مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۸
صفحه ۱۶۷-۱۵٤

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 2

طراحی و ساخت نانوحسگر زیستی بر پایه نانو ذرّات اکسید گرافن برای شناسایی ویروس برگ بادبزنی 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 Shokri[1] 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 بادبزنی مو است که هرساله موجب خسارت جبران‌ناپذیری در تاکستان‌ها می‌شود. از آنجایی‌که 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 بادبزنی مو استفاده شد. اساس کار در این حسگر، فلورسانس نشری حاصل از پروب DNA نشان‌دار می‌باشد که در صورت هیبرید شدن DNA پروب با DNA مربوط به ژن CP فلورسانس نشری 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 بادبزنی مو را با کارایی بالا تا 10^{-13} مول بر لیتر شناسایی نماید.

واژه‌های کلیدی

اکسید گرافن،
فلورسانس،
ویروس برگ باد بزنی مو،
نانوحسگر زیستی،
هیبریداسیون

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]

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 بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی هر سال موجب خسارات جبران‌ناپذیری به بخش کشاورزی از جمله مو می‌شوند (Martelli, 2009). این ویروس، در صورت آلودگی شدید، باعث کاهش تشکیل میوه و کاهش عملکرد تا ۸۰ درصد می‌شود (Hinkle, 1995). این ویروس به طور طبیعی توسط نماتد انتقال می‌یابد. با این حال، بخشی از آلودگی و شیوع آن در نتیجه تکثیر با قلمه، پیوندک و نهال‌های آلوده است (Hewitt *et al*, 1958). ویروس برگ بادبزنی 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 می‌شوند (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 می‌باشد. ژنوم GFLV شامل دو رشته RNA مثبت تک‌لا با وزن مولکولی $۲/۴\times۱۰^{۶}$ برای رشته RNA1 و $۱/۴\times۱۰^{۶}$ برای رشته RNA2 است، برای ایجاد آلودگی هر دو رشته RNA2 و RNA1 مورد نیازند (Andret-Link *et al*, 2004; Quacquarelli *et al*, 1976).

حسگر زیستی یا بیوسنسور نام گروهی از حسگرها است و به گونه‌ای طراحی می‌شوند تا تنها با یک ماده خاص واکنش نشان دهند. نتیجه این واکنش به صورت پیام‌هایی در می‌آید که یک ریزپردازنده، می‌تواند آن‌ها را تحلیل کند. پیشرفت‌های زیادی در زمینه‌ی حسگرهای زیستی به دست آمده است. طبق تعریف اتحادیه بین‌المللی شیمی کاربردی و محض International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) حسگر زیستی (شکل-۱) عبارت است از: ابزاری که با استفاده از واکنش‌های بیوشیمیایی خاصی، به‌واسطه آنزیم‌ها یا ایزوله، بافت‌ها یا سلول‌ها، عناصر شیمیایی ماده موردنظررا به‌طورمعمول به‌صورت الکتریکی، اپتیکی و یا گرمایی آشکارسازی کند (Monosik *et al*, 2012).

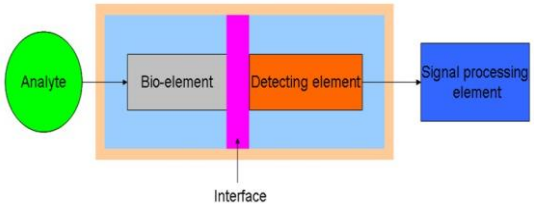
نخستین بار مفهوم حسگرهای زیستی توسط دکتر کلارک برای اندازه‌گیری غلظت گلوکز برای بیماران دیابتی توسط آنزیم گلوکز اکسید (GOX) معرفی شد (Clark & Lyons, 1962). آنزیم، آنتی‌بادی، نوکلئیک اسید، لکتین، هورمون، ساختار سلول یا بافت می‌تواند به عنوان عنصر بیولوژیکی استفاده شود. نقش عنصر بیولوژیکی، ارتباط برقرار کردن با آنالیت (مواد مورد تجزیه) هدف است که نتیجه واکنش شیمیایی از طریق مبدل به علامت قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌شود. سیستم مبدل می‌تواند الکتریکی، نوری، حرارتی، یون حساس، مغناطیسی یا صوتی باشد. بخش خیلی مهم در ساخت حسگر زیستی تثبیت عنصر بیولوژیکی می‌باشد. تثبیت مولکول‌ها 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 می‌شوند که عمدتاً در پنج گروه آنزیم، آنتی‌بادی، اسیدنوکلئیک، ساختارهای‌سلولی و سلول‌ها تقسیم‌بندی می‌شوند (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 بادبزنی مو از مواد گیاهی و نماتد طراحی کرده‌اند (Finti *et al.*, 2005). پروب‌های طراحی شده (جدول۱) گروهی از مولکول‌های فلورسنت خود هیبریدشونده را شامل می‌شود، که مولکولی فلورسنت [FAM] (carboxyfluorecein) و ROX (6-carboxy-X-rodamine) به یک انتهای سنجاق موئی و یک مولکول خاموش‌کننده DABCYL (4-(4-dimethyl-aminophenylazo)-benzoic acid)] به انتهای دیگر متصل شده و از نشر فلورسنس ممانعت می‌کند. زمانیکه پروب به DNA مکمل (ویروس) متصل می‌شود، ساختار سنجاق موئی خطی شده و گروه فلورسنتاز خاموش‌کننده دور شده و نور فلورسانس نشر می‌یابد. توالی پروب‌های طراحی شده عبارتند از:

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]

جدول۱ – پروب های طراحی شده برای شناسایی ویروس GFLV

Table1- Probes for detection of GFLV

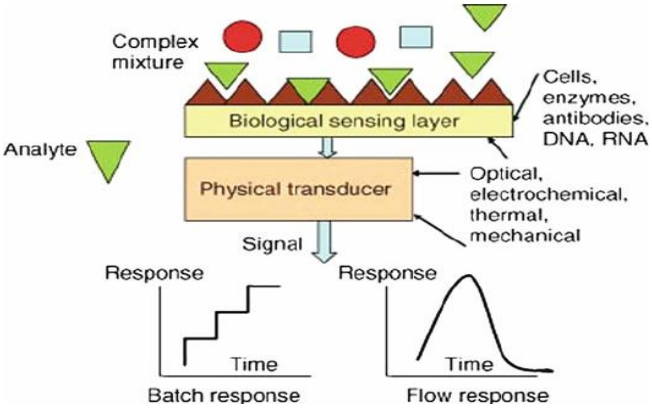
	Sequence	**Position (nt)**
Scorpion probe (forward)	GCTCGAAATATATGTGTGTA	951-970
Scorpion probe (reverse)	GCTCGACCCTCAGATA	1254-170
MBs (forward)	(G/A)AGGTTGCATTTCAV(G/A)T	2431-2447
MBs (reverse)	CA-TT(G/A)AAAAC(A/T)CCTGGGT	2559-2576



شکل۱- شمایی از یک بیوسنسور

Figure1- Schematic of a biosensor

هر دو پروب ابزارهای تشخیص مفیدی برای شناسایی ویروس در مواد رویشی و نماتدهای ناقل ویروس می‌باشد. هوانگ و همکاران حسگر زیستی فلورسنت مبتنی برگرافن اکسید را برای شناسایی جیوه از طریق واکنش‌های زنجیره هیبریداسیون (hybridization chain reactions) طراحی کردند و از آنجایی‌که مسمومیت به جیوه اثرها سوء بر سلامت انسان دارد، این حسگر روشی با حساسیت و قدرت انتخاب فوق‌العاده بالا برای شناسایی جیوه در محلول‌های آبی است (Huang *et al.*, 2014). در این سیستم شناسایی، دو پروب سنجاق موئی hairpin DNA probe 1 andhairpinHP1) DNA probe 2 و HP2) طراحی شده است. برای تحریک واکنش‌های زنجیره هیبریداسیون (HCRs) سنجاق موئی، شیمی تناسب تیمین–جیوه–تیمین (T-Hg^{2+}-T) استفاده شده است که منجر به افزایش فلورسنس می‌شود. HCRs به‌طور وسیعی برای شناسایی DNA و پروتئین‌ها استفاده شده بود و اولین بار در این بررسی برای شناسایی جیوه استفاده شده است (شکل ۲).



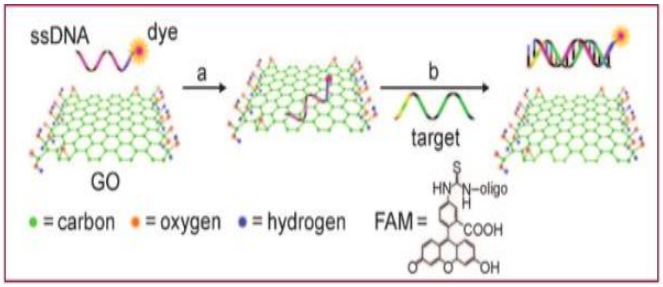
شکل۲- شماتیک واکنش شناسایی پیشنهاد شده

Figure 2- Schematic of the proposed identification method

در غیاب Hg^{2+}، گرافن اکسید پروب‌های DNA (DNA کمکی، HP1 و HP2) را با واکنش‌های غیرکووالانت جذب کرده و فلورسانس HP1 خاموش می‌شود. درحالی‌که 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 می‌شود، که نتوانسته جذب گرافن اکسید شده، در نتیجه تولید فلورسانس افزایشی می‌شود.

