

## Sensitivity of PE-LAMP assay in rapid detection of *PIK3CA*:H1047R mutation in breast cancer

Mohammad Moien Salehinejad<sup>✉</sup>, Shirin Shahbazi<sup>\*</sup>

Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received: 10 Jan 2026

Revised: 11 Apr 2026

Accepted: 15 Apr 2026

ePublished: 6 Jun 2026

#### Keywords:

- Loop-mediated isothermal amplification
- Somatic mutations
- Breast cancer

### Abstract

**Background.** The *PIK3CA*:H1047R mutation is one of the most common driver mutations in breast cancer that leads to aberrant activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Rapid and low-cost detection of this mutation can significantly contribute to a better outcome and personalized treatment protocols. This study aimed to develop and optimize an allele-specific LAMP assay for the visual detection of the H1047R mutation without the need for advanced laboratory equipment.

**Methods.** Allele-specific FIP and BIP primers were designed with a 5' end complementary to the mutant nucleotide, along with a loop primer to enhance amplification speed and sensitivity. The assay was tested on DNA from MDA-MB-453 (mutant) and MCF-7 (wild-type) breast cancer cell lines. Sensitivity was evaluated using serial dilutions. Reaction outcomes were assessed visually using Neutral Red colorimetry and SYBR Green fluorescence. Additionally, RNA-sequencing data of H1047R-positive breast cancer samples from the TCGA database were analyzed to investigate gene expression changes within the PI3K/AKT/mTOR pathway.

**Results.** The developed assay accurately distinguished mutant from wild-type sequences with high specificity. The loop primer reduced reaction time from 25 to 20 minutes and improved sensitivity, achieving a detection limit of 0.033 ng/μL. Neutral Red enabled clear visual discrimination between positive and negative reactions, whereas SYBR Green showed only minor fluorescence differences. RNA-seq analysis revealed significant alterations in the expression of multiple PI3K/AKT/mTOR pathway genes in H1047R-positive samples.

**Conclusion.** The optimized PE-LAMP assay provides a rapid, sensitive, inexpensive, and naked-eye-readable method for detecting the *PIK3CA*:H1047R mutation. Given its simplicity and minimal equipment requirements, this approach holds strong potential for clinical application in resource-limited settings to support targeted therapy selection in breast cancer patients.

**Practical Implications.** The application of the developed method in this study can facilitate the detection of the *PIK3CA*:H1047R mutation, and potentially other mutations in the future, in clinical and laboratory settings with limited resources. Its high speed, low cost, and the ability to visualize results with the naked eye make this method suitable for initial screening of the patient and rapid selection of targeted therapies. Moreover, its use in point-of-care settings can improve patient access to accurate molecular diagnostic approaches.

**How to cite this article:** Salehinejad M M, Shahbazi Sh. Sensitivity of PE-LAMP assay in rapid detection of *PIK3CA*:H1047R mutation in breast cancer. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2026;48(2):. doi: 10.34172/mj.026.35298. Persian.

\*Corresponding author; Email: sh.shahbazi@modares.ac.ir

© 2026 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

## Extended Abstract

### Background

Breast cancer, the most common cancer in women, is significantly driven by *PIK3CA* mutations like H1047R, which activate the PI3K/AKT/mTOR pathway, promoting tumor growth and resistance. The development of targeted therapies for *PIK3CA* mutations highlights the need for efficient detection, especially in resource-limited areas. Traditional methods (PCR and sequencing) are complex and time-consuming. This research focuses on creating a simple, fast, affordable, and visually interpreted allele-specific probe-enhanced LAMP assay to detect the H1047R mutation accurately without advanced lab equipment.

### Methods

#### *Effect of PIK3CA R1047H Mutation on PI3K/AKT/mTOR Pathway Gene Expression*

We analyzed TCGA RNA-seq data to assess the impact of *PIK3CA* H1047R mutations on PI3K/AKT/mTOR expression in breast cancer. Significant differences were identified and visualized between mutated tumors and healthy tissues in the gene expression patterns using DESeq2.

#### *Cell Culture*

Human breast cancer cell lines (MB-MDA-453 and MCF-7) were cultured in DMEM with 10% FBS and 1% Pen-Strep. Cells were passaged at 70-80% confluency using 0.25% Trypsin-EDTA, followed by quenching with fresh medium and dilution for further use.

#### *DNA Extraction and Validation of PIK3CA R1047H Mutation by Sanger Sequencing*

DNA was extracted from MCF-7 (WT) and MDA-MB-453 (H1047R+) cell lines using commercial kits. Purity was verified by NanoDrop and gel electrophoresis. Additionally, the confirmation of H1047R mutation in MDA-MB-453 was achieved via *PIK3CA* exon 20 PCR and Sanger sequencing analysis.

#### *Serial Dilution for Determining the Limit of Detection of the LAMP Assay*

The LOD of the LAMP assay was determined using tenfold serial dilutions of template DNA, with

the lowest detectable concentration identified by agarose gel electrophoresis.

#### *Investigating LAMP Reaction Products Using Colorimetric Indicators*

We used two colorimetric LAMP detection methods, including SYBR Green method (green fluorescence under UV for positives) and Neutral Red (color change from violet-pink to yellow-orange in positive samples, no change in negative samples).

#### *Molecular Docking between BST Polymerase and Mutant PIK3CA*

Molecular docking was used to compare the binding affinity of Bst polymerase to mutated versus wild-type DNA sequences and that of Bst versus Taq polymerase to the mutant sequence. Protein (Chimera) and DNA (3D-DART) structures were prepared, docking was performed (SwissDock), and results were statistically analyzed using *t*-test.

### Results

#### *Frequency of Mutation: PIK3CA R1047H and its Association with Cancers and Clinical Features*

The *PIK3CA* H1047R mutation ranks 7th among common cancer mutations. It is the most prevalent mutation in invasive ductal carcinoma that also occurs in endometrial, lobular, and other adenocarcinomas, linking it to distinct clinical traits.

#### *Effect of the PIK3CA H1047R Mutation on the Expression of Genes in the PI3K Signaling Pathway*

RNA sequencing data analysis showed that *PIK3CA* H1047R mutation in breast cancer significantly alters the expression of key genes (*PIK3CA*, *PIK3R3*, *AKT*, *AKT2*, and *AKT3*) in the PI3K/AKT/mTOR pathway compared to normal tissue.

#### *Results of Sanger Sequencing*

Sanger sequencing of exon 20 of *PIK3CA* from DNA of MDA-MB-453 cell line revealed an A-to-G transition at nucleotide 3140, resulting in the oncogenic H1047R mutation in the PI3K  $\alpha$ -subunit.

#### *Results of Specific LAMP Reaction for the PIK3CA H1047R Mutation*

Unlike PCR, which shows a single band, LAMP produces a characteristic ladder-like pattern due to its strand-displacement mechanism generating DNA

fragments of varying lengths. This pattern confirms successful amplification.

Key findings regarding reaction conditions include:

- Time: Longer incubation increased amplification in both positive and negative samples, but the positive sample (*PIK3CA* H1047R) amplified faster and earlier. At 25 minutes, amplification in the negative sample ceased while it continued in the positive sample.
- Temperature: Increasing the temperature from 62.5°C to 63.5°C significantly improved specificity by suppressing amplification in the negative sample while maintaining it in the positive one.

#### ***Effect of Utilizing Loop Primer in LAMP Reaction***

As shown in Figure 3A, loop primers significantly improved the efficiency of LAMP assay by facilitating continuous loop formation and providing more replication start sites. They reduced amplification time for *PIK3CA* H1047R mutant samples from 25 minutes (without loops) to 20 minutes (with loops). After 20 minutes (Figure A6), positive samples showed ladder-like bands on agarose gel, while wild-type and NTC showed none.

Though not essential, loop primers greatly accelerate LAMP. Duplex testing (Figure 3B) with 2 positive and 2 negative samples confirmed high specificity: ladders in positives and none in negatives/NTC.

#### ***Results of LAMP Product Observation Using Fluorescence Method with SYBR Green Dye***

SYBR Green detection showed higher fluorescence in *PIK3CA* H1047R positive samples, and agarose gel electrophoresis confirmed these results. In other words, samples with elevated fluorescence displayed ladder-like bands, while negatives showed none.

#### ***Evaluation of Results of LAMP Reaction Using Colorimetric Method with Neutral Red Dye***

Duplex colorimetric LAMP (Neutral Red dye) distinguished positives from negatives (Figure 4C). After 30 minutes at 63°C, mutant-positive tubes changed from pink to orange (indicating pH drop from DNA amplification and Bst activity), while

negatives and NTC remained pink. This confirms Neutral Red as a simple, rapid, and equipment-free LAMP detection method.

#### ***Molecular Docking Results: Bst Polymerase Binding Affinity to Mutant versus Wild-type Sequences***

Molecular docking of Bst polymerase with *PIK3CA* H1047R mutant and wild-type sequences showed no significant difference in binding affinity using *t*-test ( $P > 0.05$ ). Therefore, the H1047R mutation does not affect Bst binding to DNA.

