

Profiling the miRNAs for Early Cancer Detection using DNA-based Logic Gates

Tahereh Yahya¹, Shohreh Zare Karizi^{2*}, Ali Jahanian³

1. MSc, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

3. Associate Professor, Department of Computer Architecture, Faculty of Computer Science and Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Received: 6 Sep 2017, Accepted: 21 Nov 2017

Abstract

Background: DNA-based computing is an emerging research aspect that enables the in-vivo computation and decision making with significant correctness. Recent papers show that the expression level of miRNAs are related to the progress status of some diseases such as cancers and DNA computing is introduced as a low cost and concise technique for detection of these biomarkers. In this paper, DNA-based logic gates are implemented in the laboratory to detect the level of miR-21 as the biomarker of cancer.

Materials and Methods: At the first, required strands for designing DNA gates are synthesized. Then, double stranded gate is generated in laboratory using a temperature gradient that followed by electrophoresis process. This double strand is the computation engine for detecting the miR-21 biomarker. miR-21 is as input in designed gate. At the end, the expression level of miR-21 is identified by measuring the generated fluorescent.

Results: at the first stage, the proposed DNA-based logic gate is evaluated by using the synthesized input strands and then it is experimented on a tumor tissue. Experimental results on synthesized strands show that its detection quality/correctness is 2.5x better than conventional methods.

Conclusion: Experimental results on the tumor tissues are successful and are matched with those are extracted from real time PCR results. Also, the results show that this method is significantly more suitable than real time PCR in view of time and cost.

Keywords: Cancer, DNA computing, DNA logic gates, Early Detection, miRNA.

*Corresponding Author:

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

Email: shohrehzare@yahoo.com

بررسی میزان بیان miRNA جهت تشخیص زودهنگام سرطان با استفاده از دروازه‌های منطقی DNA

طاهره یحیی^۱، شهره زارع کاریزی^{۲*}، علی جهانیان^۳

۱. کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

۳. دانشیار، گروه معماری کامپیوتر، دانشکده مهندسی و علوم کامپیوتر، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۱۵، تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: محاسبات مبتنی بر DNA زمینه تحقیقاتی نوینی است که امکان محاسبه و تصمیم‌گیری درون بافت زنده را با دقت بسیار بالا فراهم می‌کند. پژوهش‌های نوین گویای آن است که میزان بیان بیومارکرهایی نظیر miRNA با وقوع شرایط رخداد بیماری‌هایی مانند انواع سرطان‌ها رابطه معناداری دارد. محاسبات DNA به عنوان روشی کم‌هزینه، سریع و دقیق برای تشخیص این بیومارکرها معرفی شده است. در این پژوهش روند آزمایشگاهی ساخت گیت‌های منطقی مبتنی بر DNA با هدف تشخیص میزان بیان miR-21 به عنوان بیومارکر سرطان ریه بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: ابتدا رشته مورد نیاز برای طراحی گیت DNA سنتز گردید. سپس دو رشته‌ای گیت منطقی با انجام یک گرادیان دمایی ایجاد شده و در یک پروسه دقیق با استفاده از الکتروفورز تخلیص شده است. این دو رشته به عنوان ماشین محاسبه منطقی برای تشخیص سطح بیان miR-21 استفاده می‌شود. ورودی گیت طراحی شده، رشته miR-21 است و پس از انجام محاسبه، میزان بیان miR-21 با اندازه‌گیری مقدار فلورسنت آزاد شده، مشخص می‌شود.

یافته‌ها: گیت منطقی طراحی شده در ابتدا روی رشته‌های ورودی سنتز شده سپس روی بافت توموری واقعی تست شده است. نتایج آزمایش‌های انجام شده نشان‌دهنده آن است که میزان قدرت تفکیک به دست آمده، حدود ۲/۵ برابر بهتر از روش‌های مشابه می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج آزمایش گیت منطقی روی بافت توموری نیز موفقیت‌آمیز بوده و قابلیت‌های روش ارائه شده را تأیید می‌نماید. نتایج گویای آن است که این روش از نظر زمان انجام و هزینه در حد قابل توجهی از روش Real time PCR مناسب‌تر می‌باشد.

واژگان کلیدی: محاسبات DNA، گیت‌های منطقی DNA، miRNA، تشخیص زودهنگام، سرطان

*نویسنده مسئول: ایران، ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

Email: shohrehzare@yahoo.com

مقدمه

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های قابل توجهی در پزشکی مبتنی بر فناوری زیستی و ژنتیک رخ داده است. یکی از این موارد، معرفی بیومارکرهای مرتبط با بیماری‌های مختلف است. بیومارکرها موادی هستند که در مایعات و بافت‌های بدن مثل خون، ادرار و سرم وجود دارند و الگوی میزان بیان آن‌ها با رخداد بیماری‌های مختلف ارتباط معنادار دارد، به صورتی که با بررسی میزان بیان بیومارکر می‌توان در مورد شرایط بیماری اطلاعاتی به دست آورد.

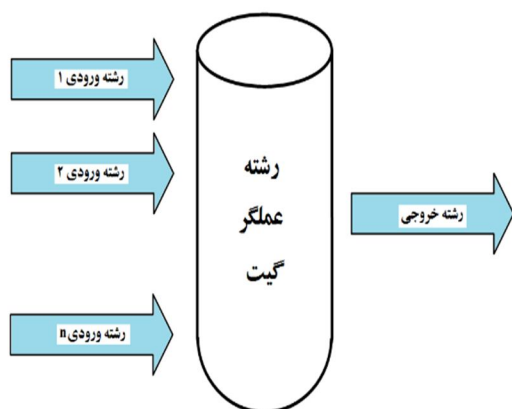
اکثر بیومارکرها جزء ترکیبات طبیعی موجود در سلول‌های بدن هستند که در شرایط طبیعی به میزان مشخصی در سلول وجود دارند و در جریان پیشرفت بیماری‌هایی مانند سرطان دچار افزایش یا کاهش بیان شده و میزان آن‌ها در مایعات یا بافت‌های بدن تغییر می‌کند (۱). پژوهش‌های انجام شده در مورد نقش miRNA در چند سال اخیر نشان‌دهنده آن است که miRNA می‌توانند به عنوان بیومارکر بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان مورد استفاده قرار گیرند (۲). میزان بیان miRNA استخراج شده از بافت‌های توموری نشان‌دهنده تفاوت میزان بیان آن‌ها می‌باشد. به‌عنوان مثال لو و همکاران نشان دادند که دسته‌هایی از سرطان‌ها دارای میزان بیان متفاوتی از miRNAهای خاص هستند (۳). تحقیق یانگ نیز نشان داد که برخی از miRNAها در بافت‌های بیمار نسبت به بافت‌های سالم کاهش یافته‌اند (۴). این تحقیقات گویای آن است که miRNAها می‌توانند به عنوان یک بیومارکر قابل اطمینان برای تشخیص زودهنگام بیماری‌ها در نظر گرفته شوند. چنان‌که گفته شد، الگوهای بیان miRNA برای سرطان‌های مختلف کشف شده است. مشکل اصلی در عمومی شدن این روش، دشواری اندازه‌گیری میزان بیان miRNA می‌باشد. در حال حاضر، انجام Real Time PCR روش مرسوم برای اندازه‌گیری میزان بیان این بیومارکرها است که زمان و هزینه بالایی برای انجام

آن مورد نیاز می‌باشد. یک روش نوین که به تازگی برای تشخیص کارآمد و دقیق miRNA ارائه شده است، استفاده از گیت‌های محاسباتی DNA برای این منظور می‌باشد.

