



Fabrication of a Colorimetric Approach for Breast Cancer Detection Using of DNAzyme Based Specific Aptamers

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Saleh-Gohari N.¹ PhD,
Karami Z.^{*2} PhD,
Mohseni F.² MA,
Karimzadeh A.³ MSc,
Sedeghi K.² MA

How to cite this article

Saleh-Gohari N, Karami Z, Mohseni F, Karimzadeh A, Sedeghi K. Fabrication of a Colorimetric Approach for Breast Cancer Detection Using of DNAzyme Based Specific Aptamers. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(1):119-126.

ABSTRACT

Breast cancer is a serious health concern for women. It contributes to about 23% of the cancer cases and accounts for the second largest number of deaths among all cancers. Expensive and time-consuming recognition methods currently available for recognition of breast cancer potentiates the need for improvement of the novel, specific and ultrasensitive strategies. Biosensors are sensitive, specific and cost-effective procedures. These also display the benefit of quick response due to direct calculation in physiological fluids (saliva, blood, serum, milk, urine, etc). Aptamer-based biosensors for cancer cell recognition have shown advantages of rapidness, simplicity and cost-efficiency over traditional approaches. In this study, by linking DNAzyme and aptamer together, it was established a colorimetric biosensor for the detection of MCF7 breast cancer cells. MUC1 and PTK7 aptamers used as specific aptamers to binding to the breast cancer cells. This manner may also evade the modification of DNA and the use of labels, which can intensely rise the cost-efficiency and simplicity of cancer cell discovery. The results indicated that these aptamers showed good activity for breast cancer cells detection but in the control cells no activity was observed. Additionally, the results also indicated that there is a good linear relationship between the cancer cell values and colorimetric signal. Finally, the obtained results indicated a cost-effective and conveniently operated approach for cancer diagnosis in future.

Keywords Aptamer; DNAzyme; Breast Cancer; Detection; Biosensor

CITATION LINKS

[1] Molecular biology of breast cancer stem cells: potential clinical ... [2] Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. Biochim Biophys ... [3] Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer ... [4] Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal ... [5] A diagnosis of chronic lymphocytic leukemia prompted by cutaneous lymphocytic infiltrates present in Mohs micrographic surgery frozen ... [6] Aptamer-based electrochemical sensor for label-free recognition and detection of cancer ... [7] An electronic, aptamer-based small-molecule sensor for the rapid, label-free detection of ... [8] Aptamer-based and DNAzyme-linked colorimetric detection of cancer ... [9] Label-free aptasensor for platelet derived growth factor (PDGF) ... [10] Nucleic acid aptamers from selection in vitro to applications in ... [11] Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases ... [12] DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ... [13] DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA ... [14] Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer ... [15] A label-free activatable aptamer probe for colorimetric detection of cancer cells based on binding-triggered in situ catalysis of split ... [16] Label free MUC1 aptasensors based on electrodeposition of gold nanoparticles on screen printed ... [17] Novel electrochemical aptamer biosensor based on an enzyme-gold nanoparticle dual label for the ultrasensitive detection of epithelial tumour marker ... [18] Detection of breast cancer cells specially and accurately by an electrochemical ... [19] Sensitive detection of human breast cancer cells based on aptamer-cell-aptamer sandwich ... [20] Rapid identification and high sensitive detection of cancer cells on the gold ... [21] Therapeutic potential of DNAzyme loaded on Chitosan/Cyclodextrin nanoparticle ... [22] An innovative paradigm of methods in microRNAs detection: highlighting ... [23] Label-free colorimetric sensor for sensitive detection of choline based on ... [24] delivery of DNAzyme targeting c-Myc gene using β -cyclodextrin polymer nanocarrier for ...

¹Medical Genetic Department, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

²Biology Department, Sciences Faculty, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

³Medical Genetic Department, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

*Correspondence

Address: Shahid Bahonar University, Pajoohesh Square, Kerman, Iran.
Postal code: 7616914111
Phone: +98 (34) 31322045
Fax: +98 (34) 31322060
karami@uk.ac.ir

Article History

Received: April 27, 2019

Accepted: October 13, 2019

ePublished: March 14, 2020

ارایه روش رنگ سنجی برای تشخیص سرطان سینه با استفاده از آپتامرهای اختصاصی مبتنی بر دزوکسی ریبوزایم

نصرالله صالح گوهری PhD

گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

زهرا کریمی* PhD

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

فرید محسنی MA

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

علی کریمزاده MSc

گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

کتایون صدیقی MA

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده

سرطان سینه یک عامل پرخطر برای سلامت زنان محسوب می شود که حدود ۲۳٪ میزان سرطان ها و دومین عامل مرگ بین تمامی سرطان ها به شمار می رود. به دلیل پرهزینه و زمان بر بودن روش های سنجش فعلی سرطان سینه، به توسعه روش های حساس تر و اختصاصی تر نیاز است. بیوسنسورها روش های حساس، اختصاصی و مقرون به صرفه ای هستند. همچنین به دلیل پاسخ سریع ناشی از محاسبه مستقیم در مایعات فیزیولوژیکی (باز، خون، سرم، شیر و ادرار و غیره) اهمیت دارند. بیوسنسورهای بر پایه آپتامر نسبت به روش های سنتی برای شناسایی سلول های سرطانی مزیت هایی از جمله سرعت، سادگی و ارزان بودن را دارند. در این مطالعه، با اتصال دزوکسی ریبوزایم و آپتامر یک روش رنگ سنجی برای شناسایی سلول های سرطان سینه MCF7 ارایه شد. آپتامرهای MUC1 و PTK7 نیز به عنوان آپتامرهای اختصاصی برای اتصال به سلول های سرطانی سینه استفاده شدند. این روش ممکن است نیازی به تغییر DNA و استفاده از برچسب نداشته باشد که می تواند تشخیص سلول های سرطانی را ساده تر و ارزان تر انجام دهد. نتایج نشان دادند که این آپتامرها فعالیت قابل توجهی برای تشخیص سلول های سرطانی دارند، در حالی که در نمونه های کنترل فعالیت مشاهده نشد. علاوه بر این، نتایج نشان دادند که یک رابطه خطی بین مقدار سلول های سرطانی و سیگنال رنگ سنجی وجود دارد. در نهایت، نتایج یک روش ارزان و راحت برای تشخیص سلول های سرطانی در آینده را پیشنهاد می کنند.

