J. Agric. Mech., 11 (2):29-39 (2026)

Journal of
Agricultural Mechanization

Online ISSN: 2717-4107
Journal homepage: https://jam.tabrizu.ac.ir/?lang=en

Original Article

Monitoring Changes in the Concentration of Orange microRNAs During Storage Using a Multiplexed Optical Biosensor Based on Förster Resonance Energy Transfer

Keyvan Asefpour Vakilian ❋

Department of Biosystems Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

ARTICLE INFO

Keywords:
Emission Wavelength,
Fluorescence Dye,
Hybridization,
Polymerase Chain Reaction

Received:
2026-04-27

Revised:
2026-08-23

Accepted:
2026-08-31

***Corresponding Author:**
keyvan.asefpour@gau.ac.ir

ABSTRACT

Introduction

Agricultural products undergo morphological, physiological, and biochemical changes during transportation and storage. Measuring these changes can help assess mechanical damage and storage quality, although many indicators are not always specific to particular treatments or conditions. In recent years, researchers have explored the role of microRNAs as biomarkers for evaluating postharvest quality in fruit such as tomatoes, bananas, pears, and peaches. microRNAs are small non-coding RNA molecules (17–23 nucleotides) that regulate gene expression and play a key role in fruit development and quality. Specific microRNAs, including miRNA397 and miRNA828, are particularly important in determining the storage quality of oranges.

Förster resonance energy transfer (FRET) is a widely used technique in microRNA biosensing due to its simplicity and high sensitivity. It involves energy transfer between two light-sensitive molecules. This study aims to develop an optical FRET-based biosensor capable of simultaneously detecting miRNA397 and miRNA828 in orange fruit tissue. The innovation lies in applying this method to fruit tissues and evaluating its performance for monitoring fruit quality during cold storage of orange fruit.

Materials and Methods

For biosensor construction, HPLC-purified oligonucleotide sequences, the nucleic acid dye TOTO, and fluorescently labeled oligonucleotides (Cy3 and Cy5) were obtained from Sangon Biotech (China). Complementary oligonucleotides (probes) and fluorescent-labeled sequences were designed to hybridize with the target microRNAs, forming stable nucleic acid duplexes. In this system, hybridization between the target microRNA and complementary probes produces double-stranded nucleic acids that enable a fluorescence-based detection mechanism. The intercalating dye TOTO binds to these duplexes and, when excited at 440 nm, emits a broad fluorescence spectrum between 500 and 700 nm. This emission acts as an energy donor that excites Cy3 and Cy5 fluorophores, leading to FRET. As microRNA concentration increases, hybridization efficiency and fluorescence intensity also increase, enabling quantitative analysis. The system allows simultaneous detection of two target microRNAs because Cy3 and Cy5 have distinct excitation and emission spectra. Cy3 and Cy5 have absorption peaks at 550 and 650 nm, and emission peaks at 570 and 670 nm, respectively.

A total of 63 fresh, uniform oranges were collected from a farm near Gorgan (Golestan Province) and transported to the laboratory. The fruit were stored under three temperature conditions (2, 4, and 6 °C) and

How to cite:
Asefpour Vakilian,K. (2026). *Monitoring Changes in the Concentration of Orange microRNAs During Storage Using a Multiplexed Optical Biosensor Based on Förster Resonance Energy Transfer.* Journal of Agricultural Mechanization, 11 (2): 29-39.
https://doi.org/10.22034/jam.2026.72144.1360

This is an open-access article under the CC BY NC license
(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

seven storage periods (0 to 30 days), following a completely randomized design with three replications. Total RNA, including microRNAs, was extracted from fruit tissues using the TRIzol method, involving phase separation with phenol–chloroform and RNA precipitation with isopropanol. Hybridization reactions were performed in PBS buffer, followed by incubation and addition of TOTO dye. Fluorescence signals were measured using a portable spectrometer at 440 nm excitation. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA and Duncan's test (5% significance level) in MATLAB 2018b, with $P < 0.05$ considered significant, enabling evaluation of storage temperature and time effects on microRNA expression.

Results and Discussion

The biosensor response, in the form of relative fluorescence intensity, increased with rising microRNA concentration. A wide linear detection range was obtained from 0 to 9 pM, indicating strong analytical performance. The system showed acceptable reproducibility, with low standard deviation values across measurements, demonstrating stable and reproducible biosensor behavior. Recovery experiments were performed by spiking known amounts of microRNA (20–200 fM) into total RNA extracted from orange samples. The biosensor achieved recovery rates mainly between 95% and 110%, indicating acceptable accuracy. At lower concentrations (20 fM), higher variability was observed, reflecting reduced accuracy near the detection limit. At higher concentrations, recovery became more stable (approximately 97–106%), confirming improved reliability in moderate and high concentration ranges.

Biological results showed that both miRNA397 and miRNA828 levels decreased over the 30-day storage period, suggesting gradual changes in gene expression during postharvest storage. The decline was most pronounced during the first 10 days, likely due to rapid physiological changes, followed by a slower decrease. Lower storage temperatures (2 and 4 °C) helped better preserve microRNA levels compared to 6 °C, although differences were not extreme. From a biological perspective, miRNA397 is associated with lignin biosynthesis by regulating laccase genes; its reduction may increase lignification and fruit firmness, contributing to quality loss. miRNA828 regulates MYB transcription factors involved in flavonoid and anthocyanin pathways, so its decline may affect phenolic composition and antioxidant capacity. Overall, the biosensor effectively captured both analytical performance and biologically meaningful changes during fruit storage, demonstrating its potential for postharvest quality monitoring.

Conclusion

Conventional microRNA measurement methods often suffer from low sensitivity, limited linear range, and insufficient accuracy, leading to increased interest in biosensor technologies. Biosensors offer advantages such as high sensitivity, rapid response, reproducibility, and cost-effectiveness, making them strong alternatives. In this study, a FRET-based optical biosensor was developed to simultaneously detect two key microRNAs (miRNA397 and miRNA828) in postharvest oranges. Using a single excitation wavelength, the system enabled selective and accurate detection through probe hybridization. Results showed that microRNA levels significantly decreased over 30 days of cold storage, indicating fruit quality deterioration and confirming the biosensor's effectiveness for rapid quality monitoring.

