

طراحی و ساخت نانوزیست حسگر مبتنی بر فلورسانس برای تشخیص گیاهان تراریخته

مهدی دادمهر^{۱*}، سید مرتضی حسینی^۲، بهناز کروژدهی^۳

۱. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور

۲. دانشیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشگاه تهران

۳. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۲۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۹/۲۱)

Design and fabrication of fluorescence based nanobiosensor for detection of transgenic plants

Mehdi Dadmehr^{1*}, Seyed Morteza Hosseini², Behnaz Korouzhdehi³

1. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Payame Noor University, Iran

2. Associate Professor, Department of Bioengineering, University of Tehran, Iran

3. Ph. D. Student, Department of Biotechnology, University of Tehran, Iran

(Received: Aug. 12, 2015 -Accepted: Nov. 11, 2015)

Abstract

Detection of foreign genes in genetically modified (GM) plants is very important for proving the effectiveness of genetic engineering procedure and determination of GM plants. In the present study a very sensitive and convenient fluorescence nanobiosensor for rapid detection of GM crops based on Fe₃O₄/Au core/shell nanoparticles was developed. Specific site of 35S CaMV, a well studied gene promoter in plant genetic engineering was used as the DNA sequence target. The core/shell Fe₃O₄/Au magnetic nanoparticles were synthesized to utilize their magnetic properties and improve their DNA functionalization. Fe@Au nanoparticles were functionalized by bounding of single stranded DNA (ssDNA) probe through sulfhydryl group at 5' phosphate end. Then complementary target ssDNA were hybridized with immobilized ssDNA probe. Methylene blue was selected as a fluorescence probe. It was shown that methylene blue had significant interaction with hybridized DNA. Upon the addition of the target ssDNA, fluorescence intensity decreased in linear range by concentration of ssDNA from 3×10⁻⁷ to 2.2×10⁻⁹ M with detection limit of 1.2×10⁻¹⁰ M. The nanobiosensor enabled us to detect the transgenic crops through convenient and reliable simple method.

Keywords: Nanobiosensor, Detection of transgenic crops, Promoter, Fluorescence

چکیده

تشخیص و تعیین کمیت دقیق حضور ژنهای خارجی در گیاهان تراریخته ژنتیکی دارای اهمیت زیادی برای اطمینان از اثربخشی روش انتقال ژن و همچنین تعیین تراریخته بودن گیاه مورد نظر دارد. به این منظور در این تحقیق از یک نانوزیست حسگر مبتنی بر فلورسانس برای تشخیص پروموتور ژن خارجی استفاده گردید. ژن مورد بررسی بخش غنی از گوانین پروموتور CaMV 35S تعیین گردید تا برهمکنش مناسبی با فلوروفور متیلن بلو مورد استفاده داشته باشد. ابتدا نانوذرات مغناطیسی با پوشش طلا مورد استفاده قرار گرفت تا از خصوصیات مغناطیسی آنها برای جداسازی ژنهای مورد بررسی و از لایه طلای اطراف آنها برای اتصال تک رشته پروب DNA استفاده گردد. با اضافه نمودن تک رشته‌های هدف مکمل با پروب مورد استفاده نانوزیست حسگر قابلیت شناسایی ژن مورد بررسی در محدوده ۳×۱۰^{-۷} تا ۲/۲×۱۰^{-۹} را با افزایش غلظت پروب نشان داد و حد تشخیص آن معادل ۱/۲×۱۰^{-۱۰} تعیین گردید. با توجه به حد تشخیص مطلوب نانوزیست حسگر مورد استفاده در این تحقیق می‌توان از آن برای بررسی تراریخته بودن گیاهان و بافت‌های گیاهی مورد آزمایش به‌منظور اطمینان از موفق بودن فرایند انتقال ژن و همچنین تمایز گیاه مورد نظر از گیاهان دستکاری نشده ژنتیکی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: نانوزیست حسگر، تشخیص گیاهان تراریخته، پروموتور، فلورسانس.

