

کاربرد نانوسنسورهای گرافنی در توالی سنجی DNA

افشان شیرکوند^۱
محمد اسماعیل زیبایی^۳

خلاصه

تلاش برای کشف مشخصه‌های گوناگون سیستم‌های زیستی مهم‌ترین محرک توسعه تحقیقات در زمینه علوم پزشکی و زیست‌مولکولی به حساب می‌آید. آنالیز سریع، حساس، دقیق و مقرون به صرفه مولکول‌های زیستی اهمیت ویژه‌ای در تشخیص و درمان‌های بالینی دارند. پیشرفت‌های اخیر در تکنولوژی توالی‌سنجی DNA سبب تحول گسترده‌ای در علوم و تحقیقات زیستی-پزشکی شده است. با پیدایش و توسعه نانومواد، استفاده از این ساختارها در آشکارسازی مولکول‌های زیستی و تشخیص ساختارهای آن‌ها مطرح و مورد توجه واقع شده است. پیدایش گرافن به عنوان یک نانوماده جدید دارای ساختار کربنی با ضخامت تک‌اتم به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد الکترونی، مکانیکی، حرارتی و اپتیکی، افقی جدید در تحقیقات علوم مختلف زیستی-پزشکی و تولید بیوسنسورهای آنالیز زیست‌مولکول‌ها گشوده است. در این مقاله به مروری بر توسعه نانوسنسورهای گرافنی و کاربرد آن‌ها در توالی‌سنجی DNA اشاره می‌شود.

۱. گروه لیزر پزشکی، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران
۲. دانشجوی دکتری فوتونیک، پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی
۳. استادیار فوتونیک، پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی

واژه‌های کلیدی: توالی‌سنجی DNA، نانوسنسور، گرافن

نویسنده مسئول: افشان شیرکوند، تلفن: ۶۶۴۹۲۵۷۲
پست الکترونیک: a_shirkavand@sbu.ac.ir

مقدمه

بودن اطلاعات توالی‌سنجی DNA و ژن‌ها برای پیش‌بینی، تشخیص سرطان و انتخاب درمان بهینه برای بیماران دلالت دارند [۷].

روش‌های توالی‌سنجی DNA:

نسل اول^۲ یا روش‌های کلاسیک-توالی‌سنجی از دهه ۱۹۷۰ هنگامی که اولین روش‌های آنزیمی آنالیز مولکول‌های بیولوژیکی معرفی شدند، شروع گردید. این روش‌های توالی‌سنجی بر پایه آزمایشات شیمیایی، آنزیمی و غیر آنزیمی استوار بودند. اگرچه تکنولوژی Sanger در این نسل به مدت حدود ۳۰ سال ابزار تحقیقات توالی‌سنجی بود [۵]، اما به دلیل توان عملیاتی محدود و هزینه بالای این روش‌ها انجام مطالعات زیاد میسر نشد [۱۷]. پس از نسل اول یا توالی‌سنجی کلاسیک، تکنولوژی‌های نوین به عنوان نسل جدید (NGS)^۳ توالی‌سنجی گسترش یافتند [۱۸]. روش‌های نوظهور نسل دوم نیز عمدتاً بر پایه آزمایشات شیمیایی بنا نهاده شده بودند که قابلیت آنالیز دقیق مولکول‌های DNA تک‌ رشته‌ای و ژنوم در این مرحله را سبب شدند [۹ و ۱۸]. توسعه این روش‌های سریع، دقیق و با توان عملیاتی بالاتر سبب کاهش قابل ملاحظه هزینه در این سال‌ها گردید که باتوجه به تقاضای روزافزون برای بهره‌بردن از ظرفیت‌های توالی‌سنجی در تشخیص بیماری‌ها و نقایص ژنتیکی مزیت این روش‌ها به حساب می‌آید [۱، ۹، ۱۹ و ۲۰]. جهت کاهش هزینه توالی‌سنجی DNA و افزایش چشمگیر دقت و سرعت توالی‌سنجی، نسل سوم توالی‌سنجی^۴ به صورت سنسورها و ریز تراشه‌ها با به کارگیری روش‌های فیزیکی توسعه یافته‌اند [۵]. مهم‌ترین مزیت نسل سوم روش‌های توالی‌سنجی، توانایی آشکارسازی تک‌مولکول‌ها و جفت‌بازهای نوکلئوتیدی DNA بدون نیاز به تقویت کلونال و فرآیندهای شیمیایی قبل از زمان انجام توالی‌سنجی می‌باشد [۹ و ۲۱]. این مزیت در مقایسه با روش‌های دو نسل قبلی به دلیل نیاز کمتر به دست‌کاری نمونه DNA که باید توالی آن‌ها خوانده شوند، سبب کاهش اختلال و خطا در فرآیند توالی‌سنجی می‌شود [۹]. به علاوه، نسل‌های قبلی توالی‌سنجی بر پایه سنتزهای شیمیایی بود در حالی که تکنیک‌های آشکارسازی نسل سوم عمدتاً تشخیص فیزیکی بازهای نوکلئوتیدی در نمونه‌های DNA به صورت دست‌کاری نشده را ممکن ساخته است [۱۸]. توالی‌سنجی نسل سوم شامل روش‌هایی از قبیل توالی‌سنجی در زمان واقعی تک‌مولکول^۵، توالی‌سنجی در زمان واقعی با استفاده از انتقال انرژی تشدید فلورسانس^۶، تصویربرداری مستقیم DNA توسط میکروسکوپ الکترونی^۷، تصویربرداری مستقیم از DNA توسط پروب‌های میکروسکوپ تونل‌زنی رویشی^۸، نانوپورها^۹، ترانزیستورها^{۱۰} و پروب‌های لبه چاقو^{۱۱} می‌باشد.

تمایل به افزایش دانسته‌ها در زمینه حقایق زندگی موجودات زنده و ویژگی‌های آن، کلید اصلی تحقیقات علمی و توسعه تکنولوژی‌های مرتبط با آن است. این تحقیقات منجر به کشف واقعیت‌هایی در مقیاس مولکولی نظیر مولکول‌های پروتئین، اسیدهای نوکلئیک (DNA) و ژن‌ها که حاوی اطلاعات حیاتی برای عملکرد سلولی ارگانیسم‌های زنده هستند، شده است. به دلیل نقش کلیدی اسیدهای نوکلئیک، تحقیقات عظیمی برای شناسایی جزئیات ساختاری و عملکردی DNA از گذشته تاکنون انجام پذیرفته است. در دو دهه اخیر، ابزارها و تکنولوژی‌ها توسعه چشمگیری داشته‌اند [۴-۱]. تکنولوژی‌های نوین توالی‌سنجی DNA افق علمی روشنی را پیش روی محققان علوم زیستی نهاده و سبب ارتقای ظرفیت تحقیقات پزشکی - زیستی و تجزیه و تحلیل زیست‌مولکول‌ها گردیده است [۴ و ۵].

