

Modeling and Optimization of Oligonucleotide–Based Nanobiosensor Using Artificial Neural Network and Genetic Algorithm Based Procedure

AYDIN IMANI¹, SOLEIMAN HOSSEINPOUR^{1*}, MOSTAFA AZIMZADEH^{2,3,4}, ALIREZA KEYHANI¹

1. Agricultural Machinery Engineering Dept., Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran.

2. Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

3. Medical Nanotechnology & Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

4. Stem Cell Biology Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

(Received: Oct. 13, 2019- Revised: Dec. 7, 2019- Accepted: Dec. 10, 2019)

ABSTRACT

Developing a biosensor faces the different challenges for parameter optimization and calibration. In this study, a machine learning based approach is used to model and optimize the effective parameters of an electrochemical nanobiosensor based on thiolated probe-functionalized gold nanorods (GNRs) decorated on the graphene oxide (GO) sheet on the surface of a glassy carbon electrode (GCE). The response of the biosensor was considered as the output and eight effective factors including GO concentration, GNR concentration, probe concentration, probe time, MCH time, hybridization time, Oracet Blue (OB) concentration, and OB incubation time were used as inputs to train and model an artificial neural network. The experimental results demonstrate that the output of the developed model has an acceptable compatibility with the results obtained in the laboratory. The developed model is able to predict the output of the nanobiosensor with accuracy of 96.91% and the mean absolute percentage error (MAPE) value of 5.5090 %. Finally, genetic algorithm is used to find the optimum values of these parameters which yield the maximum value of the nanobiosensor output. The optimization results indicated that this method has better performance compared to the laboratory results and this method can be used for nanobiosensor design.

Keywords: Nanobiosensor, Modeling, Artificial Neural Network, Optimization, Genetic Algorithm.

مدل سازی و بهینه سازی نانوبیوسنسور الیگونوکلئوتیدی با استفاده از رویکرد مبتنی بر شبکه عصبی مصنوعی و الگوریتم ژنتیک

آیدین ایمانی^۱، سلیمان حسین پور^{۱*}، مصطفی عظیم زاده^{۲،۳}، علیرضا کیهانی^۱

۱. گروه مهندسی ماشین های کشاورزی، دانشکده مهندسی و فناوری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲. گروه علوم و فناوری های نوین پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۳. مرکز تحقیقات بیولوژی سلول های بنیادی، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی یزد، یزد، ایران

۴. مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی یزد، یزد، ایران

ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۲۱ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۸/۹/۱۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۹/۱۹)

چکیده

توسعه هر نوع بیوسنسور با چالش هایی در زمینه بهینه سازی پارامترها و کالیبراسیون مواجه است. در این تحقیق رویکردی مبتنی بر یادگیری ماشین برای مدل سازی و بهینه سازی مولفه های تاثیرگذار در ساخت نانوبیوسنسور الکتروشیمیایی بر اساس الکتروود کربن شیشه ای اصلاح شده با گرافن اکسید و نانومیله طلا در شرایط کاری آزمایشگاهی ارائه شده است. پاسخ نانوبیوسنسور به عنوان خروجی و تاثیر هشت عامل موثر شامل: غلظت گرافن اکسید، غلظت نانو میله های طلا، غلظت پروب تکرشته ای، مدت زمان ماند پروب تکرشته ای بر روی الکتروود اصلاح شده، مدت زمان هیبریداسیون پروب و الیگونوکلئوتید هدف، غلظت محلول شناساگر اوراست بلو، مدت زمان ماند اوراست بلو، به عنوان ورودی های مدل شبکه عصبی برای آموزش و توسعه مدل مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج بدست آمده نشان داد که خروجی مدل همخوانی قابل قبولی با نتایج آزمایشگاهی داشته و مدل می تواند پاسخ نانوبیوسنسور را با دقت ۹۶/۹۱ درصد و میانگین درصد خطای مطلق ۵/۵۰۹۰ درصد پیش بینی کند. در پایان با استفاده از الگوریتم ژنتیک مقادیر بهینه متغیرهای ورودی برای دستیابی به حداکثر جریان پاسخ نانوبیوسنسور، محاسبه گردید. نتایج بهینه سازی نشان داد که این روش عملکرد مناسبی در مقایسه با نتایج آزمایشگاهی دارد و می تواند برای ساخت و طراحی نانوبیوسنسور مورد استفاده قرار بگیرد.

واژه های کلیدی: نانوبیوسنسور، مدل سازی، شبکه عصبی مصنوعی، بهینه سازی، الگوریتم ژنتیک.

مقدمه

انسان و توسعه صنعت غذا باقی مانده است. علاوه بر این، با توجه به پیچیدگی ساختار مواد غذایی و آثار باقیمانده آلودگی ها و سموم، توسعه رویکردهایی سریع، حساس و جدید برای تشخیص سلامت غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است. در سال های اخیر، بیوسنسورهای فراوانی به عنوان جایگزین روش های مرسوم و یا ابزارهای تشخیصی مکمل این روش ها جهت تشخیص سریع و دقیق آلودگی های غذایی، بیماری ها، اهداف بیولوژیکی و... به طور موفق توسعه داده شده اند (Sharma et al., 2015).

حسگرهای زیستی^۱ (بیوسنسورها) ابزارهای محاسباتی برای تشخیص و یا کمیت سنجی آنالیت ها در محلول های

در سال های اخیر مبحث امنیت غذایی به عنوان یک نگرانی در عرصه بین المللی مورد توجه جوامع و دولت ها قرار گرفته است. مواد خطرناک موجود در غذا می تواند تهدید بزرگی برای سلامت انسان باشد و خسارات عظیم اقتصادی را در بخش صنایع غذایی به بار بیاورد. وقوع انقلاب سبز در قرن گذشته موجب رشد سریع تولید مواد غذایی شده است. بدیهی است که احتمال آلودگی مواد غذایی به دلیل ورود ناخواسته باقیمانده سموم نیز در همین مدت افزایش یافته است (Liu et al., 2018). از این رو، امنیت غذایی همچنان به عنوان یک چالش بزرگ جهانی برای تامین سلامت