مقدمه

در سال‌های اخیر پیشرفت در زمینه مهندسی ژنتیک و فناوری DNA نو ترکیب، باعث تولید موجودات تغییر یافته ژنتیکی واجد یک یا چند خصوصیت بهبود یافته شده‌اند. گیاهان زراعی یکی از اهداف مهم در این تغییرات اعمال شده بوده‌اند. با معرفی کردن یک ژن جدید به ژنوم یک گیاه هدف، پروتئین مربوط به آن بیان شده و خصوصیات مربوط به آن در میزبان آشکار می‌شود. این خصوصیات باعث بهبود کمی یا کیفی در گیاه مورد نظر می‌گردد. آزمایش برای تعیین تراریخته بودن یک گیاه اطمینان در خصوص موثر بودن روش انتقال ژن را فراهم می‌آورد. همچنین افزایش تعداد محصولات تراریخته در بسیاری از کشورها منجر به وضع قوانینی در خصوص لزوم تمایز این گیاهان با گیاهان معمولی شده است. لذا توجه زیادی به ابداع و توسعه روش‌های تشخیص قابل اعتماد و سریع به این منظور شده است (Ericson, 2000; Huang *et al.*, 2015; Holst- Jensen *et al.*, 2012). از آنجایی که پروموتور 35S از CaMV و خاتمه دهنده NOS از پلاسمید باکتری آگروباکتريوم مهمترین عناصر شناسایی اکثر گیاهان دست‌کاری شده می‌باشند در روش‌های شناسایی از این توالی‌ها به‌عنوان شاخص ارزیابی استفاده می‌شود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روش مرسوم و متداول برای تشخیص DNA مورد نظر بوسیله پرایمرهای تخصصی آن می‌باشد. اما نظر به برخی محدودیت‌های این روش، تلاش برای یافتن راه‌های جایگزین و مستقیم برای تشخیص دارای اهمیت زیادی می‌باشد. از مهمترین و پرکاربردترین زیست‌حسگرهایی که برای شناسایی واکنش‌های زیستی استفاده شده است زیست‌حسگرهای مبتنی بر خاصیت فلورسانس می‌باشند. یکی از پروب‌های بسیار مورد استفاده برای بررسی در DNA پروب

متیلن بلو می‌باشد که یکی از اعضای خانواده فنوتیازین می‌باشد و می‌تواند به DNA تک رشته‌ای متصل شود اما اختصاصاً با بازهای گوانین واکنش می‌دهد. هنگامی که DNA تک رشته‌ای پروب با تک رشته DNA هدف واکنش می‌دهد به دلیل عدم دسترسی متیلن‌بلو با آنها ساختار جدیدی از اتصال آن با DNA ایجاد می‌شود که به دلیل حضور آن شدت فلورسانس کاهش می‌یابد (Rohs *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002). به دلیل حساسیت بالای روش‌های مبتنی بر فلورسانس و برهمکنش موثر و قابل اندازه‌گیری آنها با DNA اساس روش تشخیص ما در این مطالعه زیست‌حسگر مبتنی بر تغییرات فلورسانس فلوروفور متیلن‌بلو بود تا حضور بخشی از ژن پروموتور CaMV 35S بررسی گردد.

استفاده از نانوذرات برای کاربردهای تشخیصی، بسیار مورد توجه علوم شیمی، بیولوژی، پزشکی و علوم مواد قرار گرفته است که این به دلیل خصوصیات الکترونیکی، نوری و دمایی آنها می‌باشد (Paulose *et al.*, 2003). توجه ویژه‌ای نیز به نانوذرات طلا شده است زیرا دارای نسبت سطح به حجم بالا و شیمی سطح مناسبی برای تثبیت کنترل شده اولیگونوکئوتئیدها می‌باشند (Castaneda *et al.*, 2007). از طرف دیگر، نانوذرات مغناطیسی یکی از امیدبخش‌ترین ابزار برای زیست‌حسگرهای پروتئینی و DNA می‌باشند. نانوذرات مغناطیسی را می‌توان به آسانی و با استفاده از یک آهن‌ربا از فاز مایع جدا نمود و بلافاصله بعد از برداشتن آهن‌ربا آنها را مجدداً در محیط پراکنده کرد. این خصوصیت امکان هدایت فرایند تغییر و هیبرید شدن را امکان‌پذیر نموده و از جذب غیراختصاصی بیومولکول‌ها در سطح تشخیص زیست‌حسگر جلوگیری می‌کند (Loaiza *et al.*, 2008). غیر از سهولت دستکاری و جداسازی بیومولکول‌های متصل شده، نانوذرات مغناطیسی

