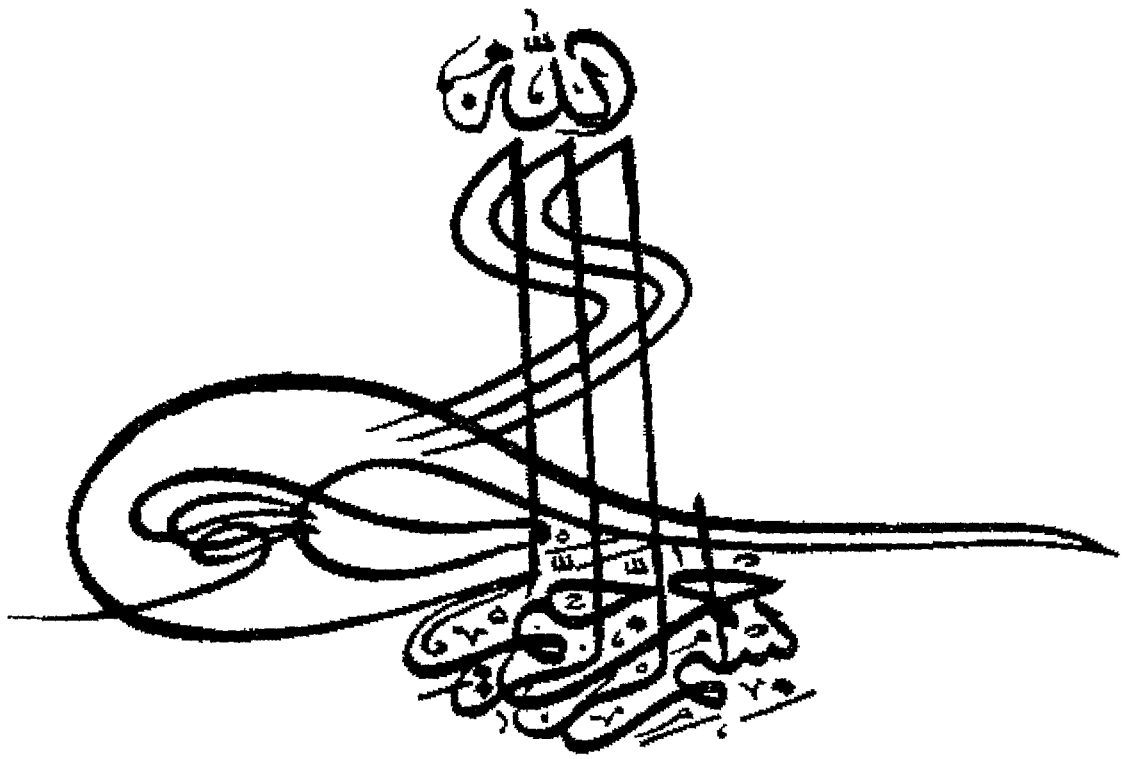


١٤٢٣٦٠

دانشگاه شهید بهشتی

پژوهشکدهٔ لیزر و پلاسما

پایان نامه

جهت اخذ درجهٔ کارشناسی ارشد فوتونیک

عنوان:

آشکار سازی هیبریداسیون DNA با استفاده از حسگر های فیبر نوری

دانشجو:

الهه قناتی

استاد راهنما:

دکتر حمید لطیفی

۱۳۸۹/۷/۲۴

استاد مشاور:

دکتر مسعود حسینی

تاریخ دفاع

تیرماه ۱۳۸۹

۱۴۲۳۴۰

تاریخ ۸۹/۴/۱۵
شماره ۱۸۲۰/۴/۱۱۱د
پیوست .....

دانشگاه شهید بهشتی

تهران ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین
تلفن: ۲۹۹۰۱

بسمه تعالی

«صورتجلسه دفاع از پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد»

بازگشت به مجوز دفاع شماره ۱۳۱۰/۲۰۰/د مورخ ۸۹/۳/۳۰ جلسه هیأت داوران ارزیابی پایان نامه خانم **الهه قناتی** به شماره شناسنامه **۳۳۷۷** صادره از **مشهد** متولد **۱۳۶۳** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته **فوتونیک** به شماره دانشجویی **۸۶۴۱۵۰۱۶** با عنوان:

"آشکارسازی هیبریداسیون DNA با استفاده از حسگر فیبر نوری"

به راهنمایی: دکتر حمید لطیفی

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۸۹/۴/۱۲ تشکیل گردید و براساس رأی هیأت داوری و با عنایت به ماده ۲۰ آئین نامه کارشناسی ارشد مورخ ۷۵/۱۰/۲۵ پایان نامه مزبور با نمره ۱۹/۲۱ و درجه عالی مورد تصویب قرار گرفت.

۱- استاد راهنما: دکتر حمید لطیفی

۲- استاد مشاور: دکتر مسعود حسینی

۳- استاد داور داخل و نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر سیدحسن توسلی

۴- استاد داور: دکتر احمد امجدی

پژوهش تحصیلات تکمیلی
کد (۸۹۰)

تقدیم به مهربانان
خانواده ی عزیزم
به پاس حمایت و صبوریشان

تشکر و قدردانی

از استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر حمید لطیفی سپاسگزاری می کنم که در زمان انجام این پروژه همواره پشتیبان من بوده اند و حمایت‌های ایشان موجب دلگرمی بوده است. همینطور از آقای زیبایی که بدون حضورشان پیشبرد تحقیقات امکان‌پذیر نمی‌بود، قدردانی می‌کنم. همچنین از استاد مشاورم جناب آقای دکتر مسعود حسینی و دوستان عزیزم آقایان کاظمی، خیری، ریاحی و موذن زاده (در قسمت تئوری پروژه) و خانم ها ضمیری و احمدلو، همینطور همه دوستانی که در این مدت یاری کننده من بوده، از هیچ لطف و محبتی دریغ ننمودند تشکر کرده و آرزوی موفقیت برای ایشان دارم. بدیهی است تمامی این موفقیت را مدیون خانواده عزیزم، مخصوصاً پدر و مادر مهربانم هستم، به امید آن که بتوانم خداوند را به خاطر تمامی این نعمات گرانقدر و عزیز شاکر باشم.

