

نانویوسنسور مبتنی بر هیبریداسیون DNA برای تشخیص توالی ژن *rfbE* در نمونه واقعی باکتری اشریشیاکولی O157:H7

محمد ابراهیم مینایی^{۱*}، مجتبی سعادت^۲، مصطفی نجفی^۳، حسین هنری^۲

^۱دانشجو، گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران؛ ^۲گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران؛

^۳گروه شیمی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۲

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۵

چکیده:

زمینه و هدف: علائم بالینی بیماران آلوده به باکتری اشریشیاکولی O157:H7 دامنه وسیعی دارد و تشخیص بیماری از روی علائم آن دشوار است. روش‌های تشخیص متعارف عوامل بیولوژیک دارای معایب بسیاری می‌باشند. هدف از انجام این تحقیق، تشخیص توالی ژن *rfbE* در نمونه واقعی باکتری اشریشیاکولی O157:H7 به وسیله نانویوسنسور الکتروشیمیایی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، برای آماده سازی نمونه قبل از سنجش با نانویوسنسور، ژنوم باکتری اشریشیاکولی O157 به روش CTAB-NaCl و با استفاده از کیت تخلیص DynaBio™ DNA Extraction Mini Kit استخراج گردید. هضم آنزیمی DNA ژنومی باکتری اشریشیاکولی O157 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۴ دقیقه و دناتوراسیون حرارتی صورت گرفت. به منظور اطمینان، ژن *rfbE* باکتری اشریشیاکولی O157:H7 توسط واکنش PCR تشخیص داده شد. توالی ژن *rfbE* در نمونه واقعی باکتری اشریشیاکولی O157:H7 به وسیله نانویوسنسور مبتنی بر هیبریداسیون DNA مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: نتایج به دست آمده از مقاومت انتقال بار بیانگر بر هم کنش مناسب بین ssDNA تثبیت شده روی الکتروود با DNA ژنوم هضم شده باکتری اشریشیاکولی O157:H7 و محصول PCR بوده و نشان دهنده تشخیص موفقیت آمیز قطعه ای از ژن *rfbE* باکتری اشریشیاکولی O157:H7 می‌باشد. این نانویوسنسور قادر به تشخیص ژنوم هضم شده باکتری تا رقت 10^{-7} بود که این رقت متناظر با غلظت 10^2 باکتری اشریشیاکولی در میلی لیتر است.

نتیجه گیری: در این تحقیق، نانویوسنسور مبتنی بر هیبریداسیون DNA برای تشخیص توالی ژن *rfbE* در نمونه واقعی باکتری اشریشیاکولی O157:H7 با دقت و حساسیت مطلوب به کارگیری شد که می‌تواند زمینه ای برای ساخت ابزار تشخیص DNA باشد.

واژه های کلیدی: باکتری اشریشیاکولی O157:H7، نانویوسنسور، هیبریداسیون.

مقدمه:

نیمی از افراد در طی دوره اسهال بدون خون، با استفراغ و حالت تهوع همراه است. پس از ۱ تا ۲ روز اسهال خونی می‌شود و دردهای شکمی افزایش می‌یابد (۲،۱). اهمیت جدایه های اشریشیاکولی انتروهموراژیک به دلیل ایجاد سندروم اورمی همولیتیک می‌باشد که جدی ترین خطر عفونت با جدایه های EHEC محسوب می‌گردد (۳). سندروم اورمی همولیتیک با سندروم آمی همولیتیک

دامنه علائم بالینی آلودگی توسط جدایه های اشریشیاکولی انتروهموراژیک (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*) وسیع است و اغلب تشخیص را دشوار می‌سازد. این باکتری می‌تواند ایجاد آلودگی بدون علامت، با علائم اسهال، اسهال خونی، کولیت هموراژیک (HC)، سندرم اورمی همولیتیک (Hemolytic Uremic Syndrome)، ترمبوسیتوپنی پورپورا (TTP) و مرگ نماید. بیماری در

*نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه جامع امام حسین (ع)- گروه زیست شناسی- تلفن: ۰۹۳۵۲۲۱۹۵۰۳، E-mail: mminaii@ihu.ac.ir

در نمونه گردد. به طور کلی، برای هیچ یک از پاتوتایپ های اشریشیاکولی محیط کشت اختصاصی وجود ندارد و باید ترکیبی از روش های کلاسیک، سرولوژی و مولکولی را برای شناسایی آن ها استفاده نمود؛ لذا جهت تشخیص اینگونه جدایه ها اطلاعات موجود بیمار نظیر علائم کلینیکی و بالینی بیمار به عنوان عوامل کمکی در تشخیص استفاده می شوند.

در این کار تحقیقاتی، با استفاده از نانوبیوسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر هیبریداسیون DNA، توالی ژن *rfbE* در نمونه واقعی باکتری اشریشیاکولی O157:H7 مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن *rfbE* حدود ۳۶۴ اسید آمینه را رمزدهی می کند که پروتئین پروزآمین سینتاز (Perosamine Synthetase) تولید می شود. این آنزیم نقش اساسی در تشکیل آنتی ژن سطحی O157 دارد و علت بیماری زایی باکتری اشریشیاکولی O157:H7 می باشد.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی، با انجام ۴ مرحله شامل الف) استخراج کل DNA ژنوم، ب) هضم DNA توسط آنزیم محدود الاثر (ج) دناتوراسیون حرارتی DNA و د) نانوبیوسنسور مبتنی بر هیبریداسیون DNA، توالی ژن *rfbE* در نمونه واقعی باکتری اشریشیاکولی O157:H7 تشخیص داده شد.