توالی‌سنجی DNA:

با شروع پروژه ژنوم انسانی^۱ که انقلابی علمی در تحقیقات پایه‌ای- کاربردی علوم پزشکی به حساب می‌آید [۱]، تلاش برای استخراج نقشه ژنتیکی، سبب شناسایی تعداد زیادی ژن و باز نوکلئوتیدی DNA (حدود ۳ بیلیون) شده است [۶ و ۷]. مهم‌ترین روش استخراج نقشه ژنتیکی، توالی‌سنجی رشته‌های DNA می‌باشد [۸]. توالی‌سنجی مولکول DNA، فرآیندی است که در آن ترتیب بازهای نوکلئوتیدی تشکیل‌دهنده هر رشته مشخص از DNA از طریق آشکارسازی خصوصیات ویژه فیزیکی، الکتریکی، نوری و مغناطیسی این بازها تعیین می‌شود [۵]. محدوده وسیعی از تحقیقات پزشکی در زمینه مطالعات سرطان [۹ و ۷]، تشخیص ژنتیکی [۱۰ و ۱۱]، ویروسی- میکروبی [۱۲] و بیوتکنولوژی [۱۳] از توالی‌سنجی DNA بهره می‌برند. پیشرفت‌های متدولوژیک در توالی‌سنجی سبب تغییر شیوه آنالیز کردن اطلاعات ژنتیکی توسط دانشمندان و افزایش اطلاعات حاصل شده است [۹]. در علوم پزشکی این سطح از اطلاعات، اساس پاتولوژی را نیز تغییر داده است. در حال حاضر پاتولوژیست‌ها با کمک تکنولوژی‌های توالی‌سنجی قادر به آنالیز، تشخیص و ردیابی محل جهش‌ها و یا تغییرهای ژنتیکی نوع خاص بیماری افراد با دقت قابل قبولی می‌باشند [۹ و ۱۴]. در زمینه تشخیص‌های پیش از تولد، پیشرفت در زمینه توالی‌سنجی DNA به توسعه روش‌های متعدد پیشگیری، تشخیص و غربالگری جنینی و مشاوره ژنتیکی مورد نیاز برای بیماری‌ها منجر شده است [۱۵ و ۱۶]. در زمینه بیماری سرطان تجربیات به دست آمده در این سال‌ها بر مفید

1. Human Genomic project (HGP)
2. 1st generation sequencing
3. Next Generation Sequencing
4. Third Generation Sequencing
5. Single-molecule real-time sequencing

6. Real-Time DNA sequencing using fluorescence resonance energy transfer
7. Direct imaging of DNA using electron microscopy
8. Direct imaging of DNA sequences using scanning tunneling microscope tips

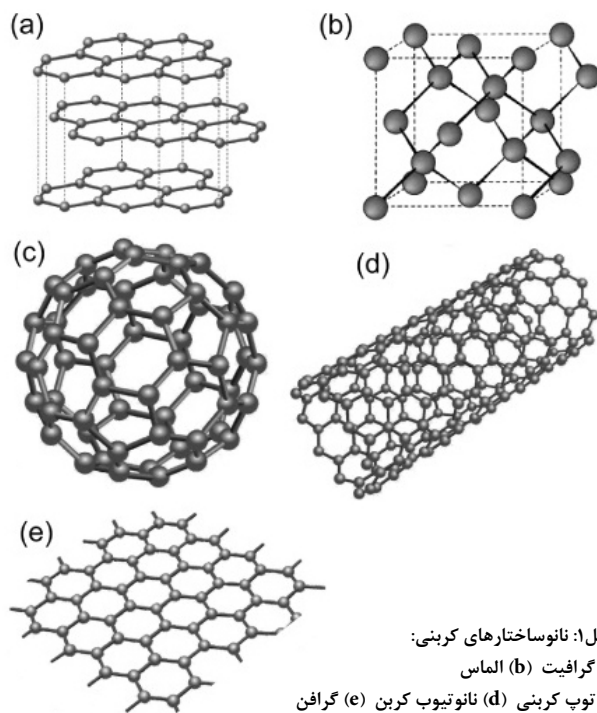
9. nanopores
10. Transistor-mediated DNA sequencing
11. Nano-Knife-Edge Probes for Sequencing

نانوسنسورهای گرافنی:

با پیدایش دانش نانو تکنولوژی و معرفی انواع مختلف نانومواد با داشتن ابعادی در مقیاس بسیار کوچک نانومتر، طراحی، ظهور و تجاری سازی تحقیقات علوم مختلف بیولوژی، فیزیک، شیمی، پزشکی و ... دچار تحولی چشمگیر گردید [۲۲]. پیشرفت و کاربرد نانو تکنولوژی در صنعت تولید دارو و علم پزشکی، آینده این علوم را تغییر داده است و پتانسیل های موجود در این زمینه محققان عرصه پزشکی و داروسازی را بیش از پیش قادر به ترکیب و تولید نانو ذرات برای تولید مولکول های دارویی اختصاصی تر برای درمان مؤثرتر بسیاری از بیماری ها همچون سرطان نموده است [۲۳ و ۲۴]. با استفاده از تکنولوژی نانو، عصر جدیدی از توسعه سنسورها برای آنالیز مواد در مقیاس های بسیار کوچک نانو که در گذشته غیر ممکن بود، آغاز گردید [۲۲ و ۲۵]. بیوسنسورها تجهیزاتی هستند که براساس برهمکنش ویژه فیزیکی- شیمیایی سبب آشکارسازی و تجزیه و تحلیل عناصر بیولوژی و بیوشیمیایی در نمونه های زیست-پزشکی می شوند [۲۶]. این بیوسنسورها براساس فرآیند برهمکنش آشکارسازی و تکنیک آشکارسازی به چند گروه از قبیل: ۱-بیوسنسورهای تشدیدی، ۲-بیوسنسورهای اپتیکی، ۳-بیوسنسورهای حرارتی، ۴-بیوسنسورهای ترانزیستورهای اثر میدان FET^{۱۲} و ۵-بیوسنسورهای الکتروشیمیایی تقسیم می شوند. از زمان پیدایش بیوسنسورها به دلیل ارتقای حساسیت و دقت این دسته از تجهیزات افزایش کاربری آن ها همواره روبه افزایش گزارش شده است [۲۶ و ۲۷]. نانومواد جدید به دلیل ویژگی های منحصر به فرد شیمیایی، فیزیکی، اپتیکی، الکترونیکی و مقیاس اندازه بسیار کوچک نانومتری برای استفاده و توسعه بیوسنسورها و اندازه گیری های بیولوژیکی بسیار سازگار، ایدئال و مقرون به صرفه هستند [۲۵]. ترکیب نانو تکنولوژی، بیولوژی مولکولی و فوتونیک امکان منحصر به فردی را برای گسترش تجهیزات بیونانوسنسورهای اپتیکی^{۱۳} با قابلیت کاربری در محدوده وسیعی از آشکارسازهای تشخیصی و درمانی برای محققان فراهم آورده است [۲۵ و ۲۶]. رشد نانوسنسورهای نوری برای آنالیز سلول ها و مولکول های زیستی- بیوشیمیایی به ابزار بسیار دقیق و سریعی که هم اکنون در بسیاری از مطالعات پایه و کاربردی علوم بهداشتی، بیولوژی سلولی، پزشکی و کشف داروها در حال استفاده است، تبدیل شده اند [۲۶ و ۲۸]. دو روش اصلی آشکارسازی در بیوسنسورهای اپتیکی عبارت اند از: آشکارسازی بر پایه تابش فلورسانس^{۱۴} و آشکارسازی بدون نشانه گذاری^{۱۵} [۲۸ و ۲۹]. در آشکارسازی نشان دار بر پایه تابش فلورسانس، مولکول های هدف یا مولکول هایی که باید آشکارسازی شوند، توسط پروتئین های فلورسانس (رنگدانه^{۱۶}) نشان دار می شوند و به واسطه برهمکنش این مولکول های نشان دار شده در نانوسنور، تابش فلورسانس

