طراحی نانوبیوسنسور فلورسانسی برای تشخیص زودهنگام سرطان کلورکتال با استفاده از کاوشگر *APC* در حضور MWCNT

سمیه حیدریان[۱]، لعیا تکبیری اسگوئی[۲*]، شهره زارع کاریزی[۳]، جعفرامانی[٤]، صدیقه اربابیان[۱]

۱.گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال. دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲.گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال. دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳.گروه زیست شناسی واحد ورامین پیشوا. دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، ورامین، ایران.

٤. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهران، ایران.

L_takbiri@iau-tnb.ac.ir

تهران، ایران

دریافت: ۱٤۰۱/۱۰/۰۳ پذیرش: ۱٤۰۳/۰۲/۱۰

چکیده

ژن *APC* در ctDNA به‌عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه برای تشخیص سرطان پیشنهاد شده است. یک نانوحسگر زیستی مبتنی بر نانولوله کربنی چند دیواره (MWCNT) و پروب DNA دارای ماده فلوئوروفور برای تشخیص ژن *APC* در ctDNA، که برای شناسایی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال (CRC)، ساخته شده است.

این روش مبتنی بر جذب و تثبیت DNA تک رشته‌ای (ssDNA) نشاندار شده با FAM بر روی MWCNT است که منجر به خاموش شدن نشر فلورسانسی FAM می‌شود. با افزودن DNA مکمل آن (cDNA)، که منجر به آزاد سازی پروب DNA تک ر شته‌ای (ssDNA) از سطح MWCNT شد و یک DNA دو رشته‌ای (dsDNA) تشکیل شد که منجر به بازگشت نشرفلورسانسی FAM شد. درحالی‌که در مورد DNA غیرمکمل، dsDNA مربوطه تشکیل نشد و بنابراین بازگشت نشرفلورسانسی FAM مشاهده نشد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوحسگر زیستی مبتنی بر نانولوله‌های کربنی، علاوه بر روش‌های موجود، می‌تواند به‌عنوان یک روش با حساسیت بالا برای تشخیص زودهنگام CRC مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: بیوسنسور، نانوذرات کربنی، *APC*

۱- مقدمه

سرطان کلورکتال (Colorectal cancer–CRC) از مجموعه ی سرطان‌های روده بزرگ (کلون) و راست روده (رکتوم) تشکیل شده است[۲،۱]. به‌دلیل اینکه در اثر یک نوع پولیپ به نام آدنوما به وجود می‌آید، آدنوماتوز کارسینوما نیز نامیده می شود[۲]. این سرطان بعد از سرطان‌های ریه، و سرطان پرو ستات در مردان و سرطان پ ستان در زنان، به‌عنوان سومین سرطان رایج در دنیا شناخته می شود. این سرطان درکشورهای غربی به خصوص آمریکا، کانادا، اروپا و همچنین استرالیا و نیوزیلند بیشتر دیده شده است و میزان شیوع آن در میان مردان و زنان به یک نسبت است. اما در برخی از نقاط دنیا سرطان رکتوم در مردان بیشتر گزارش شده است[۳].

با توجه به تکامل و انتخاب کلونال، درمان CRC نیاز به رویکردهای درمانی و مانیتورینگ دقیق بر پی شرفت تومور و اثر درمانی دارد. بیوپسی مایع استفاده از سلول‌های توموری در گردش (CTCs)، DNA توموری در گردش (ctDNA) و اگزوزوم ها جایگزین مانیتوری نگ تکاملی تومور و مقای سه پا سخ درمانی شده‌اند[٤]. سرطان روده بزرگ (CRC) سومین نوع شایع سرطان ودومین علت شایع مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان است[۳]. سرطان روده بزرگ (CRC) یک بیماری ناهمگن است که از وضعیت خوش‌خیم تا ضایعات داخل اپیتلیال معروف به آدنوما تا کار سینومای بدخیم ایجاد می شود. تغییرات در م سیر سیگنالینگ Wnt، ژن‌های م سیر TGFβ، MAPK و انتشار کلونال و سلول‌های تغییر یافته مسئول این دگرگونی هستند. تشخیص آدنوما یا مرحله اولیه سرطان در بیماران بدون علامت و نشانگرهای پیش‌آگهی و پیش‌بینی برای بهبود مدیریت بالینی CRC مهم است. CRC سومین سرطان در مردان (۱۰ در صد از موارد ابتلا به سرطان در مردان) و دومین سرطان در زنان (۹،۲ درصد از ابتلا به سرطان در زنان) است. این چهارمین علت شایع مرگ‌ومیر نا شی از سرطان در مردان ا ست و سومین علت شایع در زنان ا ست. CRC به آرامی ایجاد می شود (به ا ستثنای نوع ارثی) که در طی چندین سال از طریق ضایعات متمایز خوش‌خیم منفرد، معروف به Aberrant crypt foci (ACF) به آدنوما و کارسینومای بدخیم تبدیل می‌شود، که در صورت باقی ماندن منجر به سرطان تهاجمی می شود. این پیشرفت همزمان با تغییرات مولکولی کلیدی در ژن‌های مهارکننده تومور، ژن های انکوژن و سایر gatekeeper است. برخی از تغییرات اولیه شامل جهش در*APC* و KRAS، در حالی که جهش های اضافی در PIK3CA، TP53 و سیگنالینگ Wnt و سایر ژن‌های مسیر TGF-β باعث پی‌شرفت کار سینومای تهاجمی می شوند. مارکرهای پیش‌آگهی پیش‌بینی کن نده قوی با ید بتوان ند ناهمگنی مولکولی را به‌طور ناخوا سته در بیماران ت شخیص دهند و همچنین پاسخ درمانی را پیش‌بینی کنند، که مقاومت در برابر روش‌های درمانی خاص و حساسیت به CRC است. چنین تحولاتی منجر به درمان هدفمند سرطان می‌شود. تحقیقات گسترده‌ای در دو دهه گذشته برای شناسایی مارکر های پیش‌آگهی و پیش‌بینی شده ان جام شده است[۲،۱].

سرطان کلورک تال به‌طور ع مده در اثر جهش در ژن *APC* (Adenomatous polyposis) در رده سلولی اپی‌تلیال سطح آستری روده بزرگ و راست روده ایجاد می‌شود که در پی آن انبا شته شدن β catenin در سیتوپلا سم و انتقال β catenin به ه سته دیده می شود. β catenin در ه سته به TCF/LEF متصل گشته و کمپلکس TCF/LEF/ β catenin را ایجاد می‌کند. این کمپلکس سبب فعال شدن انکوژن هایی م ثل c-myc، cyclinD و در ن ها یت تکثیر غیرطبیعی سلول‌های آ ستری روده می شود. دومین ضربه زمانی اتفاق می‌افتد که در سلول‌های غیر طبیعی آدنوما، جهش در ژن هایی م ثل KRAS، MACC1، DAND5، SMAD4 سبب تبدیل آن‌ها به پولیپ‌های سرطانی و در

نهایت متاستاز می‌شود[۳،۸،۹]. همچنین جهش و از کار افتادن ژن‌های مربوط به سیستم ترمیم مثل MSH، MLH، MUTYH سبب ایجاد سرطان کلورکتال می‌شود. از طرف دیگر اپی‌ژنتیک (متیلاسیون ژن‌ها)، microRNA ها و نیز سابقه خانوادگی در ایجاد این سرطان نقش دارد[۲].

ژن *APC* یک مهارکننده تومور محسوب می‌شود، که در ناحیه کروموزوم ۵q۲۱ انسان قرار دارد[۲،۶]. ناحیه کدکننده به ۱۵ اگزون تقسیم شده است. mRNA آن ۱۰۷۱۹ جفت‌باز و ۸۵۳۵ نوکلئوتید طول دارد و پروتئین بزرگی به طول ۲۸۴۳ آمینواسید و وزن ملکولی ۳۱۰ کیلودالتون را کد می‌کند [۵،۶،۷]. پروتئینی که توسط *APC* کد می‌شود، علاوه برمسیر انتقال پیام wnt در تنظیم چرخه سلولی، پایداری سایتواسکلتون‌ها (cytoskeleton)، چسبندگی بین‌سلولی (Intracellular adhesion) و آپوپتوز نیز نقش دارد. به‌طور معمول *APC* در تخریب و مهار یک فاکتور رونویسی بنام β catenin ایفای نقش می‌کند[۳،۹،۸]. ۹۸ درصد از جهش‌هایی که در*APC* رخ می‌دهند از نوع تغییر قالب یا جهش بی‌معنی هستند[۲،۱۰]. در مطالعات صورت گرفته روی ژن‌های *APC*، پلی‌مورفیسم‌های زیادی دیده شده‌اند که می‌توان از آن‌ها جهت ردیابی سرطان کلورکتال استفاده کرد[۱۱]. برای مثال در مطالعه‌ای ارتباط سه پلی‌مورفیسم C18122V، E1317Q، E1307K با CRC گزارش شده است[۱۲،۱۳]. هم‌چنین در پژوهشی که روی خانواده‌ای مبتلا به پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی (FAP)در چین انجام شد، شیوع پنج جهش بررسی شد و نتایج نشان داد که، جهش C.847C>T/P.Arg283Ter (3.15%) در میان جمعیت شیوع بیشتری دارد[۱۴،۱۵،۱۶]. به‌طور کلی، مطالعات نشان داد که در خانواده‌های چینی و بیماران سراسر دنیا (لهستان ۱۰ درصد، استرالیا ۲/۴–۸/۴ درصد، اشکانزی ۱/۵–۷ درصد، ایتالیا ۱۶ درصد ایران و کره جنوبی) دو جهش C.3183-3187delACAAA و C.3927-3931deAAAGA به میزان جهش در *APC* در بیش از ۸۰ درصد موارد سبب ایجاد CRC می‌شود[۱۴،۱۵،۱۶]. بیوسنسورها گروهی از حسگرها هستند که به‌طور اختصاصی جهت ردیابی آنالیت‌های زیستی، جهت تشخیص بیماری‌ها در پزشکی کاربرد دارند. در نتیجه اتصال آنالیت به بیورسپتور پیام‌هایی از مبدل به پردازنده جهت تحلیل فرستاده می‌شود[۱۸].