چکیده

در این مطالعه هیبریداسیون دو رشته مکملDNA، با استفادُه از اثرات تغییر ضریب شکست در حجم اطراف فیبر نازک شده، با استفاده از تکنیک میدان میرا شونده، آشکارسازی شد.

مطالعه در دو بخش شبیه سازی و تجربی انجام شد. در بخش شبیه سازی، انتشار باریکه نور در فیبر نوری با روش محاسباتی FD-BPM انجام شد. داده های حاصل از محاسبات نشان دهنده افزایش سیگنال خروجی در اثر افزایش ضریب شکست محیط خارجی فیبر است.

در بخش کار تجربی، تثبیت DNA پراب بر فیبر نوری نازک شده به کمک چسب بیولوژیکی و انطباق دو تک رشته پراب و هدف بررسی شد. داده های حاصل از آزمایش نشان دهنده آنست در اثر انطباق تک رشته های هدف و پراب (در غلظت یک میکرومولار و ۵۰ نانو مولار) ، ضریب شکست محیط اطراف فیبر افزایش می یابد.

اهمیت این روش حساسیت، سرعت مناسب و عدم نیاز به برچسب گذاری در مقایسه با دیگر روش های رایج بررسی هیبریداسیون است.

فهرست

فصل اول

۱-۱ حسگرهای فیبرنوری، مزیت ها، معایب و کاربردها ۱

۲-۱تعاریف زیستی ٦

۱-۲-۱ دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید(DNA) ٦

۱-۲-۲ اهمیت توالی سنجی DNA ۹

۱-۲-٤ روش های توالی سنجی DNA ۱۱

۱-۳ حسگرهای زیستی ۱۱

فصل دوم(بررسی انتشار نور در فیبر نوری ، تثبیت نمونه های بیولوژیکی، روشها، معایب و مزایا)

۲-۱) تئوری میدان میراشونده ۱٤

۲-۲) بررسی میدان خروجی از فیبر ۱۸

۲-۲-۱) عبور فضایی و حالت فضایی پایدار ۱۸

۲-۲-۲) ثابت های انتشار و سرعت فاز ۱۹

۲-۲-۳) روابط تعامد و نرمالیزاسیون ۱۹

۲-۲-٤) انرژی و توان، شارش توان در طول محور موجبر و کسر توان برای هر مد در هسته موجبر. ۲۰

۲-۳) حل معادلات و میدان های مدی ۲۲

۲-۳-۱) معادلات ویژه مقداری ۲۳

۲-۳-۲) جفت شدگی میان مولفات میدان ۲۳

۲-۳-۳) توضیح فیزیکی مدهای TE یاTM ۲٤

۲-۳-٤) توضیح فیزیکی مدهای هیبرید و طبیعت هیبریدی میدان های مدی ۲٤

۲-۳-۵) موجبر و پارامتر های مدی ۲۵

۲-٤) حل معادلات میدان در فیبرهایی با ساختار متقارن دایره ای ۲٦

۲-٤-۱) فیبرهای نوری با هدایت ضعیف ۲۷

۲-٤-۲) فیبرهای تغییر ساختار یافته ۲۸

۲-۵) روش های ثابت سازی اجزای زیستی بمنظور ساخت حسگر ۲۹

۲-٦) بازدهی هیبریداسیون و حساسیت ۳۱

۲-۷) تمرکز یابی بر سطح ۳۲

فهرست

۲-۸) اتصال پراب ۳٤
۲-۹) روش های تثبیت ۳۵
۲-۹-۱) ابقا در ماتریس پلیمری ۳۵
۲-۹-۲) اتصال کوالانی ۳٦
۲-۹-۳) روش همبستگی ۳٦
۲-۹-٤) جذب سطحی ۳٦
۲-۹-۵) تجمع در کامپوزیت ٤۰
۲-۹-٦) تک لایه های انجمنی(SAM) ٤۱
۲-۱۰) شرایط هیبریداسیون ٤۳
۲-۱۰-۱) دما ٤۳
۲-۱۰-۲) قدرت یونی ٤٤
۲-۱۰-۳) عدم تطابق بازی ٤٤
۲-۱۰-٤) انتقال جرمی ٤۵
۲-۱۰-۵) جذب های غیر اختصاصی ٤۵
۲-۱۰-٦) کینیتیک هیبریداسیون ٤۷
۲-۱۰-۷) چگالی الیگو نوکلئوتیدها بر سطح ٤۷
۲-۱۰-۸) انتخاب توالی DNA ٤۸
۲-۱۱) پارامتر های موثر بر جذب و واجذب ٤۸

فصل سوم(نتایج حاصل از شبیه سازی)

۳-۱) الگوریتم محاسبات در روش انتشار باریکه (BPM) میدان الکتریکی در فیبر های نازک شده ۵۲
۳-۱-۱) روش FDBPM ۵۳
۳-۱-۲) شکل ماتریسی با اختلافات محدود ۵۵
۳-۲) نتایج شبیه سازی ها و انطباق با تجربه ۵٦
۳-۲-۱) نتایج شبیه سازی فیبر ساده ۵٦