لو و همکاران صفحه گرافنی برای شناسایی مولکول‌های زیستی طراحی کرده و قابلیت محلول بودن در آب صفحات گرافن اکسیدی را برای شناسایی دقیق DNA و پروتئین‌ها ثابت کردند (شکل۳). آن‌ها پیش‌بینی کردند که گرافن اکسید بتواند به DNA رنگی متصل شده و فلورسنس را به‌طور 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 به‌هم می‌خورد. چنین واکنش‌هایی، DNA رنگی را از گرافن اکسید رها کرده، در نتیجه فلورسنس به حالت اولیه برمی‌گردد (Liu *et al.*, 2010).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]



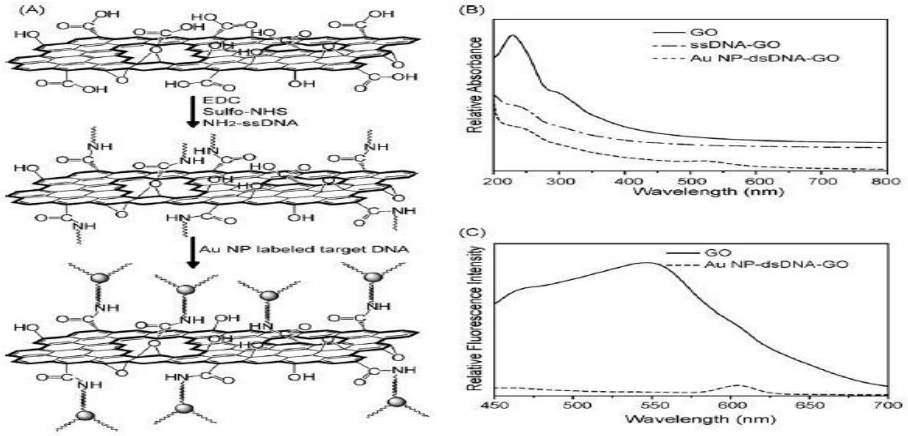
شکل۳- نمایش شماتیک تغییر فلورسنس ترکیب ssDNA-FAM-GO.
FAM رنگ فلورسنس برپایه فلورسین است.

Figure3- 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 FAM-3' (FAM = رنگ برپایه فلورسین)، و توالیDNA هدف شامل HIV1 عبارت است از: 5′-GCTAGAGATTTTCCACACTGACT-3') از توالی تکراری انتهایی HIV-1)، و توالی ناجور HIV1 عبارت است از: (5'-GCTAGAGATTGTCCACACTGACT-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 نانوذرّات طلا (AuPNs) اتفاق می‌افتد. آنتی‌بادی‌های رتروویروس روی آرایه‌های از طریق واکنش آمیداسیون مرتبط با کاربومایید 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 AuNPs بررسی شده است. آنتی‌بادی از طریق مولکول ssDNA به AuPNs متصل شده (ab-DNA-AuPNs)، که مولکول DNA به عنوان واسط عمل‌کرده است. بنابراین، نانوذرّات طلا نزدیک سطح گرافن اکسید قرار می‌گیرد. میل ترکیبی زیاد گروه‌های آمینونوکلئوتیدهای DNA برای نانوذرّات طلا چندگانه منجر به افزایش کارایی خاموش‌کنندگی گرافن اکسید می‌شود. زمانی‌که ترکیب ab-DNA-AuPNs به سلول هدف که به گرافن اکسید متصل شده به طور انتخابی متصل می‌شود، کاهش نشر فلورسنس گرافن اکسید به عنوان خاموش کننده تشخیص داده شد، بنابراین شناسایی سلول‌های هدف پاتوژنیک 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 پرین به جهت واکنش‌های غیرکووالانتی با مولکول‌ها به کار گرفته می‌شوند. آن‌ها در حسگرهای زیستی، رنگ-4-(1-pyrenyl-vinyl)-N-butylpyridnium 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، PNP+GO- نامیده می‌شود. اصول آماده‌سازی صفحات شناسایی PNP+GO- برمبنای الکترواستاتیک بی‌نظیر واکنش‌های غیرکووالانت بین آنالیت و 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. زمانی‌که DNA پروب به سطح گرافن اکسید متصل شده با رشته DNA مکمل نانوذرّه طلادار هیبرید می‌شود، شدت نشر صفحات گرافن به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. دانسته‌ها TEM نشان می‌دهند که نانو ذرّات طلا در ساختارهای تاخورده و کناره‌ها به محض هیبریداسیون نانو ذرات طلا با چگالی حدود ۸۰ نانوذرّه در هر متر مربع پراکنده می‌شوند. این امر منجر به خاموش شدن فلورسنس ناقل انرژی فلورسنس بین نانو ذرّات طلا و صفحات گرافن اکسید می‌شود (شکل ٤). 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).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]



