بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای داروسازی

عنوان

سنتز و مشخصه یابی نانوذرات کوانتوم دات پلاسمونیک جهت تهیه بیوسنسور نوری برای اندازه گیری بیومارکر میکرو آر ان ای ۱۳۴

اساتید راهنما

دکتر محمد جوهری اهر

دکتر پرویز مولوی

استاد مشاور

دکتر مهریار ندر محمدی

نگارش

بهنام باوفا

سپاس ایزد منان را که به من فرصتی بخشید تا به این مرحله از علم رسیدم و از هیچ محبتی دریغ نکرده و در تمام مراحل زندگیم مرا قوت قلب بوده است و بسی شاکرم که خانواده ای فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و در سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. این پایان نامه را تقدیم میکنم به تک تک عزیزانم که در طی این سال ها در کنار من بوده اند و در این راه پر فراز و نشیب مرا یاری نموده اند. به خصوص به دختر عزیز تر از جانم که با زبان شیرینش و جملات کودکانه اش همیشه روحیه بخش من بوده است.

از استاد بزرگ و ارجمندم آقای دکتر محمد جوهری که زحمات زیادی برای من کشیده اند و همچنین آقای دکتر پرویز مولوی و آقای دکتر مهریار ندر محمدی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

چکیده

مقدمه و هدف:

میکرو آر ان ای ها توالی های غیر کد کننده ای هستند که طول ۱۸ تا ۲۸ نوکلئوتیدی دارند. این مولکول های بیولوژیک در فرایند های سلولی نقش مهمی ایفا می کنند. بخصوص در میزان بیان پروتئین های بدن انسان و شکل گیری ساختار سلولی تاثیر به سزایی دارند. یک دسته از بیماری هایی که به شدت جوامع بشری را تحت تاثیر قرار داده بیماریهای روانی هستند. از میان بیماریهای روانی اختلال دو قطبی یکی از شایع ترین و ناتوان کننده ترین بیماریها محسوب می شود که تشخیص آن بیشتر بر مبنای علائم کلینیکال انجام می گیرد. اثبات شده است که میکرو ار ان ای ۱۳۴ نقش کلیدی در شکل گیری این بیماری دارد و در فازهای مانیک غلظت آن در پلاسما به شدت افزایش می یابد. محققان از این میکرو ار ان ای به عنوان بیومارکر تشخیصی بهره می برند تا تشخیص دقیق تر و پیگیری درمان موفقیت آمیزتری داشته باشند. هدف از این پایان نامه نیز سنتز بیوسنسور میکرو ار ان ای ۱۳۴ و ثبت سیگنال نوری در حضور miR-134 اسپایک شده به پلاسمای خون می باشد.

روش ها

ابتدا نانوذرات کوانتوم دات توسط روش آبی سنتز شد و پس از مشخصه یابی اطراف آن یک پوشش نازک طلا ایجاد گردید. پس از تهیه نانوذرات مذکور سایز، خصوصیات سطح ذره و طیف های جذب و نشری مورد مطالعه قرار گرفت و در نهایت در محیط بافری و محیط پلاسما اتصال هیبریدی نانوذرات پلاسمونیک با میکرو آر ان آی اسپایک شد و خصوصیات نوری آن مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها

نانوذرات کوانتوم دات با سایز ۳/۲ نانو متر بدست آمد و پس از پوشش ضخامت آن به ۶/۷ نانومتر افزایش یافت این پوشش امکان متصل کردن بیومولکول ها بخصوص رشته دی ان ای را فراهم نمود. بهینه سازی های مختلفی برای تهیه بیوسنسور حاضر انجام گرفت و بیوسنسور تهیه شده با حد تشخیص بسیار پایین ۱۵۰ پیکو گرم بر میلی لیتر در محدوده خطی مناسب در مدت زمان ۲۱ دقیقه پاسخ مناسب و تکرار پذیر ایجاد کرد.

بحث و نتیجه گیری

این بیوسنسور در محیط سرمی تست گردید و توانست میکرو ار ان ای ۱۳۴ موجود در سرم را تشخیص دهد به این معنی که میتواند از نمونه خونی که از بیماران مانیا گرفته می شود میکرو ار ان ای ۱۳۴ را شناسایی کند و باعث تشخیص بیماری در زمان سریعتر شود.