یافته انجام شد (Zhao et al., 2008). ۵ میلی لیتر از نانوذرات Fe_3O_4 و ۱/۵ میلی لیتر $NH_2OH.HCl$ با ۱۰۰ میلی لیتر ۰/۱۵ TMAOH مولار رقیق شده و در یک ظرف تا دمای ۸۰ درجه گرما داده شدند. سپس ۱۰۰ میلی لیتر سیترات سدیم به محلول اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه به هم زده شد تا OH^- جذب شده با یون های سیترات جایگزین شوند و در نهایت ۴۰ میلی لیتر $HAuCl_4$ ۰/۱٪ به محض رسیدن محلول به نقطه جوش به صورت قطره قطره و هم زدن شدید و تحت گاز آرگون اضافه گردید. مخلوط به مدت یک ساعت دیگر در حالی که سرد می شد هم زده شد. طی کل فرایند دما در ۸۰ درجه سانتی گراد حفظ شد و گاز آرگون برای جلوگیری از دخالت اکسیژن استفاده گردید. رنگ محلول از سیاه به قهوه ای متمایل به قرمز تبدیل شد که به دلیل خصوصیت رنگ نانوذرات دارای پوشش طلا بود.

توالی های DNA مورد استفاده

به دلیل واکنش اختصاصی متیلن بلو با بازهای گوانین، بخشی از تک رشته پرموتر CaMV که غنی از گوانین بود به عنوان پروب انتخاب گردید. به منظور اطمینان از اتصال تک رشته پروب به نانوذرات دارای پوشش طلا، انتهای ۵ آن به صورت تیول دار سفارش داده شد. همچنین تک رشته هدف با توالی مکمل پروب و تک رشته واجد یک نوکلئوتید غیر مکمل و توالی غیر مکمل نیز تهیه گردید.

Probe: 5-SH-(CH₂)₆-CGATGCTCCTCGTGGGTGGGGGTC-3
 Target: 5-GACCCACCCACGAGGAGCATCG-3
 Mismatch: 5-GACCCAACCCACGAGGAGCATCG-3
 Uncomplementary: 5-GGTACCAGGGACACGCACCAGCGA-3

اتصال نانوذرات به DNA پروب

مزیت دیگری نیز دارند که نسبت سطح بالای آنها است که به آنها اجازه می دهد که تعداد زیادی بیومولکول را روی آنها تثبیت نمود که در نهایت منجر به افزایش در سیگنال تشخیص می شود (Palecek et al., 2007). لذا سامانه نانویی مورد استفاده نیز تلفیقی از هر دو نانوذره فوق بود تا از خصوصیات مطلوب هر دو بهره گرفته شود. نانوذرات اکسید فلزی با پوشش طلا سنتز گردید و DNA تک رشته ای مربوط به بخشی از پرموتر ژن 35S CaMV روی آن تثبیت گردید تا تک رشته مکمل خود را از طریق هیبریداسیون شناسایی نماید.

مواد و روش ها

سنتز نانوذرات اکسید آهن

به منظور سنتز نانوذرات Fe_3O_4 از روش هم رسوبی Kang و همکاران (۱۹۹۶) با یک سری تغییرات استفاده شد. ابتدا ۵/۲ گرم $FeCl_3.6H_2O$ ، ۲ گرم $FeCl_2.4H_2O$ و ۰/۸۵ میلی لیتر از HCl (۱۲mol/l) در ۲۵ میلی لیتر آب دیونیزه (گاز زدایی شده با آرگون قبل از استفاده) حل شد. محلول بدست آمده با شدت و به مدت حداقل ۱۵ دقیقه هم زده شد تا نمک های موجود به صورت کامل حل شوند. سپس محلول فوق به صورت قطره قطره با حفظ دمای ۸۰ درجه به ۲۵۰ میلی لیتر $NaOH$ ۱/۵ M اضافه شد. محلول در ابتدا به رنگ زرد کم رنگ و در ادامه به رنگ قهوه ای و نهایتاً سیاه تغییر یافت. نانوذرات Fe_3O_4 به دست آمده به وسیله میدان مغناطیسی از محلول جداسازی شده و در ۲۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه ۳ مرتبه شستشو داده شد و سپس در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل شدند.