شکل٤- تصویرسازی شماتیک حسگر زیستی DNA مبتنی بر GO-b نمودار جذب UV-vis، GO، ssDNA–GO و Au NP-dsDNA-GO-C شدت فلورسنس نسبی GO و Au NP-dsDNA-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

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 به‌خوبی در هاون با هم ساییده شدند. مخلوط ۹ به ۱ از H_2SO_4 و H_3PO_4 (۳٦۰/٤۰) تهیه شده و به‌طور 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 ٤۰۰ml یخ به همراه ۳ml هیدروژن پراکسید ۳۰ درصد به آن افزوده شد. مخلوط به‌دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ٤۰۰۰rpm 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 هربار شست و شو، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ٤۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. پس از خشک شدن، جامدات به‌دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه اولتراسونیک شدند. برای خارج شدن گرافیت‌های واکنش نکرده محلول همگن شده به‌مدت 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) به‌منظور 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 بادبزنی مو انتخاب (تا نقاط حفاظت شده در همه‌ی 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 افزار7 Oligo طراحی گردید. این پروب از شرکت سینا ژن خریداری شد (جدول۲).

جدول ۲- توالی پروب آزمایش

Figure2- Probes of this experiment

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]

در این پروب، تثبیت از طریق پیوندهای π–π 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 π–π 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 ۰/۰۲Mm و pH =۷/٤، تریس به مقدار ۰/۲٤۲ گرم (هیدروکسی متیل آمینو متال) در ۱۰۰mM آب دیونیزه حل شده و pH در ۷/٤ تنظیم گردید، سپس مقادیر ۰/۵۸٤٤ 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 RNX-Plus (sina clon) استخراج گردید. بعد از تعیین غلظت RNA به روش اسپکتوفتومتری، واکنش RT-PCR با توجه به جداول زیر انجام پذیرفت. محلول تهیه شده و در بن‌ماری با دمای ٦۵ 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 ٤۲ 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 (بافرRT (5x) چهار میکرولیتر، مخلوط dNTP (۱۰میلی مولار) دو میکرولیتر، مهارکننده آنزیم RNase نیم میکرولیتر، آنزیم رونویس معکوس یک میکرولیتر، dH_2O 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 بادبزنی 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 ناحیه‌ی Cp در حدود ۳۵۵۵ نوکلئوتید بود (جدول٤).

جدول ۳- مقادیر مورد نیاز برای واکنش PCR

Table 3- The amount of materials required for PCR reaction

ماده	غلظت	مقدار (میکرولیتر)
بافرتکثیر (۱۰ x) (Cinnagen)	۱X	۲/۵
محلولdNTP (۱۰ میلی‌مولار) (Cinnagen)	۰/٤ میلی مولار	۱
آغازگر Revearse (Cinnagen)	۱۰ پیکومول	۰/۵
آغازگر Forward (Cinnagen)	۱۰ پیکومول	۰/۵
$MgCl_2$ (50mM) (Cinnagen)	۳ میلی مولار	۲
cDNA	۱میکرولیتر	۱
Fermentus DNA Enzyme (Cinnagen) 5unit/ µl	۱واحد	۰/۳
آب ddH_2O	-	۱۷/۲
جمع	-	۲۵

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]

جدول ٤- شرایط واکنش PCR

Table 4- PCR reaction condition

مرحله	دما (سانتیگراد)	زمان
Predenaturation	۹۵	٥دقیقه
Denaturation	۹۵	٤٥ ثانیه
Annealing	٥٥-٥٤	٤٥ ثانیه
Extension	۷۲	۱ دقیقه
Final Extension	۷۲	۱۰ دقیقه
تعداد سیکل‌ها	۳٦ سیکل	

