

مطالعات آزمایشگاهی و محاسباتی تیول دار کردن الیگونوکلئوتید به منظور نشان دادن آن روی سطح نانوذره های نقره

الهه عالی، علی شکوهی راد*، مهری اصفهانیان

دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر، قائمشهر، ایران

چکیده: در این مطالعه یک توالی خاص از الیگونوکلئوتید پس از تیول دار شدن در محیط نمکی به نانوذره های نقره متصل شده است. بررسی این اتصال با استفاده از طیف سنجی مرئی - فرا بنفش (طیف سنجی UV-Vis) با تغییر در طول موج حاصل از نانوذره های نقره و الیگونوکلئوتید تیول دار متصل به نانوذره های نقره انجام شده است. همچنین با جابجایی باندها در الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (PAGE) به دلیل افزایش وزن مولکولی پس از اتصال نانوذره های نقره به الیگونوکلئوتید تیول دار نیز صحت این اتصال بررسی شده است. به منظور یافتن ساختار الکترونیکی و پایداری اتصال ها، مطالعات DFT با استفاده از برنامه گوسین ۰۹ انجام شده است، که هدف آن یافتن شرایط بهینه برای اتصال الیگونوکلئوتید تیول دار به نانوذره های نقره می باشد. در کل، اتصال نانوذره های نقره به الیگونوکلئوتید تیول دار باعث هدفمندتر شدن جذب اختصاصی سکانس به سلول می شود و همچنین دقت، صحت و اختصاصیت جذب را افزایش می دهد. محاسبات میزان انرژی جذب $-54/8 \text{ kJ/mol}$ ، جابجایی بار الکتریکی $0/129e$ را پس از اتصال الیگونوکلئوتید تیول دار به نانوذره های نقره نشان داد که بیان کننده از اتصال موثر بین آنها می باشد.

کلمات کلیدی: الیگونوکلئوتید، خالص سازی، نانوذره های نقره، تیول، مکانیک کوانتومی.

KEYWORDS: Oligonucleotide, Purification, Silver nanoparticles, Thiol, Quantum mechanics.

مقدمه

گروه های عاملی فعال در نقاط مشخص الیگو اجازه اتصال الیگو به بسیاری از سطوح و لیگاندها را می دهد [۱-۴]. اصلاح کننده های تیول برای واکنش با گروه های پذیرنده فعال مانند نانوذره های فلزی طراحی شده است. هنگامیکه پایانه الیگونوکلئوتید با تیول عامل دار می شود، می تواند در بسیاری از کاربردهای گوناگون استفاده شود. شایان ذکر است که بعد از جذب تیول به سطح نانوذره های فلزی، الیگونوکلئوتیدها به صورت ایده آل عمود بر سطح قرار می گیرند. این جهت گیری باعث ایجاد پیشرفت های مهمی در پایداری اتصال الیگونوکلئوتید به نانوذره های فلزی می شود [۵-۹].

رشته های الیگونوکلئوتیدی با کمک تکنولوژی فاز جامد و با استفاده از فسفر آمیدیت های دارای گروه های محافظت کننده دی متوکسی تری تیل به عنوان واحدهای سازنده، توسط دستگاه های اتوماتیک طی یک فرایند شیمیایی چرخه ای سنتز می شوند. طی مراحل چهارگانه این فرایند، یک واحد فسفر آمیدیت به رشته الیگونوکلئوتیدی اضافه می شود. مرحله ای که در هر چرخه از سنتز شیمیایی الیگونوکلئوتیدها تکرار می شوند شامل برداشتن گروه محافظت کننده، اتصال، پوشاندن و پایداری شدن می باشند. یکی از برتری های سنتز الیگونوکلئوتید، اتصال رنج وسیعی از بازهای اصلاح شده به صورت شیمیایی می باشد. در این رابطه، استفاده از

* عهده دار مکاتبات

+E- mail: a.shokuhi@gmail.com, a.shokuhi@qaemiau.ac.ir

بررسی قرار گرفته است. بدین منظور نخست میزان خلوص و اتصال الیگونوکلئوتید تیول دار به نانوذره‌های نقره را که می‌تواند به عنوان عامل تنظیم کننده ژن داخل سلولی برای کنترل بیان پروتئین در سلول‌ها قابل استفاده باشد و یک حذف ژنی قابل تنظیم را انجام دهد، انجام شد. سپس با روش محاسباتی DFT ساختار و چگونگی اتصال الیگونوکلئوتید تیول دار به نانوذره‌های نقره بررسی شد.

بخش تجربی

مواد شیمیایی و روش‌ها

پودر Thiol-CPG (Cat No: TMC-100) از شرکت SBS کشور چین، نانوذره نقره (Cat No: 730785) از شرکت Sigma Aldrich، آمونیاک ۳۲٪ (Cat No.: 105426)، کاغذ TLC (Cat No: MC1003840001) از شرکت Merc آلمان، سدیم کلراید (Cat No.: 106404)، لیتیم پرکلرات (Cat No: 205281)، دی‌تیوتریتل (Cat No.: CH8001)، سدیم دودسیل سولفات (Cat No: CH8051)، بافر فسفات (Cat No.: P4417)، توپین ۲۰ (Cat No.: 93773-250G) از شرکت سیناکلون، ستون NAP-10 (Cat No.: GE17-0854-02) از شرکت Glean research آمریکا تهیه شدند.

تجزیه و تحلیل نمونه به منظور بررسی خلوص و اطمینان از صحت اتصال برای الیگونوکلئوتید تیول دار با نانوذره‌های نقره از طریق طیف سنجی نانودراپ، الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (PAGE) و طیف سنجی مرئی - فرا بنفش انجام شده است.

سنتز الیگونوکلئوتید تیول دار

به منظور سنتز توالی الیگونوکلئوتید

5'-GAGCTGCACGCTGCCGTCAAAAAAAAAA-Thiol-3' ستون‌های تیول - CPG آماده شد، سپس محلول‌های تهیه شده برای چهار مرحله از فرایند سنتز در دستگاه قرار داده شد و پروتکل دستگاه برای سنتز الیگونوکلئوتید تیول دار به روش DMT-OFF با استفاده از دستگاه سنتز DNA/RNA ASM2000 تنظیم شد. پس از پایان فرایند اتوماتیک سنتز شیمیایی الیگونوکلئوتید تیول دار، نخست مرحله Cleavage به منظور جدا شدن الیگونوکلئوتید تیول دار از ستون CPG با استفاده از آمونیاک ۳۲٪، سپس مرحله Deprotection