در مورد مشخصه‌های اساسی یک بیوسنسور سودمند می‌توان گفت که پاسخگویی آن باید به‌گونه‌ای قابل پیش بینی باشد که برای تغییرات مختلف در محیط بیولوژیک بتوان به آن اعتماد کرد و سنسور باید حساس و ویژه باشد. دسته جدیدی از بیوسنسورها که نانوبیوسنسور نام دارد و دارای نانوذرات و نانوتیوب‌ها می باشند توسعه یافته است که مزایای مواد نانو را با هم ترکیب نموده است. نانوتیوب های کربنی در ابتدا توسط سومیو آیجوما در سال ۱۹۹۱ توصیف شد و در آن زمان دریافتند که خواص مفید و منحصر به فرد زیادی دارند. برای تشخیص بیماری‌های عفونی، اختلالات متابولیک، سرطان های بدخیم و آشکارسازی آلودگی محیطی شدیداً به سیستم‌های آشکارسازی سریع، کم هزینه، چند بار مصرف، قابل اطمینان و حساس نیاز است. برخی از روش‌های متداول، تهاجمی، کند، پرهزینه و دشوار هستند و به ابزارهای کاملاً خاص نیاز دارند. معرفی بیوسنسورهای ساخته شده با مواد نانو همچون ترانسدیوسرهای سیگنال به حذف نقاط ضعف آشکار سازهای متداول کمک کرده است. ویژگی هایی همچون استحکام بالای مکانیکی، رسانایی الکتریکی بهتر و توانایی کار به‌عنوان تراندیسور سیگنال کارآمد، نانوتیوب‌های کربنی (CNTها) را در میان مواد نانو به ماده ای ایده‌آل برای کاربردهای بیوسنسور تبدیل کرده است. علاوه بر این CNTها به‌دلیل برخورداری از سطوح گسترده ای که برای تثبیت گیرنده به سادگی قابلیت عاملدار شدن دارند، در ساخت بیوسنسورها اهمیت می‌یابند. حوزه در حال گسترش CNTها، پلی را میان علوم فیزیکی و زیستی

ایجاد کرده اســت، زیرا برای توســعه ابزارها و پلتفرم‌های جدید برای درک سیســتم‌های بیولوژیک در تشــخیص و درمان بیماری از روش‌های شیمیایی ا ستفاده می شود. در این پژوهش از MWCNT استفاده شده است که خود یک ماده‌ی فلورسـنت اسـت، اما جالب توجه اسـت که باعث کاهش خا صیت فلور سانس می شود. این خواص به ظاهر متناقض جلوه‌ای از خواص شــیمیایی ناهمگن، اتمی و الکترونیکی MWCNT اســت. بخوبی مشــخص شــده که نانولو له کربنی چ ند دیواره باعث کاهش خاصـــیت فلورسـانسـی مولکول‌های رنگی جذب شـده روی سـطح خود می‌شود [۱۷].

حسـگرهای زیسـتی تشـخیص نوری، متنوع ترین کلاس حســگرهای زیســتی هســتند، زیرا می‌توانند برای انواع مختلف طیف‌ســنجی ما نند جذبی، فلورســـانســـی، ف سفر ساز سی، رامان، شک ست و طیف سنجی پراکندگی اسـتفاده می‌شـوند. با این‌حال، دسـتگاه‌هایی که بر اسـاس طیف سـنجی فلورسـانسـی، تشـدید پلاسـمون سـطحی، تداخل‌سـنجی و طیف‌سـنجی هدایت شـونده هسـتند در ســـاختارهای نوری رایج‌ترین هســـتند.در اکثر مطالعات موجود، از DNA توموری در گردش، برای تشـــخیص جهش ا ستفاده شده ا ست. تجزیه و تحلیل cfDNA اغلب در زمینه تشـــخیص جهش های غیرتهاجمی که منجر به مکانیسم‌های مقاومتی و نظارت درمانی در بیماران سرطانی می‌شود، مورد بحث قرار می‌گیرد. در واقع، با پیشرفت‌های چشمگیری که در این زمینه حا صل شده ا ست حساسیت و تعداد زیادی از ژن‌ها مورد شناسایی واقع شدند[۱۸].

در این مطالعه یک نانوحســـگر زیســـتی مبتنی بر نانولوله کربنی چنـد دیواره (MWCNT) و پروب DNA دارای فلوئوروفور FAM، برای ت شخیص و شنا سایی ژن *APC* در ctDNA، در بی ماران مبتلا به ســـر طان کولورک تال (CRC)، ساخته شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ نمونه‌برداری و استخراج ctDNA در پلاسما

نمونه خون (۲ میلی‌لیتر از هر بیمار)، با رضـــایت آگاهانه، در لوله‌های حاوی EDTA و در مراحل مختلف ســـرطان جمع‌آوری شـــد. نمو نه های خون به مدت ۱۰ دقیقه در دورrpm ۲۰۰۰ ســانتریفیوژ شــدند و بار دیگر به مدت ۳ دقیقه در دور rpm ۱۱۰۰۰ ســانتریفیوژ شــدند تا پلاســما ا ستخراج شود. پلا سما ظرف ٦ ساعت پس از جمع‌آوری خون جداســازی شــد و از پلاســمای جدا شــده جهت ا ستخراج ctDNA ا ستفاده شد. برای ا ستخراج DNA آزاد توموری، به‌دلیل ح سا سیت کار و پایین بودن میزان DNA در سرم وپلاسما، از روش column based ا ستفاده شد و در این پژوهش نیز از کیت NucleoSpin ® plasma XS برای استخراج ctDNA استفاده شد. بررسی کمی DNA با اســـتفـاده از دســـتگـاه اســـپکتروفتومتر ,UV-1800) (SHIMADZU درطول موج ۲٦۰ نانومتر محاســبه شــد و ســپس محاســبات خلوص DNA بر اســاس نســبت‌های A260/A280 محا سبه شد. برر سی کیفی DNA با ا ستفاده از ژل الکتروفورز محاسبه شد. در این پژوهش، یک جفت پرایمر مربوط به ژن *APC* ج هت تقو یت DNA ژنومی طراحی و به کار برده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، PCR معمولی جهت تقویت ناحیه و تکثیر قطعه خاصـــی از کروموزوم 5q22 جهت بهینه‌سازی زیست حسگر DNA و به‌د ست آوردن ح سا سیت PCR و مقای سه عملکرد آن با تکنیک نانوبیوسنسور است. شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR برای پرایمر *APC* در جدول ۱ آمده است.

۲-۲ معرف‌ها

DNA تک رشـــته‌ای به‌عنوان کاوشـــگر، توالی هدف یا تارگت مکمل ســنتتیک و توالی هدف غیرمکمل ســنتتیک، برای توالی‌های خاص ژن *APC* طراحی شـــد. که توالی‌ها توسط شرکت bioneer کره سنتز شد. کاوشگرهای مربوط به ژن *APC* بر ا ساس توالی م شخص در ان سان با ا ستفاده از نرم‌افزار oligo۷ طراحی شدند.

جدول ۱ شرایط دمایی و زمانی واکنشPCR برای پرایمر APC

Step number	Step name	Temperature (°C)	Time
1	Initial denaturation	95	5 min
2	Denaturation	94	45 s
3	Annealing	58	45 s
4	Extension	72	60 s
5	Go to step 2	36 cycle	
6	Final extension	72	10 min

جدول ۲ توالی‌های پرایمر و پروب طراحی شده برای ژن *APC*

نام ژن **(Gene)**	موقعیت کروموزومی **(Location)**	طول قطعه **(bp)**	نام توالی	توالی پرایمر و پروب **(Sequences)**
APC p.E1309fs, c.3927delAAAGA	5q22.2		APC-F	5′- GATCTTCAGCTGACCTAGTTCCAA-3′
			APC-R	5′- CAGATTCTGCTAATACCCTGCAA-3′
			Probe1	5′-FAM-CCCTGCAATAGCAGAAAAGA-3′
			Probe2	5′- AAAGATTGGAACTAGGTC-NH2-3′
			T	GACCTAGTTCCAATCTTTTCTTTTCTGCTATTGCAGGG
			dt	GACCTAGTTCCAATCTTTTAGGCTCTGCTATTGCAGGG

انتهای '۵ پروب ۱ مربوط به ژن *APC* با FAM نشـــاندار شد و انتهای '۳ پروب ۲ مربوط به ژن *APC* با عامل آمین (NH2) عاملدار شد. محلول استوک پروب ssDNA با حل کردن الیگونوکلئوتیدها در آب اســتریل با pH خنثی (pH 7,0) تهیه شـــد و در دمای ۲۰- درجه نگهداری شـــد. نانومواد شـــامل یک نانولوله کربنی چند دیواره از ســیگما آلدریچ، ایالات متحده آمریکا تامین شـــد. توالی پرایمر و کاوشگرهای ژن *APC* در جدول ۲ آمده است.

