بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد
رشته زیست سلولی ملکولی

بررسی اثراندازه نانوذرات طلا وساختار لیگاند در راستای طراحی یک زیست حسگر برای شناسائی گیاهان تراریخت

نگارش
الهام نوری‌سعید

استاد راهنما
دکتر ایوب آرپنائی

استاد مشاور
دکتر سید امیر موسوی

۱۳۹۰

تقدیم به

پدر بزرگوار و مادر مهربانم ؛

آن دو فرشته ای که از خواسته هایشان گذشتند، سختی ها را به جان خریدند وخود را سپر بلای مشکلات و ناملایمات کردند تا من به جایگاهی که اکنون در آن ایستاده‌ام برسم.

و همسر عزیزم ؛

که سایه مهربانیش سایه سار زندگی‌ام شد او که پناه خستگی‌هایم بود و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود.

و

تقدیم به توئی که اشتیاق به دانستن در چشمانت موج می‌زند.

تشکر و قدردانی:

حمد و سپاس خدای را که الطاف بی کرانش همواره شامل حال بندگانش بوده است. بی شک انجام این پروژه را مدیون راهنمایی ها و مساعدت های ارزنده اساتید راهنما و مشاور جناب آقای دکتر آرپنائی و جناب آقای دکتر موسوی هستم. بنابر این لازم دانسته به خاطر اعتماد به بنده و اعتماد به نفسی که به من بخشیده اند از ایشان تشکر نمایم و از درگاه خداوند متعال همواره برایشان آرزوی توفیق و بهروزی مینمایم. هم چنین از جناب آقای دکتر ولی، استاد دانشگاه مک‌گیل کانادا، که بنده را در آنالیز تصاویر TEM یاری نمودند کمال سپاس و قدردانی را دارم.

بی‌شک هیچ پژوهشی بدون همدلی و یاری همراهان و دوستان به پایان نخواهد رسید. لذا وظیفه خود می‌دانم که از یکایک این عزیزان نیز تقدیر و سپاسگزاری نمایم. از خانواده که همواره مشوق و پشتوانه ام بوده اند نیز کمال سپاس و تشکر را دارم.

چکیده

در این تحقیق نانوذرات طلا جهت توسعه یک زیست‌حسگر نوری DNA، برپایه رنگ‌سنجی، ساخته و به کار گرفته شدند. دراین راستا اثرات اندازه نانوذرات و ساختار روبشگر بر تجمع نانوذرات طلای عاملدار شده و تغییر خصوصیات نوری محلول در حضور ملکولهای هدف و در نتیجه علکرد سامانه، مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه، یک توالی موجود در گیاهان تراریخت، به‌عنوان مدل، در آشکارسازی توالی‌های DNA استفاده شد.

سنتز نانوذرات با استفاده از ۵ نسبت متفاوت از سیترات به طلا (نسبت‌های ۱:۱، ۰/۳: ۱، ۰/۲۵: ۱، ۰/۲: ۱، ۰/۱: ۱) به عنوان مواد پیش‌ساز انجام گرفت، این ذرات به‌ترتیب دارای متوسط اندازه ۹۲/۲٦، ۱۸/٤٤، ۱۵/۳۹، ۱۳/٦۵و ۲۰/۲۲ نانومتر بودند. ثابت نگه‌داشتن غلظت سیترات، تأثیر تغییر غلظت نمک طلا بر خصوصیات نانوذرات سنتز شده را مشخص کرد. تصاویر TEM نشان داد همراه با کاهش غلظت طلا و در نتیجه افزایش pH، اندازه نانوذرات کاهش یافته و توزیع اندازه نانوذرات نیز محدودتر می‌شود. اما این روند تا نسبت ۰/۲: ۱ ادامه داشته و با کاهش بیشتر غلظت نمک طلا، اندازه نانوذرات افزایش یافت، ولی توزیع اندازه آنها همچنان محدود بود.

