

روش های مبتنی بر هیبریداسیون و تقویت جهت شناسایی microRNAs

آفاق محمدی^۱، حمیدرضا ملاصالحی^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه میکروبیولوژی و زیست

فناوری میکروبی

۲- دانشیار دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی

H_mollasalehi@sbu.ac.ir

چکیده:

شناسایی MicroRNA ها (miRs, miRNAs) به عنوان مولکول های کلیدی در تنظیم بیان ژن و فرآیندهای بیولوژیکی، اهمیت بسیاری در تحقیقات زیست پزشکی و تشخیص بیماری ها دارد. روش های مختلفی برای شناسایی miRNA توسعه یافته اند که هر یک مزایا و معایب مختص به خود را دارند. در این مقاله مروری به بررسی روش های مبتنی بر هیبریداسیون شامل northing blotting و microarray و تکنیک های بر پایه تقویت شامل RCA, SDA, HCR, LAMP, EXPAR, DSN, CHA و RT-qPCR، میپردازیم. این مقاله هم چنین به مقایسه روش ها با بررسی مزایا و معایب آنها میپردازد و چالش ها و فرصت های تحقیقات آینده را مورد بحث قرار میدهد. نتایج این مطالعه نشان میدهد که ترکیب روش های هیبریداسیون و تقویت میتواند به بهبود دقت و حساسیت شناسایی miRNA کمک کند و زمینه ساز توسعه تکنیک های نوین در این حوزه باشد.

واژه های کلیدی: miRNA، هیبریداسیون، تقویت سیگنال، شناسایی miRNA، تکنیک های مولکولی

^۱Rolling circle amplification

^۲Strand-displacement amplification

^۳Hybridization chain reaction

^۴Loop-mediated isothermal amplification

^۵Exponential amplification reaction

^۶Duplex specific nuclease

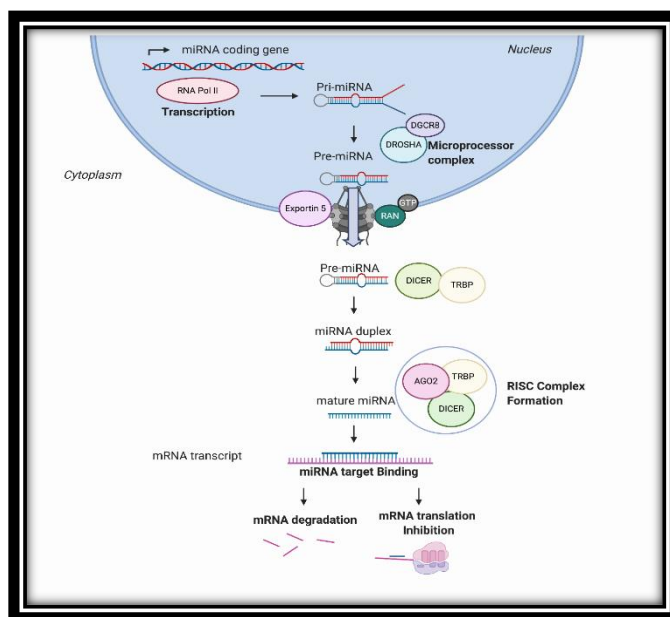
^۷Catalytic hairpin assembly

^۸Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction

۱-مقدمه:

MicroRNA ها (miRs, miRNAs) اسیدهای نوکلئیک کوچک به طول ۲۴-۱۹ نوکلئوتید هستند که غیرکدکننده و عملکردی میباشند. بیان غیرطبیعی آنها به شناسایی بیماری ها کمک میکند و به عنوان یکی از قوی ترین نشانگرهای زیستی هم به عنوان پیش آگهی دهنده و هم در نظارت روند بیماری و درمان ظاهر شده چرا که microRNA ها نه تنها در پوست بلکه در ادرار، سرم، بزاق و در همه جای بدن یافت میشوند و دسترسی به آنها راحت است. هم چنین آنها نسبتاً پایدار هستند و به راحتی قابل تشخیص اند. microRNA ها هم بیان ژن را در سلولی که سنتز میشوند میتوانند کنترل کنند و هم میتوانند در وزیکول های خارج سلولی احاطه شده و ترشح شوند. آنها با اتصال به mRNA (messenger RNA) منجر به مهار فرایند ترجمه میشوند. از طرفی تحقیقات اخیر نشان دهنده آن است که miRNA ها میتوانند از طریق برهمکنش با پروتئین ها روی بیان ژن و مکانیسم های اپی ژنتیکی تاثیر بگذارند. بیش از ۶۰٪ mRNA جایگاه حفاظت شده تکاملی برای miRNA دارند که این حاکی از تاثیر زیاد miRNA در فنوتیپ و حالات سلولی ست. آنها تقریباً هر مسیری را کنترل میکنند و تکثیر سلولی، تمایز، مورفوژنز و آپوپتوز را هدایت میکنند در نتیجه حفظ هموستاز miRNA امری ضروری ست و با توجه به نقش حیاتی آنها، تشخیص اختصاصی آنها حائز اهمیت میباشد [۴-۱]. سنتز آنها به این صورت است که از توالی DNA هسته ای توسط RNAPol II رونویسی صورت میگیرد. سپس یک نوع RNase III به نام Drosha به همراه پروتئین DGCR8 ، miRNA اولیه را تبدیل به پیش ساز حدود ۷۰ نوکلئوتید میکند. این پیش ساز توسط exportin_5 به سیتوپلاسم منتقل شده سپس توسط نوع دیگری RNase III به نام Dicer و پروتئین TRBP پیرایش میشود. در نهایت ساختار حلقه ای انتهای آن حذف شده و miRNA به صورت دو رشته در خانواده پروتئین آرگونات بارگذاری میشود. در آنجا یک رشته باید انتخاب گردد که اساس این انتخاب به پایداری ترمودینامیکی ست (پایداری ۵' یوراسیل در موقعیت نوکلئوتید ۱) که اگر این پایداری کمتر باشد باقی میماند و با کمپلکس پروتئینی RISC ادغام میشود و اعمال نقش صورت میگیرد (شکل ۱، ۳).

۴]



شکل ۱. نحوه سنتز miRNA: miRNA ها از ژنوم به یک پیش miRNA رونویسی می شوند. pre-miRNA یک ساختار ساقه‌دار کوچک‌تر است که توسط Exportin 5 از هسته به سیتوپلاسم منتقل می‌شود. هنگامی که در سیتوپلاسم قرار گرفت، توسط DICER و TRBP شکافته می‌شود و منجر به یک miRNA دابلکس کوچک می‌شود که در حدود ۲۰-۲۵ نوکلئوتید است. از طول دابلکس جدا می‌شود و یکی از رشته‌ها به RISC که توسط پروتئین‌های عضو AGO تشکیل شده است، وارد می‌شود. سپس miRNA بالغ تولید می‌شود و به طور خاص به رونوشت mRNA با تشخیص هدف مکمل متصل می‌شود. اتحاد mRNA-miRNA از ترجمه mRNA جلوگیری می‌کند یا منجر به تخریب mRNA و سپس خاموش شدن ژن می‌شود. AGO خانواده پروتئین آرگونات و RISC کمپلکس خاموش کننده ناشی از RNA [۳].

