

الکترو اصلاح شده الکتروشیمیایی جهت توسعه نانویوسنسور برای تشخیص ژن rfbE باکتری اشریشیا کولی O157:H7

محمد ابراهیم مینایی^{۱*}، مجتبی سعادت^۲، مصطفی نجفی^۳، حسین هنری^۴

^۱ دانشجوی دکتری نانویوتکنولوژی، گروه و مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

^۲ استاد، دکتری باکترای شناسی، گروه و مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

^۳ دانشیار، دکتری شیمی تجزیه، گروه و مرکز علم و فناوری شیمی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

^۴ دانشیار، دکتری ژنتیک، گروه و مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، گروه و مرکز علم و فناوری زیست شناسی، محمد ابراهیم مینایی

E-mail: mminaii@ihu.ac.ir

وصول: ۹۳/۱۲/۲۰، اصلاح: ۹۴/۲/۷، پذیرش: ۹۴/۴/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: نانویوسنسورها می توانند به جای روش های تشخیص قدیمی باکتری اشریشیا کولی O157:H7 مورد استفاده قرار گیرند. در این تحقیق، یک نانویوسنسور برای تشخیص بخشی از ژن rfbE باکتری اشریشیا کولی O157:H7 توسط تثبیت و هیبریداسیون توالی تک رشته DNA (ssDNA) در سطح الکترو اصلاح شده با نانو ذرات طلا مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: روش طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی برای بررسی خواص حسگری الکترو اصلاح شده مورد استفاده قرار گرفته است. سطح الکترو کار با روش الکتروشیمیایی توسط نانوذرات طلا اصلاح شد. توالی تک رشته DNA تیوله با روش تک لایه خود تجمعی، روی سطح الکترو طلا به مدت دو ساعت تثبیت شد. تک لایه مخلوط، شامل مرکاپتوهگزانول و مرکاپتوپروپیونیک اسید به عنوان یک لایه مسدودکننده استفاده گردید. هیبریداسیون DNA/DNA با غوطه ورسازی الکترو طلای اصلاح شده با ssDNA در غلظت ۱ میکرومولار DNA هدف انجام شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که الکترو اصلاح شده با نانوذرات طلا پس از تثبیت ssDNA، به طور مؤثری ژن rfbE باکتری اشریشیا کولی O157:H7 را از طریق هیبریداسیون DNA تشخیص می دهد. نانویوسنسور گزینش پذیری بسیار خوبی در تشخیص توالی DNA هدف نسبت به توالی دارای باز ناچور و توالی غیر مکمل نشان داد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده و بررسی مطالعات مشابه، نانویوسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر هیبریداسیون DNA، دارای مزایایی از جمله هزینه کم، سادگی و کوچک سازی می باشد و می تواند زمینه ای برای توسعه ایزار تشخیص ژنومی را فراهم آورد.

واژه های کلیدی: باکتری اشریشیا کولی O157:H7، نانویوسنسور، هیبریداسیون DNA

مقدمه

واقعه ای اپیدمیولوژیکی شناسایی شد. اولین گزارش

در سال ۱۹۸۳ توسط ری لی و همکارانش بر اثر شیوع

باکتری اشریشیا کولی سروتیپ O157 به دنبال دو

تحولات اخیر در نانومواد، فرصت‌های زیادی برای پیشبرد سنجش DNA و تشخیص ژن ایجاد می‌کند. از نانومواد، به‌طورگسترده‌ای به‌عنوان یک واسطه‌ی تقویت سیگنال به‌منظور افزایش حد تشخیص DNA استفاده شده است (۷). اگرچه تحقیقات زیادی در مورد اصلاح الکترو اصلاح توسط نانوموادهای مختلف برای بهبود عملکرد بیوحسگر DNA گزارش شده، اما آماده سازی نانومواد یا استراتژی اصلاح الکترو اصلاح اغلب پیچیده است. علاوه بر این، برخی از حسگرهای زیستی DNA مبتنی بر نانومواد اصلاح شده هنوز هم برای بهبود عملکرد بیوحسگر DNA محدودیت‌هایی دارند (۸).

