نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

مطالعه و بررسی تثبیت یک بیومولکول روی سطح جامد،به منظور کاربرد در نانوبیوتکنولوژی

منوچهر وثوقی[۱]، امیر رضا گودرزی[۱*]

۱. مرکز تحقیقات مهندسی بیوشیمی و محیط زیست- دانشگاه صنعتی شریف

amrgud@hotmail.com

چکیده

طراحی و تولید قطعات کم هزینه و حساس، به منظور ساخت دستگاههای آنالیز نوین در مقیاس نانو، که با دقت، سرعت و راندمان بالا فرایند های شیمیایی و بیوشیمیایی را افزایش دهند از اهداف مهندسی فرایندهای زیستی نوین می‌باشد. تراشه‌های زیستی، دستگاه‌هایی هستند که در عین ارزان بودن، ضایعات مضری نیز (در مقایسه با روشهای مشابه) تولید نمی‌کنند. در این تحقیق با استفاده از مکانیسم خودسامان‌یافتن در مقیاس نانو، بیومولکولهای خاصی را روی سطح جامد، تثبیت کرده و شرایط عمل با انتخاب محیطهای مختلف، بهینه می‌شود..

کلمات کلیدی: تثبیت، تراشه زیستی، نانوبیوتکنولوژی، خودسامان‌یافتن

مقدمه

یکی از بهترین راههای سنجش زیستی، با هدف ارزیابی بیان ژنها، ردیابی وجود مادهٔ پروتئینی خاص یا ترکیبات ویژه در سیستم، استفاده از تراشه‌های زیستی[۱،۲]، همچون تراشه‌های DNA [۳،۴] و تراشه‌های پروتئینی می‌باشد. این تراشه‌ها، بستری جامد از مواد مختلف (مثل شیشه، سیلیکون، طلا، ...) به اندازهٔ اسلایدهای میکروسکوپی هستند، که مولکولهای فانکشنال ویژه‌ای، به صورت یک آرایهٔ منظم روی آنها متصل می‌شوند[4]. ساخت این دستگاه‌ها به روشهای متفاوتی ممکن می‌باشد. در یکی از این روشها یک روبات برنامه‌ریزی‌شده، صدها تا هزارها نقطهٔ حاوی بیومولکولهای فانکشنال، با دقت زیادی در جایگاه‌های خاص خود روی تراشه قرار می‌گیرد. این نقاطِ پس از خشک‌شدن، موقعیت‌های ویژه‌ای جهت اتصال بیومولکول به سطح می‌گردند[5].

در تراشه‌های DNA، اغلب از cDNAهای ۵۰۰ تا ۵۰۰۰ بازی استفاده می‌شود. از آنجا که با استفاده از دستگاه‌های مهندسی ژنتیک، هر نوع توالی برای مصارف مختلف قابل تولید است، تراشه‌هایی با قابلیتهای گوناگون امکان ساخته‌شدن دارند. تراشه‌های تجاری، الیگونوکلئوتیدهایی با طول ۲۵ باز، هستند. هر تراشه حدود ۱/۳ سانتیمتر طول دارد، که می‌تواند حدود ۲۰۰۰۰۰ جایگاه را شامل شود. پروبهای DNA، اغلب EST [1]، هستند . EST جزیی از توالی یک ژن (جزئی از مولکول cDNA) است که مختص آن ژن بوده و می‌توان آنرا برای تشخیص بیان ژن بکار برد. اسیدهای نوکلئیک مورد نظر که باید آنالیز شوند (مولکولهای هدف[2])، پس از جداسازی، با گروههای فلوئورسنس نشانه‌گذاری می‌شوند. مولکول هدف ممکن است mRNA یا cDNA باشد. بعد از این مرحله، تراشه را، تا زمانی که از اتصال مطلوب مولکلولهای هدف با پروبها اطمینان حاصل شود، در تماس با محلول حاوی مولکولهای هدف نگاه می‌دارند.سپس به منظور زدودن مولکولهای متصل‌نشده به سطح، سطح تراشه شسته می‌شود. تراشهٔ آماده، توسط پرتو لیزر اسکن می‌شود. حضور فلوئورسانس در یک نقطه، بیانگر اتصال مولکول پروب خاص به مولکول هدف در آن نقطه است. از این طریق می‌توان به میزان بیان یک ژن پی‌برد[6].

