



A Comparative Study of DNA Loading on the Positive and Negative Surface Charge Gold Nanoparticles

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Farahani N.¹ PhD,
Behmanesh M.² PhD,
Ranjbar B.^{*3} PhD

How to cite this article

Farahani N, Behmanesh M, Ranjbar B. A Comparative Study of DNA Loading on the Positive and Negative Surface Charge Gold Nanoparticles. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3): 447-454.

ABSTRACT

Aims Due to their unique properties, functionalized GNPs provide a high potential for solving many problems, such as diagnosis and treatment of genetic diseases using nanotechnology. Depending on the purpose of each experiment, a particular interaction of DNA and nanoparticle is desirable that can be achieved by changing various parameters. The purpose of this study was to investigate the effect of gold nanoparticles surface charge on the conjugation process and the type of DNA interactions, as well as increasing the loading of DNA on the surface of gold nanoparticles.

Materials and Methods Two types of 30nm gold nanoparticles with positive and negative charge were synthesized. Gold nanoparticles were functionalized with three different concentrations of DNA. Bioconjugation was investigated using UV-Vis and fluorescence spectroscopy. Quantification of the DNA loading on each nanoparticle surface was done using two methods by fluorescence assay.

Findings The SPR spectrum of nanoparticles confirmed the binding of DNA to the surface of nanoparticles and also illustrates the level of DNA loading to the surface of the nanoparticle, as well as the effect of the surface charge of nanoparticles on the bioconjugation process. The fluorescence assay showed a higher loading of DNA in CTAB-stabilized nanoparticles and more non-specific than citrate-stabilized nanoparticles.

Conclusion Depending on the surface charge of GNPs, DNA loading on the surface of GNPs occurs with different affinities. Based on the purpose of the study, citrate stabilized GNPs and high concentration of DNA was appropriate to achieve this goal.

Keywords Gold nanoparticle; DNA oligonucleotide; Quantification of bioconjugation; Fluorescence

CITATION LINKS

- [1] Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ...
- [2] Review on gold nanoparticles and their ... [3] Physico-chemical characteristics of gold ...
- [4] Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in ... [5] Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of ... [6] Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle ... [7] Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene ... [8] Thermal stability of DNA functionalized gold ... [9] Gold nanoparticles: a critical review of therapeutic applications and toxicological ... [10] Size-dependent cellular uptake of DNA functionalized gold ... [11] Covalent and non-covalent DNA-gold-nanoparticle interactions: new avenues of ... [12] Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold ... [13] Ultrasensitive DNA detection using highly fluorescent bioconjugated ... [14] Magnetically assisted DNA assays: high selectivity using conjugated polymers for amplified fluorescent ... [15] Quantitative enhanced Raman scattering of labeled DNA from gold and silver ... [16] Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA ... [17] Ultra-sensitive, rapid gold nanoparticle-quantum dot plexcitonic self-assembled aptamer-based nanobiosensor for the ... [18] Preparation and characterization of Au Colloid ... [19] Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of ... [20] Surface plasmon resonance spectroscopy of gold nanoparticle-coated ... [21] Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold ... [22] Solvent and ligand effects on the localized surface plasmon resonance (LSPR) of ... [23] Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline aqueous ... [24] The role radius of curvature plays in thiolated oligonucleotide loading on gold ... [25] Conformation of oligonucleotides attached to gold nanocrystals probed by gel ... [26] Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of ...

¹Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Genetics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116

Phone: +98 (21) 82882005

Fax: -

ranjbarb@modares.ac.ir

Article History

Received: July 30, 2018

Accepted: September 30, 2018

ePublished: September 21, 2019

مطالعه مقایسه‌ای بارگیری DNA به نانوذرات طلای دارای بار سطحی مثبت و منفی

نسرین فراهانی PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مهرداد بهمنش PhD

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

بیژن رنجبر PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: نانوذرات طلا عامل‌دار شده با DNA به دلیل دارابودن ویژگی‌های منحصربه‌فرد، پتانسیل بالایی برای حل بسیاری از مشکلات همچون تشخیص و درمان بیماری‌های ژنی با استفاده از نانوفناوری فراهم می‌کنند. بسته به هدف هر آزمایش، برهم‌کنش خاصی از DNA با نانوذره مدنظر است که با تغییر دادن پارامترهای مختلف قابل دستیابی است. هدف این پژوهش بررسی اثر بار سطحی نانوذرات طلا بر فرآیند اتصال زیستی و نوع اتصالات DNA به سطح و افزایش بارگیری توالی‌های DNA بر سطح نانوذرات طلا بود.

مواد و روش‌ها: دو نوع نانوذره با قطر حدود ۳۰ نانومتر و بار سطحی مثبت و منفی سنتز شد. فرآیند اتصال زیستی نانوذرات با استفاده از سه غلظت مختلف از DNA انجام شد و با استفاده از اسپکتروسکوپی UV-Vis و فلوروسانس مورد بررسی قرار گرفت. کمی‌سازی درصد اتصال DNA به سطح هر نانوذره با استفاده از دو روش و با کمک سنجش فلوروسانس انجام شد.

یافته‌ها: طیف SPR، اتصال DNA به سطح نانوذرات را تایید کرد و به‌خوبی نشان‌دهنده میزان اتصال DNA به سطح نانوذره و نیز اثر بار سطحی نانوذرات بر فرآیند اتصال زیستی بود. سنجش فلوروسانس، درصد اتصال زیستی در نانوذرات تثبیت‌شده با CTAB را بالاتر و غیراختصاصی‌تر از نانوذرات تثبیت‌شده با سیترات نشان داد.

نتیجه‌گیری: بسته به بار سطحی نانوذرات طلا، اتصالات DNA به سطح با برهم‌کنش‌ها و مقادیر متفاوت از بارگیری رخ می‌دهد. با توجه به هدف این پژوهش، نانوذرات طلا تثبیت‌شده با سیترات و استفاده از غلظت بالای DNA، برای رسیدن به این هدف مناسب بودند.

