

تشخیص رنگ سنجی ژن RdRp ویروس SARS-CoV-2 با نانوذرات طلای عامل دار شده با DNA سنجاق سری: رویکردی مبتنی بر PCR با قابلیت تعمیم به سایر ویروس‌ها

عباس کرمی و معصومه حسینی*

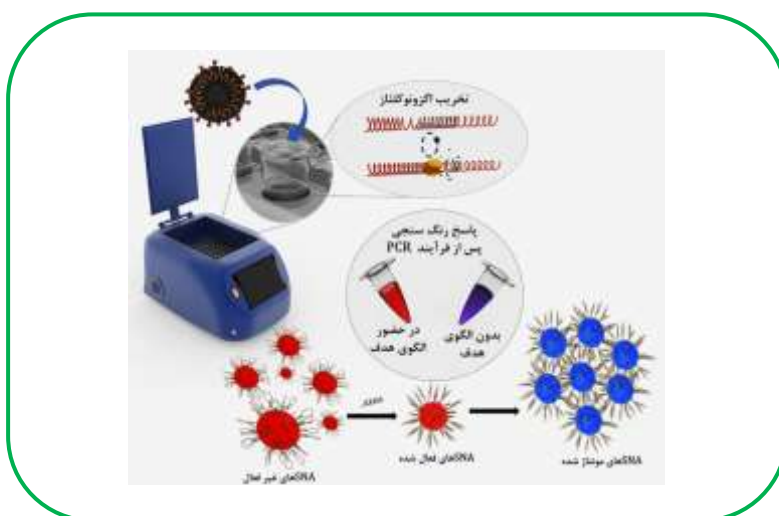
دانشکده شیمی و علوم نفت، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳ فروردین ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: ۵ اردیبهشت ۱۴۰۴

چکیده: در این مطالعه، یک نانوحسگر رنگ سنجی تک جزئی مبتنی بر نانوذرات طلای عامل دار شده با DNA سنجاق سری (H-SNA) برای شناسایی ژن RdRp ویروس SARS-CoV-2 پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) طراحی و ارائه شده است. در این سامانه، DNA سنجاق سری با ساختار ساقه-حلقه‌ای به سطح نانوذرات طلا متصل می‌گردد. ناحیه حلقه حاوی توالی مکمل ژن هدف و ناحیه ساقه شامل دو بازوی پالیندرومیک است. با افزودن پروب فعال کننده، که مکمل توالی موجود در حلقه می‌باشد، ساختار سنجاق سری باز شده و در اثر تعامل بین بازوهای پالیندرومیک، تجمع نانوذرات طلا صورت می‌گیرد که این امر منجر به تغییر رنگ محلول از قرمز به آبی می‌شود. در نمونه‌های مثبت که حاوی ژن هدف هستند، پروب فعال کننده در طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آمپلیکون ژن هدف هیبرید شده و توسط فعالیت ۵'-اگزونوکلئازی آنزیم DNA پلیمراز تخریب می‌گردد. در نتیجه، پس از افزودن محلول H-SNA به محصول نهایی PCR، ساختار سنجاق سری همچنان بسته باقی مانده و رنگ قرمز محلول H-SNA حفظ می‌شود. در نمونه‌های منفی فاقد ژن هدف، پروب فعال کننده طی فرایند PCR بدون تغییر باقی می‌ماند و پس از افزودن محلول H-SNA به محصول نهایی PCR، ساختار سنجاق سری در اثر برهم کنش با پروب فعال کننده باز شده، که این امر موجب تجمع نانوذرات طلا و در نهایت تغییر رنگ محلول به آبی می‌گردد. با در نظر گرفتن امکان طراحی دو بازوی پالیندرومیک در طرفین توالی هر ژنوم، این روش از پتانسیل توسعه برای شناسایی سایر ژنوم‌های ویروسی نیز برخوردار است.

کلیدواژه: ژن RdRp، تشخیص رنگ سنجی، فعالیت ۵'-اگزونوکلئاز، نانوذرات طلا، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ویروس SARS-CoV-2



۱- مقدمه

در سال‌های اخیر، سنجش زیستی مبتنی بر نانومواد به یکی از داغ‌ترین موضوعات در علوم و فناوری نانو تبدیل شده است. از این رو، نیاز به حضور و مشارکت شیمی دانان در این حوزه بیش از پیش احساس می‌شود. ویژگی‌های منحصر به فرد نانومواد، بسترهای ایده‌آلی را برای انتقال سیگنال‌های الکترونیکی و نوری فراهم کرده و امکان طراحی نسل جدیدی از ابزارهای زیست سنجی را ارائه می‌دهند. از این رو، نانوزیست سنجی مفاهیم نوینی را برای تحقیقات بنیادی، کاربردی و توسعه ابزارهای جدید سنجش زیستی با حساسیت بالا در حوزه‌های بالینی، محیط زیستی و صنعتی ارائه کرده است [۱ و ۲]. از طرف دیگر، ادغام مولکول‌های زیستی مانند DNA، پروتئین‌ها [۳]، پپتیدها [۴] با نانوذرات فلزی، نیمه هادی‌ها و نانولوله‌های کربنی، منجر به ایجاد نانو ساختارهای جدیدی با ویژگی‌های منحصر به فرد شده است که در هیچ یک از اجزا به تنهایی وجود ندارد و از هم افزایی ویژگی‌های هر دو بخش ناشی می‌شود [۵]. در این مقاله، تمرکز اصلی بر روی دسته‌ی جدید و جذابی از نانو ساختارها، تحت عنوان نوکلئیک‌اسیدهای کروی (SNA) می‌باشد.

نوکلئیک‌اسیدهای کروی به طور معمول با قرار گرفتن یک لایه متراکم از نوکلئیک‌اسیدهای خطی (DNA یا RNA) در اطراف یک هسته نانوذره ساخته می‌شوند [۵-۷] آنچه نوکلئیک‌اسیدهای کروی را از سایر نانو ساختارها متمایز می‌سازد و موجب جلب توجه گسترده در جامعه علمی شده است، ساختار سه بعدی و متراکم نوکلئیک‌اسیدها در اطراف هسته مرکزی آن‌هاست، ویژگی‌ای که در طبیعت یافت نمی‌شود. SNAها تاکنون کاربردهای چشم گیری در حوزه‌ی پزشکی، به ویژه در زمینه‌هایی نظیر تشخیص بیماری‌ها [۸-۱۰] و سامانه‌های دارورسانی هدفمند [۱۱] از خود نشان داده‌اند. این ساختارهای نوین همچنین پتانسیل بالایی در طراحی و توسعه‌ی واکسن‌های جدید [۱۲] و نیز در حوزه‌ی ایمنی‌درمانی سرطان [۱۳ و ۱۴] ارائه داده‌اند. در سال‌های اخیر، مقاله‌های مروری متعددی پیرامون چگونگی

کاربردهای نوکلئیک‌اسیدهای کروی در حوزه‌های مختلف منتشر شده‌اند که بیانگر اهمیت روزافزون این ترکیب‌ها در تحقیقات زیستی و فناوری نانو می‌باشد [۱۷-۱۵].

سیگنال‌های رنگ سنجی و فلورسانس از رایج‌ترین انواع سیگنال‌های مورد استفاده در حسگرهای زیستی مبتنی بر نانوذرات هستند. نانوذرات طلا به دلیل ویژگی‌های نوری وابسته به اندازه و شکل، پدیده‌ای به نام رزونانس پلاسمون سطحی را نشان می‌دهند که منجر به جذب شدید نور در محدوده مرئی می‌شود [۱۸]. جذب نور توسط اتم‌های فلزی موجود در یک نانوذره، باعث ایجاد نوسانات پلاسمونیک الکترون‌ها در نوار هدایت می‌شود. این نوسان‌های جمعی، منجر به جذب شدید نور در محدوده ۵۵۰-۵۲۰ نانومتر شده و مسئول رنگ قرمز شدید محلول‌های کلئیدی نانوذرات طلا می‌باشند [۱۸]. زمانی که نانوذرات طلا تجمع می‌یابند، تغییرهای قابل توجهی در طیف جذبی آن‌ها رخ می‌دهد، از جمله جابجایی پیک جذبی از ۵۲۰ به ۶۵۰ نانومتر، پهن‌شدگی نوار پلاسمون سطحی و تغییر رنگ محلول از قرمز به آبی (به دلیل همپوشانی پلاسمون بین ذرات متصل شده). این ویژگی منحصربه‌فرد باعث شده است که نانوذرات طلا به یک سکوی آرمانی برای سنجش‌های رنگ سنجی تبدیل شوند و توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کنند [۱۹ و ۲۰].

