سنتز نانوذره مغناطیسی با پوشش SiO_2 با هدف خالص سازی مولکول DNA

ناهید مرادی[۱]، امیرحسین احمدی*[۱]، حسین نیک منش[۱]

[۱]دانشکده علوم و فناوری‌های نانو و زیستی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر ، ahahmadi@pgu.ac.ir

چکیده

ذرات مغناطیسی پس از اصلاح سطح می‌توانند به جدایی سریع از یک سیستم چند فازی پیچیده دست یابند، بنابراین می‌توان آنها را در جداسازی DNA استفاده کرد. با توجه به اینکه استخراج مغناطیسی DNA باعث صرفه‌جویی در زمان و کاهش استفاده از حلال‌های شیمیایی می‌شود؛ پژوهش حاضر با هدف استخراج و خالص‌سازی DNA با استفاده از نانوذرات مغناطیسی انجام شده است. در این مطالعه از نمونه‌های خون، بزاق و برگ گیاه برای استخراج DNA ژنومی استفاده شد. استخراج با استفاده از نانوذرات Fe3O4@SiO2، سنتز شده از طریق فرآیند استوبر، صورت گرفت. کیفیت DNA استخراج شده با کمک الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. فرآیند PCR با کمک ژن HP به عنوان ژن هدف و با استفاده از DNA استخراج شده نمونه‌های خون و بزاق انجام گرفت و محصولات PCR با الکتروفورز ژل آگارز مشاهده شدند. نتایج حاصل از PCR تایید کرد که DNAهای استخراج شده با Fe3O4@SiO2 هیچ آلودگی نداشته و می‌توان آنها را در واکنش‌های PCR تکثیر کرد.

واژه‌های کلیدی:استخراج DNA، نانوذرات مغناطیسی، ژن HP، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Synthesis of SiO_2-coated magnetic nanoparticle ith the aim of DNA purification

Nahid Moradi, Amirhossein Ahmadi*, Hossein Nikmanesh

Faculty of Nano and Bio Science and Technology, ahahmadi@pgu.ac.ir

Abstract

After surface modification, magnetic particles can achieve rapid separation from a complex multiphase system, so they can be used in DNA isolation. Considering that DNA magnetic extraction saves time and reduces the use of chemical solvents; The current research was carried out with the aim of extracting and purifying DNA using magnetic nanoparticles. In this study, blood, saliva and plant leaf samples were used to extract genomic DNA. Extraction was done using Fe3O4@SiO2 nanoparticles, synthesized through Stöber process. The quality of the extracted DNA was checked with the agarose gel electrophoresis. The PCR process was carried out on HP gene as the target gene and using DNA extracted from blood and saliva samples, and the PCR products were observed by agarose gel electrophoresis. The results of PCR confirmed that the DNAs extracted with Fe3O4@SiO2 have no contamination and can be amplified in PCR reactions.

Key words: DNA extraction, magnetic nanoparticles, HP gene, polymerase chain reaction

۱. مقدمه

استخراج اسیدهای نوکلئیک (DNA) با کیفیت بالا از منابع مختلف نقطه شروع در هر مطالعه زیست‌شناسی مولکولی است [3]. DNA را می‌توان از منابع مختلفی مانند نمونه‌های بالینی، نمونه‌های پزشکی قانونی، نمونه‌های خاک، گیاه، بافت حیوانی، حشرات، تک یاخته‌ها، باکتری‌ها و مخمرها استخراج کرد. DNA استخراج شده می‌تواند برای DNA Sequencing، PCR، qPCR، Southern Blotting، RAPD، AFLP، RFLP، STRP،SNP و VNTR مورد استفاده قرار گیرد [4]. در سال‌های اخیر، با پیشرفت تکنیک‌های زیست‌پزشکی، نانوذرات مغناطیسی به دلیل کاربردهای گسترده در زمینه‌های زیست‌پزشکی و صنعتی، و همچنین پاسخ‌های مغناطیسی پایدار و هزینه کم آنها؛ به عنوان یکی از امیدوارکننده‌ترین مواد کاربردی شناخته شده‌اند [9,11]. کاربرد بیولوژیکی این نانوذرات مانند جداسازی مغناطیسی، سنجش ایمنی، هایپرترمی مغناطیسی، تحویل دارو و کنترل سرطان از اهمیت فزاینده‌ای در بیوتکنولوژی برخوردار است. از آنجایی که ذرات مغناطیسی پس از اصلاح سطح می‌توانند به جدایی سریع از یک سیستم چند فازی پیچیده دست یابند، می‌توان آنها را به طور گسترده در طیف وسیعی از کاربردها، از جمله دارورسانی، جداسازی پروتئین و DNA، خواص نوری، کاتالیزورها، حذف آلاینده‌های آلی و فلزات سنگین از آب شهری استفاده کرد [5,7].