کلیدواژه‌ها: نانوذره طلا، الیگونوکلوئوتید DNA، کمی‌سازی اتصال زیستی، فلوروسانس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۸

نویسنده مسئول: ranjbarb@modares.ac.ir

مقدمه

نانوذرات طلا یکی از نانومواد هستند که به‌طور گسترده مورد تحقیق و مطالعه قرار گرفته‌اند^[1]. از زمان اولین گزارش تولید نانوذرات کلوئیدی طلا توسط فارادی در بیش از صد سال پیش که مبنای نانوفناوری مدرن شد، تا به امروز مطالعات بسیاری در مورد نحوه سنتز، خصوصیات و کاربردهای کلاسترها، کلوئیدها و نانوذرات طلا منتشر شده است^[1,2]. نانوذرات طلا به دلیل دارابودن ویژگی‌های منحصربه‌فرد نوری و فیزیکی همچون رزونانس پلاسمون سطحی (SPR)، تفرق رامان افزایش‌یافته سطحی (SERS)، تعدیل پلاسمونیک فلوروسانس مولکولی، جنبش تابشی پلاسمون سطحی

و ویژگی‌های نوری غیرخطی (NLO) در بسیاری از زمینه‌ها به‌منظور برچسب‌گذاری، تصویربرداری و حسگرهای تشخیصی به‌طور گسترده به کار برده می‌شوند^[1-3]. امکان عامل‌دارکردن آسان سطح نانوذرات طلا با عوامل و لیگاندهای مختلف یکی دیگر از خصوصیات ویژه این نانومواد است که آن را بستری مناسب برای اتصالات نانوزیستی با الیگونوکلوئوتیدها، آنتی‌بادی‌ها و پروتئین‌ها کرده است. اتصال زیستی نانوذرات طلا همچنین کاندیدای امیدبخشی برای طراحی مواد زیستی جدید به‌منظور تجسس در سیستم‌های زیستی شده است^[4].

عامل‌دارکردن نانوذرات طلا توسط طیف وسیعی از لیگاندها و مولکول‌های زیستی، با بهره‌مندی از ویژگی جذب سطحی آسان آلکان تیول‌ها روی نانوساختارهای فلزی همچون طلا که یک فرآیند شیمیایی کاملاً شناخته شده است، امکان‌پذیر است^[5]. به‌طور خاص، الیگونوکلوئوتیدهای اصلاح‌شده با تیول (توالی‌های کوتاه DNA سنتزی) را می‌توان بر سطح نانوذرات طلا تثبیت کرد^[6]. نانوذرات طلای عامل‌دار شده با الیگونوکلوئوتیدهای تیوله (DNA-AuNPs)، در محلول‌های نمکی به‌شدت پایدار هستند و به توالی‌های نوکلئیک اسیدی مکمل‌شان به شکل کاملاً انتخابی در یک رفتار تعاونی متصل می‌شوند^[7]. نانوذرات عامل‌دار شده با DNA به شکل گسترده به‌عنوان بلوک‌های ساختمانی نانومقیاس در روش‌های اسمبلی، پروب در بسیاری از سیستم‌های تشخیص زیستی و عوامل تشخیصی و درمانی برای بیماری‌ها کاربرد دارند^[8,9]. DNA-AuNPs به‌عنوان عوامل آنتی‌سنس برای تنظیم بیان ژن درون سلولی با هدف درمان بیماری‌هایی همچون سرطان و ایدز، حمل دارو، تصویربرداری از سلول‌های سرطانی و درمان‌های فتوترمال مورد استفاده قرار گرفته‌اند^[7,8,10]. نانوذرات متصل‌شده با DNA به‌عنوان عوامل حفاظتی در مقابل تخریب نوکلئازها عمل می‌کنند و بنابراین زمان گردش و دسترس‌پذیری زیستی را افزایش می‌دهند. نانوذرات همچنین حفاظتی در برابر تخریب فیزیکی و آنزیمی DNA ایجاد کرده و این امکان را فراهم می‌کنند تا رشته‌های DNA با غلظت بالاتری به جایگاه عملشان برسند و بدین‌ترتیب کارایی آنها نسبت به روش‌های سنتی درمانی فاقد نانوذرات، افزایش می‌یابد^[11].

اولین روش شناسایی زیستی که از نانوذرات عامل‌دار شده با DNA به‌منظور شناسایی پلی‌نوکلئوتیدها استفاده کرد، شامل استراتژی‌های خوانش رنگ‌سنجی بود که توسط میکین و همکاران در سال ۱۹۹۷ گزارش شد^[12]. این روش‌ها از توده‌ای شدن القاشده که همراه با تغییر رنگ قرمز به آبی است، الهام گرفته بودند. پس از توسعه اولین روش‌های رنگ‌سنجی، نانوذرات طلای عامل‌دار شده با DNA یک عنصر مرکزی در تعداد بسیار زیادی از طرح‌هایی شدند که از روش‌های خوانش مانند فلوروسانس، رادیواکتیویتی، نشر نور مبتنی بر واکنش شیمیایی، میکروبالانس کریستال کوآرتز، اسپکتروسکوپی رامان، پراکنش نور و سیگنال‌های الکتریکی استفاده می‌کردند^[6]. به‌عنوان مثال جایگزین کردن رنگ‌های فلوروسانس که اغلب دارای اشکالاتی همچون سیگنال نسبتاً پایین و پایداری نوری

نوع اول نانوذرات تثبیت‌شده با CTAB با بار سطحی مثبت بودند که از طریق احیای HAuCl_4 طبق روش رضایی و رنجبر^[17] سنتز شدند. برای سنتز این نانوذرات سه محلول شامل $250 \mu\text{g}$ میکرولیتر از 0.1% مولار HAuCl_4 ، $500 \mu\text{g}$ میکرولیتر از سدیم‌سیترات 3% میلی‌مولار و 2 mL میلی‌لیتر از 3% میلی‌مولار NaBH_4 آماده شد. سپس محلول اول به $9750 \mu\text{g}$ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد و سپس $250 \mu\text{g}$ میکرولیتر از محلول دوم و $75 \mu\text{g}$ میکرولیتر از محلول سوم به‌ترتیب به آن اضافه شدند و این محلول برای مدت 10 دقیقه هم‌زده شد (محلول بذر طلا). در مرحله دوم مقدار $250 \mu\text{g}$ میکرولیتر از محلول طلا 0.1% مولار به $9750 \mu\text{g}$ میکرولیتر آب اضافه شد و 3% گرم از CTAB در آن به‌طور کامل حل شد. سپس $500 \mu\text{g}$ میکرولیتر از محلول ویتامین C ($35/2$ میلی‌گرم از ویتامین C در 2 mL میلی‌لیتر از آب) و درنهایت یک میلی‌لیتر از محلول بذر به آن اضافه و به‌مدت 10 دقیقه هم‌زده شد.