در این کار تحقیقاتی، پس از اصلاح سطح الکترو اصلاح با نانوذرات طلا به تشخیص اولیگونوکلوئید ژن rfbE باکتری اشیریشیا کولی O157:H7 با روش طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی مبتنی بر هیبریداسیون DNA پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی، توالی ژن rfbE از بانک ژن (با شماره‌ی 1.CP008957) استخراج شد و آغازگرها و اولیگونوکلوئیدها توسط نرم‌افزار Oligo 7 و Primer 3، طراحی و از شرکت Bioneer Corporation کشور کره جنوبی خریداری شد. این اولیگونوکلوئیدها شامل آغازگرهای پیشرو و پیرو، توالی ۲۳ مری تیوله شده در انتهای ۵' به همراه فضا ساز C₆، توالی ۲۳ مری کاملاً مکمل، توالی ۲۳ مری دارای دو باز ناجور و توالی ۲۳ مری غیر مکمل می‌باشند (جدول ۱).

تشخیص ژن rfbE با روش PCR

در ابتدا یک کلنی تک از محیط کشت نوترینت آگار به محیط کشت LB برات، تلقیح و ۲۴ ساعت در گرمخانه‌ی ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از محیط فوق، برداشته و با دور ۵۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه، سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و به

بیماری گوارشی همراه با دردهای شکمی، اسهال آبکی و به دنبال آن اسهال خونی شدید بود و آنها این بیماری را که انتقال آن از راه توزیع همبرگرهای نیم‌پخته‌ی آلوده در یک فست فود بود، به‌عنوان کولیت هموراژیک در نظر گرفتند (۱). دومین مطالعه توسط کارمالی و همکارانش انجام شد، در این تحقیق آن‌ها ارتباط بین سندروم اورمی همولیتیک را با سیتوتوکسین مدفوعی گزارش کردند (۲).

روش‌های شناسایی متعارف عوامل بیولوژیک شامل کشت و شمارش کلنی، سنجش تکنیک‌های ایمنی و سرولوژی (مبتنی بر فلورسانس با استفاده از مولکول‌های رنگی آلی) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) می‌باشد. اما این روش‌ها دشوار، پیچیده و وقت‌گیر هستند و برخی از آنها ویژگی‌های لازم برای ردیابی هدف را ندارند (۳). بیوسنسور DNA در طول دهه‌ی گذشته، در زمینه-

ی تجزیه و تحلیل ژن، تشخیص اختلالات ژنتیکی، تشخیص عوامل بیولوژیک، تطبیق بافت، کاربردهای پزشکی و پزشکی قانونی توسعه‌ی قابل توجهی داشته است (۴). به‌ویژه هیبریداسیون DNA برای تشخیص عوامل بیولوژیک با توجه به پتانسیل فوق العاده‌ی شناسایی مولکولی آن، بسیار مناسب است. حسگرهای زیستی DNA، از اتصال ترجیحی مکمل تک رشته توالی اسید نوکلئیک، بهره می‌برند. این سیستم معمولاً به ثابت کردن پروب DNA تک رشته‌ای (ssDNA) روی یک سطح برای تشخیص توالی هدف DNA مکمل خود از طریق هیبریداسیون متکی است (۴، ۵).

در حال حاضر، مطالعات و تحقیقات زیادی به ارتقای حساسیت تشخیص و انتخاب‌گری بیوحسگرهای الکتروشیمیایی DNA معطوف شده است (۶). از آنجاکه بیوسنسورها ابزاری توانمند جهت شناسایی مولکول‌های زیستی می‌باشند، امروزه از آنها در علوم مختلف پزشکی، صنایع شیمیایی، صنایع غذایی، مانیتورینگ محیط زیست، تولید محصولات دارویی، بهداشتی و غیره بهره می‌گیرند.