۲-۳ بهینه‌ســـازی تثبیت پروب اختصـــاصـــی ژن *APC* نشاندار شده با FAM روی سطح MWCNT

برای بهینه‌سازی تثبیت کاوشگر اختصاصی ژن *APC* روی MWCNT، تمام شـــرایط‌های واکنش مانند زمان تثبیت و غلظت MWCNT بهینه شدند. واکنش با مخلوط کردن ۱۰ میکرولیتر پروب ۱ بـا غلظـت (۱۰ پیکو مولار)، بـا ۱۵ میکرولیتر MWCNT با غلظت (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در حجم نهـایی ۲ میلی‌لیتر از بـافر Tris-HCL ۲۰ میلی‌مولار، که شـــامل محلول‌های (100mM NaCl,5mM Kcl,5 mM Mgcl2) با pH=7.4 اســـت، تهیه شـــد و نشرفلورسانس در زمان‌های مختلف بررسی شد. همچنین، برای تعیین غلظت بهینه MWCNT برای خاموش کردن

نشرفلور سانسی پروب، غلظت‌های مختلف MWCNT با ۱۰ میکرولیتر پروب ۱ (۱۰ پیکو مولار) ژن APC مخلوط شد و در زمان بهینه تثبیت، نشر فلورسانسی خاموش شد. پس از آماده‌سازی کونژوگه MWCNT-Probe–FAM، توسط میکروسکوپ الکترونی TEM (TEM, Zeiss EM 900 electron microscope)، میکروسکوپ الکترونی SEM (SEM, Zeiss-DSM 960A microscope) و پراش انرژی پرتو ایکس EDX (EDX, Zeiss-DSM 960A microscope) بررسی شد و نشر فلورسانس توسط دستگاه اسپکتروفلوریمتری اندازه‌گیری شد.

۲-٤ تشخیص توالی‌های اختصاصی *APC* توسط نانوحسگر مبتنی بر MWCNT-Probe– FAM

برای بهینه‌سازی زمان واکنش هیبریداسیون نانوحسگر مبتنی بر پروب MWCNT-Probe –FAM با DNA هدف و تارگت، با مقدار مساوی پروب بهینه شده، شدت نشرفلورسانسی در زمان‌های مختلف بررسی شد. سپس برای بهینه سازی غلظت واکنش هیبریداسیون، غلظت‌های مختلف DNA مکمل، باکونژوگه پروب Probe– FAM-MWCNT مخلوط شد و شدت نشرفلورسانسی در زمان بهینه هیبریداسیون اندازه‌گیری شد. حساسیت نانوحسگر زیستی توسط غلظت‌های مختلف DNA مکمل (از ۱۰ نانو گرم تا ۰٫۰۱) تعیین شد. DNA ژنومی نمونه‌های سالم به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

۲-۵ تثبیت کووالانسی پروب ۲ ژن APC، پروب آمین دار (NH2)، در سطح نانوذرات کربنی MWCNT کربوکسیل‌دار

در یک ظرف شیشه‌ای نانولوله کربنی با غلظت ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر، محلول تازه تهیه شده‌ی EDC.HCl با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، سدیم کلرید ۲۵ میلی‌مولار و DNA اصلاح شده با آمین به غلظت ۲ میکرو ولار، آماده شد. مخلوط با استفاده از بافر PBS به غلظت ۲۵ میلی‌مولار و (pH=6) به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳ ساعت در دمای محیط هم‌زده شد. پس از این مدت MWCNT-ssDNA کانژوگه شده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱٤/۵ rpm سانتریفیوژ شد. به منظور خارج شدن DNA واکنش نکرده و EDC.HCl رسوبات بدست آمده دو مرتبه با آب دیونیزه (۲×۳۰۰) شسته شدند. در نهایت رسوبات حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه دیسپرس شده و در دمای ٤ °C نگهداری شدند.

۲-٦ روش شناسایی جهش

برای شناسایی جهش MWCNT+P2 DNA ۱۰ میکرو لیتر کانژوگه شده، ۱۰ میکرولیتر P1 DNA با غلظت ۱۰ پیکو مولار، ۲۰ میکرولیتر TDNA با غلظت ۱۰ پیکو مولار، مقدار ۱۰ میکرو لیتر بافر Ligation، ۱۰ میکرولیتر محلول PEG، ۲ میکرولیتر آنزیم DNA لیگاز با یکدیگر مخلوط شده و سپس حجم مخلوط با استفاده از آب دیونیزه به، ۱۰۰ میکرولیتر رسید. مخلوط حاصل ورتکس شده و به مدت یک شب در دمای ۲۲ °C ماند. پس از این زمان مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ °C جهت دناتوراسیون قرار داده شد و سپس بلافاصله به حمام آب و یخ منتقل شده و ۵ دقیقه در دمای صفر درجه ماند. مخلوط حاصل بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱٤/۵ rpm سانتریفیوژ شد.

مراحل بالا برای dt DNA به جای T DNA تکرار شد. در نهایت رسوبات حاصل دو مرتبه (100 × 2) با آب دیونیزه شسته شده و در انتها در ۱۰۰ ماکرو لیتر آب دیونیزه دیسپرس شد و در دمای ۲۲ °C نگهداری شد. برای شناسایی جهش، روی ۱۰۰ ماکرو لیتر از مخلوط حاصل از Ligation با T DNA، مقدار ٤۰ میکرولیتر T DNA با غلظت ۱۰ پیکو مولار ریخته شد. مخلوط حاصل با استفاده از MWCNT به حجم، ۲۰۰ ماکرولیتر رسید و سپس ورتکس شده و به مدت ۳۰ دقیقه دمای محیط مانده و از آن طیف جذبی گرفته شد. این مراحل برای dt DNA نیز تکرار شد.

۲-۷ آزمایش حسگر زیستی برای نمونه‌های اصلی

پس از ساخت حسگر DNA و بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر پاسخ حسگر، این بار آزمایش با ctDNA استخراج شده از پلاسمای افراد مبتلا به سرطان کلورکتال انجام شد. برای این منظور ctDNA های ا ستخراج شده و نمونه‌های PCR را با ۱۰۰ ماکرولیتر بافر Tris-Hcl ۰/۰۲ میلی مولار رقیق شده و به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد، سپس بلافاصله در داخل ظرف پر از یخ قرار داده شد. در این کار تحقیقاتی زمان هیبریداسیون و غلظت DNA مکمل سنتتیک بهینه شد تا بهترین بازده برای نمونه‌های اصلی حاصل شود. حسگر زیستی با توالی اختصاصی ژن *APC*، هیبریداسیون و شدت نشر فلورسانسی قابل‌توجهی را نشان داد.

۲-۸ آنالیز آماری

تمام آزمایش‌های اندازه‌گیری فلورسانس در سه تکرار انجام شد. نتایج ارائه شده در هر شکل به صورت مقادیر میانگین ± انحراف معیار بیان شد. تمامی تجزیه‌وتحلیل های آماری با استفاده از برنامه آماری Graphpad prism 9.5.1 انجام شد. تفاوت‌های آماری بین مقادیر میانگین انت شار فلور سانس بیو سن سور در واکنش با تارگت و ژن *APC* در نمونه‌های اصلی با استفاده از آزمون one-way ANOVA تعیین شد و معنی‌داری آماری در ۰,۰۵ تعیین شد.

