

طیف‌نگاری ساختار DNA به کمک رنگدانه‌های مصنوعی با استفاده از نور LED

سید میلاد هاشمی، سمیه سلمانی و محمدحسین مجلس‌آرا*

دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۱۷ / پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹

آزمایشگاه فوتونیک، دانشکده فیزیک، دانشگاه خوارزمی، تهران

*مسئول مکاتبات: majlesara@khu.ac.ir

چکیده. واضح است که دستگاه‌های تشخیص غلظت DNA در زمینه‌های ژنتیک و زیستی و بیوتکنولوژی کاربرد زیادی دارند. بر این اساس، تعدادی دستگاه مشابه با نور لیزر طراحی شده است که معایب آن قیمت بالا و استفاده از مقادیر قابل ملاحظه از نمونه می‌باشد. دستگاه طراحی شده با نور LED کار می‌کند که هزینه ساخت این دستگاه را بسیار ارزان‌تر می‌کند. مقادیر DNA استفاده شده در این دستگاه بسیار کم و در حدود چند میکرولیتر می‌باشد و اندازه‌گیری سریع و کوچک و قابل حمل بودن آن نیز از امتیازات این دستگاه می‌باشد. داده‌های خروجی از این دستگاه به صورت ولتاژ بر حسب زمان و تبدیل فوریه آن، یعنی تبدیل فرکانسی ثبت می‌شود. از نمودارهای فرکانسی بدست آمده می‌توان با استفاده از قانون بیرلامبرت به غلظت نسبی DNA و سنجش ویروس‌ها و اندازه‌گیری میزان آسیب به DNA و کاربردهای بسیار دیگر پی برد. با استفاده از این دستگاه، غلظت DNAهای رنگ شده با سه رنگینه مختلف توسط دستگاه فلورومتر اندازه‌گیری شد.

واژه‌های کلیدی. رنگدانه، فلورومتر، فرکانس، غلظت DNA

DNA structure spectroscopy by synthetic pigments using LED lighting

Seyed Milad Hashemi, Somayeh Salmani and Mohammad Hossein Majles Ara *

Received 08.07.2015 / Accepted 09.03.2016

Photonic Lab, Faculty of Physics, Kharazmi University, Tehran, Iran

*Correspondent author: majlesara@khu.ac.ir

Abstract. It is clear that DNA concentration and biological detection devices have many applications in the fields of genetics and biotechnology. For this goal, some similar devices have been designed working with the laser light which the disadvantages of them are high prices and the use of significant amounts of sample volume. But this designed device which works with LED light has very cheap manufacturing cost. The amounts of DNA used in this device are very low, about a few micro-liters and measurement of small, fast and portable it is also the advantages of these devices. The Data recorded as voltage versus time and the Fourier transform the frequency domain. From the frequency curve, by using the Byrlambert it is possible to obtain the relative concentrations of DNA, viruses and assays measuring DNA damage and many other applications. By use of this device, the concentration of DNA colored with three different pigments was measured.

Keywords. pigments, fluormeter, frequency, concentration, DNA

مقدمه

در سال‌های اخیر، تعیین غلظت DNA در بررسی‌های زیستی بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Alberti & Mergny, 2003). بر همین مبنا، دستگاه‌های اندازه‌گیری لیزری در سال‌های اخیر طراحی و ساخته شده‌اند که بسیار گران قیمت می‌باشند (Yan et al., 2002). بدین منظور، دستگاه فلورومتر طراحی شده ابزاری ضروری در مطالعه‌ی DNA می‌باشد که نسبت به دستگاه‌های مشابه بسیار ارزان می‌باشد. روش این دستگاه از این واقعیت بهره می‌گیرد که یک مولکول رنگینه فلورسنت دهنده به وسیله‌ی منبع نوری که می‌تواند انرژی خود را به یک مولکول رنگ فلورسنت پذیرنده بفرستد، تحریک می‌شود و این مولکول رنگ دوم دارای یک باند جذب است که با باند گسیل رنگ اول تداخل می‌کند. میزان انرژی انتقال بین دو مولکول قویاً تابع فاصله‌ی بین آن‌هاست (Simmel & Yurke, 2002)، بنابراین تشخیص یا تغییر در فلورسانس رنگ‌دهنده و یا تغییر در فلورسانس رنگ‌پذیرنده یا هر دو به ما اجازه می‌دهد، به تغییرات پیکربندی در سازه‌های نانو که به رنگ متصل می‌شوند، پی ببریم. دستگاه اندازه‌گیری فلورسانس شرح داده شده در این تحقیق با عبور از فیلترهای خاص، اجازه می‌دهد تنها انرژی (FRET) که در آن تنها فلورسانس رنگ دهنده است را اندازه‌گیری کنیم (Mao et al., 1999)، با استفاده از نمودارهای استاندارد می‌توان در تشخیص تفاوت DNAهای سلول‌های مختلف به عنوان مثال DNAهای سالم و بیمار و کنترل کیفی DNA و سنجش میزان بیان ژن و اندازه‌گیری میزان آسیب به DNA پی برد (Yurke et al., 2000).

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از سه نوع رنگدانه‌ی سایبرگرین برای رنگ‌آمیزی DNA استفاده شده است که این رنگدانه از رنگدانه‌های مصنوعی است که به رنگ سبز می‌باشد و دارای وزن مولکولی $509 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{g}$ و $73 \text{ C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{S}^+$ است. همچنین سایبرگرین حداکثر جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر و حداکثر انتشار در طول موج ۵۲۰ نانومتر را داراست. نمونه‌های آماده شده عبارتند از: ۱- DNA رنگ‌آمیزی شده با مولکول رنگ سایبرگرین از نوع ۵۸ که از سلول‌های گیاهی استخراج شده است که دارای ضریب مولار ۲/ و غلظت ۴۴۰ میکرومولار می‌باشد؛ ۲- DNA رنگ‌آمیزی شده با مولکول رنگ سایبرگرین از نوع d6 که از سلول‌های گیاهی استخراج شده است که دارای ضریب مولار ۲/ و غلظت ۱۸۴ میکرومولار می‌باشد؛ ۳- DNA رنگ‌آمیزی شده با مولکول رنگ سایبرگرین از نوع مولوئیکا که دارای ضریب مولار ۲/ و غلظت ۲۱۲ میکرومولار می‌باشد.