#### ***Molecular Docking Results: Bst versus Taq Polymerase Binding to R1047H Mutant Sequence***

Bst polymerase showed significantly higher binding affinity to the *PIK3CA* H1047R mutant sequence than Taq polymerase using *t*-test ( $P < 0.05$ ), indicating superior amplification capability.

## **Conclusion**

This study introduced a robust, rapid, and low-cost PE-LAMP assay for the clinically significant *PIK3CA*:H1047R mutation. The present method combines allele-specific primer design, loop primers, and a simple colorimetric readout method with Neutral Red, enabling naked-eye visualization of results within 20-30 minutes without sophisticated laboratory equipment. The current assay showed good specificity, high sensitivity (detection limit of 0.033 ng/μL), and very good concordance with Sanger sequencing and RNA-seq results. In-depth molecular validation and transcriptomic analysis were combined with docking simulations, providing a comprehensive overview of both the technical performance of the assay and the biological relevance of the mutation. Owing to its speed, affordability, and minimal technical requirements, this system may represent an exceptionally powerful PE-LAMP system for use in resource-limited clinical settings and in point-of-care diagnostics for rapid screening programs, enabling precision oncology and improving outcomes for breast cancer patients.

## سنجش حساسیت PE-LAMP برای تشخیص سریع جهش *PIK3CA: H1047R* در سرطان پستان

محمد معین صالحی‌نژاد<sup>1</sup>، شیرین شهبازی<sup>2\*</sup>

گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

### چکیده

**زمینه.** جهش *PIK3CA: H1047R* یکی از شایع‌ترین جهش‌های پیش‌برنده در سرطان پستان است که فعال‌سازی غیرکنترل شده مسیر پیام‌رسانی PI3K/AKT/mTOR را به دنبال دارد. شناسایی سریع و کم‌هزینه این جهش می‌تواند نقش کلیدی در انتخاب برنامه درمانی هدفمند و بهبود پیش‌آگهی بیماران ایفا کند. هدف این مطالعه، توسعه و بهینه‌سازی یک روش اختصاصی برای شناسایی این جهش بدون نیاز به تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی بود. **روش کار.** پرایمرهای اختصاصی FIP و BIP به گونه‌ای طراحی شدند که انتهای 5' آنها مکمل نوکلئوتید جهش‌یافته باشد. همچنین، یک پرایمر حلقه برای افزایش کارایی و سرعت واکنش طراحی شد. واکنش LAMP روی DNA رده‌های سلولی MDA-MB-453 (جهش‌یافته) MCF-7 (نوع وحشی) انجام شد و حساسیت روش با رقیق‌سازی سریالی ارزیابی گردید. برای مشاهده نتایج، از روش رنگ‌سنجی با رنگ قرمز خنثی و همچنین فلورسانس با سایبرگرین استفاده شد. علاوه بر این، به منظور تأیید اهمیت این جهش داده‌های توالی‌یابی RNA مربوط به بیماران دارای جهش از پایگاه داده TCGA استخراج و بیان ژن‌های مسیر پیام‌رسانی PI3K بررسی شد. **یافته‌ها.** روش طراحی شده توانست توالی جهش‌یافته را با اختصاصیت مناسبی از نوع وحشی تفکیک کند. افزودن پرایمر حلقه موجب کاهش زمان واکنش و افزایش حساسیت شد؛ به طوری که حد تشخیص روش ۰/۰۳۳ نانوگرم میکرولیتر تعیین گردید. رنگ قرمز خنثی قادر بود تغییر رنگ واضح بین نمونه‌های مثبت و منفی ایجاد کند؛ در حالی که سیگنال سایبرگرین تفاوت چشمگیری نداشت. تحلیل توالی‌یابی RNA نیز نشان داد جهش *H1047R* باعث بازآرایی الگوی بیان ژن‌های مسیر PI3K/AKT/mTOR شده و چندین ژن کلیدی این مسیر دچار افزایش یا کاهش بیان معنادار می‌شوند.

**نتیجه‌گیری.** روش PE-LAMP توسعه یافته در این مطالعه، روشی سریع، حساس، کم‌هزینه و قابل مشاهده با چشم غیرمسلح برای تشخیص جهش *PIK3CA: H1047R* است و می‌تواند به عنوان یک ابزار مناسب برای غربالگری و تشخیص مولکولی در مراکز با امکانات محدود مورد استفاده قرار گیرد. این روش با توجه به عملکرد مناسب و نیاز اندک به تجهیزات، پتانسیل تبدیل شدن به یک ابزار بالینی برای انتخاب درمان هدفمند در بیماران سرطان پستان را داراست. **پیامدهای عملی.** به کارگیری روش توسعه یافته در این مطالعه می‌تواند تشخیص جهش *PIK3CA: H1047R* در آینده جهش‌های دیگر را در مراکز درمانی و آزمایشگاهی با امکانات محدود تسهیل کند. سرعت بالا، هزینه کم و قابلیت مشاهده نتایج با چشم غیرمسلح، این روش را برای غربالگری اولیه بیماران و انتخاب سریع‌تر درمان‌های هدفمند مناسب می‌سازد. علاوه بر این، امکان استفاده از آن در محیط‌های نزدیک به بیمار (Point of care) می‌تواند به بهبود دسترسی بیماران به روش‌های تشخیص دقیق مولکولی کمک کند.

### اطلاعات مقاله

#### سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۲۰  
اصلاح نهایی: ۱۴۰۵/۱/۲۲  
پذیرش: ۱۴۰۵/۱/۲۶  
انتشار برخط: ۱۴۰۵/۳/۱۶

#### کلید واژه‌ها:

- تکثیر هم‌دما به واسطه حلقه
- جهش‌های سوماتیک
- سرطان پستان

### مقدمه

انتخاب روش‌های درمانی هدفمند، کاهش عوارض جانبی جلوگیری از اتلاف زمان و بهبود نتایج و پیش‌آگهی کمک کند. جهش *H1047R* در ژن *PIK3CA*، یکی از جهش‌های مهم مرتبط با سرطان پستان است که افزایش عملکرد پروتئین PI3K را به همراه

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در میان زنان است و جهش‌های ژنتیکی نقش مهمی در شروع و پیشرفت آن دارند. شناسایی جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های مربوط به این بیماری مانند *BRCA1/2* و *PIK3CA*، پیش از آغاز روند درمان، می‌تواند به

\*نویسنده مسؤول: ایمیل: sh.shahbazi@modares.ac.ir

شده است تا بتوانند به‌طور اختصاصی رشته DNA دارای جهش را تکثیر کرده ولی با DNA نوع وحشی واکنشی نداشته باشند. همچنین، استفاده از پروب‌های مختلف و استراتژی‌های دیگر برای جلوگیری از تکثیر توالی‌های غیردلخواه به کار گرفته شده است.<sup>۸</sup> در این پژوهش، با طراحی و بهره‌گیری از پرایمرهای اختصاصی و پرایمر حلقه و استفاده از روش تشخیص رنگ‌سنجی، تکنیکی مبتنی بر LAMP ارائه می‌شود که قادر به شناسایی جهش H1047R در ژن *PIK3CA* در بیماران مبتلا به سرطان پستان است.

### روش کار

برای بررسی تأثیر جهش H1047R: *PIK3CA* بر بیان ژن‌های مسیر پیام‌رسانی PI3K/AKT/mTOR، داده‌های توالی‌یابی RNA مربوط به نمونه‌های سرطان پستان دارای این جهش و نمونه‌های بافت سالم مجاور از پایگاه داده اطلس سرطان‌های انسانی (TCGA) دریافت شد. ابتدا نمونه‌های دارای جهش H1047R: *PIK3CA* فیلتر و سپس نمونه‌های مرتبط با سرطان پستان انتخاب گردید. داده‌های توالی‌یابی RNA مربوط به نمونه‌های توموری و بافت سالم مجاور دریافت شد. داده‌های استخراج شده پس از یک سری فرآیندهای پیش‌پردازش مانند حذف RNA های غیرکدکننده و اطلاعات اضافی دیگر، به صورت یک ماتریس سازماندهی شدند. در این ماتریس، ردیف‌ها ژن‌های کدکننده پروتئین و ستون‌ها نمونه‌های سالم و توموری را نشان می‌دادند و مقادیر ماتریس بیانگر میزان بیان هر ژن در هر نمونه بودند. تحلیل داده‌ها با استفاده از بسته نرم‌افزاری DESeq2 در محیط برنامه‌نویسی R انجام شد. این بسته با استفاده از آزمون‌های آماری، تفاوت بیان هر ژن میان نمونه‌های سالم و توموری را محاسبه و مقدار P-value را برای سنجش میزان معنی‌داری تغییرات ارائه می‌دهد. بدین ترتیب، الگوی بیان ژن‌ها در نمونه‌های سرطانی دارای جهش H1047R: *PIK3CA* و بافت‌های سالم مشخص شد. برای نمایش بهتر نتایج، داده‌ها با بسته ggplot2 بصری‌سازی و نمودارهای مرتبط ترسیم شد تا تغییرات بیان ژن‌ها به صورت واضح و قابل تفسیر ارائه گردد. رده‌های سلولی انسانی سرطان پستان MDA-MB-453 و MCF-7 با محیط کشت کامل (DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین) در فلاسک ۲۵ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت داده شدند. هنگامی که سلول‌ها به ۷۰ تا ۸۰ درصد تراکم رسیدند، برای آزمایش‌های بعدی یا پاساژ آماده شدند. پاساژ سلول‌ها با استفاده از تریپسین-EDTA ۲۵ صدم درصد انجام شد. پس از شست‌وشوی سلول‌ها با PBS و افزودن تریپسین، سلول‌ها به مدت ۲-۵ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند تا از سطح

