

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

ساخت زیست حسگر بر پایه DNA جهت اندازه گیری گلوکز و نارینگین و بررسی اثر آنتی اکسیدانی گلوکز و نارینگین

پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

ثنا کربلائی

استاد راهنما

پروفسور علی اصغر انصافی



دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی شیمی خانم ثنا کربلائی

تحت عنوان

**ساخت زیست‌حسگر بر پایه DNA جهت اندازه‌گیری گلوکاتایون و نارینگین و بررسی اثر
آنتی‌اکسیدانی گلوکاتایون**

در تاریخ ۱۳۹۲/۱۰/۲۵ توسط کمیته‌ی تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

پروفسور علی اصغر انصافی

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه

پروفسور بهزاد رضایی

۲- استاد مشاور پایان‌نامه

پروفسور تقی خیامیان

۳- استاد داور

دکتر محمد سراجی

۴- استاد داور

دکتر علیرضا نجفی

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده



دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

تعهد نامه اصالت پایان نامه تحصیلی

اینجانب ثنا کربلائی دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد ناپیوسته در رشته شیمی که در تاریخ ۱۳۹۲/۱۰/۲۵ از پایان نامه خود تحت عنوان ساخت زیست حسگر بر پایه DNA جهت اندازه گیری گلوکوتاتیون و نارینگین و بررسی اثر آنتی اکسیدانی گلوکوتاتیون دفاع نموده ام بدینوسیله متعهد می شوم :

(۱) این پایان نامه حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (اعم از پایان نامه، کتاب، مقاله و ...) استفاده نموده ام، مطابق ضوابط و رویه موجود، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آنرا در فهرست مربوطه ذکر و درج کرده ام.

(۲) این پایان نامه قبلاً برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح، پایین تر یا بالاتر) در سایر دانشگاهها و موسسات آموزش عالی ارائه نشده است.

(۳) چنانچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده و هرگونه بهره برداری اعم از چاپ کتاب، ثبت اختراع و ... از این پایان نامه یا رساله را داشته باشم، از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان، مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم.

(۴) چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را می پذیرم و دانشگاه صنعتی اصفهان مجاز است با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی ام هیچگونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی: ثنا کربلائی

تاریخ و امضاء: ۱۳۹۲/۱۰/۲۵

سپاس خدا را به اندازه همه سپاسی که نزدیک ترین فرشتگان و کرامی ترین بندگان و پسندیده ترین ستایش کنندگان او را ستایش کرده اند، سپاسی که بر سپاس های دیگر برتری داشته باشد مانند برتری پروردگار نسبت به آفریدگان خود. هم او که حکمت بیکرانش هدایت بخلق به لحاظ انسان را در تقدیرش نوشت و صاحبان و نیک اندیشان را راهنمای ساخت. پس به شکرانه اش و طیفه دارم، که زبان گشایم به تقدیر.

باسپاس فراوان از استاد فرزانه ام جناب آقای پروفور انصافی که دانایی شان، علم، کلامشان، روشنائی و ساگر ویشان افتخار را برایم به همراه داشت. همچنین از جناب آقای پروفور رضایی استاد مشاور پایان نامه صمیمانه ساکزارم. از جناب آقای پروفور خیامیان و جناب آقای دکتر سراجی که زحمت مطالعه و داوری این پایان نامه را قبل نمودند، صمیمانه ساکزارم.

بر خود لازم می دانم از عزیزترین افراد زندگی ام، مادر و پدر بزرگوارم، همسر عزیزم و خواهر مهربانم که رسیدن به این لحظه بدون حضور و همراهیشان ممکن نبود تشکر کنم.

از زحمات بی دریغ جناب آقای دکتر حدیدی کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

از تمامی دوستان خوبم در آرزو نگاه تحقیقاتی که با دگر می و صمیمیت برایم خاطره آفرین بودند بی نهایت ساکزارم.

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوریهای ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

تقدیم به عزیزانی که گذشته و حامل از آنان

و

آینده ام برای ایشان است

با همه این که می دانم این ناپسند خورد خور

بزرگی آنان نیست.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
هشت	فهرست مطالب
یازده	فهرست اشکال
سیزده	فهرست جداول
۱	چکیده
۲	فصل اول: اهمیت و کاربردها
۲	۱-۱- مقدمه
۳	۲-۱- ساختار DNA
۴	۳-۱- تخریب DNA
۵	۱-۳-۱- نقش آنتی اکسیدان‌ها در جلوگیری از تخریب DNA
۵	۴-۱- اهمیت و کاربرد مواد مورد بررسی
۶	۱-۴-۱- گلو تاتیون
۷	۲-۴-۱- نارینگین
۸	۵-۱- مروری بر کارهای انجام شده در زمینه اندازه گیری گلو تاتیون و نارینگین
۸	۱-۵-۱- اندازه گیری گلو تاتیون
۱۱	۲-۵-۱- اندازه گیری نارینگین
۱۳	۶-۱- زیست حسگرهای DNA
۱۳	۱-۶-۱- زیست حسگرهای الکتروشیمیایی DNA
۱۴	۷-۱- بررسی الکتروشیمیایی برهمکنش گونه‌های مختلف با DNA
۱۵	۸-۱- نانو تکنولوژی
۱۵	۱-۸-۱- حسگرها بر پایه نانولوله‌های کربن (CNTs)
۱۶	۲-۸-۱- نانولوله‌های کربنی
۱۷	۹-۱- مبانی الکتروشیمی
۱۷	۱۰-۱- فرآیندهای الکتروشیمیایی
۱۸	۱-۱۰-۱- ماهیت فرآیندهای الکترودی
۱۹	۱۱-۱- انواع روش‌های الکتروشیمیایی
۲۰	۱۲-۱- مروری بر روش‌های الکتروشیمیایی
۲۰	۱-۱۲-۱- ولتامتری
۲۱	۱-۱۲-۱- الف- ولتامتری پالس تفاضلی
۲۲	۱۳-۱- الکترودهای کار