چیدمان آزمایشگاهی

فلورومتر مبتنی بر LED دارای چهار بخش اصلی می‌باشد: ۱- سیستم انتشار نور (LED و مدار کنترل)؛ ۲- آشکارساز نور سیستم (فیلتر و فوتودیود و مدار تقویت کننده و مبدل آنالوگ به دیجیتال)؛ ۳- سیستم ارسال اطلاعات (مدار کنترل، آی سی DAQ و مبدل سریال به USB)؛ ۴- سیستم پردازش سیگنال الکترونیکی که در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- قسمت الکترونیکی دستگاه تعیین غلظت DNA.

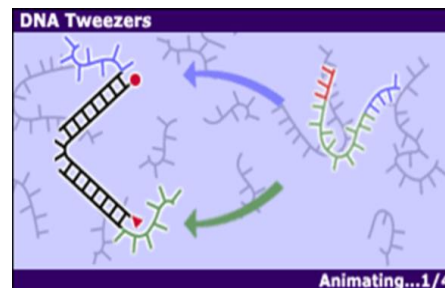
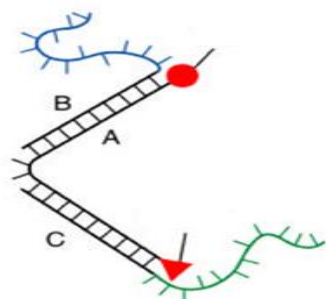
Fig. 1. The electrical part of device for determination of DNA concentration.

می‌کند و می‌تواند اطلاعات را با سرعت به پورت USB کامپیوتر منتقل نماید. اطلاعات توسط میکرو با سرعت ۳۸۴۰۰ بیت بر ثانیه از مبدل ارسال می‌شود. آخرین بخش دستگاه فلورومتر سیستم پردازش سیگنال الکترونیکی است که اطلاعات به وسیله پورت USB کامپیوتر توسط نرم‌افزار نوشته شده تحت زبان شی گرای ویژوال بیسیک دریافت می‌شود و به صورت RealTime نمایش داده می‌شود و در واحدهای زمانی مشخص ۱ ثانیه از اطلاعات دریافتی تبدیل فرکانس FFT گرفته می‌شود و در نرم‌افزار به نمایش در می‌آید. نرم‌افزار امکان بزرگ‌نمایی در مقدار و زمان را دارد و امکان ذخیره اطلاعات به صورت داده و عکس به صورت ولتاژ بر حسب زمان و فرکانس را در اختیار کاربر قرار می‌دهد.

روش انجام آزمایش

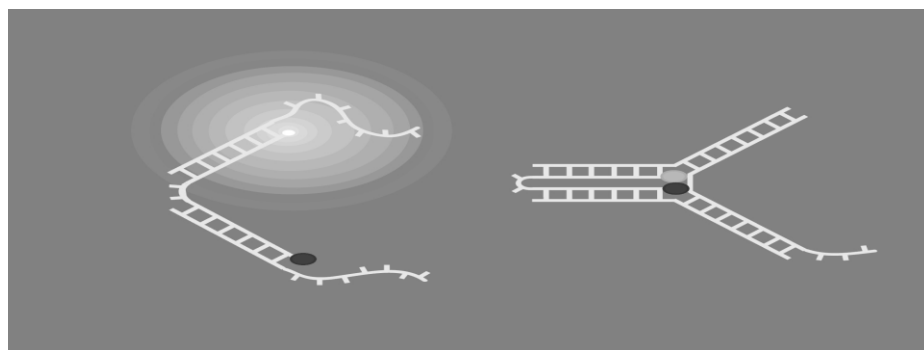
در ابتدا طیف نور گسیلی از دیود LED که دارای طول موج ۲۵۰nm می‌باشد توسط میکرو کنترل به صورت امواج پالسی ۱۰ تا ۲۰ هرتز تبدیل می‌شود. سپس با گذراندن این طیف از فیلتر دارای باند گذار متناسب با طیف برانگیختگی مولکول رنگ مورد نظر به نمونه برخورد می‌کند. نمونه DNA قبلاً توسط مولکول رنگ مورد نظر رنگ می‌شود. که این مولکول رنگ مطابق شکل ۲ به هارپین DNA متصل می‌شود (Stryer & Haugland, 1967)، این مولکول رنگ‌ها توسط طیف گسیلی برانگیخته می‌شوند و از خود نور ساطع می‌کنند. همان‌طور که فاصله این دو کاهش می‌یابد، فلورسنت دهنده به صورت گسیل دفع می‌شود (Heller & Morrison, 1995). تغییر در فلورسانس ایجاد شده، تغییر در جابجایی بین رنگ‌ها را می‌دهد که نشان‌دهنده حرکت مولکول‌ها در DNA می‌باشد. اندازه‌گیری فلورسانس ساطع شده از رنگ متصل به رشته‌های DNA به طور موثر نشان‌دهنده فاصله بین رنگ‌ها می‌باشد (Niemeyer & Adler, 2002).