داشته و در نهایت می‌تواند موجب افزایش تکثیر سلولی، پیشرفت تومور و مقاومت به شیمی درمانی شود.<sup>۱</sup> روش‌های متعددی برای شناسایی جهش‌های نقطه‌ای وجود دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به روش‌های بر پایه تکثیر DNA اشاره کرد. این روش‌ها شامل PCR و روش‌های تکثیر هم‌دمای DNA هستند. روش‌های تکثیر هم‌دما، برخلاف PCR که نیاز به چرخه‌های دمایی متعدد دارد، می‌تواند در یک دمای ثابت واکنش تکثیر را انجام دهند.<sup>۲</sup> این روش‌ها نیاز به تجهیزات پیچیده و سنگین تنظیم‌کننده چرخه دمایی (ترموسایکلر) را برطرف می‌کنند و از مزایای آن‌ها می‌توان به حساسیت بالا، سرعت بیشتر و پایداری بیشتر در برابر مهارکننده‌های واکنش تکثیر اشاره کرد.<sup>۳</sup> از مهم‌ترین روش‌های تکثیر هم‌دما می‌توان به روش RPA، RCA و LAMP اشاره کرد. هر یک از این روش‌ها نقاط قوت و محدودیت‌های خاص خود را دارند و می‌توانند در تشخیص جهش‌ها و همچنین شناسایی پاتوژن‌ها در نمونه‌های بالینی و صنایع گوناگون مانند صنایع غذایی به کار روند.<sup>۴،۵</sup> تکنیک تکثیر هم‌دما به واسطه حلقه (LAMP) یکی از شناخته‌شده‌ترین روش‌های تکثیر هم‌دمای DNA است که می‌تواند تا یک میلیارد کپی از قطعه DNA را در مدت زمانی کمتر از یک ساعت تکثیر کند، در حالی که روش PCR قادر است تنها حدود یک میلیون کپی در ساعت تکثیر نماید. این تکنیک به تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی نیاز ندارد و به دلیل استفاده از چهار تا شش پرایمر که شش تا هشت جایگاه روی رشته DNA هدف را شناسایی می‌کنند، دارای اختصاصیت بسیار بالایی است. پرایمرهای مورد استفاده شامل پرایمر داخلی فوروارد (FIP)، پرایمر داخلی بک‌وارد (BIP)، پرایمر خارجی فوروارد (F3)، پرایمر خارجی بک‌وارد (B3) و پرایمرهای اختیاری حلقه (LF, LB) می‌باشند.<sup>۶</sup> تکنیک LAMP به دلیل توانایی جابه‌جایی رشته مختص آنزیم Bst پلی‌مرز، فاقد مرحله دناتوراسیون DNA بوده و همه مراحل واکنش در یک دمای ثابت از ۶۰ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شوند. بنابراین، نیازی به دستگاه ترموسایکلر برای تغییر دمای مرحله‌ای واکنش وجود ندارد. یکی دیگر از مزایای LAMP نسبت به PCR، امکان مشاهده مستقیم نتیجه واکنش با چشم غیرمسلح در حین و پس از پایان واکنش، بدون نیاز به انتقال محصولات به ژل آگارز است.<sup>۶</sup> مشاهده نتیجه واکنش می‌تواند با استفاده از رنگ‌های فلورسنتی مانند سایبرگرین، رنگ‌های غیر فلورسنت همچون قرمز خنثی یا بر اساس میزان کدورت محیط واکنش انجام شود.<sup>۷</sup> با وجود مزایای اشاره شده، این تکنیک در نوع ابتدایی خود قادر به تشخیص جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی و تمایز میان DNA جهش‌یافته و نوع وحشی نیست. برای بهینه‌سازی این تکنیک، تغییراتی در طراحی پرایمرها اعمال

پیشرفته، از دو رویکرد رنگ‌سنجی استفاده شد. در روش نخست، مقدار ۱ میکرولیتر رنگ سایبر گرین ۱۰۰X پیش از شروع تکثیر به مخلوط واکنش اضافه گردید. این رنگ با اتصال به DNA دو رشته‌ای حاصل از تکثیر، در مواجهه با نور فرابنفش تابش فلورسانس سبز رنگی از خود بروز می‌دهد که نشان‌دهنده وقوع واکنش تکثیر بود. در روش دوم، مقدار ۱ میکرولیتر رنگ قرمز خنثی (Neutral Red) پیش از آغاز واکنش به مخلوط اضافه شد. این رنگ به‌عنوان یک نشانگر حساس به pH عمل کرده و در اثر آزاد شدن یون هیدروژن طی فرآیند سنتز DNA توسط آنزیم پلی‌مرز تغییر رنگ می‌دهد. در واکنش‌های مثبت، بر اثر کاهش pH ناشی از آزاد شدن یون هیدروژن رنگ محیط از طیف رنگی بنفش-صورتی به نارنجی-زرد تغییر می‌یابد، در حالی که در واکنش‌های منفی که تکثیری رخ نمی‌دهد، طیف رنگ اولیه بنفش-صورتی بدون تغییر باقی می‌ماند. به منظور بررسی و مقایسه میزان تمایل اتصال آنزیم Bst پلی‌مرز به توالی دارای جهش *PIK3CA: H1047R* و توالی فاقد این جهش و همچنین مقایسه تمایل آنزیم‌های Bst و Taq پلی‌مرز به اتصال با توالی دارای این جهش، از روش داکینگ مولکولی استفاده شد. این روش امکان ارزیابی میزان تمایل اتصال یک پروتئین به لیگاند هدف را به صورت نرم‌افزاری و *in silico* فراهم می‌کند. ساختار سه‌بعدی آنزیم‌های Bst و Taq پلی‌مرز از پایگاه داده RCSB به فرمت فایل PDB دریافت شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Chimera، پیش‌پردازش‌های لازم شامل حذف مولکول‌های آب و افزودن یون‌های هیدروژن بر روی ساختارهای آنزیمی انجام گرفت. به منظور طراحی ساختار سه‌بعدی DNA بر اساس توالی مورد نظر، از نرم‌افزار تحت وب 3D-DART استفاده و فرآیند داکینگ مولکولی با بهره‌گیری از پلتفرم تحت وب SwissDock انجام شد. برای افزایش اعتبار نتایج، داکینگ برای هر آنزیم در پنج تکرار مستقل انجام شد و نتایج به دست آمده با آزمون آماری T مورد تحلیل و مقایسه قرار گرفت.

### یافته‌ها

بر اساس داده‌های استخراج شده از پایگاه داده The Cancer Genome Atlas (TCGA)، جهش *PIK3CA: H1047R* یکی از ۲۰ جهش شایع در انواع مختلف سرطان‌ها محسوب می‌شود و در میان تمام جهش‌های سوماتیک مرتبط با سرطان‌ها، رتبه ۷ را به خود اختصاص داده است. تحلیل داده‌های بالینی مرتبط نشان داد که جهش *PIK3CA: H1047R* با برخی ویژگی‌های بالینی خاص در بیماران سرطانی همراه است. بیشترین فراوانی این جهش در کارسینوما داکتال مهاجم (Invasive Ductal Carcinoma)،