در سال ۱۹۹۴ آدلمان متوجه شد که ساختار مولکول DNA امکان انجام نوعی محاسبات منطقی و حسابی را فراهم می‌کند (۵). تولید گیت‌های منطقی متشکل از DNA توسط تیم تحقیقاتی راجستر اولین گام به سوی ساختن یک کامپیوتر با ساختاری مشابه کامپیوترهای الکترونیکی بوده است (۶، ۷). در سال ۲۰۰۶، روش جدیدی برای انجام محاسبات DNA ابداع شد که بر پایه استفاده از توهملد بود که باعث افزایش سرعت عملیات می‌شود (۸). دروازه‌های seesaw در سال ۲۰۰۹ برای فراهم ساختن امکان ساخت مدارها در مقیاس بزرگ که قابلیت ایجاد مدارهای چند سطحی را داشته باشند، ارائه شدند (۹).

منطق یک و صفر در مدارهای منطقی DNA وجود یا عدم وجود یک رشته خاص است؛ بدین معنا که اگر رشته خاصی در محیط آزمایش وجود داشته باشد، به معنای منطق یک و عدم وجود آن رشته خاص به معنای منطق صفر است (۱۰).

شکل ۱ یک گیت منطقی مبتنی بر DNA را نشان می‌دهد. چنان‌که گفته شد، یک گیت منطقی شامل یک سری رشته ورودی، رشته گیت و یک سری رشته خروجی می‌باشد.



شکل ۱. ساختار کلی یک گیت مبتنی بر DNA

جهت تشخیص زودهنگام سرطان ارائه شده است. در این روش، گیت‌های DNA مناسب جهت تشخیص میزان بیان بالای miR-21 به عنوان یکی از مهم‌ترین بیومارکرهای سرطان طراحی شده و به صورت عملی در آزمایشگاه ساخته شده است.

در روش ارائه شده، استفاده از گیت‌های منطقی AND مبتنی بر DNA جهت تشخیص وجود همزمان دو یا چند miRNA ارزیابی شده است. به صورتی که با استفاده از این گیت‌ها بتوان با دقت بالاتر و هزینه کمتر، الگوی نشان‌دهنده پیشرفت سرطان را تشخیص داد. نتایج به دست آمده نشان‌دهنده آن است که گیت طراحی شده قابلیت تشخیص miR-21 را با دقت بالا و هزینه کمتر نسبت به روش‌های موجود داراست.

مواد و روش‌ها

در پژوهش انجام شده، یک گیت مبتنی بر DNA برای تشخیص وجود miR-21 طراحی گردید و کار در دو مرحله انجام شد.

در مرحله اول، گیت DNA طراحی شده با استفاده از ابزارهای شبیه‌سازی معتبر، مدل‌سازی و شبیه‌سازی گردید و با بررسی کل واکنش‌های رخ داده بین زیر رشته‌ها، از صحت طراحی اطمینان حاصل شد.

در مرحله دوم، گیت طراحی شده در محیط آزمایشگاهی پیاده‌سازی و روی رشته‌های DNA سنتزی و بافت سرطانی تست گردید. نتایج حاصل از اعمال این گیت با نتایج به دست آمده از Real time PCR مقایسه شد.

شبیه‌سازی کامپیوتری واکنش

در این مقاله از ابزار VisualDSD محصول شرکت میکروسافت به‌عنوان یک ابزار شبیه‌سازی واکنش‌های جاب‌جایی رشته‌های DNA استفاده شده است (۱۴). این ابزار قابلیت شبیه‌سازی واکنش‌های بین تک رشته و دو رشته DNA و RNA را داراست و به فراوانی در

پس از انجام هیبریداسیون، بنا به وجود یا عدم وجود رشته‌های ورودی و نیز با توجه به نوع رشته عمل‌گر، عملیات منطقی مورد نظر انجام می‌گیرد (۶).

نخستین روشی که برای طراحی گیت‌های منطقی با DNA مطرح شد، روش مبتنی بر استفاده از آنزیم بوده که روشی بسیار پیچیده و پرهزینه بود (۱۰). در سال‌های بعد روش مبتنی بر Toehold ارائه گردید که نقطه عطفی در محاسبات DNA ایجاد کرد. در این روش از این اصل استفاده می‌شود که تمایل یک رشته برای جفت شدن با رشته مکمل نسبت عکس با طول رشته دارد. با استفاده از رشته‌های کوتاه - که Toehold نامیده می‌شوند - روند واکنش‌ها کنترل می‌شود (۱۰).

در سال ۱۹۹۷، محققان دانشگاه راجستر موفق به ساخت دروازه‌های منطقی با استفاده از رشته‌های DNA شدند. در این طرح به جای سیگنال‌های الکتریکی در ورودی‌ها و خروجی‌های دروازه‌ی منطقی، رشته‌های DNA مورد استفاده قرار گرفته بودند (۱۱). بعدها ایهود شاپیرو امکان برنامه‌ریزی مولکول‌ها با اطلاعات پزشکی و دارویی و تزریق آن‌ها به افراد را بررسی کرد و در سال ۲۰۰۱ موفق شد یک محاسبه‌گر بسیار کوچک بسازد که به اندازه یک قطره آب بود و از مولکول‌های DNA و آنزیم‌ها به عنوان ورودی و خروجی و اجزای تشکیل دهنده محاسبه‌گر استفاده می‌کرد (۱۲). پس از ابداع روش جاب‌جایی رشته‌های DNA توسط ژانگ و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۱۳)، گروه‌های بسیاری از روش جاب‌جایی رشته برای ساخت مدارهای دودویی با پیچیدگی بیشتر استفاده کردند. دروازه‌های seesaw در سال ۲۰۰۹ برای فراهم ساختن امکان ساخت مدارها در مقیاس بزرگ که قابلیت ایجاد مدارهای چند سطحی را داشته باشند، ارائه شدند (۱۳). گیت‌های DNA در ابتدا صرفاً با هدف محاسبات ارائه شدند، اما تحقیقات اخیر نشان داد که این گیت‌ها می‌توانند برای تشخیص و درمان بیماری‌ها نیز استفاده شوند. در این تحقیق روشی برای استفاده از گیت‌های DNA