انجام می شود. شدت تابش فلورسانس به قدرت برهمکنش بیومولکول ها در سنسور ارتباط داده می شود و آنالیزها بر این اساس انجام می گیرد. بالعکس، در روش غیرنشان دار، مولکول ها به شکل اصلی خود و بدون برچسب خوردن یک رنگدانه مورد آشکارسازی قرار می گیرند. این نوع از آشکارسازی نسبتاً آسان، ارزان و برای انجام آنالیزها در زمان واقعی و بررسی کینتیک^{۱۷} برهمکنش های بیومولکول ها مناسب است. در جدول ۱ براساس تکنولوژی برخی از بیوسنسورهای نوری، خصوصیات اپتیکی و محدوده آشکارسازی آن ها به تفصیل معرفی شده است که از این میان می توان به تداخل سنج ها، موجبر نوری^{۱۷}، ریزتراشه ها^{۱۸} و فیبرهای نوری^{۱۹} اشاره نمود [۲۸ و ۲۹].

در سال های اخیر، تحقیقات بسیار زیادی در زمینه ساختارهای نانوکربنی صورت گرفته است. لذا، این دسته از نانومواد قابلیت استفاده در نانوبیوسنسورهای اپتیکی را دارا می باشند. از انواع مختلف ساختارهای نانوکربنی به نانوتیوب ها، نانوذرات و ساختار سه بعدی گرافیت می توان اشاره نمود (شکل ۱). جدیدترین ساختار نانوکربنی گرافن می باشد که در شکل ۱ نشان داده شده است. گرافن یک ساختار دو بعدی نازک از حلقه های شش اتمی کربن است که تشکیل یک شبکه اتمی هگزاگونال^{۲۱} که به طور قوی به هم پیوند خورده اند را می دهد. از ویژگی منحصر به فرد گرافن می توان به حالت هیبریداسیون SP² و ضخامت بسیار نازک اتمی آن (از مرتبه چند صدم نانومتر) اشاره نمود [۳۰].



12. Field effect transistor; FET
13. Bio-optical nanosensors
14. fluorescence-based detection

15. label-free detection
16. fluorophore
17. Kinetic

18. Optical waveguide based biosensors
19. Chip-based sensors
20. Optical fiber based biosensors

21. honeycomb

پایگاه تکنولوژی (Technology Platform)	خصوصیات اپتیکی	آنالیز	محدودیت آشکارسازی
رزونانس پلاسمون سطحی	- رزونانس پلاسمون سطحی - محدوده وسیع رزونانس پلاسمون سطحی - تصویربرداری براساس رزونانس پلاسمون سطحی - ترکیب اپتیکی رزونانس پلاسمون سطحی - رزونانس پلاسمون سطحی حساس به فاز - رزونانس پلاسمون سطحی طول موج مدوله شده - رزونانس پلاسمون سطحی زاویه مدوله شده - رزونانس پلاسمون سطحی بر پایه منشور	- Bulk solution - Bulk solution - پروتئین - پروتئین - پروتئین - DNA - پروتئین - پروتئین	10^{-5}-10^{-8} RIU 10^{-7}-10^{-8} RIU 0.1nM 0.2nM 1.3Nm 10 pM 0.15 ng mL⁻¹ 106 cfumL⁻¹
تداخل سنج	- BIAcore 2000 SPR - Mach-Zehnder - Young's interferometer - Hartman interferometer - Porous silicon - BioCD - Microchannel	- باکتری - پروتئین - ویروس - DNA - پروتئین - DNA - پروتئین - پروتئین	25 cfumL⁻¹ 20 pgmm⁻² 1000 particle mL⁻¹ 4 ngmL⁻¹ - Protein 5ngmL⁻¹ 2pM 0.1 ngmL⁻¹ - femto-mole/ pico-mole
موج بر	- آینه رزونانسی - پوشش کلد فلزی - تقارن معکوس - کلد فلزی متقارن	- پروتئین - سلول - سوش باکتری - سلول - سلول - Bulk solution	~ 0.1 pgmm⁻² 106 cellsmL⁻¹ ~ 105 sporesmL⁻¹ ~ 10 cellsmm⁻² 60 cellsmm⁻² 2×10^{-7} RIU
رزوناتور حلقوی	- حلقه بر روی ریزتراشه - میکروکره دی الکتریک - حلقه اپتیکی-فلوئیدی بر پایه لوله موئین	- DNA - پروتئین - DNA - پروتئین - ویروس/باکتری - DNA - پروتئین	~ 100nM 60-250 pgmm⁻² 1 pgmm⁻² 10 pgmL⁻¹ ~ 1pgmm⁻² - pgmm⁻², 10pM ~ 1pgmm⁻², 3pM
فیبر نوری	- توری براگ با تناوب کوتاه - توری براگ با تناوب بلند - نانوفیبر نوری - کوپلر فیبر نوری - کاواک فابری-پرو فیبر نوری	- DNA - پروتئین - Bulk solution - پروتئین - DNA - پروتئین	0.7_gmL-1, 0.1_M 2_gmL-1 10-7 RIU 0.5_gmL-1 76_M, 1.7 ng 25_gmL⁻²
فوتونیک کریستال	- فوتونیک کریستال دوبعدی - میکروکاواک فوتونیک کریستالی دوبعدی - موجبر فوتونیک کریستالی - آرایه میکروکاواکی فوتونیک کریستال یکبعدی	- پروتئین - پروتئین - پروتئین - Bulk solution	0.4 pgmm⁻² 1 fg 0.15_M 7×10^{-5} RIU

رسانش الکترونی ماده کاملاً پایین است، اما سطح فرمی^{۲۸} می تواند با ناخالص سازی ماده (با الکترون ها و حفره ها) تغییر داده شود به طوری که ماده در دمای اتاق به طور بالقوه دارای هدایت الکترونی بهتر از مس شود [۳۴ و ۳۵].