جدول ۱) توالی DNA و اصلاحات آن

اسم	توالی و اصلاحات (از $3'$ به $5'$)
الیگونیوکلوئوتید DNA	S-S-(CH ₂) ₆ -GAGCTACAGG-(CH ₂) ₆ -Cy3

نوع دوم نانوذرات طلا تثبیت‌شده با سیترات با بار منفی بودند که از طریق احیای HAuCl_4 طبق روش گرابر و همکاران^[18] با اندکی تغییر سنتز شدند. برای این منظور ابتدا $20 \mu\text{g}$ میلی‌لیتر محلول طلا $250 \mu\text{g}$ میلی‌مولار آماده شده و روی هم‌زن با دور متوسط و همراه با گرما قرار داده شد. وقتی این محلول در آستانه جوش قرار گرفت، به آن یک میلی‌لیتر از محلول سدیم‌سیترات (0.1% گرم در یک میلی‌لیتر آب) اضافه و برای 15 دقیقه همراه با حرارت هم‌زده شد. بعد از حدود 3 دقیقه رنگ محلول به سمت تیره‌شدن رفت و سپس به قرمز تغییر رنگ داد. بعد از این مرحله، این محلول بدون گرمادهی هم‌زده می‌شود تا کاملاً سرد شود.

فرآیند سنتز نانوذرات به‌نحوی بهینه‌سازی شد تا سایز هر دو نوع نانوذره یکسان باشد. سایز و غلظت مولی نانوذرات سنتز شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و اسپکترسکوپی نشر اتمی (AES)، طبق روش لیبو و همکاران^[1] به دست آمد.

اسپکترسکوپی UV-Vis: تشکیل نانوذرات طلا و تغییر در ویژگی‌های رزونانس پلاسمون سطحی قبل و بعد از برهم‌کنش با غلظت‌های مختلف از DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراء بنفش- مرئی مدل cary 100 (Agilent؛ ایالات متحده آمریکا) در محدوده $400-700$ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آماده‌سازی نانوذرات عامل‌دارشده با DNA: نانوذرات طلا با بار مثبت و منفی با روشی مشابه با آنچه که توسط لی و همکاران^[8] و لیبو و لوب^[19] ایجاد کرده بودند، توسط توالی‌های الیگونیوکلوئوتیدی DNA عامل‌دار شدند. روش کار به این ترتیب بود عامل دی‌سولفید از طریق اضافه‌کردن TCEP با غلظت $100 \mu\text{g}$ میکرومولار به DNA با غلظت

ضعیف بودند با نانومواد بر پایه نانوذرات طلا موجب شد تا روش‌هایی فوق‌حساس برای شناسایی محصولات ژنی با اختصاصیت بالا ایجاد شود^[13, 14]. همچنین به‌کارگیری نانوذرات طلا در کنار رنگ‌های فلئوئورسانس و استفاده از ویژگی پراکنش رامان تشدیدشده، امکان شناسایی و کمی‌سازی توالی‌های الیگونیوکلوئوتیدی در یک روش حساس و موثر همراه با فلئوئورسانس زمینه بسیار کم را فراهم ساخت^[15, 16]. علاوه بر اینها، روش بیوبارکد نیز یک گام مهم در زمینه شناسایی زیستی بر پایه نانوذرات طلا با فراهم‌کردن یک پروتکل برای شناسایی پروتئین‌ها، DNA و دیگر بیومولکول‌ها در غلظت‌های بسیار پایین ایجاد کرد^[6].

در تمامی کاربردهای نانوذرات عامل‌دارشده با DNA، درک میزان پوشانده‌شدن سطح نانوذره با DNA، نوع اتصالات و نیز در بسیاری از موارد افزایش میزان اتصال DNA به سطح نانوذره از اهمیت زیادی برخوردار است. مزیت افزایش مقدار DNA متصل‌شده به نانوذره این است که به شکل چشمگیری فرآیند شناسایی زیستی و نانودرمانی را بهبود می‌بخشد^[6].

به‌دلیل کاربردهای بسیار گسترده نانوذرات طلا عامل‌دارشده با DNA و اهمیت نحوه اتصال DNA به سطح نانوذره در نانو فناوری، در این پژوهش ما دو نوع مختلف از نانوذرات طلا با سایز یکسان که دارای بارهای سطحی مثبت و منفی بودند، سنتز کردیم. در مرحله بعد میزان اتصال DNA به نانوذرات با کمک توالی 10 نوکلئوتیدی DNA که دارای گروه تیول از یک سر و رنگ فلئوئورسانس Cy3 از سر دیگر بود، با استفاده از دو روش کمی‌سازی شد و درنهایت تاثیر بار سطحی نانوذرات طلا بر فرآیند اتصال زیستی و نوع اتصالات DNA مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: مواد شیمیایی شامل تتراکلریک‌اسید (HAuCl_4)، سیتیل‌متیل‌آمونیم‌بروماید (CTAB)، نیترات‌نقره، سدیم‌پروپیل‌کربنات، آسکوربیک‌اسید (سیگما‌آلدیرچ؛ ایالات متحده آمریکا)، تری‌سدیم‌دهیدرات، سدیم‌کلرید، سدیم‌هیدروژن‌فسفات، سدیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات و دیگر مواد برای آماده‌سازی بافرها (مرک؛ آلمان) خریداری شدند. TCEP (ترموفیشر؛ ایالات متحده آمریکا) نیز به کار رفت. تمامی محلول‌ها با استفاده از آب فوق خالص میلی‌کیو آماده شدند.

سنتز الیگونیوکلوئوتید: الیگونیوکلوئوتید DNA به شکل خالص‌شده با HPLC، توسط شرکت AnaSpec, Inc کانادا سنتز و به فرم پودر لیوفیلیزه تحویل گرفته شد. DNA سنتز شده در آب میلی‌کیو حل شد و تا زمان استفاده در دمای 20°C - نگه‌داری شد. توالی DNA و گروه‌های عاملی دو سر $5'$ و $3'$ آن، در جدول ۱ نشان داده شده است.

