بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه دکتری داروسازی

عنوان

بررسی کینتیک اتصال گاماآریزانول به DNA و محاسبات ثابت اتصال با استفاده از تکنیک رزونانس پلاسمون سطحی

اساتید راهنما

دکتر محمد جوهری اهر

دکتر فرزانه فتحی

نگارنده

پویا عباسقلی‌زاده

پاییز ۱۴۰۰

تقدیم به :
ای پدر از تو هر چه می گویم باز هم کم می آورم

خورشیدی شدی و از روشنایی ات جان گرفتم و در ناامیدی ها نازم را

کشیدی و لبریزم کردی از شوق

اکنون حاصل دستان خسته ات رمز موفقیتم شد

به خودم تبریک می گویم که تو را دارم و دنیا با همه بزرگیش مثل تو را ندارد .....

و تو ای مادر، ای شوق زیبایی نفس کشیدن

ای روح مهربان هستی ام

تو رنگ شادی هایم شدی و لحظه ها را با تمام وجود از من دور کردی و

عمری خستگی ها را به جان خریدی تا اکنون توانستی طعم خوش

پیروزی را به من بچشانی

تقدیم به پدر مادرمهربانم که هر لحظه وجودم را از چشمه سارپراز عشق چشمانشان سیراب میکنند.....

تقدیم به برادر عزیزم پارسا و خواهر نازنینم پارمیدا که درهمه حال همراه و مشوقم بوده اند

تشکر و قدرداني:

بسیار سپاسگذارم:

از استاد گرامیم جناب آقای دکتر محمد جوهری چرا که

بدون راهنماییهای ایشان انجام این پایان نامه بسیار مشکل مینمود .

از سرکار خانم دکتر فرزانه فتحی

به دلیل یاریها و راهنماییهای بی چشمداشت ایشان که بسیاری از سختیها را برایم آسانتر نمودند.

چکیده:

مقدمه: پلاسمون رزونانس سطحی یک پدیده نوری است که به عنوان ابزاری نوین و کارا برای بررسی برهم کنش های بین یک آنالیت و زیست مولکول تثبیت شده بر روی سطح بکار می رود. در صورت پیوند بین آنالیت و زیست مولکول به دلیل تغییر ضریب دی اکتریک محیط، تغییر زاویه رزونانس اتفاق می افتد که با اندازه گیری این تغییر زاویه می توان به تغییرات غلظت رسید و حضور مواد مختلف و اتصالات آنها را بررسی کرد. γ اوریزانول یک ترکیب آنتی اکسیدانی موجود در روغن سبوس برنج است که از نظر خصوصیات آنتی اکسیدانی مشابه توکوفرول ها است. در سال های اخیر ترکیب γ اوریزانول به عنوان یک منبع تغذیه‌ای مورد توجه قرار گرفته است. برای شناخت بیشتر γ اوریزانول و نحوه اتصال آن با زیست ماکرومولکول ها، در این مطالعه کینتیک اتصال γ اریزانول به DNA بررسی و محاسبات ثابت اتصال با استفاده از تکنیک رزونانس پلاسمون سطحی و اسپکتروسکوپی فلورسانس انجام شد تا اطلاعات آن در دسترس جامعه علمی قرار گیرد.

روش کار: به طور خلاصه، جهت ایجاد گروه های کربوکسیلیک، ترکیب مرکاپتوآندکانوئیک اسید از روی سطح تراشه طلا ثبیت شد تا واکنش بین تیول مربوط به مرکاپتوآندکانوئیک اسید و طلای سطح تراشه کامل گردد و یک لایه از مرکاپتوآندکانوئیک اسید بر روی تراشه تشکیل شود. چون گروه های کربوکسیلیک اسید مرکاپتوآندکانوئیک اسید برای تشکیل پیوند آمیدی نیاز به فعال سازی دارند محلول ان هیدروکسی سوکسینیمید و ۱-اتیل ۳و۳ دی متیل آمینوپروپیل کربودی ایمید از روی تراشه طلا عبور داده شد تا در مرحله بعدی رشته DNA با انتهای آمین به آن متصل شود. در نهایت، DNA با انتهای آمینی از روی تراشه به آرامی عبور داده شد تا پیوند آمیدی برای تثبیت DNA تشکیل گردد. جهت بررسی تمایل اتصال γ اوریزانول به DNA، غلظتهای مختلف از آن در سه دمای مختلف ۲۵، ۳۱ و ۳۷ درجه سانتی گراد از روی تراشه عبور داده شد تا بتوان از روی نتایج حاصل از سنسوگرام پارامترهای کنیتیک اتصال بدست آورد.