در این مطالعه سعی بر این است که تکنیک‌های برپایه هیبریداسیون (hybridization) و تقویت (amplification) را با تمرکز بر مزایا و معایب آنها جهت اذعان به اهمیت و افزایش علاقه تحقیقاتی، بررسی شود (جدول ۱). سنجش‌های مختلف miRNA در دقت، هزینه، کارایی و راحتی در نظارت، متفاوت است. روش‌های برپایه هیبریداسیون شامل northern blotting و microarray می‌باشد (در صورت زیاد بودن حجم نمونه از آنها کمک می‌گیریم) و تکنیک‌های برپایه تقویت شامل RT-qPCR، RCA، SDA، HCR، LAMP، EXPAR، DSN، CHA است که همگی به جز RT-qPCR تکنیک‌های هم‌دما هستند و RT-qPCR احتیاج به سیکل دمایی دارد (در صورت کم بودن حجم نمونه از آنها کمک می‌گیریم).

جدول ۱. روش‌های شناسایی miRNA مبتنی بر هیبریداسیون و تقویت

رفرنس	معایب	مزایا	تکنیک	اساس تکنیک
[۱، ۴، ۵]	زمان براه‌احتیاج به مقدار زیاد RNA، عدم تشخیص RNA با وزن مولکولی پایین، نیمه کمی، توان عملیاتی پایین، حساسیت	امکان سنجش اندازه RNA، تشخیص miRNA هم در فرم پیش ساز و هم بالغ، ظرفیت مولتی پلکسی، احتیاج به	northern blotting	بر اساس هیبریداسیون

		تجهیزات ارزان و غیر تخصصی	کم، احتمال زیاد تجزیه RNA	
	microarray	ظرفیت مولتی پلکسی، توان عملیاتی بالا	زمان هیبریداسیون طولانی، حساسیت و اختصاصیت پایین، محدودیت در کشف RNA جدید	[۱، ۴، ۶]
بر اساس تقویت	RT_qPCR	حساسیت و اختصاصیت بالا، امکان تکرار پذیری زیاد، دامنه دینامیکی زیاد، مانیتورینگ در زمان واقعی	تکنیکی پیچیده که نیاز به مهارت آزمایشگاهی دارد، احتمال زیاد مثبت کاذب، احتمال زیاد خطاهای انسانی، چالش در طراحی پرایمر	[۱، ۴، ۷]
	HCR	عدم نیاز به آنزیم، شرایط همدم، سادگی، کاملاً کمی، ظرفیت مولتی پلکسی	امکان هیبریداسیون غیر اختصاصی، هزینه بر	[۸-۱۰]
	SDA	شرایط همدم، ظرفیت مولتی پلکسی، حساسیت بالا، تولید محصولات تقویت شده کوتاه	محدودیت در سایز توالی، نیمه کمی، وابستگی به آنزیم های خاص	[۱۱-۱۳]
	LAMP	شرایط همدم، سرعت و کارایی بالا، سادگی، حساسیت و اختصاصیت بالا	چالش در طراحی پرایمر، محدودیت در تعیین کمیت، احتمال زیاد مثبت کاذب، احتمال زیاد آلودگی	[۱۴-۱۶]
	DSN	شرایط همدم، حساسیت بالا، حذف انتخابی، توالی یابی و تجزیه و تحلیل دقیق داده ها	احتیاج به مقدار زیاد RNA، امکان سوگیری در فرآیند تخریب	[۱۷-۱۹]
	RCA	شرایط همدم، تشخیص غلظت های بسیار کم RNA، تجزیه و تحلیل RNA های	حساسیت زیاد به آلوده ها منجر به اتصالات غیر اختصاصی می گردد، محدودیت در	[۲۰، ۲۱]

		حلقوی، سادگی، حساسیت بالا	تکرارپذیری، محدودیت در اندازه RNA حلقوی	
	EXPAR	شرایط همدم، سریع، حساسیت بالا، امکان تشخیص RNA با فراوانی کم	احتمال بالای آلودگی، چالش در طراحی پرایمر	[۲۳، ۲۲]
	CHA	شرایط همدم، عدم نیاز به آنزیم، حساسیت و اختصاصیت بالا	پیچیدگی در بهینه سازی، حساسیت زیاد به تغییرات دمایی	[۲۷-۲۴]

۲- روش شناسی:

برای بررسی روش های مبتنی بر هیبریداسیون و تقویت جهت شناسایی miRNA از یک رویکرد سیستماتیک و جامع و برای جمع آوری داده ها و اطلاعات از پایگاه های داده علمی معتبر نظیر PubMed، Google scholar و... استفاده شد. جستجوی اولیه با استفاده از کلیدواژه های مرتبط شامل miRNA biomarkers, hybridization methods, amplification, detection nucleic acid hybridization انجام شد. مقالات منتشر شده در ۲۰ سال اخیر (با تمرکز بر مقالات جدید) که به زبان انگلیسی بودند و به بررسی روش های شناسایی miRNA پرداخته بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از مطالعات مختلف با هدف شناسایی نقاط قوت و ضعف هر روش تجزیه و تحلیل شد. در نهایت یافته ها به صورت یک مقاله مروری منسجم نگارش شد. این روش شناسی به ما این امکان را داد تا یک تصویر جامع از وضعیت کنونی شناسایی miRNA به دست آوریم و به شناسایی روند های نوین و چالش های موجود در این حوزه بپردازیم.

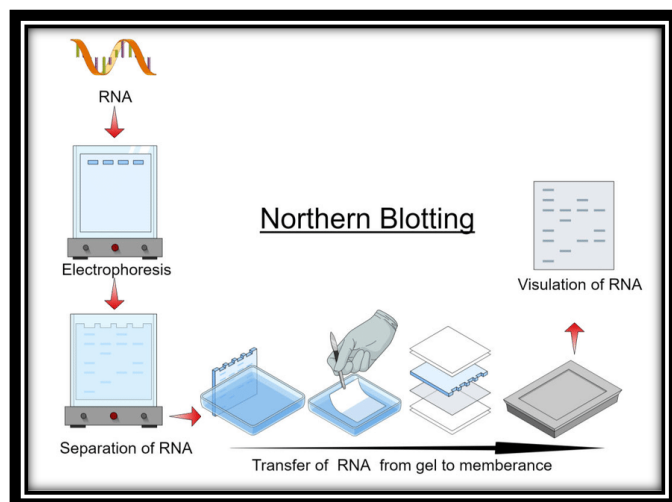
۳- بخش اصلی:

روش های مبتنی بر هیبریداسیون شامل northern blotting و microarray می باشد.