تهیه محلول‌های تثبیت DNA روی سطح گرافن اکسید

به‌منظور بهینه‌سازی زمان اتصال پروب DNA، ابتدا ۱۹۷۵میکرولیتر از بافر تریس HCL برداشته به فالکون 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) فلوری‌متری ریخته شد و در زمان‌های ۰،۲، ۵، ۷، ۱۰، ۱۲، ۱۵ دقیقه با دستگاه فلوری‌متری 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 فالکون 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 فلوری‌متری طیف‌گیری انجام شد. در غلظت ۱۰ میکرولیتر گرافن اکسید، ۱۹۸۰ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL برداشته و درون فالکون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA بر روی آن اضافه کرده و ۱۰ میکرولیتر گرافن اکسید به آن اضافه شد. پس از سپری‌شدن ۱۰ دقیقه محلول در دستگاه فلوری‌متری طیف‌گیری شد. در غلظت ۱۵ میکرولیتر گرافن اکسید، میکرولیتر ۱۹۷۵ از محلول تریس بافر HCL برداشته و درون فالکون 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 فلوری‌متری طیف‌گیری گردید. در غلظت ۲۰ میکرولیتر گرافن اکسید، میکرولیتر ۱۹۷۰ از محلول تریس بافر HCL با سمپلر برداشته و درون فالکون ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر پروب DNA بر روی آن اضافه شده و ۱۰ میکرولیتر گرافن اکسید به آن افزوده شد و بعد از سپری‌شدن ۱۰ دقیقه محلول در دستگاه فلوری‌متری طیف‌گیری شد. در غلظت ۲۵ میکرولیتر گرافن اکسید، ۱۹٦۵ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL با سمپلر برداشته و درون فالکون 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 فلوری‌متری طیف‌گیری انجام شد. در غلظت ۳۰ میکرولیتر گرافن اکسید، ۱۹٦۰ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL برداشته و درون فالکون 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 فلوری‌متری طیف‌گیری شد. در غلظت ۳۵ میکرولیتر گرافن اکسید، ۱۹۵۵ میکرولیتر از محلول تریس بافر HCL با سمپلر برداشته و درون فالکون 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 فلوری‌متری طیف‌گیری انجام گردید. به منظور بهینه‌سازی زمان هیبریداسیون DNA مکمل به پروب DNA متصل به گرافن اکسید، ابتدا ۱۹٦۵ میکرولیتر از بافر تریس HCL را با سمپلر برداشته و در داخل فالکون اضافه گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از پروب DNA به فالکون 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 زمان‌های۰، ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ دقیقه در دستگاه فلوری‌متری 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]

میکرولیتر DNA مکمل، ۱۹۷٤ 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 ۱۰دقیقه 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 فلوری‌متری 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 فلوری‌متری 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 سپری‌شدن ۱۰ دقیقه با دستگاه فلوری‌متری طیف‌گیری انجام شد. در غلظت ۱۰ میکرولیتر DNA مکمل، ۱۹٦۵ 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 فلوری‌متری طیف‌گیری انجام گرفت. در غلظت ۱۵ میکرولیتر DNA مکمل، ۱۹٦۰ 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 فلوری‌متری 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 ازسپری شدن ۱۰ دقیقه، ۲۰ میکرولیتر DNA مکمل به محلول اضافه شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه با دستگاه فلوری‌متری 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 فلوری‌متری 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 فلوری‌متری طیف‌گیری انجام گردید.

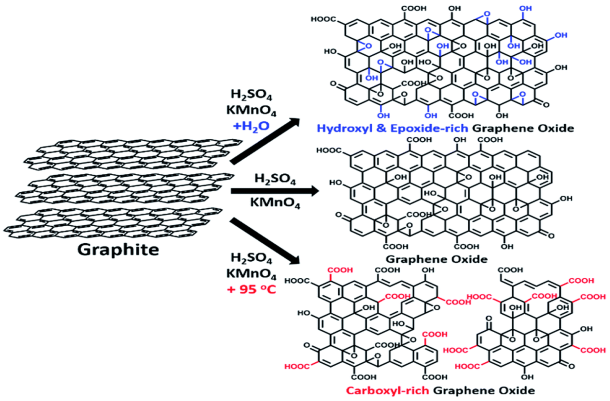
بررسی با نمونه DNA غیرمکمل

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 فلوری‌متری طیف‌گیری انجام گردید در این پروژه گرافن اکسید با استفاده از روش هامر تهیه شد و برای تایید آن از تجزیه و تحلیل FT-IR، UV-Vis 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 محدوده‌ی $2500-3500cm^{-1}$ 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

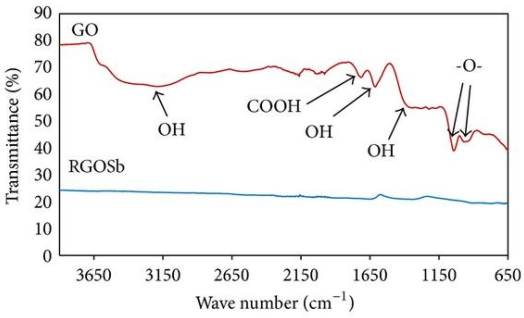
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]