برای اولین بار در این تحقیق، رشته‌های روبشگر با استفاده از یک توالی نوکلئوتید آدنین که نقش فضاپرکن افقی را نیز ایفا می‌کرد، بر روی سطح نانوذرات طلا تثبیت شدند. توالی بهینه‌ای از آغازگر rRNA 35s ویروس موزاییک گل کلم، در طراحی ساختار رشته‌های روبشگر و رشته هدف استفاده شد. در ساختمان روبشگرهای اتصالی به نانوذرات، علاوه بر توالی دخیل در هیبریداسیون، دو بخش، توالی از آدنین برای اتصال به نانوذرات طلا و به‌عنوان فضاپرکن افقی و دیگری توالی از تیمین به عنوان فضاپرکن عمودی لحاظ شد.

پس از آماده‌سازی دو گروه از نانوذرات عامل‌دار شده که قابلیت ایجاد تجمع در حضور ملکولهای هدف را دارا بودند، تجمع نانوذرات در مجاورت رشته هدف تحت شرایط مختلف بررسی شد. تغییرات ایجاد شده در طیف جذبی و تغییر رنگ مشاهده شده در محلول در مورد نانوذرات بزرگتر بیشتر بود. افزایش اندازه نانوذرات هرچند با کاهش همگنی اندازه همراه بود ولی موجب عملکرد بهتر آنها در تجمع نانوذرات شد.

از طرف دیگر، بلندتر شدن فضاپرکنهای عمودی با کاهش سرعت ایجاد تجمع بین نانوذرات و همچنین با تغییرات اندک خصوصیات نوری محلول پس از مجاورت با ملکول هدف همراه بود. به عبارت دیگر در این شرایط عملکرد ضعیفتری به دست آمد. در پایان بررسی عملکرد سامانه طراحی شده در مجاورت DNA گیاه تراریخت مطلوب نبود.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات طلا، رشته‌های روبشگر، تجمع نانوذرات، فضاپرکن افقی و عمودی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱- گیاهان نوترکیب ۲

۱-۲- روشهای آشکارسازی گیاهان تراریخت ۳

۱-۲-۱- واکنش زنجیره پلیمراز(PCR) ۳

۱-۲-۲- زیست حسگر ٤

۱-۳- نانوفناوری و تلفیق آن با علوم زیستی و زیست‌فناوری ٤

۱-۳-۱- ملکول‌های زیستی در نانوفناوری ٥

۱-۳-۲- نانوزیست‌فناوری ٦

۱-۳-۳- DNA ملکولی مناسب، در معماری ساختارهای نانو ۷

۱-۳-۳-۱- رشته‌های تک بعدیDNA قالبی برای تجمع ۸

۱-۳-۳-۲- DNA پایه ساختارهای چند بعدی ۸

۱-۳-٤- نانوذرات ۹

۱-۳-٤-۱- روش‌های مختلف سنتز نانوذرات ۹

۱-۳-٤-۱-۱- روش‌های بالا به پایین ۹

۱-۳-٤-۱-۲- روش‌های پایین به بالا ۹

۱-۳-٤-۱-۳- روش‌های مرکب ۱۰

۱-۳-٤-۲- نانوذرات طلا ۱۰

۱-۳-٤-۲-۱- خاصیت تشدید پلاسمون سطحی طلا ۱۰
۱-۳-٤-۲-۲- کاربردهای زیستی و پزشکی نانوذرات طلا ۱۲
۱-۳-۵- سامانه‌های تلفیقی ۱٤
فصل دوم: بررسی منابع ۱٦
۲-۱- سنتز نانوذرات طلا ۱۷
۲-۱-۱- روشهای شیمیائی سنتز نانوذرات طلا ۱۷
۲-۱-۱-۱- روش ترکویچ ۱۸
۲-۱-۱-۲- روش براست ۱۸
۲-۱-۲-۳- روش پرالت ۱۹
۲-۱-۱-٤- روش سولونیز ۱۹
۲-۱-۲- استفاده از احیاءگر سیترات سدیم ۱۹
۲-۱-۲-۱- بررسی عوامل تأثیرگذار بر اندازه، شکل و پایداری نانوذرات طلا ۲۰
۲-۱-۲-۱-۱- غلظت‌های بهینه مواد اولیه واکنش ودما ۲۰
۲-۱-۲-۱-۲- نسبتهای مختلف سیترات سدیم به نمک طلا ۲۰
۲-۱-۲-۱-۳- pH ۲۲
۲-۲- عامل‌دار کردن نانوذرات طلا ۲٤
۲-۲-۱- نانوذرات طلای عامل‌دار شده با DNA ۲۵
۲-۲-۲- مزایای استفاده از روبشگر های DNA ۲٦
۲-۲-۳- راههای اتصال عوامل مختلف ۲٦
۲-۲-۳-۱- برهمکنشهای الکترواستاتیک ۲۷
۲-۲-۳-۲- اتصال کوالانسی ۲۷

