

بهینه‌سازی عملکرد نانوزیست‌حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر DNA فاقد نشانگر برای

شناسایی ویروس موزاییک انجیر

Optimizing of electrochemical nano-biosensor based on the label-free DNA and modified nanomaterial to detect *Fig Mosaic Virus*نیلوفر رجبی^۱، محمدرضا صفرنژاد^۲، فرشاد رخشنده‌رو^{۳*}، مسعود شمس‌بخش^۴ و حجت‌اله ربانی^۵

دریافت: ۱۴۰۲/۴/۲

پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۱۰

چکیده

امروزه زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی به دلیل حساسیت و دقت بالا در ردیابی اسیدهای نوکلئیک هدف مورد توجه بسیار قرار گرفته‌اند. از طرفی به دلیل اهمیت اقتصادی درختان انجیر، تشخیص سریع و دقیق بیماری‌های آن از جمله بیماری موزائیک انجیر، Fig Mosaic Disease (FMD)، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی درختان انجیر، نقش مؤثری در مدیریت این بیماری ایفا می‌کند. در این مطالعه، نانوزیست‌حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر DNA و فاقد نشانگر مولکولی برای شناسایی کیفی و کمی ویروس FMV در نمونه‌های آلوده بهینه‌سازی شد. در این راستا، جهت بهینه‌سازی و بهبود عملکرد زیست‌حسگر طراحی شده، پارامترهای غلظت کاوشگر DNA برای تشکیل تک‌لایه‌های خود انباشته و زمان لازم جهت انجام فرآیند هیبریداسیون در محدوده زیستی با بیشترین تأثیر در زیست‌حسگر DNA، مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به داده‌های منحنی کالیبراسیون، اولین محدوده خطی ۳- میکرومولار تا ۳ میکرومولار با معادله خط $y = 4.81x + 34.58$ و ضریب تشخیص $(R^2 = 0.9967)$ به‌دست آمد. زیست‌حسگر بهینه‌سازی شده در این پژوهش جهت تشخیص ماده ژنتیکی FMV دارای پایداری، گزینش‌پذیری بالا و همچنین کاربری آسان و سریع بوده که نوید یک روش تشخیصی با کارایی و دقت بالا جهت شناسایی این ویروس را می‌دهد.

واژگان کلیدی: ویروس موزاییک انجیر، زیست‌حسگر الکتروشیمیایی، بهینه‌سازی، کالیبراسیون

مقدمه

امروزه با بهبود روش‌های شناسایی بیمارگرهای گیاهی، کیت‌های تشخیصی متعددی برای شناسایی سریع و دقیق بیمارگرهای گیاهی ایجاد شده‌اند، اما نوآوری‌های کنونی به شناسایی بیمارگرهای شناخته شده با دقت تشخیص کم محدود شده است (Patel *et al.*, 2022).

تشخیص مولکولی با استفاده از نشانگرهای زیستی DNA و RNA پیشروترین نوع مکانیسم تشخیص بیماری‌های عفونی (Liu *et al.*, 2009; 2011; Pividori *et al.*, 2000; Mikkelsen, 1996) و گیاهان آلوده (Firrao *et al.*, 2005; Rana *et al.*, 2021; 2018a,b; 2019; Haji-Hashemi *et al.*, 2015; Papadakis *et al.*, 2017; Lau *et al.*, 2023; Patel *et al.*, 2021) هستند. امروزه حسگرهای زیستی مبتنی بر DNA در حال تبدیل به کارآمدترین حوزه کاربردی برای

۱- دانشجوی سابق دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی،

تهران، ایران

۲- استاد، بخش تحقیقات ویروس‌شناسی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵- دانشیار، گروه مهندسی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشکده ابن سینا، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: Rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir

توالی‌یابی‌های ژنی هستند که بر موانع تشخیص مانند محدودیت اندازه نمونه و پیچیدگی‌های روش‌های قدیمی غلبه می‌کند.

حسگر زیستی مبتنی بر DNA یک دستگاه تحلیلی است که عناصر زیستی را با یک آشکارساز فیزیکوشیمیایی متشکل از یک گیرنده زیستی حسگر، یک مبدل و یک آشکارساز با خروجی دیجیتال ترکیب می‌کند (Khan *et al.*, 2020). در این فرآیند، تشخیص پذیرنده‌های زیستی با یک مبدل به پاسخ قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌شوند، مبدل این تغییرات را در خواص فیزیکوشیمیایی آن (خواص نوری، حرارتی، الکتریکی و ترمودینامیکی) به پاسخ الکتریکی قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند و در نهایت پاسخ تولید شده توسط پردازشگر، پردازش و به یک پاسخ قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌شود (Adam *et al.*, 2010؛ Luo *et al.*, 2008؛ Kuehn, 2016؛ Uliana *et al.*, 2011).

زیست‌حسگرها یک جایگزین سریع‌تر، ارزان‌تر و ساده‌تر برای سنجش اسیدهای نوکلئیک ارائه می‌دهند (Mazlan *et al.*, 2019؛ Brazaca *et al.*, 2021). در مقایسه با روش‌های هیبریداسیون سنتی، حسگرهای زیستی دارای مزایایی مانند کوچک بودن و قابلیت حمل، تشخیص در محل نسبت به آنالیزهای معمولی (Wu *et al.*, 2001؛ Silvestrini *et al.*, 2015)، حساسیت جرمی بالا، عملکرد آسان، هزینه کم، بدون برچسب (Cesewski and Johnson, 2020) و تشخیص مولکولی با ارائه اطلاعات سریع اسید نوکلئیک هستند (Dai Tran *et al.*, 2011؛ Topkaya *et al.*, 2016؛ Jafari *et al.*, 2019). همچنین فراوانی هدف و شدت هیبریداسیون اساس حسگرهای زیستی مبتنی بر DNA می‌باشد (Yu *et al.*, 2017؛ Saylan *et al.*, 2019). اساس عملکرد زیست‌حسگر DNA یا ژن حسگر، تثبیت یک تک رشته‌ای الیگونوکلوئید (ssDNA) به‌عنوان یک کاوشگر در سطح مبدل برای شناسایی توالی DNA مکمل یا مولکول هدف آن می‌باشد (Guliy *et al.*, 2019؛ Rasheed and Sandhyarani, 2017). زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی بدون برچسب در مقایسه با تکنیک‌های برچسب‌دار بسیار ساده و ارزان هستند، زیرا آماده‌سازی نمونه در آنها ساده و فرآیند تشخیص کوتاه‌تر بوده و همچنین نیازی به آنتی‌بادی ثانویه نیست (Du *et al.*, 2012؛ Mazloun-Ardakani *et al.*, 2015).

