

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

سمیه حیدریان^۱، لعلیا تکبیری اسگوئی^{۲*}، شهره زارع کاریزی^۳، جعفرامانی^۴، 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.

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

L_takbiri@iau-tnb.ac.ir

تهران، ایران

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۰

دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۳

چکیده

ژن APC در ctDNA به عنوان 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 فلوروفور 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 رشته‌ای (ssDNA) از سطح MWCNT شد و یک DNA دو رشته‌ای (dsDNA) تشکیل شد که منجر به بازگشت نشر فلورسانسی FAM شد. درحالی‌که در مورد DNA غیرمکمل، dsDNA مربوطه تشکیل نشد و بنابراین بازگشت نشر فلورسانسی FAM مشاهده نشد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوحسگر زیستی مبتنی بر نانولوله‌های کربنی، علاوه بر روش‌های موجود، می‌تواند به عنوان 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]. به دلیل اینکه در اثر یک نوع پولیپ به نام آدنوما به وجود می‌آید، آدنوماتوز کارسینوما نیز نامیده می‌شود [۲]. این سرطان بعد از سرطان‌های ریه، و سرطان پروستات در مردان و سرطان پستان در زنان، به عنوان سومین سرطان رایج در دنیا شناخته می‌شود. این سرطان در کشورهای 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 پیشرفت تومور و اثر درمانی دارد. بیوپسی مایع استفاده از سلول‌های توموری در گردش (CTCs)، DNA توموری در گردش (ctDNA) و آگزوم‌ها جایگزین مانیتورینگ تکاملی تومور و مقایسه پاسخ درمانی شده‌اند [۴]. سرطان روده بزرگ (CRC) سومین نوع شایع سرطان و دومین علت شایع مرگ و میر 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 کارسینومای بدخیم ایجاد می‌شود. تغییرات در مسیر سیگنالینگ Wnt، ژن‌های مسیر TGF β ، 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 درصد 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 مرگ و میر

ناشی از سرطان در مردان است و سومین علت شایع در زنان است. CRC به آرامی ایجاد می‌شود (به استثنای 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 می‌شود. این پیشرفت همزمان با تغییرات مولکولی کلیدی در ژن‌های مهارکننده تومور، ژن‌های انکوژن و سایر gatekeeper است. برخی از تغییرات اولیه شامل جهش در APC، KRAS، در حالی که جهش‌های اضافی در PIK3CA، TP53 و سیگنالینگ Wnt و سایر ژن‌های مسیر TGF- β باعث پیشرفت کارسینومای تهاجمی می‌شوند. مارکرهای پیش‌آگهی پیش‌بینی کننده قوی با ید بتوانند ناهمگنی مولکولی را به طور ناخواسته در بیماران تشخیص 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 مارکرهای پیش‌آگهی و پیش‌بینی شده انجام شده است [۲،۱].

سرطان کلورکتال به طور عمده 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 انباشته شدن β catenin در سیتوپلاسم و انتقال β catenin به هسته دیده می‌شود. β catenin در هسته به TCF/LEF متصل گشته و کمپلکس TCF/LEF/ β catenin را ایجاد می‌کند. این کمپلکس سبب فعال شدن انکوژن‌هایی مثل c-myc، cyclinD و در نهایت تکثیر غیرطبیعی سلول‌های آستری روده می‌شود. دومین ضربه زمانی اتفاق می‌افتد که در سلول‌های غیر طبیعی آدنوما، جهش در ژن‌هایی مثل KRAS، MACC1، DAND5، SMAD4 سبب تبدیل آن‌ها به پولیپ‌های سرطانی و در

نهایت متاستاز می‌شود [۳۸،۹]. همچنین جهش و از کار افتادن ژن‌های مربوط به سیستم ترمیم مثل MSH، MLH، MUTYH، سبب ایجاد سرطان کلورکتال می‌شود. از طرف دیگر اپی ژنتیک (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 جفت باز 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 بر مسیر انتقال پیام wnt در تنظیم چرخه سلولی، پایداری سائتواسکلتون‌ها (cytoskeleton)، چسبندگی بین سلولی (Intracellular adhesion) و آپوپتوز نیز نقش دارد. به طور 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، پلی مورفیسم‌های زیادی دیده شده‌اند که می‌توان از آن‌ها جهت ردیابی سرطان کلورکتال استفاده کرد [۱۱]. برای مثال در مطالعه‌ای ارتباط سه پلی مورفیسم E1307K، E1317Q، C18122V 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]. به طور 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

بیش از ۸۰ درصد موارد سبب ایجاد CRC می‌شود [۱۴،۱۵،۱۶]. بیوسنسورها گروهی از حسگرها هستند که به طور 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 به گونه‌ای 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 می‌باشند توسعه یافته است که مزایای مواد نانو را با هم ترکیب نموده است. نانوتیوب‌های کربنی در ابتدا توسط سومیو آیچوما 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، سرطان‌های 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 ترانسدایوسرهای سیگنال به حذف نقاط ضعف آشکار سازهای متداول کمک کرده است. ویژگی‌هایی همچون استحکام بالای مکانیکی، رسانایی الکتریکی بهتر و توانایی کار به عنوان تراندیوسور سیگنال کارآمد، نانوتیوب‌های کربنی (CNTها) را در میان مواد نانو به ماده‌ای ایده‌آل برای کاربردهای بیوسنسور تبدیل کرده است. علاوه بر این CNTها به دلیل برخورداری از سطوح گسترده‌ای 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