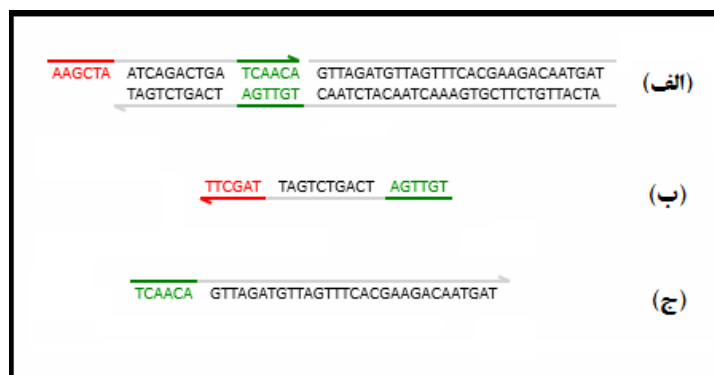
در شکل ۲-الف تا ۲-ج، رشته‌های ورودی و رشته گیت مورد استفاده در گیت AND شبیه‌سازی شده نشان داده شده است. این رشته‌ها به ترتیب متناظر با رشته گیت، رشته miR-21 و رشته B-21 هستند. شکل ۲-د هم مدل ورودی به زبان DSD را نشان می‌دهد که قابل شبیه‌سازی در ابزار VisualDSD می‌باشد. سه سطر ابتدایی این مدل، شرایط آزمایش را مشخص می‌کند.

سپس رشته‌های mir21، bb21 و gate را تعریف کرده و خط انتهایی مدل، غلظت هر کدام از این رشته‌ها را در محیط شبیه‌سازی نشان می‌دهد. ابزار VisualDSD این مدل را دریافت کرده و واکنش‌های انجام شده بین رشته‌ها را در طول زمان شبیه‌سازی می‌نماید.

حوزه‌های مرتبط با محاسبات DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد.

این ابزار یک زبان برنامه‌نویسی خاص به نام DSD دارد که سامانه‌های منطقی مبتنی بر DNA را شبیه‌سازی می‌کند. با استفاده از این ابزار می‌توان رشته‌های ورودی و داخلی دروازه DNA را تعریف، شرایط آزمایش را مشخص و میزان رشته‌های حاصل از واکنش بین رشته‌های ورودی را ارزیابی نمود.

قبل از پیاده‌سازی آزمایشگاهی، ابتدا کل روند با استفاده از ابزار VisualDSD شبیه‌سازی می‌شود تا از طراحی رشته گیت و سایر پارامترهای روند طراحی اطمینان حاصل شود. شکل ۲-الف تا ۲-ج رشته‌های ورودی مورد استفاده در شبیه‌سازی و شکل ۲-د مدل گیت طراحی شده برای شبیه‌سازی در ابزار VisualDSD را نشان می‌دهند.



```
directive sample 1000000.0 1000
directive scale 100.0
def Ni = 1
def Ng = 10
def mir21() = {m21_t^ m21_10* b21_t^*}
def bb21() = <b21_t^ b21>
def gate() = <m21_t^*(m21_10 b21_t^):(b21)
(Ni*mir21() | Ni*bb21() | Ng*gate() )
```

(د)

شکل ۲. الف - رشته‌های ورودی برای مدل‌سازی گیت AND در ابزار VisualDSD؛ ب-مدل ورودی تعریف‌شده برای گیت

آماده‌سازی بافر و تولید رشته‌های مورد نیاز در ابتدا باید بافر لازم برای تهیه رشته گیت و انجام محاسبه ایجاد شود. مواد تشکیل دهنده این بافر طبق جدول ۱ می‌باشد.

جدول ۱. مواد تشکیل دهنده بافر TAE/Mg²⁺

مقدار	عنوان
0.04 M	Tris-acetate(MW=181/19)
1 mM	(EDTA) Ethylenediaminetetra acetic acid (MW=372/24)
12.5 mM	Magnesium acetate (MW=214/45)

برای ایجاد گیت منطقی، رشته‌های نشان داده شده در جدول ۲ (به شرکت متایون) سفارش داده شد.

جدول ۲. توالی رشته‌های سنتز شده

نام توالی	جزئیات توالی از 5' به 3'
G _T	TCAACATCAGTCTGATA <u>AAGCTA</u>
G _Q	ATCAGACTGATGTTGAATCATTGTCTTCGTGAAACTAACATCTAAC-BHQ ₂
G _F	TAMRA-GTTAGATGTTAGTTTCACGAAGACAATGAT
miR-21	<u>UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA</u>
B-21	GTTAGATGTTAGTTTCACGAAGACAATGATCAACA

(با استفاده از Kiaspin Gel Extraction Kit شرکت کیاژن) انجام شد.

انجام محاسبه DNA و تولید رشته خروجی چنانچه بیان شد، مبنای محاسبه با DNA، واکنش جابه‌جایی رشته‌ها بین رشته‌های ورودی و رشته گیت می‌باشد. محاسبه با افزودن رشته‌های ورودی به بافر حاوی رشته گیت انجام می‌شود. بدین منظور، مقدار ۸۰۰ نانومتر از رشته‌های ورودی (miR-21 و B-21) به‌همراه ۲۰۰ نانومتر از رشته گیت تخلیص شده در ۵۰ میکرولیتر بافر در دمای اتاق قرار داده می‌شود و پس از ۲/۵ ساعت میزان فلورسنت سنجیده می‌شود. رشته گیت به‌صورتی طراحی شده که اگر هر دو رشته ورودی یعنی miR-21 و B-21 در بافر حاوی گیت وجود داشته باشند، فلورسنت تولید می‌شود.