سیستم انتشار نور دستگاه فلورومتر شامل قسمت‌های زیر می‌باشد: ۱- LED: برای تولید نور از LEDهای دارای توان ۱ وات و ولتاژ ۳ ولت و جریان ۳۰۰ میلی آمپر و طول موجهای مختلف استفاده می‌شود؛ ۲- مدار کنترل: میکرو کنترل وظیفه‌ی ایجاد پالس‌های نوری بین ۱۰ تا ۲۰ هرتز را دارد که برای روشن و خاموش کردن LED استفاده می‌شود و نیز از تداخل این امواج با نور حالت ثابت و هارمونیک جلوگیری می‌کند. همچنین قطعات سیستم آشکارساز به شرح زیر است: ۱- فیلتر: از فیلترهای دارای باند گذار ۴۹۰ نانومتر و ۵۲۰ نانومتر برای تحریک بهینه‌ی نور LED قبل و بعد از برخورد به نمونه‌ی آزمایش استفاده می‌شود؛ ۲- فوتودیود: فوتودیود که وظیفه دریافت فلورسانس ساطع شده از نمونه را دارد از نوع RadioShack می‌باشد؛ ۳- مدار تقویت کننده: از آی سی AD633 جهت تقویت سیگنال ضعیف دریافتی از فوتودیود تا ۳۰ برابر و کاهش نویز همراه سیگنال استفاده می‌شود؛ ۴- مبدل آنالوگ به دیجیتال: از آی سی AD7816 جهت تبدیل سیگنال آنالوگ فوتودیود به دیجیتال استفاده می‌شود. این آی سی توانایی نمونه‌برداری تا سرعت ۲۰۰ کیلوهرتز و دقت ۱۲ بیت را دارد. قسمت سوم این دستگاه سیستم ارسال اطلاعات است که شامل ۱- مدار کنترل: میکرو کنترل Atmega16 ساخت شرکت Atmel که با فرکانس ۸ مگا هرتز و ولتاژ ۵ ولت در این مدار استفاده شده که وظیفه دریافت اطلاعات دیجیتال از فوتودیود و ارسال این اطلاعات به کامپیوتر را دارد؛ ۲- آی سی DAQ: در این مدار جهت جمع‌آوری داده‌ها و نیز به خاطر کم کردن هزینه‌ها و بالا بردن سرعت پردازش از حافظه داخلی میکرو که ۱۰۲۴ بایت می‌باشد، استفاده می‌شود. اطلاعات به صورت نرم‌افزاری در صدم ثانیه توسط میکرو دریافت و در این حافظه انباشته و جهت ارسال به کامپیوتر آماده می‌شود؛ ۳- مبدل سریال به USB: جهت ارسال اطلاعات به کامپیوتر از پورت سرعت بالای USB استفاده می‌شود اما قبل از ارسال اطلاعات نیاز است که اطلاعات سریال میکرو به USB تبدیل شود. جهت انجام این تبدیل از مبدل Serial to USB، FT232 ساخت شرکت FTDI استفاده شده است. این مبدل ۱۰۲۴ بیت گنجایش ذخیره اطلاعات را دارد و از پروتکل‌های USB1 و USB2 پشتیبانی



شکل ۲- نحوه اتصال مولکول رنگها به ساختار DNA.

Fig. 2. The style of connection between pigment molecules to DNA structure.



شکل ۳- انتشار نور فلورسانت توسط مولکول رنگینه.

Fig. 3. The fluorescent beam propagation by pigment molecule.

دست آمده به صورت مستقیم به سطح فلورسانس مشخص شده بستگی دارد (Smith et al., 1992).

سپس این اطلاعات توسط آی سی DAQ جمع آوری شده و توسط مبدل سریال به USB به منظور پردازش اطلاعات توسط نرم افزار نوشته شده به زبان برنامه نویسی شی گرای ویژوال بیسیک به کامپیوتر فرستاده می شود. این اطلاعات در این نرم افزار به صورت ولتاژ بر حسب زمان و تبدیل فوریه آن به صورت فرکانسی نمایش داده می شود. تبدیل فوریه نوعی تبدیل است که یک تابع را بصورت توابع پایه ای سینوسی که هر کدام در مقادیری ضرب شده اند، نشان می دهد. اگر بردار X را مقادیر یک سری زمانی در نظر بگیریم، که $X(t)$ مقدار مشاهده شده در زمان t است، تبدیل فوریه بر روی این بردار، مقادیر آن را از

شکل ۳ نشان می دهد که فلورسانس دهنده تابعی از فاصله بین مولکول فلورسانس می باشد. فلورسانس گسیلی از نمونه با عبور از فیلتر دارای باند گذار متناسب با طیف انتشار مولکول رنگینه مورد نظر منتشر می شود. فلورسانس گسیلی توسط سیلیکون فوتودیود جذب می شود. سیگنال خروجی از فوتودیود توسط آمپلی فایر تقویت شده و مقداری از نویز اپتیکی آن گرفته می شود. سپس توسط مبدل آنالوگ به دیجیتال از حالت آنالوگ به دیجیتال تبدیل شده سپس سیگنال خروجی از مبدل با سیگنال خروجی که به صورت مستقیم از LED دیود به مدار کنترل می آید، تداخل می کند. این امر به این دلیل می باشد که طیف زمینه ی نور LED از طیف گسیلی از نمونه ی DNA کسر شود؛ زیرا فقط طیف فلورسانس حاصل از نمونه برای ما اهمیت دارد و نشان دهنده فلورسانس DNA مربوطه می باشد. این سیگنال به-