رسوب حاصل، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش جوشانده شد. مقدار ۱ میکرولیتر از این محلول به عنوان الگو در آزمایش PCR توسط آنزیم DNA پلیمراز (تهیه شده از شرکت تکاپوزیست) مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرهای پیشرو و پیرو هر کدام به میزان ۴ دهم پیکومول، نمک $MgSO_4$ با غلظت ۲ میلی مولار، dNTP با غلظت ۲ دهم میلی مولار و ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم پلیمراز با غلظت 10X برای حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتری مورد استفاده واقع شدند. فرآیند بهینه سازی و اتصال آغازگرها در واکنش PCR انجام شد (جدول ۲).

تشخیص ژن rfbE با روش طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی

رسوب الکتروشیمیایی نانوذرات طلا روی الکتروود

محلول ۵ میلی مولار $HAuCl_4$ برای pH برابر ۵ با محلول سود و هیدروکلراید تنظیم شد و برای حدود ۱۲ ساعت در این شرایط باقی ماند. نانوساختارهای طلا روی الکتروود مسطح طلا با قطر ۲ میلی متر در پتانسیل ثابت ۵ دهم ولت در دمای اتاق به مدت ۳۰۰ ثانیه و در شرایط هم زن ۵۰۰ دور در دقیقه، به روش رسوب الکتروشیمیایی ته نشین شدند. جهت بررسی سطح اصلاح شده با نانوساختارهای طلا توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) از سطح تصویر برداری شد. در بین انواع نانومواد، اغلب برای ساخت بیوحسگر الکتروشیمیایی با توجه به استراتژی های تابع سطح و سهولت کار و همچنین زیست سازگاری خوب، از نانوذرات طلا استفاده می شود (۱۶). نانوذرات طلا به راحتی بر روی سطح الکتروود توسط برخی از استراتژی ها نظیر روش های تجمع الکترواستاتیک مستقیم (direct electrostatic assembly)، اتصال کووالانسی (covalent linking)، به دام افتادن پلیمر (polymer entrapment) و رسوب الکتروشیمیایی (گالوانوتکنیک، آبکاری یا electrodeposition) متصل می شود. روش رسوب الکتروشیمیایی به طور گسترده برای

اصلاح بستر استفاده می گردد. نانوساختارهای طلا با مورفولوژی های مختلف توسط روش آب کاری به دست آمده است. مورفولوژی نهایی نانوذرات طلا می تواند به راحتی توسط تغییرات ساده ی pH محلول پیش سازهای طلا کنترل شود. توسعه نانوساختارها ممکن است پلت فرم با ارزشی برای کاربردهای بیوحسگر DNA، حتی پروتئین و آنزیم بیوحسگر را فراهم نماید (۹).

تثبیت ssDNA روی سطح الکتروود اصلاح شده

برای تثبیت توالی DNA روی الکتروود طلای اصلاح شده، اولیگومر ssDNA تیوله در موقعیت ۵' (۱) میکرومولار) به همراه الکتروود طلا درون بافر تثبیت، به مدت دو 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 (۱۰). توالی ssDNA تیوله یک تک-لایه ی خودتجمعی را به دلیل تمایل بالای گروه تیول نسبت به طلا، روی سطح الکتروود تشکیل می دهد. پس از فرایند جذب شیمیایی، الکتروود با آب دوبار تقطیر شستشو داده تا رشته هایی که به صورت ضعیف متصل شده اند حذف شوند. پس از آن، برای تشکیل تک لایه های تیول مخلوط، الکتروود اصلاح شده در محلول مرکاپتوهگزانول و مرکاپتوپروپیلونیک اسید (۲ میلی مولار) در بافر سیترات (۱۰۰ میلی مولار، pH برابر ۲/۴) به مدت ۱ ساعت غوطه ور شد.

هیبریداسیون DNA روی الکتروود اصلاح شده

پس از تثبیت ssDNA روی سطح الکتروود طلای اصلاح شده، برای هیبریداسیون با DNA مکمل، الکتروود طلای آماده شده مرحله ی قبل در بافر هیبریداسیون به مدت ۳۰ 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 مکمل می باشد. همین روش برای هیبریداسیون با توالی دارای باز ناجور و توالی غیر مکمل انجام شد (۹، ۲۱).

