Archive of SID

Modares Journal of Biotechnology
Volume 11, Issue 1, Winter 2020
Pages: 119-126
Type: Original Research

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

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

[1] Medical Genetic Department, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
[2] Biology Department, Sciences Faculty, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
[3] Medical Genetic Department, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Abstract

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

Keywords
Aptamer [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68052157];
DNAzyme [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Deoxyribozymes];
Breast Cancer [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68001943];
Detection [Not in MeSH];
Biosensor [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Biosensor]

*Corresponding Author
Tel: +98 (34) 31322045
Fax: +98 (34) 31322060
Post Address: Shahid Bahonar University, Pajoohesh Square, Kerman, Iran. Postal code: 7616914111
karami@uk.ac.ir
Received: April 27, 2019 Accepted: October 13, 2019 ePublished: March 14, 2020

www.SID.ir

Archive of SID

ارایه روش رنگ‌سنجی برای تشخیص سرطان سینه با استفاده از آپتامرهای اختصاصی مبتنی بر دزوکسی‌ریبوزایم

نصرالله صالح‌گوهری PhD
گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
زهرا کرمی* PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
فرید محسنی MA
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
علی کریم‌زاده MSc
گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
کتایون صدیقی MA
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده
سرطان سینه یک عامل پرخطر برای سلامت زنان محسوب می‌شود که حدود ۲۳% میزان سرطان‌ها و دومین عامل مرگ بین تمامی سرطان‌ها به شمار می‌رود. به‌دلیل پرهزینه و زمان‌بربودن روش‌های سنجش فعلی سرطان سینه، به توسعه روش‌های حساس‌تر و اختصاصی‌تر نیاز است. بیوسنسورها روش‌های حساس، اختصاصی و مقرون‌به‌صرفه‌ای هستند. همچنین به‌دلیل پاسخ سریع ناشی از محاسبه مستقیم در مایعات فیزیولوژیکی (بزاق، خون، سرم، شیر و ادرار و غیره اهمیت دارند. بیوسنسورهای بر پایه آپتامر نسبت به روش‌های سنتی برای شناسایی سلول‌های سرطانی مزیت‌هایی از جمله سرعت، سادگی و ارزان‌بودن را دارند. در این مطالعه، با اتصال دزوکسی‌ریبوزایم و آپتامر یک روش رنگ‌سنجی برای شناسایی سلول‌های سرطان سینه MCF7 ارایه شد. آپتامرهای MUC1 و PTK7 نیز به‌عنوان آپتامرهای اختصاصی برای اتصال به سلول‌های سرطانی سینه استفاده شدند. این روش ممکن است نیازی به تغییر DNA و استفاده از برچسب نداشته باشد که می‌تواند تشخیص سلول‌های سرطانی را ساده‌تر و ارزان‌تر انجام دهد. نتایج نشان دادند که این آپتامرها فعالیت قابل توجهی برای تشخیص سلول‌های سرطانی دارند، در حالی که در نمونه‌های کنترل فعالیتی مشاهده نشد. علاوه بر این، نتایج نشان دادند که یک رابطه خطی بین مقدار سلول‌های سرطانی و سیگنال رنگ‌سنجی وجود دارد. در نهایت، نتایج یک روش ارزان و راحت برای تشخیص سلول‌های سرطانی در آینده را پیشنهاد می‌کنند.

کلیدواژه‌ها: آپتامر، دزوکسی‌ریبوزایم، سرطان سینه، تشخیص، بیوسنسور

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۲۱
*نویسنده مسئول: karami@uk.ac.ir