از طرف دیگر، از نظر اقتصادی بیشترین خسارت درختان انجیر توسط ویروس موزاییک انجیر (FMV) ایجاد می‌شود. انجیر معمولی (*Ficus carica*) یک گونه درخت میوه مهم است که در بسیاری از مناطق جغرافیایی، به‌ویژه در منطقه ساحلی مدیترانه رشد می‌کند (Dalkılıç *et al.*, 2011). این گونه متعلق به جنس *Emaravirus* از خانواده جدید Fimoviridae (Elbeaino *et al.*, 2018) می‌باشد. ژنوم ویروس FMV به‌صورت شش قطعه RNA تک رشته‌ای منفی می‌باشد (Elbeaino *et al.*, 2009a, b) که هر کدام از این قطعات ژنومی دارای یک چارچوب خواندنی باز یا Open Reading Frame= ORF مونوسیسترون می‌باشد که RNA3 در این ساختار ژنومی با طول ۱۴۹۰ جفت باز پروتئینی را با وزن مولکولی ۳۵ کیلودالتون به‌عنوان پروتئین نوکلئوکسپید (NP) ویروس تولید می‌کند. در واقع ژن NP اولین ژن ویروسی می‌باشد که در فرآیند همانندسازی، رونویسی از آن صورت پذیرفته و به‌عنوان فراوان‌ترین نسخه ژنی در سلول‌های آلوده وجود دارد و به دلیل امکان وقوع تنوع طی فرآیند نسخه‌برداری همانند پروتئین‌های پوششی به‌عنوان کاندید مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در ویروس‌ها مطرح می‌باشند (Walpita and Nguyen and Haenni, 2003؛ Flick, 2005). علائم در این بیماری گسترده و متنوع بوده و درختان آلوده علائم متنوعی از جمله موزاییکی و پیسه‌ای و همچنین بدشکلی برگ‌ها و وجود لکه‌های نکروزه بر روی برگ‌ها و میوه‌ها به همراه ریزش میوه‌های نارس را نشان می‌دهند. میوه‌ها در برخی ارقام انجیرهای آلوده ممکن است کوچک‌تر از اندازه معمول و بدشکل شوند که این امر از لحاظ کمی و کیفی کاهش عملکرد را به دنبال خواهد داشت. همچنین امکان انتقال مکانیکی توسط کنه‌های اریوفید وجود دارد (Elbeaino *et al.*, 2018). کاشت نهال سالم و تأیید شده مؤثرترین روش برای مدیریت گسترش FMV در درختان انجیر می‌باشد.

با توجه به اهمیت اقتصادی درختان انجیر و شیوع بیماری در ایران و سایر کشورها روش‌های مختلفی جهت شناسایی FMV در نمونه‌های آلوده معرفی شدند. این روش‌ها عبارتند از آزمون‌های Real time PCR و

Reverse Transcription= RT-PCR (Caglayan *et al.*, 2012؛ Alimoradian *et al.*, 2016؛ Alisaheli *et al.*, 2021) Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification= RT-LAMP (Walia *et al.*, 2009؛ Elbeaino *et al.*, 2009b) و (Shahmirzaie *et al.*, 2019) تولید آنتی سرم پلی کلونال توسعه آنتی بادی نو ترکیب مونوکلونال اختصاصی (Rajabi *et al.*, 2022). بنابراین تشخیص دقیق و حساس این ویروس در نمونه های آلوده در زمان کوتاه تر ضروری است. در این مطالعه بهینه سازی زیست حسگر FMV طراحی شده بر اساس پارامترهای غلظت کاوشگر DNA برای تشکیل تک لایه های خود انباشته و بررسی زمان لازم جهت انجام فرآیند هیبریداسیون DNA الکتروشیمیایی بدون برچسب برای تشخیص و شناسایی دقیق تر و سریع تر ویروس موزایک انجیر مورد بررسی قرار گرفت.

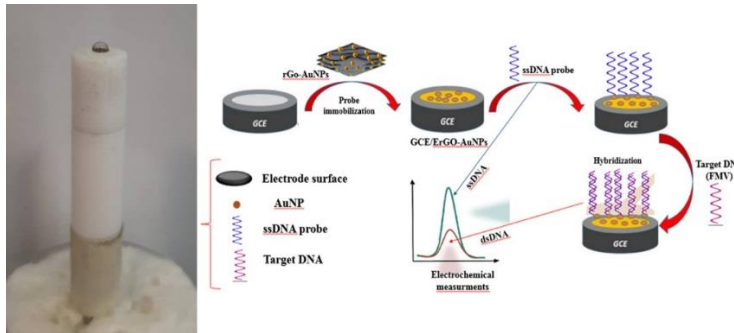
مواد و روش ها

آزمون های الکتروشیمیایی شامل ولتامتری چرخه ای (Circular Voltammetry= CV) و ولتامتری موج مربعی با تبدیل فوریه سریع (Fast Fourier Transformation-Square Wave Voltammetry= FFT-SWV) با دستگاه پتانسیو استات Ultralab Voltammetry مدل Modern voltammetry system: M-ENA-V2012 انجام شد که در انیستیتو الکتروشیمی دانشگاه تهران توسط دکتر پرویز نوروزی طراحی و ساخته شده است. برای آزمون اسپکتروسکوپی امپدانس الکتروشیمیایی (Electrochemical Impedance Spectrometry= EIS) از دستگاه پتانسیو استات شرکت PalmSens4 هلند متصل به یک سیستم سه الکترودی معمولی الکتروکاتود Ag/AgCl به عنوان الکتروکاتود مرجع، الکتروکاتود پلاتین به عنوان الکتروکاتود کمکی و الکتروکاتود کربن شیشه ای دیسکی شکل با قطر دو میلی متر به عنوان الکتروکاتود کار استفاده شد. برای اندازه گیری دقیق pH از pH متر ساخت شرکت Shanghai San-Xin مدل MP512 precision استفاده گردید. همچنین از ترازو مدل Sartorius analytic A200 و حمام فراصوت مدل Branson Ultrasonics B8510 استفاده شد.

بافر فسفات نمکی (Phosphate Buffer Saline= PBS) با غلظت ۱۰ میلی مولار و غلظت نمک سدیم کلرید (NaCl) ۱۰۰ میلی مولار و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) با غلظت ۱۰ میلی مولار در pH برابر ۸ استفاده شد. جهت رقیق سازی های نمونه های DNA نیز از بافر PBS با غلظت ۱۰ میلی مولار و NaCl با غلظت ۱۰۰ میلی مولار و pH برابر با ۷/۴ استفاده شد. بافری تحت عنوان بافر شوینده از مرحله تثبیت کاوشگر به بعد استفاده شد که شامل بافر PBS با غلظت ۵۰ میلی مولار و NaCl با غلظت ۱۳۷ میلی مولار در pH برابر ۷ ساخته شد. بافر استفاده شده در اندازه گیری نیز PBS با غلظت ۱۰ میلی مولار و پتاسیم کلرید (KCl) ۰/۲ میلی مولار با pH برابر ۷/۴ استفاده شد.

در این مطالعه تمام الیگونوکلئوتیدهای DNA مصنوعی از شرکت پیشگام خریداری شد که شامل: توالی هدف مربوط به FMV، یک الیگونوکلئوتید مصنوعی ۱۹ باز (5'-GTGTTTCGGACGTCGTGAG-3')، توالی های DNA تک رشته ای کاوشگر تکمیل کننده توالی هدف به صورت (5'-Tiol-CTCACGACGT CCGAAA CAC-3') و دنباله هدف غیر مکمل (FMV-Mt) (NC) ارزیابی انتخابی حسگر زیست به صورت (5'-GTCATACTGATACATGACCTG-3') بود.