اندازه‌گیری الکتروشیمیایی

طیف امپدانس الکتروشیمیایی در حضور زوج رودکس $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ در غلظت‌های ۲ میلی‌مولار و با استفاده از سه الکتروود متشکل از یک الکتروود مرجع AgCl/Ag (در ۳ مولار)، یک الکتروود کمکی سیم پلاتین و الکتروود اصلاح شده طلا به‌عنوان الکتروود کار، ثبت شد. پتانسیل DC ثابت (۲۲۰ میلی‌ولت در مقابل AgCl/Ag) استفاده شده است. فرکانس مدولاسیون (تعديل) AC از ۱ کیلوهرتز تا ۱۰ مگا هرتز با ۶۰ نقطه اندازه‌گیری شده انتخاب شد. بررسی‌های الکتروشیمیایی با استفاده از دستگاه پتانسیواستا/گالوانواستا μ Autolab III FAR 2 دارای آنالیزکننده‌ی پاسخ فرکانسی ساخت شرکت Eco Chemie هلند انجام گرفت (شکل ۱).

یافته‌ها

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن rfbE بوسیله آغازگرهای اختصاصی

پس از دریافت آغازگرها و آماده‌سازی آن‌ها، واکنش PCR برای تکثیر ژن rfbE در دماهای اتصال مختلف آغازگر به رشته الگو توسط آنزیم pfu DNA پلیمرز انجام شد (شکل ۲).

بررسی الکتروود اصلاح شده با نانوساختار طلا

الکتروود اصلاح شده با نانوساختار طلا ابتدا توسط روش رسوب الکتروشیمیایی، تهیه و پس از آن به‌عنوان بستر برای تثبیت و هیبریداسیون DNA استفاده شد. شکل ۳ تصویر SEM به‌دست آمده از نانوساختارهای طلا را در pH برابر ۵ بر روی بستر طلا نشان می‌دهد. با تنظیم pH به ۵، ذرات شبیه شکوفه در بستر الکتروود مشاهده می‌شود. با استفاده از نرم‌افزار Measurement ابعاد نانوساختار طلا به‌صورت میانگین حدود 300 ± 100 نانومتر تعیین شد. الکتروود اصلاح شده با نانوساختارهای طلا به‌دست آمده در pH برابر ۵ به مدت ۳۰۰ ثانیه برای ساخت

نانوبیوسنسور DNA مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی تثبیت ssDNA روی سطح الکتروود

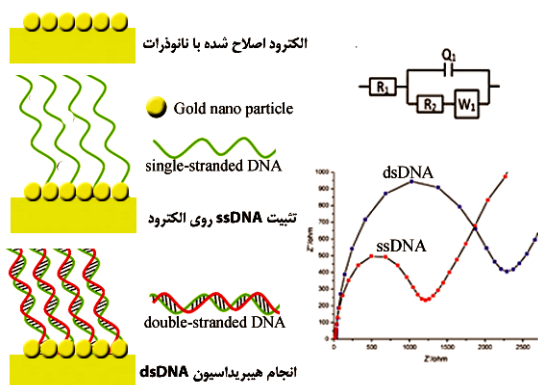
پس از اصلاح الکتروود توسط نانوذرات طلا، تثبیت ssDNA روی سطح الکتروود اصلاح شده با روش طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی مطالعه شد. طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی، روشی مناسب برای تثبیت و هیبریداسیون DNA/DNA روی سطح الکتروود می‌باشد. طیف امپدانس شامل یک بخش نیم‌دایره در فرکانس‌های بالا (نمودار نایکوئیست) مربوط به فرایند کنترل شده با فرآیند انتقال الکترون و یک بخش خطی در فرکانس‌های پایین‌تر مربوط به مرحله‌ی کنترل‌شده با انتشار در فرایند الکتروشیمیایی است. قطر نیم‌دایره برابر با مقاومت انتقال بار است که رفتار سطح الکتروود برای زوج رودکس را نشان می‌دهد و بنابراین می‌تواند به‌عنوان علامتی برای مشخص کردن تغییر در مراحل تثبیت و هیبریداسیون مورد استفاده قرارگیرد. اندازه‌گیری‌های امپدانس الکتروشیمیایی یک الکتروود طلا اصلاح شده با نانوذرات طلا و تثبیت شده با ssDNA در شکل ۴ نشان داده شده است. همانگونه که در شکل ۴ الف مشاهده می‌شود، نمودار نایکوئیست الکتروود طلا اصلاح شده با نانوذرات طلا تقریباً به-