نانوذره‌ها خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بسیاری را نشان می‌دهند که با حالات حجیم آن‌ها بسیار متفاوت است. مشخصات فیزیکوشیمیایی و سایز خاص نانوذره‌ها کاربردهای بسیار نوینی را در زمینه‌های گوناگون ایجاد می‌کند. بررسی برهمکنش بیومولکول‌ها با نانوذره‌های فلزی از جمله نانوذره‌های طلا و نقره اخیراً در کاربردهای زیستی مورد توجه قرار گرفته است [۱۱ و ۱۰]. از برهمکنش نانوذره‌ها با الیگونوکلئوتیدها برای تولید بیوسنسورها، مشاهده باکتری پاتوژن، تصویربرداری، تشخیص بالینی و کاربردهای رهایش دارو استفاده می‌شود [۱۲]. تشخیص مولکولی نیز زمینه‌ای را برای مطالعات تحلیلی زیستی جدید بوجود آورده است که یکی از مهمترین زمینه‌ها نانومواد و اتصال یا همبستگی بیومولکول‌ها با نانوذره‌های فلزی است. یکی از کاربردهای اتصال، یافتن سکانس‌های انتخابی برای بیماری یا جهش‌های ژنتیکی می‌باشد که نقش کلیدی در روش‌های مدیریت بیماری‌های جدید دارد [۶]. نانوذره‌های فلزی گوناگونی از جمله نانوذره‌های طلا و نقره به صورت انتخابی واکنش می‌دهند و بیومولکول‌هایی مانند DNA را مشخص می‌کنند. به عنوان نمونه رهبان^۱ و همکاران برهمکنش نانوذره‌های نقره را با DNA غده طیموس گاوی گزارش کردند [۱۳]. گودمن^۲ و همکاران، تأثیر گروه هیدروفوبیک عامل‌دار شده با نانوذره‌های طلا در DNA را بررسی کردند [۱۴]. در مطالعه دیگری، مایید^۳ و همکاران سامانه بدون اتصالات عرضی از DNA تک رشته‌ای با نانوذره‌های طلا به صورت همگن را تهیه کردند [۱۵-۱۷]. استفاده از روش‌های محاسباتی برای بررسی واکنش‌های DNA و RNA بسیار در مقاله‌های اخیر دیده شده است [۱۸، ۱۹]. بعنوان نمونه، مانوج ک. شوکلا^۴ و همکاران با استفاده از DFT تأثیر نانوذره‌های طلا بر روی باز سیتوزین - گوآنین واتسن - کریک و باز گوآنین را بررسی کرده‌اند [۱۰]. مارتی کاردنس^۵ و همکاران تغییرات در ظاهر و سایز ذره‌ها را در اتصال نانوذره‌های طلا با DNA تک‌رشته‌ای تیول دار و DNA تک‌رشته‌ای بدون تیول با میکروسکوپ الکترونی روبشی و پراکنش نور دینامیکی بررسی کرده‌اند [۲۰].

با در نظر گرفتن ویژگی و کاربردهای زیاد اتصال الیگونوکلئوتید تیول دار به نانوذره‌های فلزی، می‌توان گفت که این موضوع از اهمیت زیادی برخوردار است. در این کار، سنتز الیگونوکلئوتید تیول دار و اتصال آن به نانوذره‌های نقره و همچنین محاسبه پارامترهای کوآتومی مربوط به این اتصال برای اولین بار مورد

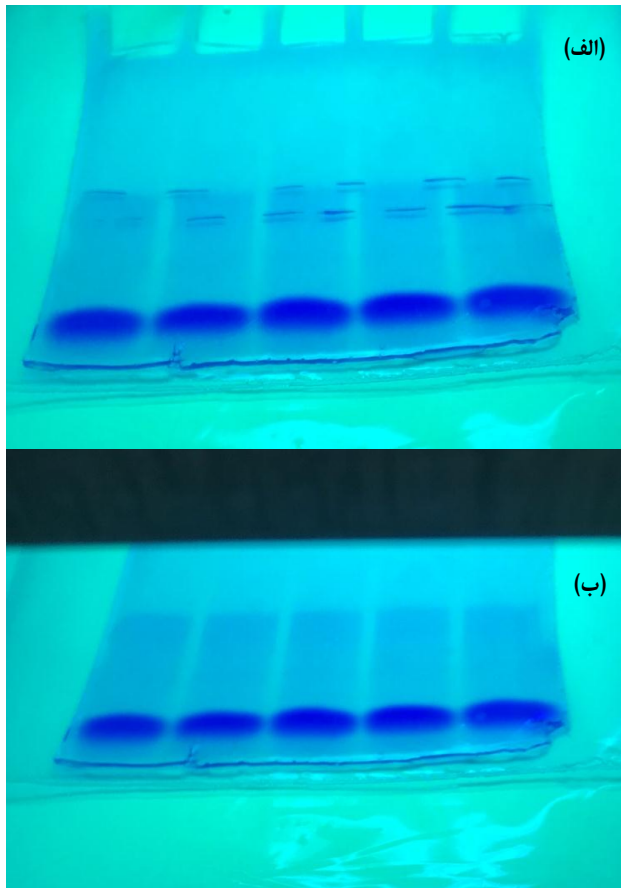
(۱) Rahban

(۳) Maeda

(۵) Marite Cardenas

(۲) Goodman

(۴) Manoj K. Shukla



شکل ۱- (الف) روشن شدن لامپ UV و مشاهده باند الیگونوکلئوتید تیولدار، (ج) علامت گذاری باند دیده شده. (در همه چاهکها الیگونوکلئوتید تیولدار بارگذاری شده است)

و همچنین به عنوان هشدار برای خارج نشدن نمونه هنگام الکتروفورز از ژل عمل کرده است.

به منظور جدا کردن الیگونوکلئوتید تیولدار از ژل آکریل آمید و بازیابی آن، باند بریده شده در محلول لیتیم پرکلرات ۱ M در یک شیشه و در یک فضای تاریک به مدت ۱۲ ساعت روی شیکر قرار داده شد. در این مدت الیگونوکلئوتید تیولدار از ژل آکریل آمید خارج شده است و به دقت مایع اطراف ژل درون شیشه جمع آوری شد. اما این مایع هنوز دارای ناخالصی‌هایی از محلول ژل و همچنین محلول لیتیم پرکلرات می‌باشد. لذا، به منظور تغییر بافر و بدست آوردن الیگونوکلئوتید تیولدار خالص از ستون‌های NAP-10 G25 استفاده شد.

پس از خالص سازی الیگونوکلئوتید تیولدار، همانگونه که در جدول ۱ نشان داده شده است مقدارهای وزن مولکولی (MW)، دمای ذوب (TM)، درصد GC، میزان نانومول الیگونوکلئوتید و میزان آبی که برای رسیدن الیگونوکلئوتید تیولدار به غلظت ۱۰۰ μM لازم است محاسبه شد.

با استفاده از هیدرولیز بازی در دمای بالا برای جدا شدن گروه‌های محافظت کننده انجام شدند.

خالص سازی الیگونوکلئوتید تیولدار با ژل پلی آکریل آمید (Poly Acryl amide Gel Electrophoresis) و کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography)

هدف از خالص سازی با ژل الکتروفورز، جداسازی فرآورده دلخواه از دیگر الیگونوکلئوتیدهای ناخواسته در مخلوط خام است. اقدام کلیدی در این فرایند جداسازی ژل، اشعه UV، برش فرآورده از ژل با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک و بازیابی فرآورده از مخلوط ژل است. در الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید از درصد بالای ژل پلی آکریل آمید برای الیگونوکلئوتیدها استفاده می‌شود. زیرا الیگونوکلئوتیدها قطعات کوچکی هستند که از خلل و فرج ژل آگارز به راحتی عبور می‌کنند، به همین دلیل به بستری با روزنه‌های کم‌تر و درصد بالاتر احتیاج است که بتوان آسان‌تر الیگونوکلئوتیدها را جدا کرد [۲۱، ۲۲].