۲-۲-۳-۲-۱- موانع موجود در بکارگیری گروههای سولفید ۲۷
۲-۲-۳-۳- استفاده از ملکول‌های رابط ۲۸
۲-۲-٤- بررسی عوامل مؤثر بر هیبریداسیون رشته های روبشگر و رشته هدف ۲۸
۲-۲-٤-۱- فشردگی رشته‌های DNA روی سطح ۲۸
۲-۲-٤-۲- طول رشته‌های الیگونوکلئوتیدی و استفاده از فضاپرکن عمودی ۲۹
۲-۲-٤-۳- استفاده از قطعات الیگونوکلئوتیدی $d(T_m-A_n)$ برروی سطح ۳۰
۲-۲-۵- عوامل مؤثر درمیزان رشته‌های روبشگر تثبیت شده برروی نانوذرات طلا ۳۱
۲-۲-۵-۱- استفاده از غلظتهای بالای نمک و انجام سونیکاسیون ۳۱
۲-۲-۵-۲- نوع فضاپرکن مورد استفاده..... ۳۲
۲-۲-۵-۳- میزان انحناء نانوذرات ۳۲
۲-۲-٦- کاهش زمان مراحل تثبیت ۳۳
۲-۳- تجمع نانوذرات طلا ۳۳
۲-۳-۱- اثر فاصله بین نانوذرات طلای تجمع یافته بر خواص نوری آنها..... ۳۵
۲-۳-۲- اندازه نانوذرات طلا..... ۳٦
۲-٤- کاربرد نانوذرات طلا در طراحی زیست‌حسگرهایی بر پایه رنگ‌سنجی ۳۷
۲-٤-۱- استفاده از نانوذرات طلا بدون عامل‌دارکردن سطح..... ۳۷
۲-٤-۲- افزایش اندازه نانوذرات بعد از تشکیل تجمعات ۳۷
۲-٤-۳- استفاده از نانوذرات طلا برای آشکارسازی گیاهان تراریخت..... ۳۸
۲-۵- اهداف این تحقیق با توجه به مطالعات مروری ۳۹
فصل سوم: مواد و روش‌های انجام آزمایش‌ها ٤۲
۳-۱- آماده‌سازی ظروف آزمایشگاهی ٤۳

۳-۱-۱- شستشوی ظروف وسطوح با محلول پیرانها ٤٣
۳-۱-۲- شستشوی ظروف وسطوح با تیزاب ٤٤
۳-۲- مواد مورد استفاده در آزمایش‌ها ٤٤
۳-۲-۱- سنتز نانوذرات طلا ٤٤
۳-۲-۲- مواد لازم جهت ثابت‌سازی رشته‌هایDNA برروی نانوذرات طلا و ایجاد حالت تجمع بین آنها ٤٤
۳-۲-۲-۱- توالی‌های مورد استفاده در ثابت‌سازی رشته‌های DNA ٤٥
۳-۳- تعیین ویژگی‌های نانوذرات و سامانه‌های سنتز شده ٤٦
۳-۳-۱- اندازه‌گیری اندازه نانوذرات ٤٦
۳-۳-۲- مطالعه خصوصیات نوری نانوذرات طلا ٤٦
۳-۳-۳- مطالعه گروه‌های عاملی تثبیت شده بر روی نانوذرات ٤٦
۳-٤- روش انجام آزمایش‌ها ٤٧
۳-٤-۱- سنتز نانوذرات طلا (Au) ٤٧
۳-٤-۲- بررسی خصوصیات نوری نانوذرات طلا ٤٨
۳-٤-۳- جداسازی نانوذرات از محلول ٤٩
۳-٤-٤- عامل‌دارکردن نانوذرات طلا به وسیله رشته‌های DNA ٤٩
۳-٤-٤-۱- جداسازی و شستشوی نانوذرات عامل‌دار شده ٤٩
۳-٤-٤-۲- عامل‌دارکردن نانوذرات طلا به وسیله روبشگرهای بلندتر ٥٠
۳-٤-٥- هیبریداسیون رشته هدف با رشته‌های روبشگر ثابت‌شده روی نانوذرات و بررسی تجمع ایجادشده ٥٠
۳-٤-٥-۱- بررسی تأثیر اندازه نانوذرات در تجمع ایجاد شده ٥٠

