

طراحی و ساخت نانوحسگر زیستی بر پایه نانو ذرات اکسید گرافن برای شناسایی ویروس برگ بادبزی مو

Designing and Constructing of Nano Biosensor Based on Grafen Oxide Nano Particles for Detection of Grapevine Fanleaf Virus (GFLV)

فاطمه شکری^۱، مهرداد صالح زاده^{۲*}

Fatemeh Shokri¹ and Mehrdad Salehzadeh^{2*}

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه

۲- کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

1- M.S.c of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, The Islamic Azad
University of Maragheh

2- M.S.c of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mehrdadsalehzadeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۴/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۱۵)

چکیده

مخرب‌ترین بیماری ویروسی شناخته شده در گیاه مو، ویروس برگ بادبزی مو است که هر ساله موجب خسارت جبران‌ناپذیری در تاکستان‌ها می‌شود. از آنجایی که سطح زیر کشت انگور نسبت به سایر محصولات چشم‌گیر بوده و انتقال و انتشار گسترده آن از طریق مواد رویشی انجام می‌شود، شناسایی دقیق این بیماری در تاکستان‌ها با استفاده از یک روش سریع با حساسیت بالا، ضروری است. در این پژوهش به منظور طراحی یک نانوحسگر زیستی بر پایه اکسید گرافن از cDNA ژن کت پروتئین (CP) مربوط به ویروس برگ بادبزی مو استفاده شد. اساس کار در این حسگر، فلورسانس نشی حاصل از پروب DNA نشان‌دار می‌باشد که در صورت هیبرید شدن DNA پروب با DNA مربوط به ژن CP فلورسانس نشی مشاهده شده و با استفاده از دستگاه فلوریمتری اندازه‌گیری می‌شود. به منظور بهینه‌سازی نانوحسگر تمام فاکتورهای زمان اتصال پروب DNA به گرافن اکسید، غلظت گرافن اکسید، زمان هیبریداسیون DNA مکمل به پروب DNA نشان‌دار و غلظت DNA مکمل به منظور هیبریداسیون با پروب متصل به گرافن اکسید مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمایشات نشان داد که نانوحسگر طراحی شده قابلیت شناسایی ژن CP را داشته و می‌تواند ویروس برگ بادبزی مو را با کارایی بالا تا 10^{-13} مول بر لیتر شناسایی نماید.

واژه‌های کلیدی

اکسید گرافن،
فلورسانس،
ویروس برگ بادبزی مو،
نانوحسگر زیستی،
هیبریداسیون

مقدمه

انگور *Vitis vinifera* به صورت تجاری پرورش داده می شود و بیش از ۵۴۰۰ رقم از گونه *vinifera spp* تحت ۲۴۰۰ نام در نقاط مختلف دنیا انتشار دارد. همچنین بیماری های ویروسی و شبه ویروسی هر سال موجب خسارات جبران ناپذیری به بخش کشاورزی از جمله مو می شوند (Martelli, 2009). این ویروس، در صورت آلودگی شدید، باعث کاهش تشکیل میوه و کاهش عملکرد تا ۸۰ درصد می شود (Hinkle, 1995). این ویروس به طور طبیعی توسط نماتد انتقال می یابد. با این حال، بخشی از آلودگی و شیوع آن در نتیجه تکثیر با قلمه، پیوندک و نهال های آلوده است (Hewitt et al, 1958). ویروس برگ بادبزی مو چندوجهی با قطر ۲۸ نانومتر بوده و مشتمل بر ۳ بخش غیرقابل تشخیص سرولوژیکی از لحاظ چگالی است که T (بالا) ، M (متوسط) و B (پایین) نامیده می شوند (Quacquarelli et al, 1976; Brown et al, 1995; Mayo and Robinson, 1996). اجزای بخش T اسکلت خالی، اجزای بخش M حامل RNA 1 و بخش B شامل هر دو رشته RNA می باشد. ژنوم GFLV شامل دو رشته RNA مثبت تکلا با وزن مولکولی $2/4 \times 10^6$ برای رشته RNA1 و $1/4 \times 10^6$ برای رشته RNA2 است، برای ایجاد آلودگی هر دو رشته RNA1 و RNA2 مورد نیازند (Andret-Link et al, 2004; Quacquarelli et al, 1976).

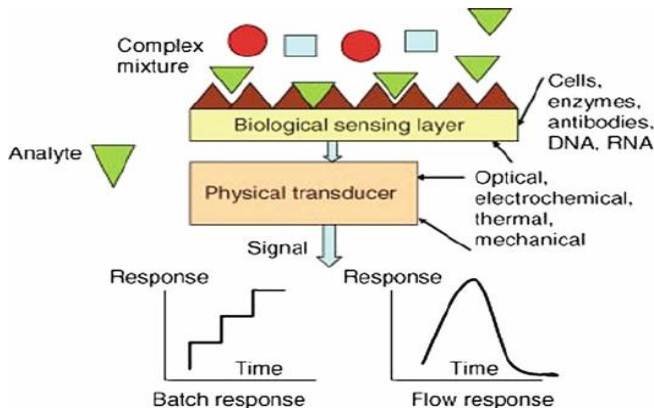
حسگر زیستی یا بیوسنسور نام گروهی از حسگرها است و به گونه ای طراحی می شوند تا تنها با یک ماده خاص واکنش نشان دهند. نتیجه این واکنش به صورت پیام هایی در می آید که یک ریزپردازنده، می تواند آن ها را تحلیل کند. پیشرفت های زیادی در زمینه حسگرهای زیستی به دست آمده است. طبق تعریف اتحادیه بین المللی شیمی کاربردی و محض International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) حسگر زیستی (شکل-۱) عبارت است از: ابزاری که با استفاده از واکنش های بیوشیمیایی خاصی، به واسطه آنزیم ها یا ایزوله، بافت ها یا سلول ها،

عناصر شیمیایی ماده مورد نظر را به طور معمول به صورت الکترونیکی، اپتیکی و یا گرمایی آشکارسازی کند (Monosik et al, 2012).

نخستین بار مفهوم حسگرهای زیستی توسط دکتر کلارک برای اندازه گیری غلظت گلوکز برای بیماران دیابتی توسط آنزیم گلوکز اکسید (GOX) معرفی شد (Clark & Lyons, 1962). آنزیم، آنتی بادی، نوکلئیک اسید، لکتین، هورمون، ساختار سلول یا بافت می تواند به عنوان عنصر بیولوژیکی استفاده شود. نقش عنصر بیولوژیکی، ارتباط برقرار کردن با آنالیت (مواد مورد تجزیه) هدف است که نتیجه واکنش شیمیایی از طریق مبدل به علامت قابل اندازه گیری تبدیل می شود. سیستم مبدل می تواند الکترونیکی، نوری، حرارتی، یون حساس، مغناطیسی یا صوتی باشد. بخش خیلی مهم در ساخت حسگر زیستی تثبیت عنصر بیولوژیکی می باشد. تثبیت مولکول ها به فاکتورهایی از قبیل شرایط فیزیکی و شیمیایی (pH و دما)، ضخامت و ثبات مواد بستگی دارد (Kissinger, 2005). عناصر بیولوژیکی عامل اصلی گزینش در حسگر زیستی محسوب می شوند که عمدتاً در پنج گروه آنزیم، آنتی بادی، اسیدنوکلئیک، ساختارهای سلولی و سلول ها تقسیم بندی می شوند (Finti et al, 2005). در مورد کارهایی که صورت گرفته دو نوع پروب شامل MBs (magnetic Beads-Based) sensor و پروب عقربی Scorpion probe را برای ردیابی ویروس برگ بادبزی مو از مواد گیاهی و نماتد طراحی کرده اند (Finti et al, 2005). پروب های طراحی شده (جدول ۱) گروهی از مولکول های فلورسنت خود هیبریدشونده را شامل می شود، که مولکولی فلورسنت [FAM] (carboxyfluorecein) و ROX (-6-carboxy-X-rodamine) به یک انتهای سنجاج موئی و یک مولکول خاموش کننده [DABCYL (4-(4-dimethyl-aminophenylazo))] (benzoic acid) به انتهای دیگر متصل شده و از نشر فلورسنتس ممانعت می کند. زمانیکه پروب به DNA مکمل (ویروس) متصل می شود، ساختار سنجاج موئی خطی شده و گروه فلورسنتاز خاموش کننده دور شده و نور فلورسنتس نشر می یابد. توالی پروب های طراحی شده عبارتند از:

جدول ۱ - پروب های طراحی شده برای شناسایی ویروس GFLV

| Table 1- Probes for detection of GFLV | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|---------------|
| | Sequence | Position (nt) |
| Scorpion probe (forward) | GCTCGAAATATATGTGTGTA | 951-970 |
| Scorpion probe (reverse) | GCTCGACCCTCAGATA | 1254-170 |
| MBs (forward) | (G/A)AGGTTGCATTTCAV(G/A)T | 2431-2447 |
| MBs (reverse) | CA-TT(G/A)AAAAC(A/T)CCTGGGT | 2559-2576 |

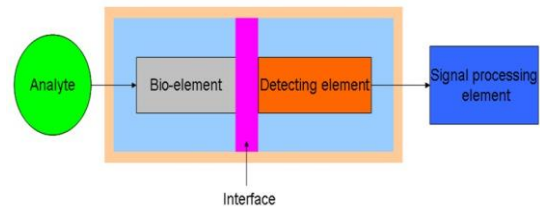


شکل ۲- شماتیک واکنش شناسایی پیشنهاد شده

Figure 2- Schematic of the proposed identification method

در غیاب Hg^{2+} ، گرافن اکسید پروب های DNA (DNA کمکی، HP1 و HP2) را با واکنش های غیرکووالانت جذب کرده و فلورسانس HP1 خاموش می شود. در حالی که در حضور Hg^{2+} ، DNA کمکی HP1 را با تشکیل ساختار محکم T- Hg^{2+} -T باز کرده و منجر به هیبریداسیون پیوسته HP1-HP2 می شود، که نتوانسته جذب گرافن اکسید شده، در نتیجه تولید فلورسانس افزایشی می شود.

لو و همکاران صفحه گرافنی برای شناسایی مولکول های زیستی طراحی کرده و قابلیت محلول بودن در آب صفحات گرافن اکسیدی را برای شناسایی دقیق DNA و پروتئین ها ثابت کردند (شکل ۳). آن ها پیش بینی کردند که گرافن اکسید بتواند به DNA رنگی متصل شده و فلورسانس را به طور کامل فرونشاند (مرحله a شکل ۳). در حضور DNA هدف، در نتیجه اتصال DNA رنگی و مولکول DNA هدف، واکنش بین DNA رنگی و گرافن اکسید به هم می خورد. چنین واکنش هایی، DNA رنگی را از گرافن اکسید رها کرده، در نتیجه فلورسانس به حالت اولیه برمی گردد (Liu et al., 2010).



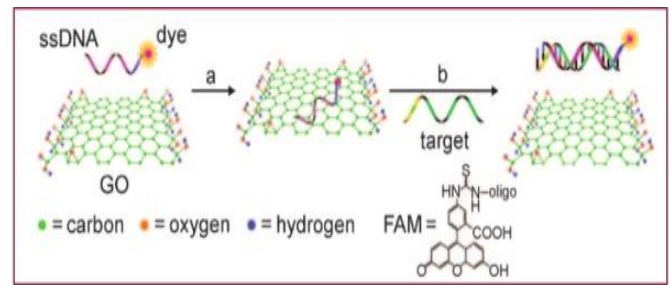
شکل ۱- شمایی از یک بیوسنسور

Figure 1- Schematic of a biosensor

هر دو پروب ابزارهای تشخیص مفیدی برای شناسایی ویروس در مواد رویشی و نماتدهای ناقل ویروس می باشد. هوانگ و همکاران حسگر زیستی فلورسنت مبتنی بر گرافن اکسید را برای شناسایی جیوه از طریق واکنش های زنجیره هیبریداسیون (hybridization chain reactions) طراحی کردند و از آنجایی که مسمومیت به جیوه اثرها سوء بر سلامت انسان دارد، این حسگر روشی با حساسیت و قدرت انتخاب فوق العاده بالا برای شناسایی جیوه در محلول های آبی است (Huang et al., 2014). در این سیستم شناسایی، دو پروب سنجاق موئی 1 hairpin DNA probe 2 DNA probe 2 (HP2 and hairpinHP1) طراحی شده است. برای تحریک واکنش های زنجیره هیبریداسیون (HCRs) سنجاق موئی، شیمی تناسب تیمین-جیوه-تیمین (T- Hg^{2+} -T) استفاده شده است که منجر به افزایش فلورسانس می شود. HCRs به طور وسیعی برای شناسایی DNA و پروتئین ها استفاده شده بود و اولین بار در این بررسی برای شناسایی جیوه استفاده شده است (شکل ۲).

نانوذرات طلا چندگانه منجر به افزایش کارایی خاموش‌کنندگی گرافن اکسید می‌شود. زمانی که ترکیب $ab\text{-DNA-AuPNs}$ به سلول هدف که به گرافن اکسید متصل شده به طور انتخابی متصل می‌شود، کاهش نشر فلورسنس گرافن اکسید به عنوان خاموش‌کننده تشخیص داده شد، بنابراین شناسایی سلول‌های هدف پاتوزنیک را توانا می‌سازد (Jung *et al.*, 2010).

بالاپانورو و همکاران استراتژی تبادل ساده یونی برای ترکیبات الکترواستاتیک گرافن اکسید با رنگ‌های سنتتیک برای ایجاد ترکیب انتقال بار یا انرژی گزارش کرده‌اند. مشتقات پیرین به جهت واکنش‌های غیرکووالانته با مولکول‌ها به کار گرفته می‌شوند. آن‌ها در حسگرهای زیستی، رنگ (1-pyrenyl-vinyl)-4-N-butylpyridinium bromide (PNPB) با بار مثبت و قابل حل در آب طراحی کرده‌اند، که می‌تواند با گرافن با بار منفی برای تشکیل ترکیب انتقال- بار خاموش‌کننده فلورسنس واکنش دهد که از این پس، $\text{PNP}+\text{GO}$ نامیده می‌شود. اصول آماده‌سازی صفحات شناسایی $\text{PNP}+\text{GO}$ بر مبنای الکترواستاتیک بی‌نظیر واکنش‌های غیرکووالانته بین آنالیت و $\text{PNP}+$ است، که فلورسنس خاموش شده روشن خواهد شد (Balapanuru *et al.*, 2010). لی و همکاران از صفحات گرافن اکسید برای شناسایی هیبریداسیون DNA خاصی از طریق انتقال انرژی تشدید فلورسنس استفاده کرده‌اند. زمانی که DNA پروب به سطح گرافن اکسید متصل شده با رشته DNA مکمل نانوذره طلا دار هیبرید می‌شود، شدت نشر صفحات گرافن به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. دانسته‌ها TEM نشان می‌دهند که نانو ذرات طلا ساختارهای تاخوردده و کناره‌ها به محض هیبریداسیون نانو ذرات طلا با چگالی حدود ۸۰ نانوذره در هر متر مربع پراکنده می‌شوند. این امر منجر به خاموش شدن فلورسنس ناقل انرژی فلورسنس بین نانو ذرات طلا و صفحات گرافن اکسید می‌شود (شکل ۴). نتایج نشان‌دهنده آن است که نانو مواد گرافن اکسید، که به آسانی در مقیاس بزرگ از یک منبع گرافیت ارزان سنتز می‌شود، می‌تواند طیف وسیعی از کاربردهای زیستی را در حسگرهای زیستی، تصویربرداری مولکولی و نانوبیوتکنولوژی داشته باشد (Liu *et al.*, 2010).