نشریه
مکانیزاسیون کشاورزی
شاپا الکترونیکی: 2717-4107
درگاه نشریه: https://jam.tabrizu.ac.ir



مقاله پژوهشی

پایش تغییر غلظت ترکیبات MicroRNA پرتقال در دوره انبارمانی به کمک یک بیوسنسور نوری مالتی‌پلکس مبتنی بر انتقال انرژی رزونانسی فورستر

کیوان آصف پور وکیلیان *

تاریخ دریافت:۱۴۰۵/۰۲/۰۷ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۶/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۰۹

گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

* نویسنده مسئول: E-mail: keyvan.asefpour@gau.ac.ir

چکیده

امروزه، اندازه‌گیری غلظت ترکیبات microRNA در میوه‌ها به عنوان یک روش کارآمد برای بررسی کیفیت محصولات کشاورزی معرفی شده است. با این حال، روش‌های موجود برای اندازه‌گیری این ترکیبات، از جمله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و میکروآرایه‌ها، زمان‌بر و گران بوده و امکان اندازه‌گیری همزمان چندین ترکیب microRNA را فراهم نمی‌کنند. در این مطالعه، یک بیوسنسور مبتنی بر انتقال انرژی رزونانس فورستر رنگیزه‌های فلوئورسانس توسعه داده شد که بر اساس هیبریداسیون پراب‌های اولیگونوکلئوتیدی برچسب‌دار شده با این رنگیزه‌ها و ترکیبات microRNA هدف در حضور نور با طول موج تحریک، سیگنال نوری متناسب با غلظت ترکیبات مورد اندازه‌گیری را تولید می‌کند. روش کار بیوسنسور بر اساس تحریک رنگیزه دی‌مری تیازول اورنج در طول موج ۴۴۰ نانومتر بود که باعث تولید طیف گسترده فلوئورسانس در بازه ۵۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر می‌شد. در ادامه، دو رنگیزه فلوئورسانس Cy3 و Cy5 که طول موج تحریک آنها در این بازه است، باعث تابش قوی در طول موج‌های به ترتیب ۵۷۰ و ۶۷۰ نانومتر می‌شدند که شدت تابش متناسب با غلظت ترکیبات microRNA مورد اندازه‌گیری بود. از این بیوسنسور برای اندازه‌گیری همزمان (مالتی‌پلکس) ترکیبات miRNA397 و miRNA828 در پرتقال که نقش مهمی در ویژگی‌های انبارمانی این میوه دارند، استفاده شد. نتایج نشان داد که بیوسنسور توسعه‌یافته دارای دقت مناسب (خطای بازیابی کمتر از ۱۰ درصد)، بازه خطی وسیع (تا حداکثر ۹ پیکومولار)، و بازتولیدپذیری قابل قبول ست. نتایج این پژوهش همچنین نشان‌دهنده کاهش معنادار غلظت هر دو ترکیب microRNA مورد بررسی در طول دوره انبارمانی سرد به مدت ۳۰ روز بود. یافته‌های این مطالعه، کاربرد بیوسنسورهای مبتنی بر انتقال انرژی رزونانس فورستر را در ارزیابی سریع و قابل اعتماد کیفیت میوه در طول دوره انبارداری آشکار می‌کند.

کلمات کلیدی: رنگیزه فلوئورسانس، طول موج انتشار، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، هیبریداسیون

This is an open-access article under the CC BY NC license
(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

۱- مقدمه

ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی محصولات کشاورزی در طول فرآیند حمل و نقل و دوره انبارداری تغییر می‌کنند (Sharbati et al., 2025). اندازه‌گیری چنین ویژگی‌هایی می‌تواند شاخص مناسبی برای آسیب مکانیکی و کیفیت انبارداری در طول دوره انبارداری باشد. با این حال، بسیاری از این ویژگی‌ها ممکن است به شکل اختصاصی[1] نسبت به تیمارها و شرایط انبارداری تغییر نکنند (Hashemi Shabankareh et al., 2023). در دهه گذشته، کیفیت انبارمانی محصولات با تجزیه و تحلیل غلظت ترکیبات microRNA در محصولاتی مانند گوجه‌فرنگی، موز، گلابی و هلو مورد بررسی قرار گرفته است (Kong et al., 2021). ترکیبات microRNA مولکول‌های RNA کوچک غیر کدکننده در گیاهان، حیوانات و برخی ویروس‌ها هستند که از حدود ۱۷ تا ۲۳ نوکلئوتید تشکیل شده‌اند و تأثیر قابل توجهی بر بیان ژن دارند (Samadi et al., 2025). شبکه‌های بیان ژن و ترکیبات microRNA به تولید میوه و شکل‌گیری کیفیت آن کمک می‌کنند. ترکیبات miRNA167 و miRNA828 از جمله این ترکیبات هستند و نقش قابل توجهی در تعیین کیفیت نگهداری میوه پرتقال دارند (Dayeh et al., 2024).

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری غلظت (و یا شدت بیان) ترکیبات microRNA وجود دارد، از جمله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، میکروآرایه‌ها، و بیوسنسورهای نوری و الکتروشیمیایی. محدودیت‌های موجود در روش‌های متداول تعیین ترکیبات microRNA منجر به گسترش تحقیقات در مورد استفاده از بیوسنسورها شده است (Turner, 2013). بیوسنسورها مزایای قابل توجهی مانند میزان اختصاصی بودن بالا، پاسخ سریع، تکرارپذیری مناسب و مقرون به صرفه بودن دارند (Bahadır & Sezgintürk, 2015). با توجه به این مزایا، بیوسنسورها می‌توانند جایگزین روش‌های قبلی شوند (Bazin et al., 2017).

بیوسنسورهای microRNA عمدتاً بر اساس سیگنالی که توسط هیبریداسیون microRNA هدف و یک پراب با توالی مکمل ارائه می‌شود، کار می‌کنند (Asefpour Vakilian, 2020). برای انجام یک هیبریداسیون قابل اعتماد، روش‌های متعددی معرفی شده است، مانند طیف‌سنجی رامان ارتقایافته سطحی (SERS)[2] (Lau et al., 2016)، ایمونوسنسورهای میکروسیال (Jones et al., 2019)، و روش‌های الکتروشیمیایی (Pimalai et al., 2021) و فلوئورسانس (Jie et al., 2017). برخی از این روش‌ها در ارائه سنسورهای لندازه‌گیری همزمان چندین ترکیب microRNA هدف (لندازه‌گیری مالتی‌پلکس) موفق بوده‌اند. به عنوان مثال، پژوهشگران یک ایمونوسنسور فوق حساس برای تشخیص پپتیدهای مرتبط با هورمون پاراتیروئید با استفاده از یک دستگاه میکروسیال نیمه‌خودکار توسعه دادند (Otieno et al., 2016). همچنین، یک روش تصویربرداری مبتنی بر الکتروکمی‌لومینسانس برای تشخیص همزمان نشانگرهای زیستی سرطان با استفاده از یک آرایه الکترود دوقطبی گزارش شده است (Wu et al., 2015).