سنتز و مشخصه‌یابی نانوذرات طلا: دو نوع مختلف از نانوذرات طلا با سایز $30 \sim$ نانومتر در این پژوهش سنتز و مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها و بحث

مطالعات اسپکتروسکوپی UV-Vis: تشکیل نانوذرات طلا براساس مشاهده باند رزونانس پلاسمون سطحی موضعی (LSPR) در ناحیه مرئی با استفاده از اسپکتروسکوپی UV-Vis مورد بررسی قرار گرفت. وجود یک تک پیک در ناحیه ۵۲۶ نانومتر نشان‌دهنده ماهیت کروی نانوذرات سنتز شده بود. قطر نانوذرات سنتز شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری حدود ۳۰ نانومتر محاسبه شد و تعداد اتم‌های طلا برای این سایز از نانوذره کروی با استفاده از فرمول (۳) به دست آمد. در این فرمول N تعداد متوسط اتم‌های طلا برای هر نوع از نانوذره کروی، ρ دانسیته طلا (۱۹/۳ گرم بر سانتی‌مترمکعب)، M وزن اتمی طلا (۱۹۷ گرم بر مول) و D متوسط قطر ذره است [1]:

$$N = \frac{\pi \rho D^3}{6M} \quad (3)$$

با استفاده از تکنیک اسپکتروسکوپی نشر اتمی، تعداد اتم‌های طلا در یک‌سی‌سی از محلول نانوذرات طلای سنتز شده محاسبه شد (N کلی) و در نهایت غلظت مولار نانوذرات سنتز شده با استفاده از فرمول (۴) به دست آمد. در این فرمول N تعداد متوسط اتم‌های طلا، V حجم محلول به لیتر و NA عدد آووگادرو است:

$$C = \frac{N \text{ total}}{NVN_A}$$

موقعیت و شدت باند LSPR توسط عواملی همچون دما، لیگاند سطحی، شکل، سایز، ویژگی‌های دی‌الکتریک و محیط موضعی اطراف نانوذره به شدت تحت تاثیر قرار می‌گیرد [20, 21]. اضافه کردن یک پوسته لیگاند پایدارکننده به نانوذرات فلزی تثبیت شده موجب ایجاد تغییراتی در محیط دی‌الکتریک موضعی نانوذرات می‌شود و در نتیجه آن یک شیفت در λ_{max} باند LSPR ایجاد می‌شود. میزان شیفت جذب ماکزیمم همچنین به نسبت حجم پوسته به هسته نانوذرات فلزی و لیگاند بستگی دارد [22]. بنابراین امکان بررسی اتصال به الیگونوکلوئید از طریق مشاهده تغییر در پیک LSPR بعد از اتصال زیستی نانوذرات با DNA وجود دارد.

طیف UV-Vis نانوذرات طلا تثبیت شده با CTAB و نانوذرات تثبیت شده با سیترات در نمودار ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود هر دو نانوذره دارای یک پیک رزونانس شدید در ناحیه حدود ۵۲۶ نانومتر (λ_{max}) هستند. باند LSPR هر دو نوع نانوذره بعد از اتصال به DNA دچار کاهش شدت و شیفت به سمت ناحیه با طول موج بلندتر (Red shift) شده است که نشان‌دهنده اتصال توالی‌های الیگونوکلوئیدی به GNP است. مقدار شیفت نانوذرات تثبیت شده با CTAB، بعد از اتصال با DNA حدود ۸ تا ۱۴ نانومتر بود و نانوذرات تثبیت شده با سیترات، شیفت ۲ تا ۳ نانومتر داشتند. شدت پیک نیز در نانوذرات سیترا ته بعد از اتصال زیستی به میزان کمتری نسبت به نانوذرات CTAB کاهش یافته

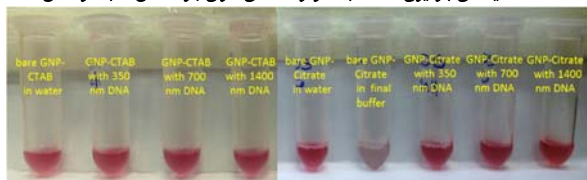
۵۰ میکرومولار، احیا شد. این مخلوط برای مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. در مرحله بعد غلظت‌های مختلف از الیگونوکلوئید فعال شده (۳۵۰، ۷۰۰ و ۱۴۰۰ نانومتر) به یک میلی‌لیتر از کلوئید طلا (۳ نانومولار) در ویال‌های جداگانه اضافه و غلظت بافر فسفات و SDS در محلول نهایی به ترتیب به ۰/۱ مولار و ۰/۱٪ رسانده شد. این مخلوط برای مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق با هم‌زدن آرام انکوبه شد. سپس به هر یک از ویال‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر از سدیم کلرید یک‌مولار اضافه و برای مدت ۱۰ ثانیه با دور کم سونیکیت شدند. فرایند نم‌زنی دو مرتبه دیگر با فواصل یک ساعت تکرار شد. بعد از اضافه کردن دور آخر نمک و سونیکیت، ویال‌ها به مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه شدند.

کمی‌سازی الیگونوکلوئیدهای تثبیت شده بر سطح نانوذرات طلا: فرایند کمی‌سازی اتصال زیستی با استفاده از دو روش انجام شد. در روش اول غلظت الیگونوکلوئیدهای متصل نشده به نانوذرات که به صورت آزاد در محلول هستند، اندازه‌گیری شد. برای این منظور ویال‌های حاوی محلول واکنش، با دور ۱۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت هر یک از ویال‌ها جداسازی و به منظور اندازه‌گیری فلوئورسانس، فلوئورفور Cy3 در ۵۱۲ نانومتر تهییج شده و نشر آن در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه فلورسنت اسپکتروفتومتر مدل LS55 (Perkin Elmer؛ ایالات متحده آمریکا) خوانده شد. غلظت DNA موجود در هر نمونه از طریق فرمول به دست آمده از نمودار استاندارد، محاسبه شد. سپس این غلظت‌ها در فرمول (۱) قرار گرفت و درصد اتصال زیستی محاسبه شد:

$$100 * \left(\frac{\text{غلظت DNA موجود در سوپرناتانت} - \text{غلظت اولیه DNA}}{\text{غلظت اولیه DNA}} \right) \quad (1)$$

در روش دوم مقدار DNA متصل شده به نانوذرات کمی‌سازی و درصد اتصال زیستی محاسبه شد. در این روش، رسوب باقی‌مانده درون هر ویال با فسفات بافر سالین (۰/۱٪ SDS، میزان pH برابر با ۷/۴) سه مرتبه شسته و در نهایت رسوب در همین بافر حل شد. سپس TCEP با غلظت نهایی ۵۰۰ نانومولار به نانوذرات طلای عامل‌دار شده با DNA اضافه و ویال‌ها به مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه شدند. با این کار توالی‌های الیگونوکلوئیدی که از طریق گروه تیول روی نانوذرات طلا تثبیت شده بودند، از آنها جدا می‌شوند. این محلول‌ها مجدداً مشابه قبل سانتریفیوژ و سوپرناتانت آنها جدا شد. مقدار DNA موجود در هر نمونه نیز از طریق نمودار استاندارد به دست آمد و با استفاده از فرمول (۲) درصد اتصال زیستی محاسبه شد [6]. تمامی آزمایش‌ها به منظور به حداقل رساندن میزان خطا، سه مرتبه و با استفاده از نمونه‌های تازه آماده شده تکرار شد:

$$100 * \left(\frac{\text{غلظت DNA جدا شده از نانوذره}}{\text{غلظت اولیه DNA}} \right) \quad (2)$$



شکل ۱ عدم تغییر رنگ نانوذرات عامل‌دار شده با DNA بعد از اضافه کردن بافر نهایی کانجوگه و تغییر رنگ و توده‌ای شدن نانوذره تنها با اضافه شدن بافر نهایی، نشان‌دهنده اتصال الیگونوکلوئوتیدها به سطح نانوذرات و پایداری آنها در برابر نمک است.