۳-٤-٥-۲- بررسی تأثیر وجود فضاپرکنهای بلندتر در تجمع نانوذرات ۵۰
۳-٤-٥-۳- بررسی حساسیت سامانه حاصل در مجاورت غلظتهای متفاوت رشته هدف ۵۱
۳-٥- مواد و روشهای آزمایش در بخش گیاهی ۵۱
۳-٥-۱- استخراج DNA کلزای غیر تراریخت ۵۱
۳-٥-۱-۱- مواد استخراج DNA ۵۲
۳-٥-۱-۲- استخراج DNA ژنومی کلزای غیر تراریخت با استفاده از روش CTAB ۵۲
۳-٥-۱-۲-۱- تعیین کمیت و کیفیت DNA ٥٤
۳-٥-۲- واکنش زنجیره پلیمراز ۵۵
۳-٥-۲-۱- مواد واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) ٥٦
۳-٥-۲-۲- آغازگرها ۵۷
۳-٥-۲-۳- مراحل PCR ۵۷
۳-٥-۳- بررسی عملکرد سامانه طراحی شده در مجاورت DNA گیاه تراریخت ۵۷
فصل چهارم: ارائه نتایج ۵۹
٤-۱- سنتز نانوذرات طلا ٦۰
٤-۱-۱- بررسی اثر نسبتهای متفاوتی از نمک طلا / سیرات سدیم بر خواص نانوذرات طلا ٦۱
٤-۱-۱-۱- بررسی خواص نوری نانوذرات طلا ٦٥
٤-۱-۱-۲- محاسبه غلظت و ضریب خاموشی نانوذرات طلا ٦٦
٤-۲- تثبیت رشتههای روبشگر بر روی نانوذرات طلا ٦۹
٤-۲-۱- خصوصیات نوری نانوذرات عاملدار شده ٦۹
٤-۲-۲- اثر غلظت DNA بر بار سطحی نانوذرات عاملدار شده ۷۰

٤-٣- بررسی تجمع نانوذرات عامل‌دار شده در مجاورت رشته هدف وتأثیر بر خصوصیات نوری آنها ٧١

٤-٣-١- بررسی اثر غلظت نانوذرات طلا و رشته‌های روبشگر بر خصوصیات نوری تجمعات تشکیل شده ٧٢

٤-٣-٢- بررسی اثر غلظتهای نانوذرات طلا و رشته‌های روبشگر بر اندازه تجمعات تشکیل شده... ٧٤