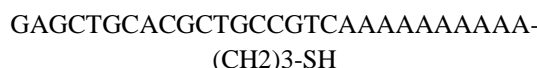
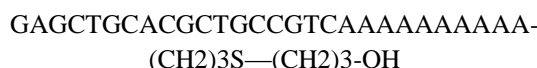
پس از آماده سازی محلول ژل پلی آکریل آمید ۲۰٪ برای انجام فرایند خالص سازی، فرایند پلیمریزاسیون ژل که یک واکنش گرماده است [۲۳] در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. دستگاه الکتروفورز عمودی آماده و نمونه به همراه رنگ نشانگر در چاهک‌های ژل بارگذاری شد. برای رسیدن به جداسازی بهینه فرآورده، تا جایی که ممکن است اجازه داده شد نمونه روی ژل پایین بیاید که در وضعیت دلخواه، باند فرآورده حداقل تا دو سوم طول ژل حرکت می‌کند. بعد از الکتروفورز، به آرامی ژل از روی پلیت با یک کاردک غیر فلزی جدا شده و با یک پلاستیک ۲۰*۲۰ پوشانده و با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک به محیط فلورسنت و روی صفحه TLC منتقل شد. از آنجا که اشعه UV رایج ترین تکنیک تصویری برای خالص سازی است، الیگونوکلئوتیدها نور UV با طول موج کوتاه را جذب کردند و مانند یک سایه بنفش رنگ روی صفحه فلورسنت ظاهر شدند، سپس با استفاده از دوربین در حداقل زمان و با احتیاط کامل از ژل‌ها عکس گرفته شد. تصاویر در شکل ۱ نشان داده شده است. باند بنفش پررنگ پس از مشاهده، علامت گذاری شده و سپس با کاتر از ژل جدا شد. باندهای اسمیر دیده شده در شکل ۱- (الف، ب)، نشان دهنده فرآوردهات جانبی ناخواسته و یا اتصالات ناقص می‌باشند که حذف می‌شوند. رنگ آبی پایین ژل، رنگ برموفنول بلو است که هنگام بارگذاری نمونه با آن مخلوط شد و به عنوان نشانگر در پایین ترین قسمت ژل قرار گرفته است

جدول ۱- مشخصات الیگونوکلئوتید تیول دار

نام	توالی (۳' - ۵')	وزن مولکولی (دالتون)	جذب (1000 μL)	نانومول	میزان آب/تیوب (μL)	دمای ذوب (°C)	درصد GC	تعداد نوکلئوتید
الیگونوکلئوتید تیول دار	GAGCTGCACGCTGCCGTCAAAAAAAAAAAAA[Thiol]	۸۷۶۲	۳/۸	۱۴/۳۱	۱۴۳/۱۲	۶۸/۵۰	۴۶	۲۹

احیاء الیگونوکلئوتید تیول دار

الیگونوکلئوتید تیول دار برای جلوگیری از اکسیداسیون کنترل نشده و خودبخودی به فرم دی سولفیدی محافظت می شود که در صورت استفاده به این فرم، منجر به تشکیل دایمر شده و الیگونوکلئوتید غیر قابل استفاده خواهد شد [۲۴ و ۲۵]. به منظور فعال سازی الیگونوکلئوتید تیول دار قبل از مرحله اتصال به نانوذره های فلزی نخست الیگونوکلئوتید تیول دار با محلول دی تیوتریتل (DTT) ۱۰۰ mM به غلظت ۱۰۰ μM (رسانده شد. سپس نمونه به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. برای برداشتن دی تیوتریتل از الیگونوکلئوتید، از ستون های NAP-10 و سامانه تعویض بافر استفاده شد و با ۱ mL استونیتریل ۱۰٪ در آب، الیگونوکلئوتید اصلاح شده با تیول از ستون NAP-10 جمع آوری و سپس با دستگاه لیوفیلیزه خشک شد. همانگونه که انتظار می رود پس از پایان مرحله احیاء، باند دی سولفید الیگونوکلئوتید اصلاح شده ۳- تیول به فرم فعال سولفیدریل مانند فرمول زیر تبدیل می شود:



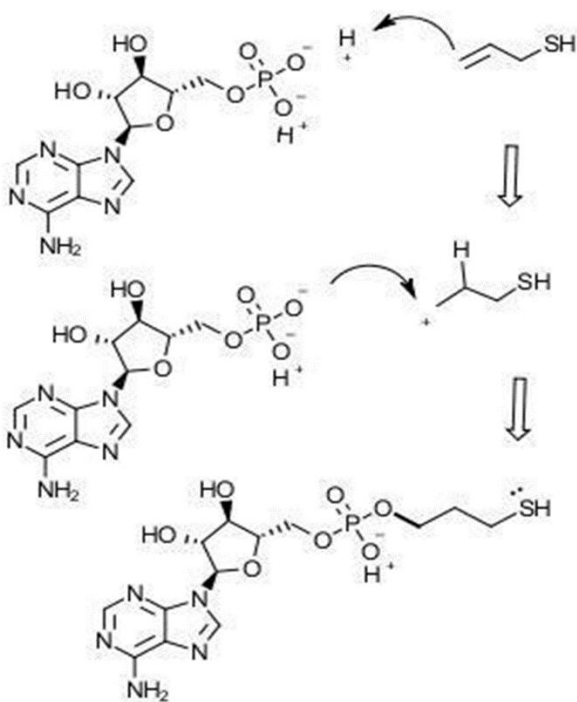
اتصال الیگونوکلئوتید تیول دار به نانوذره های نقره

پس از احیاء الیگونوکلئوتید تیول دار با دی تیوتریتل، اتصال نانوذره های نقره به الیگونوکلئوتید تیول دار مطابق پروتکل زیر انجام شد: الیگونوکلئوتید تیول دار احیاء شده با آب خالص به غلظت ۲۰ μM تنظیم شد. ۱ mL محلول نانوذره های نقره با غلظت ۲ nM به ۲۲۵۱ μ الیگونوکلئوتید تیول دار با غلظت ۲۰ μM اضافه شد. سدیم دودسیل سولفات ۱٪ اضافه شد (غلظت پایانی سدیم دودسیل سولفات در محلول به ۰/۰۱٪ می رسد)، فسفات بافر (pH=۷/۴) ۱۰۰ mM اضافه شد (غلظت نهایی فسفات بافر در محلول به ۱۰ mM می رسد) و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه به صورت قطره قطره به محلول سدیم کلراید ۲M اضافه شد (غلظت نهایی سدیم کلراید در محلول به ۰/۱۵ M می رسد)