مقدمه

طبق آمار جهانی، سرطان سینه نخستین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان است. با توجه به اینکه تشخیص به‌موقع سرطان سینه می‌تواند از مرگ و میر و هزینه‌های درمان بکاهد، استفاده از روش‌های موثر برای تشخیص زودهنگام سرطان سینه ضروری می‌کند[1-3]. روش‌های مرسوم در تشخیص سرطان سینه شامل ماموگرافی، نمونه‌گیری از بافت پستان، تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI)، سنجش ایمنی مرتبط با آنزیم یا الایزا (ELISA) و سونوگرافی هستند. علی‌رغم استفاده نسبتاً گسترده این روش‌ها در تشخیص سرطان، محدودیت‌هایی وجود دارد. برای مثال تشخیص دقیق در نمونه‌های کم دشوار و قرارگیری در معرض اشعه ایکس در روش MRI تهدیدکننده سلامتی افراد است. علاوه بر این عوامل، هزینه‌های مربوط به استفاده از یک روش تشخیصی و نیز میزان آسیب احتمالی وارد به بیمار (سطح تهاجم روش) نیز باید مورد توجه و بررسی قرار گیرد[4-6]. از این رو، درمان سرطان به چالشی بزرگ برای دانشمندان و پزشکان تبدیل شده است. در سال‌های اخیر، توجه به این امر منجر به شناسایی و استفاده از فاکتورهایی تحت عنوان بیومارکر شده است. یک بیومارکر، ترکیبی است که معمولاً از جنس پروتئین و وجود یا مقدار آن در حالت سرطانی نسبت به حالت سلامت در سلول‌ها به‌طور معنی‌داری متفاوت است. یکی از روش‌های مقرون به صرفه، سریع و دقیق به‌منظور شناسایی بیومارکرهای مختلف، استفاده از حسگرهایی است که با تکیه بر واکنشی شیمیایی، قادر به شناسایی مولکول هدف هستند[7-10].

یکی از این حسگرها، آپتامرها هستند که قابلیت قابل توجهی در یافتن بیومارکرها دارند و از ویژگی‌های برجسته‌ای همچون اندازه کوچک، هزینه‌بری کمتر و عدم سمیت‌زایی برخوردار هستند. این ساختارها می‌توانند از جنس DNA تک‌رشته‌ای یا RNA باشند که گلیکوپروتئین‌های سطح سلول‌های سرطانی و میکروRNAها را شناسایی می‌کنند و با آنها برهم‌کنش می‌دهند. سلول‌های سرطانی مختلف مارکرهای اختصاصی روی سطح خود بیان می‌کنند که باعث می‌شود از روش‌های آزمایشگاهی برای شناسایی و تشخیص این سلول‌ها استفاده شود. یکی از روش‌های جدید و با کارآیی بالا در این زمینه استفاده از آپتامرهایی است که به‌طور اختصاصی و با تمایل بالا به این مارکرها متصل می‌شوند[11-14].

از مزیت‌های این روش نسبت به روش آنتی‌بادی می‌توان به سنتز ساده، مقرون به صرفه‌بودن، حساسیت بالا و پایداری در شرایط آزمایشگاهی مثل دما، pH و رفع نیاز برای کار در محیط سرد اشاره کرد. معمولاً هدف با استفاده از یک ماده رادیواکتیو یا فلورسنت نشان‌دار می‌شود تا در صورت شناسایی توسط آپتامر، این امر به‌سادگی مشخص شود. در مطالعه حاضر، به تشخیص دو بیومارکر MUC1 و PTK7 با استفاده از روش رنگ‌سنجی مبتنی بر دزوکسی‌ریبوزایم شبه پراکسیدازی پرداخته شد.

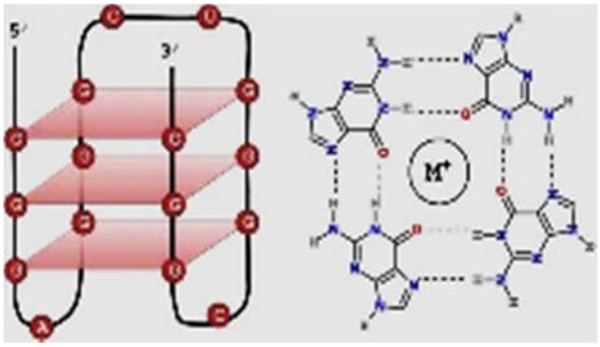
DNAهای دارای خاصیت آنزیمی را دزوکسی‌ریبوزایم (DNAzyme) می‌نامند که با استفاده از تکنیک تکامل سیستماتیک لیگاندها توسط غنی‌سازی نمایی به دست می‌آیند. از جمله دزوکسی‌ریبوزایم‌هایی که مورد استفاده قرار می‌گیرند، دزوکسی‌ریبوزایم‌های شبه پراکسیدازی هستند[15, 16]. این نوع دزوکسی‌ریبوزایم‌ها ترکیبی از DNAهای چهار رشته‌ای و هِمین (Hemin) هستند. DNAهای چهار رشته‌ای، توالی‌های

www.SID.ir

Archive of SID

نوکلئیک‌اسید غنی از گوانین، بر پایه پیوند هوگستین بین رزیدوهای گوانین و کوارتت‌های روی هم قرارگرفته هستند. این ساختارها به وسیله کاتیون‌های تک‌ظرفیتی (به‌خصوص یون پتاسیم) پایدار می‌شوند[17]. با استفاده از دزوکسی‌ریبوزایم‌های شبه پراکسیدازی شناسایی مولکول‌های زیستی مانند نوکلئیک‌اسیدها، پروتئین‌ها، نوکلئوتیدها، انواع فلزات سمی (یون‌های فلزی)، غربالگری انواع لیگاندها و کوفاکتورها و شناسایی و سنجش فعالیت تلومرازی امکان‌پذیر است. به‌طور کلی این دزوکسی‌ریبوزایم‌ها می‌توانند در طراحی انواع حسگرهای زیستی برای مولکول‌ها و ترکیبات مختلف استفاده شوند. به‌منظور ایجاد فعالیت کاتالیتیک، اولیگونوکلئوتیدهای غنی از گوانین باید یک ساختار ۴ رشته‌ای که می‌تواند به مولکول هِمین متصل شود را به دست آورند. آپتامرهای G- کوادروپلکس به‌عنوان پروب‌هایی برای تشخیص رنگ‌سنجی که یک شدت سیگنال قابل مشاهده با چشم غیرمسلح را امکان‌پذیر می‌سازد، به کار می‌روند[18-24]. این سیستم یک واکنش را بین مولکول هدف (ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) و پراکسیدهیدروژن تسهیل می‌کند که منجر به ظهور محصولات اکسیدشده ($ABTS^{+}$) و تولید رنگ سبز می‌شود (شکل ۱).

در این مطالعه، امکان تشخیص سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 با استفاده از دو آپتامر اختصاصی سرطان سینه (MUC1: The transmembrane glycoprotein Mucin 1 و PTK7: Tyrosine-protein kinase-like 7) در حضور DNA چهار رشته‌ای CatG4، با تکیه بر روش رنگ‌سنجی مورد بررسی قرار گرفته است.



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

مواد و روش‌ها

تعیین غلظت DNA

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

آماده‌سازی هِمین

استوک هِمین در DMSO با غلظت ۵میلی‌مولار تهیه و در تاریکی در دمای ۲۰°C- نگهداری شد. در هر بار استفاده از هِمین، استوک آن از فریزر ۲۰°C- خارج و با بافر ۱۰میلی‌مولار تریس- هیدروکلراید و MES محتوی نمک‌های مطالعه‌شده و ۰/۰۱% تراینون-X۱۰۰ با ۷/۴ =pH، به حجم و غلظت مورد نظر رسانده شد.

آماده‌سازی DNA چهار رشته‌ای

الیگونوکلئوتیدهای سنتزشده (جدول ۱) ابتدا با آب مقطر تزریقی به غلظت مورد نظر رسانده و سپس در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه به‌منظور ازبین‌رفتن هر گونه برهم‌کنش بین مولکولی گرما داده و به‌آرامی تا رسیدن به دمای اتاق با سرعت ۱°C در هر دقیقه سرد شدند. به همین منظور محلول DNA در دستگاه ترموسایکلومتر قرار داده شد. سپس توالی DNA در دمای اتاق به‌مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد و بعد از آن اجازه داده شد تا محلول DNA، به مدت یک ساعت برای رسیدن به ساختارهای چهار رشته‌ای در ۱۰میلی‌مولار محلول بافر تریس- هیدروکلراید و ۰/۰۱% تراینون-X۱۰۰، به‌طور مناسب تا بخورد.

جدول ۱) طراحی آپتامرهای متصل‌شونده به دزوکسی‌ریبوزیم

۵ ⟶ ۳	
ATCTAACTGCTGCGCCGCCGGGAAAATACTGTACG GTTAGACCCAACCC	**PTK7.D1**
TGGGTAGGGCGGGTTGGGTCTAACCGTACAGTA	**PTK7.D2**
GCAGTTGATCCTTTGGATACCCTGGTTTCCCAACCC	**MUC1.D1**
TGGGTAGGGCGGGTTGGGAAAC	**MUC1.D2**

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

آماده‌سازی کمپلکس هِمین DNA- چهار رشته‌ای (دزوکسی‌ریبوزایم)

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

بررسی فعالیت پراکسیدازی دزوکسی‌ریبوزایم

آماده‌سازی دزوکسی‌ریبوزایم

۲میکرولیتر از استوک محلول DNA، با غلظت ۴۰۰میکرومولار برداشته و در میکروتیوب ۰/۲میلی‌لیتری با آب مقطر تزریقی به حجم مورد نظر و غلظت ۲۵میکرومولار رسانده و در ترموسایکلومتر قرار داده شد. سپس برنامه دستگاه به گونه‌ای تنظیم شد که محلول DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C قرار بگیرد و سپس به‌آرامی با سرعت ۱°C در هر دقیقه تا دمای ۲۵°C سرد شود. در مرحله بعد، میکروتیوب از دستگاه خارج و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس ۳۲میکرولیتر بافر، ۱۰میلی‌مولار تریس- هیدروکلراید محتوی نمک‌های مطالعه‌شده و ۰/۰۱% تراینون-X۱۰۰ با ۷/۴ =pH به آن اضافه شد و اجازه داده شد، به‌منظور تشکیل DNA چهار رشته‌ای با غلظت ۱۲/۵میکرومولار، به مدت یک ساعت در

www.SID.ir

Archive of SID

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

آماده‌سازی محلول پراکسیدهیدروژن

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

آماده‌سازی محلول ABTS

۰/۴میلی‌گرم ABTS در بافر ۱۰میلی‌مولار محتوی نمک‌های مطالعه‌شده و ۰/۰۱% ترایتون-X۱۰۰ با pH= ۸ به غلظت ۱/۴۳میلی‌مولار رسانده شد.

اندازه‌گیری فعالیت پراکسیدازی دزوکسی‌ریبوزایم

۱۶میکرولیتر دزوکسی‌ریبوزایم سنتزشده درون سل کوارتز با طول یک‌سانتی‌متر ریخته شد. سپس ۱۶۸میکرولیتر ABTS با غلظت ۱/۴۳میلی‌مولار به آن اضافه و سپس ۱۶میکرولیتر پراکسیدهیدروژن با غلظت ۱۵میلی‌مولار درون سل ریخته و در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد. جذب رادیکال ABTS به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر طی زمان (صفر تا ۳۰۰ ثانیه) ثبت شد. ظهور رادیکال رنگی ABTS نشان‌دهنده انجام واکنش است که بررسی میزان جذب آن در ۴۱۴نانومتر برای آنالیزهای کمی استفاده می‌شود[8].

بهینه‌سازی غلظت دزوکسی‌ریبوزایم

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت بهینه دزوکسی‌ریبوزایم، غلظت‌های مختلف آن به‌صورت رقیق‌سازی متوالی، در بافر ۱۰میلی‌مولار تریس- هیدروکلراید با pH= ۸ تهیه شدند و فعالیت پراکسیدازی غلظت‌های مختلف دزوکسی‌ریبوزایم در حضور ۰/۹میلی‌مولار پراکسیدهیدروژن و ۱/۲میلی‌مولار ABTS، در یک بازه زمانی ۳۰۰ ثانیه‌ای، اندازه‌گیری شد.

آماده‌سازی سلول‌های سرطانی MCF7

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

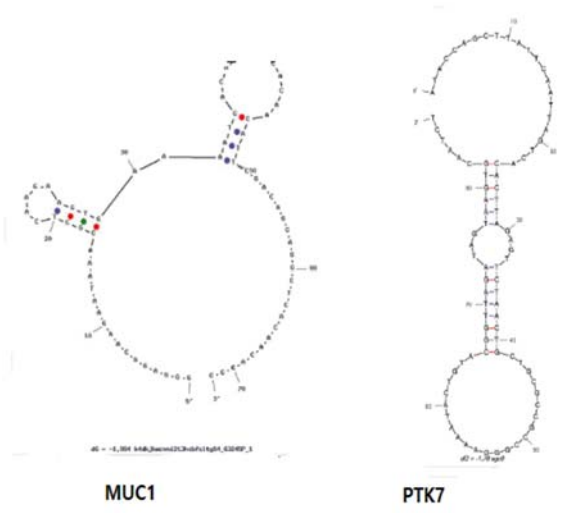
کشت سلول و تعویض محیط

به‌منظور تهیه ۵۰۰میلی‌لیتر محیط کشت کامل، ۶/۷گرم پودر DMEM و ۱/۸۵گرم بی‌کربنات‌سدیم به ۴۰۰میلی‌لیتر آب مقطر اضافه، با همزن مغناطیسی مخلوط و pH محلول در محدوده ۷/۴-۷/۲ تنظیم شد. سپس محیط کشت با استفاده از فیلتر ۰/۲ استریل و در یخچال نگهداری شد. آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین به ترتیب به میزان ۵۰ و ۳۱/۲۵میلی‌گرم به همراه ۱۰۰میلی‌لیتر آب مقطر ساخته و با استفاده از فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲میکرومتری استریل شدند. برای ساخت محیط کشت کامل (۱۰%)، FBS به نسبت ۱۰% حجم کل محیط کشت و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین به نسبت ۱% اضافه می‌شود. پس از خروج کرایوتیوب حاوی سلول از تانک ازت با قراردادن آنها در داخل بن‌ماری حاوی آب ۳۷°C قرار داده شدند. پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۱۵۰۰دور بر دقیقه، محیط روی سلول‌ها دور ریخته و قرص سلولی ته‌نشین‌شده در ۲-۱میلی‌لیتر محیط کشت سوسپانسیون شد. سوسپانسیون فوق به فلاسک کشت انتقال داده شد و در انکوباتور CO_2دار انکوبه شد. روز بعد سلول‌ها برای بررسی رشد و اطمینان از عدم آلودگی با میکروسکوپ معکوس اختلاف فاز (میکروسکوپ اینورت فاز کنتراست) بررسی شدند. تمامی مراحل کشت و تعویض محیط، زیر هود لامینار و در شرایط کاملاً استریل انجام می‌شود.

یافته‌ها و بحث

انتخاب، طراحی و سنتز آپتامرها

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



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

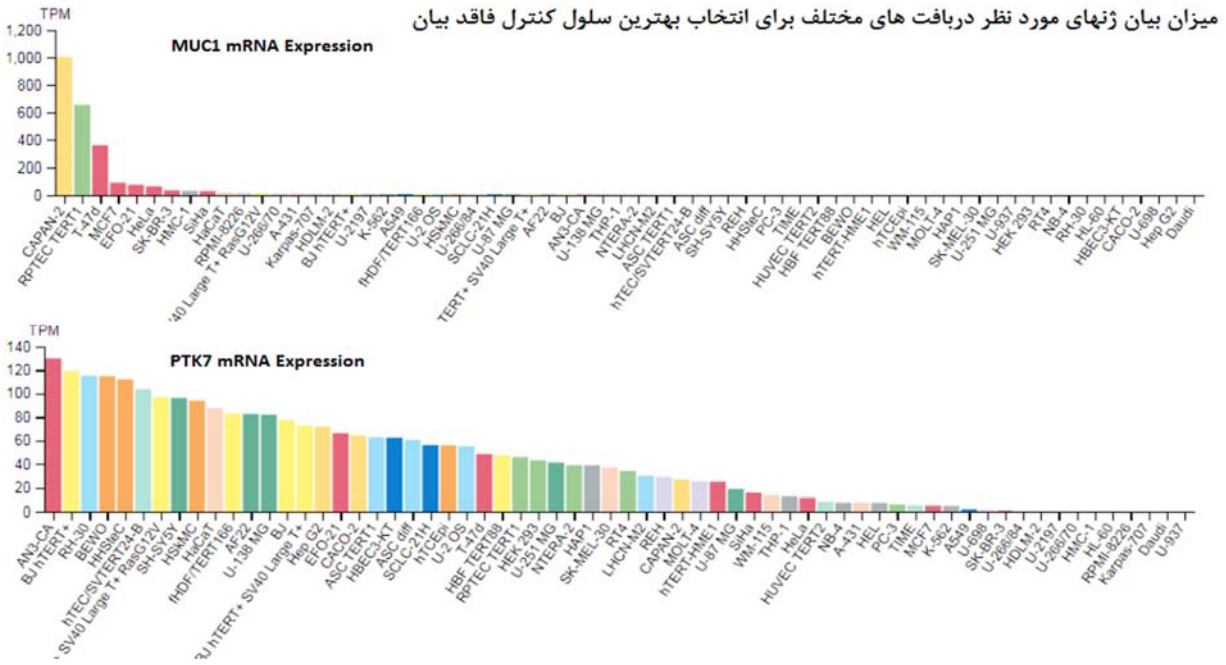
برای به‌دست‌آوردن نتیجه مطلوب و اطمینان از صحت کارکرد روش مورد نظر برای هر یک از آپتامرها بایستی سلول‌های کنترل مناسب انتخاب می‌شدند که کمترین میزان بیان در سطح mRNA را نشان می‌دادند. برای همین منظور پروفایل بیانی برای دو آپتامر ذکرشده

www.SID.ir

Archive of SID

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

در مرحله بعد، آپتامرهایی مناسب همراه با لینکر اختصاصی متصل‌شونده به دزوکسی‌ریبوزایم برای تشخیص موثر بیومارکرهای مذکور طراحی شد (جدول ۱). طراحی به این صورت انجام شد که محل اتصال دزوکسی‌ریبوزایم روی آپتامر براساس محاسبات با نرم‌افزارهای پیش‌گویی‌کننده ساختار دوم واجد بیشترین میزان پایداری و کمترین سطح انرژی باشند.



نمودار ۱) انتخاب سلول‌های کنترل فاقد بیان

بررسی عملکرد آنزیمی آپتامرها

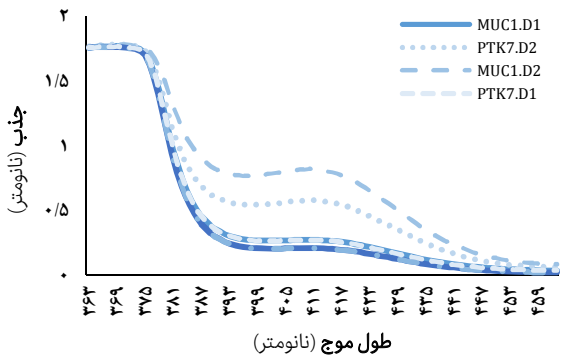
در این مطالعه، طیف جذب رادیکال ABTS، درحضور ۱/۲میلی‌مولار پراکسیدهیدروژن و۱/۲میلی‌مولار ABTS و غلظت ۰/۰۵نانومولار دزوکسی‌ریبوزایم در بافر ۱۰میلی‌مولار تریس- هیدروکلراید با ۸ =pH، در ناحیه ۴۸۰-۳۸۰نانومتر اندازه‌گیری شد. رادیکال ABTS، در ناحیه ۴۱۴نانومتر دارای یک پیک جذب است و همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، تنها در حضور آپتامرهای واجد دزوکسی‌ریبوزایم، فعالیت پراکسیدازی مشاهده می‌شود و با وجود آپتامرهای دیگر، فعالیت پراکسیدازی مشاهده نمی‌شود. این امر نشان‌دهنده عملکرد صحیح پراکسیدازی دزوکسی‌ریبوزایم در حضور پراکسیدهیدروژن و ABTS است.

بهینه‌سازی غلظت آپتامرهای واجد فعالیت آنزیمی

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

تایید اختصاصیت عملکرد آپتامرها

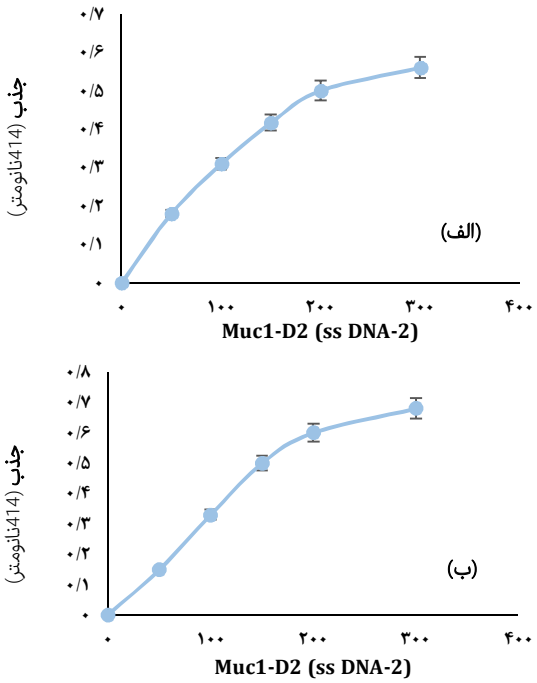
پس از ساخت آپتامرها و تهیه محلول حاوی غلظت مناسب از آنها، ابتدا نیاز به بررسی عملکرد آپتامرها و اختصاصیت فعالیت آنها بود. به همین منظور، ابتدا عملکرد هر یک از آپتامرهای اختصاصی مورد آزمایش قرار گرفت. این امر با خوانش جذب در طول موج ۴۱۴نانومتر و در بازه ۳۰۰ ثانیه انجام شد. با توجه به اینکه D2 در هر دو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



