

## مطالعه بیان میزان ژن PSA در سرطان پروستات با استفاده از روش نانو حسگر زیستی

صدیقه رضایی<sup>۱</sup>، دکتر فرخ کریمی<sup>۲\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی مولکولی-ژنتیک، دانشکده علوم پایه گروه زیست‌شناسی،

دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر

۲. استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه مراغه

### چکیده

**مقدمه:** پروستات یک غده مترشحه خارجی گرد که اطراف مجاری خروجی مثانه قرار دارد، سرطان پروستات عبارت است از ایجاد سلول‌های سرطانی در پروستات که می‌تواند باعث انسداد در دستگاه ادراری یا متاستاز به سایر اعضای بدن شود. از جمله ژن شاخص درگیر سرطان پروستات، ژن PSA می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا کاوشگر برای ژن PSA طراحی گردید سپس این کاوشگرها در سطح نانو ذرات گرافن اکسید تثبیت شد. کاوشگرها که توسط ماده فلورسئین‌زا نشان‌دار شده بودند در اثر تثبیت خاصیت فلورسئین خاموش گردید. به منظور بررسی میزان بیان RNA کل از نمونه سرطان استخراج شد و پس از سنتز cDNA در واکنش هیبریداسیون با کاوشگر تثبیت‌شده در سطح نانوذره گرافن مورد استفاده قرار گرفت.

**نتیجه‌گیری:** در واکنش هیبریداسیون، cDNA مربوط به نمونه‌های بیماران سرطان پروستات و سالم در اثر هیبرید شدن الگوی نشر فلورسانس متفاوت را نشان داد. میزان بیان ژن PSA نمونه بیمار به‌طور معنی‌داری ( $p < 0.01$ ) نسبت به PSA نمونه سالم بیشتر است.

**کلیدواژه‌ها:** سرطان پروستات، اکسیدگرافن، هیبرید کردن، بیان ژن PSA

\*ایمیل نویسنده مسئول: karimifm@maragheh.ac.ir

## مقدمه

پروستات یک غده مترشحه خارجی گرد که اطراف مجاری خروجی مثانه قرار دارد (۲). سرطان پروستات عبارت است از ایجاد سلول‌های سرطانی در پروستات که می‌تواند باعث انسداد در دستگاه ادراری یا متاستاز به سایر اعضا بدن شود (۳). به‌طور اختصاری با Pca یا PC<sup>1</sup> نشان داده می‌شود (۴،۵). هیپرپلازی خوش‌خیم BPH<sup>2</sup> به‌طور انحصاری از منطقه انتقال و سرطان پروستات (بدخیم) از منطقه محیطی ناشی می‌شود. هر دو می‌تواند باعث انسداد مجرای ادرار شوند. از آنجاکه تومور پروستات در منطقه محیطی بیشتر از هیپرپلازی BPH<sup>3</sup> قرار گرفته نشانه‌های سرطان پروستات دیر و در مراحل پیشرفته متوجه می‌شوند. در کشورهای پیشرفته سرطان پروستات شایع‌ترین سرطان پس از سرطان پوست و مرگ‌آورترین سرطان در مردان پس از سرطان ریه است (۳). در ایران سرعت رشد آن در سال ۱۳۸۷ بیش از ۸،۸۳٪ است. سرطان به‌عنوان سلول‌های غیرطبیعی و غیرقابل کنترل تعریف شده به علت تجمع ژنتیکی خاص، نقص اپی‌ژنتیک و یا منشأ محیطی و ژنتیکی است و به‌عنوان پیشرفت سرطان، فراتر از منشأ گسترش و منجر به متاستاز به سایر اعضای بدن و سیستم‌ها که در آن نقطه، سرطان اساساً علاج ناپذیر است (۶). سن، قومیت، خانواده، عوامل ژنتیکی، تأثیرات محیطی جزء مؤلفه‌های تأثیرگذار است (۷،۲). مهم‌ترین عامل شناخته‌شده برای سرطان پروستات سن است (۲،۳). سرطان پروستات یک بیماری هتروژن است چندین مکانیسم مولکولی مختلف به توسعه آن کمک کند (۲).

تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی به‌عنوان بیومارکر سرطان هستند (۸). از جمله ژن شاخص درگیر سرطان پروستات، ژن PSA می‌باشد (۸،۹)؛ که به علت تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیک بخصوص فرایندهای متیلاسیون، سطح تولید این پروتئین از حالت طبیعی تغییر کرده و باعث ایجاد بیماری سرطان پروستات می‌گردند (۹،۱). تغییرات اپی‌ژنتیک به‌طور کامل یا جزئی موجب سرکوب رونویسی مرتبط با سرطان است (۸). این ژن‌ها به‌عنوان بیومارکرهای اختصاصی سرطان پروستات می‌باشند که امروزه برای تشخیص زودهنگام این بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند. بیومارکرها از عوامل تشخیصی مؤثر در تشخیص سرطان پروستات است (۹). علاوه بر این دو مارکر شاخص، AMACR، EPCA2، EPCA1، به‌عنوان نشانگر سرطان پروستات هستند (۱۰).