فرآیند هیبرید شدن بین یک نوکلئیک‌اسید تک رشته‌ای (ssDNA) و رشته مکمل آن، یکی از ویژه‌ترین سازوکارهای شناسایی مولکولی شناخته شده است. این فرآیند منجر به ایجاد یک فاصله کوتاه و پایدار بین نانوذرات شده و از طریق برنامه پذیری DNA، امکان تبدیل نانوذرات طلا به مبدل‌های قابل کنترل برای سیگنال‌های رنگ سنجی و فلورسانس را فراهم می‌آورد. تاکنون، روش‌های شیمیایی ساده، ارزان و در دسترس متنوع و متعددی برای اتصال مولکول‌های زیستی مانند رشته‌های DNA به سطح نانوذرات طلا توسعه یافته‌اند [۲۱ و ۲۲]. این ویژگی، در کنار سنتز آسان و مقرون به صرفه نانوذرات طلا، موجب شده است که آن‌ها به عنوان پرکاربردترین مبدل‌های سیگنال در

pH=7/6، ابتدا ۱۱/۹۱۵ گرم از پودر HEPES در ۹۰ میلی لیتر از آب فوق خالص بدون یون حل شد. سپس با استفاده از هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید، pH محلول روی ۷/۶ تنظیم شد. در نهایت، حجم کل محلول با اضافه کردن مقدار بیشتری آب بدون یون به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. برای تهیه بافر سیترات ۵۰۰ میلی مولار با pH=3/1 با پایه کاملاً نمکی، مقدار ۱۴/۷۰۵ گرم از نمک تری سدیم سیترات دو آبه در ۹۰ میلی لیتر آب بدون یون حل و سپس از هیدروکلریک اسید غلیظ برای تنظیم pH تا حدود ۳ استفاده شد. سپس حجم نهایی با اضافه کردن مقدار بیشتری آب بدون یون به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

۲-۳- سنتز نانوذرات طلا

هسته‌های کروی نانوذرات طلا با استفاده از روش استاندارد کاهش HAuCl_4 توسط سیترات، سنتز شدند [۲۴]. در ابتدا، ۵۰ میلی لیتر از محلول ۱ میلی مولار HAuCl_4 در یک بالن ته گرد سه دهانه‌ی ۱۰۰ میلی لیتری مجهز به مبرد، به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه حرارت داده شد تا به نقطه جوش برسد. سپس، ۵ میلی لیتر از محلول ۳۸/۸ میلی مولار سدیم سیترات به صورت ناگهانی و در حین هم زدن شدید، به محلول در حال جوش افزوده شد. در کمتر از یک دقیقه، رنگ محلول از زرد شفاف به کدر و تیره تغییر یافت و با ادامه‌ی بازروانی، رنگ محلول به تدریج قرمز شد. بازروانی و هم زدن شدید به مدت ۱۲ دقیقه دیگر ادامه یافت تا رنگ قرمز یکنواخت و شدیدی حاصل گردد. در پایان، محلول در دمای اتاق سرد شد. این نانوذرات طلا به عنوان هسته جهت سنتز نوکلئیک‌اسیدهای کروی در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۴- سنتز نوکلئیک‌اسیدهای کروی با هسته نانوذرات طلا

برای اتصال متراکم DNA به سطح نانوذرات طلا و سنتز نوکلئیک اسیدهای کروی، استفاده از

حسگرهای زیستی مطرح شوند. به همین دلیل، تاکنون حجم وسیعی از مطالعه‌ها، به بررسی کاربرد نانوذرات طلا در تشخیص اهداف زیستی اختصاص یافته است [۲۳]. در این مطالعه از پدیده مونتاژ قابل برنامه ریزی سامانه‌های تک جزئی نوکلئیک اسیدهای کروی (SNAs) حاوی هسته‌های نانوذرات طلا به عنوان یک سکوی رنگ سنجی ویژه توالی برای تشخیص مولکولی ژن RdRp ویروس SARS-CoV-2 استفاده شده است. این روش، همچنین قابل تعمیم برای تشخیص سایر ژنوم‌های ویروسی نیز می‌باشد.

۲-بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی و دستگاه‌ها

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در سنتز نانوذرات طلا و تهیه بافرها از شرکت مرک تهیه گردید و بدون انجام خالص سازی بیشتر، مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه ی محلول‌ها از آب بدون یون با هدایت ویژه کمتر از ۰/۰۶ میکروزیمنس بر سانتیمتر استفاده شد. تمامی رشته‌های اولیگونوکلئوتیدی طراحی شده، شامل رشته متصل شونده به سطح نانوذره طلا (رشته SNA) که با فسفورو تیوات (PS) اصلاح شده بود، توالی‌های اصلاح شده با رنگ فلورسئین (6-FAM)، اتصال دهنده‌ها و پرایمرهای مورد نیاز برای واکنش PCR، از شرکت بایونیر کره جنوبی سفارش داده شدند. همچنین، پروب TaqMan با اصلاح دوگانه (۵'-فلورفور و ۳'-خاموش-کننده) از شرکت متابیون آلمان تهیه گردید.

اندازه گیری‌های طیف سنجی با استفاده از دستگاه طیف سنج دو پرتویی مدل اسپکورد ۲۱۰ ساخت شرکت آنالیتیک جنا انجام شد. این دستگاه به یک سامانه‌ی سردکننده‌ی پلتیر دست ساز به منظور کنترل دقیق دما مجهز شده بود.

۲-۲- تهیه بافرها

برای تهیه بافر ۵۰۰ میلی‌مولار از HEPES با

غلظت ۱۰ میلی مولار، $pH=7/6$ پراکنده شد تا محلول نهایی نوکلئیک اسیدهای کروی به دست آید. شکل ۱ طرح وارهایی از یک نانوذره نوکلئیک اسید کروی با هسته‌ای از نانوذرات کروی طلا را نشان می‌دهد.



شکل ۱. طرح واره سه بعدی از نوکلئیک اسیدهای کروی با هسته نانوذرات طلا (گوی قرمز رنگ). ناحیه مشکی و قرمز در رشته متصل شده به ترتیب نماینده بلوک اتصال (پلی آدنین یا poly-A اصلاح شده با PS) و بلوک شناسایی می‌باشد.

۲-۵- تهیه نمونه‌های بالینی و استخراج RNA

پیش از انجام آزمایش‌های مرتبط با زیست‌شناسی مولکولی، از جمله محلول‌سازی اولیگونوکلوئوتیدها، استخراج، PCR و ژل الکتروفورز، همه وسایل مصرفی مانند سرسمپلرها، لوله‌های اپندورف و میکروتیوب‌های PCR از طریق اتوکلاو استریل شدند. کلیه آزمایش‌ها در زیر هود با جریان آرام (فلوی لامینار) مجهز به لامپ فرابنفش برای استریل کردن انجام شد و همه ابزار و سطوح به طور کامل با محلول اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شدند.