* نویسنده مسئول: shosseinpour@ut.ac.ir

1. Biosensors
2. Analyte

بهترین شرایط آزمایشی یک بیوسنسور با هزینه و زمان کم باشد. از سوی دیگر استفاده از مدل‌های رایانه‌ای ممکن است اعتبار کمتری در مقایسه با نتایج آزمایشگاهی داشته باشد. از این رو، برخی از محققان تلاش کردند تا بر این مشکل غلبه کنند. اکثر رویکردهای مدل‌سازی سعی در فهم پاسخ حسگر به عنوان تابعی از رفتار سینتیک شیمیایی بیوسنسور الکتروشیمیایی داشته‌اند. به عنوان مثال، *Blaedel et al.* (1972) اولین مدل قابل توجه را برای توصیف بخشی از رفتار سینتیک یک بیوسنسور ایده‌آل آنزیمی ارائه دادند. از این مدل برای بررسی رفتار پتانسیومتریک الکترودهای اوره‌آز^۴ استفاده شد. با استفاده از شبیه‌سازی‌های دیجیتال، *Mell & Maloy* (1975) پاسخ جریان حالت پایدار الکترودهای آمپرومتریک آنزیمی را مدل کردند. با این وجود، عدم توصیف دقیق شرایط مرزی انتقال جرم تعمیم مدل را با محدودیت روبرو کرد.

روش‌های دیگر شامل استفاده از رویکردهایی برای مدل‌سازی پاسخ بیوسنسور با استفاده از تحلیل‌های ریاضی معادلات دیفرانسل جزئی است. این رویکردها در فرآیندهای بیوکاتالیستی ساده و همچنان مدل‌سازی‌های دیجیتال با استفاده از تبدیلات پیچیده بیوکاتالیستی، هندسه مبدل‌های چندوجهی و ساختارهای غشایی بیوکاتالیستی قابل استفاده هستند (*Bartlett et al., 2008; Baronas et al., 2009*). اخیراً پتانسیل استفاده از روش‌های یادگیری ماشین مانند شبکه عصبی مصنوعی (*Alonso et al., 2010; Rangelova et al., 2010*)، ماشین بردار پشتیبان (*Hastie et al., 2005*)، سیستم عصبی فازی تطبیقی (انفیس) (*Akbari et al., 2016*) و... برای مدل‌سازی پاسخ بیوسنسور الکتروشیمیایی توسط محققان گوناگون مورد توجه قرار گرفته است.

رویکردهای مبتنی بر هوش مصنوعی مانند شبکه‌های عصبی مصنوعی به دلیل اینکه تنها به ورودی و خروجی برای ایجاد مدل احتیاج دارند، می‌توانند ابزارهای بسیار کارآمدی برای مدل‌سازی کاربردهای شیمیایی مانند پاسخ بیوسنسور باشند. شبکه عصبی مصنوعی قادر به مدل‌سازی سیگنال‌های خطی یا غیر خطی با دقت بالا، در مدت زمان کوتاه و در عملیات زمان واقعی هست. مزیت دیگر عدم نیاز این رویکرد به روابط میان پارامترهای به شدت غیرخطی موجود در فرایند آزمایش است (*Gutés et al., 2005; Valdés-Ramírez et al., 2009; Alonso et al., 2012*).

در سال‌های اخیر پژوهش‌های انجام گرفته در زمینه توسعه

شیمیایی و بیوشیمیایی مانند مارکرهای زیستی^۱ هستند. بیوسنسورهای مرسوم برای مصارف گوناگونی از قبیل تشخیص عوامل سرطان‌زا، اندازه‌گیری سم در محیط یا کاربردهای بسیار متنوع دیگر مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یک بیوسنسور به‌طور کلی از بخش‌های مختلفی شامل گیرنده زیستی^۲، مبدل^۳، پردازشگر سیگنال و نمایشگر تشکیل شده است. گیرنده زیستی می‌تواند شامل DNA، RNA، آنتی بادی، آپتامر، آنزیم و یا یک سلول باشد. مبدل از اجزای اساسی بیوسنسورها است که پیام حاصل از برهم‌کنش آنالیت (جزء شناسایی شونده) با بخش زیستی که اغلب به‌صورت بیوشیمیایی است به پیام الکتریکی قابل ثبت تبدیل می‌کند. بیوسنسورها بر اساس مبدل به انواع مختلف از قبیل الکتریکی، الکتروشیمیایی، نوری (رنگ‌سنجی)، فلئورسانت و...، مکانیکی، گرمایی و... تقسیم می‌شوند (*Topkaya et al., 2016*).

بیوسنسورهای الکتروشیمیایی به دلیل دقت بالا، ارزان بودن و ساختار ساده‌تر جزو فراوان‌ترین بیوسنسورهای مورد استفاده هستند. به طور مثال، یک دستگاه اندازه‌گیری قند خون نمونه‌ای از یک بیوسنسور الکتروشیمیایی است که دارای خصوصیات ذکر شده است. در بیوسنسورهای الکتروشیمیایی، الکتروده جزء اصلی به حساب می‌آید و سطح آن محلی برای قرارگیری گیرنده زیستی است. برای دستیابی به بهترین نتیجه جهت توسعه یک بیوسنسور الکتروشیمیایی، پارامترهای ساخت باید از طریق آزمایش‌هایی، ارزیابی و مقادیر بهینه آنها برای دستیابی به بالاترین حساسیت تعیین گردد. پژوهشگران برای دستیابی به این هدف از رویکردهای متفاوتی از جمله: بهینه‌سازی گام به گام، طراحی آزمایش‌ها، شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای و مدل‌سازی استفاده کرده‌اند (*Topkaya & Azimzadeh, 2016; Azimzadeh et al., 2017*).

توسعه هر نوع بیوسنسور با چالش‌هایی در زمینه بهینه‌سازی پارامترها و کالیبراسیون مواجه است. به طور معمول، اجرای این مراحل نیازمند انجام آزمایش‌های فراوان و یافتن روش‌های مناسب پردازش سیگنال برای ثبت فعل و انفعال زیستی رخ داده همراه با کمترین میزان نویز و خطای اندازه‌گیری است. در نتیجه، دستیابی به یک رویکرد ارزان، سریع و دوست‌دار محیط زیست در روند بهینه‌سازی بیوسنسور ضروری به نظر می‌رسد (*Rodriguez-Mozaz et al., 2004; Sapeliasukas et al., 2014; Eaimkhong, 2013*).