1 Prostate Cancer

2 Benign Prostatic Hyperplasia

## مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر سفارش ساخت کاوشگرها فلورسئین زا و توالی هدفها از شرکت Bioner کره جنوبی تهیه شد. کاوشگر و توالی هدفها به صورت خشک تهیه شدند. در جدول مشخصات کاوشگر و توالی هدفها بکار رفته در این مطالعه آورده شده است.

### ویژگی‌های حسگر زیستی بر اساس نانو مواد گرافن:

این توالی با استفاده از نرم افزار oligo بر اساس توالی‌های مربوط به ژن PSA طراحی شده از طریق شرکت Bioner کره جنوبی تهیه گردید (جدول ۱). لازم است که برای نشان‌دار کردن کاوشگر رنگ فلورسنت زایی FAM استفاده شد.

جدول (۱): توالی الیگونوکلیوتید مورد استفاده برای بررسی بیان ژن PSA

ژن	لوکوس	طول DNA	توالی کاوشگر (۳' به ۵')	توالی هدف
PSA	19q13.4	20	5'CTA CTT ACC AgA Tgg gAC AC 3'	5'GTG TCC CAT CTG GTAAGTAG3'

## دستگاه Spectro Fluorometer

دستگاه spectro fluorometer مدل FP-750 شرکت Jasc بکار رفته است.

## سنتز GO

پیش از استفاده، (۱۰) میلی گرم اکسید گرافن GO در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و پس از آن به مدت یک ساعت sonicated و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ در سانتریفوژ قرار می‌دهیم و سپس در C4<sup>o</sup> ذخیره می‌کنیم.

## آماده‌سازی یک روش بر پایه نانو ذرات کربنی گرافن اکسید

به منظور یک روش بر پایه نانو ذرات کربنی گرافن اکسید، ابتدا شرایط برای تثبیت الیگونوکلیوتیدهای مربوط به ژن‌های هدف در سطح نانو ذرات گرافن بهینه‌سازی شده است. برای بهینه‌سازی فاکتورهای زمان،

غلظت گرافن اکسید، در نظر گرفته شد. برای بهینه‌سازی غلظت گرافن اکسید، با ۱۰ میکرولیتر توالی الیگونوکلوئوتیدی مخلوط گردید. با توجه به اینکه توالی الیگونوکلوئوتیدی DNA (DNA کاوشگر) می‌تواند از طریق پیوندهای کوالان به سطح اکسید گرافن متصل شوند و اتصال آن‌ها باعث کاهش نشر فلورسانسی کاوشگری گردد. برای بهینه‌سازی زمان، مدت‌زمان واکنش DNA کاوشگر و غلظت گرافن اکسید بهینه‌سازی گردید. برای این منظور کاهش نشر فلورسانس در زمان‌های مختلف خوانده شد و بیشترین مقدار کاهش به‌عنوان بهینه‌ترین زمان در نظر گرفته شد.

### زمان بهینه برای تثبیت اکسید گرافن روی ژن PSA

جدول (۲): زمان بهینه برای تثبیت اکسید گرافن روی پروب PSA

شماره	بافر تریس ( $\mu\text{I}$ )	پروب GSTP1 ( $\mu\text{I}$ )	GO ( $\mu\text{I}$ )	زمان بر حسب دقیقه	ماکسیمم طول موج
۱	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۲	۱۳۳
۲	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۴	۵۸
۳	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۶	۳۰
۴	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۸	۱۹
۵	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۴
۶	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۱۲	۱۱

## غلظت‌های بهینه اکسید گرافن برای ژن PSA

جدول (۳): غلظت‌های بهینه اکسید گرافن برای پروب PSA

شماره	بافر تریس ( $\mu\text{l}$ )	پروب PSA ( $\mu\text{l}$ )	غلظت متغیبر GO ( $\mu\text{l}$ )	ماکسیم طول موج
۱	۱۹۸۸	۱۰	۲	۹۶
۲	۱۹۸۵	۱۰	۵	۳۶
۳	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۴
۴	۱۹۷۸	۱۰	۱۲	۵۸
۵	۱۹۷۵	۱۰	۱۵	۳۴
۶	۱۹۷۰	۱۰	۲۰	۱۲
۷	۱۹۶۵	۱۰	۲۵	۳.۷
۸	۱۹۶۰	۱۰	۳۰	۸.۵
۹	۱۹۵۵	۱۰	۳۵	۱.۵

## استخراج RNA کل از بافت تومور سرطان پروستات

استخراج RNA کل از نمونه بافت سرطانی پروستات و سالم با استفاده از روش ترایزول استخراج شد. برای استخراج RNA ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از بافت سرطانی به هر میکروتیوب منتقل کرده به میزان ۱ میلی‌لیتر ترایزول اضافه می‌گردد. پس از مخلوط کردن، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرارداده می‌شود سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط اضافه کرده و به مدت ۱۵ ثانیه با تکان ملایم (نه شدید) مخلوط می‌گردد. در ادامه مخلوط به دست‌آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ می‌شود. بعد از سانترفیوژ فاز رویی را به ویال‌های جدید استریل انتقال داده سپس به اندازه هم‌حجم فاز رویی ایزوپروپانول اضافه گردید. بعد از اضافه کردن ایزوپروپانول مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرارداده می‌شود. سپس مخلوط حاصل با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ می‌شود. بعد از سانترفیوژ فاز رویی را دور ریخته و رسوب مربوط به RNA با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ شستشو داده می‌شود. در نهایت RNA حل‌شده در اتانول، با سرعت ۷۵۰۰ rpm به مدت ۸ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانترفیوژ گردید. بعد از سانترفیوژ فاز رویی را دور ریخته و رسوب حاصل خشک (رسوب RNA نباید کامل خشک گردد) خواهد شد. در نهایت رسوب خشک‌شده را در

