

طراحی و ساخت سامانه تشخیص میکرو RNA-9 دخیل در سرطان ریه در بستر هیدروژل

مروارید سادات تاجیک^۱، عبدالله اله وردی^{۲*}، حسین نادری منش^۳

۱- دانشجوی ارشد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* صندوق پستی ۱۱۱ ۱۴۱۵، تهران، ایران
a-allahverdi@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۶

دریافت: ۱۴۰۲/۰۱۵/۰۵

چکیده

سرطان یکی از عوامل مرگ در جوامع بشری می باشد و علت اصلی عدم موفقیت در درمان آن، تشخیص دیر هنگام و درگیر شدن دیگر اعضا بدن می باشد. سنجش نشانگرهای زیستی مایعات بدن می تواند به عنوان یکی از مهم ترین روش های غربالگری و تشخیص سرطان، در مراحل اولیه باشد. میکرو RNA های گردشی به عنوان بیومارکرها برای تشخیص و پیش آگاهی سرطان مطرح شده اند. استفاده از این مولکول ها علاوه بر تشخیص زودهنگام و پیش از متاستاز، به دلیل امکان دستیابی غیرتهاجمی، موجب کاهش آسیب های وارد شده به بیمار خواهند شد. بنابراین، ابداع روشی برای شناسایی، آشکار سازی و کمی سازی آن یک ضرورت می باشد. هدف از این مطالعه، بهبود تشخیص میکرو RNA-9 به عنوان یکی از میکرو RNA های دخیل در سرطان ریه با استفاده از تکنیک نوری در بستر هیدروژل است. در این سیستم، با استفاده از کاوشگر گیرنده (DNA تک رشته) که در بستر هیدروژل تثبیت شد، جداسازی میکرو RNA انجام شد. با اتصال میکرو RNA به این پروب، پروب دوم که DNA بیوتینه مکمل بخش بالایی میکرو RNA است به آن متصل شده و ساختار ساندویچی ایجاد کردند. در نهایت میکرو RNA به دام افتاده میان دو کاوشگر توسط استرپتاویدین متصل به FITC تشخیص داده شد.

کپی رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه ای کپی، باز نشر و باز آفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیر تجاری استفاده کنید.

در این پژوهش غلظت‌های متفاوت میکرو RNA-9 از ۱۰۰۰ پیکومولار تا ۱ فمتومولار برای تخمین حدتشخیص بیوسنسور طراحی شده استفاده شد و ۵۰ فمتومولار به عنوان حدتشخیص اندازه‌گیری شد.

کلید واژگان: بیومارکر، کیتوزان، استرپتاویدین-FITC، میکروRNA-بیوسنسور

۱- مقدمه

میکرو RNAها گروهی از مولکول‌های RNA تک رشته‌ای با طول ۱۹-۲۳ نوکلئوتید هستند که بیان ژن را در یوکاریوت‌ها تنظیم می‌کنند و فرایند‌های فیزیولوژیکی مانند تمایز سلولی، تکثیر، ایمنی و آپوپتوز را کنترل می‌کنند [۱ و ۲]. میکروRNAها که در گیاهان، حیوانات و برخی ویروس‌ها یافت می‌شوند، در خاموش کردن RNA و تنظیم بیان ژن پس از رونویسی نقش مهمی دارند [۳]. میکروRNAها هیچگونه فراورده پروتئینی را کد نمی‌کنند [۴ و ۳].

بیشتر ژن‌های میکروRNAها توسط RNA Pol II درون هسته رونویسی می‌شوند. رونوشت اولیه (pri-miRNA) با طولی در حدود چند صد تا چند هزار نوکلئوتید دارد و دارای دم پلی A و کلاهک ۵' می‌باشد. حدود ۳۰ درصد از میکروRNAها از اینترون ژن‌های کد کننده پروتئین پردازش می‌شوند. در حالی که، سایرین غالباً از نواحی ژنومی اختصاصی میکروRNAها بیان می‌شوند [۴]. رونوشت اولیه می‌تواند یک میکروRNA بالغ را ایجاد کند و یا خوشه‌ایی از دو یا چند میکروRNA باشد. بیشتر ژن‌های میکروRNA انسان به صورت مجزا و غیر خوشه‌ای رونویسی می‌شوند. در حالی که، بیش از نیمی از miRNAها در دروزوفیلا به صورت خوشه‌ای قرار دارند [۵].

سرطان ریه کشنده‌ترین سرطان در زنان و مردان بوده است و هر ساله تعداد بیشتری در اثر سرطان ریه در مقایسه با سرطان‌های روده بزرگ، پستان و پروستات جان خود را از دست می‌دهند. میزان بقای مبتلایان سرطان ریه پنج سال پس از تشخیص بیماری در حدود ۱۵-۱۳ درصد می

باشد [۶ و ۵]. در حال حاضر، اغلب روش‌های بالینی مورد استفاده برای تشخیص سرطان ریه، روش‌هایی تهاجمی بوده و سبب آزردن شدن بیمار می‌شوند و همچنین از لحاظ اقتصادی نیز بسیار پرهزینه هستند. اما مهمترین ایراد روش‌های رایج تشخیص سرطان ریه عدم توانایی آنها برای تشخیص در مراحل ابتدایی ابتلا است. به گونه‌ای که این روش‌ها زمانی قادر به تشخیص سرطان می‌باشند که قطر تومور حداقل به ۱ سانتی‌متر رسیده باشد که در این مرحله به احتمال زیاد متاستاز رخ داده است و سایر اندام‌ها درگیر شده‌اند. سنجش مارکرهای زیستی خون می‌تواند مکمل یا جایگزین روش‌های تصویر برداری موجود در غربالگری سرطان ریه شوند. میکروRNA در تکوین و تومور زایی ریه موثر هستند. میکروRNAهای متعددی در بافت، خلط و خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان ریه با ثبات قابل توجهی شناسایی شده است، که آنها را به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی، جذاب می‌کند [۷]. میکروRNAهای miR-372, miR-18a, miR-222, miR-221, miR-486, miR-9, miR-21, miR-144, miR-155 به عنوان انکوژن در سرطان ریه هستند [۸ و ۷].

هیدروژل یک ماده دوفازی و مخلوطی از مواد جامد متخلخل و نفوذپذیر است. حداقل ۱۰ درصد از وزن آن یا حجم مایع بینابینی، متشکل از آب است [۱۴]. در هیدروژل‌ها، جامد متخلخل نفوذپذیر، یک شبکه سه بعدی نامحلول در آب از پلیمرهای طبیعی یا مصنوعی و با یک سیال است که مقدار زیادی آب یا سیالات بیولوژیکی را جذب خود کرده است [۱۵-۱۲].

