

طراحی و ساخت نانوزیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر چارچوب آلی - فلزی و گرافن برای تشخیص سرطان پستان

علی اکبر زارع^{1,2}، فاطمه ملاعباسی³، حسین نادری منش^{4*}

- 1- دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 2- مربی پژوهشی، گروه پژوهشی پروتئین های نو ترکیب، مرکز تحقیقات سرطان پستان، پژوهشکده معتمد، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
- 3- استادیار شیمی، گروه تحقیقات بیومواد و مهندسی بافت، گروه فناوری های میان رشته ای، مرکز تحقیقات سرطان پستان، پژوهشکده سرطان معتمد، تهران، ایران
- 4- استاد بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*نویسنده مسئول:

ایمیل: Naderman@modares.ac.ir

* صندوق پستی 14115-175، تهران، ایران

پذیرش: 1402/7/29

دریافت: 1402/5/4

چکیده

تشخیص به موقع سرطان پستان به ویژه در مراحل ابتدایی شکل گیری آن، از اهمیت به سزایی برخوردار است. یکی از روش های تشخیص سلول های سرطانی، استفاده از حسگرهای الکتروشیمیایی است. در اینجا نانوکامپوزیت جدیدی معرفی شده است که در طراحی آن از چارچوب فلزی آلی مس و نانوخوشه های نقره استفاده می شود. نانوکامپوزیت حاصل را می توان به عنوان داربستی برای اتصال آنتی بادی ها جهت تشخیص سلول های زنده HER2 مثبت استفاده کرد. در ساختار نانوکامپوزیت نهایی، نانوخوشه های نقره در حفره های داخلی چارچوب فلزی آلی مس قرار می گیرند که منجر به آسان سازی و سرعت انتقال الکترون، زیست سازگاری و فعالیت الکتروشیمیایی بهتر می شود. نتایج به دست آمده نشان داد که حسگر الکتروشیمیایی طراحی شده قادر به شناسایی سلول های HER2 مثبت با حد تشخیص 3 سلول و در محدوده خطی 100 تا 5000 سلول سلول در میلی لیتر می باشد. همچنین پایداری، کارایی و گزینش پذیری حسگر معرفی شده ارزیابی و تأیید شدند. این راهبرد می تواند یک رویکرد امیدوارکننده و مبتنی بر چارچوب های آلی فلزی برای تشخیص سلول های سرطانی ارائه کند.

واژه های کلیدی: سرطان پستان، حسگر الکتروشیمیایی، چارچوب آلی - فلزی، نانوخوشه های نقره.

1- مقدمه

سرطان یکی از نگرانی‌های بزرگ جهان بشریت است و سرطان پستان حدود یک‌چهارم از کل سرطان‌ها را تشکیل می‌دهد [1]. در ایران میزان بروز سرطان پستان در سنین خاص 40 مورد در هر صد هزار نفر زن می‌باشد [2]. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که مرگ‌ومیر ناشی از سرطان پستان در سال‌های گذشته و در کشورهای پردرآمد حدود 40 درصد کاهش پیدا کرده است؛ یعنی اینکه مرگ‌ومیر سالیانه سرطان پستان را می‌توان تا 4 درصد در سال کاهش داد. به این ترتیب در بازه 20 ساله می‌توان از 2,5 میلیون مرگ پیشگیری کرد. مهم‌ترین دلیل این موفقیت، تشخیص زودهنگام سرطان برای افزایش شانس زنده ماندن است. بنابراین، توسعه یک روش سریع، کم هزینه و حساس برای تشخیص سرطان پستان امری بسیار ضروری در ارتقای سلامت جامعه به نظر می‌رسد.

اگرچه ماموگرافی، یکی از رایج‌ترین روش‌های تشخیص سرطان پستان است، اما ممکن است نتواند ضایعات خوش‌خیم و بدخیم را از یکدیگر تمایز دهد [3]. همچنین برای تأیید یا رد سرطان بیوپسی موردنیاز است که روشی تهاجمی محسوب می‌شود. بررسی نشانگرهای سطح سلولی، روشی غیرتهاجمی برای تشخیص سرطان است [4]. یکی از این نشانگرهای سطح سلولی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (HER2) است که یک گیرنده تیروزین کیناز به شمار می‌آید و این فاکتور در 30 درصد از نمونه‌های سرطان پستان بیش از حد بیان می‌شود [5؛ 6]. برای شناسایی بیمارانی که از داروهایی مانند هرستین سود می‌برند، ارزیابی دقیق سلول‌های HER2+ موردنیاز است [7]. روش‌های مختلفی مانند بیوپسی تومور و شناسایی این سلول‌های سرطانی با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی (IHC)، فلورسانس هیبریداسیون درجا (FISH) و هیبریداسیون

درجا کروموزنیک (CISH) برای شناسایی سلول‌های HER2 مثبت وجود دارد [8؛ 9].

حسگرهای الکتروشیمیایی به دلیل ویژگی‌هایی مانند آسانی کار، سادگی، هزینه کم و حساسیت به طورگسترده در بسیاری از زمینه‌ها از جمله پزشکی بالینی و تشخیص بیماری‌ها استفاده شده است [10]. زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی از یک سیستم شناسایی و یک سیستم انتقال تشکیل شده‌اند. عملکرد سیستم شناسایی تعامل انتخابی با آنالیت و تبدیل پارامترهای حاصل به یک سیگنال خاص است و وظیفه سیستم انتقال، دریافت سیگنال‌ها و ارسال آنها به سیستم الکترونیکی به صورت سیگنال‌های الکتروشیمیایی است. سیستم الکترونیکی سیگنال را تقویت کرده و در نهایت کمیت آنالیت را درک می‌کند. یکی از رایج‌ترین روش‌ها در حسگر زیستی الکتروشیمیایی، سنجش امپدانس است. در این روش سلول‌هایی که روی سطح الکتروود قرار می‌گیرند، می‌توانند امپدانس را در سطح مشترک الکتروود تغییر دهند. بنابراین یک حسگر زیستی الکتروشیمیایی مبتنی بر سنجش امپدانس می‌تواند تغییرات مقاومت لایه سلولی ناشی از مورفولوژی سلول، حرکت سلولی یا تماس سلولی را اندازه‌گیری کند. براساس اصول بالا، حسگرهای امپدانس الکتروشیمیایی مختلفی با الکترودهای اصلاح‌شده براساس روش نوآورانه طراحی شده است که در تشخیص سلول‌های سرطانی کاربرد دارند [11؛ 12].

علاوه بر این، هنوز به توسعه روش‌های الکتروشیمیایی با حساسیت بالا و با استفاده از نانو مواد جدید برای بهبود سرعت جذب، رسانایی و شناسایی سلول‌های سرطانی نیاز است. بر همین اساس، پیش‌تر یک مطالعه بر مبنای روش‌های الکتروشیمیایی انجام گرفت که نشان می‌دهد حسگر زیستی مبتنی بر نانوذرات طلا می‌تواند برای تثبیت آنتی‌بادی anti-EpCAM استفاده شود و سلول‌های MCF-7 را شناسایی کند [13].