به منظور ساخت حسگر زیستی در ابتدا پس از آماده سازی بستر مورد نظر، ssDNA، کاوشگر تیولدار شده (مکمل تک رشته DNA هدف) با استفاده از روش تک لایه خود تشکیل شونده به عنوان کاوشگر شناسایی توالی مورد نظر، بر روی سطح نانو ذره طلائی ایجاد شده تثبیت گردید. در مرحله بعد الکتروکاتود در معرض تک رشته DNA هدف قرار گرفته و هیبریداسیون انجام گرفت. کلیه این مراحل توسط ولتامتری چرخه ای، موج مربعی، اسپکتروسکوپی امپدانس الکتروشیمیایی مورد بررسی قرار گرفته و با استفاده از اندازه گیری اختلاف جریان (قبل و بعد از هیبریداسیون) با استفاده از روش FFT-SWV می توان به غلظت DNA هدف پی برد. در تمام مراحل ساخت زیست حسگر از طیفسنجی امپدانس الکتروشیمیایی جهت تأیید داده های ولتاموگرام چرخه ای استفاده شد.



شکل ۱- زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی DNA برای شناسایی ویروس موزائیک انجیر (FMV)

Fig. 1. Outline of DNA electrochemical biosensors label free to identify Fig Mosaic Virus (FMV)

به‌منظور اندازه‌گیری DNA هدف (FMV) و بررسی هیبریداسیون با کاوشگر تثبیت شده بر سطح الکتروود اصلاح شده، از روش هیبریداسیون در محلول استفاده شد. به این صورت که الکتروود درون بشر حاوی محلول ۱۰ نانومتر از DNA هدف رقیق شده با بافر PBS با غلظت ۱۰ میلی‌مولار و NaCl با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار و pH برابر با ۷/۴ و به مدت ۴۵ دقیقه در حالی که محلول به آرامی هم زده می‌شد، قرار گرفت. بعد از گذشت این زمان مشخص، الکتروود به جهت حذف رشته‌های هیبرید نشده، به مدت ۲ دقیقه با بافر شوینده شسته شد. در این مرحله نیز به منظور مشخصه‌یابی سطح از روش ولتامتری چرخه‌ای با پتانسیلی در محدوده -۰/۳ تا ۰/۸ ولت با سرعت روبش ۰/۱ ولت بر ثانیه در محلول پتاسیم فری سیانید با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار و فروسیانید با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار که محلول‌سازی با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و KCl با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار در pH برابر ۷/۴، استفاده شد.

در زیست‌حسگر طراحی شده از روش ولتامتری موج مربعی با تبدیل فوری به سریع FFT-SWV به منظور به‌دست آوردن پاسخ حسگر زیستی به هیبریداسیون توالی‌های DNA استفاده شد.

جهت بهینه‌سازی و بهبود عملکرد زیست‌حسگر طراحی شده، پارامترهای واجد بیشترین تأثیر در زیست‌حسگر DNA، مورد بررسی قرار گرفت. مهم‌ترین پارامترهای بررسی شده، غلظت کاوشگر DNA برای تشکیل تک‌لایه‌های خود انباشته و زمان لازم جهت انجام فرآیند هیبریداسیون در محدوده زیستی بود. به منظور بررسی اثر غلظت کاوشگر بر پاسخ زیست‌حسگر، پنج الکتروود مجزا را در شرایط یکسان آماده کرده و سپس زیست‌حسگر را در معرض کاوشگر DNA با استفاده از روش قطره‌گذاری به میزان ۱۰ میکرولیتر در غلظت‌های ۱ میکرومولار، ۳ میکرومولار، ۵ میکرومولار، ۷ میکرومولار و ۱۰ میکرومولار قرار گرفت. سپس محفظه مرطوب و تاریک به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد؛ بعد از آن، سطح الکتروودها با بافر شست‌وشو، شسته شد. در مرحله بعدی تمام الکتروودها با استفاده از روش هیبریداسیون در محلول به مدت ۶۰ دقیقه، در محلول ۵۰۰ پیکومولار توالی هدف قرار داده شد. در نهایت با توجه به اختلاف پاسخ زیست‌حسگر در مرحله قبل و بعد از هیبریداسیون، بهترین غلظت برای کاوشگر DNA مشخص شد. به منظور بررسی اثر زمان هیبریداسیون بر پاسخ زیست‌حسگر، در ابتدا الکتروودها تمیز و لایه‌گذاری‌های لازم پیش برده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از DNA کاوشگر با غلظت ۵ میکرولیتر به روش قطره‌گذاری به مدت ۹۰ دقیقه، در محفظه مرطوب و تاریک در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس با بافر شست‌وشو، شسته شد و پاسخ به‌دست آمده از این مرحله ثبت شد. در مرحله بعدی فرآیند هیبریداسیون با الیگونوکلئوتید هدف با غلظت ۵۰۰ پیکومولار، به روش هیبریداسیون در محلول، در مدت زمان‌های ۵ دقیقه، ۱۰ دقیقه، ۲۰ دقیقه، ۳۰ دقیقه، ۴۵ دقیقه، ۶۰ دقیقه و ۷۵ دقیقه انجام شد. در نهایت پاسخ زیست‌حسگر ثبت شد و اختلاف پاسخ نسبت به لایه کاوشگر در زمان‌های مشخص محاسبه شد. به منظور به‌دست آوردن منحنی کالیبراسیون، از محلول‌های استاندارد الیگونوکلئوتیدهای هدف با غلظت ۰ تا ۱۰۰ میکرومولار استفاده شد.

طبق فرآیند گفته شده در قسمت‌های قبلی، با زیست‌حسگرهای DNA ساخته شده در تماس قرار داده شد و سپس ولتاموگرام‌های موج مربعی با تبدیل فوری به سریع با اعمال پتانسیل از -۰/۲ تا ۰/۸ ولت با فرکانس ۲۰ هرتز و دامنه

پالس ۱۰ میلی‌ولت در تعداد ۱۶ چرخه انجام شد. اندازه‌گیری در محلول پتاسیم فری سیانید با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار و فروسیانید با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار، محلول‌سازی با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و KCl با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار در pH برابر با ۷/۴ انجام شد. در نهایت به‌منظور بررسی توانایی زیست‌حسگر DNA بهینه‌سازی شده، جهت اندازه‌گیری کمی توالی ژنوم ویروس FMV در نمونه‌های آلوده، محلول‌هایی از توالی ویروس با غلظت ۵ پیکومولار و ۱۰ پیکومولار در عصاره گیاه سالم تهیه شد. پاسخ زیست‌حسگر با استفاده از روش FFT-SWV ثبت شد. سپس پاسخ بدست آمده در معادله خط بدست آمده در منحنی کالیبراسیون جاگذاری شد و غلظت توالی ویروس محاسبه شد.

نتایج

در این پژوهش، یک زیست‌حسگر DNA الکتروشیمیایی بدون برچسب ساخته شده به منظور شناسایی کیفی و کمی ویروس موزائیک انجیر در نمونه‌های آلوده بهینه شد. نتایج مطالعه هیبریداسیون با پروب ثابت شده روی سطح الکترواد اصلاح شده برای اندازه‌گیری DNA هدف (توالی نوکلئوتیدی ویروس موزائیک انجیر) نشان داد که دسترسی مولکول‌های هدف به پروب ثابت شده روی سطح الکترواد افزایش یافته است.

