روش‌های تثبیت DNA برای ساخت نانو زیست‌حسگرهای نوکلئیک اسید

صدیقه فلاحی[۱]، نفیسه شریفی[۲،*]

۱-پژوهشکده علوم و فناوری نانو، دانشگاه کاشان
۲-دانشکده فیزیک، دانشگاه کاشان

چکیده

در سال‌های اخیر، زیست‌حسگرهای DNA با روند رو به رشدی به‌عنوان ابزاری جایگزین و امیدوارکننده در تشخیص‌های بالینی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اساس کار تراشه‌های نانویی مشخصه‌یابی تغییرات DNA و تبدیل آن‌ها به سیگنال قابل مشاهده است. اتصال دقیق و کنترل شده‌ی DNA بر روی سطوح مبدل، یکی از مهم‌ترین مراحل ساخت زیست‌حسگرهای نوکلئیک اسید است و اثر به سزایی بر بازده زیست‌حسگر دارد. مطالعات زیادی در زمینه‌ی اصلاح مبدل‌ها با نانومواد و مولکول‌های زیستی، برای افزایش حساسیت و انتخاب‌پذیری زیست‌حسگرها انجام شده است. در این مقاله، مواد اصلاح‌گر سطح مبدل و روش‌های گوناگون تثبیت DNA روی سطوح عامل‌دار شده؛ مزایا و معایب هر یک از این روش‌ها مرور شده است.

واژه‌های کلیدی: تثبیت DNA، زیست‌حسگر، نوکلئیک اسید، هیبریداسیون

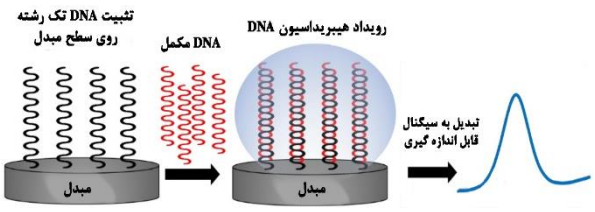
ایمیل نویسنده مسئول: sharifi@kashanu.ac.ir

۱- مقدمه

زیست‌حسگر[۱]، ابزاری است که برای اندازه‌گیری مستقیم ترکیب آزمایشی (آنالیت[۲]) در نمونه به‌کار می‌رود. زیست‌حسگر متشکل از دو جزء اصلی، عنصرزیستی[۳] و مبدل[۴] فیزیکی یا شیمیایی است. عناصر زیستی شامل آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها، میکروارگانیسم‌ها و نوکلئیک اسیدها[۵] هستند. عنصر زیستی روی سطح مبدل تثبیت[۶] می‌شود و هنگام تماس با آنالیت به ترکیب مورد نظر متصل می‌شود آن‌گاه مبدل، تغییرات فیزیکی یا شیمیایی ناشی از این اتصال را به یک پیغام قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند [۱]. زیست‌حسگرهای نوکلئیک اسید که امروزه بسیار رواج یافته‌اند ابزار مهمی برای تشخیص عوامل بیماری‌زا هستند. رویداد هیبریداسیون[۷] DNA اساس کار زیست‌حسگرهای نوکلئیک اسید است. به این منظور لایه‌ای از DNA تک رشته‌ای (پروب[۸]) روی سطح مبدل تثبیت می‌شود و هنگام تماس با نمونه‌ی خون، ادرار، بزاق یا بافت بدن بیمار، با توالی DNA مکملش هیبرید می‌شود و مارپیچ دورشته‌ای DNA را تشکیل می‌دهند. رویداد هیبریداسیون به کمک مبدل تبدیل به سیگنال قابل اندازه‌گیری می‌شود و مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (شکل ۱) [۲]. موفقیت این ابزار بستگی به شیمی استفاده شده برای اتصال پروب به سطح مبدل و کنترل چگالی آن دارد [۳]. روش‌های مرسوم برای ساخت میکروآرایه[۹] ی DNA الف)تولید مسقیم DNAها روی سطح مبدل با استفاده از روش لیتوگرافی و ب)نهشت دادن DNA است [۴].از معایب این روش‌ها ناتوانی در کنترل چگالی پروب تثبیت شده و عدم تکرارپذیری، است که کیفیت کارایی زیست‌حسگر را کاهش می‌دهد [۵]. با توجه به اهمیت مسأله‌ی تثبیت در فرآیند طراحی زیست‌حسگرها و اثر آن بر بازده زیست‌حسگر؛ پژوهش‌های بسیاری در زمینه‌ی شناسایی روش‌های کارآمد برای بهینه‌سازی فرآیند تثبیت DNA انجام شده است. در این مقاله مهم‌ترین روش‌های تثبیت مرور شده است و مزایا و معایب هریک از این روش‌ها مورد بررسی قرار گرفته است.