در میان نانوذرات مغناطیسی، ریزکره‌های ساختاری هسته-پوسته توجه خاصی را برای عملکردهای ترکیبی به خود جلب کرده‌اند. تا به امروز، انواع زیادی از مواد برای استفاده به عنوان تشکیل دهنده پوسته، از جمله مولکول‌های آلی کوچک، پلیمرها و مواد معدنی، کشف شده‌اند [2,8]. در میان این مواد، ساختار هسته-پوسته Fe3O4@SiO2 با مزایای سوپرپارامغناطیس، سمیت کم، زیست سازگار، زیست تخریب پذیر، غیر سمی برای انسان، اندازه ذرات کنترل شده، سطح ویژه بسیار وسیع و سطوح مختلف بسیار مورد توجه قرار گرفته است [10]. در این ساختار، پوسته SiO2 به عنوان یک لایه محافظ عمل کرده که از هسته Fe3O4 (یک ساختار نسبتا ناپایدار) در برابر اثرات شیمیایی و حرارتی محافظت می‌کند. به این ترتیب، میکروسفرهای سیلیس مغناطیسی پوسته-هسته پتانسیل زیادی در جداسازی زیستی، تجزیه و تحلیل تشخیصی، خالص‌سازی و بی‌حرکتی DNA، جذب پروتئین، تثبیت آنزیم و استخراج اسید نوکلئیک نشان داده‌اند [6]. تاکنون روش‌های زیادی برای سنتز پوشش‌های سیلیس بر روی سطوح نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن توسعه یافته‌اند. از میان تمامی روش‌ها، فرآیند استوبر به دلیل روش ساده، کنترل آسان ضخامت پوسته سیلیس و شکل خوب محصول، انتخاب غالب است [8]. فرآیند استوبر را می‌توان به طور مستقیم برای پوشش سولفید روی، دی اکسید تیتانیوم و سایر مواد اعمال کرد. در این روش به دلیل عدم وجود سورفکتانت، ذرات سنتز شده به راحتی تمیز و پراکنده می‌شوند و برای کاربردهای بیولوژیکی مناسب‌تر هستند [1,2].

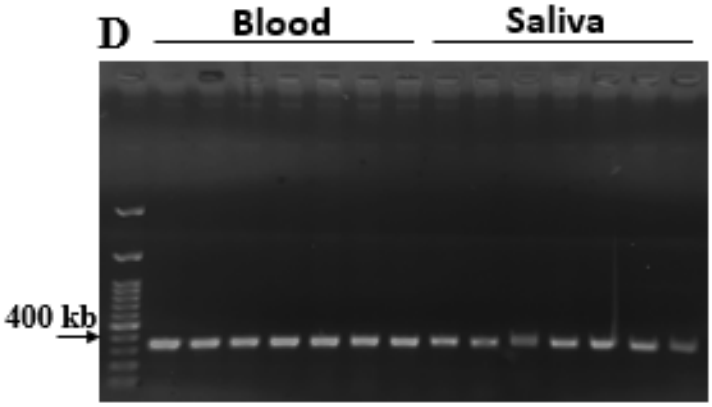
۲. مواد روش‌ها

روش سنتز ذرات مغناطیسی در شکل ۱ نشان داده شده است. در این روش، ذرات Fe3O4 با روش هم‌رسوبی یون‌های آهن در محلول قلیایی تهیه شدند، سپس ذرات Fe3O4 توسط سیلیس متراکم از طریق هیدرولیز تترا اتیل ارتوسیلیکات (TEOS) در دمای اتاق برای محافظت از ذرات Fe3O4 در برابر خوردگی، پوشش داده شدند. برای تهیه نانوذرات Fe3O4@SiO2، Fe3O4 آماده شده ابتدا در محلول مخلوط اتانول (۵۰۰ میلی لیتر) و آب (۵۰ میلی لیتر) پراکنده شد و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد تحت سونیکاسیون قرار گرفت. محلول آبی آمونیاک به مدت ۱ ساعت تحت هم زدن مکانیکی به محلول فوق اضافه شد. پس از آن، TEOS به ظرف واکنش شارژ شد، مخلوط به مدت ۱۲ ساعت به طور مداوم هم زده شد. در نهایت محصول به‌دست‌آمده (Fe3O4@SiO2) جمع‌آوری و با آهن‌ربا جدا شد، سپس به‌ترتیب با EtOH، آب دی‌یونیزه و دی‌اتیل اتر چندین بار شسته و در آون خلاء با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد.

