

اصلاح خصوصیات سطح در سیستم میکروفلوئیدیک به منظور شناسایی miR-21 و

miR-486 در سرطان ریه

الهام کشاورز باحقیقت^۱، عبدالله اله وردی^{۱*}، مسلم صدقی^۱، علیرضا نادری سهی^۲، فاطمه کوه کن^۲ و حسین نادری منش^{۱*}

^۱ ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه نانوبیوتکنولوژی/بیوفیزیک

^۲ ایران، تهران، مرکز تحقیقات فن آوری بن یاخته

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۱۲

چکیده

میکرو RNA های گردشی به عنوان بیومارکرهایی جدید جهت تشخیص و حتی پیش‌آگاهی سرطان مطرح شده‌اند. استفاده از این مولکولها علاوه بر تشخیص زودهنگام و به موقع پیش از متاستاز، به دلیل امکان دستیابی غیرتهاجمی، موجب کاهش آسیبهای وارد شده به بیمار خواهند شد. در این مطالعه، بیوسنسوری جهت جداسازی و شناسایی میکروRNAهای گردشی خون در بستر میکروفلوئیدیک طراحی شده است. انتخاب بر پایه تحقیقات گذشته مبنی بر دخالت دو میکروRNA (miR-21 و miR-486) در ایجاد و گسترش سرطان ریه و همچنین استفاده به عنوان بیومارکر تشخیصی، انجام شده است. در این سیستم بر روی چیپ میکروفلوئیدیک، با استفاده از کاوشگر گیرنده (DNA تک رشته) که به وسیله لینکر GPTMS بر روی سطح PDMS تثبیت شده، جداسازی میکروRNA انجام شد. با اتصال میکروRNA به این پروب، پروب دوم که DNA بیوتینه مکمل بخش بالایی میکروRNA است به آن متصل شده و ساختار ساندویچی ایجاد می‌کند. در نهایت میکروRNA به دام افتاده میان دو کاوشگر به وسیله استرپتاویدین متصل به FITC تشخیص داده شد.

واژه های کلیدی: میکروRNA، سرطان ریه، تشخیص سرطان، میکروفلوئیدیک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۷۴۹، پست الکترونیکی: naderman@modares.ac.ir و a-allahverdi@modares.ac.ir

مقدمه

بدخیمی ناشی از بافت پوششی به کار می رود. روشهای تشخیص این سرطان غالباً بر پایه روشهای تصویربرداری و در ادامه انجام بیوپسی و برونکوسکوپی است. این روشها عبارتند از: رادیوگرافی قفسه سینه، CT اسکن و PET اسکن، برونکوسکوپی، بافت برداری اسپیراسیون و پرتونگاری با استفاده از تشدید میدان میغناطیسی (MRI).

با توجه به اینکه هم اکنون این سرطان ریه در مراحل پیشرفته تشخیص داده می شود، متأسفانه بیش از ۷۵ درصد از سرطانهای ریه هنگامی تشخیص داده می‌شوند که تومور

سرطان ریه دومین سرطان شایع در مردان و زنان است و با اختلاف زیاد اصلی‌ترین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در جهان، با حدود یک میلیون فوت در سال است (۵). علت اصلی مرگ و میر بالا در این سرطان، عدم وجود نشانه های بالینی در مراحل اولیه سرطان ریه می باشد. این امر موجب تشخیص دیرهنگام بیماری شده و سرطان ریه را تبدیل به کشنده ترین سرطان در جهان کرده است (۱۶). عبارت Lung Cancer در مورد تومورهایی به کار می‌رود که از اپیتلیوم مجاری تنفسی (برونش، برونشیولها، و آلوئولها) نشأت گرفته. بنابراین لغت کارسینوم در مورد

می‌شوند(۸)، تخمین زده می‌شود که میکرو RNA ها حدود ۳۰ درصد از ژنوم کد کننده پروتئین در انسان را تنظیم کند(۲).

در بسیاری از مسیرهای تومورزاییهای انسانی تغییر بیان میکرو RNA وجود دارد. بنابراین احتمال داده می‌شود، میکرو RNA ها به عنوان دسته جدیدی از ژنهای انکوژن یا تومورسپرسور نقش مهمی داشته باشند (۱۰). سطح بیان میکرو RNA های انکوژن که انکومیر نامیده می‌شوند، در سرطانهای مختلف افزایش می‌یابد. این میکرو RNA ها غالباً با مهار ژنهای تومورسپرسور و/ یا ژنهایی که تمایز سلولها یا آپوپتوز را کنترل می‌کنند، موجب پیشرفت تومور می‌شوند. با وجود این میکرو RNA های زیادی هم می‌توانند تومورسپرسور در نظر گرفته شوند زیرا بیان آنها در سلولهای بدخیم کاهش می‌یابد. این میکرو RNA ها می‌توانند با مهار منفی انکوژنها و/ یا ژنهایی که تمایز سلولی یا آپوپتوز را مهار می‌کنند، عملکردشان را انجام دهند(۲ و ۸). بنابراین، این میکرو RNA ها می‌توانند بیومارکر خوبی برای تشخیص سرطان در ابتدایی ترین مراحل تشخیص باشد. به طور مثال، حسین پور فیضی و همکاران افزایش بیان miR16 را در سرطان سینه با استفاده از PCR اندازه گیری کردند و تأیید کردند در بیماران سرطانی (حتی در ابتدای سرطان که با هیچ روش دیگری قابل اثبات نیست) افزایش بیان miR16 نسبت به افراد سالم کاملاً مشهود است(۶). همچنین این گروه دریافتند افزایش میزان بیان miR 4270 در مواردی از سرطان سینه که به سایر بافتها تهاجم می‌کند، الزامی است (۱).