۱-۲ نمونه برداری و استخراج ctDNA در پلاسما

نمونه خون (۲ میلی لیتر از هر بیمار)، با رضایت آگاهانه، در لوله های حاوی EDTA و در مراحل مختلف سرطان جمع آوری شد. نمونه های خون به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و بار دیگر به مدت ۳ دقیقه در دور ۱۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند تا پلاسما استخراج شود. پلاسما ظرف ۶ ساعت پس از جمع آوری خون جداسازی شد و از پلاسما جدا شده جهت استخراج ctDNA استفاده شد. برای استخراج DNA آزاد توموری، به دلیل حساسیت کار و پایین بودن میزان DNA در سرم و پلاسما، از روش column based استفاده شد و در این پژوهش نیز از کیت NucleoSpin® plasma XS برای استخراج ctDNA استفاده شد. بررسی کمی DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-1800, SHIMADZU) در طول موج ۲۶۰ نانومتر محاسبه شد و سپس محاسبات خلوص DNA بر اساس نسبت های A260/A280 محاسبه شد. بررسی کیفی DNA با استفاده از ژل الکتروفورز محاسبه شد. در این پژوهش، یک جفت پرایمر مربوط به ژن APC جهت تقویت DNA ژنومی طراحی و به کار برده شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز، PCR معمولی جهت تقویت ناحیه و تکثیر قطعه خاصی از کروموزوم 5q22 جهت بهینه سازی زیست حسگر DNA و به دست آوردن حساسیت PCR و مقایسه عملکرد آن با تکنیک نانوبیوسنسور است. شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR برای پرایمر APC در جدول ۱ آمده است.

۲-۲ معرف ها

DNA تک رشته ای به عنوان کاوشگر، توالی هدف یا تارگت مکمل سنتتیک و توالی هدف غیرمکمل سنتتیک، برای توالی های خاص ژن APC طراحی شد. که توالی ها توسط شرکت bioneer کره سنتز شد. کاوشگرهای مربوط به ژن APC بر اساس توالی مشخص در انسان با استفاده از نرم افزار oligoV طراحی شدند.

ایجاد کرده است، زیرا برای توسعه ابزارها و پلتفرم های جدید برای درک سیستم های بیولوژیک در تشخیص و درمان بیماری از روش های شیمیایی استفاده می شود. در این پژوهش از MWCNT استفاده شده است که خود یک ماده ی فلورسنت است، اما جالب توجه است که باعث کاهش خاصیت فلور سانس می شود. این خواص به ظاهر متناقض جلوه ای از خواص شیمیایی ناهمگن، اتمی و الکترونیکی MWCNT است. بخوبی مشخص شده که نانولوله کربنی چند دیواره باعث کاهش خاصیت فلورسانسی مولکول های رنگی جذب شده روی سطح خود می شود [۱۷].

حسگرهای زیستی تشخیص نوری، متنوع ترین کلاس حسگرهای زیستی هستند، زیرا می توانند برای انواع مختلف طیف سنجی مانند جذبی، فلورسانسی، فسفر سانس، رامان، شکست و طیف سنجی پراکندگی استفاده می شوند. با این حال، دستگاه هایی که بر اساس طیف سنجی فلورسانسی، تشدید پلاسما سطحی، تداخل سنجی و طیف سنجی هدایت شونده هستند در ساختارهای نوری رایج ترین هستند. در اکثر مطالعات موجود، از DNA توموری در گردش، برای تشخیص جهش استفاده شده است. تجزیه و تحلیل cfDNA اغلب در زمینه تشخیص جهش های غیرتهاجمی که منجر به مکانیسم های مقاومتی و نظارت درمانی در بیماران سرطانی می شود، مورد بحث قرار می گیرد. در واقع، با پیشرفت های چشمگیری که در این زمینه حاصل شده است حساسیت و تعداد زیادی از ژن ها مورد شناسایی واقع شدند [۱۸].

در این مطالعه یک نانوحسگر زیستی مبتنی بر نانولوله کربنی چند دیواره (MWCNT) و پروب DNA دارای فلوروفور FAM، برای تشخیص و شناسایی ژن APC در ctDNA، در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال (CRC)، ساخته شده است.

