

طراحی نانویوسنسور فلورسانسی جهت تشخیص زودهنگام سرطان کولورکتال با استفاده از کاوشگرهای APC و miR-21-5p به طور همزمان

نویسندگان:

سمیه حیدریان^۱، نعیا تکبیری اسکوئی^{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، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.2, Summer 2023

چکیده:

مقدمه: ژن APC در ctDNA و miR-21-5p به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه برای تشخیص سرطان پیشنهاد شده‌اند.

روش کار: در این مطالعه فوق یک نانوحسگر زیستی مبتنی بر نانولوله کربنی چند دیواره (MWCNT) و پروب DNA دارای ماده فلوروفور FAM (۶- کربوکسی فلورسین) برای تشخیص ژن APC در ctDNA، و پروب DNA دارای ماده فلوروفور ROX (۵- کربوکسی-x-رودامین) برای تشخیص miR-21-5p برای شناسایی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال (CRC) طراحی شده است. این روش مبتنی بر جذب و تثبیت DNA تک رشته‌ای (ssDNA) نشاندار شده با FAM و ROX بر روی MWCNT است که منجر به خاموش شدن نشر فلورسانسی FAM و ROX می‌شود. با افزودن DNAهای مکمل آن‌ها (cDNA)، که منجر به آزادسازی پروب‌های DNA تک رشته‌ای (ssDNA) از سطح MWCNT شده و یک DNA دو رشته‌ای (dsDNA) تشکیل شده که منجر به بازگشت نشر فلورسانسی FAM و ROX گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه، حساسیت فلوروفور FAM، ۵۰ نانومولار (۵۰ nM) و حساسیت فلوروفور ROX، ۲۵ نانومولار (۲۵ nM) به دست آمد. مدت زمان پاسخ‌دهی در حضور رشته هدف ۱۲ دقیقه است. LOD و LOQ بیوسنسور DNA به صورت تکی به ترتیب ۱،۱۲ نانومولار و ۳،۲ میکرومولار به دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که نانوحسگر زیستی مبتنی بر نانولوله‌های کربنی و پروب DNA، علاوه بر روش‌های موجود، می‌تواند به عنوان یک روش با حساسیت بالا برای تشخیص زودهنگام CRC مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نانوحسگر زیستی، ژنوسنسور، نانوذرات کربنی، بیومارکر، فلورسانسی

Pars J Med Sci 2023;21(2):53

مقدمه:

این چهارمین علت شایع مرگ و میر ناشی از سرطان در مردان است و سومین علت شایع در زنان است [۲]. امروزه سرطان در ابعاد جهانی به نحوی شیوع یافته که توجه جدی پژوهشگران را به خود جلب کرده است. به طور خاص سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین سرطان‌های بدخیم در ایران و جهان

از بین بیماری‌های مختلف، سرطان دومین (در برخی کشورها، نخستین) عامل مرگ و میر انسان‌ها در سراسر دنیا است [۱]. CRC سومین سرطان در مردان (۱۰٪ از موارد ابتلا به سرطان در مردان) و دومین سرطان در زنان (۹/۲٪ از ابتلا به سرطان در زنان) است.

* نویسنده مسئول، نشانی: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

پست الکترونیک: L_takbiri@iau-tnb.ac.ir

تلفن تماس: ۰۲۱۷۷۰۰۹۸۳۶

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۴

اصلاح: ۱۴۰۲/۰۸/۰۷

دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۹

(CT) هستند که معمولاً برای غربالگری یا تشخیص CRC استفاده می‌شوند [۲]. FOBT پرکاربردترین روش مقرون به صرفه برای آزمایش هموگلوبین در مدفوع با استفاده از آنتی بادی است، اما میزان بالایی از نتایج مثبت و منفی کاذب و همچنین حساسیت محدودی دارد، در حالی که CTC، سیگمئیدوسکوپی و کولونوسکوپی تجسم مستقیم دقیق‌تری را ارائه می‌کنند. ضایعات، اما نیاز به آماده‌سازی وسیع روده دارند، گران‌تر هستند و نرخ مشارکت پایینی دارند [۷۶].

از سوی دیگر، رویکردهای تشخیصی CRC با استفاده از روش الایزا (ELISA) [۸]، ایمونوهیستوشیمی (IHC) [۹]، رادیوایمونواسی [۱۰]، فلورسانس [۱۱]، نورتابی شیمیایی [۱۲]، الکتروفورز [۱۳]، و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز [۱۴] توسعه یافته است.

بیومارکرهای سرطان مولکول‌های زیستی هستند که به عنوان نشانه بیماری عمل می‌کنند و می‌توانند انواع متفاوتی داشته باشند. سرطان کلورکتال به طور عمده در اثر جهش در ژن APC 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. TCF/LEF/ β catenin متصل گشته و کمپلکس TCF/LEF/ β catenin را ایجاد می‌کند. این کمپلکس سبب فعال شدن انکوژن‌هایی مثل cyclinD، c-myc و در نهایت تکثیر غیرطبیعی سلول‌های آستری روده می‌شود [۱۵].

میکرو RNAها مولکول‌های غیر کدکننده ۲۵-۱۸ نوکلئوتیدی هستند که از نظر تکاملی حفاظت شده می‌باشند، که بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه mRNA یا القا تجزیه آن کنترل می‌کنند و این کار را از طریق اتصال به ناحیه ترجمه نشدنی mRNA (UTR ۳') انجام می‌دهند [۱۶]. در بین بیومارکرها، مارکرهای RNA از قبیل microRNA (miRNA)ها به طور رایجی در سرطان‌های گوارشی مورد بررسی قرار گرفته‌اند و به عنوان کاندیدهای بالقوه‌ای برای تشخیص اولیه سرطان، در بافت و مدفوع و سرم قابل تشخیص می‌باشند. نقش miRNA به عنوان فاکتورهای اپی‌ژنتیکی در پاتوژنز سرطان کلورکتال در مطالعات بسیاری ارزیابی و تایید شده است. miRNAها به عنوان نشانگرهای زیستی CRC مرحله II هستند که با جراحی قابل درمان است. مشکل عمده CRC مرحله II ظهور مجدد بیماری و افزایش میزان مرگ و میر است. miR-21 یکی از نشانگرهای زیستی مهم برای CRC مرحله II است. miR-21 یکی از miRNAهایی است که به طور گسترده‌ای در سرطان‌های متعدد بررسی شده است. miR-21 در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال نابجا بیان می‌شود. شواهد بسیاری نقش miR-21 را به عنوان یک

است. تشخیص زودهنگام سرطان گام اساسی در درمان می‌باشد. شیوع و کشندگی بالای سرطان کلورکتال به این معناست که روش‌های تشخیصی که تاکنون برای آن ارائه شده‌اند، به اندازه کافی موثر نبوده‌اند و بنابراین ابزار تشخیصی حساس و سریع در مراقبت ویژه سرطان کلورکتال برای تشخیص اولیه و غربالگری بیومارکرهای سرطان کلورکتال مورد نیاز است. زیست‌حسگرها این امکان را می‌دهند که در زمان کوتاه‌تر و با دقت زیاد، سرطان را تشخیص داد. سرمایه‌گذاری‌های گسترده شرکت‌های مختلف روی زیست‌حسگرهای تشخیص‌دهنده سرطان اهمیت این ابزار را نشان می‌دهد. چالش‌های اصلی‌ای که در رابطه با سرطان مطرح است شامل تشخیص زودهنگام و همچنین بررسی پاسخ به درمان می‌باشد. تشخیص دیرهنگام یا تشخیص در مراحل پیشرفته، به معنی نرخ زندگی کمتر از ۵ سال برای سرطان‌های اصلی مثل سینه، ریه و روده است [۱]. حسگرهای زیستی ابزارهای قوی برای تشخیص خاص، حساس و سریع مولکول‌های بیولوژیکی هستند که مجموعه‌ای از کاربردهای متنوع در زمینه‌های مختلف دارند [۳]. اصل شناسایی حسگر زیستی مبتنی بر واکنش بین سیستم‌های تحلیلی و بیولوژیکی است [۴]. نانو ساختارهای کربنی در حال حاضر به دلیل قابلیت‌های الکتریکی، نوری و مکانیکی قابل توجه خود به عنوان بخش‌های کلیدی چارچوب‌های حسگرزیستی پدیدار شده‌اند. پیش‌بینی می‌شود که نانو ساختارهای کربنی، دقت، کارایی و سرعت حسگرهای زیستی را به دلیل قابلیت‌های برجسته‌شان بهبود بخشند [۵].