جدول ۱: اولیگونوکلئوتیدهای طراحی شده شامل آغازگر پیشرو و پیرو، توالی پروب تیوله شده، توالی کاملاً مکمل، توالی دارای ۲ باز ناچور و توالی غیرمکمل

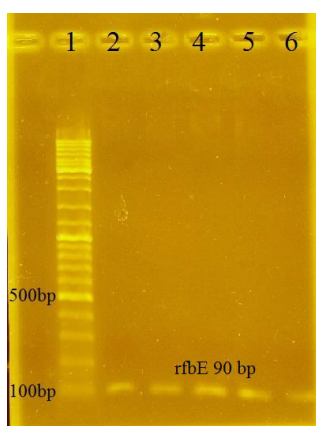
نوع	توالی 3' → 5'
الیکونوکلئوتید	
Primer F	TAAGTATGCTATATATGTCAGTG
Primer R	CGGTTGCTCTTCATTTAGCTTTG
Prob1	SH-(CH ₂) ₆ -CGGTTGCTCTTCATTTAGCTTTG
complementary	GCCAACGAGAAAGTAAATCGAAAC
Mismaich	GCTAACGAGAAAGTACATCGAAAC
Non complementary	ATGCAGTCTCTACGCGATCGCA

جدول ۲: برنامه زمانی برای انجام واکنش PCR

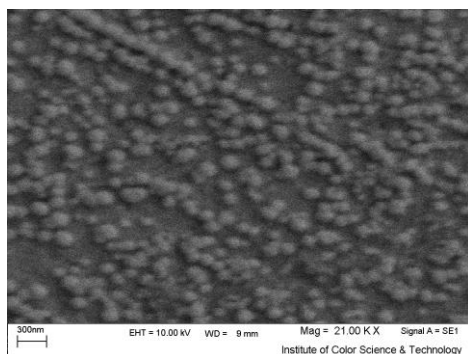
مراحل	دما (°C)	زمان	سیکل
تقلیب اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
تقلیب	۹۴	۴۵ ثانیه	
اتصال	۵۸	۴۵ ثانیه	۳۰
طویل شدن	۷۲	۴۵ ثانیه	
طویل شدن نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱



شکل ۱: تصویر شماتیک از مراحل اصلاح الکتروود با نانوذرات طلا، تثبیت تک رشته ssDNA و هیبریداسیون دو رشته dsDNA به همراه مدار معادل و طیف امپدانس الکتروشیمیایی.



شکل ۲: محصول PCR ژن rfbE روی ژل آگاروز ۲ درصد. ردیف ۱: نشانگر مولکولی DNA، ردیف ۲ تا ۵ محصول PCR در گرایان دمایی.



شکل ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از سطح الکتروود. محلول ۵ میلی مولار HAuCl₄ برای pH برابر ۵ در پتانسیل ثابت ۰/۵ ولت در دمای اتاق به مدت ۳۰۰ ثانیه و در شرایط هم زن ۵۰۰ دور در دقیقه، به روش رسوب الکتروشیمیایی ته نشین شد.