نمونه‌های بالینی از دستگاه تنفسی فوقانی توسط پرسنل آموزش دیده در آزمایشگاه تشخیص مولکولی و پاتوبیولوژی، با رعایت دستورالعمل‌های زیست‌ایمنی از جمله استفاده از تجهیزات حفاظت فردی مناسب، جمع‌آوری و به دقت مورد استفاده قرار گرفتند. وضعیت

اولیگونوکلوئوتیدهای اصلاح شده با گروه‌های تیول ($-SH$) یا فسفورتیوات (PS) به عنوان عوامل اتصال دهنده، در منابع مختلف گزارش شده است [۲۱ و ۲۲]. این گروه‌های شیمیایی به دلیل تمایل بالا به سطح طلا، قادر به ایجاد پیوندهای شبه کووالانسی پایدار با سطح نانوذرات هستند و از این رو به طور گسترده برای تثبیت الیگونوکلوئوتیدها بر سطح نانوذرات طلا مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این مطالعه، از اولیگونوکلوئوتیدهای اصلاح شده با گروه فسفورتیوات برای اتصال به نانوذرات استفاده شد. در این کار، برای سنتز نوکلئیک اسیدهای کروی از DNA سنجاق سری طراحی شده برای ژن RdRp و ویروس SARS-CoV-2 (جدول ۱) استفاده شد. این DNA، که در هشت نوکلئوتید ابتدایی دارای توالی پلی‌آدنین با اصلاح فسفورتیوات می‌باشد، بر اساس روش کاهش pH توسعه یافته توسط لیو و همکاران، به صورت پایدار به سطح نانوذرات طلا متصل گردید [۲۵]. به طور خلاصه، ۱۵ میکرولیتر از DNA با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول نانوذرات طلای سنتز شده (با غلظت تقریبی ۱۰ نانومولار) درون یک لوله اپندورف استریل افزوده شد و محلول با شدت از طریق ورتکس کردن مخلوط گردید. پس از ۵ دقیقه، ۱۰ تا ۱۵ میکرولیتر از بافر سیترات (۵۰۰ میلی مولار، $pH=3/0$) به مخلوط اضافه و مجدداً به شدت ورتکس شد تا pH محلول کاهش یابد. پس از گذشت ۳ دقیقه، ۱۰ تا ۱۵ میکرولیتر از محلول سدیم کلراید (۲ مولار) به محلول افزوده شد و اجازه داده شد که مخلوط به مدت ۳ دقیقه دیگر در همان شرایط باقی بماند. سپس ۴۰ تا ۵۰ میکرولیتر از بافر HEPES (۵۰۰ میلی مولار، $pH=7/6$) به محلول اضافه گردید تا pH به وضعیت خنثی بازگردد. پس از انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، مخلوط نهایی به مدت ۷ دقیقه در سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. گلوله ژلاتینی باقی مانده در ته لوله در ۵۰۰ میکرولیتر از بافر HEPES پراکنده و مجدداً سانتریفیوژ شد. این فرآیند شستشو سه بار تکرار گردید و در نهایت گلوله ژلاتینی در ۲۵۰ میکرولیتر بافر HEPES (با

مثبت یا منفی بودن نمونه‌های بالینی جمع‌آوری شده توسط کیت تشخیص SARS-CoV-2، که ژن RdRp را هدف قرار می‌دهد، در آزمایش‌های استاندارد تشخیص آلودگی ویروسی تعیین شد. کلیه مراحل ذکرشده در آزمایشگاه تشخیص مولکولی و پاتوبیولوژی فرزنان، همدان انجام شد.

۲-۶- ملاحظه‌های اخلاقی

این تحقیق توسط کمیته اخلاق تحقیقات زیست پزشکی دانشگاه بوعلی سینا همدان بررسی و با کد تاییدیه IR.BASU.REC.1400.017 مورد تأیید قرار گرفته است. همه نمونه‌های بالینی از آزمایشگاه مولکولی و پاتوبیولوژی فرزنان در همدان، ایران، جمع‌آوری شده و موافقت استفاده از نمونه‌ها در مطالعات تحقیقاتی اخذ گردیده است.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اصول طراحی سامانه تک جزئی مبتنی بر SNA برای تشخیص ژن RdRp در SARS-CoV-2

یک توالی نوکلئوتیدی، زمانی پالیندرومیک محسوب می‌شود که رشته مکمل آن با خود توالی یکسان باشد. به عبارت دیگر، در چنین توالی‌هایی، خوانش توالی از انتهای ۵' به ۳' در رشته اصلی، مکمل خوانش همان توالی از انتهای ۳' به ۵' در رشته مکمل است. این ویژگی، به توالی‌های پالیندرومیک خاصیت خود مکملی می‌بخشد. در کار قبلی، ما از یک اتصال دهنده پالیندرومیک شش نوکلئوتیدی در راهبرد مونتاژ تک جزئی برای تشخیص مستقیم ژنوم ویروس نقص ایمنی انسانی نوع ۱ (HIV-1) استفاده کرده‌ایم [۲۶]. در روش مونتاژ تک جزئی، تنها یک نوع SNA تهیه می‌شود و همه نانوذرات طلا با یک نوع رشته DNA دارای توالی پالیندرومیک عامل دار می‌گردند. وجود انتهای پالیندرومیک در این رشته‌ها، موجب مونتاژ خودسازمان‌یافته ساختارهای SNA می‌شود.

برای تشخیص SARS-CoV-2، نواحی مختلفی از ژنوم ویروس از جمله ژن پروتئین سنبه (S)، ژن RNA

پلیمراز وابسته به RNA (RdRp) و ژن پروتئین نوکلئوکسپید (N) به‌عنوان اهداف شناسایی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۸ و ۹]. در این کار، از سامانه SNA همراه با پروب‌های فعال کننده مربوطه برای تشخیص SARS-CoV-2 از طریق هدف‌گیری ژن RdRp استفاده شده است. ناحیه انتخاب‌شده از ژن RdRp ویروس SARS-CoV-2 با استفاده از پایگاه داده NCBI و نرم‌افزار BLAST طراحی شد. معیار انتخاب شامل ویژگی‌های خاص ژن، از جمله حساسیت بالا، عدم تطابق با ژنوم سایر ویروس‌ها یا ژنوم انسانی، و همچنین دمای ذوب مناسب جهت هیبریداسیون با پروب بود. پروب فعال‌کننده یک الیگونوکلئوتید تک‌رشته‌ای است که به گونه‌ای طراحی شده تا مکمل ناحیه‌ی حلقه‌ای در ساختار سنجاق‌سری DNA متصل به نانوذرات طلا، و همچنین ناحیه‌ی هدف از ژن RdRp ویروس SARS-CoV-2 باشد. هیبرید شدن این پروب با ناحیه‌ی حلقه‌ای، منجر به باز شدن ساختار سنجاق‌سری و در نهایت فعال سازی سامانه تشخیص می‌شود.

۳-۲- استفاده از پروب‌های TaqMan برای طراحی پروب‌های فعال کننده

پروب TaqMan یک الیگونوکلئوتید تک رشته‌ای است که دارای یک فلوروفور (نشانه‌گر فلورسنت) در یک انتها و یک خاموش کننده در انتهای دیگر است. این پروب به‌طور اختصاصی به بخشی از توالی هدف، در ناحیه‌ی بین دو پرایمر در PCR متصل می‌شود. در طول مرحله‌ی طویل سازی، آنزیم Taq DNA پلیمراز هنگام سنتز رشته‌ی جدید در جهت ۵' به ۳' به پروب متصل شده، برخورد می‌کند. این آنزیم به واسطه‌ی فعالیت اگزونوکلئازی خود در جهت ۵' به ۳'، پروب متصل شده را تجزیه می‌کند که منجر به آزاد شدن فلوروفور و در نتیجه ایجاد سیگنال فلورسانس می‌شود. این سیگنال در هر چرخه‌ی PCR تقویت می‌شود و امکان پایش فرآیند تکثیر DNA را به صورت زمان واقعی فراهم می‌سازد.

در نهایت توالی پالیندرومیک خارجی که در فرآیند مونتاژ نقش دارد. توالی تشخیص میان دو ناحیه‌ی پالیندرومیک داخلی و خارجی قرار گرفته و در جدول ۱، این دو ناحیه‌ی پالیندرومیک با رنگ سبز مشخص شده‌اند.