در این پژوهش برای بررسی نتیجه محاسبه گیت طراحی شده، از اندازه‌گیری میزان فلورسنت خروجی (با

سپس به‌منظور تولید رشته گیت برای انجام محاسبه، در ابتدا مقدار ۲ میکرومول از سه رشته سنتزی GT (مکمل miR-21)، GQ (دارای کوانچر) و GF (دارای فلورسنت) به استریپ حاوی بافر TAE/Mg²⁺ برای هیبرید شدن اضافه شد و محلول حاصل در گرادیان دمایی (در دستگاه Step OnePlus Real-Time PCR) قرار داده شد. در این گرادیان دمایی گیت دو رشته‌ای شکل می‌گیرد. برای خالص‌سازی دورشته‌ای گیت در این تحقیق از الکتروفورز افقی و ژل آگارز ۳/۵ درصد به‌منظور تخلیص دورشته‌ای گیت با اندازه کامل استفاده می‌شود. ولتاژ مورد نظر برای این مرحله ۹۰ ولت به مدت ۵۰ دقیقه می‌باشد. میزان خلوص رشته گیت با اندازه‌گیری نسبت چگالی نوری دو رشته‌ای‌ها به چگالی نوری تک رشته‌ای‌ها در گیت حاصل قابل اندازه‌گیری است. در روند انجام این تحقیق، به‌منظور استفاده از رشته گیت تولید شده با اندازه کامل، استخراج DNA از روی ژل آگارز

گراف شکل ۳ نشان می‌دهد که گیت و ورودی‌ها به صورتی طراحی شده‌اند که در روند واکنش‌ها، رشته‌های ورودی مصرف‌شده و رشته خروجی تولید می‌شود. در واقع دو رشته سبز و قرمز که ورودی هستند، در روند شبیه‌سازی مصرف شده و رشته آبی که رشته خروجی را نشان می‌دهد، به تدریج تولید می‌شود. غلظت یا میزان نهایی رشته خروجی نشان‌دهنده صحت کارکرد گیت است. بدین صورت که هرگاه میزان رشته خروجی از حد آستانه بیشتر شود، منطق خروجی، ۱ می‌شود. در ضمن این گراف نشان می‌دهد که غلظت رشته خروجی در کمتر از ۷ دقیقه به بیش از ۹۰ درصد مقدار نهایی می‌رسد. خروجی شبیه‌سازی نشان می‌دهد که حداکثر آن پس از حدود ۱۰۰ دقیقه به دست خواهد آمد؛ البته نتایج واقعی گویای آن بود که زمان در محیط آزمایشگاهی خیلی کمتر از شبیه‌سازی بوده است.

نتایج پیاده‌سازی اول

به منظور تولید رشته گیت برای انجام محاسبه، در ابتدا سه رشته سنتزی GT، GQ و GF به استریپ حاوی بافر اضافه شد. سپس به منظور جدا شدن کامل دو رشته‌ای‌هایی که احتمالاً باهم جفت شده‌اند از دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه تا دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد سرد شد. سپس در دمای نهایی به مدت ۳۰ ثانیه نگه داشته شد. لازم به ذکر است که در هر دقیقه دما ۲/۴۳ درجه سانتی‌گراد پایین می‌آید که کل زمان این شیب ۳۰ دقیقه می‌باشد.

برای جدا کردن رشته گیت از تک رشته‌ها، آگارز ۳/۵ درصد آماده شد و محلول به صورت یک‌جا (با ایجاد یک چاهک بزرگ) با جریان ۹۰ ولت و زمان ۵۰ دقیقه الکتروفورز گردید. شکل ۴ باند تولیدشده پس از انجام الکتروفورز را نشان می‌دهد.

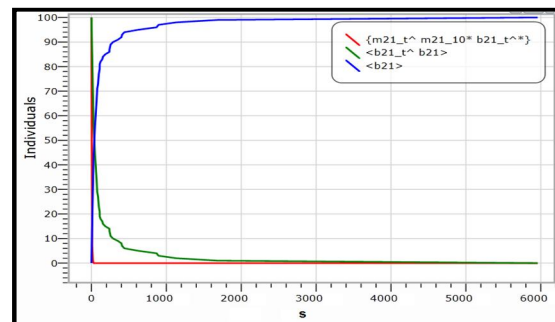
استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Epoch) استفاده شد. به این منظور، بافر، گیت و ورودی‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای الیزا قرار گرفت و سپس میزان جذب فلورسنت در سه طول موج مختلف ۵۷۶، ۵۳۲ و ۵۶۸ نانومتر اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

در این تحقیق برای اطمینان از صحت طراحی گیت DNA، ابتدا رشته‌های طراحی شده توسط ابزار VisualDSD شبیه‌سازی شد و پس از درستی‌سنجی رشته طراحی شده، گیت طراحی شده به صورت فیزیکی در محیط آزمایشگاه تولید گردید. در ادامه، روند تولید گیت و انجام محاسبه در چهار حالت مختلف انجام گردید تا به بهترین سطح از دقت و کیفیت محاسبه به دست آید. لازم به ذکر است که ابزار شبیه‌سازی VisualDSD به‌عنوان یک ابزار پژوهشی معتبر برای شبیه‌سازی واکنش‌های جابه‌جایی رشته‌های DNA شناخته می‌شود (۱۴). در ادامه نتایج به دست آمده از شبیه‌سازی و پیاده‌سازی‌های آزمایشگاهی تشریح شده است.

نتایج حاصل از شبیه‌سازی کامپیوتری

شکل ۳ نتایج حاصل از شبیه‌سازی گیت AND را در محیط شبیه‌سازی VisualDSD نشان می‌دهد. در این گراف، نمودارهای سبز و قرمز، رشته‌های ورودی و نمودار آبی رشته خروجی را نشان می‌دهد.



شکل ۳. گراف نشان‌دهنده روند تولید رشته‌های خروجی

همراه miR-21 و گیت به همراه B-21 در بافر وجود داشته است و در نهایت ستون Gate+miR-21+B-21 نشان‌دهنده حالتی است که گیت به همراه هر دو ورودی یعنی miR-21 و B-21 در بافر حضور دارند.

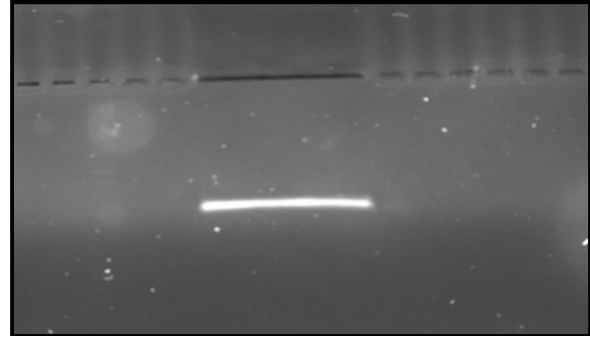
لازم به ذکر است که میزان جذب در سه طول موج ۵۶۸، ۵۳۲ و ۵۷۶ نانومتر سنجیده شده است. همان‌گونه که در شکل ۵ نشان داده شده است، میزان فلورسنت خروجی در سه حالت «گیت تنها»، «گیت + ورودی اول» و در نهایت «گیت + ورودی دوم» بسیار کم می‌باشد در حالی که میزان فلورسنت در حضور «گیت + هر دو ورودی» سطح بالاتری داشته است. این نتایج نشان‌دهنده عملکرد صحیح منطقی گیت AND می‌باشد. در واقع در سه حالت اول خروجی گیت AND برابر «صفر» منطقی و در حالت آخر خروجی برابر «۱» منطقی است. در تکرار بعد با هدف بهبود قدرت تفکیک بین حالات «صفر» و «۱» گیت AND، استخراج دو رشته‌ای گیت با شرایط متفاوت آزمایش شد.

