

تشخیص سلول‌های سرطانی با استفاده از نانوزیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر گرافن / نانوذرات طلا

میثم امیدی^{۱*} (Ph.D)، امیر یادگاری^۱ (M.Sc)، حکیمه زالی^۲ (Ph.D)، محدثه هاشمی^۳ (M.Sc)، هادی حسن زاده^۴ (Ph.D)

۱- گروه مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات سرطان و دیارتمان فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه تشخیص زودهنگام و درمان مؤثر سرطان در بهبود تشخیص و مدیریت سرطان حیاتی به شمار می‌آید. به طور خاص، تشخیص کیفی دقیق سلول‌های سرطانی نشان‌دهنده گامی مهم در تشخیص سرطان است. هدف این مطالعه، تشخیص سلول‌های سرطانی با استفاده از نانوزیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر گرافن / نانوذرات طلا بود.

مواد و روش‌ها: در این جا بهبود میزان حساسیت و دقت اندازه گیری سلول‌های سرطان پستان MCF-7 از طریق بیو مارکر CD44 با استفاده هم‌زمان از اکسید گرافن و نانوذرات طلا صورت پذیرفت. به همین منظور پس از اصلاح سطح الکتروود توسط نانوساختارهای گرافن، نانوذرات طلا بر روی سطح الکتروود حاصل رسوب داده شد. در ادامه آنتی‌بادی مونوکلونال علیه CD44 بر روی سطح الکتروود تثبیت شد. در نهایت عمل‌کرد زیست حسگر الکتروشیمیایی در یک سیستم سه الکتروودی به همراه الکتروود مرجع نقره- کلرید نقره و الکتروود کانتور پلاتینی و در حضور غلظت‌های مختلفی از سلول‌های سرطان بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده این مطلب می‌باشد که نانوزیست حسگر ارائه شده از حساسیت و دقت بالایی جهت تشخیص سلول‌های سرطانی MCF-7 از طریق مارکر علیه CD44 برخوردار می‌باشد. هم‌چنین مقدار حساسیت متوسط و کمینه حد تشخیص این حسگر به سلول‌های سرطانی به ترتیب برابر $12/1 \text{ cells ml}^{-1}$ و $6 \mu\text{A}$ و سلول محاسبه گردد.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان‌دهنده این امر می‌باشد که از این نانوزیست حسگر می‌تواند به عنوان ابزاری قدرتمند در تشخیص سلول‌های سرطانی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: نانوزیست حسگر الکتروشیمیایی، سلول‌های سرطان پستان MCF-7، آنتی‌بادی مونوکلونال علیه CD44

مقدمه

حساس به منظور تشخیص به موقع آن امری ضروری است [۱]. روش‌هایی که امروزه به منظور تشخیص سلول‌های

به منظور غلبه بر بیماری مهلک سرطان، روشی سریع و

استفاده گردید. نتایج حاکی از حساسیت و پایداری بالای زیست حسگر ساخته شده است [۲۲]. در مطالعه صورت گرفته توسط Wang و همکارانش، نانوکلاسترهای طلا بر روی صفحات گرافن اکساید کاهش یافته شده قرار گرفتند، زیست حسگر ساخته شده علاوه بر خاصیت تشخیصی به دلیل بارگذاری داروی دوکسوروبیسین هیدروکلراید دارای خاصیت درمانی علیه سلول‌های کبدی نیز بود [۲۳]. در مطالعه دیگری توسط Kumar و همکارانش نانوذرات طلا بر روی سیلیکای متخلخل و گرافن کتزوگه شد و از آن در کاربردهای الکترولیتیکی و تشخیص سرطان استفاده شده است. بررسی‌ها نشان داد زیست حسگر ساخته شده توانایی بالایی در تشخیص مقادیر کم و با حساسیت بالایی از هیدروژن پراکساید را دارد [۲۴].

در حال حاضر، سرطان سینه یکی از بدخیمی‌های مهم می‌باشد که از هر هشت زن یک نفر را مبتلا می‌کند و تقریباً از هر چهار نفر یک نفر جان خود را از دست می‌دهد [۲۵]. در میان گیرنده‌های سلولی، گیرنده هیالورونات CD44 نقش مهمی در چسبندگی سلول، مهاجرت و متاستاز تومور بازی می‌کند [۲۶]. مطالعات ایمونوهیستولوژیکی نشان داده است که در ۸۶٪ از سرطان‌های سینه CD44 بیش از حد معمول بیان می‌شود [۲۵] و در نتیجه CD44 می‌تواند در تشخیص سلول‌های سرطانی سینه استفاده شود [۲۶].

در مطالعه حاضر، بهبود میزان حساسیت و دقت اندازه‌گیری سلول‌های سرطان پستان MCF-7 از طریق بیومارکر CD44 با استفاده هم‌زمان از اکساید گرافن و نانوذرات طلا صورت پذیرفته است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول. در این مطالعه رده سلولی MCF-7 که یک نوع رده سلولی داکتال کارسینوما بوده و ۸۵٪ از سرطان پستان از این نوع رده سلولی است [۲۶، ۲۵]؛ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت در حال رشد خریداری شد. پس از تعویض محیط اولیه، در محیط کشت DMEM به همراه

سرطانی به کار برده می‌شود عبارتند از: واکنش پلیمریزاسیون زنجیره‌ای [۲]، ایمونوهیستوشیمی [۳]، اسپکتروسکوپی جرمی [۴] و فلوسایتومتری [۵]. با وجود مزایایی که هر یک از روش‌های ذکر شده دارا هستند، هم‌چنان ایجاد سیستمی ساده، ارزان و در عین حال دقیق در تشخیص سرطان امری ضروری است.

