طیف‌نگاری ساختار DNA به کمک رنگدانه های مصنوعی با استفاده از نور LED

سید میلاد هاشمی، سمیه سلمانی و محمدحسین مجلس‌آرا*

دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۱۷/ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹

آزمایشگاه فوتونیک، دانشکدهٔ فیزیک، دانشگاه خوارزمی، تهران

*مسئول مکاتبات: majlesara@khu.ac.ir

چکیده. واضح است که دستگاه‌های تشخیص غلظت DNA در زمینه‌های ژنتیک و زیستی و بیوتکنولوژی کاربرد زیادی دارند. بر این اساس، تعدادی دستگاه مشابه با نور لیزر طراحی شده است که معایب آن قیمت بالا و استفاده از مقادیر قابل ملاحظه از نمونه می‌باشد. دستگاه طراحی شده با نور LED کار می‌کند که هزینهٔ ساخت این دستگاه را بسیار ارزان‌تر می‌کند. مقادیر DNA استفاده شده در این دستگاه بسیار کم و در حدود چند میکرولیتر می‌باشد و اندازه‌گیری سریع و کوچک و قابل حمل بودن آن نیز از امتیازات این دستگاه می‌باشد. داده‌های خروجی از این دستگاه به صورت ولتاژ بر حسب زمان و تبدیل فوریه آن، یعنی تبدیل فرکانسی ثبت می‌شود. از نمودارهای فرکانسی بدست آمده می‌توان با استفاده از قانون بیرلامبرت به غلظت نسبی DNA و سنجش ویروس‌ها و اندازه‌گیری میزان آسیب به DNA و کاربردهای بسیار دیگر پی برد. با استفاده از این دستگاه، غلظت DNAهای رنگ شده با سه رنگینهٔ مختلف توسط دستگاه فلورومتر اندازه‌گیری شد.

واژه‌های کلیدی. رنگدانه، فلورومتر، فرکانس، غلظت DNA

DNA structure spectroscopy by synthetic pigments using LED lighting

Seyed Milad Hashemi, Somayeh Salmani and Mohammad Hossein Majles Ara*

Received 08.07.2015 / Accepted 09.03.2016

Photonic Lab, Faculty of Physics, Kharazmi University, Tehran, Iran
*Correspondent author: majlesara@khu.ac.ir

Abstract. It is clear that DNA concentration and biological detection devices have many applications in the fields of genetics and biotechnology. For this goal, some similar devices have been designed working with the laser light which the disadvantages of them are high prices and the use of significant amounts of sample volume. But this designed device which works with LED light has very cheap manufacturing cost. The amounts of DNA used in this device are very low, about a few micro-liters and measurement of small, fast and portable it is also the advantages of these devices. The Data recorded as voltage versus time and the Fourier transform the frequency domain. From the frequency curve, by using the Byrlambrt it is possible to obtain the relative concentrations of DNA, viruses and assays measuring DNA damage and many other applications. By use of this device, the concentration of DNA colored with three different pigments was measured.

Keywords. pigments, fluormeter, frequency, concentration, DNA

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.7.0]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.312]

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.7.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.312]

مقدمه

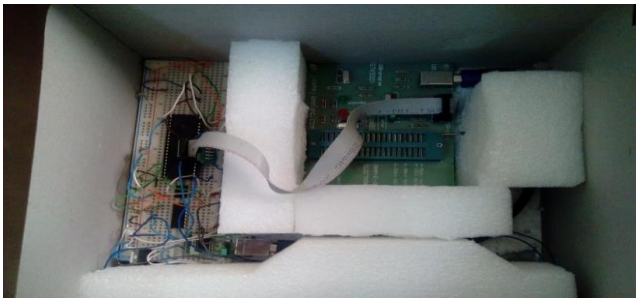
در سال‌های اخیر، تعیین غلظت DNA در بررسی‌های زیستی بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Alberti & Mergny, 2003)، برهمین مبنا، دستگاه‌های اندازه‌گیری لیزری در سال‌های اخیر طراحی و ساخته شده‌اند که بسیار گران قیمت می‌باشند (Yan *et al*., 2002). بدین‌منظور، دستگاه فلورومتر طراحی شده ابزاری ضروری در مطالعه‌ی DNA می‌باشد که نسبت به دستگاه‌های مشابه بسیار ارزان می‌باشد. روش این دستگاه از این واقعیت بهره می‌گیرد که یک مولکول رنگینهٔ فلورسنت دهنده به وسیلهٔ منبع نوری که می‌تواند انرژی خود را به یک مولکول رنگ فلورسنت پذیرنده بفرستد، تحریک می‌شود و این مولکول رنگ دوم دارای یک باند جذب است که با باند گسیل رنگ اول تداخل می‌کند. میزان انرژی انتقال بین دو مولکول قویاً تابع فاصلهٔ بین آن‌هاست (Simmel & Yurke, 2002)، بنابراین تشخیص یا تغییر در فلورسانس رنگ‌دهنده و یا تغییر در فلورسانس رنگ‌پذیرنده یا هر دو به ما اجازه می‌دهد، به تغییرات پیکربندی در سازه‌های نانو که به رنگ متصل می‌شوند، پی ببریم. دستگاه اندازه‌گیری فلورسانس شرح داده شده در این تحقیق با عبور از فیلترهای خاص، اجازه می‌دهد تنها انرژی (FRET) که در آن تنها فلورسانس رنگ دهنده است را اندازه‌گیری کنیم (Mao *et al*., 1999)، با استفاده از نمودارهای استاندارد می‌توان در تشخیص تفاوت DNAهای سلول‌های مختلف به عنوان مثال DNAهای سالم و بیمار و کنترل کیفی DNA و سنجش میزان بیان ژن و اندازه‌گیری میزان آسیب به DNA پی برد (Yurke *et al*., 2000).

