بیستمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک ایران
و ششمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران
۸ تا ۱۰ بهمن ماه۱۳۹۲ - دانشگاه صنعتی شیراز

طیف نگاری ساختار *DNA* به کمک رنگدانه های مصنوعی با استفاده از نور *LED*

سید میلاد هاشمی زاده، سمیه سلمانی و محمد حسین مجلس آرا

آزمایشگاه فوتونیک، دانشکده فیزیک، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

چکیده - دستگاه فلورومتر ابزاری ضروری در مطالعه ی DNA می باشد. اساس روش این دستگاه از این واقعیت بهره می گیرد که یک مولکول رنگ فلورسنت دهنده به وسیله ی منبع نوری که می تواند انرژی خود را به یک مولکول رنگ فلورسنت پذیرنده بفرستد, تحریک می شود و این مولکولرنگ دوم دارای یک باند جذب است که با باند گسیل رنگ اول تداخل می کند. بنابراین تشخیص یا تغییر در فلورسانس رنگ دهنده و یاتغییردرفلورسانس رنگ پذیرنده یا هر دو به ما اجازه می دهد که به تغییرات پیکربندی در سازه های نانو که به رنگ متصل می شوند, پی ببریم.

کلید واژه: رنگدانه , فلورومتر, DNA , LED

"The Spectrometry structure of the DNA with dye Tetrachloro-Fluorescein by Using LED lighting"

SeyedMiladHashemiZade, SomayehSalmani,MohamadHosseinMajlesAra

Photonics lab, Department of Physics, Kharazmi University, Tehran, Iran

Abstract- Fluorometer device is an indispensable tool for the study of DNA. This method takes advantage of the fact that a fluorescent molecule by a light source that can send some energy to an acceptor molecule and a fluorescent dye, is stimulated and The second dye molecule has an absorption band that is interfering with the first color band emission. Therefore, diagnosis or change in color or fluorescence changes in the fluorescence of the acceptor dye, or both, allows us to change the configuration of the nanostructures that are connected to colors.

Keywords: Pigment ,Fluorometer , DNA , LED

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-20]

مقدمه:

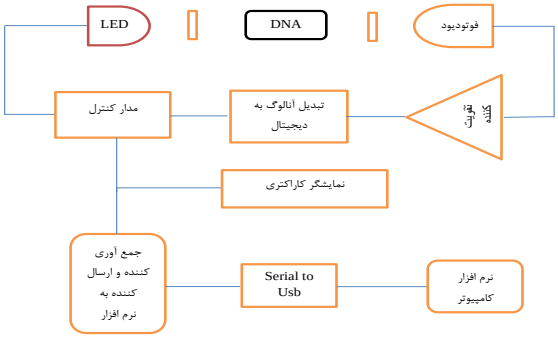
دستگاه فلورموتر ابزاری ضروری در مطالعه ی DNA می باشد که نسبت به دستگاه های مشابه بسیار ارزان می باشد. اساس روش این دستگاه از این واقعیت بهره می گیرد که یک مولکول رنگ فلورسنت دهنده به وسیله منبع نوری که می تواند انرژی خود را به یک مولکول رنگ فلورسنت پذیرنده بفرستد, تحریک می شود. میزان انرژی انتقال بین دو مولکول قویا تابع فاصله ی بین آنهاست[۱].بنابراین تشخیص یا تغییر در فلورسانس رنگ دهنده و یا تغییر در فلورسانس رنگ پذیرنده یا هر دو به ما اجازه می دهد که به تغییرات پیکربندی در سازه های نانو که به رنگ متصل می شوند, پی ببریم دستگاه اندازه گیری فلورسانس شرح داده شده در اینجا به ما اجازه می دهد فقط انرژی (FRET) که در آن تنها فلورسانس رنگ دهنده است را اندازه گیری کنیم, چون که از فیلترهای خاص عبور داده می شوند[۲]. این دستگاه امکان بررسی DNA مبتنی بر فناوری نانو یا عملکرد انرژی (FRET) بر اساس آزمایشات بیولوژی را در دانشگاه فراهم می کند [۳].

چیدمان آزمایشگاهی:

در این آزمایش از دو جعبه کوچک و بزرگ که جعبه ی کوچک برای تعبیه کردن LED دیود و فوتودیود و فیلترها و DNA و جعبه ی بزرگ برای ایجاد فضای تاریک برای جلوگیری از ایجاد نویزهای اپتیکی موجود در فضای اطراف استفاده شده است.