سنتز نانوذرات اکسید آهن با پوشش طلا

پوشش طلا به وسیله احیای یون های Au روی سطح Fe_3O_4 با استفاده از روش جوش سیترات تغییر

نتایج و بحث

تعیین خصوصیات نانوذرات Fe_3O_4

احیای پوشش طلا روی نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 باعث شد رنگ سیاه محلول حاوی نانوذرات تبدیل به قهوه‌ای متمایل به قرمز شود (شکل ۱). این تغییر حضور لایه سطحی طلا روی سطح نانوذرات مغناطیسی را اثبات می‌کرد و اینکه SPR این نانوذرات باعث تاثیر در خصوصیات قابل مشاهده نانوذرات گشته است.

به منظور اطمینان از اینکه نانوذرات مغناطیسی بعد از احیای لایه طلا روی آنها همچنان خصوصیات مغناطیسی خود را حفظ نموده‌اند با قرار دادن آهن ربا و ایجاد میدان مغناطیسی اقدام به جداسازی نانوذرات از محلول حاوی آنها نمودیم. همانگونه که در شکل ۱ دیده می‌شود، بعد از القای میدان مغناطیسی نانوذرات به صورت کامل جذب آهن ربا شده و محلول باقیمانده شفاف می‌شود.



شکل ۱. نانوذرات $Fe_3O_4@Au$ تشکیل شده و خاصیت مغناطیسی آنها

آنالیز نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی اندازه و شکل نانوذرات بوسیله تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM قبل از احیای پوشش طلا (شکل ۲-a) و بعد از تشکیل پوشش طلا تهیه شد

روش اتصال نانوذرات دارای پوشش طلا با پروب تک رشته‌ای DNA تیول‌دار در انتهای ۵ بر اساس پروتوکل Zhang و همکاران (۲۰۱۱) با بعضی تغییرات انجام شد. ۱ میلی‌لیتر نانوذرات دارای پوشش طلا به یک میکروتیوب منتقل شدند و سپس در یک میلی‌لیتر محلول Tris-HCl ۰/۰۱ مولار ($pH = 7/4$) سوسپانسیون شدند. ۲۰ میکرولیتر پروب DNA با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به یک میلی‌لیتر نانوذره اضافه گردید و محلول به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه قرار گرفت. پس از عمل‌گرا شدن پروب DNA متصل نشده با استفاده از جداسازی مغناطیسی حذف گردید. پس از آن نانوذرات جدا شده مغناطیسی در ۵ میلی‌لیتر محلول Tris-HCL ($pH = 7/4$) پراکنده شدند.