۲- مواد و روش ها

جدول ۱ شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR 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.3927delAAAAGA	5q22.2		APC-F	5'- GATCTTCAGCTGACCTAGTTCCAA-3'
			APC-R	5'- CAGATTCTGCTAATACCCTGCAA-3'
			Probe1	5'-FAM-CCCTGCAATAGCAGAAAAGA-3'
			Probe2	5'- AAAGATTGGAAGTCTAGGTC-NH2-3'
			T	GACCTAGTTCCAATCTTTTCTTTTCTGCTATTGCAGGG
			dt	GACCTAGTTCCAATCTTTTAGGCTCTGCTATTGCAGGG

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

۲-۳ بهینه‌سازی تثبیت پروب اختصاصی ژن APC نشاندار شده با FAM روی سطح MWCNT

برای بهینه‌سازی تثبیت کاوشگر اختصاصی ژن APC روی MWCNT، تمام شرایطهای واکنش مانند زمان تثبیت و غلظت MWCNT بهینه شدند. واکنش با مخلوط کردن ۱۰ میکرولیتر پروب ۱ با غلظت (۱۰ پیکو مولار)، با ۱۵ میکرولیتر MWCNT با غلظت (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر از بافر Tris-HCL ۲۰ میلی‌مولار، که شامل محلول‌های ۱۰۰mM NaCl, 5mM Mgcl₂ با KCl, 5 mM pH=7.4 است، تهیه شد و شرفلورسانس در زمان‌های مختلف بررسی شد. همچنین، برای تعیین غلظت بهینه MWCNT برای خاموش کردن

حاصل به مدت ۳ ساعت در دمای محیط هم‌زده شد. پس از این مدت MWCNT-ssDNA کانژوگه شده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۴/۵ rpm سانتریفیوژ شد. به منظور خارج شدن DNA واکنش نکرده و EDC.HCl رسوبات بدست آمده دو مرتبه با آب دیونیزه (۳۰×۲) شسته شدند. در نهایت رسوبات حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه دیسپرس شده و در دمای ۴ °C نگهداری شدند.

۲-۶ روش شناسایی جهش

برای شناسایی جهش MWCNT+P2 DNA ۱۰ میکرو لیتر کانژوگه شده، ۱۰ میکرو لیتر P1 DNA با غلظت ۱۰ پیکو مولار، ۲۰ میکرو لیتر TDNA با غلظت ۱۰ پیکو مولار، مقدار ۱۰ میکرو لیتر بافر Ligation، ۱۰ میکرو لیتر محلول PEG، ۲ میکرو لیتر آنزیم DNA لیگاز با یکدیگر مخلوط شده و سپس حجم مخلوط با استفاده از آب دیونیزه به، ۱۰۰ میکرو لیتر 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 ۱۴/۵ rpm سانتریفیوژ شد.

مراحل بالا برای dt DNA به جای T DNA تکرار شد. در نهایت رسوبات حاصل دو مرتبه (2 × 100) 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 ۴۰ میکرو لیتر T DNA با غلظت ۱۰ پیکو مولار ریخته شد. مخلوط حاصل با استفاده از MWCNT به حجم، ۲۰۰ ماکرو لیتر 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.

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

۲-۴ 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 نشرفلور سانس در زمان‌های مختلف بررسی شد. سپس برای بهینه‌سازی غلظت واکنش هیبریداسیون، غلظت‌های مختلف DNA مکمل، باکانژوگه پروب FAM-Probe-MWCNT مخلوط شد و شدت نشرفلور سانس 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 کوالانسی 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 میلی لیتر، محلول تازه تهیه شده‌ی EDC.HCl با غلظت ۱۰ میلی مولار، سدیم کلرید ۲۵ میلی مولار و DNA اصلاح شده با آمین به غلظت ۲ میکرو ولار، آماده شد. مخلوط با استفاده از بافر PBS به غلظت ۲۵ میلی مولار و (pH=6) به حجم ۵۰۰ میکرو لیتر رسانده شد. مخلوط

ANOVA تعیین شد و معنی‌داری آماری در ۰,۰۵ تعیین شد.

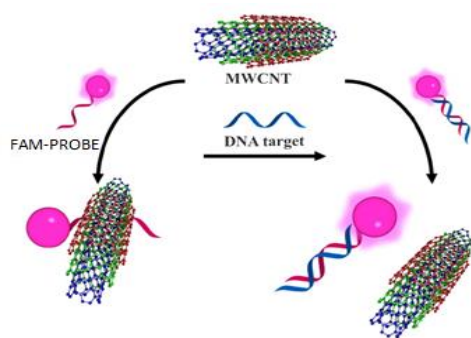
۳- نتایج

۳-۱ استراتژی تشخیص بر اساس FRET

کونژوگه 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، پیوندهای MWCNT با پروب ssDNA، نشر فلورسانسی فلوروفور FAM را خاموش می‌کند. در مقابل، در حضور cDNA، در طی هیبریداسیون، پروب از سطح MWCNT آزاد شد، یک کمپلکس DNA دو رشته‌ای، بین پروب ssDNA و توالی تارگت تشکیل شد و بازگشت نشر فلورسانسی دیده شد.

۳-۲ تأیید و بررسی نانولوله‌های کربنی و کونژوگه ssDNA-MWCNT

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



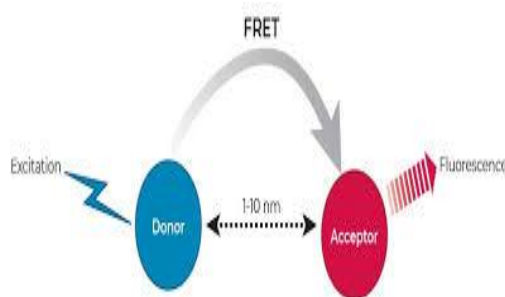
شکل ۱ شکل شماتیک بیوسنسور مبتنی بر MWCNT برای تشخیص توالی اختصاصی APC در غیاب DNA هدف، کاوشگر ssDNA نشاندار شده با FAM متصل می‌شود و در حضور DNA هدف، کاوشگر از سطح MWCNT آزاد شده و با توالی مکمل هیبرید شده و یک DNA دو رشته‌ای تشکیل داده و بازگشت نشر فلورسانسی FAM مشاهده شد.