ابتدا محلول ذخیره باکتری اشریشیاکولی O157:H7 (جدایه باکتری از دانشگاه شاهد تهیه گردید) آماده شد. برای این منظور، یک کلونی تک باکتری اشریشیاکولی O157:H7 از محیط کشت نوترینت آگار به محیط کشت LB براث تلقیح و ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد؛ سپس با دور ۵۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه، سانتریفیوژ گردید و سلول های جمع آوری شده دوباره در یک محلول سالین (۰/۹٪ وزنی/ حجمی NaCl) به حالت تعلیق درآمد و در ۴ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. تعداد سلول های هر میلی لیتر از کشت به وسیله میکروسکوپ با استفاده از یک لام نئوبار قبل از استفاده مشخص شد.

میکروآنژیوپاتیک، ترمبوسیتوپنی و نقص کلیوی حاد مشخص می گردد. بیماران در هر سنی می توانند به HUC مبتلا گردند؛ ولی اغلب موارد آن در بچه های کمتر از ۱۰ سال رخ می دهد. از میان جدایه های انتروهوموراژیک، سروتیپ O157:H7 به عنوان شایع ترین عامل ایجاد کننده سندروم اورمی همولیتیک محسوب می شود (۴). به نظر می رسد که بعد از اتصال جدایه های مربوط به اپیتلیال روده و ایجاد آسیب های تخریبی شدید (ضایعات اتصال و محو شدن یا Attaching/ Effacing) در سطح سلول های پوششی روده ی کوچک، شیگا توکسین تولید شده توسط مکانیسمی ناشناخته از موکوس روده وارد جریان خون شده و به بافت های ویژه به خصوص کلیه متصل می شود و سندروم اورمی همولیتیک را به وجود می آورد. در مطالعات انجام شده پیشنهاد می کنند که ممکن است نوتروفیل ها عامل انتقال شیگا توکسین به خون و گلوامرول های کلیه باشند که در اثر این حادثه تورم سلول های اندوتلیال کورتکس و نکروز آتروفی در آن ناحیه دیده می شود. به نظر می رسد رسپتور Gb₃ روی کلیه به عنوان رسپتور برای شیگا توکسین عمل می کند (۵). باکتری EHEC را همچنین اشریشیاکولی وروتوکسیژنیک می نامند که بیماری اسهال خونی را به وجود می آورد. این باکتری دارای ۵۴۹۸۴۵۰ باز، ۸۳ ژن و ۹۶ لوکوس پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism= SNP) است (۶).

فناوری های تشخیص سریع، دقیق و حساس برای باکتری های بیماری زا در تشخیص بالینی، کنترل بیماری، پایش محیط زیست و ایمنی مواد غذایی اهمیت بسیار زیادی دارند. روش های شناسایی متعارف عوامل بیولوژیک شامل روش بیوشیمیایی، استفاده از تکنیک های سرولوژی و نیز روش های مولکولی از جمله واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) می باشد؛ اما این روش ها دشوار، پیچیده و وقت گیر هستند و برخی از آن ها ویژگی لازم برای ردیابی هدف را ندارند (۷). نتایج حاصل از روش های متعارف در نهایت می تواند منجر به تشخیص سروتیپ خاص موجود

جدول شماره ۱: واکنش هضم آنزیمی ژنوم استخراج

شده باکتری اشریشیاکولی O157:H7

مواد	حجم (میکرولیتر)
آب مقطر	۱۵
DNA ژنومی استخراج شده	۲
بافر هضم سریع ۱۰ X	۱
MboII	۱
TruII	۱
حجم کل	۲۰

به منظور تولید تک رشته DNA برای تجزیه و تحلیل نانوحسگر DNA، مخلوطی شامل ۵۰ میکرولیتر از ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر نمونه DNA برش خورده، ۲۰ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد؛ سپس بلافاصله دمای نمونه در مجاورت با آب یخ کاهش یافت. پس از دناتوراسیون حرارتی و ایجاد تک رشته های DNA برش خورده، هیبریداسیون روی سطح الکتروود اصلاح شده با نانوذرات طلا که روی آن ssDNA تثبیت شده بود، بر اساس طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی بررسی شد (۹).

برای تثبیت توالی DNA روی الکتروود طلای اصلاح شده با نانوذرات، اولیگومر ssDNA تیوله در موقعیت ۵' (۱ میکرومولار) درون بافر، تثبیت و به مدت ۲ ساعت غوطه ور شد. بافر تثبیت شامل Tris-HCl ۱۰ میلی مولار، EDTA ۱ میلی مولار و KH_2PO_4 ۱ میلی مولار، pH برابر ۷ می باشد (۸). اولیگونوکلئوتید تک رشته ۲۳ مری تیوله شده در انتهای ۵' به همراه فضا ساز C_6 شامل SH-(CH₂)₆.CGGTTGCTCTTCATTTAGCTTTG (تهیه شده از شرکت Bioneer Corporation کشور کره