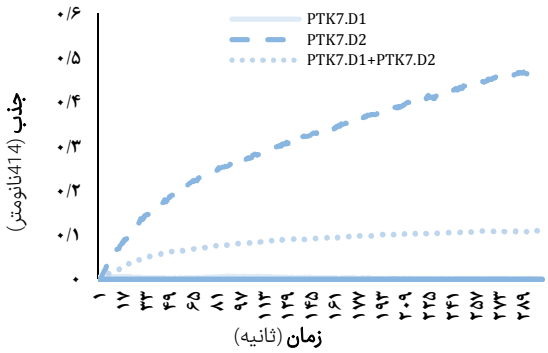
نمودار ۲) بررسی فعالیت آنزیمی آپتامرها در شرایط مختلف

www.SID.ir

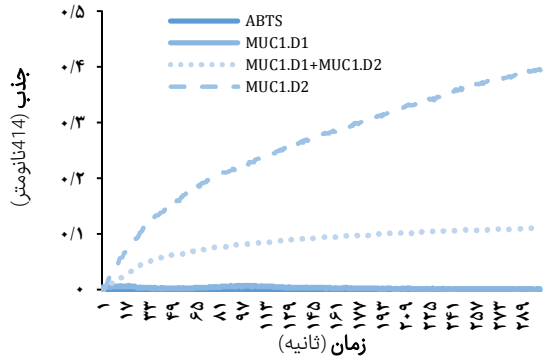
Archive of SID



نمودار ۳) بهینه‌سازی غلظت آپتامرهای واجد فعالیت آنزیمی؛ الف) MUC1.D2؛ ب) PTK7.D2



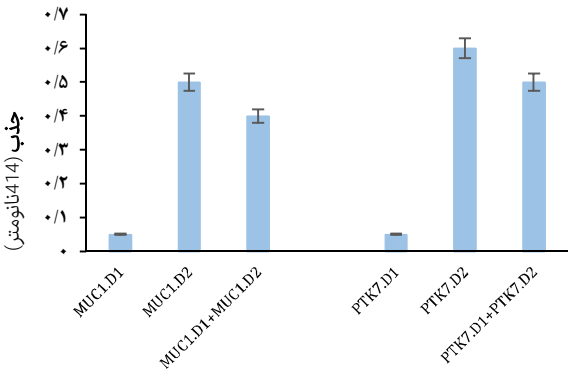
نمودار ۴) منحنی فعالیت شبه پراکسیدازی در زمان‌های مختلف برای آپتامر PTK7 در حضور PTK7.D1 و PTK7.D2 و PTK7.D1 که در آغاز واکنش با PTK7.D2 تیمار شده است (تغییرات جذب ABTS فاقد هر گونه الیگونوکلئوتید نیز نشان داده شده است.).



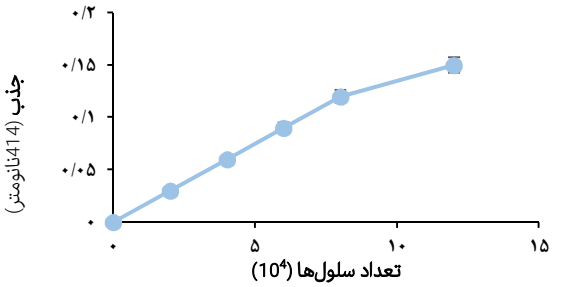
نمودار ۵) منحنی فعالیت شبه پراکسیدازی در زمان‌های مختلف برای آپتامر MUC1 در حضور MUC1.D1، MUC1.D2 و MUC1.D2 که در آغاز آزمایش با MUC1.D1 انکوبه شده است (تغییرات جذب ABTS فاقد هر گونه الیگونوکلئوتید نیز نشان داده شده است.).

استفاده از آپتامرها برای تشخیص سلول‌های سرطانی سینه

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



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



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

www.SID.ir

Archive of SID

به‌منظور تایید اختصاصیت تشخیص توسط آپتامر، نیاز به اجرای این پروتکل روی سلول‌هایی است که این بیومارکرها را بیان نمی‌کنند و به عبارت دیگر، از آنها به‌عنوان کنترل منفی استفاده می‌شود. در این آزمایش رده سلولی HepG2 به‌عنوان کنترل منفی برای بررسی بیان MUC1 و رده سلولی U266 به‌عنوان کنترل منفی برای بررسی بیان PTK7 مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه این رده‌های سلولی، بیومارکرهای مذکور را بیان نمی‌کنند، ساختار آنزیمی فعال ایجاد نشده و درنتیجه واکنشی نیز انجام نمی‌شود.