روش انتقال انرژی رزونانس فورستر (FRET)[3] به دلیل ساختار ساده با حساسیت اندازه‌گیری بالا به طور گسترده برای سنجش‌های زیستی استفاده می‌شود (Liu et al., 2017). این روش مکانیسمی است که شامل انتقال انرژی بین دو کروموفور[4] حساس به نور است. یک کروموفور دهنده، که در ابتدا در حالت برانگیخته خود است، انرژی را از طریق یک جفت‌شدن دوقطبی-دوقطبی به یک کروموفور پذیرنده منتقل می‌کند (Kaur et al., 2020). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که اتصال رنگیزه‌های[5] آلی به مولکول‌های زیستی مختلف را می‌توان بدون تغییر قابل توجه در عملکرد بیوکنژوگه‌های[6] فلوئورسنت انجام داد. روش‌های مبتنی بر فلوئورسانس برای اندازه‌گیری‌های همزمان (مالتی‌پلکس) معمولاً تحت طول موج‌های تحریک چندگانه عمل می‌کنند، زیرا تجزیه و تحلیل تداخل طیفی در پلتفرم‌های چندگانه که در آن‌ها از یک طول موج تحریک واحد استفاده می‌شود، چالش برانگیز است (Mansfield et al., 2005).

چندین روش برای غلبه بر مشکلات مربوط به همپوشانی طیفی در زمانی که یک طول موج تحریک واحد در اندازه‌گیری‌های microRNA به کمک انتقال انرژی رزونانس فورستر استفاده می‌شود، توسعه داده شده است. محققان یک بیوسنسور مبتنی بر انتقال انرژی رزونانس فورستر برای اندازه‌گیری همزمان شش ترکیب مختلف گزارش کردند که منجر به حذف بسیار کارآمد سیگنال پس‌زمینه شد (Geißler et al., 2013). همچنین، روشی برای کاهش تداخل ارائه شده است که چندین پرتو لیزر را مدوله کرده تا فلوئوروفورها را به صورت انتخابی توسط یک پرتو با طول موج خاص با استفاده از مدولاتورهای صوتی-نوری تحریک کند (Panwar & Merten, 2023).

در یک تحقیق پیشگامانه، پژوهشگران از رنگیزه اسید نوکلئیک دی‌مر رنگ نارنجی تری‌آزول (TOTO) و سه رنگیزه فلوئورسانس نشاندار Cy3، Cy3.5 و Cy5 برای انتقال انرژی رزونانس فورستر استفاده کردند، که در آن TOTO پس از هیبریداسیون ترکیب microRNA هدف و اولیگونوکلئوتیدهای پراب، یک سیگنال فلوئورسانس قوی ساطع می‌کرد (Liu et al., 2017). با توجه به طول موج‌های مختلف انتشار رنگیزه‌های مورد استفاده، سنسور پیشنهادی آنها توانایی تشخیص مالتی‌پلکس سه ترکیب

[1] Specific
[2] Surface-enhanced Raman spectroscopy
[3] Förster resonance energy transfer
[4] Chromophore
[5] Pigments
[6] Bioconjugates

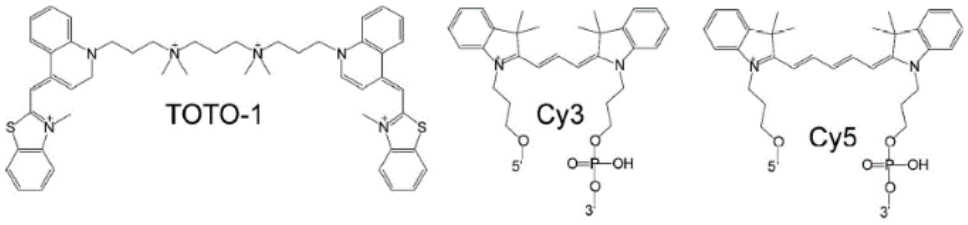
microRNA مؤثر در تشخیص سرطان در انسان را داشت. در تحقیق حاضر تلاش شده است از این روش برای توسعه یک بیوسنسور نوری microRNA مبتنی بر انتقال انرژی رزونانسی فورستر برای اندازه‌گیری همزمان و مالتی‌پلکس miRNA397 و miRNA828 که نقش مهمی در ویژگی‌های پس از برداشت میوه پرتقال دارند، استفاده شود. جنبه‌های نوآوری این پژوهش متمرکز بر بررسی معیارهای عملکردی بیوسنسور (ناحیه خطی و تکرارپذیری) در اندازه‌گیری ترکیبات microRNA موجود در بافت میوه (که با بافت‌های انسانی مورد استفاده در تحقیقات پیشین متفاوت است) و تلاش برای معرفی یک روش نوین برای پایش کیفیت میوه در دوره انبارمانی سرد (علاوه بر ویژگی‌های متداول مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی) است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- توسعه بیوسنسور نوری microRNA

پژوهش حاضر در آزمایشگاه سنسور و بیوسنسور گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. برای آماده‌سازی بیوسنسور، توالی‌های اولیگونوکلئوتیدی خالص شده به کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، رنگیزه TOTO، و اولیگومرهای برچسب‌داده شده با رنگیزه‌های فلوئورسانس Cy3 و Cy5 از طریق نماینده و واردکننده محصولات شرکت فناوری و خدمات مهندسی زیستی سانگون (Sangon, China) تهیه شد. ساختار شیمیایی این ترکیب‌ها در شکل ۱ آورده شده است. توالی ترکیب microRNA هدف به همراه توالی پراب‌های مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