فهرست

۳-۲-۲) نتایج شبیه سازی فیبر نازک شده ٦١

فصل چهارم (نتایج تجربی، مقایسه و نتیجه گیری)

٤-١) جزئیات ساخت حسگر، باریک کردن فیبرنوری توسط لیزر۲ CO ٦٩

٤-٢) ساخت نگهدارنده فیبرنوری و انتقال فیبر نازک شده به آن ٧٢

٤-٣) معرفی چیدمان اصلی آزمایش و قطعات استفاده شده ٧٣

٤-٤) تقسیم بندی بخش های مختلف آزمایش و بیان اهمیت آن ها ٧٥

٤-٤-١) بررسی و تعیین نویز آشکارسازها ونوسانات شدت لیزر ٧٦

٤-٤-٢) بررسی رفتار سیگنال خروجی از حسگر در ازای تثبیت چسب بیولوژیکی در حین ساعت های اولیه تثبیت ٧٦

٤-٤-٣) بررسی چگونگی تطبیق رشته پراب بر روی پلی ال لایزین تثبیت شده و همینطور رشته هدف بر رشته پراب تثبیت شده توسط پلی ال لایزین بر روی فیبر ٨١

٤-٤-٤) بررسی پایایی داپلکس ایجاد شده توسط دو رشته مکمل با اضافه کردن اسید ٨٣

٤-٥) تحلیل نتایج (بخش تجربی) ٩٦

٤-٥-١) تاثیر میزان غلظت بر بازدهی هیبریداسیون ٩٦

٤-٥-٢) تاثیر دما بر بازدهی هیبریداسیون ٩٦

٤-٥-٣) انطباق تجربه و شبیه سازی ٩٦

٤-٥-٤) پیشنهادات برای ادامه کار ٩٧

فصل اول: مقدمه

۱-۱ حسگرهای فیبرنوری، مزیت ها، معایب و کاربردها

حسگرهای بیولوژیکی در سال های اخیر بدلیل نیاز پیوسته به وجود یک وسیله که بتواند به سادگی و با سرعت زیاد به اندازه گیری نمونه های بیولوژیکی بپردازد پیشرفت های فراوانی داشته اند و در زمینه های گسترده ای چون پزشکی، داروسازی، محیط زیست، دفاعی، پردازش زیستی و تکنولوژی غذایی کاربرد پیدا کرده اند.

سیستم های بیولوژیکی (از قبیل بافت، میکروارگانیزم ها، آنزیم ها، آنتی بادی ها یا نوکلئیک اسید) وقتی با یک مبدل فیزیکی- شیمیایی مخلوط می شوند(نوری، الکتروشیمیایی، ترمومتریک یا پیزوالکتریک) یک بیوحسگر را تشکیل می دهند. بیوحسگر از مجموعه تحلیل شونده، گیرنده، مبدل و پردازش گر سیگنال تشکیل شده است.

از طرف دیگر پیشرفت در زمینه فیبرهای نوری در سال های اخیر مرتبط با دو پیشرفت علمی در دو نوع وسیله بوده است. لیزر و فیبر های نوری با افت پایین. اخیراً فیبر های نوری قسمت عمده ای از تکنولوژی حسگرها را به خود اختصاص داده اند که استفاده از آنها بعنوان جزء حسگری در کاربردهای کلینیکی، داروسازی، صنعتی یا نظامی بسیار رایج و گسترده است. انتقال خوب نور، طول برهمکنشی بالا، قیمت پایین و توانایی برانگیختن مولکول های هدف و گرفتن نورگسیلی از مولکول های هدف بهترین نکاتی هستند که فیبر های نوری را گزینه مناسبی برای استفاده در بیوحسگرها می سازد.

فیبرهای نوری، نور را بر پایه اصول انعکاس داخلی[1] انتقال می دهند. در بیو حسگر های فیبر نوری، فیبر نوری نقش جزء مبدل را بازی می کند. سیگنالی که ایجاد می شود متناسب با تمرکز یابی مواد بیوشیمیایی یا شیمیایی در نمونه زیستی است. تکنیک های نوری که در مبدل حسگرهای زیستی فیبر نوری مورد استفاده قرار می گیرد

---

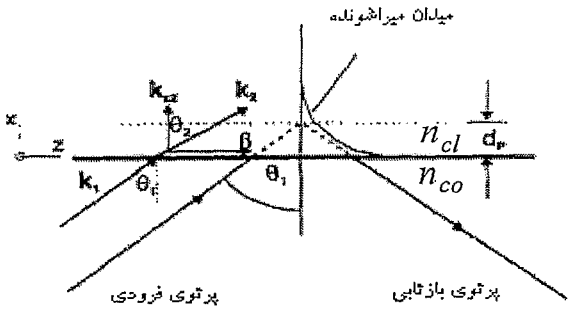
[1] - Total Internal Reflection(TIR)

عبارتند از تکنیک میدان میراشونده، تداخل سنجی و اثر دوپلر همچنین، تکنیک های دیگری از جمله تکنیک های طیف سنجی[۲]، جذبی[۳]، فلورسانسی[٤]، فسفر سانسی[٥]، تشدید پلاسمون های سطحی[٦] یا غیره استفاده می شوند.

این حسگر ها می توانند از لحاظ کلی به دو دسته تقسیم شوند، حسگر های داخلی که بر همکنش با نمونه طوری است که فیبر نوری در طول نمونه قرار گرفته است و حسگر های خارجی که فیبر استفاده می شود تا نور را داخل محیط نوری هدایت کند و سپس نور را که از محیط تاثیر پذیرفته را انتقال دهد.