داده‌های فزاینده‌ای وجود دارد که نشان می‌دهد نشانگرهای تومور مولکول‌هایی هستند که ممکن است در مایعات یا بافت‌های بدن شناسایی شوند و شامل پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، ژن‌ها، محصولات ژنی، سلول‌های خاص یا هورمون‌ها هستند. شناسایی اولیه بیومارکرهای اختصاصی در سرطان‌ها یک گام اساسی در درمان است. اخیراً تجزیه و تحلیل چندگانه بیومارکرها نتایج خیلی دقیق و با حداقل درصد خطا ارائه کرده است. آنالیز بیومارکرهای چندگانه در نمونه‌های سرطانی دقت تشخیص و حساسیت بیشتری نسبت به شناسایی بیومارکرهای تکی نشان می‌دهند. بنابراین تقاضای ضروری برای ایجاد یک پلتفرم مراقبت ویژه در تشخیص سرطان با اختصاصیت و دقت بالا وجود دارد، که قیمت مناسب و سهولت استفاده داشته باشد [۱].

غربالگری و تشخیص زود هنگام CRC، برای یافتن یک راهکار درمانی مناسب و بقای طولانی مدت بسیار مهم است. چندین رویکرد شامل کولونوسکوپی، سیگمئیدوسکوپی، آزمایش مدفوع، آزمایش خون (FOBT)، نشانگرهای زیستی سرم مانند آنتی ژن جنینی (CEA) و آنتی ژن کربوهیدرات ۱۹-CA۹، همراه با تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI) و پرتونگاری کامپیوتری

آن با تکنیک نانوبیوسنسور است. شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR برای پرایمر APC در جدول ۱ آمده است.

معرف‌ها:

DNA تک رشته‌ای به عنوان کاوشگر، توالی هدف یا تارگت مکمل سنتتیک، برای توالی‌های خاص ژن APC طراحی گردید. که توالی‌ها توسط شرکت bioneer کره سنتز شدند. کاوشگرهای مربوط به ژن APC بر اساس توالی مشخص در انسان با استفاده از نرم افزار oligoY طراحی شدند. انتهای ۵' پروب مربوط به ژن APC با FAM نشاندار شد و انتهای ۳' پروب ۲ مربوط به ژن APC با عامل آمین (NH₂) عاملدار شد. پروب با عامل آمین (NH₂) روی سطح نانوذره کربنی با عامل COOH به صورت کوالانسی تثبیت گردید. بدین منظور در یک ظرف شیشه‌ای نانولوله کربنی با غلظت ۱۰۰ μg/ml، محلول تازه تهیه شده‌ی EDC.HCl با غلظت ۱۰ mM، سدیم کلرید ۲۵ mM و DNA اصلاح شده با آمین به غلظت ۲ μM، آماده گردید. مخلوط با استفاده از بافر PBS به غلظت ۲۵ mM و pH=6 به حجم ۵۰۰ μl 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 ۱۴/۵ rpm سانتیفریوژ گردید. به منظور خارج شدن DNA واکنش نکرده و EDC.HCl رسوبات بدست آمده دو مرتبه با آب دیونیزه (۲×۳۰) شسته شدند. در نهایت رسوبات حاصل در ۱۰۰ μl آب دیونیزه دیسپرس شده و در دمای ۴C نگهداری شدند.

اتصال پروب با عامل آمین (NH₂) به پروب FAM در حضور توالی تارگت انجام شد. سپس دناتوراسیون انجام شد که کانژوگه FAM-Lprobe + MWCNT از توالی تارگت جدا شود.

DNA تک رشته‌ای به عنوان کاوشگر، توالی هدف یا تارگت مکمل سنتتیک، برای miR-21 طراحی گردید. که توسط bioneer کره سنتز شدند.

کاوشگرهای miR-21 با استفاده از نرم افزار oligoY طراحی شدند. انتهای ۵' پروب مربوط به miR-21 با فلوروفور ROX نشاندار شده است. محلول استوک پروب های ssDNA تهیه شده با حل کردن لیگنونوکلئوتیدها در آب استریل با pH خنثی (7,0) تهیه شد و در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. نانومواد شامل یک نانولوله کربنی چند دیواره از سیگما آلدريج، ایالات متحده آمریکا تامین شد.

توالی پرایمر و کاوشگرهای ژن APC و کاوشگرهای miR-21 در جدول ۲ آمده است.

فاکتور کلیدی برای شروع، پیشرفت و متاستاز انواع گسترده‌ای از تومورها با عملکرد هدف‌گیری ژن‌های سرکوبگر تومور متعدد تایید می‌کنند. miR-21 یکی از اولین "oncomiRs" سرطان زا است نقش قابل توجهی در چرخه سلول، آپوپتوز، مهاجرت، تمایز و خودتجدیدی سلول بنیادی دارند و نسبت بزرگی از این اهداف در شروع سرطان، ترانسفورماسیون، تهاجم و متاستاز درگیر می‌باشند [۱۷،۱۸].

لذا هدف ما در این پروژه طراحی یک بیوسنسور نوری است که بتواند همزمان چند مارکر سرطانی را شناسایی کند، که در واقع به عنوان یک ابزار سریع، کم هزینه و قابل اطمینان به تشخیص زودهنگام سرطان کولورکتال کمک کند. که در این طرح، ارزیابی شاخص‌های مولکولی شامل شناسایی توالی miR-21 و ژن APC در DNA آزاد توموری (ctDNA) بررسی شد.

روش کار:

نمونه‌برداری و استخراج ctDNA و miRNA در پلاسما: نمونه خون (۲ میلی لیتر از هر بیمار)، با رضایت آگاهانه، در لوله‌های حاوی EDTA و در مراحل مختلف سرطان جمع‌آوری شد. نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ rpm سانتیفریوژ شدند و بار دیگر به مدت ۳ دقیقه در دور rpm ۱۱۰۰۰ سانتیفریوژ شدند تا پلاسما استخراج شود. پلاسما ظرف ۶ ساعت پس از جمع‌آوری خون جداسازی شد و از پلاسمای جدا شده جهت استخراج ctDNA و miRNA استفاده گردید.

استخراج miRNA از پلاسمای بیماران سرطانی با استفاده از کیت miRNeasy صورت گرفت. مقدار RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر (UV1800, SHIMADZU) از جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر محاسبه شد و سپس بر اساس محاسبات خلوص RNA بر اساس نسبت‌های A260/A280 محاسبه شد.

جهت 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 گردید و سپس محاسبات خلوص DNA بر اساس نسبت‌های A260/A280 محاسبه شد. بررسی کیفی DNA با استفاده از ژل الکتروفورز محاسبه شد. در این تحقیق، یک جفت پرایمر مربوط به ژن APC جهت تقویت DNA ژنومی طراحی و به کار برده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، PCR معمولی جهت تقویت ناحیه و تکثیر قطعه خاصی از کروموزوم 5q22 جهت بهینه‌سازی زیست حسگر DNA و به دست آوردن حساسیت PCR و مقایسه عملکرد

یافته‌ها:

بیوسنسور مورد نظر برای FAM و ROX به صورت دوگانه ساخته شد و پاسخ آن ارزیابی شد. در تشخیص همزمان نیز پارامترهای غلظت پروب، زمان تثبیت، غلظت و مقدار نانوذره کربنی، PH بافر، مقدار تارگت و زمان هیبریداسیون بهینه‌سازی شد. نمایش شماتیک نانوحسگر DNA همزمان، مبتنی بر انتقال انرژی رزونانس فلورسانسی (FRET) در شکل ۱، نشان داده شده است. خصوصیات MWCNT و کونژوگه پروب FAM/ROX-MWCNT-ssDNA توسط آنالیزهای اتمی SEM و EDX تأیید شد. نتایج آنالیز مورفولوژی SEM در شکل ۲، و نتایج آنالیز عنصری EDX در شکل ۳، آورده شده است.

