بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه الزهرا(س)
دانشکده علوم پایه

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد شیمی (گرایش تجزیه)

عنوان:

مطالعه برهمکنش ذرات نانو نقره با DNA

اساتید راهنما:
سرکار خانم دکتر ژیلا آزاد
سرکار خانم دکتر زهرا طالب پور

دانشجو:
منصوره طاهری

مهر ۱۳۹۰

چکیده :
در سال‌های اخیر ساخت و استفاده از ذرات نانو نقره (SNP) بسیار مورد توجه قرار گرفته است و کاربردهای زیادی در محصولات مصرفی، از ابزارهای پزشکی میکروب‌زدایی و کاربردهای خانگی گرفته تا تصفیه‌ی آب، پیدا کرده‌اند. چون مکانیسم حاکم بر رفتار مواد اولیه‌ای که در ساخت این ذرات نانو از آن‌ها استفاده شده برای موادی با مقیاس نانو کاربردی ندارد، نگرانی‌های زیادی در مورد صدمات احتمالی وارد بر محیط به خاطر استفاده از ذرات نانو نقره وجود دارد. بنابراین بررسی برهم کنش این ذرات با ملکول مهم زیستی می‌تواند جوابگوی بسیاری از پرسش‌ها در مورد احتمال اثرات منفی آن‌ها بر موجودات زنده و محیط زیست باشد.

در این پژوهش، برهم کنش ذرات کلوئیدی نانو نقره با DNA طحال گوساله به وسیله‌ی تکنیک‌های طیفبینی فلورسانس و جذب مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده ازمعادله‌ی بِنِسی- هیدربراند و تغییرات طیف جذبی در حین افزایش ذرات نانو نقره به DNA، ثابت تشکیل ظاهری کمپلکس ($Kapp = ۲/۳۷ \times ۱۰^{۴}\ M^{-۱}$) محاسبه شد. به منظور بررسی رفتار فلورسانس DNA در حضور ذرات نانو نقره و به دلیل ضعیف بودن شدت فلورسانس DNA، از یک پروب با نام اتیدیم برماید (EB) استفاده شد. افزودن ذرات نانو نقره کلوئیدی، خاموشی فلورسانس DNA اتیدیم برماید را در پی داشت. تعداد مکان‌های اتصال(۰/۹۹۷ =n) و ثابت اتصال ظاهری$K=۴/۵۱ \times ۱۰^{۴}\ M^{-۱}$ با استفاده از داده‌های خاموشی فلورسانس محاسبه شد. ضمناً اندازه‌ی ذرات نانو نقره بوسیله‌ی تکنیک پخش نور دینامیک.(DLS) تعیین شد. عکس‌های ثبت شده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری(TEM) قرار گرفتن ذرات نانو نقره بر روی DNA را نشان داد. در نهایت نتایج حاصل نشان داد که ذرات نانو نقره کلوئیدی با DNA به طور معنی‌داری برهم کنش دارند.

لازم به ذکر است ذرات نانو نقره استفاده شده در این کار، در آزمایشگاه و به روش پایین به بالا bottom-up ساخته شدند. در این روش از نمک نقره نیترات به عنوان نمک فلزی اولیه، سدیم

بوروهیدرید به عنوان عامل کاهنده، سدیم سیترات به عنوان عامل پایدار کننده و آب به عنوان حلال استفاده شد. به منظور بررسی اندازه ذرات و توزیع آن‌ها از روش پخش نور دینامیکی(DLS) استفاده گردید. نتایج نشان دادند که اندازه متوسط ذرات nm ۴/۳۲ و انحراف استاندارد آن ۰/۰۲ بود.

Alzahra University

Title:

Intraction study of silver nanoparticles and DNA

Advisors:

Dr. Jila Azad

Dr. Zahra Taleb pour

BY:

Mansoure Taheri

Oct . 2011

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه..... ۱

۱-۲- ذرات نانو نقره..... ۱

۱-۳- روش های سنتز ذرات نانو نقره..... ۲

۱-۳-۱- نمک فلزی اولیه..... ۳

۱-۳-۲- حلال ها.....