هنگامی که نانوذرات طلا با رشته‌های DNA سنجاق سری مبتنی بر ساقه‌های پالیندرومیک عامل دار می‌شوند، می‌توان آن‌ها را به گونه‌ای برنامه ریزی کرد که در حضور توالی هدف، پروب فعال کننده هیچ گونه هیبریدی با ناحیه حلقه ایجاد نکند. در این حالت، به دلیل بسته بودن ساختار ساقه، نانوذرات در وضعیت پراکنده و پایدار باقی می‌مانند. اما در غیاب توالی هدف هنگامی که پروب فعال کننده با توالی حلقه (که مکمل آن است) هیبرید می‌شود، ساختار سنجاق سری باز می‌شود و این تغییر ساختار موجب القای مونتاژ تک جزئی بین نانوذرات SNA می‌گردد. انتظار می‌رود که این مونتاژ فعال شده بین ذرات SNA منجر به تغییر رنگ محلول از قرمز به آبی شود. این تغییر رنگ ناشی از برهم کنش پلاسمونیک بین نانوذرات تجمع یافته است. ایده به کارگیری توالی‌های پالیندرومیک از توانایی خود مکملی آن‌ها در تشکیل ساختارهای سنجاق سری الهام گرفته شده است. به همین دلیل، این توالی‌ها را DNAهای سنجاق سری مبتنی بر پالیندرومیک نامگذاری کرده‌ایم و نانوذرات طلای عامل دار شده با این رشته‌ها را H-SNA می‌نامیم.

توالی پروب فعال کننده استفاده شده در این کار به گونه‌ای انتخاب شده است که مشابه پروب TaqMan مورد استفاده برای شناسایی ژن RdRp در روش PCR در زمان واقعی باشد (qPCR) (جدول ۱). از آن جا که در روش ارائه شده در این مطالعه، پروب فعال کننده عملکردی مشابه پروب TaqMan در واکنش qPCR دارد و در چرخه PCR معمولی نیز تحت تأثیر فعالیت ۵'-گزونوکلئازی آنزیم DNA پلیمرز قرار می‌گیرد، فعالیتی که در qPCR موجب تجزیه پروب TaqMan می‌شود، طراحی توالی آن می‌تواند مشابه با پروب TaqMan انجام گیرد.

۳-۳- ساختار سنجاق سری در سامانه H-SNA و عملکرد آن

DNA متصل به نانوذرات طلا که به آن رشته SNA گفته می‌شود، دارای ساختار سنجاق سری است. ساختار سنجاق سری نوعی شکل تاخورد در رشته‌های DNA است که در آن بخش‌هایی از رشته به هم جفت می‌شوند و یک حلقه و ساقه می‌سازند. در این مطالعه، رشته SNA از یک ساختار حلقه-ساقه مبتنی بر توالی پالیندرومیک بهره می‌برد. این DNA دارای چهار ناحیه عملکردی اصلی است: بلوک لنگر یا اتصال، که از پلی‌آدنین‌های متوالی با اصلاح فسفورو تیوات تشکیل شده و برای پیوند به سطح نانوذرات طلا طراحی شده است (در جدول ۱ با علامت ستاره مشخص شده‌اند)، توالی پالیندرومیک داخلی که به پایداری ساختار سنجاق سری کمک می‌کند، توالی مکمل هدف (توالی تشخیص) که برای شناسایی رشته هدف استفاده می‌شود، و

جدول ۱. توالی‌های DNA استفاده شده در این مطالعه

نام توالی	توالی و اصلاح‌ها (از ۵' به ۳')
DNA سنجاق سری	A*A*A*A*A*A*A*A*AAACCCGGGCATCTCCTGATGAGGTTCCACCTGCAACCCGG ^a
پروب فعال کننده	CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC
پروب TaqMan	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAG ATGC-BBQ ^b
پرایمر رفت	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
پرایمر برگشت	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA

^aتوالی پالیندرومیک با رنگ سبز و اصلاح فسفورو تیوات با "*" مشخص شده است. ^bFAM = رنگ فلورسین.

۳-۴- بررسی ساختار ثانویه رشته‌های DNA طراحی

شده

برای پیش‌بینی ساختارهای ثانویه احتمالی رشته‌های درگیر در سامانه، از الگوریتم‌های آنالیز نیوپک استفاده شد. این ابزار، با محاسبه حداقل انرژی آزاد، پایدارترین ساختارهای ثانویه را برای رویدادهای اتصال بین الیگونوکلوئوتیدهای طراحی شده پیش‌بینی می‌کند. الگوریتم‌های نیوپک قادرند انرژی‌های آزاد مربوط به تا شدن و جفت شدن رشته‌های نوکلوئوتیدی، ناشی از برهم کنش‌های واتسون-کریک را به صورت کمی ارزیابی کند. همچنین، این نرم‌افزار می‌تواند پایدارترین ساختارهای دوگانه را در مخلوط نوکلئیک اسیدها به صورت شکل‌های بسیاری نمایش دهد.

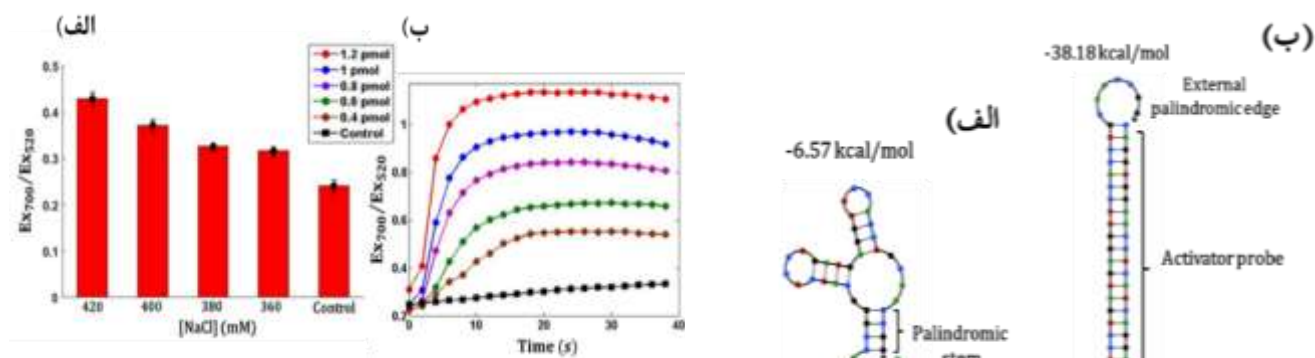
در این مطالعه، ساختارهای ثانویه مربوط به سه حالت مختلف مورد بررسی قرار گرفتند: نخست، ساختار حلقه‌ی بسته‌ی سنجاق سری که ناشی از هیبرید شدن درون مولکولی ساقه‌های پالیندرومیک است (شکل ۲-الف) دوم، حالت بازشده‌ی جفت رشته‌ای حلقه‌ی فعال کننده که در اثر هیبرید شدن بین توالی حلقه‌ی DNA سنجاق سری و پروب فعال کننده به وجود می‌آید (شکل ۲-ب) و سوم، ساختار هدایت کننده‌ی مونتاژ که ناشی از جفت شدن توالی‌های پالیندرومیک خارجی آزاد شده از دو رشته‌ی سنجاق سری مربوط به ذرات مجاور است (شکل ۲-ج). این ساختارها برای توالی‌های طراحی شده‌ی مربوط به ژن RdRp با استفاده از الگوریتم‌های دقیق نرم‌افزار نیوپک شبیه سازی و تحلیل شدند. نتایج نشان می‌دهند که ساختار نمایش داده شده در شکل ۲-ج دارای کمترین انرژی آزاد محاسبه شده است. این ساختار، در مقایسه با سایر حالت‌ها، از پایداری ترمودینامیکی بالاتری برخوردار بوده و به‌عنوان محتمل‌ترین ساختار شناخته می‌شود که فرآیند مونتاژ را هدایت می‌کند.