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



شکل۵- واکنش تهیه گرافن اکسید

Figure5- Reaction of producing Graphene oxide

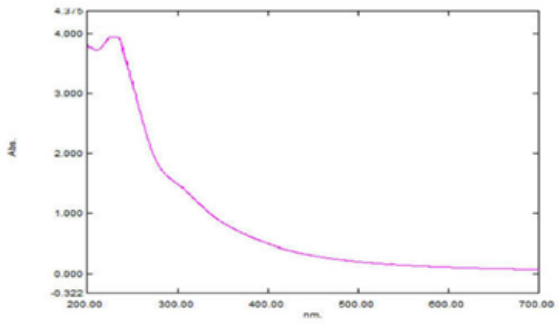


نمودار۱- طیف FT-IR گرافن اکسید

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 می‌باشد. گرافن اکسید در طول موج ۲۲۶ نانومتر دارای طیف جذبی UV می‌باشد. در این طیف یک جذب ضعیف در ۲۹۰ نانومتر وجود دارد که به انتقالات π–π گروه C=O مربوط می‌شود (Liu *et al*, 2010).



نمودار۲- 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 می‌باشد. در نتایج TEM گرافن اکسید با ابعاد جانبی ۵۰۰ نانومتر تا ۳ میکرومتر قابل مشاهده می‌باشد، که برجستگی‌های بسیاری در مرکز و نیز تاخوردگی‌هایی در لبه‌های آن را شامل می‌شود. به منظور حفظ ثبات ترمودینامیکی، به‌طور معمول برجستگی و تاخوردگی در گرافن اکسید دوبعدی یافت می‌شوند. اگرچه مطالعات قبلی بیانگر این است که گروه‌های عاملی کربوکسیلیک اسید به‌صورت یکنواخت روی گرافن اکسید توزیع شده است. چنین به‌نظر می‌رسد که برجستگی و تاخوردگی تولید شده در طول فرآیند اکسایش، گروه‌های کربوکسیلیک اسید بیشتری را به‌عنوان نقص کریستالی دارند (Liu *et al*, 2010). چنانچه در شکل (شکل٦) نشان‌داده شده، ساختار ورقی و چین‌خورده گرافن اکسید به‌خوبی نشان داده شده است که فرضیات گفته شده را تایید می‌کند.



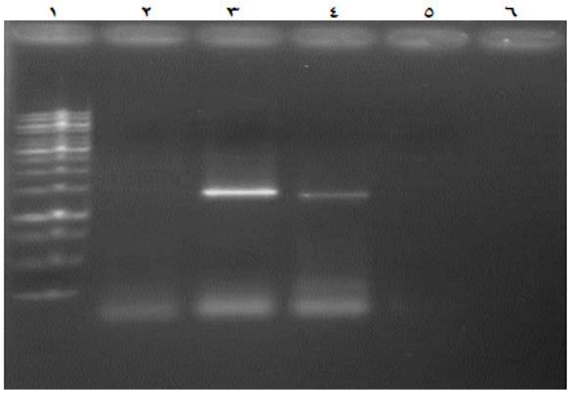
شکل٦- تصویر TEM ورقه گرافن اکسید حاوی ناهمواری

Figure 6- TEM image of graphene oxide sheet has rippling

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]

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 (شکل۷).



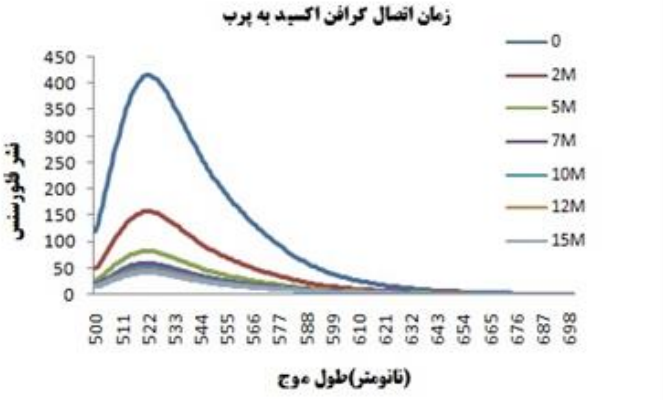
شکل ۷- الگوی الکتروفورز مربوط به نتیجه RT-PCR ژن *CP* ویروس برگ بادبزنی مو. چاهک شماره یک مربوط به نشانگر وزن مولکولی DNA چاهک دو نتیجه مربوط به گیاه عاری از ویروس برگ بادبزنی مو، چاهک سه مربوط به گیاه آلوده به ویروس برگ بادبزنی مو.