کلیدواژه ها: آپتامر، دزوکسی ریبوزایم، سرطان سینه، تشخیص، بیوسنسور

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۲۱

*نویسنده مسئول: karami@uk.ac.ir

مقدمه

طبق آمار جهانی، سرطان سینه نخستین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان است. با توجه به اینکه تشخیص به موقع سرطان سینه می تواند از مرگ و میر و هزینه های درمان بکاهد، استفاده از روش های موثر برای تشخیص زودهنگام سرطان سینه ضروری می کند [1-3]. روش های

مرسوم در تشخیص سرطان سینه شامل ماموگرافی، نمونه گیری از بافت پستان، تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI)، سنجش ایمنی مرتبط با آنزیم یا الایزا (ELISA) و سونوگرافی هستند. علی رغم استفاده نسبتاً گسترده این روش ها در تشخیص سرطان، محدودیت هایی وجود دارد. برای مثال تشخیص دقیق در نمونه های کم دشوار و قرارگیری در معرض اشعه ایکس در روش MRI تهدیدکننده سلامتی افراد است. علاوه بر این عوامل، هزینه های مربوط به استفاده از یک روش تشخیصی و نیز میزان آسیب احتمالی وارد به بیمار (سطح تهاجم روش) نیز باید مورد توجه و بررسی قرار گیرد [4-6]. از این رو، درمان سرطان به چالشی بزرگ برای دانشمندان و پزشکان تبدیل شده است. در سال های اخیر، توجه به این امر منجر به شناسایی و استفاده از فاکتورهایی تحت عنوان بیومارکر شده است. یک بیومارکر، ترکیبی است که معمولاً از جنس پروتئین و وجود یا مقدار آن در حالت سرطانی نسبت به حالت سلامت در سلول ها به طور معنی داری متفاوت است. یکی از روش های مقرون به صرفه، سریع و دقیق به منظور شناسایی بیومارکرهای مختلف، استفاده از حسگرهایی است که با تکیه بر واکنشی شیمیایی، قادر به شناسایی مولکول هدف هستند [7-10].

یکی از این حسگرها، آپتامرها هستند که قابلیت قابل توجهی در یافتن بیومارکرها دارند و از ویژگی های برجسته ای همچون اندازه کوچک، هزینه بری کمتر و عدم سمیت زایی برخوردار هستند. این ساختارها می توانند از جنس DNA تک رشته ای یا RNA باشند که گلیکوپروتئین های سطح سلول های سرطانی و میکروRNA ها را شناسایی می کنند و با آنها برهم کنش می دهند. سلول های سرطانی مختلف مارکرهای اختصاصی روی سطح خود بیان می کنند که باعث می شود از روش های آزمایشگاهی برای شناسایی و تشخیص این سلول ها استفاده شود. یکی از روش های جدید و با کارایی بالا در این زمینه استفاده از آپتامرهایی است که به طور اختصاصی و با تمایل بالا به این مارکرها متصل می شوند [11-14].

از مزیت های این روش نسبت به روش آنتی بادی می توان به سنتز ساده، مقرون به صرفه بودن، حساسیت بالا و پایداری در شرایط آزمایشگاهی مثل دما، pH و رفع نیاز برای کار در محیط سرد اشاره کرد. معمولاً هدف با استفاده از یک ماده رادیواکتیو یا فلورسنت نشان دار می شود تا در صورت شناسایی توسط آپتامر، این امر به سادگی مشخص شود. در مطالعه حاضر، به تشخیص دو بیومارکر MUC1 و PTK7 با استفاده از روش رنگ سنجی مبتنی بر دزوکسی ریبوزایم شبه پراکسیدازی پرداخته شد.

DNA های دارای خاصیت آنزیمی را دزوکسی ریبوزایم (DNAzyme) می نامند که با استفاده از تکنیک تکامل سیستماتیک لیگاندها توسط غنی سازی نمایی به دست می آیند. از جمله دزوکسی ریبوزایم هایی که مورد استفاده قرار می گیرند، دزوکسی ریبوزایم های شبه پراکسیدازی هستند [15، 16]. این نوع دزوکسی ریبوزایم ها ترکیبی از DNA های چهار رشته ای و همین (Hemin) هستند. DNA های چهار رشته ای، توالی های

آماده‌سازی همین

استوک همین در DMSO با غلظت ۵ میلی‌مولار تهیه و در تاریکی در دمای 20°C - نگهداری شد. در هر بار استفاده از همین، استوک آن از فریزر 20°C - خارج و با بافر ۱۰ میلی‌مولار تریس- هیدروکلراید و MES محتوی نمک‌های مطالعه‌شده و ۰/۱% تراپتون-۱۰۰ X با ۷/۴ pH=، به حجم و غلظت مورد نظر رسانده شد.

آماده‌سازی DNA چهار رشته‌ای

الیگونوکلوئوتیدهای سنتز شده (جدول ۱) ابتدا با آب مقطر تزریقی به غلظت مورد نظر رسانده و سپس در 95°C به مدت ۵ دقیقه به منظور از بین رفتن هر گونه برهم‌کنش بین مولکولی گرما داده و به آرامی تا رسیدن به دمای اتاق با سرعت 1°C در هر دقیقه سرد شدند. به همین منظور محلول DNA در دستگاه ترموسایکلومتر قرار داده شد. سپس توالی DNA در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد و بعد از آن اجازه داده شد تا محلول DNA، به مدت یک ساعت برای رسیدن به ساختارهای چهار رشته‌ای در ۱۰ میلی‌مولار محلول بافر تریس- هیدروکلراید و ۰/۱% تراپتون-۱۰۰ X، به طور مناسب تا بخورد.