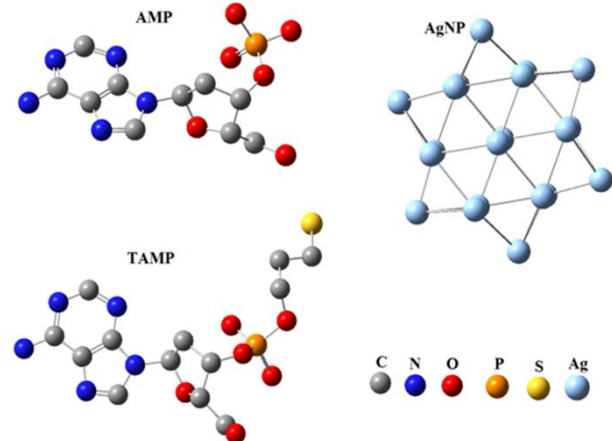
که از تجمع هنگامیکه سطح نانوذره ها از الیگونوکلئوتید اشباع شده است جلوگیری می کند و اتصال را پایدارتر می کند. سپس محلول به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق انکوبه شد و به منظور جدا شدن الیگونوکلئوتیدهای متصل نشده، مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۴۵۰۰ سانتریفیوژ شد، مایع رویی از تیوب خالی شد و رسوب در بافر فسفاتی با غلظت نهایی M ۰/۱۵ سدیم کلراید، توین ۲۰ و بافر فسفات ۱۰ mM حل شد. این محلول سه مرتبه سانتریفیوژ می شود تا الیگوهای متصل نشده کاملاً جدا شوند.

مطالعات کوانتومی

در مطالعات کوانتومی برهمکنش آدنوزین منوفسفات به عنوان نوکلئوتید و فرم کوچکی از مولکول های DNA یا RNA با نانوذره های نقره به صورت تئوری با مطالعه DFT بررسی شده است. ساختارهای هندسی آدنوزین منوفسفات (AMP)، آدنوزین منوفسفات تیول دار (TAMP)، Ag20، جذب آدنوزین منوفسفات تیول دار بر روی Ag (Ag-TAMP) با استفاده از برنامه Gaussian 09 بهینه سازی شده است. همچنین به منظور بررسی هیبریداسیون از عملکرد B3LYP-D در DFT استفاده شده است. همه اتم ها به جز Ag بر اساس 6-31G (d,p) تنظیم شده اند. برای اتم Ag از پتانسیل هسته موثر LANL2DZ (ECP) استفاده شده است. محاسبات بر پایه دقت بالا انتخاب شده است [۲۶ و ۲۷]. ساختارهای الکترونیک نانوذره های نقره و آدنوزین منوفسفات تیول دار (TAMP) قبل و بعد از برهمکنش در شکل ۲ مقایسه شده است. آدنوزین منوفسفات به عنوان نوکلئوتیدی از یک DNA یا RNA کوتاه و Ag20 به عنوان شکل پایداری از نانوذره های نقره در محاسبات ما بررسی شده اند. در این مطالعه پارامترهای مهم شامل انرژی جذب [۲۸] و خواص الکترونی شامل آنالیز جمعیت طبیعی (NBO)، پایین ترین مدار مولکولی خالی (LUMO)، بالاترین مدار مولکولی اشغال شده (HOMO) و گپ انرژی (Eg) به صورت تئوری محاسبه شده است. انتقال بار بین TAMP و نانوذره های Ag بر پایه اختلاف غلظت بار بر روی مولکول TAMP قبل و بعد از جذب نیز تخمین زده شده است.



شکل ۳- مکانیزم تیولدار شدن AMP



شکل ۲- ساختارهای آدنوزین منوفسفات (AMP)، آدنوزین منوفسفات تیولدار (TAMP) و نانوذره‌های نقره (AgNP).

شکل هندسی بهینه شده ساختارها قبل از جذب در شکل ۲ نشان داده شد. همان‌گونه که دیده شد، مولکول AMP یک گروه فسفات در انتهای مولکول دارد که بخش فعال مولکول برای واکنش با تیول می‌باشد. ساختار TAMP بعد از تیولدار شدن AMP نیز نشان داده شد. براساس نتیجه‌های بدست آمده، برخی از چرخش مولکول‌ها در واکنش قابل پیش‌بینی است.

مکانیزم تیولدار شدن در شکل ۳ نشان داده شده است. با افزودن واکنش الکترون دوست، پیوند π آلیل مرکپتان شکسته می‌شود و منجر به تشکیل ۲ پیوند σ می‌شود. نیروی محرکه برای این واکنش از طریق تشکیل یک H^+ الکترون دوست که یک پیوند کووالانسی با پیوند $C=C$ غیر اشباع غنی از الکترون تشکیل می‌دهد، ایجاد می‌شود. به دنبال انتقال بار مثبت روی H به پیوند کربن - کربن، هنگام تشکیل پیوند $C-H$ کربوکسیون انجام می‌شود. در مرحله دوم افزودن الکترون دوست، حدواسط بار مثبت با اتم اکسیژن با بار منفی (O^-) که غنی از الکترون می‌باشد برای تشکیل پیوند کووالانسی دوم ترکیب می‌شود.

نتیجه‌ها و بحث

طیف سنجی نانودراپ

میزان جذب یا جذب نوری (Optical Density) الیگونوکلئوتید تیولدار قبل و بعد از خالص‌سازی با الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید، با استفاده از دستگاه طیف سنجی نانودراپ در طول موج 260 nm اندازه‌گیری شد. نتیجه‌ها در شکل ۴ نشان داده شده است.

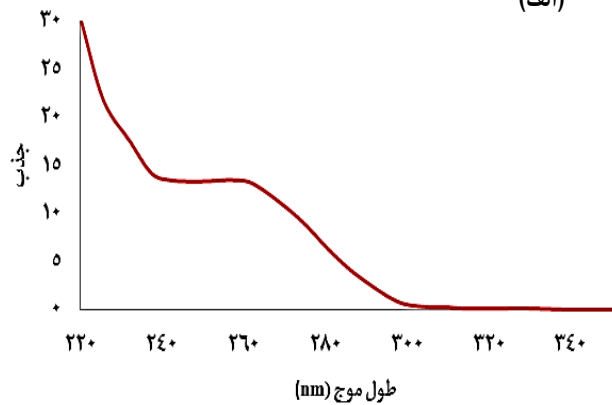
با توجه به شکل ۴-الف) برای الیگونوکلئوتید تیولدار قبل از خالص‌سازی، یک پیک در طول موج 260 nm و یک پیک در طول موج 230 nm مشاهده می‌شود که پیک در طول موج 230 nm به دلیل وجود ناخالصی و فراورده‌ها ناخواسته و جانبی می‌باشد و انتظار می‌رود پس از فرایند خالص‌سازی با ژل پلی‌آکریل‌آمید از بین برود و تنها یک پیک در طول موج 260 nm مشاهده شود. با توجه به شکل ۴-الف) و داده‌های گزارش شده در جدول (۲) میزان جذب الیگونوکلئوتید تیولدار $OD=13/1$ و در مقیاس $439/5\text{ ng}/\mu\text{L}$ می‌باشد. میزان جذب در $260/230$ برابر با $0/71$ و در $260/280$ برابر با $1/97$ می‌باشد. مقادیر پایینی $260/230$ نسبت به $260/280$ برای الیگونوکلئوتید تیولدار خالص‌نویسن را نشان می‌دهد. مقادیر $260/230$ به‌طور معمول در بازه $2/0-2/2$ قرار دارند که نسبت پایینی آن، وجود آلودگی‌ها را نشان می‌دهد که در طول موج 230 nm نشان داده شده است. در شکل ۴-ب) و داده‌های گزارش شده در جدول ۲ نشان داده شده است که بعد از فرایند خالص‌سازی، الیگونوکلئوتید تیولدار تنها دارای یک پیک در طول موج 260 nm می‌باشد و پیک در 230 nm حذف شده است که خلوص و از بین رفتن آلودگی‌ها را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۴-ب) مشاهده می‌شود جذب الیگونوکلئوتید تیولدار پس از فرایند سنتز $OD=3/8$ می‌باشد و در مقیاس $127/2\text{ ng}/\mu\text{L}$ می‌باشد.