[1] Biosensor
[2] Analyte
[3] Biological element
[4] Transducer
[5] Nucleic Acid
[6] Immobilization
[7] Hybridization
[8] Probe
[9] Microarray

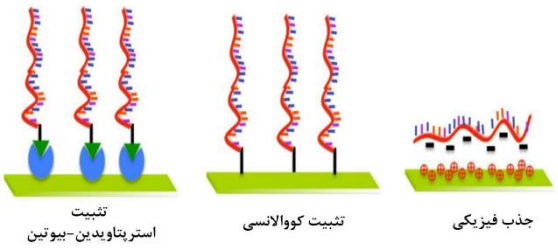
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۰۹ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۰۵/۳۰



شکل ۱. طرح کلی از زیست‌حسگر DNA [۲]

۲- روش‌های تثبیت پروب DNA بر سطح مبدل

اتصال مولکول‌ها به سطح که باعث افزایش یا کاهش جنبش مولکول‌ها شود را تثبیت می‌گویند. فرآیند تثبیت رشته‌های DNA یکی از مهم‌ترین مراحل ساخت زیست‌حسگرهای نوکلئیک اسید است که تأثیر زیادی بر بازده زیست‌حسگر دارد. در حالت کلی انتخاب یک روش تثبیت مناسب، بستگی به خواص فیزیکی-شیمیایی سطح و پروب دارد. در شکل ۲ روش‌های مختلف تثبیت، که طی سال‌های اخیر استفاده شده‌اند، نشان داده شده است. این روش‌ها دارای سه نوع سازوکار جذب فیزیکی، تثبیت کووالانسی و تثبیت استرپتاویدین/آویدین-بیوتین هستند [۶]. نتیجه‌ی یک تثبیت کارآمد واکنش‌پذیری بالا و جهت‌گیری خوب رشته‌های DNA برای هیبریداسیون با رشته DNA مکمل است.



شکل ۲. روش‌های تثبیت DNA بر روی سطح الکترود

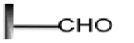
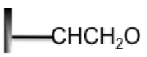
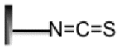
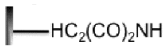
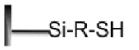
۲-۱- جذب فیزیکی

از آن‌جایی‌که در روش جذب فیزیکی اصلاح DNA نیاز نیست، ساده‌ترین روشِ تثبیت محسوب می‌شود. جذب فیزیکی مبتنی بر برهم‌کنش یونیِ بین گروه‌های باردار منفی روی پروب گیرانداز و بارهای مثبتی که سطح را پوشانده‌اند؛ است. DNAهای تثبیت شده دارای جهت‌گیری تصادفی هستند. معمولاً از لایه‌ای از کیتوسان[1] برای تثبیت DNA به روش جذب فیزیکی روی سطح الکترود استفاده می‌شود. بارهای منفی فسفات ساختمان DNA با بارهای مثبت لایه کیتوسان موجود در سطح الکترود جفت و میکروآرایه‌ی DNA ایجاد می‌شود [۷]. از معایب روش جذب فیزیکی، جهت‌گیری تصادفی و اتصال ضعیف DNAها به سطح است. به‌دلیل همین اتصال ضعیف پروبِ گیرانداز است که هنگام شست‌وشو و یا سنجش به وسیله‌ی بافرها، DNA از سطح جدا می‌شود. به‌علاوه مسائل ناشی از انتقال جرم و سیگنال‌های پس-زمینه‌ی بالا، باعث اشتباه در محاسبه‌ی ثابت‌های رشد سینتیکی و حتی تشخیص نادرست می‌شود. در جدول ۱ چند گروه عاملی که در روش جذب فیزیکی، برای اصلاح سطح استفاده می شود معرفی شده است.