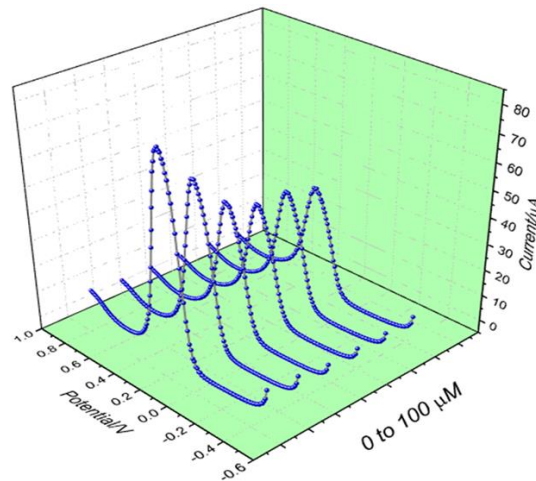
در زیست‌حسگر طراحی شده به منظور دریافت پاسخ زیست‌حسگر به هیبریداسیون توالی‌های DNA ویروس موزائیک انجیر از روش ولتامتری موج مربعی با تبدیل فوریه سریع استفاده شد. در حقیقت، هیبریداسیون ناشی از برهمکنش توالی DNA هدف و توالی DNA کاوشگر در سطح الکترواد، موجب کند شدن فرآیند نفوذ گونه الکتروفعال یا گونه‌هایی که گونه الکتروفعال برای انتقال به آن‌ها وابسته است می‌شود و در نتیجه موجب کاهش ولتاموگرام می‌شود. بنابراین اختلاف جریان ولتاموگرام ($I\Delta$) حاصل از زیست‌حسگر DNA جهت حذف اختلافات جزئی، قبل و بعد از هیبریداسیون در نظر گرفته می‌شود.

بنابر نتایج پارامتر دارای بیشترین تأثیر بر حسگر زیستی DNA، تغییرات در پاسخ حسگر زیستی با توجه به غلظت پروب ثابت روی سطح الکترواد است. پاسخ زیست‌حسگر با افزایش غلظت کاوشگر تا ۵ میکرومولار، افزایش و در غلظت‌های بالاتر کاوشگر، کاهش می‌یابد. این کاهش نشان‌دهنده کاهش بازده هیبریداسیون در نتیجه افزایش ممانعت فضایی و الکترواستاتیکی می‌باشد. بنابراین غلظت بهینه برای تثبیت کاوشگر بر سطح الکترواد ۵ میکرومولار می‌باشد. فرآیند هیبریداسیون با الیگونوکلئوتید هدف در غلظت ۵۰۰ پیکومولار با هیبریداسیون در محلول به مدت ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵ دقیقه و پاسخ حسگر زیستی و همچنین تفاوت در پاسخ به لایه کاوشگر ارزیابی شد (شکل ۱).

نتایج بدست آمده برای منحنی کالیبراسیون، افزایش غلظت توالی DNA ویروس موزائیک انجیر را تأیید کرد، به دلیل هیبریداسیون و توالی‌یابی DNA ویروس موزائیک انجیر دو رشته‌ای، دافعه فضایی و الکترواستاتیکی در برابر انتقال جرم ردوکس و انتقال الکترون به سطح الکترواد، جریان اوج در موج ولتاموگرافی مربع با تبدیل فوریه سریع کاهش می‌یابد. تغییرات قابل توجهی در پاسخ FFT-SWV برای توالی هدف در غلظت‌های مختلف مشاهده شد (شکل ۲).

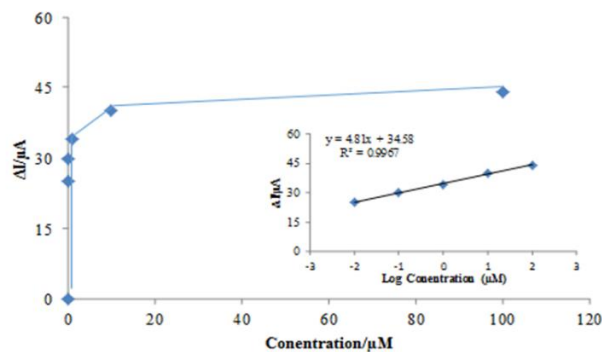
با توجه به ولتاموگرام‌های بدست آمده در شکل ۲، در ابتدا با افزایش مقدار غلظت DNA هدف، مقدار ΔI با شیب نسبتاً زیادی افزایش می‌یابد، اما در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میکرومولار، شیب تغییرات پاسخ تقریباً کاهش می‌یابد. پاسخ با شیب کمتر در غلظت‌های بالا را می‌توان به اشباع شدن تک لایه‌های خود انباشته کاوشگر از DNA هدف و نیز افزایش ممانعت فضایی و الکترواستاتیکی در این تک لایه‌ها نسبت داد.

همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، زیست‌حسگر DNA طراحی شده دارای محدوده خطی در محدوده ۳- میکرومولار تا ۳ میکرومولار با معادله خطی $y = 4.81x + 34.58$ و ضریب تشخیص R^2 برابر با ۰/۹۹۶۷ است. در این منحنی کالیبراسیون، به ازاء هر غلظت از DNA هدف، مقدار میانگین پاسخ بدست آمده از سه زیست‌حسگر DNA مجزا بوده و انحراف استاندارد آن‌ها جهت نشان دادن مقدار خطا استفاده شد. بررسی توانایی زیست‌حسگر DNA طراحی شده برای اندازه‌گیری کمی توالی ژنوم ویروس موزائیک انجیر در نمونه‌های واقعی نشان‌دهنده عملکرد خوب زیست‌حسگر DNA بر اساس تکنیک FFT-SWV در بافت پیچیده زیستی است.



شکل ۲- ولتاموگرافی موج مربعی با تبدیل فوریه سریع یک زیست حسگر DNA در تماس با ۰ میکرومولار به ۱۰۰ میکرومولار توالی DNA ویروس موزائیک انجیر با اعمال پتانسیل -۰/۶ تا ۱ ولت در فرکانس ۲۰ هرتز در ۱۶ سیکل انجام شد. اندازه‌گیری در محلول سیانید آهن پتاسیم با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار و فروسیانید با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار که با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و غلظت نمک ۰/۲ میلی‌مولار KCl در pH برابر با ۷/۴ حل شد.