یافته ها: نتایج حاصل از مطالعات SPR نشان داد که بهترین دما برای اتصال γ اوریزانول به DNA دمای ۳۷ درجه سانتی گراد می باشد که نتایج حاصل از بررسی های اسپکتروسکوپی فلورسانس نیز آنها را تایید می کند. ثابت اتصال بدست آمده از SPR و طیف سنجی فلورسانس نشان داد که γ اوریزانول به DNA با تمایل نسبتا بالای متصل می شود.

نتیجه گیری: در مطالعه حاضر، برای اولین بار مطالعات برهمکنش بین γ-اوریزانول و DNA با استفاده از روش SPR و طیف سنجی فلورسانس صورت گرفت. محاسبات ثابت اتصالγ -اوریزانول و DNA این نکته را اثبات کرد که γ-اوریزانول میل ترکیبی قابل توجهی با DNA دارد و فعل و انفعالات واندروالسی و پیوند های هیدروژنی نقش مهمی در شکل گیری این اتصالات دارند. بنابراین پیشنهاد می شود مطالعات تکمیلی سمیت در این رابطه در مطالعات آینده صورت گیرد.

کلید واژه ها: رزونانس پلاسمون سطحی، γ اوریزانول، اسید نوکلئیک، اسپکتروسکوپی فلورسانس

فهرست مطالب

چکیده: ..... أ
فهرست مطالب ..... ب
فهرست اشکال ..... ث
فهرست جداول ..... ج
فهرست اختصارات ..... ح
۱ -مقدمه ۲
۱ - ۱ -روغن سبوس برنج و Γ اوریزانول ۲
۱-۲-پلاسمون ۶
۱ - ۳ -رزونانس پلاسمون سطحی ۷
۱ - ۴ -انواع رزونانس پلاسمون سطحی ۸
۱ - ۴ - ۱ -پلاسمون سطحی آکوستیک ۸
۱ - ۴ - ۲ -پلاسمون سطحی انتشاری: ۸
۱ - ۴ - ۳ -پلاسمون سطحی مستقر ۹
۱ - ۴ - ۴ -عوامل موثر بر پلاسمون سطحی ۱۰
۱ - ۵ -بیوسنسور ۱۱
۱ - ۶ -بیوسنسورهای بر پایه رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) ۱۲
۱ - ۶ - ۱ -نحوه عملکرد دستگاه SPR ۱۴
۱ - ۶ - ۲ -سنسوگرام (منحنی پاسخ SPR) ۱۶
۳-۶-۱-تراشه طلا ۱۷
۴-۶-۱-روش های تثبیت لیگاند در سطح تراشه ۱۸
۱ - ۶ - ۵ -انواع تراشه های آماده تجاری SPR ۲۲
۱-۷-کاربرد و چشم انداز بیوسنسورهای بر پایه SPR ۲۴
۱ - ۸ -هدف از تحقیق حاضر ۲۷
۲ -فصل دوم: مواد، دستگاهها و روش‌ها ۲۹
۲ - ۱ -معرف ها و مواد شیمیایی ۲۹
۲ - ۲ -دستگاههای مورد استفاده ۳۰
۲ - ۳ -تهیه محلول ها و بافر ۳۰
۲ - ۳ - ۱ -تهیه بافر فسفات (PBS) ۳۰
۲ - ۳ - ۲ -تهیه محلول Γ-اوریزانول ۳۰
۲ - ۳ - ۳ -تهیه محلول DNA ۳۱
۲ - ۳ - ۴ -تعیین خلوص محلول DNA ۳۲