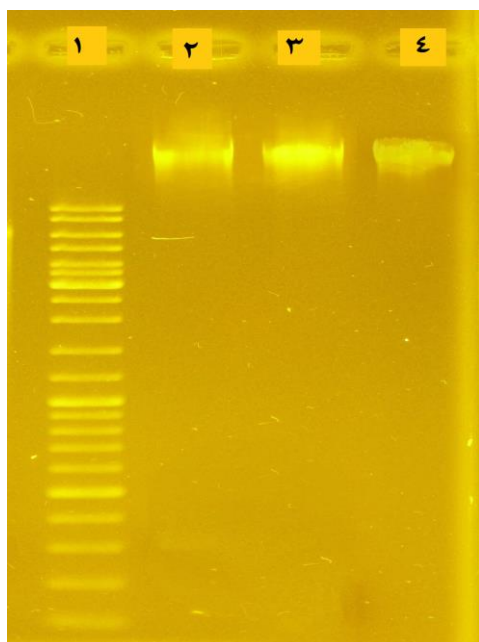
سپس آماده سازی نمونه و استخراج DNA باکتری اشریشیاکولی O157:H7 انجام شد. با توجه به این که غلظت اولیه مورد استفاده برای استخراج DNA ژنومی 10^8 سلول در میلی لیتر بود، عصاره به دست آمده از این غلظت DNA ژنومی مطابق با غلظت سلول اولیه در نظر گرفته شد؛ همچنین در نظر گرفته شد که ۱۰۰٪ DNA ژنومی به دست آمده با استفاده از روش CTAB-NaCl و با استفاده از کیت استخراج DNA چند منظوره DynaBio™ DNA Extraction Mini Kit تحت شرایط مطلوب استخراج شده است. علاوه بر این، رقت های زیر پس از طی مرحله هضم شدن DNA و دناتوراسیون، با ۱۰ بار رقیق شدن DNA ژنومی به دست آمد. قبل از تجزیه و تحلیل نانوحسگر زیستی، DNA ژنومی تیمار شده به رقت های 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} ، 10^{-6} ، 10^{-7} و 10^{-8} رقیق شد. بر اساس فرض فوق، این رقت ها به ترتیب، متناظر با غلظت 10^5 ، 10^4 ، 10^3 ، 10^2 ، 10^1 و ۱ سلول اشریشیاکولی در میلی لیتر، در نظر گرفته شد. فرض فوق به دلیل مقایسه کردن بین نانوحسگر زیستی و تکنیک شمارش باکتری ایجاد است. در نهایت، قسمتی از هر رقت با نانوحسگر زیستی ۳ بار اندازه گیری شد و اختلاف مقاومت انتقال بار (ΔR_{ct}) برای هر رقت مشخص شد.

پس از آنالیز بیوانفورماتیکی، با استفاده از نرم افزار ۲ Neb cutter آنزیم محدود الاثر برای هضم ژن *rfbE* انتخاب شد که هر دو از نوع هضم سریع تهیه شدند. یکی آنزیم MboII که ۲ جایگاه برش روی ژن *rfbE* دارد و آن را به اولیگونوکلئوتید ۲۹۶ جفت بازی برش می زند و دومی آنزیم TruII (*MseI*) که این قطعه را به اولیگونوکلئوتید ۹۰ جفت بازی برش می زند. با توجه به اینکه این ۲ آنزیم بافر مشترک دارند، از هر ۲ آنزیم به صورت همزمان استفاده گردید. هضم آنزیمی DNA ژنومی باکتری اشریشیاکولی O157 طبق جدول شماره ۱ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۴ دقیقه صورت گرفت. پس از انجام هضم آنزیمی ژنوم باکتری، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ انجام شد.

به صورت زیر است که نشان دهنده خلوص قابل قبول DNA ژنومی استخراج شده می باشد (تصویر شماره ۱).

جدول شماره ۲: نتایج استخراج DNA ژنومی باکتری اشریشیاکولی O157:H7

روش استخراج	CTAB/NaCl	با کیت
Concentration	۳۴۵ ng/μl	۳۵۶ ng/μl
A _{۲۶۰/۲۸۰}	۱/۹۳۵	۱/۹۸۶



تصویر شماره ۱: الکتروفورز استخراج DNA ژنومی

باکتری اشریشیاکولی O157:H7 روی ژل آگاروز ۲٪

ستون ۱) نشانگر مولکولی DNA (ستون ۲) ژنوم باکتری استخراج شده با روش CTAB-NaCl (ستون ۳ و ۴) ژنوم باکتری استخراج شده با روش استفاده از کیت تخلیص.

هضم آنزیمی DNA ژنومی باکتری اشریشیاکولی O157 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۴ دقیقه صورت گرفت. پس از انجام هضم آنزیمی ژنوم

جنوبی) یک تک لایه ی خودتجمعی را روی سطح الکتروود تشکیل می دهد؛ سپس الکتروود با آب دوبار تقطیر شستشو داده شد. برای هیبریداسیون با DNA نمونه باکتری، الکتروود طلای آماده شده در بافر هیبریداسیون به مدت ۱۵ دقیقه غوطه ور شد. پس از آن، الکتروود با بافر فسفات شستشو داده شد. بافر هیبریداسیون شامل Tris-HCl ۱۰ میلی مولار، EDTA ۱ میلی مولار و NaCl ۱ میلی مولار، pH برابر ۷ به همراه ۱ میکرومولار DNA نمونه باکتری می باشد.

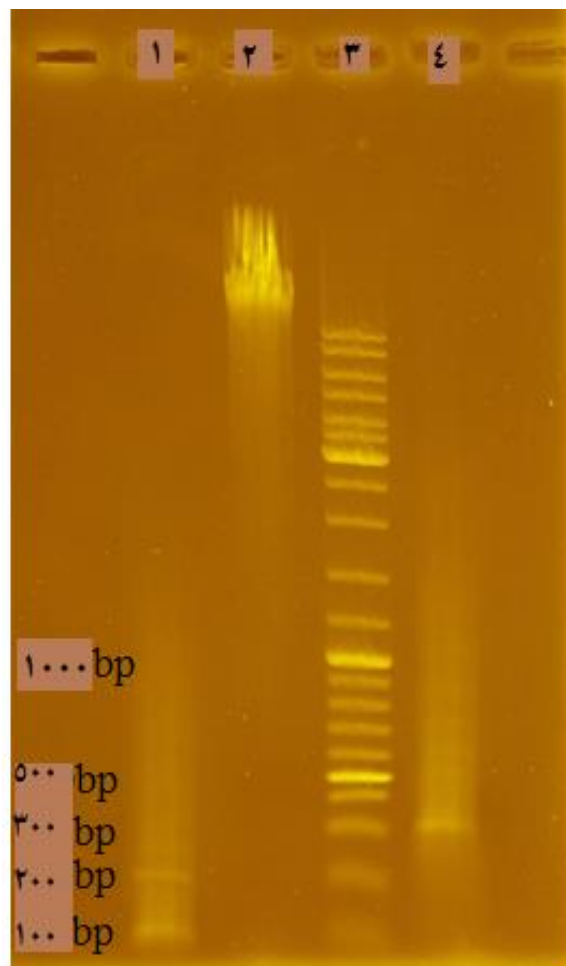
طیف امپدانس الکتروشیمیایی در حضور زوج ردوکس $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ در غلظت های ۲ میلی مولار و با استفاده از ۳ الکتروود متشکل از ۱ الکتروود مرجع AgCl/Ag (در ۳ مولار)، ۱ الکتروود کمکی سیم پلاتین و الکتروود اصلاح شده طلا به عنوان الکتروود کار، ثبت شد. پتانسیل DC ثابت (۲۲۰ میلی ولت در مقابل AgCl/Ag) استفاده شده است. فرکانس مدولاسیون (تعديل) AC از ۱ کیلوهرتز تا ۱۰ مگاهرتز با ۶۰ نقطه اندازه گیری شده انتخاب شد. بررسی های الکتروشیمیایی با استفاده از دستگاه پتانسیواستا/ گالوانواستا ۲ μAutolab III FAR Eco Chemie آنالیزکننده پاسخ فرکانسی ساخت شرکت هلند انجام گرفت (۹).

