مقاله پژوهشی مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان دوره ۱۷، اردیبهشت ۱۳۹۷، ۱۳۰–۱۱۵

تشخیص آنتیژن اختصاصی پروستات با استفاده از بیوسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر آپتامر اسماعیل حیدری بفروئی'، سمیرا عسکری'

دريافت مقاله:6/١٨/٠٦ ارسال مقاله به نويسنده جهت اصلاح: ٩٦/١٠/٣٠ دريافت اصلاحيه از نويسنده:٩٤/١٢/٠۶ پذيرش مقاله: ٩٤/١٢/٠٨

چکیدہ

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، آنتیژن اختصاصی پروستات (Prostate specific antigen) (PSA است. هدف پژوهش حاضر طراحی بیوسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر آپتامر (آپتاسنسور الکتروشیمیایی) جهت اندازه گیری PSA است.

مواد و روشها: در این پژوهش آزمایشگاهی از نانو لولههای کربنی چند دیواره (MWCNTs)، نانوذرات طلا (AuNPs)، نانوذرات طلا (AuNPs)، نانوذرات طلا (rGO) و کیتوسان (CS) به منظور هدایت الکتریکی و افزایش سطح استفاده شد. همچنین از آپتامر اختصاصی PSA جهت اتصال PSA به سطح الکترود 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 اندازه گیری 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 ۲۰۰۱–۲۰۱۰ نانوگرم بر میلیلیتر برای PSA بهدست آمد. تکرارپذیری و تکثیرپذیری آپتاسنسور برای غلظت ۹/۰ نانوگرم بر میلیلیتر AuNPs به ترتیب ما درصد انحراف استانداردهای نسبی (۳SD) به تعریز در ای غلظت ۹/۰ نانوگرم بر میلیلیتر برای مدوله با ترمین در جهبندی، حد تشخیص ۶/۰ پیکوگرم بر میلیو و رادیومتری بر میلیلیتر کر مر میلی لیتر برای PSA به ترتیب ما درصد انحراف استانداردهای نسبی (۳SD) به مناز انه شده و روش ایمونو رادیومتری، قابلیت به کارگیری آپتاسنسور با درصد انحراف استانداردهای نسبی (شکار طاقه ما دارانه شده و روش ایمونو رادیومتری، قابلیت به کارگیری آپتاسنسور ساخته شده در اندازه گیری نمونههای حقیقی را نشان میدهد. به نظر می رسد بیوسنسور ساخته شده با حدتشخیص کم و محدوده خطی وسیع میتواند ایزار مناسبی جهت تشخیص سرطان پروستات باشد. **واژههای کلیدی:** آنتیژن اختصاصی پروستات، آپتامر، ولتامتری پالس تفاضلی، آپتاسنسور، الکتروشیمی

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

تلفن: ۳۱۳۱۲۴۳۳-۱۳۰، دورنگار: ۳۱۳۱۲۴۴۰-۱۳۴، پست الکترونیکی: e.heydari@vru.ac.ir

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

مقدمه

آپتامرها لیگاندهای الیگونوکلئوتیدی تکرشتهای (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 و میتوانند ای ای اصال هدف از طریق پیوندهای هیدروژنی، واکنشهای الکترواستاتیک، نیروهای ضعیف واندروالسی و یا مجموعهای از این نیروها رخ میدهد [۲].

به دلیل ساخت برونتنی و آزمایشگاهی آپتامرها آنها می توانند با انتخاب گری 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 زیستتشخیصی آنتیژن/ آنتیبادی مے باشند [۳]. از مہمترین مزیت آیتامرها نسبت به آنتیژن/ آنتیبادی میتوان به راحت بودن روشهای اصلاحسازی و تثبیت آنها [۴]، اختصاصی بودن اتصال آنها [۵]، پایداری به گرما [۱]، حساسیت فوقالعاده به کوچـکتـرین تغییـر در مولکـول هـدف [۶]، مقاومت در برابر تغییرات pH و غلظت نمکها [۳]، انـدازه 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 [8].