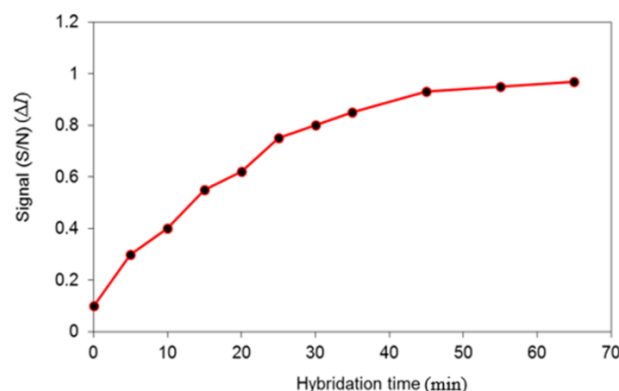
Fig. 2. Square-wave voltammogram was performed by rapid Fourier transform of a DNA biosensor in contact with 0 μM to 100 μM of target FMV- DNA sequence by applying a potential of -0.6 to 1 volts at a frequency of 20 Hz in 16 cycles. Measurements in a solution of potassium ferric cyanide with a concentration of 2.5 mM and ferrocyanide with a concentration of 2.5 mM, which was solubilized with a phosphate buffer of 10 mM and a salt concentration of 0.2 mM KCl at a pH of 7.4.



شکل ۳- رابطه خطی پاسخ جریان با غلظت DNA هدف اندازه‌گیری شده توسط زیست حسگر DNA. منحنی کالیبراسیون حسگر زیستی DNA در محدوده غلظت ۰ میکرومولار تا ۱۲۰ میکرومولار DNA ویروس موزائیک انجیر بر اساس روش ولتامتری موج مربع با تبدیل فوریه سریع طراحی شده است.

Fig. 3. Linear relationship of current response vs target DNA concentration measured by DNA biosensor. DNA biosensor calibration curve designed in the concentration range of 0 μM to 120 μM of FMV target DNA based on square wave voltammetry method with fast Fourier transform.

پاسخ زیست‌حسگر با افزایش زمان هیبریداسیون تا ۷۰ دقیقه افزایش یافته و پس از آن کاهش می‌یابد. افزایش پاسخ تا ۷۰ دقیقه، ناشی از تجمع بیشتر رشته هدف بر روی سطح الکتروود است. همچنین کاهش پاسخ پس از این زمان را می‌توان به آسیب دیدن و کاهش تک لایه‌های خودانباشته در نتیجه به هم خوردن محلول و افزایش ممانعت فضایی سطح و دافعه الکترواستاتیکی، نسبت داد (شکل ۴).



شکل ۴- منحنی پاسخ زیست حسگر نسبت به زمان انجام هیبریداسیون

Fig. 4. Response curve of biosensor hybridization time, differences in response to layer probes (ΔI) at specific times.

بحث

در دهه‌های اخیر، فناوری نانو به دلیل توانایی خود در طراحی و توسعه حسگرهای زیستی توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌است. استفاده از نانومواد در تولید حسگرهای زیستی می‌تواند باعث بهبود خواص آن حسگرها شود. از نانومواد می‌توان برای اصلاح لایه‌ها یا به‌عنوان نشانگر در طراحی حسگرهای زیستی استفاده کرد.

زیست حسگرهای الکتروشیمیایی DNA، قدرت تحلیلی روش‌های الکتروشیمیایی را با ویژگی‌های فرآیند تشخیص اسید نوکلئیک ترکیب می‌کنند که نوید تشخیص حساس‌تر، دقیق‌تر و سریع‌تر هیبریداسیون DNA را می‌دهند (Fotouhi *et al.*, 2013). حسگرهای ایمنی الکتروشیمیایی بدون برچسب به دلیل سادگی، پاسخ سریع و امکان نظارت در زمان واقعی به‌طور گسترده برای تشخیص بیماری‌ها بخصوص بیماری‌های ویروسی استفاده می‌شوند (Brazaca *et al.*, 2021). این حسگرها دارای ویژگی‌های مناسبی مانند هزینه کم، حساسیت بالا، قابلیت حمل آسان (Tian *et al.*, 2020) حداقل ضرورت‌های مدیریت و تشخیص سریع بیمارگرها بر روی سطوح هستند (Amiri *et al.*, 2018؛ Mishra *et al.*, 2018؛ Furst and Francis, 2018؛ Felix and Angnes, 2018؛ Rastogi and Singh, 2019؛ Duffy and Moore, 2017).

در فرآیند هیبریداسیون، یک DNA تک رشته‌ای (ssDNA) به‌عنوان یک کاوشگر شناخته می‌شود که می‌تواند با یک رشته مکمل هیبرید شود و یک DNA دو رشته‌ای هیبرید شده (dsDNA) را روی سطح الکتروود تشکیل دهد. این فرآیند از کارایی و ویژگی بالایی برخوردار است. از نانوذرات فلزی و اکسید فلزی به دلیل الکتروفعال بودن و قابلیت تجزیه زیستی بسیار عالی، به‌عنوان نشانگر در حسگرهای زیستی DNA بسیار استفاده می‌شود. سنجش‌های مبتنی بر نانوذرات دارای مزایای قابل توجهی نسبت به سیستم‌های تشخیصی معمولی مانند حساسیت و گزینش‌پذیری بالاتر می‌باشد. یکی از بهترین نانوذرات مورد استفاده برای ساخت حسگرهای زیستی، نانوذرات طلا (AuNPs) هستند. این نانوذره به دلیل خواص منحصر به فرد مانند نسبت سطح به حجم بالا، رسانایی الکتریکی عالی و الکتروکاتالیستی بالا، بستر خوبی برای تثبیت DNA ارائه می‌دهد که منجر به پایداری و حساسیت بهتر مطابق با حسگر زیستی توسعه یافته می‌شود (Kerman *et al.*, 2004؛ Authier *et al.*, 2001؛ Sedlackova *et al.*, 2020). ابتدا کاوشگر DNA تیوله شده روی سطح الکتروود اصلاح شده بی‌حرکت می‌شود. سپس لایه کامپوزیت کربوکسیله شده تا به گروه آمینه روی یک کاوشگر DNA متصل شود و سپس با DNA مکمل خود هیبرید شود (Sun *et al.*, 1998).

چگالی کاوشگر ثابت روی سطح الکتروود یکی از عوامل کنترل‌کننده سینتیک هیبریداسیون دنباله هدف است. در بیشتر موارد، به منظور دستیابی به پاسخ‌های بهتر و در نتیجه بهبود حد تشخیص، ایجاد تراکم پروب بالا بر روی سطح الکتروود در نظر گرفته می‌شود. از سوی دیگر، چگالی بالای پروب روی سطح الکتروود می‌تواند باعث ایجاد مانع فضایی شود، بنابراین اقدامات لازم برای یافتن مقدار بهینه در نظر گرفته شد (Movilli *et al.*, 2018).

از نکات مهم در طراحی و عملکرد حسگر زیستی، میل اتصال (Idili *et al.*, 2014) گزینش‌پذیری از ویژگی‌های حیاتی است که می‌تواند کل نوآوری تشخیص را هدایت کند. بنابراین، استنباط اینکه کدام جزء شناسایی زیستی در برابر یک بیمارگر هدف معین استفاده شود، دشوار است (Esfandyarpour *et al.*, 2013).