نتایج به‌دست‌آمده در این پیاده‌سازی، امکان‌پذیر بودن این نوع محاسبات را اثبات کرد، اما تجربه نشان داد که تکرار نتایج بسیار مشکل است. بنابراین آزمایش‌ها با شرایط جدید تکرار شد تا یک روند پایدار به دست آید.

نتایج پیاده‌سازی دوم

در این پیاده‌سازی، رشته‌ها از دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه تا دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد سرد شد و سپس در دمای نهایی به مدت ۳۰ ثانیه نگه داشته شد. لازم به ذکر است که در هر دقیقه ۸/۳ درجه سانتی‌گراد دما پایین می‌آید که کل زمان این شیب ۱۰ دقیقه می‌باشد.

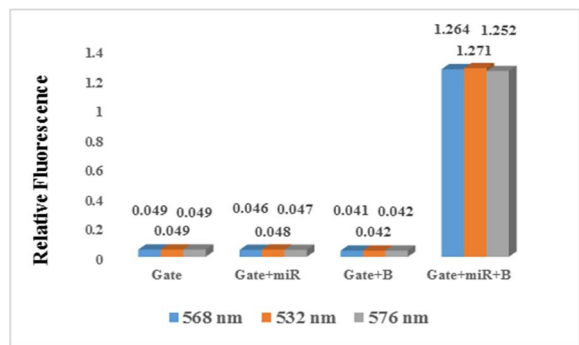
در این پیاده‌سازی نیز از آگارز ۳/۵ درصد، جریان ۹۰ ولت و زمان ۵۰ دقیقه استفاده شد. دو رشته‌ای گیت توسط کیت کایژن طب برای مراحل بعدی استخراج گردید. شکل ۵ فلورسنت ایجادشده توسط گیت AND در این آزمایش را نشان می‌دهد. چنان‌چه در گراف شکل ۶ دیده می‌شود، میزان فلورسنت در حالت چهارم حدود ۶ برابر حالات دیگر است.



شکل ۴. باند تولیدشده پس از انجام الکتروفورز

پس از این مرحله، گیت تخلیص شده برای انجام محاسبات DNA آماده می‌باشد. میزان جذب فلورسنت گیت به دست آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین می‌شود. میزان OD دو رشته‌ای استخراج‌شده در این آزمایش برابر با (۱۲/۰۸ نانوگرم بر میکرولیتر) بود.

در این مرحله از آزمایش دو رشته‌ای استخراج‌شده به همراه رشته‌های ورودی در بافر پیت می‌شود و سپس میزان فلورسنت ایجادشده در اثر واکنش رشته‌ها بعد از گذشت ۲/۵ ساعت سنجیده می‌شود که نتایج آن در شکل ۵ آورده شده است.



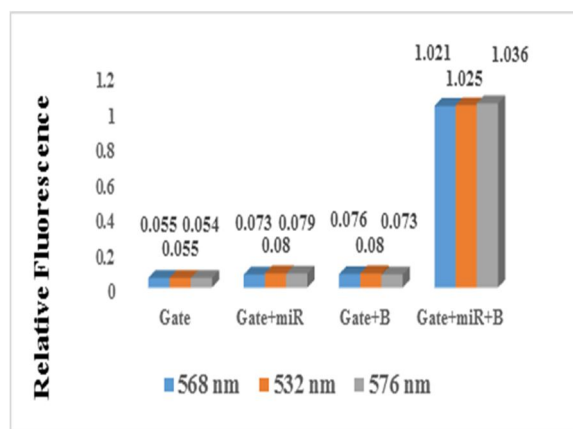
شکل ۵. فلورسنت ایجادشده توسط گیت AND به ازای ورودی‌های مختلف در اولین آزمایش

در شکل ۵ ستون Gate میزان فلورسنت را در حالتی نشان می‌دهد که تنها رشته گیت در بافر وجود دارد. دو ستون Gate+B-21 و Gate+miR-21 به ترتیب میزان فلورسنت تولیدشده را در حالتی نشان می‌دهند که گیت به

ایجادشده در اثر واکنش رشته‌ها بعد از گذشت ۲/۵ ساعت سنجیده می‌شود که نتایج آن در شکل ۷ آورده شده است.

همان طور که گفته شد، میزان فلورسنت خروجی در سه حالت اول بسیار کم و در حضور «گیت + هر دو ورودی» سطح بسیار بالاتری داشته است. چنانچه در شکل ۷ دیده می‌شود، میزان فلورسنت در حالت چهارم و در صورتی که غلظت تک رشته‌ها افزایش داده شود حدود ۱۸ برابر است. این نتایج هم درستی عملکرد گیت AND را نشان می‌دهند.

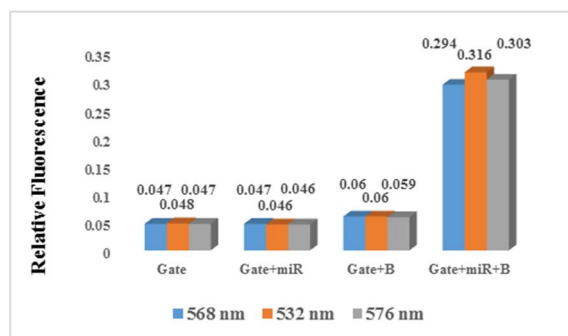
نتایج به دست آمده در این پیاده‌سازی از نظر دقت به سطح قابل قبولی رسید و هم‌چنین قابلیت تکرارپذیری بیشتری را نسبت به حالات قبل داشت.



شکل ۷. فلورسنت ایجادشده توسط گیت AND با تغییر غلظت به ازای ورودی‌های مختلف

نتایج پیاده‌سازی چهارم

در مرحله بعد با هدف افزایش کارایی گیت دو رشته‌ای، دو تغییر اعمال گردید. در مرحله اول غلظت تک رشته‌ها افزایش یافته و سپس شیب دمایی کارآمدتر استفاده گردید. در واقع از ترکیب دو آزمایش دوم و سوم به صورت توأم استفاده شد و میزان ۳ میکرومول از تک رشته‌ها از دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد (در هر دقیقه ۸/۳ درجه سانتی‌گراد) سرد شد.



شکل ۶. فلورسنت ایجادشده توسط گیت AND به ازای ورودی‌های مختلف در دومین آزمایش

در این تحقیق پس از انجام این پیاده‌سازی به شرایط پایدارتر و تکرارپذیرتری دست یافتیم. در ادامه با افزایش غلظت رشته گیت همان‌گونه که تشریح می‌گردد دقت بالاتری در محاسبه به دست آمد.