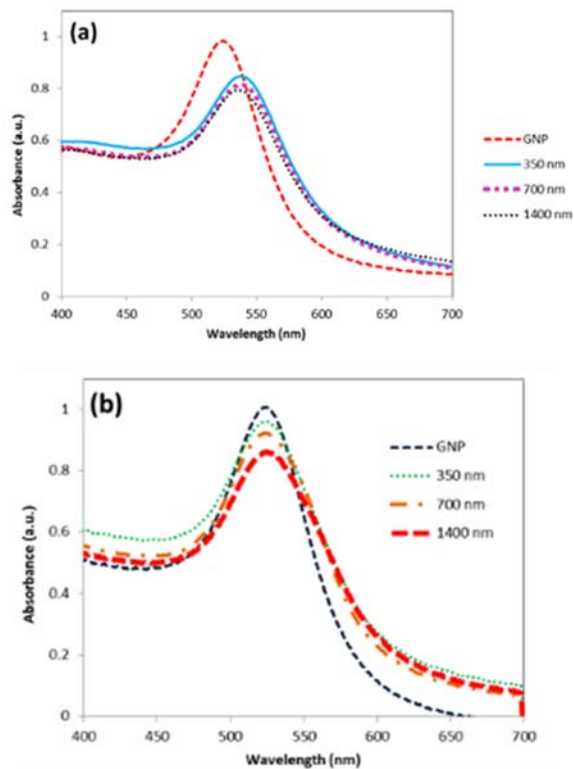
محاسبه درصد الیگونوکلوئوتیدهای کانجوگه‌شده به نانوذرات طلا: در برهم‌کنش زنجیره‌های DNA بلند، الیگونوکلوئوتیدهای کوتاه زنجیر و واحدهای سازنده آنها (نوکلوئوتیدها، نوکلئوزیدها و بازها) با نانوذرات طلا، از نظر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی تفاوت‌هایی وجود دارد، همان‌طور که هر یک از این لیگاندها خودشان با هم از نظر ماهیت تفاوت دارند. با این حال برخی از قوانین را می‌توان برای هر کدام از آنها در نظر گرفت. به‌عنوان مثال مشاهده شده است که توالی‌های DNA تک‌ رشته‌ای (ssDNA)، تمایل خوبی برای اتصال به سطح نانوذره طلا دارند. البته ساختار واقعی زنجیره DNA هنگام جذب روی نانوذره بسته به غلظت ssDNA (در غلظت‌های بالاتر به‌دلیل دافعه بدنه فسفات، اغلب کانفورماسیون‌های قائم و راست دیده می‌شود)، قدرت یونی، انعطاف‌پذیری زنجیره و تمایل هر یک از نوکلئوتیدها و همچنین توالی‌ها به سطح طلا دارد [11]. از آنجایی که در اغلب روش‌های اتصال زیستی از نانوذرات طلا با بار سطحی منفی استفاده می‌شود، در این پژوهش از دو نوع نانوذره طلا با بار سطحی مثبت و منفی استفاده شد تا اثر این بارهای سطحی متفاوت نیز بر فرآیند اتصال زیستی مورد بررسی قرار گیرد. به همین منظور درصد DNA متصل‌شده به نانوذرات دارای بار منفی و بار مثبت با استفاده از کمی‌سازی الیگونوکلوئوتیدهای متصل‌نشده به نانوذره (روش اول) و کمی‌سازی الیگونوکلوئوتیدهای متصل‌شده به نانوذره (روش دوم) محاسبه شد (جدول ۲).

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، در کمی‌سازی اتصال زیستی به روش اول، نانوذرات تثبیت‌شده با CTAB که دارای بار مثبت هستند، درصد اتصال بالاتری نسبت به نانوذرات سیتراته با بار منفی دارند. از آنجایی که الیگونوکلوئوتیدهای DNA به‌دلیل داشتن بدنه فسفات دارای بار منفی هستند، این افزایش اتصال می‌تواند ناشی از جاذبه الکترواستاتیک بین بارهای مثبت سطح نانوذره و منفی بدنه DNA باشد. در GNP-CTAB با افزایش غلظت DNA، درصد اتصال زیستی کاسته می‌شود اما میزان DNA متصل‌شده رو به افزایش است.

در GNP-Citrate به‌دلیل اثر دافعه بار منفی سطح نانوذره بر رشته‌های DNA، درصد اتصال زیستی نسبت به GNP-CTAB کمتر است. بیشترین میزان این اختلاف در غلظت ۳۵۰ نانومولار دیده می‌شود که درصد اتصال زیستی GNP-CTAB، ۷/۱ برابر GNP-Citrate است. این اختلاف در غلظت ۷۰۰ نانومولار، ۲/۱ برابر و در

بود. کمتری بودن مقدار شیفت و نیز تغییر شدت پیک SPR در نانوذرات دارای بار منفی نسبت به بار مثبت، می‌تواند نشان‌دهنده اتصال کمتر DNA در نانوذرات سیتراته و در نتیجه تغییر کمتر محیط پیرامونی این نانوذره باشد. همچنین مشاهده می‌شود که در هر دو نوع نانوذره، با افزایش غلظت الیگونوکلوئوتید اضافه‌شده به نانوذرات، شدت پیک کاهش بیشتری را نشان می‌دهد که این موضوع نیز می‌تواند ناشی از اتصال بیشتر الیگونوکلوئوتیدها به سطح نانوذره و در نتیجه تغییرات بیشتر دی‌الکتریک سطحی آن باشد (نمودار ۱).