۵۰ میکرولیتر ۵٪ SDS یا ۵۰ میکرولیتر آب عاری از Rnase حل می‌شود. بعد از استخراج RNA جهت اطمینان از عاری از DNA بودن RNA استخراج شده از تیمار Dnase نیز استفاده می‌شود.

### سنتز cDNA و تأیید آن

در ابتدا با استفاده از Oligodt مبادرت به ساخت cDNA توسط آنزیم Reverse (M-MuLV) Transcriptase شرکت فرمانتاز شد که واکنش‌های آن به شرح زیر می‌باشد:

جدول (۴): مواد لازم برای از بین بردن پیوندهای داخلی mRNA برای سنتز cDNA

Total RNA	5 $\mu$ l
(100 $\mu$ m) Oligo dt(100 pmol)	1 $\mu$ l
DEPC Water	14 $\mu$ l
	20 $\mu$

محلول حاصل ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. این دوره دمایی احتمالاً باعث از بین رفتن پیوندهای داخلی mRNA شده و به دنبال آن ساختار ثانوی آن در پرایمرها از بین رفته و دو جزء برای اتصال به یکدیگر آماده می‌شود. پس از زمان مذکور محلول سریعاً بر روی یخ سرد شده تا پیوندها مجدداً تشکیل نشوند. سپس محلول زیر تهیه شد:

جدول (۵): مواد لازم برای سنتز cDNA

Reverse Transcriptase Enzyme	1 $\mu$ l
(5X) Reverse Transcriptase buffer(1x)	8 $\mu$ l
(100 mM) DDT(10 mM)	4 $\mu$ l
(25 mM) dNTP(1 mM)	1/6 $\mu$ l
(25U/ $\mu$ l) Rnase Inhibitor(20 U/ $\mu$ l)	1/6 $\mu$ l
DEPC Water	2/8 $\mu$ l
	20 $\mu$ l

محلول فوق به مدت ۱ تا ۲ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آنزیم RT از روی کل mRNA ها cDNA سنتز کند. cDNA سنتز شده در واکنش هیبریداسیون نانو حسگر برای بررسی بیان ژن PSA استفاده گردید.

تعداد نمونه‌های بیماران ۳ نفر و افراد سالم نسبت به بیماری سرطان پروستات ۳ نفر در نظر گرفته شد.

## شناسایی DNA هدف با استفاده از کاوشگر ژن PSA

به منظور بهینه‌سازی شرایط واکنش برای شناسایی توالی CDNA ژن PSA ابتدا کاوشگر تثبیت‌شده در سطح گرافن برای شناسایی توالی مکمل آن مورد استفاده قرار گرفت و شرایط واکنش برای توالی مکمل بهینه‌سازی گردید. در بهینه‌سازی عملکرد کاوشگر تثبیت‌شده در سطح گرافن برای شناسایی توالی مکمل (توالی هدف) فاکتورهای زمان و غلظت‌های مختلف توالی مکمل بهینه‌سازی گردید بهترین غلظت توالی مکمل، غلظتی است که بیشترین نشر فلورسانسی را نشان دهد به عبارت دیگر در اثر اتصال توالی مکمل به DNA کاوشگر در سطح گرافن جدا شده و باعث ظاهر شدن نشر فلورسانس می‌گردد.

## شناسایی و بررسی میزان کمی cDNA مربوط به ژن PSA با استفاده از کاوشگر تثبیت‌شده در سطح گرافن

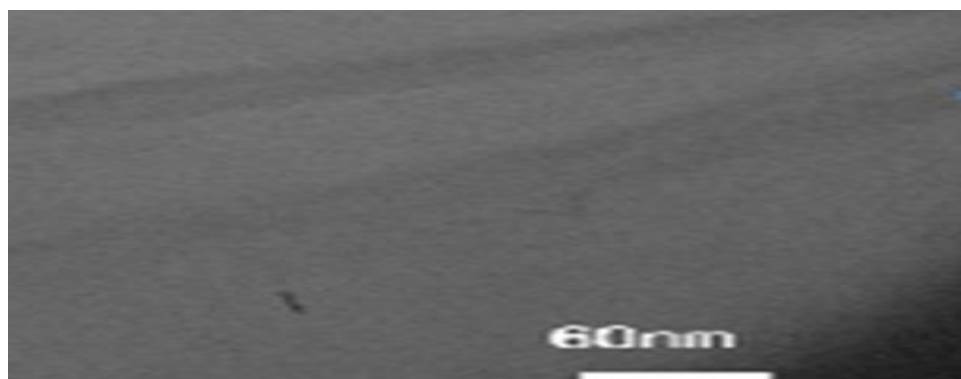
بعد از بهینه‌سازی عملکرد کاوشگر، cDNA مربوط به نمونه‌های بیماران سرطان پروستات مورد بررسی قرار می‌گیرد. در واکنش هیبریداسیون به جای DNA مکمل توالی cDNA بیماران استفاده گردید؛ که با توجه به مکمل بودن کاوشگر با توالی، cDNA اتصال کاوشگر به cDNA موجب جدا شدن کاوشگر از سطح گرافن می‌شود.