در طراحی زیست حسگرهای الکتروشیمیایی از نانومواد گوناگونی استفاده شده است که به ویژگی‌های برخی از آنها اشاره می‌شود. نانوذرات فلزی مانند نانوخوشه‌های نقره خواص ویژه‌ای مانند پایداری شیمیایی، زیست‌سازگاری، هدایت الکتریکی، هزینه پایین و سنتز آسان دارند که می‌توانند به راحتی با سایر نانومواد ادغام شوند. پیش‌تر در یک مطالعه حسگر الکتروشیمیایی برپایه نانوخوشه‌های نقره طراحی و برای تشخیص سلول‌های سرطان پستان MCF-7 به کار برده شده است که در نهایت نیز حساسیتی در حد 50 سلول در میلی‌لیتر نشان داده است [14]. پیش‌تر یک حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر آپتامر برای تشخیص حساس و انتخابی سلول‌های سرطان پستان و نشانگرهای زیستی MUC1 توسعه داده شده است. سلول‌های MCF-7 به وسیله آپتامرهای روی الکتروثابت شدند. سپس آپتامرهای برچسب‌گذاری‌شده با نانوذرات نقره برای شناسایی سلول‌ها برای افزایش انتخاب‌پذیری و تقویت سیگنال استفاده شدند [15]. گرافن یکی دیگر از انواع موادی است که به واسطه خواص ویژه از قبیل پایداری شیمیایی، انعطاف‌پذیری، رسانایی و سطح ویژه بالا می‌تواند با سایر مواد از جمله با نانوخوشه‌های فلزی همراه شود [16-18].

چارچوب‌های فلزی-آلی (MOFs) یکی از مواد پرجاذبه‌ای است که به تازگی به آن توجه شده است و برای اهداف متفاوتی مانند اندازه‌گیری، تحویل دارو، تشخیص و ... استفاده شده‌اند [19؛ 20]. چارچوب‌های فلزی-آلی به دلیل ویژگی‌هایی مثل منافذ قابل تنظیم، مساحت خاص بزرگ، زیست‌سازگاری عالی، اندازه و برهم‌کنش با مولکول‌های زیستی به عنوان حسگر برای تشخیص حساس عوامل مختلف توسعه پیدا کرده‌اند [21؛ 22]. بنابراین کامپوزیت چارچوب‌آلی-فلزی با ذرات فلزی دیگر یک روش مؤثر برای طراحی حسگرهای الکتروشیمیایی است و به طور گسترده در

حسگرهای مختلف الکتروشیمیایی استفاده می‌شود. در یک مطالعه دیگر برای پایش تریپتوفان از MIL-101 به همراه نقره استفاده شده است [23]. همچنین به تازگی از نانوخوشه‌های نقره که در چارچوب‌های آلی فلزی امیدارزولات زئولیت کپسوله شده‌اند، برای تشخیص مس در خون استفاده شده است [24].

با توجه به اندازه منافذ محدود چارچوب‌های فلزی-آلی، اندازه ذرات سنتز شده محدود به مقیاس نانو خواهد بود. نانوذرات فلزی با مزایای رسانایی برتر و مساحت سطح بالا می‌توانند برای افزایش سرعت انتقال الکترون به همراه MOFها استفاده شوند. به طور کلی، نانوکامپوزیت‌های MOF-فلز تطبیق‌پذیری، پایداری بالا و پراکندگی دارند. بنابراین کامپوزیت MOF با ذرات فلزی یک ایده مؤثر برای طراحی حسگرهای الکتروشیمیایی است [25]. در یک مطالعه که به وسیله لی¹ و همکاران در سال 2020 انجام شد، یک حسگر الکتروشیمیایی بر پایه چارچوب آلی فلزی زیرکونیوم (که روی الکتروثابت برهنه طلا پوشیده شده) برای تشخیص سلول‌های MCF-7 سرطان پستان طراحی شد که حد تشخیص 31 سلول در میلی‌لیتر داشت [26]. همچنین در مطالعه دیگری پیش‌تر یک حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر چارچوب فلزی-آلی و نانوساختارهای DNA برای شناسایی سلول‌های سرطان پستان ساخته شده است [27]. پیوند بین دو کاتیون فلزی مختلف می‌تواند رسانایی الکتریکی را افزایش داده و بازده الکتروکاتالیستی را بهبود بخشد که به پتانسیل‌های اکسیداسیون متفاوت و پیکربندی‌های الکترونی مرتبط نسبت داده می‌شود [28].

به تازگی، نانوذرات دو فلزی با اثر مشارکتی توسعه پیدا کرده‌اند که عملکرد MOFs را بیش از حد بهینه می‌کنند [29]. برای مثال نانومواد چارچوب‌های فلزی-آلی مس به همراه نانوذرات طلا با ساختارهای منحصربه‌فرد

1 Li

می‌توانند به‌طور مؤثری تعداد مکان‌های اتصال را در شبکه پلیمری افزایش دهند و حسگر الکتروشیمیایی حساس‌تری به دست آورند [30].

ساختار پیشرفته هسته-پوسته برای ساخت کامپوزیت‌ها با کپسوله‌کردن اکسیدهای فلزی یا نانوذرات فلزی به‌عنوان یک هسته و MOFs به‌عنوان یک پوسته معرفی شده است. اکسیدهای فلزی یا نانوذرات فلزی به‌عنوان یک کاتالیزور و پوسته‌های MOFs به‌عنوان عامل شناسایی برای غربال‌های مولکولی آنالوگ عمل می‌کنند. این ساختارهای پیشرفته می‌توانند تا حد زیادی پایداری ضدتجمع خود را بهبود بخشند و از انحلال یا خوردگی نامطلوب جلوگیری کنند. در نتیجه خواص کاتالیزوری و جذب را افزایش دهند [31]. بنابراین در ترکیب نانوخوشه نقره با چارچوب آلی فلزی مس، یک اثر هم‌افزایی منحصربه‌فرد بین دو عنصر فلزی مختلف برای به‌دست‌آوردن پایداری و کارایی بیشتر به وجود می‌آید [32].

برای بهبود رسانایی و پایداری الکترونیکی چارچوب‌های آلی-فلزی می‌توان آنها را با مواد رسانا مانند گرافن و مشتقات آن همراه کرد. بنابراین وجود گرافن در ساختار چنین کامپوزیت‌هایی باعث افزایش سطح، ظرفیت جذب و نیز بهبود حساسیت و گزینش‌پذیری خواهد شد [33]. برای مثال در یک مطالعه چارچوب‌های آلی فلزی مبتنی بر مس به همراه گرافن برای سنجش H_2O_2 و اسید اسکوربیک پیشنهاد شده است [34].

حسگرهای زیستی در تشخیص سلول‌های سرطانی می‌توانند نقش به‌سزایی داشته باشند. در این مطالعه با هدف معرفی یک حسگر الکتروشیمیایی جدید برای تشخیص سلول‌های HER2 مثبت، نانوکامپوزیتی بر پایه نانوخوشه‌های نقره و چارچوب فلزی آلی مس/گرافن

طراحی و سنتز شده و برای تشخیص سلول‌های سرطان پستان با بیان بیش از حد HER2 آماده شده است.

2- بخش تجربی

2-1 مواد و شناساگرها

فری‌سیانید پتاسیم، فروسیانید پتاسیم، نیترات مس، اسید سولفوریک، پودر گرافیت، پراکسید هیدروژن، نیترات سدیم، پرمنگنات پتاسیم، پیرول، اسید پروپیونیک، کربوکسی بنزالدئید ($C_3H_6O_2$) و دی‌متیل فرمامید (DMF) از شرکت Merck تهیه شدند. اتانول، بافر سالین فسفات (PBS)، EDC، NHS، نیترات نقره و NaOH از شرکت سیگما خریداری شد. آنتی‌بادی مونوکلونال ضد HER2 انسان (هرسپتین²) از شرکت آریوزن (ایران) خریداری شد. رده‌های سلولی SKBR3 و MCF-7 از منابع ATCC به دست آمدند.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) به‌وسیله دستگاه Carl Zeiss گرفته شد. مشخصه‌یابی TEM در 100 کیلوولت انجام شد. طیف جذبی به‌وسیله Scinco UV (کره) در محدوده طول موج 250 تا 600 نانومتر به دست آمد. طیف FTIR نمونه‌ها در فرکانس‌های 400 تا 4000 بر سانتی‌متر انجام شد. طیف رامان به‌وسیله طیف‌سنج رامان SENTERA با نور لیزر 780 نانومتر انجام شد. طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (EIS) با استفاده از نرم‌افزار 2 palmsens در پتانسیل 10 میلی‌ولت حول OCP و محدوده فرکانس 0.01 هرتز تا 10 کیلوهرتز انجام شد. همچنین مدار معادل با استفاده از نرم‌افزار Zview رسم شد. منحنی ولتاژمتری چرخه‌ای در پتانسیل -0.4 تا 0.6 ولت ثبت شد. تمام آزمایش‌های الکتروشیمیایی با استفاده از یک سیستم سه الکترودی شامل الکتروکد، الکتروشمارشگر و الکتروکد Ag/AgCl به‌عنوان الکتروکد مرجع انجام شد.