نتایج پیاده‌سازی سوم

به منظور افزایش کارایی گیت استخراج‌شده و در نتیجه دقت بالاتر محاسبات، میزان غلظت رشته‌ها افزایش داده شد و نتایج پایدارتری به دست آمد. برای این منظور، میزان ۳ میکرومول از ورودی‌ها در واکنش اضافه شد که بعد از استخراج و انجام محاسبه نتایج به دست آمده در شکل ۷ آورده شده است.

چنانچه دیده شد، آزمایش‌های متعددی برای دست‌یابی به نتایج بهتر و پایدارتر انجام شده است.

در این مرحله از انجام آزمایش، ۳ میکرومول از رشته‌های GT، GQ و GF به استریپ حاوی بافر اضافه شد. سپس از دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه به دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد (در هر دقیقه ۲/۴۳ درجه سانتی‌گراد) سرد شد و در دمای نهایی به مدت ۳۰ ثانیه نگه داشته شد. کل زمان این شیب ۳۰ دقیقه بوده است.

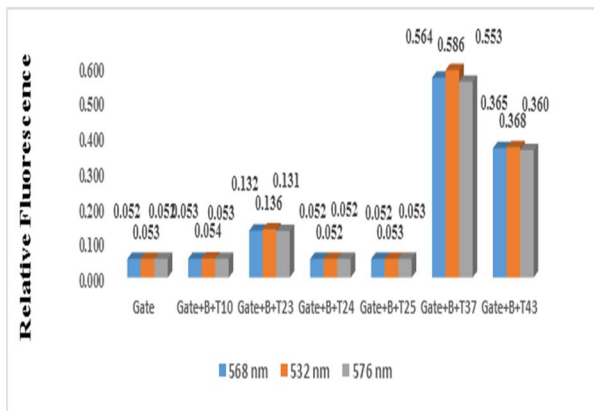
برای استخراج رشته گیت از روش مورد استفاده در پیاده‌سازی قبل استفاده شد. دو رشته‌ای استخراج‌شده به همراه رشته‌های ورودی به بافر اضافه می‌شود و میزان فلورسنت

میکرولیترا) شدند تا شرایط برای ورودی‌ها یکسان باشند. هر نمونه توموری در یک ویال مجزا با دو رشته‌ای گیت DNA و رشته سنتزی B-21 مخلوط شده و میزان فلورسنت آن در سه طول موج سنجش شد. برای مقایسه نتایج به دست آمده از آزمایش فوق، میزان فلورسنت استخراج شده برای نمونه‌های بافت‌های توموری به ازای سه طول موج مختلف به صورت گرافیکی در شکل ۹ نشان داده شده است.

در این شکل میزان فلورسنت خروجی از سمت چپ به ترتیب برای «گیت به تنهایی»، «گیت + miR-21»، «گیت + B-21»، «گیت + miR-21 + B-21»، «گیت + T-10 + 21»، «گیت + T-23 + B-21»، «گیت + B-21 + T-24»، «گیت + T-25 + B-21»، «گیت + T-34 + B-21» و «گیت + T-37 + B-21» نشان داده شده است.

چنانچه در شکل ۹ دیده می‌شود، خروجی در نمونه‌های T-23، T-37 و T-43 مقدار فلورسنت بالا و در سایر نمونه‌ها مقدار فلورسنت پایین را نشان می‌دهد که با نتایج حاصل از بررسی بیان این miRNA که از روش Real time به دست آمده (جدول ۳) هم‌خوانی دارد.

لازم به ذکر است که میزان فلورسنت T- و T-37 بسیار بالاتر از خروجی T-23 است، چرا که میزان بیان miR-21 در این دو نمونه بسیار بالاتر از نمونه T-23 است.

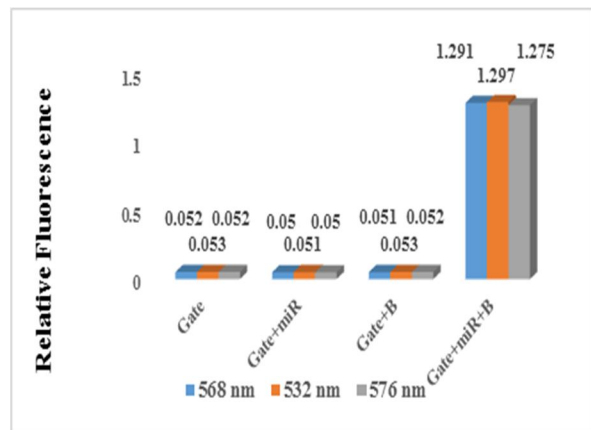


شکل ۹. فلورسنت ایجادشده توسط گیت AND به ازای miRNAهای استخراج‌شده

چنانچه در گراف شکل ۸ دیده می‌شود، میزان فلورسنت در حالت چهارم حدود ۲۵ برابر حالات دیگر است. این نتایج نشان‌دهنده عملکرد منطقی گیت AND و کیفیت بالای گیت طراحی شده می‌باشد. در واقع در سه حالت اول، خروجی گیت AND برابر «صفر» منطقی و در حالت آخر خروجی برابر «۱» منطقی است.

نتایج آزمایش روی بافت توموری

پس از انجام آزمایش‌های متعدد با رشته‌های سنتز شده و در نهایت دست‌یابی به یک گیت با نتایج قابل قبول، در این مرحله miRNAهای استخراج‌شده از بافت توموری جایگزین رشته ورودی سنتزی شده و سپس محاسبه با ورودی جدید انجام گردید. برای این منظور، ۶ نمونه بافت توموری مورد آزمایش قرار گرفت.



شکل ۸. فلورسنت ایجادشده توسط گیت AND به ازای ورودی‌های مختلف

در این مرحله، هدف ارزیابی دقت گیت DNA ارائه‌شده و مقایسه آن با روش‌های مرسوم جهت سنجش میزان بیان miR-21 روی نمونه‌های توموری سرطان ریه می‌باشد. انتظار داریم نتایج حاصل از اعمال گیت طراحی شده به بافت توموری با نتایج به دست آمده از آن روی نمونه‌های سنتز شده سازگار باشد.

ابتدا غلظت رشته‌های ورودی (توسط دستگاه نانودراپ Epoch) سنجش شد و سپس رشته miRNAهای استخراج‌شده با ورودی B-21 هم غلظت (۲۰۰ نانوگرم بر

نتایج حاصل از بررسی سطح بیان miR-21 که با استفاده از روش Real time به دست آمده، در جدول ۳ آورده شده است.

برای اطمینان از صحت اندازه‌گیری میزان بیان miR-21 در نمونه‌های توموری با گیت DNA، این سنجش، با نتایج حاصل از Real time-PCR مقایسه شد.