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از سه نوع رنگدانهٔ سایبرگرین برای رنگ‌آمیزی DNA استفاده شده است که این رنگدانه از رنگدانه‌های مصنوعی است که به رنگ سبز می باشد و دارای وزن مولکولی ۵۰۹ و۷۳ $mol^{-1}.g$ و فرمول شیمیایی $C_{32}H_{37}N_4S^+$ است. همچنین سایبرگرین حداکثر جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر و حداکثر انتشار در طول موج ۵۲۰ نانومتر را داراست. نمونه‌های آماده شده عبارتند از: ۱- DNA رنگ‌آمیزی شده با مولکول رنگ سایبرگرین از نوع ۵۸ که از سلول‌های گیاهی استخراج شده است که دارای ضریب مولار ۲/. و غلظت ۴۴۰ میکرومولار می‌باشد؛ ۲- DNA رنگ آمیزی شده با مولکول رنگ سایبرگرین از نوع d6 که از سلول‌های گیاهی استخراج شده است که دارای ضریب مولار ۲/. و غلظت ۱۸۴میکرومولار می‌باشد؛ ۳- DNA رنگ‌آمیزی شده با مولکول رنگ سایبرگرین از نوع مولوئیکا که دارای ضریب مولار ۲/. و غلظت ۲۱۲ میکرومولار می‌باشد.

چیدمان آزمایشگاهی

فلورومتر مبتنی بر LED دارای چهار بخش اصلی می‌باشد: ۱- سیستم انتشار نور (LED و مدار کنترل)؛ ۲- آشکارساز نور سیستم (فیلتر و فوتودیود و مدار تقویت کننده و مبدل آنالوگ به دیجیتال)؛ ۳- سیستم ارسال اطلاعات (مدار کنترل، آی سی DAQ و مبدل سریال به USB)؛ ۴- سیستم پردازش سیگنال الکترونیکی که در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- قسمت الکترونیکی دستگاه تعیین غلظت DNA.

Fig. 1. The electrical part of device for determination of DNA concentration.

سیستم انتشار نور دستگاه فلورومتر شامل قسمت‌های زیر می‌باشد: ۱- LED: برای تولید نور از LEDهای دارای توان ۱ وات و ولتاژ ۳ ولت و جریان ۳۰۰ میلی آمپر وطول موجهای مختلف استفاده می‌شود؛ ۲- مدار کنترل: میکرو کنترل وظیفه‌ی ایجاد پالس‌های نوری بین ۱۰ تا ۲۰ هرتز را دارد که برای روشن و خاموش کردن LED استفاده می‌شود و نیز از تداخل این امواج با نور حالت ثابت و هارمونیک جلوگیری می‌کند. همچنین قطعات سیستم آشکارساز به شرح زیر است: ۱-فیلتر: از فیلترهای دارای باند گذار ۴۹۰ نانومتر و ۵۲۰ نانومتر برای تحریک بهینه‌ی نور LED قبل و بعد از برخورد به نمونه‌ی آزمایش استفاده می‌شود؛ ۲- فوتودیود: فوتودیود که وظیفهٔ دریافت فلورسانس ساطع شده از نمونه را دارد از نوع RadioShack می‌باشد؛ ۳- مدار تقویت‌کننده: از آی سی AD633 جهت تقویت سیگنال ضعیف دریافتی از فوتودیود تا ۳۰ برابر و کاهش نویز همراه سیگنال استفاده می‌شود؛ ۴- مبدل آنالوگ به دیجیتال: از آی سی AD7816 جهت تبدیل سیگنال آنالوگ فوتودیود به دیجیتال استفاده می‌شود. این آی سی توانایی نمونه‌برداری تا سرعت ۲۰۰ کیلوهرتز و دقت ۱۲ بیت را دارد. قسمت سوم این دستگاه سیستم ارسال اطلاعات است که شامل ۱- مدار کنترل: میکروکنترل Atmega16 ساخت شرکت Atmel که با فرکانس ۸ مگا هرتز و ولتاژ ۵ ولت در این مدار استفاده شده که وظیفهٔ دریافت اطلاعات دیجیتال از فوتودیود و ارسال این اطلاعات به کامپیوتر را دارد؛ ۲-آی سی DAQ: در این مدار جهت جمع‌آوری داده‌ها و نیز به خاطر کم کردن هزینه‌ها و بالا بردن سرعت پردازش از حافظهٔ داخلی میکرو که ۱۰۲۴ بایت می‌باشد، استفاده می‌شود. اطلاعات به‌صورت نرم‌افزاری در صدم ثانیه توسط میکرو دریافت و در این حافظه انباشته و جهت ارسال به کامپیوتر آماده می‌شود؛ ۳- مبدل سریال به USB: جهت ارسال اطلاعات به کامپیوتر از پورت سرعت بالای USB استفاده می‌شود اما قبل از ارسال اطلاعات نیاز است که اطلاعات سریال میکرو به USB تبدیل شود. جهت انجام این تبدیل از مبدل Serial to USB، FT232 ساخت شرکت FTDI استفاده شده است. این مبدل ۱۰۲۴ بیت گنجایش ذخیرهٔ اطلاعات را دارد و از پروتکل‌های USB1 و USB2 پشتیبانی می‌کند و می‌تواند اطلاعات را با سرعت به پورت USB کامپیوتر منتقل نماید. اطلاعات توسط میکرو با سرعت ۳۸۴۰۰ بیت بر ثانیه از مبدل ارسال می‌شود. آخرین بخش دستگاه فلورومتر سیستم پردازش سیگنال الکترونیکی است که اطلاعات به‌وسیلهٔ پورت USB کامپیوتر توسط نرم‌افزار نوشته شده تحت زبان شی گرای ویژوال بیسیک دریافت می‌شود و به صورت RealTime نمایش داده می‌شود و در واحدهای زمانی مشخص ۱ ثانیه از اطلاعات دریافتی تبدیل فرکانس FFT گرفته می‌شود و در نرم‌افزار به نمایش در می‌آید. نرم‌افزار امکان بزرگ‌نمایی در مقدار و زمان را دارد و امکان ذخیرهٔ اطلاعات به صورت داده و عکس به صورت ولتاژ بر حسب زمان و فرکانس را در اختیار کاربر قرار می‌دهد.