2-4 تهیه ترکیب نانوخوشه‌های نقره و چارچوب‌های فلز-آلی (نانوکامپوزیت)

محلول‌های نانوخوشه نقره و چارچوب فلز آلی به ترتیب به مقدار 1,5 میلی گرم در لیتر و 1 میلی گرم در لیتر ترکیب شد و 20 دقیقه تحت اولتراسونیک قرار گرفت. سپس در دمای 37 درجه سانتی گراد هم زده شد تا یک سوسپانسیون همگن تشکیل شود.

2-5 ساخت حسگرهای الکتروشیمیایی

مقدار 10 میکرولیتر از نانوکامپوزیت حاصل بر سطح الکترودهای کربن شیشه‌ای (GCE) از پیش تیمار شده قرار گرفت و به مدت 12 ساعت در دمای 4 درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شد. سپس سه بار با PBS شسته شد تا برای مرحله بعدی آماده شود. در ادامه الکتروده آماده شده با استفاده از محلول EDC/NHS (300 μ M / 100 μ M) به مدت 2 ساعت در دمای اتاق قرار گرفت و با PBS شستشو شد. 10 میکرولیتر از محلول anti-HER2 (1 میلی گرم بر میلی لیتر) روی سطح الکترودها قرار داده شد و یک شب در دمای 4 درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از آن برای حذف جذب‌های غیراختصاصی، الکتروده سه بار با PBS شستشو شد. به این ترتیب آنتی بادی ضد HER2 روی حسگر تثبیت شد که حالا می تواند سلول‌های سرطانی HER2+ را شناسایی کند.

2-6 کشت سلولی و تشخیص سلول‌های سرطانی

رده‌های سلولی سرطان پستان شامل SKBR3 و MCF-7 در محیط کشت DMEM، FBS 10% و 1 درصد آنتی بیوتیک (محلول پنی سیلین - استرپتومایسین) در دمای 37 درجه سانتیگراد در انکوباتور (5% CO₂ و 95% رطوبت) کشت داده شدند. سلول‌ها پس از چند روز کشت با EDTA / تریپسین جمع آوری شدند. برای

اندازه گیری‌ها در بافر PBS 0,1 مولار (pH=7.4) حاوی 5 محلول میلی مولار فری سیانید پتاسیم و فروسیانید پتاسیم انجام شد.

2-2 سنتز نانوخوشه‌های نقره/گرافن

نانوخوشه‌های نقره با افزودن 5 میلی لیتر محلول نیترات نقره و به دنبال آن افزودن 0,2 میلی لیتر NaOH سنتز شده و به مدت 2 روز در دمای 37 درجه سانتی گراد تحت هم زدن شدید قرار گرفت. سپس محلول‌ها برای حذف ذرات بزرگ و خالص سازی در دور 12000g سانتریفیوژ شدند. در ادامه 0,5 گرم پودر گرافیت در 5 میلی لیتر محلول آبی نانوخوشه‌های نقره پراکنده شد. سپس مخلوط به مدت 5 ساعت (درحالی که با یک همزن مغناطیسی مخلوط می شد) تحت فراصوت قرار گرفت. آنگاه مخلوط به مدت 30 دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول نهایی آبی پایدار به دست آمد.

2-3 سنتز چارچوب آلی فلزی/ گرافن: (MOF/ گرافن)

این ترکیب از راه مخلوط کردن حدود 22 میلی گرم نیترات مس، 24 میلی گرم کربوکسی فنیل پورفین، 5 میلی لیتر DMF و 2 میلی لیتر اتانول سنتز شده و به مدت 30 دقیقه هم زده شد. پس از آن، سوسپانسیون 1 میلی گرم در میلی لیتر اکسید گرافن به مخلوط اضافه و با پوشش تفلون در اتوکلاو قرار داده شد. نخست تا دمای 80 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت گرم و بعد تا دمای اتاق خنک شد. در انتها پودر MOF/ گرافن به دست آمد که برای خالص سازی با اتانول شسته شد. محصول به دست آمده در دمای 60 درجه سانتی گراد خشک شد.

1660cm^{-1} می‌تواند با کشش حلقه اسکلتی صفحات گرافن مرتبط باشد [38].

طیف FTIR کامپوزیت نهایی چندین پیک آشکار از جمله 1065 و 1158cm^{-1} (که مربوط به ورقه‌های گرافن در نانوخوشه‌های نقره/گرافن است) را نشان می‌دهد که البته از شدت آنها کاسته شده است. همچنین ناحیه 1640cm^{-1} می‌تواند ناشی از پیوندهای بین گروه‌های C=O لیگاند پورفیرین و اتم‌های مس در ساختار MOF موجود در نانوکامپوزیت نهایی باشد. همچنین نانوکامپوزیت آماده‌شده قله‌های جدیدی را در 1700cm^{-1} مربوط به کشش C=O و نیز در 2960cm^{-1} مربوط به کشش C-H نشان می‌دهند [39]. در مجموع، نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده تشکیل موفقیت آمیز نانوکامپوزیت به‌عنوان یک پلتفرم جدید الکتروشیمیایی برای تشخیص سلول‌های سرطانی است.

برای تعیین همگنی و اصالت کامپوزیت‌های کربن از طیف‌سنجی رامان می‌توان استفاده کرد. بنابراین طیف رامان کامپوزیت نهایی بررسی شد که در شکل 1 ب نشان داده شده است. در این روش پیک‌های D و G مربوط به کربن دیده می‌شوند [38]. همان‌طور که در شکل 1 ب نشان داده شده است، پیک‌های D و G مربوط به اکسید گرافن که به‌ترتیب در 1339cm^{-1} و 1591cm^{-1} مشاهده می‌شوند در طیف کامپوزیت طراحی‌شده نیز ظاهر شده است که حضور گرافن در ساختار کامپوزیت نهایی را تأیید می‌کنند.

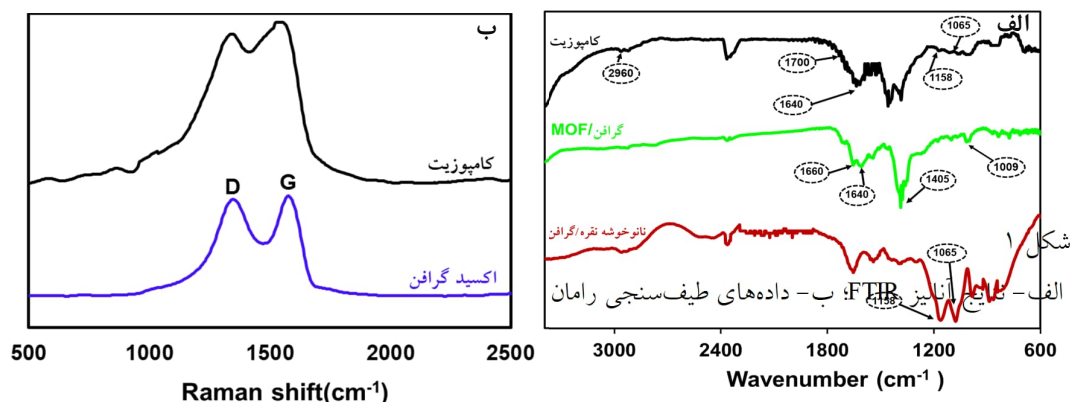
شناسایی سلول‌های سرطانی با نانوزیست حسگر، 10 میکرولیتر از محلول سلول‌ها با غلظت 5000 سلول در میلی‌لیتر روی الکتروود عامل‌دار به‌صورت قطره‌ای پوشش داده شد. پس از انکوباسیون برای مدت زمان کافی، الکتروود با PBS شستشو داده شد.