حسگرهای فیبرنوری ازتغییر ساختار فیبرنوری و یک چیدمان اپتیکی ساخته می شوند و برای اندازه گیری پارامترهایی مانند دما، فشار، استرین و یا پارامترهای زیستی از قبیل میزان گلوکوزخون، نرخ رشد باکتری و یا آشکارسازی ویروس ها و میکروارگانیسم ها استفاده می شوند.

زمانیکه بازتابش کلی در فیبر نوری رخ می دهد در مرز مغزی- غلاف در محل بازتابش مقداری از موج الکترومغناطیسی به داخل غلاف تونل می زند که آنرا اصطلاحاً میدان میراشونده می نامند. موج میرا شونده یک میدان الکتریکی است که بصورت نمایی در غلاف میرا می شود. شکل(۱-۱)



شکل۱-۱ میدان میراشونده حاصل از بازتاب کلی نور در سطح مقطع فیبر

---

۲ - Spectroscopic

۳ - Absorption

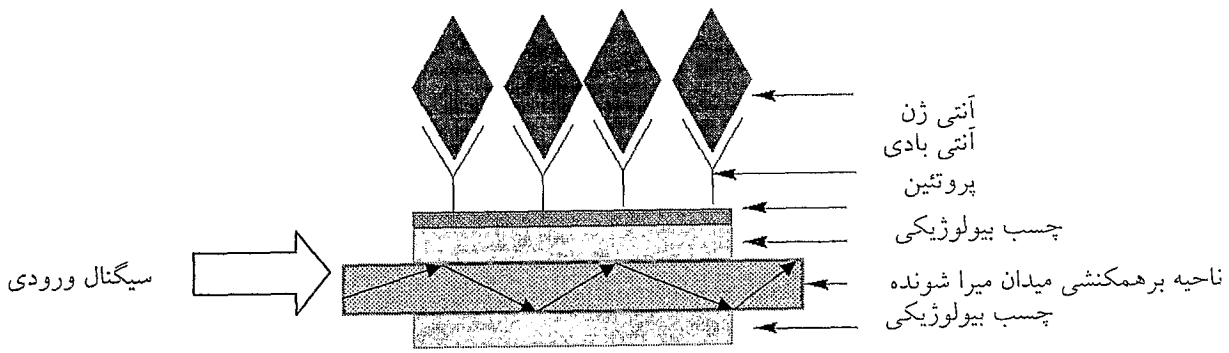
٤ - Fluorescence

٥ - Phosphorescence

٦ - Surface plasmon

اگرچه این میدان به سرعت در غلاف فیبر میرا و از بین می رود، با برداشتن چند میکرومتر از غلاف فیبر بدلیل ایجاد توانایی کوپلینگ نور در ناحیه نازک شدگی با تغییر ساختار، می توان عمق نفوذ آنرا افزایش داده و شرایط را برای برهمکنش با نمونه ی زیستی فراهم کرد. اگر غلاف فیبر برداشته شود، میدان میراشونده با محیط اطراف برهمکنش خواهد کرد و از طریق خروجی اپتیکی می توان تغییرات میدان ناشی از برهمکنش با محیط اطراف را بدست آورد.

در مطالعات اولیه بر روی حسگرهای بیولوژیکی فیبر نوری، غلاف به صورت یکنواخت برداشته شده و به جای آن نمونه قرار می گرفت. پارامترهای بیولوژیکی از قبیل آنتی بادی ها و آنزیم ها یا رشته های انطباقی DNA در صورتی که در مجاورت ناحیه ای که موج میراشونده وجود دارد، می تواند به عنوان هدف برای آشکارسازی و اندازه گیری در نظر گرفته شوند.



شکل۱-۲ برهمکنش میدان میرا شونده[۷] موجود در غلاف فیبرنوری با نمونه ی زیستی

تکنیک بکار رفته در این حسگرها ساده و دقیق است، مطابق شکل (۱-۲). از اثر برهمکنش میدان میرا شونده[۸] موجود در غلاف فیبرنوری با نمونه ی زیستی می توان بیوحسگر فیبرنوری میدان میراشونده ساخت.

از آنجائی که عمق نفوذ بسیار کوچک است، نیاز است که متناسب با ابعاد نمونه، عمق نفوذ که عمقی است که میدان به $1/e$ مقدار خود میرسد را افزایش داد. لذا برای افزایش عمق نفوذ، اقداماتی از جمله باریک کردن فیبر

---

[۷] Evanescent field

[۸] Evanescent field

نوری، خمش در ناحیه نازک شده، تغییر زاویه نور فرودی و افزایش طول موج منبع ورودی صورت گرفته است [۱]، که این روش را اصطلاحا باریک شدگی[۹] می نامند و حسگرهای فیبرنوری تهیه شده از این روش را بیوحسگر فیبرنوری باریک شده[۱۰] معرفی می کنند.