جدول ۱) طراحی آبتام‌های متصل‌شونده به دزوکسی‌ریبوزایم

5' → 3'	
ATCTAACTGCTGCGCCGCGGAAAAATACTGTACG	PTK7.D1
GTTAGACCCAACCC	
TGGGTAGGGCGGGTTGGGTCTAACCGTACAGTA	PTK7.D2
GCAGTTGATCCTTTGGGATACCTGGTTTCCCAACCC	MUC1.D1
TGGGTAGGGCGGGTTGGGAAAC	MUC1.D2

ناحیه پرنک مربوط به توالی Catg4 واجد فعالیت پراکسیدازی است. توالی‌هایی که زیر آنها خط کشیده شده است، توالی‌های اختصاصی آبتام را نشان می‌دهند. نواحی رنگی هم توالی‌های مکمل در الیگونوکلوئوتیدها هستند.

آماده‌سازی کمپلکس همین DNA- چهار رشته‌ای (دزوکسی‌ریبوزایم)

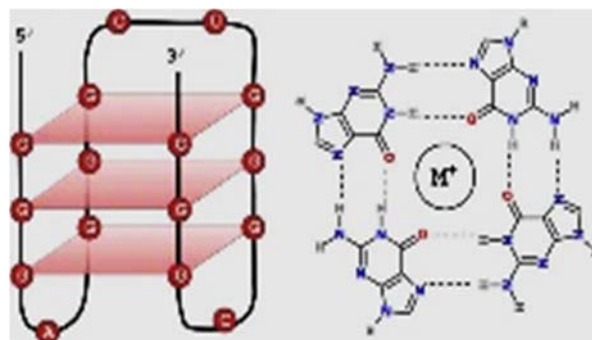
به منظور تشکیل دزوکسی‌ریبوزایم، DNA چهار رشته‌ای با همین به صورت هم‌حجم و هم‌غلظت، به مدت یک ساعت دیگر در ۱۰ میلی‌مولار بافر تریس- هیدروکلراید با pH= ۸ انکوبه شدند.

بررسی فعالیت پراکسیدازی دزوکسی‌ریبوزایم

آماده‌سازی دزوکسی‌ریبوزایم

۲ میکرولیتر از استوک محلول DNA، با غلظت ۴۰۰ میکرومولار برداشته و در میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری با آب مقطر تزریقی به حجم مورد نظر و غلظت ۲۵ میکرومولار رسانده و در ترموسایکلومتر قرار داده شد. سپس برنامه دستگاه به گونه‌ای تنظیم شد که محلول DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای 95°C قرار بگیرد و سپس به آرامی با سرعت 1°C در هر دقیقه تا دمای 25°C سرد شود. در مرحله بعد، میکروتیوب از دستگاه خارج و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس ۳۲ میکرولیتر بافر، ۱۰ میلی‌مولار تریس- هیدروکلراید محتوی نمک‌های مطالعه‌شده و ۰/۱% تراپتون-۱۰۰ X با pH= ۷/۴ به آن اضافه شد و اجازه داده شد، به منظور تشکیل DNA چهار رشته‌ای با غلظت ۱۲/۵ میکرومولار، به مدت یک ساعت در

نوکلیک‌اسید غنی از گوانین، بر پایه پیوند هگستین بین رزیدوهای گوانین و کوآرنت‌های روی هم قرار گرفته هستند. این ساختارها به وسیله کاتیون‌های تک‌ظرفیتی (به‌خصوص یون پتاسیم) پایدار می‌شوند^[17]. با استفاده از دزوکسی‌ریبوزایم‌های شبه پراکسیدازی شناسایی مولکول‌های زیستی مانند نوکلئیک‌اسیدها، پروتئین‌ها، نوکلئوتیدها، انواع فلزات سمی (یون‌های فلزی)، غربالگری انواع لیگاندها و کوفاکتورها و شناسایی و سنجش فعالیت تلومرازی امکان‌پذیر است. به طور کلی این دزوکسی‌ریبوزایم‌ها می‌توانند در طراحی انواع حسگرهای زیستی برای مولکول‌ها و ترکیبات مختلف استفاده شوند. به منظور ایجاد فعالیت کاتالیتیک، اولیگونوکلوئوتیدهای غنی از گوانین باید یک ساختار ۴ رشته‌ای که می‌تواند به مولکول همین متصل شود را به دست آورند. آبتام‌های G- کوادروپلکس به عنوان پروب‌هایی برای تشخیص رنگ‌سنجی که یک شدت سیگنال قابل مشاهده با چشم غیرمسلح را امکان‌پذیر می‌سازد، به کار می‌روند^[18-24]. این سیستم یک واکنش را بین مولکول هدف (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) و پراکسید هیدروژن تسهیل می‌کند که منجر به ظهور محصولات اکسید شده (ABTS⁺) و تولید رنگ سبز می‌شود (شکل ۱). در این مطالعه، امکان تشخیص سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 با استفاده از دو آبتام اختصاصی سرطان سینه (MUC1: The transmembrane glycoprotein Mucin 1 و PTK7: Tyrosine-protein kinase-like 7) در حضور DNA چهار رشته‌ای CatG4، با تکیه بر روش رنگ‌سنجی مورد بررسی قرار گرفته است.



شکل ۱) ساختار دزوکسی‌ریبوزایم G- کوادروپلکس (حرف M نشان‌دهنده حضور یک فلز است).

مواد و روش‌ها

تعیین غلظت DNA

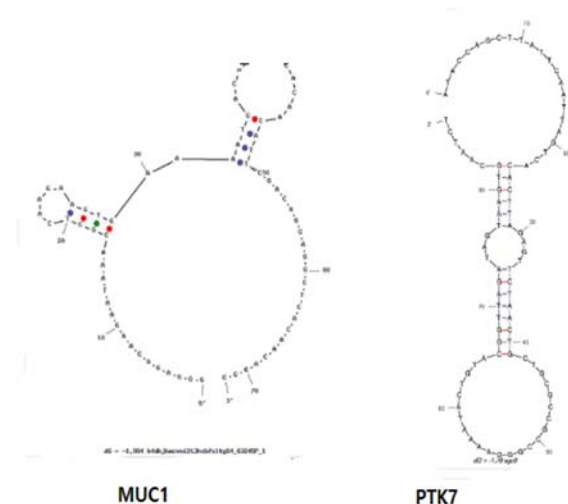
غلظت‌های سریالی اولیگونوکلوئوتیدها (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ نانومولار) به صورت غلظت‌های تک‌رشته در آب تهیه شدند. سپس غلظت‌های تک‌رشته به وسیله اندازه‌گیری جذب در ۲۶۰ نانومتر تعیین و ضرایب خاموشی مولی، با استفاده از نزدیک‌ترین تقریب مجاور محاسبه شدند.