۲-۲- تثبیت کووالانسی

برای تثبیت DNA روی سطوح جامد، با استفاده از برهم‌کنش‌های الکتروستاتیکی، تغییرات محیطی مانند قدرت یونی، pH و دما بسیار موثر است. دو روش معمول برای اتصال DNA روی سطوح که در مقالات گزارش شده روش شیمیایی و کووالانسی است. در جدول ۱، گروه‌های عاملی که برای اتصال به DNA، با استفاده از روش کووالانسی می‌توان به کار گرفت گزارش شده است [۸].

جدول ۱. روش‌های فیزیکی و کووالانسی تثبیت DNA [۸]

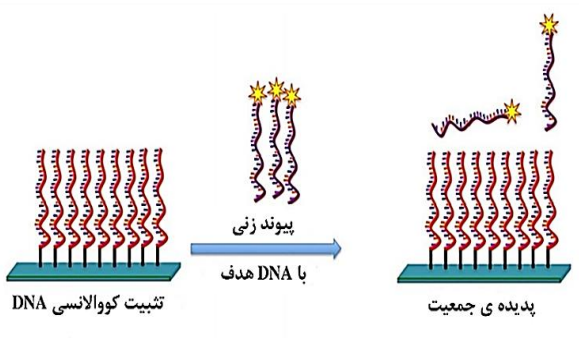
اصلاح گر سطح	ساختار اصلاح گر	اصلاح گر پروب DNA	روش تثبیت
Amine		------	فیزیکی
Nitrocellulose		------	فیزیکی
Poly(l-lysine)		------	فیزیکی
PAAH		------	فیزیکی
Diazonium ion		------	فیزیکی
Gold (Au)	------	تیول - (SH)	کووالانسی
Carboxyl (with EDC)	-COOH group (with EDC)	آمین - (NH2)	کووالانسی
Aldehyde		آمین - (NH2)	کووالانسی
Epoxy		آمین - (NH2)	کووالانسی
Isothiocyanate		آمین - (NH2)	کووالانسی
Maleimide		تیول - (SH)	کووالانسی
Mercaptosilane		تیول - (SH)	کووالانسی

در یک اتصال مناسب، پروب‌های DNA بایستی با چگالی یکنواختی روی سطح تثبیت شده باشند؛ روش اتصال مولکول‌های زیستی به آسانی از مقیاس آزمایشگاهی به میزان تولید انبوه قابل

[1] Chitosan

تعمیم باشد؛ قابل اطمینان، تکرارپذیر و مقاوم در برابر شست‌وشو باشد.

مزیت این روش این است که آرایه‌های DNA با فاصله‌ی مناسب، طوری تشکیل می‌شوند که میزان هیبریداسیون با DNA هدف و گزینش‌پذیری بسیار افزایش می‌یابد. اما در این روش، حتی با اینکه بیش‌ترین مقدار تثبیت رخ می‌دهد، چون پروب‌های DNA به‌صورت فشرده روی سطح قرار می‌گیرند به‌دلیل برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی، نمی‌توانند در هیبریداسیون شرکت داشته باشند [۹]. در روش اتصال کووالانسی به‌دلیل چگالی بالای DNA تثبیت شده؛ نسبت سیگنال به سیگنالِ پس‌زمینه و برهم‌کنش‌های غیرخاص[1] افزایش می‌یابد. به این پدیده، اثرجمعیت[2] گفته می‌شود (شکل ۲).