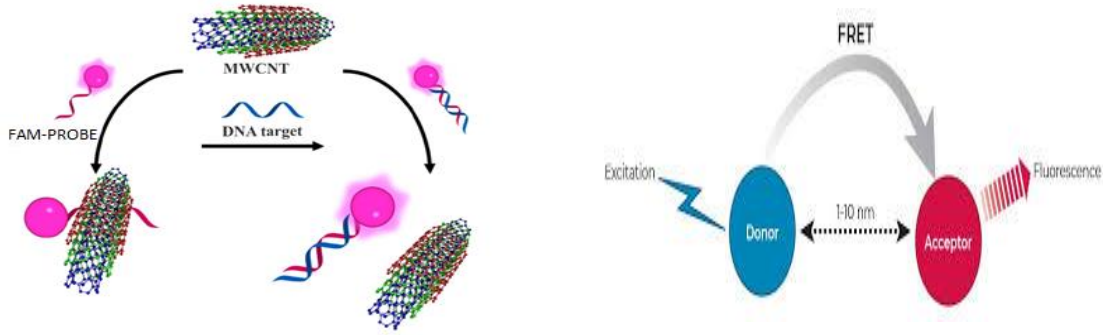
۳- نتایج

۳-۱ استراتژی تشخیص بر اساس FRET

کونژو گه MWCNT-ssDNA در طرح شکل ۱ برای تشخیص توالی اختصاصی *APC* نشان داده شده است. کاوشگر ssDNA مدیفای شده با FAM (6-carboxyfluorescein) برای تشخیص توالی اختصاصی *APC*، در پلتفرم حسگر زیستی انتخاب شد. در غیاب cDNA، پیو ند های MWCNT با پروب ssDNA، نشر فلورسانسی فلوروفور FAM را خاموش می‌کند. در مقابل، در ح ضورcDNA، در طی هیبریدا سیون، پروب از سطح MWCNTآزاد شد، یک کمپلکس DNA دو رشته‌ای، بین پروب ssDNA و توالی تارگت تشکیل شد و بازگشت نشر فلورسانسی دیده شد.

۳-۲ تائید و بررسی نانولوله‌های کربنی و کونژوگه ssDNA –MWCNT

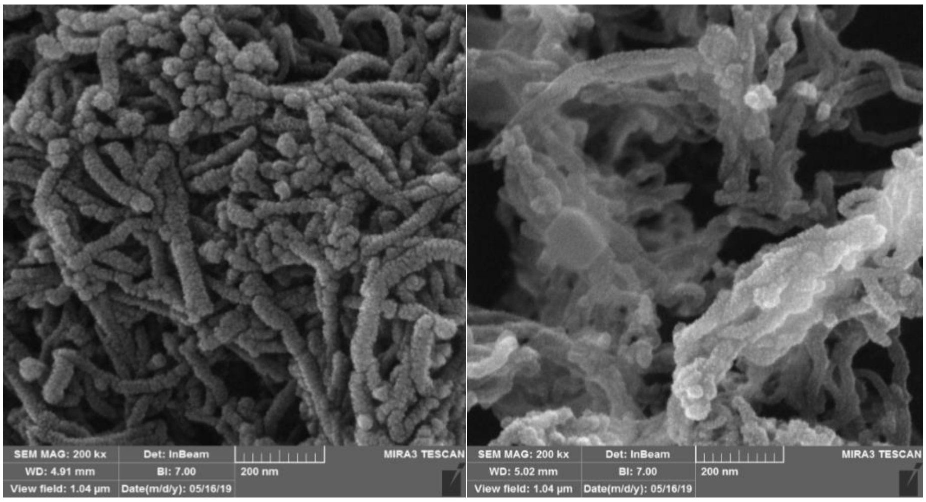
در روش مبتنی برحسگرهای زیستی، نانولوله‌های کربنی چند دیواره تهیه شده (MWCNT) و کونژوگه MWCNT-ssDNA ابتدا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM و آنالیز EDX تأیید شدند.



شکل ۱ شکل شماتیک بیوسنسور مبتنی بر MWCNT برای تشخیص توالی اختصاصی *APC* در غیاب DNA هدف، MWCNT به پروب ssDNA نشاندار شده با FAM متصل می‌شود و نشر فلورسانسی را خاموش می‌کند و در حضورDNA هدف، کاوشگر از سطح MWCNT آزاد شده و با توالی مکمل هیبرید شده و یک DNA دو رشته‌ای تشکیل داده و بازگشت نشر فلورسانسی FAM مشاهده شد.

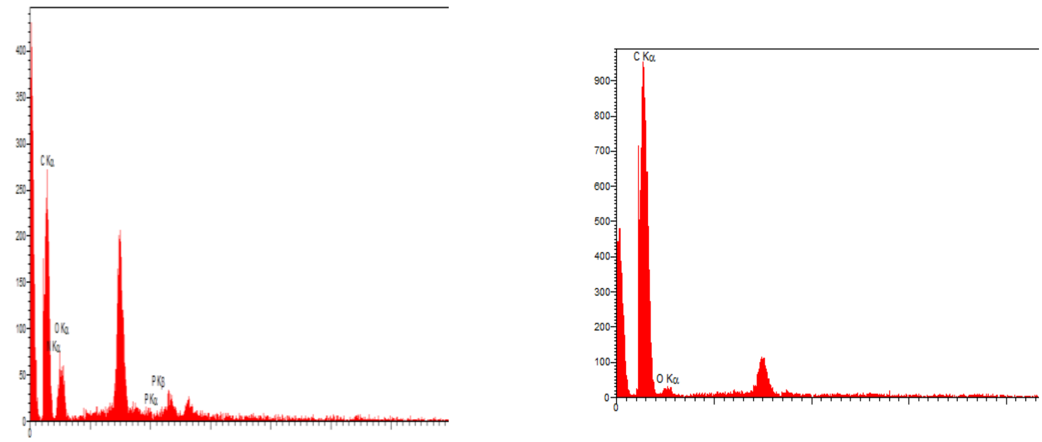
SEM سطح را نشان می‌دهد و پس از تثبیت کاوشگر روی نانوذرات MWCNT، تغییر مورفولوژی نانوذرات را تایید می‌کند. تغییر در ســـاختار کونژوگه MWCNT-ssDNA نسبت به MWCNT در شکل ۲ نشان داده شده است. نانولوله کربنی MWCNT و کونژوگه MWCNT-ssDNA تهیه و توســـط آنالیز SEM و EDX تایید شـــدند. تجزیه‌وتحلیل SEM خواص مورفولوژیکی MWCNT را تایید کرد. آنالیز عنصری نیز با استفاده ازپرتو انرژی پراش ایکس (EDX) انجام شد.

نتایج تجزیه‌وتحلیل EDX نشـــان می‌دهد که قبل از تثبیت پروب *APC* بر روی این نـانوذره، جـذب بـالایی روی عناصر C و O وجود دارد (شکل ۳ الف). با این‌حال، پس از تثبیـــت پروب *APC* بر روی MWCNT، علاوه بر اتم‌های کربن و اکســیژن، پیک‌هایی از عناصـــر N و P نیز وجود دارد که تثبیت پروب *APC* را در ســطح MWCNT تأیید می‌کند (شکل ۳ ب).



ب الف

شکل ۲. الف) تصویر SEM از MWCNT، ب) تصویر SEM ازکونژوگه پروب MWCNT-ssDNA.

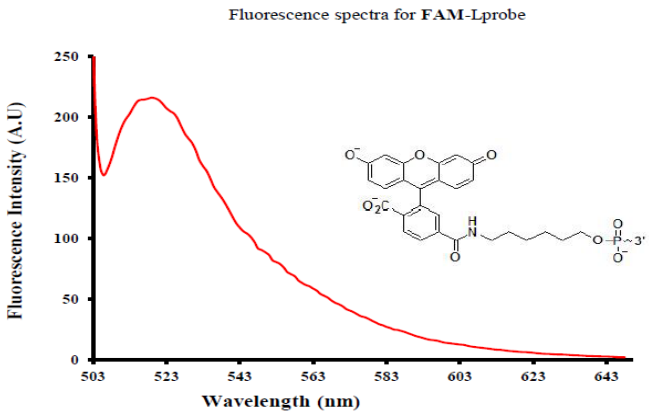


ب الف

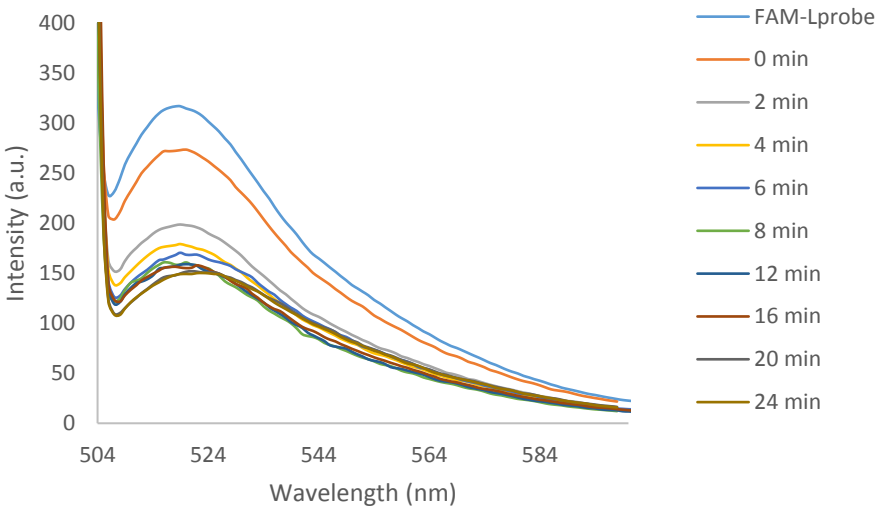
شکل ۳ الف) طیف EDX از MWCNT، ب) طیف EDX حاوی عناصر N و P در کونژوگه FAM-Lprobe+ MWCNT

۳-۳ طیف نشری فلورسانسی پروب نشاندار شده با FAM برای تعیین توالی اختصاصی *APC*

پس از تایید مورفولوژی نانوذرات، کاوشگر APC روی سطح MWCNT تثبیت شد. کاوشگر با فلوروفور FAM به تنهایی دارای گسیل نوری در ۵۲۰ نانومتر بود، که با تثبیت در سطح MWCNT خاموش شد. نتایج به وضوح نشان می‌دهد که MWCNT، کاوشگر ssDNA را به شدت جذب کرده و به‌طور موثر نشر فلورسانسی آن را خاموش می‌کند. بعد از افزودن توالی مکمل پروب و انجام واکنش هیبریداسیون، بر اساس اصل جفت شدن بازهای مکمل، نشرفلورسانسی دوباره ظاهر شد. شکل ٤، طیف نشری فلورسانسی پروب ssDNA FAM را در شرایط مختلف نشان می‌دهد.