امروزه در تشخیص سرطان روش‌های مینی‌بر الکتروشیمی از جمله: اسپکتروسکوپی امیدانسی الکتروشیمیایی (EIS) [۶-۹]، ولتامتری پالسی تفاضلی (DPV) [۱۰-۱۳]، ولتامتری سیکلی (CV) [۱۴]، ولتامتری stripping (SV) [۱۶، ۱۵] و لومینسانس الکتروشیمیایی [۱۸، ۱۷] (ECL)، بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

در مقایسه با روش‌های متداول، روش‌های مینی‌بر الکتروشیمی دارای مزیت‌های حائز اهمیت است که از آن جمله می‌توان به: حساسیت قابل قبول، سادگی عملیاتی، پاسخ سریع و قیمت پایین اشاره کرد. علاوه بر این، می‌توان با استفاده از الکتروکاتالیست‌های طراحی شده سیگنال‌های الکتروشیمی را تقویت کرده و در نتیجه حساسیت تشخیص را افزایش داد. از جمله روش‌های رایج در تقویت سیگنال، بارگذاری آنزیم بر روی الکتروود با استفاده از فرآیند الکتروشیمیایی آزیمی است. متأسفانه حساسیت و تشخیص اکثر حسگرهای زیستی الکتروشیمیایی رضایت‌بخش نیست، و روش‌های مینی‌بر آن هم‌چنان در مرحله توسعه است. لذا طراحی بیوسنسور الکتروشیمی با حساسیت بالا در تشخیص سلول‌های سرطانی هدف هم‌چنان به عنوان چالش مطرح است [۱۹].

گرافن (G)، ورقه‌ای دو بعدی از اتم‌های کربن اتصال یافته با پیوند sp²، با توجه به خواص منحصر به فرد و پتانسیل کاربردی بالا به شدت مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲۰]. بررسی‌ها نشان داده است که بیوسنسور نانو هیبریدی طلا / گرافن میزان زیست‌سازگاری و حساسیت اندازه‌گیری را افزایش می‌دهد [۲۱]. در کاری که توسط Pan و همکارانش انجام شد از سنسور زیستی طلا/گرافن در تشخیص بیسفنول

تهیه نانو ذرات طلا. نانوذرات طلا از طریق روش احیا نمک HAuCl_4 تهیه شد. به صورت اختصار ۵۰ میلی لیتر 0.3HAuCl_4 میلی مولار ۳ آبه در حال هم‌زده در بشر سر پوشیده جوشانده شد. ۵ میلی لیتر تری سدیم سیترات ۵ میلی مولار به محلول فوق افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. در این مدت رنگ محلول به قرمز آلبالویی تبدیل شد. محلول در دمای اتاق و در شرایط هم‌زده سرد شد، این محلول برای استفاده‌های بعدی در یخچال نگهداری شد.

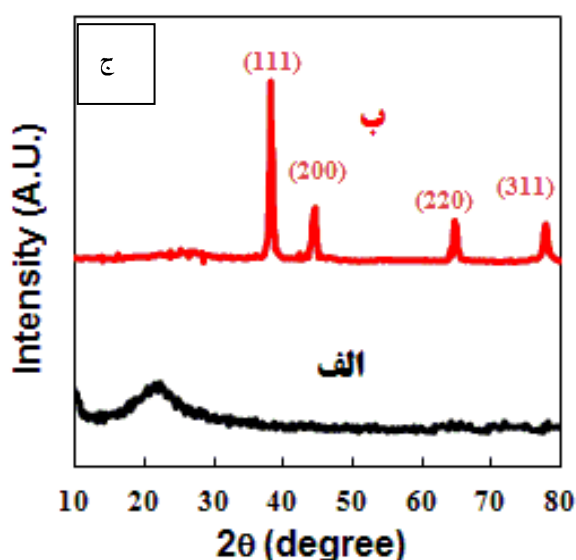
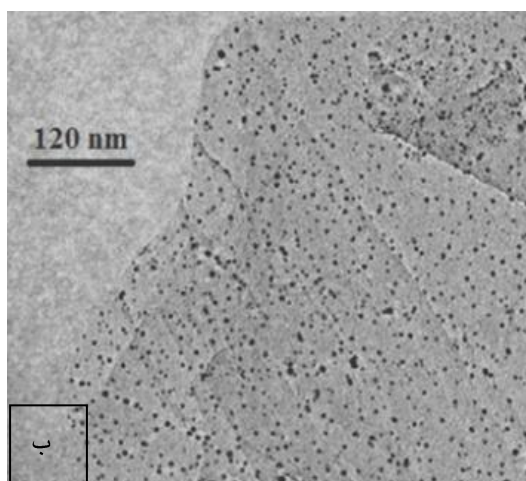
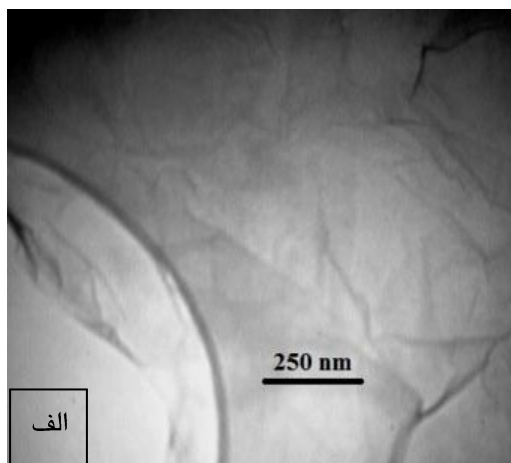
آماده سازی الکتروود. الکتروود طلای مورد استفاده در این‌جا از یک میله طلا ساخته شد. این میله توسط پوشش پلاستیکی عایق و قسمت سر جهت استفاده به عنوان بستر تثبیت با اکسید آلومینیوم صیقل داده شد و در محلول پیرانا (نسبت ۱ به ۳ از پراکسید هیدروژن و اسید سولفوریک) به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس با آب دیونیزه شسته شد. پس از آماده‌سازی الکتروود کار محلول اکسید گرافن با نسبت مشخص ۱:۱:۳ با آب و نفیون مخلوط شد. سپس به روش قطره‌ای ۱۰ میکرولیتر از محلول فوق روی الکتروود کار تثبیت شد. میزان بارگذاری حدود $0.1/0$ ٪ اندازه‌گیری شد. روش کار به این گونه است که پس از آن‌که سطح عریان الکتروود کار به کمک روش شیمیایی و الکتروشیمیایی تمیز و آماده بارگذاری شد، محلول فوق به شکل تک قطره، بر روی سطح الکتروود تثبیت گردید و پس از هر قطره در معرض تابش نور لامپ ۲۲۰ ولت با فاصله مشخص قرار گرفت. تا حلال‌های استفاده شده مانند آب و اتانول تبخیر شوند و وارد واکنش نشوند. دلیل استفاده از نفیون استحکام تثبیت لایه اکسید گرافن بر روی سطح الکتروود می‌باشد. در واقع نفیون چسبندگی لایه گرافن را بهبود می‌بخشد. پس از تثبیت لایه گرافن اکسید، به منظور نشان دادن نانوذرات طلا، الکتروود مذکور در محدوده پتانسیل مشخص، درون محلول نانوذره طلا به عنوان الکتروود قرار گرفت که این الکتروود $\text{AuNP}/\text{GO}/\text{Au}$ نامیده شد.