نتایج آنالیز اتمی:

در تشخیص همزمان طراحی بایستی به گونه‌ای باشد که پدیده FRET بین دو فلوروفور رخ دهد، نشر فلورسانسی FAM/ROX-Lprobe به صورت همزمان برپایه پدیده FRET در شکل ۴، آورده شده است. در شکل ۵، برای به دست آوردن زمان بهینه جذب FAM/ROX-Lprobe بر سطح MWCNT در داخل بافر Tris-HCl ۰/۰۲ مولار (PH=7.4) طیف نشری فلورسانسی در زمان‌های مختلف گرفته شد. بهینه زمان لازم برای جذب FAM/ROX-Lprobe بر سطح MWCNT را از رسم طیف فلورسانسی در زمان‌های مختلف به دست آوردیم. با گذشت زمان و جذب FAM/ROX-Lprobe بر سطح MWCNT، شدت نشر فلورسانسی به تدریج کاهش می‌یابد و پس از گذشت ۱۲ دقیقه برای حسگر دوگانه، شدت نشر فلورسانسی به مقدار ثابتی می‌رسد. در واقع، زمان‌های بیشتر از مقدار حد صرفاً باعث طولانی‌تر شدن آنالیز می‌شود.

در مرحله بعد، بعد از اعمال زمان‌های مختلف و مشخص شدن بهینه زمان جذب DNA پروب بر سطح MWCNT، جهت تعیین مقدار بهینه نانولوله کربنی برای خاموشی نشر فلورسانسی غلظت‌های مختلفی از MWCNT بررسی شد. به ازای غلظت $70 \mu\text{l}$ میکرولیتر MWCNT، برای حسگر دوگانه، بیشترین کاهش نشر فلورسانسی مشاهده گردید (شکل ۶).

سپس، برای تعیین بهترین شرایط جهت انجام فرایند هیبریداسیون تک رشته‌ای پروب با رشته هدف، ابتدا زمان لازم برای هیبریداسیون و تشکیل dsDNA ارزیابی شد. برای این منظور زمان‌های مختلف هیبریداسیون نانوحسگر DNA بر پایه MWCNT با غلظت ثابت توالی کامل سنتتیک مورد بررسی قرار گرفت. شدت نشر فلورسانسی با افزایش زمان ابتدا افزایش یافت و سپس ثابت شد. دستیابی به بیشترین میزان هیبریداسیون در محلول $10 \mu\text{l}$ میکرولیتر از رشته هدف نیازمند مدت زمان ۱۲ دقیقه

بهینه سازی تثبیت پروب ژن APC نشاندار شده با FAM و پروب miR-21 نشاندار شده با ROX روی سطح MWCNT:

برای بهینه سازی تثبیت کاوشگر اختصاصی ژن APC و miR-21 روی MWCNT، تمام شرایط‌های واکنش مانند زمان تثبیت و غلظت MWCNT بهینه شدند. واکنش با مخلوط کردن $10 \mu\text{l}$ میکرولیتر پروب FAM با غلظت (10 pM)، با $15 \mu\text{l}$ میکرولیتر MWCNT با غلظت ($50 \mu\text{g/ml}$) در حجم نهایی 2ml از بافر 20mM Tris-HCL، که شامل محلول‌های (100mM NaCl 5 mM KCl 5 mM MgCl₂) با PH 7.4 است تهیه گردید. در ویال دیگری $10 \mu\text{l}$ میکرولیتر پروب ROX با غلظت (10 pM)، با $15 \mu\text{l}$ میکرولیتر MWCNT با غلظت ($50 \mu\text{g/ml}$) در حجم نهایی 2ml از بافر 20mM Tris-HCL، تهیه گردید. دو ویال واکنش پروب FAM و ROX با هم مخلوط شدند و نشر فلورسانسی در زمان‌های مختلف بررسی شد. همچنین برای تعیین غلظت بهینه MWCNT برای خاموش کردن نشر فلورسانسی پروب‌ها، غلظت‌های مختلف MWCNT با $10 \mu\text{l}$ میکرولیتر پروب FAM (10 pM) و $10 \mu\text{l}$ میکرولیتر پروب ROX به طور همزمان مخلوط شد و در زمان بهینه تثبیت، نشر فلورسانسی خاموش گردید.

پس از آماده سازی کونژوگه FAM/ROX-Lprobe + MWCNT توسط میکروسکوپ الکترونی TEM (TEM, Zeiss EM 900 electron microscope، میکروسکوپ الکترونی SEM, SEM (Zeiss-DSM 960A microscope)، و پراش انرژی پرتو ایکس (EDX, Zeiss-DSM 960A microscope) بررسی شدند. و نشر فلورسانسی آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفلوریمتری اندازه‌گیری شد.

تشخیص توالی‌های اختصاصی APC و miR-21 توسط نانوحسگر مبتنی بر FAM/ROX-Lprobe + MWCNT:

برای بهینه سازی زمان واکنش هیبریداسیون نانوحسگر مبتنی بر FAM/ROX-Lprobe + MWCNT با DNA هدف و تارگت، با مقادیر مساوی پروب‌های بهینه شده، شدت نشر فلورسانسی در زمان‌های مختلف بررسی شد. سپس برای بهینه‌سازی غلظت واکنش هیبریداسیون، غلظت‌های مختلف DNA مکمل، با کونژوگه پروب FAM/ROX-Lprobe + MWCNT مخلوط گردید و شدت نشر فلورسانسی در بهینه زمان هیبریداسیون اندازه‌گیری شد.

در مرحله بعد، برای بررسی اختصاصیت و انتخاب پذیری زیست حسگر دوگانه مبتنی بر (FRET)، طیف فلورسانسی TDNA و mDNA (mismatch) ارزیابی شد، که در شکل ۹، بیوسنسور مورد نظر بین تارگت و mDNA تمایز قائل شده است.

پس از بهینه‌سازی پارامترهای ساخت بیوسنسور، حساسیت و تکرار پذیری پاسخ بیوسنسور، در حضور یک مقدار مشخص از تارگت ارزیابی شد. همانطور که در شکل ۱۰، قابل مشاهده هست شدت نشر فلورسانسی بیوسنسور در هر چهار تکرار یکسان بوده و تفاوت معناداری بین شدت نشر فلورسانسی در چهار تکرار ارزیابی شده، مشاهده نشد که حاکی از آن است که بیوسنسور طراحی و ساخته شده تکرارپذیری قابل قبولی را از خود نشان داده است. در شکل ۱۱، نیز نتایج طیف FT-IR مربوط به MWCNT و MWCNT-ssDNA نشان داده شده است.

جهت هیبریداسیون همزمان FAM/ROX-Lprobe می‌باشد. بنابراین بهینه زمان بدست آمده برای هر نانوحسگر ساخته شده برای مطالعات بعدی به عنوان بهترین زمان برای انجام هیبریداسیون انتخاب شد (شکل ۷).

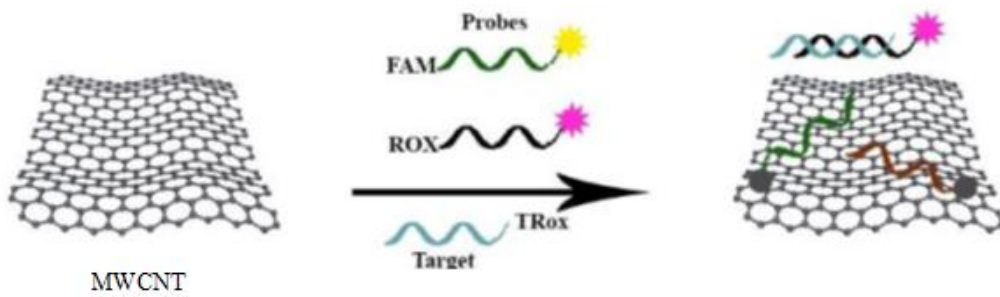
در مرحله، بعد تاثیر غلظت‌های مختلف رشته مکمل سنتتیک بر شدت نشر فلورسانسی نانوحسگر به صورت همزمان بررسی شد. که طی آن با افزایش غلظت Target، کاوشگر بیشتری از سطح نانولوله کربنی جدا شده و به دلیل تشکیل زنجیره دوتایی DNA بیشتر، نشر فلورسانسی افزایش می‌یابد اما بعد از اشباع شدن هیبریداسیون، شدت نشر فلورسانسی به مقدار ثابتی می‌رسد. یعنی در این غلظت بیشترین مقدار از توالی پروب جدا شده از سطح نانولوله کربنی درگیر پدیده هیبریداسیون است. در نانوحسگر دوگانه با $150 \mu\text{M}$ میکرولیتر غلظت تارگت، بیشترین افزایش نشر فلورسانسی مشاهده شد (شکل ۸).