٤-٣-٣- بررسی اثر اندازه نانوذرات برروی عملکرد ٧٥

٤-٣-٤- بررسی اثر ساختار روبشگر بر تجمع نانوذرات طلا ٧٧

٤-٣-٥- بررسی حساسیت سامانه با تغییر غلظت رشته هدف ٧٨

٤-٤- نتایج آزمایش در بخش گیاهی ٧٩

٤-٤-١- استخراج DNA ژنومی کلزا غیرتراریخت ٧٩

٤-٤-١-١- تعیین کمیت وکیفیت DNA ٨٠

٤-٤-٢- واکنش زنجیره پلیمراز ٨٠

٤-٤-٣- بررسی عملکرد سامانه طراحی شده در مجاورت DNA گیاه تراریخت ٨١

فصل پنجم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادات ٨٣

٥-١- سنتز نانوذرات طلا ٨٤

٥-١-١- بررسی تأثیر غلظتهای مختلف نمک طلا در سنتز نانوذرات ٨٥

٥-١-١-١- بررسی اثر نسبت سیترات به طلا بر خواص نانوذرات طلا ٨٦

٥-١-١-٢- بررسی خواص نوری نانوذرات طلا ٨٨

٥-٢- تثبیت رشته‌های روبشگر برروی نانوذرات طلا ٨٩

٥-٢-١- بررسی خصوصیات نوری نانوذرات عامل‌دار شده ٩١

٥-٢-٢- بررسی پتانسیل زتای نانوذرات عامل‌دار شده ٩١

۵-۳- بررسی خصوصیات نوری نانوذرات تجمع‌یافته در مجاورت رشته هدف ۹۱
۵-۳-۱- بررسی اثر غلظت نانوذرات طلا و رشته‌های روبشگر بر تجمع ۹۲
۵-۳-۲- بررسی حالت تجمع در مجاورت رشته هدف به‌وسیله قطر هیدرودینامیکی ۹۳
۵-۳-۳- بررسی اثر اندازه نانوذرات برروی تجمع آنها ۹۳
۵-۳-٤- بررسی اثر ساختار روبشگر بر تجمع نانوذرات طلا ۹٦
۵-٤- بررسی عملکرد سامانه طراحی شده در مجاورت DNA گیاه تراریخت ۹۷
۵-۵- نتیجه‌گیری ۹۸
۵-٦- پیشنهادها ۱۰۰
منابع ۱۰۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱- توالی‌های مورد استفاده در عاملدار کردن و بررسی تجمع نانوذرات طلا.....٤٥

جدول ۳-۲- غلظتهای مورد استفاده $HAuCl_4$ در نسبتهای مختلف $HAuCl_4$ / Na_3Ct ٤٨

جدول ۳-۳- ترکیب بافر استخراج DNA ژنومی از گیاه.....٥٢

جدول ۳-٤- مقادیر و نوع مواد استفاده شده در واکنش PCR.....٥٦

جدول ۳-٥- آغازگرهای مورد استفاده در PCR ٥٧

جدول ۳-٦- برنامه دمایی PCR ٥٧

جدول ٤-۱- متوسط اندازه نانوذرات طلای سنتز شده در هر یک از نسبتهای سیترات سدیم به نمک طلا.....٦٤

جدول ٤-۲- طول موج دارای حداکثر جذب نانوذرات سنتز شده با نسبتهای مختلف ٦٦

جدول ٤-۳- غلظت نانوذرات طلا ٦٦

جدول ٤-٤- ضریب خاموشی محاسبه شده هر یک از نانوذرات طلا ٦٩

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- نمائی شماتیک از پروموتر ،خاتمه دهنده وژن نشانگر ٤

شکل ۱-۲- مقیاس نانو و مواد معمول زیستی و تشابه ابعاد آنها..... ٦

شکل ۱-۳- روش‌های مختلف برای توسعه سامانه‌های تشخیصی مبتنی بر نانوذرات ٦

شکل ۱-٤- قابلیت ایجاد ساختارهای مختلف به وسیله رشته‌های DNA..... ۸

شکل ۱-۵- : نمایش الکترونهای نوسانی سطوح پلاسمون ۱۱

شکل ۱-٦- تجمع نانوذرات طلا و تغییر رنگ محلول کلوئیدی مورد استفاده در یک آشکارساز...۱۲

شکل ۱-۷- قابلیت استفاده از نانوذرات در ساختار یک زیست‌حسگر.....۱٤

شکل ۱-۸- تشابه زیست ملکول‌ها با ابعاد نانوذرات ۱٤

شکل ۲-۱- : تغییر رنگ سوسپانسیون نانوذرات طلا با تغییر نسبت سیترات مصرفی ۲۰

شکل ۲-۲- عکسهایTEM مربوط به سنتز نانوذرات درنسبتهای متفاوت $Na_3Ct/HAuCl_4$.....۲۲