این ویژگی‌ها زیربنای کاربردهای متعددی هستند، به ویژه در حوزه زیست پزشکی بسیاری از هیدروژل‌ها مصنوعی

هستند، اما برخی از آنها از طبیعت مشتق شده‌اند. اولین بار اصطلاح "هیدروژل" در سال ۱۸۹۴ ابداع شد [۸]. هیدروژل‌ها را می‌توان به‌عنوان عناصر فعال در سیستم‌های میکروسیال برای تحقق عملکردهایی با هدف کاربردهای گسترده‌تر، مانند حسگرهای زیستی، ژنراتورهای گرادیان، دریچه‌ها و محرک‌ها گنجانند. علاوه بر این، هیدروژل‌هایی که به‌عنوان بسترها، موانع یا دیوارها در سیستم میکروسیال مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توانند مقاومت سیال را افزایش دهند و انتشار آزاد و ایجاد یک محیط بدون جریان را تایید کنند [۲۰]. هیدروژل‌های طبیعی در دهه‌ی اخیر به دلیل ویژگی‌های اولیه‌ی خود، توجه بیشتری را به خود جلب کرده‌اند که چالش‌های بزرگی را برای محققان ایجاد کرده است [۲۲].

کیتوزان به‌دلیل خواص منحصر به فرد خود، پتانسیل یک هیدروژل مفید را دارد [۲۱]. علاوه بر زیست تخریب پذیری (از مشتقات پوست سخت پوستان دریایی مانند میگو و خرچنگ استخراج می‌شود)، زیست سازگاری [۱۰]، غیرسمی بودن، ایمنی‌زایی کم و چسبندگی مخاطی [۹]، تحقیقات جدید ویژگی‌های بیولوژیکی دیگری مانند فعالیت ضد سرطانی را نشان داده است [۲۳]. ارزش این پلی ساکارید طبیعی با پیدا شدن کاربردهای جدید افزایش می‌یابد. کیتوزان تنها پلیمر با خواص کاتیونی و آبدوست است. از آنجایی که این خاصیت کاتیونی بر اساس گروه‌های آمینه و هیدروکسیل آن است، دارای خواصی مانند چسبندگی مخاطی، فراهمی زیستی، حالیت و بار الکتریکی است که می‌توان آنها را برای افزایش خواص فیزیکی آن از نظر شیمیایی اصلاح کرد [۲۴]. تیولیزاسیون گروه‌های آمینه در کیتوزان به‌عنوان یک مشتق جدید کیتوزان در میان سایر تغییرات مورد مطالعه قرار گرفته است. علاوه بر این، پلیمرهای کیتوزان تیوله آنزیم‌ها را به

طور موثرتری نسبت به کیتوزان اصلاح نشده مهار می‌کنند [۲۳].

در این مطالعه، کیتوزان تیول پالمیتیک اسید سنتز شد و به‌عنوان یک مشتق کیتوزان آمفی‌فیلیک ابتکاری شنا سایی شد. هدف از این مطالعه طراحی حسگر زیستی برای تشخیص زودهنگام سرطان ریه بود و برای این منظور، در این سیستم، میکرو RNA ها در بستر هیدروژل با استفاده از یک کاوشگر گیرنده DNA تک رشته‌ای جدا شد و بر روی سطح ثابت شد. هیدروژل کیتوزان تیوله با اتصال میکرو RNA ها به این کاوشگر، کاوشگر دوم (آشکارساز) حاوی بیوتین، مکمل DNA می‌شود. قسمت بالایی میکرو RNA به آن متصل شده و یک ساختار ساندویچی را تشکیل می‌دهد. در نهایت، میکرو RNA به دام افتاده بین دو پروب توسط استرپتاویدین متصل به FITC^۱ شناسایی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد

کیتوزان با درجه داستیلاسیون ۹۵ درصد از شرکت سیگما خریداری شد. اسید پالمیتیک با وزن مولکولی ۱۵۰۰۰ گرم در مول و کیسه دیالیز با سایز ۳ کیلودالتون نیز از شرکت سیگما تهیه شد. اسید تیوگلیکولیک^۲ (TGA)،^۳ (EDAC)،^۴ (NHS) و اسید استیک و سایر معرف‌های شیمیایی از شرکت مرک خریداری شدند. علاوه بر این، BioRP و توالی‌های الیگونوکلوته‌یدی از شرکت Bioneer (کره جنوبی) خالص تهیه شد. استرپتاویدین متصل به FITC نیز از بایولجن (آمریکا) خریداری شد.

۲-۲ انتخاب میکرو RNA های مناسب

در سرطان ریه بیان برخی از میکرو RNA ها در سرم بیماران افزایش می‌یابد که قابل اندازه‌گیری می‌باشد [۱۷]. دو miR-9 و miR-486 انتخاب شدند. از MiRBase برای

^۳ N-(3-Dimethylaminopropyl)-N' Ethylcarbodiimide Hydrochloride

^۴ NHydroxysuccinimide

^۱ Fluorescein isothiocyanate

^۲ Thioglycolic acid

انتخاب توالی این میکرو RNA ها استفاده شد. کلیه مواد و عوامل شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از درجه خلوص بسیار بالایی برخوردار بودند. توالی این دو میکرو RNA در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱ توالی ریبونوکلوئیدی miR 9 و miR 486-5p

نام میکرو RNA	توالی ۵'-۳'	Accession number
Hsa-miR-9	(5'-UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA-3')	MI0000466
Hsa-miR-486	(5'-UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG-3')	MIMAT0002177

جدول ۲ توالی الیگونوکلوئیدها

الیگونوکلوئیدها	توالی ۵'-۳'
Capture probe 9	SH-TTTTTTTTTTTTTTTTCATACAGCTAG
Capture probe 486	SH-TTTTTTTTTTTTTTTCTCGGGGCAGC
Detection probe 9	TGTTTCCAATAGATCGACATACT-Biotin
Detection probe 486	TCAGTACAGGATTTTTTTTTTTTTT-Biotin

واکنش مورد نظر به مدت زمان مطلوب در دمای اتاق و تحت هم زدن مغناطیسی مداوم ادامه پیدا کرد. در مرحله بعد، برای حذف محصولات جانبی باقیمانده، مخلوط واکنش با استفاده از کیسه دیالیز در برابر آب دیونیزه به مدت سه روز دیالیز شد. در نهایت، کیتوزان استیک اسید سنتز شده با استفاده از خشک کن انجمادی لیوفیلیز شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای شناسایی و ادامه ی روند آزمایش نگهداری شد.