میکروفلوئیدیک هم به عنوان دانش مطالعه رفتار مایعات درون میکروکانالها و هم تکنولوژی کوچک سازی کانالها و تونلها در حد میکرو جهت جریان یافتن مایعات مورد توجه قرار می‌گیرد (۱۳). میکروفلوئیدیک با حجم بسیار کم مایعات، در حدود میکرولیتر در ارتباط است. رفتار

در محل پیشرفت کرده یا متاستاز داده و در این شرایط کمتر از ۱۵ درصد افراد بیمار تا ۵ سال بعد زنده خواهند ماند. درحالی که بیماری که زودتر تشخیص داده شوند شانس درمان و زنده مانی بسیار بهتر است. به عبارت دیگر در صورت تشخیص در مراحل اولیه بیماری، بیش از ۵۰ درصد افزایش بقای عمر تا ۵ سال وجود دارد. بنابراین نیاز مبرمی جهت تشخیص سرطان در مراحل اولیه مخصوصاً پیش از متاستاز وجود دارد. این مسئله موجب توجه بیشتر به یک روش غربالگری کارآمد در تشخیص سرطان در مراحل اولیه، خصوصاً برای گروههای با ریسک بالا مانند افراد سیگاری، می‌شود.

تاکنون تعدادی مولکول مانند آنتی ژن سرطان جنینی (Carcinoembryonic antigen)، سایتوکراتین ۱۹ (Cytokeratin 19)، آنزیم انولاز ویژه عصب (-Neuron specific enolase) با هدف استفاده به عنوان بیومارکر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند(۵ و ۷). این بیومارکرها اگرچه در سرم مبتلایان به سرطان ریه بالا می‌روند، اما حساسیت و ویژگی لازم را ندارند و برای تشخیص افراد بدون علائم، قابل اعتماد نیستند؛ همچنین تولید گسترده آنها بسیار هزینه بر بوده و مقرون به صرفه نمی‌باشد.

بسیاری از میکرو RNA ها در گستره وسیعی از فرآیندهای بیولوژیکی و پاتولوژیکی شامل تکامل، تکثیر سلولی، متابولیسم، تمایز، انتقال پیام و پاسخ به استرس نقش دارند(۲ و ۴) و از زمان کشف اولین میکرو RNA در نماتود *C.elegans*، بیش از ۳۰۰۰۰ میکرو RNA بالغ در ۲۰۶ گونه شناسایی شده‌اند (۳).

بسیاری از ژنها، نقاط هدف برای تنظیم شدن به وسیله میکرو RNA را دارند. یک میکرو RNA توانایی تنظیم بیان چندین ژن را دارد که موجب افزایش پیچیدگی این شبکه تنظیمی می‌شود. در انسان بیش از ۸۰۰ میکرو RNA شناخته شده‌است که بسیاری از آنها در مراحل خاص تکامل یا در مسیرهای مخصوص هر بافت بیان

امکان تشخیص به صورت غیر تهاجمی وجود دارد. همچنین در این طراحی از سیستم میکروفلوئیدیک استفاده گردید تا علاوه بر مصرف کمتر نمونه و مواد بتوان سرعت انجام تست را افزایش داد (۱۵).

مواد و روشها

انتخاب میکرو RNA های مناسب و سفارش توایها: طبق گزارشات در سرطان ریه مقدار بیان بعضی میکرو RNA ها در سرم خون افراد بیمار افزایش می‌یابد که قابل بررسی و اندازه‌گیری است. پس از بررسیها، در نهایت miR 21 و miR 486-5p انتخاب شدند (۹ و ۱۴).

جهت انتخاب توای این میکرو RNA ها از سایت miRBase استفاده شد. توای این دو میکرو RNA در جدول ۱ ذکر شده است.

هیدرومکانیکی سیالات در محدوده میکرومتر با رفتار آنها در حجم بالا متفاوت است. این ویژگی خاص، کلیدی برای آزمایشهای علمی و نوآوریهاست. برای رسیدن به میکروفلوئیدیک باید در نهایت یکی از ابعاد کانال در محدوده یک تا دهها میکرومتر باشد. از مزایای میکروفلوئیدیک می‌توان به مصرف کمتر نمونه و مواد، افزایش انتقال گرمایی، افزایش سرعت جداسازی، انجام موازی و همزمان تستها، قابلیت حمل و نقل و افزایش کارایی جداسازی اشاره کرد (۱۱-۱۲).

هدف از این مطالعه طراحی بیوسنسوری جهت تشخیص زودهنگام سرطان ریه است و برای این کار از ثبیت میکرو RNA بر روی سطح استفاده گردید. وجود میکرو RNA های گردشی در خون یکی دیگر از مزایای استفاده از این مولکولهاست که در این تحقیق از آنها استفاده شد زیرا تنها با استفاده از چند قطره سرم خون

جدول ۱- توای ریبونوکلوئیدی miR 21 و miR 486-5p

نام میکرو RNA	توای ۵'-۳'	Accession number
hsa-mir-21	<i>UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA</i>	MI0000077
hsa-miR-486-5p	<i>UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG</i>	MIMAT0002177

جدول ۲ طراحی شدند، و به شرکت تکاپوزیست سفارش داده شدند.