## نتایج

### تأیید نانو ذرات گرافن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی<sup>۱</sup> TEM

بعد از سنتز نانو ذرات اکسید با میکروسکوپ TEM آنالیز شد که نتایج مربوط به میکروسکوپ الکترونی TEM نانو ذرات گرافن اکسید را تأیید نمود (شکل ۱).

<sup>۱</sup> Transmission Electron Microscope



شکل (۱): نانو ذرات گرافن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM

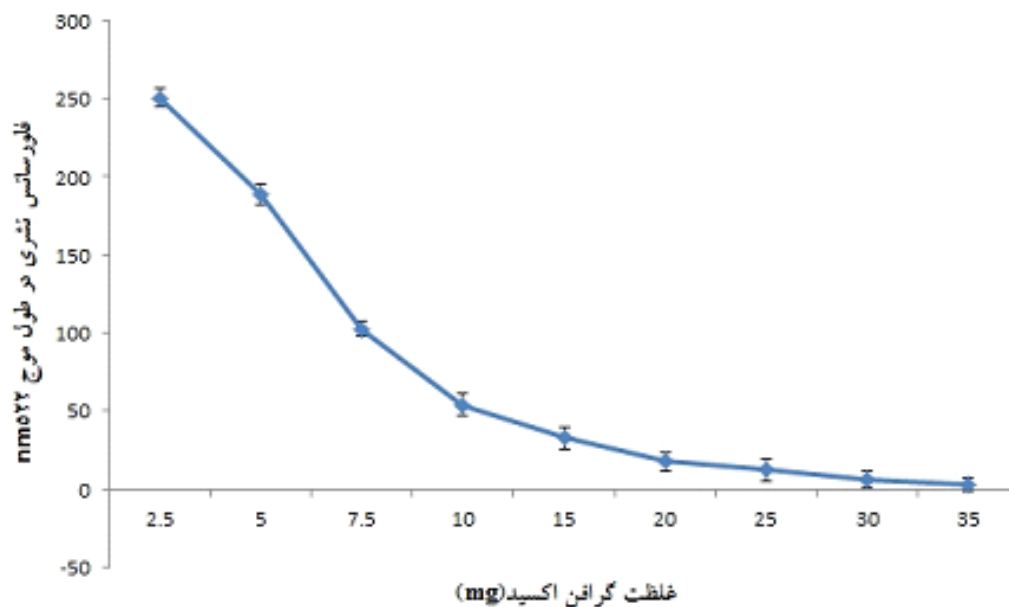
### سنتز cDNA مربوط به ژن PSA

CDNA مربوط به ژن PSA با استفاده از RNA کل استخراج شده از بافت تومور توسط کیت آنزیم (M- Reverse Transcriptase MuLV سنتز شد.

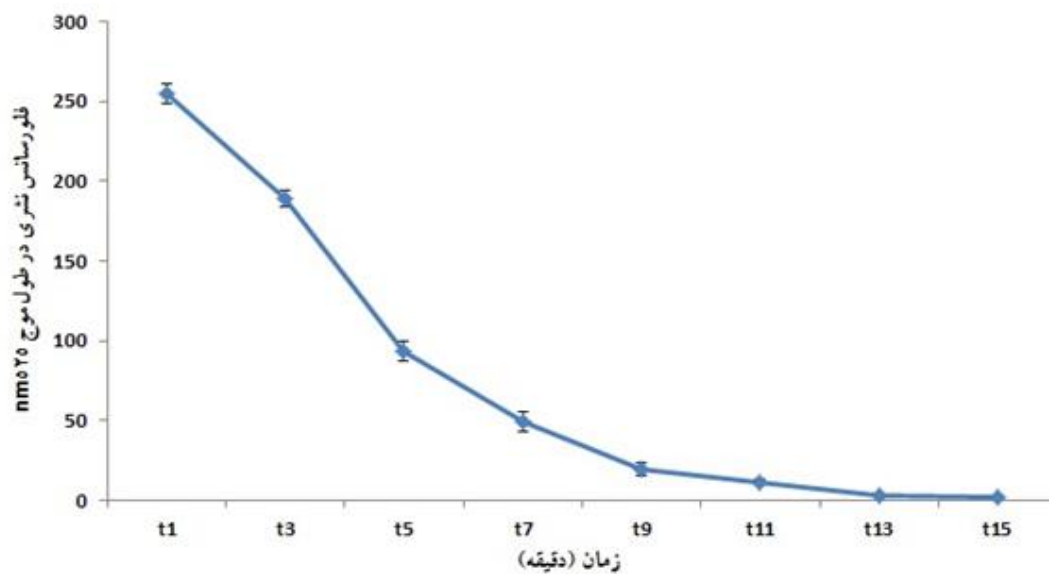
### بهینه‌سازی تثبیت کاوشگر مربوط به ژن PSA در سطح نانوذره گرافن