یافته ها:

باکتری اشریشیاکولی O157 روی محیط کشت LB آگار رشد داده شد و کلونی تک آن در محیط کشت LB مایع تلقیح شد و DNA ژنومی آن به روش CTAB-NaCl و با استفاده از کیت تخلیص DynaBio™ DNA Extraction Mini Kit، استخراج و بر روی ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز گردید (جدول شماره ۲). نسبت جذب OD_{260}/OD_{280} و غلظت ژنوم تخلیص شده به روش اسپکتروسکوپی با دستگاه پیکودراپ (PICO 200 Picodrop Spectrophotometer)

باکتری، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ انجام شد (تصویر شماره ۲).

توسط دستگاه مستند ساز ژل مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت (۹). تصویر شماره ۳ الگوی الکتروفورز قطعات تکثیر شده ژن *rfbE* به اندازه های ۹۰ و ۲۹۶ جفت باز را نشان می دهد.

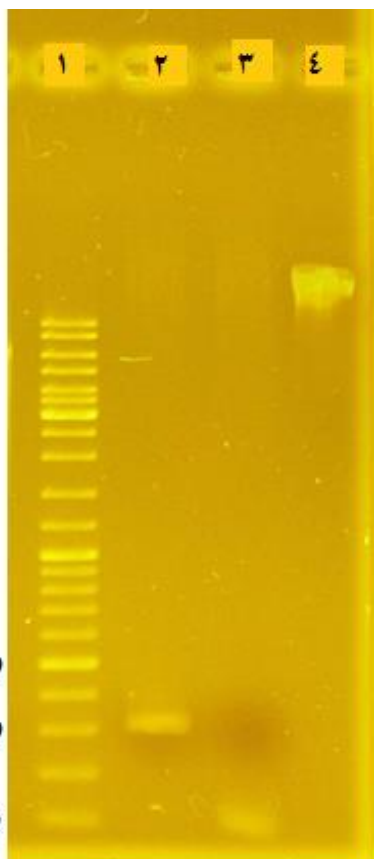


تصویر شماره ۲: هضم ژنوم باکتری *اشرشیاکولی*

با آنزیم محدود الاثر روی ژل آگاروز *O157:H7*/۲

ستون ۱) هضم آنزیمی ژنوم با آنزیم *MboII* و *MseI* (ستون ۲) ژنوم استخراج شده؛ ستون ۳) نشانگر مولکولی؛ ستون ۴) هضم آنزیمی ژنوم با آنزیم *MboII*

به منظور بررسی جدایه باکتری *اشرشیاکولی* *O157:H7* از روش تشخیص مولکولی PCR برای تأیید ژن *rfbE* استفاده شد. محصول PCR به دست آمده، در ارزیابی با نانویوسنسور می تواند عملکرد سیستم را تأیید نماید. برای ارزیابی واکنش PCR با آنزیم pfu DNA پلیماز، محصول واکنش PCR در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برمایند

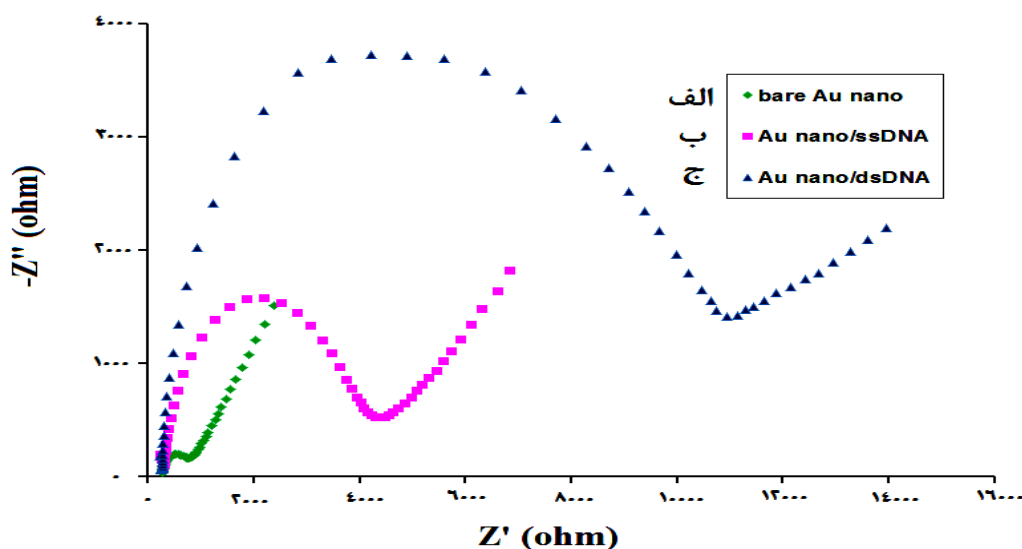


تصویر شماره ۳: محصول PCR با آنزیم pfu روی

ژل آگاروز ۲٪

ستون ۱) نشانگر مولکولی؛ ستون ۲) باند حاصل از PCR و مشاهده قطعه ۲۹۶bp؛ ستون ۳) باند حاصل از PCR و مشاهده قطعه ۹۰bp؛ ردیف ۴) ژنوم استخراج شده.