- **Northern blotting:** در ابتدا نمونه RNA استخراج شده تحت الکتروفورز ژل دنا توره کننده قرار می گیرد که معمولاً از ژل آگارز حاوی فرمالدئید استفاده می کنند و RNA ها بر اساس اندازه جدا میشوند. سپس نمونه ها به یک غشای دارای بار مثبت (نیتروسلولزی یا نایلونی) منتقل شده و در آنجا با پروب های اختصاصی نشاندار مواجه میشوند. پس از هیبریداسیون با پروب ها، پروب های آزاد شسته شده و توالی مورد هدف با اتورادیوگرافی یا فلورسانس مشخص میگردد (شکل ۱، ۴، ۵).

مزایا: در این تکنیک هم میتوان miRNA های بالغ را تشخیص داد و هم پیش ساز آنها را و اندازه RNA را نیز مشخص

میکند، توانایی آنالیز چند نمونه بر روی یک غشا را دارد و احتیاج به تجهیزات نسبتاً ارزان و غیرتخصصی دارد [۱، ۴، ۵]. معایب: زمان بر است و نیاز به مقدار RNA بالا دارد، نیمه کمی ست یعنی اندازه و فراوانی RNA ها به صورت نسبی به دست می آید، توان عملیاتی کم، احتمال بالای تجزیه RNA، حساسیت کم در حد نانومول دارد (برای افزایش حساسیت میتوان از پروب هایی که با رادیوایزوتوپ ها نشانه گذاری شدند استفاده کرد اما خطر را نیز افزایش میدهد) و RNA با وزن مولکولی پایین قابل تشخیص نیست [۱، ۴].

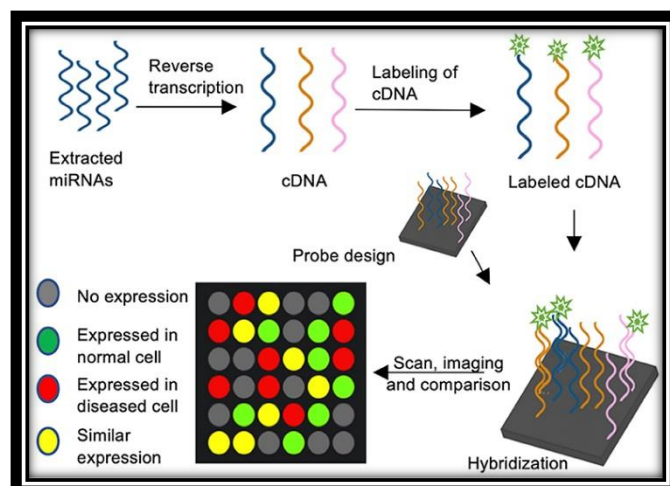


شکل ۲. northern blotting: نمونه RNA استخراج شده پس از الکتروفورز ژل به یک غشای دارای بار مثبت منتقل شده و در آنجا با پروب های اختصاصی نشاندار مواجه میشوند. پس از هیبریداسیون با پروب ها، توالی مورد هدف با اتورادیوگرافی یا فلورسانس مشخص میگردد [۲۸].

• **Microarray:** این تکنیک از یک سطح جامد کوچک تشکیل شده است که پروب های DNA یا RNA به صورت شبکه ای روی آن ثابت می شوند و سپس نمونه RNA استخراج شده پس از تبدیل به cDNA و نشاندار شدن اضافه میگردد. پس از شست و شوی توالیهای متصل نشده میتوان به کمک اتورادیوگرافی یا فلورسنت توالی های هیبرید شده را تشخیص داد (شکل ۳) [۱، ۴].

مزایا: توان عملیاتی بالا و ظرفیت مولتی پلکسی دارد و میتواند به طور همزمان صدها miRNA را بررسی کند و امکان تجزیه و تحلیل مقایسه ای را فراهم میکند [۱، ۶].

معایب: حساسیت ضعیف و زمان هیبریداسیون طولانی دارد، هم چنین اختصاصیت کم در توالی های مشابه دارد و امکان اتصال غیر اختصاصی وجود دارد، عدم امکان کشف miRNA های جدید چرا که برای طراحی پروب ها به دانش قبلی از ژنوم و توالی های خاص نیاز دارند که توانایی آن ها را برای شناسایی انواع جدید یا نادر محدود می کند [۱، ۴، ۶].

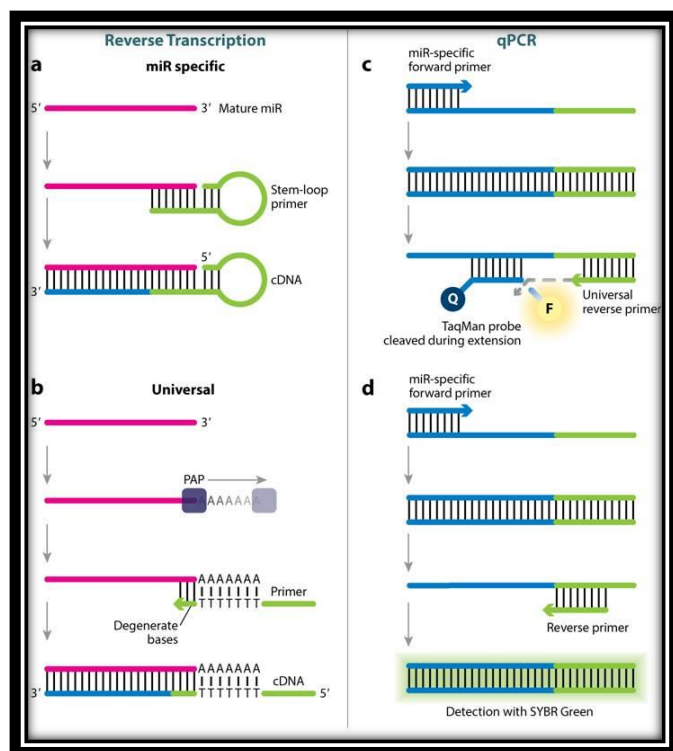


شکل ۳. **Microarray:** cDNA با رونویسی معکوس miRNA های استخراج شده سنتز می شود و cDNA ها متعاقباً با برچسب فلوروفور برچسب گذاری می شوند. کاوشگرهای الیگونوکلوئیدی مکمل miRNA های هدف بر روی یک صفحه حامل مشاهده می شوند و cDNA نشاندار شده با فلورسنت هیبرید می شود. شدت سیگنال با فراوانی miRNA مطابقت دارد [۴].