۲۲	۱-۱۳-۱- الکترودهای کربن.....
۲۳	۱-۱۳-۱-الف- الکترودهای کربن شیشه‌ای.....
۲۳	۱-۱۳-۱-ب- الکترودهای الیاف کربنی.....
۲۳	۱-۱۳-۱-ج- الکترودهای خمیر کربن.....
۲۴	۱-۱۳-۱-د- الکترودهای گرافیت مداد (PGE).....
۲۴	۱۴-۱- روش‌های تهیه الکترودهای اصلاح‌شده شیمیایی.....
۲۴	۱-۱۴-۱- جذب سطحی.....
۲۵	۱-۱۴-۲- اتصال کووالانسی.....
۲۵	۱-۱۴-۳- تشکیل لایه نازک بسیار در سطح الکترودها.....
۲۶	۱۵-۱- اهداف و اهمیت پروژه.....
۲۸	فصل دوم: بخش تجربی.....
۲۸	۱-۲- مقدمه.....
۲۸	۲-۲- وسایل و ابزارهای مورد استفاده.....
۲۹	۲-۳- نرم‌افزارهای مورد استفاده.....
۲۹	۲-۴- واکنش‌گرها.....
۲۹	۲-۴-۱- تهیه محلول بافر استاتی.....
۳۰	۲-۴-۲- تهیه محلول بافر تریس.....
۳۰	۲-۴-۳- تهیه محلول بافر فسفات.....
۳۰	۲-۴-۴- تهیه محلول مادر نارینگین و گلو تاتیون.....
۳۰	۲-۴-۵- تهیه محلول مادر DNA.....
۳۰	۲-۵- آماده‌سازی نانولوله‌های کربنی چند دیواره.....
۳۰	۲-۶- آماده‌سازی نمونه جهت ثبت تصاویر SEM.....
۳۰	۲-۷- ساخت زیست‌حسگر DNA جهت بررسی برهمکنش نارینگین با DNA و اندازه‌گیری آن با استفاده از ولتامتری پالس تفاضلی بر روی گرافیت مدادی.....
۳۱	۲-۷-۱- آماده کردن الکترودهای گرافیت مدادی.....
۳۱	۲-۷-۲- آماده‌سازی سوسپانسیون MWCNTs.....
۳۲	۲-۷-۳- ساخت الکترودهای اصلاح‌شده PGE.....
۳۲	۲-۷-۴- بررسی مورفولوژی سطح الکترودها.....
۳۲	۲-۷-۵- مطالعات اولیه برهمکنش dsDNA با نارینگین با استفاده از روش ولتامتری پالس تفاضلی.....
۳۵	۲-۷-۶- مطالعات اسپکتروسکوپی جذبی برهمکنش dsDNA با نارینگین.....
۳۶	۲-۷-۷- بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر حساسیت روش.....
۳۶	۲-۷-۸- انتخاب pH.....
۳۶	۲-۷-۹- اثر غلظت dsDNA در مرحله تثبیت بر روی الکترودهای اصلاح‌شده.....
۳۷	۲-۷-۱۰- اثر مدت زمان برهمکنش dsDNA/MWCNTs-PDDA/PGE با نارینگین.....

۳۷PDDA-MWCNTs روی الکتروود اصلاح شده با
۴۰منحنی تنظیم
۴۳حد تشخیص روش
۴۴اثر مزاحمت‌های احتمالی
۴۵بررسی کارایی روش
۴۶بحث و نتیجه‌گیری
۴۹ساخت زیست‌حسگر DNA جهت بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی گلوکاتایون و اندازه‌گیری آن در نمونه‌های بیولوژیکی
۴۹۱-۸-۲ مطالعات اولیه بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی گلوکاتایون با استفاده از روش ولتامتری پالس تفاضلی
۵۱۲-۸-۲ بهینه‌سازی مدت زمان برهمکنش dsDNA و گلوکاتایون
۵۳۳-۸-۲ انتخاب بافر مناسب جهت برهمکنش بین dsDNA/MWCNTs-PDDA/PGE و گلوکاتایون
۵۴۴-۸-۲ بهینه کردن مقدار MWCNTs
۵۶۵-۸-۲ بهینه‌سازی زمان تثبیت نانوکامپوزیت MWCNTs-PDDA روی سطح PGE
۵۷۶-۸-۲ منحنی تنظیم
۶۰۷-۸-۲ دقت و حد تشخیص روش
۶۱۸-۸-۲ اثر مزاحمت‌های احتمالی
۶۲۹-۸-۲ آنالیز نمونه‌های حقیقی
۶۳۱۰-۸-۲ بحث و نتیجه‌گیری
۶۸منابع و مراجع