شکل ۳. پدیده‌ی اثر جمعیت هنگام هیبریداسیون با پروب گیرانداز

در جدول ۲ شیمی اتصالات کووالانسی مختلف به همراه گروه‌های عاملی مربوط به هریک و هم‌چنین مزیت‌ها و محدودیت‌های آن‌ها خلاصه شده است. معمولاً در برهم‌کنش‌های کووالانسی از واکنش‌گر ۱-اتیل-۳-(۳-دی متیل آمینو پروپیل)، EDC[3]، به‌عنوان عامل فعال کننده استفاده می‌شود. DNAهای آمین یا کربوکسیل‌دار شده می‌توانند به وسیله‌ی EDC روی نانولوله‌های کربنی تک جداره‌ی آمین یا کربوکسیل‌دار شده تثبیت شوند [۹].

در ابتدا فرض می‌شد سطوحی که قابلیت تثبیت چگالی بالایی از پروب DNA را دارند؛ قدرت هیبریداسیون بیشتری نیز دارند. اما اگر چگالی پروب‌های تثبیت شده زیاد باشد، DNAهای هدف فضای کافی برای جای‌گیری بین پروب‌ها و هیبرید شدن با آن‌ها را ندارند. پدیده‌ی جمعیت مهم‌ترین چالش پیش روی تراشه‌های DNA است. البته چنان‌چه در این روش فاصله‌ی کافی بین DNA های تثبیت شده باشد؛ هیبریداسیون افزایش می‌یابد [۱۰].

جدول ۲. مزایا و معایب اصلاح‌گرهای سطح در روش اتصال کووالانسی [۸]

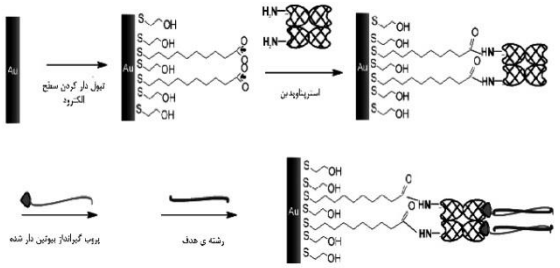
عامل سطحی	نوع واکنش	مزیت ها	معایب
Carboxyl	پیوند شیمیایی بین آمین و DNA	-تثبیت آسان -افزایش میزان تثبیت و هیبریداسیون	-نیاز به تنظیم غلظت، pH، زمان واکنش و قدرت یونی
Aldehyde	پیوند شیمیایی بین آمین و DNA	-پایداری خوب -پیوند های قوی -کاهش تثبیت تصادفی	-مدت زمان طولانی و نیاز به دمای بالا برای هیبریداسیون
Epoxy	پیوند شیمیایی بین هیدروکسیل، آمین و گروه های سولفید	-پایداری خوب -پیوند های قوی -تثبیت آسان	-چگالی پایین DNA تثبیت شده -برهم کنش کند بین DNA و اپوکسی
Isothiocyanate	پیوند شیمیایی بین آمین و DNA	-قابلیت استفاده مکرر -چگالی بالای DNA تثبیت شده -پایداری طولانی مدت	-چگالی بالای هیبریداسیون های غیر خاص -مدت زمان طولانی برای هیبریداسیون
Mercaptosilane	پیوند شیمیایی DNA-SH	-پایداری خوب -پیوند های قوی -قابلیت استفاده مکرر	-تخریب پذیری در محلول های آبی -هیبریداسیون در دماهای بالا
Maleimide	پیوند شیمیایی با گروه سولفید متصل به DNA	-تثبیت سریع -پایداری خوب -قابلیت استفاده مکرر -پیوندهای قوی	-تخریب پذیری در محلول های آبی -برهم کنش های غیر خاص زیاد