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 کولورکتال انجام شد. برای این منظور ctDNA های استخراج 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 قابل توجهی را نشان داد.

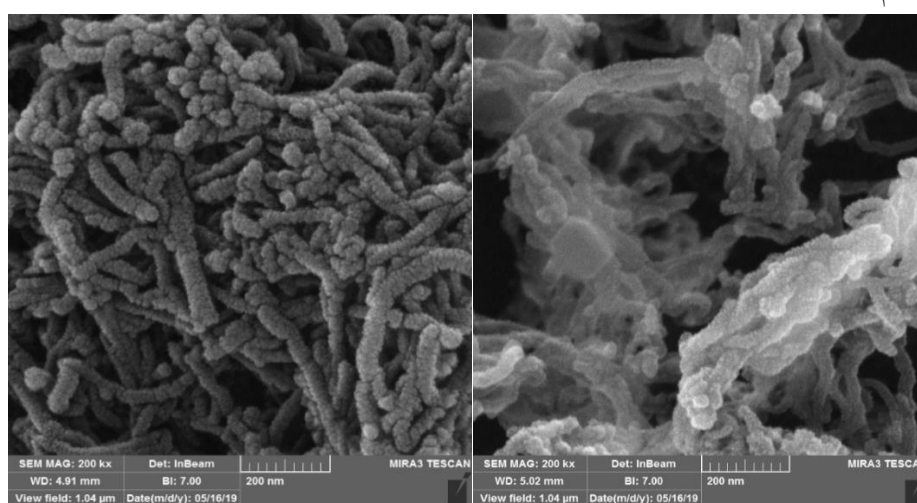
۲-۸ آنالیز آماری

تمام آزمایش‌های اندازه‌گیری فلورسانس در سه تکرار انجام شد. نتایج ارائه شده در هر شکل به صورت مقادیر میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شد. تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از برنامه آماری Graphpad prism 9.5.1 انجام شد. تفاوت‌های آماری بین مقادیر میانگین آنتشار فلورسانس بیوسنسور در واکنش با تارگت و ژن APC در نمونه‌های اصلی با استفاده از آزمون one-way



SEM سطح را نشان می‌دهد و پس از تثبیت کاوشگر روی نانوذرات MWCNT، تغییر مورفولوژی نانوذرات را تایید می‌کند. تغییر در ساختار کونژوگه MWCNT-ssDNA نسبت به MWCNT در شکل ۲ نشان داده شده است. نانوله کربنی MWCNT و کونژوگه MWCNT-ssDNA تهیه و توسط آنالیز SEM و EDX تایید شدند. تجزیه و تحلیل SEM خواص مورفولوژیکی MWCNT را تایید کرد. آنالیز عنصری نیز با استفاده از پرتو انرژی پراش ایکس (EDX) انجام شد.

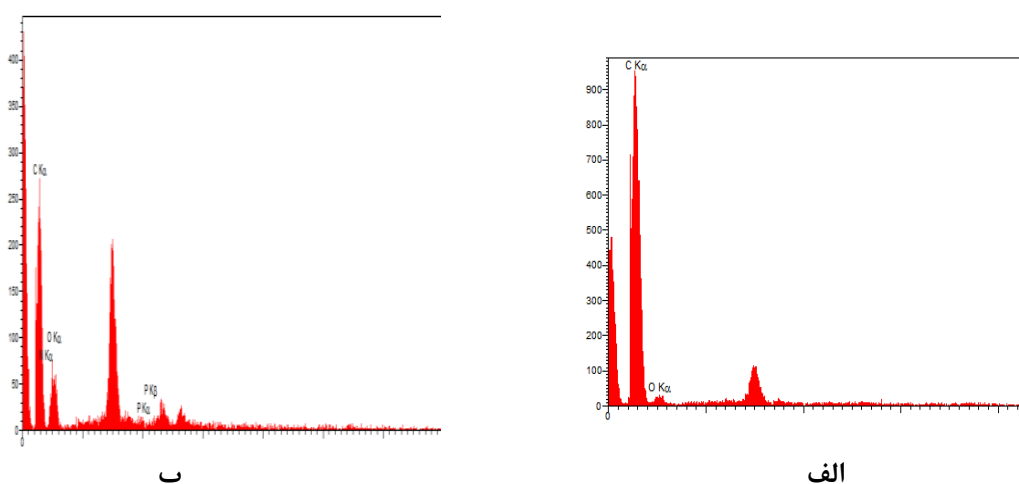
نتایج تجزیه و تحلیل EDX نشان می‌دهد که قبل از تثبیت پروب APC بر روی این نانوذره، جذب بالایی روی عناصر C و O وجود دارد (شکل ۳ الف). با این حال، پس از تثبیت پروب APC بر روی MWCNT، علاوه بر اتم‌های کربن و اکسیژن، پیک‌هایی از عناصر N و P نیز وجود دارد که تثبیت پروب APC را در سطح MWCNT تأیید می‌کند (شکل ۳ ب).