روش های مبتنی بر تقویت شامل RT-qPCR, RCA, SDA, HCR, LAMP, EXPAR, DSN, CHA و می باشد.

• **Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR):** روش تشخیص به این

صورت است که ابتدا miRNA توسط آنزیم reverse transcriptase به cDNA تبدیل گشته سپس سیکل دمایی واکنش PCR شامل دمای دناتوراسیون (denaturation)، بازسرشتگی (annealing) و گسترش (extension) صورت میگیرد و cDNA در زمان واقعی با استفاده از نشانگرهای فلورسنت تقویت و کمیت می شود. واژه quantitative به کمی بودن و قابلیت سنجش مقدار بیان آن RNA برمیگردد [۱، ۲۹]. تبدیل miRNA به cDNA از دو طریق صورت میگیرد: ۱- استفاده از پرایمرهای RT با ساختار ساقه حلقه مخصوص miRNA ۲- گسترش miRNA با دم پلی A به کمک آنزیم PAP (Poly(A) polymerase) و تبدیل به کمک پرایمر جهانی (حاوی دم پلی T) (شکل ۴) [۴، ۷، ۳۰]. مزایا: حساسیت بالا، دامنه داینامیکی زیاد و اختصاصیت بالا و تکرار پذیری بالا و مانیتورینگ در زمان واقعی [۱، ۴، ۷]. معایب: تکنیکی پیچیده ست و نیاز به مهارت آزمایشگاهی دارد، احتمال مثبت کاذب دارد، مشکل طراحی پرایمر، احتمال بالای خطاهای انسانی [۱، ۴، ۷].

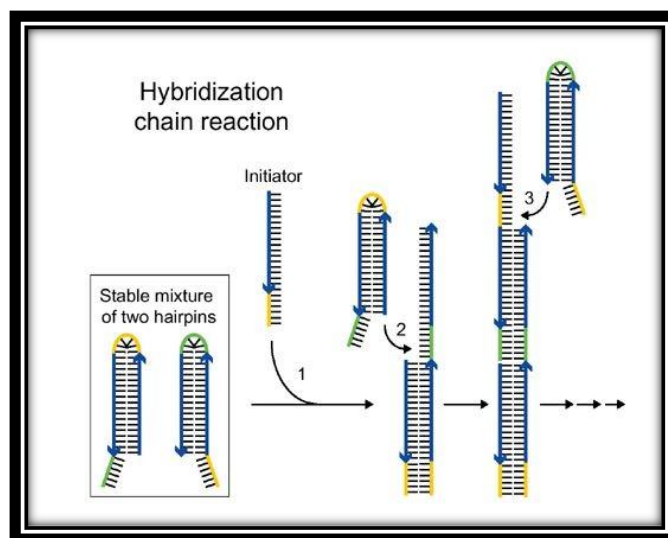


شکل ۴. **RT-qPCR**: روش‌هایی برای سنتز cDNA با رونویسی معکوس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (a) miR یا جهانی. (b) دو روش فلورسنت برای پایش miR qPCR استفاده می‌شود: (c) TaqMan فعالیت اگزونوکلئاز پلیمرز، فلوروفور را در طول گسترش PCR آزاد می‌کند. رنگ فلورسنت (d) SYBR Green به dsDNA تولید شده توسط تقویت PCR تبدیل می‌شود. اختصارات: PAP، پلی آدنیلات پلیمرز. PCR، واکنش زنجیره ای پلیمرز؛ RT-qPCR، واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی رونویسی معکوس [۷].

- **Hybridization chain reaction (HCR)**: HCR از دو مجموعه از پروب‌های سنجاق سر DNA، به عنوان پروب‌های "آغاز کننده" و "تقویت کننده" استفاده می‌کند. کاوشگر آغازگر به RNA هدف متصل می‌شود، و باز می‌شود تا دنباله ای را نشان دهد که می‌تواند با پروب‌های تقویت کننده چندگانه هیبرید شود. هنگامی که پروب‌های تقویت کننده به آغازگر متصل می‌شوند، یک واکنش زنجیره ای تشکیل می‌دهند و پلیمرهای تقویت کننده طولانی را ایجاد می‌کنند. این منجر به تقویت سیگنال قابل توجهی می‌شود که به ویژه برای تشخیص رونوشت‌های RNA با فراوانی کم مفید است (شکل ۵) [۴، ۸، ۱۰، ۳۱].

مزایا: HCR در شرایط هم‌دما عمل می‌کند و به آنزیم نیاز ندارد و در مقایسه با سایر روش‌های تقویت، آن را ساده‌تر و به طور بالقوه قوی‌تر می‌کند، در این تکنیک سیگنال تقویت شده به صورت خطی با تعداد مولکول‌های هدف همبستگی دارد و امکان تعیین کمی دقیق سطوح RNA را فراهم می‌کند و قابلیت مولتی پلکسی دارد و می‌تواند همزمان چندین RNA را تجزیه و تحلیل کند [۸، ۱۰].

معایب: HCR گاهی اوقات می‌تواند سیگنال‌های پس زمینه غیر اختصاصی را به دلیل هیبریداسیون خارج از هدف تولید کند، که ممکن است تفسیر داده‌ها را پیچیده کند و معرف‌های HCR می‌توانند گران باشند، به خصوص زمانی که پروب‌های سفارشی مورد نیاز است [۸، ۹].



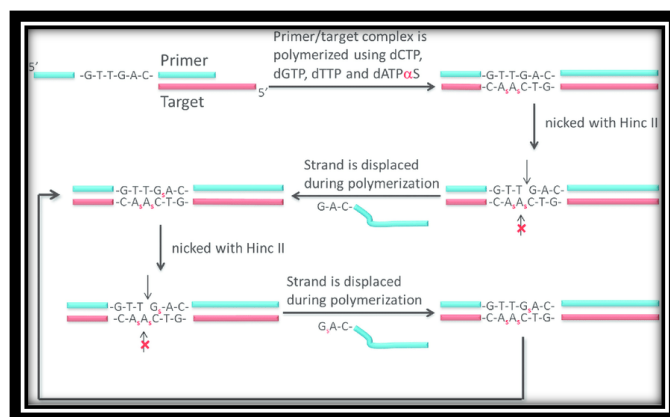
شکل ۵. HCR: افزودن یک رشته آغازگر DNA به مخلوط پایدار دو گونه سنجاق سر، یک واکنش زنجیره‌ای از رویدادهای هیبریداسیون بین سنجاق‌ها را آغاز می‌کند [۳۲].