شکل ٤ ساختار مولکولی و نشر فلورسانسی FAM در بافر Tris-Hcl 0.02 مولار PH=7.4. بالاترین شدت نشر فلورسانسی در ناحیه ۵۲۰ نانومتر و پس از برانگیختگی در ٤۹۵ نانومتر مشاهده شد.



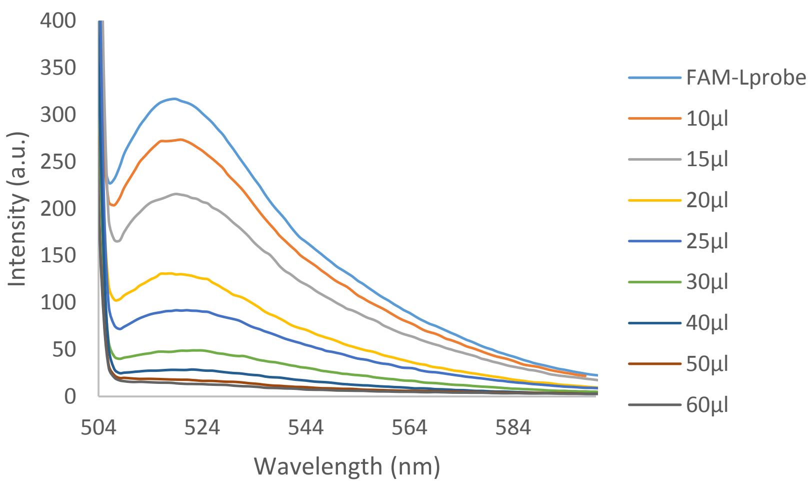
شکل ۵ طیف نشری فلورسانسی FAM-Lprobe در حضور MWCNT در زمان‌های مختلف. شدت نشرفلورسانسی با افزایش زمان کاهش می‌یابد و پس از ٦ دقیقه تفاوت قابل‌توجهی در شدت نشرفلورسانسی مشاهده نشد و این زمان به‌عنوان زمان بهینه برای تثبیت پروب در سطح MWCNT انتخاب شد.

برای بهینه‌سازی زمان تثبیت پروب ssDNA FAM روی MWCNT، طیف نشری فلورسانسی در حضور MWCNT، در زمان های مختلف اندازه‌گیری شد. در نتیجه، شدت نشر فلورسانسی به‌تدریج کاهش یافت و زمان بهینه تثبیت پروب ssDNA FAM روی MWCNT در ٦ دقیقه به‌دست آمد (شکل ٥).

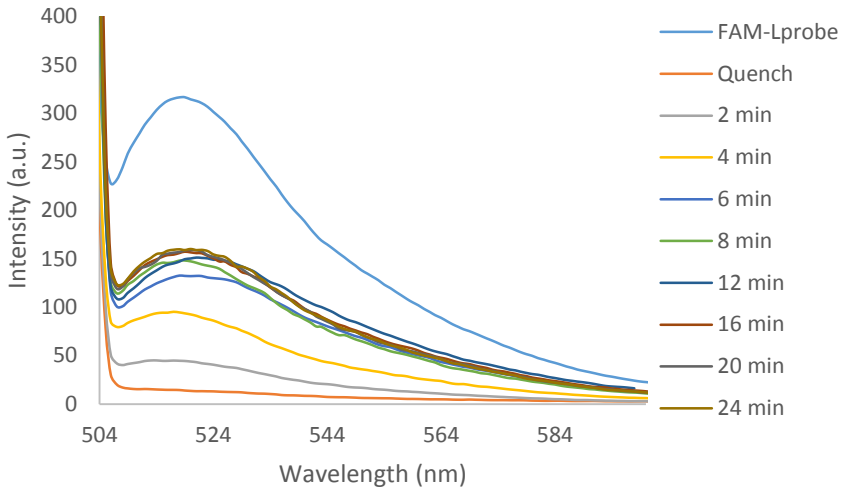
شکل ٦، طیف نشری فلورسانسی پروب نشاندار شده ssDNA را در حضور و غیاب MWCNT نشان می‌دهد، طیف نشری فلورسانسی ۱۰ میکرولیتر پروب *APC* با غلظت ۱۰ پیکومولار در غیاب MWCNT، گسیل نوری در ٥۲۰ نانومتر را نشان می‌دهد، اما با افزودن ٤۰ میکرولیتر MWCNT با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در شدت نشر فلورسانسی تا ۹٦ درصد کاهش مشاهده شد. علت این فرایند جذب پروب ssDNA روی سطح MWCNT از طریق پیوند $\pi \rightarrow \pi^*$ استاکینگ و پیوندهای هیدروژنی است.

نتایج در شکل ٦ نشان داده شده است که در اینجا مقدار بهینه، ٤۰ میکرولیتر MWCNT با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

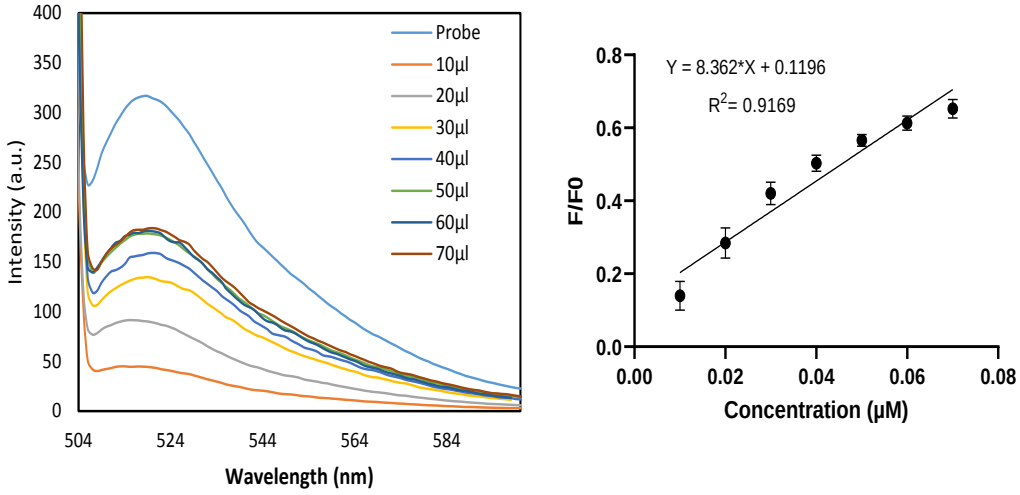
سپس، طیف نشری فلورسانسی کونژوگه پروب MWCNT-DNA در حضور cDNA 10µl با غلظت (۱۰pM) بررسی شد. همانطور که در شکل ۷ نشان داده شده است، با افزودن cDNA، شدت نشر فلورسانسی که خاموش شده بود تا ٥۲۰ نانومتر افزایش یافت که باعث جداسازی پروب ssDNA از سطح MWCNT شد و منجر به هیبریداسیون پروب ssDNA با cDNA و تشکیل DNA دورشته‌ای شد. برای به‌دست آوردن زمان بهینه هیبریداسیون طیف نشری فلورسانسی در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شد و زمان ۸ دقیقه به‌عنوان زمان بهینه هیبریداسیون به‌دست آمد (شکل۷).



شکل ٦ طیف نشری فلورسانسی FAM-Lprobe در حضور غلظت‌های مختلف MWCNT (1mg/ml) جهت خاموشی کامل نشر فلورسانسی. طیف نشری فلورسانسی پروب FAM-Lprobe در حضور غلظت‌های مختلف MWCNT (1mg/ml) جهت خاموشی کامل نشر فلورسانسی بررسی شد. با افزایش مقدار MWCNT، شدت نشرفلورسانسی کاهش می‌یابد و پس از افزودن ٤۰ میکرولیتر نانوذره MWCNT، خاموشی کامل نشر فلورسانسی مشاهده شد.



شکل ۷ طیف نشری فلورسانسی نانوحسگر زیستی FAM-Lprobe+ MWCNT در حضور رشته هدف مکمل سنتتیک در زمان‌های مختلف. طیف نشری فلورسانسی نانوحسگر زیستی (FAM -ssDNA + MWCNT)در حضور رشته هدف مکمل سنتتیک، در زمان‌های مختلف، بررسی شد. در حضور توالی هدف، زمان ۸ دقیقه، زمان بهینه هیبریداسیون شد و پس از آن طیف نشری فلورسانسی ثابت شده و تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای در آن مشاهده نشد.

