایی آن را بیشترازدوتایی DNA-DNA ناپایدار می کند. ثابت شده است که این ساختارتوسط نوکلئازها و پروتئازها تخریب نشده وازپایداری بیولوژیکی برخوردار است.

1- Nielsen
2- Watson-Crick

۲-۲- ساختار کلی بیوسنسورها

امروزه تشخیص DNA به لحاظ اهمیتی که بعنوان جزء اصلی ساختار موجودات زنده دارد در تمامی حوزه های بیولوژیکی و مطالعات بیوتکنولوژی حائز اهمیت است. با کشف بیماری ها و عوامل ژنتیکی دخیل در آنها روشهای تشخیص ژنها نیز به سرعت رشد کرده است تا جائی که امروزه بیشترین هزینه های تحقیقاتی در کشورهای پیشرفته صرف بهبود روشهای تشخیص DNA و در نتیجه ارائه روشهای درمان پیشرفته در بیماری های مختلف می شود. تشخیص DNA بر اساس تعیین توالی ژنومی به یک روش بسیار حساس و دقیق در تشخیص تغییرات ژنی نیاز دارد.

تشخیص DNA به دو روش انجام می شود :

یکی بر اساس تعیین مستقیم توالی DNA (روش PCR)[1] و دیگری استفاده از روش هیبریداسیون است.

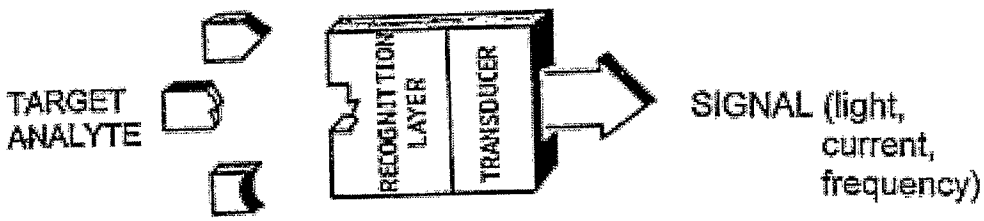
هر یک از این روشها به نوبه خود دارای معایب و مزیت هایی هستند که در بخش های بعدی مورد بررسی قرار می گیرند. در روش استفاده از هیبریداسیون است که مبحث بیوسنسورها به میان می آید. در روش هیبریداسیون DNA ، ترتیب ژن هدف بوسیله پروب DNA ای که می تواند یک هیبرید دو زنجیری با نوکلئیک اسید مکمل خود (هدف) با کارایی بالا و انتخاب گری ویژه در مخلوط حاوی نوکلئیک اسیدهای مختلف و غیر مکمل تشکیل می دهد، تعیین می گردد.

۲-۲-۱- تعریف بیوسنسور :

یک بیوسنسورشامل یک لایه فعال بیولوژیکی است که بعنوان جزء شناساگر عمل می کند. در سطح این لایه فعال یک سری برهمکنش های بیولوژیکی در طی مراحل مختلف انجام می شود که می توان پارامترهای فیزیکی مربوط به این فعالیت ها را با استفاده از مبدل ها به سیگنال های قابل اندازه گیری تجزیه ای تبدیل کرد. معمولا این لایه فعال بیولوژیکی همان پروب نام دارد که عامل مؤثر در تامین انتخابگری و حساسیت سیگنال اندازه گیری شونده است. شکل (۱-٤) طرحی شماتیک از عملکرد یک بیوسنسور است.

---

1 - Polymerase Chain Reaction



شکل۱-٤- نحوه عملکرد یک بیوسنسور

نقش اصلی سنسور تامین یک خط مشی مناسب است که تشکیل کمپلکس پروب- هدف را طوری ساده تر بکند که فرایند اتصال پروب- هدف، تامین کننده یک سیگنال قابل قرائت باشد.