مدل‌سازی رایانه‌ای می‌تواند یک راه موثر برای یافتن

الکترولیت برای اندازه‌گیری‌های ولتامتری پالس تفاضلی تهیه گردید. برای تثبیت الیگونوکلئوتیدها بر روی نانومیل‌های طلای موجود در سطح الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده، از بافر فسفات ۰/۱ M با pH برابر ۴/۵ شامل تک‌رشته‌ای پروب تیول‌دار استفاده شد. جهت انجام فرایند هیبریداسیون از محلول شامل غلظت‌های مختلف از تک‌رشته‌ای مکمل، بافر فسفات ۰/۰۵ M و ۰/۳ M با pH برابر ۷/۰ استفاده شد. به منظور تهیه محلول شناساگر، مقدار مشخصی از اوراست‌بلو در متانول حل شده و پس از آن با افزایش محلول‌های بافر فسفاتی ۰/۱ M با pH برابر ۷/۰ حجم مورد نظر رسید. از محلول‌های ۱/۰ mM از MCH و ۱/۰ M از سولفوریک اسید، در آب دو بار تقطیر، به ترتیب برای تهیه محلول‌های MCH و پیش‌تیمار الکتروشیمیایی الکتروود طلا استفاده شد. محلول اولیه الیگونوکلئوتیدها به وسیله بافر TE (۰/۱ M Tris-EDTA) با غلظت نهایی ۱۰۰ μM تهیه و در دمای ۲۰ °C - تا زمان استفاده با غلظت مورد نظر نگهداری شدند.

تهیه نانوبیوسنسور

آزمایشات مربوط به چرخه ولتامتری و ولتامتری پالس تفاضلی با استفاده از یک دستگاه potentiostat-golvanostat microautolab III انجام گرفت. سیستم سه الکتروودی مورد استفاده از الکتروود کالومل اشباع‌کبه عنوان الکتروود مرجع، الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح‌شده با گرافن اکسید و نانومیل‌های طلا به عنوان الکتروود کار و الکتروود پلاتینی به عنوان الکتروود کمکی تشکیل شده بود. در نانوبیوسنسور تحت آزمایش از الکتروود کار کربن شیشه‌ای با قطر ۲ mm اصلاح شده، ساخت شرکت آذر الکتروود ایران استفاده شد.

به منظور پاکسازی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای، توسط مخلوط آلومینا با ذرات ۰/۰۵ μm و ۰/۱ μm با آب بر روی یک سطح پارچه‌ای نخی، صیقل داده شد تا زمانی که یک سطح شبه آینه‌ای برای الکتروود بدست آید. در نهایت الکتروود با آب دو بار تقطیر شستشو داده شد و مجدداً به منظور حذف ذرات آلومینیوم بر روی پارچه‌ای تمیزی ساییده و صیقل داده شد. در نهایت با استفاده از حمام فراصوت الکتروود کار در آب مقطر یون‌زدایی شده به مدت ۵ دقیقه برای از بین بردن بقایای آلومینا قرار گرفته و تحت جریان گاز نیتروژن خشک گردید.

برای یافتن پاسخ بهینه نانوبیوسنسور نسبت به متغیرهای مورد بررسی در این تحقیق، ابتدا مخلوط‌های با غلظت مختلف گرافن اکسید (۲ mg/mL - ۰/۲۵ mg/mL مخلوط معلق در آب) بر روی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای آماده شده قرار داده شد و به مدت

روش‌های مبتنی بر شبکه عصبی مصنوعی برای پردازش سیگنال بیوسنسورهای گوناگون مانند: مدل‌سازی پاسخ بیوسنسور جهت اندازه‌گیری باقیمانده سموم موجود در مواد غذایی (Ferentinos *et al.*, 2012)، شبیه‌سازی پاسخ بیوسنسورهای نوری (Abdullah *et al.*, 2008)، توسعه بیوسنسور جهت پایش و کنترل غیر مستقیم پپتیدهای ضد میکروب^۱ (Hou *et al.*, 2016)، اندازه‌گیری میزان ترکیب‌های موجود در شیر (Mishra *et al.*, 2016)، تشخیص ترکیبات فنلی در آب (Maleki *et al.*, 2017) گسترش یافته است.

در این تحقیق رویکردی مبتنی بر یادگیری ماشین برای مدل‌سازی و بهینه‌سازی عوامل تاثیرگذار در ساخت نانوبیوسنسور مبتنی بر الیگونوکلئوتید در شرایط کاری آزمایشگاهی ارائه شده است. بدین منظور، در پژوهش حاضر یک مدل مبتنی بر شبکه عصبی مصنوعی به عنوان ابزاری قدرتمند برای تخمین پاسخ جریان نانوبیوسنسور الکتروشیمیایی بر اساس الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با گرافن اکسید و نانومیل طلا مورد استفاده در پژوهش Azimzadeh *et al.* (2016) توسعه داده شد. تاثیر هشت عامل موثر بر پاسخ نانوبیوسنسور به عنوان ورودی مدل شبکه عصبی و میزان پاسخ نانوبیوسنسور به عنوان خروجی مدل در نظر گرفته شد. در نهایت پس از تکمیل فرایند مدل‌سازی برای یافتن شرایط آماده‌سازی بهینه مربوط به حداکثر جریان پاسخ نانوبیوسنسور، از الگوریتم ژنتیک برای بهینه‌سازی مدل توسعه داده شده، استفاده شد.