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

دسته الکتروشیمیایی و نوری معرفی شدهاند [۱۰–۸]. در ساخت آپتاسنسور الکتروشیمیایی معمولاً از یک سطح الکترود بهعنوان 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 ۱۰۰۰۰

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 می دهد [۱۳]. تشخیص زود هنگام سرطان پروستات از اهمیت ویژه ای برخوردار است. یکی از روش های مؤثر تشخیص و درمان این بیماری تشخیص نشانگر زیستی آن می باشد. در حال حاضر بهترین نشانگر زیستی برای کنترل و تشخیص این سرطان آنتیژن اختصاصی پروستات (Prostate specific این Prostate specific) است [۱۴]. PSA یک پروتئاز سرینی است که ۹۳ درصد آن پپتید و ۷ درصد آن را قند تشکیل می دهد. در ساختار مونومری این آنتیژن ۲۴۰ آمینواسید و چهار زنجیره جانبی کربوهیدرات مشاهده می شود [۱۵]. PSA هم توسط سلول های سالم و هم سلول های سرطانی خون انسان حدود ۲/۰ نانوگرم بر میلی لیتر است اما در بیماران مبتلا به سرطان پروستات مقدار آن به چندین

Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-06-07

سطح PSA در محدوده ۹/۹–۹/۱ نانوگرم بر میلیلیتر دارای این بیماری میباشند. بنابراین اندازه گیری 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 اندازه گیری 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 و به سطح الکترود استفاده شده است. برهم کنش PSA و آپتامر تثبیت شده بر سطح آپتاسنسور باعث تغییر در جریان اکسایش ردیاب +Fe³⁺/Fe 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 ۱۳۹۶و در آزمایشگاه شیمی تجزیه دانشگاه ولیعصر رفسنجان به انجام رسید. کلیه واکنش گرها و مواد شیمیایی استفاده شده از خلوص تجزیهای برخوردار بوده و از شرکتهای تولید کننده مواد شیمیایی Merck و ماواد شیمیایی استفاده قرار گرفتند و بدون هیچ گونه خالصسازی مورد استفاده قرار گرفتند. هم چنین از آب دو بار تقطیر برای تهیه محلولها و رقیق کردن آنها استفاده شده است. MWCNTS به کار گرفته شده از شرکت مواکه با مشخصات: درصد خلوص بیش از ۹۰ درصد، قطر خارجی ۱۰۰–۲۰ نانومتر و طول

متوسط ۹-۵ 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 رفلاکس 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. آیتامر NA تیولدار PSA مورد استفاده با توالی-Fl-5 آیتامر OCC CAT مورد استفاده با توالی-Gl-5 جنوبی) خریداری شد. محلول استوک آیتامر در محلول جنوبی) خریداری شد. محلول استوک آیتامر در محلول بافر فسفات ۱/۰ مولار (۲/۰=pH) ساخته شد. محلول ردیاب آهن حاوی ۵٫K4Fe(CN) با غلظت ۱/۰ مولار است.

مطالعات ولتامتري با استفاده از دستگاه پتانسیواستات-گالوانواستات اتولب (PGSTAT302N ساخت شرکت Metrohm/Autolab کشور هلند) انجام شد. از pH متر شر کت ساخت **.**827 Metrohm (مدل Metrohm/Autolab، کشور هلند)، ترازوی Sartorius (مدل BP221S، ساخت شركت Sartorius، كشور ألمان) و حمام فراصوت شرکت پارس نهاد (مدل PARSONIC 2600، شرکت پارس نهاد، ساخت ایران) استفاده شد. از دستگاه میکروسکوپ الکترونی پیمایشی (Scanning Philips شركت ،XL30) (electron microscope; SEM .SEM S.A، آمریکا) جهت تصویربرداری سطوح استفاده گردید. در تمام اندازه گیریهای ولتامتری، از سیستم سه الكترودى استفاده شد. مجموعه سه الكترودى شامل الكترود كار (الكترودهای كربن شیشهای اصلاح شده)،

الکترود کمکی پلاتین و الکترود 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 میلیلیتر 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 HAuCl4 (W/V) درصد) و ۲۰۰ میلیگرم 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 دقيقه سانترفيوژ (مدل EBA20، شرکت Hettich، کشور آلمان) گردید و به منظور حذف پلیوینیل پیرولیدین و اسکوربیک اسید اضافه، رسوب حاصل چندین دفعه با آب شستشو داده شد. در نهایت rGO-AuNP سنتز شده در ۲۰ میلیلیتر آب دیسپرس شد.