۳-۲- برهم‌کنش‌های استرپتاویدین/آویدین-بیوتین

روش دیگری برای اتصال غیرکووالانسی پروب DNA به سطح مبدل، براساس تشکیل کمپلکس استرپتاویدین/آویدین-بیوتین است. بیوتین مولکول کوچکی است که با پیوندی نزدیک به قدرت پیوند کووالانسی به استرپتاویدین یا آویدین متصل می‌شود. از این رو، اتصال بیوتین به استرپتاویدین/آویدین بسیار پایدار و مقاوم در برابر تغییرات دما، pH و حلال‌های آلی است. آویدین و استرپتاویدین می‌توانند چهار محل اتصال یکسان برای بیوتین فراهم کنند. می‌توان از این برهم‌کنش‌ها برای تثبیت پروب DNA به سطوح مبدل استفاده کرد. در این روش انتهای پروب DNA

[1] Nonspecific
[2] Crowding effect
[3] 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)

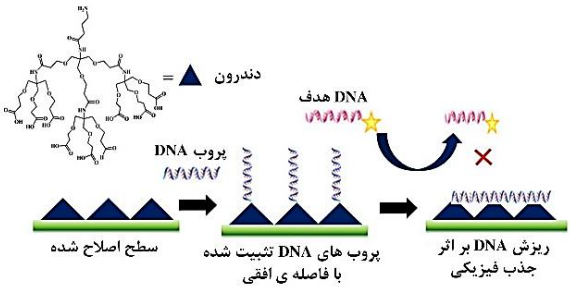
بیوتین‌دار شده در تماس با سطوح اصلاح شده با استرپتاویدین/بیوتین قرار می‌گیرد و در پی اتصال بیوتین به استرپتاویدین/بیوتین روی سطح مبدل تثبیت می‌شود (شکل ۴) [۱۳-۱۱].



شکل ۴. تثبیت DNA از طریق برهم‌کنش استرپتاویدین-بیوتین [۱۳]

۴-۲- تثبیت با استفاده از دندرون‌های مخروطی شکل[1]

با استفاده از دندرون مخروطی شکل، مساله فشردگی پروب‌های تثبیت شده حل می‌شود. فضای بین نوک مولکول‌های شاخه‌دار، فاصله‌ی مناسب بین پروب‌هایDNA را ایجاد می‌کند و پروب‌ها، فضای کافی برای نزدیک شدن و هیبریداسیون با توالی مکمل را نیز پیدا می‌کنند. هم‌چنین پروب‌های DNA با توالی نامناسب، در مرحله‌ی شست‌وشو حذف می‌شوند و از این‌رو اتصالات غیرخاص کاهش می‌یابد [۱۴]. همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است؛ یکی از معایب این روش فرو افتادن پروب‌های تثبیت شده بر روی سطح تراشه است. به‌همین دلیل این روش نیاز به شست‌وشوی زیاد دارد و اعمال دمای بالاتر به ایجاد هیبریداسیون کمک می‌کند. در غیر این‌صورت حساسیت به‌شدت کاهش می‌یابد.



شکل ۵. استفاده از دندرون‌ها برای تثبیت کووالانسی DNA

ایجاد حساسیت و انتخاب پذیری بالا نیازمند حذف جذب‌های غیرِ خاص، جهت‌گیری مناسب و پایداری پروب DNA تثبیت شده است. که با کنترل بر مرحله ی تثبیت امکان‌پذیر است.
در جدول ۳ چالش‌های مرتبط با هریک از روش‌های تثبیت خلاصه شده است.