کلمات کلیدی

مانیا، نانوفناوری، نانوذرات، کوانتوم دات، میکرو RNA 134

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۱
۱-۱. بیماری دو قطبی (مانیا) ۲
۱-۱-۱. اپیدمیولوژی ۲
۱-۱-۲. علایم بالینی ۳
۱-۱-۳. تشخیص بیماری دو قطبی ۵
۱-۱-۴. درمان بیماری دو قطبی ۵
۱-۲.نانو فناوری ۶
۱-۳. نانو ذرات ۷
۱-۳-۱ :طبقه بندی نانو ذرات ۸
۱-۳-۱-۱: کوانتوم دات ۸
۱-۳-۱-۲: نانو ذرات فلزی ۹
۱-۳-۱-۳: نانو ذرات طلا ۱۲
۱-۴:محاسبات کمی خواص نوری نانو ذرات ۱۳
۱-۵: عوامل موثر بر پیک پلاسمون سطحی ۱۵
۱-۵-۱: ثابت دی الکتریک محیط ۱۵
۱-۵-۲: ترکیب ۱۶
۱-۵-۳: شکل و اندازه ۱۷
۱-۶: روش های تولید نانو ذرات فلزی ۲۰
۱-۷: سنتز نانو ذرات طلا با روش های شیمیایی ۲۱
۱-۸: تعیین اندازه نانوذرات ۲۳
۱-۹:کاربردهای نانوذرات طلا در آنالیز مواد ۲۴
۱-۹-۱: روش های اندازه گیری مبتنی بر تشکیل نانو ذرات فلزی ۲۴
۱-۹-۲:حسگرهای شیمیایی براساس تجمع نانو ذرات فلزی ۲۵
۱-۹-۳: حسگرهای شیمیایی براساس خاموشی نشر فلورسانس ۲۷
۱-۹-۴: حسگرهای شیمیایی براساس تغییر ضریب شکست محیط ۲۸
۱-۹-۵: افزایش پاسخ های طیف سنجی ۲۹
۱-۱۰: میکرو RNAها ۳۱
۱-۱۰-۱: miR-134 ..... ۳۱
۱-۱۱: هدف از تحقیق حاضر ۳۴
۱-۱۲: اهداف پایان نامه ۳۶
۱-۱۲-۱: هدف کلی ۳۶
۱-۱۲-۲: اهداف اختصاصی ۳۶
۱-۱۲-۳: اهداف کاربردی ۳۶
۱-۱۳: فرضیات یا سوالات تحقیق ۳۶
فصل دوم: مواد، دستگاه ها و روش ها ۳۷

۲-۱: معرف‌ها و مواد شیمیایی ۳۸
۲-۲: دستگاه ها ۳۹
۲-۳: سنتز کوانتوم دات CdTeQD ۳۹
۲-۴. سنتز پوسته-هسته QD@Au ۴۰
۲-۵. سنتز بیوسنسور Ps-QD@Au ۴۰
۲-۶. اندازه گیری miR-134 توسط بیوسنسور Ps-QD@Au ۴۱
۲-۷. ملاحظات اخلاقی ۴۱
فصل سوم: نتایج و بحث ۴۲
۳-۱: سنتز کوانتوم دات، پوسته – هسته و بیوسنسور ۴۳
۳-۲. مشخصه یابی نانوذرات و بیسنسور طراحی شده توسط اسپکتروسکوپی UV-Vis ۴۴
۳-۳. ریخت شناسی و بررسی اندازه و شکل نانوذرات و بیوسنسور طراحی شده توسط TEM و DLS ۴۷
۳-۴. بهینه سازی پارامترهای مختلف موثر بر روی عملکرد بیوسنسور ۴۹
۳-۴-۱. بهینه‌سازی حجم بیوسنسور (Ps-QD@Au) ۴۹
۳-۴-۲. بهینه‌سازی pH بافر ۵۰
۳-۴-۳. بهینه سازی مدت زمان ترسیب پروب های RNA (Ps) بر روی QD@Au ۵۴
۳-۴-۴. بهینه سازی مدت زمان انکوباسیون آنالیت با بیوسنسور ۵۶
۳-۵. منحنی کالیبراسیون و تعیین حد تشخیص بیسنسور طراحی شده ۵۷
۳-۶. مطالعه اثر گونه‌های مزاحم در بیوسنسور طراحی شده ۵۹
۳-۷. اندازه گیری miR-134 در نمونه‌های حقیقی توسط بیوسنسور طراحی شده ۶۰
فصل چهارم: نتیجه گیری و پیشنهادات ۶۱
۴-۱. نتیجه‌گیری ۶۲
۴-۲. پیشنهادهایی برای ادامه این کار پژوهشی ۶۳
منابع ٦٤