روش انجام آزمایش

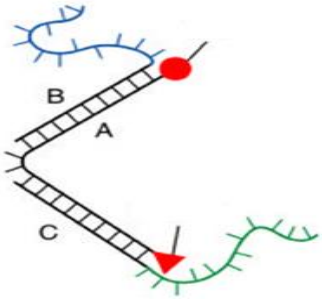
در ابتدا طیف نور گسیلی از دیود LED که دارای طول موج ۲۵۰nm می‌باشد توسط میکروکنترل به صورت امواج پالسی ۱۰ تا ۲۰ هرتز تبدیل می‌شود. سپس با گذراندن این طیف از فیلتر دارای باند گذار متناسب با طیف برانگیختگی مولکول رنگ موردنظر به نمونه برخورد می‌کند. نمونه DNA قبلاً توسط مولکول رنگ مورد نظر رنگ‌آمیزی شده است.که این مولکول رنگ مطابق شکل ۲ به هاربین DNA متصل می‌شود (Stryer & Haugland, 1967)، این مولکول رنگ‌ها توسط طیف گسیلی برانگیخته می‌شوند و از خود نور ساطع می‌کنند. همان‌طور که فاصلهٔ این دو کاهش می‌یابد، فلورسنت دهنده به صورت گسیل دفع می‌شود (Heller & Morrison, 1995). تغییر در فلورسانس ایجاد شده، تغییر در جابجایی بین رنگ‌ها را می‌دهد که نشان‌دهندهٔ حرکت مولکول‌ها در DNA می‌باشد. اندازه‌گیری فلورسانس ساطع شده از رنگ متصل به رشته‌های DNA به طور موثر نشان دهندهٔ فاصلهٔ بین رنگ‌ها می‌باشد (Niemeyer & Adler, 2002).

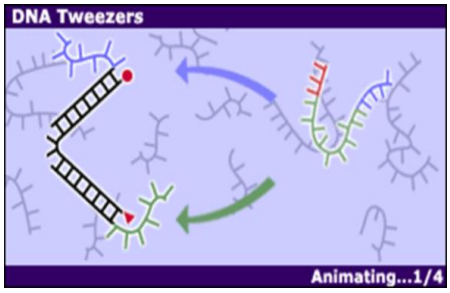
[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.7.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.312]

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.7.0]

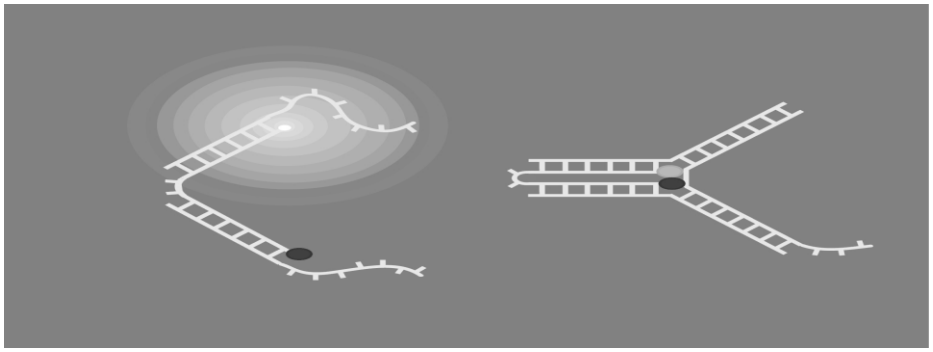
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.312]





شکل ۲- نحوهٔ اتصال مولکول رنگ‌ها به ساختار DNA.

Fig. 2. The style of connection between pigment molecules to DNA structure.



شکل ۳- انتشار نور فلورسانت توسط مولکول رنگینه.

Fig. 3. The fluorescent beam propagation by pigment molecule.

شکل ۳ نشان می‌دهد که فلورسانس دهنده تابعی از فاصلهٔ بین مولکول فلورسانس می‌باشد. فلورسانس گسیلی از نمونه با عبور از فیلتر دارای باند گذار متناسب با طیف انتشار مولکول رنگینه مورد نظر منتشر می‌شود. فلورسانس گسیلی توسط سیلیکون فوتودیود جذب می‌شود. سیگنال خروجی از فوتودیود توسط آمپلی فایر تقویت شده و مقداری از نویز اپتیکی آن گرفته می‌شود. سپس توسط مبدل آنالوگ به دیجیتال از حالت آنالوگ به دیجیتال تبدیل شده سپس سیگنال خروجی از مبدل با سیگنال خروجی که به‌صورت مستقیم از LED دیود به مدار کنترل می‌آید، تداخل می‌کند. این امر به‌این دلیل می‌باشد که طیف زمینه‌ی نور LED از طیف گسیلی از نمونه‌ی DNA کسر شود؛ زیرا فقط طیف فلورسانس حاصل از نمونه برای ما اهمیت دارد و نشان دهندهٔ فلورسنت DNA مربوطه می‌باشد. این سیگنال به‌دست آمده به صورت مستقیم به سطح فلورسانس مشخص شده بستگی دارد (Smith *et al*., 1992).

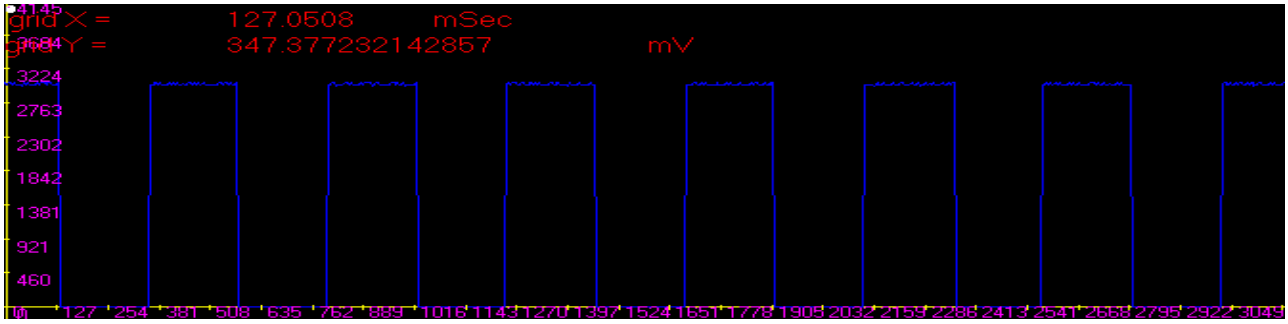
سپس این اطلاعات توسط آی سی DAQ جمع‌آوری شده و توسط مبدل سریال به USB به منظور پردازش اطلاعات توسط نرم‌افزار نوشته شده به زبان برنامه نویسی شی گرای ویژیوال بیسیک به کامپیوتر فرستاده می‌شود. این اطلاعات در این نرم‌افزار به‌صورت ولتاژ برحسب زمان و تبدیل فوریهٔ آن به صورت فرکانسی نمایش داده می‌شود. تبدیل فوریه نوعی تبدیل است که یک تابع را بصورت توابع پایه‌ای سینوسی که هر کدام در مقادیری ضرب شده‌اند، نشان می‌دهد. اگر بردار x را مقادیر یک سری زمانی در نظر بگیریم، که x(t) مقدار مشاهده شده در زمان t است، تبدیل فوریه برروی این بردار، مقادیر آن را از