مواد و روش‌ها

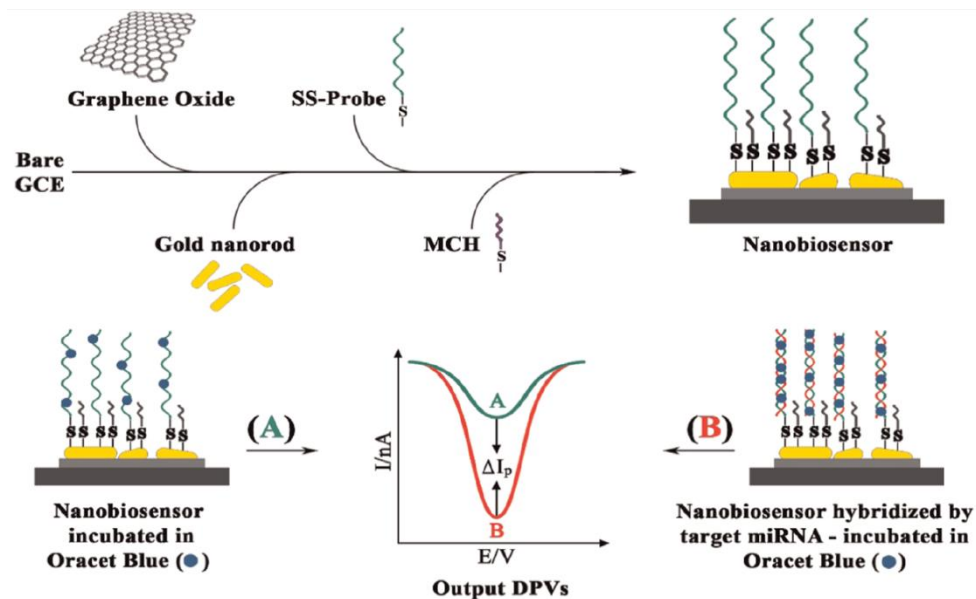
مواد شیمیایی و محلول‌های آزمایش

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در پژوهش حاضر بدون تغییر مورد استفاده قرار گرفتند و از خلوص آزمایشگاهی برخوردار بودند. الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در این تحقیق به صورت پودر لیوفلیز شده و با درجه خلوص HPLC از شرکت‌های Bioneer و Macrogen تهیه شدند. آنالیت هدف در این تحقیق miRNA-155 (با توالی هدف TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT) بود. تمام ظروف شیشه‌ای و لوله‌های آزمایش مورد استفاده در این تحقیق در شرایط مناسب به طور مجزا توسط دستگاه اتوکلاو ضدعفونی شدند. تمام محلول‌های مورد استفاده (بجز محلول‌های MCH و اوراست‌بلو)، توسط آب دو بار تقطیر تهیه شدند.

محلول بافر فسفات با مقدار pH برابر با ۷/۰ به عنوان

پس از آماده سازی سطح نانوبیوسنسور و ذخیره پاسخ نانوبیوسنسور در هر مرحله، عمل هیبریداسیون توسط الیگونوکلوئوتید هدف در چند سطح از بازه های زمانی (۱۵۰ min – ۱۵) بر روی سطح نانوبیوسنسور انجام گرفت. در نهایت بعد از اطمینان از صحت فرایندهای آماده سازی نانوبیوسنسور در محلول با غلظت های مختلف اوراستبلو (۰/۰۵ – ۰/۳ mM) و همچنین سطوح مختلف زمان انباشت (۱۲۰ min – ۵) قرار داده شد. در نهایت تمامی اطلاعات بدست آمده از مراحل مختلف آزمایش به صورت ترکیب هشت متغیر به عنوان ورودی و پاسخ جریان نانوبیوسنسور به عنوان مقادیر خروجی جهت آموزش و توسعه مدل شبکه عصبی در بخش مدل سازی مورد استفاده قرار گرفتند. در (شکل ۱) خلاصه ای از روند انجام گرفته در تحقیق حاضر ارائه شده است. جزئیات مراحل مختلف آزمایش در پژوهش *Azimzadeh et al.* (2016) موجود هست.

۵ دقیقه در محفظه سر بسته با رطوبت بالا قرار گرفت تا خشک شود. پس از حصول اطمینان از اصلاح الکتروود با گرافن اکسید، غلظت های مختلف نانومیله طلا (۲۵ – ۳۰۰ mcg/mL) مخلوط معلق در آب) بر روی الکتروود شیشه ای اصلاح شده با گرافن اکسید در محفظه ای سر بسته با رطوبت بالا قرار گرفت تا به آرامی خشک شود. شایان ذکر هست که پیش از استفاده از نانوذرات گرافن اکسید و نانوذرات طلا، مخلوط معلق آنها به مدت ۵ دقیقه در حمام فراصوت قرار داده شدند. در مرحله بعدی، غلظت های مختلف از پروب تیول دار بر روی الکتروود اصلاح شده با گرافن اکسید و نانومیله طلا (۲۰۰ – ۱۰ nM) در بازه های مدت زمانی (۲۴۰ – ۳۰ min) در محفظه ای سر بسته با رطوبت بالا قرار گرفت تا به آرامی امکان اتصال کووالانسی گروه های عاملی تیول (-SH) به سطح نانومیله های طلا برقرار شود. پس از این مرحله، الکتروود به آرامی توسط محلول شستشو تمیز شده و در ادامه در بازه های مدت زمانی مختلف (۲۵ min – ۰/۵) در محلول MCH غوطه ور گشت.



شکل ۱- خلاصه ای از روند تهیه و کار نانوبیوسنسور الیگونوکلوئوتید، برگرفته از (Azimzadeh et al., 2016)، با کسب اجازه از نویسندگان.

دقیق وزن ها و نوع تابع انتقال هر لایه است. عملکرد شبکه ممکن است با افزایش تعداد نورون ها بهبود یابد؛ اما پیچیدگی محاسبات نیز متناظر با آن افزایش خواهد یافت. بنابراین، در تصمیم گیری درباره ساختار یک شبکه همواره باید تعادلی میان عملکرد و پیچیدگی شبکه برقرار کرد.

در این پژوهش، یک شبکه عصبی پرسپترون چندلایه^۱ (MLP) برای مدل سازی داده های آزمایشی بدست آمده مورد

مدل شبکه عصبی مصنوعی

لایه های مختلف شبکه عصبی شامل یک لایه ورودی، یک یا چندین لایه پنهان و یک لایه خروجی هستند (شکل ۲). این شبکه چندلایه بدون نیاز به اطلاعات اولیه و یا دانش مربوط به روابط ریاضی حاکم بر داده، قادر به پیش گویی رابطه بین ورودی و خروجی است. یافتن بهترین ساختار برای شبکه عصبی شامل مشخص کردن تعداد دقیق لایه های پنهان و نورون ها، مقادیر

به صورت زیر تعریف می‌شوند:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (z_{predict}^i - z_{target}^i)^2}{\sum_{i=1}^N (z_{target}^i - \bar{z})^2} \quad (\text{رابطه ۱})$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (z_{predict}^i - z_{target}^i)^2}{N}} \quad (\text{رابطه ۲})$$

$$MAPE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{z_{target}^i - z_{predict}^i}{z_{target}^i} \right| \quad (\text{رابطه ۳})$$

که در این روابط $y_{predict}^i$ ، y_{target}^i و y_{target} و y به ترتیب جریان خروجی پیش‌بینی شده، جریان خروجی واقعی و مقدار میانگین جریان خروجی واقعی را نشان می‌دهند و N نشان‌دهنده تعداد کل داده است.