شکل ۲-۳- نمائی شماتیک از دو مسیر پیشنهاد شده برای سنتز نانوذرات طلا ۲۳

شکل ۲-٤- نمائی شماتیک از انواع اتصال مولکولها با سطح نانوذرات طلا.....۲٦

شکل ۲-۵- نمائی شماتیک از اتصال رشته‌هایDNA توسط قطعات الیگونوکلئوتیدی آدنین ۳۰

شکل ۲-٦- نمایش تأثیر انحناء نانوذرات در رشته‌های DNA ۳۲

شکل ۲-۷- : اتصال رشته‌های DNA به‌واسطه گروه تیول برروی نانوذره پایدار شده با آدنین ۳۳

شکل ۲-۸- هیبریداسیون رشته‌های روبشگر با رشته هدف ۳٤

شکل ۲-۹- ساختار رشته DNA که به عنوان متصل کننده استفاده شد ۳۵

شکل ۲-۱۰- تغییرات جذب نوری نانوذرات در مجاورت متصل‌کننده‌هایی با طول متفاوت.....۳٦

شکل ۲-۱۱- تغییرات الگوی جذب نانوذرات با اندازه‌های متفاوت ۳٦

شکل ۲-۱۲- افزایش اندازه نانوذرات به‌منظور افزایش حساسیت بعد از ایجاد تجمع بین آنها ۳۸

شکل۲-۱۳- ساختار یک زیست‌حسگر جهت شناسائی گیاهان تراریخت ۳۸

شکل۲-۱٤- نمایش شماتیک مراحل کار، روشهای مورد استفاده و آنالیزهای انجام شده ٤۱

شکل ۳-۱- ساختار مولکولی سدیم سیترات دو آبه..... ٤٤

شکل ۳-۲- دستگاه سنتز نانوذرات طلا. متراکم‌کننده (۱) و گرمکن (۲) ٤۸

شکل ٤-۱- محلولهای کلوئیدی نانوذرات طلا ٦۱

شکل ٤-۲- طیف‌های EDX نانوذرات طلا ٦۱

شکل ٤-۳- A) تصویر TEM, B) نمودار هیستوگرام نانوذرات سنتز شده با نسبت ۱:۱ ..... ٦۲

شکل ٤-٤- A) تصویر TEM, B) نمودار هیستوگرام نانوذرات سنتز شده با نسبت ۰/۳ : ۱ ..... ٦۲

شکل ٤-٥- A) تصویر TEM, B) نمودار هیستوگرام نانوذرات سنتز شده با نسبت ۰/۲۵ : ۱ ..... ٦۳

شکل ٤-٦- A) تصویر TEM, B) نمودار هیستوگرام نانوذرات سنتز شده با نسبت ۰/۲ : ۱ ..... ٦۳

شکل٤-۷- A) تصویر TEM, B) نمودار هیستوگرام نانوذرات سنتز شده با نسبت ۰/۱ : ۱ ..... ٦٤

شکل ٤-۸- طیف جذبی نانوذرات طلا در دو حالت مختلف A) طیف جذبی نانوذرات سنتز شده B) طیف جذبی نانوذرات پس از یکسان‌سازی غلظت نانوذرات ٦٥

شکل٤-۹- نمودارهای ماکزیمم طیف جذب بر حسب غلظت نانوذرات طلا سنتز شده در هریک از نسبتهای سیترات به نمک طلا(A- 1: 0.3, B-1:0.25, C-1:0.2, D-1:0.1) ٦۸

شکل٤-۱۰- تغییر جذب نوری نانوذرات طلا بعد از تثبیت رشته‌های روبشگر..... ۷۰

شکل ٤-۱۱- توزیع پتانسیل زتای نانوذرات عامل‌دار شده با رشته‌های روبشگر ۷۱

شکل٤-۱۲- تغییرات نوری نانوذرات بعد از ایجاد حالت تجمع..... ۷۲

شکل ٤-۱۳- A) تغییرات طیف جذبی نانوذرات با استفاده از غلظت ۱/۲ نانومولار نانوذرات و غلظتهای متفاوتی از رشته‌های روبشگر بعد از ایجاد تجمع B) تغییر رنگ در محلول کلوئیدی نانوذرات با استفاده از غلظت ۸ میکرومولار رشته روبشگر بعد از ایجاد تجمع ۷۳