فهرست جداول

جدول ۲-۱مشخصات مواد شیمیایی به کار رفته..... ۳۸
جدول ۳-۱: داده های حاصل از اندازه گیری miR-134 در نمونه های حقیقی..... ۶۰

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱: اندازه نسبی ذرات در مقیاس نانو در مقایسه با مولکول های دیگر ۷
شکل ۱-۲: شکل های مختلف نانوذرات که تاکنون ساخته شده اند ۸
شکل ۱-۳: نمونه ای از نقاط کوانتومی نیمه هادی هسته-پوسته کادمیوم سلنید/روی سولفید با تغییر اندازه طول موج نشر آن تغییر کرده است. ۹
شکل ۱-۴: وجود رنگ قرمز و سبز در جام لیکرگوس به علت وجود نانوذرات طلا و نقره در شبکه بلوری شیشه ۱۰
شکل ۱-۵: نمونه هایی از نانو ذرات فلزی با شکل و اندازه مختلف. شکل سمت چپ تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانو ذرات طلا کروی ومیلهای(a,b) ونانو منشورهای نقره (c)و شکل سمت راست محلول کلوئیدی نانو ذرات آلیاژ طلا و نقره با افزایش غلظت طلا (d)، نانو میله های طلا با افزایش نسبت ابعادی (e) و نانو منشورهای نقره با افزایش اندازه جانبی را نشان میدهد. ۱۱
شکل ۱-۶: طیف خاموشی محاسبه شده بوسیله تئوری می برای نانو کره های طلا با قطر های مختلف از ۵ تا ۱۰۰ نانومتر ۱۴
شکل ۱-۷: پیک های جذب (منحنی قرمز رنگ)، پخش (منحنی سیاه رنگ) و خاموشی (منحنی سبز رنگ) محاسبه شده با تئوری می برای نانو ذرات کروی طلا با قطرهای (الف) ۲۰nm، (ب) ۴۰nmو (ج) ۸۰ nm ۱۵
شکل ۱-۸: پیک خاموشی نانو ذرات طلا ۲۰ نانومتر در محلولهایی با ضرایب دی الکتریک مختلف. ۱۶
شکل ۱-۹: وابستگی پیک پلاسمون به ترکیب نانوذرات. ۱۶
شکل ۱-۱۰: نوسان طولی و عرضی الکترون ها در نانو میله های فلزی ۱۸
شکل ۱-۱۱: پیک جذبی مرئی فرابنفش نانو میله های طلا با نسبت ابعادی مختلف. ۱۸
شکل ۱-۱۲: شکلA تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نانو قفس های طلا. شکلB بالا، محلول شامل نانو قفس های طلا که از تیتراسیون نانو مکعب های نقره توسط حجم های مختلفی از Au^{3+} تشکیل شده اند و شکلB پایین، طیف بدست آمده از محلول سوسپانسیون این نانو قفس ها رانشان میدهد ۱۹
شکل ۱-۱۳: شمای کلی روش های مختلف تهیه نانو ذرات فلزی ۲۱
شکل ۱-۱۴: کاهش نمک طلا به نانو ذرات طلا در حضور ترکیات فنولی و تشکیل پیک پلاسمونی ۲۵
شکل ۱-۱۵: شمای کلی حسگر شیمیایی بر اساس تجمع نانو ذرات طلا. ۲۶
شکل ۱-۱۶: تغییر رنگ نانو ذرات طلا از قرمز به آبی در اثر تجمع. ۲۶
شکل ۱-۱۷: خاموشی نشر فلورسانس رنگدانهFITC با قرار گرفتن بر روی سطح نانو ذرات طلا و افزایش دوباره پیک نشری آنها پس از افزودن یدید ۲۸
شکل ۱-۱۸: تغییر در ضریب شکست محیط اطراف نانو ذرات و جابجایی در پیک پلاسمون ۲۹
شکل ۱-۱۹: افزایش شدت رامان در اثر ایجاد پلاسمون سطحی بر روی نانو ذرات فلزی ۳۰
شکل ۱-۲۰: ساختار دو بعدی miR-134 ..... ۳۳
شکل ۱-۲۱: مراحل ساخت و بررسی عملکرد بیوسنسور میکرو RNA 134 ..... ۳۵
شکل ۳-۱: مراحل ساخت و عملکرد بیوسنسور miR-134. ..... ۴۳
شکل ۳-۲: طیف جذبی UV-Vis برای (A): CdTeQD (a)، AuNPs (b) و QD@Au (c) و (B): Ps-AuNPs (d)، (miR-134)-Ps-AuNPs (e)، Ps-QD@Au (f) و (miR-134)-Ps-QD@Au (g) (تصاویر الحاقی: تصویر واقعی از محلول های مورد نظر). ۴۵