تثبیت آنتی‌بادی بر روی الکتروود. الکتروودهای اصلاح شده با نانوذره طلا به مدت ۲ ساعت در محلول ۳-

۱۰٪ سرم جنین گاوی، پنی سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کشت داده شد. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵٪ و دی اکسیدکربن ۵٪ قرار گرفتند. قبل از پاساژ دادن و هم‌چنین انتقال به پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای، سلول‌ها در فلاسک T 25 کشت داده شدند و هنگامی که بیش از ۷۰٪ از کف فلاسک را پر کردند؛ توسط تریسین EDTA - ۲۵/۰٪ از کف ظرف جدا شدند.

سنتر گرافن. اکسید گرافن به روش هامر اصلاح شده سنتز شد [۲۰]. به طور خلاصه مقدار مشخصی از گرافیت نرم با ۳۲۵ در حدود ۳ گرم در ۱۲ میلی لیتر محلول غلیظ اسید سولفوریک، $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ و P_2O_5 را با نسبت ۱ به ۱ در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای ۴ ساعت مخلوط شد. سپس گرافیت اکسید حاصل شده با مقدار کافی آب دی یونیزه تا pH خنثی شسته و در دمای محیط خشک شد. در مرحله بعد محصول خشک شده به روش هامر اکسید می‌شود. برای این منظور، گرافیت اکسید حاصل شده به ۱۲۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ که در دمای صفر درجه قرار دارد اضافه شد. سپس ۱۵ گرم پرمنگنات پتاسیم به آرامی به مخلوط حاصل تحت هم زدن شدید اضافه و برای مدت ۲ ساعت تحت هم‌زدن قرار گرفت. در ادامه، حدود ۲۵۰ میلی لیتر آب دی یونیزه به مخلوط فوق به آرامی اضافه شد در حالی که باید دمای واکنش به دلیل گرمازا بودن فرآیند در کم‌تر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد حفظ شود. در این مرحله مجدداً مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت تحت هم زدن قرار گرفت و سپس مقدار ۷۰۰ میلی لیتر دیگر آب دی یونیزه به آن اضافه شد. بلافاصله پس از افزودن آب مقدار ۲۰ میلی لیتر آب اکسیژنه جهت اکسیداسیون یون‌های اضافی در محلول به سوسپانسیون فوق اضافه شد. پس از گذشت مدتی مخلوط حاصل با یک لیتر محلول ۱:۱۰ اسید کلریدریک و آب و متعاقباً یک لیتر آب دی یونیزه شسته شد. در نهایت با کمک سانتریفیوژ، کیف بوختر و نهایتاً غشای دیالیز Da 8000 محلول مورد نظر تا pH در حدود ۵ خنثی‌سازی گردید.

شبکه‌های (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) می‌باشند ملاحظه می‌گردد.



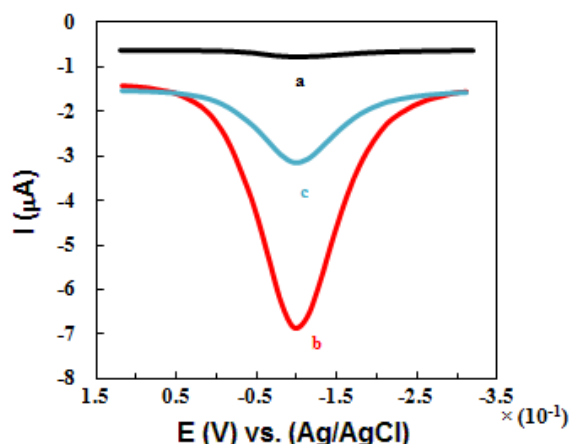
شکل ۱. (الف) تصویر TEM صفحات اکسید گرافن. (ب) تصویر TEM ترکیب نانو ذرات طلا تثبیت شده بر روی صفحات اکسید گرافن. (ج) طیف پراش اشعه ایکس مربوط به اکسید گرافن (الف) و ترکیب نانو ذرات طلا و اکسید گرافن (ب).

