مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم، شماره بیست و دو - بهار ۱۳۹۵

Research Article
مقاله تحقیقی

تشخیص بیومارکرهای miRNA با استفاده از نانوذرات طلا

مهسا مختاری[۱]، مهدی ارجمند[۲*]، مهدی رهایی جهرمی[۳]، علیرضا نیک فرجام[۴]

۱. گروه مهندسی گروه بیوتکنولوژی ، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۲. گروه مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
۳. گروه علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران
۴. گروه مهندسی سیستم و مکاترونیک، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران

چکیده

سابقه و هدف: کشف اخیر راجع به اینکه "بیان miRNA در بیش تر مواقع در سرطان دچار تغییر می‌شود" و از آنجایی که امروزه سرطان دومین عامل مرگ و میر انسان ها در جوامع بشری است، مسیر جدیدی از تحقیقات را باز نموده است. در چندین سال گذشته، از رویکرد بسیار متفاوتی نسبت به توسعه انواع روش های مختلف تشخیص بیومارکرهای miRNA استفاده شده است. به طور که در طول دهه گذشته پیشرفت‌های زیادی در استفاده از روش‌های نانو جهت تشخیص مولکولی حاصل شده است.

مواد و روش ها: برای تهیه نانوذره های طلا، نسبت مشخصی از سدیم سیترات و $HAuCl_4 3H_2O$ با یکدیگر ترکیب نموده. میانگین قطر نانوذره های طلا با استفاده از دستگاه زتا سایزر محاسبه شد. سپس نسبت های مشخصی اولیگونوکلئوتید به نانوذرات اضافه نموده و نانوپروب ساخته شده در معرض توالی هدف قرار گرفت و نواسانات پلاسمون سطحی با استفاده از دستگاه طیف سنج مرئی-فرابنفش بررسی گردید.

یافته ها: میانگین قطر نانوذرات طلای سنتز شده با کمک دستگاه زتا سایزر اندازه گیری شد که ۲۰ نانومتر به دست آمد. غلظت بهینه اولیگونوکلئوتید برای اتصال به نانوذرات با استفاده از دستگاه طیف سنج مرئی-فرابنفش حدود pM ۵ به دست آمد. حد تشخیص این روش برای miRNA سنتز شده تک رشته ای با طول mer ۲۳، در حدود pM ۵ می باشد.

نتیجه گیری: این بررسی نشان داد، تهیه نانوذرات طلا با استفاده از روش کاهش سیترات جهت تشخیص بیومارکرهای miRNA با استفاده از خاصیت SPR نانوذرات طلا میسر می باشد.

کلمات کلیدی: سرطان، بیومارکر، ، نانوذرات طلا

مقدمه

MicroRNAها یا (miRNAs) مولکول های RAN کوچکی هستند با طولی حدود ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتید که قادر به تعدیل و اصلاح ژن ها در گیاهان و حیوانات می باشند.(۱۳) .

اولین بار در سال ۱۹۹۳ در کرم نماتود سی الگانس (Caenorhabditis elegans)، ژن یک ریز RNA به نام lin-4 گزارش شد که به mRNA سازنده lin-4 متصل می شود و موجبات مهار ترجمه این mRNA را فراهم می آورد.

سپس، در سال ۲۰۰۰، *Ruvukun* و همکارانش یک ریز RNA دیگر به نام Let-7 را در همان کرم شناسایی کردند. گفتنی است که توالی Let-7 از کرم تا پستانداران حفظ شده و ثابت باقی مانده است. این ریز RNAها به عنوان تنظیم کننده های زمان رشد و نمو سلولی عمل می کنند. گروه *Ruvukun*، به نحو گسترده ژن های هم ساخت Let-7 را در جانوران دیگر از جمله موش و انسان کشف کردند(۱۲،۲).

تا به امروز، چندین روش برای تشخیص miRNAها کشف شده است. از جمله آنالیز Northern blot با پروب برچسب دار (۴،۱،۱۰) Microarray-based، روش PCR (۱۵،۳) می باشد. با این وجود هیچ یک از این روش ها کامل نبوده و هر کدام دارای محدودیت هایی می باشند. بنابراین انتخاب مناسب ترین روش برای تشخیص miRNA به طور عمده به زمینه تجربی خاصی بستگی دارد(۱۶). با این وجود، روش ایده آل آنالیز miRNA باید دارای چندین خصوصیت باشد:

مسئول نویسنده: گروه مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
پست الکترونیکی: mrahaiee@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۰۹

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.4.9]

- برای آنالیز کمی miRNA حتی با مقادیر کم مواد برای آزمایش، به اندازه کافی حساس باشد
- به اندازه کافی specific بوده تا تفاوت های تک نوکلئوتیدی بین miRNAها را تشخیص دهد
- باید قادر به پردازش نمونه های متعدد به صورت موازی باشد
- و سرانجام، باید روش انجام آزمایش ها ساده بوده و نیازی به تجهیزات و امکانات گران قیمت نباشد

در چندین سال گذشته، از روی کرد بسیار متفاوتی نسبت به توسعه انواع روش های مختلف تشخیص miRNA استفاده شده است. اکثر روش های تشخیصی نیاز به دانش قبلی از miRNAها دارد.

این روش ها را می توان در فاز محلول (هیبریداسیون در محلول صورت می گیرد)، فاز جامد (پروب برای هیبریداسیون بر روی یک سطح جامد قرار می گیرد) و روش های هیبریداسیون in situ، تقسیم بندی کرد(۸،۱۰.) روش هایی که در فاز محلول استفاده می شوند، روش های آنالیز سریع تری می باشند، در حالی که روش هایی که در فاز جامد صورت می گیرند به طور کلی برای تجزیه و تحلیل با توان بالا مورد استفاده قرار می گیرند.

این روش ها دارای حساسیت تشخیص پایین بوده و نیز نیاز به تعداد مراحل زیادی دارند، در نتیجه روش های وقت گیر و پر زحمت بوده است که برای تجزیه و تحلیل معمول miRNA دشوار می باشند. بنابراین، برای اندازه گیری سریع پروفایل های بیان و تشخیص miRNAها، به طور قابل توجهی سرعت و حساسیت مهم می باشد. علاوه بر این، پیشرفت های اخیر در فناوری نانو طراحی بیوسنسور و تولید انواع نانو ابزارها را برای اهداف بیولوژیکی میسر کرده است. بنابراین، از نانوذرات طلا (GNPs) به طور گسترده در استفاده از بیوسنسورها برای کاربردهای تشخیصی به دلیل شکل، اندازه و خواص نوری که رزونانس پلاسمون سطحی SPR) (را موجب می شود، استفاده می گردد. ترکیب نانوذرات طلا با اولیگونوکلئوتید برای ساخت نانوبیوسنسورها، امروزه توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در این مطالعه، با استفاده از اتصال نانوذرات طلا به اولیگونوکلئوتیدها و استفاده از خاصیت SPR آن ها، به تشخیص miRNA مصنوعی با غلظت کم و حساسیت بالا پرداخته شد.

مواد و روش ها

مواد

DTT، تتراکلروآئوریک اسید($HAuCl_4 3H_2O$)، پودر HEPES و سدیم سیترات که از شرکت سیگما خریداری گردیدند. پروب الیگونوکلئوتید با طول ۳۱ نوکلئوتید و miR10-b و توالی غیر مکمل که از شرکت BIONEER خریداری گردید.

سنتز نانوذره طلا

روش سنتز به روش *Turkovich* انجام شده است. مقدار ۲ میلی لیتر محلول ۳۹ mM سدیم سیترات را به ۲۰ میلی لیتر از محلول ۱ mM نمک طلا $HAuCl_4 3H_2O$ که در حال جوشیدن است اضافه گردیده شد. این فرآیند به مدت ۱۵ دقیقه به طول انجامید.

ساخت نانوپروب

قبل از ساخت نانوپروب ابتدا باندهای دی سولفیدی تشکیل شده در انتهای اولیگونوکلئوتیدها که به علت وجود گروه تیول(گروه های سولفور دار) می باشد، احیا شدند و برای این کار از محلول DTT ،N1 استفاده شد.(۹)

سپس ۶۰ میکرولیتر بافر HEPES یک میلی مولار را به ۸۰ میکرولیتر اولیگونوکلئوتید اضافه شد. به طور تقریبی ۵-۱۰ دقیقه زمان داده شد تا نمونه ها در دمای اتاق انکوبه شوند. سپس ۴۰۰ میکرولیتر نانوذره طلا به استوک اضافه گردید. برای افزایش راندمان ساخت نانوپروب از محلول ۰/۰۲ مولار NaCl استفاده شد. به این صورت که ابتدا نیمی از محلول NaCl را اضافه کرده سپس ویال حاوی نانوذره طلا و اولیگونوکلئوتید را به مدت ۲۰-۳۰ ثانیه درون دستگاه اولتراسونیک قرار داده. پس از آن محلول به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید، سپس باقی مانده محلول NaCl را داخل ویال ریخته و دوباره محلول حاصل سونیکیت گردید. سپس ویال محتوی نانوپروب ساخته شده را به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت را از محیط خارج کرده و به رسوبات ته ویال بافر HEPES اضافه شد.(۱۴،۷)

بررسی واکنش نانوپروب با توالی هدف

پس از ساخت نانو پروب ها نوسان های پلاسمون سطحی نانوپروب ها پس از میان کنش با غلظت های مختلف توالی مکمل مورد بررسی قرار گرفته و با حالت آزاد مقایسه شدند. لذا غلظت های pM ۵، pM ۱ و fM ۵۰۰ از توالی هدف تهیه شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد برای هیبریداسیون با نانوپروب های با غلظت pM ۵ زمان داده شد. در این آزمایش می توان به غلظتی از توالی مکمل که باعث تجمع نانوپروب می شود دست یافت. لازم به ذکر است که نانوذره های طلا با داشتن نوسان های پلاسمونیک بسیار حساس قادر خواهند بود که با دقت بالایی به شناسایی توالی هدف بپردازند. لذا در غلظت پایین توالی هدف نیز، تغییرهای کامل مشهودی در طیف جذبی پروب اتفاق می افتد.

اختصاصیت نانوپروب

اختصاصیت نانوپروب به معنای قدرت تشخیص اختصاصی توالی هدف و عدم اتصال به توالی غیر هدف می باشد. قدرت تشخیص نانوپروب، به توالی خاص آن بستگی دارد. لذا بدین منظور توالی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.4.9]

غیر اختصاصی طراحی شد تا این فاکتور مورد بررسی قرار گیرد. در واقع، این فاکتور یکی از مهم ترین عواملی است که برای کاربردی نمودن نانوپروب حائز اهمیت می باشد. بدین منظور، نوسان های پلاسمون سطحی نانوپروب در حضور توالی غیر مکمل با غلظت ۵ pM مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

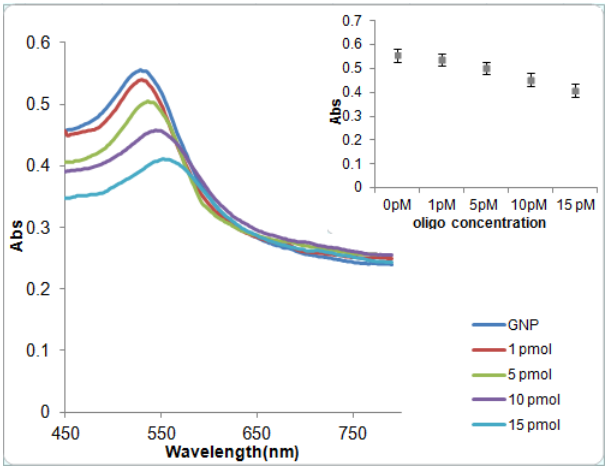
تعیین اندازه نانوذرات

تعیین اندازه نانوذرات با استفاده از دستگاه زتاسایزر (مدل Malvern Instruments Ltd) انجام شده و میانگین سایز ذرات حدود ۲۰ nm گزارش گردید.

ساخت نانوپروب

برای ساخت نانوپروب با افزودن اولیگونوکلئوتید با غلظت های ۱, ۵, ۱۰و ۱۵ pM به نانوذره طلا، کاهش در میزان جذب نانوذره و نیز تمایل طیف جذبی به سمت طول موج های قرمز با استفاده از دستگاه طیف سنج مرئی-فرابنفش (مدل UV- PG INSTRUMENT T60 Vis) مورد بررسی قرار گرفت.

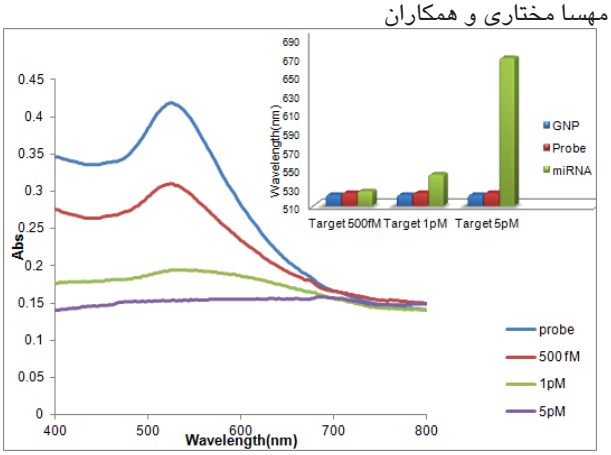
در غلظت های بالا، کاهش نوسان های پلاسمونیک آن قدر زیاد است که حساسیت نانوبیوسنسور را پایین آورده و آن را به سمت تجمع غیراختصاصی سوق می دهد. بنابراین غلظت بهینه اولیگونوکلئوتید برای میان کنش با نانوذره ۵ pM می باشد.



شکل۱: طیف UV-Vis حاصل از اتصال اولیگونوکلئوتید به نانوذره طلا و بهینه سازی غلظت اولیگونوکلئوتید

واکنش نانوپروب با توالی هدف

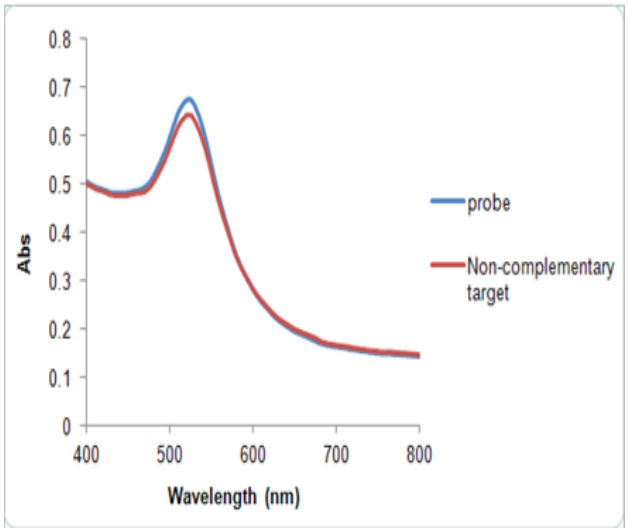
نوسان های پلاسمونیک نانوپروب در حضور غلظت های مختلف توالی هدف نشان داده با افزایش غلظت توالی مکمل طیف جذبی نانوساختار با روند منظمی کاهش یافته است که در مورد نوسان های پلاسمون سطحی نانوپروب به وضوح مشخص است. در غلظت های بالای ۱ pM از توالی هدف پدیده تجمع غیر اختصاصی نانوپروب به تدریج آغاز شد که در غلظت ۵ pM از آن به طور واضح مشهود است.



شکل۲: طیف UV-Vis حاصل از تشخیص توالی هدف

اختصاصیت نانوپروب

به منظور نشان دادن اختصاصیت نانوپروب، در حضور توالی های مکمل و غیر مکمل پروب، به بررسی تغییر های رخ داده در طیف جذبی پرداخته شد. در حضور توالی غیرمکمل تغییر های چندانی در طیف جذبی نانوپروب اتفاق نیفتاده است. کاهش بسیار کم طیف جذبی نانوپروب در حضور توالی غیرمکمل را می توان به اتصال فیزیکی و غیراختصاصی الیگونوکلئوتیدها روی سطح نانوساختارهای طلا نسبت داد. این در حالی است که در حضور توالی مکمل، نوسان های پلاسمونیک نانوپروب به طور کامل تحت تاثیر قرار گرفت.



شکل۳: طیف UV-Vis حاصل از تشخیص توالی غیر مکمل

بحث

در سال های اخیر استراتژی های مختلفی جهت تشخیص miRNA ها با استفاده از نانوذرات توسعه داده شده است. تمام این روش ها روش های مستقیم بوده. در سال های اخیر تعدادی از روش های مبتنی بر نانوتکنولوژی بر پایه ی روش های الکتریکی ارائه شده است.

در سال ۲۰۰۵ *Gao Z.* و *Yang Z.* با استفاده از تگ های نانوذرات الکتروکاتالیتیک که بر اساس تقویت شیمیایی با استفاده از یک

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.4.9]

الکترود اکسید قلع ایندیوم و برچسب نانوذرات OsO_2 می باشد. در این روش ابتدا miRNA با سدیم پریودات اکسید شده سپس بر روی الکترود فرآیند هیبریداسیون با پروب DNA رخ می دهد. سپس سیگنال از طریق واکنش miRNA با نانوذرات OSO_2 تقویت می شود. با این روش می توان مقدار fM ۸۰ از مقدار miRNA را تشخیص داد. این روش برای آنالیز و تشخیص mir-106 و mir-139 در Total RNA استخراج شده از سلول استفاده شده است.(۱۷)

همان گروه در سال ۲۰۰۷ روش دیگری را برپایه ی روش های شیمیایی بر اساس پلت فرم میکروسکوپی ساخته شده با طلا و میکروالکترودهای تیتانیوم که چاهک هایی در میان آن تعبیه شده بود، توسعه دادند. در این روش پروب های نوکلئیک اسید به صورت شیمیایی داخل این چاهک ها ثابت می شوند و هیبریداسیون با miRNAها اتفاق می افتد. به این ترتیب میزان هدایت نانوسیم ها ارتباط مستقیم با مقدار miRNA هیبرید شده با پروب دارد. با استفاده از Total RNA استخراج شده از سلول های سرطانی، miRNA هدف در محدوده fM ۱۰ تا pM ۲۰ اندازه گیری شده است(۶)

در سال ۲۰۰۶ *Fang* و همکارانش روشی را برای تشخیص miRNA ها بر اساس SPRI به کار بردند. آن ها در این روش، به توصیف روشی جدید برای شناسایی miRNAها در میکروآرایه های LNA با غلظت fM ۱۰ و با استفاده از تکنیک تصویربرداری رزونانسی پلاسمون سطحی (SPRI) پرداختند. این متدولوژی ترکیبی از ماهیت شیمیایی آنزیم های سطحی پلی(A) و سنجش های SPRI نانوذرات- تقویت شده را به کار می گیرد. این متدولوژی فوق حساس در تعیین غلظت های miRNA ها در یک نمونه کل RNA از بافت کبد موش مورد استفاده قرار گرفت(۵).

به منظور استفاده از یک روش با حساسیت بالا که نیازی به ابزار های پیچیده و گران قیمت نداشته باشد، *Yang* و همکارانش یک روش کالریمتریک بر اساس نانوذرات طلا ارائه دادند. در این روش به دو پروب نیاز است، پروب بیوتینه شده و پروب نانوذرات طلا که به miRNA هدف هیبرید می شود. سپس ترکیب این دو بر روی میکروپلیت هایی که با streptavidin پوشانده شده اند، جذب می شوند و سیگنال نانوذرات جذب شده با استفاده از رنگ جذب شده توسط میکروپلیت خوانده می شود.

با این روش، miR-122a/miR-128 در Total RNA استخراج شده از مغز موش و بافت کبد تشخیص داده شد و miRNA -122a با حد تشخیص fM ۱۰ و یا ۲نانوگرم از Total RNA محاسبه شد(۱۸)

روشی که این پژوهش برای تشخیص miRNAها استفاده شد مبتنی بر نانوتکنولوژی بوده و در فاز مایع می باشد. و با توجه به نتایجی که به دست آمد این روش، در مقایسه با روش های ذکر شده یک روش کاربردی با هزینه عملیاتی به طور نسبی پایین و با دقت تشخیص در حد pM ۵ در نمونه سنتز شده می باشد.

سپاسگزاری

تمامی مراحل آزمایشگاهی در آزمایشگاه نانو و علوم زیستی دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران انجام شده است. بدین وسیله از استاد ارجمند جناب آقای دکتر مهدی رهایی جهرمی که با تمام وجود همکاری لازم را داشته اند، تقدیر و تشکر به عمل می آید.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.4.9]

منابع

1. A. Valoczi, C. Hornyik, N. Varga, J. Burgyan, S. Kauppinen, Z. Havelda, Nucleic Acids Res 32 (2004) e175.
2. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004; 116: 281-97.
3. C. Chen, D.A. Ridzon, A.J. Broomer, Z. Zhou, D.H. Lee, J.T. Nguyen, M. Barbisin,N.L. Xu, V.R. Mahuvakar, M.R. Andersen, K.Q. Lao, K.J. Livak, K.J. Guegler,Nucleic Acids Res 33 (2005) e179.
4. E. Varallyay, J. Burgyan, Z. Havelda, Nat Protoc 3 (2008) 190–196.
5. Fang, S.P.; Lee, H.J.; Wark, A.W.; Corn, R.M. Attomole microarray detection of MicroRNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 14044-14046.
6. Fan, Y.; Chen, X.T.; Trigg, A.D.; Tung, C.H.; Kong, J.M.; Gao, Z.Q. Detection of microRNAs using target-guided formation of conducting polymer nanowires in nanogaps. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 5437-5443.
7. Gao, Z.; Yang, Z. Detection of MicroRNAs Using Electrocatalytic Nanoparticle Tags. Anal. Chem. 2006, 78, 1470-1477.
8. G. Nuovo, E.J. Lee, S. Lawler, J. Godlewski, T. Schmittgen, Biotechniques 46 (2009) 115–126.
9. Hill, Haley D., and Chad A. Mirkin. "The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange." Nature Protocols 1.1 (2006): 324-336.
10. L.A. Neely, S. Patel, J. Garver, M. Gallo, M. Hackett, S. McLaughlin, M. Nadel, J.Harris, S. Gullans, J. Rooke, Nat Methods 3 (2006) 41–46.
11. L.A. Neely, S. Patel, J. Garver, M. Gallo, M. Hackett, S. McLaughlin, M. Nadel, J.
12. Harris, S. Gullans, J. Rooke, Nat Methods 3(2006) 41–46.
13. Noori-Daloii MR, Alvandi E. Micro RNA: small but full of mystery and use. Journal of Tehran University of Medical Science 2006; 64: 5-18.
14. Noori-Daloii MR, Jalilian N. Applications of comparative genomic hybridization in cancer and genetic disorders: a review. Tehran Univesity Medical Journal 2010; 68: 1-11.
15. Sambrook, J., T. Maniatis and E. F. Fritsch. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
16. S. Fang, H.J. Lee, A.W. Wark, R.M. Corn, J Am Chem Soc 128 (2006) 14044–14046.
17. Takada, Shuji, and Hiroyuki Mano. "Profiling of microRNA expression by mRAP." Nature protocols 2.12 (2007): 3136-3145.
18. Taton, T. Andrew. "Preparation of gold nanoparticle–DNA conjugates." Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry (2002): 12-2.
19. Yang, W.-J.; Li, X.-B.; Li, Y.-Y.; Zhao, L.-F.; He, W.-L.; Gao, Y.-Q.; Wan, Y.-J.; Xia, W.; Chen, T.; Zheng, H.; Li, M.; Xu, S.-q. Quantification of microRNA by gold nanoparticle probes. Anal. Biochem. 2008, 376, 183-18

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.4.9]

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.4.9]