ب

الف

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



ب

الف

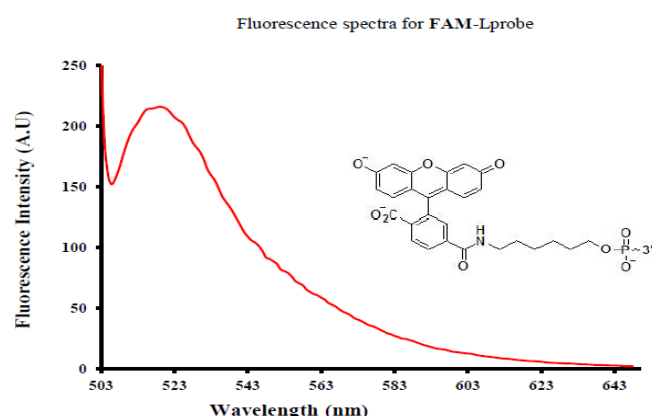
شکل ۳ الف) طیف EDX از MWCNT، ب) طیف EDX حاوی عناصر N و P در کونژوگه MWCNT-FAM-Lprobe+

۳-۳ طیف نشری فلورسانسی پروب نشاندار شده با

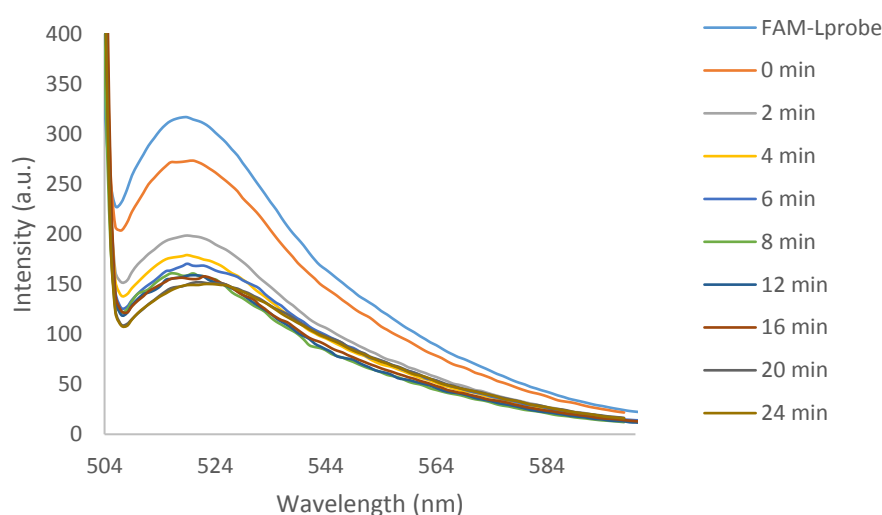
FAM برای تعیین توالی اختصاصی APC

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، نشر فلورسانسی دوباره ظاهر شد. شکل ۴، طیف نشری فلورسانسی پروب FAM ssDNA را در شرایط مختلف نشان می‌دهد.



شکل ۴ ساختار مولکولی و نشر فلورسانسی FAM در بافر 0.02 Tris-HCl مولار $\text{pH}=7.4$. بالاترین شدت نشر فلورسانسی در ناحیه ۵۲۰ نانومتر و پس از برانگیختگی در ۴۹۵ نانومتر مشاهده شد.



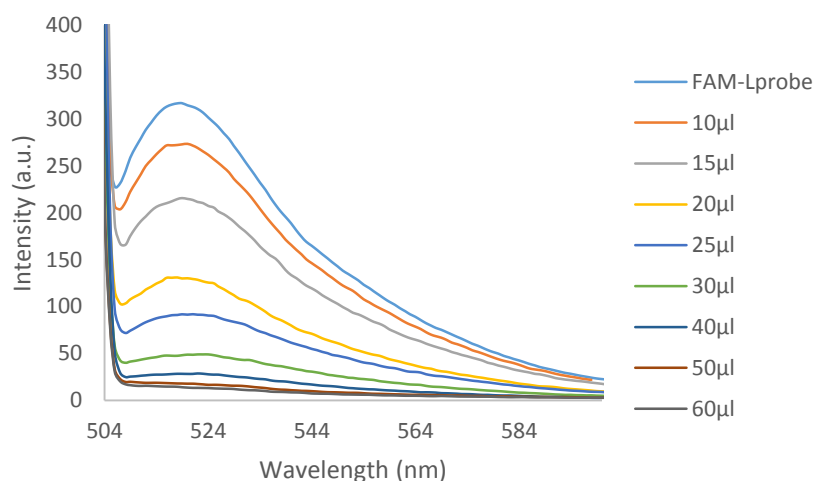
شکل ۵ طیف نشری فلورسانسی FAM-Lprobe در حضور MWCNT در زمان‌های مختلف. شدت نشر فلورسانسی با افزایش زمان کاهش می‌یابد و پس از ۶ دقیقه تفاوت قابل توجهی در شدت نشر فلورسانسی مشاهده نشد و این زمان به‌عنوان زمان بهینه برای تثبیت پروب در سطح MWCNT انتخاب شد.