مدل شبکه عصبی مصنوعی پیشنهادی شامل یک لایه ورودی، یک لایه پنهان و یک لایه خروجی است. توابع انتقال Tangent-sigmoid و Pureline به ترتیب برای لایه پنهان و لایه خروجی در نظر گرفته شده‌اند.

بهینه‌سازی

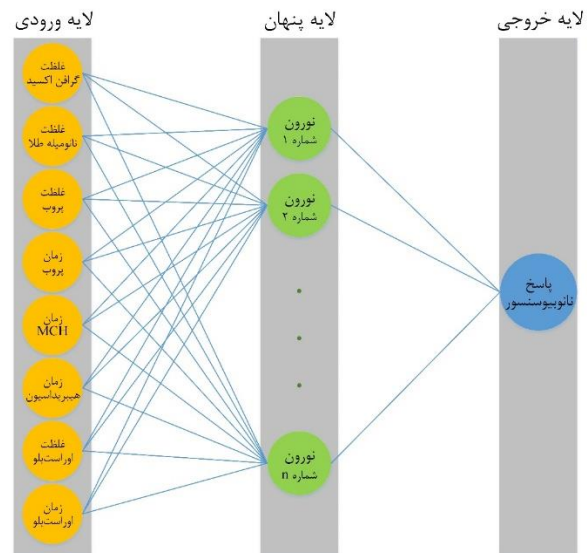
بعد از توسعه مدل نانوبیوسنسور الیگونوکلوئیدی، به یک فرایند بهینه‌سازی برای تعیین مقادیر بهینه متغیرهای مستقل مدل نیاز است. به این معنی که، مقادیر غلظت گرافن اکسید (x_1, x_2)، غلظت نانومیمه طلا (x_2, x_3)، غلظت پروب (x_3, x_4)، زمان انباشت MCH (x_4, x_5)، زمان هیبریداسیون (x_5, x_6)، غلظت اوراستبلو (x_6, x_7) و زمان انباشت اوراستبلو (x_7, x_8) که منجر به بیشترین جریان خروجی می‌شوند، باید تعیین شوند. برای این منظور، معادله بهینه‌سازی زیر باید حل شود:

$$\operatorname{argmax}_{x_1, x_2, \dots, x_n} I(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

$$\text{subject to } x_i^{\min} \leq x_i \leq x_i^{\max}, i = 1, 2, \dots, n \quad (\text{رابطه ۴})$$

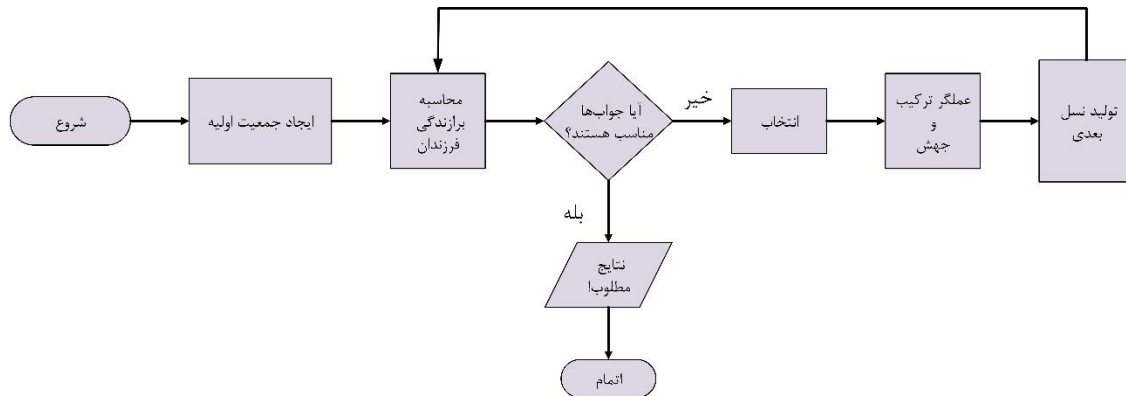
که در آن x_1, x_2, \dots, x_8 متغیرهای مستقل و $I(x_1, x_2, \dots, x_8)$ جریان خروجی است. x_i^{\min} و x_i^{\max} نشان‌دهنده مقادیر کمینه و بیشینه هر یک از متغیرها هستند. در این مرحله مدل شبکه عصبی بدست آمده در مرحله قبل به عنوان تابع هدف و مقادیر بهینه متغیرهای: غلظت گرافن اکسید، غلظت نانومیمه طلا، غلظت پروب، زمان پروب، زمان انباشت MCH، زمان هیبریداسیون، غلظت اوراستبلو و زمان انباشت اوراستبلو خروجی‌های مرحله بهینه‌سازی بودند.

استفاده قرار گرفته است. در این مدل، پاسخ نانوبیوسنسور در قالب جریان خروجی (nA) به عنوان خروجی شبکه در نظر گرفته شد و متغیرهای مستقل شامل: غلظت گرافن اکسید (۲ mg/mL) - ۲۵/۰)، غلظت نانومیمه طلا (۲۵۰ - ۳۰۰ mcg/mL)، غلظت پروب (۱۰ - ۲۰۰ nM)، زمان پروب (۲۴۰ - ۳۰ min)، زمان انباشت MCH (۲۵ min - ۰/۵)، زمان هیبریداسیون (۱۵۰ min - ۱۵)، غلظت اوراستبلو (۰/۰۵ - ۰/۳ mM) و زمان انباشت اوراستبلو (۱۲۰ min - ۵) بودند. مجموعه داده های مورد استفاده برای توسعه این مدل شامل ۶۳ داده بودند. از میان این ۶۳ داده ۷۵ و ۱۵ درصد به ترتیب به عنوان داده‌های آموزشی و داده‌های تست به صورت تصادفی انتخاب شدند. ۱۰ درصد باقیمانده داده‌ها به عنوان داده‌های اعتبارسنجی برای ارزیابی توانایی تعمیم مدل استفاده شد.



شکل ۲- ساختار شبکه عصبی دو لایه با ۸ ورودی، n نورون در لایه پنهان و ۱ نورون در لایه خروجی.