"مزیت های بیوحسگرهای فیبر نوری ایده آل"

بیوحسگر های فیبر نوری از این لحاظ که ناحیه بر همکنشی بسیار کوچکی با نمونه بیولوژیکی دارند و استفاده از آنها آموزش خاصی را نیاز ندارد حائز اهمیت هستند. چرا که در این صورت می توان از آنها در آزمایش های روز مره، مراقبت های پزشکی در خانه، جراحی و مراقبت های ویژه در مواقع ضروری استفاده کرد.[۲]

حسگرفیبرنوری ایده آل دارای ویژگی های منحصر بفردی است که در این میان می توان به این موارد اشاره کرد:

۱. امنیت نسبت به انفجار : در فیبر های نوری چون همواره سیگنال اصلی که آشکار سازی با آنها انجام می شود نور است، بنابراین هیچ خطر جرقه و انفجار وجود ندارد. بنابراین این حسگر ها در علوم پزشکی بدون وجود هیچ نگرانی می توانند استفاده شوند. همچنین می شود از این آشکار ساز ها در مواردی که خطراتی از قبیل وجود گازها و یا مواد قابل اشتعال وجود دارد استفاده کرد.
۲. تاثیر ناپذیری از امواج الکتریکی و یا تداخل امواج الکترومغناطیسی و نبود اتصال دهنده های الکتریکی آنها را مطمئن تر از حسگرهای زیستی الکتریکی می کند. چرا که جنس فیبر های نوری از دی الکتریک هایی چون شیشه یا پلاستیک است بنابراین احتیاجی به عایق بندی و یا بررسی محیط ها از لحاظ وجود مسیر های رسانا در محیط های با ولتاژ بالا نیست.
۳. مقاومت در محیط، فیبر های نوری از موادی ساخته می شوند که براحتی خورده نمی شوند، بنابراین پایایی بالایی نسبت به قرار گرفتن در محیط هایی مثل محلول های الکترولیت یا تابش های یونیزه کننده دارند. همچنین این فیبرها بسته به جنس فیبر می توانند در دماهای بالایی بین ۳۵۰ تا ۱۲۰۰درجه سلسیوس دوام بیاورند.

---

[۹] Tapering

[۱۰] Taper fiber optic biosensor

٤. هسته هدایت کننده نور در فیبر های نوری ابعادی بین ٥ تا ٦٠٠ میکرومتر را دارند با توجه به تغییر ساختار برای انجام عمل حسگری قابلیت کوچکتر شدن ابعاد را دارند و به راحتی در بافت زنده قابلیت استفاده را دارد. به دلیل کوچک بودن و سبکی استفاده از فیبر های نوری در ماهواره ها برای بررسی وضعیت بدنه نیز رایج است.

٥. حسگری از فواصل دور، بخاطر در دسترس بودن فیبر های نوری با اتلاف پایین، از آنجا که این فیبرها سیگنال نوری را از فواصل زیاد از حدود یک تا ١٠ کیلومتر بدون هیچ اتلافی جابجا می کنند، در مواردی که دسترسی به نمونه ها سخت و خطرناک است مثل محیط های بسیار داغ یا سرد یا دارای سمیت یا رادیواکتیو.

٦. حساسیت بالا توام با رفتار خطی نیز از خصوصیات منحصر بفرد این نوع حسگرها می باشد و با بکارگیری دو یا چند عامل اتصال این حسگرها توانایی پاسخ گیری همزمان از چند نمونه را دارند.

٧. دارای پتانسیل برای حسگری توزیعی، حسگری توزیعی یکی از مزایای فیبر های نوری است که هیچ رقیبی در این زمینه برای آنها وجود ندارد. چرا که این فیبر ها این توانایی را فراهم می آورند که پارامتر های فیزیکی یا شیمیایی را بصورت تابعی از مکان اندازه گرفت و بنابراین می توان تغییرات فضایی کمیات مختلف را بر اساس تغییرات سیگنال اندازه گرفت.

٨. با وجود منابع و آشکار ساز های کوچک برای فیبر های نوری، امکان طراحی یک سیستم حسگری در مجموعه ای کوچک وجود دارد.[٣]

از طرفی بعضی گزارشات بیانگر بعضی موانع قابل رفع در این حوزه می باشند که از این دسته می توان به این موارد اشاره کرد، تثبیت نمونه روی فیبر نوری ممکن است با مشکلاتی مواجه باشد که این امر با توجه به سطح تماس کوچک عامل اتصال نمونه به وجود می آید، ضمناً در صورتیکه معرف بکار برده شده گران باشد بازگشت پذیری آزمایش ممکن است مقدور نباشد.

کاربرد های فراوانی از فیبر نوری در زمینه حسگری گزارش شده است که از این میان می توان به کاربردهایی از قبیل موارد ذکر شده اشاره کرد.

- حسگر زیستی فیبرنوری برای فلوئورومتریک مارپیچ سه گانه DNA .[٤]
- آشکار سازی توالی خاصی از DNA با استفاده از فیبر های نوری.[٥]

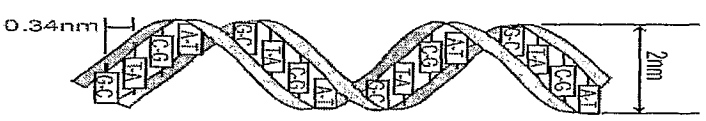
- آشکار سازی میزان کل پروتئین موجود در نمونه با استفاده از فیبر نوری و تکنیک فلوئورسانسی.[٦]
- استفاده از فیبرنوری فوتونیک کریستالی برای حسگری بیوشیمیایی.[٧]
- طیف سنجی موج میرا شونده با فیبر های چندین مده نازک شده.[٨]
- آشکار سازی نمونه های نیتریت در آب با استفاده از فیبر های نوری میدان میرا شونده.[٩]
- بیوحسگر های فیبر نوری DNA با تکنیک فلوئورسانسی.[١٠]

١-٢ تعاریف زیستی

١-٢-١ دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید(DNA)

نوعی اسید نوکلئیک می‌باشد که پایه ای ترین جزء سازنده سلول های هر ارگانیزم زنده در طبیعت است. ارگانیزم ها براساس دستورالعمل های ژنتیکی که برای کار کرد و توسعه بیولوژیکی موجودات زنده و ویروس در DNA قرار گرفته است بنا می شوند.