.....

۴.....

۱-۳-۳- عوامل کاهنده.....

.....

.....

۵.....

۱-۳-۴- عوامل پایدار کننده.....

.....

.....

۶

۱-۴- مورفولوژی ذره.....

.....

.....

۸.....

۱-۵- کاربردهای ذرات نانو نقره.....

.....

۱۰.....

۱-۶- ساختمان و ویژگی های DNA.....

.....
۱۲.....
۱-۶-۱- بررسی برهم کنش DNA با ترکیبات مختلف.....
.....
۱۶.....
۱-۷- روش های بررسی برهمکنش بین مولکول ها.....
.....
۱۷.....
۱-۷-۱- طیف بینی جذبی ماوراء بنفش- مرئی (UV).....
.....
۱۷.....
۱-۷-۲- طیف بینی فلورسانس مولکولی.....
.....
۱۸.....
۱-۷-۲-۱- اندازه گیری های حالت پایه (steady state measurment).....
۱۸.....
۱-۷-۲-۲- اندازه گیری های Time Resolved
.....

.....
۲۲.....
۱-۷-۳- طیف بینی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR).....
.....
۲۳.....
۱-۷-۴- طیف بینی مادون قرمز Infra Red (IR)
.....
.....
۲۳....
۱- ۷-۵- طیف بینی دو رنگ نمایی مدور Circular (CD) Dichroism.....
۲۴.....
۱- ۷-۶- میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)
.....
.....
۲۵.....
۱- ۷- ۷- میکروسکپی نوری پیمایشی میدان نزدیک (NSOM)
.....
۲۷.....
۱-۷-۸- بررسی بار سطحی بوسیله ی پتانسیل زتا.....
.....
۲۷.....

فصل دوم: بخش تجربی

۲-۱- مواد مصرفی.....
.....
.....
.....۲۸
۲-۲- دستگاه های مورد استفاده.....
.....
.....۲۸
۲-۲-۱- سیستم پخش نور دینامیکی Dynamic Light Scattering (DLS).....
.....۲۸
۲-۲-۲- طیف بین جذبی فرا بنفش-مرئی(UV).....
.....
.....۲۹
۲-۲-۳- طیف بینی فلورسانس مولکولی.....
.....
.....۲۹
۲-۲-۴- میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM).....

.....
۲۹.....
۲-۳- مراحل تهیه نمونه.....
.....
.....
۳۰.....
۲-۳-۱- تهیه بافر Tris - HCl.....
.....
۳۰.....
۲-۳-۲- تهیه ذرات نانو کلوئیدی نقره.....
.....
۳۰.....
۲-۳-۳- تهیه محلول برای تعیین اندازه SNP.....
.....
۳۱.....
۲-۳-۴- تهیه محلول DNA مادر.....
.....
۳۱.....

۲-۳-۵- تهیه محلول‌های مورد نیاز برای طیف بینی جذبی (UV).....
.....۳۲
۲-۳-۶-تهیه محلول های مورد نیاز برای طیف بینی فلورسانس.....
.....
۳۳
۲-۳-۷-تهیه محلول برای ثبت عکس های میکروسکپ الکترونی عبوری (TEM).....
.....۳۵
فصل سوم: نتایج و بحث و بررسی
۳-۱- تعیین اندازه SNP.....
.....
.....
۳۷..
۳-۲- بررسی خلوص DNA
.....
.....
.....۳۸
۳-۳- نتایج حاصل از بررسی‌ها توسط روش طیف بینی جذبی UV.....
.....۳۸