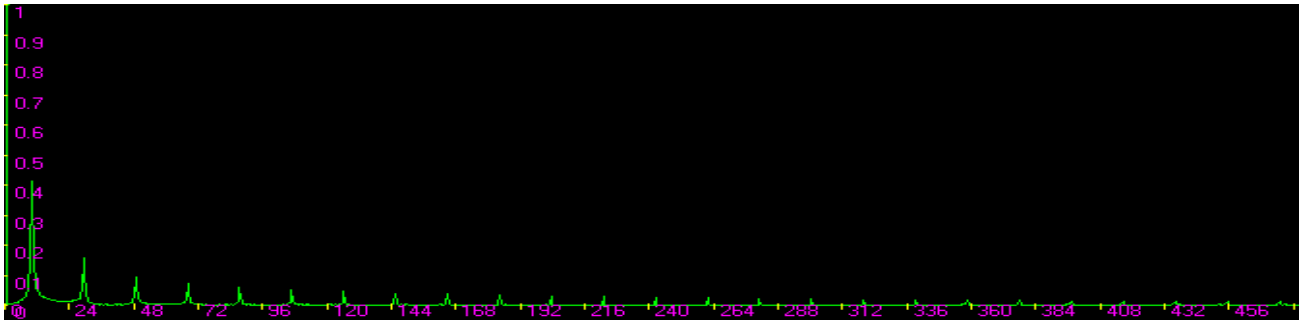
دامنهٔ زمانی به دامنه‌ی فرکانسی منتقل می‌کند. ضرایب بدست آمده از تبدیل فوریه به گونه‌ای مرتب شده قرار می‌گیرند به‌طوری که ضرایب پر اهمیت در سمت چپ و ضرایب کم اهمیت‌تر در سمت راست قرار می‌گیرند. بنابراین پر اهمیت‌ترین ضریب در X(0) و کم اهمیت‌ترین ضریب در X(N-1) ذخیره شده است. هرچه یک ضریب پر اهمیت‌تر باشد، بدان معنی است که آن ضریب حاوی اطلاعات مهم‌تری (کلی‌تری) از بردار x می‌باشد.

از نمودارهای فرکانس و دامنهٔ فرکانس به‌دست آمده می توان با استفاده از قانون بیر لامبرت غلظت نسبی DNA مورد نظر را به‌دست آورد. طبق قانون لامبرت، در غلظت ثابت با افزایش طول ماده، میزان نور جذب شده به تناسب افزایش می‌یابد. طبق قانون بیر نیز میزان جذب ماده تابع غلظت اجزای ماده می‌باشد. ترکیب این دو قانون تحت قانون بیر-لامبرت بیان می‌شود که رابطهٔ آن به صورت $A = \log\frac{1}{T} = \log\frac{I_0}{I} = -\varepsilon cL$ بیان می‌شود که در آن A میزان جذب T ضریب انتقال، ε ضریب جذب مولار (که تابع ساختار شیمیایی ماده ی جاذب می باشد)، L طول مسیر عبور نور یا ضخامت مادهٔجاذب، C غلظت مادهٔ جاذب، I شدت نور تابیده‌شده و I شدت یا توان نور منتقل شده است. برطبق این رابطه میزان جذب در یک فرکانس مشخص، مستقیماً متناسب با غلظت ماده و طول آن است. نسبت دامنهٔ فرکانس یا ولتاژ بدست آمده توسط سری فوریه متناسب است با نسبت شدت قبل و بعد از برخورد با نمونه می‌باشد. با داشتن ضریب جذب مولار DNA و طول سلول حاوی نمونه ی DNA می توان غلظت نمونهٔ DNA را تعیین نمود.