۳-۵- بهینه سازی شرایط تجربی سنجش

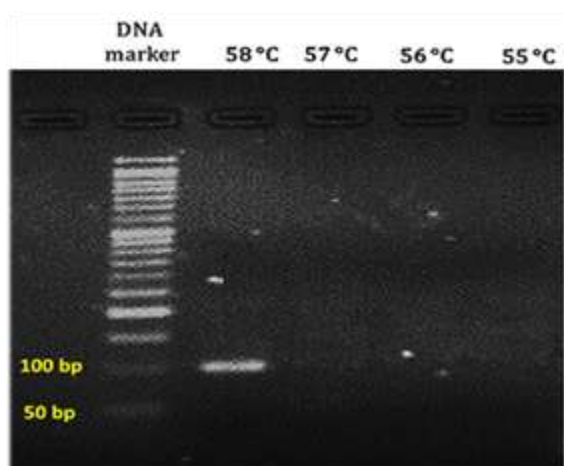
برای بهینه سازی فرآیند مونتاژ تک جزئی نانوذرات طلا، داده‌های سینتیکی-طیفی ثبت و نسبت Ex700/Ex520 به عنوان تابعی از زمان مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله‌ی

نخست، پایداری محلول‌های H-SNA در غلظت‌های مختلف NaCl و در حضور $MgCl_2$ ۰/۶۲۵ میلی مولار ارزیابی شد. استفاده از $MgCl_2$ با هدف پایداری ساختارهای DNA و همچنین برای شبیه سازی شرایط زیستی موجود در واکنش PCR صورت گرفت، زیرا Mg^{2+} یکی از اجزای ضروری برای عملکرد صحیح آنزیم DNA پلیمراز در واکنش PCR است. نتایج نشان داد که در غلظت‌های بالاتر از ۴۰۰ میلی مولار NaCl، نسبت Ex700/Ex520 به طور محسوسی افزایش می‌یابد که بیانگر تجمع برگشت ناپذیر نانوذرات SNA به دلیل کاهش پایداری کلوتیدی در قدرت یونی بالا است. بنابراین، برای حفظ پایداری محلول SNA، NaCl با غلظت ۳۸۰ میلی مولار به‌عنوان شرایط بهینه انتخاب شد (شکل ۳-الف). در مرحله‌ی بعد، برای تعیین غلظت بهینه‌ی پروب فعال کننده، سینتیک تشکیل مونتاژ در حضور مقادیر مختلفی از این پروب (در بازه‌ی ۰/۴ تا ۱/۲ پیکومول معادل با ۱۲ تا ۲۵ نانومولار) مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش در حضور NaCl ۳۸۰ میلی‌مولار و پس از یک دقیقه آنیلینگ در دمای ۶۰ درجه‌ی سلسیوس انجام شد. نتایج نشان داد که بهترین پاسخ رنگ‌سنجی برای تشخیص ژن RdRp در حضور ۱/۲ پیکومول معادل با ۲۰ نانومولار از پروب فعال کننده به دست می‌آید (شکل ۳-ب).

برای بهینه سازی شرایط واکنش PCR، دمای اتصال (آنیلینگ) پرایمرها در دماهای ۵۵، ۵۶، ۵۷ و ۵۸ درجه‌ی سلسیوس مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش PCR در هر یک از این دماها انجام شد و محصولات حاصل، پس از بارگذاری بر روی ژل آگارز، با روش الکتروفورز بررسی شدند. نتایج ژل الکتروفورز (شکل ۴) نشان داد که در دمای ۵۸ درجه‌ی سلسیوس، نوار DNA با وضوح و اندازه‌ی مورد انتظار مشاهده شد که نشان دهنده‌ی تکثیر مؤثر و اختصاصی هدف ژنی است. بنابراین، دمای ۵۸ درجه‌ی سلسیوس به عنوان دمای بهینه‌ی آنیلینگ برای تکثیر ژن RdRp انتخاب شد.

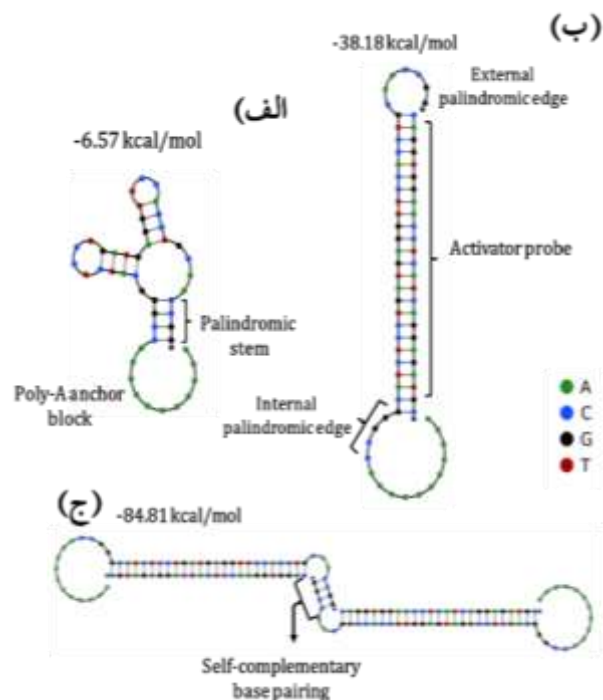


شکل ۳. بهینه سازی پاسخ رنگ سنجی (الف) بررسی پایداری کلونیدی نانوذرات SNA بر پایه ژن RdRp. نسبت جذب نوری Ex700/Ex520 به عنوان تابعی از غلظت NaCl در حضور Mg^{2+} ۰/۶۲۵ میلی مولار اندازه گیری شده است. طیف‌های فرابنفش-مرئی ده دقیقه پس از افزودن NaCl ثبت شده‌اند. (میل‌های خطا نشان دهنده انحراف معیار هستند، $n=3$)، (ب) ارزیابی غلظت پروب فعال کننده. نسبت Ex700/Ex520 به عنوان تابعی از زمان در مقادیر مختلف پروب فعال کننده پایش شد. نسبت‌های Ex700/Ex520 بالاتر از ۰/۸ منجر به تغییر رنگ کافی می‌شوند که به راحتی با چشم غیرمسلح قابل تشخیص است.

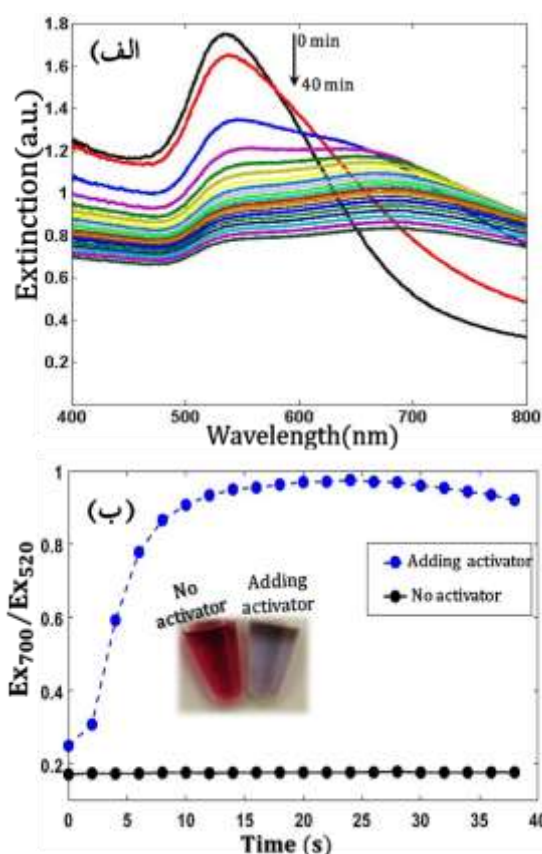


شکل ۴. تصویر ژل الکتروفورز آگارز محصول PCR در دماهای مختلف برای بهینه سازی دمای اتصال (آنیلینگ).

شکل ۲. شکل‌های بسیاری شبیه سازی شده توسط الگوریتم‌های آنالیز نیوپیک که نمایانگر تشکیل ساختارهای ثانویه مورد انتظار برای DNA سنجاق سری و پروب فعال کننده طراحی شده برای سیستم ژن RdRp هستند. (الف) ساختار بسته‌ی سنجاق سری که به صورت حلقه-ساقه تشکیل شده است، (ب) ساختار باز که بیانگر هیبرید شدن توالی حلقه‌ی سنجاق سری با پروب فعال کننده و تشکیل یک ساختار دو رشته‌ای می باشد، (ج) ساختار ثانویه‌ای که نشان دهنده باز شدن انتهای چسبنده‌ی پالیندرومیک است و فرآیند مونتاژ تک جزئی را هدایت می‌کند. مقدار کمینه انرژی آزاد هر ساختار در بالای هر تصویر نمایش داده شده است.