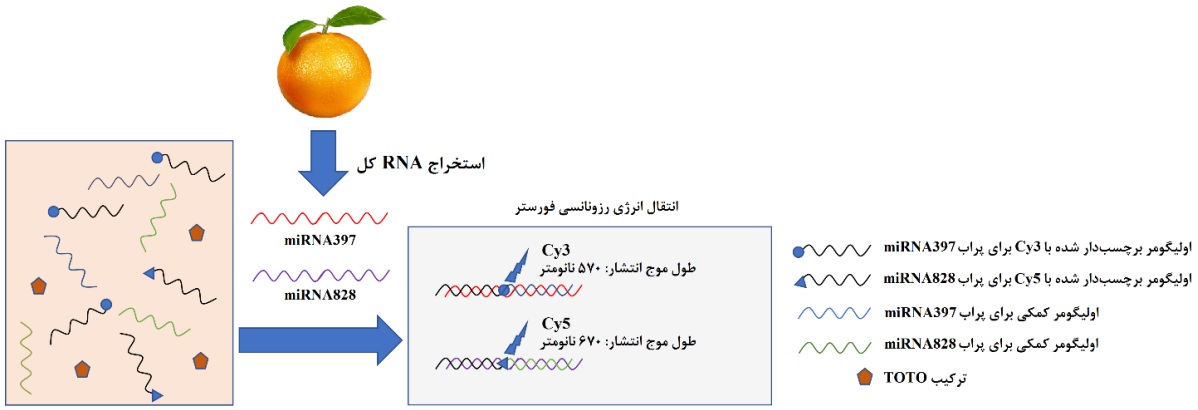
روش کار بیوسنسور به صورت شماتیک در شکل ۲ نشان داده شده است. در این روش، اولیگومر کمکی (مکمل) به همراه ترکیب‌های اولیگونوکلئوتید دارای برچسب رنگیزه‌ای فلوئورسانس با ترکیب microRNA هدف هیبرید شده و یک اسیدنوکلئیک جفت‌شده (داپلکس) را به وجود می‌آورند. این اسید نوکلئیک جفت‌شده باعث می‌شود که ترکیب TOTO در طیف ۴۴۰ نانومتر تحریک شده و طیف گسترده فلوئورسانس در بازه ۵۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر منتشر کند و باعث جذب نور توسط رنگیزه‌های فلوئورسانس Cy3 و Cy5 شود زیرا طول موج تحریک این دو رنگیزه در بازه فوق قرار دارد. این فرآیند انتقال انرژی رزونانسی فورستر نامیده می‌شود. پیک‌های تحریک رنگیزه‌های Cy3 و Cy5 به ترتیب ۵۵۰ و ۶۵۰ نانومتر است؛ در حالی که پیک‌های انتشار آن‌ها به ترتیب ۵۷۰ و ۶۷۰ نانومتر است. هرچه غلظت ترکیب microRNA هدف بیشتر باشد، فرآیند با شدت بیشتری انجام شده و شدت پیک‌های مرتبط با microRNA هدف قوی‌تر می‌شود. دلیل استفاده از دو رنگیزه در این تحقیق، اندازه‌گیری همزمان دو ترکیب microRNA بود.



شکل ۱- ساختار شیمیایی ترکیبات رنگیزه‌ای فلوئورسانس مورد استفاده در این تحقیق
Fig 1. Chemical structure of the fluorescent dye compounds used in this study

جدول ۱- توالی microRNA هدف به همراه توالی پراب‌های مورد استفاده در این تحقیق
Table 1. Sequences of target microRNAs along with their probes used in this study

ترکیب Compound	توالی Sequence
اولیگومر کمکی L_1 Auxiliary oligomer L_1	5′-CAATGA-3′
اولیگومر کمکی L_2 Auxiliary oligomer L_2	5′-GCAAGA-3′
اولیگومر برچسب‌دار شده با رنگیزه فلوئورسانس Cy3 Cy3 fluorescence dye-labeled oligomer	5′-CATCAACGCTGCACT-3′-Cy3
اولیگومر برچسب‌دار شده با رنگیزه فلوئورسانس Cy5 Cy5 fluorescence dye-labeled oligomer	5′-TGGGATACTCATTTAG-3′-Cy5
miRNA397	5′-UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG-3′
miRNA828	5′-UCUUGCCUAAAUGAGUAUCCCA-3′



شکل ۲- روش مورد استفاده در پژوهش حاضر برای اندازه‌گیری مالتی‌پلکس ترکیبات microRNA میوه پرتقال

Fig 2. Method used in this study for multiplex measurement of microRNA in orange fruit

۲-۲- طرح آزمایش‌ها

تعداد ۶۳ عدد پرتقال تازه هم‌شکل و هم‌اندازه از رقم والنسیا از یک مزرعه در نزدیکی شهرستان گرگان در استان گلستان تهیه شد و به محل انجام آزمایش انتقال پیدا کرد. نمونه‌ها در سه سطح دمایی (۲، ۴ و ۶ درجه سلسیوس) و در هفت سطح زمان انبارداری (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ روز) نگهداری شدند. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد.

۲-۳- اندازه‌گیری غلظت ترکیبات microRNA

محتوای RNA کل میوه (که حاوی microRNA هدف بود) به کمک پروتکل تریزول استخراج گردید (Meisel et al., 2005). این روش سریع، کارآمد و مناسب برای استخراج RNA باکیفیت بالا از بافت‌ها و سلول‌های مختلف است و در مطالعات مولکولی کاربرد گسترده دارد (Sharbati et al., 2025).

مقدار ۵ میکرولیتر ترکیب‌های مکمل و اولیگونوکلئوتیدهای برچسب‌دار شده با رنگیزه‌ها (با غلظت ۱۰ نانومولار) و محتوای RNA کل استخراج شده در ۵۰۰ میکرولیتر محلول بافر PBS در دمای ۲۵ درجه سلسیوس مخلوط شدند و ۱۲۰ دقیقه به مخلوط زمان داده شد تا فرایند هیبرید شدن کامل گردد. سپس اولیگومرهای هیبرید شده با رنگیزه TOTO با غلظت ۱۰۰ نانومولار به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند. در نهایت، نمونه‌ها با قرارگیری در یک دستگاه طیف‌سنجی فلوئورسانس قابل حمل (IndiGo, GoyaLab, France) در طیف ۴۴۰ نانومتر برانگیخته شدند و شدت فلوئورسانس در طول موج‌های ۵۷۰ و ۶۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت ترکیب TOTO به میزان ۱۰۰ نانومولار انتخاب شده بود.