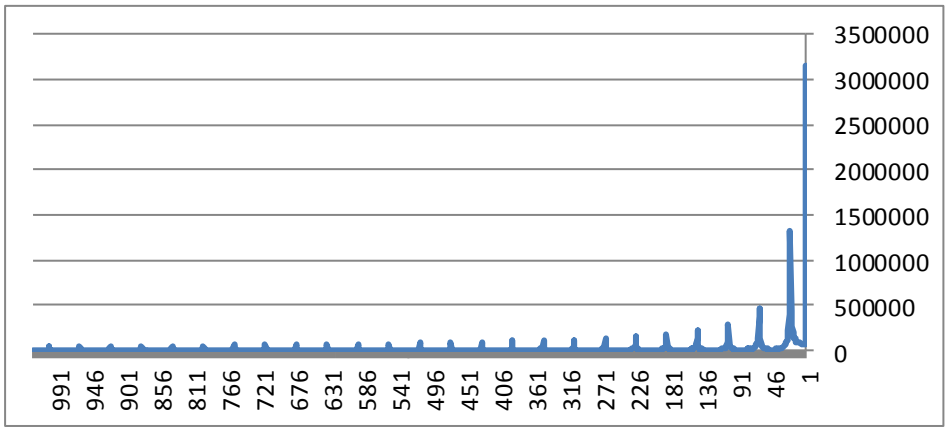
نتایج و بحث

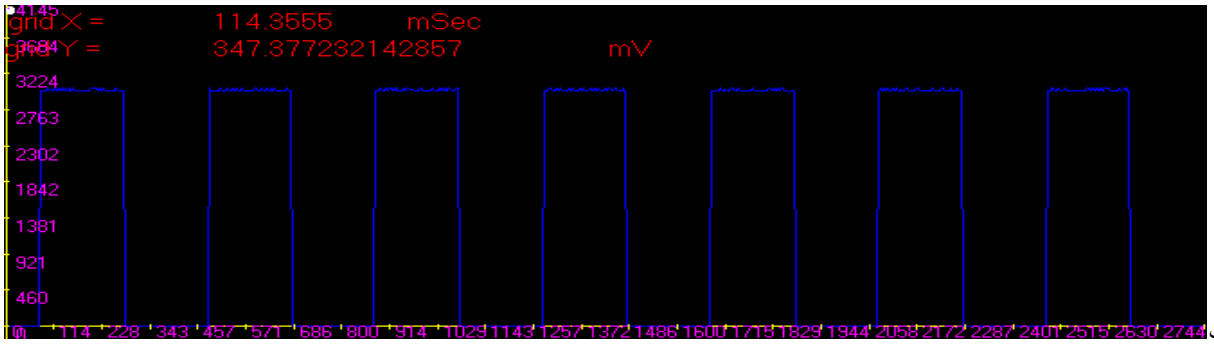
همان‌طور که بیان شد DNA رنگ آمیزی شده با مولکول رنگ سایبرگرین از نوع ۵۸ که از سلول های گیاهی استخراج شده است، دارای ضریب مولار ۰/۲ و غلظت ۴۴۰ میکرومولار می‌باشد. با قرار دادن پارامترهای I=۱۳۰۰۰۰۰ ، I_0=۱۴۰۰۰۰۰ ، ε=۰/۲ و $L =$ ۰/۳۶۵mm و با جایگزاری در فرمول $A = \log\frac{1}{T} = \log\frac{I_0}{I} = -\varepsilon cL$ ؛ μm ۴۴۰.۸۹ =c به‌دست می آید.



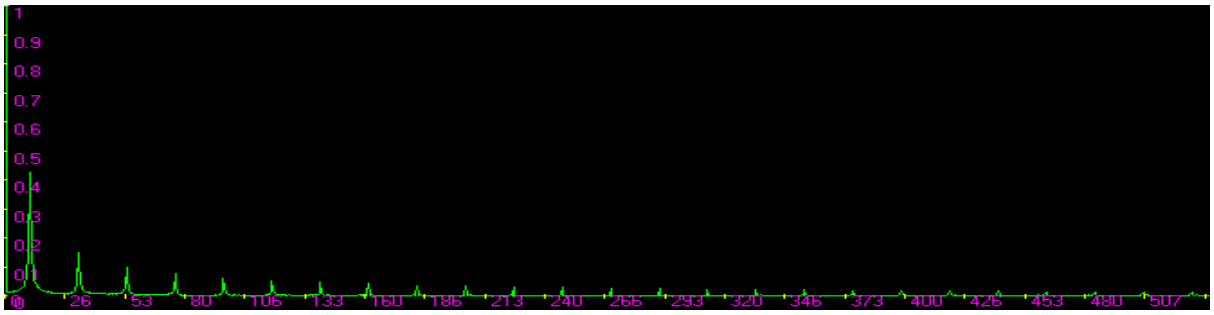


[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.7.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.312]





ب

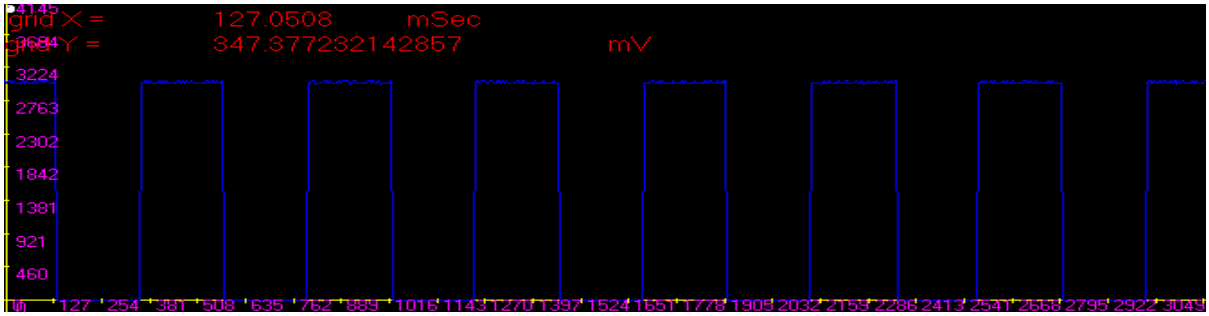


شکل ۴- نمودار طیف ولتاژ بر حسب زمان و دامنهٔ ولتاژ حالت الف) بدون ماده، ب) با ماده.

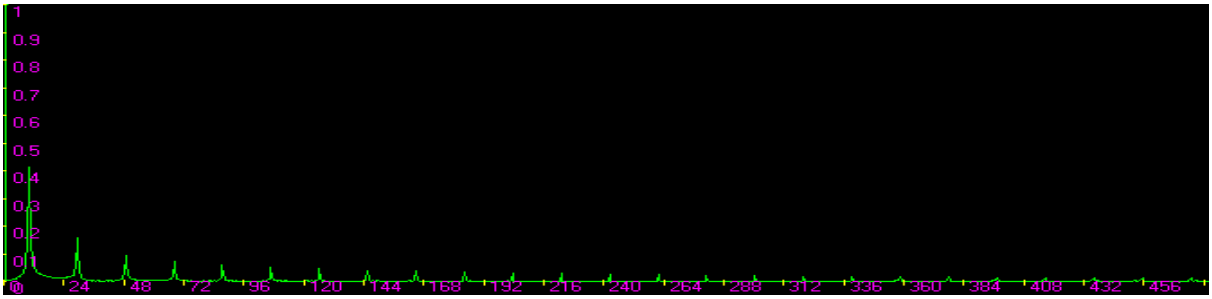
Fig. 4. The plot of voltage spectrum versus of time and amplitude for (a) without sample and (b) with sample.