از الگوریتم پس‌انتشار معروف لونیبرگ-مارکوارت^۱ برای آموزش شبکه عصبی چندلایه استفاده شد. این الگوریتم، یک الگوریتم آموزش تکراری است که از یک معیار خطا برای به روز کردن وزن‌ها و بایاس‌ها استفاده می‌کند که شامل دو مرحله "انتشار" و "به‌روزرسانی وزن" است. برای ارزیابی شبکه‌های عصبی آموزش داده شده، سه معیار ضریب تعیین (R^2) (رابطه ۱)، ریشه میانگین مربع خطا ($RMSE$) (رابطه ۲) و میانگین درصد خطای مطلق ($MAPE$) (رابطه ۳) استفاده شد که



شکل ۳- فرایند بهینه‌سازی توسط الگوریتم ژنتیک.

دست آمده، در مرحله انتخاب استفاده می‌شوند تا مناسب‌ترین موجودیت‌ها را که نسل بعدی پاسخ‌ها را تولید خواهند کرد، انتخاب شوند. سپس، یک عملگر ترکیب بر روی دو موجودیت انتخاب‌شده اعمال می‌شود و یک فرزند تولید می‌شود. در نهایت، عملگر جهش برای حفظ تنوع جمعیت و بسط فضای جستجو استفاده می‌شود. مرحله جهش به الگوریتم ژنتیک این امکان را می‌دهد که از پاسخ‌های مشابه دوری کرده و از همگرایی به نقطه کمینه محلی اجتناب کند. جدول ۱ ساختار الگوریتم ژنتیک مورد استفاده در این تحقیق را نشان می‌دهد.

در این پژوهش، از الگوریتم ژنتیک برای حل این مساله استفاده شده است. شکل ۳ گام‌های اصلی الگوریتم ژنتیک را نمایش می‌دهد. در گام اول که به آن نسل آغازین گفته می‌شود، الگوریتم با مجموعه‌ای از مقادیر اولیه برای x_1, x_2, \dots, x_8 آغاز می‌شود که به عنوان جواب اولیه مساله (۴) در نظر گرفته می‌شوند. در گام برازندگی، یک تابع برازندگی برای تخصیص یک امتیاز برازندگی به هر یک از موجودیت‌ها، تعریف می‌شود. این امتیاز مشخص می‌کند که هر موجودیت تا چه اندازه برای حل مساله مورد نظر مناسب است. امتیازهای برازندگی به

جدول ۱- ساختار مربوط به الگوریتم ژنتیک مورد استفاده در تحقیق حاضر

پارامتر	مقدار	Parameter
نوع جمعیت	Double vector	Population type
اندازه جمعیت	200	Population size
تابع تولید	Constraint dependent	Creation function
تابع برازندگی	Rank	Fitness scaling function
تابع انتخاب	Stochastic uniform	Selection function
تعداد نخبه	10	Elite count
کسر تلفیق	0.8	Crossover fraction
تابع جهش	Constraint dependent	Mutation function
جهت مهاجرت	Forward	Migration direction
کسر مهاجرات	0.2	Migration fraction
الگوریتم مقید غیرخطی	Augmented Lagrangian	Nonlinear constraint algorithm
جریمه اولیه	10	Initial penalty
ضریب جریمه	100	Penalty factor
معیارهای توقف	Generations: 600 Stall generations: 50 Function tolerance: 1×10^{-6} Constraint tolerance: 1×10^{-3}	Stopping criteria

نتایج و بحث

(جدول ۳) پارامترهای آماری $RMSERMSE$

مشخصات مدل شبکه عصبی مصنوعی توسعه یافته با ۸ ورودی و یک خروجی در (جدول ۲) نمایش داده شده است. همان گونه که در جدول مشاهده می شود، این شبکه از یک لایه پنهان با ۱۳ نورون ساخته شده است. بهترین ساختار شبکه تحت شرایط زیر یافت گردید: اول، تعداد گره های لایه ورودی براساس تعداد متغیرهای مدل برابر ۸ بود. دوم، تعداد گره های لایه مخفی بر اساس یک روند سعی و خطا به گونه ای تعیین گردید که دو معیار $RMSERMSE$ و $MAPEMAPE$ دارای مقدار کمینه و معیار R^2 دارای مقدار بیشینه گردد. در نهایت، خروجی یک گره شامل مقدار جریان پاسخ نانوبیوسنسور در نظر گرفته شد.

جدول ۲- مشخصات مدل شبکه عصبی مصنوعی توسعه داده شده برای تخمین خروجی نانوبیوسنسور

نوع شبکه	لایه پنهان		لایه خروجی		تابع یادگیری	ساختار شبکه
	تعداد نورون	تابع انتقال	تعداد نورون	تابع انتقال		
چندلایه پرسپترون	۱۳	تانژانت-سیگموئید	۱	خطی	لونبرگ-مارکوارت	۱-۱۳-۸

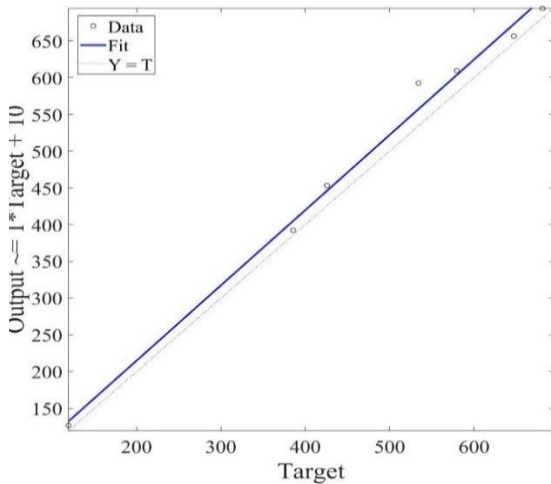
جدول ۳- نتایج شاخص های آماری در پیش بینی مقدار جریان خروجی نانوبیوسنسور

	$RMSE$	$MAPEMAPE$	R^2R^2
داده های آموزش	۳۱/۵۱۰۰	۵/۳۲۲۷	۰/۹۷۰۵
داده های تست	۲۷/۶۸۴۷	۴/۷۷۰۸	۰/۹۷۶۰
تمام داده ها	۳۳/۶۱۷۵	۵/۵۰۹۰	۰/۹۶۹۱