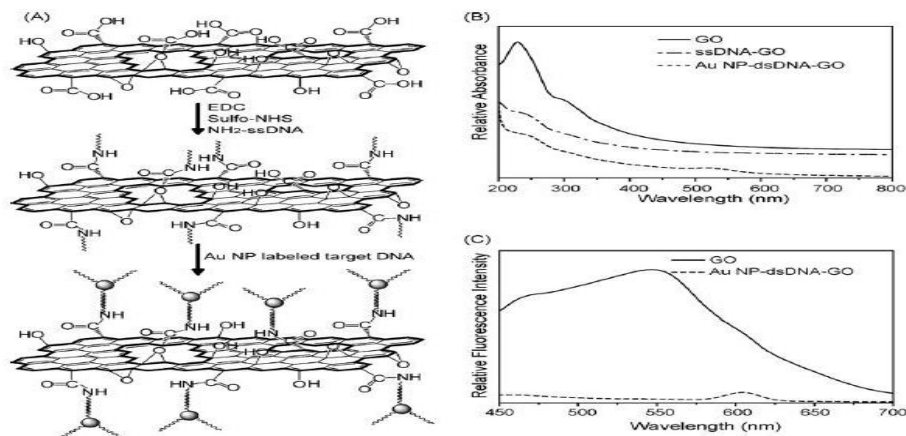


شکل ۳- نمایش شماتیک تغییر فلورسنس ترکیب ssDNA-FAM-GO.

FAM رنگ فلورسنس بر پایه فلورسین است.

Figure 3- Schematic of fluorescence change of ssDNA-FAM-GO composition. FAM is the fluorescence dye based on fluorescein.

این طرح می‌تواند در شناسایی بر اساس افزایش فلورسنس برای مولکول‌های هدف حساس و انتخابی نتیجه‌بخش باشد. آن‌ها برای تحقق بخشیدن به طرحشان، صفحه گرافن اکسید را برای شناسایی DNA مربوط به HIV1 را بررسی کردند. توالی ssDNA رنگی (P1) 5'-AGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGC-3' (FAM-3' FAM = رنگ بر پایه فلورسین)، و توالی DNA هدف شامل HIV1 عبارت است از: 5'-GCTAGAGATTTTCCCACTGACT-3' از توالی تکراری انتهای HIV-1)، و توالی ناجور HIV1 عبارت است از: (5'-GCTAGAGATTGTCCCACTGACT-3' زیر نوکلئوتید ناجور خط کشیده شده است. جانگ و همکاران حسگری زیستی- ایمنی بر پایه گرافن اکسید برای شناسایی رتروویروس (Retrovirus) به عنوان بیماری مدل طراحی کرده‌اند. شناسایی با قدرت و حساسیت بالا با خاموش‌کنندگی گرافن اکسید تحریک شده به وسیله انتقال انرژی شدت فلورسنس (FRET) بین ورق‌های گرافن اکسید و نانوذرات طلا (AuPNs) اتفاق می‌افتد. آنتی‌بادی‌های رتروویروس روی آرایه‌های از طریق واکنش آمیداسیون مرتبط با کاربوماید ثابت شده و سلول رتروویروس با واکنش آنتی‌بادی- آنتی‌ژن ویژه به دام می‌افتد. به دام افتادن سلول هدف با مشاهده خاموش‌کنندگی فلورسنس ناشی از گرافن اکسید با FRET بین GO و AuPNs بررسی شده است. آنتی‌بادی از طریق مولکول ssDNA به AuPNs متصل شده ($ab\text{-DNA-AuPNs}$), که مولکول DNA به عنوان واسط عمل کرده است. بنابراین، نانوذرات طلا نزدیک سطح گرافن اکسید قرار می‌گیرد. میل ترکیبی زیاد گروه‌های آمینونوکلئوتیدهای DNA برای



شکل ۴- تصویرسازی شماتیک حسگر زیستی DNA مبتنی بر GO-b نمودار جذب UV-vis، ssDNA-GO، GO، و Au NP-dsDNA-GO-C شدت فلورسنس نسبی Au NP-dsDNA-GO و GO

Figure4- Schematic of DNA biosensor based on GO-b of a absorption graphs UV-vis, GO,ssDNA-GO and Au NP- ds DNA-Goc and relative biosensor strength of GO and Au NP-ds_dna -GO

دقیقه اولتراسونیک شدند. برای خارج شدن گرافیت‌های واکنش نکرده محلول همگن شده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاوی گرافن اکسید بوده و برای استفاده‌های بعدی نگهداری شد. همچنین با استفاده از دستگاه‌های UV-Vis و FT-IR تهیه صحیح گرافن اکسید تایید گردید.

همچنین از دستگاه Transmission Electron Microscopy (TEM) به منظور تایید ابعاد نانومتری در گرافن اکسید استفاده شد (Daniela et al, 2010). در این تحقیق توالی مربوط به ژن Cp از سایت NCBI استخراج گردید. برای طراحی پرایمر و پروب‌های اختصاصی توالی ژن Coat protein چندین سویه ویروس برگ بادبزی مو انتخاب (تا نقاط حفاظت شده در همه سویه‌ها با هم مقایسه شوند) و با استفاده از نرم افزار Blast مقایسه شدند. در نهایت نقاط حفاظت شده مربوط به cp برای طراحی پروب مورد استفاده قرار گرفتند. پروب با نرم افزار Oligo 7 طراحی گردید. این پروب از شرکت سینا ژن خریداری شد (جدول ۲).

جدول ۲- توالی پروب آزمایش

Figure2- Probes of this experiment

| توالی پروب | توالی مکمل |
|--|------------------------|
| FAMTCC TCT TCC ACA TAC ACC CC C6 Amine | ggggTg TAT gTggAAgAggA |

مواد و روش‌ها

گرافن اکسید به روش هامر اصلاح شده، تهیه شد. در این روش، مقدار ۱۸ گرم $KMnO_4$ و ۳ گرم پودر گرافیت به خوبی در هاون با هم ساییده شدند. مخلوط ۹ به ۱ از H_2SO_4 و H_3PO_4 (۳۶۰/۴۰) تهیه شده و به طور سریع به مخلوط گرافیت و پتاسیم پرمنگنات افزوده شد. سپس دمای مخلوط واکنش در ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شده و به مدت ۱۲ ساعت در این دما همگن شد. پس از آن واکنش تا دمای اتاق سرد شده و ۴۰۰ml یخ به همراه ۳ml هیدروژن پراکسید ۳۰ درصد به آن افزوده شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. برای خروج یون‌های اضافی، مواد جامد حاصله دو مرتبه با آب دوبار تقطیر، سه مرتبه با هیدروژن کلراید ۳۰ درصد و در انتها دو مرتبه با اتانول ۹۸ درصد شسته شدند. برای هر بار شست و شو، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. پس از خشک شدن، جامدات به دست آمده به مدت ۲۰

دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده می‌شود. سپس محلول شماره ۱ بلافاصله بر روی یخ قرار گرفته و محلول (شامل پنج میکرولیتر RNA کل، یک میکرولیتر Oligo (dt) همچنین شش میکرولیتر آب DEPC و به حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر) ساخته و به آن اضافه شد. محلول نهایی در بن‌ماری با دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد. در پایان جهت غیرفعال شدن آنزیم، به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. cDNA ساخته شده (بافر RT (5x) چهار میکرولیتر، مخلوط dNTP (۱۰ میلی مولار) دو میکرولیتر، مهارکننده آنزیم RNase نیم میکرولیتر، آنزیم رونویس معکوس یک میکرولیتر، dH₂O نیم میکرولیتر و حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر)) تا زمان انجام واکنش PCR در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت. برای طراحی آغازگر ابتدا نیاز به توالی کامل ژن Cp مربوط به ویروس برگ بادبزی مو بود. جستجو توالی کامل ژن مربوطه در سایت NCBI صورت پذیرفت و با استفاده از نرم‌افزار الیگو طراحی آغازگر انجام گرفت. اندازه کل توالی ژن مربوط به ناحیه ی Cp در حدود ۳۵۵۵ نوکلئوتید بود (جدول ۴).