نانو کامپوزیت کیتوسان و نانوذرات طلا (Cs-AuNPs) مطابق با روش ارائه شده توسط Sun و همکارانش [۱۹] ســنتز شـد. مخلـوط ۲۰/۰ میلـیلیتـر کیتوسـان در ۱۵۰/۲ مـولار (۷/۷ ۱ درصـد) و ۲۵۰/۲ میکرولیتر HAuCl4 (۷/۷ ۱ درصد) به مدت یک ساعت هم زده شد، پس از آن مقـدار ۱۰۰/۰ میکرولیتر HAuBH4 با غلظت ۲/۴ میلیمولار کمکم به آن اضافه گردیـد. ایـن محلول بـه مـدت یـک ساعت هـم زده شـد و در نهایـت

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. ۲۰/۵ گرم از نانولولههای کربنی عاملدار شده به همراه ۰/۵ میلیلیتر آب دوبار تقطیر به مدت یک ساعت تحت امواج مافوق صوت قرار گرفت. پس مدت یک ساعت تحت امواج مافوق صوت قرار گرفت. پس از آن ۰/۰۵ میکرولیتر HAuCl4 (۷/۷ ۱ درصد) به آن اضافه گردید و به مدت یک ساعت محلول هم زده شد. در نهایت مقدار ۱۰۰/۰ میکرولیتر ۱۸BH4 (۲/۰ میلیمولار) به محلول افزوده شد و پس از یک ساعت هم زدن،

به منظور تثبیت نانوکامپوزیتهای سنتز شده بر روی الکترود کربن شیشهای، ۵/۰ میکرولیتر از هر محلول بر روی سطح الکترود صیقل داده شده چکانده شد و بعد از خشک شدن، چندین بار با آب دو بار تقطیر شسته شد تا نانوکامپوزیتهای جذب نشده از روی سطح جدا شوند. در نهایت اجازه داده شد که سطح الکترود خشک شود [۲۱]. در نهایت الکترودهای اصلاح شده با نانوکامپوزیتهای سنتز شده به مدت ۹ ساعت درون محلول بافر فسفات ۱/۰ مولار (۰/۲=pH) حاوی آپتامر با غلظـت ۲۰۰/۰ نانومولار قرار گرفت و سپس با آب دو بار تقطیر شسـته شد و اجازه داده شد تا خشک شود [۲۱].

آپتاسنسورهای 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 غلظتهای مشخص قرار داده شد. سپس آپتاسنسور با آب دو بار تقطیر شسته و به یک سل الکتروشیمیایی حاوی ۱۰/۰ میلیلیتر 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 (I=I_{PSA} – I_{blank}) به عنوان سیگنال تجزیهای مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت منحنی I نسبت به لگاریتم غلظت PSA رسم گردید [۲۲].

برای اندازه گیری 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 اندازه گیری شد و سپس همان نمونهها ۱۰ مرتبه با محلول بافر فسفات ۰/۱ مـولار (pH=٧/٠) رقيق گرديد و با استفاده از روش افزايش استاندارد، مقدار PSA در آن با استفاده از آپتاسنسور گزارش شد [۲۳]. در این پژوهش به منظور ارزیابی اثر مزاحمـت سـایر گونـههـا در تشـخیص PSA از آزمـون t مستقل در سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده شد.

به کمک روش تصویربرداری SEM، ریختشناسی

نتايج

نانوکامپوزیتهای سنتز شده مشخص گردید. شکل ۱ بخشهای A، B و C به ترتیب تصاویر SEM الکترود کربن شیشهای اصلاح شده با MWCNT-AuNPs، شیشه ای اصلاح شده با و rGO-AuNPs را نشان میدهد. همان طور که در تصویر A مشاهده می شود MWCNT به صورت همگن بر روی سطح الکترود کربن شیشهای توزیع شده است و نانوذرات طلا نیز به خوبی در این تصویر مشاهده می شود. تصویر B نشان میدهد که نانوذرات طلا با قطرهای مختلف (اندازههای مختلف) بر روی فیلم CS قرار گرفتهاند. در تصویر C نقطههای روشن بیانگر نانوذرات طلا هستند که در تمام سطح الکترود کربن شیشهای پخش شدهاند و بیشتر چگالی آنها در سایتهای پرچین و لبههای گرافناکساید کاهشیافته میباشد. همچنین تصویر D نانوكامپوزیت rGO-AuNPs بر روی نانوكامپوزیت MWCNT-AuNPs/Cs-AuNPs در سطح الكترود کربنشیشهای را نشان میدهد. نتایج حاصل از این تصاویر به خوبی بیانگر قرار گرفتن و توزیع مناسب این نانوکامپوزیتهای سنتز شده بر روی سطح الکترود کربن شیشهای میباشد.