3- نتایج و بحث

3-1- خصوصیات نانوکامپوزیت

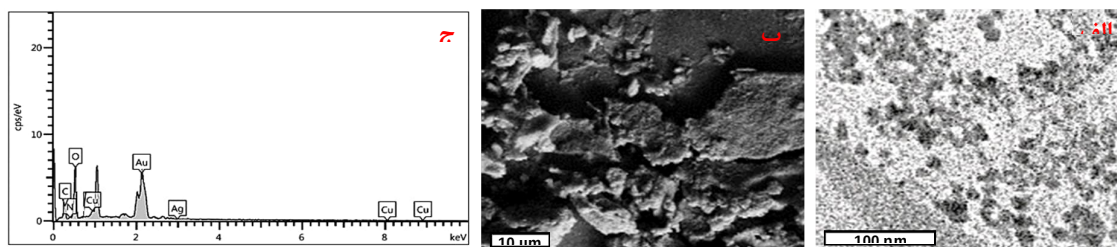
نانوکامپوزیت حاصل با روش‌های FE-SEM، EDS، Raman و FT-IR بررسی شد.

برای مطالعه تشکیل نانوکامپوزیت جدید، طیف FTIR برای خوشه‌های نقره، چارچوب فلز آلی و کامپوزیت نهایی (نانوخوشه‌های نقره - چارچوب آلی فلزی/گرافن) ثبت شد (شکل 1 الف). در طیف‌های IR ثبت‌شده، نوارهای اصلی زیر به دست آمد: در مورد نانوخوشه‌های نقره/گرافن می‌توان گفت که دو قله مشاهده‌شده در 1065cm^{-1} و 1158cm^{-1} مربوط به کشش C-O به دلیل گروه‌های کربونیل بوده و نشان‌دهنده تشکیل ورقه‌های گرافن است [35، 36]. در مورد نمودار چارچوب آلی فلزی/گرافن، یک پیک در حدود 1009cm^{-1} و دو پیک دیگر در 1405 و 1640 وجود دارند که می‌توانند به تشکیل پیوندهای هماهنگ بین گروه‌های کربوکسیل لیگاند پورفیرین و اتم مس در چارچوب آلی فلزی و به فلزی‌شدن حلقه پورفیرین مربوط باشد [37]. علاوه بر این، نوار جذب در



نتیجه بررسی FE-SEM در شکل 2 ب نشان می‌دهد که چارچوب آلی فلزی/ گرافن ساختار متخلخل خود را حفظ کرده و وجود نانوخوشه‌های نقره باعث ایجاد سطح ناهموار در نانوکامپوزیت است. وجود منافذ زیاد از مزایای ویژه در ساختار نانوکامپوزیت باعث می‌شود که نانوخوشه‌های نقره و مولکول‌های آنتی‌بادی بیشتری در چارچوب آلی فلزی/ گرافن قرار بگیرند. نتیجه بررسی EDS (Energy Dispersive X-ray) در شکل 2 ج ارائه شده است که وجود عناصر کربن (C)، اکسیژن (O)، نیتروژن (N)، نقره (منشأگرفته از نانوخوشه‌های نقره) و مس (منشأگرفته از چارچوب آلی فلزی- مس) را تأیید می‌کند.

در تصویر به‌دست‌آمده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) (شکل 2 الف) به نظر می‌رسد اندازه نانوکامپوزیت بزرگ‌تر از مواد دیگر است. قطر متوسط نانوکامپوزیت حدود 7 نانومتر است که بزرگ‌تر از نانوخوشه‌های نقره (3 نانومتر) می‌باشد؛ یعنی اینکه که نانوخوشه‌های نقره و چارچوب آلی فلزی به‌کاررفته در سنتز کامپوزیت برهم کنش کرده و ذرات بزرگ‌تری را تشکیل می‌دهند. گروه‌های اپوکسی در ساختار گرافن از تجمع چارچوب آلی فلزی جلوگیری کرده و منجر به تشکیل بلوک‌های چارچوب آلی فلزی- مس با اندازه نانو می‌شود [40].



شکل 2 الف - تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری؛ ب - تصویر FESEM؛ ج - نتایج آنالیز EDS نانوکامپوزیت

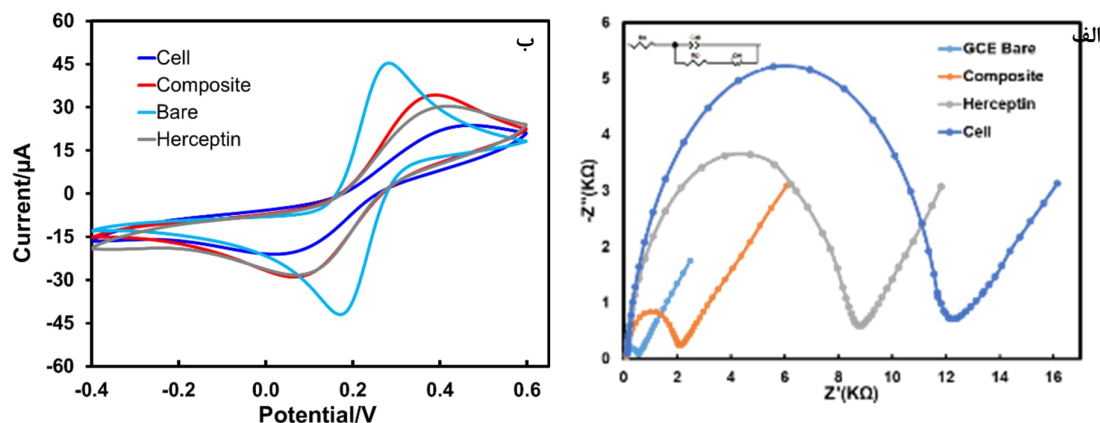
(0/5K Ω) است که فرایند انتقال سریع الکترون را نشان می‌دهد. پس از قرارگرفتن و اتصال نانوکامپوزیت روی الکتروود، R_{ct} افزایش پیدا کرد و مقدار آن به $2/2 K\Omega$ رسید که نشان‌دهنده انتقال الکترون کندتر است. R_{ct} پس از اتصال آنتی‌بادی بر سطح نانوکامپوزیت به‌طور چشمگیری افزایش پیدا کرد و به $8/8 K\Omega$ رسید. در مرحله آخر با اضافه‌شدن سلول‌های سرطانی به سطح الکتروود، به دلیل جذب خاص بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن، تثبیت انتخابی سلول‌های سرطانی بر الکتروود اتفاق افتاده و R_{ct} افزایش پیدا می‌کند. در این مرحله، برهم‌کنش بین هرسپتین و سلول HER2 مثبت منجر به افزایش بیشتر مقدار R_{ct} ($12/2K\Omega$) می‌شود. همان‌طور که مشاهده

2-3 عملکردهای الکتروشیمیایی نانوکامپوزیت

برای بررسی هر مرحله از تغییرات در طول ساخت حسگر زیستی الکتروشیمیایی از روش طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (EIS) استفاده شده است. پارامتر مقاومت انتقال بار (R_{ct}) برای کنترل سینتیک انتقال الکترون استفاده شد. توصیف الکتروشیمیایی تغییرات سطح الکتروود پس از اصلاح الکتروود با نانوکامپوزیت، هرسپتین و سلول سرطانی در نمودارهای Nyquist و ولتامتری چرخه‌ای نشان داده شده است (شکل‌های 3 الف و ب). نانوکامپوزیت طراحی شده به‌عنوان لایه‌ای برای تثبیت آنتی‌بادی‌ها و شناسایی سلول‌های HER2 مثبت بررسی شد. در حالت خام الکتروود GCE، مقدار R_{ct} کم

K Ω افزایش پیدا کرد (شکل 3 الف).