طیف های امپدانس الکتروشیمیایی یک الکتروود اصلاح شده با نانوذرات طلا که روی آن ssDNA تثبیت شده، بعد از دناتوراسیون حرارتی ژنوم هضم شده باکتری *اشرشیاکولی* *O157:H7* و هیبریداسیون آن با ssDNA تثبیت شده روی سطح الکتروود و همچنین پس از دناتوراسیون حرارتی محصول PCR و هیبریداسیون آن، به ترتیب در تصاویر شماره ۴ و ۵ نشان داده شده اند.

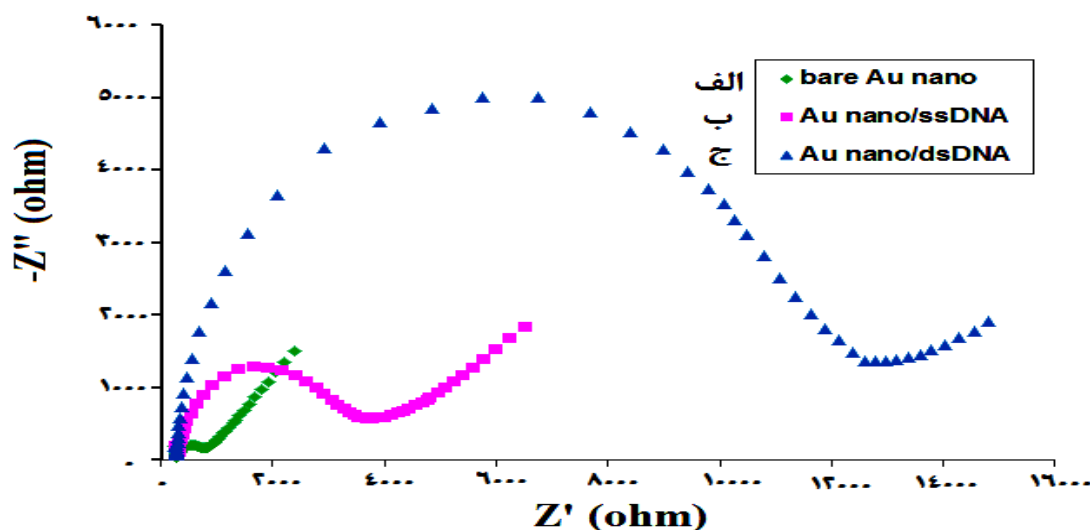


تصویر شماره ۴: طیف امپدانس الکتروشیمیایی نانوحسگر زیستی با ژنوم هضم شده باکتری اشریشیاکولی

پس از دناتوراسیون حرارتی O157:H7

الف) الکتروود اصلاح شده با نانوذرات (♦) ب) الکتروود اصلاح شده با نانوذرات طلا که روی آن ssDNA تثبیت شده است (■)؛

ج) هیبریداسیون نانوحسگر زیستی با ژنوم هضم شده باکتری اشریشیاکولی O157:H7 (▲).



تصویر شماره ۵: طیف امپدانس الکتروشیمیایی نانوحسگر زیستی با محصول PCR پس از دناتوراسیون حرارتی

الف) الکتروود اصلاح شده با نانوذرات (♦) ب) الکتروود اصلاح شده با نانوذرات طلا که روی آن ssDNA تثبیت شده است (■)؛

ج) هیبریداسیون نانوحسگر زیستی با محصول PCR (▲).

O157:H7 و با محصول PCR، نسبت به این نمودار در الکتروود اصلاح شده با نانوذرات که روی آن ssDNA

مقاومت انتقال بار در نمودار نایکوئیست بعد از هیبریداسیون با ژنوم هضم شده باکتری اشریشیاکولی

پاسخ دستگاهی (y) به طور معنی دار متفاوت از پاسخ زمینه یا شاهد به وجود می آورد. حد تشخیص تئوری در روش های دستگاهی تجزیه، به عنوان غلظتی از نمونه آزمایشی که پاسخی برابر با پاسخ نمونه شاهد، به اضافه ۳ برابر انحراف استانداردهای وابسته به آن به دست می آید، در نظر گرفته می شود (۱۰).

$$\text{حد تشخیص محاسباتی} = y_B + 3S_B$$

در این رابطه y_B ، میانگین پاسخ دستگاهی برای نمونه های شاهد و S_B ، انحراف معیار اختلاف مقاومت بار نمونه های شاهد می باشد. پاسخ نانوحسگر زیستی برای نمونه شاهد ۵ بار تکرار شد و نتایج آن در جدول شماره ۳ ارائه شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، طیف های امپدانس الکتروشیمیایی که اختلاف مقاومت انتقال بار آن بیشتر از ۵۱۳۰ اهم باشد، به عنوان پاسخ مثبت در نظر گرفته می شوند.

همان طور که در تصویر شماره ۶ نشان داده شده است، این نانوحسگر زیستی قادر به تشخیص ژنوم هضم شده باکتری تا رقت 10^{-6} بود (جدول شماره ۳). با توجه به فرض در نظر گرفته شده در فصل روش ها، این رقت متناظر با غلظت 10^2 باکتری اشریشیاکولی در میلی لیتر است.