است. بر اساس این تصویر، ساختاری منحصر به فرد با آرایشی شبیه به گل مشاهده می‌شود که در این مطالعه با عنوان «پیکربندی گل مانند» معرفی شده است. این ساختار به عنوان یکی از ویژگی‌های شاخص سامانه‌های مونتاژ تک جزئی گزارش شده است [۸ و ۹]. چنین آرایشی حاصل توانایی هر ذره‌ی SNA در ایجاد پیوند با ذرات هم نوع مجاور خود با احتمال تقریباً یکسان است، که در نهایت منجر به شکل گیری این ساختار منظم و سازمان یافته می‌شود.



شکل ۵. الف) تغییرات طیفی فرابنفش-مری مربوط به تشکیل مونتاژ تک جزئی سامانه طراحی شده برای ژن RdRp (ب) تغییرات نسبت Ex_{700}/Ex_{520} به عنوان تابعی از زمان که از داده‌های طیفی بخش الف محاسبه شده است. عکس‌هایی که رنگ محلول SNA را در حضور و در غیاب پروب فعال کننده نشان میدهند درون شکل ب نشان داده شده اند.

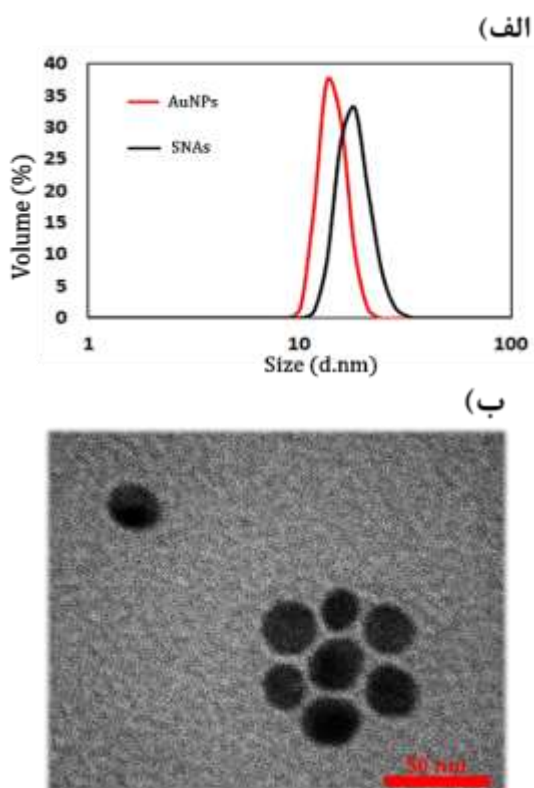
۳-۶- بررسی طیف سنجی و سینتیکی فرآیند مونتاژ تک جزئی سامانه طراحی شده

سینتیک تشکیل مونتاژ تک جزئی فعال شده مربوط به سامانه H-SNA طراحی شده برای ژن RdRp در حضور پروب فعال کننده در شرایط بهینه با طیف سنجی فرابنفش-مری مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۵-الف تغییرات طیفی فرابنفش-مری را در طول این فرایند نشان می‌دهد. این اندازه گیری طی ۴۰ دقیقه با فواصل ۲ دقیقه‌ای، در دمای ثابت ۲۵ درجه سلسیوس و در حجم کل ۶۰ میکرولیتر از بافر ۱۰ میلی مولار HEPES با pH برابر ۷/۶، شامل ۸ نانومولار SNA، ۲۰ نانومولار پروب فعال کننده و ۳۸۰ میلی مولار انجام شد. در این فرآیند، کاهش شدت جذب در حدود ۵۲۰ نانومتر و افزایش آن در محدوده ۶۵۰ تا ۷۵۰ نانومتر بیانگر وقوع مونتاژ نانوذرات است. همان طور که در شکل ۵-ب مشاهده می‌شود، نسبت Ex_{700}/Ex_{520} در حضور پروب فعال کننده با سرعت نسبتاً بالایی افزایش می‌یابد، در حالی که در غیاب آن، این نسبت بدون تغییر باقی می‌ماند که نشان دهنده عدم وقوع مونتاژ است. این فرآیند با یک تغییر رنگ سریع و آشکار همراه است که از قرمز به آبی تبدیل می‌شود و به عنوان یک پاسخ رنگ سنجی قابل تشخیص با چشم غیرمسلح محسوب می‌شود (تصویر داخل شکل ۵-ب).

۳-۷- تحلیل اندازه ذرات و بررسی ساختار گل مانند SNAها

توزیع اندازه هیدرودینامیکی نانوذرات طلای عریان و SNAهای سنتز شده با استفاده از روش پراکندگی دینامیکی نور در شکل ۶-الف نشان داده شده است. اندازه متوسط نانوذرات طلای عریان و SNAها به ترتیب برابر با 13 ± 3 نانومتر و 17 ± 3 نانومتر به دست آمد. این مقادیر از میانگین پیک‌های حاصل از سه اندازه‌گیری مستقل محاسبه شده‌اند و انحراف معیار مربوطه نیز لحاظ شده است. همچنین، تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مربوط به SNAهای سنتز شده در شکل ۶-ب نمایش داده شده

هیچ نواری در اندازه مورد انتظار مشاهده نشد (شکل ۷-۲). در مرحله بعد، ۱۵ میکرولیتر از محصولات PCR مربوط به آمپلیکون ژن RdRp به محلول‌های H-SNA مربوطه در حجم کل ۶۰ میکرولیتر اضافه و سپس در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه بازپخت شد. همان‌طور که در شکل ۷-۲ نشان داده شده است، رنگ ویال محلول آزمایشی مربوط به نمونه مثبت قرمز باقی مانده است، در حالی که ویال مربوط به نمونه کنترل منفی طی چند دقیقه دچار تغییر رنگ از قرمز به آبی شد.



شکل ۶. الف) طیف پراکندگی دینامیکی نور هسته‌های AuNP و H-SNAهای تهیه شده با همان هسته‌های AuNP در ۲۵ درجه سلسیوس و ب) تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مربوط به سامانه مونتاژ سیستم تک جزئی ژن RdRp.

۸-۳- تشخیص رنگ سنجی ژن RdRp ویروس SARS-CoV-2 مبتنی بر مونتاژ H-SNA

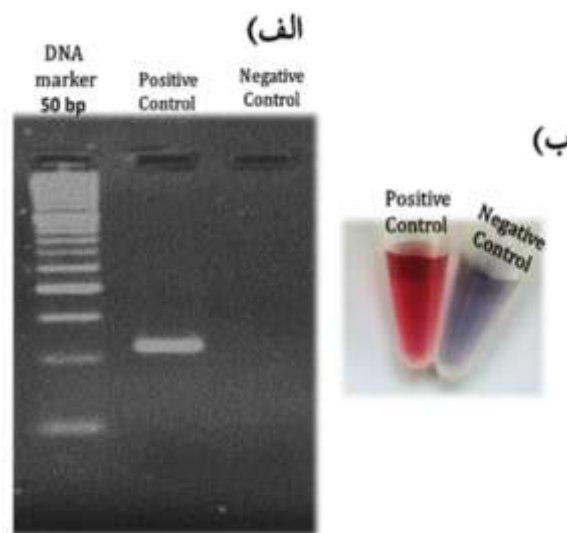
به منظور تشخیص رنگ سنجی ژن RdRp ویروس SARS-CoV-2، از یک سامانه تک جزئی قابل برنامه ریزی مبتنی بر اتصال دهنده پالیندرومیک، همراه با فعالیت ۵'-اگزونوکلئاز DNA پلیمرز در روش PCR معمولی، استفاده شد.

در نمونه‌های مثبت که الگوی هدف در آن‌ها وجود دارد، DNA فعال کننده که به طور ویژه برای اتصال به بخشی از یک آمپلیکون خاص از توالی هدف انتخاب شده است به ویال‌های PCR اضافه و با الگوی هدف هیبرید می‌شود. در طول چرخه PCR و از طریق فعالیت ۵'-اگزونوکلئاز DNA پلیمرز، DNA فعال کننده تخریب می‌گردد. در این صورت، با افزودن محلول H-SNA ساخته شده برای ژن RdRp به محصول نهایی PCR به عنوان مرحله تشخیص رنگ سنجی پس از PCR، فرم کلئیدی و رنگ قرمز محلول سوسپانسیون حفظ می‌شود. زیرا DNA فعال کننده قبلاً توسط آنزیم در طول فرآیند تقویت PCR هضم شده و دیگر قادر به بازکردن ساختار سنجاق سری رشته SNAهای متصل شده به نانوذرات طلا نخواهد بود. به عبارت دیگر، ثابت ماندن رنگ قرمز محلول H-SNA پس از افزودن به محصولات PCR، نشان دهنده وجود الگوی صحیح DNA در واکنش PCR و نمونه مثبت است. اما در صورت عدم وجود الگوی هدف در نمونه، فعال کننده‌ها در طول PCR دست نخورده باقی می‌مانند و از طریق هیبرید شدن با توالی حلقه، باعث باز شدن ساختار حلقه-ساقه در DNAهای سنجاق سری و در نتیجه القای مونتاژ H-SNAها می‌شوند. در این حالت، یک تغییر رنگ شدید از قرمز به آبی در مرحله رنگ سنجی پس از PCR مورد انتظار خواهد بود. آنالیز ژل الکتروفورز بر روی محصولات PCR آمپلیکون‌های ژن RdRp مربوط به یک نمونه مثبت با مقدار Ct پایین و یک نمونه منفی انجام شد که تصویر ژل نشان دهنده نوارهای واضح یگانه در اندازه‌های مورد انتظار برای خط ژن RdRp در نمونه مثبت بود. در حالی که در نمونه کنترل منفی،

شد. فرآیند رونوشت برداری معکوس و تکثیر به صورت یک مرحله‌ای و در حضور پروب اختصاصی مربوطه صورت گرفت. محصولات PCR معمولی حاصل از هر آزمایش به طور جداگانه با استفاده از الکتروفورز ژل مورد ارزیابی قرار گرفتند. همان طور که در شکل ۸-الف مشاهده می‌شود، در نمونه‌های مثبت، نوارهایی با اندازه‌ی مورد انتظار دیده شد، در حالی که در نمونه‌های منفی شامل شماره‌های ۲، ۶ و ۷ هیچ نواری مشاهده نگردید.

به منظور ارزیابی عملکرد روش رنگ سنجی ارائه شده در شرایط بالینی، مقدار ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR به محلول H-SNA اختصاصی برای ژن RdRp افزوده شد. پس از بازپخت شدن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، نمونه‌ها از نظر تغییر رنگ مورد بررسی قرار گرفتند. در نمونه‌های مثبت، رنگ محلول قرمز باقی ماند که نشان دهنده‌ی تخریب پروب فعال کننده در جریان واکنش PCR و عدم تشکیل ساختار مونتاژ تک جزئی بود. این امر بیانگر حضور RNA ویروسی هدف در نمونه و صحت عملکرد واکنش PCR در مرحله‌ی پیشین است. در مقابل، در نمونه‌های منفی، محلول رنگ آبی (مایل به آبی) به خود گرفت که بیانگر باقی ماندن پروب فعال کننده، باز شدن ساختار سنجاق سری، و در نتیجه القای تجمع نانوذرات بود؛ پدیده‌ای که در نبود محصول PCR اختصاصی رخ می‌دهد. مطابق شکل ۸-ب، تمامی نتایج نمونه‌ها به درستی شناسایی و دسته بندی شدند.

نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از روش استاندارد RT-qPCR به طور کامل مطابقت داشتند، که نشان دهنده‌ی قابلیت اطمینان بالای روش پیشنهادی در کاربردهای بالینی است. این یافته‌ها اهمیت بالای روش رنگ سنجی مبتنی بر H-SNA را به ویژه در شرایطی که تجهیزات پیشرفته‌ی تشخیص مولکولی در دسترس نیستند، برجسته می‌سازد. همچنین، حساسیت بالای این روش در تشخیص بار ویروسی پایین، آن را به گزینه‌ای مناسب برای غربالگری اولیه در مراکز درمانی و آزمایشگاهی با امکانات محدود تبدیل می‌کند.



شکل ۷. الف) آنالیز ژل الکتروفورز محصولات PCR معمولی که با استفاده از جفت پرایمرهای ویژه آمپلیکون‌های ژن RdRp و در حضور پروب‌های مربوطه (پس از ۴۵ چرخه تقویت) به دست آمده است. ب) عکس نشان دهنده تشخیص رنگ سنجی بعد از PCR مربوط به نمونه‌هایی که در آزمایش ژل الکتروفورز به دست آمده بودند.

۳-۹- ارزیابی عملکرد سامانه در نمونه‌های بالینی واقعی

برای بررسی دقت و کارایی روش پیشنهادی در شرایط واقعی، تعداد ۹ نمونه RNA استخراج شده از سواب حلقی بیماران مشکوک به عفونت SARS-CoV-2 (همدان، آزمایشگاه پاتوبیولوژی و ژنتیک مولکولی فرزانه) (همدان، ایران) مراجعه کرده بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. این نمونه‌ها پیش تر با استفاده از کیت استاندارد PCR در زمان واقعی و با هدف یابی ژن RdRp مورد آزمایش قرار گرفته و وضعیت مثبت یا منفی بودن آن‌ها مشخص شده بود. از میان این ۹ نمونه، شش مورد مثبت و سه مورد منفی گزارش شده بودند. به منظور ارزیابی کارایی روش در شرایط سخت تر، سه نمونه‌ی مثبت به صورت سریالی رقیق شدند تا بار ویروسی آن‌ها کاهش یابد و مقدار Ct در بازه‌ی ۳۴ تا ۳۸ قرار گیرد. ابتدا، واکنش RT-PCR معمولی برای تمامی نمونه‌ها انجام

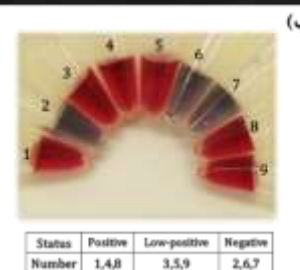
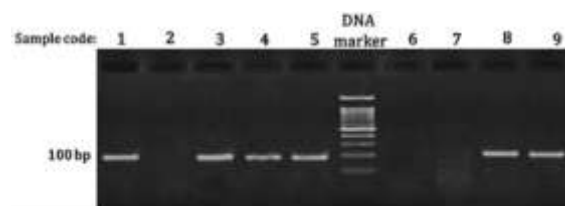
فرا تر رفته و سیگنال فلورسانسی که در حین تقویت تولید می‌شود، به طور نمایی از سطح پس زمینه (یا خط آستانه) عبور می‌کند. مقادیر Ct رابطه معکوسی با بار ویروسی دارند، به طوری که مقادیر پایین تر Ct نشان دهنده تعداد کپی‌های بالاتر RNA ویروسی است. به طور کلی، مقادیر Ct بالاتر از ۴۰ از نظر بالینی به عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته نمی‌شود و در مقابل، مقادیر Ct کمتر از ۴۰ برای SARS-CoV-2 مثبت تلقی می‌شود. در عملکرد تشخیص RT-qPCR در زمان واقعی، در مرحله پنجم رقیق سازی (یعنی ضریب رقت ۱۰^۵)، عملکرد برای نمونه شماره ۱ و ۲ مناسب بود، اما برای نمونه ۳ ضعیف بود. اما روش رنگ سنجی پس از PCR (روش ارائه شده در این پژوهش)، در هر سه نمونه و در پنج مرحله رقیق سازی، نتایج دقیقی ارائه داد که نشان دهنده قابلیت اطمینان و کارایی این روش است. نتایج این آزمایش‌ها در جدول ۲ ارائه شده‌اند.