پس از انتخاب توای میکرو RNA ها از سایت، توایهای کاوشگرها به صورت مکمل با میکرو RNA ها مطابق

جدول ۲- **Error! No text of specified style in document.** توای اولیگونوکلوئیدها

اولیگونوکلوئید	توای ۵'-۳'
Capture probe 21	<i>SH-TTTTTTTTTTTTTTTTCAACATCAGT</i>
Capture probe 486	<i>SH-TTTTTTTTTTTTTTTTCTCGGGGCAGC</i>
Detection probe 21	<i>CTGATAAGCTATTTTTTTTTTTTTT-Biotin</i>
Detection probe 486	<i>TCAGTACAGGATTTTTTTTTTTTTT-Biotin</i>
miR 21	<i>UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA</i>
miR 486	<i>UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG</i>

بر ماکرولیتر از هریک از این اولیگونوکلوئیدها به دست آمد. برای میکرو RNA ها از آب DEPC استفاده شد.

طراحی و ساخت تراشه سیلیکونی: طراحی و ترسیم نقشه تراشه ها با استفاده از نرم افزار Adobe Illustrator انجام

آماده سازی اولیگونوکلوئیدها: اولیگونوکلوئیدها به صورت لیوفیلیزه تحویل شد و هنگام استفاده در آب مقطر حل شدند. پس از افزودن مقدار مشخصی آب (که در دستورالعمل شرکت قید شده بود)، غلظت ۱۰۰ پیکومول

GPTMS رقیق شده با متانول به میزان ۱۵۰ ماکرولیتر از داخل کانالهای چپ عبور داده شد و ۵-۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه قرار داده شد، سپس با پمپ گاز (نیتروژن) خالی و کاملاً خشک گردید.

اتصال کاوشگر گیرنده (capture probe) به لینکر:

ابتدا ۹۰ ماکرولیتر آب به ۱۰ ماکرولیتر از محلول DNA با غلظت ۱۰۰ پیکومول بر ماکرولیتر اضافه کرده و محلول ۱۰ پیکومول بر ماکرولیتر DNA آماده شد. در این مرحله با نانو درآپ میزان DNA تک رشته اندازه‌گیری شد.

سپس به ۱۰۰ ماکرولیتر، از محلول اولیگونوکلوئوتید ۵ پیکومول بر ماکرولیتر، ۲۵ ماکرولیتر محلول DTT ۰/۱ نرمال، اضافه گردید. بعد از اینکه ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت تا DTT عمل نموده و پیوند S=S شکسته شود، سپس ۲۰۰ ماکرولیتر اتیل‌استات به این محلول اضافه و ۹۰ ثانیه ورتکس شد، سپس ۱۰ دقیقه زمان داده شد تا DTT توسط اتیل‌استات به بالا کشیده شود. محلول دو فاز تشکیل می‌دهد فاز روئی اتیل‌استات حاوی DTT می‌باشد که جدا و دور ریخته شد و فاز زیرین DNA محلول در آب است. این کار سه بار تکرار گردید تا DTT کاملاً جدا شود. پس از جدا شدن بخش انتهایی اولیگونوکلوئوتید و آزاد شدن گروه SH، محلول باید سریعاً استفاده شود. در این مرحله نیز میزان DNA با نانو درآپ اندازه‌گیری شد.

اتصال کاوشگر گیرنده به لینکر: جهت اتصال بهتر گروه SH به گروه اپوکسی، pH محلول باید نسبتاً قلیایی و در حدود ۸/۵ باشد. برای افزایش pH، از تری‌اتیل‌آمین استفاده شد. به این محلول حاوی کاوشگر گیرنده، ۱۰۰ ماکرولیتر از TEA اضافه گردید تا pH محلول به ۸ برسد.

در کانال میکروفلوئیدیک پوشانده شده با لینکر، ۱۰۰ ماکرولیتر DNA فعال شده وارد گردید و یک شب در انکوباتور با دمای ۳۶ درجه قرار گرفت. پس از این چپ

شد. این تراشه به منظور به دام انداختن میکرو RNA موجود در مایع روئی سلولهای کشت داده شده سرطانی طراحی شده است. ساخت تراشه‌های سیلیکونی (الگو) مورد استفاده در این تحقیق توسط شرکت فنون ریز تراشه میزان انجام شد.

تهیه الاستومر PDMS و کپی برداری از تراشه سیلیکونی:

PDMS از ترکیب PDMS پایه و ماده پلیمریزه‌کننده تشکیل می‌شود. این پلیمر به دلیل شفافیت، خنثی بودن الکتریکی و شیمیایی، عدم واکنش با ترکیبات سلولی و بافرها، نفوذپذیری به گازها و عدم سمیت برای ترکیبات سلولی، به طور وسیع در میکروفلوئیدیک به کار می‌رود. جهت تهیه این الاستومر، PDMS پایه و ماده پلیمریزه کننده به نسبت وزنی ۱:۱۰ 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 و 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 آرامی از مستر جدا گردید و بخشهای اضافی برش داده شد. طرح میکروکانالها بر روی PDMS باقی ماند. به وسیله یک سوزن تیز (شکافنده) منافذی روی ورودیها و خروجیهای کانال ایجاد گردید. سپس PDMS به همراه یک لامل به مدت ۴۵ ثانیه درون دستگاه Harrick Plasma etching قرار گرفت و در نهایت PDMS به لامل چسبانده و ۲ دقیقه بر روی هیتر در دمای ۹۵-۱۰۰ قرار گرفت تا کاملاً به یکدیگر متصل شوند.