۲-۴-بررسی نحوه برهمکنش Γ-اوریزانول با DNA ۳۲
۲ - ۴ - ۱ -مطالعات طیف سنجی فلورسانس ۳۲
۲ - ۴ - ۲ -تعیین ثابت خاموش سازی استرن-ولمر و ثابت اتصال ظاهری با استفاده از طیف فلورسانس ۳۳
۲ - ۴ - ۳ -مطالعات رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) ۳۴
۲ - ۴ - ۴ -آنالیز ترمودینامیکی ۳۶
۲ - ۵-نرم افزارهای استفاده شده در کار پژوهشی حاضر ۳۷
۲ - ۶ -ملاحظات اخلاقی ۳۸
۳ -نتایج و بحث ۴۰
۱-۳-مشخصه یابی برهمکنش Γ-اوریزانول و DNA توسط طیف سنجی فلورسانس ۴۰
۳ - ۲ -تعیین ثابت خاموش سازی استرن-ولمر با استفاده از طیف فلورسانس ۴۰
۳ - ۲ - ۱ -تعیین ثابت اتصال ظاهری با استفاده از طیف فلورسانس ۴۲
۳ - ۳ -طراحی بیوسنسور نوری بر پایه توسط SPR ۴۵
۳ - ۳ - ۱ -مشخصه یابی مراحل ساخت بیوسنسور توسط SPR ۴۶
۳ - ۳ - ۲ -بررسی سینتیک برهمکنش Γ-اوریزانول با DNA توسط SPR ۴۸
۳ - ۴ -مطالعه ترمودینامیک برهمکنش Γ-اوریزانول با DNA ۵۰
۴- نتیجه گیری و پیشنهادات ۵۳
۴-۱- نتیجه گیری ۵۳
۴– ۲ پیشنهادات ۵۳
۵-منابع ۵۴
ABSTRACT I