جدول ۲ - داده‌های به‌دست‌آمده از طیف سنجی نانودراپ

مشخصات نمونه	جذب نوری	غلظت (ng/ μ L)	۲۶۰/۲۳۰	۲۶۰/۲۸۰
قبل از خالص سازی	۱۳/۱	۴۳۹/۵	۰/۷۱	۱/۹۷
بعد از خالص سازی	۳/۸	۱۲۷/۲	۲/۱۱	۲/۰۳

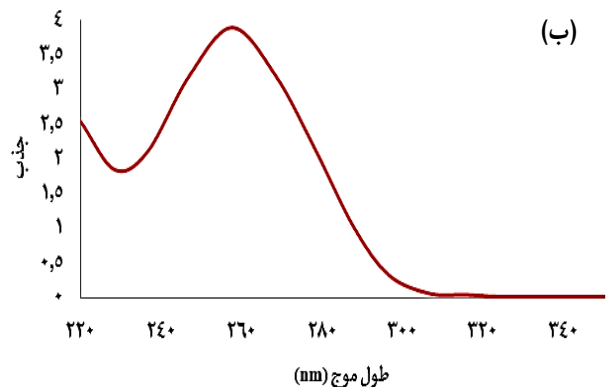
قبل از خالص سازی

(الف)



بعد از خالص سازی

(ب)

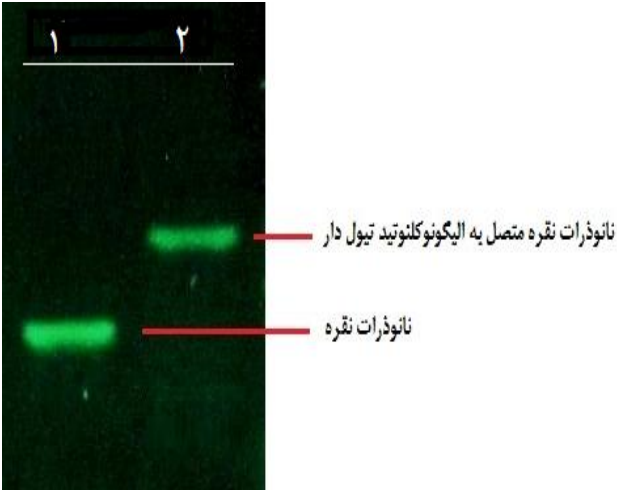


شکل ۴- اندازه‌گیری جذب الیگونوکلئوتید تیول‌دار با استفاده از دستگاه طیف سنجی نانودراپ (الف) قبل از خالص‌سازی (ب) پس از خالص‌سازی

با توجه به داده‌های به‌دست آمده میزان جذب در ۲۶۰/۲۳۰ برابر با ۲/۱۱ و در ۲۶۰/۲۸۰ برابر با ۲/۰۳ می‌باشد. با توجه به کاهش میزان جذب الیگونوکلئوتید پس از فرایند خالص‌سازی از $OD=13/1$ به $OD=3/8$ و افزایش میزان ۲۶۰/۲۳۰ از ۰/۷۱ به ۲/۱۱ می‌توان از حذف فراورده‌های ناخواسته و آلودگی‌ها اطمینان یافت.

ژل پلی آکریل آمید

به منظور تحلیل نتیجه‌ها و اطمینان از صحت اتصال نانوذره‌های نقره به الیگونوکلئوتید تیول‌دار از ژل پلی آکریل آمید استفاده شد.



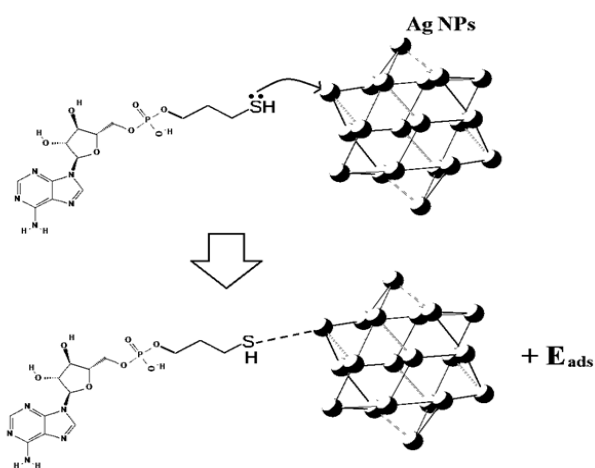
شکل ۵- باند (۱) نانوذره‌های نقره (باند پایین)، باند (۲) الیگونوکلئوتید تیول‌دار متصل به نانوذره‌های نقره (باند بالا) در ژل پلی آکریل آمید.

این مرحله مانند مرحله خالص‌سازی انجام شد با این تفاوت که پس از پایان الکتروفورز، برای مشاهده باند نانوذره‌های نقره و الیگونوکلئوتید تیول‌دار متصل به نانوذره‌های نقره، ژل آکریل آمید با سایبرگرین با غلظت IX رنگ آمیزی شد.

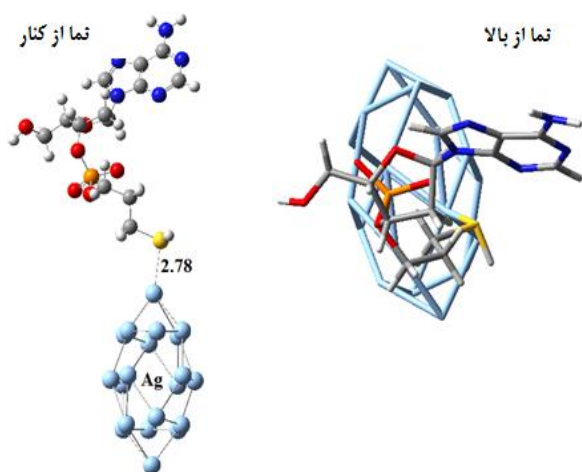
در الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید، نمونه‌ها با وزن مولکولی کمتر با سرعت بیشتری در ژل پلی آکریل آمید حرکت می‌کنند. در شکل ۵ نیز مشاهده می‌شود که سرعت حرکت نانوذره‌های نقره از الیگونوکلئوتید تیول‌دار متصل به نانوذره‌های نقره سریعتر بوده است، زیرا باند نانوذره‌های نقره با وزن مولکولی کمتر در قسمت پایین‌تری نسبت به باند الیگونوکلئوتید تیول‌دار متصل به نانوذره‌های نقره که دارای وزن مولکولی بیش‌تری است (وزن مولکولی نانوذره‌های نقره + وزن مولکولی الیگونوکلئوتید تیول‌دار)، قرار دارد و همچنین بالاتر قرار گرفتن باند الیگونوکلئوتید تیول‌دار متصل به نانوذره‌های نقره دلیل اتصال مناسب نانوذره‌های نقره به الیگونوکلئوتید تیول‌دار است.

