Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2):313-319

Design and Synthesis of DNA-Templated Silver Nanoclusters for Recognition of microRNA-103

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Ahmadi E.[1] *MSc,*
Barghaii Y.S.[1] *PhD,*
Hoseini S.M.*[1] *PhD*

How to cite this article
Ahmadi E, Barghaii Y.S, Hoseini S. M. Design and Synthesis of DNA-Templated Silver Nanoclusters for Recognition of microRNA-103. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2): 313-319.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are single-stranded RNAs that play key roles in cellular disorders or disease diagnosis. Thus the method for sensitive and selective detection of miRNAs is imperative to clinical diagnosis. Recently it has witnessed the rapid development of Metal Nanocluster-Based fluorescent probe design and its successful applications in detecting various targets, such as ssDNA, miRNA and Metal Ions. The DNA scaffolded Metal nanoclusters display excellent photostability, subnanometer size, nontoxicity, biocompatibility and thus well-suited as a fluorescent probe for biochemical applications. Here we develop a DNA/Metal Nanoclusters (MNCs)-based turn-on fluorescence method in the presence of target microRNAs as a potential biomarker for screening cancer. DNA scaffold Metal nanocluster was fabricated by a one-pot wet-chemical strategy and characterized by TEM and DLS techniques. This nanobisensor had a detection limit of 0.64pM. Conclusion, this nanobiosensors could become a potential alternative tools for detection of miRNAs in biological samples and useful in biomedical research and early clinical diagnosis.

Keywords Fluorescence; Nanobisensor; DNA-Templated Silver Nanoclusters; MicroRNA

[1]Life Science Engineering Department, New Sciences & Technologies Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

Correspondence
Address: New Sciences & Technologies Faculty, North Kargar Street, Tehran, Iran. Postal Code: 1439957131
Phone: +98 (21) 86093198
Fax: +98 (21) 88497324
hosseini_m@ut.ac.ir

Article History
Received: November 22, 2017
Accepted: January 4, 2018
ePublished: June 20, 2019

CITATION LINKS

[1] Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [2] Oncomirs - microRNAs with a role in cancer [3] Electron transfer mediated electrochemical biosensor for microRNAs detection based on metal ion functionalized titanium phosphate nanospheres at attomole level [4] Rapid and sensitive detection of multiple microRNAs in cell lysate by low-fouling surface plasmon resonance biosensor [5] Fluorescent silver nanoclusters stabilized by DNA scaffolds [6] Towards understanding of poly-guanine activated fluorescent silver nanoclusters [7] Ultrasensitive and universal fluorescent aptasensor for the detection of biomolecules (ATP, adenosine and thrombin) based on DNA/Ag nanoclusters fluorescence light-up system [8] Cancer and prevention ways. Tehran: Gooya House of Art and Culture; 2013 [9] Lack of association between human papillomavirus infection and colorectal cancer [10] Challenges for biomarkers in cancer detection [11] Identification and validation of potential biomarkers for the detection of dysregulated microRNA by qPCR in patients with colorectal adenocarcinoma [12] A plasma microRNA panel for early detection of colorectal cancer [13] The role of miR-103 and miR-107 in regulation of CDK5R1 expression and in cellular migration [14] Oligonucleotide-stabilized Ag nanocluster fluorophores [15] A novel label-free microRNA-155 detection on the basis of fluorescent silver nanoclusters [16] High-yield synthesis of silver nanoclusters protected by DNA monomers and DFT prediction of their photoluminescence properties [17] MicroRNA: Function, detection, and bioanalysis

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

طراحی و سنتز نانوخوشه‌های نقره بر پایه داربست DNA در تشخیص microRNA-103

الناز احمدی MSc
گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
یاسمن‌السادات برقعی PhD
گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
سیدمرتضی حسینی* PhD
گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده
میکروRNAها ریبونوکلئیک‌اسیدهای تک‌رشته‌ای هستند که نقش‌های مهمی در فرآیندهای طبیعی سلول‌ها دارند و در برخی بیماری‌ها میزان بیان آنها تغییر می‌کند، در نتیجه می‌توان از آنها برای تشخیص بیماری‌ها استفاده کرد. بنابراین روش‌هایی برای شناسایی دقیق و حساس آنها ضروری است. در سال‌های اخیر، طراحی پروب‌های فلورسنت مبتنی بر نانوخوشه‌های فلزی و کاربرد موفق آنها در تشخیص هدف‌های مختلف همچون miRNA، ssDNA و یون‌های فلزی، توسعه یافته است. نانوخوشه‌های فلزی بر پایه داربست DNA دارای ویژگی‌هایی همچون پایداری نوری عالی، اندازه کمتر از نانومتر، سمیت کم و زیست‌سازگاری هستند؛ بنابراین گزینه مناسبی برای مطالعات زیستی هستند. در این پروژه برای اولین‌بار از نانوخوشه‌های نقره مبنی بر DNA استفاده شده است که در حضور توالی هدف (miR_103) که بیومارکری برای تشخیص زودهنگام سرطان روده بزرگ است، نشر آنها افزایش یافت. نانوخوشه‌ها به روش کاهش شیمیایی تولید شدند و خصوصیات آنها با تکنیک‌های تصویربرداری الکترونی عبوری (TEM) و پراکندگی دینامیکی نور (DLS) مورد بررسی قرار گرفت. حد تشخیص در نانوزیست حسگر طراحی‌شده ۰/٦٤پیکومولار است و می‌تواند به‌عنوان ابزاری برای بررسی microRNAها در نمونه‌های زیستی و تشخیص‌های کلینیکی زودهنگام با دقت و حساسیت بالا به کار گرفته شود.

کلیدواژه‌ها: فلورسانس، نانوزیست حسگر، نانوخوشه‌های نقره مبتنی بر DNA، microRNA

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۴
*نویسنده مسئول: hosseini_m@ut.ac.ir

مقدمه

امروزه بیماری‌های صعب‌العلاج مانند سرطان در سراسر دنیا رو به گسترش است. بسیاری از سرطان‌ها تا مراحل پیشرفته علایم بالینی از خود نشان نمی‌دهند و متاسفانه بعد از گسترش تومور در سراسر بدن، فرد متوجه بیماری می‌شود که درمان در این مرحله بسیار سخت است. حال اگر بتوان روش‌هایی را ابداع کرد که منجر به تشخیص زودهنگام سرطان شود بسیاری از افراد از درد و رنج این بیماری در امان خواهند بود.

میکروریبونوکلئیک اسیدها (miRNA) زیرگروه بزرگی از RNAهای غیرکدکننده به طول تقریبی ۲۵-۱۸نوکلئوتید با طول متوسط ۲۲نوکلئوتید هستند که از نظر تکاملی محافظت‌شده هستند. این مولکول‌های زیستی بیان ژن‌ها را پس از رونویسی و از طریق مهار ترجمه mRNA یا القای تجزیه آن کنترل می‌کنند. در بسیاری از تحقیقات روی سرطان‌ها تغییر غیرمعمول بیان miRNAها گزارش شده است. در این موارد حذف miRNAهایی که نقش سرکوب‌گری تومور یا افزایش miRNAهایی که نقش انکوژن را دارند، اتفاق افتاده است. در برخی موارد می‌توان از روی میزان بیان miRNAها به نوع سرطان، مرحله سرطان و سایر متغیرهای کلینیکی سرطان پی برد؛ از این جهت می‌توان miRNAها را یک نشانگر تشخیصی یا پیش‌تشخیصی دقیق در نظر گرفت[1, 2]. امروزه برای بررسی، تجزیه و تحلیل miRNAها اغلب از روش‌های نوترن‌بلاتینگ، PCR کمی در زمان واقعی، و هیبریداسیون مبتنی بر میکروآرایه استفاده می‌شود، اما این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی از جمله اختصاصیت کم، حساسیت پایین، زمان‌بربودن، نیاز به مقدار زیاد نمونه و هزینه بالا هستند. به‌منظور غلبه بر این معایب روش‌های مختلفی ابداع شده‌اند که چند نمونه از آن شامل روش‌های الکتروشیمیایی[3]، فلورسانس[3, 4]، کالری‌متری[5, 6]، اسپکتروفوتومتری UV-Visible، فوتوالکتروشیمیایی[7]، کمی‌لومینوسانس، الکتروکمی‌لومینوسانس و رزنانس پلاسمون سطحی[4] است.

سرطان روده بزرگ (CRC) یک بیماری مرگ‌بار بوده که اخیراً رو به افزایش است و به‌عنوان سومین سرطان رایج در سراسر دنیا در هر دو جنس مذکر و مونث شناخته شده است. براساس گزارشات سایت Globocan2008 سرطان روده بزرگ در مردان ایرانی پنجمین سرطان شایع با شیوع ۹/۶ و مرگ‌ومیر ۳/۶% است. در زنان ایرانی سومین سرطان با شیوع ۷% و مرگ‌ومیر ۷/۶% گزارش شده است[8]. در سال ۲۰۱۳ بیش از ۵۰۰۰۰۰ نفر در سراسر دنیا قربانی این نوع سرطان شده‌اند[9]. اگر سرطان روده بزرگ در مراحل ابتدایی تشخیص داده شود به احتمال ۹۵% بیمار زنده می‌ماند اما اگر در مراحل پیشرفته بیماری و بعد از متاستاز تشخیص داده شود تنها ۷% احتمال زنده‌ماندن بیمار وجود دارد[10]. از این رو این بیماری توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است[11]. اگر این بیماری در مراحل ابتدایی تشخیص داده شود قابل درمان است اما متاسفانه اغلب بیماران در مراحل ابتدایی علایمی را بروز نمی‌دهند[12]. به‌تازگی بسیاری از محققان روی ارتباط بین الگوی بیان miRNAها و سرطان روده بزرگ تمرکز کرده‌اند و بیان می‌دارند که می‌توان به miRNA به‌عنوان نشانگرهای زیستی مناسب برای تشخیص زودهنگام CRC نگاه کرد. ابزارهایی که امروزه برای غربالگری CRC استفاده می‌شوند به‌دلیل حساسیت و اختصاصیت کم رضایت‌بخش نیستند. یکی از miRNAهایی که در مراحل ابتدایی این سرطان افزایش بیان دارد، miR-103 است که منحصر به بیماری سرطان روده بزرگ است[13]. در جدول ۱ برخی از miRNAهای درگیر در سرطان روده بزرگ بیان شده است.

جدول ۱) برخی miRNAهای درگیر در سرطان روده بزرگ (ستون میانی miRNAهای درگیر در آغاز CRC را نشان می‌دهد).

مراحل پیشرفته سرطان	مراحل ابتدایی سرطان	افراد سالم و سرطانی
miR-92a	miR-21	miR-326
miR-18a	miR-15a	miR-487b
miR-21	miR-103	miR-92
	miR-148a	miR-134
	miR-320a	miR-191
	miR-451	miR-221
	miR-378	miR-222
	miR-29c	miR-223
		miR-229
		miR-225
		miR-20a
		miR-320

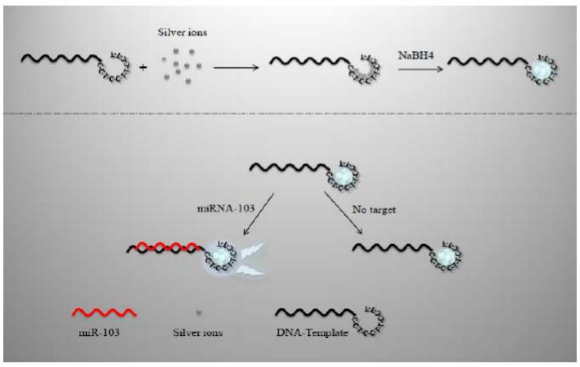
با توجه به این که miRNAها به‌عنوان بیومارکرهای جدید شناخته می‌شوند، امروزه تلاش محققان بر این است که بتوانند آنها را با روش‌های نوین در مقادیر کم شناسایی کنند در این میان نانوخوشه‌های فلزی به‌عنوان طبقه جدیدی از پروب‌های فلورسنت در نظر گرفته می‌شود. آنها از چند اتم تشکیل شده‌اند و اغلب اندازه‌ای

www.SID.ir

Archive of SID

بین یک تا ۱۰نانومتر دارند و از پراکندگی مناسب و توزیع سایز کوچکی برخوردارند. نانوخوشه‌های فلزی، به‌دلیل ویژگی‌های جذابی که دارند می‌توانند همچون رنگ‌های ارگانیک و کوانتوم دات‌ها مورد استفاده قرار بگیرند. علاوه بر این به‌دلیل ویژگی‌های نوری- فیزیکی و سمیت کم برای مطالعات زیستی بسیار رضایت‌بخش هستند[5]. نانوخوشه‌های نقره مبتنی بر DNA دارای نشر فلورسانس بسیارقوی، پایداری نوری بالا، سنتز آسان، اندازه بسیار کوچک و سمیت کم هستند. در سال‌های اخیر توالی‌های الیگونوکلئوتیدی نسبت به سایر داربست‌ها، توجه بیشتری را جلب کرده‌اند[6]. نانوخوشه‌های نقره فلورفورهایی با خاصیت فلورسنتی عالی، توزیع‌پذیری خوب در آب، اندازه زیرنانومتری، سمیت کم، ممانعت فضایی کم، تولید ارزان‌قیمت و ساده، چشم‌انداز جدیدی را برای توسعه برچسب‌ها و حسگرهای مولکولی ارایه کرده است[14].

در این تحقیق برای اولین‌بار از توالی جدیدی به‌عنوان داربست تشکیل نانوخوشه‌های نقره به‌منظور تشخیص miR-103 استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱) طرح نمادین آزمایش که بیانگر افزایش نشر نانوخوشه‌های نقره در حضور miR-103 است (چکیده گرافیکی)

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: تمام مواد شیمیایی مورد استفاده از جمله سدیم‌بورهیدرید ($NaBH_4$)، نیترات‌نقره ($AgNO_3$)، نمک سدیم‌کلرید (NaCl)، سدیم‌هیدروکسید، منیزیم‌نیترات‌هگزاهیدرات (مرک؛ آلمان) با خلوص بالا تهیه شدند. توالی‌های الیگونوکلئوتیدی DNA به‌صورت لیوفلیزه (Shanghai Generay Biotech Co؛ چین) خریداری شد و توالی‌های پروب دارای OD=۱۰ و توالی‌های هدف دارای OD=۵ بودند. برای استفاده از الیگونوکلئوتیدهای لیوفلیزه از بافر TE و برای تهیه بافرها و همچنین حل‌کردن پودرهای مصرفی از آب دیونیزه استفاده شد. واکنش ساخته‌شدن نانوخوشه‌های نقره در بافر فسفات ۲۰۰میلی‌مولار حاوی یک‌میلی‌مولار منیزیم و یک‌مولار سدیم‌کلرید در pH=۷ صورت گرفت.

در این تحقیق هدف تشخیص miR-103 با استفاده از نانوخوشه‌های نقره مبتنی بر ssDNA است؛ به این منظور از توالی پروبی استفاده شد که در سر ´۵ خود دارای توالی نوکلئوتیدی مناسب به‌منظور تشکیل نانوخوشه‌های فلورسنت نقره است و در انتهای ´۳ آن توالی مکمل با miR-103 قرار دارد:

توالی پروب:

5´-CCTCCTTCCTCCTCATAGCCCTGTACAATGCTGCT-3´

توالی هدف (miR-103):

5´-AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA-3´

توالی غیرمکمل ۱

5´-GGGTAGGGAGGGTTGGGT-3´

توالی غیر مکمل۲:

5´-GGCACCCGCGTCCACGCCATGGCCATCTAC-3´

توالی miR-21:

5´-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3´

روش آزمایش

سنتز نانوخوشه‌های نقره: ساخت نانوخوشه‌های نقره مبتنی بر DNA در دمای اتاق و از طریق مخلوط‌کردن پی‌درپی الیگونوکلئوتیدهای غنی از سیتوزین، نمک نقره، یک عامل کاهنده مناسب با نانوخوشه مورد نظر، در محلول بافری صورت پذیرفت. انتخاب بافر مناسب، pH بهینه برای واکنش و رعایت نسبت مولی صحیح در تشکیل نانوخوشه‌ها با اندازه‌های کوچک، بسیار تاثیرگذار است. توالی DNA و ساختار ثانویه آن نقش مهمی را در تعیین ویژگی‌های نشر فلورسانس نانوخوشه‌ها ایفا می‌کند.

برای سنتز نانوخوشه‌های نقره از پروب الیگونوکلئوتیدی به طول ۳۵نوکلئوتید استفاده شد که در انتهای ´۳ آن توالی مکمل با miRNA هدف قرار داشت و در سمت ´۵ دارای نوکلئوتیدهای مناسب جهت شکل‌گیری نانوخوشه‌های فلورسنت نقره بود. روش به‌کارگرفته برای سنتز نانوخوشه‌های نقره، با توجه به گزارش‌های قبلی با اندکی تغییرات انجام شد[15]. ابتدا ۱۵میکرولیتر از توالی پروب غنی از سیتوزین با غلظت ۱۰۰میکرومولار به درون بافر فسفات ۲۰۰میلی‌مولار حاوی نمک سدیم‌کلرید و منیزیم با pH=۷ ریخته شد. سپس ۶میکرولیتر از محلول تازه نیترات‌نقره به آن اضافه شد و به‌مدت ۳۰دقیقه، به‌صورت نسبتاً ملایم شیک‌کردن صورت گرفت. سپس به‌مدت ۴۵دقیقه محلول حاصل در دمای اتاق و در شرایط تاریکی نگه داشته شد و بعد از آن ۶میکرولیتر از سدیم‌بورهیدرید تازه محلول‌شده به آن اضافه شد و به‌مدت ۶۰دقیقه میکروتیوب‌ها در شرایط تاریکی درون یخ قرار گرفتند. بعد از این مدت‌زمان محلول حاصل به‌مدت ۱۲ساعت در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شد تا عامل کاهنده واکنش که $NaBH_4$ است، یون‌های نقره را احیا کرده و نانوخوشه‌های نقره تشکیل شود.

غلظت نهایی پروب DNA در حجم کلی واکنش ۱۴/۸میکرومولار و غلظت‌های نیترات‌نقره و بورهیدرید هر کدام ۸۸/۸میکرومولار و نسبت مولی در واکنش DNA-Ag-$NaBH_4$ به‌صورت ۱:۶:۶ است. برانگیختگی نانوخوشه‌های حاصل‌شده در ۳۵۰نانومتر صورت گرفت و در ۴۴۷نانومتر نشر داشتند. برای ثبت طیف‌های فلورسانس، دستگاه فلوریمتر مدل LS-50B (پرکین المر؛ ایالات متحده آمریکا) با سل‌های کوارتز به حجم ۵۰میکرومولار و قطر یک‌سانتی‌متر مورد استفاده قرار گرفت.

برهم‌کنش توالی هدف با نانوخوشه‌های نقره: اساس کار در این تحقیق افزایش نشر فلورسانس نانوخوشه‌های نقره در حضور توالی هدف است. در این روش ابتدا نانوخوشه‌های فلورسنت نقره تحت شرایط مناسب تشکیل شده و نشر فلورسانس آن با دستگاه اسپکتروفلوریمتر در طول موج تحریک ۳۵۰نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس غلظت‌های مختلفی از نمونه مورد نظر به ویال‌های واکنش که حاوی نانوخوشه‌های نقره بود اضافه شد و هیبریداسیون توالی هدف و پروب از طریق هم‌زدن آرام در دمای ۳۷°C و در حمام آب گرم صورت پذیرفت. سپس شدت نشر فلورسانس بعد از برهم‌کنش با مولکول‌های هدف، اندازه‌گیری و ثبت شد.

www.SID.ir

Archive of SID

سنجش در نمونه حقیقی: به‌منظور سنجش در محیط بیولوژیک ابتدا ۱۰۰۰میکرولیتر از سرم خون انسان به‌مدت ۱۰دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی را از رسوب جدا کرده و به ۹۰میکرولیتر از آن ۱۰میکرولیتر miR-103 با غلظت ۱۰۰میکرومولار اضافه شد. بعد از سنتز نانوخوشه‌های نقره طبق روش گزارش‌شده در این مقاله، به آن ۷/۵میکرولیتر از سرم آماده‌شده اضافه شد. محلول حاصل برای هیبریداسیون بین پروب و توالی هدف به‌مدت ۳۰دقیقه درون حمام آب گرم قرار گرفت و سپس نشر نانوخوشه‌های حاصل‌شده از محلول هیبریداسیون اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

در این آزمایش نانوخوشه‌های نقره مبتنی بر DNA به روش کاهش شیمیایی سنتز شدند. مطالعات نشان داده است که یون‌های نقره Ag^{+} تمایل زیادی برای اتصال به باز سیتوزین دارند[16]. طی واکنش نمک نقره با الیگونوکلئوتیدها، یون‌های نقره به‌طور انحصاری به بازهای آلی توالی متصل می‌شوند و با فسفات‌ها وارد واکنش نمی‌شوند. این اتصال در نوکلئوتیدها در دو محل مختلف (N3 در پریمیدین ها و N7 در پورین‌ها) صورت می‌گیرد.

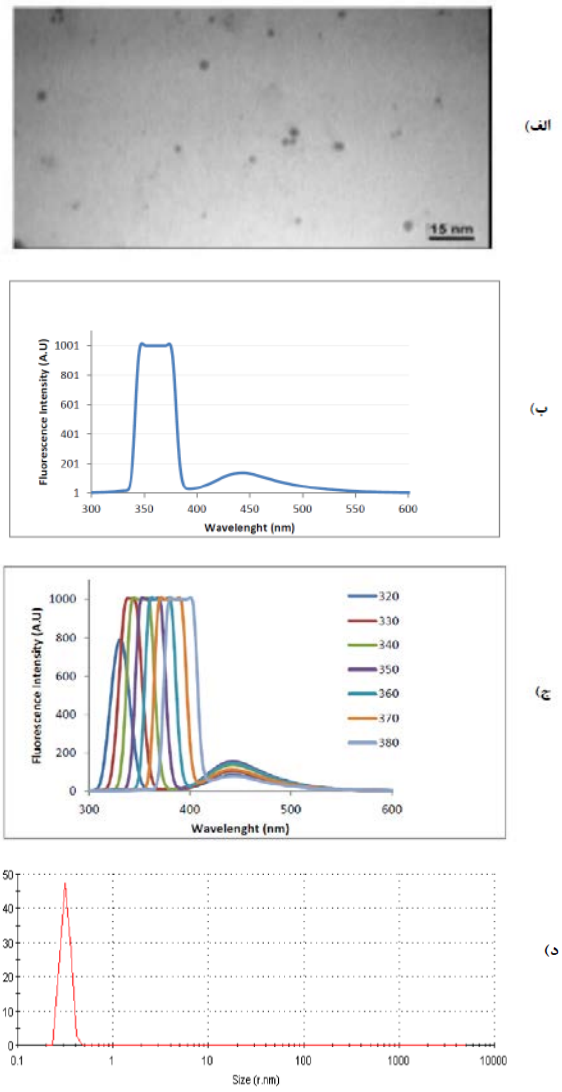
اندازه نانوخوشه‌های تشکیل‌شده همان‌طور که در شکل ۲- الف مشخص است به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری در حدود ۲ تا ۴نانومتر تعیین شد. نانوخوشه‌های نقره از اضافه‌شدن نیترات‌نقره به محلول حاوی پروب مورد نظر و کاهش یون‌های نقره توسط سدیم‌بورهیدرید حاصل شده است. برای اطمینان از شکل‌گیری نانوخوشه‌های نقره، نشر فلورسانس آن مورد بررسی قرار گرفت. در اثر تحریک نانوخوشه‌های نقره با طول موج ۳۵۰نانومتر، باند نشر در محدوده ۴۴۷نانومتری مشاهده شد. نتایج آن در قسمت ب شکل ۲ بیان شده است.

اثر طول موج تحریک در شدت نشر نانوخوشه‌های نقره مبتنی بر DNA بررسی شد. به این منظور طول موج‌های مختلف با توجه به گزارش‌های قبلی[15] از ۳۲۰نانومتر تا ۳۸۰نانومتر با فاصله ۱۰نانومتر بر آنها اعمال شد. حداکثر پیک نشر در ۴۴۷نانومتر مشاهده می‌شود که در اثر تهییج در ۳۵۰نانومتر ایجاد می‌شود (شکل ۲-- ج). این مطلب بیان می‌دارد که باندها با طول موج‌های تحریکی مختلف، در یک محدوده نشر دارند و این نشان می‌دهد که نشر این دسته از نانوخوشه‌ها از یک منبع تحریکی یا یک حالت الکترونی مشترک به وجود می‌آید. طیف‌های نشری حاصل‌شده در ناحیه‌ای ۴۴۷نانومتر با شدت‌های مختلف هستند. در بررسی‌های بعدی از این محدوده تحریک ۳۵۰نانومتر برای نشر نانوخوشه‌ها استفاده شد. در بررسی‌های بعدی از طول موج تحریک ۳۵۰نانومتر به‌منظور نشر نانوخوشه‌ها استفاده شد. یکی از روش‌های آنالیز نانوذرات روش پراکندگی دینامیک نور (DLS) است که توانایی اندازه‌گیری ذرات در داخل محلول به‌صورت سریع، ساده و بدون نیاز به آماده‌سازی نمونه، را دارد. در روش پراکندگی دینامیک نور، حرکت براونی ذرات که وابسته به اندازه آنها است اندازه‌گیری می‌شود. نتایج DLS برای محلول حاوی نانوخوشه‌های نقره در نمودار شکل ۲- د آمده است که حاکی از اندازه یکنواخت ۲-۴نانومتر است.

به‌منظور ساختن نانوخوشه‌هایی با کیفیت بالا و نشر قوی، پارامترهای مختلف مورد بررسی قرار گرفتند و شرایط بهینه برای تشکیل نانوخوشه‌های نقره حاصل شد. برای به‌دست‌آوردن زمان کافی و مناسب به‌منظور سنتز نانوخوشه‌های نقره، نشر محلول حاوی نانوخوشه‌ها در زمان‌های مختلف بررسی شد و بهترین زمان برای تشکیل آنها با شدت نشر بالا، ۱۸ساعت بعد از اضافه‌کردن نیترات‌نقره به محلول بوده است. نتایج این بررسی در نمودار ۱- الف ذکر شده است.

برای انتخاب بافر مناسب چهار نوع بافر شامل بافر فسفات ۲۰۰میلی‌مولار، بافر فسفات ۲۰۰میلی‌مولار حاوی یک‌میلی‌مولار منیزیم، بافر فسفات ۲۰۰میلی‌مولار حاوی یک‌مولار سدیم‌کلرید و بافر فسفات ۲۰۰میلی‌مولار حاوی یک‌میلی‌مولار منیزیم و یک‌مولار سدیم‌کلرید آزمایش شد. همان‌طور که در نمودار ۱- ب مشخص است بافر فسفات حاوی منیزیم و سدیم‌کلرید، بیشترین تغییر نشر را به‌صورت افزایشی هنگام حضور هدف به وجود آورده است. میزان pH برای تمامی بافرهای مورد استفاده روی ۷ تنظیم شد.

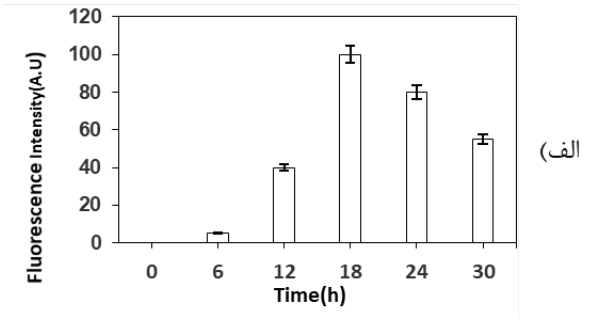
نانوخوشه‌های تشکیل‌شده از پایداری نوری خوبی برخوردار بودند. نتایج حاکی از آن است که گذر زمان تاثیر کمی، بر نشر فلورسانس نانوخوشه‌های شکل‌گرفته روی توالی طراحی‌شده دارد. به‌طوری که بعد از گذشت ۴۲ساعت با وجود کاسته‌شدن از نشر اولیه ولی باز هم شدت نشر قابل توجهی وجود دارد (نمودار ۲).



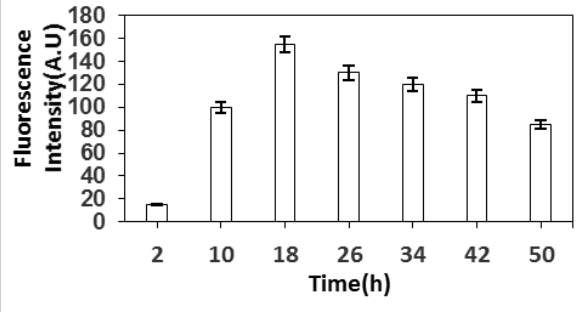
شکل ۲) الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوخوشه‌های نقره، **ب)** طیف نشری حاصل از برانگیختگی نانوخوشه‌های نقره مبتنی بر DNA در طول موج ۳۵۰نانومتر، **ج)** اثر طول موج تحریک بر طول موج و شدت جذب فلورسانس نانوخوشه‌های نقره مبتنی بر DNA، **د)** اندازه نانوخوشه‌های نقره مبتنی بر توالی الیگونوکلئوتیدی تعیین‌شده به پراکندگی دینامیک نور

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱) الف) اثر زمان بر تشکیل نانوخوشه‌های نقره، **ب)** بررسی بافرهای مختلف بر سنتز نانوخوشه نقره



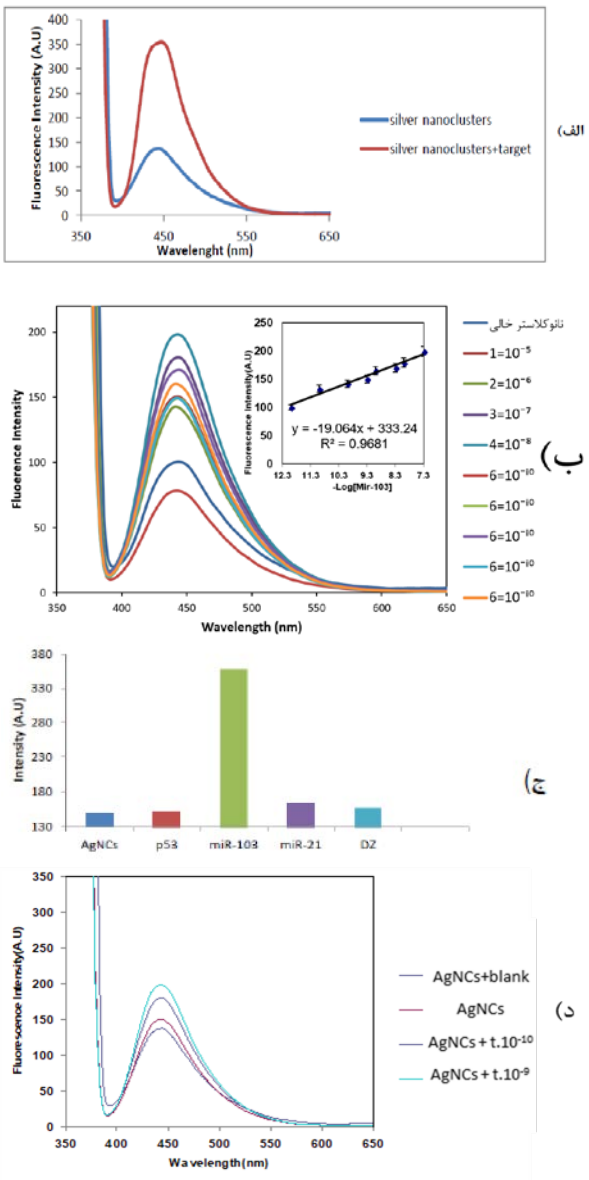
نمودار ۲) اثر زمان بر شدت نشر فلورسانس نانوخوشه‌ها

نمودار ۳- الف نشر نانوخوشه‌های نقره را در حضور و عدم حضور بیومولکول هدف نشان می‌دهد. افزایش نشر در حضور مولکول هدف می‌تواند ناشی از تشکیل ساختار دورشته‌ای باشد که درجه آزادی کمتری نسبت به پروب تک‌رشته‌ای دارد. از طرفی در حضور هدف، پروب ساختاری محکم به خود می‌گیرد که نانوخوشه‌های نقره را در مقابل خاموشی نشر فلورسانس در محلول، بهتر محافظت می‌کند و باعث افزایش نشر نانوخوشه‌ها می‌شود.

پس از اطمینان از سنتز نانوخوشه‌های نقره، غلظت‌های مختلفی از مولکول هدف تهیه و به محلول حاوی نانوخوشه‌های نقره اضافه شد. همان‌طور که در نمودار ۳- ب مشخص شده است با افزایش غلظت miR-103 از یک‌پیکومولار تا ۵۰نانومولار در محلول واکنش، شدت نشر فلورسانس نیز به‌صورت خطی افزایش پیدا کرده است و دارای حد تشخیص ۰/۶۴پیکومولار است که براساس نسبت سه‌برابر انحراف استاندارد بلانک به شیب نمودار کالیبراسیون محاسبه شده است. با افزایش غلظت مولکول هدف، میزان نشر نانوخوشه‌های نقره به‌صورت خطی افزایش پیدا می‌کند.

به‌منظور بررسی قدرت گزینش‌پذیری زیست‌حسگر طراحی‌شده، از یک نوع miRNA دیگر و دو توالی نوکلئوتیدی غیرمکمل استفاده شد. غلظت ۱۰۰میکرومولار از توالی‌ها به‌صورت جداگانه به محلول حاوی نانوخوشه‌های نقره اضافه شد. همان‌طور که نتایج نمودار ۳-ج نشان می‌دهد، نشر نانوخوشه‌های نقره در اثر حضور توالی هدف miR-103 به‌طور چشمگیری نسبت به سایر توالی‌های نوکلئوتیدی افزایش پیدا می‌کند که این نشان‌دهنده قدرت انتخاب‌گری بالای این پروب برای بیومولکول miR-103 است.

پس از انجام مراحل مختلف از جمله اطمینان از تشکیل نانوخوشه‌های نقره، تشخیص مولکول هدف به کمک افزایش نشر فلورسانس و همچنین بهینه‌سازی فاکتورهای موثر در واکنش، سنجش miR-103 در سرم مورد مطالعه قرار گرفت. همان‌طور که در نمودار ۳- د مشهود است با افزایش غلظت توالی هدف نشر نانوخوشه‌های نقره نیز افزایش پیدا کرد.



نمودار ۳) الف) نشر فلورسانس نانوخوشه‌های نقره در حضور و عدم حضور مولکول هدف، **ب)** افزایش خطی شدت نشر نانوخوشه‌های نقره با افزایش غلظت miR-103، **ج)** گزینش‌پذیری نانوخوشه‌های نقره بر پایه DNA نسبت به مولکول‌های مشابه مولکول هدف، **د)** سنجش قدرت تشخیص مولکول هدف در سرم خون توسط نانوخوشه‌های نقره

نتیجه‌گیری

همان‌طور که توضیح داده شد، miRNAها در بسیاری از فرآیندهای زیستی بدن دخیل هستند و به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های بیان ژن مطرح هستند. تغییر در سطح بیان miRNAها در بسیاری از بیماری‌ها همچون بیماری‌های قلبی، مشکلات سیستم عصبی و

www.SID.ir

Archive of SID

سرطان‌ها گزارش شده است[17]. روش‌های استانداردی که امروزه برای بررسی miRNAها به کار می‌رود دارای محدودیت‌هایی از جمله؛ نیاز به مقدار زیاد نمونه اولیه، زمان‌بربودن، هزینه بالا، حساسیت و دقت ناکافی هستند. البته مطالعات زیادی به‌منظور ابداع روش‌های کارآمد براساس فلورسانس، کالریمتری، الکتروشیمی و غیره صورت گرفته است.

یکی از راهبردهایی که امروزه بسیار جلب توجه کرده است؛ استفاده از نانوذرات در تشخیص miRNAها است. نانوذرات با ویژگی‌های منحصربه‌فرد خود در بسیاری از علوم مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته‌اند. زیست‌حسگرهایی که بر پایه نانوذرات طراحی شده‌اند نسبت به زیست‌حسگرهای مبتنی بر مواد توده‌ای از مزیت‌های زیر برخوردارند: ۱) اندازه کوچک نانوذرات منجر به اجرایی‌شدن طرح‌هایی با هزینه کم و تجهیزات محدود می‌شود، ۲) به‌علت افزایش نسبت سطح به حجم قسمت زیادی از نانوذرات در تماس با محیط هستند که این ویژگی می‌تواند منجر به افزایش سرعت انتقال سیگنال شود و در نتیجه آن آنالیزی سریع با کمترین محدودیت حد تشخیص صورت بگیرد، ۳) استفاده از نانوذرات (Biomimetic)، منجر به استفاده کمتر معرف در حسگرهای زیستی و تشخیص "*درون محیط زنده*" با سمیت کمتر و پایداری بیشتر را به همراه آورده است.

نانوخوشه‌های فلزی به‌دلیل خواص ویژه الکترونی، فیزیکی و شیمیایی که دارند، یک خانواده جدید از مولکول‌های فلورفور با خاصیت لومینسانس با پایداری نوری بالا هستند. علی‌رغم حجم وسیعی از مطالعات اخیر در حوزه نانوخوشه‌های فلزی به‌ویژه نانوخوشه‌های نقره مبتنی بر DNA، هنوز به‌طور کامل خواص فلورسنت آنها درک نشده است اما با این وجود بین نانوخوشه‌های مختلف سنتزشده روی داربست‌های گوناگون، نانوخوشه‌های فلزی مبتنی بر DNA جایگاه ویژه‌ای دارند زیرا با اختصاصیت بالا و حساسیت زیاد مولکول هدف را شناسایی می‌کنند. از این رو می‌توانند یک راه حل مقرون‌به‌صرفه و مناسب برای مطالعه مولکول‌های زیستی، تغییرات کوچک ساختاری به‌علت برهمکنش‌های مختلف مولکولی باشند. همچنین با توجه به این که نانوخوشه‌های فلزی مبتنی بر DNA دارای نشر درخشان فلورسانس، پایداری نوری، سمیت کم و اندازه کوچک هستند می‌توانند جایگزین مناسبی برای نقاط کوانتومی و رنگ‌های آلی موجود نیز باشند.

در این پروژه یک روش جدید، ساده، کم‌هزینه، بدون نیاز به برچسب‌گذاری برای تشخیص microRNA مربوط به سرطان روده بزرگ توسط نانوخوشه‌های فلزی صورت گرفت. بدین‌صورت که miR-103 توسط نانوخوشه‌های نقره مورد ارزیابی و تشخیص قرار گرفت. افزایش نشر فلورسانس نانوخوشه‌های نقره در حضور مولکول هدف، اساس تشخیص در این پژوهش است.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از کلیه دانشجویان آزمایشگاه دکتر *حسینی* در انستیتو الکتروشیمی دانشگاه تهران که در تحقیق حاضر همکاری نموده‌اند، سپاسگزاری می‌شود.

تاییدیه‌اخلاقی: نتایج مندرج در این مقاله از صحت و اصالت علمی برخوردار است و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران اعم از پایان‌نامه، کتاب، مقاله و غیره استفاده شده است، رعایت کامل امانت انجام شده و مطابق مقررات، به تمامی آنها در فهرست منابع و ماخذ مقاله اشاره شده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: الناز احمدی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۳٤%)؛ یاسمن‌السادات برقعی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳٤%)؛ سیدمرتضی حسینی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۲%)

منابع مالی: منابع مالی این تحقیق توسط دانشگاه تهران تامین شده است.

منابع

1- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101(9):2999-3004.
2- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6(4):259-69.
3- Cheng FF, He TT, Miao HT, Shi JJ, Jiang LP, Zhu JJ. Electron transfer mediated electrochemical biosensor for microRNAs detection based on metal ion functionalized titanium phosphate nanospheres at attomole level. ACS Appl Mater Interfaces. 2015;7(4):2979-85.
4- Vaisocherová H, Šípová H, Víšová I, Bocková M, Špringer T, Ermini ML, et al. Rapid and sensitive detection of multiple microRNAs in cell lysate by low-fouling surface plasmon resonance biosensor. Biosens Bioelectron. 2015;70:226-31.
5- Yuan Z, Chen YC, Li HW, Chang HT. Fluorescent silver nanoclusters stabilized by DNA scaffolds. Chem Commun (Camb). 2014;50(69):9800-15.
6- Walczak S, Morishita K, Ahmed M, Liu J. Towards understanding of poly-guanine activated fluorescent silver nanoclusters. Nanotechnology. 2014;25(15):155501.
7- Zhu Y, Hu XC, Shi S, Gao RR, Huang HL, Zhu YY, et al. Ultrasensitive and universal fluorescent aptasensor for the detection of biomolecules (ATP, adenosine and thrombin) based on DNA/Ag nanoclusters fluorescence light-up system. Biosens Bioelectron. 2016;79:205-12.
8- Motevali Zade Ardakani A, Boromand M .Cancer and prevention ways. Tehran: Gooya House of Art and Culture; 2013. [Persian]
9- Taherian H, Tafvizi F, Tahmasebi Fard ZT, Abdirad A. Lack of association between human papillomavirus infection and colorectal cancer. Przegląd Gastroenterologiczny. 2014;9(5):280-4.
10- Wagner PD, Verma M, Srivastava S. Challenges for biomarkers in cancer detection. Ann N Y Acad Sci. 2004;1022:9-16.
11- Wu X, Xu X, Li S, Wu S, Chen R, Jiang Q, et al. Identification and validation of potential biomarkers for the detection of dysregulated microRNA by qPCR in patients with colorectal adenocarcinoma. PLoS One. 2015;10(3):e0120024.
12- Wang S, Xiang J, Li Z, Lu S, Hu J, Gao X, et al. A plasma microRNA panel for early detection of colorectal cancer. Int J Cancer. 2015;136(1):152-61.
13- Moncini S, Salvi A, Zuccotti P, Viero G, Quattrone A, Barlati S, et al. The role of miR-103 and miR-107 in regulation of CDK5R1 expression and in cellular migration. PLoS One. 2011;6(5):e20038.
14- Richards CI, Choi S, Hsiang JC, Antoku Y, Vosch T, Bongiorno A, et al. Oligonucleotide-stabilized Ag nanocluster fluorophores. J Am Chem Soc. 2008;130(15):5038-9.

www.SID.ir

Archive of SID

15- Hosseini M, Akbari A, Ganjali MR, Dadmehr M, Rezayan AH. A novel label-free microRNA-155 detection on the basis of fluorescent silver nanoclusters. J Fluoresc. 2015;25(4):925-9.
16- Yang X, Gan L, Han L, Wang E, Wang J. High-yield synthesis of silver nanoclusters protected by DNA monomers and DFT prediction of their photoluminescence properties. Angew Chem Int Ed Engl. 2013;52(7):2022-6
17- Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X. MicroRNA: Function, detection, and bioanalysis. Chem Rev. 2013;113(8):6207-33.

www.SID.ir