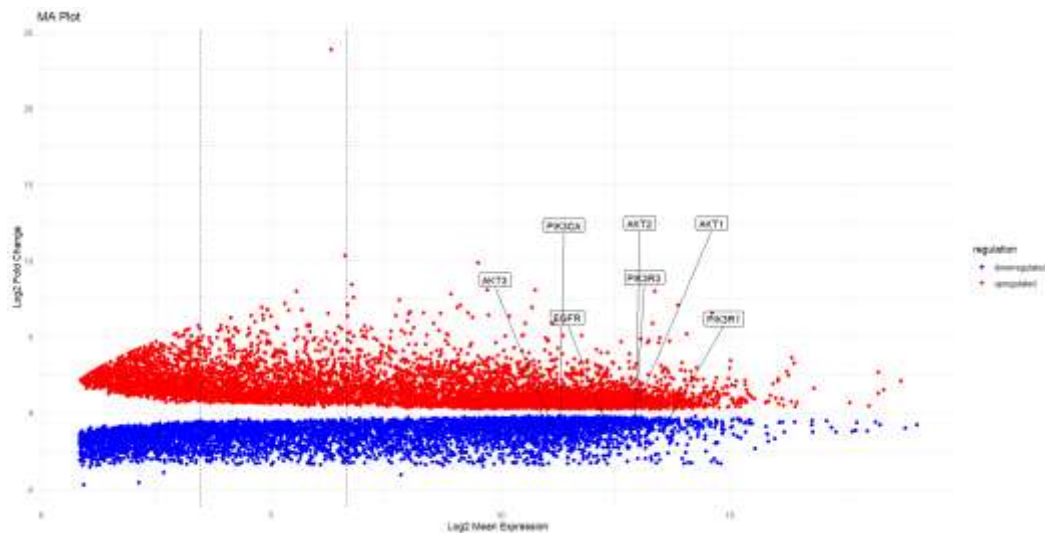
فلاسک جدا شوند. سپس اثر تریپسین با افزودن محیط کشت تازه حاوی سرم متوقف شد تا از آسیب به سلول‌ها جلوگیری شود. سلول‌ها سپس به نسبت مناسب برای ادامه کشت یا انجام آزمایش‌ها منتقل شدند. برای استخراج DNA و با استفاده از کیت‌های تجاری، رده سلولی MCF-7 به عنوان کنترل منفی و فاقد جهش *PIK3CA: H1047R* و رده سلولی MDA-MB-453 به عنوان کنترل مثبت که دارای جهش *PIK3CA: H1047R* هستند، استفاده شد. کیفیت و غلظت DNA استخراج شده با نانو دراپ و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. به منظور تأیید جهش *H1047R* در DNA استخراج شده از رده سلولی MDA-MB-453، آگزون ۲۰ ژن *PIK3CA* که جهش در آن واقع شده است با واکنش PCR و پرایمرهای اختصاصی تکثیر و برای توالی‌یابی برای شرکت زیست فناوری پیشگام ارسال شد. در نهایت، فایل کروماتوگرام مربوط به توالی‌یابی سنگر، با استفاده از نرم افزار کروماتس آنالیز گردید. پرایمرهای واکنش LAMP شامل *F3*، *B3*، *FIP*، *BIP* و پرایمر حلقه از مطالعه‌ای که قبلاً صورت گرفته بود، انتخاب شدند.<sup>۹</sup> برای تهیه مخلوط پرایمرهای واکنش، ۱۰ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای خارجی *F3* و *B3* با غلظت ۱۰ پیکومولار، ۱۰ میکرولیتر از پرایمرهای داخلی *FIP* و *BIP* با غلظت ۱۰۰ پیکومولار و ۵ میکرولیتر پرایمر حلقه با غلظت ۱۰۰ پیکومولار به همراه ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل به آرامی ترکیب شدند. واکنش LAMP اختصاصی در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. ترکیب واکنش شامل ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل به عنوان حلال، ۲/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP، ۱/۵ میکرولیتر بافر 10X برای فراهم کردن شرایط یونی و pH مناسب در محیط واکنش، ۱ میکرولیتر منیزیم سولفات به عنوان کوفاکتور ضروری آنزیم Bst پلی‌مرز، ۱ میکرولیتر میکس پرایمر اختصاصی، ۵/۵ میکرولیتر آنزیم Bst پلی‌مرز و ۱ میکرولیتر DNA نمونه به عنوان الگو اضافه شد. واکنش در دمای ثابت بین ۶۰ تا ۶۵ (در دمای ۶۲/۵) درجه سانتی‌گراد به مدت زمان مشخص (۲۰ تا ۴۰ دقیقه) انجام گرفت و در نهایت محصولات واکنش جهت مشاهده باندها بر روی ژل الکتروفورز بررسی شدند. به منظور ارزیابی حساسیت و تعیین حد تشخیص (LOD) تکنیک LAMP طراحی شده، از روش رقیق‌سازی سریالی استفاده شد. برای این منظور رقت‌های متوالی به نسبت یک دهم از DNA الگوی با غلظت اولیه تهیه گردید. هر کدام از رقت‌های تهیه شده به عنوان الگو در واکنش LAMP به کار رفت و نتایج با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز ارزیابی گردید. این آزمایش امکان تعیین کمترین غلظت DNA قابل شناسایی توسط سیستم طراحی شده توسط ما را فراهم ساخت. برای مشاهده نتیجه واکنش به صورت سریع، آسان و بدون نیاز به تجهیزات

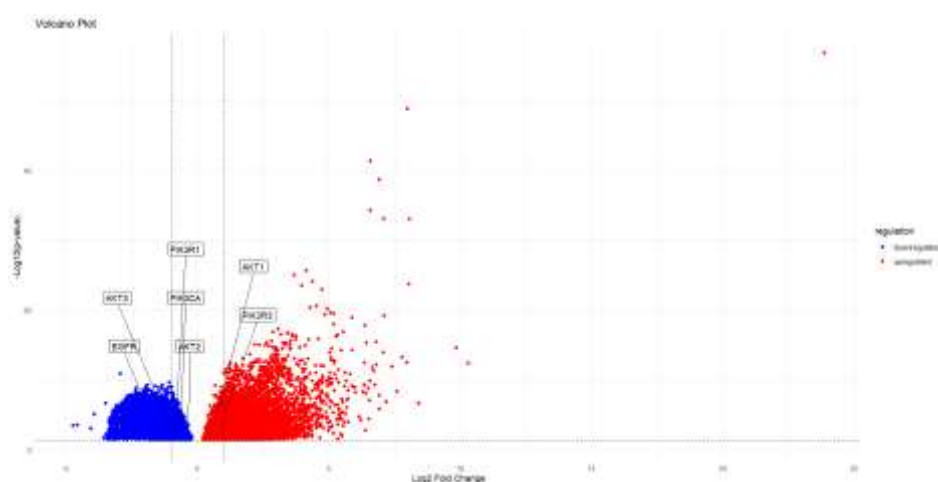
منفی افزایش یافت، اما تکثیر در نمونه حاوی جهش *PIK3CA: H1047R* در مدت زمان کوتاه‌تری نسبت به نمونه فاقد جهش آغاز شد. به بیان دیگر، تحت شرایط یکسان، میزان تکثیر در نمونه مثبت بیشتر بوده و آغاز واکنش تکثیر نیز زودتر از نمونه منفی مشاهده شد. همچنین، مشخص شد که افزایش دمای واکنش تأثیر قابل‌توجهی بر افزایش اختصاصیت واکنش LAMP دارد. به‌طور مشخص، با افزایش دما از ۶۲/۵ به ۶۳/۶۵ درجه سانتی‌گراد، میزان تکثیر در نمونه منفی فاقد جهش کاهش یافت، در حالی که تکثیر در نمونه مثبت همچنان ادامه داشت. همان‌طور که در شکل ۳A قابل مشاهده است، نتایج نشان داد که پرایمرهای حلقه با تسهیل تکثیر، از طریق تشکیل مداوم حلقه‌ها، فراهم کردن نقاط شروع تکثیر بیشتر فعالیت نقش مهمی در بهبود بازده واکنش LAMP دارند. استفاده از این پرایمرها باعث شد که مدت زمان لازم برای تکثیر نمونه دارای جهش *PIK3CA: H1047R* کاهش یابد؛ به‌طوری که مدت زمان واکنش از ۲۵ دقیقه در حالت بدون پرایمر حلقه به ۲۰ دقیقه با پرایمر حلقه کاهش یافت. مطابق با شکل ۶A، پس از ۲۰ دقیقه، نمونه مثبت دارای جهش تکثیر شده و الگوی باندهای نردبان‌مانند بر روی ژل آگارز دیده می‌شود. در مقابل، در نمونه فاقد جهش و واکنش کنترل بدون الگو (NTC)، در این مدت زمان هیچ تکثیری مشاهده نشده و باندی بر روی ژل ظاهر نمی‌شود. بنابراین، اگرچه استفاده از پرایمر حلقه برای وقوع واکنش و تکثیر ضروری نیست، اما سرعت تکثیر واکنش را به‌طور قابل‌توجهی بهبود بخشیده و مدت زمان را کاهش می‌دهد. نتایج تست دوگانه واکنش LAMP نشان داد که این روش اختصاصی برای شناسایی جهش *PIK3CA: H1047R* بسیار دقیق است. در این آزمایش، از دو نمونه مثبت دارای جهش و دو نمونه منفی فاقد جهش استفاده شد. پس از انجام واکنش LAMP و الکتروفورز محصولات روی ژل آگارز، مشاهده شد که در نمونه‌های مثبت تکثیر موفقیت‌آمیز رخ داده و الگوی باندهای نردبانی تشکیل شد، در حالی که در نمونه‌های منفی و NTC هیچ باندهای مشاهده نگردید. این یافته‌ها نشان‌دهنده اختصاصیت بالای واکنش و توانایی آن در تمایز واضح بین نمونه‌های حاوی جهش و نمونه‌های فاقد جهش هستند و در شکل ۳B قابل مشاهده هستند. نتایج مربوط به رقیق‌سازی سریالی که در شکل ۳C نمایش داده شده است نشان داد که تکنیک اختصاصی LAMP توسعه یافته در این مطالعه از حساسیت بالایی برخوردار است و می‌تواند نمونه‌هایی با غلظت ۰/۰۳۳ نانوگرم بر میکرولیتر از DNA دارای جهش *PIK3CA: H1047R* را تکثیر و شناسایی کند. پس از اجرای واکنش LAMP روی رقت‌های مختلف و بررسی محصولات بر روی ژل آگارز، مشاهده شد که در غلظت‌های بالا (۳۳ و ۳/۳