۲-۴- روش تحلیل آماری نتایج

برای تحلیل آماری از آزمون تحلیل واریانس استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. تمامی تحلیل‌ها با استفاده از نرم‌افزار MATLAB نسخه 2018b انجام شد و مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شدند. این رویکرد آماری امکان ارزیابی دقیق اثر متغیرها بر پاسخ‌های مورد بررسی را فراهم کرد.

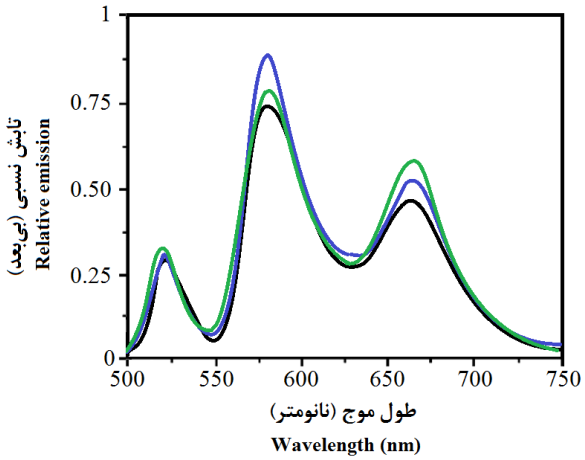
۳- نتایج و بحث

۳-۱- عملکرد بیوسنسور نوری microRNA

از آنجا که رنگیزه‌های Cy3 و Cy5 به ترتیب برای اندازه‌گیری غلظت ترکیبات miRNA397 و miRNA828 به کار رفته بودند، انتظار می‌رفت بیوسنسور در شرایط حضور این دو ترکیب، به ترتیب در نواحی ۵۷۰ و ۶۷۰ نانومتر تغییر شدت تابش نشان دهد. شکل ۳ اثر حضور ترکیبات microRNA بر روی شدت تابش نسبی بیوسنسور نوری را نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که دو پیک تابش در نواحی ۵۷۰ و ۶۷۰ نانومتر با حضور ترکیبات miRNA397 و miRNA828 در مقایسه با حالت غلظت صفر افزایش یافته‌اند.

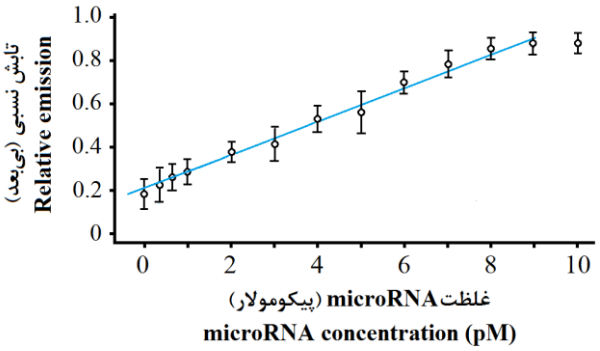
اثر غلظت ترکیبات microRNA بر روی پاسخ بیوسنسور (شدت تابش نسبی) در شکل ۴ نشان داده شده است. مقادیر تابش در این شکل به صورت میانگین و انحراف استاندارد پنج اندازه‌گیری نشان داده شده اند. خط آبی رنگ ناحیه خطی بیوسنسور را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشخص است، بازه خطی صفر تا ۹ پیکومولار برای اندازه‌گیری غلظت ترکیبات microRNA به دست آمده است. این موضوع نشان می‌دهد ترکیب TOTO در حضور طیف ۴۴۰ نانومتر توانسته است طیف گسترده فلوئورسانس در بازه ۵۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر منتشر کند و باعث جذب نور توسط رنگیزه‌های فلوئورسانس Cy3 و Cy5 شود. هرچه میزان microRNA هدف بیشتر باشد، این فرآیند با شدت بیشتری انجام می‌شود و شدت پیک‌های مرتبط با microRNA هدف قوی‌تر می‌شود. بر اساس شکل ۴، انحراف استاندارد کوچک در طول اندازه‌گیری‌ها مشاهده شد که تکرارپذیری مناسب بیوسنسور در اندازه‌گیری ترکیبات microRNA مورد مطالعه

را نشان می‌دهد. بازه خطی به دست آمده برای این بیوسنسور برای اندازه‌گیری غلظت طیف وسیعی از ترکیبات microRNA در موجودات زنده مناسب است (Rosatti et al., 2024).



شکل ۳- اثر حضور ترکیبات microRNA بر روی شدت تابش نسبی بیوسنسور نوری. منحنی‌های سیاه، آبی و سبز به ترتیب نشان‌دهنده غلظت صفر، غلظت ۱۰۰ فمتومولار miRNA397 و غلظت ۱۰۰ فمتومولار miRNA828 هستند.

Fig 3. Effect of the presence of microRNAs on the relative emission intensity of the optical biosensor. The black, blue, and green curves represent zero concentration, 100 fM of miRNA397, and 100 fM of miRNA828, respectively.



شکل ۴- اثر غلظت microRNA بر روی شدت تابش نسبی بیوسنسور نوری. مقادیر به صورت میانگین و انحراف استاندارد پنج اندازه‌گیری نشان داده شده اند. خط آبی رنگ ناحیه خطی بیوسنسور را نشان می‌دهد.

Fig 4. Effect of microRNA concentration on the relative emission intensity of the optical biosensor. Values are shown as the mean and standard deviation of five measurements. The blue line indicates the linear range of the biosensor.

به منظور بررسی دقت بیوسنسور در اندازه‌گیری غلظت ترکیبات microRNA در محلول RNA کل پرتقال، مقدار مشخصی از هر یک از ترکیبات microRNA مورد مطالعه (از ۲۰ تا ۲۰۰ فمتومولار) به نمونه‌های پرتقال اضافه شده و درصد بازیابی سیگنال بررسی شد (جدول ۲). بیوسنسور توسعه‌یافته در اندازه‌گیری هر دو ترکیب micrRNA دقت قابل قبولی داشت، به‌طوری‌که درصد بازیابی در محدوده استاندارد ۹۵ تا ۱۱۰ درصد قرار گرفته است.