تراشه‌هایDNA و میکروآرایه‌ها، نمایانگر گستره‌ای از فناوری‌ها -از میکروسیالات تا میکروالکترونیک- بجای یک فناوری خاص می‌باشند. از این رو کاربرد آنها، در محدوده‌ای فراتر از استفادهٔ کنونی آنها در طبقه‌بندی بیان ژن‌ها و شناسایی بیماری‌ها، در حال گسترش یافتن است[۷،۸]. این تحقیق از طراحی، مطالعه و ساخت دستگاهی در مقیاس نانو (تعریف نانوتکنولوژی)، برای کاربرد در فناوری زیستی (کشف بیماری، درمان سریع، تولید صنعتی) استفاده می‌کند (نانوبیوتکنولوژی).

[1] Expressed Sequence Tag
[2] Target

مواد و روشها

مواد مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از: اسلایدهای شیشه‌ای، طلا و کروم، اسیدسولفوریک ٪۷۰، اسید کلریدریک، اتمسفر نیتروژن، آب اکسیژنه، بیومولکول DNA، نمکهای NaCl، KCl، $MgCl_2.6H_2O$، $CaCl_2.2H_2O$ نیز در کنار بافرهای TE استفاده شدند. مادهٔ مرکاپتوهگزانول نیز به طور جداگانه خریداری شد. لایه‌نشانی: در این آزمایش، از لایه‌های طلا، روی اسلایدهای خاص شیشه‌ای استفاده می‌شود. سطح اسلایدهای شیشه‌ای به‌منظور استفاده در روشهای مختلف تغییر می‌کند. قبل از شروع عملیات لایه‌نشانی، سطح سوبسترا، در دما و مدت زمان معین، شسته می‌شود. سپس لایه‌هایی توسط تکنیک رسوب‌دادن مادهٔ شیمیایی در حالت بخار، در دانشکدهٔ فیزیک دانشگاه صنعتی شریف، روی سطح نشانده شد. قبل از تثبیت DNA، مجدداً سوبستراها کاملاً شستشو داده می‌شوند.

جدول ۱- توالی رشته‌های DNA استفاده شده و تغییرات داده شده در آنها

توالی رشته	کاربرد
HS-C6-CAA CTA CCA GCA CGG G-FITC	اندازه‌گیری و کنترل
CAA CTA CCA GCA CGG G-FITC	آزمایش کنترل

تثبیت: پس از انتخاب طول و توالی مناسب جهت فرایند تثبیت، این رشته‌ها سفارش داده شدند. جهت تثبیت بیومولکول روی سطح از گروههای فعالی در انتهای ۵پریم می‌توان استفاده کرد. همچنین پروب‌هایی با طول یکسان، بدون گروه پیونددهنده، سنتز شدند. الگیونوکلئوتیدها در حضور آنزیم انتهایی خاصی، نشاندار می‌شوند. این محصول به صورت خالص دریافت شده و به صورت محلول نگهداری می‌شود. کنترل مقدار تثبیت مولکلولهای زیستی توسط سنجش XPS در دانشگاه صنعتی شریف فراهم می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش کیفیت DNA تثبیت‌شده[3]، به‌منظور تولید حسگرهای بر مبنای DNA که بتوانند اندازه‌گیریهای دقیقی انجام دهند، بسیار مهم است. بدون اندازه‌گیری پوشش سطحی، نتایج حاصل از این حسگر فقط به منظور تعیین وجود یا عدم وجود DNA هدف در نمونه می‌باشد. در صورت دانستن تعداد DNA تثبیت شده روی سطح، می‌توان تعداد DNA هدف را بعد از هیبریدشدن پیش‌بینی کرد. تحقیقات گسترده‌ای روی چگونگی بدست‌آوردن تک‌لایهٔ منظمی از DNA، که توانایی هیبریدشدن با رشتهٔ مکمل خود را داشته باشد، انجام شده است. عوامل متعددی بر ساختار تک‌لایهٔ جذب‌شده از DNA، و به نوبهٔ خود بر هیبریدشدن DNA هدف موثر می‌باشند. بعضی از این عوامل اثرگذار عبارتند از: نوع عملگر کردن DNA پروب، غلظت محلول حاوی DNA پروب، زمان لازم برای تثبیت DNA پروب، طول رشته DNA پروب، استفاده از مولکول فاصله‌انداز[4] و ساختار سطح. پارامترهای موثر در جذب بیومولکلول نیز در جدول یک نشان داده شده‌اند[۹،۱۰].