شایع‌ترین زیرگونه سرطان پستان، مشاهده شد. علاوه بر این، فراوانی قابل توجهی از این جهش در کارسینوما آندومتر، آدنوکارسینوما و کارسینوما لوبولار نیز ثبت گردید. آنالیز داده‌های توالی‌یابی RNA مربوط به نمونه‌های سرطان پستان دارای جهش *PIK3CA: H1047R* و مقایسه آن‌ها با بافت‌های نرمال و غیرتوموری مجاور نشان داد که برخی از اجزای مسیر پیام‌رسانی PI3K/AKT/mTOR تحت تأثیر این جهش قرار گرفته‌اند. نتایج این آنالیز مشخص کرد که در نمونه‌های دارای جهش، بیان ژن‌های *PIK3CA*، *PIK3E1*، *PIK3R3*، *AKT*، *AKT2* و *AKT3* به‌طور معنادار ( $P < 0/05$ ) نسبت به نمونه‌های نرمال تغییر کرده است. میزان تغییر بیان این ژن‌ها شکل شماره ۱ ارائه شده و نشان‌دهنده نقش جهش *PIK3CA: H1047R* در مسیر پیام‌رسانی PI3K/AKT/mTOR در سرطان پستان است. پس از تکثیر آگزون ۲۰ ژن *PIK3CA* از DNA استخراج شده از رده‌ی سلولی MDA-MB-453، محصول PCR ارسال و نتایج توالی‌یابی به صورت فایل کروماتوگرام و با استفاده از نرم‌افزار Chromas تحلیل شد. آنالیز نتایج که در شکل شماره ۲ مشاهده می‌شود، نشان داد که DNA استخراج شده از رده سلولی MDA-MB-453 در آگزون ۲۰ ژن *PIK3CA* دارای یک جهش نقطه‌ای است؛ به گونه‌ای که باز آلی آدنین در نوکلئوتید شماره ۳۱۴۰ به گوانین تبدیل شده است. این جهش باعث تغییر اسید آمینه شماره ۱۰۴۷ در زیر واحد  $\alpha$  پروتئین PI3K هیستیدین به آرژنین می‌شود، که با جهش  $c.3140A>G$ ،  $H1047R$  شناخته شده و اهمیت بالایی در فرآیند تومورزایی دارد. برخلاف واکنش PCR که الگوی باندها بر روی ژل به صورت تک باند دیده می‌شود، الگوی باندهای حاصل از واکنش LAMP به صورت نردبان‌مانند (Ladder-Like) ظاهر می‌شود. این الگو ناشی از مکانیسم خاص تکثیر در LAMP است که در آن، تکثیر پیوسته و تصاعدی DNA منجر به تولید محصولات با طول‌های متفاوت می‌شود. فعالیت جا به جایی رشته آنزیم BST پلی‌مراز، تشکیل ساختارهای حد واسط حلقه‌ای و عدم نیاز به دناتوراسیون دوره‌ای، از عوامل اصلی ایجاد قطعات با اندازه گوناگون و این الگوی باند ویژه هستند. بنابراین، مشاهده این الگو نشان‌دهنده تکثیر موفق و عملکرد صحیح واکنش LAMP است. نتایج حاصل از این بخش نشان داد که مدت زمان انجام واکنش تأثیر مستقیم بر میزان تکثیر نمونه‌ها و همچنین بر اختصاصیت واکنش دارد. پس از ۲۵ دقیقه انجام واکنش LAMP، مشاهده شد که تکثیر در نمونه منفی فاقد جهش *PIK3CA: H1047R* به‌طور کامل متوقف شده است، در حالی که تکثیر در نمونه مثبت حاوی جهش همچنان، هرچند با شدت کمتر نسبت به شرایط اولیه ادامه دارد. با افزایش مدت زمان انکوباسیون، میزان تکثیر در هر دو نمونه مثبت و

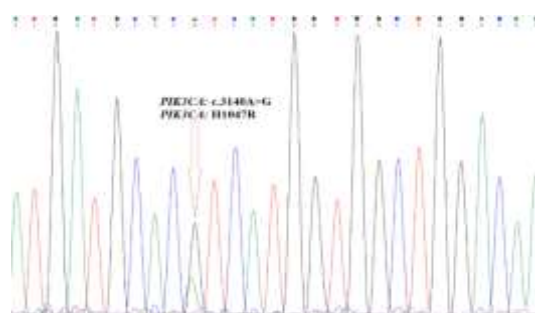
همان‌طور که در شکل C4 مشاهده می‌شود، در لوله‌های حاوی نمونه‌های مثبت دارای جهش، پس از ۳۰ دقیقه واکنش در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد، رنگ محیط واکنش از طیف رنگی صورتی به نارنجی تغییر یافت که نشان‌دهنده کاهش pH محیط واکنش ناشی از تکثیر موفق DNA و فعالیت آنزیم Bst پلی‌مرز است. در مقابل، در لوله‌های حاوی نمونه‌های منفی فاقد جهش و همچنین در لوله NTC هیچ تغییر رنگی مشاهده نشد و طیف رنگی صورتی اولیه حفظ شد. این امر نشان‌دهنده عدم وقوع تکثیر در این نمونه‌ها بود. این نتایج تأیید می‌کند که روش رنگ‌سنجی با استفاده از رنگ نشانگر قرمز خنثی، می‌تواند به عنوان روشی ساده، سریع و قابل اعتماد برای ارزیابی واکنش LAMP بدون نیاز به تجهیزات ویژه‌ای مورد استفاده قرار گیرد. نتایج داکینگ مولکولی بین آنزیم BST پلی‌مرز و توالی‌های دارای جهش *PIK3CA: H1047R* و توالی وحشی و مقایسه میزان تمایل اتصال (affinity) آنزیم به هر دو توالی با استفاده از آزمون T، نشان داد که تفاوت معناداری وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). بنابراین، حضور یا عدم حضور جهش *H1047R* تأثیری بر میزان اتصال آنزیم BST پلی‌مرز به DNA نخواهد داشت. مقایسه میزان تمایل اتصال با استفاده از آزمون T نشان داد که تفاوت معناداری بین تمایل آنزیم Bst پلی‌مرز و Taq پلی‌مرز به این توالی وجود دارد ( $P < 0.05$ ). این یافته نشان می‌دهد که آنزیم Bst پلی‌مرز نسبت به Taq پلی‌مرز تمایل بیشتری برای اتصال به توالی دارای جهش *H1047R* داشته و توانایی بالاتری در تکثیر این توالی دارد.

نانوگرم بر میکرولیتر) تکثیر شدید و واضح بوده و باندهای نردبانی به وضوح بالایی قابل مشاهده‌اند، در حالی که با کاهش غلظت به ۰/۳۳ و ۰/۰۳۳ نانوگرم بر میکرولیتر، تکثیر همچنان رخ می‌دهد اما وضوح باندها کاهش یافته و الگوی تشکیل باندها به سمت اسمیر شدن پیش می‌رود. در رقت ۰/۰۰۳۳ نانوگرم بر میکرولیتر و نمونه NTC هیچ تکثیری مشاهده نشد. این نتایج نشان‌دهنده حساسیت بالای واکنش LAMP و وابستگی وضوح الگوی باندها به مقدار الگوی اولیه است. استفاده از رنگ سایبرگرین برای مشاهده محصولات واکنش LAMP تحت نور فرابنفش نشان داد که شدت نور فلورسانس در نمونه‌های مثبت دارای جهش *PIK3CA: H1047R* نسبت به نمونه‌های منفی و NTC بیشتر است، هرچند این تفاوت شدت تابش فلورسانس چندان چشمگیر نبود. به منظور اعتبارسنجی نتایج رنگ سایبرگرین، محصولات واکنش LAMP بر روی ژل آگارز منتقل شدند. نتایج مشاهده شده در شکل ۴ نشان داد که در نمونه‌هایی که میزان تابش فلورسانس آن‌ها کمتر بود، هیچ باندهایی که باندهای نردبان مانند تشکیل دادند، در حالی که در نمونه‌هایی که میزان تابش فلورسانس آن‌ها کامل با یافته‌های فلورسانس سایبرگرین دارد و اختصاصیت نتایج روش مشاهده محصولات با سایبرگرین را تأیید می‌کند. نتایج حاصل از مشاهده محصولات واکنش LAMP با روش رنگ‌سنجی که به صورت دوگانه انجام شد، نشان داد که این روش قادر به تمایز میان نمونه‌های مثبت و منفی است.