برای miRNA397، میزان بازیابی بین ۹۵ تا ۱۱۵ درصد متغیر بود. در کمترین غلظت (۲۰ فمتومولار)، نوسان بیشتری مشاهده می‌شود (۹۵ تا ۱۱۵ درصد) که نشان‌دهنده کاهش دقت در نزدیکی حد تشخیص است. با افزایش غلظت، مقادیر بازیابی در بازه‌ای پایدارتر (حدود ۹۷ تا ۱۰۶ درصد) قرار می‌گیرند که بیانگر بهبود قابلیت اطمینان در غلظت‌های متوسط و بالا است. به‌طور مشابه، miRNA828 بازیابی بین ۹۶ تا ۱۱۰ درصد را نشان می‌دهد و در غلظت‌های بالاتر پراکندگی کمتری (حدود ۹۶ تا ۱۰۴ درصد) دارد که نشان‌دهنده پاسخ یکنواخت‌تر بیوسنسور است.

بازتولیدپذیری بیوسنسور با توجه به پراکندگی محدود درصدهای بازیابی، به‌ویژه در غلظت‌های ۵۰ تا ۲۰۰ فمتومولار، قابل قبول ارزیابی می‌شود. تغییرات کم بین مقادیر اندازه‌گیری‌شده نشان‌دهنده ثبات عملکرد در تکرار آزمایش‌ها است، هرچند در غلظت‌های پایین نوسان بیشتری مشاهده می‌شود. بنابراین، این بیوسنسور از نظر بازیابی عملکرد مناسبی دارد و دارای بازتولیدپذیری قابل قبول، به‌ویژه در غلظت‌های متوسط تا بالا است. تحقیقات پیشین در اندازه‌گیری microRNA مرتبط با تشخیص سرطان در انسان نیز نتایج مشابهی گزارش کرده‌اند (Liu et al., 2017).

۳-۲- غلظت microRNA پرتقال در دوره انبارمانی

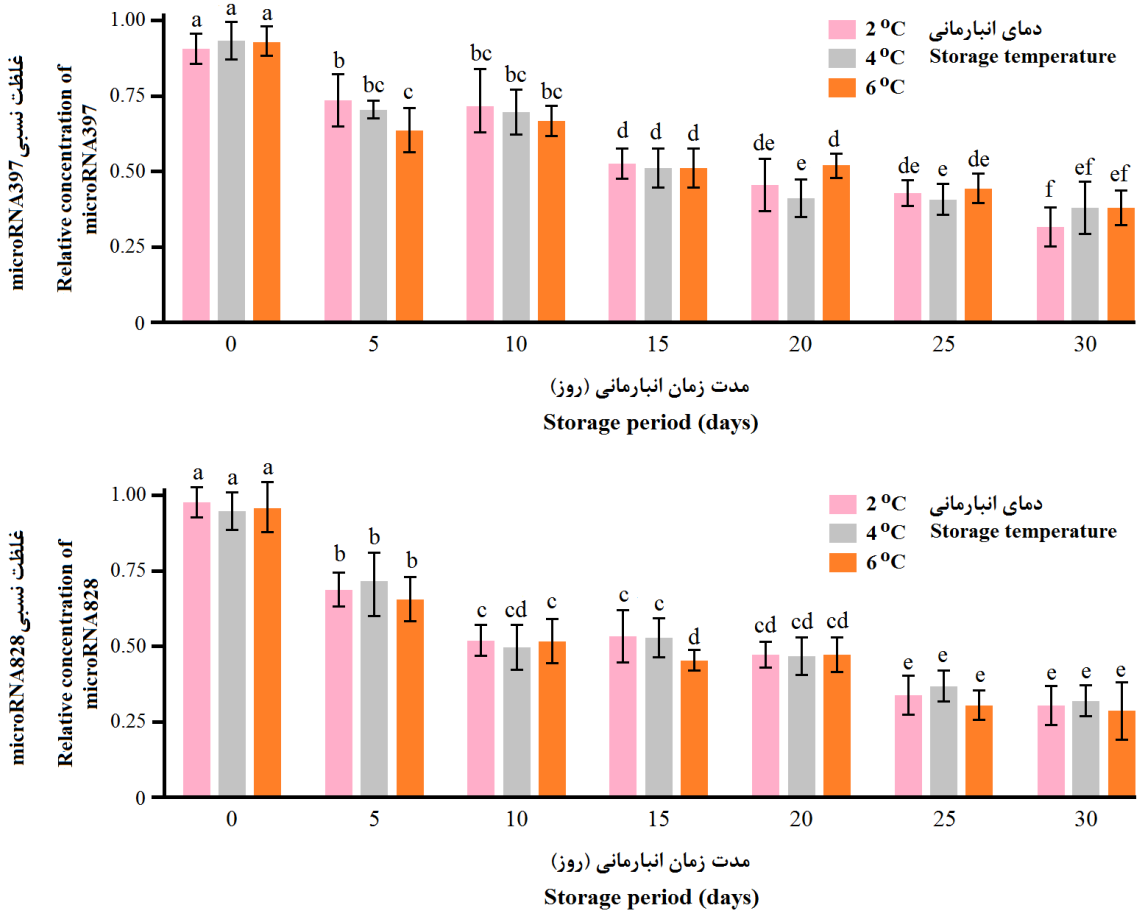
بر اساس نمودارهای ارائه شده در شکل ۵، غلظت نسبی هر دو ترکیب miRNA397 و miRNA828 در میوه پرتقال نسبت به مقادیر بیشینه در طول دوره نگهداری روند کاهشی مشخصی را نشان می‌دهند، اما شدت این کاهش و حساسیت به دما بین آن‌ها متفاوت بود. به‌طور کلی، افزایش مدت زمان نگهداری از صفر تا ۳۰ روز باعث کاهش تدریجی غلظت نسبی هر دو ترکیب microRNA شده که نشان‌دهنده تغییر بیان این مولکول‌ها و در نتیجه، تغییر بیان ژن هدف آنها در شرایط پس از برداشت است.

از نظر اثر زمان نگهداری، هر دو ترکیب microRNA کاهش تقریباً نمایی یا شبه‌خطی را نشان می‌دهند که می‌تواند ناشی از تجزیه RNA، فعالیت RNaseها، یا تغییرات متابولیکی پس از برداشت باشد. بیشترین افت در بازه صفر تا ۱۰ روز رخ می‌دهد، که احتمالاً به تغییرات فیزیولوژیکی سریع در بافت میوه مربوط است. سپس، کاهش با شیب ملایم‌تری ادامه می‌یابد. در مورد اثر دما، نتایج نشان می‌دهد که دماهای پایین‌تر (۲ و ۴ درجه سلسیوس) تا حدی در حفظ غلظت ترکیبات microRNA مؤثرتر از دمای بالاتر (۶ درجه سلسیوس) هستند، اگرچه این تفاوت در تمام زمان‌ها بسیار شدید نیست.