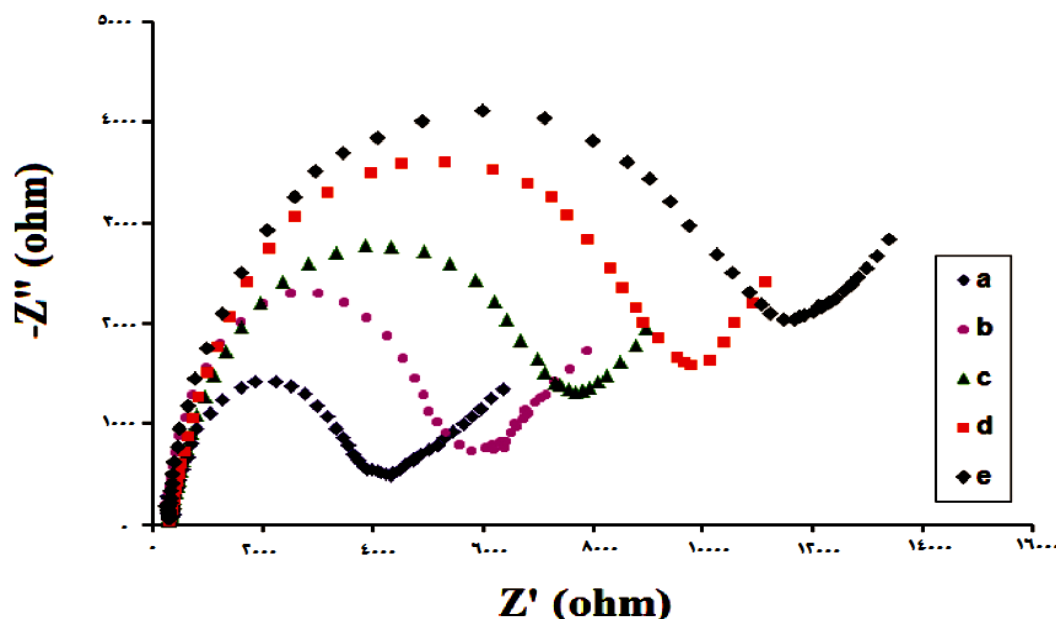
تثبیت شده قبل از هیبریداسیون افزایش یافته است. این نتایج بیانگر بر هم کنش مناسب بین ssDNA تثبیت شده و DNA ژنوم هضم شده باکتری اشریشیاکولی O157:H7 و همچنین محصول PCR بوده و نشان دهنده تشخیص موفقیت آمیز قطعه ای از ژن *rfbE* باکتری *Escherichia coli* O157:H7 می باشد.

حد تشخیص نمونه واقعی باکتری اشریشیاکولی O157:H7 توسط نانویوسنسور به روش زیر بررسی شد. محلول ذخیره باکتری اشریشیاکولی O157:H7 در محلول سالین تهیه و با روش شمارش با لام نئوبار به غلظت 10^8 باکتری در میلی لیتر نگهداری شد. با استفاده از روش CTAB-NaCl و کیت استخراج DNA چند منظوره DynaBio™ DNA Extraction Mini Kit، تحت شرایط مطلوب DNA ژنومی 10^8 باکتری اشریشیاکولی O157:H7 در میلی لیتر استخراج شد. پس از طی مرحله هضم شدن DNA، رقت های 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} ، 10^{-6} ، 10^{-7} و 10^{-8} به دست آمد. پس از دناتوراسیون حرارتی، طیف امپدانس الکتروشیمیایی هر رقت با نانوحسگر زیستی ۳ بار اندازه گیری شد و اختلاف مقاومت انتقال بار (ΔR_{ct}) برای هر رقت مشخص شد.

طبق تعریف، حد تشخیص تئوری یک ترکیب آزمایشی به عنوان پایین ترین غلظتی تعیین می شود که

جدول شماره ۳: پاسخ الکتروود اصلاح شده با نانوذرات طلا که روی آن ssDNA تثبیت شده (نمونه شاهد)

Rct	پاسخ الکتروود اصلاح شده با نانوذرات طلا و تثبیت ssDNA
۴۳۹۰	پاسخ نانوحسگر زیستی برای نمونه شاهد تکرار ۱
۴۲۸۰	پاسخ نانوحسگر زیستی برای نمونه شاهد تکرار ۲
۴۴۸۰	پاسخ نانوحسگر زیستی برای نمونه شاهد تکرار ۳
۴۷۴۹	پاسخ نانوحسگر زیستی برای نمونه شاهد تکرار ۴
۴۸۵۰	پاسخ نانوحسگر زیستی برای نمونه شاهد تکرار ۵
۴۴۸۰	y_B ، میانگین پاسخ دستگاهی برای نمونه های شاهد
۲۱۵/۸۷۰۷	S_B ، انحراف معیار اختلاف مقاومت بار نمونه های شاهد
۵۱۲۷/۶۱۲	$y_B + 3S_B = \text{حد تشخیص}$



تصویر شماره ۶: طیف امپدانس الکتروشیمیایی نانوحسگر زیستی با رقت های مختلف ژنوم هضم شده باکتری

اشریشیاکولی O157:H7 پس از دناتوراسیون حرارتی

(a) الکتروود اصلاح شده با نانوذرات که روی آن پروب DNA تثبیت شده است؛ (b) هیبریداسیون در رقت ۱۰-۳ ژنوم

هضم شده؛ (c) هیبریداسیون در رقت ۱۰-۴ ژنوم هضم شده؛ (d) هیبریداسیون در رقت ۱۰-۵ ژنوم هضم شده؛

(e) هیبریداسیون در رقت ۱۰-۶ ژنوم هضم شده.

بحث:

(Electrochemical Impedance Spectroscopy= EIS)

می باشد (۱۴،۱۳).