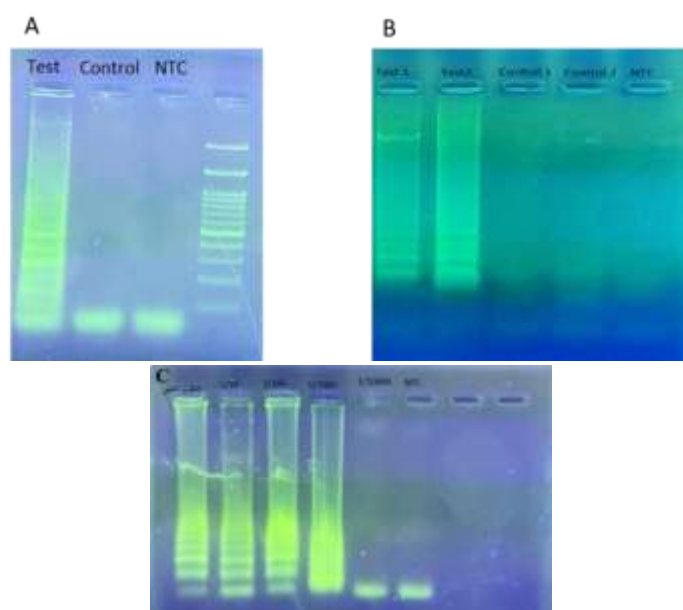




شکل ۱. نمودارهای MA-plot و Volcano-plot مربوط به تحلیل داده‌های توالی‌یابی RNA در نمودار MA (بالای تصویر)، محور افقی میانگین سطح بیان و محور عمودی میزان تغییر بیان (Log<sub>2</sub> fold change) را نشان می‌دهد و نقاط قرمز بیانگر ژن‌های دارای تغییر بیان معنادار ( $P < 0.05$ ) هستند. نمودار Volcano (پایین تصویر) نیز ژن‌های تغییر بیان یافته را بر اساس Log<sub>2</sub> fold change (محور افقی) نمایش می‌دهد و محور عمودی نیز بیانگر مقدار  $p$ -value می‌باشد، به طوری که ژن‌های با افزایش بیان در رنگ قرمز و ژن‌های با کاهش بیان در رنگ آبی مشخص شده‌اند.

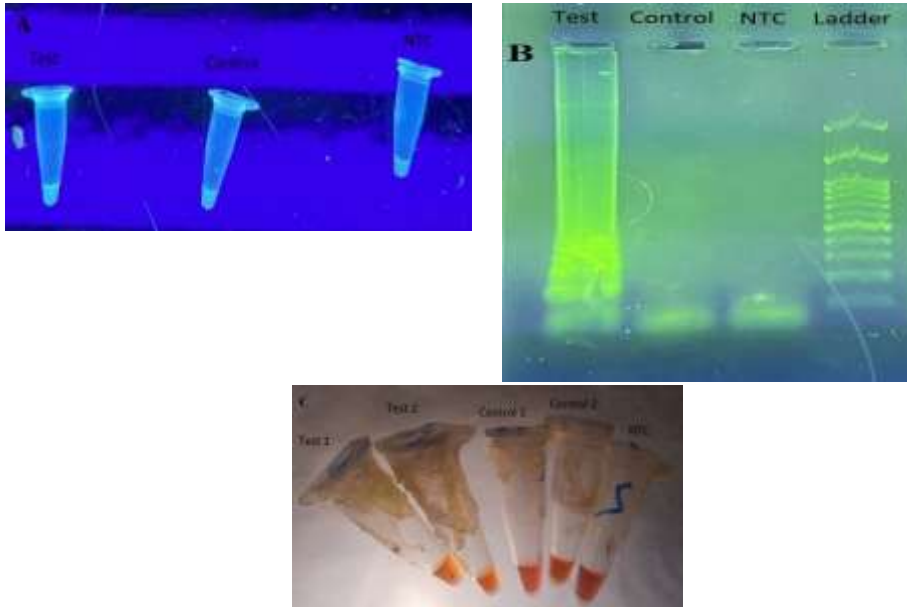


شکل ۲. نتایج حاصل از تحلیل توالی‌یابی سنگر با نرم‌افزار Chromas که نشان‌دهنده جهش H1047R، c.3148A>G در DNA استخراج شده از رده سلولی MDA-MB-453 است.



شکل ۳. A - نتایج مربوط به استفاده از پرایمر حلقه و مدت زمان واکنش ۲۰ دقیقه. چاهک TEST حاوی نمونه دارای جهش H1047R، چاهک Control حاوی نمونه فاقد این جهش و چاهک NTC نمونه بدون الگو. در چاهک Test الگوی نردبان مانند مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده رخداد واکنش می‌باشد؛ در حالی که در چاهک‌های Control و NTC باندها دیده نمی‌شوند.

نمی‌شوند. B- نتایج مربوط به تست دوگانه LAMP اختصاصی. چاهک‌های Test ۱ و ۲ حاوی نمونه دارای جهش H104YR که مشاهده الگوی نردبان مانند نشان‌دهنده وقوع واکنش در این نمونه‌ها و چاهک‌های Control شماره ۱ و ۲ دارای نمونه فاقد جهش که عدم مشاهده الگوی باندی نشان‌دهنده عدم وقوع واکنش در این نمونه‌ها می‌باشد. C: نتایج مربوط به رقیق‌سازی سریالی. چاهک اول نمونه حاوی غلظت اصلی DNA الگو (۳۳ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک دوم رقت یک به ده (۳/۳ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک سوم رقت یک به صد (۰/۳۳ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک چهارم رقت یک به هزار (۰/۰۳۳ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک پنجم رقت یک به ده هزار (۰/۰۰۳۳ نانوگرم بر میکرولیتر) و چاهک ششم نمونه بدون الگو. با کاهش غلظت نمونه DNA الگو، الگوی تشکیل باندها از حالت نردبان مانند با وضوح تفکیک بالا به سمت اسمیر شدن پیش رفته است و در چاهک دارای رقت نمونه DNA الگوی یک به ده هزار (۰/۰۰۳۳ نانوگرم بر میکرولیتر) تکثیر رخ نداده است.



**شکل ۴.** نتایج مربوط به مشاهده واکنش LAMP با رنگ سایبرگرین و قرمز خنتی A: لوله Test حاوی نمونه دارای جهش H104YR و لوله Control حاوی نمونه فاقد این جهش در معرض تابش فرابنفش. لوله دارای نمونه حاوی جهش به میان کمی پراکنش فلورسین بیشتری دارد اما قابل توجه نیست. B: ژل آگارز متناظر با لوله‌های در معرض نور فرابنفش. چاهک Test حاوی نمونه دارای جهش R104YR و چاهک Control حاوی نمونه فاقد این جهش. در چاهک Test تکثیر رخ داده است که با بیشتر بودن میزان پراکنش فلورسین لوله Test همخوانی دارد. C: نتایج مربوط به مشاهده نتیجه واکنش با روش رنگ‌سنجی: لوله‌های 1 Test و 2 Test حاوی نمونه دارای جهش H104YR و لوله‌های 1 control و 2 Control حاوی نمونه فاقد این جهش هستند. لوله‌های 1 Test و 2 Test رنگ محیط واکنش بر اثر کاهش pH ناشی از تکثیر رشته الگو متمایل به نارنجی شده اما رنگ محیط واکنش در لوله‌های control و NTC که تکثیری در آن‌ها رخ نداده، تغییر نکرده و طیف رنگی صورتی را حفظ کرده‌اند.

#### بحث

تجهیزات پیچیده آزمایشگاهی شناسایی کرد. جهش H104YR دومین جهش شایع در ژن PIK3CA است و موجب فعال‌سازی غیرقابل کنترل مسیر پیام‌رسانی PI3K/AKT/mTOR می‌شود.<sup>۱</sup> این جهش با پیشرفت سرطان، مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی و کاهش پاسخ به هورمون درمانی در بیماران HR+/HER2- همراه است.<sup>۱۳،۱۴</sup> تحلیل داده‌های توالی‌یابی RNA از تومورهای حامل این جهش در مطالعه حاضر نشان داد که جهش H104YR می‌تواند بیان اعضای مسیر PI3K/AKT/mTOR را تحت تأثیر قرار دهد و منجر به اثرات منفی یاد شده شود. بنابراین، شناسایی سریع این جهش برای تعیین روش درمان هدفمند بالایی دارد. روش‌های متداول برای شناسایی جهش‌های نقطه‌ای، عمدتاً شامل تکنیک‌های مبتنی بر PCR و توالی‌یابی هستند؛ با این حال، نیاز به تجهیزات پیچیده و هزینه بالای این روش‌ها، کاربرد بالینی گسترده آن‌ها را محدود می‌کند. با توجه به اهمیت شناسایی دقیق

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در میان زنان در سراسر جهان است و یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان‌ها به شمار می‌رود.<sup>۱۰</sup> شناسایی جهش‌های سوماتیک حتی با فراوانی پایین در DNA تومور، چه در نمونه‌های بافتی و چه در خون محیطی، نقش حیاتی در ارزیابی متاستاز، پیش‌آگهی بیماری، انتخاب روش درمانی، پایش درمان و تشخیص زودهنگام سرطان ایفا می‌کند.<sup>۱۱</sup> بر اساس جدیدترین راهنمای انجمن انکولوژی بالینی آمریکا (ASCO)، شناسایی جهش‌های سوماتیک ژن PIK3CA در سرطان پستان، از اهمیت بالینی بالایی برخوردار است. در این پژوهش، ما روشی اختصاصی برای شناسایی جهش H104YR در ژن PIK3CA در سرطان پستان توسعه دادیم که مبتنی بر تکنیک LAMP است. یافته‌های ما نشان داد که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و پرایمرهای حلقه، همراه با به‌کارگیری رنگ قرمز خنتی، می‌توان جهش مورد نظر را به شیوه‌ای سریع، ساده و بدون نیاز به