[3] Probe DNA
[4] Spacer

جدول ۲ - پارامترهای مختلفی موثر در تعیین شرایط بهینه

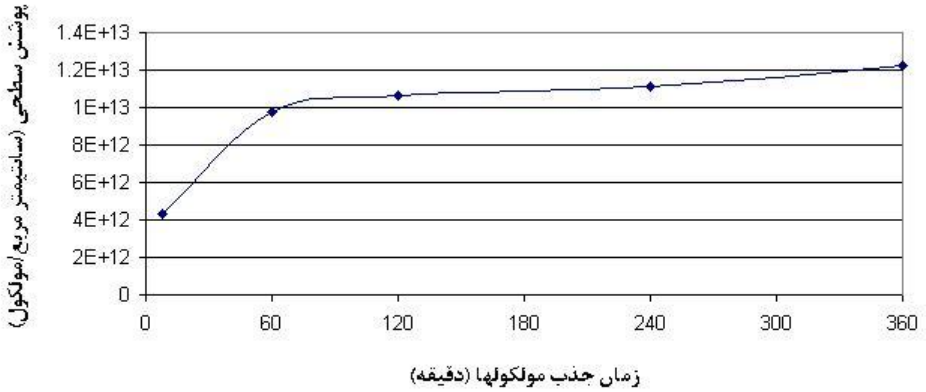
پارامتر
توالی رشته (ترکیب اجزای رشته، موقعیت هر کدام داخل رشته، گروههای عاملی)
طول رشته
بافر بهینه اتصال (نوع بافر، غلظت بافر)
زمان در معرض قرار گرفتن
غلظت DNA در تماس با سطح

در این مقاله، با هدف ارایه راهبردی عملی در ساخت نمونه‌ای از یک تراشه DNA، قسمتی از ژنوم ویروس هپاتیت ب[5]، به عنوان پروب مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از برنامهٔ نوشته شده، پس از بدست آوردن نقشه کامل ژنتیکی میکروارگانیسم‌های مختلف، برنامه‌ای کامپیوتری جهت انتخاب توالی‌های خاصی از این رشته که مشخصات خاصی داشتند، نوشته شد. این برنامه، خواص عمدهٔ زیر را در طراحی رشته لحاظ می‌کند:

- **پروتئین سطحی خاص**. بنیادی‌ترین شرط یک سنجش زیستی کارآمد، یکتا بودن پروتئین تولیدی در تمام گونه‌های مختلف یک سویه می‌باشد.
- **طول مشخص**. با استفاده از طولهای مختلف امکان انتخاب توالی معینی از ژنوم میکروارگانیسم‌هایی که مختص به همان موجود بوده و احتمال بیان‌شدن ساده و سریع‌تری را داشته باشند، میسر می‌گردد.
- **عدم وجود نواحی مکمل روی رشته**[6]. وجود نواحی خود-مکمل روی رشته، سبب گره خوردن آن و امکان تشکیل حلقه‌های مختلف و عدم هیبریدشدن را به همراه خواهد داشت. گرچه بعضاً ساختارهای Hairpin، در طراحی پروبها مورد استفاده قرار می‌گیرد، عدم کارایی ثابت شدهٔ آنها، باعث لحاظ کردن این شرط در طراحی برنامه شده است.
- **تمایل زیاد برای جذب مولکول هدف**. ترکیب اجزای موجود روی تک رشته پروب، با ایجاد آرایش فضایی مناسب و پایدار، امکان جذب آسانتر مولکهای هدف را فراهم می‌سازد. معیار جذب دو-رشته‌ای ها در این سیستم، دمای همجوشی آنها می‌باشد. این هدف با بهینه‌کردن مقدار گوانین و سیتوزین در رشتهٔ طراحی شدهٔ برنامه کامپیوتری، میسر گردید.
- **تمایل جذب سطحی کم و دفع آسان در صورت جذب**. به علت ساختار شیمیایی الیگونوکلئوتیدهای مختلف (دوحلقه‌ای و تک‌حلقه‌ای)، میانکنش خاصی نیز بین آنها و سطح بوجود می‌آید. با محاسبه داده‌های تجربی انتالپی جذب سطحی و دفع از روی سطح، می‌توان حضور نسبی آدنین و تایمین را به عنوان مولکولهای موثری در جذب سطحی ناپایدار و دفع آسان نام برد.
- **دیگر شرایط**. انتخاب رشتهٔ مناسب، اگرچه منوط به لحاظ کردن شروط بالا می‌باشد، اما بسته به روش آزمایشی، شرطهای محدودکنندهٔ دیگری نیز مطرح می‌شوند. دستگاه‌های مطالعه نانوتکنولوژی، شرایط ویژه‌ای را جهت کار با نمونه‌های بیولوژیکی می‌طلبند. در این برنامه، به علت استفاده از چند راهکار مختلف آزمایشی، شروط دیگری نیز در طراحی رشته، لحاظ گردیدند.