از نظر فوتونیکی به این دلیل که در دمای اتاق حامل های بار الکتریکی گرافن فرم یون های دو بُعدی دیراک با جرم مؤثر صفر و سرعتی در حد سرعت نور، تحرک پذیری ذاتی قوی دارند، (آزادی حرکتی برابر $2.53105 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) می توانند مسیرهای طولانی را بدون پراکندگی طی کنند. گرافن خواص نوری متنوعی را به نمایش می گذارد که از جمله آن می توان به رسانایی نوری ثابت در محدوده مادون قرمز و جذب نوری قابل کنترل اشاره نمود. گرافن ثابت هدایت جهانی نوری به اندازه $G = \pi e^2 / 4\hbar$ دارد [۳۱ و ۳۴]. در محدوده نور مرئی فیلم های گرافنی نازک دارای شفافیت هستند. به عبارت دیگر، کدری گرافن به صورت $\pi\alpha$ محاسبه می شود که α یک ثابت ساختاری می باشد (در محدوده فرکانسی مرئی تا مادون قرمز $\pi\alpha \approx 2.3\%$ است). این شفافیت نوری گرافن با افزایش ضخامت به طور خطی کاهش پیدا می کند (برای یک فیلم نازک ۲ نانومتری شفافیت نوری برابر ۹۵ درصد است اما، برای ضخامت ۱۰ نانومتر به کمتر از ۷۰ درصد کاهش پیدا می کند). مجموع این ویژگی ها استفاده فیلم های گرافن با ضخامت گوناگون را برای تولید و توسعه قطعات و تجهیزات فوتونیکی قابل کنترل مختلف از جمله ایزولاتورها، مدولاتورها، دتکتورهای نوری، ژنراتورهای امواج تراهرتز، دتکتورهای امواج تراهرتز، لیزرهای حالت جامد و ... مناسب می سازد [۳۱، ۳۴ و ۳۷].

پروپ های گرافنی مورد استفاده در توالی سنجی DNA:

گرافن به دلیل ویژگی های ساختاری که در بخش قبل به آن ها اشاره شد، پتانسیل مناسبی را برای استفاده در کاربردهای بیولوژیکی فراهم آورده است. خلوص شیمیایی، سطح وسیع، عامل دار کردن آسان این سطح و هزینه پایین تولید مقادیر زیاد فیلم های گرافنی، کاربرد این ماده را در ساخت نانوبیوسنسورهای ایتیکی و دارورسانی افزایش داده است [۳۱ و ۳۸]. گرافن یا مشتقات گرافنی مانند گرافن اکساید و یا گرافن اکساید احیاء شده که ترکیبات کربنی محلول در آب هستند برای بیوسنسورها و پلات فرم های ایتیکی قابل کاربرد در تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی مولکول های زیستی و بیوشیمیایی ایدنال هستند [۳۸ و ۳۹]. تحقیقات مختلفی سازگاری زیستی گرافن و گرافن اکساید را برای سلول های میکروارگانیسم های زنده نشان داده اند. براساس آزمایش های کشت سلولی انجام شده، از آنجاکه ورقه های گرافنی، زیست سازگار و دارای سمیت ناچیزی هستند، برای کاربردها

ورقه های گرافن دارای مشخصات ویژه حرارتی، الکتریکی، مکانیکی و ایتیکی می باشند [۳۵-۳۰]. پیش از سال ۲۰۰۴، از نظر تئوری دانشمندان بر این اعتقاد بودند که ترکیب های دو بُعدی به دلیل عدم پایداری حرارتی به هنگام جداسازی نمی توانند وجود داشته باشند. اما، با جداسازی گرافن این امر ممکن گردید و دانشمندان به چگونگی آن پی بردند. پس از اینکه ورقه های معلق گرافن به وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی شد، دانشمندان دلیل آن را ناشی از ناهموازی^{۲۲} اندک گرافن در اثر اصلاح ساختار ماده اعلام کردند. با این حال، تحقیقات بیشتر نشان داد که پایداری حرارتی گرافن ناشی از پیوندهای بین مولکولی قوی کربن-کربن این ماده است که سبب جلوگیری از نوسانات حرارتی آن می شود [۳۱ و ۳۳]. یک خصوصیت دیگر گرافن، قدرت ذاتی این ماده به دلیل قدرت پیوندهای کربنی آن است. به همین دلیل از گرافن با استحکام کششی نهایی ۱۳۰ گیگا پاسکال به عنوان ماده ای قوی یاد می شود [۳۶]. مشخصه دیگری که گرافن را ویژه می کند این است که گرافن خصوصیات الاستیک دارد که آن را قادر می سازد اندازه اولیه خود را پس از اعمال فشار حفظ نماید. در سال ۲۰۰۷ آزمایش های میکروسکوپ نیروی اتمی^{۲۳} که بر روی ورقه های گرافن بر روی حفره های سیلیکون دی اکسید انجام گرفت نشان داد که ورقه های گرافنی (با ضخامت ۸-۲ نانومتر) ثابت فنر $5-11 \text{ N/m}$ و مدول یانگ $E = 1 \text{ Terapascals}$ داشتند [۳۶].