- **SDA: Strand-displacement amplification (SDA)** تحت شرایط ایزوترمال عمل می‌کند، ابتدا پرایمرها به توالی

DNA هدف متصل می‌شوند. سپس یک قطعه از *Escherichia coli* DNA polymerase (exoklenow) پرایمرها را گسترش می‌دهد و رشته پایین دست را جابجا می‌کند و در نهایت یک آنزیم محدود کننده رشته جدید سنتز شده را در یک مکان خاص می‌شکافد و رشته شکافدار به عنوان الگویی برای تقویت بیشتر عمل می‌کند و امکان رشد نمایی دنباله هدف را فراهم می‌کند (شکل ۶) [۱۱-۱۳، ۳۱].

مزایا: SDA را می‌توان در دمای ثابت انجام داد، که نیاز به تجهیزات پیچیده حرارتی را از بین می‌برد، حساسیت بالا دارد و می‌تواند مقادیر کم اسیدهای نوکلئیک هدف را شناسایی کند، و اغلب تک نسخه‌های DNA یا RNA را شناسایی می‌کند. قابلیت مولتی پلکسی دارد و استفاده از پرایمرهای متعدد امکان تقویت همزمان اهداف مختلف را در یک واکنش واحد فراهم می‌کند و SDA معمولاً محصولات تقویت شده کوتاه‌تر (کمتر از ۱ کیلوبایت) تولید می‌کند که می‌تواند برای کاربردهای خاص مفید باشد [۱۱-۱۳].

معایب: SDA برای تقویت توالی‌های طولانی موثر نیست، که می‌تواند کاربرد آن را در برخی زمینه‌ها محدود کند، SDA به طور کلی فقط نتایج نیمه کمی ارائه می‌دهد و کمی سازی دقیق را به چالش می‌کشد و وابستگی به آنزیم‌های خاص [۱۱-۱۳].



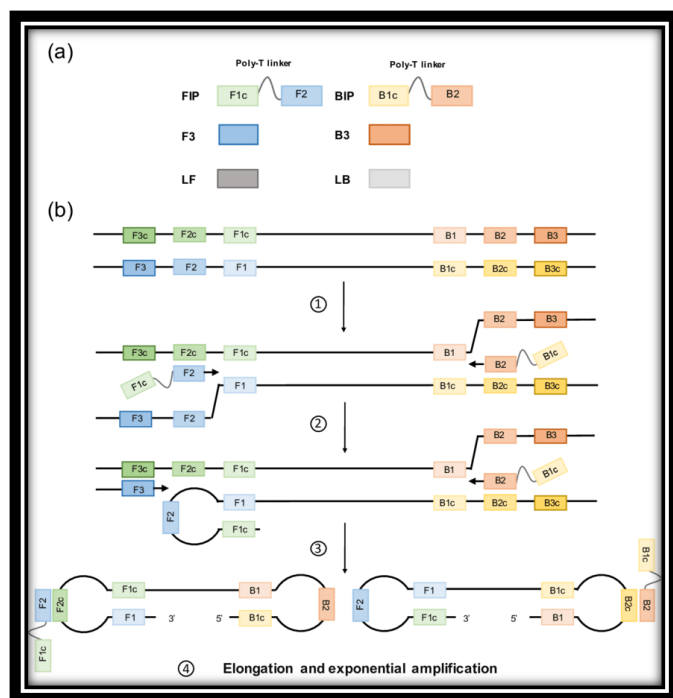
شکل ۶.SDA: پرایمر دارای محل تشخیص HincII و محل اتصال هدف است. پس از اتصال هدف، DNA جدید توسط DNA پلیمراز سنتز می شود. با این حال DNA جدید دارای اصلاح تیوفسفات است زیرا dATPaS به جای dATP استفاده می شود، پرایمر اصلی توسط HincII شکافته می شود اما نه رشته DNA جدید [۳۳].

• **Loop-mediated isothermal amplification (LAMP):** LAMP تحت شرایط همدم، معمولاً در دمای ۶۰-۶۵

درجه سانتیگراد، با استفاده از مجموعه ای از آغازگرهای طراحی شده ویژه (معمولاً ۴ تا ۶) که نواحی متمایز اسید نوکلئیک هدف را تشخیص می دهند، عمل می کند. LAMP را می توان برای تشخیص RNA با ترکیب ترانس کریپتاز معکوس، و در نتیجه RT-LAMP سازگار کرد (شکل ۷) [۱۴، ۳۶-۳۴].

مزایا: سرعت و کارایی بالا دارد و می تواند نتایج را در کمتر از ۳۰ دقیقه، بسیار سریعتر از روش های سنتی PCR ایجاد کند هم چنین به ترموسایکلرهای گران قیمت نیاز ندارد، فرآیندی ساده است و می توان آن را با حداقل آموزش انجام داد، حساسیت و اختصاصیت بالا [۱۶-۱۴].

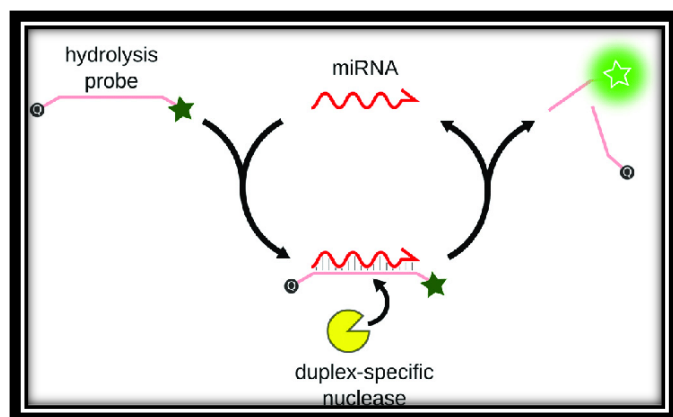
معایب: طراحی پرایمر برای LAMP به دلیل نیاز به پرایمرهای متعددی که مناطق مختلف اسید نوکلئیک را هدف قرار می دهند، می تواند چالش برانگیز باشد، قابلیت کمی محدود دارد و در حالی که LAMP می تواند وجود یا عدم وجود یک توالی هدف را نشان دهد، تعیین مقدار اسید نوکلئیک موجود می تواند دشوار باشد، خطر آلودگی دارد و اگر اقدامات احتیاطی برای جلوگیری از آلودگی در طول آزمایش انجام نشود، به راحتی می تواند نتایج مثبت کاذب ایجاد کند [۱۴-۱۶].



شکل ۷. LAMP: یک مجموعه معمولی از آغازگرهای LAMP نشان داده شده است. واکنش LAMP به چهار آغازگر، دو پرایمر داخلی (پرایمر داخلی جلو) (FIP) و (پرایمر داخلی عقب) (BIP) و دو پرایمر خارجی (F3 و B3) نیاز دارد. FIP و BIP هر کدام شامل دو توالی (معمولاً) توسط یک پیوند دهنده poly-T به هم متصل می شوند) مربوط به توالی های DNA هدف است. پرایمرهای حلقه اضافی (لوپ رو به جلو) (LF) و (حلقه به عقب) (LB)، می توانند شامل شوند که زمان واکنش را تا ۳۰ دقیقه کوتاه می کنند [۳۷].