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، سوسپانسیون کردن نانوذرات عامل‌دار شده با DNA در بافر نهایی کانجوگه که دارای نمک و SDS بود، هیچ‌گونه تغییر رنگی نسبت به نانوذرات حاضر در آب، ایجاد نکرد و رنگ قرمز آنها نشان‌دهنده موفق بودن فرآیند اتصال زیستی و عدم توده‌ای شدن بود. در واقع اتصال توالی‌های الیگونوکلوئوتیدی DNA بر سطح نانوذرات موجب پایداری نانوذره در برابر نمک شده است. اضافه کردن بافر نهایی کانجوگه موجب توده‌ای شدن نانوذره تنها شد، زیرا نمک بارهای سطحی نانوذرات طلا را پوشش می‌دهد و در نتیجه این کار، نانوذرات به‌هم متصل‌شده و ایجاد توده می‌کنند. این توده‌ای شدن موجب ایجاد پدیده‌ای به نام جفت شدن پلاسمون سطحی می‌شود که میزان جذب ماکزیم نور را به طول موج‌های بلندتر تغییر داده و در نتیجه موجب تغییر رنگ محلول نانوذره می‌شود [23] (شکل ۱).



نمودار ۱ (a) باند SPR نانوذره تثبیت‌شده با CTAB در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف از الیگونوکلوئوتید DNA، (b) باند SPR نانوذره تثبیت‌شده با سیتراته در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف الیگونوکلوئوتید

افزایش یافته است اما با افزایش غلظت تا ۱۴۰۰ نانومولار این درصد رو به کاهش می‌گذارد. در این نانوذره نیز مقدار DNA متصل‌شده به نانوذره با افزایش غلظت اولیه DNA، رو به افزایش است. نتایج این بخش، با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات UV-Vis یکسان بود (جدول ۲؛ DNA/GNP*: تعداد DNA متصل‌شده به‌ازای هر نانوذره).

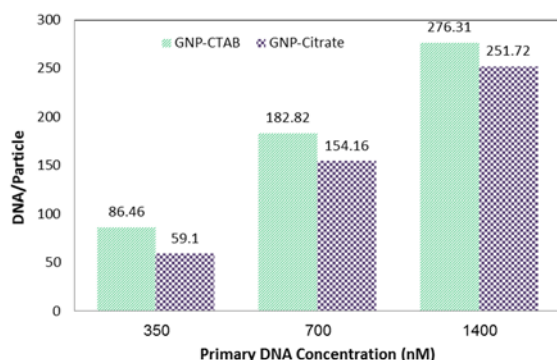
۱۴۰۰ نانومولار، ۱/۱ برابر است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت DNA اولیه، اثر بار سطحی بر اتصال زیستی کمتر می‌شود که می‌تواند به‌دلیل تمایل بالای گروه‌های تیول به سطح نانوذره طلا و غلبه آن بر اتصالات غیراختصاصی در غلظت‌های بالاتر باشد. همچنین مشاهده می‌شود که در GNP-Citrate، با افزایش غلظت DNA از ۳۵۰ نانومولار به ۷۰۰ نانومولار، درصد اتصال زیستی

جدول ۲) مقایسه درصد اتصال الیگونوکلوئوتیدهای DNA بر سطح نانوذرات طلا

GNP-Citrate			GNP-CTAB			روش	غلظت DNA استفاده‌شده در ابتدای فرآیند (نانومولار)	حجم و غلظت نانوذره طلا
DNA/GNP*	مقدار DNA متصل‌شده (نانومولار)	درصد اتصال زیستی (%)	DNA/GNP*	مقدار DNA متصل‌شده (نانومولار)	درصد اتصال زیستی (%)			
۵۹/۱۰	۱۷۷/۳۱	۵۰/۶۶	۸۶/۴۶	۲۹۵/۳۷	۸۴/۳۹	اول	۳۵۰	یک میلی‌لیتر نانوذره طلا با غلظت ۳ نانومولار
		۴۵/۷۵			۴۳/۳۵	دوم		
۱۵۴/۱۶	۴۶۲/۴۹	۶۶/۰۷	۱۸۲/۸۲	۵۴۸/۴۵	۷۸/۳۵	اول	۷۰۰	
		۶۲/۴۲			۵۰/۵۱	دوم		
۲۵۱/۷۲	۷۵۵/۱۶	۵۳/۹۴	۲۷۶/۳۱	۸۲۸/۹۴	۵۹/۲۱	اول	۱۴۰۰	
		۵۱/۸۱			۳۴/۲۹	دوم		

DNA/GNP*: تعداد DNA متصل‌شده به‌ازای هر نانوذره

جایگزین کردن شیمیایی DNA متصل‌شده از طریق گروه تیول به سطح نانوذره صورت می‌گیرد و این ماده تأثیری بر سایر نیروها و پیوندهای متصل‌کننده DNA به سطح نانوذره ندارد. بنابراین چنانچه توالی‌های الیگونوکلوئوتیدی با برهم‌کنش‌های دیگری همچون الکترواستاتیک به سطح متصل شده باشند بعد از اضافه‌کردن TCEP نیز به سطح نانوذره متصل خواهند ماند.



نمودار ۲) مقدار اتصال DNA به‌ازای هر نانوذره در نمونه‌های GNP-CTAB و GNP-Citrate

همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، با افزایش تعداد DNAهای متصل به سطح نانوذره اغلب کانفورماسیون‌ها به شکل قائم خواهند بود. در واقع مشاهده شده است که قسمت داخلی الیگونوکلوئوتید که به سطح نانوذره نزدیک‌تر است کاملاً کشیده شده است در حالی که قسمت‌های بیرونی بیشتر کانفیگوراسیون رندوم‌کوئل دارند. هر قدر که غلظت DNA بیشتر باشد، میزان اتصالات غیراختصاصی به سطح نانوذره کمتر شده و مانع از پیچش DNA در سطح نانوذره می‌شود، بنابراین این قطعات DNA کاذب‌گه‌شده برای هیبریداسیون با