۲-۴ تیولاسیون کیتوزان استیک اسید

سنتز کیتوزان پالمیتیک اسید با تثبیت پیوندهای آمیدی بین گروه های آمینه اولیه کیتوزان در پلیمر کیتوزان-پالمیتیک اسید و گروه های اسید کربوکسیلیک در ال سیستین انجام شد. این واکنش توسط EDAC و NHS به عنوان فعال کننده ال سیستین انجام شد. به طور خلاصه، ۱۲۵ میلی مولار EDAC و ۱۱۲،۵ میلی مولار NHS به طور جداگانه

۲-۳ سنتز کیتوزان-پالمیتیک اسید

۰/۲۵ گرم کیتوزان در ۲۵ میلی لیتر محلول اسید پالمیتیک آبی ۰/۵ درصد حل شد و در طول ۲۴ ساعت در دمای اتاق با استیرر مغناطیسی هم زده شد تا محلول کیتوزان (۱) درصد وزنی - حجمی) به دست آید. سپس، برای مشاهده اولین نشانه های ته نشینی، محلول کیتوزان تهیه شده با استفاده از محلول های ۰،۵، ۰،۱ و ۰،۲ مولار سدیم هیدروکسید قلیایی شد تا غلظت سدیم هیدروکسید مورد استفاده بهینه شد. علاوه بر این، ۲ میلی مولار EDAC و ۱،۸ میلی مولار NHS (غلظت نهایی) به محلول اضافه شد و به مدت زمان کافی هم زده شد تا این اسید چرب اشباع، فعال شود. سپس، محلول پالمیتیک اسید فعال شده به صورت قطره ای به محلول کیتوزان از پیش آماده شده اضافه شد.

ای با نانو دراپ اندازه‌گیری شد. پلیت به مدت یک شب در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، سپس، دو بار با آب دیونیزه شسته شد. مایع رویی از هر خانه جمع‌آوری شد و در این مرحله مقدار DNA با نانو دراپ اندازه‌گیری شد. برای اتصال بهتر گروه -SH به گروه تیول هیدروژل کیتوزان، pH محلول باید نسبتاً قلیایی و حدود ۷٫۵ باشد.

۷-۲ اتصال میکرو RNA و کاوشگر آشکارساز به کاوشگر گیرنده

در این مرحله با افزودن ۷۰ میکرولیتر بافر SSC^۳ به ۱۰ میکرولیتر از محلول میکرو RNA، محلول میکرو RNA ۱ میکرومولار تهیه شد. به ۱ میکرولیتر گیرنده آشکارساز با غلظت ۱۰۰ پیکومول در میکرولیتر، ۹۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه شد و آزمایش طبق مراحل زیر انجام شد. در این مرحله با افزودن ۷۰ میکرولیتر بافر SSC به ۱۰ میکرولیتر محلول میکرو RNA، محلول میکرو RNA ۱ میکرومولار تهیه شد. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق برای انجام واکنش مهلت داده شد. مشابه مرحله اول، به خانه‌ها در پلیت کشت سلولی اضافه شد. پس از گذشت زمان کافی در انکوباتور، دو بار شستشو انجام شد و مایع رویی برای آنالیز توسط نانو دراپ جمع‌آوری شد. سپس، ۹۰ میکرولیتر آب دیونیزه به ۱ میکرولیتر گیرنده آشکارساز حاوی بیوتین با غلظت ۱۰۰ پیکومول در میکرولیتر اضافه شد و زمان واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق داده شد. محلول به خانه‌ها در پلیت کشت سلولی اضافه شد. پس از یک روز در انکوباتور ۳۸ درجه، دو بار شستشو انجام شد و مایع رویی توسط نانو دراپ جمع‌آوری شد تا میزان DNA و پروتئین بررسی شود. جهت انجام تست اختصاصیت، از 9 Capture-prob و miR-486 استفاده شد.

۸-۲ ارزیابی نهایی توسط استرپتاویدین متصل به FITC

در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شدند. سپس، این دو محلول در حالی که به مدت ۱ ساعت در تاریکی به صورت مغناطیسی هم زده می‌شدند، به ۵۰۰ میلی‌گرم ال سیستین اضافه شدند. علاوه بر این، ۰٫۲۵ گرم Chi-PA^۱ در مقدار کافی اسید استیک ۱ درصد تحت هم زدن مداوم حل شد. پس از آن، محلول L-سیستین فعال شده به آرامی به طور قطره ای به Chi-PA اضافه شد. پلیمر کونژوگه حاصل در تاریکی در محلول حاوی ۵ میلی‌مولار HCL حاوی ۱ درصد NaCl در مدت زمان مناسب دیالیز شد. پلیمر تیوله شده‌ی نهایی لیوفیلیز شد و تا استفاده بعدی در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۶].

تمام نمونه‌ها به صورت پودر ورقه‌ای به دست آمدند. طیف FTIR توسط طیف سنج مادون قرمز^۲ نسخه ۱۰،۴،۱ طیف PerkinElmer ثبت شد.

۵-۲ تهیه هیدروژل کیتوزان تیوله

ابتدا غلظت‌های مختلف هیدروژل را تهیه شد. برای این منظور از پلیت ۹۶ خانه کشت سلولی برای ایجاد سطوح کوچک برای آزمایش (off-chip) استفاده شد. محلول هیدروژل ۲ درصد تهیه شد. ۱٫۶ میلی‌گرم کیتوزان لیوفیلیزه در ۸۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل شد و سپس ۱۰۲۴ بار رقیق شد. برای خشک شدن آب هیدروژل، پلیت به مدت یک روز در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد [۱۶].

۶-۲ اتصال کاوشگر گیرنده به هیدروژل تیوله کیتوزان

ابتدا ۱۲ میکرولیتر ۱۰۰ پیکومول در هر میکرولیتر محلول الیگونوکلوئیدی (کاوشگر گیرنده ۴۸۶) به ۱۲ میکرولیتر محلول ۰٫۱ نرمال DTT اضافه شد. پس از ۳۰-۲۰ دقیقه قرار گرفتن در دمای محیط برای عمل DTT و شکستن پیوند S=S، ۵۶ میکرولیتر آب به محلول اضافه و ۱ میکرومولار محلول DNA تهیه شد. سپس، در مدت زمان مناسب مخلوط شد. در این مرحله مقدار DNA تک رشته

^۳ Saline-Sodium Citrate Buffer

^۱ Chitosan-Palmitic Acid

^۲ Fourier Transform Infrared Spectrometer

۲-۱۰ تهیه الاستومر PDMS و ساخت تراشه سیلیکونی
 الاستومر پلی دی متیل سیلوکسان (PDMS) از ترکیب PDMS پایه و ماده پلیمریزه کننده تشکیل می شود. این پلیمر به دلیل شفافیت، خنثی بودن الکتریکی و شیمیایی، عدم واکنش با ترکیبات سلولی، مولکولی و بافرها، نفوذپذیری به گازها و عدم سمیت، به طور وسیع در میکروفلوئیدیک استفاده می شود. برای تهیه این الاستومر، PDMS پایه و ماده پلیمریزه کننده به نسبت وزنی ۱۰:۱ کاملاً با یکدیگر مخلوط شده، مستر سیلیکونی چپ در ظرفی قرار داده شد و مخلوط PDMS پایه و ماده پلیمریزه کننده بر روی آن ریخته شد. سپس، ظرف در دسیکاتور قرار گرفت و به مدت حداقل ۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۶۵ درجه حرارت داده شد تا پلیمر بسته شده و سفت شود. PDMS پس از بسته شدن به شکل لایه ای بسیار نازک، به آرامی از مستر جدا شد و بخش های اضافی برش داده شد و بین دو لام قرار گرفت. طرح میکروکانال ها بر روی PDMS و لام ها باقی ماند. در این مرحله با توجه به تعیین مقادیر مختلف از هیدروژل در مرحله ی قبل، ۲۵، درصد به عنوان غلظت بهینه انتخاب شد.

جدول ۳ میزان هریک از مواد استفاده شده در تست دوم

نام لام	میکرو RNA	کاوشگر آشکارسازی	بافر سالین سدیم سیترات	غلظت میکرو RNA
C8	تست اول	۱ میکرولیتر	۹۹ میکرولیتر	-
C7	تست دوم	-	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰ نانومولار
C6	تست سوم	۲۰ میکرولیتر	۲۰۰ میکرولیتر	۱۰۰۰ پیکومولار
C5	تست چهارم	۵۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۵۰۰ پیکومولار
C4	تست پنجم	۲۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ پیکومولار
C3	تست ششم	۱۰ میکرولیتر	۱۰۰۰ میکرولیتر	۱۰۰۰ فمتو مولار
C2	تست هفتم	۵۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۵۰۰ فمتو مولار
C1	تست هشتم	۲۰ میکرولیتر	۱۰۰۰ میکرولیتر	۱۰ فمتو مولار

هر چپ حدود ۲،۲ پیکومول بر ماکرولیتر بود. سایر مواد مطابق جدول ۳ مخلوط شده و در چپ مورد مطالعه

پس از پایان هیبریدا سیون، خانه های پلیت کشت سلولی دو بار با آب دیونیزه شسته شدند. مقدار ۰،۵ میکرولیتر استرپتاویدین متصل به FITC^۱ به ۸۲ میکرولیتر بافر PBS^۲ اضافه شد و ۱۶۴ بار رقیق شد. پس از رقیق سازی، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد و به هر خانه ۱۰ میکرولیتر از این محلول اضافه شد. سلول ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند تا واکنش نشان دهند و سپس دو بار با آب دیونیزه شسته شدند. در نهایت با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده و بررسی شدند. ارزیابی نهایی در تاریکی انجام شد.

۲-۹ ساخت سیستم با چپ میکروفلوئیدیکی حاوی پلی دی متیل سیلوکسان (PDMS)

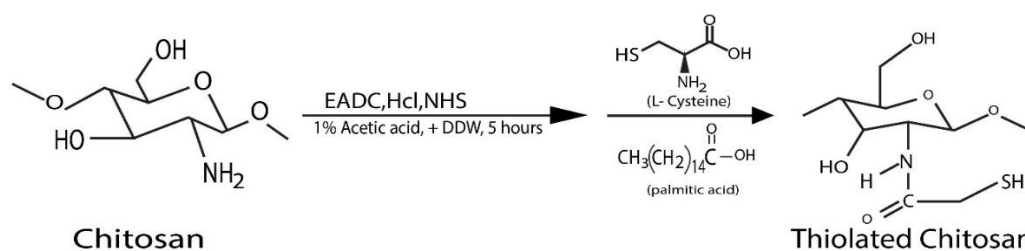
طراحی و ترسیم نقشه تراشه های میکروفلوئیدیکی حاوی پلی دی متیل سیلوکسان (PDMS)^۳ با استفاده از نرم افزار Adobe Illustrator انجام شد. این تراشه برای به دام انداختن میکرو RNA موجود در مایع رویی سلول های کشت داده شده سرطانی طراحی شده است. ساخت تراشه های سیلیکونی الگو مورد استفاده در پژوهش حاضر، توسط شرکت فنون ریز تراشه میزان انجام شد.

ابتدا به ورودی هر ۸ کانال به اندازه ی مقدار بهینه، هیدروژل وارد شد. میزان کاوشگر گیرنده اضافه شده به

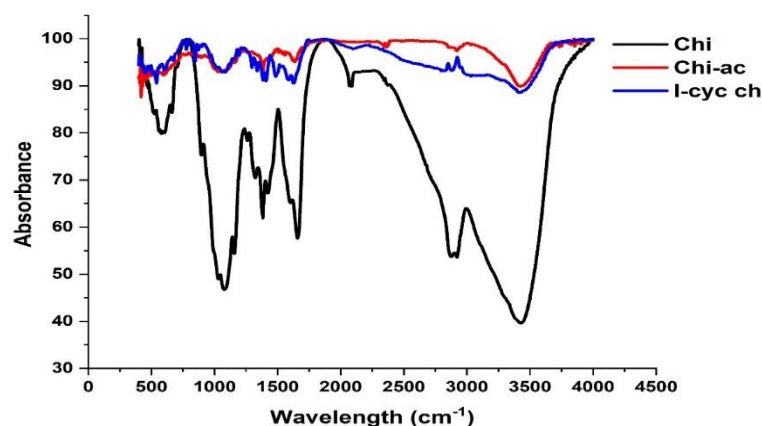
^۳ Polydimethylsiloxane

^۱ Fluorescein Isothiocyanate

^۲ Phosphate Buffered Saline



شکل ۱ کونژوگاسیون کیتوزان-سیستئین.



شکل ۲ طیف های FTIR کیتوزان، کیتوزان-اسید استیک و کیتوزان تیوله.

نشان داده شده است، طیف جذب الیگونوکلیوتید کاهش یافت. در جدول ۴ نیز نشان داده شده است که، غلظت کاوشگرها پس از افزودن DTT کاهش می‌یابد که به دلیل جدا شدن توالی محافظت کننده است که شامل چند نوکلئوتید بود.

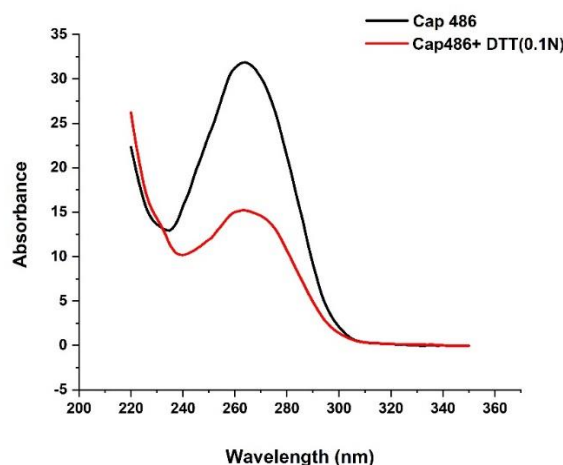
۳-۴ اتصال میکرو RNA و کاوشگر گیرنده به کاوشگر آشکارساز

برای تشخیص از واکنش بیوتین-استرپتاویدین استفاده شد. تمایل استرپتاویدین به بیوتین برای واکنش یکی از قوی‌ترین واکنش‌های غیر کووالانسی شناخته شده است. کاوشگر آشکارساز حاوی بیوتین است. و در نتیجه این پروتئین حداکثر به چهار مولکول بیوتین متصل می‌شود.

قبل از اتصال به گروه هیدروژل تیول، لازم است اولیگونوکلیوتید بازسازی شود و این توالی جدا شود تا تیول بتواند واکنش نشان دهد. برای این منظور از DTT^۱ استفاده شد.

DTT یک عامل احیا کننده قوی است. در حالت اکسید دارای یک حلقه ۶ عضوی با پیوند دی سولفید داخلی است. یک پیوند دی سولفید معمولی توسط دو واکنش متوالی تبادل تیول دی سولفید انجام شد. DTT با محلول DNA مخلوط شد و واکنش نشان داد و سپس با شستشو حذف شد. پس از اتصال کاوشگر گیرنده به DTT، توالی محافظ که از طریق پیوند دی سولفیدی به کاوشگر گیرنده (capture prob) متصل بود، توسط DTT احیا شد و از آن جدا شد. در نتیجه، همانطور که مقدار DNA در شکل ۳

^۱ Dithiothreitol



شکل ۳ کمی سازی و تجزیه و تحلیل اسید نوکلئیک با استفاده از نانو دراپ

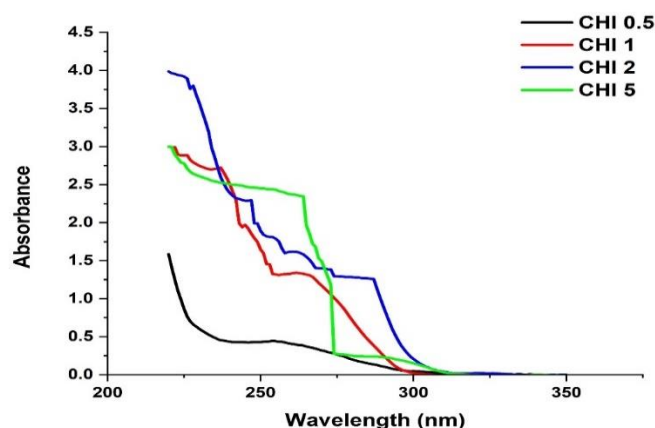
جدول ۴ غلظت الیگونوکلوئیدها

	قبل از اضافه شدن DTT	بعد از اضافه شدن DTT
Cap-486	68 ng/ μ L	52 ng/ μ L

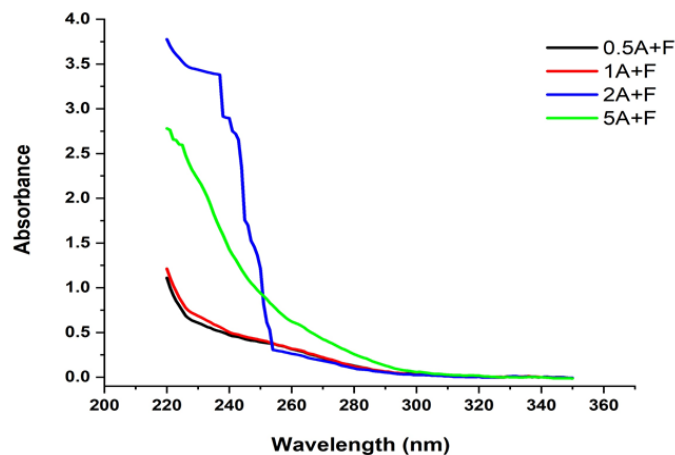
دلیل استفاده از سیستم بیوتین-استرپتاویدین در این کار افزایش تعداد مولکولهای FITC است. FITC مشتقی از فلورسین است که کاربردهای زیادی به ویژه در فلوسایتومتری دارد. مولکول اصلی آن فلورسئین است که یک گروه ایزوتیوسیانات فعال است که جایگزین اتم هیدروژن در یکی از حلقه های آن می شود. هر استرپتاویدین به چندین FITC متصل است که با افزایش فلورسانس کارایی سیستم افزایش داده شد و نور سبز با شدت و کیفیت بالا مشاهده شد. همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است، با افزایش غلظت هیدروژل، طیف جذب نیز بالاتر می رود و در نتیجه، اتصال FITC به الیگونوکلوئید مورد نظر قوی تر می باشد. هرچقدر میزان غلظت هیدروژل بیشتر شود، میزان جذب هیدروژل در محدوده مورد نظر افزایش می یابد و در نهایت در محدوده ۳۴۰ تا ۳۵۰ به هم می رسند.

هر مونومر استرپتاویدین می تواند به یک مولکول بیوتین متصل شود. این اتصال علاوه بر قدرت باندینگ بسیار خاص بوده و با سرعت بالایی انجام می شود. همچنین، در برابر تغییرات دما و pH و وجود حلال های آلی و عوامل دناتوره کننده بسیار مقاوم است. برای تنظیم pH از آب دیونیزه استفاده شد. در این مرحله، مقدار DNA موجود در مایع رویی در هر خانه از پلیت کشت سلولی در شکل ۴ گزارش شده است. همانطور که در شکل ۴ مشخص است، هرچه غلظت هیدروژل بیشتر باشد، مقدار DNA موجود در مایع رویی بیشتر است و در نتیجه طیف جذبی مورد نظر در محدوده طول موج مشخص شده، بالاتر خواهد بود. این روند به این معنا است که میزان جذب DNA با افزایش غلظت هیدروژل مورد نظر کاهش می یابد و مقدار DNA آزاد در شستشوها خارج می شود.

۳-۵ اتصال استرپتاویدین - FITC به کاوشگر گیرنده



شکل ۴: کمیت و آنالیز اسید نوکلئیک در غلظت‌های مختلف هیدروژل.

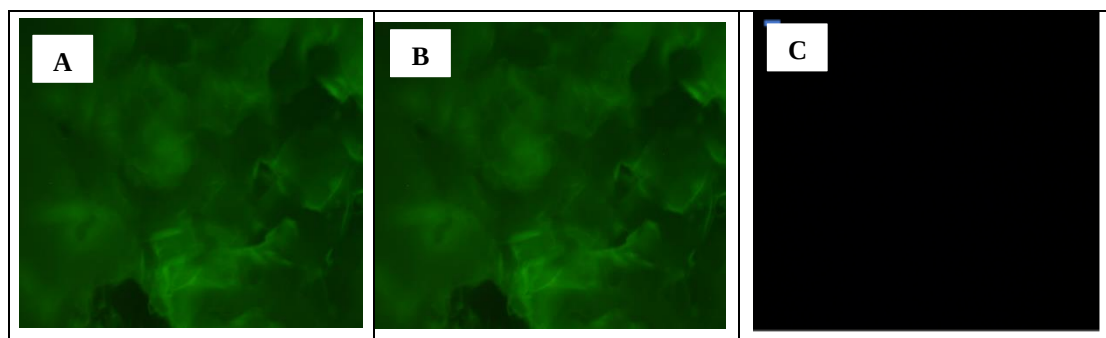


شکل ۵: طیف اتصال FITC در غلظت‌های مختلف هیدروژل.

۳-۶ بررسی تصاویر

پس از تثبیت کاوشگر گیرنده و بقیه گروه‌ها به هیدروژل تیوله در پلیت ۹۶ خانه، انتهای ۳' کاوشگر به انتهای ۳' میکرو RNA در صورت وجود متصل شد. سپس، استرپتاویدین متصل به FITC برای تشخیص استفاده شد و به صورت نقاط سبز روشن توسط میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شد. این مورد در شکل ۶ نشان داده شده است. در شکل ۶ (A)، حضور رنگ سبز پررنگ معادل این است که اتصالات سانددویچی مورد نظر،

صورت گرفته است و این میزان رنگ نشان دهنده‌ی اتصال موفقیت‌آمیز است. (B) در غیاب میکرو RNA غیاب زمینه‌ی تاریک، هیچ رنگ سبزی قابل مشاهده نیست و تنها هیدروژل پایه (بدون میکرو RNA) مشاهده می‌شود، زیرا در نبود میکرو RNA اتصالات پشت سر هم به درستی انجام نمی‌شود. (C) غیاب میکرو RNA در میکروسکوپ زمینه تاریک، در اینجا نیز به دلیل عدم حضور میکرو RNA، اتصالات بعدی صورت نگرفته و در نهایت رنگ سبز مربوط به FITC قابل مشاهده نیست.



شکل ۶ آشکار سازی میکرو RNA توسط رنگ فلوروفور FITC در بستر هیدروژل

حضور میکرو RNA با شستشو حذف می‌شود. نتایج کنترل منفی بدون حضور میکرو RNA-9 در شکل ۷ و نتایج کنترل منفی بدون حضور کاوشگر آشکار سازی در شکل ۸ مشاهده می‌شود. همچنین، نتایج در غلظت‌های متفاوت میکرو RNA-9 در شکل ۹ مشاهده می‌شود.

۷-۳ استفاده از تراشه میکروفلوئیدیک برای تثبیت و

شناسایی میکرو RNA-9

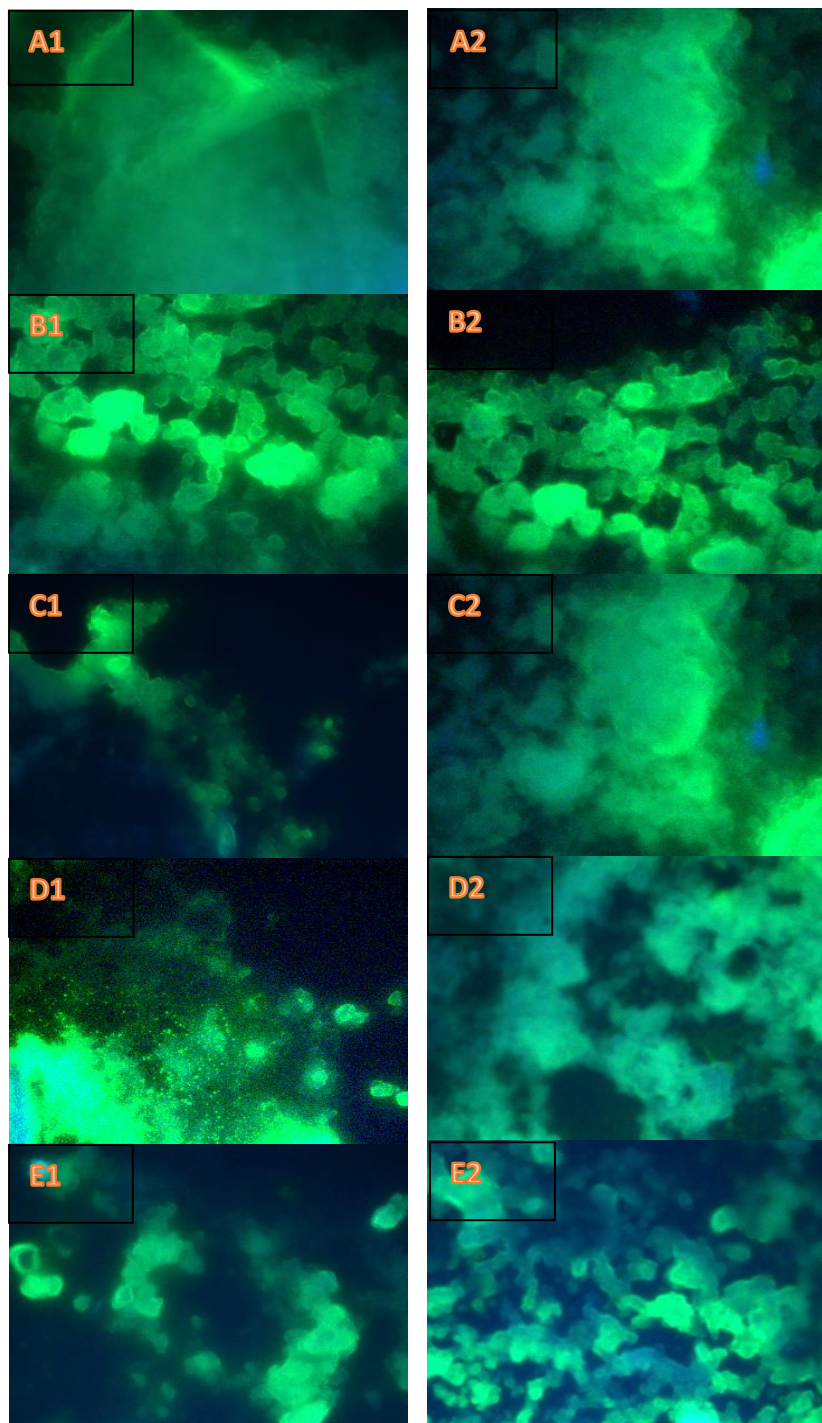
وجود لکه‌های سبز رنگ در داخل هیدروژل نشان دهنده تثبیت موفقیت‌آمیز میکرو RNA است و در صورت عدم

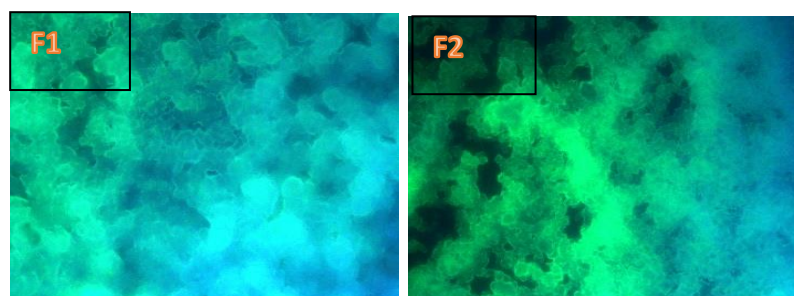


شکل ۷ با توجه به تصویرهای بالا، به دلیل عدم حضور میکرو RNA، رنگ سبز در بستر هیدروژل قابل مشاهده نیست.



شکل ۸ به دلیل عدم حضور کاوشگر آشکار ساز، اتصالی صورت نگرفته است.





شکل ۹ مشاهده FITC در هیدروژل، در حضور میکرو RNA با غلظت‌های مختلف. (A) ۱۰۰۰ پیکومولار میکرو RNA-9. (B) ۵۰۰ پیکومولار میکرو RNA-9. (C) ۱۰۰ پیکومولار میکرو RNA-9. (D) ۱۰۰۰ فمتومولار میکرو RNA-9. (E) ۵۰۰ فمتومولار میکرو RNA-9. (F) ۵۰ فمتومولار میکرو RNA-9.

۴- بحث

روش‌های کنونی تشخیص سرطان به دلیل تشخیص دیر هنگام، باعث شده است که شاخص زنده‌مانی بیماران پس از ۵ سال کم باشد. این شاخص در مورد سرطان ریه حدود ۲۲ درصد می‌باشد [۲۵]. بنابراین، توجه محققین در سال‌های اخیر به استفاده از بیومارکر برای ساخت بیوسنسور و غربالگری جوامع هدف گسیل شده است. میکرو RNA-۹ یکی از میکرو RNA های دخیل در گسترش سرطان ریه است [۲۶]. هدف از این مطالعه اصلاح خصوصیات سطح هیدروژل برای تثبیت، جداسازی و آشکارسازی میکرو RNA ها بود [۱۷]. پلیمرهای طبیعی و مصنوعی مختلفی در تحقیقات هیدروژل با کیتوزان، مورد مطالعه قرار گرفته شده است. کیتوزان یک کوپلیمر کاتیونی طبیعی است که منافع خوبی برای ساختارهای هیدروژل دارد. این پلیمر دارای ماهیت آبدوست با قابلیت تشخیص بالا است که منجر به زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری می‌شود. این دو خاصیت بیولوژیکی معمولاً برای دستگاه‌های بیولوژیکی مورد نیاز است. هیدروژل‌های مبتنی بر کیتوزان به طور بالقوه دارای دستاوردهای تشخیصی هستند [۱۸، ۱۹].

نکته مهم این است که این استراتژی نیاز به کنترل‌کننده‌های جریان خارجی پیچیده را از بین می‌برد و سیستم ما را برای کاربردهای عمیق تر مناسب می‌کند. با این حال، این اندازه‌گیری بر اساس اندازه‌گیری‌های فلورسانس بود و نیازی به ابزارهای تصویربرداری گران قیمت و پیچیده ندارد. در اینجا، از یک رویکرد برچسب زدن فلورسنت مبتنی بر هیدروژل برای تقویت سیگنال و تصویربرداری میدان تاریک استفاده شد. استفاده از روش تشخیص بر بالین بیمار^۱ سیستم هیدروژل باعث افزایش سرعت و کاهش مصرف مواد می‌شود و همچنین تعداد کمتری از میکرو RNA ها را می‌توان مشاهده کرد. این امر به ویژه در سرطان اولیه هنگامی که میزان انتشار میکرو RNA بسیار کم است، اهمیت دارد. در این پژوهش از مقادیر متفاوت (۱۰۰۰ پیکومولار تا ۱ فمتو مولار) میکرو RNA-۹ برای آشکارسازی و محاسبه حد تشخیص استفاده شد. حد تشخیص در این تحقیق ۵۰ فمتو مولار میکرو RNA-۹ تعیین شد و داده‌های ۱ فمتو مولار میکرو RNA-۹ به دلیل عدم تکرارپذیری مناسب غیر قابل استناد بود. هر چند روش آشکارسازی نوری توانایی تشخیص تا ۱ زپتومولار [۲۶] را ندارد. اما با توجه به اینکه غلظت میکرو RNA ها در اوایل سرطان ۲۰۰ تا ۴۰۰ فمتومولار

- al. Ultrasound-assisted catalyst-free thiol-yne click reaction in chitosan chemistry: Antibacterial and transfection activity of novel cationic chitosan derivatives and their based nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;143:143-52.
- [10] Morin-Crini N, Lichtfouse E, Torri G, Crini G. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environmental Chemistry Letters*. 2019;17(4):1667-92.
- [11] Saeed RM, Dmour I, Taha MO. Stable chitosan-based nanoparticles using polyphosphoric acid or hexametaphosphate for tandem ionotropic/covalent crosslinking and subsequent investigation as novel vehicles for drug delivery. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2020;8:4.
- [12] Azmana M, Mahmood S, Hilles AR, Rahman A, Arifin MAB, Ahmed S. A review on chitosan and chitosan-based bionanocomposites: Promising material for combatting global issues and its applications. *International journal of biological macromolecules*. 2021;185:832-48.
- [13] Tekie FSM, Soleimani M, Zakerian A, Dinarvand M, Amini M, Dinarvand R, et al. Glutathione responsive chitosan-thiolated dextran conjugated miR-145 nanoparticles targeted with AS1411 aptamer for cancer treatment. *Carbohydrate polymers*. 2018;201:131-40.
- [14] Shaban NZ, Aboelsaad AM, Shoueir KR, Abdulmalek SA, Awad D, Shaban SY, et al. Chitosan-based dithiophenolato nanoparticles: Preparation, mechanistic information of DNA binding, antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Molecular Liquids*. 2020;318:114252.
- [15] Summonte S, Racaniello GF, Lopodota A, Denora N, Bernkop-Schnürch A. Thiolated polymeric hydrogels for biomedical application: Cross-linking mechanisms. *Journal of Controlled Release*. 2021;330:470-82.
- [16] Luo Q, Han Q, Wang Y, Zhang H, Fei Z, Wang Y. The thiolated chitosan: Synthesis, gelling and antibacterial capability. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;139:521-30.

است [۲۷ و ۲۸]، بیوسنسور مورد نظر کارایی لازم برای غربالگری را دارد و از سویی قابل حمل و نقل می‌باشد که خود مزیت قابل توجه است. [۱۱، ۱۷]

تشکر و قدردانی

بدینوسیله مولفین از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور INSF با شماره گرنت ۹۶۰۰۶۷۵۹ تشکر می‌کنند.

۵-منابع

- [1] Fakhri N, Abarghoei S, Dadmehr M, Hosseini M, Sabahi H, Ganjali MR. Paper based colorimetric detection of miRNA-21 using Ag/Pt nanoclusters. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2020; 227:117529.
- [2] Choi C, Nam J-P, Nah J-W. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2016; 33:1-10.
- [3] Zhao J, Fu W, Liao H, Dai L, Jiang Z, Pan Y, et al. The regulatory and predictive functions of miR-17 and miR-92 families on cisplatin resistance of non-small cell lung cancer. *BMC cancer*. 2015;15(1):1-14.
- [4] Lee D, Zhang W, Shirley SA, Kong X, Hellermann GR, Lockey RF, et al. Thiolated chitosan/DNA nanocomplexes exhibit enhanced and sustained gene delivery. *Pharmaceutical research*. 2007;24(1):157-67.
- [5] Zmay, T.N., et al. Current and prospective protein biomarkers of lung cancer. *Cancers*, 2017. 9(11): p. 155.
- [6] Liu X, Chen Y, Huang Q, He W, Feng Q, Yu B. A novel thermo-sensitive hydrogel based on thiolated chitosan/hydroxyapatite/beta-glycerophosphate. *Carbohydrate Polymers*. 2014;110:62-9.
- [7] Jantus-Lewintre, E., et al., Update on biomarkers for the detection of lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy*, 2012. 3: p. 21.
- [8] Akbuga J, Ozbas-Turan S, Ekentok C. Chitosan Nanoparticles in Gene Delivery. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Springer*; 2016. p. 337-51.
- [9] Kritchenkov AS, Egorov AR, Artemjev AA, Kritchenkov IS, Volkova OV, Kurliuk AV, et

robust gold nanostructures for early diagnosis of lung cancer. *Talanta Open*. Vol 8. 100272-89

[27] Smolarz B, Durczyński A, Romanowicz H, Szyłło K, Hogendorf P. miRNAs in Cancer (Review of Literature). *Int J Mol Sci*. 2022 Mar; 23(5): 2805

[28] Shademan Behrouz et al. MicroRNAs as Targets for Cancer Diagnosis: Interests and Limitations. *Adv Pharm Bull*. 2023 Jul; 13(3): 435–445.

[17] Shandilya R, Ranjan S, Khare S, Bhargava A, Goryacheva IY, Mishra PK. Point-of-care diagnostics approaches for detection of lung cancer-associated circulating miRNAs. *Drug Discovery Today*. 2021;26(6):1501-9.

[18] Azzouz A, Hejji L, Kim K-H, Kukkar D, Souhail B, Bhardwaj N, et al. Advances in surface plasmon resonance-based biosensor technologies for cancer biomarker detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2022;197:113767.

[19] Shafabakhsh R, Yousefi B, Asemi Z, Nikfar B, Mansournia MA, Hallajzadeh J. Chitosan: A compound for drug delivery system in gastric cancer-a review. *Carbohydrate Polymers*. 2020;242:116403.

[20] Li W, Jiang C, Lu S, Wang F, Zhang Z, Wei T, et al. A hydrogel microsphere-based sensor for dual and highly selective detection of Al³⁺ and Hg²⁺. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2020;321:128490.

[21] Kassahun G, Griveau S, Juillard S, Champavert J, Ringuede A, Bresson B, et al. Hydrogel matrix-grafted Impedimetric Aptasensors for the detection of Diclofenac. *Langmuir*. 2020;36(4):827-36.

[22] Gam JJ, Babb J, Weiss R. A mixed antagonistic/synergistic miRNA repression model enables accurate predictions of multi-input miRNA sensor activity. *Nature communications*. 2018;9(1):1-12.

[23] Chen W, Cai B, Geng Z, Chen F, Wang Z, Wang L, et al. Reducing false negatives in COVID-19 testing by using microneedle-based oropharyngeal swabs. *Matter*. 2020;3(5):1589-600.

[24] Martínez-Ruvalcaba A, Chornet E, Rodrigue D. Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. *Carbohydr Polym*. 2017;67:586–595.

[25] Da Som Jeon et al. Five-Year Overall Survival and Prognostic Factors in Patients with Lung Cancer: Results from the Korean Association of Lung Cancer Registry (KALC-R) 2015. *Cancer Res Treat*. 2023 Jan; 55(1): 103–111

[26] Sahafnejad Z, Hashemzadeh H, Allahverdi A, Fathi A, Saievar-Iranizad E, Naderi-Manesh H. Sensitive detection of miR-9 in human serum: An electrochemical approach utilizing

Design and construction of a microRNA-9 detection system for lung cancer in hydrogel platform

Morvarid Tajik¹, Abdollah Allahverdi^{2*}, Hossein Naderi-Manesh³

1. MSc Student, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Assistant Prof, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

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

a-allahverdi@modares.ac.ir

Receipt: 2023/03/25

Accepted: 2025/04/15

Abstract

Cancer is one of the causes of death in human societies, and the main reason for failure in its treatment is late diagnosis and involvement of other body organs. Biomarkers measurement of body fluids can be one of the most important methods of cancer screening and diagnosis in the early stages. Circulating microRNAs have been proposed as new biomarkers for cancer diagnosis and prognosis. The use of these molecules, in addition to early and timely diagnosis before metastasis, will reduce the damage to the patient due to the possibility of non-invasive access. Therefore, developing a method to identify, reveal and quantify it is a necessity. In this study, a biosensor was designed to isolate and identify circulating blood microRNAs in a hydrogel platform. In our work, microRNA was isolated using a single-stranded DNA receptor probe and fixed in a platform containing hydrogels. By attaching the microRNA to the probe, the second probe, which complements the biotinylated DNA at the top of the microRNA, forms a sandwich structure. Finally, microRNA trapped between the two probes was detected by FITC-bound streptavidin in the hydrogel platform. In this research, different concentrations of microRNA-9 from 1000 picomolar to 1 femtomol were used to estimate the limit of detection (LOD) of the designed biosensor, and 50 femtomol was measured as the detection limit.

Keywords: Biomarker, Chitosan, Streptavidin-FITC, MicroRNA-biosensor.