۳. نتایج

برای ارزیابی اینکه آیا MNP های سنتز شده در استخراج DNA از نمونه‌های مختلف بیولوژیکی مفید هستند؛ نمونه‌های خون، بزاق و برگ گیاه برای استخراج DNA استفاده شدند. برای بررسی کیفیت DNA، ۳ میکرولیتر از هر DNA استخراج شده روی ژل آگارز (1% w/v) الکتروفورز لود (run) شد. نتایج حاصله نشان داد که MNPهای سنتز شده می‌توانند با موفقیت DNA را از برگ گیاه، خون و بزاق گرفته و خالص کنند. اگرچه برخی از نمونه‌های DNA اسمیر را نشان دادند، اکثر نمونه‌های DNA استخراج‌شده یکپارچگی خوبی داشتند. تکثیر DNA استخراج شده از ۷ نمونه خون و ۷ نمونه بزاق توسط PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن HP به عنوان ژن هدف انتخاب شد. واکنش PCR در حجم کل ۱۵ میکرولیتر با ۵۰ نانوگرم DNA استخراج شده، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر رو به جلو و معکوس و ۷.۵ میکرولیتر PCR Master Mix 2X انجام شد. واکنش PCR با دستگاه PCR (Bio-Rad، ایالات متحده آمریکا) اجرا شد. محصولات PCR با الکتروفورز ژل آگارز ۱.۲ درصد مشاهده شدند. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، باندهای PCR (۳۴۹ جفت باز) نشان دادند که تمام DNAهای استخراج شده را می‌توان در واکنش‌های PCR تکثیر کرد. نتایج به دست آمده تایید می‌کند DNAهای استخراج شده با Fe3O4@SiO2 هیچ آلودگی ندارند که بتواند کاربردهای پایین دست را مختل کند.

شکل ۱. تصویر شماتیک سنتز نانوذرات مغناطیسی



شکل ۲. نمایش باندهای مربوط به قطعات تکثیری در الکتروفورز ژل آگارز ۱.۲ درصد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که Fe3O4@SiO2 می‌تواند به خوبی در فرایند استخراج DNA مورد استفاده قرار گیرد و و استفاده از آن در کیت‌های استخراج DNA پیشنهاد می‌شود. همچنین نتایج حاصل از PCR تایید کرد که DNAهای استخراج شده با Fe3O4@SiO2 هیچ آلودگی نداشته و می‌توان آنها را در واکنش PCR تکثیر کرد.

منابع

[1] Abbas, M., Abdel-Hamed, MO., Chen, J. 2017. Efficient one-pot sonochemical synthesis of thickness-controlled silica-coated superparamagnetic iron oxide (Fe3O4/SiO2) nanospheres, Journal of Applied Physics A, 123, 12.

[2] Chen, X., Mao, S.S. 2007. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications, Journal of Chemical Reviews, 38 ,41.

[3] Dahm, R. 2005. Friedrich Miescher and the discovery of DNA, Journal of Developmental Biology, 278, 2, 274-288.

[4] Dhaliwal, A. 2013. DNA Extraction and Purification, Journal of Materials and Methods, 3.

[5] Han, H.J., Hou, Y., Chen, X.H., Zhang, P.S., Kang, M.X., Jin, Q., Ji, J., Gao, M.Y. 2020. Metformin-Induced stromal depletion to enhance the penetration of gemcitabine loaded magnetic nanoparticles for pancreatic cancer targeted therapy, Journal of the American Chemical Society, 142, 4944–4954.

[6] Mostafaei, M., Hosseini, S.N., Khatami, M., Javidanbardan, A., Sepahy, A.A., Asadi, E. 2018. Isolation of recombinant Hepatitis B surface antigen with antibody-conjugated superparamagnetic Fe3O4/SiO2 core-shell nanoparticles, Journal of Protein Expression and Purification, 145, 1-6.

[7] Maleki, A., Hajizadeh, Z., Sharifi, V., Emdadi, Z. 2019. A green, porous and eco-friendly magnetic geopolymer adsorbent for heavy metals removal from aqueous solutions, Journal of Cleaner Production, 215, 1233–1245.

[8] Rao, K.S., Elhami, K., Kodaki, T., Matsushige, K., Makino, K. 2005. A novel method for synthesis of silica nanoparticles, Journal of Colloid and Interface Science, 289, 1, 125-131.

[9] Silva, D.O.C., Estevanato, L.L.C., Simioni, A.R., Rodrigues, M.M.A., Lacava, B.M., Lacava, Z.G.M., Tedesco, A.C., Morais, P.C., Báo, S.N. 2012. Successful strategy for targeting the centralnervous system using magnetic albumin nanospheres, Journal of Biomedical Nanotechnology, 8, 182.

[10] Sonmez, M., Georgescu, M., Alexandrescu, L., Gurau, D., Ficai, A., Ficai, D., Andronescu, E. 2015. Synthesis and applications of Fe3O4/SiO2 core-shell materials, Journal of Current Pharmaceutical Design, 2, 37, 5324-5335.

[11] Xu, C.J., Sun, S.H. 2007. Monodisperse magnetic nanoparticles for biomedical applications, Journal of Polymer International. 56, 821.