в

شکل ۱ – تصاویر میکروسکوپ الکترونی پیمایشی نانو کامپوزیتهای سنتز شده تثبیت شده بر روی الکترود کربن شیشه ای MWCNTs-AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs (D) grGO-AuNPs (C) CS-AuNPs (B) MWCNTs-AuNPs (A)

دوره ۱۷، شماره ۲، سال ۱۳۹۷

DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.7.8



در ادامه از تکنیکهای ولتامتری چرخهای و طيفسنجي مقاومت ظاهري الكتروشيميايي به منظور بررسى فرآيند اصلاح سطح الكترودها استفاده شد. ولتاموگرامهای چرخهای مربوط به الکترودهای کربن شیشهای اصلاح شده با MWCNT-AuNPs، اسیشهای اصلاح MWCNT-AuNPs/Cs-AuNPs/CS-AuNPs 9 AuNPs/rGO-AuNPs در ردیاب آهن ثبت گردید. همان طور که در نمودار ۱۸ مشاهده می شود الکترود کربن شیشهای اصلاح نشده دو موج اکسایش-کاهش واضح را نشان میدهد و اصلاح الکترود کربن شیشهای با نانوكامپوزيت MWCNT-AuNPs در مقايسه با الكترود اصلاح نشده باعث افزایش جریان اکسایش-کاهش ردیاب روى سطح الكترود شده است. علاوه بر اين جدايي پيک کاتدی و آندی کاهش یافته که این به دلیل افزایش مساحت سطح و افزایش هدایت الکتریکی حاصل از نانوذرات طلا و MWCNT مىباشد.

برای تأیید نتایج حاصل از ولتامتری چرخهای، طیفسنجی امپدانس الکتروشیمیایی نیز بررسی شد

(نمودار ۱B). مطابق این شکل، کم شدن مقاومت انتقال بار الكترود اصلاح شده با نانوكامپوزيت -MWCNT AuNPs در مقایسه با الکترود اصلاح نشده، تأییدی بر نتایج حاصل از ولتامتری چرخهای میباشد. همچنین پس از اضافه کردن CS-AuNPs ۵/۰ μL بر روی الکترود کربن شیشهای اصلاحشده با MWCNT-AuNPs، جریان پیکهای کاتدی و آندی ردیاب +Fe³⁺/Fe²⁺ باز هم افزایش يافت (نمودار ١٨، ولتامو گرام c) كه اين امر به علت اضافه شدن نانوذرات طلا بیشتر بر روی سطح الکترود است. در نمودار B (منحنى c) كاهش مقاومت انتقال بار نيز نشان دهنده افزایش هدایت الکتریکی میباشد. در نهایت پس از افزودن rGO-AuNPs برروی -MWCNT-AuNPs/CS AuNPs/GCE افزایش بیشتر جریان ولتاموگرام چرخهای (ولتاموگرام c) و کاهش مقاومت انتقال بار امپدانس الكتروشيميايي (منحني d) مشاهده شد كه اين افزايش شدید در جریان ناشی از اثر تعاونی هدایت الکتریکی خوب گرافن اکساید کاهش یافته و نانوذرات طلا می باشد.



نمودار ۱ – ولتامو گرامهای چرخهای (A) و منحنیهای نایکوئیست (B) مربوط به اکترود کربن شیشه ای اصلاح نشده (a) و اصلاح شده با (b) MWCNTs-AuNPs/CS-AuNPs (c) MWCNTs-AuNPs و (A) و MWCNTs-AuNPs/CS-AuNPs در محلول حاوی K4Fe(CN)6 ۳/۰ mmol/L و K3Fe(CN)6 ۳/۰ mmol/L با سرعت اسکن ۱۰۰ mVs

به منظور بررسی کاربرد نانوکامپوزیت-MWCNT در اندازهگیری AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs در اندازهگیری PSA، الکترودهای کربن شیشهای اصلاح شده با MWCNT-AuNPs و-MWCNT-AuNPs MWCNT-AuNPs/Cs-AuNPs و-Tunps/CS-AuNPs یکدیگر مقایسه گردید. نمودار ۲ ولتاموگرامهای پالس یفاضلی این سه الکترود کربن شیشهای اصلاح شده را در مراحل مختلف تشخیص PSA نشان میدهد. همان طور که مشاهده میشود با اصلاح الکترود کربن شیشهای به

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 برهم کنش آپتامر با PSA، سیگنال مجدداً کاهش مییابد (ولتاموگرامهای d) که این کاهش نیز برای تمام الکترودهای اصلاحشده با بزرگیهای مختلف مشاهده میشود.