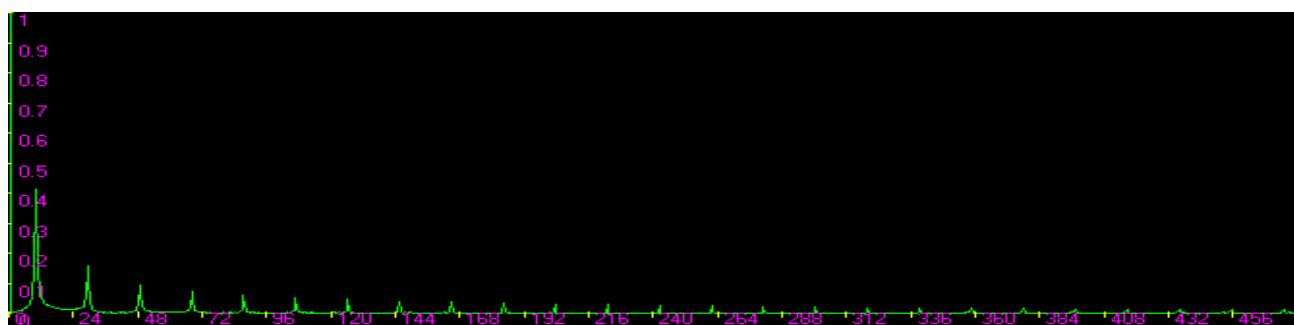
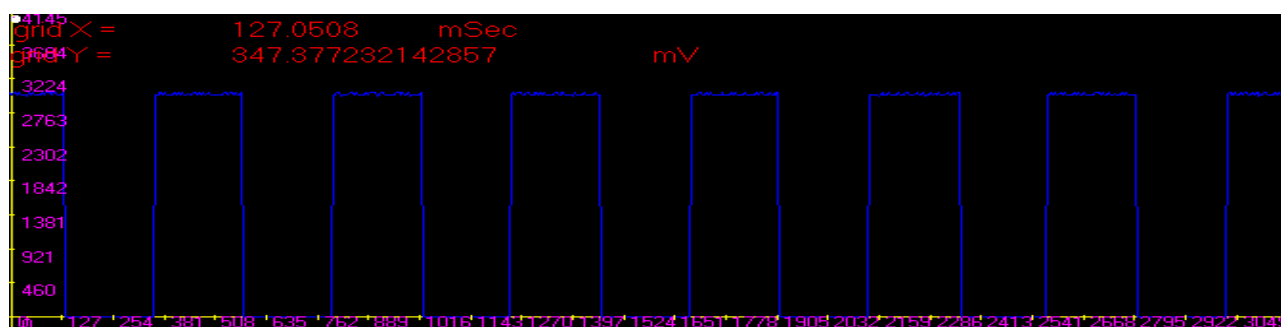
نور تابیده شده و I شدت یا توان نور منتقل شده است. برطبق این رابطه میزان جذب در یک فرکانس مشخص، مستقیماً متناسب با غلظت ماده و طول آن است. نسبت دامنه فرکانس یا ولتاژ بدست آمده توسط سری فوریه متناسب است با نسبت شدت قبل و بعد از برخورد با نمونه می‌باشد. با داشتن ضریب جذب مولار DNA از طول سلول حاوی نمونه ی DNA می توان غلظت نمونه DNA را تعیین نمود.

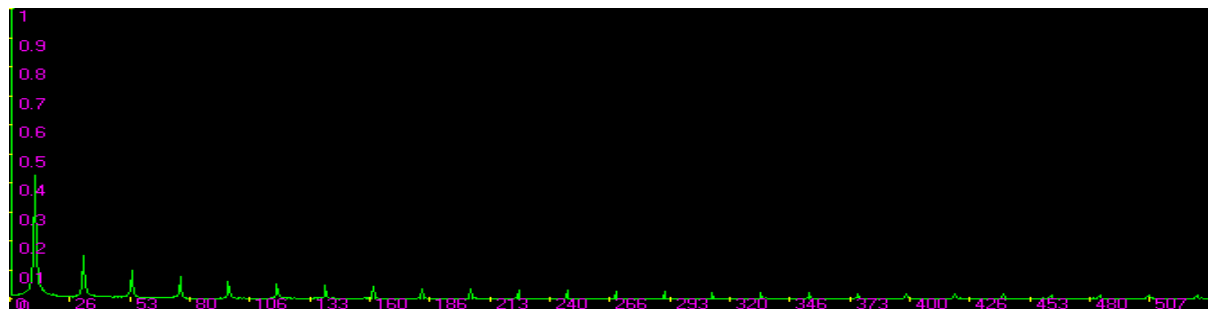
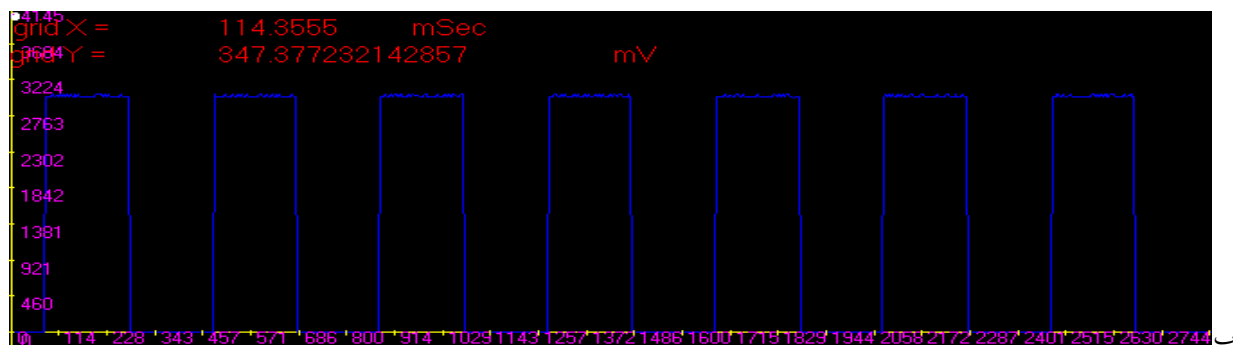
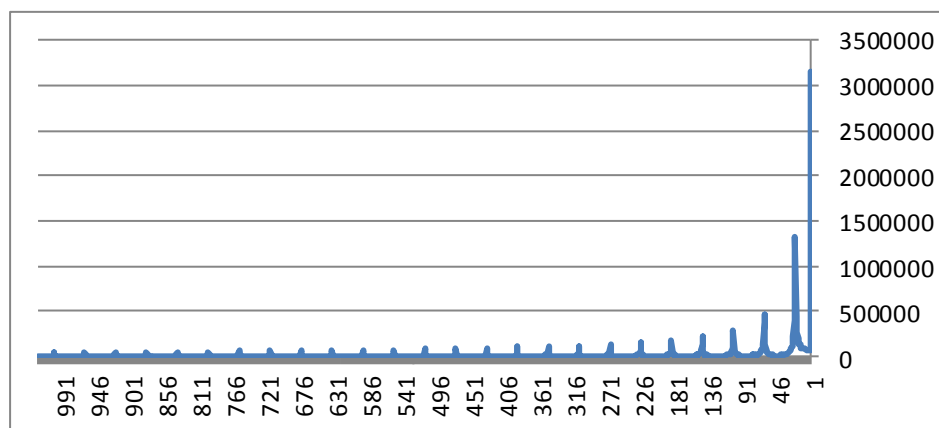
نتایج و بحث