قبل از به کارگیری نانوبیوسنسور برای تشخیص هیبریداسیون DNA/DNA، مرحله آماده سازی نمونه ژنوم باکتری به صورت ایجاد قطعه DNA تک رشته انجام می شود. در حال حاضر، پروتکل های مختلفی برای استخراج DNA باکتری وجود دارد که مهم ترین آن ها استفاده از کیت های تجاری و یا روش های دستی مانند روش CTAB-NaCl می باشد. به طور کلی، روش های استخراج DNA به ۳ مرحله کلیدی تقسیم می شوند: (۱) تخریب سلولی، (۲) استخراج DNA و (۳) تخلیص DNA. اسید نوکلئیک به وسیله تخریب دیواره سلول و سپس از طریق اختلاف خصوصیات بین DNA با پروتئین، لیپید، پلی ساکارید و RNA استخراج می شود. در فرایند تخریب، دیواره سلولی معمولاً از طریق مکانیکی (سایش،

حسگرهای زیستی مبتنی بر جفت شدن یک عامل مشخص بیولوژیکی به همراه یک مبدل فیزیکی برای تبدیل اطلاعات بیولوژیکی به یک سیگنال قابل تشخیص، متناسب با غلظت آنالیت ها، می باشند (۱۱). سیگنال ممکن است به علت تغییرات به وجود آمده نظیر تغییر در غلظت پروتون، انتشار و یا جذب گازها (به عنوان مثال، آمونیاک یا اکسیژن)، جذب یا انعکاس تابش نور، انتشار گرما و تغییرات جرم تولید شود (۱۲). هیبریداسیون DNA با استفاده از تکنیک ها و دستگاه های مختلف در گزارشات بررسی شده است. با این حال، آزمایشات ژنتیکی نیازمند توسعه آسان، سریع و دستگاه های ارزان برای گزارش رویداد هیبریداسیون می باشند. یک تکنیک مناسب الکتروشیمیایی که کاربرد گسترده ای در تشخیص DNA دارد، روش طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی

دارد. بر اساس مطالعات انجام شده، آخرین مانع بزرگ برای تحقق بخشیدن به یک محصول واقعی و عملی تشخیص عوامل بیولوژیک، یکپارچه سازی کامل فرایند آماده سازی نمونه به طور خودکار به ویژه برای سیستم هایی که بر اساس تست اسید نوکلئیک کار می کنند، می باشد. با ادغام مراحل آماده سازی نمونه به صورت خودکار، مصرف واکنشگرها، زمان سنجش و خطر آلودگی کاهش می یابد (۲۰).

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه مشخص می شود که نانوبیوسنسور مبتنی بر هیبریداسیون DNA برای تشخیص توالی ژن *rfbE* در نمونه واقعی باکتری *اشریشیا کولی O157:H7* یک حسگر مناسب می باشد. با این وجود، حسگرهای زیستی DNA برای تشخیص عوامل بیولوژیک هنوز دارای محدودیت هایی هستند و مطالعات وسیعی در این زمینه در حال انجام است.

نتیجه گیری:

در این تحقیق، بخشی از ژن *rfbE* در نمونه واقعی باکتری *اشریشیا کولی O157:H7* پس از استخراج و هضم آنزیمی ژنوم و دناتوراسیون حرارتی DNA توسط یک نانوبیوسنسور مبتنی بر هیبریداسیون DNA تشخیص داده شد. این نانوبیوسنسور دارای دقت و حساسیت مناسب بود و حسگرهای DNA بر اساس تشخیص EIS، می توانند زمینه ای برای ساخت ابزار تشخیص عوامل بیولوژیک باشند.

تشکر و قدردانی:

از تمامی استادان، پژوهشگران و همکاران محترم در دانشگاه جامع امام حسین (ع) که در به نتیجه رسیدن این تحقیق تلاش فراوان کردند، تشکر و سپاسگزاری می شود.

حرارت، فراصوت، مایکروویو و میدان الکتریکی) و یا مواد شوینده (SDS، Triton-100X و آنزیم ها) از بین می رود و مواد ژنتیکی داخل سلول آزاد می شوند؛ سپس DNA در فاز مایع جزء بندی می شود (۲ فاز فل- کلروفرم/ آب بیشتر استفاده می شود، زیرا فل- کلروفرم می تواند پروتئین ها را حل و دناتوره نماید؛ در حالی که DNA را حل نمی کند) و یا روش معادل آن، با جذب بر روی یک سطح سیلیکا ژل (و یا دانه های مغناطیسی) با استفاده از روش میل پیوندی بافر بالای نمک انجام می شود. در نهایت، DNA در محلول آبی (یا شستشوی ابتدایی تحت بافر کم نمک اگر آن ها در سطح فاز جامد جذب شده باشند) توسط الکل رسوب می کند (۲/۵ حجم اتانول یا ۱ حجم ایزوپروپانول) (۱۶،۱۵). از آنجا که برای تشخیص ژنومی و مولکولی نیاز به استخراج DNA می باشد، مطالعات زیادی جهت کم کردن مراحل و کاهش زمان استخراج DNA و ادغام مرحله آماده سازی نمونه ژنوم باکتری با مرحله تشخیص انجام شده است (۱۸،۱۷).

این نانوحسگر زیستی قادر به تشخیص ژنوم هضم شده باکتری تا رقت 10^{-6} بود و این رقت متناظر با غلظت 10^2 باکتری *اشریشیا کولی* در میلی لیتر است. در مطالعه مشابهی که توسط Mahadhy و همکاران در زمینه حسگر زیستی فوق حساس برای تشخیص DNA انتروباکتریاسه انجام شد. گزارش شد که حسگر خازنی ساخته شده قادر به تشخیص 10^2 باکتری *اشریشیا کولی* در میلی لیتر است (۱۹).