نمودار ۲- ولتامو گرامهای پالس تفاضلی مربوط به الکترودهای اصلاح شده با نانو کامپوزیتهای (A) MWCNT-AuNPs (B) MWCNT-AuNPs و (A) و K3Fe(CN) و K4Fe(CN) و K4Fe(CN) در محلول حاوی K4Fe(CN) در محلول حاوی K4Fe(CN) (T/ mmol/L و (A) MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs در محلول حاوی K4Fe(CN) (C) الکترود اصلاح شده با الکترود اصلاح شده با نانو کامپوزیتهای سنتزشده، (c) الکترود اصلاح شده پس از اضافه کردن آ پتامر و (b) الکترود اصلاح شده با آ پتامر پس از ۴۰ دقیقه برهم کنش با PSA ۰/۹ ng/mL

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 (I). همان طور که در شکلها دیده می شود، مقدار I پس از تثبیت پروتئین PSA بر روی الکترود کاهش مییابد (میله صورتی)، ولی میزان این کاهش برای

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



نمودار ۳- تغییر در جریان اکسایش آهن مربوط به الکترودهای اصلاح شده با نانو کامپوزیتهای MWCNT-AuNPs/Cs- MWCNT-AuNPs AuNPs و MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs پس از تثبیت نانو کامپوزیت، آپتامر و PSA در محلول ردیاب آهن

جهت بررسی اثر برهمکنش بین PSA و آپتامر، آپتاسنسور ساخته شده با -MWCNT-AuNPs/CS AuNPs/rGO-AuNPs در زمانهای مختلف داخل محلول PSA بافر فسفات 1/1 مولار با 1/2 PH= V/2 در حضور و غیاب 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 برهم کنش کرده با (I=I_{PSA} – I_{blank}) PSA و برهم کنش نکرده با PSA بهعنوان سیگنال تجزیهای مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت منحنی I نسبت به زمان رسم گردید. با اندازه گیری جریان ها در زمان های 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 (I) افزایش می یابد. سپس در زمان

۴۰ دقیقه به حداکثر مقدار میرسد و از این زمان به بعد ثابت میماند. بنابراین جهت رسم منحنی کالیبراسیون از زمان ۴۰ دقیقه به عنوان زمان بهینه جهت برهم کنش PSA با آیتامر استفاده گردید.



نمودار ۴- نتایج حاصل از برهم کنش PSA (۰/۹ ng/mL) و آپتامر تثبیت شده بر سطح الکترود در زمانهای مختلف در محلول ردیاب آهن ولتاموگرامهای حاصل از برهم کنش غلظتهای مختلف

PSA با آپتامر متصل شده به سطح در نمودار A-۵ نشان داده شده است. با اندازه گیری جریان های مربوط به مقادیر مختلف PSA ارتباط بین غلظت PSA و جریان با رسم منحنی مربوطه به دست آمد (نمودار B-۵). همچنین به

منظور رسیدن به رابطه خطی بین غلظت و جریان،

منحنى I برحسب لگاريتم غلظت PSA رسم گرديد

(نمودار C-۵). مطابق شکل ارتباط بین سیگنال و غلظت در محدوده ۱۰۰–۰/۰۱ نانوگرم بر میلی لیتر خطی است.



نمودار ۵– (A) ولتامو گرامهای پالس تفاضلی مربوط به غلظتهای مختلف PSA (از بالا به پایین: ng/mL ۰، ۱۰/۰، ۲۰/۰، ۰/۵، ۲/۵، ۲۰/۰ و ۱۰۰/۰. (B) وابستگی سیکنال (Ip) به غلظت PSA (C) وابستگی سیکنال (Ip) به لگاریتم غلظت PSA

برای تعیین حد تشخیص روش، از معادله 🛛 = LOD 3sb/m استفاده شد که در این رابطه LOD حدتشخیص، Sb 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 اندازه گیری جریان هر کدام به طور مجزا در محلول ردیاب آهن، انحراف استاندارد متناظر با آن به دست آورده شد. حد تشخیص روش برای اندازه گیری PSA برابر با ۶/۰ پیکو گرم بر میلی لیتر محاسبه گردید. برای بررسی تکرارپذیری پاسخ آپتاسنسور ساخته شده نسبت به اندازه گیری PSA، سیگنالهای I_P حاصل از اندازه گیری ۰/۹ نانو گرم بر میلی لیتر 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، شاهدی بر تكرارپذيري خوب پاسخ اين آپتاسنسورها ميباشد.