Figure 7- Agarose gel electrophorese 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 باد بزنی مو وجود آلودگی در نمونه‌های مشکوک مشخص شد. این در حالی بود که هیچ باندی در نمونه‌های عاری ازویروس 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 ضرورتا 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 ۱۰دقیقه و ۱۰ دقیقه به بعد نشر فلورسنس به آرامی کاهش یافته و به ثبات رسید (نمودار۳). بنابراین زمان بهینه اتصال پروب DNA به گرافن اکسید ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. با توجه به خاصیت خاموش‌کنندگی گرافن اکسید از طریق پیوندهای π-π پروب DNA و گرافن اکسید نشر فلورسنس کاهش یافته و خاموش می‌شود.

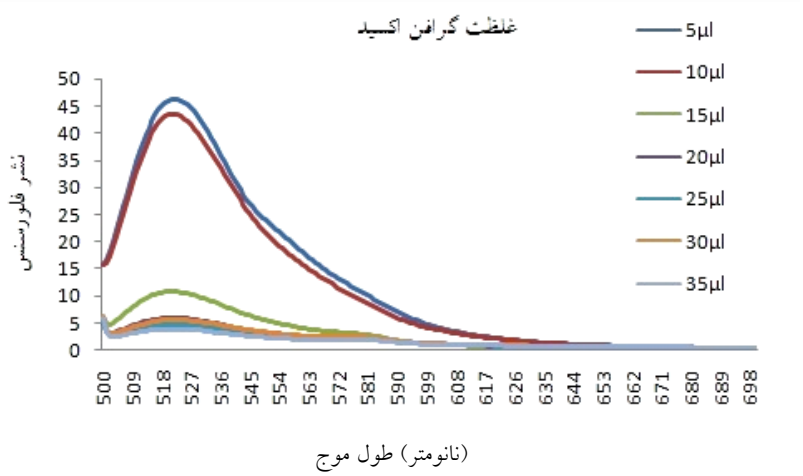


نمودار ۳- بهینه سازی زمان اتصال گرافن اکسید به پروب

Diagram3- Optimizing the time of Graphene oxide-probe incubation

واکنش قوی گرافن و گرافن اکسید با اسید نوکلئیک به‌وسیله پیوندهای π-π شامل واکنش بین ساختارهای حلقه باز اسیدنوکلئیک سلول‌های شش ضلعی گرافن وگرافن اکسید و در نتیجه خاصیت خاموش‌کنندگی گرافن وگرافن اکسید توسط وانگ و همکاران گزارش شده است (Wang *et al.*, 2003). به‌منظور دستیابی به بهترین عملکرد شناسایی، غلظت گرافن اکسید با ۱۰ میکرولیتر پروب DNA بهینه شد. همان‌طور که در نمودار٤ 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 π-π اتصال پیدا می‌کنند. در اثر این اتصال باتوجه به خاصیت خاموش‌کنندگی گرافن اکسید، نشر فلورسنس به‌طور کامل خاموش می‌شود. با گذشت زمان نور ساطع شده از پروب DNAافزایش 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).

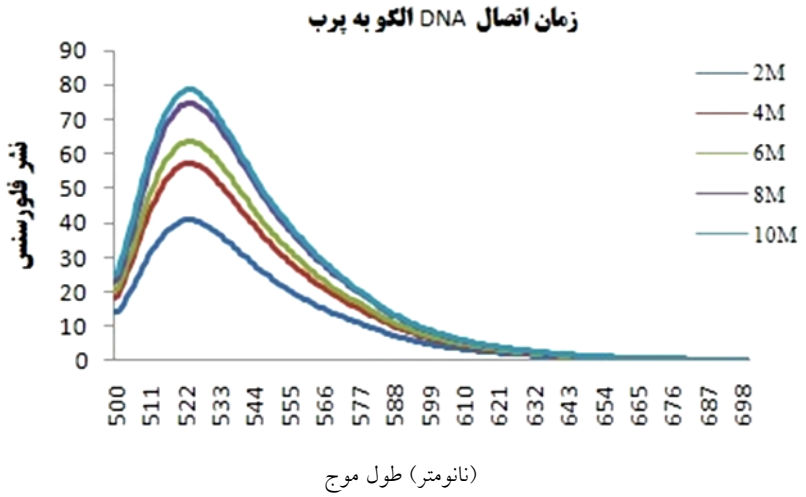
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]



نمودار ٤- بهینه‌سازی غلظت اتصال گرافن اکسید به پروب DNA

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

از آن‌جایی‌که پیوند هیدروژنی DNA مکمل و پروب DNA از پیوندهای π-π 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، درنتیجه نور فلورسنس منتشر می‌گردد. به علت خاصیت خاموش‌کنندگی فوق‌العاده زیاد گرافن اکسید، نشر فلورسنس DNA تک رشته‌ای در حضور گرافن اکسید به حداقل می‌رسد. درصورتی‌که با تشکیل مارپیچ دورشته‌ای پروب با مکمل هدف، منجر به بازگشت فلورسنس و از بین رفتن خاصیت خاموش‌کنندگی گرافن اکسید می‌گردد.