مرکاپتوپروپیونیک اسید (MPA) حل شده در اتانول با pH=۱۱ (برای تنظیم pH از NaOH یک مولار استفاده شد) در دمای اتاق غوطه‌ور شدند. MPA به دلیل داشتن گروه تیول تمایل بالایی برای اتصال به ذرات طلا دارد. پس از ۲ ساعت الکترودها با آب دیونیزه شسته شدند تا MPA اضافی (که به طور فیزیکی جذب شده‌اند) از سطح الکترودها شسته شوند. پس از خشک شدن الکترودها در محلول آنتی‌بادی مونوکلونال علیه CD 44 در حضور EDC ۱-۳-Dimethyl aminopropyl-3-ethylcarbodiimide methiodide و NHS (N-Hydroxysucc) به مدت ۲۴ ساعت در ۴°C انکوبه گردید. پس از ۲۴ ساعت الکترودها با آب شسته شد تا پروتئین‌هایی که به طور ضعیف متصل شده‌اند شسته شوند. تمام آزمایش‌های ولتامتری با استفاده از سامانه سه الکترودی انجام شد که الکترودها نقره-کلرید نقره در آن به عنوان الکتروده مرجع و از الکتروده میله‌ای پلاتین به عنوان الکتروده کمکی (Cunter electrode) و الکتروده طلا و به عنوان الکتروده کار (Working electrode) استفاده شد.

نتایج

تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از صفحات اکسید گرافن و اکسید گرافن-نانوذرات طلا ساخته شده در شکل ۱. الف ارائه گردیده است. طیف پراش اشعه ایکس (X-ray diffraction) (XRD) مربوط به اکسید گرافن و ترکیب نانو ذرات طلا و اکسید گرافن در شکل ۱. ج نشان داده شده است. در طیف مربوط به اکسید گرافن یک پیک مشخص در ناحیه ۲۶/۰۱ درجه که مربوط به ساختارهای کریستالی صفحه‌های گرافن در شبکه (۰۰۲) کربن می‌باشد مشاهده می‌گردد، همچنین در طیف مربوط به اکسید گرافن - نانوذرات طلا که به رنگ قرمز در شکل مشخص می‌باشد پیک‌های مشخص در نواحی ۳۸/۳، ۴۴/۴، ۶۴/۷ و ۷۷/۷ که به ترتیب نشان‌دهنده ساختارهای کریستالی نانو ذرات طلا در

سرطانی MCF-7 (منحنی الف) در مقایسه به حالت عدم حضور سلول (منحنی س) به شدت افزایش می‌یابد.



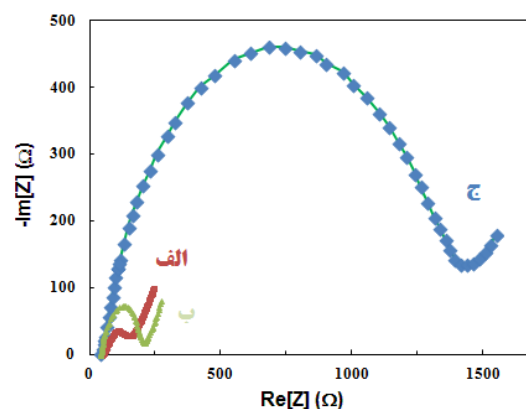
شکل ۳. ولتامتری پالس تفاضلی الکتروود در محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار و pH معادل ۷ (A). منحنی (a) الکتروود طلا ساده در حضور سلول‌های سرطانی، منحنی (b) الکتروود اصلاح شده در حضور سلول‌های سرطانی و منحنی (c) الکتروود اصلاح شده در عدم حضور سلول‌های سرطانی

نمودار تغییرات پاسخ ولتامتری پالس تفاضلی بر حسب غلظت‌های مختلف از سلول‌های سرطانی در شکل ۴ الف نمایش داده شده است. همان‌گونه که در شکل ۴ الف ملاحظه می‌گردد با افزایش غلظت سلول‌های سرطانی شاهد افزایش تغییرات پیک شدت جریان می‌باشیم. علاوه بر این شکل ۴ ب مبین این موضوع است که تغییرات پیک شدت جریان نسبت به غلظت‌های مختلف از سلول‌های سرطانی از یک رابطه خطی تبعیت می‌کند. رابطه خطی بین Δip و غلظت سلول‌های سرطانی در محدوده ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ سلول برای یک میلی‌لیتر حجم محلول در مقیاس لگاریتمی می‌باشد. معادله خط رگرسیون به شرح ذیل می‌باشد. ضریب تصحیح این معادله برابر با ۰/۹۶ می‌باشد.

$$\Delta ip (\mu A) = 2.06 + 1.12 \log C \text{ cells (cells ml}^{-1}\text{)}$$

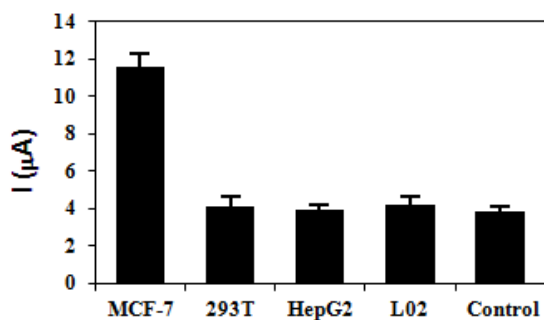
یکی دیگر از پارامترهای مهم که می‌بایست مورد بررسی قرار گیرد بحث اختصاصیت حسگر است. به منظور بررسی رفتار و میزان اختصاصی بودن حسگر طراحی شده، آزمایش‌های مختلفی با استفاده از رده‌های سلولی‌های مختلف انجام شده

در شکل ۲ نمودار نایکویست مربوط به مراحل آماده‌سازی و اصلاح سطح الکتروود شامل طیف امپدانس الکتروود طلا، ترکیب بیومارکر CD 44 (Biomarker) و گرافن-نانوذرات طلا، و ترکیب گرافن-نانوذرات طلا/بیومارکر CD / سلول‌های سرطانی MCF-7 نمایش داده شده است. تمام اندازه‌گیری‌ها و سنجش‌ها در محلول ۰/۱ مولار KCL و در حضور محلول ۴ میلی‌مولار $[FeCN_6]$ صورت پذیرفته است. همان‌گونه که در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد نمودار نایکویست الکتروود طلا (منحنی الف) در مقایسه با الکتروود طلا گرافن-نانوذرات طلا (منحنی ب) شامل یک نیم دایره بسیار کوچک است. هم‌چنین در حضور سلول‌های سرطانی (منحنی ج) افزایش چشمگیر شعاع قوس نمودار نایکویست مشاهده می‌گردد.