و در یخچال نگهداری شد. آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین به ترتیب به میزان ۵۰ و ۳۱/۲۵ میلی‌گرم به همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ساخته و با استفاده از فیلتر سر سرنگی ۲۲/۰ میکرومتری استریل شدند. برای ساخت محیط کشت کامل (۱۰٪)، FBS به نسبت ۱۰٪ حجم کل محیط کشت و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین به نسبت ۱٪ اضافه می‌شود. پس از خروج کرایوتیوب حاوی سلول از تانک ازت با قراردادن آنها در داخل بن‌ماری حاوی آب 37°C قرار داده شدند. پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه و با سرعت 1500 دور بر دقیقه، محیط روی سلول‌ها دور ریخته و قرص سلولی ته‌نشین‌شده در ۲-۱ میلی‌لیتر محیط کشت سوسپانسیون شد. سوسپانسیون فوق به فلاسک کشت انتقال داده شد و در انکوباتور CO_2 دار انکوبه شد. روز بعد سلول‌ها برای بررسی رشد و اطمینان از عدم آلودگی با میکروسکوپ معکوس اختلاف فاز (میکروسکوپ اینورت فاز کنتراست) بررسی شدند. تمامی مراحل کشت و تعویض محیط، زیر هود لامینار و در شرایط کاملاً استریل انجام می‌شود.

یافته‌ها و بحث

انتخاب، طراحی و سنتز آپتامرها

ابتدا طی بررسی مقالات و نیز پایگاه‌های داده، MUC1 و PTK7 به عنوان دو بیومارکر اختصاصی سرطان سینه انتخاب شدند. این دو پروتئین دارای سطح بیان بالایی در سطح سلول‌های MCF-7 هستند (شکل ۲). انتخاب آپتامرها با توجه به اختصاصیت بالای آنها و با استفاده از پایگاه Aptagen انجام شد.



شکل ۲) انتخاب آپتامرهای MUC1 و PTK7 برای شناسایی سلول‌های سرطان سینه از پایگاه Aptagen

برای به‌دست‌آوردن نتیجه مطلوب و اطمینان از صحت کارکرد روش مورد نظر برای هر یک از آپتامرها بایستی سلول‌های کنترل مناسب انتخاب می‌شدند که کمترین میزان بیان در سطح mRNA را نشان می‌دادند. برای همین منظور پروفایل بیانی برای دو آپتامر ذکرشده

دمای اتاق انکوبه شود. در مرحله بعد ۶۴ میکرولیتر همین با غلظت ۱۲/۵ میکرومولار به آن اضافه و اجازه داده شد یک ساعت دیگر در این دما انکوبه و دزوکسی‌ریبوزایم با غلظت ۶/۲۵ میکرومولار تشکیل شود.

آماده‌سازی محلول پراکسید هیدروژن

۵ میکرولیتر از محلول استوک پراکسید هیدروژن با غلظت ۱۱/۵ میکرومولار برداشته و در فالكون، با آب مقطر به حجم مورد نظر و غلظت ۱۵ میلی‌مولار رسانده شد.

آماده‌سازی محلول ABTS

۴/۰ میلی‌گرم ABTS در بافر ۱۰ میلی‌مولار محتوی نمک‌های مطالعه‌شده و ۰/۱٪ تری‌تئون-۱۰۰ با $\text{pH} = 8$ به غلظت ۱/۴۳ میلی‌مولار رسانده شد.

اندازه‌گیری فعالیت پراکسیدازی دزوکسی‌ریبوزایم

۱۶ میکرولیتر دزوکسی‌ریبوزایم سنتز شده درون سل کوارتز با طول یک سانتی‌متر ریخته شد. سپس ۱۶۸ میکرولیتر ABTS با غلظت ۱/۴۳ میلی‌مولار به آن اضافه و سپس ۱۶ میکرولیتر پراکسید هیدروژن با غلظت ۱۵ میلی‌مولار درون سل ریخته و در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد. جذب رادیکال ABTS به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر طی زمان (صفر تا ۳۰ ثانیه) ثبت شد. ظهور رادیکال رنگی ABTS نشان‌دهنده انجام واکنش است که بررسی میزان جذب آن در ۴۱۴ نانومتر برای آنالیزهای کمی استفاده می‌شود [8].

بهینه‌سازی غلظت دزوکسی‌ریبوزایم

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت بهینه دزوکسی‌ریبوزایم، غلظت‌های مختلف آن به‌صورت رقیق‌سازی متوالی، در بافر ۱۰ میلی‌مولار تریس-هیدروکلراید با $\text{pH} = 8$ تهیه شدند و فعالیت پراکسیدازی غلظت‌های مختلف دزوکسی‌ریبوزایم در حضور ۰/۹ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۱/۲ میلی‌مولار ABTS، در یک بازه زمانی ۳۰۰ ثانیه‌ای، اندازه‌گیری شد.