طیف سنجی مرئی - فرا بنفش

از آنجا که طول موج خوانش برای نانوذره‌های نقره در بازه nm ۴۰۰ و نور مرئی است با استفاده از طیف سنجی مرئی - فرا بنفش میزان جذب نوری نانوذره‌های نقره و الیگونوکلئوتید تیول‌دار متصل به نانوذره‌های نقره در طول موج nm ۳۵۰ تا nm ۷۰۰ خوانش شده است. با توجه به شکل ۶ طیف به‌دست آمده از نانوذره‌های نقره و الیگونوکلئوتید تیول‌دار متصل به نانوذره‌های نقره نشان می‌دهد که نانوذره‌های نقره یک پیک در طول موج nm ۴۰۰ را نشان می‌دهند و پس از اتصال آن‌ها به الیگونوکلئوتید تیول‌دار، پیک در



شکل ۷- مکانیزم جذب TAMP روی نانوذره‌های نقره

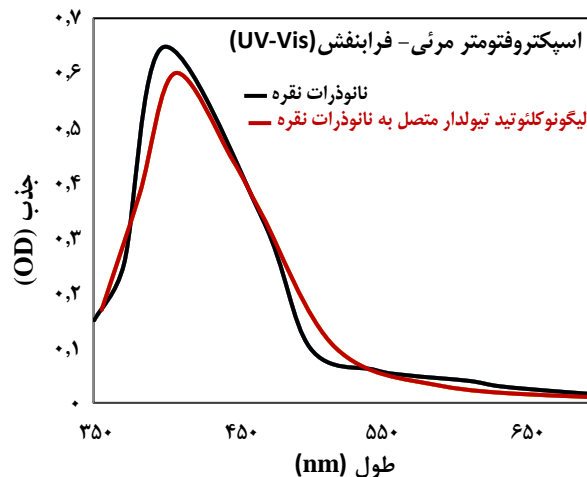


شکل ۸- ساختار جذب TAMP روی نانوکلاسترهای نقره

فورالکان تیولیت (-20 kcal/mol) روی $\text{Ag}(111)$ قابل مقایسه است [۲۹]. جذب بالاتر TAMP روی نانوذره‌ها باعث ایجاد برهمکنش قوی‌تر می‌شود.

همان‌گونه که در جدول ۳ دیده می‌شود، میزان انتقال بار از TAMP به نانوذره‌های نقره، 0.129 محاسبه شده است. مقدارهای بالاتر انتقال بار مطابق با برهمکنش قوی‌تر، مقدار بیشتر انرژی جذب را نشان می‌دهد. تأثیر جذب TAMP روی نانوذره‌های نقره باعث تغییر در خواص الکترونی از جمله گپ انرژی و مدارهای مولکولی مرزی (FMOs) می‌شود.

همان‌گونه که در جدول ۳ نشان داده شده است، انرژی‌های HOMO و LUMO نانوذره‌های نقره به تنهایی $-3/836$ و $-1/990 \text{ eV}$



شکل ۶- طیف سنجی مرئی - فرا بنفش از نانوذره‌های نقره و الیگونوکلئوتید تیولدار متصل به نانوذره‌های نقره

طول موج 400 nm به میزان کم تغییر یافته است که می‌تواند به دلیل پلاسمونی باشد که در سطح نانوذره‌های نقره پس از ترکیب با الیگونوکلئوتید تیولدار اتفاق افتاده است. یا به عبارت دیگر، همان نوسان‌ها یا تغییرهای به‌دست آمده از دانسیته الکترون‌های آزاد در سطح نانوذره‌های نقره است.

محاسبه‌های کامپیوتری

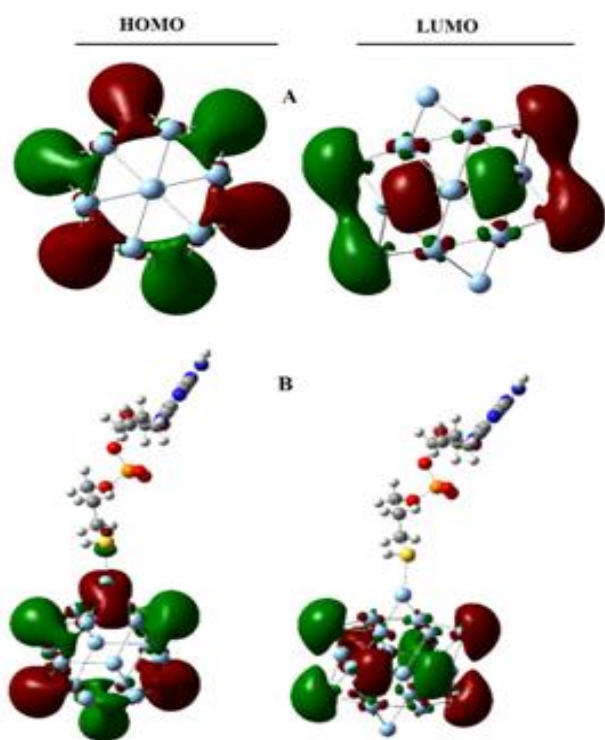
بر اساس پتانسیل TAMP برای جذب روی سطح نانوذره‌های نقره، ما یک مولکول TAMP از طریق گروه تیول در بالای نانوساختار قرار دادیم و به سامانه اجازه داده شد تا با انرژی استراحت کند. که مکانیزم آن در شکل ۷ نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، جذب TAMP نتیجه تشکیل پیوند $\text{S} \dots \text{Ag}$ می‌باشد. هرچه فاصله باند کوتاه‌تر باشد پیوند قوی‌تر است. ساختارهای ریلکس شده از TAMP جذب شده روی نانوذره‌های نقره در شکل ۸ نشان داده شده است. برای نمایش نماهای کنار و بالای ساختمان آن‌ها به ترتیب از روش‌های ball-and-bond و tube استفاده شده است.

نتیجه‌های جذب در جدول (۳) خلاصه شده است انرژی‌های جذب، منفی محاسبه شده است، به بیان دیگر بیشترین مقدار منفی ΔE_{ads} برای پایدارترین ساختار است. جذب TAMP روی نانوذره‌های نقره باعث ایجاد فاصله پیوندی 2.78 \AA می‌شود. انرژی جذب ($-54/8$ (-44.6 BSSE corrected) محاسبه شده است. این مقدارها با مقدارهای بدست آمده از مطالعه جذب فروسرخ بنزن دی‌تیول روی فیلم نقره در بنزن (-9.4 kcal/mol) و حدود 20 kcal/mol

جدول ۳- پارامترهای محاسبه شده در کل سامانه: انرژی جذب (kJ/mol)، انتقال بار (qt, e)، مقادیر HOMO و LUMO و گپ انرژی (Eg)

گپ انرژی (Eg)	LUMO	HOMO	انتقال بار (qt, e)	انرژی جذب (kJ/mol) Ead	سامانه
۵/۴۱۸	-۰/۵۹۰	-۶/۰۰۸	-	-	AMP
۵/۴۲۲	-۰/۵۴۰	-۵/۹۶۲	-	-	TAMP
۱/۸۴۶	-۱/۹۹۰	-۳/۸۳۶	-	-	AgNP
۱/۷۸۸	-۱/۹۶۳	-۳/۷۵۱	۰/۱۲۹	-۵۴/۸ (-۴۴/۶) ^۱	AgNP-TAMP

۱. BSSE corrected



شکل ۹- توزیع HOMO-LUMO سامانه‌های گوناگون: کلاستر نقره ایزوله شده (A)، ترکیب نقره - آدنوزین (B).