جهش‌های نقطه‌ای در سرطان‌ها، توسعه روش‌هایی ساده، سریع و مقرون به صرفه می‌تواند نقش مؤثری در بهبود مدیریت و درمان بیماران سرطانی ایفا کند.<sup>۱۴</sup> استفاده از تکنیک LAMP به دلیل انجام واکنش در دمای ثابت، عدم نیاز به ترموسایکلر، اختصاصیت بالا و توانایی تکمیل واکنش در کمتر از یک ساعت، نسبت به روش‌های سنتی مانند PCR و توالی‌یابی، مزیت قابل توجهی دارد.<sup>۱۵، ۱۶</sup> در این پژوهش، پرایمرهای داخلی FIP و BIP به گونه‌ای به کار گرفته شدند که نوکلئوتید انتهایی آن‌ها مکمل نوکلئوتید جهش‌یافته باشد و در حضور توالی نوع وحشی، واکنش صورت نگیرد. این طراحی سبب افزایش چشمگیر اختصاصیت می‌شود. تکنیک LAMP کاربردهای گسترده‌ای در حوزه‌های بالینی و تحقیقاتی دارد؛ از جمله در شناسایی سریع پاتوژن‌ها مانند *Escherichia coli* و ویروس‌هایی با اهمیت جهانی مانند کووید ۱۹.<sup>۱۷، ۱۸</sup> همچنین در صنایع غذایی برای کنترل کیفیت و پیشگیری از بیماری‌های منتقله از غذا به کار می‌رود.<sup>۱۸</sup> از کاربردهای جدید این روش، شناسایی جهش‌های نقطه‌ای در بیماری‌ها، به ویژه جهش‌های سوماتیک در نمونه‌های توموری است. با این حال، محدودیت ذاتی LAMP در افتراق تک‌نوکلئوتیدها باعث شده اصلاحاتی در طراحی پرایمرها و استفاده از پروب‌ها برای افزایش اختصاصیت ایجاد شود.<sup>۸</sup> با توجه به اینکه تاکنون روش LAMP برای شناسایی جهش‌های نقطه‌ای سوماتیک در ایران به کار گرفته نشده است، هدف اصلی این مطالعه استانداردسازی و راه‌اندازی این آزمون برای شناسایی جهش *PIK3CA: H1047R* به عنوان گامی پایه‌ای در مسیر کاربرد بالینی آن بود. به منظور اطمینان از استحکام روش‌شناسی و قابلیت تکرارپذیری در مرحله اعتبارسنجی، از رده سلولی سرطان پستان MDA-MB-453 که دارای جهش *PIK3CA: H1047R* تأیید شده توسط روش توالی‌یابی سنگر بود، استفاده شد. این تکنیک چندین بار بر روی نمونه مرجع تکرار شد تا شرایط واکنش بهینه‌سازی، حساسیت، ویژگی و تکرارپذیری بین دفعات انجام آزمایش مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج پایدار و سازگار حاصل از آزمایش‌های مکرر، کارایی و پایداری پروتکل LAMP توسعه یافته را تأیید کردند. در گام‌های بعدی در آینده، عملکرد این تکنیک بر روی نمونه‌های بافت تومور تثبیت شده با فرمالین و پارافینه (FFPE) از بیماران مبتلا به سرطان پستان ارزیابی خواهد شد تا اعتبار تحلیلی و قابلیت کاربرد بالینی آن مشخص شود. این رویکرد دو مرحله‌ای شامل استانداردسازی اولیه با استفاده از نمونه‌های مرجع با مشخصات دقیق و سپس اعتبارسنجی بالینی توسعه آزمون LAMP را به شکلی نظام‌مند و دقیق برای ادغام در روندهای تشخیصی روتین تضمین می‌کند. ایتونوگا و همکاران با استفاده از

پروب PNA، جهش‌های ژن *KRAS* را شناسایی کردند؛ این روش اختصاصیت بالاتری داشت، اما روش ما به دلیل استفاده از پرایمر حلقه، حساسیت و سرعت بالاتری ارائه می‌دهد.<sup>۱۹</sup> در پرایمر حلقه ای که تانگ و همکاران برای تشخیص جهش در ژن H19 طراحی کردند، نوکلئوتید مکمل با جهش در سر ۳ پرایمر پرایمر قرار داشت، اما در روش ما نوکلئوتید مکمل اختصاصی جهش در سر ۵ پرایمر پرایمرهای داخلی بود که اختصاصیت بالاتری را برای شناسایی *USS-sbLAMP* نشان داد.<sup>۲۰</sup> کالوفونو و همکاران، روش *USS-sbLAMP* را برای شناسایی جهش H ۱۰۴۷R در ژن *PIK3CA* طراحی کردند و روی چیپ‌های حساس به تغییرات (ISEFT) پیاده‌سازی کردند. استفاده از پرایمرهای رقابتی *USS* و چیپ حساس، اختصاصیت و دقت بالایی فراهم می‌کرد.<sup>۹</sup> در مقابل، روش ما با استفاده از سیستم رنگ‌سنجی ساده، سریع و کم‌هزینه، نتیجه واکنش را به راحتی قابل مشاهده می‌سازد. مشابه آن، الکساندرو و همکاران از *USS-LAMP* برای شناسایی جهش E5۴۵K در DNA گردش‌کننده در خون استفاده کردند و پرایمرها را فشرده طراحی و راه‌اندازی کردند.<sup>۲۱</sup> یکی از مهم‌ترین مزایای تکنیک LAMP نسبت به PCR و سایر روش‌های شناسایی جهش‌های نقطه‌ای، امکان استفاده از روش‌های متنوع برای مشاهده نتیجه واکنش و تشخیص وقوع تکثیر است. در مطالعات مختلف، از روش‌های ساده و کم هزینه مانند کدورت‌سنجی و رنگ‌سنجی تا روش‌های پیشرفته مانند رنگ‌های فلورسنت و ISEFT استفاده شده است.<sup>۲۲</sup> در این مطالعه، سه روش ساده و قابل مشاهده با چشم غیرمسلح به کار گرفته شد: رنگ‌سنجی با قرمز خنثی که روش اصلی مطالعه بود و با تغییر رنگ محیط همراه است، تشخیص فلورسنت با سایبر گرین که تحت تابش فرابنفش تغییر رنگ می‌دهد و کدورت‌سنجی که بر اساس محصولات تکثیر باعث کدر شدن محیط می‌شود. در واکنش LAMP، فعالیت آنزیم *Bst* و افزودن dNTPها یون هیدروژن آزاد می‌کند که pH محیط را کاهش داده و امکان تشخیص تکثیر با رنگ‌های معرف pH را فراهم می‌سازد. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که روش‌های رنگ‌سنجی مبتنی بر نشانگرهای pH، به ویژه رنگ قرمز خنثی، ابزار مؤثری برای مشاهده نتیجه واکنش LAMP هستند. برای نمونه، مطالعه لی و همکاران برای شناسایی سوبه دلتای ویروس کرونا از متیل رد و مطالعه جومویی و همکاران برای شناسایی آلفا تالاسمی از فنول رد به عنوان نشانگر pH استفاده کردند.<sup>۲۳، ۲۴</sup> رنگ قرمز خنثی در مواجهه با تغییرات pH محیط، از صورتی به زرد تغییر رنگ می‌دهد و در این مطالعه نیز جهت مشاهده بصری نتیجه واکنش به کار رفت؛

کم‌هزینه و قابل رؤیت با چشم غیرمسلح برای تشخیص جهش *PIK3CA: H1047R* در سرطان پستان ارائه داد.

### قدردانی

نویسندگان بدین‌وسیله مراتب تقدیر و سپاس خود را از تمامی افرادی که به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم در پیشبرد این پژوهش همکاری داشته‌اند، اعلام می‌دارند. همچنین، از حمایت‌ها و تسهیلات پژوهشی فراهم شده توسط دانشگاه تربیت مدرس که امکان اجرای این تحقیق را مهیا ساخت، تشکر و قدردانی می‌کنند.

### مشارکت پدیدآوران

تمامی نویسندگان در طراحی مطالعه، اجرای مراحل پژوهش، تحلیل داده‌ها و نگارش یا بازنگری محتوای علمی مقاله مشارکت مؤثر داشته‌اند. محمد معین صالحی‌نژاد: ایده‌پردازی، انجام بخش‌های عملی و آزمایشگاهی پژوهش، جمع‌آوری، پردازش و تحلیل داده‌ها و نگارش پیش‌نویس اولیه مقاله؛ شیرین شهبازی: ایده‌پردازی، هدایت و نظارت علمی بر تمامی مراحل پژوهش، بازبینی انتقادی محتوا، نقد و بررسی و تأیید نهایی نسخه کامل شده مقاله را بر عهده داشته‌اند.

### منابع مالی

بخشی از منابع مالی مورد نیاز برای این مطالعه توسط دانشگاه تربیت مدرس و مابقی منابع مالی توسط نویسندگان این مقاله فراهم شده است.

### دسترس‌پذیری داده‌ها

هم‌رسانی داده‌ها در این مقاله مورد ندارد، زیرا هیچ داده‌ای در طول مطالعه فعلی تولید یا مورد تجزیه و تحلیل قرار نگرفته است.