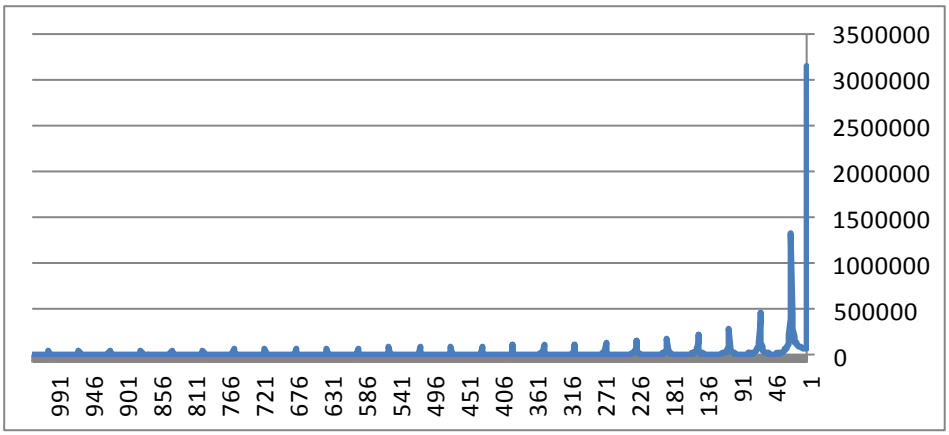
در ادامه DNA رنگ‌آمیزی شده با مولکول رنگ سایبر گرین از نوع d۶ که از سلول‌های گیاهی استخراج شده است، دارای ضریب مولار ۲/. و غلظت ۱۸۴میکرومولار می‌باشد.۱۳۵۷۴۰۰= I، ۱۴۰۰۰۰۰ =I_0، ۰.۲ =ε و ۳۶۵mm/. = L و با جای‌گذاری در فرمول $A = \log\frac{1}{T} = \log\frac{I_0}{I} = -\varepsilon cL$؛ c= ۱۸۳/۳۸ μm به دست می‌آید.

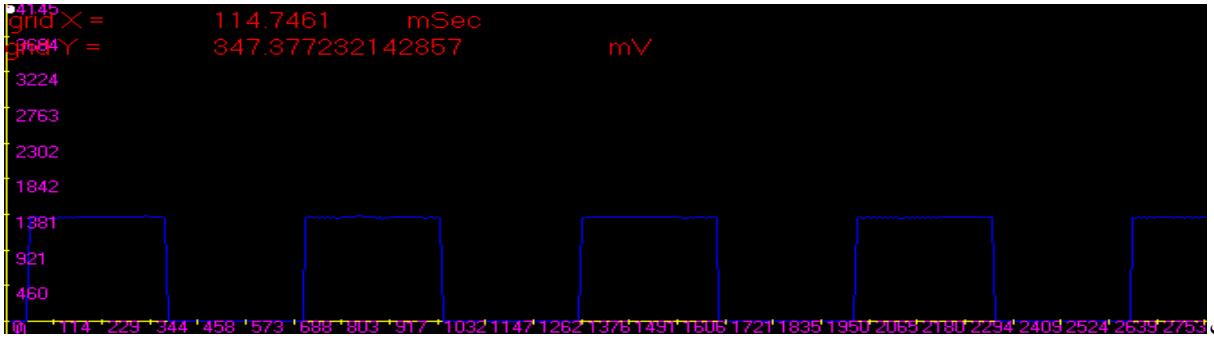
[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.7.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.312]



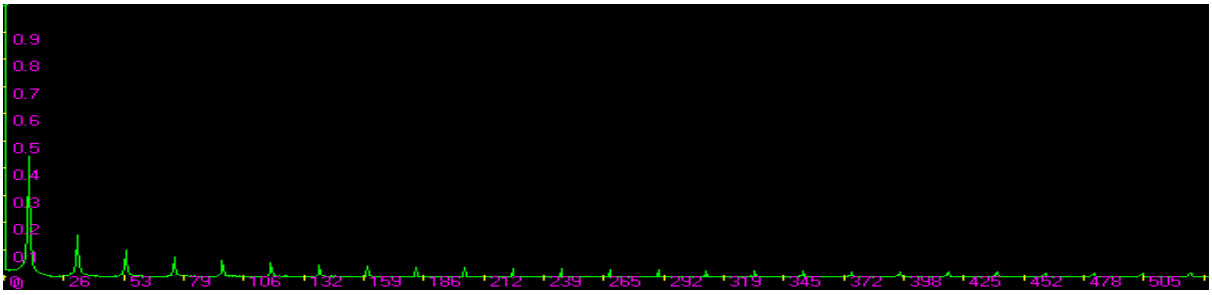
الف



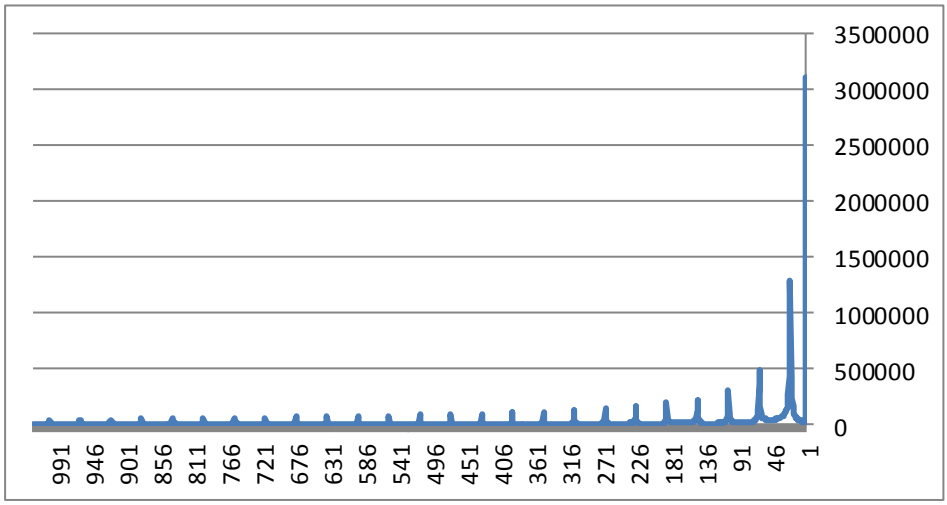




ب



[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.7.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.312]