جدول ۱. شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR برای پرایمر APC

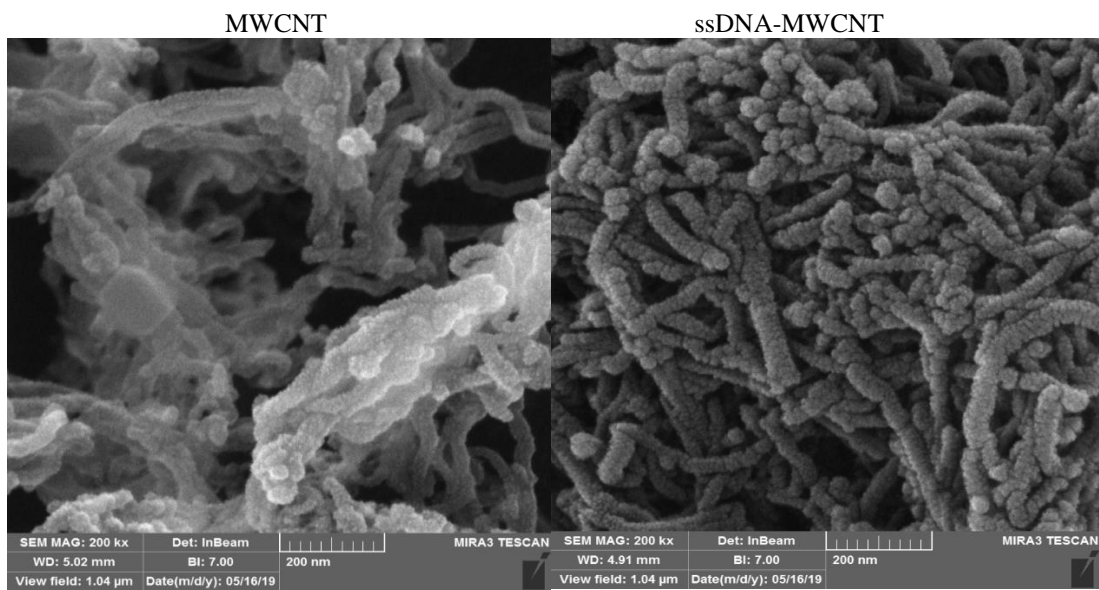
Step number	Step name	Temperature (°C)	Time
1	Initial denaturation	95	5 min
2	Denaturation	94	45 s
3	Annealing	58	45 s
4	Extension	72	60 s
5	Go to step 2	36 cycles	
6	Final extension	72	10 min

جدول ۲. توالی های پرایمر و پروب طراحی شده برای ژن APC و miR-21-5p

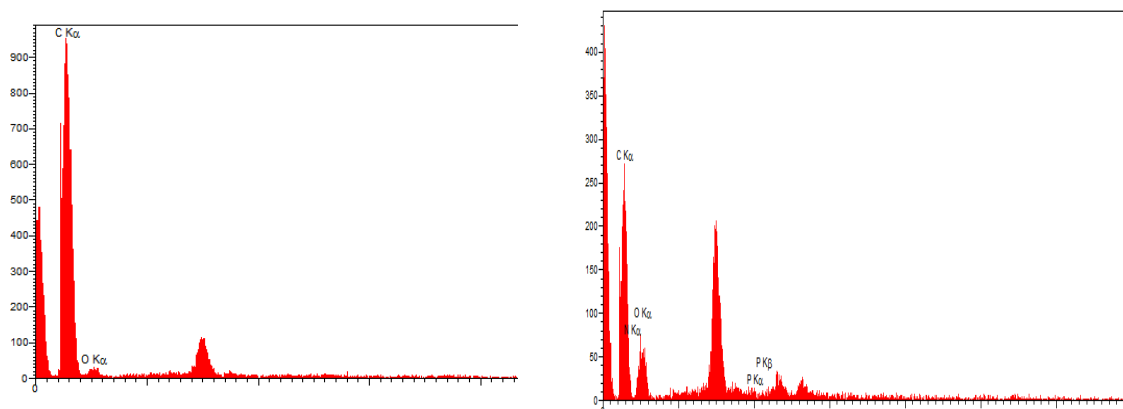
نام ژن (Gene)	موقعیت کروموزومی (Location)	نام توالی	توالی پرایمر و پروب (Sequences)
miR-21-5p	17q23.1	miR-21-Lprobe Target mDNA	5'-ROX- TAGCTCGGTCAACATCAGTCTGATAAGCTAAAC -3' 5'- TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3' 5'-TTGCTTGTGCAACTGATCTTGA-3'
APC	5q22.2	APC-F APC-R Probe1 Probe2 T dt	5'- GATCTTCAGCTGACCTAGTTCCAA-3' 5'- CAGATTCTGCTAATACCCTGCAA-3' 5'-FAM-CCCTGCAATAGCAGAAAAGA-3' 5'- AAAGATTGGAAGTCTAGGTC-NH2-3' GACCTAGTTCCAATCTTTTCTTTTCTGCTATTGCAGGG GACCTAGTTCCAATCTTTTAGGCTCTGCTATTGCAGGG



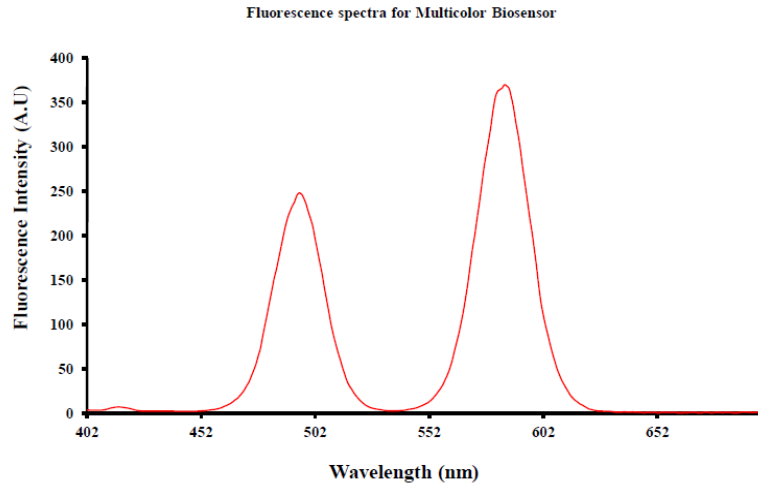
شکل ۱. نمایش شماتیک حسگر DNA همزمان بر اساس نانوذرات کربنی



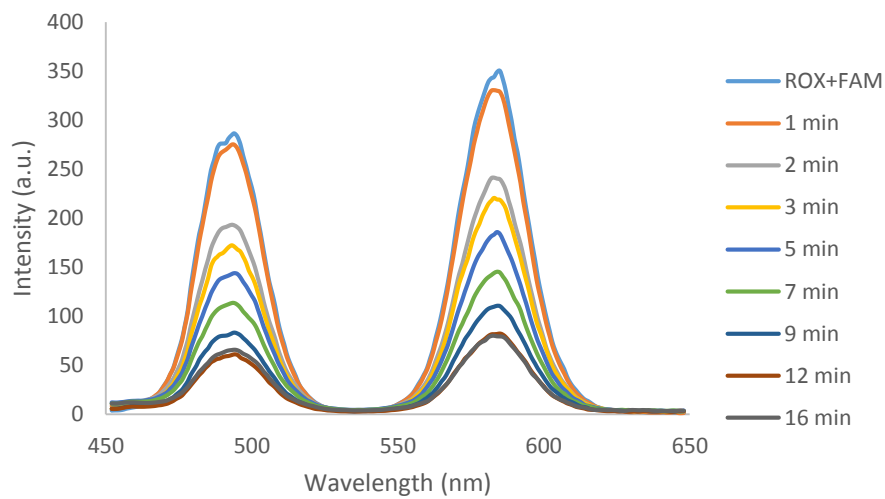
شکل ۲. (الف) تصویر SEM از MWCNT، (ب) تصویر SEM از کونژوگه پروب MWCNT-ssDNA