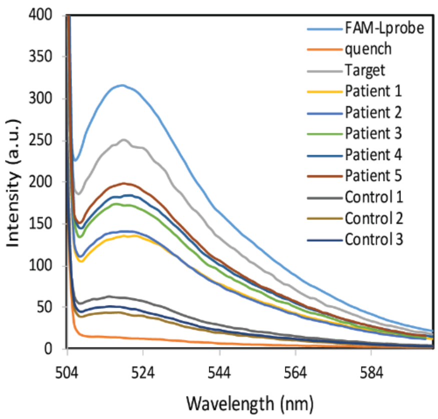


شکل۸ طیف فلورسانسی نانوحسگر زیستی FAM-Lprobe+ MWCNT در حضور غلظت‌های مختلف DNA تارگت. الف) طیف نشری فلورسانسی نانوحسگرزیستی در حضور غلظت‌های مختلف DNA تارگت. پس از به‌دست آوردن زمان بهینه هیبریداسیون، غلظت‌های مختلف DNA تارگت بررسی شد. در حضور ۵۰ میکرولیتر از توالی هدف با غلظت (۱۰pM) برگشت نشر فلورسانسی بیشتری مشاهده شد. ب) منحنی کالیبراسیون. منحنی کالیبراسیون در حضور غلظت‌های مختلف DNA تارگت نشان می‌دهد که پاسخ بیوسنسور در حضور غلظت‌های بررسی شده از DNA تارگت پاسخ خطی بوده که گستره خطی ۰,۰۱ تا ۰,۰۷ میکرومولار را نشان می‌دهد.

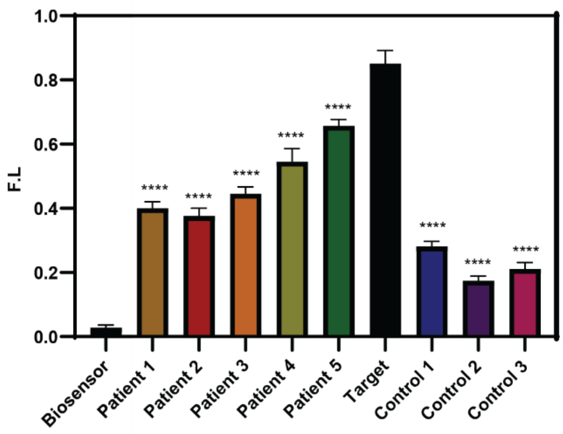
پا سخ فلور سانسی نانوبیو سنسور نسبت به غلظت‌های مختلف cDNA بررسی شد. شدت نشر فلورسانسی در مقابل غلظت‌های مختلف cDNA در شکل ۸ نشان داده شده است که نشان می‌دهد شدت نشر فلورسانسی با افزایش غلظت cDNA، افزایش می یابد. غلظت بهینه DNA تارگت ۵۰ میکرولیتر محاسبه شد. تجزیه‌وتحلیل کیفی برای مطالعه اختصاصیت وگزینش‌پذیری پلتفرم سنجش *APC* با اندازه‌گیری پاسخ فلورسانسی حسگر زیستی نسبت به cDNA و یک DNA غیرمکمل نیز انجام شد.

در شکل ۹ نتایج طیف فلورسانسی نانوحسگر زیستی FAM-Lprobe+ MWCNT برای تشخیص ژن *APC* در حضور سرم ۵ نمونه بیمار نشان داده شده است.

در جدول ۳، مقایسه عملکرد تشخیصی، حسگرهای زیستی فلورسنتی و حسگر مورد مطالعه ارائه شده است. همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است روش انجام این پژوهش، در مقایسه با سایر روش‌های موجود، نتایج قابل قبولی را ارائه کرده است. در این مطالعه، LOD و LOQ بیوسنسور DNA به‌صورت تکی به ترتیب ۱٫۱۲ نانومولار و ۳٫۲ میکرومولار تعیین شد.



الف



ب

شکل۹ طیف فلورسانسی نانوحسگر زیستی FAM-Lprobe+ MWCNT برای تشخیص ژن *APC* در حضور سرم ۵ نمونه بیمار و سه نمونه سرم افراد سالم (نمونه کنترل). الف) طیف فلورسانسی برای ارزیابی کاربرد بیوسنسور برای تشخیص ژن *APC* در سرم پنج بیمار نمونه مختلف نشان داده شده است. که نشرفلورسانسی قابل‌توجهی در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده شد (p>0.05). ب) تجزیه‌وتحلیل آماری نمونه‌های اصلی و نمونه‌های کنترل (سرم افراد سالم). برای تجزیه‌وتحلیل آماری ANOVA یک‌طرفه غیرپارامتریک انجام شد. Error bars نشان دهنده میانگین ± SD است. *P<0.05 ، **P<0.01، ***P<0.001 و ****P<0.0001

٤- بحث و نتیجه‌گیری

دراین مطالعه، از پلتفرم بیوسنسور برای تشخیص توالی اختصاصی ژن *APC* استفاده شد. پروب ssDNA نشاندار شده با ماده فلوئوروفور FAM به‌عنوان کاوشگر APCانتخاب شد[۱۹]. همچنین تعیین ژن *APC* براساس بیوسنسور DNA فلوریمتری انجام شد. برای افزایش تکرار پذیری و حساسیت بیوسنسور DNA، در ابتدا مولکول‌های فلوئوروفور بر روی نانوذره کربنی MWCNT تجمع یافتند، که این یک روش جدید برای ساخت بیوسنسور DNA است. در مرحله بعدی، با در نظر

گرفتن تعامل بین فلوروفور و بازهای پروب ssDNA از طریق فلورسانسی ثابت شد که پیوند هیدروژنی بین فلوروفور و بازهای پروب ssDNA تشکیل شده است. با افزودن MWCNT، کونژوگه MWCNT-ssDNA تهیه شد و با میکروسکوپ الکترونی SEM و آنالیز EDX تائید شد[۲٤].

جدول ۳ مقایسه عملکرد تشخیصی حسگرهای زیستی فلورسنتی و حسگرهای زیستی فلورسنتی مبتنی بر تقویت سیگنال DSN

Fluorescent Materials	Targets	Linear Interval (pM)	Limit of Detection (pM)	Ref.
DNA-AgNCs	miR-141	5×10^3–1×10^5	2.5×10^3	[۲۹]
Protonated phenyl-doped carbon nitride, ROX	miRNA-224	10^3–2×10^4	200	[۳۰]
FAM, TAMRA	miRNA-21	10^2–2×10^4	73	[۳۱]
NMM, DAPI	miRNA-21	10–4.5×10^4	3.1	[۳۲]
Chameleon Ag NCs	miR-17-5p	10–10^4	2.8	[۳۳]
CDs, FAM	miRNA-21	50–10^4	1	[۳٤]
CdTe QDs, FCMMs	let-7a	2–2×10^2	0.1	[۳٥]
Boron doped g-C_3N_4 nanosheets, Cu NCs	miR-582-3p	0.2–1	0.049	[۳٦]
FAM	let-7a	0.5–5×10^2	0.4	[۳۷]
FAM	miRNA-21	0.1–1×10^3	0.1	[۳۸]
FAM	let-7b	0.5–103	0.16	[۳۹]
FAM	miRNA-141	5–10^3	0.42	[٤۰]
FAM	let-7a	0.1–2×10^3	0.06	[٤۱]
Hairpin structure molecular beacons	let-7a	1–10^4	0.0325	[٤۲]
MWCNTs@Au NCs, Atto-425	miR-92a-3p	0.1–10	0.031	[۲۸]
MWCNTs@prob FAM	apc			This work

در غیاب cDNA، MWCNT به پروب ssDNA نشاندار شده با FAM متصل شده و نشر فلورسانسی آن را خاموش می‌کند. در مقابل، در طول هیبریداسیون در حضور cDNA، پروب نشاندار شده با FAM از سطح MWCNT آزاد شده و یک کمپلکس DNA دو رشته‌ای را با توالی هدف تشکیل می‌دهد و برگشت نشر فلورسانسی دیده می‌شود. هدف از این مطالعه طراحی و توسعه حسگر زیستی نوری مبتنی بر DNA و نانوذرات کربنی برای تشخیص زودهنگام سرطان کولورکتال با استفاده از تشخیص *APC* در ctDNA بود.