همان‌طور که بیان شد DNA رنگ آمیزی شده با مولکول رنگ سایبرگرین از نوع ۵۸ که از سلول های گیاهی استخراج شده است، دارای ضریب مولار ۰/۲ و غلظت ۴۴۰ میکرومولار می‌باشد. با قرار دادن پارامترهای $I = 1300000$ ، $I_0 = 1400000$ ، $\epsilon = 0.2$ و $L = 0.365 \text{ mm}$ با جایگزاری در فرمول $A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{I_0}{I} = -\epsilon c L$ می‌آید.

دامنه زمانی به دامنه‌ی فرکانسی منتقل می‌کند. ضرایب بدست آمده از تبدیل فوریه به گونه‌ای مرتب شده قرار می‌گیرند به طوری که ضرایب پر اهمیت در سمت چپ و ضرایب کم اهمیت‌تر در سمت راست قرار می‌گیرند. بنابراین پر اهمیت‌ترین ضریب در $X(0)$ و کم اهمیت‌ترین ضریب در $X(N-1)$ ذخیره شده است. هرچه یک ضریب پر اهمیت‌تر باشد، بدان معنی است که آن ضریب حاوی اطلاعات مهم‌تری (کل‌تری) از بردار X می‌باشد.

از نمودارهای فرکانس و دامنه فرکانس به دست آمده می‌توان با استفاده از قانون بیر لامبرت غلظت نسبی DNA مورد نظر را به دست آورد. طبق قانون لامبرت، در غلظت ثابت با افزایش طول ماده، میزان نور جذب شده به تناسب افزایش می‌یابد. طبق قانون بیر نیز میزان جذب ماده تابع غلظت اجزای ماده می‌باشد. ترکیب این دو قانون تحت قانون بیر-لامبرت بیان می‌شود که رابطه آن به صورت $A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{I_0}{I} = -\epsilon c L$ بیان می‌شود که در آن A میزان جذب T ضریب انتقال، ϵ ضریب جذب مولار (که تابع ساختار شیمیایی ماده ی جاذب می باشد)، L طول مسیر عبور نور یا ضخامت ماده جاذب، C غلظت ماده جاذب، I شدت



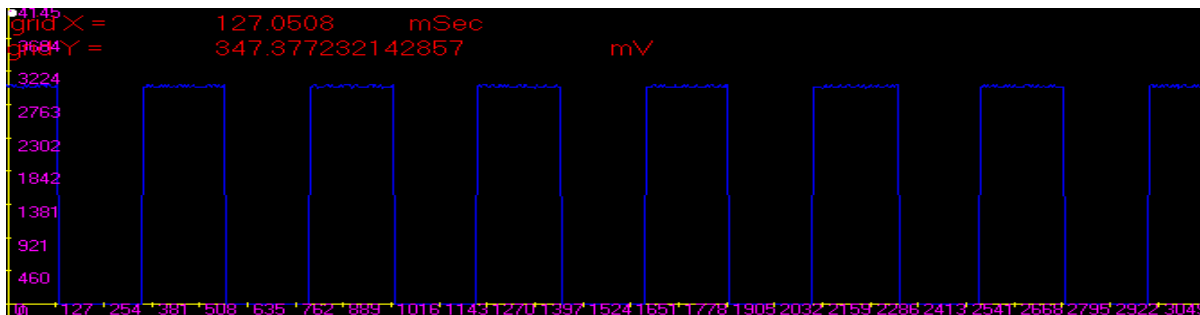


شکل ۴- نمودار طیف ولتاژ بر حسب زمان و دامنه ولتاژ حالت الف) بدون ماده، ب) با ماده.