آماده‌سازی سلول‌های سرطانی MCF7

MCF7 (The Michigan Cancer Foundation) یک رده سلولی کشت‌شده از سلول‌های اپی‌تلایال سرطان پستان انسانی است که به‌طور گسترده‌ای برای مطالعات زیستی سرطان پستان و مکانیزم عملی هورمون‌ها استفاده می‌شود. این رده سلولی اولین بار در سال ۱۹۷۰ از بافت بدخیم پستان یک زن قفقازی ۶۹ ساله در بنیاد سرطان ایالت میشیگان جداسازی شد. این رده همانند سلول‌های اپی‌تلایال در محیط آزمایشگاه به‌صورت تک‌لایه رشد می‌کنند و توانایی زندگی طولانی در چندین ماه را دارند. رده‌های سلولی MCF7، به‌عنوان شاهد از بانک سلول انسیتو پاستور تهران به‌صورت کرایوتیوب تهیه و به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

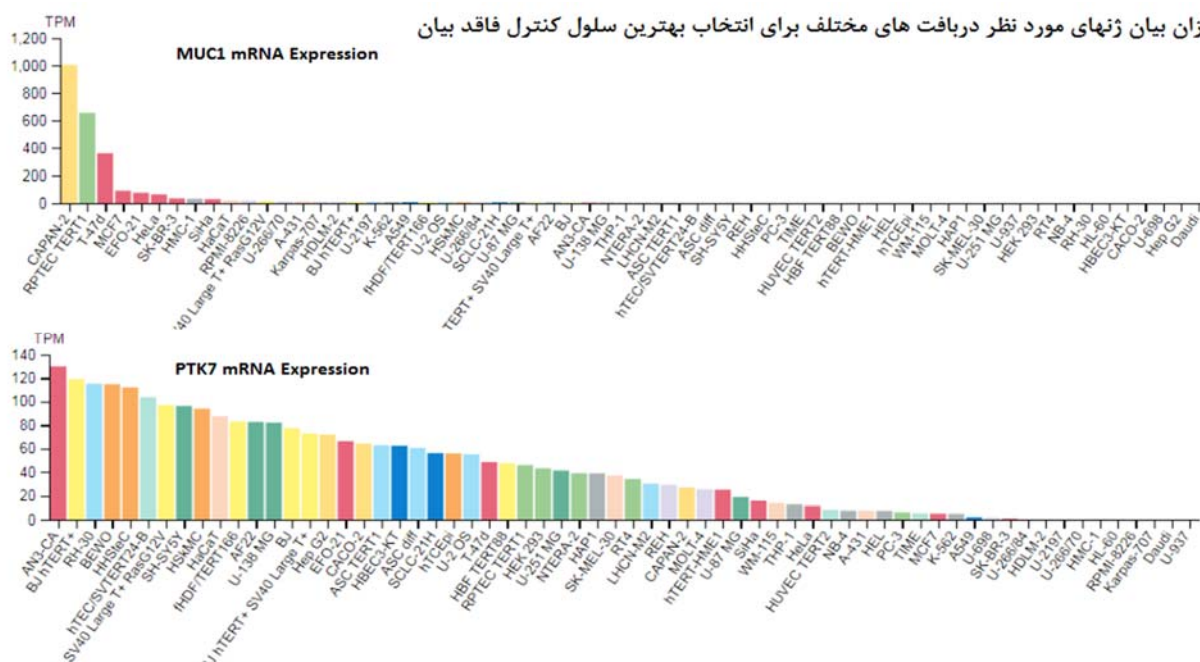
کشت سلول و تعویض محیط

به‌منظور تهیه ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل، ۶/۷ گرم پودر DMEM و ۱/۸۵ گرم بی‌کربنات سدیم به ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه، با همزن مغناطیسی مخلوط و pH محلول در محدوده ۷/۴-۷/۲ تنظیم شد. سپس محیط کشت با استفاده از فیلتر ۰/۲ استریل

مذکور طراحی شد (جدول ۱). طراحی به این صورت انجام شد که محل اتصال دزوکسی‌ریبوزایم روی آپتامر براساس محاسبات با نرم‌افزارهای پیش‌گویی‌کننده ساختار دوم واجد بیشترین میزان پایداری و کمترین سطح انرژی باشند.

در سطح mRNA بررسی شد و دو رده سلولی HEP G2 و U266 انتخاب شدند (نمودار ۱).

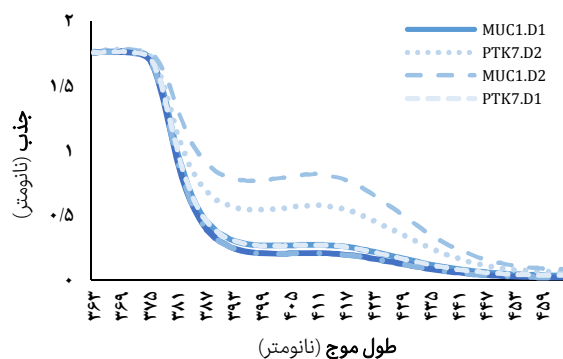
در مرحله بعد، آپتامرهایی مناسب همراه با لینکر اختصاصی متصل‌شونده به دزوکسی‌ریبوزایم برای تشخیص موثر بیومارکرهای



نمودار ۱) انتخاب سلولهای کنترل فاقد بیان

تایید اختصاصیت عملکرد آپتامرها

پس از ساخت آپتامرها و تهیه محلول حاوی غلظت مناسب از آنها، ابتدا نیاز به بررسی عملکرد آپتامرها و اختصاصیت فعالیت آنها بود. به همین منظور، ابتدا عملکرد هر یک از آپتامرهای اختصاصی مورد آزمایش قرار گرفت. این امر با خوانش جذب در طول موج ۴۱۴ نانومتر و در بازه ۳۰۰ ثانیه انجام شد. با توجه به اینکه D2 در هر دو آپتامر MUC1 و PTK7 واجد توالی CATG4 است، فعالیت پراکسیدازی قابل توجهی را نشان داد. تیمار D2 با D1 باعث کوپل شدن آنها شد و افت شدید فعالیت پراکسیدازی را نشان داد. فعالیت اندک پراکسیدازی مشاهده شده مربوط به حضور الیگونوکلوئوتیدهای D2 است که احتمالاً با D1 کوپل نشده‌اند (نمودارهای ۴ و ۵).