فهرست اشکال

- شکل (۱-۱) ساختار DNA ۴
- شکل (۲-۱) ساختار شیمیایی گلوکاتینون ۶
- شکل (۳-۱) ساختار شیمیایی نارینگین ۸
- شکل (۴-۱) تبدیل صفحه گرافیت به نانولوله‌های کربنی ۱۷
- شکل (۵-۱) مدل مرز مشترک الکتروود - محلول ۱۸
- شکل (۶-۱) مسیر کلی یک واکنش الکتروودی ۱۹
- شکل (۷-۱) رویدادها برای الکتروود کربن شیشه‌ای در یک آزمایش پالسی تفاضلی ۲۱
- شکل (۱-۲) نمایی از سل ولتامتری، W.E.=الکتروود کار، R.E.=الکتروود مرجع Ag/AgCl، C.E.=الکتروود همراه پلاتین. الکتروودها در سوراخ‌های درپوش ظرف قرار گرفته‌اند ۲۹
- شکل (۲-۲) بررسی تغییرات مورفولوژی سطح الکتروود شکل A: PGE، شکل B: PDDA-MWCNTs/PGE، شکل C: dsDNA/PDDA-MWCNTs/PGE ۳۳
- شکل (۳-۲) ولتاموگرام‌های پالس تفاضلی گوانین (A) و آدنین (B) بر روی PDDA-MWCNTs/PGE پس از برهمکنش با dsDNA، $1/0 \times 10^{-4}$ ، $3/0 \times 10^{-4}$ ، $7/0 \times 10^{-4}$ ، $1/0 \times 10^{-3}$ مولار نارینگین با dsDNA (شرایط: اندازه‌گیری سیگنال در بافر استاتی ۰/۵ مولار (pH = ۴/۸) محدوده پتانسیل +۰/۴۰ تا +۱/۴۰ ولت با دامنه پالس ۵۰ میلی‌ولت، پهنای پالس ۵۰ میلی‌ثانیه و سرعت روبش ۱۰ میلی‌ولت بر ثانیه) ۳۴
- شکل (۴-۲) بررسی وجود برهمکنش بین dsDNA و نارینگین با استفاده از طیف UV-Vis (A): طیف محلول ۱۰/۰۰ میلی‌گرم بر لیتر dsDNA (B) طیف محلول ۵/۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نارینگین (C): طیف محلولی حاوی نارینگین و dsDNA با همان غلظت‌های قسمت a و b ۳۵
- شکل (۵-۲) وابستگی سیگنال DPV بازهای آدنین (■) و گوانین (▲) با غلظت dsDNA، (شرایط: تثبیت dsDNA بر روی PGE اصلاح‌شده با PDDA-MWCNTs در طول ۳۰ min بقیه شرایط مشابه شکل (۳-۲)) و ولتاموگرام‌های مربوط به آن (a): گوانین، (b): آدنین) ۳۷
- شکل (۶-۲) وابستگی سیگنال DPV بازهای آدنین (■) و گوانین (▲) dsDNA ۱/۰۰ گرم بر لیتر به مدت زمان برهمکنش با نارینگین $1/0 \times 10^{-3}$ مولار با استفاده از الکتروود dsDNA/MWCNTs-PDDA/PGE تحت شرایط مشابه شکل (۳-۲) و ولتاموگرام‌های مربوطه (a): گوانین، (b): آدنین) ۳۹
- شکل (۷-۲) وابستگی سیگنال DPV بازهای آدنین (■) و گوانین (▲) dsDNA ۱/۰۰ گرم بر لیتر به مدت زمان تثبیت آن روی MWCNTs-PDDA/PGE تحت شرایط مشابه شکل (۳-۲) و ولتاموگرام‌های مربوطه (a): گوانین، (b): آدنین) ۴۰
- شکل (۸-۲) منحنی تنظیم در ناحیه غلظتی ۰/۵۸ تا ۵/۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نارینگین از طریق دنبال کردن جریان اکسایشی گوانین DNA در شرایط بهینه غلظتی و دستگاهی ۴۱
- شکل (۹-۲) منحنی تنظیم در ناحیه غلظتی ۵/۸۰ تا ۵۸/۰ میلی‌گرم بر لیتر نارینگین از طریق دنبال کردن جریان اکسایشی گوانین DNA در شرایط بهینه غلظتی و دستگاهی ۴۱
- شکل (۱۰-۲) منحنی تنظیم در ناحیه غلظتی ۰/۵۸ تا ۵/۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نارینگین از طریق دنبال کردن جریان اکسایشی آدنین DNA در شرایط بهینه غلظتی و دستگاهی ۴۱

شکل (۱۱-۲) منحنی تنظیم در ناحیه غلظتی ۵/۸۰ تا ۵۸۰/۰ میلی گرم بر لیتر نارینگین از طریق دنبال کردن جریان اکسایشی آدنین DNA در شرایط بهینه غلظتی و دستگاهی ۴۲

شکل (۱۲-۲) ولتاموگرامهای پالس تفاضلی گوانین (a) و آدنین (b) بر روی dsDNA/PDDA-MWCNTs/PGE پس از برهمکنش با ۰/۵۸ تا ۵۸۰/۰ میلی گرم بر لیتر نارینگین (شرایط: اندازه گیری سیگنال در بافر استاتی ۰/۵ مولار (pH=۴/۸) محدوده پتانسیل ۰/۴۰ تا +۱/۴۰ ولت با دامنه پالس ۵۰ میلی ولت، پهنای پالس ۵۰ میلی ثانیه و سرعت روبش ۱۰ میلی ولت بر ثانیه) ۴۲

شکل (۱۳-۲) ولتاموگرامهای پالس تفاضلی گوانین و آدنین بر روی PDDA-MWCNTs/PGE پس از برهمکنش با (a): dsDNA، (b): آنتی اکسیدان، + تخریب کننده dsDNA، (c): تخریب کننده dsDNA (شرایط: اندازه گیری سیگنال در بافر استاتی ۰/۵ مولار (PH = ۴/۸) محدوده پتانسیل ۰/۴۰ تا +۱/۴۰ ولت با دامنه پالس ۵۰ میلی ولت، پهنای پالس ۵۰ میلی ثانیه و سرعت روبش ۱۰ میلی ولت بر ثانیه) ۵۱