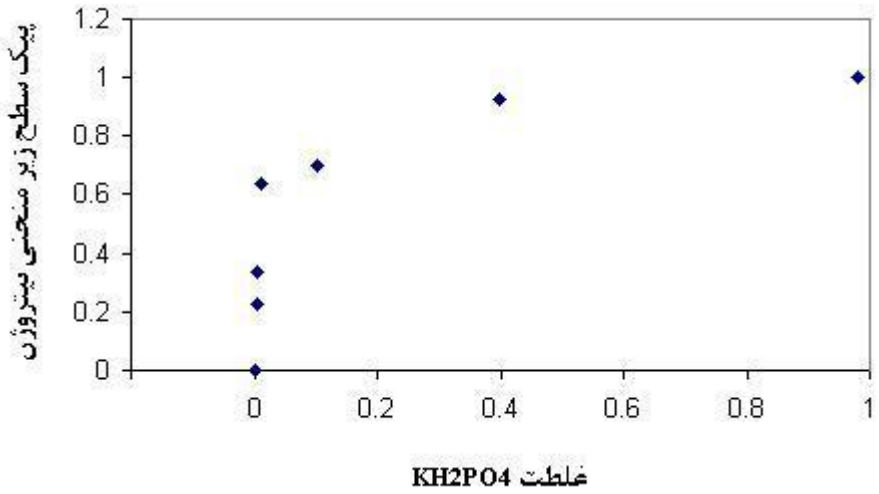
[5] Hepatitis B Virus
[6] Non-self-complementary

با توجه به قابلیت‌های این برنامه، فعالیت تحقیقاتی که در آزمایشگاه‌های ژنتیک، چندین هفته را به خود اختصاص می‌داد، در مدت کمی به بهره‌برداری رسید. مولکولهای اصلاح‌شدهٔ DNA، اگرچه، امکان میانکنش غیرمستقیم زنجیره‌های جانبی نوکلئوتیدهای حاوی نیتروژن را با سطح دارند؛ از طریق گروه‌های فعال انتهایی به طور ویژه‌ای، با سطح واکنش می‌دهند. برای تعیین نحوهٔ جذب "خاص" بیومولکول (تنها از طریق گروه انتهایی)، و همچنین نحوهٔ جذب "غیر خاص" آن (از طریق بازهای نوکلئوتیدی و یا دیگر عوامل موجود در رشته)، اطلاعات XPS بیومولکول حاوی گروه عاملی و بیومولکول بدون گروه عاملی، بدست آمد و مقایسه شد. حضور پیک عناصر معینی در اطلاعات XPS معیار مناسبی از جذب بیومولکول روی سطح می‌باشد، چراکه سطح مورد نظر، در مجاورت محلول بافر عاری از بیومولکول، هیچگونه پیک XPS قابل رؤیت از بعضی عناصر خاص را نمی‌دهد. حضور نیتروژن، معرف بسیار مناسبی برای ردیابی DNA جذب‌شده می‌باشد، چرا که حضور آنها معمولاً از آلودگی‌های سطحی در طی آماده‌سازی و جابجایی تاثیرپذیر نیست. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که هرگونه سیگنال رؤیت‌شده از نیتروژن، به طور انحصاری از بازهای پورین و پیریمیدین موجود در بیومولکول نشأت می‌گیرد. به علاوه مقدار نسبی بیومولکول جذب‌شده از نمونه‌های مختلف با مقایسه سطوح زیر منحنی عنصری قابل تعیین است و معیاری کمّی از نوع آرایش بیومولکولها روی سطح می‌باشد. با مطالعهٔ مقدار مولکلول جذب‌شده روی سطح، با استفاده از تکنیک XPS می‌توان تعداد مولکلولهای تثبیت‌شده روی سطح را بدست آورد. شکل یک، نمونه‌ای از پوشش سطحی بدست آمده در آزمایش ما می باشد.