بحث

نتایج به دست آمده از آزمایش‌های این تحقیق نشان داد که الکتروود اصلاح شده با نانوذرات طلا که روی سطح آن ssDNA تثبیت شده است می‌تواند براساس

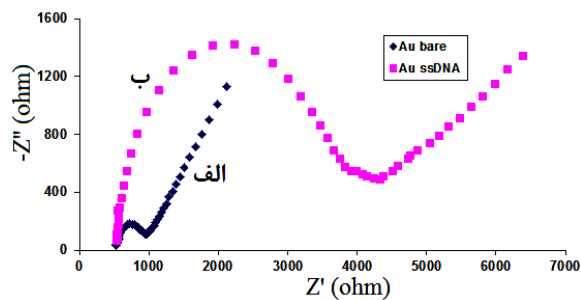
صورت یک خط مستقیم است که نشان‌دهنده‌ی کنترل فرآیند با انتشار است. لایه‌ی خودتجمعی ssDNA و MCH/MPA بر روی الکتروود به‌عنوان یک لایه‌ی عایق عمل کرده و مانع انتقال الکترون در سطح الکتروود می‌شود که نتیجه‌ی آن مشاهده‌ی یک نیم‌دایره در فرکانس‌های بالاتر می‌باشد (شکل ۴ ب). نتایج به دست آمده از روش طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی تایید می‌کند که تثبیت ssDNA و MCH/MPA روی سطح الکتروود طلا به خوبی انجام شده است.

بررسی هیبریداسیون DNA/DNA روی الکتروود اصلاح شده روی الکتروود اصلاح شده با نانوذرات طلا، رشته‌های ssDNA، تثبیت و پس از هیبریداسیون با اولیگونوکلوئوتید مکمل، طیف امپدانس الکتروشیمیایی بررسی شد. مقاومت انتقال بار در نمودار نایکوئیست در الکتروود اصلاح شده با نانوذرات بعد از هیبریداسیون DNA مکمل، افزایش یافته است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که بر هم کنش بین ssDNA تثبیت شده روی سطح الکتروود اصلاح شده با نانوذرات طلا و DNA مکمل آن مناسب بوده و بیانگر تشخیص موفقیت آمیز قطعه‌ای از ژن rfbE باکتری اشریشیا کولی O157:H7 می‌باشد (شکل ۵).

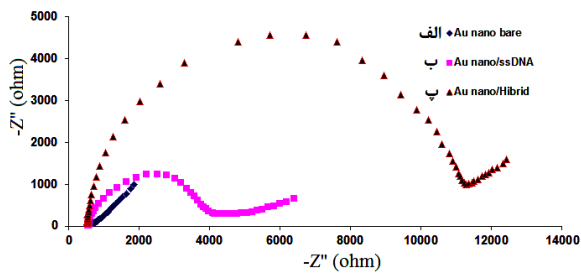
کارایی و انتخاب‌گری نانوبیوسنسور با استفاده از هیبریداسیون ssDNA تثبیت شده روی سطح الکتروود اصلاح شده با سایر اولیگونوکلوئوتیدها نظیر اولیگونوکلوئوتید غیر مکمل و اولیگونوکلوئوتید دارای ناجوری بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوبیوسنسور هیبریداسیون ssDNA با اولیگونوکلوئوتید مکمل، باعث افزایش مقاومت انتقال بار می‌شود و اولیگونوکلوئوتید هدف را شناسایی می‌کند. از طرفی دیگر، نانوبیوسنسور در هیبریداسیون ssDNA با اولیگونوکلوئوتید غیر مکمل و اولیگونوکلوئوتید دارای ناجوری، تغییر قابل ملاحظه‌ای را در طیف امپدانس الکتروشیمیایی نشان نمی‌دهد (شکل ۶).

ترکیب مورد سنجش دارای تناسب کمی است. این ابزارها در گستره‌ی وسیعی از کاربردهای آنالیتیکی نظیر تشخیص‌های پزشکی و علوم آزمایشگاهی، کنترل‌های زیست محیطی، کنترل فرآیندهای صنعتی و سرانجام هشداردهنده‌های ایمنی کارآیی دارند (۴).