شکل (۱۴-۲) وابستگی سیگنال اکسایش DPV بازهای گوانین (▲) و آدنین (■) با مدت زمان برهمکنش بین dsDNA/MWCNTs-PDDA/PGE و گلوکاتیون $10^{-3} \times 10^{-3}$ مولار (تحت شرایط دامنه پالس ۵۰ میلی ولت، پهنای پالس ۵۰ میلی ثانیه و سرعت روبش ۱۰ میلی ولت بر ثانیه در محدوده ۰/۴۰ تا +۱/۴۰ ولت نسبت به الکتروود مرجع Ag/AgCl) و ولتاموگرامهای مربوطه (a): گوانین، (b): آدنین) ۵۳

شکل (۱۵-۲) وابستگی سیگنال اکسایش DPV بازهای گوانین (▲) و آدنین (■) به مقدار MWCNTs (تحت شرایط دامنه پالس ۵۰ میلی ولت، پهنای پالس ۵۰ میلی ثانیه و سرعت روبش ۱۰ میلی ولت بر ثانیه در محدوده ۰/۴۰ تا +۱/۴۰ ولت نسبت به الکتروود مرجع Ag/AgCl) و ولتاموگرامهای مربوطه (a): گوانین، (b): آدنین) ۵۵

شکل (۱۶-۲) وابستگی سیگنال اکسایش DPV بازهای گوانین (▲) و آدنین (■) به زمان تثبیت نانوکامپوزیت MWCNTs-PDDA روی سطح PGE تحت شرایط شکل (۱۳-۲) و ولتاموگرامهای مربوطه (a): گوانین، (b): آدنین) ۵۷

شکل (۱۷-۲) منحنی تنظیم در ناحیه غلظتی ۰/۳۰۷ تا ۳/۰۷ میلی گرم بر لیتر گلوکاتیون از طریق دنبال کردن جریان اکسایشی گوانین DNA در شرایط بهینه غلظتی و دستگاهی ۵۸

شکل (۱۸-۲) منحنی تنظیم در ناحیه غلظتی ۳/۰۷ تا ۳۰۷/۳ میلی گرم بر لیتر گلوکاتیون از طریق دنبال کردن جریان اکسایشی گوانین DNA در شرایط بهینه غلظتی و دستگاهی ۵۸

شکل (۱۹-۲) منحنی تنظیم در ناحیه غلظتی ۰/۳۰۷ تا ۳/۰۷ میلی گرم بر لیتر گلوکاتیون از طریق دنبال کردن جریان اکسایشی آدنین DNA در شرایط بهینه غلظتی و دستگاهی ۵۸

شکل (۲۰-۲) منحنی تنظیم در ناحیه غلظتی ۳/۰۷ تا ۳۰۷/۳ میلی گرم بر لیتر گلوکاتیون از طریق دنبال کردن جریان اکسایشی آدنین DNA در شرایط بهینه غلظتی و دستگاهی ۵۹

شکل (۲۱-۲) ولتاموگرامهای پالس تفاضلی گوانین (a) و آدنین (b) بر روی dsDNA/PDDA-MWCNTs/PGE پس از برهمکنش با ۰/۳۰۷ تا ۳۷۰/۳ میلی گرم بر لیتر گلوکاتیون (شرایط: اندازه گیری سیگنال در بافر استاتی ۰/۵ مولار (pH=۴/۸) محدوده پتانسیل ۰/۴۰ تا +۱/۴۰ ولت با دامنه پالس ۵۰ میلی ولت، پهنای پالس ۵۰ میلی ثانیه و سرعت روبش ۱۰ میلی ولت بر ثانیه) ۶۰