شکل ۳-۳: آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای (A) CdTeQD، (B) QD@Au و (C) Ps-(miR-134)-QD@Au و آنالیز تفرق دینامیکی نور (DLS) برای (D) CdTeQD، (E) QD@Au، (F) Ps-QD@Au و (G) (miR-134)-Ps-QD@Au ۴۸
شکل ۳-۴: تاثیر غلظتPs-QD@Au در سرعت فرایند تجمع در غلظت های (A) ۰/۵، (B) ۱/۰، (C) ۱/۵ و (D) ۱/۷۵ mL از آن در حضور $\mu g.mL^{-1}$ ۰/۴ از miR-134 (هر طیف در فواصل زمانی min ۳ ثبت شده است)..... ۵۰
شکل ۳-۵: تغییرات طیف جذبی (A) Ps-QD@Au و (B) (miR-134)-Ps-QD@Au با تغییر pH..... ۵۲
شکل ۳-۶: (A)تغییرات شدت پیک پلاسمونی Ps-QD@Au و (B) اختلاف شدت جذب پیک پلاسمونی (miR-134)-Ps-QD@Au با Ps-QD@Au در طول موج ۵۲۵ (a) و ۶۲۵ nm (b) با تغییر pH..... ۵۳
شکل ۳-۷: جانشینی یون های سیترات با Ps بر روی سطح QD@Au..... ۵۴
شکل ۳-۸: (A) طیف جذبی و (B) تغییرات پیک پلاسمونی QD@Au با ترسیب Ps با گذشت زمان (هر طیف در فواصل زمانی min ۱۰ ثبت شده است)..... ۵۵
شکل ۳-۹: (A) طیف جذبی و (B) تغییرات پیک پلاسمونی Ps-QD@Au در حضور $\mu g.mL^{-1}$ ۰/۴ از miR-134 با گذشت زمان در طول موج ۵۲۵ (a) و ۶۲۵ nm (b) (هر طیف در فواصل زمانی min ۳ ثبت شده است).....۵۶
شکل ۳-۱۰: (A) طیف جذبی Ps-QD@Au در حضور غلظت های مختلف miR-134 ($ng.mL^{-1}$ ۰-۵۰۰) بعد از min ۲۱ زمان انکوباسیون (تصاویر الحاقی: تصویر واقعی از محلولهای مورد نظر). تغییرات شدت جذب ومنحنی کالیبراسیون در طول موج (B) ۵۲۵ nm و (C) ۶۲۵ nm..... ۵۸
شکل ۳-۱۱: مطالعه اثر مزاحمت و پاسخ بیوسنسور Ps-QD@Au برای میکروRNA های با یک ((miR(1)، دو ((miR(2)، چهار ((miR(3) و شش ((miR(4) باز نوکلئوتیدی متفاوت و miR-134 با غلظت $\mu g.mL^{-1}$ ۰/۴ در دو طول موج ۵۲۵ و ۶۲۶ nm..... ۶۰

فهرست اختصارات

نام اختصار	معادل انگلیسی	معادل فارسی
AuNPs	Gold Nanoparticles	نانوذرات طلا
DLS	Dynamic light Scattering	پراکندگی دینامیکی نور
miR	MicroRNA	میکرو آر ان ای
miR-134	MicroRNA 134	میکرو آر ان ای ۱۳۴
QDCdTe	CdTe Quantum dots	کوانتوم دات کادمیوم تلوراید
QD@Au	Core-shell QD@Au	پوسته-هسته کوانتوم دات در طلا
SPR	Surface Plasmon Resonance	رزونانس پلاسمون سطحی
TEM	Transmission electron microscopy	میکروسکوپ الکترونی عبوری