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

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 ۹/۰ 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

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

اطمینان برای آپتاسنسور PSA در غیاب مزاحم و در سطح اطمینان ۹۵ درصد (۹۶ = ۱)، ۱۸/۱ ± ۳۹/۲ 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 موادن آن ثبت شد. اگر افزودن گونه، سیگنال مربوط به محاسبه شده خارج کند، آن گونه به عنوان مزاحم در نظر گرفته می شود و در غیر این صورت مزاحم تلقی نمی شود. طبق نتایج (نمودار ۶)



نمودار ۶- نتایج حاصل از بررسی اثر مزاحمتها بر روی سیکنال تجزیهای (غلظت ۸۹/۹ PSA و غلظت مزاحهها مراحهها ng/mL در حضور ۵۰/۰). (a) PSA بدون حضور مزاحه، (b) PSA در حضور ۱یمونو گلوبین، (c) PSA در حضور ترومبین و (f) PSA در حضور لیزوزیم.

میانگین سیگنالها برای آپتاسنسور PSA در حضور گونههای آلبومین سرم گاوی، هموگلوبین، ترومبین، ایمنوگلوبولین انسان و لیزوزیم همگی در دامنه اطمینان قرار دارند، بنابراین اضافه کردن این گونهها با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر هیچ گونه مزاحمتی برای اندازه گیری PSA ندارد.

به منظور بررسی قابلیت آپتاسنسور پیشنهاد شده برای اندازه گیری PSA در نمونه های حقیقی، از نمونه خونی چهار فرد مبتلا به سرطان پروستات استفاده شد. برای هر نمونه خونی پنج بار اندازه گیری انجام شد. سپس غلظت های به دست آمده به وسیله آپتاسنسور پیشنهادی با اندازه گیری های به دست آمده از روش آزمایشگاهی ایمونو رادیومتری توسط روش های F-test و t-test مقایسه شدند. نتایج به دست آمده در جدول (۱) خلاصه شده است. همان طور که نتایج جدول نشان می دهد هیچ کدام از مقادیر t و F تجربی در ۲۰/۵ از مقادیر تئوری تجاوز نکرده است که نشان می دهد تفاوت معنی داری بین نتایج دو روش وجود ندارد. نتایج مقایسه های انجام شده نشان دهنده قابلیت به کار گیری آپتاسنسور ساخته شده در اندازه گیری نمونه های حقیقی می باشد.

جدول ۱ – مقایسه عملکرد آ پتاسنسور پیشنهادشده و روش آزمایشگاهی ایمونو رادیومتری برای اندازه گیری PSA در نمونههای خون چهار فرد مبتلا به سرطان پروستات در پنج بار اندازه گیری هر نمونه (اصفهان، ۱۳۹۶)

				غلظت بدست آمده با	غلظت بدست آمده	
تجربیF	جدولF	تجربیt	جدولt	روش ایمنو رادیومتری	با روش ارائه شده	نمونه
				(ng/mL)	(ng/mL)	
۲/۴۹۸	۶/۳۸۸	•/۴۲۳	۲/۱۳۲	$17/21 \pm \cdot/49$	$17/6 \cdot \pm \cdot/71$	А
7/•۴1	۶/۳۸۸	1/014	2/122	$18/49 \pm \cdot/8 \cdot$	$11/1 \pm 1/47$	В
1/824	۶/۳۸۸	•/۲۴٣	2/122	$Y N/9 \Lambda \pm \cdot/V9$	$\gamma \gamma $	С
١/١٨۶	$\mathcal{F}/\Upsilon\Lambda\Lambda$	•/۵۵۴	7/147	$\Delta/\Lambda \pm \cdot/9$	$\Delta \Delta \lambda \pm \cdot \Lambda$	D