نتایج در شکل ۶ نشان داده شده است که در اینجا مقدار بهینه، ۴۰ میکرولیتر MWCNT با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد.

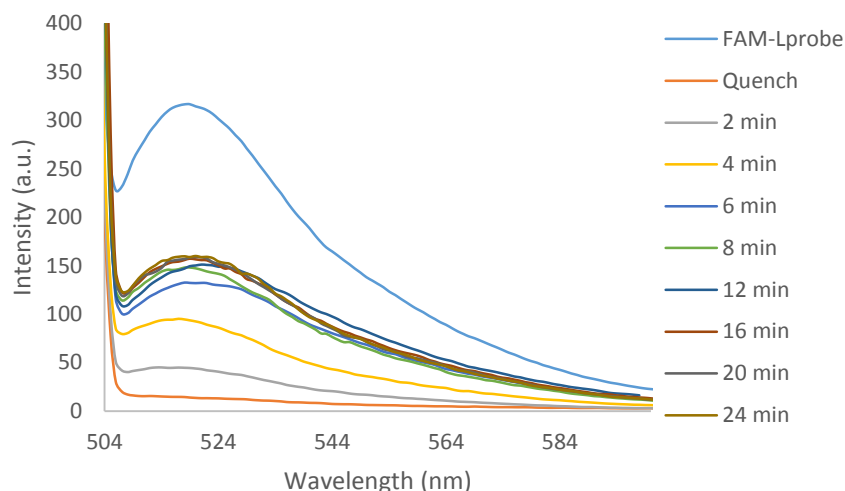
سپس، طیف نشری فلورسانسی کونژوگه پروب MWCNT-DNA در حضور ۱۰ μl cDNA با غلظت (۱۰ pM) بررسی شد. همانطور که در شکل ۷ نشان داده شده است، با افزودن cDNA، شدت نشر فلورسانسی که خاموش شده بود تا ۵۲۰ نانومتر افزایش یافت که باعث جداسازی پروب ssDNA از سطح MWCNT شد و منجر به هیبریداسیون پروب ssDNA با cDNA و تشکیل DNA دورشته ای شد. برای به دست آوردن زمان بهینه هیبریداسیون طیف نشری فلورسانسی در زمان های مختلف اندازه گیری شد و زمان ۸ دقیقه به عنوان زمان بهینه هیبریداسیون به دست آمد (شکل ۷).

برای بهینه سازی زمان تثبیت پروب FAM ssDNA روی MWCNT، طیف نشری فلورسانسی در حضور MWCNT در زمان های مختلف اندازه گیری شد. در نتیجه، شدت نشر فلورسانسی به تدریج کاهش یافت و زمان بهینه تثبیت پروب FAM ssDNA روی MWCNT در ۶ دقیقه به دست آمد (شکل ۵).

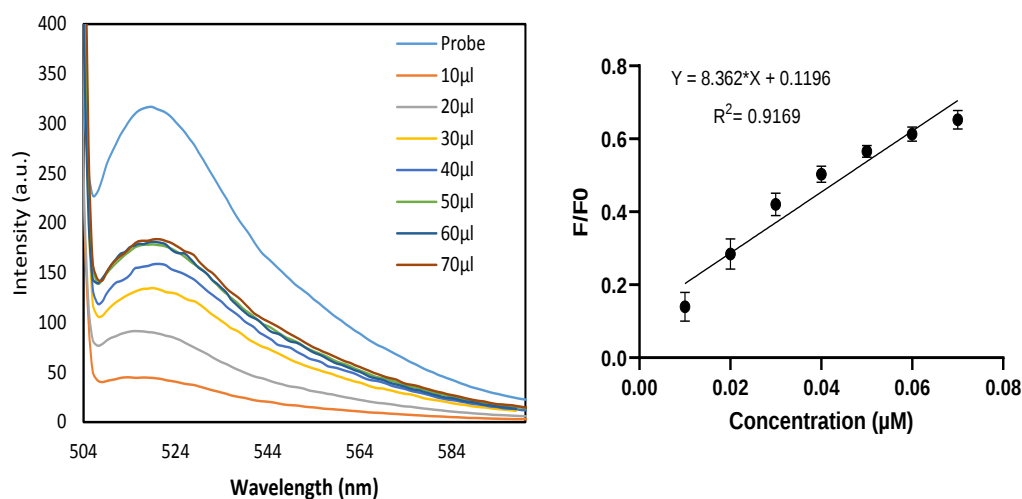
شکل ۶، طیف نشری فلورسانسی پروب نشاندار شده ssDNA را در حضور و غیاب MWCNT نشان می دهد، طیف نشری فلورسانسی ۱۰ میکرولیتر پروب APC با غلظت ۱۰ پیکومولار در غیاب MWCNT، گسیل نوری در ۵۲۰ نانومتر را نشان می دهد، اما با افزودن ۴۰ میکرولیتر MWCNT با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در شدت نشر فلورسانسی تا ۹۶ درصد کاهش مشاهده شد. علت این فرایند جذب پروب ssDNA روی سطح MWCNT از طریق پیوند $\pi \rightarrow \pi^*$ استاکینگ و پیوندهای هیدروژنی است.