جدول ۲. مقایسه حساسیت روش PCR در زمان واقعی با

روش رنگ سنجی						
RT-qPCR (Ct value)			Post-PCR colorimetric method			
شماره	شماره	شماره ۳	شماره	شماره	شماره	شماره
۱	۲		۱	۲	۳	
۱	۲۲/۸۷	۲۴/۰۹	۲۴/۳۸	+	+	+
۱۰	۲۵/۴۰	۲۶/۰۸	۲۸/۷۲	+	+	+
۱۰۰	۲۹/۶۸	۳۰/۴۲	۳۱/۵۷	+	+	+
۱۰۰۰	۳۲/۳۳	۳۳/۴۲	۳۴/۵۱	+	+	+
۱۰۰۰۰	۳۵/۳۴	۳۶/۱۶	۳۶/۱۶	+	+	+
۱۰۰۰۰۰	۳۸/۸۲	۳۹/۷۲	قابل کاربرد نیست	+	+	+

۴- نتیجه گیری

در این کار از ویژگی تغییر پذیر ساختار ساقه-حلقه مبتنی بر توالی‌های پالیندرومیک برای القاء مونتاژهای تک جزئی پاسخگو به هدف در SNAها استفاده شد. این مونتاژ پاسخگو به هدف، یک پاسخ رنگ سنجی ساده و قابل تشخیص با چشم غیر مسلح را ارائه می‌دهد. فعالیت ۵'-



شکل ۸. الف) تصویر ژل مربوط به محصولات PCR معمولی حاصل از ۹ نمونه بالینی که برای تأیید دقت آزمون مورد استفاده قرار گرفته‌اند. ب) عکس نشان دهنده نتایج تشخیص رنگ سنجی مربوط به نمونه‌های بالینی است.

۳-۱۰- تکرارپذیری و حساسیت روش

برای ارزیابی تکرارپذیری سنجش، محصول PCR یک نمونه مثبت به سه لوله PCR مجزا تقسیم و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد تا در سه تکرار جداگانه و در سه روز مختلف، توسط SNA های تازه تهیه شده مورد بررسی قرار گیرد. نتایج حاصل از هر سه تکرار کاملاً یکسان بودند، که نشان دهنده تکرارپذیری، قابلیت اطمینان و پایداری روش پیشنهادی است. حساسیت روش ارائه شده نیز با مقایسه نتایج حاصل از سنجش بر روی رقت‌های سریالی (با فاکتور رقیق سازی ۱۰ و در ۵ مرحله) از سه نمونه حقیقی مثبت RNA استخراج شده، با نتایج به دست آمده از روش استاندارد RT-qPCR برای ناحیه ژنی RdRp مورد بررسی قرار گرفت. در جدول ۲ نتایج RT-PCR در زمان واقعی و روش رنگ سنجی پس از PCR (روش ارائه شده در این کار) به ترتیب به صورت مقدار Ct و پاسخ بولین (+ یا -) گزارش شده است. مقدار Ct به تعداد چرخه‌های تقویتی در روش استاندارد RT-qPCR که برای تشخیص یک سیگنال معنادار از نمونه‌ها نیاز است، اشاره دارد. پس از انجام چندین چرخه، تعداد کپی‌های ژن هدف از سطح آستانه

- [7] J. I. Cutler, E. Auyeung, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1376 (2012).
- [8] A. Karami, M. Hasani, F. Azizi Jalilian, R. Ezati, *Sens. Actuators, B* **328**, 128971 (2021).
- [9] A. Karami, M. Hasani, F. Azizi Jalilian, R. Ezati, *Anal. Chem.* **93**, 9250 (2021).
- [10] F. Liu, R. Chen, W. Song, L. Li, C. Lei, Z. Nie, *Anal. Chem.*, **93**, 3517 (2021).
- [11] X. Tan, X. Lu, F. Jia, X. Liu, Y. Sun, J. K. Logan, K. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 10834 (2016).
- [12] M. H. Teplensky, M. E. Distler, C. D. Kusmierz, M. Evangelopoulos, H. Gula, D. Elli, A. Tomatsidou, V. Nicolaescu, I. Gelarden, A. Yeldandi, D. Battle, D. Missiakas, C. A. Mirkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2119093119 (2022).
- [13] C. E. Callmann, L. E. Cole, C. D. Kusmierz, Z. Huang, D. Horiuchi, C. A. Mirkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **117**, 17543 (2020).
- [14] L. Chou, C. E. Callmann, D. Dominguez, B. Zhang, C. A. Mirkin, *ACS Cent. Sci.*, **8**, 1299 (2022).
- [15] G. Wang, S. Han, Y. Lu, Small, **20**, 2310026 (2024).
- [16] Z. Tao, H. Zhang, S. Wu, J. Zhang, Y. Cheng, L. Lei, Y. Qin, H. Wei, C. Y. Yu, *Nanoscale*, **16**, 4392 (2024).
- [17] X. Tang, S. Zhao, J. Luo, B. Wang, X. Wu, R. Deng, K. Chang, M. Chen, Small, **20**, 2310732 (2024).
- [18] X. Huang, M. A. El-Sayed, *J. Adv. Res.*, **1**, 13 (2010).
- [19] K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li, V.M. Rotello, *Chem. Rev.* **112**, 2739 (2012).
- [20] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 3280 (2010).
- [21] B. Liu, J. Liu, *Anal. Methods* **9**, 2633 (2017).
- [22] A. Karami, M. Hasani, *Anal. Methods*, **14**, 4104 (2023).
- [23] A. Karami, M. Hasani, *Sens. Actuators B Chem.*, **365**, 131899 (2022).
- [24] J. Liu, Y. Lu, *Nat. Protoc.* **1**, 246 (2006).
- [25] X. Zhang, M. R. Servos, J. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 7266 (2012).
- [26] A. Karami, M. Hasani, *Anal. Chim. Acta*, **1102**, 119 (2020).

اگزونوکلئازی DNA پلیمرز با پروبهای H-SNA حاوی هسته‌های نانوذره طلا با PCR معمولی ادغام شد و نتایج خوبی برای تشخیص رنگ سنجی ژن RdRp ویروس SARS-CoV-2 به دست آمد. با توجه به نیاز سامانه‌های بهداشت عمومی به ابزارهای تشخیصی ساده، ارزان و در دسترس برای بیماری‌های عفونی، روش‌های سنجش زیستی مبتنی بر مونتاژ قابل برنامه ریزی نوکلئیک اسیدهای کروی می‌توانند کاربرد گسترده‌ای در تشخیص بیماری‌های ویروسی داشته باشند. این روش به سادگی و با طراحی دو بازوی پالیندرومیک در دو طرف توالی هدف، قابلیت توسعه برای شناسایی سایر ژنوم‌های ویروسی را نیز دارا است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حمایت مالی دانشگاه بوعلی سینا در انجام این تحقیق تشکر می‌نمایند. همچنین از همکاری و مساعدت آزمایشگاه کلینیکی فرزانه (همدان) که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌گردد.

عهده دار مکاتبات

نشانی: ایران، همدان، دانشکده شیمی و علوم نفت، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده شیمی. پیام نگار:

hasani@basu.ac.ir

مراجع

- [1] S. Aftab, A. Abbas, M. Z. Iqbal, S. Hussain, F. Kabir, E. Akman, F. Xu, H. H. Hegazy, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **167**, 117223 (2023).
- [2] L. Li, T. Wang, Y. Zhong, R. Li, W. Deng, X. Xiao, Y. Xu, J. Zhang, X. Hu, Y. Wang, *J. Mater. Chem. B*, **12**, 1168 (2024).
- [3] L. Zhang, Y. Ying, Y. Li, Y. Fu, *Biosens Bioelectron.*, **154**, 112036 (2020).
- [4] J. M. Slocika, R. R. Naik, *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 3454 (2010).
- [5] C. A. Mirkin, S. H. Petrosko, *ACS Nano*, **17**, 16291 (2023).
- [6] S. N. Barnaby, G. A. Perelman, K. L. Kohlstedt, A. B. Chinen, G. C. Schatz, C. A. Mirkin, *Bioconjugate Chem.*, **27**, 2124 (2016).