### ملاحظات اخلاقی

این پژوهش توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه تربیت مدرس با کد اخلاق IR.MODARES.REC.1403.015 مورد تأیید قرار گرفته است.

### تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافع مالی، علمی یا شخصی در ارتباط با انجام این پژوهش، نگارش یا انتشار این مقاله وجود ندارد. همچنین، هیچ منبع تأمین مالی یا رابطه‌ای که ممکن است به‌طور بالقوه بر نتایج یا تفسیر داده‌ها تأثیر بگذارد، در این مطالعه دخیل نبوده است.

در واکنش‌های مثبت رنگ محیط به مایل به طیف زرد-نارنجی و در واکنش‌های منفی در طیف رنگی صورتی باقی ماند. همچنین، مطالعاتی مانند ژانگ و همکاران استفاده موفق از این رنگ برای شناسایی ویروس بیماری پا و دهان گزارش کرده‌اند، که نشان‌دهنده قابلیت این رنگ برای تشخیص محصول LAMP با چشم غیرمسلح است.<sup>۲۵</sup> گرچه رنگ‌هایی مانند سایبرگرین به عنوان روشی دیگر می‌توانند وجود DNA دو رشته‌ای را با تابش UV نشان دهند، اما برای تشخیص جهش‌های نقطه‌ای، اختلاف سیگنال بسیار کم و با چشم غیرمسلح قابل مشاهده نیست؛ به همین دلیل معمولاً نیازمند دستگاه Real-Time هستند. با این حال، هدف این مطالعه توسعه روشی ساده و کم‌هزینه بوده که بدون استفاده از دستگاه و تنها با مشاهده چشمی بتوان جهش مولکولی مشخص شد که تفاوت معناداری میان تمایل اتصال آنزیم Bst پلی‌مراز به توالی دارای جهش *PIK3CA: H1047R* و توالی فاقد این جهش وجود ندارد. بنابراین، این می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که این آنزیم به تنهایی نمی‌تواند تمایز دهنده خوبی میان این دو توالی باشد و طراحی پرایمرهای اختصاصی برای تمایز میان نمونه جهش یافته و بدون جهش اهمیت بسیار بالایی دارند. همچنین، تحلیل داده‌های RNA تأیید کرد که جهش *PIK3CA: H1047R* باعث تغییرات چشمگیر در بیان ژن‌های مسیر PI3K/AKT/mTOR می‌شود. برخی ژن‌ها مانند *PIK3R1*، *PIK3CA* و *EGFR* به دلیل مهار بازخوردی کاهش بیان دارند، در حالی که افزایش بیان *PIK3E3* و *AKT1* احتمالاً ناشی از سازوکارهای جبرانی است. همچنین، تغییرات متفاوت در ایزوفرم‌های *AKT2* و *AKT3* نشان‌دهنده تنظیم اختصاصی آنها در حضور این جهش است. مجموع این نتایج نشان می‌دهد جهش *H1047R* علاوه بر فعال‌سازی مسیر PI3K، الگوی بیان ژنی اجزای پایین‌دست را نیز بازآرایی می‌کند و اهمیت آن را به‌عنوان هدف درمانی بالقوه در سرطان پستان برجسته می‌سازد، هرچند نیازمند تأیید آزمایشگاهی بیشتر است.

### نتیجه‌گیری

در این تحقیق، با استانداردسازی دقیق پرایمرهای اختصاصی FIP و BIP و همچنین پرایمر حلقه، روش LAMP اختصاصی آلل برای شناسایی جهش *PIK3CA: H1047R* انجام شد. برای مشاهده نتایج، دو روش رنگ‌سنجی استفاده شد: رنگ قرمز خنثی که تمایز واضح ایجاد کرد و سایبرگرین که تفاوت آن کمتر قابل مشاهده بود. در مجموع، این مطالعه نشان داد که می‌توان روشی سریع،

## References

- Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2009;4(1):127-50. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311
- Glökler J, Lim TS, Ida J, Frohme M. Isothermal amplifications—a comprehensive review on current methods. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2021;56(6):543-86. doi: 10.1080/10409238.2021.1937927
- Suther C, Stoufer S, Zhou Y, Moore MD. Recent developments in isothermal amplification methods for the detection of foodborne viruses. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:841875. doi: 10.3389/fmicb.2022.841875
- Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications. *Clinical chemistry*. 2016;62(7):947-58. doi: 10.1373/clinchem.2015.245829
- Mohsen MG, Kool ET. The discovery of rolling circle amplification and rolling circle transcription. *Accounts of chemical research*. 2016;49(11):2540-50. doi: 10.1021/acs.accounts.6b00417
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*. 2000;28(12):e63-e. doi: 10.1093/nar/28.12.e63
- Shirato K. Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification. *Microbiology and immunology*. 2019;63(10):407-12. doi: 10.1111/1348-0421.12734
- Varona M, Anderson JL. Advances in mutation detection using loop-mediated isothermal amplification. *ACS omega*. 2021;6(5):3463-9. doi: 10.1021/acsomega.0c06093
- Kalofonou M, Malpartida-Cardenas K, Alexandrou G, Rodriguez-Manzano J, Yu L-S, Miscourides N, et al. A novel hotspot specific isothermal amplification method for detection of the common PIK3CA p. H1047R breast cancer mutation. *Scientific reports*. 2020;10(1):4553. doi: 10.1038/s41598-020-60852-3
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):209-49. doi: 10.3322/caac.21660
- Darbeheshti F, Makrigiorgos GM. Enzymatic methods for mutation detection in cancer samples and liquid biopsies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(2):923. doi: 10.3390/ijms24020923
- Guo S, Loibl S, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Denkert C. PIK3CA H1047R mutation associated with a lower pathological complete response rate in triple-negative breast cancer patients treated with anthracycline-taxane-based neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Res Treat*. 2020;52(3):689-96. doi: 10.4143/crt.2019.497
- Vasan N, Razavi P, Johnson JL, Shao H, Shah H, Antoine A, et al. Double PIK3CA mutations in cis increase oncogenicity and sensitivity to PI3Kα inhibitors. *Science*. 2019;366(6466):714-23. doi: 10.1126/science.aaw9032
- Jiang H, Xi H, Juhas M, Zhang Y. Biosensors for point mutation detection. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:797831. doi: 10.3389/fbioe.2021.797831
- Abdullahi UF, Naim R, Taib WRW, Saleh A, Muazu A, Aliyu S, Baig AA. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), an innovation in gene amplification: bridging the gap in molecular diagnostics; a review. *Indian Journal of Science and Technology*. 2015;8(17):1. doi: 10.17485/ijst/2015/v8i17/55767
- Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR? *Cells*. 2021;10(8):1931. doi: 10.3390/cells10081931
- Chaouch M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): an effective molecular point of care technique for the rapid diagnosis of coronavirus SARS CoV2. *Reviews in medical virology*. 2021;31(6):e2215. doi: 10.1002/rmv.2215
- Xie M, Chen T, Xin X, Cai Z, Dong C, Lei B. Multiplex detection of foodborne pathogens by real-time loop-mediated isothermal amplification on a digital microfluidic chip. *Food control*. 2022;136:108824. doi: 10.1016/j.foodcont.2022.108824
- Itonaga M, Matsuzaki I, Warigaya K, Tamura T, Shimizu Y, Fujimoto M, et al. Novel methodology for rapid detection of KRAS mutation using PNA-LNA mediated loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151654. doi: 10.1371/journal.pone.0151654
- Ding S, Chen R, Chen G, Li M, Wang J, Zou J, et al. One-step colorimetric genotyping of single nucleotide polymorphism using probe-enhanced loop-mediated isothermal amplification (PE-LAMP). *Theranostics*. 2019;9(13):3723. doi: 10.7150/thno.33980
- Alexandrou G, Moser N, Ali S, Coombes C, Shaw J, Georgiou P, et al. Distinguishing PIK3CA p. E545K Mutational Status from Pseudogene DNA with a Next-Generation ISFET Sensor Array. 2023 IEEE International Symposium on Circuits and Systems (ISCAS).2023. doi: 10.1109/ISCAS46773.2023.10181658

22. Petrusha O, Faizuloev E. Detection methods for results of a loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika*. 2020;65(1):67-72. doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-1-67-72
23. Li R, Cao W, Yuan J, Li L, Zhou Y, Wang F, et al. Development of a visual detection method of porcine deltacoronavirus using loop-mediated isothermal amplification. *Frontiers in Microbiology*. 2024;15:1465923. doi: 10.3389/fmicb.2024.1465923
24. Jomoui W, Srivorakun H, Chansai S, Fucharoen S. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) colorimetric phenol red assay for rapid identification of  $\alpha 0$ -thalassemia: application to population screening and prenatal diagnosis. *PLoS One*. 2022;17(4):e0267832. doi: 10.1371/journal.pone.0267832
25. Zhang J, Hou Q, Ma W, Chen D, Zhang W, Wubshet AK, et al. A naked-eye visual reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with sharp color changes for potential pen-side test of foot-and-mouth disease virus. *Viruses*. 2022;14(9):1982. doi: 10.3390/v14091982