شکل ۲. طیف امپدانس الکتروود طلا (الف)، الکتروود طلا/گرافن-نانوذرات طلا (ب) و الکتروود طلا/گرافن-نانوذرات طلا بیومارکر CD 44 / سلول‌های سرطانی MCF-7 (ج)

نتایج حاصل از روش ولتامتری پالس تفاضلی (DPV) برای الکتروود طلا ساده در حضور سلول‌های سرطانی، الکتروود اصلاح شده در حضور سلول‌های سرطانی و الکتروود اصلاح شده در عدم حضور سلول‌های سرطانی در شکل ۳ ارائه گردیده است. همان‌گونه که ملاحظه می‌گردد با قرار دادن الکتروود طلا در محلول بافر فسفات (منحنی الف) پیک بسیار کوچکی مشاهده می‌گردد. از سوی دیگر میزان شدت پیک جریان برای الکتروود اصلاح شده در حضور سلول‌های

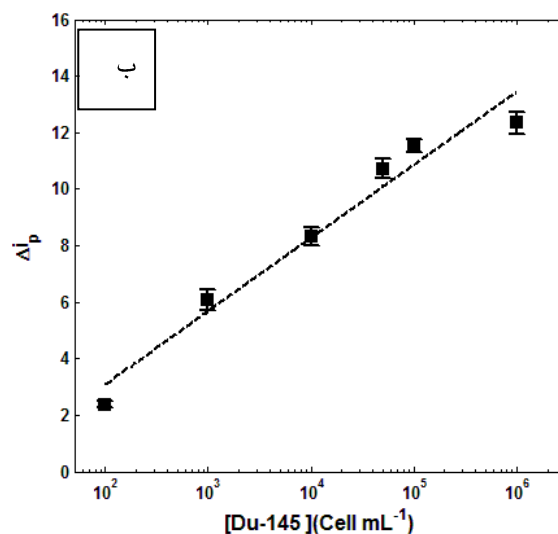
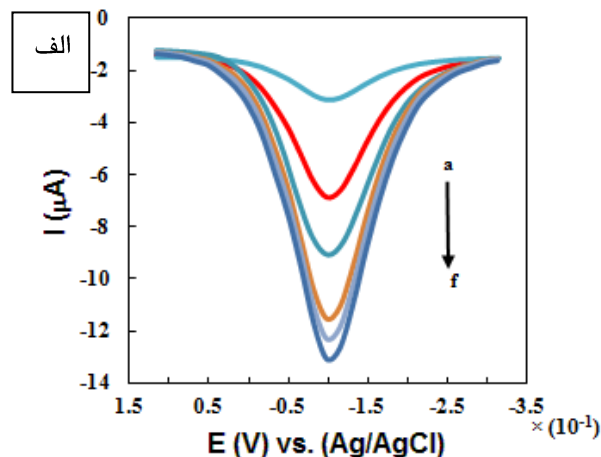


شکل ۵. شدت جریان پاسخ سیتوسنسور به انواع مختلف سلول‌های سرطانی در غلظت مشخص ۱۰۰۰۰۰ سلول در یک میلی لیتر. تمام اندازه گیری ها در محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار و pH معادل ۷، در محدوده پتانسیل -۰/۳- ولت تا ۰/۱ ولت، نمودار میله‌ای بیانگر سه مرتبه تکرار آزمایش‌ها می‌باشد

بحث و نتیجه گیری

همان گونه که در شکل ۱ مشخص شده است، صفحات گرافن به خوبی از یکدیگر تفکیک شده‌اند و با توجه به مقیاس نشان داده شده در شکل، صفحات گرافن طولی در حدود ۷۰ تا ۸۰۰ نانومتر و ضخامت آن‌ها حدود ۲ نانومتر می‌باشد. نتایج آنالیز TEM نشان‌دهنده توزیع یک‌نواخت نانو ذرات طلا با اندازه ذرات حدود ۵ تا ۱۰ نانومتر بر روی صفحات اکسید گرافن می‌باشد. همچنین پراکندگی مناسب نانو ذرات طلا در این تصویر به خوبی نشان داده شده است به گونه‌ای که تمام نانو ذرات طلا بر روی صفحه اکسید گرافن نشانده شده است و نانو ذره به صورت آزاد وجود ندارد. بررسی صحت اصلاح و آماده‌سازی سطح الکتروود توسط صفحات اکسید گرافن و نانو ذرات طلا توسط طیف سنجی امپدانس بررسی شده است. نمودار نایکویست مربوط به الکتروود طلا گرافن- نانو ذرات طلا حاکی از نرخ بالای انتقال الکترون و پایین بودن مقاومت الکتریکی ذاتی کریستال‌های تشکیل‌دهنده نانو ذرات طلا می‌باشد. با توجه به شکل ۲ مقاومت ذاتی الکتروود در حضور سلول‌های سرطانی افزایش بیش‌تری داشته که این مهم حاکی از افزایش بیش‌تر مقاومت سیستم نسبت به حالت قبلی است که با منحنی ج به خوبی قابل تشخیص است. افزایش مقاومت در این مرحله نشان‌دهنده تغییر گام به گام یا مرحله به مرحله در میزان

است. این رده‌ها شامل سلول‌های سرطان سینه MCF-7، سلول‌های جنینی کلیه T293، سلول‌های طبیعی کبد انسان L02، سلول‌های سرطان کبد انسان HepG2 و یک نمونه بدون سلول جهت مقایسه نتایج می‌باشد. شکل ۵. نشان می‌دهد که در مقایسه با نمونه بدون سلول مشاهدات رفتار پاسخ ولتامتری پالس تفاضلی مربوط به سلول‌های T293، HepG2 و L02 تغییر محسوسی نداشته‌اند.