فهرست اشکال

شکل ۱-۱: ساختار های اصلی Γ-اوریزانول [۶]. ۴
شکل ۱-۲: برهمکنش میدان الکتریکی اشعه الکترومغناطیس با الکترونهای نانوذرات فلزی و رزونانس پلاسمون [۱۶]. ۷
شکل ۱-۳: رزونانس پلاسمون سطحی انتشاری [۲۲]. ۹
شکل ۱-۴: رزونانس پلاسمون سطحی مستقر در نانوذرات هسته-پوسته نقره/کبالت که نور ورودی باعث جابجایی ابر الکترونی نسبت به هسته میشود و به دنبال آن باعث رزونانس میدان مغناطیسی در طولموج رزونانسی میشود [۲۳]..... ۹
شکل ۱-۵: رزونانس مقایسه طیف جذبی نانوذرات کروی و میله ای شکل طلا [۲۴]..... ۱۰
شکل ۱-۶: تصویر شماتیک از اجزا و عملکرد یک بیوسنسور [۲۵]. ۱۲
شکل ۱-۷: شماتیکی از اصول اندازه گیری SPR ۱۵
شکل ۱-۸: منحنی سنسوگرام SPR [۲۸]. ۱۷
شکل ۱-۹: تراشه طلا در SPR ۱۸
شکل ۱-۱۰: انواع تراشه های طلای اصلاح شده [۳۲] ۲۳
شکل ۳-۱: طیف فلورسانس با طول موج تحریکی ۲۸۰ نانومتر برای غلظت های مختلف DNA (H) ۰، (G) ۵/۷۴، (F) ۱۱/۴۸، (E) ۱۷/۲۲، (D) ۲۲/۹۶، (C) ۲۸/۷، (B) ۳۴/۴۴و (A) ۳۵/۹، در غیاب (A) و در حضور (B، C، D، E، F، G و H) ۵۰ میکرولیتر Γ-اوریزانول و در دماهای (A) ۲۵، (B) ۳۱ و (C) ۳۷ درجه سانتی گراد.. ..... ۴۱
شکل ۳-۲: نمودار خطی استرن ولمر برای خاموشی فلورسانس Γ-اوریزانول طی برهمکنش با DNA در دماهای (A) ۲۵، (B) ۳۱ و (C) ۳۷ درجه سانتی گراد..... ۴۳
شکل ۳-۳: نمودار خطی Hu et al برای خاموشی فلورسانس Γ-اوریزانول طی برهمکنش با DNA در دماهای (A) ۲۵، (B) ۳۱ و (C) ۳۷ درجه سانتی گراد..... ۴۴
شکل ۳-۴: مراحل ساخت بیوسنسور SPR و نحوه عملکرد آن..... ۴۶
شکل ۳-۵: سنسوگرام مراحل تثبیت DNA بر روی تراشه. (A) کانال آزمایش و (B) کانال مرجع. ۴۷
شکل ۳-۶: شیف زاویه SPR برای (A) تراشه طلا برهنه، (B) بعد از اصلاح با MUA و (C) بعد از تثبیت DNA. ۴۷
شکل ۳-۷: سنسوگرام سنتیکی اثر برهمکنش Γ-اوریزانول و DNA برای غلظت های مختلف از Γ-اوریزانول (۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرومولار) (سرعت جریان: ۳۰ میکرولیتر در دقیقه، زمان تزریق: ۲ دقیقه و دماهای (A) ۲۵، (B) ۳۱ و (C) ۳۷ درجه سانتی گراد). ۴۹
شکل ۳-۸: نمودار خطی Van't Hoff برای مطالعه برهمکنش ترمودینامیکی Γ-اوریزانول و DNA با استفاده از فلورسانس. ۵۱
شکل ۳-۹: نمودار خطی Van't Hoff برای مطالعه برهمکنش ترمودینامیکی Γ-اوریزانول و DNA با استفاده از SPR. ۵۱

فهرست جداول

جدول ۱-۱ نام، وزن مولکولی و فرمول تجربی ترکیبات اصلی Γ-اوریزانول [۵]. ۳
جدول ۱-۲ برخی از انواع کاربردهای SPR ۲۵
جدول ۲-۱ مشخصات مواد شیمیایی مورد استفاده.....۲۹
جدول ۳-۱ پارامترهای خاموش سازی برهمکنش Γ-اوریزانول و DNA بر اساس نمودار استرن ولمر و مطالعات فلورسانس .۴۵
جدول ۳-۲ پارامترهای سنتیکی برهمکنش Γ-اوریزانول و DNA بر اساس مطالعات فلورسانس ۴۵
جدول ۳-۳ پارامترهای سنتیکی و ترمودینامیکی کمپلکس Γ-اوریزانول-DNA با استفاده از تکنیک SPR. ۴۸

فهرست اختصارات

نام اختصار	معادل انگلیسی	معادل فارسی
DNA	Deoxyribonucleic acid	دزوکسی ریبونوکلئیک اسید
k_a	Association rate constant	ثابت سرعت اتصال
K_b	Binding constant	ثابت اتصال ظاهری
k_d	Dissociation rate constant	ثابت سرعت تفکیک
K_D	Dissociation constant	ثابت تفکیک
K_{sv}	Stern–Volmer quenching constant	ثابت خاموش سازی استرن–ولمر
K_q	Quenching constant	ثابت سرعت خاموش سازی
MCH	Mercaptohexanol	مرکاپتو هگزانول
MUA	11-Mercaptoundecanoic acid	۱۱–مرکاپتوآندکانوئیک اسید
Orz	γ-Oryzanol	γ اوریزانول
SPR	Surface Plasmon Resonance	رزونانس پلاسمون سطحی
τ_0	Fluorescence life time	طول عمر فلورسانس