فهرست جداول

- جدول (۱-۲) نتایج حاصل از وابستگی سیگنال اکسایش آدنین و گوانین با غلظت dsDNA در طول مرحله تثبیت بر روی PGE اصلاح شده با نانو کامپوزیت MWCNTs-PDDA ۳۶
- جدول (۲-۲) نتایج حاصل از وابستگی سیگنال اکسایش آدنین و گوانین dsDNA به مدت زمان برهمکنش با نارینگین $10^{-3} \times 1/0$ مولار ۳۸
- جدول (۳-۲) اثر مدت زمان قرار گرفتن الکتروود MWCNT-PDDA درون محلول dsDNA بر روی سیگنال اکسایش گوانین و آدنین ۳۹
- جدول (۴-۲) جریان های اکسایشی به دست آمده برای منحنی تنظیم در ناحیه غلظتی $0/058$ تا $580/0$ میلی گرم بر لیتر نارینگین در بافر استاتی $0/5$ مولار ($pH=4/8$) به وسیله ولتامتری پالس تفاضلی تحت شرایط بهینه دستگاهی و غلظتی ۴۳
- جدول (۵-۲) انحراف استاندارد نسبی برای اندازه گیری نارینگین از طریق دنبال کردن سیگنال آدنین و گوانین و حد تشخیص روش مورد استفاده ($n=5$) ۴۴
- جدول (۶-۲) بررسی اثر مزاحمت های احتمالی در اندازه گیری $0/406$ میلی گرم بر لیتر نارینگین از طریق دنبال کردن سیگنال گوانین ۴۵
- جدول (۷-۲) نتایج حاصل از اندازه گیری نارینگین در نمونه آب میوه های مختلف از طریق دنبال کردن سیگنال گوانین در شرایط بهینه ($n=5$) ۴۶
- جدول (۸-۲) مقایسه روش ارائه شده در اندازه گیری نارینگین در این پایان نامه با سایر روش های الکتروشیمیایی گزارش شده ۴۸
- جدول (۹-۲) نتایج حاصل از بهینه سازی مدت زمان برهمکنش بین dsDNA/MWCNTs-PDDA/PGE و گلو تاتیون در حضور تخریب کننده ۵۲
- جدول (۱۰-۲) نتایج حاصل از بهینه سازی بافر برای برهمکنش بین dsDNA/MWCNTs-PDDA/PGE و گلو تاتیون در حضور تخریب کننده ($n=5$) ۵۴
- جدول (۱۱-۲) نتایج حاصل از اثر مقدار MWCNTs بر روی جریان حاصل از اکسایش بازهای گوانین و آدنین dsDNA ۵۶
- جدول (۱۲-۲) نتایج حاصل از اثر زمان تثبیت نانو کامپوزیت MWCNTs-PDDA روی سطح PGE بر مقدار جریان حاصل از اکسایش بازهای گوانین و آدنین dsDNA ۵۷
- جدول (۱۳-۲) منحنی تنظیم در ناحیه غلظتی $0/0307$ تا $307/3$ میلی گرم بر لیتر گلو تاتیون در بافر استاتی $0/5$ مولار ($pH=4/8$) به وسیله ولتامتری پالس تفاضلی ۵۹
- جدول (۱۴-۲) انحراف استاندارد نسبی برای اندازه گیری گلو تاتیون از طریق دنبال کردن سیگنال آدنین و گوانین و حد تشخیص روش مورد استفاده ($n=5$) ۶۱
- جدول (۱۵-۲) بررسی اثر مزاحمت های احتمالی در اندازه گیری $0/307$ میلی گرم بر لیتر گلو تاتیون از طریق دنبال کردن سیگنال گوانین ۶۲
- جدول (۱۶-۲) نتایج حاصل از اندازه گیری گلو تاتیون در نمونه های بیولوژیکی از طریق دنبال کردن سیگنال گوانین در شرایط بهینه ($n=5$) ۶۳
- جدول (۱۷-۲) مقایسه روش ارائه شده در اندازه گیری گلو تاتیون در این پایان نامه با سایر روش های الکتروشیمیایی گزارش شده ۶۶

چکیده

در این تحقیق یک زیست‌حسگر الکتروشیمیایی جدید جهت بررسی برهمکنش گلوکاتایون و نارینگین با DNA و اندازه‌گیری آن‌ها در نمونه‌های حقیقی ارائه شده است. در تهیه این زیست‌حسگر از نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ای (MWCNTs) با ساختار نانومتری استفاده شده است. DNA به عنوان یک پلی‌آنیون آب‌دوست می‌تواند با تشکیل پیوندهای کووالانسی و غیر کووالانسی روی MWCNTs تثبیت شود. در ابتدا سطح الکتروود گرافیت مداد (PGE) فعال شد. سپس از یک پلیمر کاتیونی برای پخش کردن MWCNTs روی سطح PGE استفاده شد. این پلیمر کاتیونی به تثبیت DNA بر روی MWCNTs و الکتروود گرافیت مدادی کمک می‌کند. با بهره‌گیری از زیست‌حسگر ساخته‌شده و روش ولتامتری پالس تفاضلی عوامل مؤثر بر حساسیت روش از جمله غلظت DNA، مقدار MWCNTs، مدت زمان تثبیت DNA روی سطح الکتروود، مدت زمان برهمکنش ترکیبات موردنظر با DNA و..... بهینه شد. سپس تحت شرایط بهینه مقدار نارینگین و گلوکاتایون در نمونه‌های حقیقی اندازه‌گیری شد. با استفاده از روش ولتامتری پالس تفاضلی منحنی تنظیم برای دو ترکیب نام‌برده بدست آمد. برای نارینگین منحنی تنظیم در دو محدوده غلظتی ۵/۸۰-۵۸۰/۰ و ۰/۵۸-۵/۸۰ میلی‌گرم بر لیتر با حد تشخیص ۰/۱۰۳ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. برای گلوکاتایون منحنی تنظیم در دو محدوده غلظتی ۳/۰۷-۳۰۷/۳ و ۰/۰۳۰۷-۳/۰۷ میلی‌گرم بر لیتر با دو شیب متفاوت و حد تشخیص ۰/۰۰۷۱ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد. گزینش پذیری روش برای تعیین ترکیبات مورد نظر در حضور گونه‌های مختلف مزاحم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از اندازه‌گیری نارینگین در آب‌میوه مرکبات و گلوکاتایون در نمونه‌های ادرار و پلاسما نشان داد که سیستم قابلیت و کارایی بالایی در اندازه‌گیری مقادیر کم دارد.