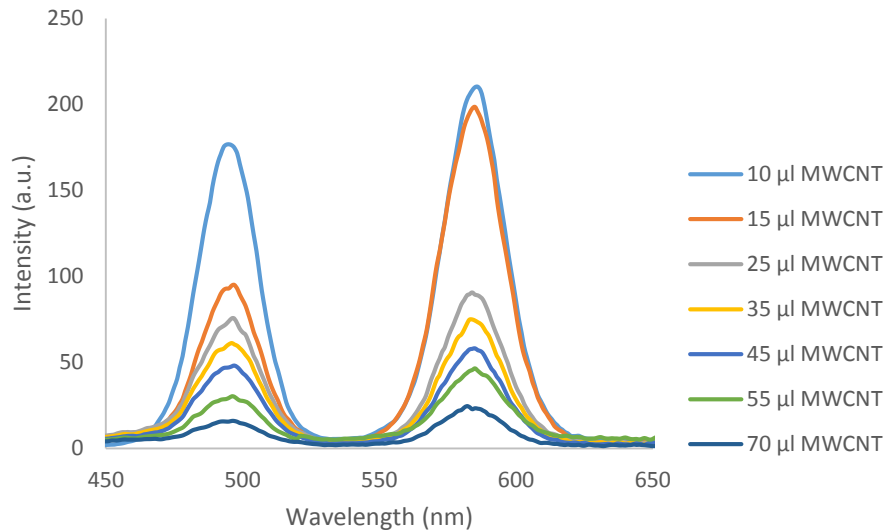
شکل ۳. (الف) طیف EDX از MWCNT، (ب) طیف EDX حاوی عناصر P و N در کونژوگه FAM-Lprobe+ MWCNT



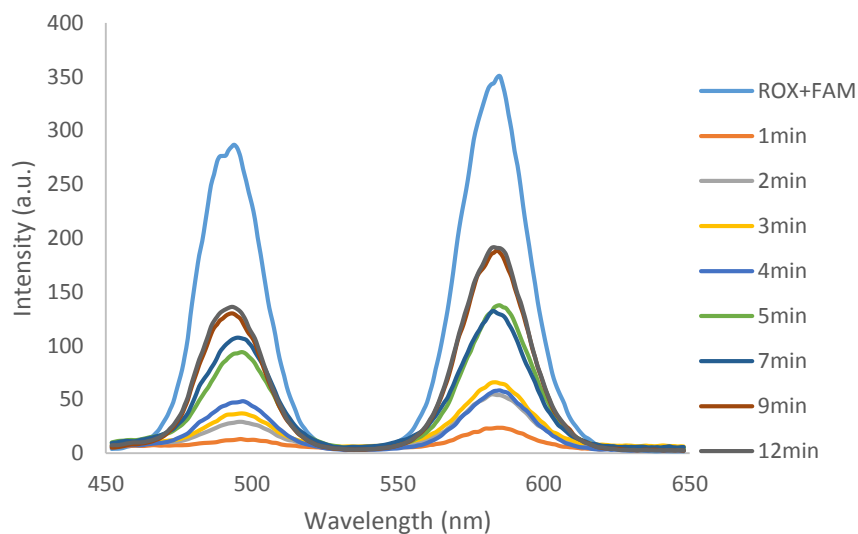
شکل ۴. نشر فلورسانسی FAM/ROX-Lprobe به صورت همزمان برپایه پدیده FRET



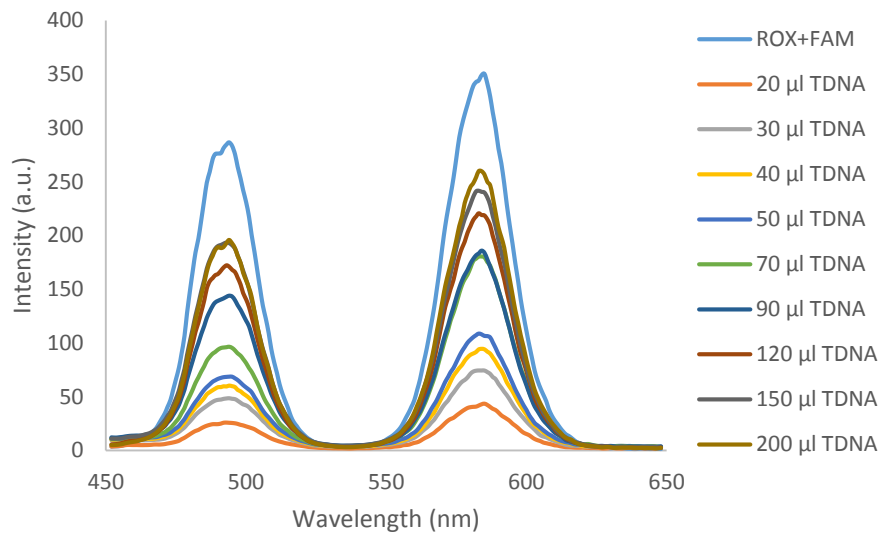
شکل ۵. تعیین بهینه زمان جذب و تثبیت FAM/ROX-Lprobe بر سطح MWCNT به صورت همزمان در زمان های مختلف. برای به دست آوردن زمان بهینه جذب FAM/ROX-Lprobe بر سطح MWCNT، در زمان های مختلف طیف فلورسانسی رسم شد. با گذشت زمان و جذب FAM/ROX-Lprobe بر سطح MWCNT، شدت نشر فلورسانسی به تدریج کاهش یافته و پس از گذشت ۱۲ دقیقه برای حسگر دوگانه، شدت نشر فلورسانسی به مقدار ثابتی رسید.



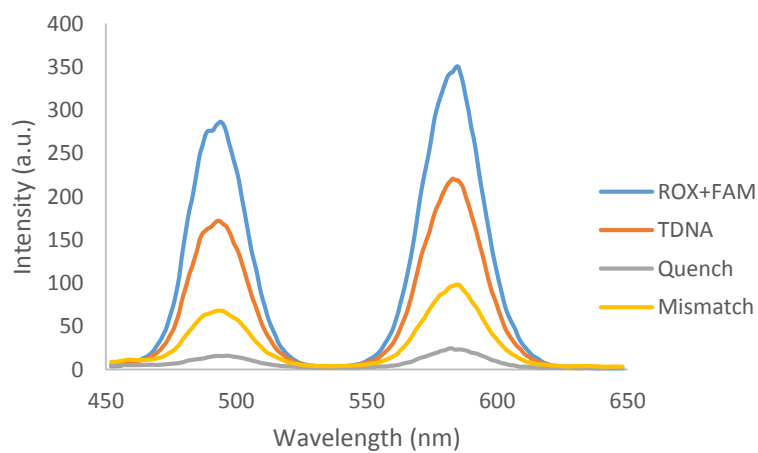
شکل ۶. طیف فلورسانسی اسکن همزمان در حضور غلظتهای مختلف MWCNT (1 mg/ml) جهت خاموشی کامل نشر فلورسانسی. بعد از اعمال زمان های مختلف و مشخص شدن بهینه زمان جذب DNA پروب بر سطح MWCNT، جهت تعیین مقدار بهینه نانولوله کربنی برای خاموشی نشر فلورسانسی غلظت های مختلفی از MWCNT بررسی شد. به ازای غلظت ۷۰ میکرولیتر MWCNT، برای حسگر دوگانه، بیشترین کاهش نشر فلورسانسی مشاهده گردید.