و نتیجه‌های به دست آمده از خوانش به ترتیب با $OD=13/1$ و $OD=3/8$ به دست آمد، که کاهش در میزان جذب الیگونوکلئوتید بعد از فرایند خالص‌سازی به دلیل حذف ناخالصی‌ها و فرآورده‌ها ناخواسته و جانبی که در حین سنتز شیمیایی الیگونوکلئوتید تیول‌دار به دست آمده شده است، می‌باشد. همان گونه که در تصویرهای طیف سنجی مرئی - فرا بنفش برای نانوذره نقره و الیگونوکلئوتید تیول‌دار دیده می‌شود پیک نانوذره‌های نقره در طول موج ۴۰۰ nm پس از اتصال به الیگونوکلئوتید تیول‌دار به میزان کم تغییر یافته که درستی ژل پلی‌آکریل‌آمید، باند الیگونوکلئوتید تیول‌دار متصل به نانوذره‌های نقره

با گپ انرژی ۱/۸۴۶ eV می‌باشد که پس از جذب TAMP روی نانوذره‌های نقره، HOMO و LUMO به سمت مقادیر منفی کم‌تر می‌رود. تغییر در گپ انرژی یک پارامتر اساسی در طراحی سنسورهای مبتنی بر الکترو است زیرا تغییر در گپ انرژی، تغییرها در رسانایی را نشان می‌دهد. رابطه بین Eg و رسانایی در معادله (۱) شرح داده شده است [۳۰].

$$\sigma \propto \exp(-Eg/kT) \quad (1)$$

از طریق برهمکنش TAMP با نانوذره‌های نقره، گپ انرژی (Eg) از ۱/۸۵ eV به ۱/۷۹ eV کاهش یافته است. مطابق معادله (۱)، کاهش در Eg منجر به افزایش هدایت الکتریکی می‌شود. بنابراین، نانوذره‌های نقره انتخاب مناسبی هستند که به عنوان سنسورهای DNA و RNA مورد استفاده قرار گیرند. بررسی برخی مطالعات این نتیجه‌ها را تأیید می‌کند [۳۱-۳۳].

مدارهای مولکولی مرزی برای توزیع چگالی نیز بررسی شده‌اند. شکل‌های هندسی HOMO و LUMO در شکل ۹ نشان داده شده است. چگالی در HOMO و LUMO نانوذره‌های نقره که در واکنش شرکت نکرده‌اند به طور یکسان در نانوکلاستر توزیع شده است و چگالی HOMO به صورت یکنواخت تنها در ۶ اتم ویژه در نانوکلاستر وجود دارد در حالی که LUMO در سرتاسر نانوکلاستر پراکنده شده است (ولی روی اتم‌های ویژه برجسته‌تر است). از شکل ۹ می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پس از جذب TAMP روی نانوکلاستر، بخش اصلی HOMO و LUMO هنوز روی نانوکلاسترها است ولی پراکندگی آن‌ها در مقایسه با نانوکلاسترهای واکنش نداد، تغییر کرده است. توزیع مجدد HOMO و LUMO در نانوذره‌ها به صورت نامتقارن اتفاق می‌افتد.

نتیجه گیری

با استفاده از دستگاه طیف سنجی میزان جذب الیگونوکلئوتید تیول‌دار در فرایند پس از سنتز و بعد از خالص‌سازی اندازه‌گیری شدند

کوانتیمی اتصال نانوذره‌های نقره به الیگونوکلوئوتید تیول‌دار باعث افزایش خواص و کاربردهای جدید این نمونه در زمینه‌های گوناگون شده است. بویژه، باعث هدفمندتر شدن جذب اختصاصی سکانس به سلول می‌شود و همچنین دقت، صحت و اختصاصیت جذب را افزایش می‌دهد.

در جایگاه بالاتری روی ژل نسبت به نانوذره نقره قرار گرفته است که به دلیل وزن مولکولی بالاتر و سرعت حرکت کمتر آن نسبت به نانوذره‌های نقره می‌باشد. در مطالعات کوانتیمی انرژی جذب نانوذره‌های نقره $44/6 \text{ kJ/mol}$ حاصل شد. جذب DNA تیول‌دار روی نانوذره‌های نقره با انتقال بار از DNA به نانوذره‌ها در بازه $0/152 \text{ e}$ می‌باشد. همچنین کاهش در گپ انرژی سامانه پس از جذب DNA روی نانوذره‌ها، منجر به افزایش هدایت الکتریکی قابل توجهی می‌شود. این نتیجه‌ها پتانسیل بالای نانوذره‌های نقره را به‌عنوان یک حسگر حساس برای اتصال به DNA و RNA تأیید می‌کند. انجام مطالعه‌های کوانتیمی در راستای مطالعه‌های تجربی باعث به‌دست آوردن یک بیان و رابطه صریح از ساختار مولکولی شده است. هدف از این اتصال را می‌توان با وی نوری و فیزیکی بی‌مانند نانوذره‌های نقره مرتبط دانست که با توجه به نتیجه‌های به‌دست‌آمده از مطالعات تجربی و

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۷

مراجع

- [1] Lundin K. E., Gissberg O., Smith C. I. E., [Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present](#), *Hum. Gene. Ther.*, **26**: 475-485 (2015).
- [2] Yang J., Stolee J. A., Jiang H., Xiao L., Kiesman W. F., Antia F. D., Fillon Y. A., Ng A., Shi X., [Solid-Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides Using Sulfurization Byproducts for in Situ Capping](#), *J. Org. Chem.*, **83**: 11577-11585 (2018).
- [3] Condon D. E., Kennedy S. D., Mort B. C., Kierzek R., Yildirim I., [Stacking in RNA: NMR of Four Tetramers Benchmark Molecular Dynamics](#), *J. Chem. Theory Comput.*, **11**: 2729-2742 (2015).
- [4] Becke T. D., Ness S., Sudhop S., Gaub H. E., Hilleringmann M., Schilling A. F., Clausen-Schaumann H., [Covalent Immobilization of Proteins for the Single Molecule Force Spectroscopy](#), *J. Vis. Exp.*, 138: p, 58167 (2018).
- [5] Cardenas M., Barauskas J., Schillen K., Brennan J. L., Brust M., Nylander T., [Thiol-Specific and Nonspecific Interactions between DNA and Gold Nanoparticles](#), *Langmuir*, **22**: 3294-3299 (2006).
- [6] Dougan J. A., Karlsson C., Smith W. E., Graham D., [Enhanced Oligonucleotide-Nanoparticle Conjugate Stability using Thioctic Acid Modified Oligonucleotides](#), *Nucleic Acids Res.*, **35**: 3668-3675 (2007).
- [7] Connolly B. A., Rider P., [Chemical Synthesis of Oligonucleotides containing a Free Sulphydryl Group and Subsequent Attachment of Thiol Specific Probes](#), *Nucleic Acids Res.*, **13**: 4485-4502 (1985).
- [8] Li P., Medon P. P., [Enzyme-linked Synthetic Oligonucleotide Probes: Nonradioactive Detection of Enterotoxigenic Escherichia Coli in Faecal Specimens](#), *Nucleic Acids Res.*, **15**: 5275-5287 (1987).
- [9] Pérez-Rentero S., Grijalvo S., Ferreira R., Eritja R., [Synthesis of Oligonucleotides Carrying Thiol Groups Using a Simple Reagent Derived from Threonine](#), *Molecules*, **17**: 10026-10045 (2012).