نمودار ٥- بهینه‌سازی زمان اتصال DNA مکمل به پروب DNA (با گذشت زمان نور ساطع شده از پروب DNA افزایش یافت).

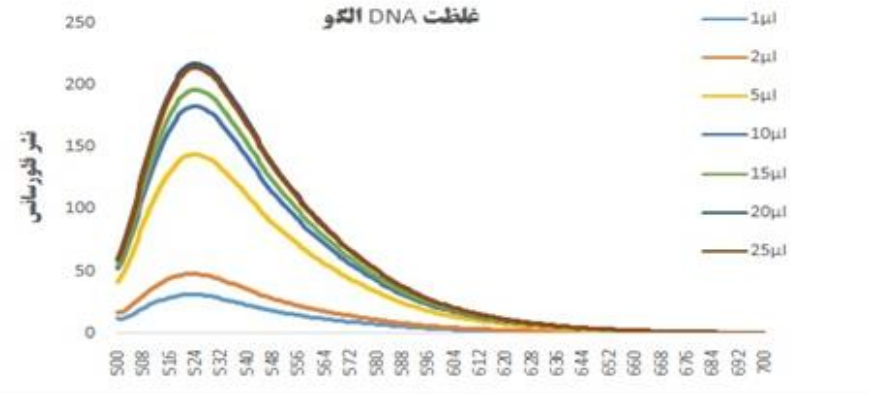
Diagram 5- Optimizing time of incubation of cDNA with DNA probe (Over time, the light emitted from DNA of the primer increased).

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]

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 حالی‌که هیبریداسیون رشته پروب و رشته مکمل و تشکیل DNA دو رشته‌ای، منجر به ایجاد فلورسنس مجدد می‌شود(Li *et al*., 2012).

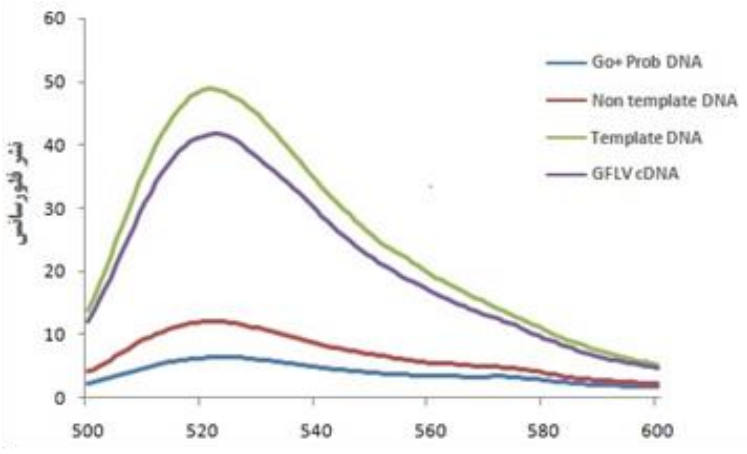
همان‌طور که نشان داده شده است، حضورگرافن اکسید منجربه خاموش‌شدن معنی‌داری در نشر فلورسنس شد (نمودار۷). با افزودن DNA مکمل و cDNA، به علت هیبریداسیون DNA مکمل و cDNA با پروب DNA، افزایش فلورسنس معنی‌داری در ترکیب GO-DNA مشاهده شد، درحالی‌که با افزودن DNA غیرمکمل، چنین افزایشی مشاهده نشد. اتصال بین DNA تک‌رشته‌ای پروب و DNA تک‌رشته‌ای مکمل ساختار را تغییر داده، متعاقبا DNA تک‌رشته‌ای پروب از سطح گرافن اکسید رها شده و در نتیجه به حالت اولیه برگشته و شناسایی cDNA تحقق یافت. لو وهمکاران 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).



(نانومتر) طول موج

نمودار ٦- 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).



(نانومتر)طول موج

نمودار ۷- نشرفلورسنس 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]

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 diseasws 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 & Murant 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]

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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.1.9]