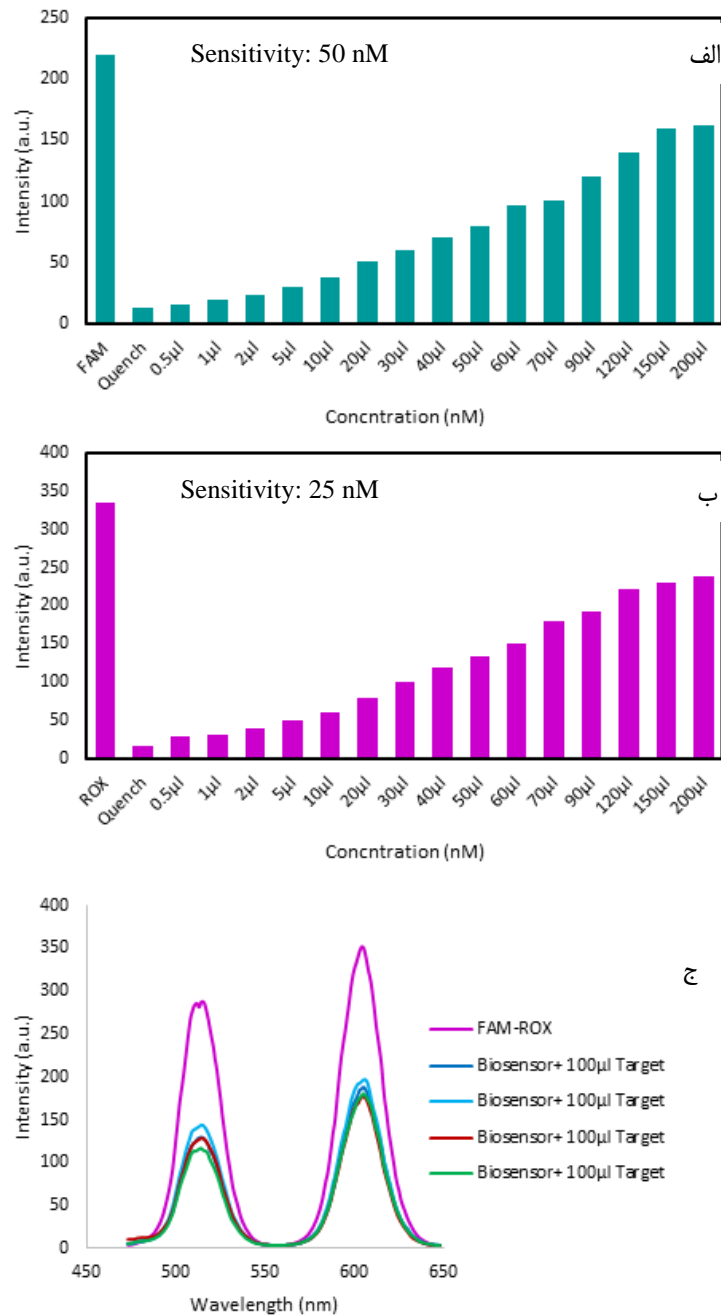
شکل ۷. طیف فلورسانسی نانوحسگر زیستی (FAM/ROX-Lprobe + MWCNT) در حضور رشته هدف سنتتیک در زمان های مختلف به صورت همزمان. برای تعیین بهترین شرایط جهت انجام فرایند هیبریداسیون تک رشته ای پروب با رشته هدف، ابتدا زمان لازم برای هیبریداسیون و تشکیل dsDNA ارزیابی شد. دستیابی به بیشترین میزان هیبریداسیون در رشته هدف، نیازمند مدت زمان ۱۲ دقیقه، جهت هیبریداسیون همزمان FAM/ROX-Lprobe می باشد.



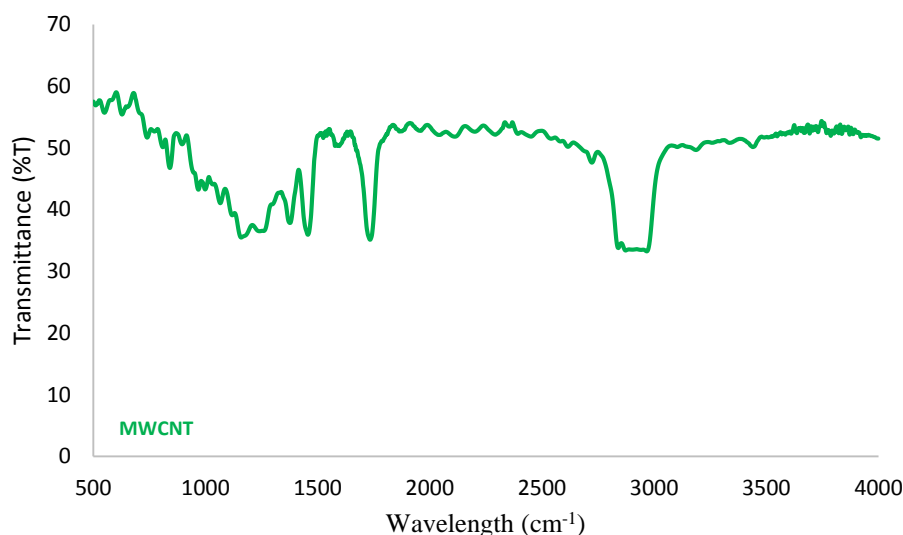
شکل ۸. طیف فلورسانسی نانوحسگر زیستی (FAM/ROX-Lprobe + MWCNT) در حضور غلظت های مختلف DNA target. در این مرحله تاثیر غلظت های مختلف رشته مکمل سنتتیک بر شدت نشر فلورسانسی نانوحسگر به صورت همزمان بررسی شد. در نانوحسگر دوگانه در $150 \mu\text{l}$ میکرولیتر غلظت تارگت، بیشترین افزایش نشر فلورسانسی مشاهده شد.



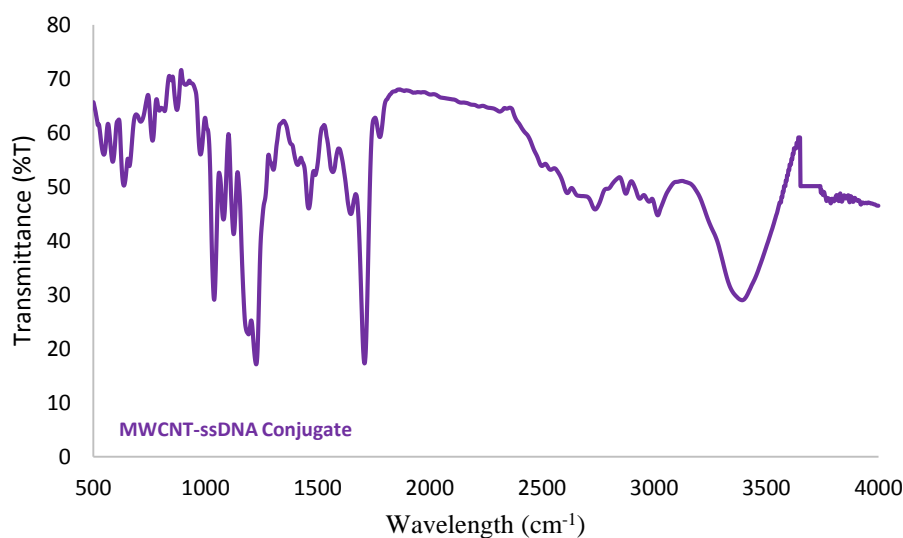
شکل ۹. بررسی اختصاصیت و انتخاب پذیری زیست حسگر دوگانه مبتنی بر (FRET). طیف فلورسانسی TDNA و mDNA (mismatch) ارزیابی شد، و زیست حسگر مورد نظر بین تارگت و mDNA تمایز قائل شده است.



شکل ۱۰. بررسی حساسیت و تکرار پذیری. الف: بررسی حساسیت فلوروفور FAM. ب: بررسی حساسیت فلوروفور ROX. ج: تکرار پذیری: پس از بهینه‌سازی پارامترهای ساخت بیوسنسور، پاسخ بیوسنسور در حضور یک مقدار مشخص از تارگت، ارزیابی شد. همانطور که در شکل بالا قابل مشاهده هست شدت نشر فلورسانسی بیوسنسور در هر چهار تکرار یکسان بوده و تفاوت معناداری بین شدت نشر فلورسانسی در چهار تکرار ارزیابی شده مشاهده نشد که حاکی از آن است که بیوسنسور طراحی و ساخته شده تکرار پذیری قابل قبولی را از خود نشان داده است.



الف



ب

شکل ۱۱. در شکل الف، از طیف FT-IR مربوط به MWCNT نوارهای زیر مشاهده شد: ارتعاش کششی گروه های O-H به عنوان یک اوج در 3436 cm^{-1} ، ارتعاشات C=O در 1725 cm^{-1} ، کشش C=C در 1454 cm^{-1} و ارتعاشات C-O در 1160 cm^{-1} مشاهده شد. شکل ب، طیف FT-IR از MWCNT-ssDNA نشان داده شده است که می توان پیک وسیعی را در 3318 cm^{-1} برای حالت های کشش O-H گروه های COOH- و 3012 cm^{-1} برای N-H قسمت های آمید مشاهده کرد.