نمودار ۲) بررسی فعالیت آنزیمی آپتامرها در شرایط مختلف

بررسی عملکرد آنزیمی آپتامرها

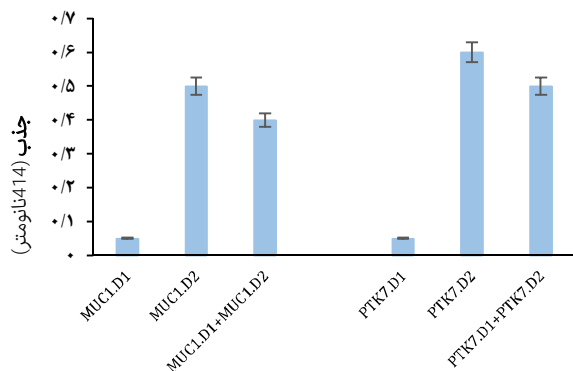
در این مطالعه، طیف جذب رادیکال ABTS، در حضور ۱/۲ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۱/۲ میلی‌مولار ABTS و غلظت ۰/۵ نانومولار دزوکسی‌ریبوزایم در بافر ۱۰ میلی‌مولار تریس-هیدروکلراید با pH=۸، در ناحیه ۳۸۰-۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. رادیکال ABTS، در ناحیه ۴۱۴ نانومتر دارای یک پیک جذب است و همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، تنها در حضور آپتامرهای واجد دزوکسی‌ریبوزایم، فعالیت پراکسیدازی مشاهده می‌شود و با وجود آپتامرهای دیگر، فعالیت پراکسیدازی مشاهده نمی‌شود. این امر نشان‌دهنده عملکرد صحیح پراکسیدازی دزوکسی‌ریبوزایم در حضور پراکسید هیدروژن و ABTS است.

بهینه‌سازی غلظت آپتامرهای واجد فعالیت آنزیمی

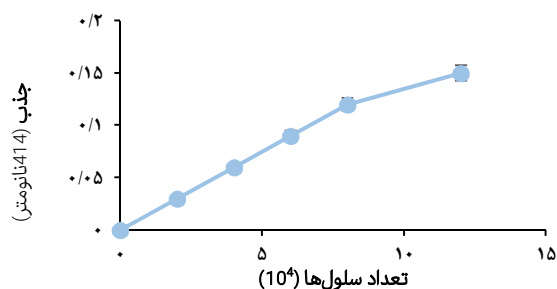
در مطالعه حاضر، غلظت‌های مختلف آپتامرهای واجد فعالیت پراکسیدازی در بافر ۱۰ میلی‌مولار تریس-هیدروکلراید با pH=۸ تهیه شدند و فعالیت پراکسیدازی غلظت‌های مختلف دزوکسی‌ریبوزایم در حضور ۱/۲ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۱/۲ میلی‌مولار ABTS، در یک بازه زمانی ۳۰۰ ثانیه‌ای اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در نمودار ۳ نشان داده شده است، بیشترین فعالیت پراکسیدازی برای MUC1.D2، در غلظت ۲۰۰ نانومولار دزوکسی‌ریبوزایم به دست آمد و در غلظت‌های بالاتر رابطه خطی دیده نشد. غلظت بهینه برای آپتامر PTK7.D2 نیز حدود ۲۰۰ نانومولار گزارش شد.

استفاده از آپتامرها برای تشخیص سلول‌های سرطانی سینه

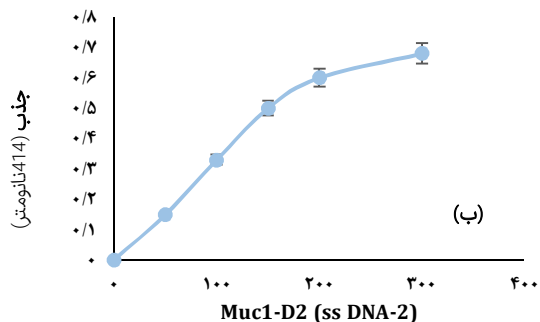
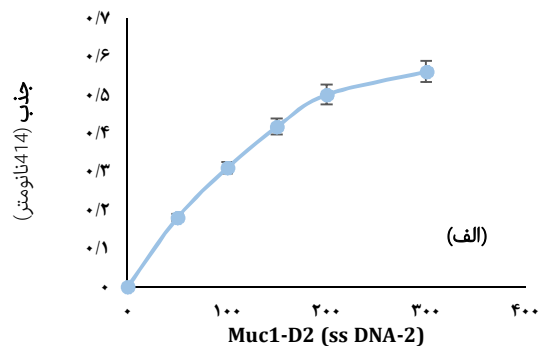
با توجه به میزان بالای بیان بیومارکرهای MUC1 و PTK7 در سطح سلول‌های MCF-7، در حضور همین و نیز ABTS، ساختار ۴ رشته‌ای فعال DNAzyme تشکیل شد و با انجام واکنش اکسیداسیون ABTS، رنگ سبز تولید می‌شود که با چشم غیرمسلح نیز قابل مشاهده است. نمودار ۶ نشان می‌دهد که در صورت تیمار سلول‌های سرطانی با D1، این آپتامر به گیرنده خود وصل می‌شود. پس از سانتریفیوژ آپتامر همراه با سلول‌ها رسوب می‌کند و از محیط واکنش خارج می‌شود. پس از افزودن D2، این الیگونوکلوئید تا پایان در محیط واکنش باقی می‌ماند و فعالیت پراکسیدازی نشان می‌دهد. در صورتی که D2 به‌تنهایی استفاده شود، چون هیچ اتصال با سلول‌ها برقرار نمی‌کند در پایان واکنش در محیط واکنش باقی می‌ماند و فعالیت پراکسیدازی نشان می‌دهد (نمودار ۷). در نمونه کنترل به علت عدم اتصال D1 به سلول‌های شاهد، این الیگونوکلوئید در محیط واکنش باقی می‌ماند و پس از افزودن D2، به آن متصل می‌شود و از تشکیل ساختار چهار رشته‌ای جلوگیری می‌کند. در نتیجه، فعالیت پراکسیدازی مشاهده نمی‌شود. در محلول عاری از پروتئین هدف، آپتامر نباید هیچ‌گونه واکنشی نشان دهد. پس از آماده‌سازی محلول‌های مربوط به هر یک از آپتامرها و خوانش جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، عدم رخداد هر گونه واکنش تایید شد و با توجه به موفقیت آمیز بودن این امر، اثر آپتامرها در تشخیص هر بیومارکر مورد بررسی قرار گرفت.