در مرحله بعد، حداقل تعداد سلول لازم برای تشخیص با روش رنگ‌سنجی تعیین شد تا بتوان با تکیه بر این یافته، گامی در راستای استفاده هرچه گسترده‌تر از این روش در شناسایی سریع و مقرون به صرفه سلول‌های سرطانی در بالین برداشت. پس از بهینه‌سازی شرایطی مانند غلظت آپتامرها و زمان، سنجش کمی سلول‌های MCF-7 شناسایی‌شده با استفاده از ترکیب آپتامرها و دزوکسی‌ریبوزایم چهار رشته‌ای مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش تعداد سلول‌ها جذب اندازه‌گیری‌شده به‌طور تدریجی افزایش می‌یابد. همبستگی خطی بین سیگنال رنگ‌سنجی و تعداد سلول‌ها مشاهده شد (نمودار ۷).

محدوده کمی شناسایی سلول‌ها

در سال ۲۰۱۰، در مطالعه‌ای از آپتامرهای اختصاصی برای تشخیص سلول‌های سرطان خونی CCRF-CEM استفاده کردند[8]. غلظت بهینه برای آپتامرهای مورد استفاده حدود ۵۰نانومولار گزارش شده است. بهترین زمان برای عملکرد مناسب آپتامرهای واجد دزوکسی‌ریبوزایم حدود ۳۰ دقیقه به دست آمد که مشابه نتایج حاصل در این سیستم است. محدوده تشخیص برای سلول‌های سرطان خون حدود ۱×۱۰^{۲} گزارش شده است. در مطالعات قبلی نیز محدوده تشخیص حدود ۱×۱۰^{۳} بود[6, 20]، در صورتی که در مطالعه حاضر محدوده تشخیص سلول‌ها نیز حدود ۱×۱۰^{۲} گزارش شد. تاکنون گزارشی مبنی از استفاده از سیستم آپتامری مبتنی بر دزوکسی‌ریبوزایم برای تشخیص سلول‌های سرطانی سینه گزارش نشده است.

نتیجه‌گیری

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

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

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

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: نصرالله صالح‌گوهری (نویسنده اول)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۵%)؛ زهرا کرمی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۵%)؛ فرید محسنی (نویسنده سوم)، روش‌شناس (۵%)؛ علی کریم‌زاده (نویسنده چهارم)، روش‌شناس (۱۰%)؛ کتایون صدیقی (نویسنده پنجم)، روش‌شناس (۵%)

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

منابع

1- Nguyen NP, Almeida FS, Chi A, Nguyen LM, Cohen D, Karlsson U, et al. Molecular biology of breast cancer stem cells: potential clinical applications. Cancer Treat Rev. 2010;36(6):485-91.

2- Videira M, Reis RL, Brito MA. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2014;1846(2):312-25.

3- Shangguan D, Cao Z, Meng L, Mallikaratchy P, Sefah K, Wang H, et al. Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells. J Proteome Res. 2008;7(5):2133-9.

4- Mittal S, Kaur H, Gautam N, Manth AK. Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. Biosens Bioelectron. 2017;88:217-31.

5- Padgett JK, Parlette III HL, English III JC. A diagnosis of chronic lymphocytic leukemia prompted by cutaneous lymphocytic infiltrates present in Mohs micrographic surgery frozen sections. Dermatol Surg. 2003;29(7):769-71.

6- Pan C, Guo M, Nie Z, Xiao X, Yao S. Aptamer-based electrochemical sensor for label-free recognition and detection of cancer cells. Electroanalysis. 2009;21(11):1321-6.

7- Baker BR, Lai RY, Wood MS, Doctor EH, Heeger AJ, Plaxco KW. An electronic, aptamer-based small-molecule sensor for the rapid, label-free detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids. J. Am. Chem. Soc. 2006;128(10):3138-9.

8- Zhu X, Cao Y, Liang Z, Li G. Aptamer-based and DNAzyme-linked colorimetric detection of cancer cells. Protein Cell. 2010;1(9):842-6.

9- Degefa TH, Kwak J. Label-free aptasensor for platelet derived growth factor (PDGF) protein. Anal Chim Acta. 2008;613(2):163-8.

10- Famulok M, Mayer G, Blind M. Nucleic acid aptamers from selection in vitro to applications in vivo. Acc. Chem. Res. 2000;33(9):591-9.

11- Ghossein RA, Bhattacharya S. Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. Eur. J. Cancer. 2000;36(13):1681-94.

12- Ferreira CS, Papamichael K, Guilbault G, Schwarzacher T, Gariepy J, Missailidis S. DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer–antibody sandwich

www.SID.ir

Archive of SID

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

www.SID.ir