بحث:

می دهند. بنابراین تقاضای ضروری برای ایجاد یک پلتفرم مراقبت ویژه در تشخیص سرطان با اختصاصیت و دقت بالا وجود دارد، که قیمت مناسب و سهولت استفاده داشته باشد. لذا هدف ما در این پروژه طراحی یک بیوسنسور نوری است که بتواند همزمان چند مارکر سرطانی را شناسایی کند، که در واقع به عنوان یک ابزار سریع، کم هزینه و قابل اطمینان به تشخیص زودهنگام سرطان کلورکتال کمک کند [۱].

از بین بیماری های مختلف، سرطان دومین (در برخی کشورها، نخستین) عامل مرگ و میر انسان ها در سراسر دنیا است. بنابراین شناسایی اولیه بیومارکرهای اختصاصی در سرطان ها یک گام اساسی در درمان است. اخیراً تجزیه و تحلیل چندگانه بیومارکرها نتایج خیلی دقیق و با حداقل درصد خطا ارائه کرده است. آنالیز بیومارکرهای چندگانه در نمونه های سرطانی دقت تشخیص و حساسیت بیشتری نسبت به شناسایی بیومارکرهای تکی نشان

کمک هلیکاز ۲ مرتبه بزرگتر از آنهاست که فاقد آنزیم هستند. در همین حال، پلتفرم جدید تشخیصی به طور چشمگیری زمان تشخیص miRNA را از ۴ ساعت به ۵۰ دقیقه کاهش می‌دهد. کاربرد گسترده هلیکازها در پروب‌های سنجاق سری و ویژگی انتخابی پلتفرم HCR/GO برای تارگت‌ها، پتانسیل زیادی برای آنالیز miRNA ها و سایر مولکول‌های زیستی به همراه دارد [۲۰]. Wang و همکاران، یک بیوسنسور فلورسانسی با واسطه نانوصفحه MnO₂ برای تشخیص miRNA در سلول‌های زنده طراحی کردند. کاوشگر نشاندار شده با FAM به عنوان دهنده فلورسانس و کاوشگر نشاندار شده با TAMRA به عنوان گیرنده فلورسانس است که در شناسایی miRNA-21 با حد تشخیص (pM) ۷۳ استفاده گردید [۲۱].

Ji و همکاران، از دو کاوشگر فلورسنتی (NMM و DAPI) برای شناسایی miRNA-21 و miRNA-125b مرتبط با سرطان استفاده کردند که قادر به شناسایی و تشخیص miRNA ها با حد تشخیص پایین (pM) ۳,۱ در نمونه‌های بیولوژیکی بود [۲۲]. Zhou و همکاران، یک بیوسنسور فلورسنتی با استفاده از نانوصفحات نیتريد کربن (PDCN) به عنوان پلتفرم خاموش‌کننده فلورسنتی و نانوحامل پروب‌های ROX-ssDNA، به عنوان کاوشگر فلورسنتی پیشنهاد دادند. این حسگر زیستی برای تشخیص miRNA-224 با حد تشخیص (LOD)، (pM) ۲۰۰ استفاده گردید [۲۳].

در مطالعه ای دیگر، بیوسنسور فلورسانسی با واسطه آگزونوکلئاز T7 برای تعیین miRNA-21، با استفاده از کوانتوم دات‌ها (CDs) و ssDNA نشاندار شده با FAM، طراحی شد. مقدار FFAM/FCDs رابطه خطی خوبی با غلظت miRNA-21 در محدوده ۰,۰۵-۱۰ نانومولار را نشان داد و حد تشخیص miRNA-21 با گزینش‌پذیری و تکرارپذیری عالی (pM) ۱ به دست آمد [۲۴]. در مطالعه‌ای دیگر، زیست حسگر دیگری با واسطه نانو صفحات C3N4 و کاوشگر نشاندار شده با CuNC طراحی شد. این حسگر برای تشخیص miR-582-3p با حد تشخیص (pM) ۰,۰۴۹، به صورت خطی عمل می‌کرد (۲۵). در مطالعه ای دیگر، یک بیوسنسور فوتو الکتروشیمیایی (PEC) مبتنی بر نانوهیبرید MoS₂@Ti₃C₂ برای تشخیص miRNA ها طراحی شد. از نظر گزینش‌پذیری، بیوسنسور PEC قادر است miR-92a-3p را از توالی‌های نامتناسب با حد تشخیص (pM) ۰,۰۳۱ شناسایی کند [۲۶].

در مطالعه ما، زیست حسگر نشاندار شده با FAM و ROX قادر به تشخیص APC و miR-21-5p بود که LOD و LOQ بیوسنسور DNA به صورت تکی به ترتیب ۱,۱۲ نانومولار و ۳,۲ میکرومولار تعیین گردید.

در این مطالعه، از پلتفرم بیوسنسور برای تشخیص همزمان توالی اختصاصی ژن APC، و توالی miR-21-5p استفاده شد. پروب ssDNA نشاندار شده با ماده فلوروفور ROX به عنوان کاوشگر miR-21-5p و پروب ssDNA نشاندار شده با ماده فلوروفور FAM به عنوان کاوشگر APC انتخاب شدند [۱۹]. همچنین تعیین توالی ژن APC و miR-21-5p براساس بیوسنسور DNA فلوریمتری انجام شد.

برای افزایش تکرارپذیری 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 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 برای کاوشگر ژن APC و miR-21-5p تهیه گردید و با میکروسکوپ الکترونی SEM و آنالیز EDX تأیید شد.

در غیاب cDNA، MWCNT به پروب ssDNA نشاندار شده با FAM و ROX متصل شده و نشر فلورسانسی هر دو فلوروفور را خاموش می‌کند. در مقابل، در طول هیبریداسیون در حضور cDNA، پروب نشاندار شده با FAM و ROX از سطح MWCNT آزاد شده و یک کمپلکس DNA دو رشته‌ای را با توالی هدف تشکیل دادند و برگشت نشر فلورسانسی مشاهده شد. هدف از این مطالعه طراحی و توسعه حسگر زیستی نوری مبتنی بر DNA و نانوذرات کربنی برای تشخیص زودهنگام سرطان کولورکتال با استفاده از دو بیومارکر APC در ctDNA و miR-21-5p به صورت همزمان بود.

نانومواد دو بعدی به طور گسترده‌ای به عنوان پلت فرم‌های خاموش‌کننده فلورسنتی و نانوحامل‌های پروب‌های اسید نوکلئیک نشاندار شده با فلوروفور برای طراحی نانو کاوشگرها برای تشخیص فلورسانسی microRNA های درون سلولی استفاده شده‌اند.

XiaoJun Fan و همکاران در سال ۲۰۱۷، هلیکاز RecQE، را با استفاده از مکانیسم مولکولی HCR در تشخیص miRNA با GO به عنوان نانوکوانچر در شرایط آزمایشگاهی برای اولین بار معرفی کردند. یک رویکرد جدید سیگنال امپلیفیکیشن به کمک هلیکاز برای تشخیص miRNA در این کار توسعه یافته است. ترکیبی از فعالیت زیستی هلیکازها در بازکردن ساختار سنجاق سری کاوشگرها با استراتژی HCR/GO برای تقویت سیگنال، پلتفرم سنجشی جدیدی برای تشخیص miRNA با حساسیت و کارایی بالا را نشان می‌دهد. حساسیت پلتفرم سنجش HCR/GO به

قوی برای کاربردهای تحقیقاتی و تشخیصی است. در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داده شناسایی miR-21 و ژن APC در ctDNA با استفاده از نانوحسگرزیستی بر پایه نانولوله های کربنی می تواند به عنوان ابزار قدرت مندی در کنار روش های PCR جهت شناسایی تومور مارکرها مورد استفاده قرار گیرد. نتایج نشان داد انتظار می رود حسگر طراحی و ساخته شده بتواند با توالی اختصاصی ژن APC و توالی miR-21-5p هیبریداسیون قابل توجهی انجام دهد و در نتیجه شدت نشر فلورسانسی قابل ملاحظه ای مربوط به هیبریداسیون ثبت شود.

تشکر و قدردانی:

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 می باشد.

تضاد منافع:

نویسندگان هیچ تضاد منافع را گزارش نمی کنند.

در مطالعه ما، رنگ فلورسنسی FAM برای نشاندار کردن کاوشگر APC، و رنگ فلورسنسی ROX برای نشاندار کردن کاوشگر miR-21-5p استفاده گردید. وقتی نور از دستگاه به محلول تابیده شد Fam برانگیخته شده چون ناپایدار است باید به تراز انرژی اولیه خود برگردد و در این هنگام Emission را از خود نشان داده و انرژی را به ROX انتقال داده و ROX نیز طیف نشری فلورسانسی را از خود نشان می دهد.