- [10] Shukla M. K., Dubey M., Zakar E., Leszczynski J., [DFT Investigation of the Interaction of Gold Nanoclusters with Nucleic Acid Base Guanine and the Watson-Crick Guanine-Cytosine Base Pair](#), *J. Phys. Chem. C.*, **113**: 3960–3966 (2009).
- [11] de Freitas L. F., Varca G. H. C., Batista J. G. d. S., Lugão A. B., [An Overview of the Synthesis of Gold Nanoparticles Using Radiation Technologies](#), *J. Nanomater.*, **8**: 939 (2018).
- [12] Pramanik S., Chatterjee S., Saha A., Devi, P. S., Kumar, G. S., [Unraveling the Interaction of Silver Nanoparticles with Mammalia and Bacterial DNA](#), *J. Phys. Chem. B.*, **120**: 15313-5324 (2016).
- [13] Rahban M., Divsalar A., Saboury A. A., Golestani A., [Nanotoxicity and Spectroscopy Studies of Silver Nanoparticle: Calf Thymus DNA and K562 as Targets](#), *J. Phys. Chem. C.*, **114**: 5798-5803 (2010).
- [14] Goodman C. M., Chari N. S., Han G., Hong R., Ghosh P., Rotello V. M., [DNA-Binding by Functionalized Gold Nanoparticles: Mechanism and Structural Requirements](#), *Chem. Biol. Drug Des.*, **67**: 297-304 (2006).
- [15] Sato K., Hosokawa K., Maeda M., [Rapid Aggregation of Gold Nanoparticles Induced by Non-Cross-Linking DNA Hybridization](#), *J. Am. Chem. Soc.*, **125**: 8102–8103 (2003).
- [16] Sato K., Hosokawa K., Maeda M., [Non-Cross-Linking Gold Nanoparticle Aggregation as a Detection Method for Single-Base Substitutions](#), *Nucleic Acids Res.*, **33**: e4 (2005).
- [17] Sato K., Onoguchi M., Sato Y., Hosokawa K., Maeda M., [Noncross-Linking Gold Nanoparticle Aggregation for Sensitive Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms: Optimization of the Particle Diameter](#), *Anal. Biochem.*, **350**: 162–164 (2006).
- [18] A.Shokuhi. Rad, S. M. Aghaei, E. Aali, M. Peyravi, [A DFT Study of O₂ and C₁₂ Adsorption onto Al₁₂N₁₂ Fullerene- Like Nanocluster](#), *Diam. Relat. Mater*, **77**: 116-123 (2017).
- [19] A. Shokuhi Rad, Y. Modanlou Jouibary, V. P. Foukolaei, E. Binaeian, [Study on the Surface Interaction of Furan with X₁₂Y₁₂ \(X = B, Al, and Y = N, P\) Semiconductors: DFT Calculations](#), *Curr. Appl. Phys.*, **27**: 316–322 (2016).
- [20] Cardenas M., Barauskas J., Schillen K., Brennan J. L., Brust M., Nylander T., [Thiol-Specific and Nonspecific Interactions between DNA and Gold Nanoparticles](#), *Langmuir*, **22**: 3294-3299 (2006).
- [21] Frank R., Koster H., [DNA Chain-Length Markers and the Influence of Base Composition on Electrophoretic Mobility of Oligodeoxyribonucleotide in Polyacrylamide Gel](#), *Nucleic Acids Res.*, **6**: 2069-2087 (1979).
- [22] Saenger W., [Gel Structure of Guanosine and Guanylic Acid: in Principles of Nucleic Acid Structure](#), *Springer-Verlag*. **8**: 315-320 (1984).
- [23] Efcavitch J. W., [“The Electrophoresis of Synthetic Oligonucleotide: In Gel Electrophoresis of Nucleic A CIDS- a Practical Approach”](#), Rickwood D. and Hames B. D., Eds. Oxford University Press: Oxford, (1990).
- [24] Bischoff R., Coull J. M., Regnier F. E., [Introduction of 5'-terminal Functional Groups into Synthetic Oligonucleotides for Selective Immobilization](#), *Anal. Biochem.*, **164**: 336–344 (1987).

- [25] Sinha N. D., Cook R. M., [The Preparation and Application of Functionalized Synthetic Oligonucleotides: III. Use of H-Phosphonate Derivatives of Protected Amino-Hexanol and Mercapto-Propanol or Hexanol](#), *Nucleic Acids Res.*, **16**: 2659–2669 (1988).
- [26] Shokuhi Rad A., Abedini E., [Chemisorption of NO on Pt-Decorated Graphene as Modified Nanostructure Media: a First Principles Study](#), *Appl. Surf. Sci.*, **360**: 1041–1046 (2016).
- [27] Shokuhi Rad A., [Adsorption of C₂H₂ and C₂H₄ on Pt-Decorated Graphene Nanostructure: Ab-Initio Study](#), *Synth. Met.*, **21**: 115–120 (2016).
- [28] Shokuhi Rad A., [DFT Study of Nitrous Oxide Adsorption on the Surface of Pt-Decorated Graphene](#), *Phys. Chem. Res.*, **4**: 619-626 (2016).
- [29] Gan W., Gonella G., Zhang M., Dai H. L., [Communication: Reactions and Adsorption at the Surface of Silver Nanoparticles Probed by Second Harmonic Generation](#), *J. Phys. Chem. B.*, **134**: 3456-3465 (2011).
- [30] Li S. S., “[Semiconductor Physical Electronics](#)”, 2nd ed., Springer, Berlin, (2006).
- [31] Liu Y., Chen D., Zhang W., Zhang Y., [Mobile DNA Tetrahedron on Ultra-Low Adsorption Lipid Membrane for Directional Control of Cell Sensing](#), *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 307: 127570 (2020).
- [32] González-López A., Abedul M. T. F., “[Laboratory Methods in Dynamic Electroanalysis](#)”, ELSEVIER, (2020).
- [33] Mobed A., Hasanzadeh M., Shadjou N., Hassanpour S., Saadati A., Agazadeh M., [Immobilization of ssDNA on the Surface of Silver Nanoparticles-Graphene Quantum Dots Modified by Gold Nanoparticles towards Bio Sensing of Microorganism](#), *Microchem. J.*, **152**: 104286 (2020).