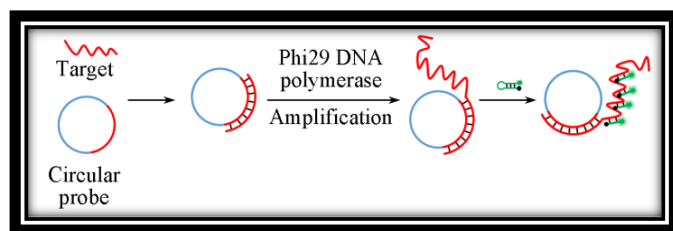
- **Duplex specific nuclease (DSN):** نمونه RNA کل با پروب های خاصی که توالی های ناخواسته را هدف قرار می دهند هیبرید می شود سپس آنزیم DSN به طور انتخابی توالی های دو رشته ای تشکیل شده توسط هیبریداسیون را هضم می کند و به طور موثر موارد ناخواسته را حذف می کند. این روش می تواند به محققان این امکان را دهد تا با تمرکز بر روی RNA های کم تر اما از نظر بیولوژیکی مهم، نمایش دقیق تری از رونوشت به دست آورند (شکل ۸) مزایا: حذف انتخابی، حساسیت بالا دارد به دلیل حذف توالی های ناخواسته، این روش حساسیت را برای تشخیص رونوشت های کم از نظر فراوانی که ممکن است توسط سیگنال های توالی هایی که مورد هدف نیستند پوشانده شوند، افزایش می دهد، کاهش توالی های ناخواسته منجر به توالی یابی تمیزتر داده ها، تسهیل تجزیه و تحلیل و تفسیر بهتر پروفایل های بیان ژن می شود.

معایب: روش DSN اغلب به مقدار نسبتاً بالایی از RNA کل برای هیبریداسیون و تخریب مؤثر نیاز دارد، که می تواند در هنگام کار با نمونه های کم بازده مانند نمونه های بالینی یک محدودیت باشد. این خطر وجود دارد که فرآیند تخریب انتخابی می تواند سوگیری ایجاد کند [۱۷-۱۹].



شکل ۸. DSN: هیبریداسیون miRNA به یک پروب هیدرولیز DNA مکمل، یک دوبلکس RNA/DNA را تشکیل می دهد. نوکلئاز مخصوص دوبلکس، دوبلکس را تشخیص می دهد و به طور انتخابی پروب را تخریب می کند و فلورسانس تولید می کند. miRNA دست نخورده باقی می ماند و آزاد است که به کاوشگر هیدرولیز دیگری متصل شود و باعث تخریب آن شود [۳۸].

- **Rolling circle amplification (RCA):** تکنیکی همدم است که از یک الگوی دایره ای، یک آغازگر، و یک DNA یا RNA پلیمراز جابجایی رشته، مانند پلیمراز phi29 یا T7 RNA پلیمراز، برای اضافه کردن نوکلئوتیدها به پرایمر، استفاده می کند و در نهایت یک محصول تک رشته ای طولانی به نام RNA تک رشته ای یا DNA ترکیبی ایجاد می شود که حاوی تکرارهای پشت سر هم متعدد است. ویژگی کلیدی RCA این است که چندین تکرار پشت سر هم از الگوی دایره ای ایجاد می کند که امکان تقویت قابل توجهی را از مقادیر کم ماده اولیه فراهم می کند (شکل ۹) [۲۲، ۲۳، ۳۱]. مزایا: تشخیص غلظت های بسیار پایین اسیدهای نوکلئیک، تجزیه و تحلیل RNA های حلقوی، شرایط ایزوترمال RCA منجر به عدم نیاز به تجهیزات چرخه حرارتی مانند PCR میشود، حساسیت بالا دارد و روشی نسبتاً ساده است که می توان در فرمت های مختلف، از جمله فاز محلول، فاز جامد و حتی در سلول های زنده مورد استفاده قرار داد. معایب: حساسیت به آلاینده ها دارد که باعث تقویت غیر اختصاصی و مثبت کاذب میشود، تنوع در نتایج می تواند به دلیل تفاوت در فعالیت آنزیم یا آماده سازی الگو رخ دهد که بر تکرارپذیری در آزمایش ها تأثیر می گذارد والگوهای دایره ای کوچک تر ممکن است در مقایسه با بزرگ تر برای تقویت کارآمد نباشند [۲۲، ۲۳].

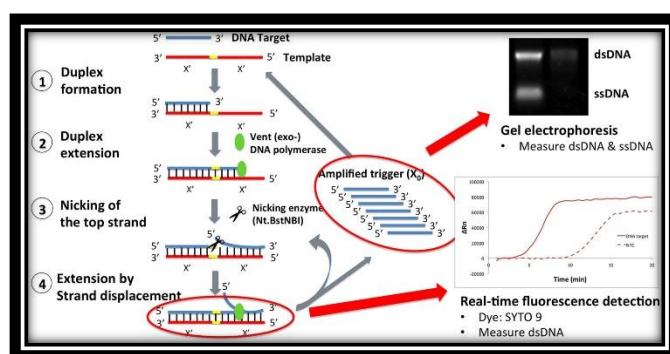


شکل ۹. RCA: نیاز به یک الگوی دایره ای، یک آغازگر، و یک DNA یا RNA پلیمراز جابجایی رشته، تا در نهایت ترکیبی ایجاد شود که حاوی تکرارهای پشت سر هم متعدد میباشد [۳۳].

- **Exponential amplification reaction (EXPAR):** الگوی تقویت دارای دو توالی جانبی مکرر در انتهای ۳' و ۵' است که مکمل miRNA مورد نظر هستند و توسط یک مکان شناسایی برای آنزیم nicking از هم جدا میشوند. miRNA هدف با توالی های مکمل به الگو هیبرید میشوند تا نوکلئوتیدها را با کمک DNA پلیمراز اضافه کند. توالی های توسعه

یافته حاوی محل تشخیص اندونوکلاز nicking توسط آنزیم nicking بریده میشوند تا یک توالی آزاد شود که باعث تقویت دیگری گردد (شکل ۱۰) [۴].