ابتدا کاوشگر APC و کاوشگر miR-21-5p روی سطح MWCNT تثبیت شدند. کاوشگر APC دارای بیشینه نشر فلورسانسی در ۵۲۰ نانومتر بود، و کاوشگر miR-21-5p دارای بیشینه نشر فلورسانسی در ۶۰۵ نانومتر بود که با تثبیت در سطح MWCNT خاموش شدند و نشر فلورسانسی در هردو کاوشگر کوانچ شد. بعد از افزودن توالی مکمل پروب ها و انجام واکنش هیبریداسیون، نشر فلورسانسی برگشت داده شد. تغییرات شدت نشر فلورسانسی با غلظت ssDNA به صورت خطی بود. این نانوبیوسنسور DNA ساخته شده یک روش ساده، حساس و سریع برای تعیین همزمان توالی ژن APC و miR-21-5p در نمونه های واقعی پلاسما را ارائه داد.

نتیجه گیری:

حسگر زیستی چندگانه و همزمان APC و miR-21-5p به دلیل گزینش پذیری قوی، پایداری بالا و تکرارپذیری خوب، ابزاری

References:

- Gaikwad PS, Banerjee R. Advances in point-of-care diagnostic devices in cancers. *Analyst*. 2018;143(6):1326-48.
- Jia S, Zhang R, Li Z, Li J. Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(33):55632.
- Chadha U, Bhardwaj P, Agarwal R, Rawat P, Agarwal R, Gupta I, et al. Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2022-۱۰۹:۲۱; ۵۱
- Purohit B, Vernekar PR, Shetti NP, Chandra P. Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis. *Sensors International*. 2020;1:100040.
- Campuzano S, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. Carbon dots and graphene quantum dots in electrochemical biosensing. *Nanomaterials*. 2019;9(4):634.
- Ferlizza E, Solmi R, Sgarzi M, Ricciardiello L, Lauriola M. The roadmap of colorectal cancer screening. *Cancers*. 2021;13(5):1101.
- Kaminski MF, Robertson DJ, Senore C, Rex DK. Optimizing the quality of colorectal cancer screening worldwide. *Gastroenterology*. 2020;158(2):404-17.
- Arya SK, Estrela P. Recent advances in enhancement strategies for electrochemical ELISA-based immunoassays for cancer biomarker detection. *Sensors*. 2018;18(7):2010.
- Rizk EM, Gartrell RD, Barker LW, Esancy CL, Finkel GG, Bordbar DD, et al. Prognostic and predictive immunohistochemistry-based biomarkers in cancer and immunotherapy. *Hematology/Oncology Clinics*. 2019;33(2):291-9.
- Buono A, Lidbury J, Wood C, Wilson-Robles H, Dangott L, Allenspach K, et al. Development, analytical validation, and initial clinical evaluation of a radioimmunoassay for the measurement of soluble CD25 concentrations in canine serum. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2019;215:109904.
- Xie Q, Weng X, Lu L, Lin Z, Xu X, Fu C. A sensitive fluorescent sensor for quantification of alpha-fetoprotein based on immunosorbent assay and click chemistry. *Biosensors and bioelectronics*. 2016;77:46-50.
- Yang X, Zhao Y, Sun L, Qi H, Gao Q, Zhang C. Electrogenerated chemiluminescence biosensor array for the detection of multiple AMI biomarkers. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018;257:60-7.
- Issaq HJ, Veenstra TD. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*. 2008;44(5):697-700.

14. Mehta PK, Raj A, Singh NP, Khuller GK. Detection of potential microbial antigens by immuno-PCR (PCR-amplified immunoassay). *Journal of medical microbiology*. 2014;63(5):627-41.
15. Nelson S, Näthke IS. Interactions and functions of the adenomatous polyposis coli (APC) protein at a glance. *Journal of cell science*. 2013;126(4):873-7.
16. Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer letters*. 2009;285(2):116-26.
17. Peng Q, Zhang X, Min M, Zou L, Shen P, Zhu Y. The clinical role of microRNA-21 as a promising biomarker in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(27):4. ۴۸۹۳
18. Ma X, Kumar M, Choudhury SN, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Kanakamedala K, et al. Loss of the miR-21 allele elevates the expression of its target genes and reduces tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(25):10-۱۴۴ .۹
19. Heydari N, Nikbakhsh N, Sadeghi F, Farnoush N, Khafri S, Bastami M, et al. Overexpression of serum MicroRNA-140-3p in premenopausal women with newly diagnosed breast cancer. *Gene*. 2018;655:25-9.
20. Robertson NM, Toscano AE, LaMantia VE, Hizir MS, Rana M, Balcioglu M, et al. Unlocked Nucleic Acids for miRNA detection using two dimensional nano-graphene oxide. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;89:551-7.
21. Wang S, Wang L, Xu X, Li X, Jiang W. MnO₂ nanosheet-mediated ratiometric fluorescence biosensor for MicroRNA detection and imaging in living cells. *Analytica Chimica Acta*. 2019;1063:152-8.
22. Ji D, Mou X, Kwok CK. Label-free and ratiometric detection of microRNA based on target-induced catalytic hairpin assembly and two fluorescent dyes. *Analytical Methods*. 2019;11(37):4808-13.
23. Zhou D, Liu X, Liu X, Xu Y, Chen R, Lin C, et al. Ratiometric fluorescent biosensor for microRNAs imaging in living cells. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2020;322:128632.
24. Wang Z, Xue Z, Hao X, Miao C, Zhang J, Zheng Y, et al. Ratiometric fluorescence sensor based on carbon dots as internal reference signal and T7 exonuclease-assisted signal amplification strategy for microRNA-21 detection. *Analytica Chimica Acta*. 2020;1103:212-9.
25. Wang Y, Wu N, Guo F, Gao R, Yang T, Wang J. gC₃N₄ nanosheet-based ratiometric fluorescent probes for the amplification and imaging of miRNA in living cells. *Journal of Materials Chemistry B*. 2019;7(47):7566-73.
26. Sun Z, Tong Y, Zhao L, Li J, Gao F, Wang C, et al. MoS₂@Ti₃C₂ nanohybrid-based photoelectrochemical biosensor: a platform for ultrasensitive detection of cancer biomarker exosomal miRNA. *Talanta*. 2022;238:123077.

Designing a fluorescence nanobiosensor for early detection of colorectal cancer using APC and miR-21-5p probes simultaneously

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

Received: 2023.04.08

Revised: 2023.10.29

Accepted: 2023.12.15

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, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.2, Summer 2023

Pars J Med Sci 2023;21(2):53-67

Abstract:

Introduction:

APC gene in ctDNA and miR-21-5p have been proposed as potential biomarkers for cancer diagnosis.

Materials and Methods:

In this above study, a biosensor based on multi-walled carbon nanotube (MWCNT) and DNA probe with fluorophore FAM (6-carboxyfluorescein) to detect APC gene in ctDNA, and DNA probe with fluorophore ROX (5-carboxy-x-rhodamine) to detect miR-21-5p, was designed to identify patients with colorectal cancer (CRC). This method is based on the adsorption and stabilization of single-stranded DNA (ssDNA) labeled with FAM and ROX on MWCNT, which leads to the quenching of the fluorescence emission of FAM and ROX. By adding their complementary DNA (cDNA), which led to the release of single-stranded DNA (ssDNA) probes from the MWCNT surface and a double-stranded DNA (dsDNA) was formed, which led to the return of FAM and ROX fluorescence emission.

Result:

In this study, the sensitivity of FAM fluorophore was 50 nM (50 nM) and the sensitivity of ROX fluorophore was 25 nM (25 nM). The response time in the presence of the target strand is 12 minutes. The LOD and LOQ of DNA biosensor individually were 1.12 nM and 3.2 μ M, respectively.

Conclusion:

The results of this study showed that the biosensor based on carbon nanotubes and DNA probe, in addition to existing methods, can be used as a high-sensitivity method for early detection of CRC.

Keywords: Nanobiosensor, Genosensor, Carbon Nanoparticles, Biomarker, Fluorescence

* Corresponding author Email: L_takbiri@iau-tnb.ac.ir