دستور العمل های ژنتیکی موجود در مولکول DNA نهایتاً برای مواردی از قبیل ساخت پروتئین و مولکول های RNA در سلول، مورد استفاده قرار می‌گیرد. قطعاتی از DNA که اطلاعات ژنتیکی را با خود حمل می کنند ژن نامیده می شوند. ولی DNA دارای توالی های دیگری نیز می‌باشد که برای ساخت خود DNA یا تنظیم استفاده از اطلاعات ژنتیکی موجود در ژن، مورد استفاده قرار می‌گیرد. از لحاظ شیمیایی، واحد های متشکل از قند و گروه فسفات به صورت متناوب و تکراری در طول رشته قرار گرفته اند. قند مورد استفاده در DNA دئوکسی ریبوز که نوعی پنتوز (قند پنج کربنی) است تشکیل شده است. قندها توسط گروه‌های فسفری به یکدیگر پیوند داده شده اند. اگرچه هر واحد تکرار شونده DNA بسیار کوچک می‌باشد (عرض رشته زنجیرهای DNA ٢٢ تا ٢٦ آنگستروم (٢/٢ تا ٢/٦ نانومتر) و طول هر واحد آن ٠/٠٣٣آنگستروم یا (٠/٣٣ نانومتر) می‌باشد. شکل(١-٣)



شکل ١-٣ ساختار DNA

ولی رشته پلیمری DNA ممکن است از میلیون ها نوکلئوتید(هر گروه شکر، فسفات و یک باز ئیدروژنی یک نوکلئوتید خوانده می شود) تشکیل شده باشد. برای مثال بزرگترین کروموزوم انسان، کروموزوم شماره یک دارای طولی به اندازه ۲۲۰ میلیون باز آلی مکمل می‌باشد. در دو رشته سازنده DNA ساختار در هم پیچیده‌ای همچون درخت انگور به شکل مارپیچ دارند. یک باز آلی پیوند داده شده به قند نکلوزید گفته می شود واگر نکلوزید از طریق باز خود به گروه فسفات متصل شود نکلئوتید تشکیل می شود. اگر چندین نوکلئوتید با یکدیگر پیوند داده شده باشند به طور مثال در DNA به آن پلی نکلئوتید گفته می شود.

نکلئوتید هر رشته از طریق باز های آلی در هر دو رشته به یکدیگر متصل می شوند، این اتصال بین دوباز آلی نوکلئوتیدهای دوطرف رشته می‌باشد که به این بازهای متصل به هم باز مکمل گفته می شود. باز های آلی به چهار شکل به نام های «سیتوزین»[11]، «گوآنین»[12]، «تیمین»[13] و «آدنین»[14] وجود دارند که باز آدنین مکمل باز تیمین ، وباز گوآنین مکمل باز سیتوزین می‌باشد. شکل هایی از ساختار چهار نوع باز آلی در شکل(۱-٤) آمده است. این توالی دورشته‌ای غیر قطبی ونامحلول در آب می‌باشد. پیوند بازهای مکمل با یکدیگر از طریق پیوند بین هیدروژن یک باز با مولکول نیتروژن یا اکسیژن باز مکمل ایجاد می شود این پیوند از نوع قوی کووالانسی نمی‌باشد و در نتیجه به راحتی شکسته و قابل جایگزینی می‌باشد، شکل(۱-۵ الف و ب) بترتیب نشان دهنده اتصال دوباز مکمل و دو رشته از طریق دو باز مکمل است. مطابق شکل پیوند مولکول هیدروژن بین دوباز مکمل آدنین-تیمین با گوآنین-سیتوزین متفاوت می‌باشد. در گوآنین-سیتوزین سه مولکول هیدروژن پیوندی وجو دارد در حالی که در آدنین-تیمین دو مولکول هیدروژن پیوندی وجود دارد در نتیجه میزان تعداد بازهای مکمل گوآنین-سیتوزین تعیین کننده استحکام DNA می‌باشد بطوری که هرچه مقدار آن بیشتر باشد DNA مستحکمتر است[۱۱].