شکل ٤-١٤- A) تغییرات طیف جذبی نانوذرات با استفاده از غلظت ٢/٢ نانومولار نانوذرات و غلظتهای متفاوتی از رشته‌های روبشگر بعد از ایجاد تجمع B) تغییر رنگ در محلول کلوئیدی نانوذرات با استفاده از غلظت ٨ میکرومولار رشته روبشگر بعد از ایجاد تجمع ٧٣

شکل ٤-١٥- نمودار توزیع اندازه رسم شده با دستگاه زتاسایزر A) نانوذرات طلای عامل‌دار شده با رشته‌های روبشگر B) تجمع نانوذرات عامل‌دارشده در مجاورت رشته هدف بعد از گذشت ٢٠ دقیقه C) تجمع نانوذرات عامل‌دار شده در مجاورت رشته هدف بعد از گذشت ٤٠ دقیقه ٧٥

شکل ٤-١٦- A) تغییر خصوصیات نوری با استفاده از نانوذرات با متوسط اندازه ١٣/٦٥ نانومتر و بررسی حالت تجمع B) تغییر رنگ ایجاد شده در محلول کلوئیدی بر اثر تجمع نانوذرات ٧٦

شکل ٤-١٧- A) تغییر خصوصیات نوری با استفاده از نانوذرات با متوسط اندازه ١٥/٣٩ نانومتر و بررسی حالت تجمع B) تغییر رنگ ایجاد شده در محلول کلوئیدی بر اثر تجمع نانوذرات ٧٦

شکل ٤-١٨- : A) تغییر خصوصیات نوری با استفاده از نانوذرات با متوسط اندازه ١٨/٤٤نانومتر و بررسی حالت تجمع B) تغییر رنگ ایجاد شده در محلول کلوئیدی بر اثر تجمع نانوذرات ٧٧

شکل ٤-١٩- A)تغییر خصوصیات نوری با استفاده از نانوذرات با متوسط اندازه ٢٠/٢٢ نانومتر و بررسی حالت تجمع B) تغییر رنگ ایجاد شده در محلول کلوئیدی بر اثر تجمع نانوذرات ٧٧

شکل ٤-٢٠- بررسی اثر ساختار روبشگر بر تجمع A) استفاده از ١٠ باز تیمین به‌عنوان فضاپرکن B)استفاده از ١٥ باز تیمین به‌عنوان فضاپرکن.....٧٨

شکل ٤-٢١- : بررسی وجود غلظتهای متفاوتی از رشته هدف A) ٢٠٠ B) ١٠٠ C) ٧٠ D) ٥٠ E) ٢٠ نانومولار از رشته هدف ٧٩

شکل ٤-٢٢- لکتروفورز DNA استخراج شده از گیاه کلزای تراریخت و غیر تراریخت.....٨٠

شکل ٤-٢٣- الکتروفورز محصول PCR سه نمونه DNA گیاه تراریخت ٨١

شکل ٤-٢٤- خصوصیات نوری نانوذرات عاملدار شده با رشته‌های روبشگر در مجاورت DNAگیاه تراریخت ٨٢

شکل ٤-٢٥- خصوصیات نوری نانوذرات عاملدار شده با رشته‌های روبشگر در مجاورت DNA گیاه تراریخت A) غلظت ٥٠٪ از DNA گیاه تراریخت B) غلظت ١٠٠٪ از DNA گیاه تراریخت.....٨٢

شکل ۵-۱- نمائی شماتیک از اتصال رشته‌های روبشگر با نانوذرات طلا ۸۹

شکل ۵-۲- ساختمان دو نوکلئوتید آدنین و تیمین ۹۰

شکل ۵-۲- نمائی شماتیک از شکل‌گیری تجمع نانوذرات طلا در مجاورت رشته هدف.....۹۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱- گیاهان نوترکیب