کلمات کلیدی: زیست‌حسگر الکتروشیمیایی DNA، نارینگین، گلوکاتایون، ولتامتری پالس تفاضلی، الکتروود گرافیت مداد، نانولوله‌های کربنی چند دیواره، پلی (دی‌آلیل‌دی‌متیل‌آمونیم کلراید)

فصل اول

اهمیت و کاربردها

۱-۱- مقدمه

با توجه به پیشرفت‌های اخیر در علم پزشکی و فناوری زیستی و هم‌چنین توجه روزافزون انسان به بهداشت و سلامت، ضرورت اندازه‌گیری مقادیر کم زیست‌مولکول‌ها و داروها روز به روز بیشتر احساس می‌گردد. در واقع می‌توان گفت با افزایش دانش بشر در زمینه‌های پزشکی و بهداشت، نیاز به روش‌های اندازه‌گیری دقیق‌تر نیز افزایش می‌یابد. با مشخص شدن این نیازها و تلاش برای ارائه روش‌های جدید، اطلاعات تازه و به دنبال آن نیازهای جدیدی فراهم می‌شود و این زنجیره دائماً ادامه می‌یابد که نتیجه نهایی آن توسعه چند جانبه علم می‌باشد. بنابراین به نظر می‌آید که نیاز بشر به ارائه روش‌های تجزیه‌ای جدید برای حل مسائل تجزیه‌ای نوین نیازهای پایانی نیافتنی است و تلاش برای رفع این نیاز همواره ادامه خواهد داشت.

در سال‌های اخیر استفاده از تکنولوژی نانو به علت کارایی بالا که در حوزه‌های وسیعی از زمینه‌های مختلف دانش مانند الکترونیک، کاتالیست، سرامیک، حسگرهای الکتروشیمیایی و ... دارد، گسترش قابل توجهی یافته است. گستردگی وسیع تکنولوژی نانو، کاربرد و دامنه کارایی آن را در حسگرهای الکتروشیمیایی به صورت قابل ملاحظه‌ای افزایش داده است. با کاهش اندازه مواد تا ابعاد نانومتری خواص مکانیکی و الکتریکی آن‌ها بهبود قابل توجهی پیدا می‌کند. این تغییر در خواص الکتروشیمیایی و بهبود در انتقال الکترون باعث افزایش کارایی این دسته از ترکیبات در اصلاح زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی برای آنالیز ترکیبات بیولوژیک شده است.

از طرف دیگر، امروزه توجه زیادی به برهمکنش‌های بین دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید^۱ (DNA) و گونه‌های مختلف معطوف شده است. توسعه زیست‌حسگرها بر پایه DNA تلاش محققان را به سمت تشخیص‌های تکنیکی و کشف داروهای جدید سوق داده است. زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی بر پایه DNA امکان ارزیابی و پیشگویی

^۱ Deoxyribonucleic acid

برهمکنش‌های ترکیبات سمی و سرطان‌زا، انواع داروهای ضدسرطان و هم‌چنین بررسی تخریب DNA را فراهم می‌کند که اطلاعات بدست آمده با استفاده از این روش‌ها گامی ارزنده در جهت کشف و تولید داروهای جدید می‌باشد [۱-۲].

در این تحقیق از خواص منحصر به فرد نانولوله‌های کربنی و مخلوط آنها با یک ترکیب پلیمری جهت ساخت زیست‌حسگر بر پایه DNA استفاده شده است. زیست‌حسگر طراحی شده به منظور بررسی برهمکنش بین دو ترکیب نام‌برده و DNA و بررسی تخریب ایجاد شده در DNA ناشی از عامل تخریب‌زا مورد استفاده قرار گرفت. در فصل اول جزئیاتی از مبانی زیست‌حسگرهای DNA، نانولوله‌های کربنی و اهمیت اندازه‌گیری مواد استفاده شده مرور خواهد شد، سپس شرح مختصری از الکتروشیمی خواهیم داشت. در نهایت در فصل دوم به بررسی نتایج حاصل از این پایان‌نامه پرداخته و جزئیات انجام شده و تحلیل داده‌های به‌دست آمده در آنالیز نمونه‌ها را به تفصیل ارائه خواهیم نمود.

۱-۲- ساختار DNA

دئوکسی‌ریبونوکلئیک‌اسید مولکول بسیار مهمی است که نقش اصلی آن در تعیین خصوصیات وراثتی و زنجیره اطلاعات ژنتیکی لازم برای موجود زنده می‌باشد. این مولکول شامل دو زنجیره موازی پلی‌نوکلئوتیدی است که هر نوکلئوتید از ۳ نوع ماده شیمیایی تشکیل شده است: یک گروه فسفات، مونوساکاریدهای پنج کربنی (ریبوز و دئوکسی‌ریبوز) و یک ترکیب حلقوی نیتروژن‌دار بازی (پورین^۱ یا پیریمیدین^۲). گروه‌های قند و فسفات به وسیله پیوندهای استری به هم اتصال یافته‌اند و اسکلت بندی مولکول را تشکیل می‌دهند. یکی از تفاوت‌های اصلی میان DNA و RNA گروه قند آن‌ها می‌باشد که شامل ۲-دئوکسی‌ریبوز در DNA و ریبوز در RNA می‌باشد. پورین‌های موجود در نوکلئوتیدها عبارتند از آدنین^۳ (A) و گوانین^۴ (G) و پیریمیدین‌های آن نیز عبارتند از: تیمین^۵ (T) و سیتوزین^۶ (C). توالی بازهای موجود در DNA اطلاعات ژنتیکی موردنیاز برای ساخت پروتئین را حمل می‌کند.