تعداد الیگونوکلوئوتیدها به‌ازای هر ذره از طریق تقسیم‌کردن غلظت الیگونوکلوئوتیدهای فلئوئورسانس به غلظت نانوذرات برای هر نمونه محاسبه شد [6]. همان‌طور که در نمودار ۲ دیده می‌شود، با افزایش غلظت DNA استفاده‌شده برای اتصال زیستی، تعداد DNAهای متصل‌شده به نانوذرات افزایش می‌یابد. مقدار DNA متصل‌شده به هر نانوذره در GNP-CTAB بیشتر از GNP-Citrate است و این اختلاف در تمامی غلظت‌ها مشاهده می‌شود. میرکین و همکاران [24] نیز برای نانوذرات با قطر ۳۰ نانومتر، مقدار DNA متصل‌شده به‌ازای هر نانوذره سیتراته را ۲۵۰-۲۷۰ گزارش داده بودند که این مقدار معادل آخرین غلظت DNA اولیه استفاده‌شده (۱۴۰۰ نانومولار) در این پژوهش است. لازم به ذکر است که غلظت‌های بالاتر از DNA اولیه برای فرآیند اتصال زیستی نیز انتخاب شدند (<۱۴۰۰)، اما در نمونه‌های GNP-Citrate همگی دچار حالت توده‌ای شده و برای مقایسه مناسب نبودند. به همین دلیل به نظر می‌رسد که به‌منظور افزایش اتصال الیگونوکلوئوتیدهای DNA بر سطح نانوذرات، خصوصاً نانوذرات دارای بار منفی عوامل دیگری همچون ساختار لینکر باید مورد توجه قرار گیرد [6] (نمودار ۲).

به‌منظور بررسی دقیق‌تر اثر بار سطحی نانوذره بر فرآیند اتصال زیستی، درصد اتصال با استفاده از روش دوم نیز کمی‌سازی شد. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، درصد اتصال زیستی به‌دست‌آمده از روش دوم در GNP-CTAB دارای اختلاف محسوسی با روش اول است در حالی که درصد اتصال زیستی روش دوم و اول در GNP-Citrate اختلاف چندانی با هم ندارد. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده اتصال توالی‌های الیگونوکلوئوتیدی با پیوندهایی به غیر از پیوند کووالانسی (Au-S) به نانوذرات دارای بار مثبت باشد، زیرا استفاده از احیاکننده TCEP به‌منظور

کووالانسی و محکم توالی‌های DNA به سطح نانوذرات می‌شود، به میزان پایداری این پروب‌ها خواهد افزود و از رهايش توالی‌های DNA از سطح نانوذرات کم خواهد کرد.

نتیجه‌گیری

برهم‌کنش DNA، چه توالی‌های بلند چند صد بازی و چه توالی‌های کوتاه الیگونوکلوئیدی، با لیگاندها نقش بسیار مهمی در نانومواد تشخیصی و درمانی ایفا می‌کند. نانوذرات طلا یکی از مهم‌ترین نانومواد هستند که می‌توانند به‌عنوان لیگاند برای توالی‌های DNA عمل کنند. برهم‌کنش DNA و نانوذرات طلا به عوامل متعددی همچون طول توالی، محتوای بازی سکانس DNA، گروه‌های عاملی اضافه‌شده به DNA، نوع لینکر بین گروه عاملی و DNA و ویژگی‌های نانوذره طلا (سایز، بار سطحی، مورفولوژی) بستگی دارد. در این مطالعه اثر بار سطحی نانوذرات کروی طلا بر اتصال غلظت‌های مختلف از الیگونوکلوئید تیوله DNA، با هدف افزایش میزان اتصال اختصاصی DNA به سطح نانوذره، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که GNP-CTAB به‌دلیل داشتن بار مثبت، توانایی بالاتری برای اتصال زیستی با DNA دارد اما درصد قابل توجهی از این اتصالات به شکل غیراختصاصی هستند. در حالی که در این غلظت، اغلب اتصالات در GNP-Citrate اختصاصی هستند. همچنین در صورت استفاده از غلظت‌های پایین DNA در GNP-CTAB بیشتر توالی الیگونوکلوئیدی به‌دلیل ایجاد برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک روی سطح نانوذره قرار گرفته و امکان هیبریداسیون آنها با توالی مکمل‌شان کمتر است. نتایج این پژوهش به‌خوبی اثر بار سطحی نانوذرات طلا بر فرآیند اتصال زیستی و نحوه اتصالات DNA به سطح نانوذره را نشان داد. درنهایت با توجه هدف این پژوهش، نمونه GNP-Citrate با مقدار DNA اولیه ۱۴۰۰ نانومولار که توالی‌های DNA در آن به میزان بیشتری به شکل قائم هستند، به‌عنوان پروب برای ساخت نانوبیوسنور در مراحل بعدی انتخاب شد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از دانشگاه تربیت‌مدرس برای کمک‌های مالی در راستای پیشبرد این پژوهش کمال تشکر را دارند.

تاییدیه اخلاقی: این مقاله نیاز به تاییدیه اخلاقی ندارد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: نسرین فراهانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی نگارنده بحث (۴۰٪)، مهرداد بهمنش (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)، بیژن رنجبر (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر تحت حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

توالی‌های مکمل خود، در دسترس‌پذیرتر می‌شوند [25]. در صورتی که بخش بزرگی از بازهای توالی الیگونوکلوئیدی به سطح نانوذره جذب شوند، توالی DNA در این موقعیت پایداری بیشتری نسبت به حالت هیبریدشده با مکمل خود دارد و بنابراین تمایلی برای هیبریداسیون از خود نشان نمی‌دهد. به‌طور برعکس، اگر بازها هیچ‌گونه برهم‌کنشی با سطح نداشته باشند، کاملاً به‌صورت قائم قرار می‌گیرند [26].

با توجه به نکات اشاره‌شده، این‌گونه نتیجه می‌شود که در هر دو نوع نانوذرات، با افزایش غلظت DNA اولیه و افزایش تعداد DNA متصل‌شده به‌ازای هر نانوذره، میزان اتصالات اختصاصی که از طریق ایجاد پیوند کووالانسی Au-S صورت می‌گیرد، افزایش می‌یابد و کانفورماسیون الیگونوکلوئیدها بیشتر به‌صورت قائم خواهد بود. در غلظت‌های پایین‌تر DNA اولیه، تعداد DNA متصل‌شده به سطح کمتر است، بنابراین انتظار وجود برهم‌کنش‌های غیراختصاصی و پیچیده‌شدن DNA روی سطح نانوذره بیشتر خواهد بود. میزان این برهم‌کنش‌های غیراختصاصی در GNP-CTAB بیشتر از GNP-Citrate است زیرا همان‌طور که نتایج نشان داد، نیروی جاذبه الکترواستاتیک بین بارهای مثبت و منفی نانوذره و DNA نیز در اتصال به سطح نقش دارند. آنچه که بسیار مهم به نظر می‌رسد این است که در فرآیند اتصال زیستی انتخاب روش بهتر کاملاً وابسته به هدف ما از بارگیری نانوذره با DNA دارد، به‌عنوان مثال در صورتی که ایجاد یک پوسته از DNA روی نانوذره مطلوب باشد، استفاده از نانوذرات دارای بار مثبت همراه با غلظت‌های پایین از DNA مناسب است. اگر هدف تنها افزایش اتصال DNA به سطح چه به‌صورت اختصاصی و چه غیراختصاصی باشد، نانوذرات با بار مثبت و غلظت بالا از DNA مناسب هستند و در صورتی که هدف، افزایش اتصال تنها به شکل اختصاصی باشد، نانوذرات با بار منفی و غلظت بالا از DNA مطلوب هستند. این نانوذرات همچنین پروب‌های مناسبی برای هیبریدشدن با توالی‌های مکمل خود هستند.