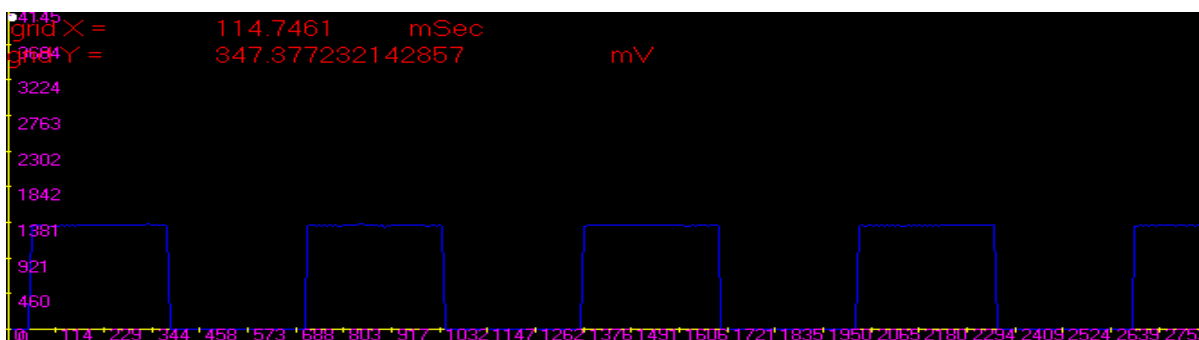
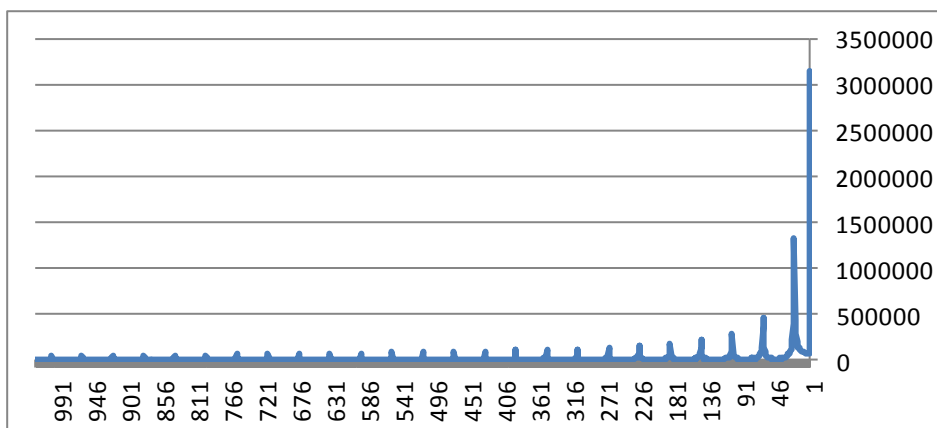
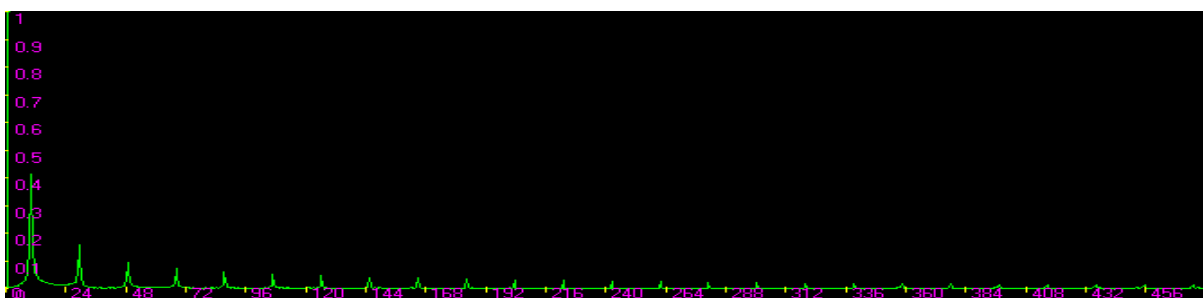
Fig. 4. The plot of voltage spectrum versus of time and amplitude for (a) without sample and (b) with sample.

فرمول $A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{I_0}{I} = -\epsilon c L$ ، $c = 183/38 \mu\text{m}$ به دست می آید.

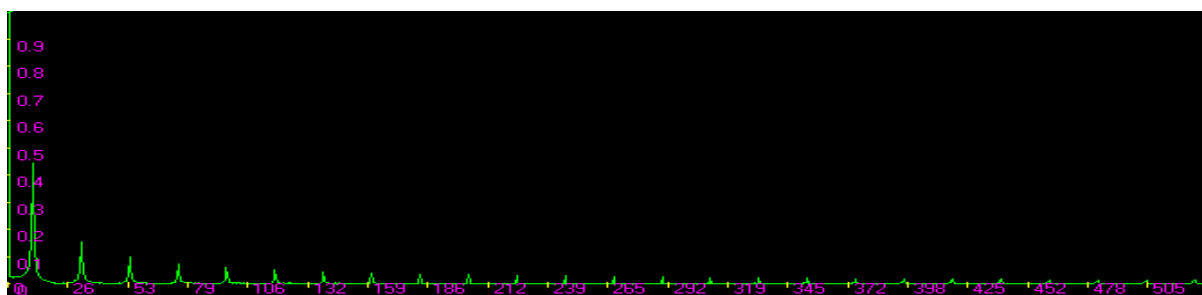
در ادامه DNA رنگ آمیزی شده با مولکول رنگ سایبرگرین از نوع d6 که از سلول های گیاهی استخراج شده است، دارای ضریب مولار ۲/ و غلظت ۱۸۴ میکرومولار می باشد. $I_0 = 1400000$ ، $\epsilon = 0.2$ و $L = 365 \text{ mm}$ و با جای گذاری در