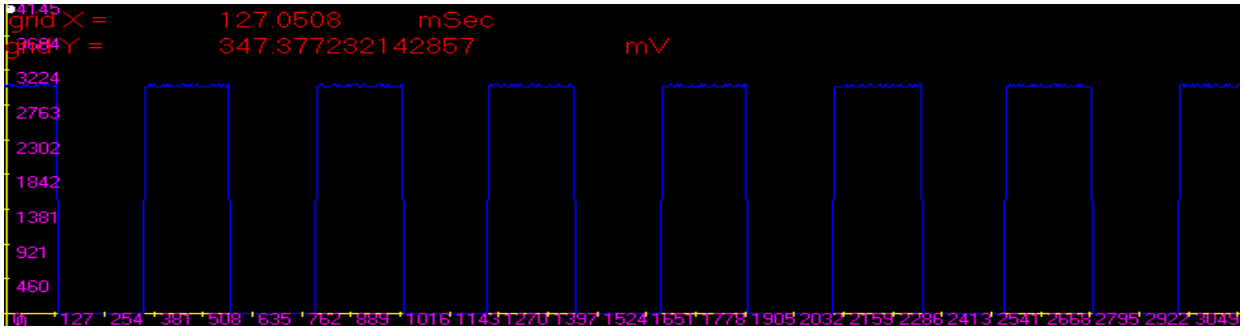


شکل ۵- نمودار طیف ولتاژ برحسب زمان و دامنهٔ ولتاژ حالت الف) بدون ماده، ب) با ماده.

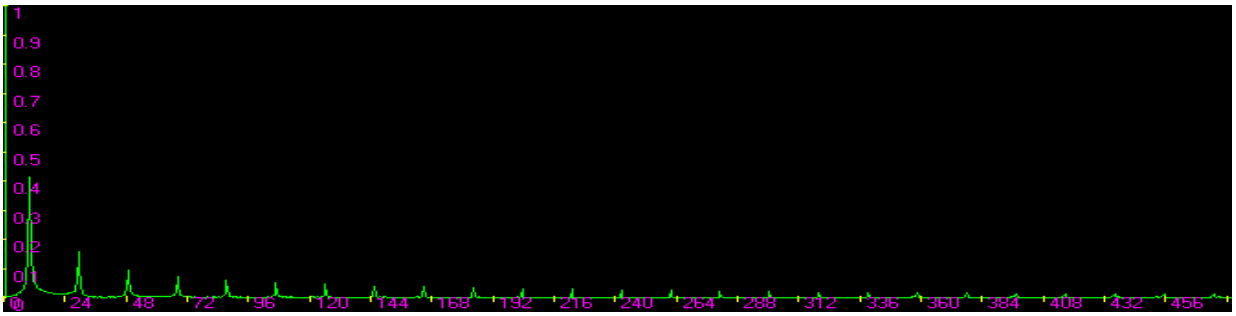
Fig. 5. The plot of voltage spectrum versus of time and amplitude for (a) without sample and (b) with sample.

در نهایت نیز DNA رنگ‌آمیزی شده با مولکول رنگینه سایبرگرین از نوع مولوئیکا که از سلول‌های گیاهی استخراج شده است، می‌باشد که دارای ضریب مولار ۰/۲ و غلظت ۲۱۲ میکرومولار می باشد. I=۱۳۵۱۰۰۰ ، I_0 =۱۴۰۰۰۰۰، ε=۰/۲

و $L =$ ۰/۳۶۵mm و با جای‌گزاری در فرمول $A = \log\frac{1}{T} = \log\frac{I_0}{I} = -\varepsilon c L$؛ c= ۲۱۱.۹۵ μm به‌دست می‌آید.