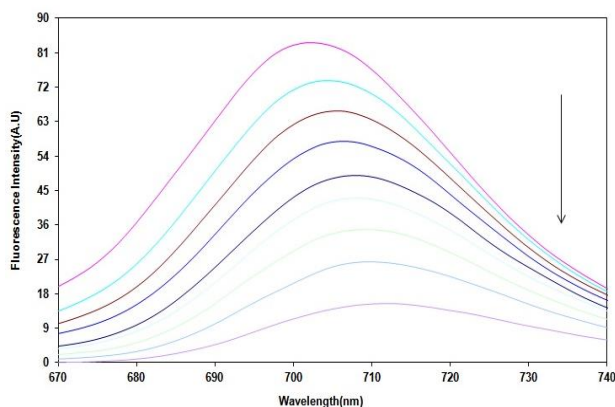
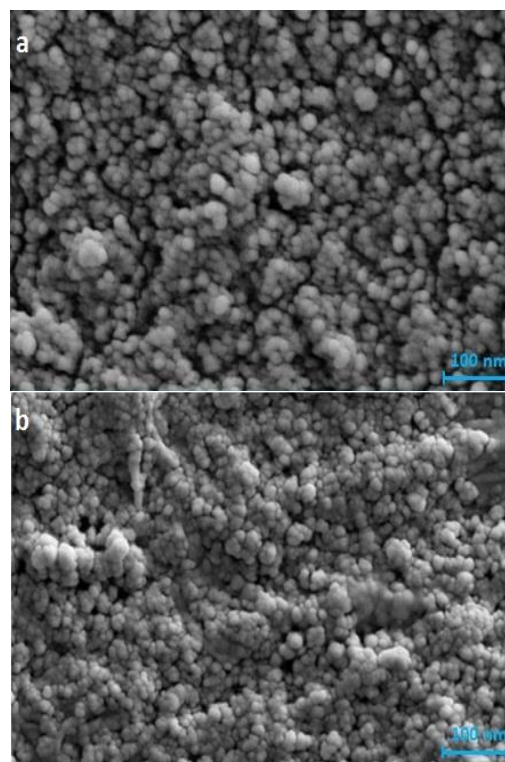
هیبریداسیون و تشخیص فلورسانس

هیبریداسیون از طریق همزدن آرام در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. غلظت‌های مختلف از DNA هدف پروموتور CaMV به ۳۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون نانوذرات عمل‌گرا شده با پروب در ۰/۰۱ مولار و ۰/۲ مولار NaCl اضافه شد و مخلوط حاصله به مدت ۲ ساعت همراه با همزدن آرام انکوبه شد تا به طور کامل مخلوط شوند. بعد از هیبریداسیون DNA، نانوذرات مجدداً پراکنده شدند و با آب و Tris-HCl (۰/۰۱ مولار) دو مرتبه شسته شدند تا الیگونوکلوئوتیدها آزاد حذف شوند. سپس ۵ میکرولیتر متیلن‌بلو با غلظت 1×10^{-6} اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. در نهایت تشخیص فلورسانس هیبریداسیون DNA در طول موج‌های تهییج و نشر به ترتیب ۶۳۰ و ۷۰۰ نانومتر انجام شد.

شکل ۲. آنالیز SEM مربوط به (a) نانوذرات Fe_3O_4 و (b) نانوذرات Fe_3O_4 دارای پوشش طلا هیبریداسیون نانوزیست حسگر با تک رشته هدف پروموتور

برای تعیین اثر هیبریداسیون تک رشته‌های DNA هدف تحت شرایط بهینه و مدت زمان انکوباسیون ۲۰ دقیقه با متیلن‌بلو قرار گرفتند و شدت نشر فلورسانس محلول واکنش پس از اضافه نمودن غلظت‌های مختلف DNA تعیین شد (شکل ۳). طول موج تهییج برابر ۶۳۰ نانومتر و طول موج نشر برابر با ۷۰۰ نانومتر تعیین شد. می‌توان به وضوح مشاهده نمود که شدت فلورسانس به صورت تدریجی با افزایش غلظت توالی مکمل در غلظت‌های 3×10^{-7} تا $2/2 \times 10^{-9}$ منجر به خاموشی معنی‌دار در نشر فلورسانس گردید. کاهش شدت فلورسانس برای غلظت‌های DNA با معادله رگرسیون $\Delta F = 227 + 11/85 \times 10^{15} C$ واحد C، M می‌باشد، ضریب رگرسیون R نمودار خطی ۰/۹۹۸ و حد تشخیص $1/2 \times 10^{-10}$ مولار بود.

(شکل ۲-b). تصاویر بدست آمده نشان می‌داد نانو ذرات دارای شکل تقریباً کروی بوده و میانگین قطر حدود ۲۵ و ۳۰ نانومتر به ترتیب برای Fe_3O_4 و $Fe@Au$ داشتند. افزایش در قطر می‌توانست نه تنها به دلیل پوشش طلا بلکه به علت تجمع نانوذرات Fe_3O_4 دارای پوشش توسط یک لایه طلا مشترک باشد.



شکل ۳. تاثیر غلظت مختلف DNA هدف روی نشر فلورسانس متیلن بلو

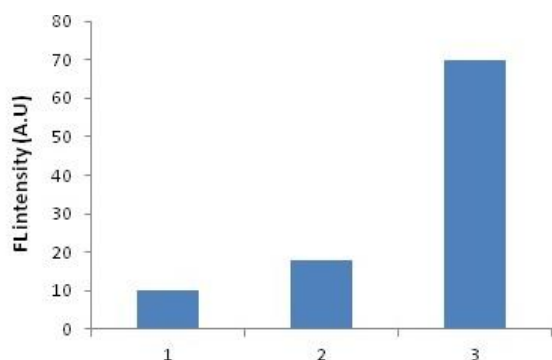
به منظور مطالعه اثرات شرایط مختلف روی نتایج

بهینه سازی نانوزیست حسگر در شرایط مختلف

شکل ۵. اثر زمان انکوباسیون روی نشر متیلن بلو

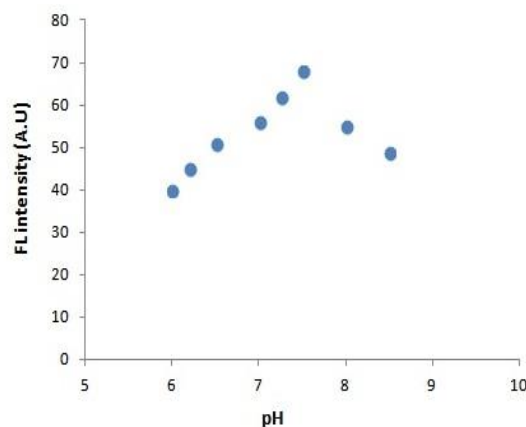
اختصاصیت و انتخاب پذیری تشخیص DNA

به منظور ارزیابی اختصاصیت و انتخاب پذیری نانوزیست حسگر، نانوذرات عملگرا شده با DNA پروب، با توالی‌های مختلف شامل الف) توالی غیرمکمل، ب) توالی دارای تفاوت تک بازی و ج) توالی مکمل در غلظت مشابه 1×10^{-9} هیبرید گردید و نتایج از طریق ارزیابی تغییرات شدت طیف‌های فلورسانس بر اساس حضور توالی‌های مختلف و متیلن بلو (شکل ۶) مقایسه گردید. می توان مشاهده نمود که شدت نشر فلورسانس در حالتی که تک رشته‌های پروب و هدف به صورت غیر هیبرید قرار دارند در بیشترین مقدار می باشد (شکل ۳-۶). پس از اضافه نمودن تک رشته دارای یک باز اختلاف هیبریداسیون جزئی مطابق انتظار باعث کاهش نشر فلورسانس گردید (شکل ۲-۶) و هیبریداسیون کامل پس از اضافه شدن تک رشته مکمل به کمترین میزان نشر رسید (شکل ۱-۶). نتایج به دست آمده نشان داد که انتخاب پذیری نانوزیست حسگر در شرایط مورد بررسی در این تحقیق بسیار بالاست و بیان نمود که اهداف غیر تخصصی نمی‌توانند دخالتی در سیستم تشخیص داشته باشند.

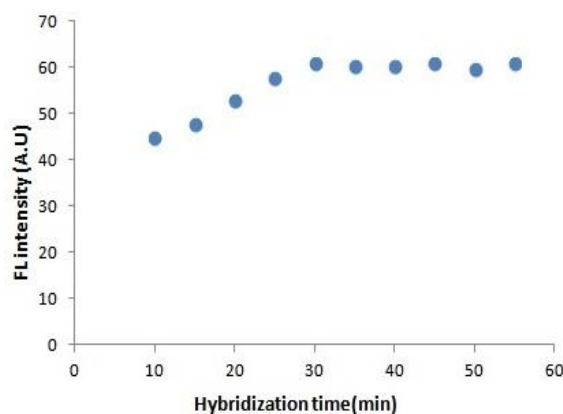


شکل ۶. آزمایش اختصاصیت توالی‌های مختلف غیر مکمل (۳)، با یک باز مختلف (۲) و کاملاً مکمل (۱) روی نشر فلورسانس

اندازه‌گیری، پارامترهای مختلف شامل pH و زمان هیبریداسیون محاسبه گردید. شکل ۴ بیان می‌کند که با افزایش در pH از ۶ تا ۷/۵ شدت فلورسانس متیلن بلو افزایش می‌یابد و وقتی pH بیشتر از ۸ شود و به شرایط بازی برسد بتدریج کاهش می‌یابد. در ادامه آزمایش دیگری به منظور بررسی تاثیر زمان انکوباسیون روی نتایج بدست آمده انجام شد. شکل ۵ نشان می‌دهد که زمان انکوبه شدن برای هیبریداسیون اثر قابل توجهی روی شدت فلورسانس متیلن بلو دارد به نحوی که با افزایش زمان انکوباسیون به ۳۰ دقیقه، فلورسانس افزایش می‌یابد. لذا بر اساس نتایج به دست آمده پارامترها به گونه‌ای تعیین شد که در pH ۷/۵ و زمان هیبریداسیون به مدت ۲۰ دقیقه برای تمامی محلول‌های مورد آزمایش تعیین گردید.



شکل ۴. اثر pH مختلف روی نشر متیلن بلو



DNA تک رشته‌ای این فلوروفور به صورت اختصاصی و عمدتاً به بازهای گوانین موجود در تک رشته متصل می‌شود. پس از انجام هیبریداسیون اتصال بین بازهای فوق با فلوروفور تغییر کرده و باعث القای تغییراتی در ساختار متیلن‌بلو مثل کاهش انعطاف پذیری می‌گردد، که این پدیده منجر به کاهش نشر می‌شود. با توجه به کاهش خطی فلورسانس و ارتباط آن با غلظت‌های مختلف DNA می‌توان به کاربرد این نانوزیست حسگر نه تنها برای تعیین ترا ریخته بودن گیاه مورد بررسی بلکه برای تعیین کمیت نسبی ژن‌های مورد نظر اطمینان حاصل نمود. با مقایسه نتایج بدست آمده با مطالعات انجام شده قبلی برای تشخیص گیاهان ترا ریخت از طریق زیست حسگر (Calogianni *et al.*, 2006, Qiu *et al.*, 2013) نانوزیست حسگر ارائه شده در این تحقیق نه تنها دارای حد تشخیص بهتری بوده بلکه نیاز به انجام PCR برای تکثیر قطعات ژنی مورد بررسی و همچنین استفاده از ساختارهای پیچیده چهار وجهی DNA ندارد. علاوه بر این، نانوزیست حسگر معرفی شده امکان جداسازی قطعات DNA تک رشته‌ای هدف، از میان انبوه رشته‌های DNA مورد آزمایش به دلیل خاصیت مغناطیسی نانوذرات را فراهم می‌کند و همچنین مزایای هزینه بسیار کم و صرفه‌جویی در زمان را نیز دارد.

سپاسگزاری

از دانشگاه پیام نور برای حمایت مالی تحقیق انجام شده، تشکر و قدردانی می‌گردد.

آزمایش نمونه حقیقی

به منظور بررسی کارایی نانوزیست حسگر در مورد نمونه‌های حقیقی، گیاه گوجه فرنگی ترا ریخته که بوسیله ناقل واجد پروموتور CaMV دست‌ورزی ژنتیکی گردیده بود مورد آزمایش قرار گرفت. بدین منظور گیاه گوجه فرنگی اولیه و غیر ترا ریخت به عنوان کنترل منفی و گیاه ترا ریخته به عنوان کنترل مثبت در شرایط یکسان بررسی گردید. نتایج بدست آمده بازایی حدود ۸۰ درصد با نتایج آزمایشگاهی ذکر شده را نشان داد که نشان‌دهنده کارایی نانوزیست حسگر بوده و امکان استفاده از آن را در مطالعات بعدی فراهم می‌کند.

نتایج و بحث

به منظور بررسی دقیق ترا ریخته بودن گیاهان و یا بافت‌های گیاهی مورد آزمایش نانوزیست حسگر جدید مبتنی بر فلورسانس طراحی گردید. ابتدا نانوذرات اکسید فلزی دارای خاصیت مغناطیسی سنتز گردید. در ادامه پوشش طلا روی سطح نانوذرات احیا گردید تا امکان اتصال تک رشته پروب دارای انتهای سولفیدریل به آن فراهم شود. DNA مورد بررسی بخشی از پروموتور CaMV 35S انتخاب گردید که پروموتور معمول در فرایند انتقال ژن می‌باشد. سپس قطعات مکمل هدف در غلظت‌های مختلف برای واکنش با نانوزیست حسگر در حضور غلظت ثابت متیلن‌بلو اضافه گردید. با افزایش میزان غلظت DNA هدف، نشر فلورسانس روند کاهشی نشان داد. غلظت ژن هدف مورد بررسی در محدوده 3×10^{-7} تا $1/2 \times 10^{-10}$ خطی بوده و حد تشخیص $1/2 \times 10^{-10}$ تعیین گردید. این پدیده را می‌توان این گونه بیان نمود که با اضافه نمودن متیلن‌بلو به محلول حاوی

REFERENCES

- Castaneda MT, Merkoci A, Pumera M, Alegret S (2007) Electrochemical genosensors for biomedical applications based on gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* 22: 1961-1967.
- Holst-Jensen A, Ronning SB, Lovseth A, Berdal KG (2003) PCR technology for screening and quantification of

- genetically modified organisms (GMOs). *Anal. Bioanal. Chem.* 375: 985-993.
- Holst-Jensen A, Bertheau Y, De Loose M, Grohmann L, Hamels S, Hougs L (2012) Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnol. Adv.* 30: 1318-1335.
- Huang L, Zheng L, Chen Y, Xue F, Cheng L, Adeloju SB (2015) A novel GMO biosensor for rapid ultrasensitive and simultaneous detection of multiple DNA components in GMO products. *Biosens. Bioelectron.* 66: 431-437.
- Kang YS, Risbud S, Rabolt JF, Stroeve P (1996) Synthesis and characterization of nanometer-size Fe₃O₄ and γ -Fe₂O₃ particles. *Chem. Mater.* 8: 2209-2211.
- Loaiza OA, Campuzano S, Pedrero M, Pividori MI, Garcia P, Pingarron JM (2008) Disposable magnetic DNA sensors for the determination at the attomolar level of a specific Enterobacteriaceae family gene. *Anal. Chem.* 80: 8239-8245.
- Palecek E and Fojta M (2007) Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing. *Talanta*, 74: 276-290.
- Paulose M, Varghese OK, Grimes CA (2003) Synthesis of gold-silica composite nanowires through solid-liquid-solid phase growth. *J. Nanosci Nanotechnol.* 3: 341-346.
- Rohs R, Sklenar H, Lavery R, Roder B (2000) Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: a modeling study. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 2860-2866.
- Yang W, Ozsoz M, Hibbert DB, Gooding JJ (2002) Evidence for the direct interaction between methylene blue and guanine bases using DNA-modified carbon paste electrodes. *Electroanalysis*, 14: 1299-1302.
- Zhang Y, Wang Z, Jiang W (2011) A sensitive fluorimetric biosensor for detection of DNA hybridization based on Fe/Au core/shell nanoparticles. *Analyst*, 136: 702-707.
- Zhao X, Cai Y, Wang T, Shi Y, Jiang G (2008) Preparation of alkanethiolate-functionalized core/shell Fe₃O₄@Au nanoparticles and its interaction with several typical target molecules. *Anal. Chem.* 80: 9091-9096.
- Kalogianni D, Koraki T, Christopoulos T, Ioannou P (2006) Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms. *Biosens. Bioelectron.* 21: 1069-1073.
- Qiu B, Zhang Y, Lin Y, Lu Y, Lin Z, Wong K, Chen G (2013) A novel fluorescent biosensor for detection of target DNA fragment from the transgene cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Biosens. Bioelectron.* 41: 168-171.