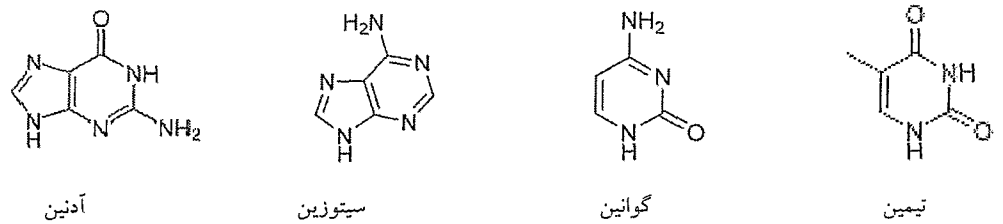
---

[11] - Cytosine

[12] - Guanine

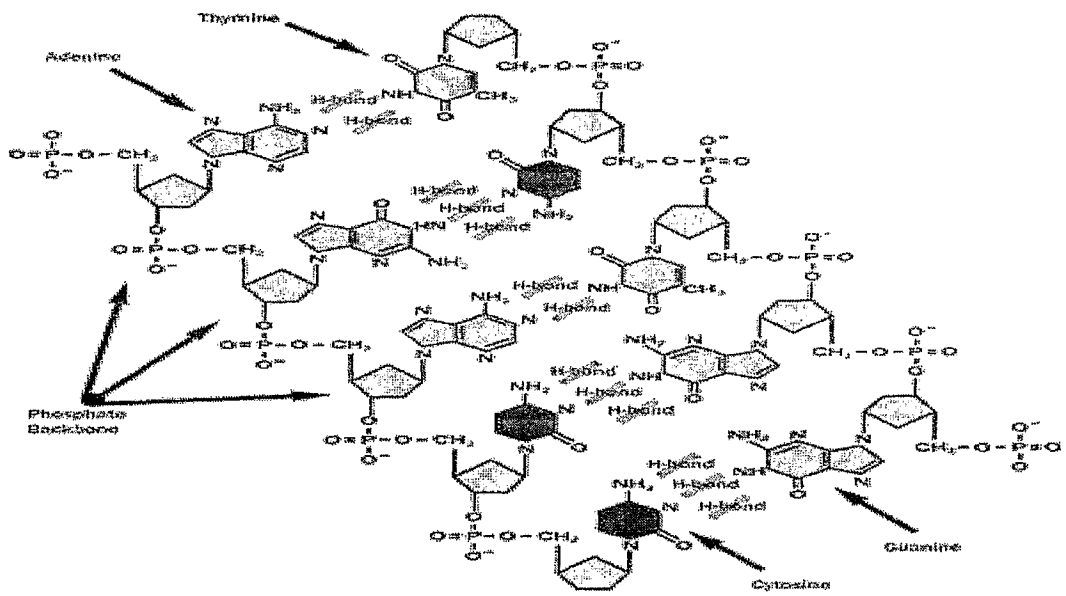
[13] - Thymine

[14] - Adenine



(الف)

(ب)



(ج)

شکل۱-٤ :الف- شکلهایی از ساختار چهار نوع باز آلی ب- اتصال دو باز مکمل ج -اتصال دو رشته از طریق دو باز مکمل(۱)*

توالی چهار باز آلی باعث کد گذاری رشته ژنتیکی می شود که این کدها برای ساخت آمینو اسید که واحد های سازنده پروتئین می‌باشند مورد استفاده قرار می‌گیرد. این کد ژنتیکی توسط مولکول RNA در مرحله به نام ترجمه[۱۵] خوانده می شود و برای ساخت آمینو اسید مورد استفاده قرار می‌گیرد. DNA در داخل سلول به شکل سازه‌هایی به نام کروموزوم می‌باشد. دو نسخه از هر کروموزوم در زمان تقسیم سلولی ساخته می شود، فرآیند تکثیر به دو نسخه را نسخه بردای DNA[۱۶] می نامند. کروموزوم در یوکاریوت ها (جانوران ، گیاهان، قارچ ها ، آغازیان) در بخشی به نام هسته سلول قرار می‌گیرد در حالی که در پروکاریوت ها (باکتری و آرکی ها) در سیتوپلاسم سلول قرار دارد و جایگاه مشخصی ندارد. در داخل کروموزوم ها پروتئین های کروماتینی (کروماتین واحد سازنده DNA می‌باشد) مانند هیستون وجود دارد که وظیفه فشرده سازی DNA را برعهده دارند. این فشرده سازی به تعامل DNA ودیگر پروتئین ها در مرحله رونویسی کمک می کند.

۱-۲-۲ اهمیت توالی سنجی DNA

آشکار سازی توالی خاصی از DNA بخاطر کاربردهای فراوان در تشخیص بهنگام بیماری ها در صنایع پزشکی، استفاده در تشخیص میکروارگانیسم ها در صنایع غذایی و شناسایی مواد سمی وغیره همواره مقوله مهمی در زمینه بیو پزشکی بوده است.

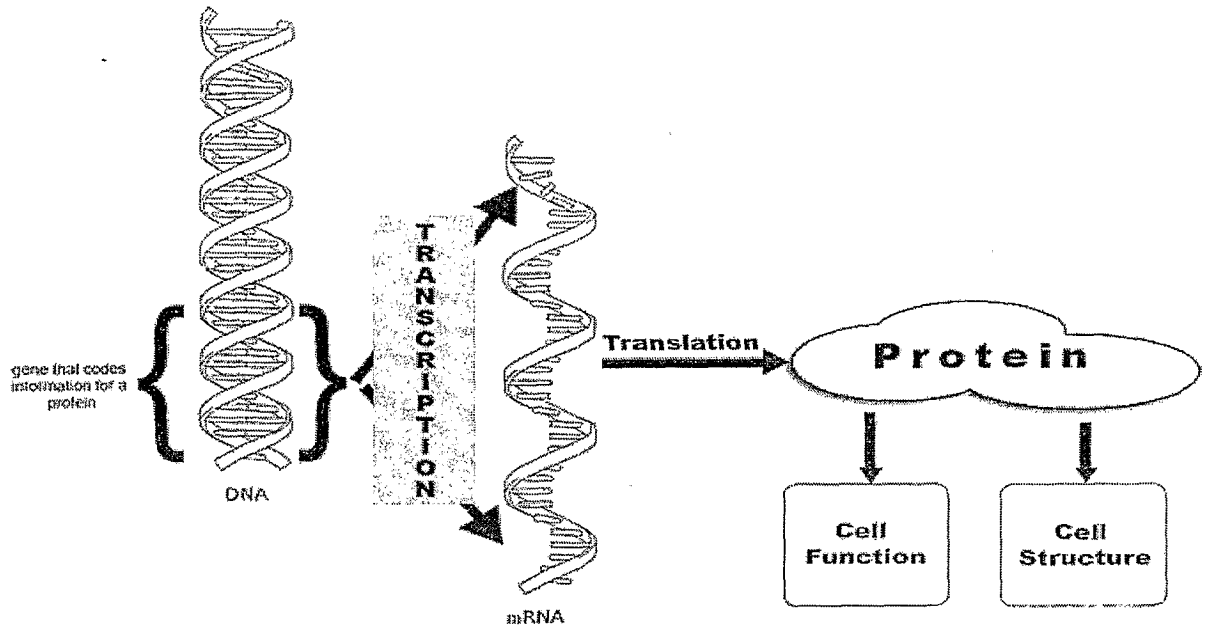
همان گونه که بیان شد DNA اطلاعات مربوط به توابع و ساختار سلول ها را در خود دارد و خواندن توالی ژنتیکی می تواند بینشی عمیق از توابع داخلی موجودات زنده برایمان فراهم آورد. شکل(۱-٦) نشان می دهد که چگونه DNA می تواند تابع سلولی و ساختاری یک ارگانیزم را مشخص کند. توالی DNA استفاده می شود تا mRNA (اسید ریبو نوکلئیک پیک[۱۷]) را بوجود آورد.