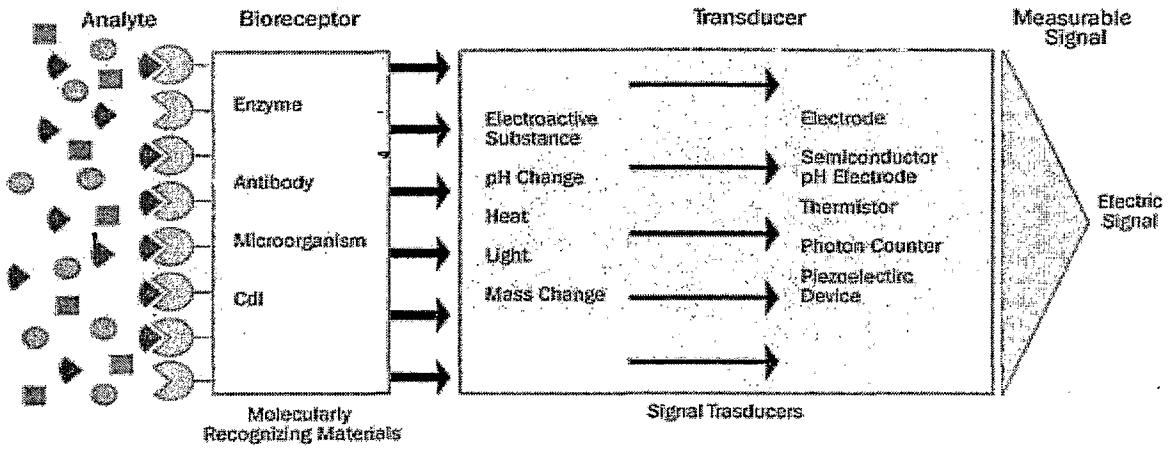
هر بیوسنسور دارای دو جزء اصلی است:

۱- اجزای بیولوژیکی ۲- مبدل ها[1]

۲-۲-۱-۱- اجزای بیولوژیکی

عمل اصلی جزء بیولوژیکی یک بیوسنسور ایجاد انتخابگری برای آنالیت مورد نظر می باشد. این عمل از طریق اتصال ماده بیولوژیکی با تمایل انتخابی نسبت به آنالیت صورت می گیرد. برخی از اجزاء بیولوژیکی به کار رفته در بیوسنسورها شامل آنزیم ها، آنتی بادی ها، گیرنده های پروتئینی، میکروارگانیسمها و ...می باشند (۲۰). شکل (۱- ۵) نحوه عملکرد این مواد را نشان می دهد.

1- Transducer



شکل ۱- ۵- ساختار اجزاء یک بیوسنسور

۲-۲-۱-۲- مبدل ها

مبدل در بیوسنسور، تغییرات در محیط عمل یا در مواد بیولوژیکی در سطح خود را اندازه گیری کرده سپس سیگنالی قابل اندازه گیری بر اساس این تغییرات ایجاد می کند. در واقع نقش اصلی یک مبدل تبدیل یک سیگنال یا اطلاعات از یک شکل به شکل قابل درک برای ما می باشد.

۲-۲-۲- اهمیت بررسی های الکتروشیمیایی بر همکنش های DNA

در بررسی برهمکنش های **DNA** بخصوص در ساختار بیوسنسورها از واکنش ها وتجهیزات الکتروشیمیایی استفاده های زیادی شده است. چرا که واکنش های الکتروشیمیایی **DNA** مستقیماً یک سیگنال الکترونیکی ایجاد می کنند، که دیگر نیازی به دستگاههای گرانقیمت تبدیل کننده سیگنال وجود ندارد. علاوه براین پروب می توانند به راحتی بر روی الکترودها تثبیت شود. ابزارهای الکتروشیمیایی بسیار حساس،سریع و ساده بوده و قابلیت سازگاری با تکنولوژی های میکرو را دارند. همچنین سیستم های قابل حمل برای آزمایش های کلینیکی و زیست محیطی نیز هستند (۲۱). تمامی این ویژگی ها، ابزارهای الکتروشیمیایی را کاندیداهای خوبی برای تشخیص سریع و ارزانقیمت بیماری های ژنی و تشخیص گونه های بیولوژیکی پاتوژنی کرده است.