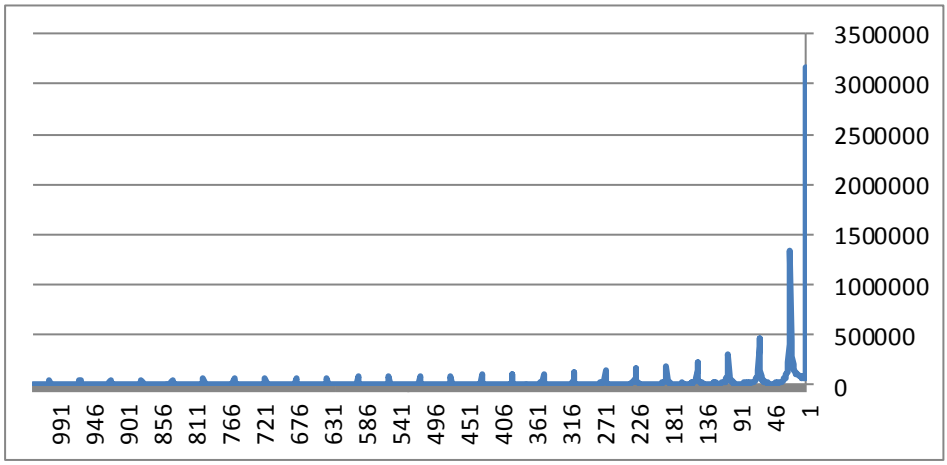


الف

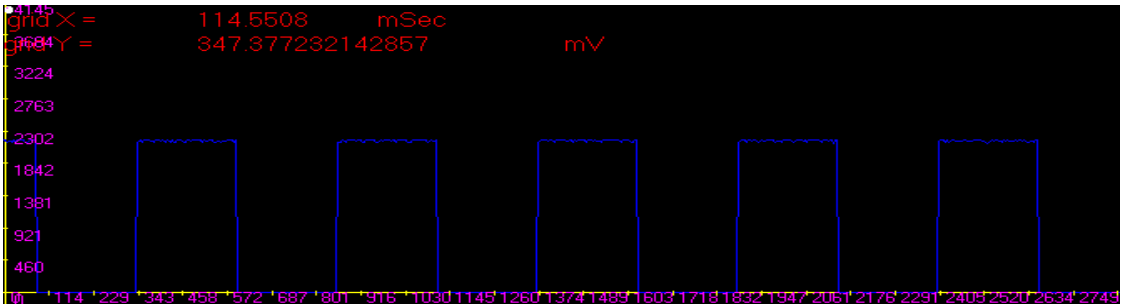


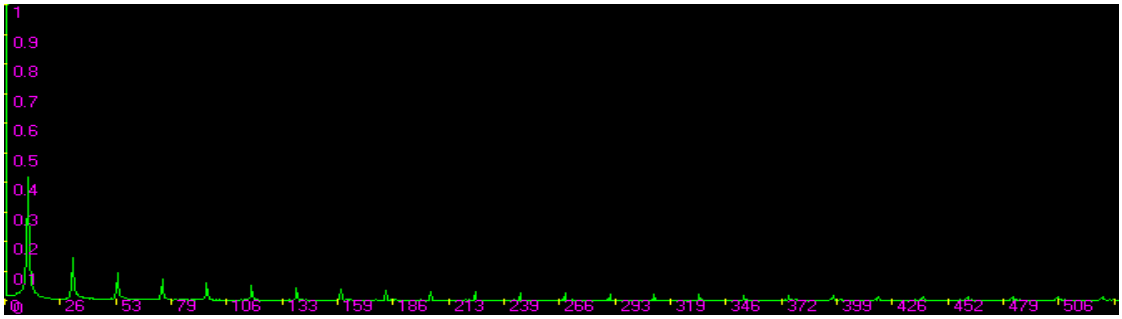
[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.7.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.312]

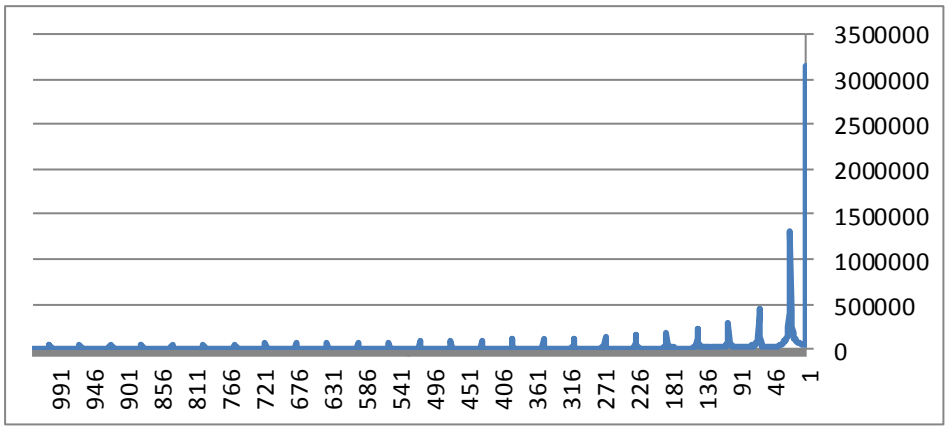
[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.7.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.312]



ب.







شکل ۶- نمودار طیف ولتاژ برحسب زمان و دامنهٔ ولتاژ حالت الف) بدون ماده، ب) با ماده.

Fig. 6. The plot of voltage spectrum versus of time and amplitude for (a) without sample and (b) with sample.

نتیجه‌گیری نهایی

در این پروژه طیف‌نگاری طراحی و ساخته شد که از نور LED برای تحریک نمونه ها استفاده می‌کند که بسیار ارزان قیمت‌تر و کاراتر از نمونه‌های مشابه می‌باشد. غلظت DNA را می‌توان به صورت مستقیم یا با استفاده از نمودارهای استاندارد تعیین کرد که در تشخیص تفاوت DNAهای سلول‌های مختلف به عنوان مثال DNAهای سالم و بیمار و کنترل کیفی DNA و سنجش میزان بیان ژن و اندازه‌گیری میزان آسیب به DNA و کاربردهای بسیار دیگر کاربرد دارد.

References

Alberti, P. and Mergny, J.L. 2003. DNA duplex-quadruples exchange as the basis for a nanomolecular machine. – PNAS 100: 1569-1573.

Heller, M.J. and Morrison, L.E. 1985. In Rapid detection and identification of infectious agents. – Academic Press, New York. pp: 245-256.

Mao, C., Sun, W., Shen, Z. and Seeman, N.C. 1999. A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA. – Nature 297: 144-146.

Niemeyer, C. and Adler, M. 2002. Nanomechanical devices based on DNA. – Angew. Chem. Int. Ed. 41: 3779-3783.

Simmel, F.C. and Yurke, B. 2002. A DNA-based molecular device switchable between three distinct mechanical states. – Appl. Phys. Lett. 80: 883-885.

Smith, S.B., Finzi, L. and Bustamante, C. 1992. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. – Science 258: 1122-1126.

Stryer, L. and Haugland, R.P. 1967. Energy transfer: a spectroscopic ruler. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58: 719-726.

Yan, H., Zhang, X., Shen, Z. and Seeman, N.C. 2002. A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology. – Nature 415: 62-65.

Yurke, B., Turberfield, A.J., Mills, Jr., A.P., Simmel, F.C. and Neumann, J.L. 2000. A DNA fuelled molecular machine made of DNA. – Nature 406: 605-608.

*****

Hashemi, S.M., Salmani, S. and Majles Ara, M.H. 2016. DNA structure spectroscopy by synthetic pigments using LED lighting. – Nova Biologica Reperta 2: 312-321.

هاشمی، س.م.، سلمانی، س. و مجلس‌آرا، م.ح. ۱۳۹۴. طیف نگاری ساختار DNA به کمک رنگدانه‌های مصنوعی با استفاده از نور LED. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۲: ۳۲۱-۳۱۲.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.7.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.312]