شکل ۱: جعبه استفاده شده و سیستم الکترونیکی در دستگاه فلورومتر

فلورموتر مبتنی بر LED دارای چهار بخش اصلی می باشد:۱. سیستم انتشار نور (LED و مدار کنترل). ۲. آشکارساز نور سیستم(فیلتر و فوتو دیود 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 شکل شماتیکی این دستگاه در شکل نشان داده شده است[۴].



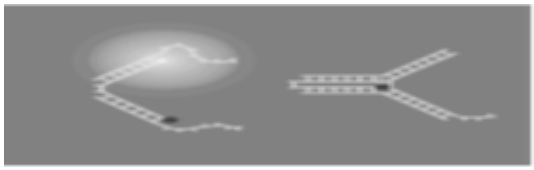
شکل۲: شکل شماتیکی دستگاه مبتنی بر LED

نحوه ی عملکرد دستگاه فلورموتر مبتنی بر LED

در ابتدا طیف نور گسیلی از LED دیود که دارای طول موج ۲۵۰nm می باشد توسط میکروکنترل به صورت امواج پالسی ۱۰ تا ۲۰ هرتز تبدیل می شود. سپس با گذراندن این طیف از فیلتر دارای باند گذار متناسب با طیف برانگیختگی مولکول رنگ مورد نظر به نمونه برخورد می کند نمونه DNA قبلا توسط مولکول رنگ مورد نظر رنگ آمیزی شده است.که این مولکول رنگ مطابق شکل به هارپین DNA متصل می شود[۵].

شکل ۳: نحوه ی اتصال مولکول رنگ ها یه ساختار هارپین DNA

این مولکول رنگ ها توسط طیف گسیلی برانگیخته می شوند و مطابق شکل از خود نور ساطع می کنند[۶].



شکل ۴: انتشار نور فلورسانت توسط مولکول رنگ

همان طور که فاصله ی این دو کاهش می یابد, فلورسنت دهنده به صورت گسیل دفع می شود.[۷]

اندازه گیری فلورسانس ساطع شده از رنگ متصل به رشته های DNAبه طور موثر نشان دهنده ی فاصله ی بین رنگ هاست[۸].شکل بالا نشان می دهد که

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-20]

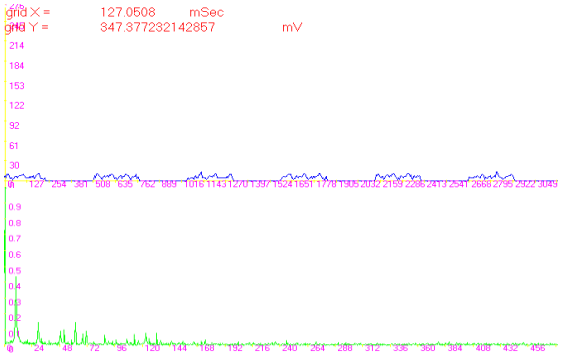
فلورسانس دهنده تابعی از فاصله ی بین مولکول فلوئورسانس می باشد. فلورسانس گسیلی از نمونه با عبور از فیلتر دارای باند گذار متناسب با طیف انتشار مولکول رنگ مورد نظر منتشر می شود. فلورسانس گسیلی توسط سیلیکون فوتودیود جذب می شود. سیگنال خروجی از فوتودیود توسط آمپلی فایر تقویت شده و مقداری از نویز اپتیکی آن گرفته می شود. سپس توسط مبدل آنالوگ به دیجیتال از حالت آنالوگ بهدیجیتال 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 طیفگسیلی از نمونه ی DNA کسر شود زیرا فقط طیف فلورسانس حاصل از نمونه برای ما اهمیت دارد و نشاندهنده ی فلورسنت DNA مربوطه میباشد.

این سیگنال بدست آمده به صورت مستقیم به سطح فلورسانس مشخص شده بستگی دارد[۹].

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 ویژیوال بیسیک به کامپیوتر فرستاده می شود. این اطلاعات در این نرم افزار به صورت ولتاژ بر حسب زمان و تبدیل فوریه ی آن به صورت فرکانسی نمایش داده می شود. در کامپیوتر و بخصوص در پردازش سیگنال معمولاً از تبدیل فوریه‌ی گسسته (DFT) استفاده می‌شود. 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.

نتایج تجربی

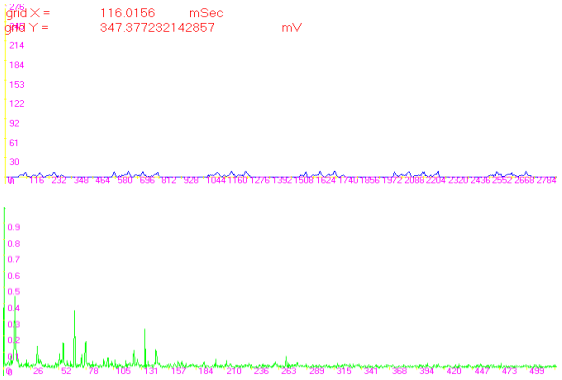
DNA رنگ آمیزی شده با مولکول رنگ کربوکسی فلورسین از مولکول های گلبول سفید استخراج شده که دارای بیماری مخرب عصبی ALS می باشد.DNA رنگ آمیزی شده با مولکول رنگ Big Dye از مولکول های گولبول سفید استخراج شده که دارای بیماری Parkinson disease می باشد.DNA رنگ آمیزی شده با مولکول رنگ سایبرگرین از سلول های TM که دارای بیماری گلوکوم می باشد, استخراج شده است. ابتدا در سیستم انتشار نور LED دیود آبی استفاده شد و با اتصال فیلتر ۴۸۵ نانومتر به دیود آبی باعث برخورد طیف های ۴۸۵ نانومتر به فوتو دیود شدیم. پس از گذشت ۳ دقیقه طیف ولتاژ بر حسب زمان و تبدیل فوریه آن,فرکانس را ثبت کردیم. ولتاژ بر حسب میلی ولت و زمان بر حسب میلی ثانیه و فرکانس بر حسب هرتز و دامنه ی فرکانس بر حسب میکرو ولت می باشد.



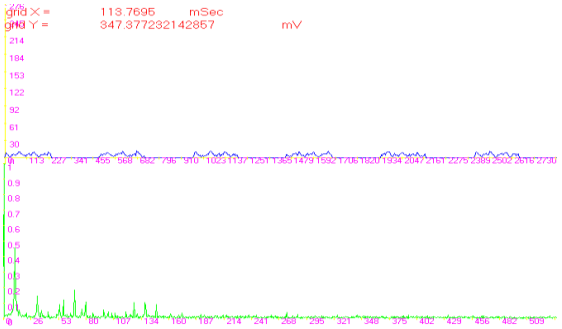
شکل ۵: نمودار طیف ولتاژ بر حسب زمان و فرکانس بعد از ۳ دقیقه

سپس DNA رنگ آمیزی شده با مولکول رنگ Big Dyeرا در دستگاه قرار داده و فیلتر ۵۱۵ نانومتر را نیز به فوتو دیود متصل کردیم مولکول رنگ BigDye دارای مولکول رنگ کربوکسی فلورسین و سایبرگرین می باشد. نور آبی LEDدیود دارای طول موج بین ۴۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر می باشد.کربوکسی فلورسئین حداکثر جذب در طول موج ۴۹۷ نانومتر و حداکثر انتشار در طول موج ۵۱۴ نانومتر را داراست.سایبرگرین حداکثر جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر و حداکثر انتشار در طول موج ۵۲۰ نانومتر را داراست. با عبور این طیف نور از فیلتر ۴۹۵ نانومتر فقط طیف مورد نظر به ماده برخورد می کند. و چون طیف نور برخوردکننده به ماده با طیف تحریک مولکول رنگ BigDye متناسب است باعث ساطع شدن فلورسانس می شود این فلورسانس با عبور از فیلتر ۵۱۵ نانومتر که متناسب با طیف انتشاری مولکول رنگ مورد نظر می باشد،به فوتودیود بخورد می کند. سپس داده های بدست آمده به صورت طیف فرکانس و ولتاژ را پس از ۳ دقیقه ثبت کردیم. سپس DNA رنگ آمیزی شده با مولکول رنگ سایبرگرین را در دستگاه قرار دادیم و نتایج را با شرایط قبل ثبت کردیم

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-20]

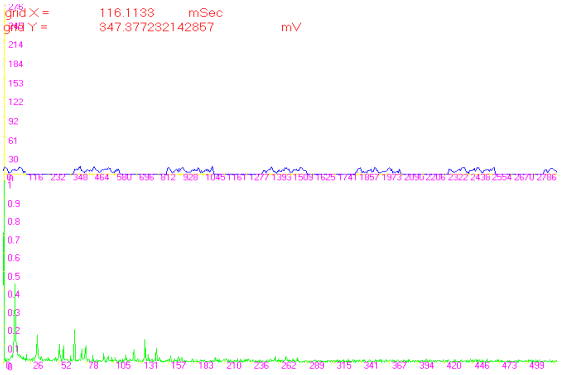


شکل ۶: نمودار طیف ولتاژ بر حسب زمان و فرکانس بعد از ۳ دقیقه



شکل ۷: نمودار طیف ولتاژ بر حسب زمان و فرکانس بعد از ۳ دقیقه

سپس DNA رنگ امیزی شده با مولکول رنگ کربوکسی فلورسین را در دستگاه قرار دادیم و نتایج را مطابق شرایط قبل ثبت کردیم



شکل ۸: نمودار طیف ولتاژ بر حسب زمان و فرکانس بعد از ۳ دقیقه

سپس فیلتر ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر را در دستگاه قرار دادیم و با DNAهای مختلف آزمایش را تکرار کردیم اما طیفی مشاهده نشد. زیرا طیف نور آبی بین ۴۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر می باشد و با عبور از فیلتر ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر، به دلیل مطابق نبودن رنج های طیفی، تمام طیف های موجود حذف می شود. از نمودارهای فرکانس و دامنه ی فرکانس بدست آمده می توان با استفاده از قانون بیر لامبرت غلظت نسبی DNAمورد نظر را بدست آورد.

طبق قانون لامبرت، در غلظت ثابت با افزایش طول ماده، میزان نور جذب شده به تناسب افزایش می یابد. طبق قانون بیر نیز میزان جذب ماده تابع غلظت اجزای مادهمی باشد.

ترکیب این دو قانون تحت قانون بیر-لامبرت بیان می شود که رابطه ی آن به صورت $A = \log\frac{1}{T} = \log\frac{I.}{I} = -\varepsilon cL$ که در آن A میزان جذب T ضریب انتقال، ε ضریب جذب مولار (که تابع ساختار شیمیایی ماده ی جاذب می باشد)، Lطول مسیرعبور نوریا ضخامت ماده ی جاذب، C غلظت ماده ی جاذب، I. شدت نور تابیده شده وIشدت یا توان نور منتقل شده است که بر طبق این رابطه میزان جذب در یک فرکانس مشخص، مستقیما متناسب با غلظت ماده و طول آن است. نسبت دامنه ی فرکانس یا ولتاژ بدست آمده توسط سریه فوریه متناسب است با نسبت شدت قبل و بعد از برخورد با نمونه می باشد. با داشتن ضریب جذب مولار DNA و طول کاوت حاوی نمونه ی DNA می توان غلظت نمونه ی DNA را تعیین نمود

منابع

[1]. Alberti, P., Mergny, J-L: DNA duplex-quadruples exchange as the basis for a nanomolecular machine. PNAS 100, 1569-1573 (2003).
[2].Yan, H., Zhang, X., Shen, Z., Seeman, N.C.: A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology. Nature 415, 62-65 (2002).
[3].Simmel, F.C., Yurke, B.: A DNA-based molecular device switchable between three distinct mechanical states. Appl. Phys. Lett. 80, 883-885 (2002).
[4].Mao, C., Sun W., Shen, Z., Seeman, N.C.: A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA. Nature 297, 144-146 (1999).
[5].Yurke, B., Turberfield, A.J., Mills, Jr., A.P., Simmel, F.C. and Neumann, J.L.: A DNAfuelled molecular machine made of DNA. Nature.406, 605–608 (2000).
[6].Stryer, L. &Haugland, R. P. Energy Transfer: A Spectroscopic Ruler. Proc. Natl. Acad. Sci. USA58, 719-726 (1967).
[7].Heller, M. J. & Morrison, L. E. in Rapid Detection and Identification of Infectious Agents (Kingsbury, D. T. &Falkow, S., Eds.) pp. 245-256, Academic Press, New York (1985).
[8].Niemeyer, C., Adler, M.: Nanomechanical Devices Based on DNA. Angew.Chem. Int. Ed. 41, 3779-3783 (2002).
[9].Smith, S. B., Finzi, L. & Bustamante, C. Direct Mechanical Measurements of the Elasticity of Single DNA Molecules by Using Magnetic Beads. Science 258, 1122-1126 (1992).

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-20]