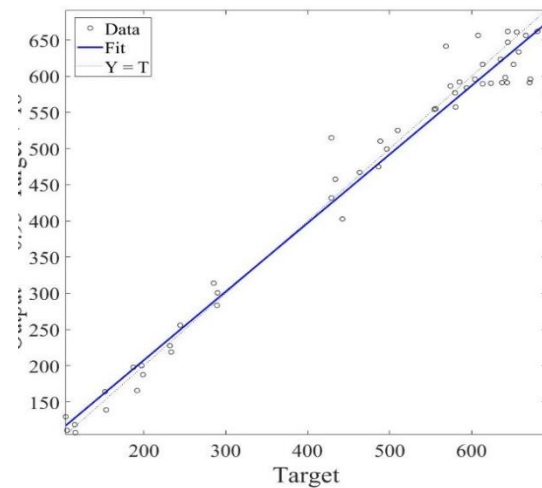
همان گونه که در جدول مشخص است پاسخ نهایی حاصل از پردازش الگوریتم ژنتیک و مقادیر آزمایشگاهی جداگانه آورده شده است که مقادیر حاصل از الگوریتم ژنتیک از لحاظ شرایط آزمایشگاهی نیز منطقی و قابل دستیابی به نظر می رسند. چرا که در کل مطلوب سازندگان نانوبیوسنسورها این است که فرایند ساخت مواد کمتری مصرف کند و زمان کمتری نیز از محقق یا سازنده بگیرد تا از لحاظ اقتصادی و آزمایشگاهی منطقی تر و عملی تر باشد که نتیجه بهینه سازی از این حیث بسیار قابل قبول می باشد و به مقدار آزمایشگاهی نیز نزدیک هست. نکته قابل توجه بالاتر بودن جریان خروجی به دست آمده از الگوریتم ژنتیک نسبت به نتایج آزمایشگاهی می باشد که می توان احتمال داد که با استفاده از روش های الگوریتم ژنتیک می توان به نتایج بهتری که حتی در آزمایشگاه تست نشده اند، دست یافت.

برای ارزیابی بیشتر عملکرد مدل توسعه یافته، مقادیر خروجی واقعی نانوبیوسنسور الیگونوکلئوتیدی برحسب مقادیر پیش بینی شده توسط مدل برای داده های آموزشی، تست و تمام داده ها رسم شده است (شکل ۴). با توجه به شکل واضح است که تمامی داده ها اطراف خطی با زاویه ۴۵ درجه متمرکز هستند. از نظر کیفی در صورتی که مقادیر تخمین زده شده به مقادیر واقعی نزدیک تر باشند، داده ها در حول این خط متمرکز خواهند شد. این نکته به این معنی است که مدل شبکه عصبی مصنوعی توسعه یافته در تخمین مقادیر واقعی جریان خروجی بسیار موفق عمل کرده است. علاوه بر این، تعداد بسیار کم تخمین های اشتباه نیز بر این مهم تاکید می کنند.

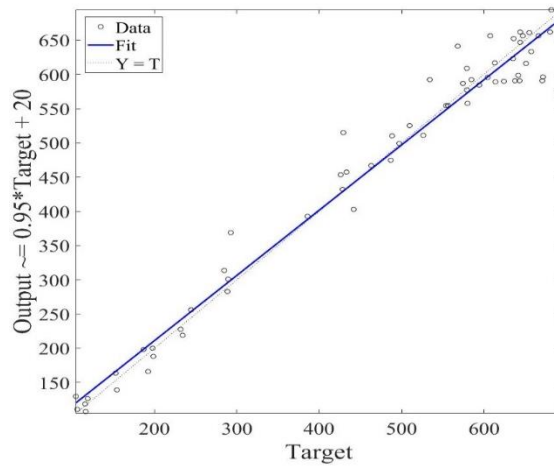
نتایج مربوط به بهینه سازی متغیرهای مستقل آزمایش توسط الگوریتم ژنتیک در (جدول ۴) نشان داده شده است.



(ب)



(الف)



(ج)

شکل ۴. نتایج مربوط به مدل شبکه عصبی. الف) نتایج مدل شبکه عصبی برای داده‌های آموزش. ب) نتایج مدل شبکه عصبی برای داده‌های تست ج) نتایج مدل شبکه عصبی برای تمام داده‌ها

جدول ۴- مقایسه مقادیر بهینه متغیرهای مستقل بدست آمده توسط الگوریتم ژنتیک برای دستیابی به بیشترین پاسخ نانوبیوسنسور الیگونوکلوئید و نتایج آزمایشگاهی بهینه

نوع روش	غلظت گرافن اکسید (mg/mL)	غلظت نانوميله طلا (µg/mL)	غلظت پروب (nM)	زمان پروب (min)	زمان MCH (min)	زمان هیبریداسیون (min)	غلظت اوراست بلو (mM)	زمان اوراست بلو (min)	پاسخ نانوبیوسنور (nA)
الگوریتم ژنتیک	۱/۱۱۵۱	۹۳/۷۵۶۲	۱۳۴/۰۵۵۹	۱۶۸/۶۲۱۴	۶/۷۵۰۷	۶۴/۱۲۹۰	۰/۱۷۹۷	۵۶/۱۱۴۰	۷۵۴/۳
آزمایشگاهی	۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۲۰	۵	۶۰	۰/۱۵	۶۰	۶۹۱/۳

نتیجه گیری

تخمین پاسخ نانوبیوسنسور با توجه به پارامترهای موثر بر میزان خروجی جریان آن از جمله: غلظت گرافن اکسید، غلظت نانو لوله‌های طلا، غلظت پروب، مدت زمان ماند پروب، مدت زمان ماند MCH، زمان هیبریداسیون، غلظت محلول شناساگر اوراست بلو، مدت زمان ماند اوراست بلو استفاده شد. نتایج بدست آمده از سه معیار آماری مورد استفاده در این تحقیق نشان داد

توسعه مدلی مبتنی بر یادگیری ماشین به عنوان رویکردی مکمل برای روش گران قیمت، زمان بر و طاقت فرسای آزمایشگاهی جهت یافتن مقدار بیشینه پاسخ نانوبیوسنسور نسبت به پارامترهای دخیل در فرایند تولید به طور موفقیت آمیزی انجام گرفت. به طور خلاصه، از شبکه عصبی مصنوعی برای توسعه یک مدل جهت

الیگونوکلوئوتیدی در نظر گرفته شود. انتظار می‌رود با توجه به قابلیت انتخابی و اختصاصی بالا در نانوبیوسنسورهای الیگونوکلوئوتیدی، استفاده از این رویکرد در آنالیت‌های دیگر نیز از کارایی مناسب برای تخمین پاسخ نانوبیوسنسور برخوردار باشد. از این رو، بررسی روند ارائه شده در این پژوهش بر روی نانوبیوسنسورهای الکتروشیمیایی مشابه جهت تشخیص آنالیت‌های گوناگون برای پژوهش‌های آینده پیشنهاد می‌گردد.