جدول ۳. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان بیان miR-21 با روش Real time PCR

ردیف	شماره نمونه توموری	نتیجه حاصل از Real time
۱	T-10	بیش از ۲ برابر کاهش
۲	T-23	۱/۸۶ برابر افزایش
۳	T-24	۱۲/۵ برابر کاهش
۴	T-25	۲ برابر کاهش
۵	T-37	۴۲ برابر افزایش
۶	T-43	۱۰/۵ برابر افزایش

در نوع خود یک نوآوری قابل توجه در پزشکی مدرن به حساب می‌آید. نتایج پژوهش آن‌ها به دلیل مشابهت با تحقیق انجام شده در این تحقیق، مبنای مقایسه ما بوده است.

در این پژوهش یک گیت مبتنی بر DNA طراحی و پیاده‌سازی شده است که قابلیت تشخیص میزان بیان miR-21 را داراست. این گیت در ابتدا با استفاده از ورودی‌های سنتز شده آزموده شده، سپس روی بافت توموری تست گردیده است.

نتایج آزمایش گیت طراحی شده روی نمونه‌های سنتزی (شکل ۷) گویای آن است که گیت طراحی شده از توانایی تفکیک بالایی برخوردار است.

گیت طراحی شده پس از تست روی رشته ورودی‌های سنتز شده، روی ۶ نمونه بافت توموری نیز آزمایش گردید.

هدف از این آزمایش، ارزیابی دقت و صحت گیت طراحی شده روی نمونه‌های واقعی بوده است. میزان بیان miR-21 در این ۶ بافت نمونه، از ۲ برابر کاهش تا ۴۲ برابر افزایش متغیر بوده است (طبق جدول ۳).

در این آزمایش، بیان بالا و پایین miR-21 در هر نمونه با استفاده از گیت DNA بررسی شده است. در

در نمونه‌های T-10، T-24 و T-25 کاهش میزان miR-21 و در نمونه‌های T-23، T-37 و T-43 افزایش میزان بیان miR-21 وجود دارد. چنانچه انتظار داشتیم، اندازه‌گیری میزان بیان miRNAها روی بافت توموری با نتایج به دست آمده پس از اعمال محاسبات DNA سازگار است. بدین صورت که در هر دو آزمایش (هم جدول ۳ و هم شکل ۹) میزان سطح بیان miR-21 در T-37، T-43 و T-23 بالا و در سایر نمونه‌ها پایین تشخیص داده شده است. در ادامه میزان همبستگی آماری این نتایج و دقت آن‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد.

بحث

نخستین بار، لئونارد آدلمن در سال ۱۹۹۴ از مولکول DNA برای محاسبات منطقی و حسابی استفاده کرد (۵). سپس در سال ۱۹۹۷ محققان دانشگاه راجستر دروازه‌های منطقی را با استفاده از رشته‌های DNA ساختند (۱۱). دروازه‌های seesaw در سال ۲۰۰۹ برای طراحی مدارهای بزرگ ارائه شدند (۱۳).

همفیل و دیترز در سال ۲۰۱۳ از گیت‌های DNA برای تشخیص miR-21 و miR-122 استفاده کردند که

جدول ۴ مقایسه میزان بیان تشخیص داده شده در بافت‌های نمونه توسط گیت‌های DNA با میزان بیان اندازه‌گیری شده توسط روش Real time نشان داده شده است.

جدول ۴. مقایسه میزان بیان اندازه‌گیری شده در دو روش گیت DNA و روش Real time PCR

Real time	میزان فلورسنت اندازه‌گیری شده با دستگاه نانودراپ با گیت‌های DNA	شماره نمونه بافت توموری
-2.000	0.054	T10
+1.860	0.136	T23
-12.500	0.052	T24
-2.000	0.053	T25
+42.000	0.586	T37
+10.500	0.368	T43

پایین بودن میزان بیان است و روشی برای یافتن مقدار مطلق میزان بیان نیست.

در تحقیق گزارش شده توسط همفیل و دیترز (۱۵) از تکنیک محاسبات DNA برای تشخیص میزان بیان miR-21 و miR-122 استفاده شده است. این دو miRNA به عنوان دو بیومارکر مؤثر در سرطان کبد مطرح هستند. در این تحقیق یک گیت AND مبتنی بر رشته‌های DNA برای تشخیص میزان بیان این دو بیومارکر طراحی شده است.

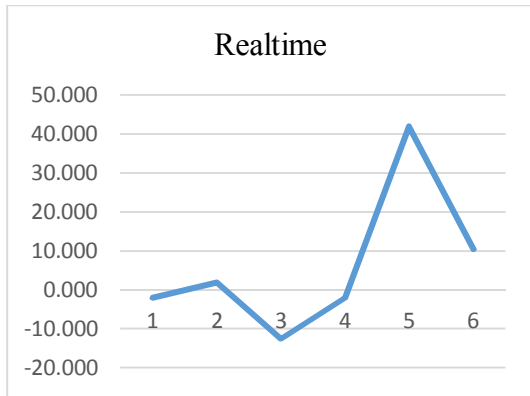
در شکل ۱۱ نتایج به دست آمده در این پژوهش با نتایج گزارش شده توسط همفیل و دیترز (۱۵) با هم مقایسه شده‌اند. چنانچه در نمودار ۱۱ دیده می‌شود، میزان فلورسنت تولید شده در روش ارائه شده در این تحقیق، در شرایطی که باید خروجی «صفر» باشد، مقدار کمتری نسبت به (۱۵) دارد و در حالتی که باید خروجی «۱» باشد، میزان فلورسنت بالاتری نسبت به (۱۵) از خود نشان داده است.

این نتایج گویای آن است که روش ارائه شده، قدرت تفکیک بالاتری نسبت به تحقیق همفیل و دیترز دارد و در نتیجه از دقت بالاتری نسبت به آن تحقیق برخوردار می‌باشد.

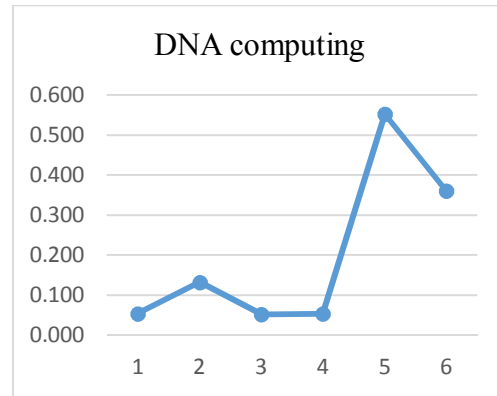
انتظار می‌رود سطح فلورسنت ایجاد شده در خروجی گیت DNA با میزان بیان اندازه‌گیری شده توسط روش Real time باهم هم‌خوانی داشته باشند. برای مشاهده میزان مشابهت نتایج دو آزمایش، نتایج در شکل ۱۰ به صورت گرافیکی رسم شده‌اند.