طی فرآیند هیبریداسیون یک زیست‌حسگر، کنترل عوامل مؤثر بر فرآیند هیبریداسیون امری بسیار مهم است. یکی از عوامل بسیار مهم در بازده قدرت یونی محیط می‌باشد. با افزایش قدرت یونی محیط، بازده هیبریداسیون به‌طور فرآیندهای افزایش می‌یابد (Lucarelli *et al.*, 2004). این افزایش به دلیل کاهش دافعه الکترواستاتیک در سطح الکتروود رخ می‌دهد؛ زیرا در محیط‌هایی با قدرت یونی بالا، بار منفی ناشی از گروه‌های فسفات در ssDNA و DNA هدف توسط یون‌هایی با بار مخالف احاطه می‌شود و دافعه الکترواستاتیک را کم می‌کند. در نتیجه بازده هیبریداسیون به‌صورت چشم‌گیری افزوده می‌شود. در این فرآیند می‌بایست از غلظت بهینه شده برای نمک استفاده کرد؛ زیرا این امکان وجود دارد که غلظت بالای نمک موجب پایداری برهمکنش بین کاوشگر و توالی اشتباه نیز گردد.

هیبریداسیون اساساً مستقل از pH می‌باشد و فرآیند هیبریداسیون در pH محیط انجام می‌گیرد. یکی دیگر از عواملی که سرعت هیبریداسیون DNA را بسیار تحت تأثیر قرار می‌دهد، دما است. بالاترین میزان هیبریداسیون در ۲۰ درجه سلسیوس پایین‌تر از دمای ذوب DNA (Tm) دو رشته گزارش شده است (Rasheed and Sandhyarani, 2017).

علاوه بر این، سینتیک هیبریداسیون با طول توالی رشته DNA رابطه معکوس دارد. اگر DNA کاوشگر و DNA هدف بلند باشند، به دلیل ممانعت فضایی، حساسیت کاهش می‌یابد (Lucarelli *et al.*, 2004). کاوشگر باید به اندازه کافی طولانی باشد تا بتواند اتصال اختصاصی در حضور تعداد زیادی توالی غیراختصاصی را تضمین کند. از طرف دیگر، کاوشگر خیلی طولانی ممکن است برای هیبریداسیون DNA مطلوب نباشد. در توالی‌های بلندتر کاوشگرها به‌صورت ماریچ در سطح درآمده و همین مورد ممکن است بازده هیبریداسیون را کاهش دهد (Palecek and Fojta, 2005).

محدوده دینامیکی خطی تشخیص DNA هدف با کنترل زمان هیبریداسیون تنظیم می‌شود. دوره کوتاه هیبریداسیون باعث ایجاد دامنه دینامیکی خطی گسترده‌تری می‌شود (Felix and Angnes, 2018).

واکنش هیبریداسیون سینتیک در سطوح جامد کندتر از هیبریداسیون در محلول است زیرا میزان دسترسی هدف به کاوشگر تثبیت شده بر روی سطح جامد کمتر بوده و لذا به زمان بیشتری برای دستیابی به بازدهی مناسب، نیاز است (Erdem *et al.*, 1999).

تاکنون FMV توسط آزمون‌های متعددی شناسایی شده است. با توجه به اهمیت اقتصادی درختان انجیر و شیوع بیماری در ایران و سایر کشورها، شناسایی و تشخیص سریع و آسان بیماری به منظور جلوگیری از خسارات اقتصادی سنگین بسیار ارزشمند است. متعاقباً، تقاضای زیادی برای حسگرهای زیستی دقیق با چارچوب‌های تشخیص سریع و ویروسی وجود دارد، از این رو بهینه‌سازی یک حسگر زیستی قابل حمل، ساده و ارزان بسیار مهم بوده و بر محدودیت استفاده از روش‌های پیشین غلبه می‌کند (Amiri *et al.*, 2018). در این پژوهش با توجه به بررسی پارامترهای مؤثر در بهبود عملکرد زیست‌حسگر، زیست‌حسگر DNA بهینه‌سازی شده جهت تشخیص ویروس عامل بیماری موزاییک انجیر، حساسیت بالا، حد تشخیص پایین و تکرارپذیری مناسب از خود نشان داد. این زیست‌حسگر با توجه به سهولت و سرعت بالا در استفاده نسبت به روش‌های انرژی‌بر و زمان‌بر زیستی نظیر PCR، پتانسیل بالایی جهت تشخیص زود هنگام و ویروس موزاییک انجیر دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب قدردانی و تشکر صمیمانه خود را از دکتر پرویز نوروزی و انیستیتو عالی الکتروشیمی دانشگاه تهران که ما را در انجام و ارتقای کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام کنند.

References

منابع

- Adam, V., Huska, D., Hubalek, J. and Kizek, R. 2010. Easy to use and rapid isolation and detection of a viral nucleic acid by using paramagnetic microparticles and carbon nanotubes-based screen-printed electrodes. *Microfluidics and Nanofluidics* 8(3): 329- 339.
- Alimoradian, M., Rakhshandehroo, F. and Shamsbakhsh, M. 2016. Prevalence and phylogenetic analysis of fig mosaic virus and fig badnavirus-1 in Iran. *Journal of Plant Protection Research* 56(2): 122-128.
- Alsaheli, Z., Abdallah, A., Incerti, O., Shalaby, A., Youssef, S., Digiario, M. and Elbeaino, T. 2021. Development of singleplex and multiplex real-time (Taqman®) RT-PCR assays for the detection of viruses associated with fig mosaic disease. *Journal of Virological Methods* 293: 114145.
- Amiri, M., Bezaatpour, A., Jafari, H., Boukherroub, R. and Szunerits, S. 2018. Electrochemical methodologies for the detection of pathogens. *ACS sensors* 3(6): 1069-1086.
- Authier, L., Grossiord, C., Brossier, P. and Limoges, B. 2001. Gold nanoparticle-based quantitative electrochemical detection of amplified human cytomegalovirus DNA using disposable microband electrodes. *Analytical Chemistry* 73(18): 4450-4456.
- Brazaca, L.C., Dos Santos, P.L., de Oliveira, P.R., Rocha, D.P., Stefano, J.S., Kalinke, C., Munoz, R.A.A., Bonacin, J.A., Janegitz, B.C. and Carrilho, E. 2021. Biosensing strategies for the electrochemical detection of viruses and viral diseases—a review. *Analytica Chimica Acta* 1159: 338384.
- Caglayan, K., Elci, E., Serce, C.U., Kaya, K., Gazel, M. and Medina, V. 2012. Detection of Fig mosaic virus in *Virulifereous eriophyide* mite *Aceria ficus*. *Journal of Plant Pathology* 94(3): 629-634.
- Cesewski, E. and Johnson, B.N. 2020. Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics* 159: 112214.
- Dai Tran, L., Nguyen, B.H., Van Hieu, N., Tran, H.V., Le Nguyen, H. and Nguyen, P.X. 2011. Electrochemical detection of short HIV sequences on chitosan/Fe₃O₄ nanoparticle based screen printed electrodes. *Materials Science and Engineering: C* 31(2): 477-485.
- Dalkılıçedil, Z., Mestav, H.O. and Kocataş, H. 2011. Genetic diversity of male fig (*Ficus carica caprificus* L.) genotypes with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology* 10(4): 519-526.
- Du, M., Yang, T., Li, X. and Jiao, K. 2012. Fabrication of DNA/graphene/polyaniline nanocomplex for label-free voltammetric detection of DNA hybridization. *Talanta* 88: 439-444.
- Duffy, G. and Moore, E. 2017. Electrochemical immunosensors for food analysis: A review of recent developments. *Analytical Letters* 50(1): 1-32.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Alabdullah, A., De Stradis, A., Minafra, A., Mielke, N., Castellano, M.A. and Martelli, G.P. 2009a. A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease. *Journal of General Virology* 90(5): 1281-1288.
- Elbeaino, T., Digiario, M. and Martelli, G.P. 2009b. Complete nucleotide sequence of four RNA segments of fig mosaic virus. *Archives of Virology* 154(11): 1719-1727.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Mielke-Ehret, N., Muehlbach, H.P. and Martelli, G.P. 2018. ICTV virus taxonomy profile: Fimoviridae. *Journal of General Virology* 99(11): 1478-1479.
- Erdem, A., Kerman, K., Meric, B., Akarca, U.S. and Ozsoz, M. 1999. DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. *Electroanalysis* 11(8): 586-587.
- Esfandyarpour, R., Esfandyarpour, H., Harris, J.S. and Davis, R.W. 2013. Simulation and fabrication of a new novel 3D injectable biosensor for high throughput genomics and proteomics in a lab-on-a-chip device. *Nanotechnology* 24(46): 465301.
- Felix, F.S. and Angnes, L. 2018. Electrochemical immunosensors—a powerful tool for analytical applications. *Biosensors and Bioelectronics* 102: 470-478.
- Firrao, G., Moretti, M., Rosquete, M.R., Gobbi, E. and Locci, R. 2005. Nanobiotransducer for detecting flavescence dorée phytoplasma. *Journal of Plant Pathology* 87: 101-107.
- Fotouhi, L., Hashkavayi, A.B. and Heravi, M.M. 2013. Interaction of sulfadiazine with DNA on a MWCNT modified glassy carbon electrode: Determination of DNA. *International Journal of Biological Macromolecules* 53: 101-106.
- Furst, A.L. and Francis, M.B. 2018. Impedance-based detection of bacteria. *Chemical Reviews* 119(1): 700-726.