در این پروب، تثبیت از طریق پیوندهای $\pi-\pi$ می‌باشد. به این منظور در انتهای 5 پروب رنگدانه FAM اضافه شده و چون این رنگدانه در ساختار خود دارای حلقه بنزنی می‌باشد، بنابراین می‌تواند از طریق پیوندهای $\pi-\pi$ به سطح گرافن اکسید متصل گردد اتصال توالی Cp به توالی پروب متصل شده در سطح گرافن اکسید باعث جدا شدن پروب و تغییر طیف جذبی گرافن اکسید می‌شود. در نتیجه حضور DNA ویروس قابل ردیابی می‌باشد. برای تهیه بافر تریس (برای تنظیم pH محلول کاربرد دارد). با غلظت ۰/۰۲M و pH = ۷/۴، تریس به مقدار ۰/۲۴۲ گرم (هیدروکسی متیل آمینو متال) در ۱۰۰mM آب دیونیزه حل شده و pH در ۷/۴ تنظیم گردید، سپس مقادیر ۰/۵۸۴۴ گرم سدیم کلرید، ۰/۰۳۷۳ گرم پتاسیم کلرید و ۰/۰۱۲ گرم منیزیم کلرید به آن افزوده، خوب به هم زده شدند. ابتدا RNA کل از برگ‌های جمع‌آوری شده از باغات شهرستان مراغه با استفاده از کیت استخراج (sina clon) RNX-Plus استخراج گردید. بعد از تعیین غلظت RNA به روش اسپکتوفوتومتری، واکنش RT-PCR با توجه به جداول زیر انجام پذیرفت. محلول تهیه شده و در بن‌ماری با

جدول ۳- مقادیر مورد نیاز برای واکنش PCR

Table 3- The amount of materials required for PCR reaction

| ماده | غلظت | مقدار (میکرولیتر) |
|--|----------------|-------------------|
| بافرتکنیر (۱۰ x) (Cinnagen) | ۱X | ۲/۵ |
| محلول dNTP (۱۰ میلی مولار) (Cinnagen) | ۰/۴ میلی مولار | ۱ |
| آغازگر Reverse (Cinnagen) | ۱۰ پیکومول | ۰/۵ |
| آغازگر Forward (Cinnagen) | ۱۰ پیکومول | ۰/۵ |
| (Cinnagen) MgCl ₂ (50mM) | ۳ میلی مولار | ۲ |
| cDNA | ۱ میکرولیتر | ۱ |
| Fermentus DNA Enzyme (Cinnagen) 5unit/ μ l | ۱ واحد | ۰/۳ |
| آب ddH ₂ O | - | ۱۷/۲ |
| جمع | - | ۲۵ |

جدول ۴- شرایط واکنش PCR

Table 4- PCR reaction condition

| مرحله | دما | زمان |
|-----------------|---------|----------|
| (سانتیگراد) | | |
| Predenaturation | ۹۵ | ۵ دقیقه |
| Denaturation | ۹۵ | ۴۵ ثانیه |
| Annealing | ۵۴-۵۵ | ۴۵ ثانیه |
| Extension | ۷۲ | ۱ دقیقه |
| Final Extension | ۷۲ | ۱۰ دقیقه |
| تعداد سیکل‌ها | ۳۶ سیکل | |

تهیه محلول‌های تثبیت DNA روی سطح گرافن اکسید

به منظور بهینه‌سازی زمان اتصال پروب DNA، ابتدا ۱۹۷۵ میکرولیتر از بافر تریس HCL برداشته به فالكون ریخته شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از پروب DNA به آن افزوده شد و در نهایت ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید به محلول فوق اضافه گردید. محلول آماده به سل دستگاه (از جنس کوارتز و در محل تقاطع دو محور است) فلوری متری ریخته شد و در زمان‌های ۰، ۲، ۵، ۷، ۱۰، ۱۲، ۱۵ دقیقه با دستگاه فلوری متری طیف‌گیری انجام گرفت. در این آزمایش گرافن اکسید در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ میکرولیتر به ترتیب مورد آزمایش قرار می‌گیرد. در غلظت ۵ میکرولیتر گرافن اکسید، ۱۹۸۵ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL برداشته و درون فالكون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA به آن افزوده و در انتها ۵ میکرولیتر گرافن اکسید به آن اضافه شد. با توجه به دانسته‌های آزمایش، بهینه‌سازی زمان اتصال پروب DNA به گرافن اکسید، زمان مناسب ۱۰ دقیقه می‌باشد. در نتیجه بعد از گذشت ۱۰ دقیقه با دستگاه فلوری متری طیف‌گیری انجام شد. در غلظت ۱۰ میکرولیتر گرافن اکسید، ۱۹۸۰ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL برداشته و درون فالكون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA بر روی آن اضافه کرده و ۱۰ میکرولیتر گرافن اکسید به آن افزوده گردید. پس از سپری شدن ۱۰ دقیقه محلول در دستگاه فلوری متری طیف‌گیری شد. در غلظت ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید، میکرولیتر ۱۹۷۵ از محلول تریس بافر HCL برداشته و درون فالكون ریخته شد، ۱۰ میکرولیتر پروب DNA روی آن اضافه کرده و ۱۵ میکرولیتر

گرافن اکسید به آن افزوده گردید. بعد از ۱۰ دقیقه محلول در دستگاه فلوری متری طیف‌گیری گردید. در غلظت ۲۰ میکرولیتر گرافن اکسید، میکرولیتر ۱۹۷۰ از محلول تریس بافر HCL با سمپلر برداشته و درون فالكون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA بر روی آن اضافه شده و ۱۰ میکرولیتر گرافن اکسید به آن افزوده شد و بعد از سپری شدن ۱۰ دقیقه محلول در دستگاه فلوری متری طیف‌گیری شد. در غلظت ۲۵ میکرولیتر گرافن اکسید، میکرولیتر ۱۹۶۵ از محلول تریس بافر HCL با سمپلر برداشته و درون فالكون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA بر روی آن اضافه شده و ۲۵ میکرولیتر گرافن اکسید به آن افزوده شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه محلول در دستگاه فلوری متری طیف‌گیری انجام شد. در غلظت ۳۰ میکرولیتر گرافن اکسید، میکرولیتر ۱۹۶۰ از محلول تریس بافر HCL برداشته و درون فالكون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA بر روی آن اضافه کرده و ۳۰ میکرولیتر گرافن اکسید به آن افزوده گردید. پس از ۱۰ دقیقه، محلول در دستگاه فلوری متری طیف‌گیری شد. در غلظت ۳۵ میکرولیتر گرافن اکسید، میکرولیتر ۱۹۵۵ از محلول تریس بافر HCL با سمپلر برداشته و درون فالكون ریخته و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA بر روی آن اضافه و ۱۰ میکرولیتر گرافن اکسید به آن افزوده گردید. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه محلول در دستگاه فلوری متری طیف‌گیری انجام گردید. به منظور بهینه‌سازی زمان هیبریداسیون DNA مکمل به پروب DNA متصل به گرافن اکسید، ابتدا ۱۹۶۵ میکرولیتر از بافر تریس HCL را با سمپلر برداشته و در داخل فالكون اضافه گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از پروب DNA به فالكون اضافه گردید و با توجه به نتایج حاصل از آزمایش بهینه سازی غلظت اتصال گرافن اکسید به پروب DNA، ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید به محلول آماده شده افزوده شده و در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ دقیقه در دستگاه فلوری متری طیف‌گیری (اسپکتروسکوپی الکترومغناطیسی) انجام گردید.

تهیه محلول بهینه‌سازی غلظت DNA مکمل برای هیبریداسیون به پروب DNA متصل به گرافن اکسید

در این آزمایش DNA مکمل در غلظت‌های ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ میکرولیتر به ترتیب مورد آزمایش قرار می‌گیرد. در غلظت ۱

DNA مکمل به محلول اضافه شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه با دستگاه فلوری متری طیف‌گیری انجام گرفت. در غلظت ۲۵ میکرولیتر DNA مکمل، ۱۹۵۰ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL درون فالکون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA به آن افزوده و ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید به آن اضافه گردید و بعد از گذشت ۱۰ دقیقه، ۲۵ DNA میکرولیتر مکمل به محلول افزوده شد و بعد از گذشت ۱۰ دقیقه با دستگاه فلوری متری طیف‌گیری انجام گردید.

اضافه نمودن cDNA

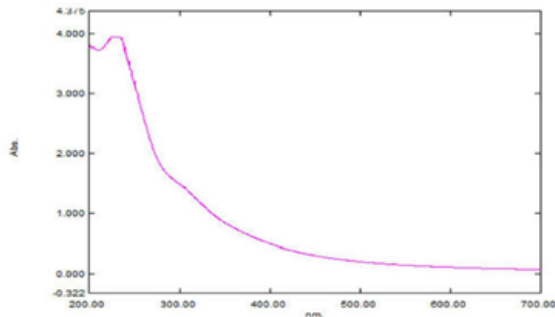
cDNA افزوده شد. ۱۹۵۰ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL درون فالکون ریخته و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA به آن افزوده و ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید به آن اضافه گردید. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه، ۲۵ میکرولیتر cDNA به محلول افزوده شد و بعد از گذشت ۱۰ دقیقه با دستگاه فلوری متری طیف‌گیری انجام گردید.

بررسی با نمونه DNA غیرمکمل

در یک بررسی دیگر از DNA غیرمکمل به عنوان جایگزین DNA مکمل ژن کد کننده پوشش پروتینی ویروس استفاده شد. ۱۹۵۰ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL درون فالکون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA به آن افزوده، ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید به آن اضافه گردید. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه، ۲۵ میکرولیتر DNA غیرمکمل به محلول افزوده شد، پس از گذشت ۱۰ دقیقه با دستگاه فلوری متری طیف‌گیری انجام گردید در این پروژه گرافن اکسید با استفاده از روش هامر تهیه شد و برای تایید آن از تجزیه و تحلیل UV-Vis، FT-IR و میکروسکوپ الکترونی TEM استفاده گردید. در شکل ۵ تهیه گرافن اکسید نشان داده شده است.

بعد از سنتز گرافن اکسید، برای تایید وجود گروه‌های عامل گرافن اکسید از طیف FT-IR استفاده شد. نتیجه آن در نمودار ۱ قابل مشاهده می‌باشد. در این شکل پیک 1375cm^{-1} نشان‌دهنده وجود گروه‌های (C=O) می‌باشد. نوار جذبی در محدوده ۲۵۰۰- 3500cm^{-1} به ارتعاش کششی گروه OH گروه کربوکسیلیک اسید مربوط می‌شود. گروه اسیدی پیک جذبی OH الکلی را پوشانیده است. نوار جذبی ظاهر شده در 1629cm^{-1} به ارتعاش کششی

میکرولیتر DNA مکمل، ۱۹۷۴ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL برداشته و درون فالکون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA به آن افزوده و ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید به آن اضافه شد و ۱۰ دقیقه نگهداری شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه، ۱ میکرولیتر DNA مکمل به محلول افزوده شد. با توجه به دانسته‌های آزمایش بهینه‌سازی زمان هیبریداسیون DNA مکمل به پروب DNA متصل به گرافن اکسید، زمان مناسب ۱۰ دقیقه می‌باشد، در نتیجه بعد از گذشت ۱۰ دقیقه با دستگاه فلوری متری طیف‌گیری انجام شد. در غلظت ۲ میکرولیتر DNA مکمل، ۱۹۷۳ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL درون فالکون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA به آن افزوده و ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید به آن اضافه گردید و بعد از گذشت ۱۰ دقیقه، ۲ میکرولیتر DNA مکمل به محلول افزوده شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه با دستگاه فلوری متری طیف‌گیری انجام شد. در غلظت ۵ میکرولیتر DNA مکمل، ۱۹۷۰ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL درون فالکون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA به آن افزوده و ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید به آن اضافه شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، ۵ DNA مکمل به محلول افزوده شده و بعد از سپری شدن ۱۰ دقیقه با دستگاه فلوری متری طیف‌گیری انجام شد. در غلظت ۱۰ میکرولیتر DNA مکمل، ۱۹۶۵ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL را برداشته و درون فالکون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA به آن افزوده شده و ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید به آن اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه، ۱۰ میکرولیتر DNA مکمل به محلول اضافه شده و بعد از گذشت ۱۰ دقیقه با دستگاه فلوری متری طیف‌گیری انجام گرفت. در غلظت ۱۵ میکرولیتر DNA مکمل، ۱۹۶۰ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL درون فالکون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA به آن افزوده و ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید به آن اضافه گردید. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه، ۱۵ میکرولیتر DNA مکمل به محلول افزوده شده و بعد از گذشت ۱۰ دقیقه با دستگاه فلوری متری طیف‌گیری انجام گردید. در غلظت ۲۰ میکرولیتر DNA مکمل، ۱۹۵۵ از محلول تریس بافر HCL را برداشته و درون فالکون ریخته شده و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA به آن افزوده گردید و ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید به آن اضافه گردید و بعد از سپری شدن ۱۰ دقیقه، ۲۰ میکرولیتر

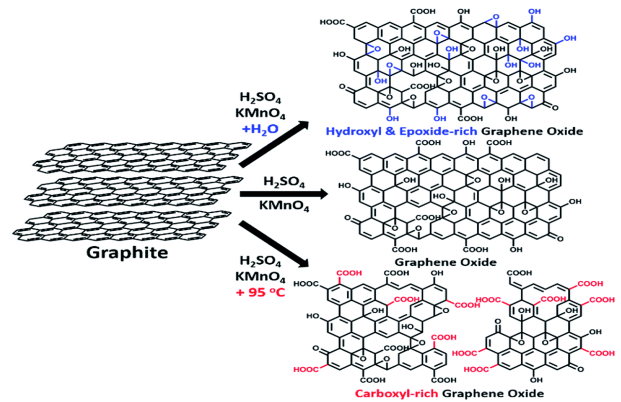


نمودار ۲- طیف UV-Vis گرافن اکسید
Diagram2- UV-Vis Graphene oxide spectrum

شکل TEM گرافن اکسید

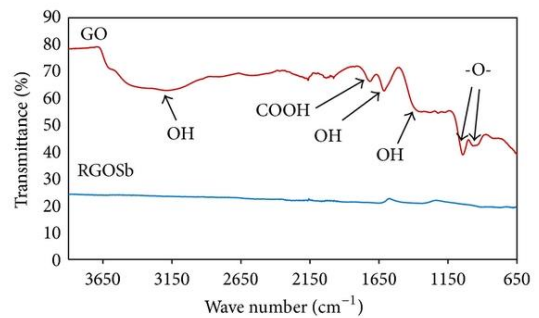
شکل زیر (شکل-۳) نتیجه عکس میکروسکوپ الکترونی گرافن اکسید سنتز شده می باشد. در نتایج TEM گرافن اکسید با ابعاد جانبی ۵۰۰ نانومتر تا ۳ میکرومتر قابل مشاهده می باشد، که برجستگی های بسیاری در مرکز و نیز تاخوردگی هایی در لبه های آن را شامل می شود. به منظور حفظ ثبات ترمودینامیکی، به طور معمول برجستگی و تاخوردگی در گرافن اکسید دوبعدی یافت می شوند. اگرچه مطالعات قبلی بیانگر این است که گروه های عاملی کربوکسیلیک اسید به صورت یکنواخت روی گرافن اکسید توزیع شده است. چنین به نظر می رسد که برجستگی و تاخوردگی تولید شده در طول فرآیند اکسایش، گروه های کربوکسیلیک اسید بیشتری را به عنوان نقص کریستالی دارند (Liu et al, 2010). چنانچه در شکل (شکل ۶) نشان داده شده، ساختار ورقه و رقی و چین خورده گرافن اکسید به خوبی نشان داده شده است که فرضیات گفته شده را تایید می کند.

گروه (C=C) آروماتیک مربوط می شود. نوار جذبی به دست آمده در 1183cm^{-1} ارتعاش کششی گروه (C-O) را نشان می دهد.



شکل ۵- واکنش تهیه گرافن اکسید

Figure5- Reaction of producing Graphene oxide



نمودار ۱- طیف FT-IR گرافن اکسید

Diagram1- FT-IR graphene oxide spectrum

تجزیه و تحلیل UV-Vis برای تایید گرافن اکسید

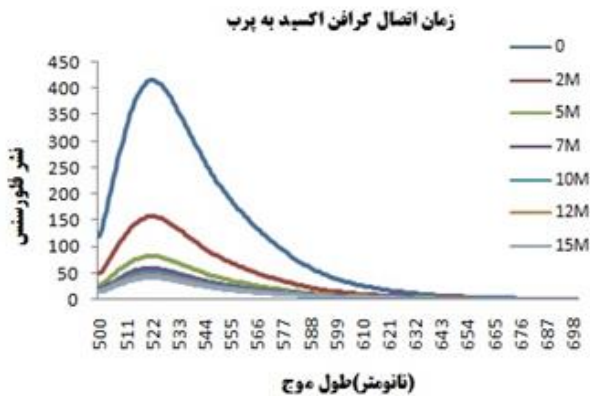
نتایج طیف جذبی UV-Vis گرافن اکسید در نمودار ۲ قابل مشاهده می باشد. گرافن اکسید در طول موج ۲۲۶ نانومتر دارای طیف جذبی UV می باشد. در این طیف یک جذب ضعیف در ۲۹۰ نانومتر وجود دارد که به انتقالات $\pi-\pi$ گروه C=O مربوط می شود (Liu et al, 2010).



شکل ۶- تصویر TEM ورقه گرافن اکسید حاوی ناهمواری

Figure 6- TEM image of graphene oxide sheet has rippling

در نظر گرفته شد. با توجه به خاصیت خاموش‌کنندگی گرافن اکسید از طریق پیوندهای $\pi-\pi$ پروب DNA و گرافن اکسید نشر فلورسنس کاهش یافته و خاموش می‌شود.



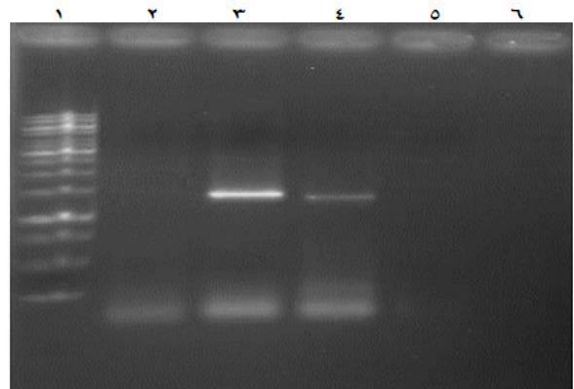
نمودار ۳- بهینه سازی زمان اتصال گرافن اکسید به پروب

Diagram3- Optimizing the time of Graphene oxide-probe incubation

واکنش قوی گرافن و گرافن اکسید با اسید نوکلئیک به وسیله پیوندهای $\pi-\pi$ شامل واکنش بین ساختارهای حلقه باز اسید نوکلئیک سلول‌های شش ضلعی گرافن و گرافن اکسید و در نتیجه خاصیت خاموش‌کنندگی گرافن و گرافن اکسید توسط وانگ و همکاران گزارش شده است (Wang et al., 2003). به منظور دستیابی به بهترین عملکرد شناسایی، غلظت گرافن اکسید با ۱۰ میکرولیتر پروب DNA بهینه شد. همان‌طور که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود، از غلظت ۵ تا ۱۰ میکرولیتر نشر فلورسنس به تدریج کاهش یافته، با افزایش غلظت از ۱۰ به ۱۵ میکرولیتر نشر فلورسنس به شدت کاهش یافته و خاموش‌کنندگی معنی‌داری مشاهده شد. در غلظت‌های بیشتر از ۱۵ میکرولیتر به بالا تغییرات جزئی مشاهده شد، بنابراین، غلظت ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید به عنوان غلظت بهینه در نظر گرفته شد. در این غلظت تمام مولکول‌های پروب DNA ژن *cp* به سطح گرافن از طریق پیوندهای $\pi-\pi$ اتصال پیدا می‌کنند. در اثر این اتصال با توجه به خاصیت خاموش‌کنندگی گرافن اکسید، نشر فلورسنس به‌طور کامل خاموش می‌شود. با گذشت زمان نور ساطع شده از پروب DNA افزایش یافت که به علت جدا شدن پروب DNA هیبرید شده با DNA مکمل می‌باشد و منجر به جدا شدن پروب DNA از سطح گرافن اکسید شد (نمودار ۵).

نتایج واکنش RT-PCR

واکنش RT-PCR برای تکثیر cDNA ژن CP انجام گرفت و نتایج حاصل روی ژل آگارز به صورت زیر مشاهده شد (شکل ۷).



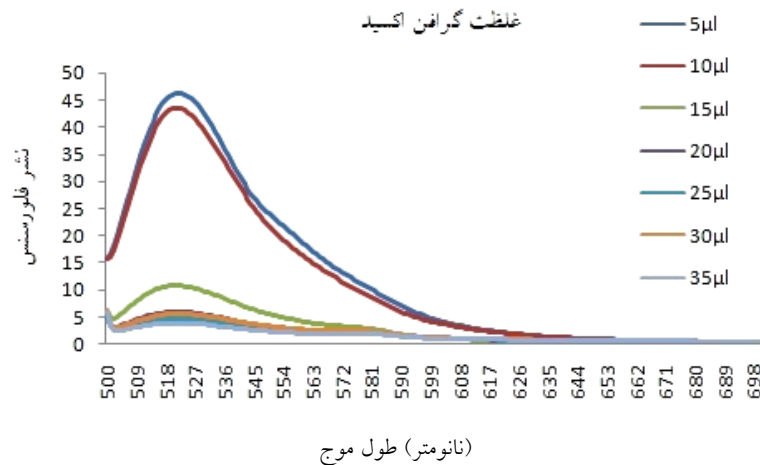
شکل ۷- الگوی الکتروفورز مربوط به نتیجه RT-PCR ژن CP ویروس برگ بادبزنی مو. چاهک شماره یک مربوط به نشانگر وزن مولکولی DNA چاهک دو نتیجه مربوط به گیاه عاری از ویروس برگ بادبزنی مو، چاهک سه مربوط به گیاه آلوده به ویروس برگ بادبزنی مو.

Figure 7- Agarose gel electrophoresis for RT-PCR results from CP gene of GFLV. Well number one related to ladder DNA. Well number two related to plant free of GFLV. Well number three related to plant infected with GFLV.

با استفاده از روش RT-PCR و جفت پرایمرهای اختصاصی برای ژن ناحیه CP از ویروس برگ بادبزنی مو وجود آلودگی در نمونه‌های مشکوک مشخص شد. این در حالی بود که هیچ بانندی در نمونه‌های عاری از ویروس مشاهده نگردید. مشابه این موارد در پژوهش‌ها دیگر نیز گزارش شده است (Zaki-Aghl et al., 2003). چنین مشاهداتی نشان می‌دهد که علایم ظاهری سالم گیاه برای اطمینان از سلامت قلمه‌ها و گیاهان کافی نیست و ضرورتاً باید از روش‌های تشخیص با دقت بالا برای تایید سلامت گیاهان تکثیری بهره گرفته شود.

آزمایش بهینه‌سازی زمان اتصال پروب DNA به گرافن اکسید

با افزایش زمان اتصال پروب DNA به گرافن اکسید از ۰ به ۲ دقیقه نشر فلورسنس به شدت کاهش یافت. از ۲ تا ۵ دقیقه با شیب ملایم کاهش و از ۵ تا ۱۰ دقیقه و ۱۰ دقیقه به بعد نشر فلورسنس به آرامی کاهش یافته و به ثبات رسید (نمودار ۳). بنابراین زمان بهینه اتصال پروب DNA به گرافن اکسید ۱۰ دقیقه

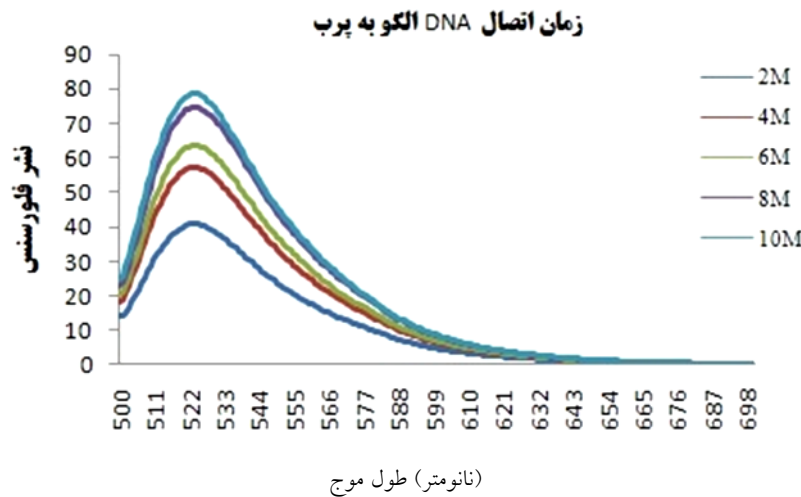


نمودار ۴- بهینه‌سازی غلظت اتصال گرافن اکسید به پروب DNA

Diagram 4- Optimizing the concentration of graphene oxide for attaching to DNA probe

فوق‌العاده زیاد گرافن اکسید، نشر فلورسنس DNA تک رشته‌ای در حضور گرافن اکسید به حداقل می‌رسد. در صورتی که با تشکیل ماریچ دورشته‌ای پروب با مکمل هدف، منجر به بازگشت فلورسنس و از بین رفتن خاصیت خاموش‌کنندگی گرافن اکسید می‌گردد.

از آنجایی که پیوند هیدروژنی DNA مکمل و پروب DNA از پیوندهای $\pi-\pi$ پروب DNA و گرافن اکسید قوی‌تر است و از طرفی در DNA دورشته‌ای حلقه‌های باز توسط فسفات با بار منفی محافظت شده و از سطح گرافن اکسید دفع می‌شود، در نتیجه نور فلورسنس منتشر می‌گردد. به علت خاصیت خاموش‌کنندگی



نمودار ۵- بهینه‌سازی زمان اتصال DNA مکمل به پروب DNA (با گذشت زمان نور ساطع شده از پروب DNA افزایش یافت).

Diagram 5- Optimizing time of incubation of cDNA with DNA probe (Over time, the light emitted from DNA of the primer increased).

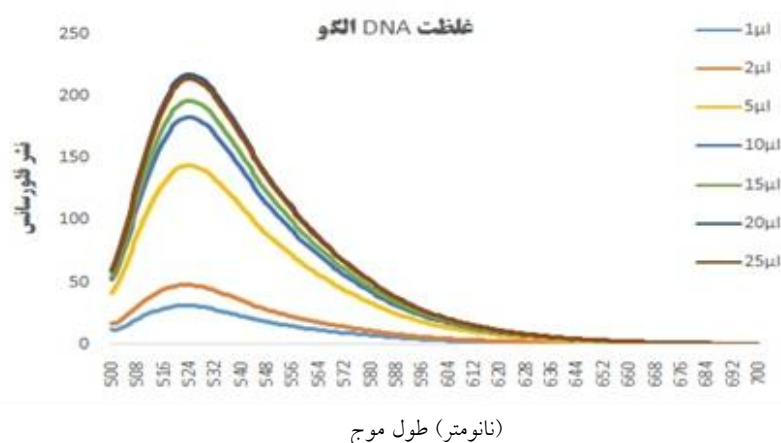
پدیده باعث جدا شدن پروب از سطح گرافن اکسید شده و نور فلورسنس ساطع شده از پروب DNA دوباره مشاهده شد. DNA مکمل با پروب DNA تشکیل DNA دورشته‌ای داده و

با افزایش غلظت DNA مکمل، نور فلورسنس پروب DNA افزایش یافت. بدین علت که، اضافه شدن DNA مکمل باعث هیبرید شدن بیشتر DNA مکمل با پروب DNA می‌شود، این

ترکیب GO-DNA مشاهده شد، درحالی که با افزودن DNA غیرمکمل، چنین افزایشی مشاهده نشد. اتصال بین DNA تک‌رشته‌ای پروب و DNA تک‌رشته‌ای مکمل ساختار را تغییر داده، متعاقباً DNA تک‌رشته‌ای پروب از سطح گرافن اکسید رها شده و در نتیجه به حالت اولیه برگشته و شناسایی cDNA تحقق یافت. لو و همکاران متصل شدن گرافن اکسید به پروب و خاموش شدن نشر فلورسنس را گزارش کرده‌اند که در حضور مکمل DNA دورشته‌ای تشکیل شده و پروب از سطح گرافن اکسید رها شده و نشر فلورسنس بازیابی می‌شود (Liu *et al.*, 2010).

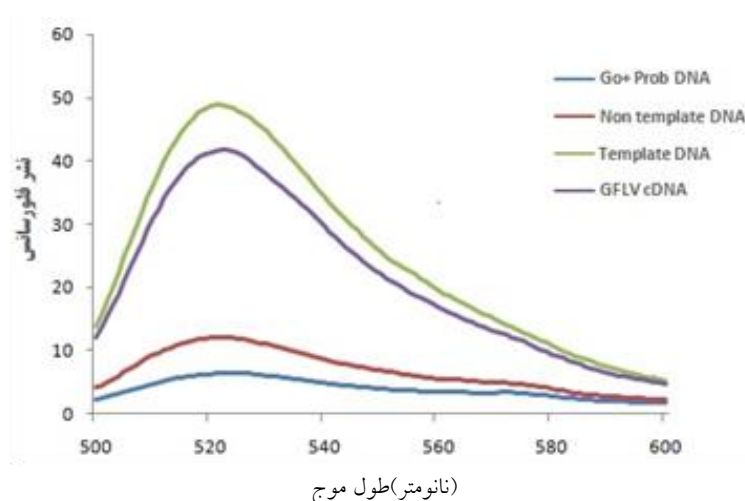
سپس از سطح گرافن اکسید دفع شد و در نتیجه نشر فلورسنس به حالت اولیه برگشت. لی و همکاران گزارش کرده‌اند که فلورسنس پروب به‌طور مشخص با گرافن اکسید خاموش می‌شود، در حالی که هیبریداسیون رشته پروب و رشته مکمل و تشکیل DNA دو رشته‌ای، منجر به ایجاد فلورسنس مجدد می‌شود (Li *et al.*, 2012).

همان‌طور که نشان داده شده است، حضور گرافن اکسید منجر به خاموش شدن معنی‌داری در نشر فلورسنس شد (نمودار ۷). با افزودن DNA مکمل و cDNA، به علت هیبریداسیون DNA مکمل و cDNA با پروب DNA، افزایش فلورسنس معنی‌داری در



نمودار ۶- بهینه‌سازی غلظت اتصال DNA مکمل به پروب DNA (با افزایش غلظت DNA مکمل، نور فلورسنس پروب DNA افزایش یافت).

Diagram 6- Optimizing the concentration of cDNA of CP gene of GFLV for attaching to DNA probe (As the concentration of cDNA increased, the fluorescence of the DNA probe increased).



نمودار ۷- نشر فلورسنس پروب DNA در حضور cDNA ژن cp ویروس GFLV

Diagram 7- Fluorescence of DNA probe in the presence of cDNA of CP gene of GFLV

منابع

- Andert L, Savino V. 2004.** Fan leaf degeneration In: Pearson RC Goheen A Compendium of grape diseases. *American Phytopathological society*, St Paul, MN, PP: 48-89.
- Balapanuru J, Yang J, Xiao S, Bao Q, Jahan M, Polavarapu L, Wei J, Xu Q & Loh KP. 2010.** A Graphene Oxide–Organic Dye Ionic Complex with DNA-Sensing and Optical-Limiting Properties. *Angewandte Chemie International_Edition*, 122: 6699-6703.
- Brown DJF, Robertson WM & Trudgill DL. 1995.** Transmission of viruses by plant nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 33: 223-249.
- Clark LC Jr & Lyons C. 1962.** Biosensors and Bioelectronics. *NY Academic Science*. 102: 29-4.
- Daniela CM, Dmitry VK, Jacob MB, Alexander S, Zhengzong S, Alexander S, Lawrence B. Lu W & James MT. 2010.** Improved Synthesis of Graphene Oxide. *American Chemical Society*, 4 (8): 4806-4814.
- Hewitt WB, Martelli GP, Dias HF & Taylor RH. 1970.** Ann *Grapevine fan leaf virus*. *Descriptions of Plant Viruses*. No, 28.
- Hinkle, RP. 1995.** Fan leaf Virus, the unmentionable virus. *Wines and Vines*, 76: 24-27.
- Finti H, He SJ, Wang Y. 2005.** A graphene based plat form for the assay by helicase. *Angewandte Chemie International_Edition International Edition*, 49: 5703-5707.
- Jung JH, CheonDS, Liu F, Lee KB & Seo TS. 2010.** A Graphene Oxide Based Immuno-biosensor for Pathogen Detection. *Angewandte Chemie International Edition*, 49: 5708-5711.
- Kissinger, P. 2005.** Graft transmissible diseases of grapevines. Handbook for Detection and Diagnosis. FAO publication division, Rome, Italy.
- Li F, Feng Y, Zhao C, Li P & Tang B. 2012.** Asensitive graghen oxide-DNA based sensing plat form for fluorescence “turn-on” detection of bleomycin. *Chemical Communications*, 48: 127-129.
- Li Q, Cai H, Xua Y, Xiao L, Yang M & Wang P. 2012.** Biosensors and Bioelectronics, *Angewandte Chemie International Edition*, 22: 3224-3229.
- Liu CH, Yang HH, Zhu CL, Chen X & Chen GN. 2010.** A graphene platform for sensing biomolecules. *Angewandte Chemie International Edition*, 48: 4785-4787.
- Martelli, GP. 2009. Grapevine virology highlights 2007–2008 In:** Proceeding of the 16th International Council for the Study of Virus and virus-like diseases of Grapevine (ICVG) Confrence, Dijon, Farance.
- Mayo MA & Robinson DJ. 1996.** Nepovirus molecular biology and replication. In Harrison BD & Murrant AF (eds). *The plant viruses, polyhedral virions and bi partite RNA*, PP139-185, Plenum, New York, NY, USA.
- Monosik R, Stredansky M & Sturdik E. 2012.** Biosensors- clasification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca*, 5 (1): 109-120.
- Quarcquarelli A, Gallitelli D, Savino V & Martelli GP. 1976.** Properties of *Grape vine fan leaf virus*. *Journal of General Virology*, 32: 349-360.
- Wang F, Choi JY & Seo TS. 2003.** Graphene oxide arrays for detecting specific DNA hybridization by fluorescence resonance energy transfer. *Biosensors and Bioelectronics*. 25: 2361-2365.
- Zaki-Aghl M, Izadpanah K. 2003.** Serology and molrcular identification of *Grape fan leaf virus* in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 39: 161-171.

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Volume 8, Number 2

Designing and Constructing of Nano Biosensor Based on Grafen Oxide Nano Particles for Detection of Grapevine Fanleaf Virus

Fatemeh Shokri and Mehrdad Salehzadeh*

1- M.S.c of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, The Islamic Azad University of Maragheh

2- M.S.c of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

* Corresponding Author: mehrdadsalehzadeh@gmail.com

Abstract

The most destructive viral disease in vine plants is grapevine fan leaf virus (GFLV) which causes severe damages to vineyards every year. Since the area under grape cultivation is significant compared to other crops and its propagation is done by vegetative materials, therefore, the identification of this disease in vineyards using a rapid method with high sensitivity is essential. In this study, in order to design a nano-biosensor based on graphene oxide, cDNA of the coat protein (CP) gene of GFLV was used. The basis of action of this sensor is the fluorescence emission obtained from the DNA probe. If the probe DNA is hybridized with the cDNA of the CP gene, the emission fluorescence is observed and measured using a fluorimetric device. In order to optimize the nanosensor, all factors of binding time of DNA probe to graphene oxide, graphene oxide concentration, time of hybridization of cDNA to DNA probe and concentration of cDNA for hybridization with probe attached to graphene oxide were evaluated. The results showed that the designed nanosensor was able to detect CP gene and could detect GFLV with high efficiency up to 10^{-13} mol/l.

Key words: Grafen Oxide, fluorescence, *Grape fan leaf virus*, nanobiosensor, hybridization.