به منظور آماده‌سازی کاوشگر فاکتورهای مربوط به اتصال DNA مربوط به کاوشگرهای ژن PSA به سطح نانو ذرات کربنی گرافن و همچنین غلظت نانوذره کربنی گرافن بهینه‌سازی گردید. بر اساس نتایج مربوط به نشر فلورسانس بهینه‌ترین زمان برای ژن PSA به ترتیب ۱۱ دقیقه محاسبه گردید. در این زمان‌ها کل مولکول‌های DNA کاوشگر به سطح نانو ذرات گرافن متصل شده‌اند به طوری که نشر فلورسانسی کاملاً خاموش گردید. علاوه بر زمان غلظت گرافن نیز بهینه‌سازی گردید و بهینه‌ترین غلظت، غلظت ۱,۵ میکروگرم ۲,۵ میکروگرم تعیین شد. در بهینه غلظت گرافن زمانی است که بتواند بیشترین کاهش در نشر فلورسانس را برای ما تولید کند (نمودار ۱ و ۲).





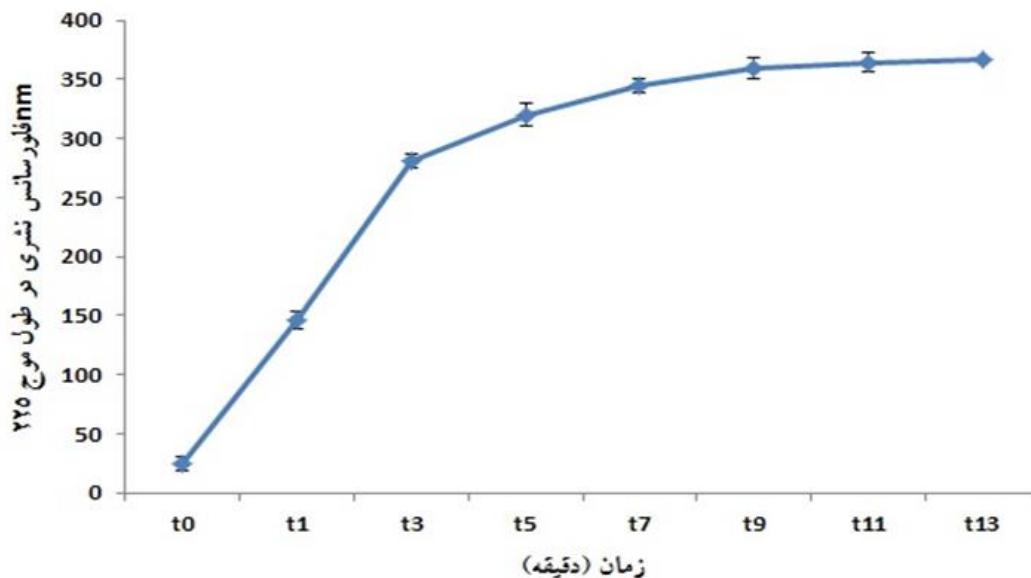
نمودار (۱): بهینه سازی غلظت گرافن اکسید جهت تثبیت کاوشگر PSA در سطح آن



نمودار (۲): بهینه سازی زمان تثبیت کاوشگر PSA به سطح گرافن اکسید

## بهینه‌سازی واکنش هیبریداسیون توالی کاوشگر PSA تثبیت‌شده در سطح گرافن با توالی مکمل و توالی هدف

در این مرحله توالی‌های مکمل مربوط یا هدف به کاوشگر PSA در واکنش هیبریداسیون استفاده شده‌اند و شرایط واکنش برای هیبریداسیون بهینه‌سازی گردید. بهینه‌سازی واکنش هیبریداسیون ژن PSA برابر ۵ برحسب دقیقه محاسبه شد. نتایج مربوط به نشان‌دار کردن با افزایش غلظت DNA هدف میزان نشر افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج، بیشترین نشر فلورسانس در غلظتی مشاهده شد که تمامی مولکول‌های کاوشگر در سطح گرافن با توالی هدفشان با زمان بهینه‌شده هیبرید گردید (نمودار ۳).