خصوصیت الکترونیکی ویژه گرافن به دلیل رسانایی الکتریکی بالای گرافن به دلیل همپوشانی صفر نیمه فلز آن (حامل های بار الکترون و حفره) است. اتم های کربن در مجموع شش الکترون دارند که دو الکترون در لایه داخلی و چهار الکترون در لایه خارجی قرار گرفته است. چهار الکترون لایه خارجی در اتم کربن از نظر پیوند شیمیایی برقرار کردن در دسترس هستند. اما، در گرافن هر اتم به سه اتم کربن دیگر در صفحه دو بُعدی گرافن متصل است لذا یک الکترون آزاد در بُعد سوم برای هدایت الکترونی وجود دارد. این الکترون های بسیار متحرک الکترون های پی (π) نامیده شده و در قسمت بالا و پایین ورقه گرافن قرار گرفته اند. اربیتال های π با هم همپوشانی دارند و این امر سبب بهتر شدن پیوندهای کربن-کربن گرافن می شود. اساساً ویژگی های الکترونی گرافن توسط پیوند و ضد پیوند^{۲۵} (پیوندهای والانس و هدایت) اربیتال های π ایجاد می شود. مطالعات ترکیبی در چند دهه گذشته اثبات کرده اند که در نقطه دیراک در گرافن، الکترون ها و حفره ها جرم مؤثر صفر دارند. این به دلیل رابطه خطی انرژی- حرکت (طیف تحریک) برای انرژی های پایین در نزدیکی منطقه بریلون^{۲۶} است. این الکترون ها و حفره ها فرم یون های دیراک^{۲۷} نامیده می شوند. به دلیل دانسیته صفر این حالت ها در نقاط دیراک

22. Rippling

23. Atomic force microscopic (AFM)

24. Young's modulus

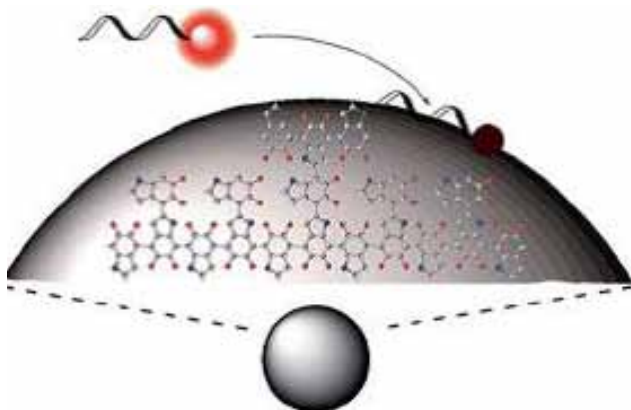
25. anti-bonding

26. Brillouin zone

27. Dirac fermions

28. Fermi level

29. fine-structure constant

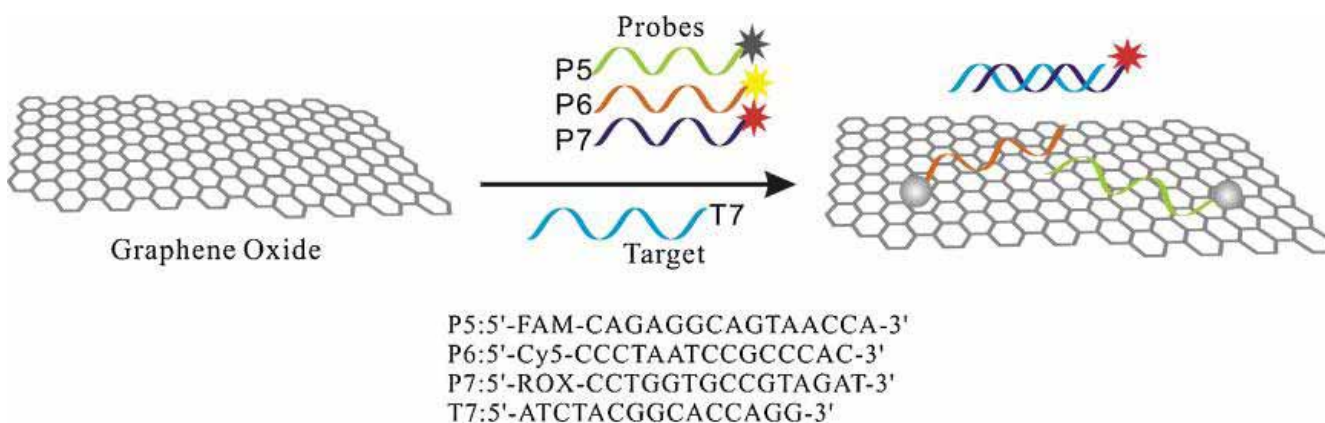


شکل ۲: شمایی از مکانیسم خاموش شدن فلورسانس تک‌رشته DNA در پروب گرافنی توالی‌سنجی DNA [۴۱]

در این پروب‌ها می‌توان به مواردی همچون آمینومتیل کورامین استات (AMCA) ^{۳۱}، کربوکسی‌فلورسین (FAM) ^{۳۲}، سیانین فایو ^{۳۳} و کربوکسی‌ایکس‌رودامین (ROX) ^{۳۴} اشاره نمود که با تابش لیزرهای با محدوده طول موجی آبی (۴۹۴ نانومتر)، قرمز (۶۴۳ نانومتر) و یا نارنجی (۵۸۷ نانومتر) به حالت تحریک در می‌آیند. در مطالعه‌ای که با پروب فلورسانسی گرافن براساس تشخیصی فلورسانس برهمکنش هیدروفوبیک تک‌رشته DNA برای توالی‌سنجی DNA انجام شده است، در آشکارسازی هدف‌های DNA در یک محلول نمونه هموزن با بهره‌برداری از برهم‌کنش GO-DNA، عملکرد سیستم هدف-پروب ^{۳۵}

و تجهیزات سنسورهای مورد استفاده در آنالیزهای زیست-پزشکی از جمله نمونه‌های بیوشیمی خون مانند اندازه‌گیری قند، کلسترول، هموگلوبین خون و بافت‌شناسی گزینه مناسبی می‌باشند [۴۰]. همچنین این بیوسنسورهای اپتیکی به دلیل آسانی فرآیند عامل‌دار کردن گرافن نسبت به موارد مشابه، جهت انجام آزمایش‌های اندازه‌گیری بسیار حساس، از سرعت بالاتری برخوردارند. حساسیت انتخابی بودن و مقرون به صرفه بودن سبب استفاده از مشتقات گرافن در تولید ابزارهای آنالیز و اندازه‌گیری فوق سریع بیومولکول‌ها در تشخیص و درمان پزشکی شده است [۳۸]. در مطالعات DNA، به منظور شناسایی ترتیب قرار گرفتن جفت‌بازهای پورین و پیریمیدین (G, A, T, and C) با قدرت تفکیک‌پذیری مناسب و تشخیص نقایص ژنتیکی، ایمنی و یا مطالعات موتاسیون ژنتیکی بیماری‌های مختلف، استفاده از بیوسنسورهای گرافنی بیش‌ازپیش مورد استقبال قرار گرفته است [۳۸].