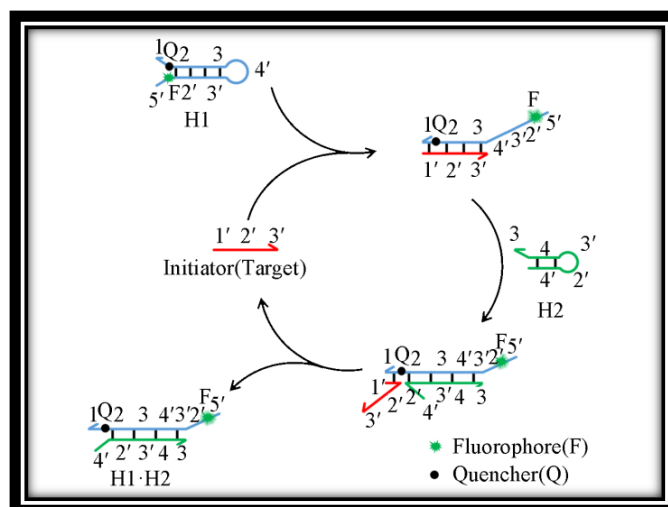
مزایا: EXPAR می تواند در عرض چند دقیقه نتیجه دهد و امکان تشخیص سریع را فراهم میکند، EXPAR به عنوان یک روش همدم، به تجهیزات گران قیمت ترموسایکلینگ نیاز ندارد و امکان دسترسی و استفاده گسترده تر در محیط های مختلف را فراهم می کند، حساسیت بالا دارد و امکان تشخیص اهداف RNA با فراوانی کم را فراهم می کند [۲۰، ۲۱]. معایب: ظهور توالی های غیراختصاصی در طول واکنش می تواند نتایج را آلوده کند و تجزیه و تحلیل های بعدی را پیچیده کند. این امر به ویژه در محیط های آزمایشگاهی که آلودگی می تواند به راحتی رخ دهد مشکل ساز است، طراحی پرایمرهای موثر برای EXPAR به دلیل ساختارهای ثانویه بالقوه در اهداف RNA و نیاز به ویژگی می تواند چالش برانگیز باشد [۲۰، ۲۱].



شکل ۱۰: EXPAR: الگوی تقویت دارای دو توالی جانبی در دو انتها است که مکمل miRNA مورد نظر هستند و توسط یک مکان شناسایی برای آنزیم nicking از هم جدا میشوند. miRNA هدف با توالی های مکمل به الگو هیبرید میشوند تا توسط DNA پلیمرز توسعه یافته و توسط آنزیم nicking بریده شوند تا باعث تقویت دیگری شود [۳۹].

• **Catalytic hairpin assembly (CHA):** روش CHA تکنیکی بدون نیاز به آنزیم است که از دو الیگونوکلوئوتید سنجاق سر استفاده می کند که به گونه ای طراحی شده اند که باز شدن یک سنجاق سر می تواند باعث باز شدن دیگری شود. هنگامی که یک اسید نوکلئیک هدف خاص مانند یک miRNA وجود دارد، به یک سنجاق سر متصل می شود و باعث می شود که باز شود و دنباله ای آزاد کند که سپس دهانه سنجاق دوم را کاتالیز و در نهایت ساختار طولانی تر تشکیل میدهد (شکل ۱۱) [۲۴، ۲۵].

مزایا: این روش در شرایط همدم بدون نیاز به آنزیم عمل می کند، که پروتکل را ساده می کند و هزینه های مربوط به استفاده از آنزیم را کاهش می دهد، حساسیت بالا، طراحی ساختارهای سنجاق سر امکان هدف گیری دقیق توالی های RNA خاص را فراهم می کند و احتمال مثبت کاذب را کاهش می دهد [۲۴-۲۶]. معایب: پیچیدگی در بهینه سازی چرا که کارایی واکنش CHA می تواند به غلظت ها و طرح های الیگونوکلوئوتیدهای سنجاق سر حساس باشد و خطر فعل و انفعالات غیر اختصاصی وجود دارد که می تواند منجر به نویز پس زمینه در سنجش شود و همچنین تغییرات دما می تواند بر نتایج تأثیر بگذارد [۲۴-۲۷].



شکل ۱۱. CHA: نیاز به دو الیگونوکلوئید سنجاق سر داریم که به گونه‌ای طراحی شده‌اند که باز شدن یک سنجاق سر می‌تواند باعث باز شدن دیگری شود. هنگامی که miRNA هدف وجود دارد، به یک سنجاق سر متصل می‌شود و باعث می‌شود که باز شود و دنباله‌ای آزاد کند که سپس دهانه سنجاق دوم را کاتالیز و در نهایت ساختار طولانی‌تر تشکیل می‌دهد [۳۳].

۴- نتیجه گیری:

در این مقاله مروری، روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون و تقویت جهت شناسایی miRNA مورد بررسی و تحلیل قرار گرفتند. بسیاری از روش‌های ذکر شده از حساسیت و دقت بالایی برخوردارند. با پیشرفت فناوری نانو و بیوتکنولوژی، فرصت‌های جدیدی برای توسعه روش‌های جدید تشخیص miRNA ایجاد شده است. نتایج نشان می‌دهد که ترکیب تکنیک‌های مختلف می‌تواند بهبود قابل توجهی در عملکرد کلی سیستم شناسایی miRNA ایجاد کند. اکثر روش‌های بررسی شده قابلیت استفاده در تشخیص بیماری‌ها را دارند چرا که miRNA‌ها به عنوان بیومارکرهای بالقوه برای تشخیص زودهنگام بیماری‌ها شناخته شده‌اند. با این حال نیاز به تحقیقات بیشتر برای رفع چالش‌ها (از جمله پیچیدگی فرآیندها، نیاز به تجهیزات پیشرفته و هزینه بالا و همچنین استانداردسازی پروتکل‌ها برای دستیابی به نتایج قابل تکرار) وجود دارد.

۵- منابع:

1. Ye, J., et al., *Research advances in the detection of miRNA*. Journal of pharmaceutical analysis, 2019. 9(4): p. 217-226.
2. Solvin, Å.Ø., et al., *MicroRNA profiling of psoriatic skin identifies 11 miRNAs associated with disease severity*. Experimental Dermatology, 2022. 31(4): p. 535-547.
3. Domingo, S., et al., *MicroRNAs in several cutaneous autoimmune diseases: Psoriasis, cutaneous lupus erythematosus and atopic dermatitis*. Cells, 2020. 9(12): p. 2656.
4. Siddika, T. and I.U. Heinemann, *Bringing MicroRNAs to light: methods for MicroRNA quantification and visualization in live cells*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2021. 8: p. 619583.
5. He, S.L. and R. Green, *Northern blotting*, in *Methods in enzymology*. 2013, Elsevier. p. 75-87.