شکل ۱- نمودار تغییرات جذب سطحی مولکلولها بر حسب زمان

برای بررسی اثر غلظت بافر در جذب بیوموکول روی سطح، اطلاعات طیف جذبی بیومولکول با غلظت معینی، در بافرهایی با غلظتهای مختلف بدست آمد. در این آزمایش با توجه به پتانسیلهای خاص بافر فسفات، به عنوان اولین گزینه انتخاب شد. سطح زیر منحنی پیک نیتروژن این دسته از طیفها بر حسب غلظت بافر در شکل ۲، نشان داده شده است. همانطور که از شکل بالا بر می‌آید، تغییر غلظت بافر از نقطه اول، تا آخرین غلظت بافر آزمایش شده، افزایش سطح زیر پیک را به اندازهٔ ۵ برابر نشان می‌دهد. این آزمایش اثر مهم غلظت بافر را بر پوشش سطحی نهایی نمایان می‌کند.



شکل ۲- سطح زیر منحنی پیک نیتروژن بر حسب غلظت بافر که در غلظت معینی از بیومولکول بدست آمده است.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، با تکیه بر انتخاب ناحیه‌ای مناسب از ژنوم ویروس هپاتیت ب، طول مشخصی از این رشته انتخاب شد. این طول با توجه به مقدار انتخاب شده، در دستگاه‌های تجاری و مقیاس تحقیقاتی، عدد مطلوبی است. تطابق پوشش سطحی بدست آمده با مقدار پیش بینی شدهٔ تئوری، نشان‌دهندهٔ مناسب‌بودن طول انتخابی است. علاوه بر این، در نظر گرفتن شرایط ویژه در طراحی رشته، که پتانسیل جذب را افزایش می‌دهند، در نتایج آشکار شده است. با احتساب شرایطی مبنا، زمان و غلظت بهینهٔ یک بافر خاص بدست آمد. تحت این شرایط، قرار گرفتن بیومولکلولِ همراه با گروه‌های عاملی، در زمانی بیش از ۵ ساعت، می تواند پوشش سطحی مناسبی را فراهم کند. علاوه بر این بافر فسفات به عنوان اولین گزینه انتخاب شد. تحت این شرایط، غلظت یک مولار بافر مناسب تشخیص داده شد.

منابع و مراجع

1. Pirrug M.C., Angew. Chem., Int. Ed., 2002, 41, 1277-1289.
2. Nelson B.P. et.al., Anal. Chem., 2001, 73, 1-7.
3. Wang J., Nucleic Acids Research, 2000, 28, 3011-3016.
4. Kasemo B., Surf. Sci., 2002, 500, 656-677.
5. Demers L.M., et.al., J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 3166-3173.
6. Chan V., et.al., Biophys. J., 1995, 69, 2243-2255.
7. Chan V., Langmuir, 1997, 13, 320-329.
8. Lipshutz R., Nat. Gent., 1999, 21, 20-24.
9. Bamdad C., Biophys. Jour., 1997, 75, 1989-1996.
10. Bamdad C., Biophys. Jour., 1997, 75, 1997-2003.