بحث

در این پژوهش، میزان کاهش در جریان اکسایش ردیاب +Fe³⁺/Fe پس از برهمکنش PSA با آپتامر متصل به سطح الکترود به عنوان سیگنال در نظر گرفته شد. بیشترین کاهش سیگنال هنگامی مشاهده شد که هر سه اصلاحگر MWCNT- AuNPs ،rGO-AuNPs و CS-AuNPs با هم بر روى الكترود تثبيت شده باشند. به عبارتي الكترود اصلاح شده با نانوكامپوزيت -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 تعاونیrGO ،MWCNT و AuNPs در افزایش هدایت الكتروني، افزايش سطح الكترود و افزايش خاصيت الكتروكاتاليزوري مي باشد [١٩]. اين اثر تعاوني موجب افزایش حساسیت، کارایی و بهبود سیگنال الکتروشیمیایی در اندازه گیری PSA می شود. 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 الكترود، سنتيك سريع انتقال الكتروني و افزايش مناطق ویژه برای تثبیت کارآمد مقدار زیادی آپتامر DNA همراه با حفظ فعالیت زیستی آن می شود [۲۴]. همچنین AuNPs به علت نسبت سطح به حجم بسیار عالی و بهبود هدایت بین نانوصفحات rGO و rGO سبب تثبیت بیشتر AuNPs می شود [۲۵]. هم چنین کیتوسان به جهت خصوصیات چسبندگی بالا، سازگاری زیستی، هدایت نسبی خوب و قابلیت فیلمسازی عالی بستر مناسبی جهت تثبیت بهتر و بیشتر آپتامر فراهم می ورد. مجموع این ویژگیها در ترکیبات تشکیل دهنده نانوکامپوزیت سبب

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

ثابت ماندن سیگنال تجزیهای پس از ۴۰ دقیقه برهم کنش PSA و آپتامر تثبیت شده بر روی سطح الکترود نشاندهنده این امر میباشد که بعد از مدت ۴۰ دقیقه سایتهای فعال آپتامر به حالت اشباع رسیده و در این حالت حداکثر مقدار برهم کنش 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 Çevik و همکاران [۲۷] و همچنین Pawan و همکاران [۲۸] آپتاسنسورهایی 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 Pawan و Pawan است.

حضور کیتوسان در نانوکامپوزیت - MWCNT باعث شده است که AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs 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 الکترود می شود. 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 اندازه گیری تکراری به مقدار ۲/۳۹ کاهش یابد.

آپتاسنسور ارائه شده است که برای این منظور مطالعات

دیگری لازم است تا با تثبیت نانوکامپوزیت -MWCNT دیگری لازم است تا با تثبیت نانوکامپوزیت -PSA بر ماروی کیتهای الکتریکی سیار، تحت شرایط کاملاً بهینه و مطمئن زیستتراشه مربوطه ساخته شود.

نتيجهگيرى

در این پروژه ساخت بیوسنسوری الکتروشیمیایی جهت اندازه گیری و تشخیص سریع و فوق العاده حساس PSA انجام گرفت که در طراحی آن از آپتامر اختصاصی PSA به عنوان یک مدل پروتئینی و از نانو کامپوزیت MWCNT-AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs اصلاح سطح الکترود کربن شیشه ای استفاده گردید. برای بررسی خواص الکتروشیمیایی آپتاسنسور طی مراحل مختلف اصلاح سطح الکترود، از تکنیکهای ولتامتری چرخه ای، ولتامتری پالس تفاضلی و طیف سنجی امپدانس

الکترود اصلاح شده با نانوکامپوزیت -MWCNT بیشترین کارایی را AuNPs/CS-AuNPs/rGO-AuNPs در تثبیت بیشتر و بهتر آپتامر دارد. همچنین اهمیت نانوکامپوزیت مورد نظر در اندازه گیری PSA توسط تکنیک ولتامتری پالس تفاضلی مورد ارزیابی قرار گرفت rGO- که نتایج نشان از اثر تعاونی بین نانوکامپوزیتهای -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 نمونه گیری و فراهم نمودن امکان استفاده از امکانات بیمارستان را به عمال 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. Aptamerbased 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 aptasensorsrecent 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 ferrocenefunctionalized peptide probes. *Electrochem Commun* 2010; 12(3): 471-4.

DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.2.7.8

- [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 multiwalled 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. Chitosangraphene oxide based aptasensor for the impedimetric detection of lysozyme. *Colloids Surf B* 2014; 115(1): 205-11.
- [27] Çevik E, Bahar Ö, enel 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 0.01-100.00 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