اتصال لینکر به سطح PDMS: لینکر GPTMS، جهت

اتصال به سطح در متانول به نسبت حجمی ۲ درصد، (۲% ۷/۷) حل گردید. پس از آماده سازی محلول لینکر، چپ ساخته شده از PDMS، به مدت ۴۵ ثانیه درون دستگاه Plasma etching system قرار گرفت تا سطح آن اکسید شده و گروه عاملی سیلان ایجاد شود. سپس محلول لینکر

میکروفلویدیک را از انکوباتور خارج کرده و جذب نوری مایع درون میکروکانال با نانو دراپ اندازه‌گیری شد.

تأیید اتصال کاوشگر گیرنده به لینکر: جهت تأیید اتصال کاوشگر گیرنده به لینکر توسط DNase، ابتدا حدود ۱۷ نانوگرم از کاوشگر گیرنده بر روی سطح PDMS تثبیت شد. در چپ، کنترل مراحل بدون افزودن لینکر انجام شد. پس از انکوباسیون و تثبیت و شستشوی کامل چپ، از DNase جهت تعیین میزان DNA درون میکروکانال استفاده شد.

در هر چپ ۰/۵ میکرولیتر آنزیم DNase، ۴ میکرولیتر بافر مخصوص و ۳۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد و ۳۰ دقیقه در دمای محیط، جهت انجام واکنش زمان داده شد. سپس پساب از چپ خارج و جهت بررسی توسط نانودراپ جمع‌آوری شد.

اتصال میکرو RNA و کاوشگر آشکارساز به کاوشگر گیرنده: چپ حاوی کاوشگر گیرنده به آرامی با بافر SSC شست‌وشو داده شد، سپس با افزودن ۹۰ میکرولیتر آب DEPC به ۱۰ میکرولیتر از محلول میکرو RNA با غلظت ۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر، محلول ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر میکرو RNA آماده شد. به ۱۰ میکرولیتر کاوشگر آشکارسازی با غلظت ۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۹۰ میکرولیتر بافر هیبریداسیون اضافه شد و آزمایش طبق مراحل زیر انجام شد.

آزمایش سیستم با miR-486: پس از ساختن چپ از PDMS و فعال‌سازی با لینکر، کاوشگر گیرنده به هر چپ حدود ۴/۲ پیکومول بر میکرولیتر اضافه شد. کاوشگر آشکارسازی، میکرو RNA، RNase inhibitor و بافر هیبریداسیون مطابق جدول ۳ مخلوط شده و در چپ مورد مطالعه تزریق شد. سپس حدود ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند تا هیبریداسیون انجام گیرد

جدول ۳- میزان هر یک از مواد استفاده شده در تست اول miR-486

غلظت میکرو RNA (پیکومول بر میکرولیتر)	آنزیم RNase inhibitor	بافر هیبریداسیون	کاوشگر آشکارسازی (۱۰ پیکومول)	میکرو RNA (۱۰ پیکومول)	نمونه
۳/۳ پیکومول	۳ میکرولیتر	۱۲ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر
-	-	۱۲ میکرولیتر	۲۳ میکرولیتر	-	کنترل

مطابق جدول ۴ مخلوط شده و در چپ مورد مطالعه تزریق شدند. سپس حدود ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند تا هیبریداسیون انجام گیرد.

آزمایش دوم: چپ ساخته شده از PDMS، طبق روش قبل آماده شد. میزان کاوشگر گیرنده اضافه شده به هر چپ حدود ۲،۲ پیکومول بر میکرولیتر بود. سایر مواد

جدول ۴- میزان هر یک از مواد استفاده شده در تست دوم miR-486

غلظت میکرو RNA (پیکومول بر میکرولیتر)	آنزیم RNase inhibitor	بافر هیبریداسیون	کاوشگر آشکارسازی (۱۰ پیکومول)	miRNA (۱۰ پیکومول)	نمونه
۴ پیکومول	۲ میکرولیتر	۸ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر	۱ نمونه
۳ پیکومول	۲ میکرولیتر	۱۳ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر	۱۵ میکرولیتر	۲ نمونه
۲ پیکومول	۲ میکرولیتر	۱۸ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر	۱۰ میکرولیتر	۳ نمونه
۱ پیکومول	۲ میکرولیتر	۲۳ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر	۵ میکرولیتر	۴ نمونه
-	۲ میکرولیتر	۲۸ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر	-	کنترل

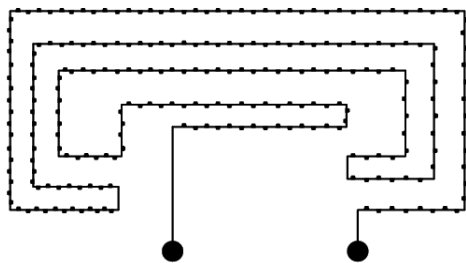
تزیق شدند. میزان کاوشگر گیرنده اضافه شده به هر چیپ حدود ۳ پیکومول بر ماکرولیتراست.

آزمایش سیستم با **miR-21**: جهت تست **miR-21** مطابق جدول ۵ مواد با یکدیگر مخلوط شده و به چیپ مورد نظر

جدول ۵- میزان هریک از مواد استفاده شده در تست **miR-21**

غلظت میکرو RNA	آنزیم RNase inhibitor	بافر هیبریداسیون	کاوشگر آشکارسازی (۱۰ پیکومول)	میکرو RNA (۱۰ پیکومول)	نمونه
۳ پیکومول	۲ ماکرولیترا	۱۳ ماکرولیترا	۲۰ ماکرولیترا	۱۵ ماکرولیترا	۱
۱ پیکومول	۲ ماکرولیترا	۲۳ ماکرولیترا	۲۰ ماکرولیترا	۵ ماکرولیترا	۲
-	۲ ماکرولیترا	۲۸ ماکرولیترا	۲۰ ماکرولیترا	-	کنترل

فرمول شیمیایی، (C_2H_6OSi) است که به عنوان ماده ساختاری برای ساخت کانالهای میکروفلوئیدیکی در فرآیند casting استفاده می‌شود. واکنش ایجاد اتصالات عرضی در PDMS پایه به کمک ماده پلیمریزه کننده و دمای ۶۵ درجه انجام می‌شود که طی آن PDMS به صورت یک ماده کشسان و یکپارچه متبلور می‌شود.



شکل ۱- طرح چیپ مورد استفاده در این کار اساس این طرح سادگی و افزایش سطح جهت کاهش سرعت جریان بود. بر اساس خصوصیات مکانیکی سیال، چون سرعت جریان در وسط کانال سریع است، شانس اتصال لینکر به سطح کمتر است. لذا اشکال دوزنقه ای تعبیه شد تا سرعت جریان در کناره ها به کمترین مقدار برسد و شانس اتصال افزایش یابد.

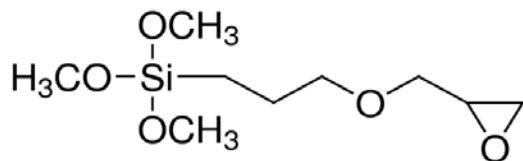
در حالت طبیعی، سطح PDMS به علت گروه هیدروفوب CH_3 تمایلی به اتصال به لینکر ندارد. اکسیداسیون سطح PDMS در فرآیند پلازما برخی از گروههای متیل را حذف نموده و موجب ایجاد انتهای سیلانول (SiOH) بر سطح آن شده و در حقیقت ستون PDMS حاوی گروههای هیدروکسیل می‌شود. سطح اکسید شده PDMS وارد تماس متقابل با شیشه شده و یک اتصال محکم و غیر

بررسی سیستم به وسیله استرپتاویدین متصل به FITC: پس از پایان زمان هیبریداسیون، چیپها دو مرتبه با بافر SSC حاوی Tween 20 و SDS و یک مرتبه با بافر SSC شست و شو داده شدند. ۵/۰ ماکرولیترا استرپتاویدین متصل به FITC به ۸۲ ماکرولیترا بافر PBS اضافه و ۱۶۴ مرتبه رقیق شد. پس از رقیق سازی در دمای ۲۰- نگهداری شد. به هر چیپ ۱۰ ماکرولیترا از این محلول اضافه شد. چیپها ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند تا واکنش انجام گیرد و سپس دو مرتبه با بافر SSC حاوی Tween 20 و SDS و یک مرتبه با بافر SSC شست و شو داده شدند. در نهایت به وسیله میکروسکوپ فلورسانس الیمپوس IX-81 و دستگاه Cytation مشاهده و بررسی شدند.

نتایج و بحث

طراحی و ساخت تراشه میکروفلوئیدیکی: این طرح بر اساس داده های شبیه سازی توسط نرم افزار Comsol رسم گردید (شکل ۱). در این طرح، اصل سادگی جهت جلوگیری از مشکلات در مراحل ساخت حفظ شده است، به طور مثال یک ورودی و یک خروجی دارد. جهت افزایش سطح و کاهش سرعت جریان و افزایش احتمال تثبیت میکرو RNA اشکال دوزنقه ای تعبیه شد تا جریان داخل این اشکال کند شده و شانس اتصال میکرو RNA به سطح افزایش یابد.

اتصال لینکر GPTMS به PDMS: PDMS الاستومری با

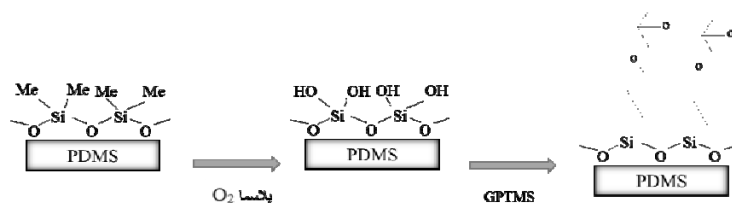


شکل ۲- لینکر GPTMS این لینکر با داشتن گروه اپوکسی و C=O ماده مناسبی جهت اتصال نوکلئیک اسید به سطوحی نظیر PDMS می‌باشد. ماده مذکور از دم Si-C=O به گروه -OH در سطح PDMS پیوند کوالانسی برقرار می‌کند و از طریق اپوکسی به انواع اولیگونوکلئوتید پیوند تشکیل می‌دهد.

قابل برگشت با آن ایجاد می‌کند. همچنین این تغییر PDMS را قابل اتصال با لینکرهایی از جنس سیلان نظیر GPTMS می‌کند.

از لینکر GPTMS جهت اصلاح سطح PDMS و ایجاد گروه اپوکسی بر روی آن استفاده شد. مطابق شکل ۲، GPTMS سیلانی حاوی گروه تری متوکسی است که با پیوند کوالانسی طی واکنش چند مرحله‌ای به سیلانول موجود بر سطح PDMS متصل می‌شود.

انجام این واکنش گروه اپوکسی مورد نیاز جهت واکنش با اولیگونوکلئوتید تیوله را فراهم می‌کند. (شکل ۳).



شکل ۳- اتصال لینکر GPTMS به PDMS پلاسما (که خود از برانگیخته شدن اکسیژن با امواج الکترومغناطیس بوجود می‌آید) باعث اکسیداسیون گروههای -CH₃ در سطح PDMS شده و بوجود آمدن گروه -OH می‌گردد. که آن را قادر می‌سازد با گروههای Si-C=O موجود در شیشه پیوند تشکیل دهد.

اپوکسی فعال لینکر متصل شود (شکل ۴). این واکنش در pH قلیایی انجام پذیر است، جهت افزایش pH محیط از تری اتیل آمین استفاده شد.

اتصال کاوشگر گیرنده به لینکر: پس از اتصال لینکر GPTMS به سطح PDMS، حال باید DNA تک رشته تیوله به وسیله گروه -SH با پیوند تیواتری به گروه



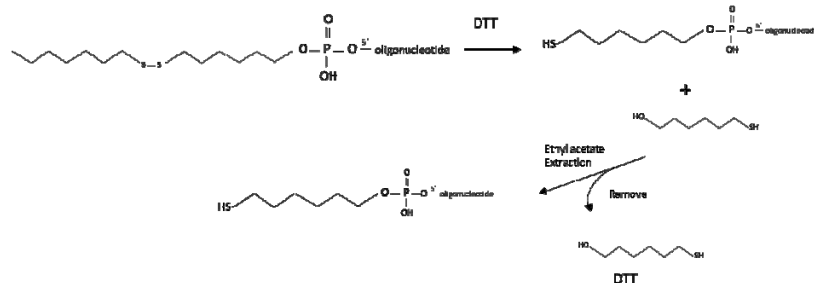
شکل ۴- اتصال کاوشگر گیرنده به لینکر اولیگومر (DNA تک رشته بعنوان کاوشگر گیرنده) از طریق گروه اپوکسی به لینکر پیوند تشکیل میدهد.

DTT استفاده شد.

DTT عامل احیا کننده است. در حالت اکسید یک حلقه ۶ عضوی با پیوند دی سولفید داخلی دارد. احیای یک پیوند دی سولفید معمولی به وسیله دو واکنش تبادل تیول دی-سولفید متوالی انجام می‌شود (شکل ۵). DTT، DNA

کاوشگر گیرنده، یک توالی محافظت کننده در انتهای تیوله خود دارد که موجب می‌شود اتمهای گوگرد در پیوند S=S به فرم اکسید خود قرار گیرد. لازم است پیش از اتصال به لینکر اولیگونوکلئوتید احیاء شده و این توالی جدا شود تا امکان واکنش تیول و اپوکسی فراهم گردد. برای این کار از

محلول DNA مخلوط شده و واکنش می‌دهد و سپس به وسیله فیلتراسیون حذف می‌شود.



شکل ۵- نحوه جدا شدن توالی محافظت کننده از کاوشگر گیرنده. توالی محافظت کننده که از طریق پیوند دی سولفیدی به کاوشگر گیرنده (capture probe) متصل است توسط DTT احیاء شده و از آن جدا می‌شود.

یک گروه فعال ایزوتیوسیانات جایگزین اتم هیدروژن در یکی از حلقه‌های آن شده است. طول موج برانگیختگی و انتشار این مولکول در ۴۹۵ و ۵۱۹ نانومتر بوده و رنگ سبز می‌دهد.

هر استرپتاویدین به چندین FITC متصل است که با افزایش فلورسانس کارایی سیستم را افزایش می‌دهد (شکل ۷).

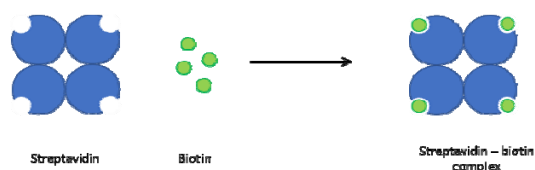


شکل ۷- اتصال استرپتاویدین-FITC به کاوشگر آشکارسازی. استرپتاویدین را می‌توان به چندین مولکول FITC متصل کرد تا کارایی سیستم افزایش یابد. به عبارت دیگر وجود یک مولکول میکرو RNA با چندین مولکول FITC متصل شده به استرپتاویدین مشاهده می‌شود.

پس از افزودن استرپتاویدین و اتصال آن به بیوتین، سیستم با بافر SSC حاوی Tween 20 و SDS شستشو داده می‌شود تا از حذف پیوندهای غیر اختصاصی و مولکولهای استرپتاویدین متصل شده به PDMS اطمینان حاصل شود. استفاده از تراشه میکروفلوییدیک به منظور تثبیت و

تیوله را احیاء نموده و توالی محافظت کننده را جدا می‌کند. اتم گوگرد انتهایی DNA تیوله، خصوصاً در حضور اکسیژن تمایل به تشکیل دایمر در محلول را دارد. DTT با

جهت آشکارسازی سیستم از واکنش بیوتین-استرپتاویدین استفاده شد. تمایل واکنش گری استرپتاویدین به بیوتین یکی از قوی‌ترین واکنشهای غیر کوالان شناخته شده است. هر مونومر استرپتاویدین می‌تواند به یک مولکول بیوتین متصل شود و در نتیجه این پروتئین حداکثر به چهار مولکول بیوتین متصل می‌شود (شکل ۶). علاوه بر قدرت پیوند، این اتصال بسیار اختصاصی بوده و با سرعت بالا انجام می‌گیرد. همچنین در برابر تغییرات دما و pH و حضور حلالهای آلی و عوامل دنا توره کننده بسیار مقاوم است.



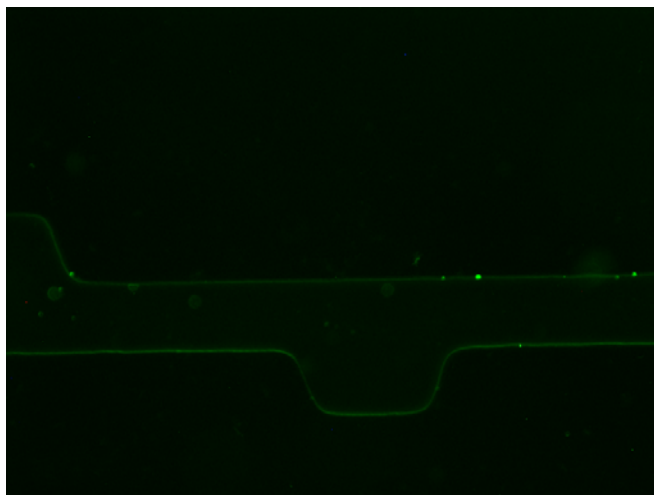
شکل ۶- اتصال بیوتین و استرپتاویدین. هر مولکول بیوتین به یک مولکول استرپتاویدین متصل می‌شود. پیوند غیر کوالانسی بوده و استرپتاویدین را می‌توان با رنگ کنژوگه کرد تا بتوان آن را مشاهده نمود.

علت استفاده از سیستم بیوتین-استرپتاویدین در این کار، افزایش تعداد مولکولهای FITC است. FITC از مشتقات فلورسئین است که کاربردهای زیادی خصوصاً در فلوسایتمتری دارد. مولکول اصلی آن فلورسئین است که

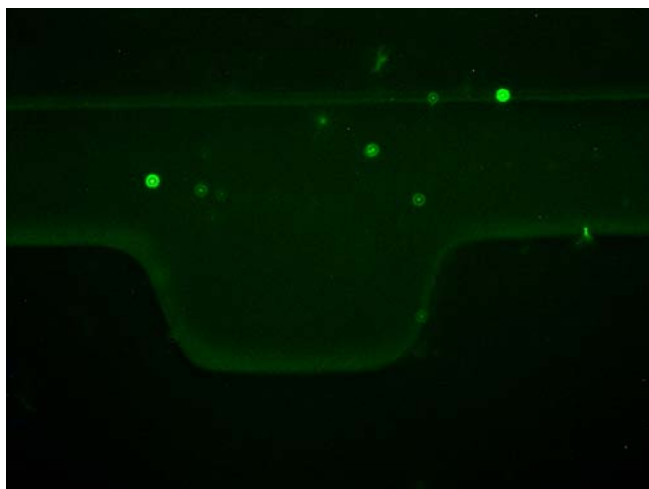
FITC استفاده شد و با میکروسکوپ فلورسانس به صورت لایه یا نقاط سبز رنگ دیده شد (شکل ۸).

استفاده از سامانه میکروفلوئیدیک باعث افزایش سرعت و کاهش مصرف مواد شده و همچنین می‌توان تعداد کمتری میکرو RNA را نیز مشاهده کرد. این امر در اوایل سرطان که میزان میکرو RNA انتشار یافته بسیار کم است بسیار اهمیت دارد.

شناسایی **miR 21** و **miR 486**: پس از تثبیت کاوشگر گیرنده به لینکر GPTMS (شکل ۴)، انتهای ۳' کاوشگر با انتهای ۳' miRNA مکمل می‌باشد و در صورتی که در سیستم میکرو RNA وجود داشته باشد به آن متصل می‌شود. پس از این مرحله از DTT به عنوان عامل احیاء کننده استفاده شد تا باعث احیای گروه دی سولفید S=S گردد. سپس جهت آشکار سازی از استرپتاویدین متصل به



شکل ۸-الف حضور FITC درون کانالهای تراشه. (بزرگنمایی 10X)



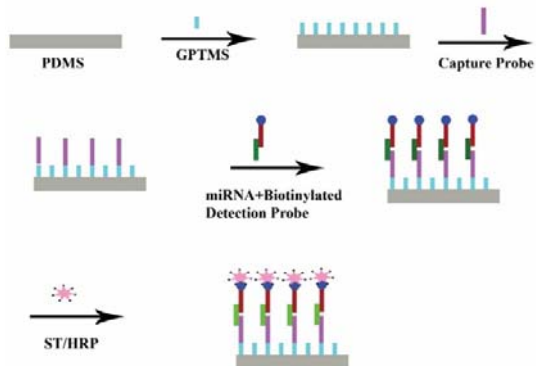
شکل ۸-ب حضور FITC درون کانالهای تراشه. (بزرگنمایی 20X) وجود لکه‌های سبز رنگ بر روی سطح PDMS نشان از تثبیت موفقیت آمیز میکرو RNA دارد. بعد از هر مرحله شستشو وجود دارد و چنانچه ماده ای متصل نشده باشد با شستشو از بین می‌رود. لذا کارایی اصلاح سطح تأیید و سیستم آماده استفاده از مایعات بیولوژیکی نظیر پلاسمای افراد را دارد.

سرطانی و تکنیکهای بر پایه پردازش تصاویر است. پژوهش جهت یافتن نشانگرهای غیر تهاجمی در مایعات

نتیجه گیری

روشهای موجود تشخیص سرطان غالباً شامل بیوپسی بافت

مولکول بیوتین است. جهت آشکارسازی نهایی از استرپتاویدین متصل به FITC استفاده شد. با اتصال استرپتاویدین به بیوتین موجود در کاوشگر آشکارسازی سیستم قابل رؤیت گردید.



شکل ۹- شمای کلی مراحل انجام کار

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مؤلفین از صندوق حمایت از پژوهشگران (INSF) به خاطر گرنت شماره ۹۶۰۰۶۷۵۹ و دانشگاه تربیت مدرس به خاطر گرنت هسته پژوهشی IG-39708 تشکر می‌کنند.