در دهه های اخیر، پیشرفت قابل‌توجهی در تشخیص بیومارکرهای CRC توسط حسگر زیستی داشته است[۲۰]. به‌طور کلی بیوسنسورها به سه نوع الکتروشیمیایی، مکانیکی و فلورسنتی طبقه‌بندی می‌شوند[۲۱]. حسگرهای زیستی فلورسانسی، ابزارهای تحلیلی هستند که برای شناسایی مولکول‌های زیستی موجود در نمونه‌های بیولوژیکی بدون روش‌های تهاجمی طراحی شده‌اند. آنها با تشخیص جذب الکترومغناطیسی توسط فلوروفورها یا مولکول‌های فلورسنت برچسب‌دار عمل می‌کنند[۲۲]. در طراحی حسگرهای زیستی فلورسانسی از نانوذرات مختلفی از جمله نانوذرات کربن، طلا و نقره استفاده شده است. گزینش‌پذیری و حساسیت بالای آنها، حسگرهای فلورسنتی را به‌دلیل زمان کوتاه پاسخ شان به یک انتخاب عالی در تشخیص بالینی تبدیل کرده است[۲۳]. Farahani

و همکارانش، رابطه متیلاسیون در ناحیه ۱۸bp از ژن *APC* با کمک نانوبیوسنسور فلئورسنتی و تشخیص به موقع سرطان را مورد بررسی قرار دادند [۲٤]. Pan و همکارانش یک ناحیه CPGی متیله شدهی ۱۰۰bp در ژن *APC* بررسی کردند. در تعدادی از بیماری‌ها به خصوص سرطان، DNA متیله دیده شده است. پروموتور 1A ژن *APC* جهت ردیابی توالی هدف DNA مورد بررسی قرار گرفت. که از یک پروب نشاندار شده با بیوتین که حاوی ناحیه CPG متیله شده می‌باشد، روی سطح سنسور SPR تثبیت می‌شود و سپس با استرپتاویدین پوشیده می‌شود. ۵ پیکو مول از پروموتور DNAی ژن *APC* متیله شده با این روش قابل ردیابی است که مدت انجام این روش ۱ ساعت طول می‌کشد. با این روش به راحتی و با سرعت می‌توان ناحیه میتلاسیون DNA خاص را در بیماری‌ها تشخیص داد [۲۵].

در مطالعه‌ای دیگر Zou و همکاران درسال۲۰۰۷ نشان دادند که پروتئین MBD نوترکیب به‌طور خاص به DNA متیله شده متصل می‌شود که از پروتئین های MBDمانند MIRA، MECP2 و COMPARE-MS برای سنجش‌های تشخیصی متیلاسیون در سرطان‌های پیشرفته استفاده شده است[۲٦].

در سال ۲۰۱۸ M. Darestani-Farahani و همکاران در مطالعه‌ای، یک فلوروفور جدید با نام آیوپاک -- ((thiophen-2-yl) methyleneamino)-5-(1H-indol-3-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol –4 را معرفی کردند که برای ساخت بیوسنسور DNA فلورسانسی به‌دلیل کارایی کوانتومی بالا، طول موج نشری خوب و قابلیت استفاده در محیط‌های آبی استفاده شد. همچنین، تعیین ژن *APC* براساس بیوسنسور DNA فلوریمتری انجام شد. در ابتدا مولکول‌های فلوئوروفور بر روی نانوذره طلا تجمع یافتند برای افزایش تکرارپذیری و حساسیت بیوسنسور DNA، که این یک روش جدید برای ساخت بیوسنسور DNA است. در مرحله بعدی، با در نظر گرفتن تعامل بین فلوروفور و بازهای پروب ssDNA از طریق فلورسانس و طیف‌سنجی FTIR ثابت شد که پیوند هیدروژنی بین فلوروفور و بازهای پروب ssDNA تشکیل شده است. وقتی توالی تارگت ssDNA به بیوسنسور DNA آماده شده اضافه شد نشر فلورسانسی با افزایش غلظت تارگت ssDNA افزایش پیدا کرد. تغییرات در شدت فلورسانسی با غلظت ssDNA به‌صورت خطی است. این نانوبیوسنسور DNA یک روش ساده، حساس و سریع برای تعیین غلظت توالی ژن *APC* در نمونه های واقعی پلاسما را نشان داد [۲۷].

در مطالعه‌ای دیگر Zhiwei Sun و همکاران یک حسگر زیستی فلورسنتی مبتنی بر نانولوله‌های چند دیواره و نانوکلاسترهای طلا (MWCNTs@Au NCs) به کمک تقویت سیگنال توسط نوکلئاز دوبلکس (DSN) برای تشخیص miRNA طراحی کردند. که miR-92a-3p مرتبط با سرطان کولورکتال (CRC) و استخراج شده از اگزوزوم‌ها به‌عنوان هدف انتخاب شد. MWCNTs@Au NCs عملکرد دوگانه خاموش‌کننده نشر فلورسانسی و برگشت آن را انجام می‌دهد [۲۸].

مطالعه ما بر طراحی و ارائه یک روش بهینه مبتنی بر حسگر زیستی برای تشخیص ژن *APC* متمرکز بود. در این مطالعه، رنگ فلورسنتی FAM برای نشاندار کردن کاوشگر *APC*، استفاده شد.

کاوشگر *APC* روی سطح MWCNT تثبیت شد. کاوشگر دارای بیشینه نشر فلورسانسی در ۵۲۰ نانومتر بود، که با تثبیت در سطح MWCNT خاموش شد. بعد از افزودن توالی مکمل پروب و انجام واکنش هیبریداسیون، نشر فلورسانسی دوباره ظاهر شد. تغییرات شدت نشر فلورسانسی با غلظت ssDNA به‌صورت خطی بود. این نانوبیوسنسور DNA یک روش ساده، حساس و سریع برای تعیین غلظت توالی ژن *APC* در نمونه های واقعی پلاسما را نشان داد.

بیوسنسور *APC* به‌دلیل گزینش‌پذیری قوی، پایداری بالا و تکرارپذیری خوب، ابزاری قوی برای کاربردهای تحقیقاتی و تشخیصی است. از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که *APC* را می توان در ctDNA با استفاده از نانوحسگرها به‌عنوان ابزاری قدرتمند در تشخیص نشانگرهای تومور شناسایی کرد. بیوسنسور *APC* قادر به شناسایی جهش در ناحیه p.E1309fs, c.3927delAAAGA از طریق فرایند لایگیشن بود. نتایج نشان داد انتظار می‌رود حسگر طراحی و ساخته شده بتواند با توالی اختصاصی ژن *APC* هیبریداسیون قابل‌توجهی انجام دهد و در نتیجه شدت نشر فلورسانسی قابل‌ملاحظه‌ای مربوط به هیبریداسیون ثبت شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال کمال تشکر و قدردانی دارند. این پژوهش حاصل رساله دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال با کد اخلاق IR.IAU.TNB.REC.1400.082 می‌باشد.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ تضاد منافع را گزارش نمی‌کنند.

۵- منابع

[1] Mahasneh, A., Al-Shaheri, F., & Jamal, E. (2017). Molecular biomarkers for an early diagnosis, effective treatment and prognosis of colorectal cancer: Current updates. Experimental and molecular pathology, 102(3), 475-483.

[2] Singh, M. P., Rai, S., Suyal, S., Singh, S. K., Singh, N. K., Agarwal, A., & Srivastava, S. (2017). Genetic and epigenetic markers in colorectal cancer screening: recent advances. Expert review of molecular diagnostics, 17(7), 665-685.

[3] Marcellinaro R, Spoletini D, Grieco M, Avella P, Cappuccio M, Troiano R, et al. Colorectal cancer: current updates and future perspectives. Journal of Clinical Medicine. 2023;13(1):40.

[4] Shegekar T, Vodithala S, Juganavar A. The emerging role of liquid biopsies in revolutionising cancer diagnosis and therapy. Cureus. 2023;15(8.).

[5] Half, E., Bercovich, D., & Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. Orphanet journal of rare diseases, 4(1), 22.

[6] Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK. Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, Mckechnie D et al. Identification of FAP locus genes from Chromosome 5q21. Science. 1991;253:661–5.

[7] Zhang L, Shay JW. Multiple roles of APC and its therapeutic implications in colorectal cancer. JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 2017;109(8):djw332

[8] Huang D, Du X. Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. World J Gastroenterol. 2008;14(12):1823–7.

[9] Yamulla RJ, Kane EG, Moody AE, Politi KA, Lock NE, Foley AV, Roberts DM. Testing models of the APC tumor suppressor/β-catenin interaction reshapes our view of the destruction complex in Wnt signaling. Genetics. 2014;197(4):1285–302.

[10] Galiatsatos P, Foulkes D. Familial adenomatous polyposis. Am J Gastroenterol. 2006;101:385–98.

[11] Matveeva, M. Y., Kashina, E. V., Reshetnikov, V. V., Bryzgalov, L. O., Antontseva, E. V., Bondar, N. P., & Merkulova, T. I. (2016). Regulatory single nucleotide polymorphisms (rSNPs) at the promoters 1A and 1B of the human APC gene. BMC genetics, 17(3), 154.

[12] Feng, M., Fang, X., Yang, Q., Ouyang, G., Chen, D., Ma, X., ... & Xie, W. (2014). Association between the APC gene D1822V variant and the genetic susceptibility of colorectal cancer. Oncology letters, 8(1), 139-144.

[13] Abdel-Malak, C., Darwish, H., Elsaid, A., El-Tarapely, F., & Elshazli, R. (2016). Association of APC I1307K and E1317Q polymorphisms with colorectal cancer among Egyptian subjects. Familial cancer, 15(1), 49-56.