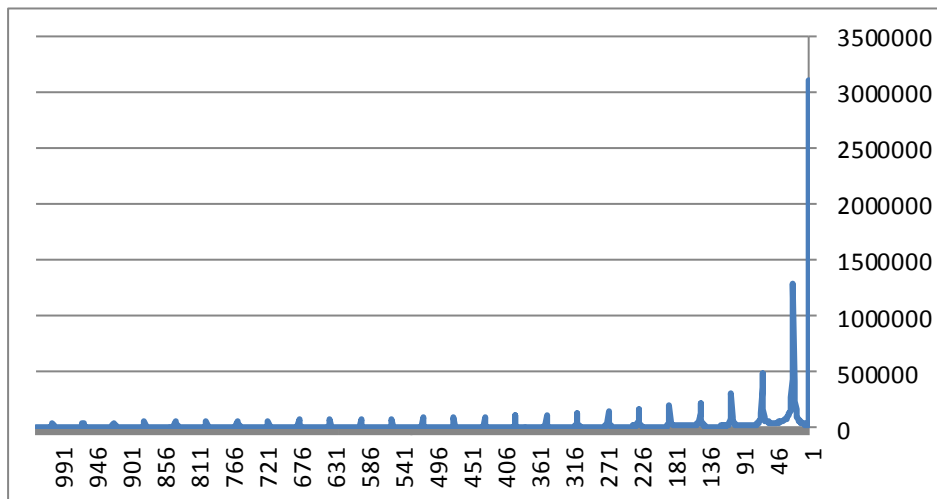


الف



ب



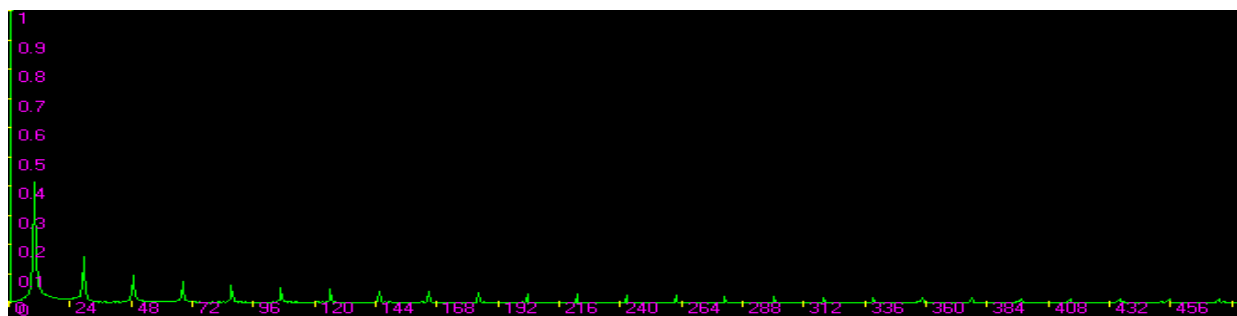
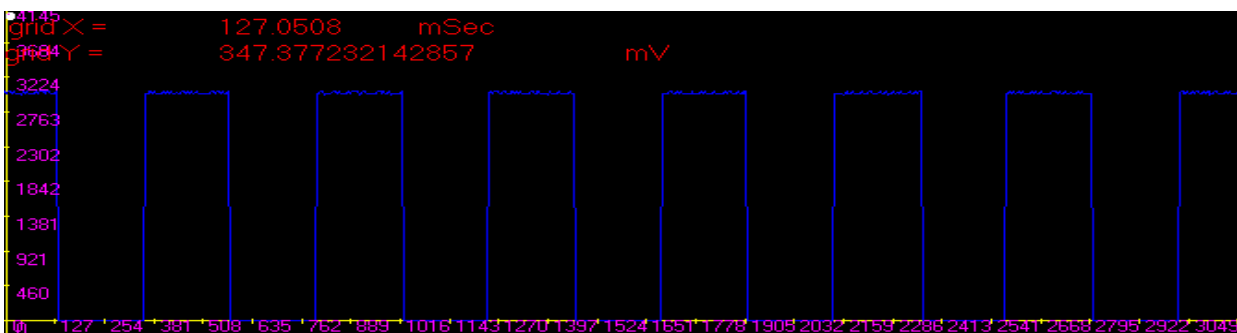


شکل ۵- نمودار طیف ولتاژ برحسب زمان و دامنه ولتاژ حالت الف) بدون ماده، ب) با ماده.

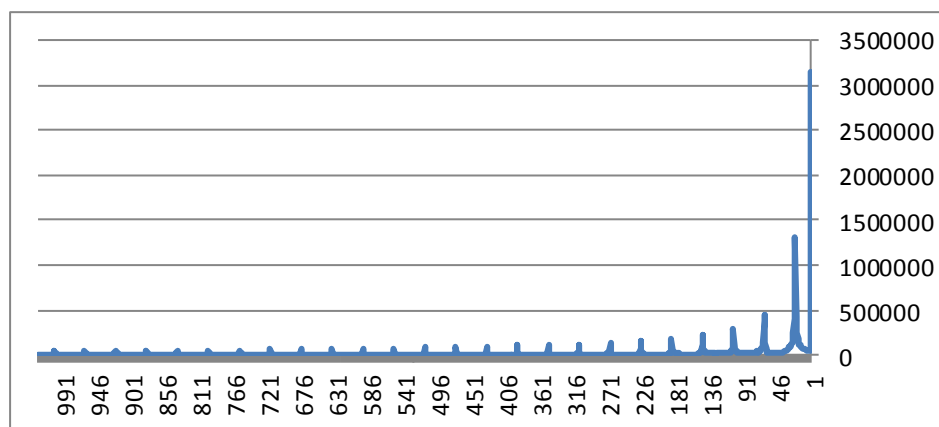
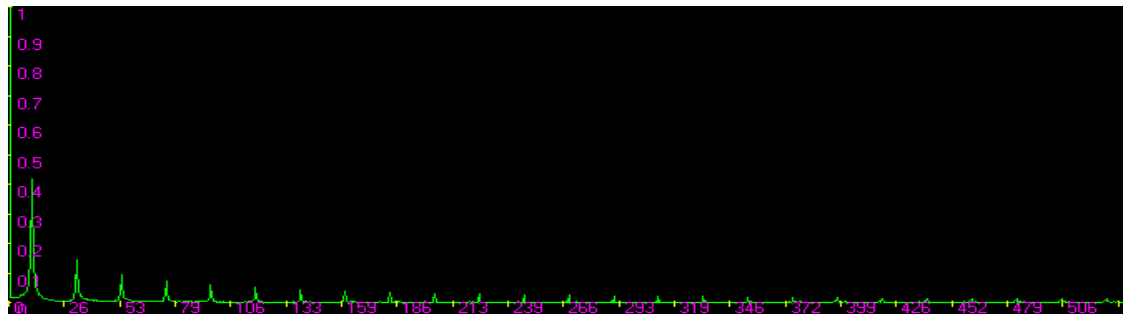
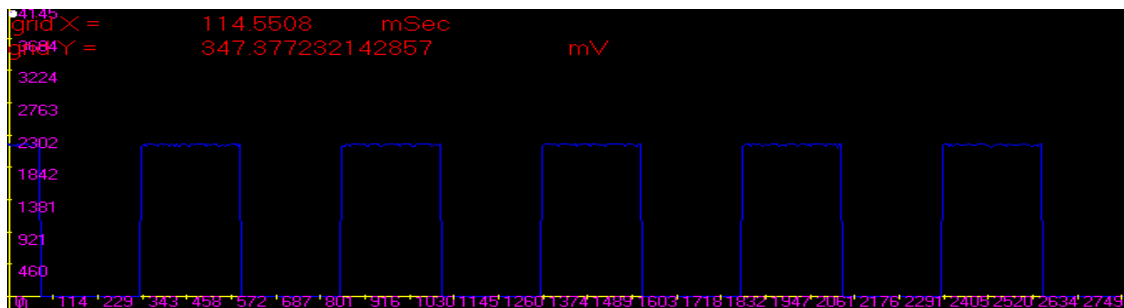
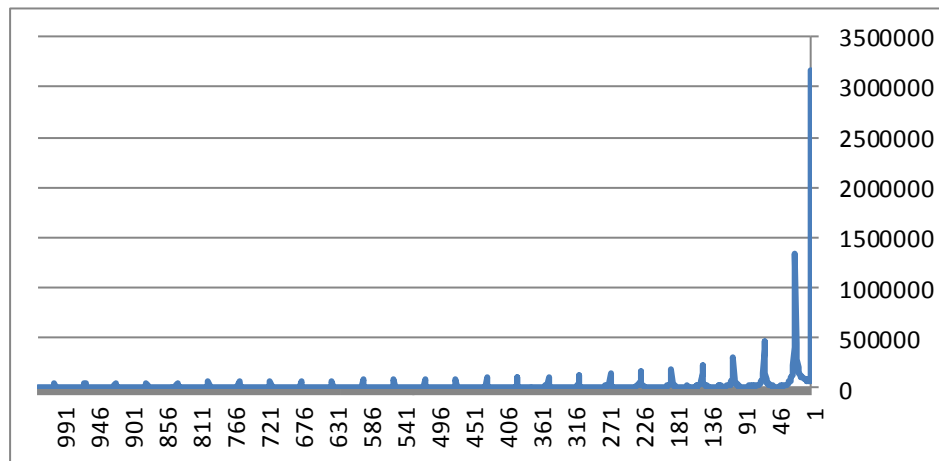
Fig. 5. The plot of voltage spectrum versus of time and amplitude for (a) without sample and (b) with sample.