از معایب نانوحسگر زیستی که بر اساس هیبریداسیون DNA کار می کنند، این است که در این روش نیاز به مراحل آماده سازی شامل استخراج DNA از میکروارگانیزم، هضم آنزیمی و ایجاد ssDNA تک رشته دارد. این آماده سازی نمونه زمان بر بوده و می تواند به نتایج کاذب منجر شود؛ بنابراین پردازش نمونه DNA قبل از استفاده در این روش اهمیت زیادی

منابع:

1. Bidet P, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Brahimi N, Courroux C, Grimont P, et al. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. J Med Microbiol. 2005; 54(1): 71-5.
2. Vanaja SK, Jandhyala DM, Mallick EM, Leong JM, Balasubramanian S. Enterohemorrhagic and other Shigatoxin-producing *Escherichia coli*. 2013: 121-8.
3. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet. 1983; 1(8325): 619-20.
4. Mayer CL, Leibowitz CS, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ. Shiga toxins and the pathophysiology of hemolytic uremic syndrome in humans and animals. Toxins. 2012; 4(11): 1261-87.
5. Malyukova I, Murray KF, Zhu C, Boedeker E, Kane A, Patterson K, et al. Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009; 296(1): G78-92.
6. Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, Qi W, Lacher DW, Ouellette LM, et al. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(12): 4868-73.
7. Sanvicens N, Pastells C, Pascual N, Marco M-P. Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria. Trac-Trend Anal Chem. 2009; 28(11): 1243-52.
8. Steel AB, Herne TM, Tarlov MJ. Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. Anal Chem. 1998; 70(22): 4670-7.
9. Minaei ME, Saadati M, Najafi M, Honari H. A modified electrochemical electrode for development of nanobiosensor for the detection of *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157:H7. J Sabzevar Univ Med Sci, 2015; 22(5): 797-804.
10. Miller JN, Miller JC. Statistics and chemometrics for analytical chemistry: Pearson Education; 2005.
11. Dolatabadi JEN, Mashinchian O, Ayoubi B, Jamali AA, Mobed A, Losic D, et al. Optical and electrochemical DNA nanobiosensors. Trac-Trend Anal Chem. 2011; 30(3): 459-72.
12. Zhai J, Cui H, Yang R. DNA based biosensors. Biotechnol Adv. 1997; 15(1): 43-58.
13. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science. 1991; 251(4995): 767-73.
14. Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. Nature. 2000; 405(6788): 827-36.
15. Cheng H-R, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. Biotechnol Lett. 2006; 28(1): 55-9.
16. Aldous WK, Pounder JI, Cloud JL, Woods GL. Comparison of six methods of extracting Mycobacterium tuberculosis DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. J Clin Microbiol. 2005; 43(5): 2471-3.
17. Dineva MA, MahiLum-Tapay L, Lee H. Sample preparation: a challenge in the development of point-of-care nucleic acid-based assays for resource-limited settings. Analyst. 2007; 132(12): 1193-9.
18. Kim J, Johnson M, Hill P, Gale BK. Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification. Integr Biol. 2009; 1(10): 574-86.
19. Mahadhy A, Mamo G, Stahl-Wernersson E, Mattiasson B, Hedström M. PCR-Free Ultrasensitive Capacitive Biosensor for Selective Detection and Quantification of Enterobacteriaceae DNA. J Anal Bioanal Tech. 2014; 5(5): 210.
20. Wu J, Kodzius R, Cao W, Wen W. Extraction, amplification and detection of DNA in microfluidic chip-based assays. Microchim Acta. 2014; 181(13-14): 1611-31.

The nanobiosensor based on DNA hybridization for the detection of *rfbE* gene in real samples of *Escherichia coli* O157:H7

Minaei ME^{1*}, Saadati M², Najafi M³, Honari H²

¹Student, Biology Dept., Imam Hosein University, Tehran, I.R. Iran; ²Biology Dept., Imam Hosein University, Tehran, I.R. Iran; ³Chemistry Dept., Imam Hosein University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 26/Dec/2015 Accepted: 1/Feb/2016

Background and aims: Clinical symptoms of patients infected with *Escherichia coli* O157:H7 is a wide range and diagnosis of the symptoms is difficult. to detect conventional methods of biological agents have many disadvantages. The aim of the current study was detection of *rfbE* gene in real samples of *Escherichia coli* O157 by by DNA hybridization-based nanobiosensor.

Methods: In this experimental study, for sample preparation prior to the measurement by the biosensor, the genome of the *Escherichia coli* O157 was extracted by the CTAB-NaCl method and DynaBio™ DNA Extraction Mini Kit. Enzymatic digestion of genomic DNA of *Escherichia coli* O157 was perform at 37°C for 4 minutes and thermal denaturation. To be sure, *rfbE* gene *Escherichia coli* O157:H7 was detected by PCR. The *rfbE* gene sequence in real samples of *Escherichia coli* O157:H7 was measured by DNA hybridization-based nanobiosensor.

Results: The results of the charge transfer resistance indicate proper interaction between ssDNA immobilized on the electrode with the DNA digested genomic of *Escherichia coli* O157:H7 and PCR product that is represents of successful detection of the *rfbE* gene *Escherichia coli* O157:H7. The nanobiosensor was able to detect bacteria digested genome to 10⁻⁶ dilution that this dilution is corresponding to the concentration of 10² of Bacterium *Escherichia coli*.

Conclusion: In this study, the nanobiosensor based on DNA hybridization was used for the detection of *rfbE* gene sequences in the real sample of *Escherichia coli* O157:H7 with high sensitivity and accuracy that could be a basis for making DNA detection tool.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, Nanobiosensor, DNA hybridization.

Cite this article as: Minaei ME, Saadati M, Najafi M, Honari H. The nanobiosensor based on DNA hybridization for the detection of *rfbE* gene in real samples of *Escherichia coli* O157:H7. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(4): 114-124.

***Corresponding author:**

Biology Dept., Imam Hosein University, Tehran, I.R. Iran. Tel: 00989352219503,
E-mail: mminaii@ihu.ac.ir