شکل ۶ طیف نشری فلورسانسی FAM-Lprobe در حضور غلظت های مختلف MWCNT (1mg/ml) جهت خاموشی کامل نشر فلورسانسی. طیف نشری فلورسانسی پروب FAM-Lprobe در حضور غلظت های مختلف MWCNT (1mg/ml) جهت خاموشی کامل نشر فلورسانسی بررسی شد. با افزایش مقدار MWCNT، شدت نشر فلورسانسی کاهش می یابد و پس از افزودن ۴۰ میکرولیتر نانوذره MWCNT، خاموشی کامل نشر فلورسانسی مشاهده شد.



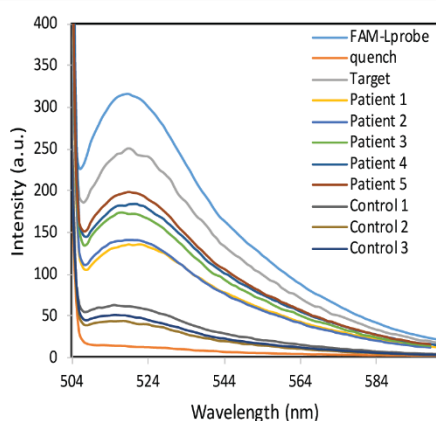
شکل ۷ طیف نشری فلورسانسی نانوحسگر زیستی FAM-Lprobe+ MWCNT در حضور رشته هدف مکمل سنتتیک در زمان‌های مختلف. طیف نشری فلورسانسی نانوحسگر زیستی (FAM -ssDNA + MWCNT) در حضور رشته هدف مکمل سنتتیک، در زمان‌های مختلف، بررسی شد. در حضور توالی هدف، زمان ۸ دقیقه، زمان بهینه هیبریداسیون شد و پس از آن طیف نشری فلورسانسی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



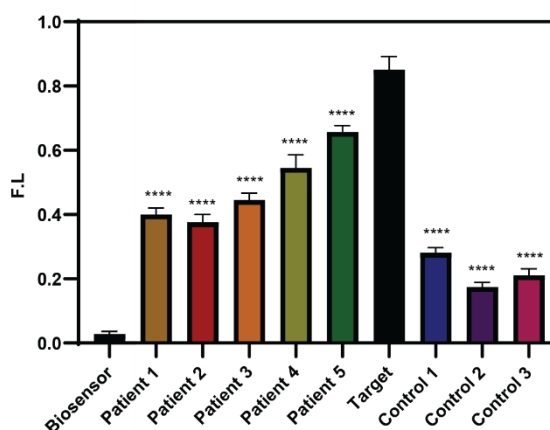
شکل ۸ طیف فلورسانسی نانوحسگر زیستی FAM-Lprobe+ MWCNT در حضور غلظت‌های مختلف DNA تارگت. الف) طیف نشری فلورسانسی نانوحسگر زیستی در حضور غلظت‌های مختلف DNA تارگت. پس از به‌دست آوردن زمان بهینه هیبریداسیون، غلظت‌های مختلف DNA تارگت بررسی شد. در حضور ۵۰ میکرولیتر از توالی هدف با غلظت (۱۰ pM) برگشت نشر فلورسانسی 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.

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 به صورت تکی به ترتیب ۱، ۱۲ نانومولار و ۳، ۲ میکرومولار تعیین شد.

با سخ فلور سانسو نانوبیو سنسور نسبت به غلظت‌های مختلف cDNA بررسی شد. شدت نشر فلور سانسو در مقابل غلظت‌های مختلف cDNA در شکل ۸ نشان داده شده است که نشان می‌دهد شدت نشر فلور سانسو با افزایش غلظت cDNA، افزایش می‌یابد. غلظت بهینه DNA تارگت ۵۰ میکرولیتر محاسبه شد. تجزیه و تحلیل کیفی برای مطالعه اختصاصیت و گزینش پذیری پلتفرم سنسجش APC با اندازه‌گیری پا سخ فلور سانسو حسگر زیستی نسبت به cDNA و یک DNA غیرمکمل نیز انجام شد.



الف



ب

شکل ۹ 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 نشر فلورسانسی قابل توجهی در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده شد ($p > 0.05$). ب) تجزیه و تحلیل آماری نمونه‌های اصلی و نمونه‌های کنترل (سرم افراد سالم). برای تجزیه و تحلیل آماری ANOVA یک طرفه غیر پارامتریک انجام شد. Error bars نشان دهنده میانگین $\pm$ SD است. $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ و $P < 0.0001$ ****

بیوسنسور DNA فلوریمتری انجام شد. برای افزایش تکرار پذیری و حساسیت بیوسنسور DNA، در ابتدا مولکول‌های فلوروفور بر روی نانوذره کربنی MWCNT تجمع یافتند، که این یک روش جدید برای ساخت بیوسنسور DNA است. در مرحله بعدی، با در نظر

۴- بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، از پلتفرم بیوسنسور برای تشخیص توالی اختصاصی ژن APC، استفاده شد. پروب ssDNA نشاندار شده با ماده فلوروفور FAM به عنوان کاوشگر APC انتخاب شد [۱۹]. همچنین تعیین ژن APC بر اساس

گرفتن تعامل بین فلوروفور و بازهای پروب ssDNA از افزودن MWCNT، کونژوگه MWCNT-ssDNA تهیه شد و با میکروسکوپ الکترونی SEM و آنالیز EDX تأیید شد [۲۴].