از محدودیت‌های کاربرد نانوذرات عامل‌دارشده با DNA، می‌توان به پایداری پایین این پروب‌های نانوذره DNA اشاره کرد که می‌تواند ناشی از هیبریدشدن توالی‌های DNA متصل به سطح نانوذره به یکدیگر، عدم عامل‌دارشدن کافی سطح برخی نانوذرات و اتصالات نانوذرات به هم یا آزادشدن برخی توالی‌های DNA از سطح نانوذرات باشد. عواملی همچون دمای بالا و سونیکاسیون، رهاسازی توالی‌های DNA از سطح نانوذره را سرعت می‌دهند. همچنین به‌کاربردن نانوذراتی که مدت زمان زیادی از سنتز آنها می‌گذرد، منجر به ناپایداری این پروب‌ها خواهد شد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که به‌منظور افزایش پایداری پروب‌های نانوذره-DNA، از نانوذرات تازه سنتز شده استفاده شود، تا حد امکان در زمان طراحی توالی DNA، نبود توالی‌های مکمل هم مورد توجه قرار گیرد و نانوذرات عامل‌دارشده با DNA در یخچال و به دور از نور نگهداری شوند. همچنین به‌کاربردن روش‌های عامل‌دارکردن که منجر به اتصالات

nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2003;125(38):11474-5.

14- Xu H, Wu H, Huang F, Song S, Li W, Cao Y, et al. Magnetically assisted DNA assays: high selectivity using conjugated polymers for amplified fluorescent transduction. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(9):e83.

15- Stokes RJ, Macaskill A, Lundahl PJ, Smith WE, Faulds K, Graham D. Quantitative enhanced Raman scattering of labeled DNA from gold and silver nanoparticles. *Small.* 2007;3(9):1593-601.

16- Cao YC, Jin R, Mirkin CA. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science.* 2002;297(5586):1536-40.

17- Rezaei Z, Ranjbar B. Ultra-sensitive, rapid gold nanoparticle-quantum dot plexcitonic self-assembled aptamer-based nanobiosensor for the detection of human cardiac troponin I. *Eng Life Sci.* 2016;17(2):1-29.

18- Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, Natan MJ. Preparation and characterization of Au Colloid monolayers. *Anal Chem.* 1995;67(4):735-43.

19- Liu J, Lu Y. Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes. *Nat Protoc.* 2006;1(1):246-52.

20- Pedersen DB, Duncan EJS. Surface plasmon resonance spectroscopy of gold nanoparticle- coated substrates. *Tech Rep.* 2005;109:1-46.

21- Su KH, Wei QH, Zhang X, Mock JJ, Smith DR, Schultz S. Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. *Nano Lett.* 2003;3(8):1087-90.

22- Ghosh SK, Nath S, Kundu S, Esumi K, Pal T. Solvent and ligand effects on the localized surface plasmon resonance (LSPR) of gold colloids. *J Phys Chem B.* 2004;108(37):13963-71.

23- Pamies R, Cifre JGH, Espín VF, Collado-González M, Baños FGD, de la Torre JG. Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline aqueous media. *J Nanopart Res.* 2014;16(4):2375-6.

24- Hill HD, Millstone JE, Banholzer MJ, Mirkin CA. The role radius of curvature plays in thiolated oligonucleotide loading on gold nanoparticles. *ACS Nano.* 2009;3(2):418-24.

25- Parak WJ, Pellegrino T, Micheel CM, Gerion D, Williams SC, Alivisatos AP. Conformation of oligonucleotides attached to gold nanocrystals probed by gel electrophoresis. *Nano Lett.* 2003;3(1):33-6.

26- Maxwell DJ, Taylor JR, Nie S. Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules. *J Am Chem Soc.* 2002;124(32):9606-12.

1- Liu X, Atwater M, Wang J, Huo Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2007;58(1):3-7.

2- Das M, Shim KH, An SSA, Yi DK. Review on gold nanoparticles and their applications. *Toxicol Environ Health Sci.* 2011;3(4):193-205.

3- Amendola V, Meneghetti M, Stener M, Guo Y, Chen S, Crespo P, et al. Physico-chemical characteristics of gold nanoparticles. *Gold Nanopart Anal Chem.* 2014;66:81-152.

4- Yeh Y, Creran B, Rotello VM. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale.* 2012;4(6):1871-80.

5- Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev.* 2005;105(4):1103-69.

6- Hurst SJ, Lytton-Jean AK, Mirkin CA. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Anal Chem.* 2006;78(24):8313-8.

7- Rosi NL, Giljohann DA, Thaxton CS, Lytton-Jean AK, Han MS, Mirkin CA. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science.* 2006;312(5776):1027-30.

8- Li F, Zhang H, Dever B, Li XF, Le XC. Thermal stability of DNA functionalized gold nanoparticles. *Bioconjug Chem.* 2013;24(11):1790-7.

9- Hornos Carneiro MF, Barbosa F. Gold nanoparticles: a critical review of therapeutic applications and toxicological aspects. *J Toxicol Environ Heal Part B Crit Rev.* 2016;19(3-4):129-48.

10- Wong AC, Wright DW. Size-dependent cellular uptake of DNA functionalized gold nanoparticles. *Small.* 2016;12(40):5592-600.

11- Carnerero JM, Jimenez-Ruiz A, Castillo PM, Prado-Gotor R. Covalent and non-covalent DNA-gold-nanoparticle interactions: new avenues of research. *Chemphyschem.* 2017;18(1):17-33.

12- Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, Letsinger RL, Mirkin CA. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science.* 1997;277(5329):1078-81.

13- Zhao X, Tapecc-Dytioco R, Tan W. Ultrasensitive DNA detection using highly fluorescent bioconjugated