عنوان صفحه

۳-۴- نتایج حاصل از بررسی‌ها توسط روش خاموشی فلورسانس EB-DNA به‌وسیله‌ی ذرات کلوئیدی نانو نقره.....۴۳
۳-۵- تعیین ثابت اتصال و تعداد مکان‌های اتصال.....
.....
.....۴۶
۳-۶- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری.....
.....
.....۴۷
نتیجه گیری.....
.....
.....
.....۴۹
مراجع.....
.....
.....
.....۵۰

فهرست جداول:

جدول ۱ غلظت نانوذرات نقره و DNA در محلول های ساخته شده برای طیف بینی UV
.....۳۳
جدول ۲ غلظت نانوذرات نقره، DNA و اتیدیم برماید (EB) در محلول های ساخته شده برای طیف بینی.....۳۴
جدول ۳ جذب مشاهده شده (A_{abs}) در محلول‌های DNA در حضور مقادیر مختلف نانو نقره.....۴۲
جدول ۴ شدت فلورسانس مشاهده شده برای خاموشی فلورسانس EB-DNA بوسیله‌ی SNP.....٤٥

فهرست شکل‌ها :

شکل ۱-۱ درصد نمک های نقره ی استفاده شده در گزارشات علمی برای سنتز ذرات نانو نقره.....
۴
شکل ۱-۲ درصد حلال های استفاده شده در گزارشات علمی برای سنتز ذرات نانو نقره.....
۵.....
شکل ۱-۳ درصد عوامل کاهنده گزارش شده در گزارشات علمی برای سنتز ذرات نانو نقره.....
۶.....
شکل۱-۴ درصد عوامل پایدارکننده استفاده شده در گزارشات علمی برای سنتز ذرات نانو نقره.....
۷....
شکل ۱-۵ درصد اندازه ذرات گزارش شده در گزارشات علمی مربوط به سنتز ذرات نانو

نقره.....
.....۹
شکل ۱-۶- ساختمان جفت بازهای موجود در DNA.....
.....
.....۱۵
شکل ۱-۷ ساختمان یک زنجیره ی دو رشته ای DNA.....
.....
.....۱۶
شکل ۱-۸ تصویر TEM نانوذرات نقره متصل شده به الف- آدنین، ب- گوانین، ج- تیمین و د- سیتوزین.....۲۶
شکل ۳-۱ نمودار DLS مربوط به نانو ذرات نقره.....
.....
.....۳۷
شکل۳-۲- طیف جذبی DNA.....
.....
.....۳۸
شکل۳-۳ الف - طیف جذبی DNA ب – طیف جذبی DNA ($۱/۲ \times ۱۰^{-۵}$ M) درحضور ذرات نانو نقره کلوئیدی ۴۰

شکل ۳-۴ نمودار بنسی هیدربراند مربوط به محاسبه K_{app} ..... ۴۲.

شکل ۳-۵ خاموشی فلورسانس EB-DNA در حضور غلظت های مختلف ذرات نانو نقره کلوئیدی ۴۳

شکل ۳-۶ نمودار استرن-والمر برای خاموشی فلورسانس EB-DNA توسط نانوذرات کلوئیدی نقره..... ۴۵

شکل ۳-۷ نمودار مربوط به محاسبه K و n..... ..... ۴۷

شکل ۳-۸ تصویر TEM ثبت شده محلولی متشکل از DNA و نانوذرات نقره پس از تثبیت و حلال پرانی..... ۴۸

۱-۱- مقدمه

نانو ذرات فلزی با خواص منحصر به فرد مانند مساحت سطح بزرگ، ساختار حفره ای، خواص الکترونی و کاتالیتیکی، کاربردهای بالقوه ای در الکترونیک، اپتیک، ژنومیک، پروتئومیکس و زمینه های بیوتجزیه ای دارند که منجر به مصرف آن‌ها در محصولات تجاری و مصرفی شده است [۱]. اگرچه کاربردهای نانوذرات به طور وسیعی در بسیاری از زمینه ها در حال افزایش است ارتباط آن ها با محیط و اثرات منفی آن ها برسلامتی موجودات زنده یک مساله ی حل نشده است. نانوذرات یک قسمت از زندگی روزمره ما شده اند اما دانسته های ما در مورد آثار زیست تخریبی و فعالیت زیستی آن ها اندک است.

۱-۲- ذرات نانو نقره[1] (SNP)

از نظر تاریخی ترکیبات و یون‌های نقره به دلیل خاصیت ضد باکتری که دارند، به طور گسترده‌ای در محصولات بهداشتی و درمانی استفاده شده‌اند [۲]. با گذشت زمان از یک طرف به دلیل معرفی آنتی بیوتیک ها و مواد ضد عفونی کننده جدید و از طرف دیگر به خاطر احتمال وجود اثرات سمی نقره، استفاده از ترکیبات و یون های نقره به عنوان عامل ضد عفونی کننده منسوخ شد.

اخیراً توجهات به ساخت و استفاده از ذرات نانو نقره به خاطر خواص فیزیکوشیمیایی و فعالیت های

[1] Silver Nano Particle

بیولوژیکی افزایش یافته‌ی آن‌ها در مقایسه با مواد اولیه، از سر گرفته شده است. از این رو طیف وسیعی از کاربردها در محصولات مصرفی ؛ از ترکیبات دارویی گندزدایی کننده و کاربردهای خانگی گرفته تا تصفیه آب، ظاهر شد [۳].

البته چون مکانیسم های فرضی که بر سرنوشت و انتقال مواد اولیه حاکم اند نمی توانند مستقیما در مورد مواد در مقیاس نانو به کار روند، نگرانی زیادی درباره توانایی صدمات محیطی مربوط به ساخت و استفاده از نانوذرات نقره وجود دارد.

۱-۳- روش های سنتز SNP

به طور کلی SNP به وسیله ی تکنیک های مختلفی سنتز می شود. با کنترل شرایط سنتز، شکل ها و اندازه های متفاوتی از SNP برای استفاده های گوناگون ایجاد می شود. تکنیک های سنتز به روش های پایین به بالا[1] و بالا به پایین[2] دسته بندی می شوند [۴]. تکنیک بالا به پایین فلز نقره را در فرم اولیه آن استفاده می کند، سپس به طور مکانیکی و با استفاده از روش های خاص مانند لیتوگرافی اندازه ی آن را به مقیاس نانو کاهش می دهد [۵]. در تکنیک پایین به بالا ابتدا نمک نقره در یک حلال حل شده، و با اضافه کردن عامل کاهنده به نقره اتمی تبدیل نمی‌شود. در این فرآیند از یک عامل پایدار کننده برای جلوگیری از انباشتگی ذرات نانو استفاده می‌شود.

به طور کلی به دلیل نقص سطح ذرات تشکیل شده با استفاده از روش بالا به پایین ، تکنیک پایین به بالا در سنتز SNP بیشتر استفاده می شود.