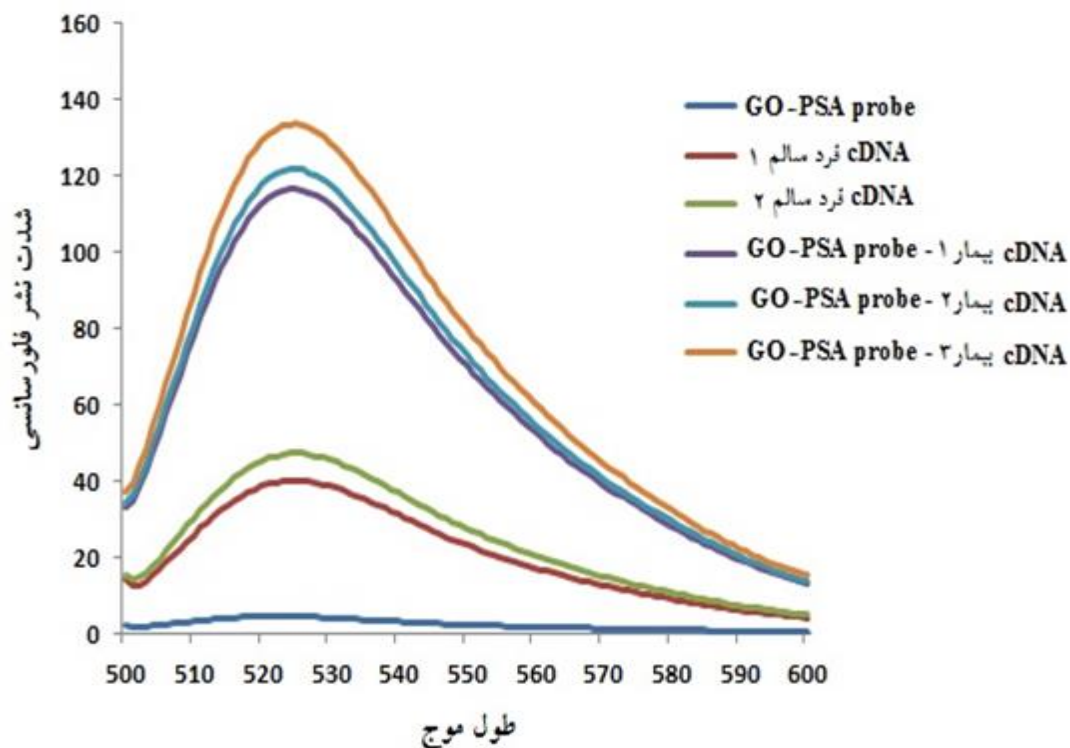


نمودار (۳): بهینه‌سازی زمان اتصال DNA هدف به PSA تثبیت شده به سطح گرافن اکسید

## شناسایی cDNA مربوط به ژن PSA نمونه‌های سرطانی با استفاده از کاوشگر تثبیت‌شده از نانوذرات گرافن

در این مرحله بعد از بهینه‌سازی واکنش هیبریداسیون با توالی سنتتیک cDNA مربوط به ژن PSA، نمونه‌های سرطانی پروستات و فرد سالم با کاوشگر بررسی شد. نتایج هیبریداسیون نشان داد که نشر فلورسانس

به طور معنی دار در نمونه‌های بیماران سرطان پروستات نسبت به فرد سالم بیشتر شد. این پدیده نشان‌دهنده بیان بالای ژن PSA در بیماران سرطان پروستات می‌باشد (نمودار ۴).



نمودار (۴): شناسایی CDNA مربوط ژن PSA با استفاده از کاوشگر تثبیت شده در سطح نانوذرات گرافن

## بحث

ژن PSA در بیماران سرطان پروستات افزایش می‌یابد (۳،۱۱). تنها در حدود یک سوم بیماران مبتلا با سطح PSA نسبتاً بالا (۴-۱۰ گرم/لیتر) در یک بافت‌برداری مثبت است در حالی که بقیه نادرست است. از سوی دیگر نتیجه بافت‌برداری ممکن است نتیجه کاذب منفی داشته باشد بخصوص در مورد سرطان‌های کوچک محلی، به‌ویژه اگر تعداد بافت‌برداری محدود باشد؛ بنابراین بهبود دقت تشخیصی از آزمون PSA نیاز است؛ بنابراین برای استراتژی بهتر، روش‌های مبتنی بر نشانگرها، فناوری نانو و تصویربرداری مورد نیاز است. اشکال مختلف فناوری نانو اغلب با روش‌های دیگر، از جمله نشانگرهای زیستی به منظور تشخیص سرطان پروستات با

دقت بیشتر ترکیب شود (۱۰). در این پروژه سعی شده است یک روش کمی برای سنجش بیان این ژن‌ها بر پایه نانو ذرات گرافن اکسید بهینه‌سازی بشود.

نانو ذرات گرافن اکسید، ذراتی هستند که از تک لایه اتم کربن تشکیل شده‌اند (۱۳، ۱۲)؛ و این صفحات کربنی می‌تواند به صورت کووالان و غیر کووالان با مولکول‌های زیستی اثر متقابل داشته باشد مولکول‌های DNA در حالت تک‌رشته‌ای، از طریق پیوندهای  $\pi-\pi$  و واکنش‌های آب‌گریز و پیوندهای هیدروژنی و نیروی واندروالسی به صفحات گرافن متصل شده‌اند این اتصالات پایدار بوده، به طوری که بعد از چند بار شستشو حتی جدا نمی‌شود (۱۵، ۱۴).