جدول ۳. مقایسه روش‌های تثبیت DNA روی سطوح عامل‌دار شده

روش تثبیت	نوع برهم‌کنش	مزیت‌ها	معایب
فیزیکی	برهم‌کنش بار- بار	آسان سریع مناسب برای DNA، RNA و PNA روش مستقیم (بدون مولکول‌های پیوند دهنده)	تخریب هنگام تغییر قدرت یونی یا pH جهت‌گیری تصادفی تخریب به وسیله‌ی بافرها مسأله‌ی پدیده‌ی جمعیت و تکرارپذیری پایین
کووالانسی	پیوند شیمیایی	پایداری خوب پیوند های قوی مدت زمان استفاده ی طولانی	نیاز به مولکول‌های پیوند دهنده بازگشت‌ناپذیر و کند مسأله‌ی پدیده‌ی جمعیت تشکیل حوزه‌های متعدد
برهم‌کنش استرپتاویدین/آویدین-بیوتین	برهم‌کنش ویژه استرپتاویدین-بیوتین	جهت‌گیری مناسب عملکرد عالی قابل کنترل برگشت‌پذیر	کند و گران مسأله‌ی پدیده ی جمعیت تکرارپذیری پایین

۳- جمع‌بندی و نتیجه‌گیری

استفاده‌ی بالینی از زیست‌حسگرهای DNA به تثبیت موفقیت‌آمیز پروب DNA روی سطوح مبدل بستگی دارد. متداول‌ترین روش‌های تثبیت، جذب فیزیکی، تثبیت کووالانسی و تثبیت استرپتاویدین/آویدین-بیوتین است. هریک از این روش‌ها مزایا و معایبی دارند. در این مقاله هریک از این روش‌ها مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته‌اند و پرکاربردترین مواد مورد استفاده برای اصلاح سطوح مبدل در نانو زیست‌حسگرهای نوکلئیک اسید نام برده شده است.

۴- منابع

[1] JJ. Gooding, Electroanalysis 17, 1149-1156, (2002).
[2] J.I. Rashid, N.A. Yusof, Sensing and Bio-Sensing Research 16, 19-31, (2017).
[3] A. Sassolas, B.D. Leca-Bouvier, L.J. Blum, Chemical Reviews 1, 109-139, (2008).

[1] Cone-shaped dendron

[4] D. Sethi, A. Kumar, K.C. Gupta, P. Kumar, Bioconjugate Chemistry 11, 2136–2143, (2008).
[5] A.W. Peterson, L.K. Wolf, R.M. Georgiadis, Journal of the American Chemical Society 49, 14601–14607, (2002).
[6] Y. Jung, J.Y. Jeong, B.H. Chung, Analyst 6, 697–701, (2008).
[7] S. Xu, Y. Zhang, K. Dong, J. Wen, C. Zheng, S. Zhao, International Journal of Electrochemical Science 12, 3443-3458, (2017).
[8] S.B. Nimse, K. Song, M.D. Sonawane, D.R. Sayyed, T, Kim, Sensors 12, 22208-22229, (2014).
[9] P.L. Dolan, Y. Wu, L.K Ista, R.L. Metzenberg, M.A. Nelson, G.P. Lopez, Nucleic Acids Research 21, 107-115, (2005).
[10] A. Csaki, R. Möller, W. Straube, J.M. Köhler, W. Fritzsche, Nucleic Acids Research 16, 81-86, (2001).
[11]R. Singh, R. Verma, G. Sumana, A.K. Srivastava, S. Sood, R.K. Gupta, B. Malhotra, Bioelectrochemistry, 86, 30-37 (2012).
[12] H.-E. Lee, Y.O. Kang, S.-H. Choi, International Journal of Electrochemical Science 9, 6793-6808, (2014).
[13] X. Li, J. Guo, Q. Zhai, J. Xia, G. Yi, Analytica Chimica Acta 934, 52-58, (2016).
[14] Z. Li, B. Zhao, D. Wang, Y. Wen, G. Liu, H. Dong, S. Song, C. Fan, ACS Applied Materials and Interfaces 20, 17944-17953, (2014).