چنانچه در شکل ۱۰ دیده می‌شود، نمودارها در هر دو آزمایش ساختار مشابهی دارند. برای تحلیل ریاضی میزان مشابهت دو نمودار، مقدار همبستگی آماری بین اعداد به دست آمده در دو روش محاسبه گردید که برابر ۳/۱۳ است. این عدد نشان‌دهنده سطح بالای مشابهت ریاضی دو نمودار با یکدیگر است که خود گویای تطبیق نتایج آن‌ها می‌باشد.

ذکر این نکته حائز اهمیت است که محور عمودی در نمودار شکل ۱۰-الف فلورسنت و محور عمودی در نمودار ۱۰-ب میزان بیان miR-21 را نشان می‌دهد، لذا اعداد روی محورها در دو نمودار یکسان نیست. آنچه در این نمودار مهم است، مقدار نسبی سطح بیان در هر نمونه بافت نسبت به بقیه است. البته باید دقت داشت اصولاً روش محاسبات DNA روی miRNA با هدف تشخیص بالا یا



(ب)



(الف)

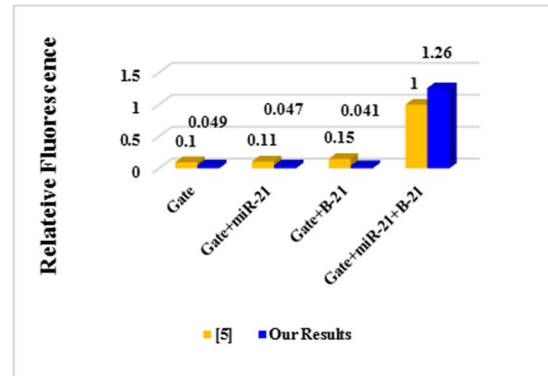
شکل ۱۰. میزان بیان miR-21 اندازه‌گیری شده در دو روش (الف) توسط گیت‌های DNA، (ب) روش Real time

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، از روش محاسبات DNA برای اندازه‌گیری میزان بیان miR-21- که در طیف وسیعی از سرطان‌ها نقش دارد- استفاده شده است. بدین منظور یک گیت AND دو ورودی طراحی و پس از شبیه‌سازی کامپیوتری به صورت آزمایشگاهی پیاده‌سازی گردید. این گیت طراحی شده در ابتدا روی نمونه‌های سنتزی و سپس روی نمونه‌های استخراج شده از بافت توموری سرطان ریه مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج آزمایش‌ها نشان‌دهنده آن است که میزان قدرت تفکیک به دست آمده در گیت ارائه‌شده حدود ۲/۵ برابر بهتر از روش‌های مشابه می‌باشد.

در ضمن این روش از نظر زمان انجام و هزینه در حد قابل‌توجهی مناسب‌تر از روش Real time-PCR می‌باشد. نتایج آزمایش گیت منطقی روی بافت توموری نیز موفقیت‌آمیز بوده و قابلیت‌های روش ارائه‌شده را کاملاً تأیید می‌نماید.

پژوهش‌های آتی ما روی طراحی گیت‌های منطقی مبتنی بر DNA برای تشخیص الگوی پیچیده miRNA جهت تشخیص زودهنگام سرطان‌های خاص که در مقالات نوین به آنها اشاره شده است (۱۶، ۱۷)، متمرکز گردیده است.



شکل ۱۱. میزان فلورسنت نسبی تولید شده در روش ارائه شده در مقایسه با نتایج گزارش شده در (۱۵).

دستاوردهای به دست آمده در این تحقیق به اختصار

عبارت انداز:

- بهبود قدرت تفکیک نسبت به پژوهش‌های مشابه (۱۵)؛
- کاهش زمان حصول نتیجه نسبت به پژوهش‌های مشابه (۱۵)؛
- کارآمدی روش ارائه شده برای نمونه‌هایی با OD بسیار کم؛
- تطبیق کامل نتایج آزمون روی بافت با نتایج حاصل از Real time.

8. Winfree E. et. al, 2006, Enzyme-free nucleic acid logic circuits, In Science, Vol. 314, No. 5805, pp.1585–1588.
9. Qian L. and E. Winfree, 2011, A simple DNA gate motif for synthesizing large-scale circuits, In J of the Roy Soc, February, pp. 1-17.
10. Liu Y, Dong B, Wu Z, Fang W, Zhou G, Shen A, et al. Toehold-mediated DNA logic gates based on host-guest DNA-GNPs. Chem Commun (Camb). 2014 Oct 18; 50(81):12026-9.
11. Ogihara M and Ray A. How DNA Computers will Work. Int Cong on Evolutionary Computation. 1999; 972-9.
12. Regev A, Silverman W and Shapiro E. Representation and simulation of biochemical processes using the pi-calculus process algebra. Pac Symp Biocomput. 2001; 459-470.
13. Seelig G, Soloveichik D, Zhang D.Y and Winfree E. Enzyme-free nucleic acid logic circuits. Science. 2006 Dec 8;314(5805):1585–8.
14. Lakin M.R, Youssef S, Polo F, Emmott S, and Phillips A. Visual DSD: a design and analysis tool for DNA strand displacement systems. Bioinformatics. 2017;27(22):3211-3.
15. Hemphill J and Deiters A. DNA Computation in Mammalian Cells: MicroRNA Logic Operations. J. Am. Chem. 2013 Jul 17;135(28):10512-8.
16. Christopher J. Cheng et. al. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment. Nature. February 2015. No. 107–110.
17. Acunzo M, Romano G, Wernicke D and Croce C. MicroRNA and cancer – A brief overview. Advances in Biological Regulation. 57. January 2015. 1-9.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از کلیه کسانی که در انجام این پژوهش همکاری و مساعدت نمودند، کمال تشکر و سپاس‌گزاری را دارند.

منابع

1. Chavoshi S, Heidari S, Rezaei M, Ebrahimi M, Etedali A, Raeisosadati R et al. Cancer Biomarkers at a Glance. Medical Science University of Ilam. 2013; 1(6):146-159.
2. Price C and Chen J. MicroRNAs in cancer biology and therapy: Current status and perspectives. Genes Dis. 2014 Sep 1; 1(1):53-63.
3. Lu J, Getz G, Miska E.A, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature. 2005 Jun 9; 435(7043): 834-8.
4. Yang C, Wang C and Chen X. Identification of seven serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential noninvasive biomarkers for malignant astrocytomas. Int J Cancer. 2013 Jan 1; 132(1): 116-27.
5. Adleman L M. Computing with DNA. EMBO Rep. 2003 Jan; 4(1): 7–10.
6. Wasiewicz P, Malinowski A, Nowak B, Mulawka J, Borsuk P, Weglenski P, et al. DNA computing: implementation of data flow logical operations. Future Generation Computer System. 2001 Jun; 17(4):361–378.
7. Shapiro E and Benenson Y. Bringing DNA computers to life. SCI AM. 2006; 17:40-7.