و $L = 365 \text{ mm}$ با جای‌گزاری در فرمول
 $A = \log \frac{I_0}{I} = -\epsilon c L$ ، $c = 211.95 \mu\text{m}$ به‌دست
 می‌آید.

در نهایت نیز DNA رنگ‌آمیزی شده با مولکول رنگینه
 سایبرگرین از نوع مولوثیکا که از سلول‌های گیاهی استخراج
 شده است، می‌باشد که دارای ضریب مولار ۰/۲ و غلظت ۲۱۲
 میکرومولار می‌باشد. $I_0 = 1400000$ ، $I = 1351000$ ، $\epsilon = 0.2$



الف



شکل ۶- نمودار طیف ولتاژ بر حسب زمان و دامنه ولتاژ حالت الف) بدون ماده، ب) با ماده.

Fig. 6. The plot of voltage spectrum versus of time and amplitude for (a) without sample and (b) with sample.

نتیجه گیری نهایی

که در تشخیص تفاوت DNAهای سلولهای مختلف به عنوان مثال DNAهای سالم و بیمار و کنترل کیفی DNA و سنجش میزان بیان ژن و اندازه گیری میزان آسیب به DNA و کاربردهای بسیار دیگر کاربرد دارد.

در این پروژه طیف نگاری طراحی و ساخته شد که از نور LED برای تحریک نمونه ها استفاده می کند که بسیار ارزان قیمت تر و کاراتر از نمونه های مشابه می باشد. غلظت DNA را می توان به صورت مستقیم یا با استفاده از نمودارهای استاندارد تعیین کرد

References

Alberti, P. and Mergny, J.L. 2003. DNA duplex-quadruples exchange as the basis for a nanomolecular machine. – PNAS 100: 1569-1573.

Heller, M.J. and Morrison, L.E. 1985. In Rapid detection and identification of infectious agents. – Academic Press, New York. pp: 245-256.

Mao, C., Sun, W., Shen, Z. and Seeman, N.C. 1999. A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA. – Nature 297: 144-146.

Niemeyer, C. and Adler, M. 2002. Nanomechanical devices based on DNA. – Angew. Chem. Int. Ed. 41: 3779-3783.

Simmel, F.C. and Yurke, B. 2002. A DNA-based molecular device switchable between three distinct mechanical states. – Appl. Phys. Lett. 80: 883-885.

Smith, S.B., Finzi, L. and Bustamante, C. 1992. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. – Science 258: 1122-1126.

Stryer, L. and Haugland, R.P. 1967. Energy transfer: a spectroscopic ruler. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58: 719-726.

Yan, H., Zhang, X., Shen, Z. and Seeman, N.C. 2002. A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology. – Nature 415: 62-65.

Yurke, B., Turberfield, A.J., Mills, Jr., A.P., Simmel, F.C. and Neumann, J.L. 2000. A DNA fuelled molecular machine made of DNA. – Nature 406: 605-608.

Hashemi, S.M., Salmani, S. and Majles Ara, M.H. 2016. DNA structure spectroscopy by synthetic pigments using LED lighting. – Nova Biologica Reperta 2: 312-321.

هاشمی، س.م.، سلمانی، س. و مجلس آرا، م.ح. ۱۳۹۴. طیف نگاری ساختار DNA به کمک رنگدانه های مصنوعی با استفاده از نور LED. – یافته های نوین در علوم زیستی ۲: ۳۲۱-۳۱۲.