دسته‌ای از نانوپلات‌فرم‌های گرافنی براساس مکانیسم نشان‌دار کردن مولکول‌های هدف به وسیله مولکول‌های پروتئین فلوروفور و برهمکنش‌های بر پایه تابش فلورسانس عمل می‌کنند. در این مکانیسم لایه گرافنی مانند یک خاموش‌کننده ^{۳۰} عمل می‌کند (شکل ۲). بدین معنی که در برهمکنش ماده فلوروفور یا بیومولکول نشان‌دار شده با فلوروفور (مانند تک‌رشته نوکلئیک اسید ssDNA) و گرافن، انرژی از ماده نشان‌دار به گرافن انتقال می‌یابد و تابش فلورسانس خاموش و یا با شدت ناچیز انجام می‌شود [۴۱ و ۴۲]. از انواع مختلف مولکول‌های نشان‌دارکننده با فلوروفور مورد استفاده



شکل ۳: شمایی از آنالیز DNA نشان‌دار شده با مولکول‌های فلوروفور [۴۲]

30. Quencher

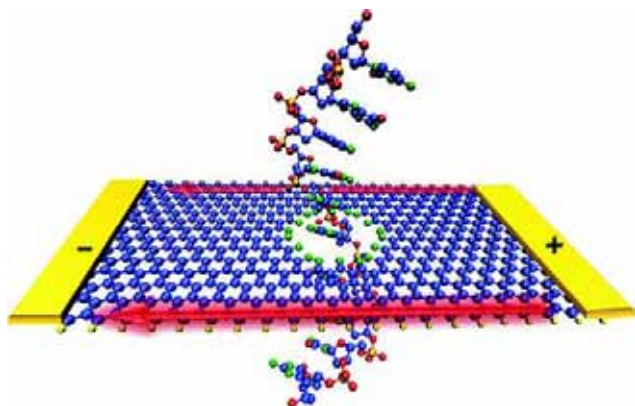
31. Aminomethylcoumarinacetate (AMCA)

32. 6-carboxyfluorescein (FAM)

33. Cyanine 5

34. 6-carboxy-X-rhodamine(ROX)

شستابدار (۳۰۰ kV) وجود دارد. هنگامی که این بمباران الکترونی در دمای اتاق انجام می‌پذیرد، سبب به هم ریختگی و نامنظم شدن شکل نانوپور گرافنی می‌شود. برای رفع این نقص، پیشنهاد شده است که بمباران باریکه الکترونی صفحه گرافنی در دمای بالای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرد [۴۵].



شکل ۴: شمایی از پروب نانوپور گرافن در توالی‌سنجی DNA

در پروب‌های نانوپور گرافن، جریان عرضی I_C با استفاده از دو الکترون با ابعاد نانومتر 41 که در عرض روزنه قرار دارند، ثبت می‌شود. با ثبت تغییرات جریان عرضی که حدود چند میکروآمپر است، می‌توان تفکیک‌پذیری فضایی و زمانی فرآیند آنالیز بیومولکول‌ها را ارتقاء داد [۴۴ و ۴۵]. جریان عرضی ثبت‌شده توسط الکترودها به‌هنگام عبور DNA به‌ازاء بازهای نوکلئوتیدی مختلف متغیر (شکل ۵) گزارش می‌شود [۳۰ و ۴۵]. براساس تفاوت در جریان می‌توان از روی منحنی‌های وابسته به زمان تغییر شدت جریان عرضی، موقعیت بازهای نوکلئوتیدی را در رشته‌های DNA پیش‌بینی نمود. نتایج مطالعات نشان داده است که پیک جریان عرضی سیتوزین از همه بازهای نوکلئوتیدی دیگر بیشتر است و گوانین کمترین پیک جریان عرضی را سبب می‌شود ($I_C > I_A > I_T > I_G$).

از آنجا که بازهای نوکلئوتید مجاور با هم در ssDNA بر روی جریان‌های نانوپور تأثیرگذار هستند، در نانوپورهای گرافن به‌دلیل ضخامت خاص بسیار نازک گرافن، ابعاد نانوپور در مقایسه با بازهای نوکلئوتیدی رشته DNA قابلیت تمایز بازها را به‌طور مجزا می‌دهد و اثر برهمکنش تداخلی بازهای مجاور هم تا حد ممکن کاسته می‌شود [۳۰ و ۴۴]. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که معمولاً در نانوپورهای گرافنی بعد از چندین ثبت توالی‌سنجی بازهای DNA به‌دلیل برهمکنش هیدروفوبیک DNA و سطح گرافن نانوپور،

گرافن اکساید (GO) حساس، دقیق و سریع گزارش گردید [۴۲]. هنگامی که ssDNA های پروب نشان‌دار شده با هدف مکمل خود جفت نمی‌شوند و یا به‌طور نادرست 36 جفت می‌شوند (شکل ۳)، خاموش‌شدگی در اثر انتقال انرژی (و یا الکترون تحریک شده) از تکرشته‌های نشان‌دار شده DNA به GO اتفاق می‌افتد و تابش فلورسانس تضعیف می‌شود. تنها در صورتی که تکرشته DNA پروب با هدف مکمل خود که توالی بازهای نوکلئوتیدی آن کاملاً مشخص است جفت شود، تابش فلورسانس با شدت بالا توسط سیستم سنسور و آشکارساز ثبت می‌شود. به‌دلیل سطح مسطح و وسیع سنسور GO قابلیت آشکارسازی چندین مولکول هدف در یک نمونه مورد آزمایش در توالی‌سنجی DNA وجود دارد [۴۲].

با وجود حساسیت بالای سنسورهای هدف-پروب با استفاده از مولکول نشان‌دارکننده، این سنسورها قابلیت پایش در زمان واقعی را ندارند و بنابراین پیچیدگی غربالگری مواد بیولوژیکی را افزایش می‌دهند [۴۱]. مطالعات دیگری در این زمینه بر روی سنسورهای بدون نشان‌دار فیلم‌های GO احیاء شده براساس مکانیسم FET که از میدان الکتریکی برای کنترل هدایت جریان الکتریکی استفاده می‌شود، انجام گرفته است [۴۳]. چالش این سنسورها این است که در فرآیند احیای GO، گروه‌های عاملی که برای برهمکنش با DNA لازم است به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاسته می‌شود. بنابراین برای رفع این مشکل، سنسور قبل و بعد از مرحله احیای GO به‌روش شیمیایی، در معرض سه ماده شیمیایی اتیلن‌دی‌آمین 37 ، گلوترالدئید 38 و تری‌فلورواتیل‌آمین 39 که لینکرهای مولکولی معمولی هستند، قرار می‌گیرد. با استفاده از این سنسور به‌هنگام توالی‌سنجی DNA به‌صورت زمان واقعی و بدون نشان‌دار شدن، جریان یونی سنسور ثبت می‌شود و اطلاعات DNA با استفاده از تغییر این جریان در واحد زمان تفسیر می‌شود [۴۳].