بعد از اضافه شدن توالی مکمل DNA و هیبریداسیون آن با توالی متصل شده به گرافن DNA دو رشته‌ای از سطح صفحات گرافن جدا می‌شوند (۱۵). این جدا شدن تنها زمانی امکان‌پذیر است که رشته‌ای مکمل وجود داشته باشد. کاوشگر متصل به ماده فلورسئین را بوده در اثر تثبیت کاوشگر، فلورسئین نشی آن حذف شده این پدیده نشان‌دهنده این است که صفحات گرافن به عنوان خاموش‌کننده فلورسئین عمل می‌کنند. در منابع خاصیت خاموش‌کنندگی گرافن اثبات شده است (۱۶، ۱۵، ۱۴). در مراحل تثبیت کاوشگر فاکتورهای زمان و غلظت بهینه‌سازی شد تا اینکه غلظت بهینه و زمان بهینه مشخص شد که بعد از مدت زمان ۱۳ برای PSA به دست آمد. این مدت زمان، زمانی است که تمامی مولکول‌های DNA کاوشگر به سطح صفحات گرافن متصل شده‌اند. در واقع بهینه زمان یا به عبارتی زمان تثبیت، زمان اتصال کاوشگر به سطح گرافن، زمانی تأیید شد که تمامی نور فلورسئین خاموش گردید. در بهینه‌سازی فاکتور غلظت ۲،۳ میکروگرم برای کاوشگر PSA انتقال شد. این غلظت، غلظتی از گرافن است که تعداد مولکول‌های گرافن توانسته که کل مولکول‌های DNA کاوشگر را به سطح خود جذب کند.

بعد از تثبیت توالی هدف و مکمل مربوط به کاوشگر PSA برای واکنش هیبریداسیون استفاده شده است. انجام واکنش هیبریداسیون در این کاوشگر فلورسانس نشی ظاهر شد. دلیل این پدیده دو رشته‌ای شدن در اثر هیبریداسیون با توالی مکمل می‌باشد و جدا شدن DNA دو رشته‌ای از سطح صفحات گرافن است. در اثر جدا شدن DNA کاوشگر افزایش دوباره فلورسانس نشی در طول موج ۵۲۰ حاصل می‌شود. این پدیده در گزارشات قبلی نیز تأیید شده است. با افزایش غلظت توالی پیوسته فلورسانس نشی افزایش می‌یابد. تقریباً نزدیک به مقدار فلورسانس نشی خود کاوشگر است.

بعد از بهینه‌سازی شرایط واکنش، با توالی مکمل سنتتیک، این روش برای سنجش بیان ژن PSA در نمونه بیماران سرطان پروستات نیز آزمایش شد.

از نمونه بافت سرطان پروستات، با استفاده از کاوشگر میزان تعداد نسخه‌های cDNA و میزان بیان ژن PSA مورد ارزیابی قرار گرفت؛ و در واکنش هیبریداسیون نمونه cDNA بافت تومور پروستات مورد استفاده قرار گرفت (۸).

۱- مطالعات انجام‌شده در مصر در مورد مردان ۵۰-۷۹ ساله در سال ۲۰۰۷-۲۰۰۹ نشان داد. در حدود ۹۰/۹٪ از DNA جمع‌آوری‌شده از بیماران سرطان پروستات متیلاسیون GSTP1 در آن‌ها مثبت است؛ و در گروه کنترل متیلاسیون GSTP1 مثبت در حدود ۴۰٪ مشاهده می‌شود؛ و افرادی با سطح PSA بالا ۳-۱۰ ng / ml میزان متیلاسیون GSTP1 ۶۴,۷٪ الگوی میلاسیون ژن را مثبت نشان می‌دهد (۱۷).

۲- در مطالعه (qMSP)<sup>۱</sup> به‌وسیله Jeronimo و همکارانش بالاترین حساسیت (۹۰,۹٪) و ویژگی (۱۰۰٪) به دست آوردند. با اندازه‌گیری سطح نسبی GSTP1 در یک‌ششم از نمونه‌های سطح پروستات از ۲۱ بیمار با سطح PSA بالا که از لحاظ بیماری سرطان پروستات بیمار محسوب می‌شوند. تشخیص داده شد که در حدود ۹۰,۹٪ از نمونه‌برداری بیماران سرطان پروستات و نمونه‌برداری از ۱۰ نفر از گروه کنترل که هیچ‌گونه شواهد سرطان نبود منفی نشان داد (۱۸).

در رابطه با ژن PSA بعد از عمل هیبریداسیون با مقدار مساوی CDNA نمونه سرطانی و نمونه سالم میزان فلورسانس نشری اندازه‌گیری شد؛ و بعد از سنجش میزان فلورسانس نشر به‌طور معنی‌دار میزان نشر در نمونه سرطانی بیشتر از نمونه شاهد مشاهده گردید. این پدیده نشان‌دهنده این است که تعداد نسخه‌های CDNA در نمونه مریض بیشتر از نمونه سالم می‌باشد. به‌طوری‌که در منابع اثبات‌شده است که در بیماران سرطان پروستات میزان بیان ژن PSA بیشتر می‌شود.

این مطالعه برای اولین بار ارتباط بین ژن گلوکوتاتیون S- ترانسفراز و آنتی‌ژن اختصاصی پروستات را در بیماری سرطان پروستات را در ایران با استفاده از تکنیک‌های نانو حسگر زیستی مبتنی بر اکسیدگرافن گزارش

1 Quantitative Methylation Specific PCR

می‌کند؛ و ارتباط معنی‌داری بین این ژن و بیماری ارائه می‌دهد؛ که می‌تواند یک خط مبنای اولیه برای ارزیابی سرطان پروستات در مراحل اولیه باشد. در این پروژه نیز افزایش نشر فلورسانسی و معنی‌دار بودن و اختلاف آن نسبت به نمونه شاهد نشان‌دهنده آن این است که بیان این ژن در نمونه‌های مریض افزایش یافته است. نتایج تحقیق نشان داد که با استفاده از یک روش مبتنی بر نانو ذرات گرافن اکسید می‌توان میزان بیان ژن PSA در نمونه‌های بیمار و سالم مورد بررسی قرارداد.

### نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که با طراحی یک روش بر مبنای صفحات گرافن اکسید و کاوشگرهای مربوط به ژن PSA بیان آن را سنجید. در نتایج این تحقیق ابتدا کاوشگرها در سطح صفحات گرافن تثبیت شده یک کاهش نشر فلورسانس مربوط به کاوشگر در اثر تثبیت نشان داد که مولکول‌های کاوشگر به سطح صفحات گرافن جذب شده‌اند. در واکنش هیبریداسیون، cDNA مربوط به نمونه‌های بیماران سرطان پروستات و سالم در اثر هیبرید شدن الگوی نشر فلورسانس متفاوت را نشان داد. میزان بیان ژن PSA نمونه بیمار به‌طور معنی‌داری ( $p < 0.01$ ) نسبت به PSA نمونه سالم بیشتر است.

## منابع

۱. کمال یاوری زهرا ابطحایی، نانو ذرات در تشخیص‌های بالینی مولکول‌های زیستی (DNA) و پروتئین در بیماری‌ها، ماهنامه فناوری نانو فرودین، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۰، ۱۳۸۶.
2. ALFONSO URBANUCCI, Overexpression of Androgen Receptor in Prostate Cancer, UNIVERSITY OF TAMPERE, 2012, 18.
3. Verma Mukesh, Patel Payal, Verma Mudit. Biomarkers in Prostate Cancer Epidemiology. 2011 cancers 30, 3773, 3774.
4. Lei Zhu, DEVELOPMENT OF NOVEL ASSAYS FOR MEASURING DIFFERENT MOLECULAR FORMS OF PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN. 2009, Department of Clinical Chemistry Helsinki University Central Hospital University of Helsinki Helsinki, Finland, 22, 40.
5. Dr T A Bailey and Dr I E Tothill, Molecular Profiling of Prostate Cancer Patients, Cranfield University, June 2009, 8, 9, 25-29, 31, 46, 73, 94-98.
6. Jianping Lei and Huangxian Ju, Signal Amplification Using Nanomaterials for Biosensing, Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. 2013, 36.
7. Vaijayanti V. Pethe, Bharati Bapat. Molecular Genetic Etiology of Prostate Cancer. 2008, The Open Genomics Journal, 13.
8. Arul Chinnaiyan, M.D. Ph.D, Prostate and Other Urological Cancers, Principal Investigator University of Michigan, 2008, 58.
9. Xu-Hua Zhao, Qiu-Juan Maa, Xiang-Xiang Wu, Xin Zhu, biosensor for sensitive fluorescence detection of DNA, based on exonuclease III-aided signal amplification, 2012, Analytica Chimica Acta 727, 67.
10. James Schwoebe, Carolyn Carlson, Yazdan Raj, Virginia Lin, Angie Kamino, Jim Overholt Pharan Evans, Rachel Spivey, and Choon Hwai Yap, Prostate cancer screening: a quantitative model for present and future method evaluation, 2011, The Journal of Young Investigators 95, 97, 98, 100.
11. Declan A. Healy, Conor J. Hayes, Paul Leonard, Louise McKenna and Richard O'Kennedy, Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection, science Direct, 2007, 125.
12. Kai 2 Xu, Junran Huang, Zunzhong Ye, Yibin Ying, and Yanbin Li Recent Development of Nano-Materials Used in DNA Biosensors, Sensors 9, 2009, 5535, 5536, 5541.
13. Ying Wang, Zhaohui Li, Jun Wang, Jinghong Li and Yuehe Lin, Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology, cell Press, 2011, 205.
14. Biwu Liu, Ziyi Sun, Xu Zhang, and Juewen Liu Mechanisms of DNA Sensing on Graphene Oxide, analytical chemistry. 85, 2013, 85, 7987, 7988.

15. Joon Soo Park, Nam-In Goo, and Dong-Eun Kim Mechanism of DNA Adsorption and Desorption on Graphene Oxide, *pubs.acs.org/Langmuir*. 2014,30,12587, 12588,12589,12587.
16. Liang Cui, Xiaoyan Lin, Ninghang Lin, Yanling Song, Zhi Zhu, Xi Chen and Chaoyong James Yang, Graphene oxide-protected DNA probes for multiplex microRNA analysis in complex biological samples based on a cyclic enzymatic amplification method, *ChemComm*,48,2012,194.
17. MONA L. ESSAWI, M.D; SAMY A. ABD EL-AZIM, Ph.D; AHMED A. MORSY, M.D. and HEBA A. HASSAN, B.Sc, Assessment of GSTP1 Gene Methylation in Early Detection of Prostate Cancer in Egyptian Patients, *Med. J. Cairo Univ.*, 2010,298,298.
18. Hafiz Ahmed, Promoter Methylation in Prostate Cancer and its Application for the Early Detection of Prostate Cancer Using Serum and Urine Samples, *Libertos Academica*. 2010,18,19, 21,28,25.