جدول ۲- نتایج بازیابی سیگنال بیوسنسور نوری microRNA

Table 2. Recovery results of the optical microRNA biosensor

miRNA828			miRNA397			
درصد بازیابی Recovery (%)	مقدار اندازه‌گیری شده (فمتومولار) Measured value (fM)	مقدار اضافه شده (فمتومولار) Spiked value (fM)	درصد بازیابی Recovery (%)	مقدار اندازه‌گیری شده (فمتومولار) Measured value (fM)	مقدار اضافه شده (فمتومولار) Spiked value (fM)	شماره نمونه Sample no.
110	22	20	115	23	20	S1
105	21	20	95	19	20	S2
106	53	50	108	54	50	S3
104	52	50	104	52	50	S4
105	105	100	97	97	100	S5
96	96	100	95	95	100	S6
96	145	150	102	153	150	S7
104	156	150	106	159	150	S8
98	196	200	104	207	200	S9
102	204	200	101	201	200	S10



شکل ۵- نمودار مقایسه میانگین تغییرات غلظت miRNA397 و miRNA828 در نمونه‌های پرتقال در طول دوره انبارمانی. ستون‌های مشخص‌شده با حروف یکسان تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

Fig 5. Mean comparison of the changes in miRNA397 and miRNA828 concentrations in orange samples during cold storage. Columns marked with the same letters are not significantly different at the 5% level.

ترکیب miRNA397 در پرتقال ژن‌های خانواده لاکاز را هدف قرار می‌دهد که در تولید لیگنین نقش دارند (Zhang et al., 2022). کاهش miRNA397 در طول نگهداری می‌تواند منجر به افزایش بیان لاکازها و در نتیجه تقویت لیگنیفیکاسیون، گرانوله شدن سلولی و سفت شدن بافت میوه شود (Li et al., 2022). گرانوله شدن سلولی نوعی تغییر فیزیولوژیکی محسوب می‌شود که طی آن، ضخیم شدن دیواره سلولی و تجمع لیگنین، سبب کاهش محتوای آب و زوال بافت حبه‌ها می‌گردد که یکی از شاخص‌های کاهش کیفیت پس از برداشت است. از سوی دیگر، miRNA828 در تنظیم فاکتورهای رونویسی MYB نقش دارد (Li et al., 2026) که در مسیرهای متابولیسم ثانویه، از جمله تولید فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها دخیل هستند (Tan et al., 2024). کاهش miRNA828 ممکن است باعث تغییر در ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه شود. با توجه به اینکه ترکیب miRNA828 نیز در تولید لیگنین و فرآیند گرانوله شدن میوه اثرگذار است، کاهش غلظت miRNA828 در طول دوره انبارمانی می‌تواند نشان‌دهنده افت کیفیت محصول باشد. نتایج مشابهی بر روی میوه‌های پرتقال پوشش‌داده شده با کیتوزان گزارش گردیده است (Dayeh et al., 2024). آنها نشان دادند اگرچه ویژگی‌های مورفولوژی و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی نمی‌توانند اثرات پوشش خوراکی بر کیفیت میوه پرتقال را نشان دهند، اما غلظت ترکیب miRNA397 با عملکرد مناسبی می‌تواند اثر تیمارهای مختلف مانند شرایط انبارمانی و پوشش‌دهی بر کیفیت میوه را تعیین کند.

۴- نتیجه‌گیری نهایی

محدودیت‌های روش‌های متداول اندازه‌گیری ترکیبات microRNA، مانند حساسیت پایین، محدوده خطی محدود و دقت ناکافی، زمینه‌ساز توجه به فناوری بیوسنسورها شده است. این ابزارها با ویژگی‌هایی همچون حساسیت بالا، سرعت در پاسخ‌دهی، قابلیت تکرارپذیری و مقرون‌به‌صرفه بودن، گزینه‌ای مناسب برای جایگزینی روش‌های قدیمی محسوب می‌شوند. در این پژوهش، یک بیوسنسور نوری مبتنی بر مکانیزم انتقال انرژی رزونانسی فورستر طراحی گردید و برای شناسایی هم‌زمان و چندگانه غلظت دو ترکیب کلیدی microRNA پس از برداشت پرتقال (miRNA397 و miRNA828) به کار گرفته شد. این بیوسنسور با یک طول موج برانگیختگی، امکان هیبریدیزاسیون پراب‌های متصل به رنگیزه‌ها را فراهم کرده و پاسخ‌هایی دقیق و انتخاب‌پذیر نسبت به microRNAهای موجود در میوه و گیاه ارائه می‌دهد. نتایج نشان داد که غلظت ترکیبات microRNA بررسی‌شده در پرتقال طی ۳۰ روز انبارمانی سرد به‌طور معناداری کاهش یافت که بیانگر افت کیفیت میوه در این بازه است. یافته‌ها مؤید کارایی بیوسنسورهای نوری microRNA برای پایش سریع و قابل اطمینان کیفیت میوه در طول دوره ذخیره‌سازی هستند.

منابع

Asefpour Vakilian, K. (2020). *Determination of nitrogen deficiency-related microRNAs in plants using fluorescence quenching of graphene oxide nanosheets*. Molecular & Cellular Probes, 52: 101576. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101576.

Bahadır, E. B., and Sezgintürk, M. K. (2015). *Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses*. Analytical Biochemistry, 478: 107-120. https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.011.

Bazin, I., Tria, S. A., Hayat, A., and Marty, J. L. (2017). *New biorecognition molecules in biosensors for the detection of toxins*. Biosensors & Bioelectronics, 87: 285-298. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.083.

Dayeh, N., Asefpour Vakilian, K., and Azadbakht, M. (2024). *A fruit edible coating machine to protect the morphological, physiological, and biochemical properties of citrus fruits*. Food and Bioproducts Processing, 148: 428-435. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.10.017.