- Guliy, O., Zaitsev, B., Larionova, O. and Borodina, I. 2019.** Virus detection methods and biosensor technologies. *Biophysics* 64(6): 890-897.
- Haji-Hashemi, H., Habibi, M.M., Safarnejad, M.R., Norouzi, P. and Ganjali, M.R. 2018a.** Label-free electrochemical immunosensor based on electrodeposited Prussian blue and gold nanoparticles for sensitive detection of citrus bacterial canker disease. *Sensors and Actuators B: Chemical* 275: 61-68.
- Haji-Hashemi, H., Norouzi, P., Safarnejad, M.R., Larijani, B., Habibi, M.M., Raiesi, H. and Ganjali, M.R. 2018b.** Sensitive electrochemical immunosensor for citrus bacterial canker disease detection using fast Fourier transformation square-wave voltammetry method. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 820: 111-117.
- Haji-Hashemi, H., Safarnejad, M.R., Norouzi, P., Ebrahimi, M., Shahmirzaie, M. and Ganjali, M.R. 2019.** Simple and effective label free electrochemical immunosensor for Fig Mosaic Virus detection. *Analytical Biochemistry* 566: 102-106.
- Idili, A., Amodio, A., Vidonis, M., Feinberg-Somerson, J., Castronovo, M. and Ricci, F. 2014.** Folding-upon-binding and signal-on electrochemical DNA sensor with high affinity and specificity. *Analytical Chemistry* 86(18): 9013-9019.
- Ishikawa, K., Maejima, K., Netsu, O., Fukuoka, M., Nijo, T., Hashimoto, M., Takata, D., Yamaji, Y. and Namba, S. 2015.** Rapid detection of fig mosaic virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of General Plant Pathology* 81(5): 382-389.
- Jafari, S., Deghani, M., Nasirizadeh, N., Baghersad, M.H. and Azimzadeh, M. 2019.** Label-free electrochemical detection of Cloxacillin antibiotic in milk samples based on molecularly imprinted polymer and graphene oxide-gold nanocomposite. *Measurement* 145: 22-29.
- Kerman, K., Saito, M., Morita, Y., Takamura, Y., Ozsoz, M. and Tamiya, E. 2004.** Electrochemical coding of single-nucleotide polymorphisms by monobase-modified gold nanoparticles. *Analytical Chemistry* 76(7): 1877-1884.
- Khan, M., Hasan, M., Hossain, S., Ahommed, M. and Daizy, M. 2020.** Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: State of the art. *Biosensors and Bioelectronics* 166: 112431.
- Kuehn, B.M. 2016.** Wearable biosensors studied for clinical monitoring and treatment. *Jama* 316(3): 255-257.
- Lau, Y., Wu, H., Wee, E.J., Trau, M., Wang, Y. and Botella, J.R. 2017.** Specific and sensitive isothermal electrochemical biosensor for plant pathogen DNA detection with colloidal gold nanoparticles as probes. *Scientific Reports* 7: 38896.
- Liu, S.J., Nie, H.G., Jiang, J.H., Shen, G.L. and Yu, R.Q. 2009.** Electrochemical sensor for mercury (II) based on conformational switch mediated by interstrand cooperative coordination. *Analytical Chemistry* 81(14): 5724-5730.
- Liu, Y.T., Deng, J., Xiao, X.L., Ding, L., Yuan, Y.L., Li, H., Li, X.T., Yan, X.N. and Wang, L.L. 2011.** Electrochemical sensor based on a poly (para-aminobenzoic acid) film modified glassy carbon electrode for the determination of melamine in milk. *Electrochimica Acta* 56(12): 4595-4602.
- Lucarelli, F., Marrazza, G., Turner, A.P. and Mascini, M. 2004.** Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. *Biosensors and Bioelectronics* 19(6): 515-530.
- Luo, X., Lee, T.M.H. and Hsing, I.M. 2008.** Immobilization-free sequence-specific electrochemical detection of DNA using ferrocene-labeled peptide nucleic acid. *Analytical Chemistry* 80(19): 7341-7346.
- Mazlan, N.F., Tan, L.L., Karim, N.H.A., Heng, L.Y., Jamaluddin, N.D., Yusof, N.YM., Quay, D.H.X. and Khalid, B. 2019.** Acrylic-based genosensor utilizing metal salphen labeling approach for reflectometric dengue virus detection. *Talanta* 198: 358-370.
- Mazloum-Ardakani, M., Hosseinzadeh, L. and Khoshroo, A. 2015.** Label-free electrochemical immunosensor for detection of tumor necrosis factor α based on fullerene-functionalized carbon nanotubes/ionic liquid. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 757: 58-64.
- Mikkelsen, S.R. 1996.** Electrochemical biosensors for DNA sequence detection. *Electroanalysis* 8 (1): 15-19.
- Mishra, G.K., Sharma, V. and Mishra, R.K. 2018.** Electrochemical aptasensors for food and environmental safeguarding: A review. *Biosensors* 8(2): 28.