بدن به منظور تشخیص تومور، یکی از زمینه‌های تحقیقاتی رو به رشد در تحقیقات سرطان است. یکی از این نشانگرهای موجود میکرو RNA می‌باشد. هدف از این مطالعه اصلاح خصوصیات سطح جهت تثبیت، جداسازی و آشکارسازی میکرو RNA ها بود. نتایج نشان می‌دهد که اصلاح خصوصیات سطح به خوبی و موفقیت آمیز انجام شد تا بتواند میکرو RNA ها توسط این سیستم به خوبی جداسازی شوند. شمای کلی مراحل این تحقیق در شکل ۹ نشان داده شده است. در ابتدا لینکر GPTMS بر سطح PDMS تثبیت شد. حضور این لینکر جهت اتصال کاوشگر گیرنده به PDMS الزامی است. سپس کاوشگرگیرنده به آن اضافه گردید. این تک رشته DNA در یازده نوکلئوتید ابتدایی در سمت ۳' خود با یازده نوکلئوتید ابتدایی ۳' میکرو RNA، مکمل است. بنابراین با ورود میکرو RNA به سیستم، بین این دو رشته اتصالات عرضی برقرار شد. به دلیل عدم امکان نشاندار کردن میکرو RNA از یک کاوشگر جهت آشکارسازی استفاده گردید. این کاوشگر گیرنده نیز مکمل قسمتی از میکرو RNA است و در صورت حضور به آن متصل می‌شود. در این هنگام میکرو RNA بین دو کاوشگر به صورت ساندویچی تثبیت شد. کاوشگر آشکارسازی در انتهای ۳' حاوی

منابع

- 1- Aminsepehr F., Babaei E., Hosseinpour Feizi M., 2018. Study of the expression of miR-4270 in plasma of patient with breast invasive ductal carcinoma. *Journal of genetic resources*. **4** (2): p. 85-89
- 2- Almeida, M.I., R.M. Reis, and G.A. Calin, 2011. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **717**(1): p. 1-8.
- 3- Babashah, S. and Soleimani, M., 2011. The oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis. *European journal of cancer*, **47**(8): p. 1127-1137
- 4- Cheng, G., 2015. Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Advanced drug delivery reviews*, **81**: p. 75-93
- 5- Ganti, A.K. and Mulshine J.L., 2006. Lung cancer screening. *The oncologist*, **11**(5): p. 481-487.
- 6- Ghazizadeh E., Hadi F., Zare M., 2016. Direct assay of miR-223, miR-145, and miR-16 by a novel method of mimic PCR in serum of breast cancer patient. *Journal of genetic resources*. **2** (2): p. 98-108
- 7- Greenberg, A.K. and Lee, M.S. 2007. Biomarkers for lung cancer: clinical uses. *Current opinion in pulmonary medicine*, **13**(4): p. 249-255
- 8- Kosaka, N., Iguchi, H. and Ochiya, T. 2010. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer science*, **101**(10): p. 2087-2092.
- 9- Le, H.-B., et al., 2012. Evaluation of dynamic change of serum miR-21 and miR-24 in pre-and post-operative lung carcinoma patients. *Medical oncology*, **29**(5): p. 3190-3197
- 10- Reid, G., Kirschner, M.B. and van Zandwijk, N. 2011. Circulating microRNAs: Association with

- disease and potential use as biomarkers. *Critical reviews in oncology/hematology*, **80**(2): p. 193-208
- 11- Tian, W.-C. and Finehout, E., 2009. *Microfluidics for biological applications*. Vol. 16.: Springer Science & Business Media
- 12- Van Dam, R.M., 2006. *Solvent-resistant elastomeric microfluidic devices and applications.*, California Institute of Technology
- 13- Verpoorte, E. and De Rooij, N.F. 2003. Microfluidics meets MEMS. *Proceedings of the IEEE*, **91**(6): p. 930-953
- 14- Wei, J., et al., 2011 Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chinese journal of cancer*, **30**(6): p. 407
- 15- Tang, D., et al., 2013. Identification of plasma microRNAs as novel noninvasive biomarkers for early detection of lung cancer. *European journal of cancer prevention*. **22**(6): p. 540-548
- 16- Zhang, Y., et al., 2013. Early lung cancer diagnosis by biosensors. *International journal of molecular sciences*, **14**(8): p. 15479-15509

Surface modification in microfluidic platform to miR-21 and miR-486 detection from lung cancer cell

Keshavarz bahaghighat E.,¹ Allahverdi A.,¹ Sedghi M.,¹ Naderi A.,² kouhkan F.² and Naderi-Manesh H.¹

¹ Dept. of Nanobiotechnology/Biophysics, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran.

² Stem Cell Technology Research Center

Abstract

Circulating miRNAs have also been proposed as novel biomarkers for diagnosis and even prognosis of cancer. Due to the non-invasive access, in addition to before metastase early detection, the use of these molecules can reduced injuries of patients. In this study, the biosensor was designed to isolate circulating mi RNAs by microfluidic system. The design was based on the isolation of two miRNAs (miR-21 and miR-486), which have been described in papers as miRNAs with potential to diagnosis of lung cancer. In this system, miRNA isolation is performed using a capture probe (single-strand DNA), immobilized by GPTMS linker on PDMS surface. By attaching of microRNA to this probe, the second probe that was biotinilated DNA complement to upper portion of microRNA, attaches to it and creates a sandwich structure. Eventually, trapped microRNA between two probes was detected by FITC- streptavidin.

Key words: miRNA, Lung cancer, early cancer diagnostic, microfluidic