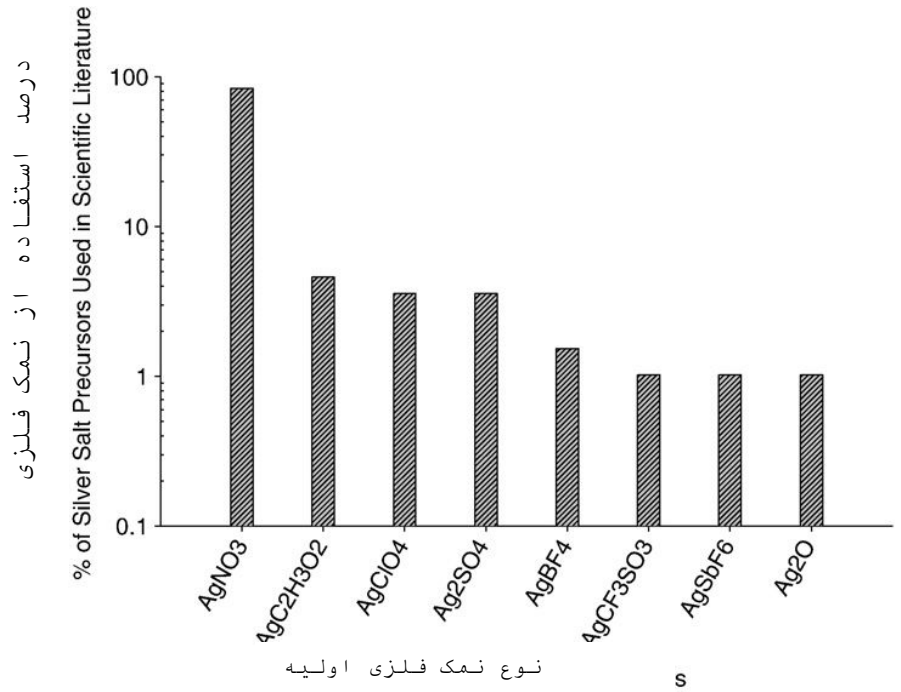
[1] Bottom-up
[2] Top-down

تجزیه و تحلیل مقالات نشان می دهد که در سنتز SNPعلاوه بر نوع تکنیک، انتخاب نمک فلزی اولیه، حلال ها، عوامل کاهنده و عوامل پایدار کننده نیز بسته به هدف سنتز این نانوذرات و نوع کاربری، بسیار متفاوت بوده و از اهمیت زیادی برخوردار است.

بی تردید حلال ها و عوامل کاهنده استفاده شده در این فرآیند ها بر روی خواص فیزیکی و نیز مورفولوژی SNP ساخته شده اثرگذار است. این خواص ویژه نیز به نوبه خود سرنوشت، انتقال و میزان سمیت نانوذرات را در محیط تحت تاثیر قرار خواهند داد. برای مثال استفاده از سدیم سیترات به عنوان عامل کاهنده SNP با یون‌های جذب سطحی شده با بار منفی را تولید می کند که احتمالا متفاوت با یک SNP با یون‌های جذب سطحی شده مثبت است که توسط پلی اتیلن ایمین شاخه‌دار ایجاد می‌شود. در ادامه به انواع مواد مختلفی که در ساخت SNP استفاده شده است، اشاره می‌شود.[۶].

۱-۳-۱- نمک فلزی اولیه

در تکنیک های پایین به بالا، نمک نقره برای تولید نقره یونی که می تواند به فرم SNP کاهش یابد، استفاده می گردد. با توجه به شکل۱-۱، نقره نیترات، نمک فلزی اولیه ای است که به طور وسیعی برای تقریبا ۸۳% از موارد گزارش شده ی روش های سنتز کلی و خاص ذرات نانو نقره استفاده می شود. (منظور از سنتز کلی، ساخت نانو ذرات به روش‌های شناخته شده‌ی معمول و سپس کاربردشان به منظور بررسی اثرات آن‌هاست و منظور از سنتز خاص ساخت نانو ذرات به روش‌های جدید ابداعی می‌باشد.) استفاده‌ی زیاد از نقره نیترات را می‌توان به قیمت پایین و پایداری شیمیایی آن در مقایسه با انواع دیگر نمک های نقره نسبت داد [۷].



شکل ۱-۱ درصد نمک های نقره ی استفاده شده در گزارش های علمی برای سنتز ذرات نانو نقره

۱-۳-۲- حلال ها

حلال ها برای حل کردن نمک های نقره و دیگر مواد شیمیایی درگیر در فرآیند سنتز استفاده می شوند. طبق شکل ۱-۲ اگر چه در سنتز SNP هم حلال‌های آلی و هم غیرآلی به کار می‌روند، اما در فرآیند های سنتز، حدود ۸۰% از آب به عنوان حلال استفاده شده است[۸].