به طور کلی می‌توان DNA را یک درشت مولکول ریسمان‌مانند با ساختار زنجیری دو رشته‌ای مارپیچی سه بعدی دانست که توالی بازهای موجود در زنجیره آن حامل اطلاعات ژنتیکی است و گروه‌های قند و فسفات تنها بخش ساختمانی را دارا هستند. ویژگی‌های عمده ساختمان مارپیچی دوتایی DNA عبارتند از:

¹ Purine

² Pyrimidyne

³ Adenine

⁴ Guanine

⁵ Thymine

⁶ Cytosine

- (۱) واحدهای دئوکسی ریبوز و فسفات بر سطح خارجی رشته قرار دارند، در حالی که بازها رو به سوی مرکز زنجیره (داخل مولکول DNA) قرار گرفته‌اند. صفحه بازها بر محور مارپیچ عمود است.
- (۲) قطر مارپیچ ۲ نانومتر است و ساختمان مارپیچی پس از هر ده واحد ساختمانی (نوکلئوتید) در فاصله ۳/۴ نانومتری تکرار می‌گردد.
- (۳) دو زنجیره به وسیله پیوندهای هیدروژنی مابین زوج بازها به یکدیگر متصل شده‌اند به طوری که همیشه آدنین با تیمین پیوند برقرار می‌کند (دو پیوند هیدروژنی) و گوانین با سیتوزین (سه پیوند هیدروژنی). این ویژگی مولکول DNA برای ایفای نقش ژنتیکی آن، امری اساسی و ضروری است.
- (۴) توالی بازها در طول یک پلی‌نوکلئوتید هیچ محدودیتی ندارد، اگرچه هر رشته باید مکمل رشته دیگر باشد، توالی این چهار باز است که توالی اسیدهای آمینه سازنده پروتئین‌ها را تعیین می‌کند [۳].



شکل ۱-۱- ساختار DNA [۳]

۳-۱- تخریب DNA

رادیکال‌های آزاد مولکول‌هایی‌اند که یک الکترون جفت‌نشده در مدار بیرونی خود دارند. رادیکال‌های آزاد علاوه بر بازها، قسمت دئوکسی‌ریبوز DNA را نیز مورد حمله قرار می‌دهند. مهم‌ترین آسیب وارده به DNA، تشکیل ۸-هیدوکسی گوانین است که این ماده به آسانی تشکیل شده و باعث جهش و تغییر در ساختار DNA و بنابراین ایجاد سرطان می‌شود [۴].

تخریب DNA توسط رادیکال‌های آزاد از طریق اکسید شدن بخش هیدوکربنی صورت می‌گیرد که باعث تغییر و شکست ساختمان DNA می‌شود. شکستن DNA می‌تواند به صورت شکست درون زنجیره‌ای و شکست بین زنجیره‌ای از طریق شکستن اتصالات صورت گیرد.

رادیکال‌های آزاد اکسیژن‌دار مانند سوپراکساید آنیون، هیدروژن پراکسید و هیدروکسیل رادیکال و رادیکال‌های آزاد نیتروژن شامل نیتریک اسید و پراکسی‌نیتريت دو گروه اصلی رادیکال‌ها به حساب می‌آیند. در شرایط بد فیزیولوژی مانند اختلالات سیستم ایمنی، متابولیسم داروها و الکل‌ها و کمبود ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی تولید ROS^۱ افزایش می‌یابد که باعث ایجاد صدمات بسیار جدی بر ماکرومولکول‌های موجود در سلول‌ها مانند DNA می‌شود [۵].

۱-۳-۱- نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در جلوگیری از تخریب DNA

آنتی‌اکسیدان، مولکولی با توانایی کاهش یا توقف اکسیداسیون مولکول‌های دیگر است. آنتی‌اکسیدان‌ها واکنش‌های زنجیره‌ای تخریب سلول‌ها را از طریق به دام انداختن رادیکال‌های آزاد متوقف می‌کنند. از مدت‌ها قبل این موضوع مطرح شده بود که آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مؤثری در جذب و از بین بردن مواد سرطان‌زا ایفا می‌کنند. مطالعات آزمایشگاهی اخیر اثر بازدارندگی آنتی‌اکسیدان‌ها بر سمیت مواد شیمیایی را در سطح سلولی تأیید می‌کند [۶].

مکانیسم‌های دفاعی بدن شامل دو دسته آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی می‌شود. سه گروه از آنزیم‌ها نقش مهمی در برابر اکسندرها دارند، این آنزیم‌ها عبارتند از:

۱. سوپراکسید دیسموتاز، آنزیمی که تبدیل سوپراکسید به هیدروژن پراکسید و اکسیژن را کاتالیز می‌کند.

۲. کاتالازها، آنزیم‌هایی که هیدروژن پراکسید را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند.

۳. گلوکوتایون پراکسید

آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مهم شامل موارد زیر می‌باشد:

۱. ویتامین E: مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان محلول در چربی.

۲. ویتامین C (آسکوربیک اسید): آنتی‌اکسیدان محلول در آب.

۳. گلوکوتایون مهم‌ترین دفاع درون سلولی در مقابل تخریب سلول‌ها توسط گونه‌های فعال اکسیژن است.

علاوه بر این سه گروه بزرگ مواد دیگری چون کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و اوریک اسید نیز می‌توانند نقش

آنتی‌اکسیدانی ایفا کنند [۷].

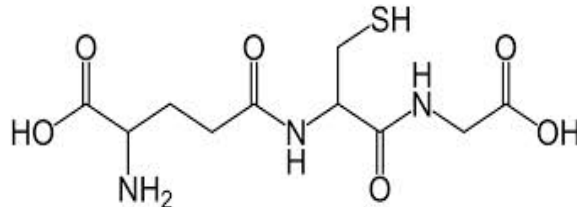
۱-۴- اهمیت و کاربرد مواد مورد بررسی

در این قسمت به برخی از مهم‌ترین خصوصیات دو ترکیب گلوکوتایون و نارینگین پرداخته می‌شود.

^۱Reactive Oxygen Species

۱-۴-۱- گلوتاتیون^۱

گلوتاتیون (GSH) پروتئینی با ساختار آنزیمی است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی می‌باشد. همان‌گونه که در شکل (۱-۲) نشان داده شده است، گلوتاتیون دارای فرمول مولکولی $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ است.



شکل ۱-۲- ساختار شیمیایی گلوتاتیون [۸]

گلوتاتیون از آمینواسیدهای ضروری نیست، زیرا می‌تواند از آمینواسیدهای L-سیستئین، L-گلوتامیک اسید و گلايسین تولید شود. تهیه این آمینواسید از L-سیستئین یک فاکتور محدودیت سرعت گلوتاتیون است، زیرا سیستئین نسبتاً در مواد غذایی کمیاب است و می‌تواند به صورت خودبه‌خود در دستگاه گوارش و پلاسما خون به گلوتاتیون تبدیل شود. گروه تیول (-SH) سیستئین به عنوان دهنده پروتون عمل می‌کند و برای فعالیت‌های بیولوژیکی گلوتاتیون مؤثر می‌باشد [۸]. گلوتاتیون خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد که به محافظت از سلول از گونه‌های فعال اکسیژنی مانند رادیکال‌های آزاد و پراکسیدها کمک می‌کند.

گلوتاتیون در دو حالت کاهش یافته و اکسید شده وجود دارد. در حالت کاهش یافته، گروه تیول می‌تواند یک الکترون به گونه‌های ناپایدار مولکولی مانند گونه‌های فعال اکسیژنی بدهد و گلوتاتیون به شکل فعال تبدیل شود، اما در این حالت قادر است که به سرعت با یک گلوتاتیون فعال دیگر واکنش بدهد تا گلوتاتیون دی‌سولفید^۲ (GSSG) را تشکیل دهد. این واکنش بر اساس غلظت بالای گلوتاتیون امکان‌پذیر است. (بالای ۵ میکرومولار در کبد). گلوتاتیون کاهش یافته می‌تواند از حالت اکسید شده آن توسط عمل آنزیم کاهش دهنده گلوتاتیون نیز به وجود آید. در بافت‌ها و سلول‌های سالم بیش‌تر از ۹۰٪ کل گلوتاتیون در فرم کاهش یافته و کم‌تر از ۱۰٪ آن در شکل دی‌سولفید وجود دارد.

از وظایف گلوتاتیون در بدن می‌توان موارد ذیل را نام برد:

الف) یک محصول مهم آنتی‌اکسیدان درون سلولی است که در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و ترکیبات

^۱ Glutathione

^۲ Glutathione disulfide

فعال اکسیژنی شرکت می کند و آنتی اکسیدان های بیرونی مانند ویتامین C و ویتامین E را در شکل فعال نگه می دارد. (ب) تنظیم کننده چرخه نیتریک اسید است که برای حیات اهمیت دارد اما اگر نامنظم شود می تواند مشکل ساز باشد [۹].

(ج) از طریق اتصال مستقیم، مسمومیت ترکیبات خارجی، نامناسب و سرطان زا را که می تواند ترکیبات آلی، معدنی و همچنین فلزات سنگین مانند جیوه، سرب و آرسنیک باشد، دفع می کند.

(د) برای سیستم ایمنی لازم است، که توانایی های زیر را دارد:

۱- عرضه ی آنتی ژن به لنفوسیت؛ ۲- افزایش تکثیر لنفوسیت ها که موجب افزایش پاسخ می شود؛ ۳- کنترل

پاسخ ایمنی

(ه) نقش اساسی در چندین واکنش متابولیک و بیوشیمی مانند DNA و اصلاح آن، سنتز پروتئین، انتقال آمینو اسید و فعالیت آنزیمی دارد. بنابراین هر سیستمی در بدن مخصوصاً سیستم ایمنی، سیستم عصبی، گوارش و ریه می تواند از حالت های گلو تاتیون تأثیر پذیر باشد [۸].

غلظت گلو تاتیون پلاسما و کبد می تواند با مکمل های خاصی که به عنوان پیش ماده گلو تاتیون به کار می روند زیاد شود. N-استیل سیستئین که به صورت NAC^۱ نشان داده می شود یکی از بیشترین پیش ماده های در دسترس برای سنتز گلو تاتیون است. مکمل های دیگری از جمله S-آدنوسیل متیونین^۲ (SAME) و پروتئین آب پنیر مقدار گلو تاتیون سلول را زیاد می کنند [۱۰].

کمبود گلو تاتیون باعث اتلاف و تعادل منفی نیتروژن می شود. مکمل های گلو تاتیون در مواردی از جمله سرطان، مسمومیت عفونی در اثر جذب باکتری و مواد فاسد و آسیب روحی مناسب هستند و باعث بهتر شدن میزان بقا می شوند. نتایج نشان داده است که به دلیل اینکه گلو تاتیون میزان گونه های فعال اکسیژنی را در سلول کم می کند، ممکن است گسترش سرطان را کاهش دهد [۱۱].

۱-۴-۲- نارینگین^۳

نارینگین متعلق به گروه فلاوونوئیدها است و عمدتاً در گریپ فروت یافت می شود که باعث تلخی آن می شود [۱۲]. فرمول مولکولی این ماده $H_{27}C_{32}O_{14}$ می باشد [۱۳]. جرم مولکولی آن ۵۸۰/۵۳ گرم بر مول و در حالت خالص یک پودر زردرنگ است. نارینگین مخلوطی از شکر با نارینگنین^۴ است که خود یک فلاوونوئید دیگر در گریپ فروت می باشد.

^۱ N-Acetyl Cysteine

^۲ S-adenosyl methionine

^۳ Naringin

^۴ Naringenin