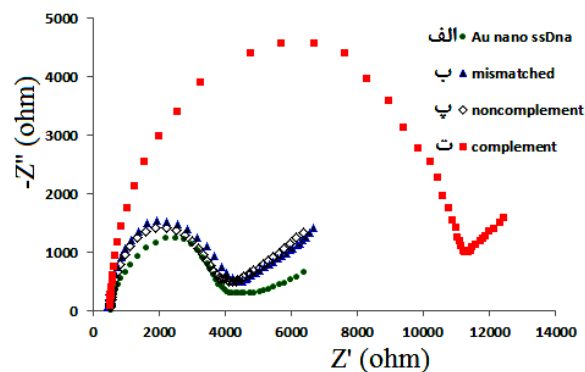
با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه مشخص می‌شود که برای مطالعه‌ی فرآیند هیبریداسیون



شکل ۴: طیف امپدانس الکتروشیمیایی: الف) الکترواد طلای اصلاح شده با نانوذرات ب) تثبیت ssDNA روی سطح الکترواد در حضور زوج ردوکس $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ در غلظت‌های ۲ میلی مولار.



شکل ۵: طیف امپدانس الکتروشیمیایی: الف) الکترواد اصلاح شده با نانوذرات طلا ب) تثبیت ssDNA روی سطح الکترواد، ب) هیبریداسیون با اولیگونوکلوئید مکمل.



شکل ۶: طیف امپدانس الکتروشیمیایی: الف) تثبیت ssDNA روی سطح الکترواد، ب) هیبریداسیون با اولیگونوکلوئید دارای باز ناچور، پ) هیبریداسیون با اولیگونوکلوئید غیر مکمل، ت) هیبریداسیون با اولیگونوکلوئید مکمل.

روش طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی مبتنی بر هیبریداسیون dsDNA، بخشی از ژن rfbE باکتری *E. coli* O157:H7 را شناسایی کند. برای شناسایی باکتری اشریشیاکولی سویه O157 آزمایش‌هایی نظیر مشاهده‌ی مستقیم و بررسی میکروسکوپی نمونه، رنگ آمیزی، کشت و بررسی کلنی‌ها، کشت در محیط‌های اختصاصی و افتراقی و غیره، نیازمندی‌های تغذیه‌ای و رشد، منبع کربن مورد استفاده، تلقیح در محیط کشت سوربیتول- مک کانگی آگار، انجام آزمایش‌های سرولوژیک و روش‌های ژنتیکی وجود دارد (۱۱). روش‌های متداول قدیمی دقت و سرعت شناسایی مطلوبی ندارند. روش‌های ژنتیکی مانند PCR، دارای حساسیت و ویژگی مطلوبی هستند، اما دارای پیچیدگی و دشواری در انجام آزمایش‌ها می‌باشند (۱۲). لذا تشخیص ژن rfbE باکتری اشریشیا کولی O157:H7 با روش‌های آسان، سریع و دقیق ضرورت دارد و ابزاری نظیر نانوبیوسنسور می‌تواند این چالش را مرتفع نماید.

حسگر بیولوژیک، تلفیقی از زیست شناسی و الکترونیک است. با به‌کارگیری گیرنده‌های اختصاصی می‌تواند مبتنی بر سیستم‌های آنزیمی، واکنش‌های آنتی-ژن- آنتی‌بادی و یا هیبریداسیون DNA باشد، استفاده از گیرنده‌ی بسیار اختصاصی عوامل بیولوژیک و پیوند آن با نشانگرهای الکترونیک می‌تواند به‌عنوان یک شناساگر فوق حساس و اختصاصی عمل کند. به‌نحوی که باحضور غلظت بسیار کمی از عامل و پیوند آن با گیرنده‌ی اختصاصی، با ارسال امواجی موجب فعال شدن بخش الکترونیک حسگر شده و در نتیجه هشدار حضور عامل به دستگاه‌ها و مراکز کنترل صادر می‌گردد (۱۳).

