



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

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original Research

#### Authors

Ahmadi E.<sup>1</sup> MSc,  
Barghahi Y.S.<sup>1</sup> PhD,  
Hoseini S.M.\*<sup>1</sup> PhD

#### How to cite this article

Ahmadi E, Barghahi 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 nanobiosensor 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; Nanobiosensor; DNA-Templated Silver Nanoclusters; MicroRNA

<sup>1</sup>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

## 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

یاسمن السادات برقی 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 ریبونوکلیک اسیدهای تک رشته‌ای 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 ssDNA، miRNA 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 اولین بار از نانوخوشه‌های نقره مبتنی 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 طراحی شده ۷۴/۱۰ پیکومولار است و می‌تواند به عنوان 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 متأسفانه 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.

میکروریبونوکلیک اسیدها (miRNA) زیرگروه بزرگی از RNAهای غیرکدکننده به طول تقریبی ۲۵-۱۸ نوکلئوتید با طول متوسط ۲۲ نوکلئوتید هستند که از نظر تکاملی محافظت شده 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، زمان‌بر بودن، 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]، کمی لومینوسانس، الکتروکمی لومینوسانس و رزناس 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 متأسفانه 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

توالی هدف (miR-103):

توالی غیرمکمل ۱' 5'-AGCAGCATTTGTACAGGGCTATGA-3'

5'-GGGTAGGGAGGGTTGGGT-3'

توالی غیر مکمل ۲:

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 مخلوط کردن پی‌درپی الیگونوکلوئوتیدهای 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.

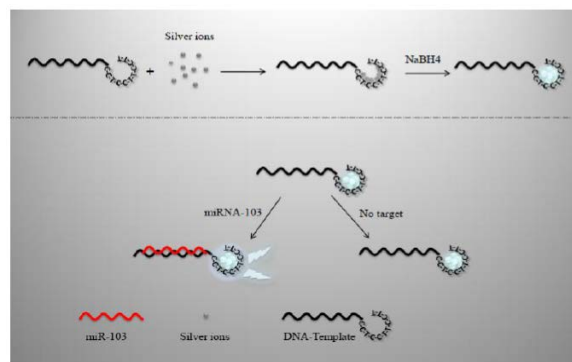
برای سنتز نانوخوشه‌های نقره از پروب الیگونوکلوئوتیدی به طول ۳۵ نوکلئوتید استفاده شد که در انتهای ۳' آن توالی مکمل با miRNA هدف قرار داشت و در سمت ۵' دارای نوکلئوتیدهای مناسب جهت شکل‌گیری نانوخوشه‌های فلورسنت نقره بود. روش به‌کارگرفته برای سنتز نانوخوشه‌های نقره، با توجه به گزارش‌های قبلی با اندکی تغییرات انجام شد<sup>[15]</sup>. ابتدا ۱۵ میکرولیتر از توالی پروب غنی از سیتوزین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به درون بافر فسفات ۲۰۰ میلی‌مولار حاوی نمک سدیم کلرید و منیزیم با pH=۷ ریخته شد. سپس ۶ میکرولیتر از محلول تازه نیترات نقره به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه، به‌صورت نسبتاً ملایم شیک‌کردن صورت گرفت. سپس به مدت ۴۵ دقیقه محلول حاصل در دمای اتاق و در شرایط تاریکی نگه داشته شد و بعد از آن ۶ میکرولیتر از سدیم بورهیدرید تازه محلول‌شده به آن اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه میکروتیوب‌ها در شرایط تاریکی درون یخ قرار گرفتند. بعد از این مدت زمان محلول حاصل به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شد تا عامل کاهنده واکنش که NaBH<sub>4</sub> است، یون‌های نقره را احیا کرده و نانوخوشه‌های نقره تشکیل شود.

غلظت نهایی پروب DNA در حجم کلی واکنش ۱۴/۸ میکرومولار و غلظت‌های نیترات نقره و بورهیدرید هر کدام ۸۸/۸ میکرومولار و نسبت مولی در واکنش DNA-Ag-NaBH<sub>4</sub> به‌صورت ۱:۶:۶ است. برانگیختگی نانوخوشه‌های حاصل‌شده در ۳۵۰ نانومتر صورت گرفت و در ۴۴۷ نانومتر نشر داشتند. برای ثبت طیف‌های فلورسانس، دستگاه فلوریومتر مدل LS-50B (پرکین المر؛ ایالات متحده آمریکا) با سل‌های کوارتز به حجم ۵۰ میکرومولار و قطر یک سانتی‌متر 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 اسپکتروفلوریومتر در طول موج تحریک ۳۵۰ نانومتر 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.

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

در این تحقیق برای اولین بار 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 سدیم بورهیدرید (NaBH<sub>4</sub>)، نیترات نقره (AgNO<sub>3</sub>)، نمک سدیم کلرید (NaCl)، سدیم هیدروکسید، منیزیم نیترات هگزاآهیدرات (مرک؛ آلمان) با خلوص بالا تهیه شدند. توالی‌های الیگونوکلوئوتیدی DNA به‌صورت لیوفلیزه (Shanghai Generay Biotech Co) خریداری شد و توالی‌های پروب دارای OD=۱۰ و توالی‌های هدف دارای OD=۵ بودند. برای استفاده از الیگونوکلوئوتیدهای لیوفلیزه با بافر TE و برای تهیه بافرها و همچنین حل کردن پودرهای مصرفی از آب دیونیزه استفاده شد. واکنش ساخته‌شدن نانوخوشه‌های نقره در بافر فسفات ۲۰۰ میلی‌مولار حاوی یک میلی‌مولار منیزیم و یک مولار سدیم کلرید 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'

**سنجش در نمونه حقیقی:** به منظور سنجش در محیط بیولوژیک ابتدا ۱۰۰۰ میکرولیتر از سرم خون انسان به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی را از رسوب جدا کرده و به ۹۰ میکرولیتر از آن ۱۰ میکرولیتر miR-103 با غلظت ۱۰۰ میکرومولار اضافه شد. بعد از سنتز نانوخوشه‌های نقره طبق روش گزارش شده در این مقاله، به آن ۷/۵ میکرولیتر از سرم آماده شده اضافه شد. محلول حاصل برای هیبریداسیون بین پروب و توالی هدف به مدت ۳۰ دقیقه درون حمام آب گرم قرار گرفت و سپس نشر نانوخوشه‌های حاصل شده 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 الیگونوکلوئیدها، 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 پرمیدین‌ها و N7 در پورین‌ها) صورت می‌گیرد.

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

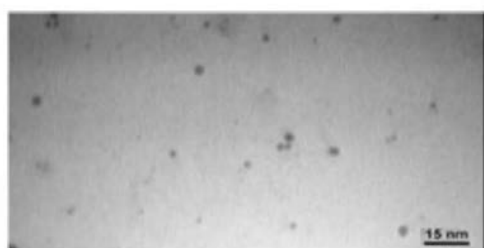
اثر طول موج تحریک در شدت نشر نانوخوشه‌های نقره مبتنی بر DNA بررسی شد. به این منظور طول موج‌های مختلف با توجه به گزارش‌های قبلی [15] از ۳۲۰ نانومتر تا ۳۸۰ نانومتر با فاصله ۱۰ نانومتر بر آنها اعمال شد. حداکثر پیک نشر در ۴۴۷ نانومتر مشاهده می‌شود که در اثر تهییج در ۳۵۰ نانومتر ایجاد می‌شود (شکل ۲- ج). این 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 حاصل شده در ناحیه‌ای ۴۴۷ نانومتر با شدت‌های مختلف هستند. در بررسی‌های بعدی از این محدوده تحریک ۳۵۰ نانومتر برای نشر نانوخوشه‌ها استفاده شد. در بررسی‌های بعدی از طول موج تحریک ۳۵۰ نانومتر به منظور 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 ۲-۴ نانومتر است.

به منظور 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 به منظور سنتز نانوخوشه‌های نقره، نشر محلول حاوی نانوخوشه‌ها در زمان‌های مختلف بررسی شد و بهترین زمان برای تشکیل آنها با شدت نشر بالا، ۱۸ ساعت بعد از اضافه کردن نیترات نقره

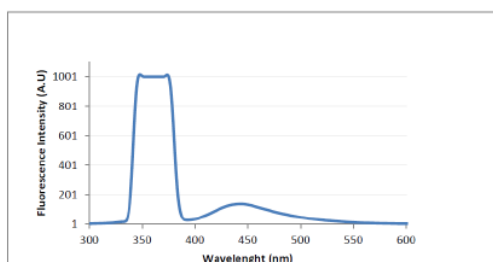
به محلول بوده است. نتایج این بررسی در نمودار ۱- الف ذکر شده است.

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

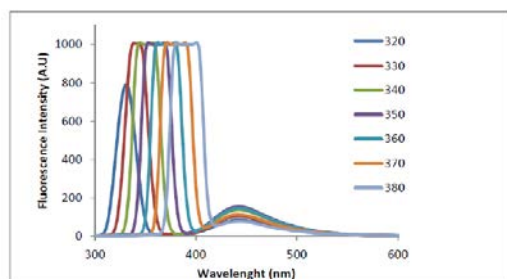
نانوخوشه‌های تشکیل شده از پایداری نوری خوبی برخوردار بودند. نتایج حاکی از آن است که گذر زمان تاثیر کمی، بر نشر فلورسانس نانوخوشه‌های شکل گرفته روی توالی طراحی شده دارد. به‌طوری که بعد از گذشت ۴۲ ساعت با وجود کاسته شدن از نشر اولیه ولی باز هم شدت نشر قابل توجهی وجود دارد (نمودار ۲).



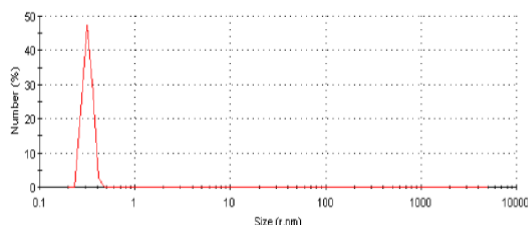
(الف)



(ب)



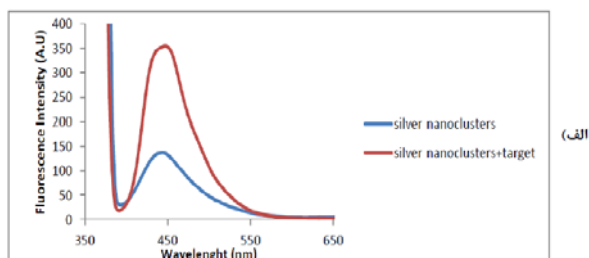
(ج)



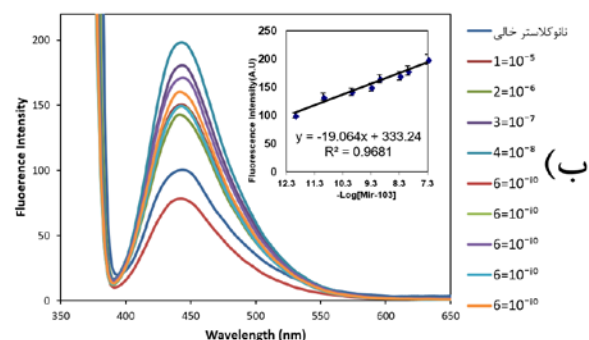
(د)

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

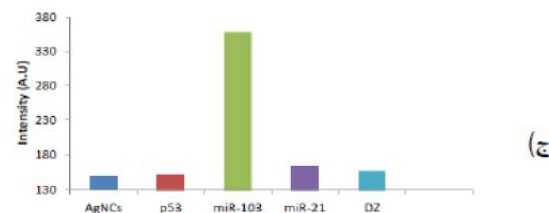
افزایش پیدا می‌کند که این نشان‌دهنده قدرت انتخاب‌گری بالای این پروب برای بیومولکول miR-103 است. پس از انجام مراحل مختلف از جمله اطمینان از تشکیل نانوخوشه‌های نقره، تشخیص مولکول هدف به کمک افزایش نشر فلورسانس و همچنین بهینه‌سازی فاکتورهای موثر در واکنش، سنجش miR-103 در سرم مورد مطالعه قرار گرفت. همان‌طور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



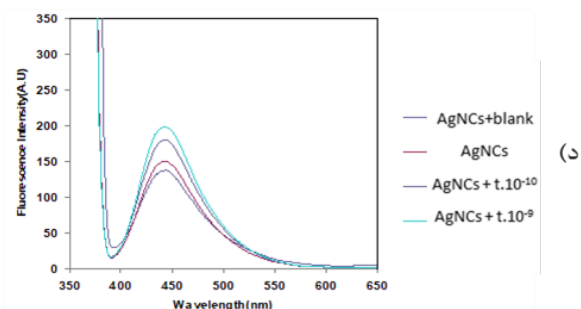
(الف)



(ب)



(ج)

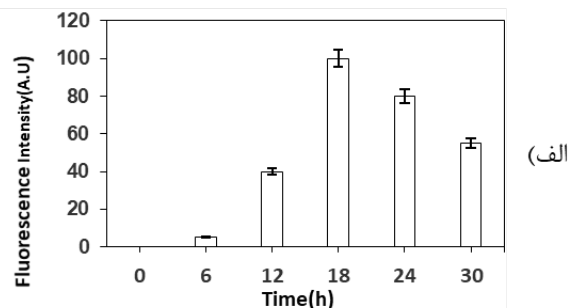


(د)

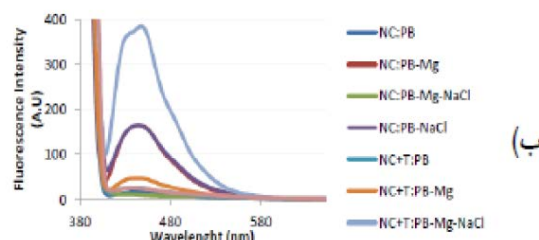
**نمودار ۳ (الف)** نشر فلورسانس نانوخوشه‌های نقره در حضور و عدم حضور مولکول هدف، **(ب)** افزایش خطی شدت نشر نانوخوشه‌های نقره با افزایش غلظت miR-103، **(ج)** گزینش‌پذیری نانوخوشه‌های نقره بر پایه DNA نسبت به مولکول‌های مشابه مولکول هدف، **(د)** سنجش قدرت تشخیص مولکول هدف در سرم خون توسط نانوخوشه‌های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

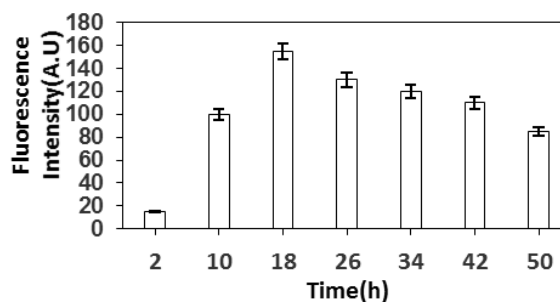


(الف)



(ب)

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



**نمودار ۲ (ب)** 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 یک پیکومولار تا ۵۰ نانومولار در محلول واکنش، شدت نشر فلورسانس نیز به‌صورت خطی افزایش پیدا کرده است و دارای حد تشخیص ۰/۶۴ پیکومولار 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 ۱۰۰ میکرومولار 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

**سهم نویسندگان:** الناز احمدی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۳۴٪)؛ یاسمن السادات برقی (نویسنده دوم)، روش شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۴٪)؛ سیدمرتضی حسینی (نویسنده سوم)، روش شناس/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.

سرطان‌ها گزارش شده است<sup>[17]</sup>. روش‌های استاندارد که امروزه برای بررسی miRNAها به کار می‌رود دارای محدودیت‌هایی از جمله: نیاز به مقدار زیاد نمونه اولیه، زمان بر بودن، هزینه بالا، حساسیت و دقت ناکافی هستند. البته مطالعات زیادی به منظور 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 اجرایی شدن طرح‌هایی با هزینه کم و تجهیزات محدود می‌شود، (۲) به علت 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 به دلیل خواص ویژه الکترونی، فیزیکی و شیمیایی که دارند، یک خانواده جدید از مولکول‌های فلزوفور 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 سنتز شده 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 مقرون به صرفه 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.

**تأییدیه اخلاقی:** 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 مآخذ مقاله اشاره شده است.

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

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.

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