- Movilli, J., Rozzi, A., Ricciardi, R., Corradini, R. and Huskens, J. 2018.** Control of probe density at DNA biosensor surfaces using poly (l-lysine) with appended reactive groups. *Bioconjugate Chemistry* 29(12): 4110-4118.
- Nguyen, M. and Haenni, A.L. 2003.** Expression strategies of ambisense viruses. *Virus Research* 93(2): 141-150.
- Palecek, E. and Fojta, M. 2005.** Electrochemical DNA sensors. Pp. 127-192. In: Willner, I. and Katz, E. (eds.). *Bioelectronics: From Theory to Applications*. Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Papadakis, G., Skandalis, N., Dimopoulou, A., Glynos, P. and Gizeli, E. 2015.** Bacteria murmur: application of an acoustic biosensor for plant pathogen detection. *PLoS One* 10(7): e0132773.
- Patel, R., Mitra, B., Vinchurkar, M., Adami, A., Patkar, R., Giacomozzi, F., Lorenzelli, L. and Baghini, M.S. 2022.** A review of recent advances in plant-pathogen detection systems. *Heliyon* 8(12): e11855.
- Patel, R., Vinchurkar, M., Shaikh, A.M., Patkar, R., Adami, A., Giacomozzi, F., Ramesh, R., Pramanick, B., Lorenzelli, L. and Baghini, M.S. 2023.** Part I: Non-faradaic electrochemical impedance-based DNA biosensor for detecting phytopathogen-*Ralstonia solanacearum*. *Bioelectrochemistry* 150: 108370.
- Pividori, M., Merkoci, A. and Alegret, S. 2000.** Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosensors and Bioelectronics* 15(5-6): 291-303.
- Rajabi, N., Safarnejad, M.R., Rakhshandehroo, F., Shamsbakhsh, M. and Rabbani, H. 2022.** Developing of specific monoclonal recombinant antibody fused to alkaline phosphatase (AP) for one-step detection of fig mosaic virus. *3 Biotech* 12(4): 88.
- Rana, K., Mittal, J., Narang, J., Mishra, A. and Pudake, R.N. 2021.** Graphene based electrochemical DNA biosensor for detection of False Smut of Rice (*Ustilaginoidea virens*). *The Plant Pathology Journal* 37(3): 291-298.
- Rasheed, P.A. and Sandhyarani, N. 2017.** Carbon nanostructures as immobilization platform for DNA: a review on current progress in electrochemical DNA sensors. *Biosensors and Bioelectronics* 97: 226-237.
- Rastogi, M. and Singh, S.K. 2019.** Advances in molecular diagnostic approaches for biothreat agents. Pp: 281-310. In: Singh, S.K. and Kuhn, J.H. (eds). *Defense Against Biological Attacks*. Springer.
- Saylan, Y., Erdem, O., Ünal, S. and Denizli, A. 2019.** An alternative medical diagnosis method: biosensors for virus detection. *Biosensors* 9(2): 65.
- Sedlackova, E., Bytesnikova, Z., Birgusova, E., Svec, P., Ashrafi, A.M., Estrela, P. and Richtera, L. 2020.** Label-free DNA biosensor using modified reduced graphene oxide platform as a DNA methylation assay. *Materials* 13(21): 4936.
- Shahmirzaie, M., Safarnejad, M.R., Rakhshandehroo, F., Safarpour, H., Rabbani, H., Zamanizadeh, H.R. and Elbeaino, T. 2019.** Production of a polyclonal antiserum against recombinant nucleocapsid protein and its application for the detection of fig mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 265: 22-25.
- Silvestrini, M., Fruk, L., Moretto, L.M. and Ugo, P. 2015.** Detection of DNA hybridization by methylene blue electrochemistry at activated nanoelectrode ensembles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 15(5): 3437-3442.
- Sun, X., He, P., Liu, S., Ye, J. and Fang, Y. 1998.** Immobilization of single-stranded deoxyribonucleic acid on gold electrode with self-assembled aminoethanethiol monolayer for DNA electrochemical sensor applications. *Talanta* 47(2): 487-495.
- Tian, B., Gao, F., Fock, J., Dufva, M. and Hansen, M.F. 2020.** Homogeneous circle-to-circle amplification for real-time optomagnetic detection of SARS-CoV-2 RdRp coding sequence. *Biosensors and Bioelectronics* 165: 112356.
- Topkaya, S.N., Azimzadeh, M. and Ozsoz, M. 2016.** Electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection: Recent advances and challenges. *Electroanalysis* 28(7): 1402-1419.
- Uliana, C.V., Tognolli, J.O. and Yamanaka, H. 2011.** Application of factorial design experiments to the development of a disposable amperometric DNA biosensor. *Electroanalysis* 23(11): 2607-2615.
- Walia, J.J., Salem, N.M. and Falk, B.W. 2009.** Partial sequence and survey analysis identify a multipartite, negative-sense RNA virus associated with fig mosaic. *Plant Disease* 93(1): 4-10.
- Walpita, P. and Flick, R. 2005.** Reverse genetics of negative-stranded RNA viruses: a global perspective. *FEMS Microbiology Letters* 244(1): 9-18.

- Wu, G., Ji, H., Hansen, K., Thundat, T., Datar, R., Cote, R., Hagan, M.F., Chakraborty, A.K. and Majumdar, A. 2001.** Origin of nanomechanical cantilever motion generated from biomolecular interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(4): 1560-1564.
- Yu, H.L.L., Maslova, A. and Hsing, I.M. 2017.** Rational design of electrochemical DNA biosensors for Point of Care applications. *ChemElectroChem* 4(4): 795-805.

Optimizing of electrochemical nano-biosensor based on the label-free DNA and modified nanomaterial to detect *Fig Mosaic Virus*

N. Farifteh¹, M. R Safarnejad², F. Rakhshandehroo^{3*}, M. Shamsbakhsh⁴ and H. Rabbani⁵

Received: 23 Jun., 2023

Accepted: 1 Sep., 2023

ABSTRACT

Today, electrochemical biosensors are highly regarded due to their high sensitivity and accuracy in tracking target nucleic acids. On the other hand, due to the economic importance of fig trees, rapid and accurate diagnosis of its diseases, including Fig Mosaic Disease (FMD), which is one of the most important and destructive viral diseases of fig trees plays an effective role in the management and control of this disease. In this study, a novel label free electrochemical DNA-based biosensor was optimized to qualitatively and quantitatively identify the presence of FMV in the infected samples. In this regard, in order to optimize and improve the performance of the designed biosensor, the concentration parameters of the DNA probe to form self-assembled monolayers and the time required to perform the hybridization process in the biological range with the greatest impact on the DNA biosensor were investigated. According to the data of the calibration curve, the first linear range at $-3 \mu\text{M}$ to $3 \mu\text{M}$ was obtained with the equation of the line $y = 4.81x + 34.58$ and the detection coefficient ($R^2 = 0.9967$). In this research, the optimized biosensor to detect a stable, high selective, easy and fast FMV-DNA, promises a diagnostic method with high efficiency and accuracy.

Key words: *Fig mosaic virus*, DNA label free electrochemical biosensor, optimizing, calibration

-
1. PhD Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
 2. Professor, Department of Plant Viruses, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran
 3. Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
 4. Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
 5. Associate Professor, Experimental Oncology Head of Antigen and Antibody Engineering Department, Monoclonal Antibody Research Centre Avicenna Research Institute, Tehran, Iran.

Corresponding author: Rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir