

تشخیص آنتی ژن اختصاصی پروستات با استفاده از بیوسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر آپتامر

اسماعیل حیدری بفرؤئی^۱، سمیرا عسکری^۲

دریافت مقاله: ۹۶/۰۸/۰۶ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۶/۱۰/۳۰ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۶/۱۲/۰۶ پذیرش مقاله: ۹۶/۱۲/۰۸

چکیده

زمینه و هدف: یکی از روش‌های مؤثر تشخیص و درمان سرطان پروستات تشخیص نشانگر زیستی آن می‌باشد. در حال حاضر بهترین نشانگر زیستی برای کنترل و تشخیص این سرطان، آنتی ژن اختصاصی پروستات (Prostate specific antigen; PSA) است. هدف پژوهش حاضر طراحی بیوسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر آپتامر (آپتاسنسور الکتروشیمیایی) جهت اندازه‌گیری PSA است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش آزمایشگاهی از نانو لوله‌های کربنی چند دیواره (MWCNTs)، نانوذرات طلا (AuNPs)، نانوصفات گرافن اکسید کاهش‌یافته (rGO) و کیتوسان (CS) به منظور هدایت الکتریکی و افزایش سطح استفاده شد. همچنین از آپتامر اختصاصی PSA جهت اتصال PSA به سطح الکتروود استفاده شد. از تکنیک‌های ولتامتری پالس تفاضلی، ولتامتری چرخه‌ای و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی جهت بررسی خواص الکتروشیمیایی و اهمیت نانوکامپوزیت سنتز شده استفاده شد. این آپتاسنسور برای اندازه‌گیری PSA چهار نمونه خونی افراد مبتلا به سرطان پروستات به کار گرفته شد و با روش آزمایشگاهی ایمونو رادیومتری مقایسه گردید. تجزیه و تحلیل داده‌های با آزمون t مستقل انجام شد.

یافته‌ها: بر اساس منحنی درجه‌بندی، حد تشخیص ۶/۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده خطی ۰/۰۱-۱۰۰/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای PSA به دست آمد. تکرارپذیری و تکتیرپذیری آپتاسنسور برای غلظت ۰/۹ نانوگرم بر میلی‌لیتر PSA به ترتیب با درصد انحراف استانداردهای نسبی (Relative standard deviation; RSD%) ۲/۳۹ و ۴/۰۱ درصد حاصل شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مقایسه‌های انجام‌شده بین روش ارائه شده و روش ایمونو رادیومتری، قابلیت به کارگیری آپتاسنسور ساخته شده در اندازه‌گیری نمونه‌های حقیقی را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد بیوسنسور ساخته شده با حدتشخیص کم و محدوده خطی وسیع می‌تواند ابزار مناسبی جهت تشخیص سرطان پروستات باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی ژن اختصاصی پروستات، آپتامر، ولتامتری پالس تفاضلی، آپتاسنسور، الکتروشیمی

۱- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ولیعصر (عج)، رفسنجان، ایران

تلفن: ۰۳۴-۳۱۳۱۲۴۳۳، دورنگار: ۰۳۴-۳۱۳۱۲۴۴۰، پست الکترونیکی: e.heydari@vru.ac.ir

۲- کارشناس ارشد شیمی تجزیه، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ولیعصر (عج)، رفسنجان، ایران

مقدمه

آپتامرها لیگاندهای الیگونوکلوئیدی تک رشته‌ای (اعم از DNA و RNA) هستند که طول آن‌ها بین ۳۰ تا ۷۰ نوکلئوتید است. این توالی‌های تک رشته، قابلیت پیچ و تاب خوردگی دارند و می‌توانند به طور اختصاصی با گونه‌های هدف پیوند برقرار کنند [۱]. اتصال هدف از طریق پیوندهای هیدروژنی، واکنش‌های الکترواستاتیک، نیروهای ضعیف واندروالسی و یا مجموعه‌ای از این نیروها رخ می‌دهد [۲].

به دلیل ساخت برون تنی و آزمایشگاهی آپتامرها آن‌ها می‌توانند با انتخاب‌گری بسیار بالا و به صورت اختصاصی به لیگاندهای مختلفی مثل پروتئین‌ها، پپتیدها، آنزیم‌ها، گیرنده‌های سطح سلول، ریزجانداران و غیره متصل شوند و جایگزین مناسبی برای لایه زیست تشخیصی آنتی ژن/آنتی بادی می‌باشند [۳]. از مهم‌ترین مزیت آپتامرها نسبت به آنتی ژن/آنتی بادی می‌توان به راحت بودن روش‌های اصلاح‌سازی و تثبیت آن‌ها [۴]، اختصاصی بودن اتصال آن‌ها [۵]، پایداری به گرما [۱]، حساسیت فوق العاده به کوچک‌ترین تغییر در مولکول هدف [۶]، مقاومت در برابر تغییرات pH و غلظت نمک‌ها [۳]، اندازه بسیار کوچک [۶]، سنتز بسیار آسان و امکان ذخیره‌سازی و نگهداری طولانی مدت آنها [۷] اشاره کرد. ویژگی‌های بارز آپتامرها باعث شده است که آن‌ها در زمینه‌های مختلف درمانی، تشخیصی و ساخت بیوسنسورها کاربرد داشته باشند [۶].

آپتاسنسورها، بیوسنسورهای مبتنی بر آپتامرها می‌باشند که می‌توان به وسیله آن‌ها به شناسایی و اندازه‌گیری مولکول‌های هدف در غلظت‌های نانومولار پرداخت [۸]. تاکنون به طور عمده آپتاسنسورها در دو

دسته الکتروشیمیایی و نوری معرفی شده‌اند [۸-۱۰]. در ساخت آپتاسنسور الکتروشیمیایی معمولاً از یک سطح الکتروده به عنوان سطح هادی جهت تثبیت آپتامر حساس بیولوژیکی استفاده می‌شود. عملکرد آپتاسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر تغییرات جریان الکتروشیمیایی پس از برهم‌کنش مولکول هدف با آپتامر می‌باشد [۱۱].

یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین جمعیت مردان جهان، سرطان پروستات می‌باشد (۳۱/۱ به ازای ۱۰۰۰۰۰ نفر) که بعد از سرطان‌های پوست دومین رده را به خود اختصاص داده است [۱۲]. طبق تحقیقاتی که در سال ۲۰۰۸ در ایالات متحده آمریکا انجام شد سرطان پروستات حدود ۲۵ درصد از کل سرطان‌های تشخیصی در مردان را شامل می‌شود و بعد از سرطان ریه بیشترین میزان مرگ و میر را به خود اختصاص می‌دهد [۱۳].

تشخیص زود هنگام سرطان پروستات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. یکی از روش‌های مؤثر تشخیص و درمان این بیماری تشخیص نشانگر زیستی آن می‌باشد. در حال حاضر بهترین نشانگر زیستی برای کنترل و تشخیص این سرطان آنتی ژن اختصاصی پروستات (Prostate specific antigen; PSA) است [۱۴]. PSA یک پروتئاز سربینی است که ۹۳ درصد آن پپتید و ۷ درصد آن را قند تشکیل می‌دهد. در ساختار مونومری این آنتی ژن ۲۴۰ آمینواسید و چهار زنجیره جانبی کربوهیدرات مشاهده می‌شود [۱۵]. PSA هم توسط سلول‌های سالم و هم سلول‌های سرطانی غده پروستات ترشح می‌شود [۱۶]. میزان نرمال PSA در خون انسان حدود ۴/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر است اما در بیماران مبتلا به سرطان پروستات مقدار آن به چندین برابر افزایش می‌یابد [۱۷]. حدود ۳۰ درصد مردان با

سطح PSA در محدوده ۹/۹-۴/۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر دارای این بیماری می‌باشند. بنابراین اندازه‌گیری دقیق میزان PSA در خون، یکی از عوامل اصلی در تشخیص و درمان سرطان پروستات است [۱۶].

با توجه به مطالب ذکر شده، هدف از این مطالعه، طراحی آپتاسنسور الکتروشیمیایی حساس و بدون برچسب جهت اندازه‌گیری PSA در خون انسان است. برای رسیدن به این هدف، از نانوصفحات گرافن (rGO)، نانولوله‌های کربنی چند دیواره (MWCNTs) و نانوذرات طلا (AuNPs) به منظور افزایش سطح و هدایت الکتریکی و همچنین از آپتامر اختصاصی PSA جهت اتصال PSA به سطح الکتروود استفاده شده است. برهم‌کنش PSA و آپتامر تثبیت شده بر سطح آپتاسنسور باعث تغییر در جریان اکسایش ردیاب Fe^{3+}/Fe^{2+} شده و این به عنوان سیگنال الکتروشیمیایی جهت بررسی غلظت PSA استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع آزمایشگاهی است که در طول مدت ۱۰ ماه در سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ و در آزمایشگاه شیمی تجزیه دانشگاه ولیعصر رفسنجان به انجام رسید. کلیه واکنش‌گرها و مواد شیمیایی استفاده شده از خلوص تجزیه‌ای برخوردار بوده و از شرکت‌های تولید کننده مواد شیمیایی Merck و Sigma-Aldrich خریداری شده‌اند و بدون هیچ گونه خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین از آب دو بار تقطیر برای تهیه محلول‌ها و رقیق کردن آن‌ها استفاده شده است. MWCNTs به کار گرفته شده از شرکت Sigma، با مشخصات: درصد خلوص بیش از ۹۰ درصد، قطر خارجی ۷۰-۱۱۰ نانومتر و طول

متوسط ۵-۹ میکرومتر بود. جهت حذف ناخالصی‌های فلزی موجود در نانولوله‌های کربنی و ایجاد خاصیت آب‌دوستی، نمونه‌های اولیه به مدت تقریباً ۱۵ ساعت در محلول ۲/۰ مولار نیتریک‌اسید رفلکس شدند. در این شرایط، سطح نانولوله‌های کربنی به گروه‌های کربوکسیلیک یا کتونی اکسید می‌گردند. در ادامه، مواد به دست آمده کاملاً شستشو گردیدند تا اسید باقی‌مانده در آن‌ها خارج شود، سپس در دمای اتاق خشک شدند. آپتامر DNA تیول‌دار PSA مورد استفاده با توالی 5'-HS-(CH₂)₆-TTT TTA ATT AAA GCT CGC CAT (کره 3'-CAA ATA GCT TT- از شرکت Bioneer) (جنوبی) خریداری شد. محلول استوک آپتامر در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷/۰) ساخته شد. محلول ردیاب آهن حاوی K₄Fe(CN)₆ و K₃Fe(CN)₆ با غلظت ۳/۰ میلی‌مولار و KCl با غلظت ۰/۱ مولار است.

مطالعات ولتامتری با استفاده از دستگاه پتانسیواستات-گالوانواستات اتولب (PGSTAT302N) ساخت شرکت Metrohm/Autolab (کشور هلند) انجام شد. از pH متر Metrohm (مدل 827، ساخت شرکت Sartorius، کشور هلند)، ترازوی Sartorius (مدل BP221S، ساخت شرکت Sartorius، کشور آلمان) و حمام فراصوت شرکت پارس نهاد (مدل PARSONIC 2600، شرکت پارس نهاد، ساخت ایران) استفاده شد. از دستگاه میکروسکوپ الکترونی پیمایشی (Scanning electron microscope; SEM) (XL30، شرکت Philips SEM S.A، آمریکا) جهت تصویربرداری سطوح استفاده گردید. در تمام اندازه‌گیری‌های ولتامتری، از سیستم سه الکترودی استفاده شد. مجموعه سه الکترودی شامل الکتروود کار (الکترودهای کربن شیشه‌ای اصلاح شده)،

الکتروود کمکی پلاتین و الکتروود مرجع نقره/ نقره کلرید بود.

گرافن اکسید (GO) مطابق با روش هامر از پودر گرافیت به دست آمد. هم‌چنین جهت سنتز نانوکامپوزیت گرافن و نانوذرات طلا (rGO-AuNP) از روش ارائه شده توسط wang و همکاران [۱۸] با اندکی تغییرات استفاده شد. بدین منظور ۵۰/۰ میلی گرم گرافن اکسید در ۲۰/۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر به مدت ۲ ساعت تحت امواج مافوق صوت قرار گرفته شد و سپس مقدار ۸۰۰/۰ میلی گرم پلی وینیل پیرولیدین به مخلوط اضافه گردید و به مدت ۱۲ ساعت هم زده شد. در مرحله بعد ۲۵۰/۰ میکرولیتر HAuCl_4 (۱ W/V درصد) و ۲۰۰ میلی گرم اسکوربیک اسید به محلول اضافه شد که این محلول به مدت یک ساعت در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد هم زده شد. محلول حاصل ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (مدل EBA20، شرکت Hettich، کشور آلمان) گردید و به منظور حذف پلی وینیل پیرولیدین و اسکوربیک اسید اضافه، رسوب حاصل چندین دفعه با آب شستشو داده شد. در نهایت rGO-AuNP سنتز شده در ۲۰ میلی لیتر آب دیسپرس شد.

نانو کامپوزیت کیتوسان و نانوذرات طلا (Cs-AuNPs) مطابق با روش ارائه شده توسط Sun و همکارانش [۱۹] سنتز شد. مخلوط ۲۰/۰ میلی لیتر کیتوسان در استیک اسید ۲/۰ مولار (۱ W/V درصد) و ۲۵۰/۰ میکرولیتر HAuCl_4 (۱ W/V درصد) به مدت یک ساعت هم زده شد، پس از آن مقدار ۱۰۰/۰ میکرولیتر NaBH_4 با غلظت ۰/۴ میلی مولار کم کم به آن اضافه گردید. این محلول به مدت یک ساعت هم زده شد و در نهایت

محلول شرابی رنگ به دست آمده نشان دهنده سنتز موفق AuNPs است. جهت سنتز MWCNT-AuNPs از روش ارائه شده توسط Suresh و همکارانش [۲۰] با اندکی تغییرات استفاده شد. ۰/۵ گرم از نانولوله های کربنی عامل دار شده به همراه ۵/۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر به مدت یک ساعت تحت امواج مافوق صوت قرار گرفت. پس از آن ۲۵۰/۰ میکرولیتر HAuCl_4 (۱ W/V درصد) به آن اضافه گردید و به مدت یک ساعت محلول هم زده شد. در نهایت مقدار ۱۰۰/۰ میکرولیتر NaBH_4 (۰/۴ میلی مولار) به محلول افزوده شد و پس از یک ساعت هم زدن، MWCNT-AuNPs سنتز گردید.

به منظور تثبیت نانوکامپوزیت های سنتز شده بر روی الکتروود کربن شیشه ای، ۵/۰ میکرولیتر از هر محلول بر روی سطح الکتروود صیقل داده شده چکانده شد و بعد از خشک شدن، چندین بار با آب دو بار تقطیر شسته شد تا نانوکامپوزیت های جذب نشده از روی سطح جدا شوند. در نهایت اجازه داده شد که سطح الکتروود خشک شود [۲۱]. در نهایت الکتروود های اصلاح شده با نانوکامپوزیت های سنتز شده به مدت ۹ ساعت درون محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷/۰) حاوی آبتامر با غلظت ۲۰۰/۰ نانومولار قرار گرفت و سپس با آب دو بار تقطیر شسته شد و اجازه داده شد تا خشک شود [۲۱].

آبتاسنسور های ساخته شده هر کدام به طور جداگانه به مدت ۴۰ دقیقه در محلول بافر فسفات ۰/۰۶ مولار (pH=۷/۰) و آب دو بار تقطیر در حضور و غیاب PSA با غلظت های مشخص قرار داده شد. سپس آبتاسنسور با آب دو بار تقطیر شسته و به یک سل الکتروشیمیایی حاوی ۱۰/۰ میلی لیتر محلول ردیاب آهن انتقال داده شد و ولتاموگرام پالس تفاضلی آن در محدوده پتانسیل -۰/۱ تا

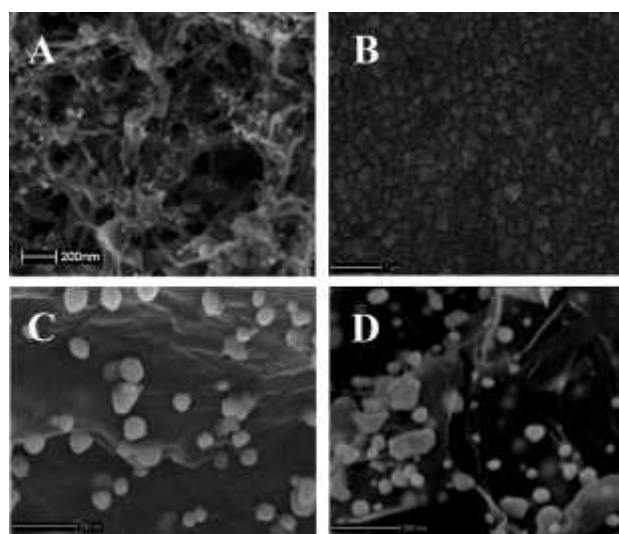
۰/۵۵ ولت انجام گرفت. اختلاف جریان حاصل از محلول حاوی PSA و جریان حاصل از نمونه شاهد در سطح آپتاسنسور ($\Delta I = I_{\text{PSA}} - I_{\text{blank}}$) به عنوان سیگنال تجزیه‌ای مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت منحنی ΔI نسبت به لگاریتم غلظت PSA رسم گردید [۲۲].

برای اندازه‌گیری PSA در نمونه خون، نمونه تازه پلاسمای خون چهار شخص مبتلا به سرطان پروستات از بیمارستان سیدالشهداء اصفهان تهیه شد و تا قبل از آزمایش در حالت یخ‌زده نگهداری شد. نمونه‌های سرم خون جدا شده و در ابتداء غلظت PSA در نمونه‌ها با استفاده از روش ایمنو رادیومتری اندازه‌گیری شد و سپس همان نمونه‌ها ۱۰ مرتبه با محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار ($\text{pH}=7.0$) رقیق گردید و با استفاده از روش افزایش استاندارد، مقدار PSA در آن با استفاده از آپتاسنسور گزارش شد [۲۳]. در این پژوهش به منظور ارزیابی اثر مزاحمت سایر گونه‌ها در تشخیص PSA از آزمون t مستقل در سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

به کمک روش تصویربرداری SEM، ریخت‌شناسی

نانوکامپوزیت‌های سنتز شده مشخص گردید. شکل ۱ بخش‌های A، B و C به ترتیب تصاویر SEM الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح‌شده با MWCNT-AuNPs، CS-AuNPs و rGO-AuNPs را نشان می‌دهد. همان‌طور که در تصویر A مشاهده می‌شود MWCNT به صورت همگن بر روی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای توزیع شده است و نانوذرات طلا نیز به خوبی در این تصویر مشاهده می‌شود. تصویر B نشان می‌دهد که نانوذرات طلا با قطره‌های مختلف (اندازه‌های مختلف) بر روی فیلم CS قرار گرفته‌اند. در تصویر C نقطه‌های روشن بیانگر نانوذرات طلا هستند که در تمام سطح الکتروود کربن شیشه‌ای پخش شده‌اند و بیشتر چگالی آن‌ها در سایت‌های پرچین و لبه‌های گرافن اکساید کاهش یافته می‌باشد. همچنین تصویر D نانوکامپوزیت rGO-AuNPs بر روی نانوکامپوزیت MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs در سطح الکتروود کربن شیشه‌ای را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از این تصاویر به خوبی بیانگر قرار گرفتن و توزیع مناسب این نانوکامپوزیت‌های سنتز شده بر روی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای می‌باشد.

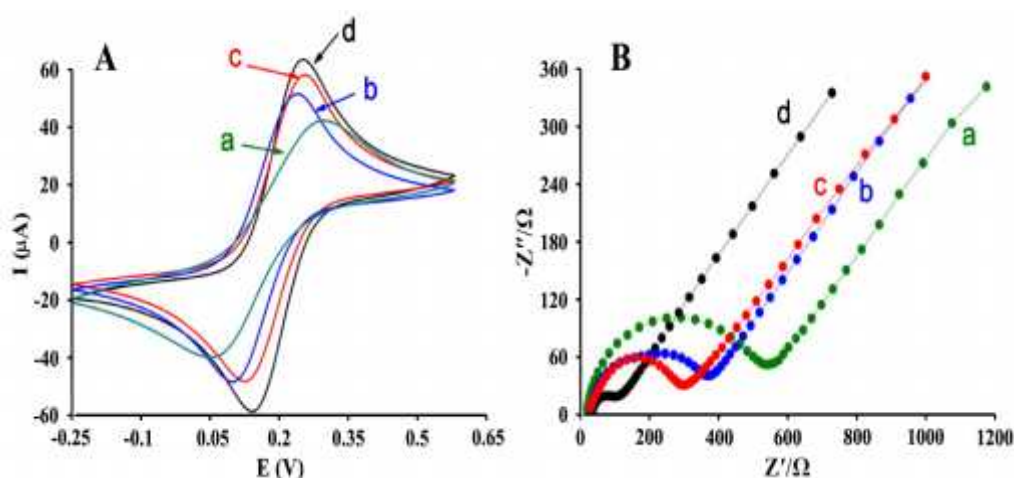


شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی پیمایشی نانوکامپوزیت‌های سنتز شده تثبیت شده بر روی الکتروود کربن شیشه‌ای

(A) MWCNTs-AuNPs (B) CS-AuNPs (C) rGO-AuNPs (D) MWCNTs-AuNPs/CS-AuNPs

(نمودار ۱B). مطابق این شکل، کم شدن مقاومت انتقال بار الکترواد اصلاح شده با نانوکامپوزیت MWCNT-AuNPs در مقایسه با الکترواد اصلاح نشده، تأییدی بر نتایج حاصل از ولتامتری چرخه‌ای می‌باشد. همچنین پس از اضافه کردن $5/0 \mu\text{L}$ CS-AuNPs بر روی الکترواد کربن شیشه‌ای اصلاح شده با MWCNT-AuNPs، جریان پیک‌های کاتدی و آندی ردیاب $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ باز هم افزایش یافت (نمودار ۱A، ولتاموگرام c) که این امر به علت اضافه شدن نانوذرات طلا بیشتر بر روی سطح الکترواد است. در نمودار ۱B (منحنی c) کاهش مقاومت انتقال بار نیز نشان دهنده افزایش هدایت الکتریکی می‌باشد. در نهایت پس از افزودن rGO-AuNPs بر روی MWCNT-AuNPs/CS- (ولتاموگرام c) و کاهش مقاومت انتقال بار امپدانس الکتروشیمیایی (منحنی d) مشاهده شد که این افزایش شدید در جریان ناشی از اثر تعاونی هدایت الکتریکی خوب گرافن اکساید کاهش یافته و نانوذرات طلا می‌باشد.

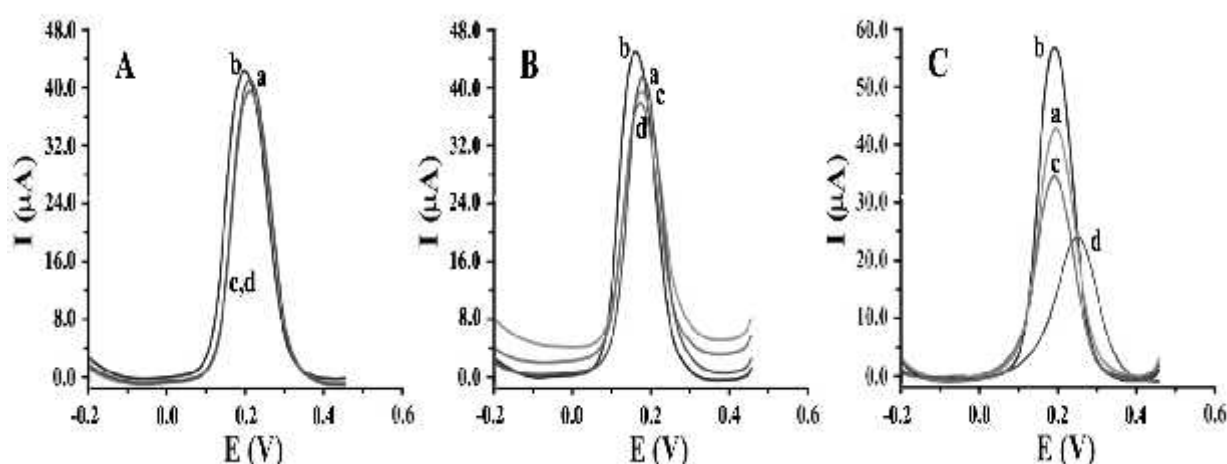
در ادامه از تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای و طیف‌سنجی مقاومت ظاهری الکتروشیمیایی به منظور بررسی فرآیند اصلاح سطح الکتروادها استفاده شد. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای مربوط به الکتروادهای کربن شیشه‌ای اصلاح شده با MWCNT-AuNPs، MWCNT-AuNPs/CS- و AuNPs/CS-AuNPs در ردیاب آهن ثبت گردید. همان طور که در نمودار ۱A مشاهده می‌شود الکترواد کربن شیشه‌ای اصلاح نشده دو موج اکسایش-کاهش واضح را نشان می‌دهد و اصلاح الکترواد کربن شیشه‌ای با نانوکامپوزیت MWCNT-AuNPs در مقایسه با الکترواد اصلاح نشده باعث افزایش جریان اکسایش-کاهش ردیاب روی سطح الکترواد شده است. علاوه بر این جدایی پیک کاتدی و آندی کاهش یافته که این به دلیل افزایش مساحت سطح و افزایش هدایت الکتریکی حاصل از نانوذرات طلا و MWCNT می‌باشد. برای تأیید نتایج حاصل از ولتامتری چرخه‌ای، طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی نیز بررسی شد



نمودار ۱- ولتاموگرام‌های چرخه‌ای (A) و منحنی‌های نایکوئیست (B) مربوط به الکترواد کربن شیشه‌ای اصلاح نشده (a) و اصلاح شده با (b) MWCNTs-AuNPs (c) و MWCNTs-AuNPs/CS-AuNPs (d) در محلول حاوی $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ و $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mmol/L و 1 mmol/L با سرعت اسکن 100 mV/s

افزایش یافته (ولتاموگرام‌های b) که این نشان از هدایت الکتریکی بالای نانوکامپوزیت‌های سنتز شده است. هنگامی که آپتامر بر روی این نانوکامپوزیت‌ها قرار می‌گیرد، در تمام حالت‌ها جریان اکسایش آهن کاهش می‌یابد (ولتاموگرام‌های c) که این نشان از کاهش انتقال الکترون و جلوگیری از دسترسی الکترون‌ها به سطح دارد. میزان این کاهش برای الکترودهای مختلف متفاوت است. پس از برهم‌کنش آپتامر با PSA، سیگنال مجدداً کاهش می‌یابد (ولتاموگرام‌های d) که این کاهش نیز برای تمام الکترودهای اصلاح‌شده با بزرگی‌های مختلف مشاهده می‌شود.

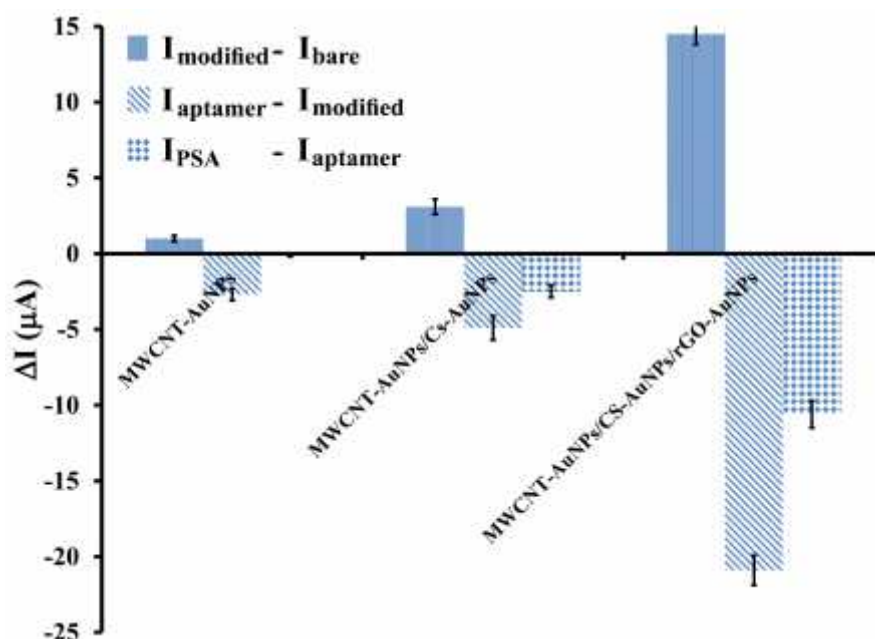
به منظور بررسی کاربرد نانوکامپوزیت-MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs در اندازه‌گیری PSA، الکترودهای کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانوکامپوزیت‌های مختلف MWCNT-AuNPs، MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs و MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs تهیه شدند و با یکدیگر مقایسه گردید. نمودار ۲ ولتاموگرام‌های پالس تفاضلی این سه الکترودهای کربن شیشه‌ای اصلاح شده را در مراحل مختلف تشخیص PSA نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با اصلاح الکترودهای کربن شیشه‌ای به وسیله این سه اصلاح گر، جریان اکسایش ردیاب آهن



نمودار ۲- ولتاموگرام‌های پالس تفاضلی مربوط به الکترودهای اصلاح شده با نانوکامپوزیت‌های (A) MWCNT-AuNPs (B) MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs و (C) AuNPs/CS-AuNPs در محلول حاوی 3 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ و 0.1 mol/L KCl . (a) الکترودهای اصلاح نشده، (b) الکترودهای اصلاح شده با نانوکامپوزیت‌های سنتز شده، (c) الکترودهای اصلاح شده پس از اضافه کردن آپتامر و (d) الکترودهای اصلاح شده با آپتامر پس از ۴۰ دقیقه برهم‌کنش با 0.4 ng/mL PSA.

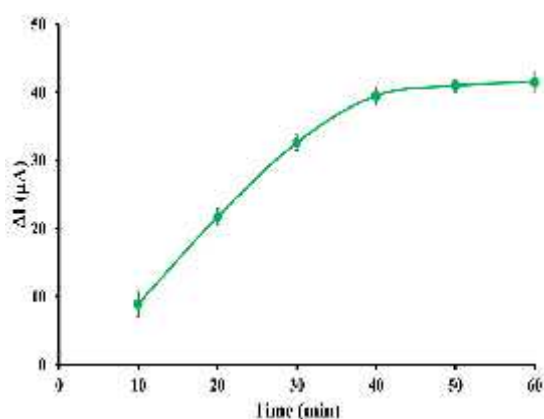
حالتی که از هر سه اصلاح گر MWCNT-rGO-AuNPs، AuNPs و CS-AuNPs استفاده شده است، بسیار شدیدتر از بقیه حالت‌ها می‌باشد. بنابراین نتایج حاصل از ولتامتری پالس تفاضلی نشان می‌دهد که MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs می‌تواند به عنوان یک اصلاح گر عالی جهت اندازه‌گیری PSA به کار رود.

نمودار ۳ نتایج مربوط به ولتامتری پالس تفاضلی این الکترودها را به صورت ستونی نشان می‌دهد. محور y نشان‌دهنده تفاضل بین I_p قبل و بعد از تثبیت لایه جدید می‌باشد (ΔI). همان‌طور که در شکل‌ها دیده می‌شود، مقدار ΔI پس از تثبیت پروتئین PSA بر روی الکترودها کاهش می‌یابد (میله صورتی)، ولی میزان این کاهش برای



نمودار ۳- تغییر در جریان اکسایش آهن مربوط به الکترودهای اصلاح شده با نانوکامپوزیت‌های MWCNT-AuNPs/CS- MWCNT-AuNPs پس از تثبیت نانوکامپوزیت، آپتامر و PSA در محلول ردیاب آهن

۴۰ دقیقه به حداکثر مقدار می‌رسد و از این زمان به بعد ثابت می‌ماند. بنابراین جهت رسم منحنی کالبراسیون از زمان ۴۰ دقیقه به عنوان زمان بهینه جهت برهم‌کنش PSA با آپتامر استفاده گردید.



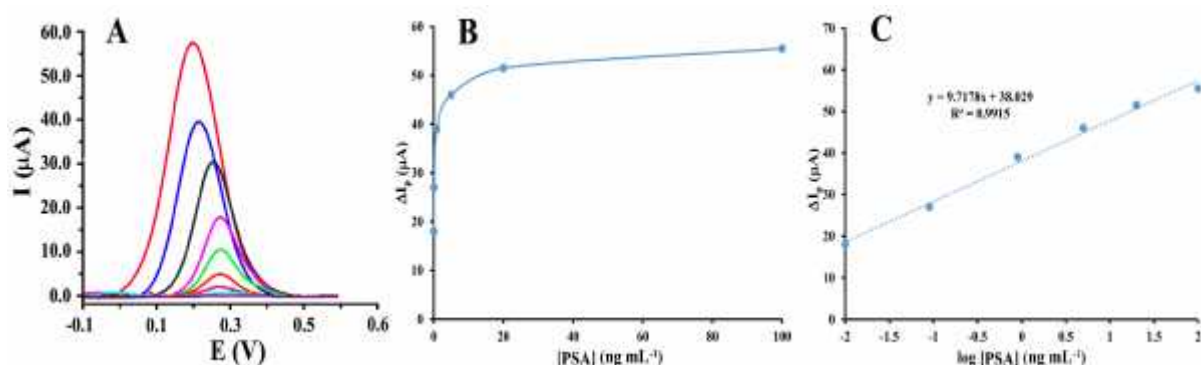
نمودار ۴- نتایج حاصل از برهم‌کنش PSA (۰/۱ ng/mL) و آپتامر تثبیت شده بر سطح الکترود در زمان‌های مختلف در محلول ردیاب آهن

ولتاموگرام‌های حاصل از برهم‌کنش غلظت‌های مختلف PSA با آپتامر متصل شده به سطح در نمودار ۵- نشان داده شده است. با اندازه‌گیری جریان‌های مربوط به مقادیر مختلف PSA ارتباط بین غلظت PSA و جریان با رسم منحنی مربوطه به دست آمد (نمودار ۵-B). همچنین به

جهت بررسی اثر برهم‌کنش بین PSA و آپتامر، آپتاسنسور ساخته شده با MWCNT-AuNPs/CS- AuNPs/rGO-AuNPs در زمان‌های مختلف داخل محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۷/۰ در حضور و غیاب PSA با غلظت ۰/۹ پیکومولار قرار داده شد و پس از شستشو با آب دو بار تقطیر به سل الکتروشیمیایی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول ردیاب آهن انتقال داده شد. سپس ولتاموگرام پالس تفاضلی محلول ثبت گردید. اختلاف جریان به دست آمده از آپتاسنسورهای برهم‌کنش کرده با PSA و برهم‌کنش نکرده با PSA ($\Delta I = I_{PSA} - I_{blank}$) به عنوان سیگنال تجزیه‌ای مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت منحنی ΔI نسبت به زمان رسم گردید. با اندازه‌گیری جریان‌ها در زمان‌های مختلف، منحنی مربوط به جریان برحسب زمان رسم گردید (نمودار ۴). نتایج نشان می‌دهد که با افزایش زمان برهم‌کنش PSA و آپتامر تثبیت شده بر روی سطح الکترود میزان تغییر در جریان پیک اکسایش آهن (ΔI) افزایش می‌یابد. سپس در زمان

(نمودار ۵-۵). مطابق شکل ارتباط بین سیگنال و غلظت در محدوده ۰/۱-۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر خطی است.

منظور رسیدن به رابطه خطی بین غلظت و جریان، منحنی ΔI_p برحسب لگاریتم غلظت PSA رسم گردید



نمودار ۵- (A) ولتاموگرام‌های پالس تفاضلی مربوط به غلظت‌های مختلف PSA (از بالا به پایین: ۰، ۰/۱، ۰/۰۹، ۰/۹، ۱، ۱۰، ۱۰۰ ng/mL) و (B) وابستگی سیگنال (ΔI_p) به غلظت PSA. (C) وابستگی سیگنال (ΔI_p) به لگاریتم غلظت PSA. (۱۰۰/۰)

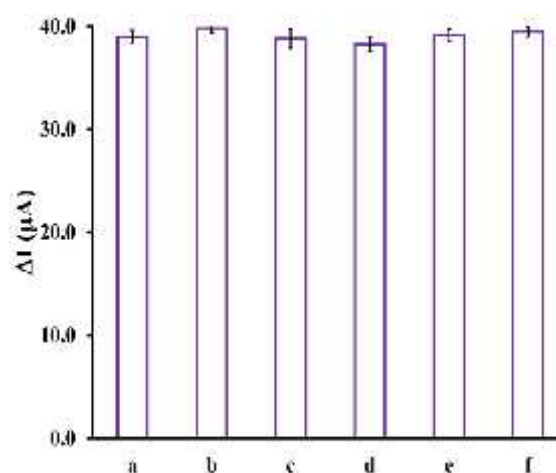
میلی‌لیتر از PSA به وسیله ۵ آپتاسنسور مجزا در ۵ روز متفاوت ثبت شد. درصد انحراف استاندارد نسبی جریان‌های به دست آمده برابر با ۴/۰۱ می‌باشد که نشان دهنده تکثیرپذیری خوب این آپتاسنسور می‌باشد. جهت بررسی پایداری، پنج آپتاسنسور ساخته شده به مدت ۳۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس برای اندازه‌گیری غلظت ۰/۹ نانوگرم بر میلی‌لیتر از PSA به کار برده شدند. نتایج نشان داد که سیگنال پس از ۳۰ روز نگهداری آپتاسنسور در شرایط بهینه، ۵/۹۶ درصد کاهش می‌یابد که این نشان دهنده پایداری خوب و طول عمر بالای آپتاسنسور می‌باشد.

جهت بررسی تأثیر سایر پروتئین‌ها در اندازه‌گیری PSA، ابتداء جریان اکسایش ردیاب آهن مربوط به غلظت ۰/۹ نانوگرم بر میلی‌لیتر از PSA بر روی الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح‌شده با آپتامر متصل به نانوکامپوزیت MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs به روش ولتامتری پالس تفاضلی و در غیاب گونه‌های دیگر چندین بار اندازه‌گیری شد و دامنه اطمینان محاسبه گردید. دامنه

برای تعیین حد تشخیص روش، از معادله $LOD = 3S_b/m$ استفاده شد که در این رابطه LOD حدتشخیص، S_b انحراف استاندارد شاهد و m شیب منحنی درجه‌بندی است. بدین منظور در شرایط بهینه، ۵ آپتاسنسور متفاوت به مدت ۴۰ دقیقه در محلول شاهد (بدون حضور PSA) قرار داده و سپس با اندازه‌گیری جریان هر کدام به طور مجزا در محلول ردیاب آهن، انحراف استاندارد متناظر با آن به دست آورده شد. حد تشخیص روش برای اندازه‌گیری PSA برابر با ۶/۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. برای بررسی تکرارپذیری پاسخ آپتاسنسور ساخته شده نسبت به اندازه‌گیری PSA، سیگنال‌های ΔI_p حاصل از اندازه‌گیری ۰/۹ نانوگرم بر میلی‌لیتر PSA به وسیله پنج آپتاسنسور مجزا (که به طریق‌های مشابه ساخته شده‌اند) ثبت شد. درصد انحراف استاندارد نسبی جریان‌های به دست آمده برابر با ۲/۳۹، شاهدهی بر تکرارپذیری خوب پاسخ این آپتاسنسورها می‌باشد.

به منظور بررسی میزان تکثیرپذیری پاسخ آپتاسنسور، سیگنال‌های حاصل از اندازه‌گیری غلظت ۰/۹ نانوگرم بر

اطمینان برای آپتاسنسور PSA در غیاب مزاحم و در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($t = 1/96$), $0.81 \pm 39/2$ میکروآمپر به دست آمد. سپس گونه‌ای که اثر مزاحمت آن مورد بررسی بود، به محلول اضافه و سیگنال ناشی از افزودن آن ثبت شد. اگر افزودن گونه، سیگنال مربوط به PSA، 0.9 نانوگرم بر میلی‌لیتر را از دامنه اطمینان محاسبه شده خارج کند، آن گونه به عنوان مزاحم در نظر گرفته می‌شود و در غیر این صورت مزاحم تلقی نمی‌شود. طبق نتایج (نمودار ۶)



نمودار ۶- نتایج حاصل از بررسی اثر مزاحمت‌ها بر روی سیگنال تجزیه‌ای (غلظت PSA ۰/۱ ng/mL و غلظت مزاحم‌ها ۵۰/۰ ng/mL). (a) PSA بدون حضور مزاحم، (b) PSA در حضور ایمونوگلوبولین، (c) PSA در حضور BSA، (d) PSA در حضور هموگلوبین، (e) PSA در حضور تروپومبین و (f) لیزوزیم.

میانگین سیگنال‌ها برای آپتاسنسور PSA در حضور گونه‌های آلبومین سرم گاوی، هموگلوبین، تروپومبین، ایمونوگلوبولین انسان و لیزوزیم همگی در دامنه اطمینان قرار دارند، بنابراین اضافه کردن این گونه‌ها با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر هیچ گونه مزاحمتی برای اندازه‌گیری PSA ندارد.

به منظور بررسی قابلیت آپتاسنسور پیشنهاد شده برای اندازه‌گیری PSA در نمونه‌های حقیقی، از نمونه خونی چهار فرد مبتلا به سرطان پروستات استفاده شد. برای هر نمونه خونی پنج بار اندازه‌گیری انجام شد. سپس غلظت‌های به دست آمده به وسیله آپتاسنسور پیشنهادی با اندازه‌گیری‌های به دست آمده از روش آزمایشگاهی ایمونو رادیومتری توسط روش‌های F-test و t-test مقایسه شدند. نتایج به دست آمده در جدول (۱) خلاصه شده است. همان‌طور که نتایج جدول نشان می‌دهد هیچ کدام از مقادیر t و F تجربی در $P=0.05$ از مقادیر تئوری تجاوز نکرده است که نشان می‌دهد تفاوت معنی‌داری بین نتایج دو روش وجود ندارد. نتایج مقایسه‌های انجام شده نشان‌دهنده قابلیت به کارگیری آپتاسنسور ساخته شده در اندازه‌گیری نمونه‌های حقیقی می‌باشد.

جدول ۱- مقایسه عملکرد آپتاسنسور پیشنهاد شده و روش آزمایشگاهی ایمونو رادیومتری برای اندازه‌گیری PSA در نمونه‌های خون چهار فرد مبتلا به سرطان پروستات در پنج بار اندازه‌گیری هر نمونه (اصفهان، ۱۳۹۶)

غلظت بدست آمده		غلظت بدست آمده با روش ایمنو رادیومتری		نمونه		
با روش ارائه شده	(ng/mL)	جدول t	تجربی t			
F	جدول F	F تجربی				
۱۳/۴۰ ± ۰/۳۱	۱۳/۵۱ ± ۰/۴۹	۲/۱۳۲	۰/۴۲۳	۶/۳۸۸	۲/۴۹۸	A
۱۷/۰۱ ± ۰/۴۲	۱۶/۴۹ ± ۰/۶۰	۲/۱۳۲	۱/۵۸۷	۶/۳۸۸	۲/۰۴۱	B
۲۲/۱۱ ± ۰/۹۱	۲۱/۹۸ ± ۰/۷۹	۲/۱۳۲	۰/۲۴۳	۶/۳۸۸	۱/۳۲۷	C
۲۵/۵۱ ± ۰/۹۸	۲۵/۱۸ ± ۰/۹۰	۲/۱۳۲	۰/۵۵۴	۶/۳۸۸	۱/۱۸۶	D

بحث

در این پژوهش، میزان کاهش در جریان اکسایش ردیاب Fe^{3+}/Fe^{2+} پس از برهم‌کنش PSA با آپتامر متصل به سطح الکتروده به عنوان سیگنال در نظر گرفته شد. بیشترین کاهش سیگنال هنگامی مشاهده شد که هر سه اصلاحگر $rGO-AuNPs$ ، $MWCNT-AuNPs$ و $CS-AuNPs$ با هم بر روی الکتروده تثبیت شده باشند. به عبارتی الکتروده اصلاح شده با نانوکامپوزیت $MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs$ به عنوان بستر مناسب جهت تثبیت آپتامر بیشتر و در نتیجه برهم‌کنش بیشتر PSA با آپتامر می‌باشد که این به دلیل اثر تعاونی rGO ، $MWCNT$ و $AuNPs$ در افزایش هدایت الکترونی، افزایش سطح الکتروده و افزایش خاصیت الکتروکاتالیزوری می‌باشد [۱۹]. این اثر تعاونی موجب افزایش حساسیت، کارایی و بهبود سیگنال الکتروشیمیایی در اندازه‌گیری PSA می‌شود. حساسیت بالا در این روش از ویژگی ترکیبات تشکیل‌دهنده نانوکامپوزیت مورد استفاده مشتق شده است. $MWCNTs$ باعث افزایش نسبت سطح به حجم، هدایت الکتریکی خوب در سطح الکتروده، سنتیک سریع انتقال الکترونی و افزایش مناطق ویژه برای تثبیت کارآمد مقدار زیادی آپتامر DNA همراه با حفظ فعالیت زیستی آن می‌شود [۲۴]. هم‌چنین $AuNPs$ به علت نسبت سطح به حجم بسیار عالی و بهبود هدایت بین نانوصفات rGO و rGO سبب تثبیت بیشتر $AuNPs$ می‌شود [۲۵]. هم‌چنین کیتوسان به جهت خصوصیات چسبندگی بالا، سازگاری زیستی، هدایت نسبی خوب و قابلیت فیلم‌سازی عالی بستر مناسبی جهت تثبیت بهتر و بیشتر آپتامر فراهم می‌آورد. مجموع این ویژگی‌ها در ترکیبات تشکیل‌دهنده نانوکامپوزیت سبب

ایجاد فعالیت الکتروکاتالیزوری بسیار عالی و تقویت سیگنال مؤثر شد [۲۶].

ثابت ماندن سیگنال تجزیه‌ای پس از ۴۰ دقیقه برهم‌کنش PSA و آپتامر تثبیت شده بر روی سطح الکتروده نشان‌دهنده این امر می‌باشد که بعد از مدت ۴۰ دقیقه سایت‌های فعال آپتامر به حالت اشباع رسیده و در این حالت حداکثر مقدار برهم‌کنش اتفاق افتاده است [۱۹].

حد تشخیص یکی از مهم‌ترین ارقام شایستگی برای مقایسه روش‌های مختلف تجزیه‌ای است که در این کار حد تشخیص بسیار کم ۶ پیکوگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. اگر چه ζ evik و همکاران [۲۷] و هم‌چنین Pawan و همکاران [۲۸] آپتاسنسورهای جهت تشخیص PSA طراحی کردند که حدتشخیص کمتری دارند (۱ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) اما محدوده خطی آپتاسنسور ارائه شده در این پژوهش به مراتب وسیع‌تر از آپتاسنسورهای طراحی شده توسط ζ evik و Pawan است.

حضور کیتوسان در نانوکامپوزیت $MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs$ باعث شده است که تکرارپذیری این آپتاسنسور افزایش یابد. نتایج تحقیقات Erdem و همکاران [۲۶] نشان داد که چسبندگی بالا و قابلیت فیلم‌سازی عالی کیتوسان باعث ساخت فیلم‌های تکرارپذیر بر روی الکتروده می‌شود. در این پژوهش نیز حضور کیتوسان به صورت مخلوط با نانوذرات طلا در لایه میانی، بین $rGO-AuNPs$ و $MWCNT-AuNPs$ ، باعث شد که درصد انحراف استاندارد نسبی برای پنج اندازه‌گیری تکراری به مقدار ۲/۳۹ کاهش یابد.

از محدودیت‌های این مطالعه قابل حمل نبودن آپتاسنسور ارائه شده است که برای این منظور مطالعات

دیگری لازم است تا با تثبیت نانوکامپوزیت MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs و آپتامر PSA بر روی کیت‌های الکتریکی سیار، تحت شرایط کاملاً بهینه و مطمئن زیست‌تراشه مربوطه ساخته شود.

نتیجه‌گیری

در این پروژه ساخت بیوسنسوری الکتروشیمیایی جهت اندازه‌گیری و تشخیص سریع و فوق‌العاده حساس PSA انجام گرفت که در طراحی آن از آپتامر اختصاصی PSA به عنوان یک مدل پروتئینی و از نانوکامپوزیت MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs جهت اصلاح سطح الکترود کربن شیشه‌ای استفاده گردید. برای بررسی خواص الکتروشیمیایی آپتاسنسور طی مراحل مختلف اصلاح سطح الکترود، از تکنیک‌های ولتامتری چرخه‌ای، ولتامتری پالس تفاضلی و طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی استفاده شد. نتایج مطالعه ما نشان داد که

الکترود اصلاح شده با نانوکامپوزیت MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs بیشترین کارایی را در تثبیت بیشتر و بهتر آپتامر دارد. همچنین اهمیت نانوکامپوزیت مورد نظر در اندازه‌گیری PSA توسط تکنیک ولتامتری پالس تفاضلی مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان از اثر تعاونی بین نانوکامپوزیت‌های rGO-AuNPs، Cs-AuNPs و MWCNTs-AuNPs می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه ولیعصر رفسنجان صمیمانه تشکر می‌نمایند. از پرسنل بیمارستان سیدالشهدای اصفهان که همکاری و هماهنگی لازم جهت کمک در نمونه‌گیری و فراهم نمودن امکان استفاده از امکانات بیمارستان را به عمل آوردند، صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌نماییم.

References

- [1] Velasco-Garcia M, Missailidis S. New trends in aptamer-based electrochemical biosensors. *Gene Ther Mol Biol* 2009; 13(1): 1-9.
- [2] Mairal T, Özalp VC, Sánchez PL, Mir M, Katakis I, O'Sullivan CK. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal Bioanal Chem* 2008; 390(4): 989-1007.
- [3] Ling Z, Ming-Hua W, Jian-Ping W, Zhun-Zhong YE. Application of biosensor surface immobilization methods for aptamer. *Chinese J Anal Chem* 2011; 39(3): 432-8.
- [4] Song S, Wang L, Li J, Fan C, Zhao J. Aptamer-based biosensors. *TrAC-Trend Anal Chem* 2008; 27(2): 108-17.

- [5] Zhou L, Li DJ, Gai L, Wang JP, Li YB. Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification. *Sens Actuat B* 2012; 162(1): 201-8.
- [6] Jayasena SD. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* 1999; 45(9): 1628-50.
- [7] Dhar S, Gu FX, Langer R, Farokhzad OC, Lippard SJ. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt (IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *P Natl Acad Sci* 2008; 105(45): 17356-61.
- [8] Hianik T, Wang J. Electrochemical aptasensors-recent achievements and perspectives. *Electroanalysis* 2009; 21(11): 1223-35.
- [9] Lee JO, So HM, Jeon EK, Chang H, Won K, Kim YH. Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. *Anal Bioanal Chem* 2008; 390(4): 1023-32.
- [10] Hong P, Li W, Li J. Applications of aptasensors in clinical diagnostics. *Sensors* 2012; 12(2): 1181-93.
- [11] Meirinho SG, Dias LG, Peres AM, Rodrigues LR. Voltammetric aptasensors for protein disease biomarkers detection: A review. *Biotechnol Adv* 2016; 34(5): 941-53.
- [12] McGuire S. World cancer report 2014. Geneva, Switzerland: world health organization, international agency for research on cancer, WHO press, 2015. *Adv Nutr* 2016; 7(2): 418-9.
- [13] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA-Cancer J Clin* 2008; 58(1): 71-96.
- [14] Chen Z, Lei Y, Chen X, Wang Z, Liu J. An aptamer based resonance light scattering assay of prostate specific antigen. *Biosens Bioelectron* 2012; 36(1): 35-40.
- [15] Kim JP, Lee BY, Lee J, Hong S, Sim SJ. Enhancement of sensitivity and specificity by surface modification of carbon nanotubes in diagnosis of prostate cancer based on carbon nanotube field effect transistors. *Biosens Bioelectron* 2009; 24(1): 3372-8.
- [16] Bohunicky B, Mousa SA. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnol Sci Appl* 2011; 4(1): 1-10.
- [17] Zhao N, He Y, Mao X, Sun Y, Zhang X, Li CZ, et al. Electrochemical assay of active prostate-specific antigen (PSA) using ferrocene-functionalized peptide probes. *Electrochem Commun* 2010; 12(3): 471-4.

- [18] Wang L, Yang R, Wang H, Li J, Qu L, Harrington PDB. High-selective and sensitive voltammetric sensor for butylated hydroxyanisole based on AuNPs-PVP-graphene nanocomposites. *Talanta* 2015; 138(1): 169-75.
- [19] Sun X, Li F, Shen G, Huang J, Wang X. Aptasensor based on the synergistic contributions of chitosan-gold nanoparticles, graphene-gold nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine nanocomposites for kanamycin detection. *Analyst* 2014; 139(1): 299-308.
- [20] Suresh S, Gupta M, Kumar GA, Rao VK, Kumar O, Ghosal P. Synergic effect of multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles towards immunosensing of ricin with carbon nanotube-gold nanoparticles-chitosan modified screen printed electrode. *Analyst* 2012; 137(17): 4086-92.
- [21] Heydari-Bafrooei E, Amini M, Ardakani MH. An electrochemical aptasensor based on TiO₂/MWCNT and a novel synthesized Schiff base nanocomposite for the ultrasensitive detection of thrombin, *Biosens Bioelectron* 2016; 85(1): 828-36.
- [22] Wang M, Zhai S, Ye Z, He L, Peng D, Feng X, et al. An electrochemical aptasensor based on a TiO₂/three-dimensional reduced graphene oxide/PPy nanocomposite for the sensitive detection of lysozyme. *Dalton Trans* 2015; 44(14): 6473-9.
- [23] Rahi A, Sattarahmady N, Heli H. Label-free electrochemical aptasensing of the human prostate-specific antigen using gold nanospears. *Talanta* 2016; 156(1): 218-24.
- [24] Benvidi A, Yazdanparast S, Rezaeinasab M, Tezerjani MD, Abbasi S. Designing and fabrication of a novel sensitive electrochemical aptasensor based on poly (L-glutamic acid)/MWCNTs modified glassy carbon electrode for determination of tetracycline. *J Electroanal Chem* 2018; 808(1): 311-20.
- [25] Chen X, Guo Z, Tang Y, Shen Y, Miao P. A highly sensitive gold nanoparticle-based electrochemical aptasensor for theophylline detection. *Anal Chim Acta* 2018; 999(1): 54-9.
- [26] Erdem A, Eksin E, Muti M. Chitosan-graphene oxide based aptasensor for the impedimetric detection of lysozyme. *Colloids Surf B* 2014; 115(1): 205-11.
- [27] Çevik E, Bahar Ö, Şenel M, Abasıyanık MF. Construction of novel electrochemical

- immunosensor for detection of prostate specific antigen using ferrocene-PAMAM dendrimers. *Biosens Bioelectron* 2016; 86(1): 1074-9.
- [28] Pawan J, Tamboli V, Harniman RL, Estrela P, Allender CJ, Bowen JL. Aptamer-MIP hybrid receptor for highly sensitive electrochemical detection of prostate specific antigen. *Biosens Bioelectron* 2016; 75(1): 188-95.

Detection of Prostate Specific Antigen Using an Electrochemical Aptamer-Based Biosensor

E. Heydari-Bafrooei¹, S. Askari²

Received:28/10/2017 Sent for Revision:20/01/2018 Received Revised Manuscript:25/02/2018 Accepted: 27/02/2018

Background and Objectives: Detection of the biomarkers is one of the effective methods for diagnosis and treatment of prostate cancer. Prostate specific antigen (PSA) is currently the best biomarker available for controlling and detecting this cancer. The purpose of the current study was to design an electrochemical aptamer-based biosensor (electrochemical aptasensor) to measure the PSA.

Materials and Methods: In this laboratory study, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), gold nanoparticles (AuNPs), reduced graphene oxide (rGO), and chitosan (CS) were used to increase the electrical conductivity and surface area. The PSA-specific aptamer was also used for binding PSA on the surface of the electrode. Differential pulse voltammetry (DPV), cyclic voltammetry (CV), and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques were applied to study the electrochemical properties and importance of synthesized nanocomposite. This aptasensor was used to measure PSA in four blood samples in patients with prostate cancer and was compared with the *in vitro* immuno-radiometric method. Data were analyzed using independent t-test.

Results: Based on the calibration curve, the detection limit of 6.0 pg mL^{-1} and the linear range of $0.01\text{-}100.00 \text{ ng mL}^{-1}$ were obtained. The repeatability and reproducibility of this aptasensor for PSA with the concentration of 0.9 ng mL^{-1} were obtained with relative standard deviations (RSD%) of 2.39 and 4.01%, respectively.

Conclusion: The results of the comparisons between the proposed method and the immuno-radiometric method showed the applicability of the aptasensor to measure the real samples. It seem that the biosensor with low limit of detection and wide linear range may be a suitable device for diagnosis of prostate cancer.

Key words: Prostate specific antigen, Aptamer, Differential pulse voltammetry, Aptasensor, Electrochemistry

Funding: This research was funded by Research Council of Vali-e-Asr University of Rafsanjan.

Conflict of interest: None declared.

How to cite this article: Heydari-Bafrooei E , Askari S. Detection of Prostate Specific Antigen Using an Electrochemical Aptamer-Based Biosensor. *Univ Med Sci* 2018; 17 (2): 115-30. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Chemistry, Faculty of Science, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran, ORCID: 0000-0001-9652-4041

(Corresponding Author) Tel: (034)31312433, Fax: (034)31312440, E-mail: e.heydari@vru.ac.ir

2- MSc in Analytical Chemistry, Faculty of Science, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran, ORCID: 0000-0002-3915-5240