نانوپورهای گرافن و توالی‌سنجی DNA:

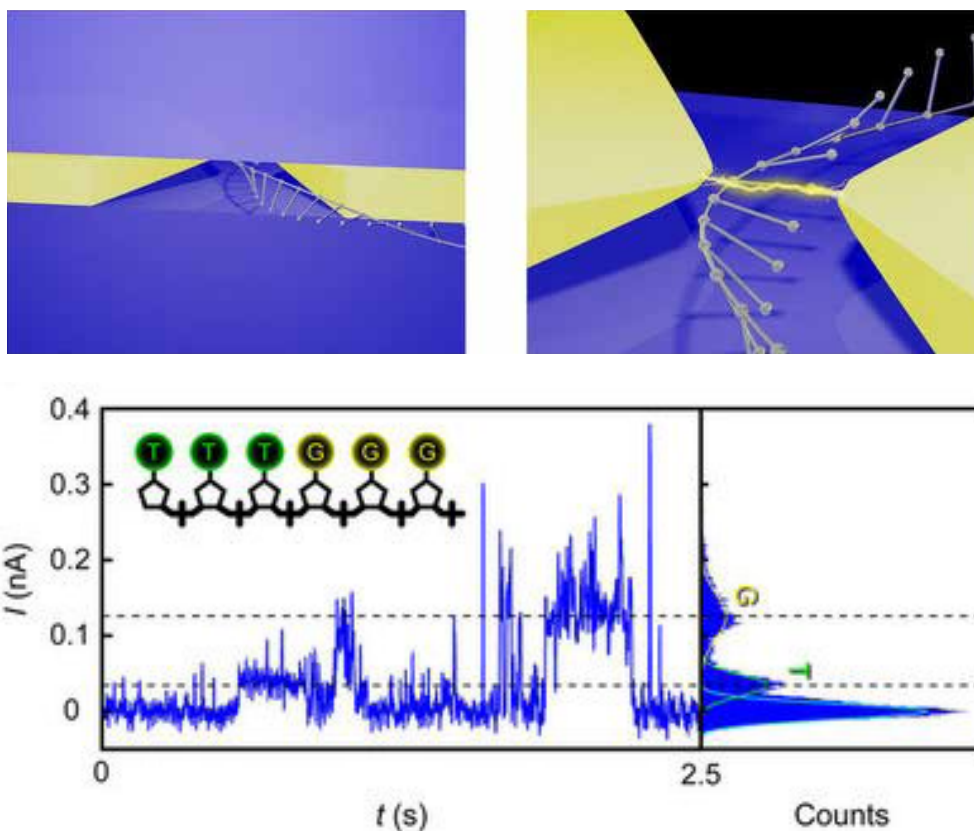
این ایده که DNA با عبور از یک روزنه نانومتری بتواند بازهای سازنده‌اش خوانده شود و توالی آن‌ها در رشته DNA آنالیز گردد، از اواخر دهه ۱۹۸۰ مطرح شده است (شکل ۴). این تکنولوژی با سرعت، دقت قابلیت انجام به‌صورت زمان واقعی را دارد [۴۴، ۳۰، ۴۵]. از زمان معرفی نانوپورها تاکنون، به‌دلیل کاهش چشمگیر هزینه‌های آنالیز مواد بیولوژیکی و بیوشیمیایی در دنیا در زمینه تحقیقات، تحولی عظیم در حال وقوع است. در گرافن به‌دلیل ساختار ویژه شبکه اتمی که دارد، قابلیت ایجاد روزنه‌هایی با شکل منظم در ابعاد حدود چند نانومتر در سطح آن توسط بمباران توسط باریکه الکترونی

ژنوم‌ها را در زمان اندک و با هزینه کم خواهد داد. این تکنولوژی، انقلابی عظیم در تکمیل پروژه‌های ژنومی خواهد بود. از آنجاکه براساس نقشه‌های راه تحقیقات جهانی، تکنولوژی پروب‌های فوتونیک بر پایه گرافن در حال توسعه و یافتن کاربری‌های نوین هستند، به نظر می‌رسد طب پزشکی، دارورسانی و درمان سرطان، متحول و طب پزشکی منحصر به بیمار^{۴۳} گسترش خواهد یافت. براین اساس پیش‌بینی، تشخیص، درمان و پایش بیماری برای هر بیمار به صورت خاص آن بیمار طراحی و اجرا خواهد شد.

DNA جذب سطحی نانوپور می‌شود و همین امر سبب گرفتگی و بسته شدن نانوپور می‌شود. برای جلوگیری از چنین برهمکنشی، روش لایه‌نشانی هیدروفیلک برای نانوپور پیشنهاد شده است تا با کمک این لایه‌نشانی از برهمکنش‌های هنگام عبور DNA و جذب سطحی شدن DNA در نانوپور و بسته شدن^{۴۲} نانوپور جلوگیری به عمل آید [۴۵].

آینده نانوسنسورهای گرافنی:

استفاده از آرایه‌های نانوپور گرافنی به محققان امکان توالی‌سنجی



شکل ۵: منحنی جریان عرضی نانوپور به‌ازاء عبور بازهای نوکلئوتیدی DNA به‌هنگام توالی‌سنجی

References:

1. Metzker LM. Emerging technologies in DNA sequencing, *Genomes Res*, 2005; 1767-76.
2. Ken H. Nanopore-based single-molecule DNA analysis, *Nano medicine*, 2007; 2(4): 459-81.
3. Edwardsa MA, Henryb RJ. DNA sequencing methods contributing to new directions in cereal research, *Journal of Cereal Science*, 2011; 54: 395-400.
4. Marziali A, Akeson M. New DNA Sequencing methods, *Annu. Rev Biomed Eng*. 2001; 3: 195-223.
5. Mingsheng X, Daisuke F, Nobutaka H. Perspectives and Challenges of Emerging Single-Molecule DNA Sequencing Technologies, *Small*, 2009; 5(23): 2638-49.
6. Kermit KM. DNA Sequencing by Mass Spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 1996; 31:1203-15.
7. Leandro S. New DNA sequencing technologies open a promising era for cancer research and treatment, *ClinTranslOncol*, 2011; 13: 301-6.
8. Kanigel R. The Genome Project, *New York Times Magazine*, December 1987; 99.
9. Morey M, Fernández-Marmiesse A, Castiñeiras DM, Fraga J, Couce LM, Cocho JA. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing, *Mol. Genet. Metab*, 2013; 1-22.
10. Neveling K, Collin R, Gilissen C, Van Huet R, Visser L, Kwint M, Gijsen S, Zonneveld M, Wieskamp N, Ligt JDe, Siemiatkowska A, Hoefsloot L, Buckley M, Kellner U, Branham K, DenHollander A, Hoischen A, Hoyng C, Klevering B, Van DB, Veltman J, Cremers F, Scheffer H. Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa, *Hum. Mutat*. 2012; 33: 963-72.
11. Pushkarev D, Norma F Neff, Stephen R Quake. Single-molecule sequencing of an individual human genome, *Nat Biotechnol*. 2009; 27(9): 847-50.
12. Kapranov P, Chen L, Dederich D, Dong B, He J, Steinmann KE, Moore AR, Thompson JF, Milos PM, Xiao W. Native molecular state of adeno-associated viral vectors revealed by single-molecule sequencing, *Hum. Gene Ther*. 2012; 23: 46-55.
13. David Edwards, Robert J, Henry and Keith J. Edwards. Preface: advances in DNA sequencing accelerating plant Biotechnology, *Plant Biotechnology Journal*, 2011; 10: 621-2.
14. Roach JC, Glusman G, Smit AF, Huff CD, Hubley R, Shannon PT, Rowen L, Pant KP, Goodman N, Bamshad M, Shendure J, Drmanac R, Jorde LB, Hood L, Galas DJ. Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole-genome sequencing, *Science* 2010; 328: 636-9.
15. Chiu RW, Sun H, Akolekar R, Clouser C, Lee C, McKernan K, Zhou D, Nicolaides KH, Lo YM. Maternal plasma DNA analysis with massively parallel sequencing by ligation for noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21, *Clin. Chem*. 2010; 56: 459-63.
16. Kin Lau T, Chen F, Pan Xi, Pooh RK, Jiang F, Li Y, Jiang H, Li X, Chen Sh, Zhang X. Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosome aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing, *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 2012; 25(8): 1370-4.
17. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977; 74: 5463-7.
18. Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies, *Genomics*, 2009; 93 : 105-11.
19. Choi M, Ute I, Schol I, Ji W, Liu T, Tikhonova RI. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing, *PNAS*, 2009; 106 (45): 19096-101.
20. Mardis E. The impact of next-generation sequencing technology on genetics, *Trends Genet*, 2008; 24: 133-41.
21. Levene MJ, Korlach J, Turner SW, Foquet M, Craighead HG, W.W. Webb, Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations, *Science* 2003; 299: 682-6.
22. Novoselov KS, Falko VI, Colombo L, Gellert PR, Schwab MG, Kim K. A roadmap for graphene, *NATURE*, 2012; 490(192).
23. Shiekh AF. Personalized nanomedicine: future medicine for cancer treatment, *International Journal of Nanomedicine*, 2013; 8: 201-2.
24. Zhang XQ, Xu X, Bertrand N, Pridgen E, Swami A,

- Farokhzad CO. Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012; 64 :1363–1384 1365.
25. Yun Yeo-H, Eteshola E, Bhattacharya A, Dong Z, Shim JS, Conforti L, Kim D, Schulz MJ, Ahn CH, Nelson Watts. Tiny Medicine: Nanomaterial-Based Biosensors, *Sensors* 2009; 9: 9275-99.
26. Velasco-Garcia MN. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 2009; 27–33.
27. Scheller FW, Schubert F, Pfeiffer D, Renneberg R. Intelligent Biosensors, *Annals New York Academy of Sciences*, 1987; 501: 240-8.
28. Fan XM, White I, Shopova IS, Zhu HD, Suter J, Sun Y. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review, *analytical Acta Chemica*, 2008; 620: 8–26.
29. Moerner WE. Proc. New directions in single-molecule imaging and analysis *Natl. Acad. Sci.* 2007; 104: 12596.
30. Bayley H. Holes with an edge, *NATURE*, 2010; 467: 164-7.
31. Novoselov KS, Falko VI, Colombo L, Gellert PR, Schwab MG, Kim K. A roadmap for graphene, *NATURE*, 2012; 490: 192-9.
32. Geim AK. Graphene: Status and Prospects, *Science* 2009; 324(5934): 1530-4.
33. Geiml AK, Novoselov KS. The rise of graphene, *Nature Materials*, 2007; 6: 183-91.
34. Geim KA. Random Walk to Graphene, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011; 50: 6967–85.
35. Novoselov SK. Graphene: Materials in the Flatland, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011; 50: 6986–7002.
36. Lee C, Wei X, Kysar JW, Hone J. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene, *Science*. 2008; 321(5887): 385-8.
37. Bao Qi, Zhang H, Wang Y, Ni Z, Yan Y, Shen ZX, PingLoh K, Tang DY. Atomic-Layer Graphene as a Saturable Absorber for Ultrafast Pulsed Lasers, *Adv. Funct. Mater.* 2009; 19:1–7.
38. Kuila T. Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 2011; 26: 4637–48.
39. Nair RR. Graphene as a transparent conductive support for studying biological molecules by transmission electron microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 2010; 97: 153102.
40. Chen H, Muller MB, Gilmore KJ, Wallace GG, Li D. Mechanically strong, electrically conductive, and biocompatible graphene paper. *Adv Mater* 2008; 20(18): 3557.
41. Weibing Q, Wei Li, Xiaoqing Li, Chen X and Xu D. Bioinspired polydopamine nanospheres: a superquencher for fluorescence sensing of biomolecules, *Chem. Sci.*, 2014; 5: 3018.
42. Shijiang He, Song B, Di Li, Zhu Ch, Wenpeng Qi, Wen Y, Wang L, Song Sh, Fang H, Fan Ch. A Graphene Nanoprobe for Rapid, Sensitive, and Multicolor Fluorescent DNA Analysis, *Adv. Funct. Mater.* 2010; 20: 453–9.
43. Stine R, Robinson JT, Sheehan PE, Tamanaha CyR. Real-Time DNA Detection Using Reduced Graphene Oxide Field Effect Transistors, *Adv. Mater.* 2010; 22: 5297–300.
44. Peng Sh, Yang Zh, Xiang Ni, Zhang H, Ouyang J, Fangping O. DNA translocation through graphene nanopores: a first-principles study, *Mater. Res. Express*, 2014; 1(1).
45. Schneider GF, Xu Q, Hage S, Luik S, Spoor NHJ, Malladi S, Zandberge H, Dekker C. Tailoring the hydrophobicity of graphene for its use as nanopores for DNA translocation, *Nature communications*, 2013; 4.