طریق فلورسانسی ثابت شد که پیوند هیدروژنی بین فلوروفور و بازهای پروب ssDNA تشکیل شده است. با

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

Fluorescent Materials	Targets	Linear Interval (pM)	Limit of Detection (pM)	Ref.
DNA-AgNCs	miR-141	$5 \times 10^3 - 1 \times 10^5$	2.5×10^3	[۲۹]
Protonated phenyl-doped carbon nitride, ROX	miRNA-224	$10^3 - 2 \times 10^4$	200	[۳۰]
FAM, TAMRA	miRNA-21	$10^2 - 2 \times 10^4$	73	[۳۱]
NMM, DAPI	miRNA-21	$10 - 4.5 \times 10^4$	3.1	[۳۲]
Chameleon Ag NCs	miR-17-5p	$10 - 10^4$	2.8	[۳۳]
CDs, FAM	miRNA-21	$50 - 10^4$	1	[۳۴]
CdTe QDs, FCMMs	let-7a	$2 - 2 \times 10^2$	0.1	[۳۵]
Boron doped g-C ₃ N ₄ nanosheets, Cu NCs	miR-582-3p	0.2-1	0.049	[۳۶]
FAM	let-7a	$0.5 - 5 \times 10^2$	0.4	[۳۷]
FAM	miRNA-21	$0.1 - 1 \times 10^3$	0.1	[۳۸]
FAM	let-7b	0.5-103	0.16	[۳۹]
FAM	miRNA-141	$5 - 10^3$	0.42	[۴۰]
FAM	let-7a	$0.1 - 2 \times 10^3$	0.06	[۴۱]
Hairpin structure molecular beacons	let-7a	$1 - 10^4$	0.0325	[۴۲]
MWCNTs@Au NCs, Atto-425	miR-92a-3p	0.1-10	0.031	[۲۸]
MWCNTs@prob FAM	apc			This work

به‌طور کلی بیوسنسورها به سه نوع الکتروشیمیایی، مکانیکی و فلورسنسی 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 فلور سنت 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 فلورسنسی را به دلیل زمان کوتاه پاسخ‌شان به یک انتخاب عالی در تشخیص بالینی تبدیل کرده است [۲۳]. Farahani

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.

دهه‌های اخیر، پیشرفت قابل توجهی در تشخیص بیومارکرهاي CRC توسط حسگر زیستی داشته است [۲۰].

و همکارانش، رابطه متیلاسیون در ناحیه ۱۸bp از ژن APC با کمک نانوبیوسنسور فلئورسنتی و تشخیص به موقع سرطان را مورد بررسی قرار دادند [۲۴]. Pan و همکارانش یک ناحیه CPG متیله شده ی ۱۰۰bp در ژن APC بررسی کردند. در تعدادی از بیماری‌ها به خصوص سرطان، DNA متیله دیده شده است. پروموتور ۱A 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 DNA 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 متیلاسیون DNA خاص را در بیماری‌ها تشخیص داد [۲۵].

در مطالعه‌ای دیگر Zou و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که پروتئین MBD نو ترکیب به‌طور خاص به DNA متیله شده متصل می‌شود که از پروتئین‌های MBD مانند MIRA، MECP2 و COMPARE-MS برای سنجش‌های تشخیصی متیلاسیون در سرطان‌های پیشرفته استفاده شده است [۲۶].

در سال ۲۰۱۸ M. Darestani-Farahani و همکاران در مطالعه‌ای، یک فلوروفور جدید با نام آیوپاک -- ((thiophen-2-yl) methyleneamino)-5-(1H-indol-3-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol 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 فلوروفور 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 نمونه‌های 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 نمونه‌های واقعی پلاسما را نشان داد.

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

بیوسنسور APC به دلیل گزینش پذیری قوی، پایداری بالا و تکرارپذیری خوب، ابزاری قوی برای کاربردهای تحقیقاتی و تشخیصی است. از این مطالعه می توان نتیجه گرفت که APC را می توان در ctDNA با استفاده از نانوحسگرها به عنوان 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 می رود حسگر طراحی و ساخته شده بتواند با توالی اختصاصی ژن APC هیبریداسیون قابل توجهی انجام دهد و در نتیجه شدت نشر فلورسنسی قابل ملاحظه ای مربوط به هیبریداسیون ثبت شود.

سپاسگزاری

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

تضاد منافع

نویسندگان هیچ تضاد منافع را گزارش نمی کنند.

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

- 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 Nanoplatfrom. *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

- [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.
- [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.

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

Somayeh Heidarian¹, Laya Takbiri Osgoei^{2*}, Shohreh Zare Karizi³, Jafar Amani⁴, Sedigheh Arbabian¹

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*