[14] Nagase H, Nakamura Y. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. Hum Mutat. 1993;2(6):425–34.

[15] Nieuwenhuis MH, Vasen HF. Correlations between mutation site in APC and phenotype of

capture methylated human DNA from stool: implications for colorectal cancer screening. Clinical Chemistry, 53(9), 1646-1651.
[27] Darestani-Farahani M, Faridbod F, Ganjali MR. A sensitive fluorometric DNA nanobiosensor based on a new fluorophore for tumor suppressor gene detection. Talanta 2018; 190:140-6.

[28] Sun, Z.; Li, J.; Tong, Y.; Zhao, L.; Zhou, X.; Li, H.;Wang, C.; Du, L.; Jiang, Y. Ratiometric Fluorescence Detection of Colorectal Cancer-Associated Exosomal miR-92a-3p with DSN-Assisted Signal Amplification by a MWCNTs@Au NCs Nanoplatform. Biosensors 2022, 12, 533. https:// doi.org/10.3390/bios12070533
[29] Huang, J.; Shangguan, J.F.; Guo, Q.P.; Ma,W.J.;Wang, H.Z.; Jia, R.C.; Ye, Z.; He, X.X.;Wang, K.M. Colorimetric and fluorescent dual-mode detection of microRNA based on duplex-specific nuclease assisted gold nanoparticle amplification. Analyst 2019, 144, 4917–4924.
[30] Zhou, D.S.; Liu, X.T.; Liu, X.T.; Xu, Y.T.; Chen, R.Q.; Lin, C.; Guo, L.Q.; Fu, F.F. Ratiometric fluorescent biosensor for microRNAs imaging in living cells. Sens. Actuator B-Chem. 2020, 322, 128632.
[31] Wang, S.; Wang, L.; Xu, X.W.; Li, X.; Jiang, W. MnO2 nanosheet-mediated ratiometric fluorescence biosensor for MicroRNA detection and imaging in living cells. Anal. Chim. Acta 2019, 1063, 152–158.
[32] Ji, D.Y.; Mou, X.; Kwok, C.K. Label-free and ratiometric detection of microRNA based on target-induced catalytic hairpin assembly and two fluorescent dyes. Anal. Methods 2019, 11, 4808–4813.
[33] Jiang, Y.T.; Ma, X.Y.; Shao, X.J.;Wang, M.Y.; Jiang, Y.; Miao, P. Chameleon silver nanoclusters for ratiometric sensing of miRNA. Sens. Actuator B-Chem. 2019, 297, 126788.
[34] Wang, Z.Z.; Xue, Z.Q.; Hao, X.L.; Miao, C.F.; Zhang, J.Z.; Zheng, Y.J.; Zheng, Z.F.; Lin, X.H.; Weng, S.H. Ratiometric fluorescence sensor based on carbon dots as internal reference signal and T7 exonuclease-assisted signal amplification strategy for microRNA-21 detection. Anal. Chim. Acta 2020, 1103, 212–219.

familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. Crit Rev Oncol Hematol. 2007;61(2):153–61.
[16] Zhang, S., Qin, H., Lv, W., Luo, S., Wang, J., Fu, C., .. & Wu, L. (2016). Novel and reported APC germline mutations in Chinese patients with familial adenomatous polyposis. Gene, 577(2), 187-192.
[17] Gupta, S., Murthy, C. N., & Prabha, C. R. (2018). Recent advances in carbon nanotube based electrochemical biosensors. International journal of biological macromolecules, 108, 687-703
[18] Touhami, A. (2014). Biosensors and nanobiosensors: design and applications. Nanomedicine, 15, 374-403.

[19] Rajasekar M. Recent Trends in Rhodamine derivatives as fluorescent probes for biomaterial applications. Journal of Molecular Structure. 2021;1235:130232.
[20] Sadighbayan D, Sadighbayan K, Khosroushahi AY, Hasanzadeh M. Recent advances on the DNA-based electrochemical biosensing of cancer biomarkers: Analytical approach. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2019;119:115609.
[21] Naresh V, Lee N. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. Sensors. 2021;21(4):1109.
[22] Nawrot W, Drzozga K, Baluta S, Cabaj J, Malecha K. A fluorescent biosensors for detection vital body fluids' agents. Sensors. 2018;18(8):2357.
[23] Girigoswami K, Akhtar N. Nanobiosensors and fluorescence based biosensors: An overview. International Journal of Nano Dimension. 2019;10(1):1-17.
[24] Darestani-Farahani M, Faridbod F, Ganjali MR. A sensitive fluorometric DNA nanobiosensor based on a new fluorophore for tumor suppressor gene detection. Talanta 2018;190:140-6.

[25] Pan, S., Xu, J., Shu, Y., Wang, F., Xia, W., Ding, Q., ... & Lu, S. (2010). Double recognition of oligonucleotide and protein in the detection of DNA methylation with surface plasmon resonance biosensors. Biosensors and Bioelectronics, 26(2), 850-853.
[26] Zou, H., Harrington, J., Rego, R. L., & Ahlquist, D. A. (2007). A novel method to

[35] Zhang,W.Y.; Hao,W.H.; Liu, X.T.; Sun, X.R.; Yan, J.L.;Wang, Y.C. Visual detection of miRNAs using enzyme-free amplification reactions and ratiometric fluorescent probes. Talanta 2020, 219, 121332.
[36] Wang, Y.T.; Wu, N.; Guo, F.N.; Gao, R.X.; Yang, T.; Wang, J.H. g-C3N4 nanosheet-based ratiometric fluorescent probes for the amplification and imaging of miRNA in living cells. J. Mat. Chem. B 2019, 7, 7566–7573.
[37] Lin, X.Y.; Zhang, C.; Huang, Y.S.; Zhu, Z.; Chen, X.; Yang, C.J. Backbone-modified molecular beacons for highly sensitive and selective detection of microRNAs based on duplex specific nuclease signal amplification. Chem. Commun. 2013, 49, 7243–7245.
[38] Sun, C.H.; Rong, Y.; Yang, Z.P.; She, D.; Gong, M.W. Construction of Dual-Target Recognition-Based Specific MicroRNA Detection Method for Acute Pancreatitis Analysis. Appl. Biochem. Biotechnol. 2022, 194, 3136–3144.
[39] Guo, S.; Yang, F.; Zhang, Y.L.; Ning, Y.; Yao, Q.F.; Zhang, G.J. Amplified fluorescence sensing of miRNA by combination of graphene oxide with duplex-specific nuclease. Anal. Methods 2014, 6, 3598–3603.
[40] Sun, Y.J.; Wang, C.C.; Tang, L.N.; Zhang, Y.L.; Zhang, G.J. Magnetic-enhanced fluorescence sensing of tumor miRNA by combination of MNPs@PDA with duplex specific nuclease. RSC Adv. 2021, 11, 2968–2975. Biosensors 2022, 12, 533 14 of 14
[41] Shen,W.; Yeo, K.H.; Gao, Z.Q. A simple and highly sensitive fluorescence assay for microRNAs. Analyst 2015, 140, 1932–1938.
[42] Yao, G.D.; Xiao, Z.Y.; Yu, S.; Yao, K.; Liu, D.H.; Chen, K.X.; Wei, Z.M.; Li, Y.J.; Sun, F.F. Tetrahedral structure supported two stages DSN-assisted amplification strategy for sensitive detection of lung cancer related MicroRNA. Microchem. J. 2022, 174, 107035.

Design of fluorescence nano biosensor for early detection of colorectal cancer using *APC* probe in the presence of MWCNT

Somayeh Heidarian[1], Laya Takbiri Osgoei[2*], Shohreh Zare Karizi[3], Jafar Amani[4], Sedigheh Arbabian[1]

1- Department of biology, Faculty of Biological Science, North Tehran Branch. Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, North Tehran Branch. Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Department of biology, Varamin Pishva Branch. Islamic Azad University Pishva, Varamin, Iran.
4- Applied Microbiology Research Center, Biomedical Technologies Research Institute, Baqiyatullah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

L_takbiri@iau-tnb.ac.ir

Receipt: 2022/12/24 Accepted: 2024/12/29

Abstract

APC gene in ctDNA has been proposed as a potential biomarker for cancer diagnosis. A biosensor based on a multi-walled carbon nanotube (MWCNT) and DNA probe with fluorophore FAM (6-carboxyfluorescein) for detection of *APC* gene in ctDNA was developed to identify patients with colorectal cancer (CRC). This method was designed based on the adsorption and immobilization of FAM-labeled single-stranded DNA (ssDNA) on MWCNT, which leads to the quenching of FAM fluorescence emission. By adding its cDNA could release single-stranded DNA probe (ssDNA) from the MWCNT surface and a double-stranded DNA (dsDNA) was formed. It led to the return of FAM fluorescence emission. While in the case of non-complementary DNA the corresponding dsDNA was not formed and therefore we did not have the return of FAM fluorescence emission. The results of this study showed that the biosensor based on carbon nanotubes can be used as a high-sensitivity method for the early detection of CRC.

Keywords: Biosensor, Carbon nanoparticles, *APC*