- .6 Rai ,M.F., E.D. Tycksen, L.J. Sandell, and R.H. Brophy, *Advantages of RNA-seq compared to RNA microarrays for transcriptome profiling of anterior cruciate ligament tears*. Journal of Orthopaedic Research®, 2018. **36**(1): p. 484-497.
- .7 Hunt, E.A., D. Broyles, T .Head, and S.K. Deo, *MicroRNA detection: current technology and research strategies*. Annual review of analytical chemistry, 2015. **8**(1): p. 217-237.
- .8 Choi, H.M., V.A. Beck, and N.A. Pierce, *Next-generation in situ hybridization chain reaction: higher gain, lower cost, greater durability*. ACS nano, 2014. **8**(5): p. 4284-4294.
- .9 Tsuneoka, Y. and H. Funato, *Modified in situ hybridization chain reaction using short hairpin DNAs*. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2020. **13**: p. 75.
- .10 Schwarzkopf, M., et al ,*Hybridization chain reaction enables a unified approach to multiplexed, quantitative, high-resolution immunohistochemistry and in situ hybridization*. Development, 2021. 148(22): p. dev199847.
- .11 Fakruddin, M., et al., *Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction*. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 2013. **5**(4): p. 245-252.
- .12 Paul, R., E. Ostermann, and Q. Wei, *Advances in point-of-care nucleic acid extraction technologies for rapid diagnosis of human and plant diseases*. Biosensors and bioelectronics, 2020. **169**: p. 112592.
- .13 Tan, M., et al., *Recent advances in recombinase polymerase amplification: Principle, advantages, disadvantages and applications*. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2022. **12** :p. 1019071.
- .14 Cao, G., et al., *A diagnostic accuracy study comparing RNA LAMP, direct LAMP, and rapid antigen testing from nasopharyngeal swabs*. Frontiers in Microbiology, 2022. **13**: p. 1063414.
- .15 Srivastava, P. and D. Prasad, *Isothermal nucleic acid amplification and its uses in modern diagnostic technologies*. 3 Biotech, 2023. **13**(6): p. 200.
- .16 Garg, N., F.J. Ahmad, and S. Kar, *Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens*. Current Research in Microbial Sciences, 2022. 3: p. 100120.
- .17 Hrdlickova, R., M. Toloue, and B. Tian, *RNA-Seq methods for transcriptome analysis*. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 2017. **8**(1): p. e1364.
- .18 Yi, H., et al., *Duplex-specific nuclease efficiently removes rRNA for prokaryotic RNA-seq*. Nucleic Acids Research, 2011. **39**(20): p. e140-e140.
- .19 Ghosh, M., et al., *Duplex-specific nuclease assisted magnetic nanoprobe for cyclic amplified RNA detection*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2024. **399**: p. 13483.3
- .20 Urtel, G., M. Van Der Hofstadt, J.-C. Galas, and A. Estevez-Torres, *rEXPAR: an isothermal amplification scheme that is robust to autocatalytic parasites*. Biochemistry, 2019. **58**(23): p. 2675-2681.
- .21 Oliveira, B.B., B. Veigas, and P.V. Baptista, *Isothermal amplification of nucleic acids: The race for the next "gold standard"*. Frontiers in Sensors, 2021. **2**: p. 752600.
- .22 Garafutdinov, R., A. Sakhabutdinova, A. Gilvanov, and A. Chemeris, *Rolling circle amplification as a universal method for the analysis of a wide range of biological targets*. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2021. **47**: p. 1172-1189.
- .23 Boss, M. and C. Arenz, *A fast and easy method for specific detection of circular RNA by rolling-circle amplification*. ChemBioChem, 2020. **21**(6):(p. 793-796.
- .24 Tian, Z., et al., *Recent advances of catalytic hairpin assembly and its application in bioimaging and biomedicine*. Journal of Materials Chemistry B, 2022. **10**(28): p. 5303-5322.
- .25 Wang, L., et al., *Dual catalytic hairpin assembly-based automatic molecule machine for amplified detection of auxin response factor-targeted MicroRNA-160*. Molecules, 2021. **26**(21): p. 6432.

- .26 Kabza, A.M. and J.T. Szczepanski, *L-DNA-based catalytic hairpin assembly circuit*. *Molecules*, 2020. 25(4): p. 947.
- .27 Liao, Y., et al., *Chaperone Copolymer-Assisted Catalytic Hairpin Assembly for Highly Sensitive Detection of Adenosine*. *Polymers*, 2024. 16(15): p. 2179.
- .28 Pall, G.S. and A.J. Hamilton, *Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA*. *Nature protocols*, 2008. 3(6): p. 1077-1084.
- .29 Costa, C., A. Giménez-Capitán, N. Karachaliou, and R. Rosell, *Comprehensive molecular screening: from the RT-PCR to the RNA-seq*. *Translational lung cancer research*, 2013. 2(2): p. 87.
- .30 Shahbazi, E., A. Moradi, H. Mollasalehi, and S.R. Mohebbi, *Unravelling the diagnostic methodologies for SARS-CoV-2; the Indispensable need for developing point-of-care testing*. *Talanta*, 2024. 275: p. 126139.
- .31 Asadi, R. and H. Mollasalehi, *The mechanism and improvements to the isothermal amplification of nucleic acids, at a glance*. *Analytical biochemistry*, 2021. 631: p. 114260.
- .32 Evanko, D., *Hybridization chain reaction*. *Nature Methods*, 2004. 1(3): p. 186-186.
- .33 Li, T., et al., *Fluorescence signal amplification strategies based on DNA nanotechnology for miRNA detection*. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2020. 36(2): p. 194-202.
- .34 Mollasalehi, H., N. Vahedipour, A. Taghvamanesh, and D. Minai-Tehrani, *Development of one-pot single specific primer-LAMP (SSP-LAMP) for identification of Shigella genus using 16S rDNA*. *Analytical Biochemistry*, 2022. 636: p. 114452.
- .35 Mollasalehi, H., F. Esmaili, and D. Minai-Tehrani, *Development and evaluation of a colorimetric LAMP-based biosensor for rapid detection of a nosocomial infection agent, Citrobacter freundii*. *Scientific Reports*, 2023. 13(1): p. 21896.
- .36 Shahbazi, E., H. Mollasalehi, and D. Minai-Tehrani, *Development and evaluation of an improved quantitative loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of Morganella morganii*. *Talanta*, 2019. 191: p. 54-58.
- .37 García-Bernalt Diego, J., P. Fernandez-Soto, and A. Muro, *LAMP in neglected tropical diseases: a focus on parasites*. *Diagnostics*, 2021. 11(3): p. 521.
- .38 Jet, T., G. Gines, Y. Rondelez, and V. Taly, *Advances in multiplexed techniques for the detection and quantification of microRNAs*. *Chemical Society Reviews*, 2021. 50(6): p. 4141-4161.
- .39 Mok, E., E. Wee, Y. Wang, and M. Trau, *Comprehensive evaluation of molecular enhancers of the isothermal exponential amplification reaction*. *Scientific reports*, 2016. 6(1): p. 37837.