Geißler, D., Stufler, S., Löhmannsröben, H. G, and Hildebrandt, N. (2013). *Six-color time-resolved forster resonance energy transfer for ultrasensitive multiplexed biosensing*. Journal of American Chemical Society, 135(3): 1102-1109. https://doi.org/10.1021/ja310317n.

Hashemi Shabankareh, S., Asghari, A., Azadbakht, M., and Asefpour Vakilian, K. (2023). *Physical and physiological characteristics, as well as miRNA concentrations, are affected by the storage time of tomatoes*. Food Chemistry, 429: 136792. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136792.

Jie, G., Zhao, Y., Wang, X., and Ding, C. (2017). *Multiplexed fluorescence detection of microRNAs based on novel distinguishable quantum dot signal probes by cycle amplification strategy*. Sensors & Actuators: B-Chemical, 252: 1026-1034. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.06.107.

Jones, A., Dhanapala, L., Kankanamage, R.N., Kumar, C. V., and Rusling, J. F. (2019). *Multiplexed immunosensors and immunoarrays*. Analytical Chemistry, 92(1): 345-362. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05080.

Kaur, A., Kaur, P., and Ahuja, S. (2020). *Förster resonance energy transfer (FRET) and applications thereof*. Analytical Methods, 12(46): 5532-5550. https://doi.org/10.1039/D0AY01961E.

Kong, X., He, M., Guo, Z., Zhou, Y., Chen, Z., Qu, H., and Zhu, H. (2021). *microRNA regulation of fruit development, quality formation and stress response*. Fruit Research, 1(1): 1-11. https://doi.org/10.48130/FruRes-2021-0005.

Lau, H. Y., Wang, Y., Wee, E. J., Botella, J. R., and Trau, M. (2016). *Field demonstration of a multiplexed point-of-care diagnostic platform for plant pathogens*. Analytical Chemistry, 88(16): 8074-8081. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01551.

Li, R., Zhao, Y., Sun, Z., Wu, Z., Wang, H., Fu, C., Zhao, H., and He, F. (2022). Genome-wide identification of switchgrass laccases involved in lignin biosynthesis and heavy-metal responses. International journal of molecular sciences, 23(12): 6530. https://doi.org/10.3390/ijms23126530.

Li, W., Xie, X., Dai, S., Yan, Y., Liu, Y., Yuan, F., Liang, Y., Yue, S., Xiao, S., Yi, D., Li, J., Nan, L., and Jiang, W. (2026). *miR828 positively regulates proanthocyanidin accumulation in sainfoin (Onobrychis viciifolia)*. BMC Plant Biology, 26: 512. https://doi.org/10.1186/s12870-026-08264-9.

Liu, Y., Wei, M., Li, Y., Liu, A., Wei, W., Zhang, Y., and Liu, S. (2017). *Application of spectral crosstalk correction for improving multiplexed microRNA detection using a single excitation wavelength*. Analytical Chemistry, 89(6): 3430-3436. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04176.

Mansfield, J. R., Gossage, K. W., Hoyt, C. C., and Levenson, R. M. (2005). *Autofluorescence removal, multiplexing, and automated analysis methods for in-vivo fluorescence imaging*. Journal of Biomedical Optics, 10(4): 041207-041207. https://doi.org/10.1117/1.2032458.

Meisel, L., Fonseca, B., González, S., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos, R., Gonzalez, M., Orellana, A., Retamales, J., and Silva, H. (2005). *A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (Prunus persica) for functional genomics analyses*. Biological Research, 38(1): 83-88. http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602005000100010.

Otieno, B. A., Krause, C. E., Jones, A. L., Kremer, R. B., and Rusling, J. F. (2016). *Cancer diagnostics via ultrasensitive multiplexed detection of parathyroid hormone-related peptides with a microfluidic immunoarray*. Analytical Chemistry, 88(18): 9269-9275. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02637.

Panwar, J., and Merten, C. A. (2023). *Fluorescence crosstalk reduction by modulated excitation-synchronous acquisition for multispectral analysis*

in high-throughput droplet microfluidics. Lab on a Chip, 23(11): 2514-2520. https://doi.org/10.1039/D2LC01016J.

Pimalai, D., Putnin, T., Waiwinya, W., Chotsuwan, C., Aroonyadet, N., and Japrung, D. (2021). *Development of electrochemical biosensors for simultaneous multiplex detection of microRNA for breast cancer screening*. Microchimica Acta, 188: 1-10. https://doi.org/10.1007/s00604-021-04995-8.

Rosatti, S., Rojas, A. M., Moro, B., Suarez, I. P., Bologna, N. G., Chorostecki, U., and Palatnik, J. F. (2024). *Principles of miRNA/miRNA* function in plant MIRNA processing*. Nucleic Acids Research, 52(14): 8356-8369. https://doi.org/10.1093/nar/gkae458.

Samadi, S. M., Asefpour Vakilian, K., and Javidan, S. M. (2025). *A review of the most important microRNAs involved in fruit postharvest properties*. Food Chemistry Advances, 9: 101168. https://doi.org/10.1016/j.focha.2025.101168.

Sharbati, M., Asefpour Vakilian, K., and Azadbakht, M. (2025). *What do microRNA concentrations tell us about the mechanical damage and storage period of strawberry fruits?* Food Chemistry: Molecular Sciences, 10: 100250. https://doi.org/10.1016/j.fochms.2025.100250.

Tan, C., Zhang, Q., Shen, W., Liu, Y., Zhang, D., Chen, L., and Chen, D. (2024). *Expression profiles of microRNA-mRNA and their potential impact on anthocyanin accumulation in purple petals of Brassica napus.* BMC Plant Biology, 24(1): 1223. https://doi.org/10.1186/s12870-024-05922-8.

Turner, A. P. F. 2013. *Biosensors: Sense and sensibility*. Chemical Society Reviews, 42(8): 3184-3196. https://doi.org/10.1039/C3CS35528D.

Wu, M. S., Liu, Z., Shi, H. W., Chen, H. Y., and Xu, J. J. (2015). *Visual electrochemiluminescence detection of cancer biomarkers on a closed bipolar electrode array chip*. Analytical Chemistry, 87(1): 530-537. https://doi.org/10.1021/ac502989f.

Zhang, Y., Shan, X., Zhao, Q., and Shi, F. (2022). *The MicroRNA397a-LACCASE17 module regulates lignin biosynthesis in Medicago ruthenica (L.).* Frontiers in Plant Science, 13: 978515. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.978515.