می‌شود، وقتی از کامپوزیت طراحی شده برای شناسایی سلول‌های SKBR3 استفاده شد، مقدار R_{ct} از 0,5 به 12,2



شکل 3 خصوصیات الکتروشیمیایی نانوکامپوزیت الف - نمودار امپدانس؛ ب - نمودار ولتامتری چرخه‌ای

می‌شود پارامتر ΔR برای سلول‌های SKBR3 برابر 27,1 است که حدود 11 برابر بیشتر از سلول‌های MCF-7 می‌باشد (شکل 4 ب). دلیل این اتفاق بیان ضعیف HER2 در سلول‌های MCF-7 است. همچنین سلول‌های SKBR3 آنتی‌ژن HER2 را بیش از حد بیان می‌کنند، بنابراین می‌توانند به‌سادگی به‌وسیله آنتی‌بادی به دام بیفتند. این موضوع نشان می‌دهد که نانوکامپوزیت طراحی شده گزینش‌پذیری بالا و میل ترکیبی خوبی برای سلول‌های HER2 مثبت دارد (شکل 4 ب).

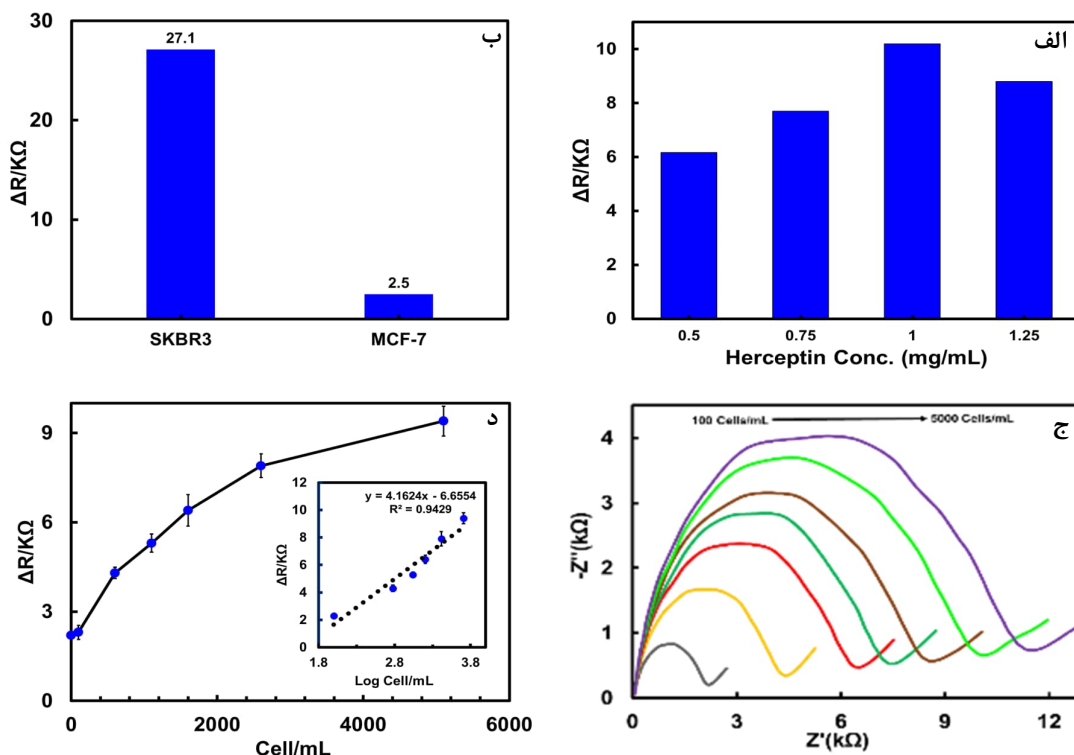
برای ارزیابی حد تشخیص حسگر ساخته‌شده، سلول‌های SKBR3 با غلظت‌های مختلف (100، 500، 1000، 1500، 2500، 5000 سلول در میلی‌لیتر) تهیه و آزمایش مانند مرحله قبل انجام شد. نتایج نشان می‌دهد مقادیر R_{ct} با افزایش غلظت سلول‌های SKBR3 افزایش پیدا می‌کند (شکل 4 ج). همچنین یک رابطه خطی مناسب و قابل قبول بین مقدار ΔR_{ct} و لگاریتم غلظت سلول SKBR3 در محدوده 100-5000 سلول در

3-3 غلظت بهینه آنتی‌بادی، گزینش‌پذیری و حد تشخیص (LOD)

برای به‌دست‌آوردن غلظت مناسب آنتی‌بادی، غلظت هرسپتین بررسی شد. نخست الکترودها با غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی تهیه شدند و تحت انکوباسیون با SKBR3 (50 سلول) قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل 4 الف مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت آنتی‌بادی تا غلظت 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر افزایش پیدا کرد و سپس دچار افت شد که بیانگر اشباع سطح الکترودها با آنتی‌بادی است. بنابراین غلظت 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌عنوان غلظت بهینه هرسپتین انتخاب شد. برای ارزیابی انتخاب‌پذیری حسگر زیستی طراحی‌شده، آزمایشی با چند رده سلولی شامل SKBR3 و MCF-7 طراحی شد. در هر مرحله، محلولی از سلول‌های مختلف با غلظت 50 سلول روی سطح الکترودها اصلاح شده به‌صورت قطره‌ای پوشش داده شد. نتایج EIS قبل و بعد از قراردادن سلول‌ها روی سطح الکترودها ثبت شد. همان‌طور که مشاهده

LOD محاسبه و برابر 3 سلول در میلی لیتر به دست آمد (شکل 4 د). به همین شیوه و براساس رابطه مربوط (که برابر است با: ده برابر انحراف استاندارد بلانک تقسیم بر شیب منحنی کالیبراسیون) LOQ محاسبه و برابر با 10 سلول به دست آمد.

میلی لیتر به دست آمد که معادله آن به صورت $\Delta R_{ct} (K\Omega) = \{SKBR3\} (cell/mL) (R^2 = 0.94)$ $4.1624x - 6.6554 \log$ با استفاده از فرمول مربوط (که برابر است با: سه برابر انحراف استاندارد بلانک تقسیم بر شیب منحنی کالیبراسیون)



شکل 4 الف - بهینه سازی غلظت آنتی بادی هرسپتین؛ ب - مقادیر ΔR_{ct} حسگر الکتروشیمیایی برای سلول های سرطانی مختلف (سلول های SKBR3 ، MCF-7)؛ ج - پاسخ های EIS حسگر در غلظت های مختلف سلول های SKBR3؛ د - وابستگی ΔR_{ct} به غلظت سلول های SKBR3 (داخل: رابطه خطی منحنی های کالیبراسیون)

سطحی می شود. این حسگر محدوده خطی گسترده و حد تشخیص کم (6 سلول در میلی لیتر) را نشان داد که از حد تشخیص به دست آمده در مطالعه حاضر بالاتر است.

یزدان پرست و همکاران یک حسگر الکتروشیمیایی را برای تشخیص حساس و انتخابی سلول های سرطان

در سال 2019 Ou و همکاران یک حسگر الکتروشیمیایی با استفاده از دو آپتامر مرتبط با یک چارچوب فلزی آلی و نانوساختارهای DNA برای شناسایی سلول های سرطان پستان ساختند [27]. این ساختار در ارتباط با آپتامرهای دوگانه تثبیت شده روی الکترود طلا باعث بهبود جهت گیری نانوکاوشر

نشان می‌دهد. گزینش‌پذیری بالای حسگر به دلیل وجود آنتی‌بادی ضد HER2 و برهم‌کنش آنتی‌بادی خاص با سطح سلول است. همه این نتایج نشان می‌دهند که نانوزیست حسگر طراحی‌شده برای تشخیص مستقیم سلول‌های SKBR3 بسیار انتخابی عمل می‌کند. بنابراین می‌تواند پتانسیل بسیاری برای کاربردهای بالینی داشته باشد.

پستان و نشانگرهای زیستی MUC1 توسعه دادند. سلول‌های MCF-7 به‌وسیله آپتامرهای ثابت روی الکتروود گرفته شد. سپس آپتامرهای برچسب‌گذاری‌شده با نانوذرات نقره برای شناسایی سلول‌های ثانویه برای افزایش انتخاب‌پذیری و تقویت سیگنال استفاده شدند. آنها به محدودیت تشخیص 25 سلول در میلی‌لیتر رسیدند که در مقایسه با حد تشخیص به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر بالاتر است؛ یعنی اینکه که حسگر طراحی‌شده در مطالعه حاضر حساسیت بهتری در تشخیص سلول سرطانی دارد [15].

در مطالعه‌ای دیگر دان³ و همکاران یک حسگر زیستی الکتروشیمیایی جدید مبتنی بر سلول برای تشخیص سلول‌های سرطانی کولورکتال براساس یک چارچوب فلزی آلی مبتنی بر کروم (Cr-MOF) و نانوذرات کبالت پیشنهاد کردند که خواص الکتروشیمیایی عالی و فلورسانس قوی داشت [41]. این حسگر محدودیت تشخیص در حدود 8 سلول در میلی‌لیتر داشت که باز از حد تشخیص به‌دست‌آمده در مطالعه ما بالاتر است.

از این‌رو (همان‌طور که در جدول 1 نیز نشان داده شده است) عملکرد سنجش نسبت به سلول‌های سرطانی نانوزیست حسگر طراحی‌شده ما بهتر از سایر حسگرهای گزارش‌شده قبلی است. بنابراین نتایج به‌دست‌آمده کارایی حسگر طراحی‌شده را تأیید می‌کند. در مقایسه با سایر حسگرهای گزارش‌شده برای تشخیص سلول (جدول 1)، حسگر طراحی‌شده در این پژوهش عملکرد خوب با محدوده خطی قابل قبول و LOD بهتر را نشان می‌دهد. نتایج حاصل، گزینش‌پذیری خوب حسگر پیشنهادی برای تشخیص سلول‌های سرطان پستان با بیان بیش از حد HER2 را

جدول 1 تشخیص سلول‌های توموری با استفاده از حسگرهای الکتروشیمیایی

سلول مورد بررسی	تکنیک	نانو مواد	محدوده خطی (سلول بر میلی لیتر)	LOD (سلول بر میلی لیتر)	مرجع
Hela	امپدانس الکتروشیمیایی	نانولوله‌های کربنی چندجداره	$2.1 \times 10^2 - 2.1 \times 10^7$	70	[42]
MCF-7	امپدانس الکتروشیمیایی	نانوذره طلا	$10 - 1 \times 10^5$	10	[11]
MCF-7	ولتاژمتری موج مربعی	نانوخوشه نقره	50-5000	50	[14]
SKBR3	استرپینگ ولتاژمتری	بیوکونژوگه هیدرازین - نانوذره نقره	$50 - 2 \times 10^4$	26	[43]
SKBR3	امپدانس الکتروشیمیایی	چارچوب آلی فلزی - نانوخوشه‌های نقره	100-5000	3	مطالعه حاضر

4- نتیجه‌گیری

سلول‌های سرطانی به‌ویژه سلول‌های بدخیم در مقایسه با سلول‌های طبیعی، قابلیت حرکت، مهاجرت غیرطبیعی و تقسیم سلولی سریع را نشان می‌دهند. با این وجود تولید و بیان برخی از نشانگرهای سطح سلولی نیز در سلول‌های سرطانی دچار تغییرات بسیاری می‌شود. این ویژگی‌ها نه تنها به پژوهشگران ایده‌های جدیدی در مورد چگونگی درمان سرطان می‌دهد بلکه مرجع ارزشمندی برای کمک به تشخیص اولیه تومورها ارائه می‌کنند.

فناوری حسگر زیستی الکتروشیمیایی به‌عنوان یک نوع فناوری جدید در تشخیص سرطان پس از دهه‌ها توسعه به نتایج مهمی دست پیدا کرده است. به‌طور خاص، ظهور حسگرهای الکتروشیمیایی سلولی ابزارهای مناسبی برای شمارش سلول، طبقه‌بندی سلولی و تشخیص سلول‌های سرطانی فراهم می‌کند [44]. همچنین حسگرهای الکتروشیمیایی در تشخیص سلول‌های سرطانی به حساسیت و ویژگی خوبی دست پیدا کرده و تشخیص آنتی‌ژن بر سطح سلول سرطانی را با موفقیت ممکن ساخته است. در این مطالعه به‌طور خلاصه، یک حسگر زیستی الکتروشیمیایی جدید مبتنی بر

چارچوب‌های آلی فلزی و خوشه‌های نقره طراحی شد که فعالیت الکتروشیمیایی و گزینش‌پذیری قابل قبولی را نشان داد.

مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که پیوند بین دو کاتیون فلزی با توجه به پتانسیل‌های اکسیداسیون و پیکربندی‌های الکترونی متفاوت می‌تواند باعث افزایش رسانایی الکتریکی شده و در نهایت بازده الکتروکاتالیستی را بهبود بخشد [28]. نانوذرات دوفلزی با اثر مشارکتی توانسته‌اند عملکرد چارچوب‌های آلی فلزی را بیش از حد بهینه کنند [29]. برای مثال چارچوب‌های آلی فلزی مس در ارتباط با نانوذرات طلا می‌تواند به‌طور مؤثری تعداد مکان‌های اتصال را افزایش دهند و حسگر الکتروشیمیایی حساس‌تری به دست آورند [30].

ساختار پیشنهادی دیگر ساختار هسته-پوسته برای ساخت کامپوزیت‌ها با کپسوله‌کردن اکسیدهای فلزی یا نانوذرات فلزی به‌عنوان یک هسته و MOFs به‌عنوان یک پوسته است. اکسیدهای فلزی یا نانوذرات فلزی با خواص مغناطیسی، الکتریکی و کاتالیزوری خود به‌عنوان یک کاتالیزور عمل می‌کنند و پوسته‌های MOFs به دلیل وجود منافذ کریستالی منظم، مزایای سازگاری ساختاری،

منابع

- [1] Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2016;17.
- [2] Haghighat S, Omid Z, Ghanbari-Motlagh A. Trend of Breast Cancer Incidence in Iran During A Fifteen-Year Interval According To National Cancer Registry Reports. *Iranian Quarterly Journal of Breast Disease* [Internet]. 2022 [cited 2022 Sep 9];15(2):4–17. Available from: <https://ijbd.ir/article-1-996-en.html>
- [3] Kearney AJ, Murray M. Breast cancer screening recommendations: is mammography the only answer? *J Midwifery Womens Health*. 2009;54(5):393–400.
- [4] Crulhas BP, Basso CR, Castro GR, Pedrosa VA. Review—Recent Advances Based on a Sensor for Cancer Biomarker Detection. *ECS Journal of Solid State Science and Technology*. 2021 Apr 1;10(4):047004.
- [5] Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*. 2003 Feb 13;421(6924):756–60.
- [6] Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*. 2014 Sep 7;2014:1–9.
- [7] Riccio G, Esposito G, Leoncini E, Contu R, Condorelli G, Chiariello M, et al. Cardiotoxic effects, or lack thereof, of anti-ErbB2 immunoagents. *The FASEB Journal* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2022 May 30];23(9):3171–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.09-131383>
- [8] Mass RD, Press MF, Anderson S, Cobleigh MA, Vogel CL, Dybdal N, et al. Evaluation of Clinical Outcomes According to HER2 Detection by Fluorescence In Situ Hybridization in Women with Metastatic Breast Cancer Treated with Trastuzumab. *Clin Breast Cancer*. 2005 Aug 1;6(3):240–6.
- [9] Yan M, Schwaederle M, Arguello D, Millis SZ, Gatalica Z, Kurzrock R. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. *Cancer and Metastasis Reviews* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2022 Sep

و انعطاف پذیری به عنوان یک کاتالیزور عمل می کنند [31].

با توجه به دلایل بیان شده در بالا در ترکیب کامپوزیت طراحی شده در این مطالعه نانو خوشه نقره با چارچوب آلی فلزی مس، یک اثر هم افزایی منحصربه فرد بین دو کاتیون فلزی مختلف برای به دست آوردن پایداری و کارایی بیشتر به وجود می آید. همچنین وجود گرافن در ساختار کامپوزیت طراحی شده نیز در آسانی و سرعت انتقال الکترون نقش به سزایی دارد و مجموع این نکته ها باعث شده است تا به حد تشخیص بسیار پایینی در شناسایی سلول سرطانی دست پیدا کند.

یکی از مهم ترین ویژگی های این حسگر زیستی این است که می تواند غلظت های پایین سلول های SKBR3 را حتی به اندازه 3 سلول تشخیص دهد که برای استفاده در نمونه های واقعی مفید می باشد. در ساختار این نانوکامپوزیت اثر هم افزایی چارچوب های آلی فلزی و کلاسترهای نقره نه تنها می تواند فعالیت الکتروشیمیایی را افزایش دهد، بلکه باعث پایداری بهتر اتصال آنتی بادی به آنتی ژن می شود. بنابراین حسگر طراحی شده گزینش پذیری، ثبات، تکرارپذیری و کاربرد قابل قبولی را نشان می دهد. استفاده از این حسگر باید در آینده با استفاده از نمونه های بالینی ارزیابی شود. همچنین این راهبرد می تواند به عنوان یک الگوی مناسب برای تشخیص الکتروشیمیایی بدون برچسب سلول های سرطانی HER2 مثبت معرفی شود و به راحتی نیز می توان آن را برای تشخیص انواع مختلف سلول های توموری گسترش داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت شورای پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشکده معتمد جهاد دانشگاهی برای ارائه تسهیلات لازم در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می کنند.

- Synthesis, Properties, and Applications. *Advanced Materials* [Internet]. 2010;22(35):3906–24. Available from: <https://doi.org/10.1002/adma.201001068>
- [18] Wu Z, Chen X, Zhu S, Zhou Z, Yao Y, Quan W, et al. Enhanced sensitivity of ammonia sensor using graphene/polyaniline nanocomposite. *Sens Actuators B Chem* [Internet]. 2013;178:485–93. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092540051300021X>
- [19] Feng M, Zhang P, Zhou HC, Sharma VK. Water-stable metal-organic frameworks for aqueous removal of heavy metals and radionuclides: A review. *Chemosphere* [Internet]. 2018;209:783–800. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653518311895>
- [20] Zhou HC “Joe”, Kitagawa S. Metal–Organic Frameworks (MOFs). *Chem Soc Rev* [Internet]. 2014;43(16):5415–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C4CS90059F>
- [21] Guo C, Su F, Song Y, Hu B, Wang M, He L, et al. Aptamer-Templated Silver Nanoclusters Embedded in Zirconium Metal–Organic Framework for Bifunctional Electrochemical and SPR Aptasensors toward Carcinoembryonic Antigen. *ACS Appl Mater Interfaces* [Internet]. 2017 Nov 29 [cited 2022 Sep 19];9(47):41188–99. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsami.7b14952>
- [22] Chen Y, Yang Z, Hu H, Zhou X, You F, Yao C, et al. Advanced Metal–Organic Frameworks-Based Catalysts in Electrochemical Sensors [Internet]. Vol. 10, *Frontiers in Chemistry*. 2022. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2022.881172>
- [23] Peng Z, Jiang Z, Huang X, Li Y. A novel electrochemical sensor of tryptophan based on silver nanoparticles/metal-organic framework composite modified glassy carbon electrode. *RSC Adv*. 2016 Feb 2;6(17):13742–8.
- [24] Fan C, Lv X, Liu F, Feng L, Liu M, Cai Y, et al. Silver Nanoclusters Encapsulated into Metal–Organic Frameworks with Enhanced Fluorescence and Specific Ion Accumulation toward the Microdot Array-Based Fluorimetric Analysis of Copper in Blood. *ACS Sens* [Internet]. 2018 Feb 23 [cited 2022 Oct 12];3(2):441–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29363946/>
- [25] Meng W, Wen Y, Dai L, He Z, Wang L. A novel electrochemical sensor for glucose detection [9];34(1):157–64. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9552-6>
- [10] Ilkhani H, Ravalli A, Marrazza G. Design of an Affibody-Based Recognition Strategy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Detection by Electrochemical Biosensors. *Chemosensors* 2016, Vol 4, Page 23 [Internet]. 2016 Dec 2 [cited 2022 May 31];4(4):23. Available from: <https://www.mdpi.com/2227-9040/4/4/23/htm>
- [11] Wang SS, Zhao XP, Liu FF, Younis MR, Xia XH, Wang C. Direct Plasmon-Enhanced Electrochemistry for Enabling Ultrasensitive and Label-Free Detection of Circulating Tumor Cells in Blood. *Anal Chem*. 2019 Apr 2;91(7):4413–20.
- [12] Xu J, Wang X, Yan C, Chen W. A Polyamidoamine Dendrimer-Based Electrochemical Immunosensor for Label-Free Determination of Epithelial Cell Adhesion Molecule- Expressing Cancer Cells. *Sensors (Basel)* [Internet]. 2019 Apr 2 [cited 2023 Sep 17];19(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31010258/>
- [13] Arya SK, Wang KY, Wong CC, Rahman ARA. Anti-EpCAM modified LC-SPDP monolayer on gold microelectrode based electrochemical biosensor for MCF-7 cells detection. *Biosens Bioelectron*. 2013 Mar 15;41(1):446–51.
- [14] Guo Q, Li X, Shen C, Zhang S, Qi H, Li T, et al. Electrochemical immunoassay for the protein biomarker mucin 1 and for MCF-7 cancer cells based on signal enhancement by silver nanoclusters. *Microchimica Acta*. 2015 Feb 3;182(7–8):1483–9.
- [15] Yazdanparast S, Benvidi A, Banaei M, Nikukar H, Tezerjani MD, Azimzadeh M. Dual-aptamer based electrochemical sandwich biosensor for MCF-7 human breast cancer cells using silver nanoparticle labels and a poly(glutamic acid)/MWNT nanocomposite. *Mikrochim Acta* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2022 Nov 30];185(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30094655/>
- [16] Sastry SSM, Panjekar S, Raman RS. Graphene and Graphene Oxide as a Support for Biomolecules in the Development of Biosensors. *Nanotechnol Sci Appl* [Internet]. 2021 Nov 16 [cited 2022 Sep 11];14:197–220. Available from: <https://www.dovepress.com/graphene-and-graphene-oxide-as-a-support-for-biomolecules-in-the-devel-peer-reviewed-fulltext-article-NSA>
- [17] Zhu Y, Murali S, Cai W, Li X, Suk JW, Potts JR, et al. Graphene and Graphene Oxide:

- Oct 7 [cited 2023 Jun 13];9. Available from: /pmc/articles/PMC8530376/
- [35] Sujiono EH, Zurnansyah, Zabrian D, Dahlan MY, Amin BD, Samnur, et al. Graphene oxide based coconut shell waste: synthesis by modified Hummers method and characterization. *Heliyon*. 2020;6(8).
- [36] Aziz M, Halim FSA, Jaafar J. Preparation and characterization of graphene membrane electrode assembly. *Jurnal Teknologi (Sciences and Engineering)*. 2014;69(9).
- [37] Rahimi R, Shariatinia S, Zargari S, Yaghoubi Berijani M, Ghaffarinejad A, Shojaie ZS. Synthesis, characterization, and photocurrent generation of a new nanocomposite based Cu-TCP MOF and ZnO nanorod. *RSC Adv*. 2015;5(58).
- [38] Dresselhaus MS. Fifty years in studying carbon-based materials. *Phys Scr* [Internet]. 2012 Jan 31 [cited 2022 Sep 4];2012(T146):014002. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-8949/2012/T146/014002>
- [39] Rahimi R, Moghaddas MM, Zargari S. Investigation of the anchoring silane coupling reagent effect in porphyrin sensitized mesoporous V-TiO₂ on the photodegradation efficiency of methyl orange under visible light irradiation. *J Solgel Sci Technol*. 2013;65(3).
- [40] Liu S, Sun L, Xu F, Zhang J, Jiao C, Li F, et al. Nanosized Cu-MOFs induced by graphene oxide and enhanced gas storage capacity. *Energy Environ Sci*. 2013 Mar 20;6(3):818–23.
- [41] Duan F, Hu M, Guo C, Song Y, Wang M, He L, et al. Chromium-based metal-organic framework embedded with cobalt phthalocyanine for the sensitively impedimetric cytosensing of colorectal cancer (CT26) cells and cell imaging. *Chemical Engineering Journal*. 2020;398:125452.
- [42] Liu M, Xu Y, Huang C, Jia T, Zhang X, Yang DP, et al. Hyaluronic acid-grafted three-dimensional MWCNT array as biosensing interface for chronocoulometric detection and fluorometric imaging of CD44-overexpressing cancer cells. *Mikrochim Acta* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2022 Nov 30];185(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29946991/>
- [43] Zhu Y, Chandra P, Shim YB. Ultrasensitive and Selective Electrochemical Diagnosis of Breast Cancer Based on a Hydrazine–Au Nanoparticle–Aptamer Bioconjugate. *Anal* based on Ag@ZIF-67 nanocomposite. *Sens Actuators B Chem*. 2018 May 1;260:852–60.
- [26] Li Y, Hu M, Huang X, Wang M, He L, Song Y, et al. Multicomponent zirconium-based metal-organic frameworks for impedimetric aptasensing of living cancer cells. *Sens Actuators B Chem*. 2020;306.
- [27] Ou D, Sun D, Liang Z, Chen B, Lin X, Chen Z. A novel cytosensor for capture, detection and release of breast cancer cells based on metal organic framework PCN-224 and DNA tetrahedron linked dual-aptamer. *Sens Actuators B Chem*. 2019;285.
- [28] Yang Y, Zeng Z, Zhang C, Huang D, Zeng G, Xiao R, et al. Construction of iodine vacancy-rich BiOI/Ag@AgI Z-scheme heterojunction photocatalysts for visible-light-driven tetracycline degradation: Transformation pathways and mechanism insight. *Chemical Engineering Journal*. 2018;349.
- [29] Wang Z, Jin H, Meng T, Liao K, Meng W, Yang J, et al. Fe, Cu-Coordinated ZIF-Derived Carbon Framework for Efficient Oxygen Reduction Reaction and Zinc–Air Batteries. *Adv Funct Mater*. 2018;28(39).
- [30] Hatamluyi B, Rezayi M, Beheshti HR, Boroushaki MT. Ultra-sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor for patulin detection based on a novel assembling strategy using Au@Cu-MOF/N-GQDs. *Sens Actuators B Chem*. 2020;318.
- [31] Kempahanumakkagari S, Vellingiri K, Deep A, Kwon EE, Bolan N, Kim KH. Metal-organic framework composites as electrocatalysts for electrochemical sensing applications. Vol. 357, *Coordination Chemistry Reviews*. 2018.
- [32] Jiang D, Xu P, Wang H, Zeng G, Huang D, Chen M, et al. Strategies to improve metal organic frameworks photocatalyst's performance for degradation of organic pollutants. Vol. 376, *Coordination Chemistry Reviews*. 2018.
- [33] Liu XW, Sun TJ, Hu JL, Wang SD. Composites of metal-organic frameworks and carbon-based materials: Preparations, functionalities and applications. Vol. 4, *Journal of Materials Chemistry A*. Royal Society of Chemistry; 2016. p. 3584–616.
- [34] Guo X, Lin C, Zhang M, Duan X, Dong X, Sun D, et al. 2D/3D Copper-Based Metal-Organic Frameworks for Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide. *Front Chem* [Internet]. 2021

[44] Sepunaru L, Sokolov S V., Holter J, Young NP, Compton RG. Electrochemical Red Blood Cell Counting: One at a Time. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2016;55(33).

Chem [Internet]. 2013 Jan 15;85(2):1058–64. Available from: <https://doi.org/10.1021/ac302923k>

Design and fabrication of nanobioelectrochemical sensor based on metal-organic framework/graphene for breast cancer diagnosis

Ali-Akbar Zare^{1,2}, Fatemeh Molaabasi³, Hossein Naderi-Manesh⁴

1- Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Recombinant Proteins Department, Breast Cancer Research Center, Motamed Cancer Institute, ACECR, Tehran, Iran

3- Biomaterials and Tissue Engineering Research Group, Department of Interdisciplinary Technologies, Breast Cancer Research Center, Motamed Cancer Institute, ACECR, Tehran, Iran

4- Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*CORRESPONDING AUTHOR: Naderman@modares.ac.ir

Received:2023/7/26

Accepted: 2023/10/21

Abstract

Rapid and sensitive diagnosis of breast cancer, especially in the early stages of its formation, is very important. One of the methods of detecting cancer cells is the use of electrochemical sensors. Here, a new nanocomposite including an organic metal framework and silver nanoclusters are used. The resulting nanocomposite can be used as a scaffold to attach antibodies for the detection of HER2-positive cells. In the final nanocomposite structure, silver nanoclusters are placed in the internal cavities of the metal-organic framework, leading to strong electron transport, good biocompatibility, and high electrochemical activity. Our results showed that the designed electrochemical sensor has a high sensitivity in identifying HER2 positive cells, with a detection limit of 3 cells and a linear range of 100 to 5000 cells/ml. Also, the investigations showed that the introduced sensor has stability, good selectivity and acceptable application. The proposed strategy for the development of sensors based on metal-organic frameworks provides a promising approach for early detection of cancer markers and living cancer cells.

Keywords: Breast cancer, Electrochemical sensor, Metal-organic framework, Ag nanocluster