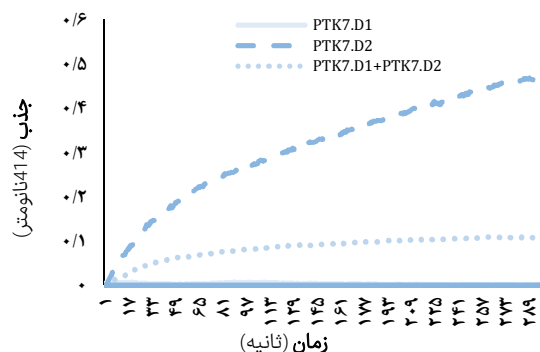
نمودار ۶) سنجش رنگ‌سنجی سلول‌های سرطانی MCF7 با استفاده از آپتامرهای اختصاصی علیه گیرنده‌های سطحی MUC1 و PTK7



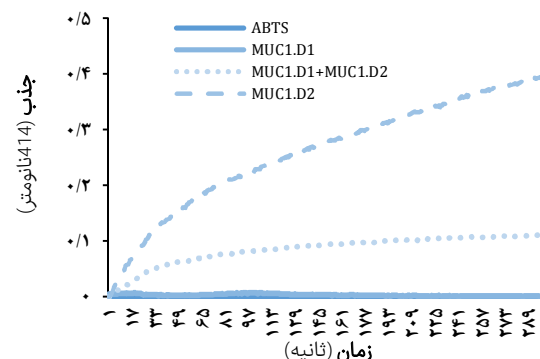
نمودار ۷) محدوده خطی شناسایی کمی سلول‌های MCF-7 با استفاده از آپتامرهای اختصاصی



نمودار ۸) بهینه‌سازی غلظت آپتامرهای واجد فعالیت آنزیمی؛ الف) MUC1.D2؛ ب) PTK7.D2



نمودار ۹) منحنی فعالیت شبه پراکسیدازی در زمان‌های مختلف برای آپتامر PTK7 در حضور PTK7.D1 و PTK7.D2 که در آغاز واکنش با PTK7.D2 تیمار شده است (تغییرات جذب ABTS فاقد هر گونه الیگونوکلوئید نیز نشان داده شده است).



نمودار ۱۰) منحنی فعالیت شبه پراکسیدازی در زمان‌های مختلف برای آپتامر MUC1 در حضور MUC1.D1 و MUC1.D2 که در آغاز آزمایش با MUC1.D1 انکوبه شده است (تغییرات جذب ABTS فاقد هر گونه الیگونوکلوئید نیز نشان داده شده است).

می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر در نشریه دیگری به زبان فارسی یا انگلیسی یا هر زبان دیگری چاپ نشده و یا به‌طور همزمان برای نشریه دیگری ارسال نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: نصرالله صالح‌گوهری (نویسنده اول)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ زهرا کرمی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ فرید محسنی (نویسنده سوم)، روش‌شناس (۵۰٪)؛ علی کریم‌زاده (نویسنده چهارم)، روش‌شناس (۱۰٪)؛ کتابیون صدیقی (نویسنده پنجم)، روش‌شناس (۵۰٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر با حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه‌های علوم پزشکی و شهید باهنر کرمان انجام شده است.

منابع

- 1- Nguyen NP, Almeida FS, Chi A, Nguyen LM, Cohen D, Karlsson U, et al. Molecular biology of breast cancer stem cells: potential clinical applications. *Cancer Treat Rev*. 2010;36(6):485-91.
- 2- Videira M, Reis RL, Brito MA. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2014;1846(2):312-25.
- 3- Shangguan D, Cao Z, Meng L, Mallikaratchy P, Sefah K, Wang H, et al. Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells. *J Proteome Res*. 2008;7(5):2133-9.
- 4- Mittal S, Kaur H, Gautam N, Manth AK. Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. *Biosens Bioelectron*. 2017;88:217-31.
- 5- Padgett JK, Parlette III HL, English III JC. A diagnosis of chronic lymphocytic leukemia prompted by cutaneous lymphocytic infiltrates present in Mohs micrographic surgery frozen sections. *Dermatol Surg*. 2003;29(7):769-71.
- 6- Pan C, Guo M, Nie Z, Xiao X, Yao S. Aptamer-based electrochemical sensor for label-free recognition and detection of cancer cells. *Electroanalysis*. 2009;21(11):1321-6.
- 7- Baker BR, Lai RY, Wood MS, Doctor EH, Heeger AJ, Plaxco KW. An electronic, aptamer-based small-molecule sensor for the rapid, label-free detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids. *J. Am. Chem. Soc*. 2006;128(10):3138-9.
- 8- Zhu X, Cao Y, Liang Z, Li G. Aptamer-based and DNAzyme-linked colorimetric detection of cancer cells. *Protein Cell*. 2010;1(9):842-6.
- 9- Degefa TH, Kwak J. Label-free aptasensor for platelet derived growth factor (PDGF) protein. *Anal Chim Acta*. 2008;613(2):163-8.
- 10- Famulok M, Mayer G, Blind M. Nucleic acid aptamers from selection in vitro to applications in vivo. *Acc. Chem. Res*. 2000;33(9):591-9.
- 11- Ghossein RA, Bhattacharya S. Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. *Eur. J. Cancer*. 2000;36(13):1681-94.
- 12- Ferreira CS, Papamichael K, Guilbault G, Schwarzscher T, Gariepy J, Missailidis S. DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich

به‌منظور تایید اختصاصیت تشخیص توسط آپتامر، نیاز به اجرای این پروتکل روی سلول‌هایی است که این بیومارکرها را بیان نمی‌کنند و به عبارت دیگر، از آنها به‌عنوان کنترل منفی استفاده می‌شود. در این آزمایش رده سلولی HepG2 به‌عنوان کنترل منفی برای بررسی بیان MUC1 و رده سلولی U266 به‌عنوان کنترل منفی برای بررسی بیان PTK7 مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه این رده‌های سلولی، بیومارکرهای مذکور را بیان نمی‌کنند، ساختار آنزیمی فعال ایجاد نشده و در نتیجه واکنشی نیز انجام نمی‌شود. در مرحله بعد، حداقل تعداد سلول لازم برای تشخیص با روش رنگ‌سنجی تعیین شد تا بتوان با تکیه بر این یافته، گامی در راستای استفاده هرچه گسترده‌تر از این روش در شناسایی سریع و مقرون به صرفه سلول‌های سرطانی در بالین برداشت. پس از بهینه‌سازی شرایطی مانند غلظت آپتامرها و زمان، سنجش کمی سلول‌های MCF-7 شناسایی‌شده با استفاده از ترکیب آپتامرها و دزوکسی‌ریبوزایم چهار رشته‌ای مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش تعداد سلول‌ها جذب اندازه‌گیری‌شده به‌طور تدریجی افزایش می‌یابد. همبستگی خطی بین سیگنال رنگ‌سنجی و تعداد سلول‌ها مشاهده شد (نمودار ۷).

محدوده کمی شناسایی سلول‌ها

در سال ۲۰۱۰، در مطالعه‌ای از آپتامرهای اختصاصی برای تشخیص سلول‌های سرطان خونی CCRF-CEM استفاده کردند^[8]. غلظت بهینه برای آپتامرهای مورد استفاده حدود ۵۰ نانومولار گزارش شده است. بهترین زمان برای عملکرد مناسب آپتامرهای واجد دزوکسی‌ریبوزایم حدود ۳۰ دقیقه به دست آمد که مشابه نتایج حاصل در این سیستم است. محدوده تشخیص برای سلول‌های سرطان خون حدود 1×10^3 گزارش شده است. در مطالعات قبلی نیز محدوده تشخیص حدود 1×10^3 بود^[6,20]، در صورتی که در مطالعه حاضر محدوده تشخیص سلول‌ها نیز حدود 1×10^3 گزارش شد. تاکنون گزارشی مبنی از استفاده از سیستم آپتامری مبتنی بر دزوکسی‌ریبوزایم برای تشخیص سلول‌های سرطانی سینه گزارش نشده است.

نتیجه‌گیری

بیوسنسورهای آپتامری بر پایه دزوکسی‌ریبوزایم نسبت به روش‌های سنتی برای شناسایی سلول‌های سرطانی مزیت‌هایی از جمله سرعت، سادگی و ارزان بودن را دارند. در مطالعه حاضر، از آپتامرهای MUC1 و PTK7 متصل به دزوکسی‌ریبوزایم نیز به‌عنوان آپتامرهای اختصاصی برای اتصال به سلول‌های سرطانی سینه استفاده شد. نتایج قابلیت قابل توجه این سیستم بیوسنسوری در تشخیص مقادیر اندک سلول‌های سرطان سینه را نشان می‌دهند که می‌تواند نویدبخش توسعه روش‌های کارآمد در تشخیص زودهنگام سرطان سینه باشد.

تشکر و قدردانی: از معاونت پژوهشی دانشگاه‌های علوم پزشکی و شهید باهنر کرمان به‌دلیل حمایت‌های آنها در انجام مطالعه حاضر قدردانی

- 19- Zhu X, Yang J, Liu M, Wu Y, Shen Z, Li G. Sensitive detection of human breast cancer cells based on aptamer-cell-aptamer sandwich architecture. *Anal Chimica Acta*. 2013;764:59-63.
- 20- He F, Shen Q, Jiang H, Zhou J, Cheng J, Guo D, et al. Rapid identification and high sensitive detection of cancer cells on the gold nanoparticle interface by combined contact angle and electrochemical measurements. *Talanta*. 2009;77(3):1009-14.
- 21- Zokaei E, Badoei-Dalfrad A, Ansari M, Karami Z, Eslaminejad T, Nematollahi-Mahani SN. Therapeutic potential of DNAzyme loaded on Chitosan/Cyclodextrin nanoparticle to recovery of chemosensitivity in the MCF-7 cell line. *Appl Biochem Biotechnol*. 2019;187(3):708-23.
- 22- Mahdiannasser M, Karami Z. An innovative paradigm of methods in microRNAs detection: highlighting DNAzymes, the illuminators. *Biosens Bioelectron*. 2018;107:123-44.
- 23- Nikzad N, Karami Z. Label-free colorimetric sensor for sensitive detection of choline based on DNAzyme-choline oxidase coupling. *Int J Biol Macromol*. 2018;115:1241-8.
- 24- Farrokhi F, Karami Z, Esmaeili-Mahani S, Heydari A. delivery of DNAzyme targeting c-Myc gene using β -cyclodextrin polymer nanocarrier for therapeutic application in human breast cancer cell line. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2018;47:477-84.
- ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours. *Anal. Bioanal. Chem*. 2008;390(4):1039-50.
- 13- Ferreira CS, Matthews CS, Missailidis S. DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers. *Tumor Biol*. 2006;27(6):289-301.
- 14- Shangguan D, Li Y, Tang Z, Cao ZC, Chen HW, Mallikaratchy P, et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(32):11838-43.
- 15- Shi H, Li D, Xu F, He X, Wang K, Ye X, et al. A label-free activatable aptamer probe for colorimetric detection of cancer cells based on binding-triggered in situ catalysis of split DNAzyme. *Analyst*. 2014;139(17):4181-4.
- 16- Florea A, Taleat Z, Cristea C, Mazloum-Ardakani M, Săndulescu R. Label free MUC1 aptasensors based on electrodeposition of gold nanoparticles on screen printed electrodes. *Electrochem Commun*. 2013;33:127-30.
- 17- Hu R, Wen W, Wang Q, Xiong H, Zhang X, Gu H, et al. Novel electrochemical aptamer biosensor based on an enzyme-gold nanoparticle dual label for the ultrasensitive detection of epithelial tumour marker MUC1. *Biosens Bioelectron*. 2014;53:384-9.
- 18- Li T, Fan Q, Liu T, Zhu X, Zhao J, L, G. Detection of breast cancer cells specially and accurately by an electrochemical method. *Biosens Bioelectron*. 2010;25(12):2686-9.