---

[۱۵] - Translation

[۱٦]- Transcription

[۱۷] - Messenger RNA



شکل ٦-١ نقش DNA در ایجاد پروتئین و ساختار و توابع موجود در ارگانیزم ها

این فرآیند برای ایجاد پروتئین های مختلف استفاده می شود، پروتئین ها قسمت مهمی از سلول هستند چون در تمامی فرآیند هایی که در سلول اتفاق می افتد شرکت می کنند، آنها مجری توابع مختلفی در سلول مثل سوخت و ساز یا کپی برداری هستند و نقش بسزایی در شکل گیری آن دارند.

همچنین برخی از قسمت های توالی هستند که هنوز کارشان در سلول نامشخص است و هنوز وظیفه ای برای آنها در سلول تعریف نشده است، قسمت هایی در نوکلئوتید هستند که برای جلوگیری از جهش مفید هستند[١١]. معمولا تشخیص یک جابجایی اشتباه در ژن خاص (بی نظمی های ژنتیکی) که تحلیل و مقایسه بخش هایی از توالی با نمونه های سالم می توانند تعیین کننده کدهایی باشند که مسئول خلق جهش های پروتئینی هستند با تعیین دلیل جهش های پروتئینی می تواند کمک موثری در تولید دارو ها و درمان بیماری ها باشد.[١٢]

بر اساس آماری که در آمریکا گرفته شده است، انتظار می رفت ١,٤٧٩,٣٥٠ نفر در سال ٢٠٠٩ به انواع سرطان ها دچار شوند. از این بین برآورد می شد ٥٦٢٣٤٠ نفر با بیماری مهلک سرطان کشته شوند که برابر بود با بیشتر از ١٥٠٠ نفر در روز که این رقم بعد از بیماری های قلبی دومین رتبه را برای علت مرگ در آمریکا به خود اختصاص می دهد، بعبارتی ١ واقعه مرگ از هر٤ واقعه مربوط به انواع بیماری های سرطان است. آماری از سال ٢٠٠٨ نشان دهنده خسارت ٢٢٨/١بیلیون دلاری ناشی ازسرطان بوده است. ٩٣/٢ بیلیون دلار در درمان

مستقیم سرطان، ۱۸/۸ بیلیون دلار در درمان دیگر عوارض عفونی همراه (درطول درمان سرطان) و ۱۱۶/۱ بیلیون دلار ناشی از مرگ افراد و عدم وجود این نیروهای انسانی در صنعت [۱۳].

۱-۲-٤ روش های توالی سنجی DNA

روش های توالی سنجی DNA حدود ٤٠ سال است که مطرح شده اند و از اواخر دهه ۱۹۷۰ توالی یابی سریع و کارآمد امکان پذیر شد. امروزه بطور گسترده ای این روش ها تغییر می یابند تا روشی بهینه ابداع شود. دو روش متفاوت قدیمی و رایج توالی یابی، روش خاتمه زنجیره [۱۸] توسط اف. سنگر[۱۹]و آ.آر. کلسون[۲۰] و روش تجزیه شیمیایی توسط آ. ماکسام[۲۱] و دابلیو گیلبرت[۲۲] در ایالات متحده بطور همزمان ابداع شدند. این دو روش اختلاف های زیادی با هم دارند، اما هر دو امکان تعیین توالی چند کیلو باز DNA را در حداقل زمان امکان پذیر می سازند. در ابتدا هر دو روش به یک اندازه بکار برده می شدند ولی امروزه همه دستگاه های توالی سنجی از روش خاتمه زنجیره استفاده می کنند، که دلیل آن وجود مضرات مواد شیمیایی بکار رفته در روش های شیمیایی است.[١٤] و[١٥]

روشهای قدیمی روش هایی طولانی و گران قیمت بودند و احتمال خطا در آنها بسیار بالا بود و نیاز به یک وسیله که بتواند در زمانی کمتر با میزان خطای کمتر DNA بزرگ چون DNA انسان را توالی یابی کند همواره احساس می شد.

مهمترین پیشرفتهایی که در این زمینه بوقوع پیوست (اختراع حسگرهای ظریف و فوق العاده حساس و آرایه های از آن ها) تا دو دهه اخیر بظهور نرسید.

۱-۳ حسگرهای زیستی DNA :

حسگرهای زیستی چون حسگر DNA شامل دو جزء کوچک در تماس با هم هستند، مولکول های تشخیص زیستی[۲۳] که بااتصال به نمونه و برهمکنش با آن شرایط را برای شناسایی نمونه مورد نظر فراهم می کند و

---

[۱۸] - Chain Termination

[۱۹] – F.Sanger

[۲۰] - A.R. Coulson

[۲۱] - A.Maxam

[۲۲] - W.Gilbert

[۲۳] - Recognition biomolecule