از سال ۱۹۹۵ عملاً محصولات کشاورزی تراریخت[1] وارد بازار تولیدات کشاورزی دنیا شدند و ما در واقع هفدهمین سال حضور این محصولات را در عرصه بازارهای بین المللی تجربه می‌کنیم. در سالهای اخیر تولید انبوه گونه‌های نوترکیب گیاهان مختلف افزایش یافته است. از عمده‌ترین محصولات تراریخت گیاهی تجاری شده می‌توان به سویا ،ذرت، پنبه و کلزا اشاره کرد که در سطحی بیش از ۱۴۸ میلیون هکتار در طی سال ۲۰۱۰ کشت شده‌اند. تغییرات ژنتیکی در گیاهان به وسیله روشهای نوترکیبی انجام می‌شود. استفاده از روش‌های نوترکیبی، در توسعه گیاهانی با قابلیتهای جدید، ایراداتی را نیز متوجه خود کرده است؛ از جمله: وجود قابلیت جریان ژنی به دیگر سازواره‌ها، کاهش تنوع در محصولات کشاورزی، ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها ودیگر موانع اقتصادی و ایمنی زیستی (Farid, 2002).

اختلاط دانه‌های غیرتراریخت (وحشی) با دانه‌های تراریخت به راحتی انجام می‌شود. به همین علت طی توافقی میان کشورها، صادرات و واردات مواد و محصولات گیاهی به ویژه در مورد گیاهانی که به صورت ژنتیکی دستکاری شده‌اند، با رعایت اصول و ضوابطی انجام می‌شود. طبق

[1]. Genetic Modified Organism

پروتکل کارتاهنا[1] صادرات و واردات محصولات گیاهی با ارائه اطلاعات لازم در مورد بذر و مواد غذایی حاوی سازواره‌های تراریخت و در برخی موارد با برچسب‌زنی[2] آنها باید همراه باشد.

۱-۲- روشهای آشکارسازی گیاهان تراریخت

به طورکلی روشهای شناسائی بر پایه شناخت و آشکارسازی DNA، RNA، پروتئین و یا متابولیتها استوار است. اما روشهای غربالگری که بر پایه شناسائی پروتئینها و یا ملکول‌های DNA نوظهور استوارند رواج بیشتری دارند. از جمله روشهای آشکارسازی پروتئینها آزمون الایزا[3] و وسترن بلات[4] را می‌توان نام برد. این دسته روشها به علت تغییر ساختار و یا تخریب پروتئینها در فرایندهای صنایع غذائی مورد توجه نیستند. اما در عوض روشهای آشکارسازی ملکول‌های DNA به دلیل پایداری بالاتر آنها در مواد خام و محصولات غذائی رواج بیشتری دارند.

در ذیل دو روش متداول در زمینه آشکارسازی ملکول‌های DNA به اختصار توضیح داده می‌شوند.

۱-۲-۱- واکنش زنجیره پلیمراز [5]

در این روش بخشی از توالی DNA به طور اختصاصی به وسیله آنزیم DNA پلیمراز و به واسطه آغازگرهای پیشرو[6] و برگشتی[7] تکثیر می‌شود. در روشهای آشکارسازی از شناسائی توالیهای DNA خارجی که به طور معمول در گیاهان تراریخت وجود دارند استفاده می‌شود. ازجمله آن می‌توان به ژن‌های انتقال یافته و عوامل کنترل کننده بیان آنها مثل پیش‌برنده[8] rRNA 35s ویروس موزائیک گل کلم (CaMV-35S) و خاتمه دهنده[9] ژن نوپالین سنتتاز (NOS) از باکتری اگروباکتریوم اشاره کرد (شکل۱-۱). ژن های مربوط به نشانگر انتخابی ویا خود ژن هدف که در این گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (مانند ژن های عامل مقاومت به علفکش‌ها ویا ژن‌های مقاومت به آفات)، در درجه بعدی اهمیت قرار دارند (Holst-Jensen, 2003).

---

1. Cartagena Biosafety Protocol
2. Labeling
3. ELISA
4. Western blot
5. Polymerase Chain Reaction (PCR)
6. Forward
7. Reverse
8. Promoter
9. Terminator