شکل ۴. الف) پاسخ ولتامتری پالس تفاضلی به تغییر غلظت (102, 103, 104, 5 x 104, 105, 106 cells ml⁻¹ سلول‌های سرطانی MCF-7 از a تا f شکل). ب) نمودار معادله کالیبراسیون شامل غلظت سلول‌های سرطانی MCF-7 در مقیاس لگاریتمی و شدت جریان پیک ΔE_p شکل. تمام اندازه گیری ها در محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار و pH معادل ۷، در محدوده پتانسیل -۰/۳- ولت تا ۰/۱ ولت، نمودار میله‌ای بیانگر سه مرتبه تکرار آزمایش‌ها می‌باشد.

مقاومت سیستم به کمک طیف سنجی امپدانس (EIS) می‌باشد. نتایج به دست آمده بیانگر صحت اصلاح سطح الکتروود طلا توسط آنتی‌بادی، سلول‌های سرطانی و نانو ساختار ترکیبی اکسید گرافن و نانو ذرات طلا به صورت مرحله به مرحله می‌باشد.

بر اساس تئوری مارکوس [۲۷] فاصله‌ی انتقال الکترون یک فاکتور قطعی برای الکتروشیمی مستقیم اکسید و احیای بیومارکرها است که وابسته به مجموع فاصله‌های بین محل اکسید و احیا درون آنزیم - پروتئین و سطح الکتروود و همچنین نوع آرایش و استقرار آنزیم به پروتئین بر سطح الکتروود می‌باشد. لذا، بهترین حالت این است که فاصله‌ی انتقال الکترون تا حد امکان کوتاه باشد. به دلایل ذکر شده استفاده از نانومواد برای کوتاه کردن این فاصله و همین‌طور کاهش میزان انرژی انتقال الکترون مناسب می‌باشد. به عنوان مثال ترکیبات نانو ساختارهای کربنی نظیر گرافن، نانولوله‌های کربنی، فولرن و غیره با پلیمرها، نانوذرات فلزی و ترکیبات معدنی دارای اهمیت بسیاری در انتقال آسان تر و با انرژی کم تر الکترون در مواد بیولوژیکی در سطح الکتروود می‌باشند [۲۸].

به منظور محاسبه میزان حساسیت متوسط حسگر از طریق محاسبه شیب خط نمودار تغییرات (k) (رابطه ۱) پیک شدت جریان بر حسب غلظت قابل محاسبه می‌باشد. مقدار حساسیت متوسط این حسگر به سلول‌های سرطانی برابر $1 \mu A / cells \text{ ml}^{-1}$ محاسبه می‌گردد. این مقدار نسبت به مقدار حساسیت حسگرهای مشابه الکتروشیمیایی که جهت اندازه‌گیری سلول‌های سرطانی به روش‌های دیگر ساخته شده بسیار مناسب می‌باشد. همچنین بالاترین مقدار انحراف معیار (σ) در اندازه‌گیری‌ها معادل $2/1 \mu A$ می‌باشد که از طریق این مقدار و شیب خط نمودار تغییرات (k) کمینه حد تشخیص حسگر از قانون "۳ σ " قابل محاسبه است [۲۹]. مطابق قانون "۳ σ " مقدار کمینه حد تشخیص برابر است با $3\sigma/k$ که در این صورت مقدار کمینه حد تشخیص برای این حسگر معادل ۶ سلول سرطانی است. نتایج نشان‌دهنده پایین بودن حساسیت حسگر طراحی شده در مقایسه با سایر حسگرهای

الکتروشیمیایی بر مبنای روش‌هایی مانند طیف سنجی امپدانس (EIS)، ولتامتری پالس تفاضلی (DPV) و ولتامتری چرخه‌ای (CV) می‌باشد. مقایسه نتایج برخی از حسگرهای الکتروشیمیایی و حسگر طراحی شده در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است. یکی دیگر از پارامترهای مهم که می‌بایست مورد بررسی قرار گیرد بحث اختصاصیت حسگر است. عمل‌کرد مطلوب حسگر طراحی شده حاکی از گزینش‌پذیری مناسب آن و پتانسیل بالا برای تشخیص سلول‌های سرطانی مختلف می‌باشد. در محدوده غلظت هزار سلول در یک میلی‌لیتر، حسگر الکتروشیمیایی مذکور انحراف از حالت استاندارد نسبی حدود ۲/۹٪ برای چهار سلول سرطانی ذکر شده، نشان می‌دهد. پایین بودن میزان انحراف از استاندارد بیانگر تکرارپذیری مناسب در عمل‌کرد حسگر است. در حسگرهای الکتروشیمیایی نانوذرات طلا می‌توانند باعث افزایش حساسیت حسگر شود. نانوذرات طلا نقش کاتالیزور را در انتقال الکترون مابین آنالیت و سطح الکتروود انجام می‌دهد [۳۰]. از طرفی خود گرافن نقش به‌سزایی در افزایش سرعت انتقال الکترون دارد. وجود گروه‌های اکسیژنی بر روی لایه‌های گرافنی تاثیر بسیار زیادی بر روی جذب و اجذب سطحی محصولات واکنش‌های شیمیایی از سطح الکتروودهای گرافنی می‌گذارد. محصولات جذب سطحی شده اغلب باعث کند شدن واکنش الکتروشیمیایی برای ترکیبات خیلی حساس به گروه‌های اکسیژن‌دار می‌شوند. لایه‌ی اکسید گرافن که دارای لایه‌های اکسیدی است به صورت عمودی یا مایل مابین سطح الکتروود و مرکز فعال بیومارکر قرار می‌گیرد بدون این‌که پروتئین ساختار خود را تغییر دهد. گرافن اکسیدی عمق بیومارکر را به الکتروود پیوند می‌دهد [۳۱].

یکی دیگر از مزایای گرافن سطح بسیار بالای آن می‌باشد که از سطح موثر یک نانولوله‌ی کربنی تک لایه بسیار بیش‌تر است. به دلیل نامحدود نبودن ابعاد گرافن دو نوع سطح برای گرافن وجود دارند که می‌توانند در انتقال الکترون هتروژن شرکت کنند. نوع اول "basal plane" یا همان طرف مسطح آن است و نوع دوم "edge plane" یا لبه‌های آن است.

[4] Whelan SA, He J, Lu M, Souda P, Saxton RE, Faull KF, et al. Mass spectrometry (LC-MS/MS) identified proteomic biosignatures of breast cancer in proximal fluid. *J Proteome Res* 2012; 11: 5034-5045.

[5] Phillips JA, Xu Y, Xia Z, Fan ZH, Tan W. Enrichment of cancer cells using aptamers immobilized on a microfluidic channel. *Anal Chem* 2008; 81: 1033-1039.

[6] Zhang JJ, Gu MM, Zheng TT, Zhu JJ. Synthesis of gelatin-stabilized gold nanoparticles and assembly of carboxylic single-walled carbon nanotubes/Au composites for cytosensing and drug uptake. *Anal Chem* 2009; 81: 6641-6648.

[7] Zheng TT, Zhang R, Zou L, Zhu JJ. A label-free cytosensor for the enhanced electrochemical detection of cancer cells using polydopamine-coated carbon nanotubes. *Analyst* 2012; 137: 1316-1318.

[8] Hu C, Yang DP, Wang Z, Huang P, Wang X, Chen D, et al. Bio-mimetically synthesized Ag@ BSA microspheres as a novel electrochemical biosensing interface for sensitive detection of tumor cells. *Biosens Bioelectron* 2013; 41: 656-662.

[9] Zhang S, Zhang L, Zhang X, Yang P, Cai J. An efficient nanomaterial-based electrochemical biosensor for sensitive recognition of drug-resistant leukemia cells. *Analyst* 2014; 139: 3629-3635.

[10] Cheng W, Ding L, Lei J, Ding S, Ju H. Effective cell capture with tetrapeptide-functionalized carbon nanotubes and dual signal amplification for cytosensing and evaluation of cell surface carbohydrate. *Anal Chem* 2008; 80: 3867-3872.

[11] Ding L, Ji Q, Qian R, Cheng W, Ju H. Lectin-based nanoprobe functionalized with enzyme for highly sensitive electrochemical monitoring of dynamic carbohydrate expression on living cells. *Anal Chem* 2010; 82: 1292-1298.

[12] Chen X, Wang Y, Zhang Y, Chen Z, Liu Y, Li Z, and Li J. Sensitive electrochemical aptamer biosensor for dynamic cell surface N-Glycan evaluation featuring multivalent recognition and signal amplification on a dendrimer-graphene electrode interface. *Anal Chem* 2014; 86: 4278-4286.

[13] Wang X, Ju J, Li J, Li J, Qian Q, Mao C, Shen J. Preparation of electrochemical cytosensor for sensitive detection of HeLa cells based on self-assembled monolayer. *Electrochimica Acta* 2014; 123: 511-517.

[14] 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 Chim Acta* 2013; 764: 59-63.

[15] Ding L, Cheng W, Wang X, Ding S, Ju H. Carbohydrate monolayer strategy for electrochemical assay of cell surface carbohydrate. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 7224-7225.

[16] Liu H, Xu S, He Z, Deng A, Zhu JJ. Supersandwich cytosensor for selective and ultrasensitive detection of cancer cells using aptamer-DNA concatamer-quantum dots probes. *Anal Chem* 2013; 85: 3385-3392.

[17] Ding C, Wei S, Liu H. Electrochemiluminescent determination of cancer cells based on aptamers, nanoparticles, and magnetic beads. *Chemistry* 2012; 18: 7263-7268.

[18] Shi HW, Wu MS, Du Y, Xu JJ, Chen HY. Electrochemiluminescence aptasensor based on bipolar electrode for detection of adenosine in cancer cells. *Biosens Bioelectron* 2014; 55: 459-463.

[19] Zhang JJ, Zheng TT, Cheng FF, Zhang JR, Zhu JJ. Toward the early evaluation of therapeutic effects: An electrochemical platform for ultrasensitive detection of apoptotic cells. *Anal Chem* 2011; 83: 7902-7909.

سرعت انتقال الکترون هتروژن در گرافن به این صورت است که انتقال در لبه‌ها بسیار سریع‌تر از سطح آن است. نسبت سرعت انتقال الکترون در لبه‌ها به سطح تقریباً بیش از یک میلیون برابر است. انتقال سریع الکترون در نانومواد بر پایه‌ی گرافن و استفاده‌ی آن‌ها در سنسورها و بیوسنسورهای الکتروشیمیایی منجر به جداسازی موج‌های طیفی موادی که با هم تداخل دارند می‌شود [۳۲].

استفاده از گرافن در طراحی و ساخت بیوسنسورهای الکتروشیمیایی و نقش کاتالیتیکی آن‌ها باعث شد که استفاده از آن و ترکیب‌های آن با پلیمر هادی، نانوذرات فلزی و یا اکسیدهای فلزی و در نهایت عامل‌دار کردن هر کدام از اجزای ترکیب الکتروود به همراه استفاده از بیومارکرها در ساختار بیوسنسور الکتروشیمیایی برای اندازه‌گیری ترکیبات بیولوژیکی و تشخیص سرطان مورد استفاده قرار گیرد.

هدف کلی از انجام این پژوهش طراحی و ساخت نانو سامانه زیستی به منظور تشخیص دقیق سلول‌های سرطان سینه بر پایه روش الکتروشیمیایی بوده است. حسگر الکتروشیمیایی طراحی شده در این تحقیق، از گزینش‌پذیری عالی و تکرارپذیری مناسبی برخوردار می‌باشد. هم‌چنین مقدار حساسیت متوسط و کمینه حد تشخیص این حسگر به سلول‌های سرطانی به ترتیب برابر $1/12 \mu\text{A} / \text{cells ml}^{-1}$ و $6 \mu\text{A} / \text{cells ml}^{-1}$ سلول محاسبه گردد. نتایج به دست آمده در این مقاله نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد که این حسگر از پتانسیل بالایی در تشخیص سلول‌های سرطانی برخوردار می‌باشد.

منابع

[1] Omid M, Malakoutian M, Choolaei M, Oroojalian F, Haghirsadat F, Yazdian F. A Label-Free detection of biomolecules using micromechanical biosensors. *Chin Phys Lett* 2013; 30: 068701. (Persian).

[2] Schamhart D, Swinnen J, Kurth K-H, Westerhof A, Kusters R, Borchers H, Sternberg C. Numeric definition of the clinical performance of the nested reverse transcription-PCR for detection of hematogenous epithelial cells and correction for specific mRNA of non-target cell origin as evaluated for prostate cancer cells. *Clin Chem* 2003; 49: 1458-1466.

[3] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401.

adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 977-991.

[27] Marcus RA. On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. I. *J Chem Phys* 1956; 24: 966-978.

[28] Artiles MS, Rout CS, Fisher TS. Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63: 1352-1360.

[29] Omid M, Alaie S, Rousta A. Analysis of the vibrational behavior of the composite cylinders reinforced with non-uniform distributed carbon nanotubes using micro-mechanical approach. *Meccanica* 2012; 47: 817-833.

[30] Omid M, Amoabediny G, Yazdian F, Habibi-Rezaei M. Protein-based nanobiosensor for direct detection of hydrogen sulfide. *EPL (Europhysics Letters)*. 2015; 109: 18005.

[31] Baniasadi L, Omid M, Amoabediny G, Yazdian F, Attar H, Heydarzadeh A, et al. An inhibitory enzyme electrode for hydrogen sulfide detection. *Enzyme Microb Technol* 2014; 63: 7-12.

[32] Sheng ZH, Zheng XQ, Xu JY, Bao WJ, Wang FB, Xia XH. Electrochemical sensor based on nitrogen doped graphene: simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Biosens Bioelectron* 2012; 34: 125-131.

[20] Bonanni A, Ambrosi A, Pumera M. Nucleic acid functionalized graphene for biosensing. *Chemistry* 2012; 18: 1668-1673.

[21] Li L, Wu G, Yang G, Peng J, Zhao J, Zhu JJ. Focusing on luminescent graphene quantum dots: current status and future perspectives. *Nanoscale* 2013; 5: 4015-4039.

[22] Pan D, Gu Y, Lan H, Sun Y, Gao H. Functional graphene-gold nano-composite fabricated electrochemical biosensor for direct and rapid detection of bisphenol A. *Anal Chim Acta* 2015; 853: 297-302.

[23] Wang C, Li J, Amatore C, Chen Y, Jiang H, Wang XM. Gold nanoclusters and graphene nanocomposites for drug delivery and imaging of cancer cells. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011; 50: 11644-11648.

[24] Maji SK, Sreejith S, Mandal AK, Ma X, Zhao Y. Immobilizing gold nanoparticles in mesoporous silica covered reduced graphene oxide: a hybrid material for cancer cell detection through hydrogen peroxide sensing. *ACS Appl Mater Interfaces* 2014; 6: 13648-13656.

[25] Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 106-130.

[26] Lagarde SM, ten Kate FJ, Richel DJ, Offerhaus GJA, van Lanschot JJB. Molecular prognostic factors in

Cancer cell detection using electrochemical nanobiosensor based on graphene / gold nanoparticle

Meisam Omid (Ph.D)^{*1}, Amir Yadegari (M.Sc)¹, Hakimeh Zali (Ph.D)², Mohadese Hashemi (M.Sc)¹ Hadi Hasanzadeh (Ph.D)⁴

1 – Dept. of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical sciences, Tehran, Iran

2 - Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 - Faculty of New Science and Technology University of Tehran, Tehran, Iran

4 - Cancer Research Center and Dept. of Medical Physics, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received: 25 Nov 2015; Accepted: 15 May 2016)

Introduction: Nowadays, early cancer detection and effective treatment is crucial for improved prognosis and cancer management. In particular, the accurate qualitative detection of cancer cells represents a critical step in cancer diagnosis. **The aim of this study was to examine Cancer cell detection using electrochemical nanobiosensor based on graphene / gold nanoparticle.**

Materials and Methods: Modified graphene oxide/gold nanoparticle electrodes were employed to increase the sensitivity of human breast cancer MCF-7 cells detection, using CD44 biomarker. First the electrodes were modified with graphene, then gold nanoparticles were sediment on graphene-modified electrode. Then CD44 monoclonal antibody conjugated on the surface of gold nanoparticles, on graphene-modified electrode. Finally, the performance of the fabricated biosensors were investigated by using a common reference electrode composed of silver-silver chloride and a common platinum counter electrode at different antigen concentrations with the buffer and serum.

Results: The proposed electrochemical cytosensor delivered a high sensitivity with the average of 1.12 $\mu\text{A} / \text{cells ml}^{-1}$, and a low detection limit of 6 cells.

Conclusion: These results indicate that the cytosensor has great potential in diagnosis of cancers.

Keywords: Electrochemical nanobiosensor, Human breast cancer MCF-7 cells, CD44 Monoclonal antibody

* Corresponding author. Tel: ++98 21 22439848

m_omidi@sbmu.ac.ir