REFERENCES

- Abdullah, J., Ahmad, M., Heng, L. Y., Karuppiah, N., & Sidek, H. (2008). Evaluation of an optical phenolic biosensor signal employing artificial neural networks. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134(2), 959-965.
- Akbari, E., Buntat, Z., Shahraiki, E., Zeinalinezhad, A., & Nilashi, M. (2016). ANFIS modeling for bacteria detection based on GNR biosensor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(6), 1728-1736.
- Alonso, G. A., Istamboulie, G., Ramírez-García, A., Noguera, T., Marty, J. L., & Muñoz, R. (2010). Artificial neural network implementation in single low-cost chip for the detection of insecticides by modeling of screen-printed enzymatic sensors response. *Computers and Electronics in Agriculture*, 74(2), 223-229.
- Alonso, G. A., Istamboulie, G., Noguera, T., Marty, J. L., & Muñoz, R. (2012). Rapid determination of pesticide mixtures using disposable biosensors based on genetically modified enzymes and artificial neural networks. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 164(1), 22-28.
- Azimzadeh, M., Rahaie, M., Nasirizadeh, N., Ashtari, K., & Naderi-Manesh, H. (2016). An electrochemical nanobiosensor for plasma miRNA-155, based on graphene oxide and gold nanorod, for early detection of breast cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 99-106.
- Azimzadeh, M., Rahaie, M., Nasirizadeh, N., Daneshpour, M., & Naderi-Manesh, H. (2017). Electrochemical miRNA biosensors: the benefits of nanotechnology. *Nanomedicine Research Journal*, 2(1), 36-48.
- Baronas, R., Ivanauskas, F., & Kulys, J. (2009). *Mathematical modeling of biosensors: an introduction for chemists and mathematicians* (Vol. 9). Springer Science & Business Media.
- Bartlett, P. N., Toh, C. S., Calvo, E. J., & Flexer, V. (2008). *Modelling biosensor responses* (pp. 267-325). Wiley: Chichester, England.
- Blaedel, W. J., Kissel, T. R., & Boguslaski, R. C. (1972). Kinetic behavior of enzymes immobilized in artificial membranes. *Analytical Chemistry*, 44(12), 2030-2037.
- Eaimkhong, S. (2013). Application of Nanotechnology in Biological Research: Diagnostics and Physical Manipulation (Doctoral dissertation, UCLA).
- Ferentinos, K. P., Yialouris, C. P., Blouchos, P., Moschopoulou, G., Tsourou, V., & Kintzios, S. (2012). The use of artificial neural networks as a component of a cell-based biosensor device for the detection of pesticides. *Procedia Engineering*, 47, 989-992.
- Hastie, T., Tibshirani, R., Friedman, J., & Franklin, J. (2005). The elements of statistical learning: data mining, inference and prediction. *The Mathematical Intelligencer*, 27(2), 83-85.
- Hou, H., Fan, Y., Wang, S., Si, L., & Li, B. (2016). Immunomodulatory activity of Alaska pollock hydrolysates obtained by glutamic acid biosensor–Artificial neural network and the identification of its active central fragment. *Journal of functional foods*, 24, 37-47.
- Gutés, A., Céspedes, F., Alegret, S., & Del Valle, M. (2005). Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(8), 1668-1673.
- Liu, J. M., Hu, Y., Yang, Y. K., Liu, H., Fang, G. Z., Lu, X., & Wang, S. (2018). Emerging functional nanomaterials for the detection of food contaminants. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 94-106.
- Maleki, N., Kashanian, S., Maleki, E., & Nazari, M. (2017). A novel enzyme based biosensor for catechol detection in water samples using artificial neural network. *Biochemical engineering journal*, 128, 1-11.
- Mell, L. D., & Maloy, J. (1975). Model for the amperometric enzyme electrode obtained through digital simulation and applied to the immobilized glucose oxidase system. *Analytical Chemistry*, 47(2), 299-307.
- Mishra, R. K., Alonso, G. A., Istamboulie, G., Bhand, S., & Marty, J. L. (2015). Automated flow based biosensor for quantification of binary organophosphates mixture in milk using artificial neural network. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 208, 228-237.
- Rangelova, V., Tsankova, D., & Dimcheva, N. (2010). Soft computing techniques in modelling the influence of pH and temperature on dopamine biosensor. *Intelligent and Biosensors*, 99.
- Rodriguez-Mozaz, S., Marco, M. P., De Alda, M. L., & Barceló, D. (2004). Biosensors for environmental

- applications: Future development trends. *Pure and applied chemistry*, 76(4), 723-752.
- Sapeliauskas, E., Barauskas, D., Vanagas, G., & Virzonis, D. (2014, September). Surface micromachined CMUTs for liquid phase sensing. In *2014 IEEE International Ultrasonics Symposium* (pp. 2580-2583). IEEE.
- Sharma, R., Ragavan, K. V., Thakur, M. S., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015). Recent advances in nanoparticle based aptasensors for food contaminants. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 612-627.
- Topkaya, S. N., Azimzadeh, M., & Ozsoz, M. (2016). Electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection: Recent advances and challenges. *Electroanalysis*, 28(7), 1402-1419.
- Topkaya, S. N., & Azimzadeh, M. (2016). Biosensors of in vitro detection of cancer and bacterial cells. *Nanobiosensors for Personalized and Onsite Biomedical Diagnosis. Institution of Engineering and Technology*, 73-94.
- Valdés-Ramírez, G., Gutiérrez, M., Del Valle, M., Ramírez-Silva, M. T., Fournier, D., & Marty, J. L. (2009). Automated resolution of dichlorvos and methylparaoxon pesticide mixtures employing a Flow Injection system with an inhibition electronic tongue. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(5), 1103-1108.