حسگرهای زیستی معمولاً قابلیت‌هایی دارند که با بهره‌گیری از ویژگی عمل و خصوصیات ماده‌ی بیولوژیک خود یک ترکیب یا گروهی از ترکیبات مشابه را شناسایی و با آنها برهم کنش نمایند و نتیجه را به‌صورت یک پیام الکتریکی گزارش کنند. این پیام همواره با غلظت

نانوذرات طلا، اولیگونوکلوئوتید خاصی از باکتری را تشخیص می‌دهد و این موضوع می‌تواند برای توسعه‌ی حسگرهای بیولوژیک جهت آشکارسازی عوامل بیولوژیک مورد استفاده قرارگیرد.

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 می‌شود.

DNA/DNA روش طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی، یک تکنیک مناسب با حساسیت و کارایی بالا می‌باشد. حسگرهای DNA براساس تشخیص EIS، بدون برچسب هستند و بنابراین، دارای مزایای استفاده از جمله هزینه‌ی کم، سادگی، سهولت و کوچک‌سازی می‌باشند. با این حال، حسگرهای زیستی DNA برای تشخیص عوامل بیولوژیک دارای محدودیت‌هایی هستند (۱۴، ۱۵). استفاده از نانوذرات برای ساخت الکتروود اصلاح شده با نانوساختار طلا، یک استراتژی ساده برای بهبود حساسیت تشخیص DNA می‌باشد (۱۶). در این مطالعه، توالی تثبیت شده ssDNA روی سطح الکتروود اصلاح شده با

References

- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. *N Engl J Med.* 1983;308(12):681-5.
- Karmali MA, Petric M, Bielaszewska M. Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in Escherichia Coli. *J Clin Microbiol.* 1999 Feb; 37(2): 396-9.
- Sanvicens N, Pastells C, Pascual N, Marco MP. Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Anal Chem.* 2009;28(11) 1243-52.
- Gunnarsson A, Jonsson P, Marie R, Tegenfeldt JO, Hook F. Single-molecule Detection and Mismatch Discrimination of Unlabeled DNA Targets. *Nano Lett.* 2008;8 (1): 183-8.
- Minaei ME, Saadati M, Najafi M, Honari H. Immobilization and Hybridization of DNA/DNA of the rfbE Gene Escherichia Coli O157:H7 on Gold Electrode Surface for the Detection of Specific Sequences by Electrochemical Impedance Spectroscopy Method. *Passive Defence Sci & Tech.* 2014; 4: 279-83. [Persian]
- Kannan B, Williams DE, Booth MA, Travas-Sejdic J. High-sensitivity, label-free DNA sensors using electrochemically active conducting polymers. *Anal Chem.* 2011;83(9),3415-21.
- Katz E, Willner I, Wang J, Electroanalytical and bioelectroanalytical systems based on metal and semiconductive nanoparticles. *Electroanalysis.* 2004;16(1-2), 19-44.
- Liu S, Liu J, Han X, Cui Y, Wang W. Electrochemical DNA biosensor fabrication with hollow gold nanospheres modified electrode and its enhancement in DNA immobilization and hybridization. *Biosen. Bioelectron.* 2010;25(7): 1640-5.
- Seo B, Choi S, Kim J. Simple electrochemical deposition of au nanoplates from au(I) cyanide complexes and their electrocatalytic activities. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2011;3(2): 441-6.
- Steel AB, Herne TM, Tarlov MJ. Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold. *Anal Chem.* 1998; 70(2): 4670 -7.
- Deisingh AK, Thompson M. Strategies for the detection of Escherichia coli O157:H7 in foods. *J Appl Microbiol.* 2004;96(3):419-29.
- Oda M, Morita M, H U, Tanji Y. Rapid Detection of Escherichia coli O157:H7 by Using Green Fluorescent Protein-Labeled PP01 Bacteriophage. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(1): 527-34.
- Pohanka M, Skladai P. Electrochemical biosensors—principles and applications. *J Appl Biomed.* 2008;6:57-64.
- Daniels JS, Pourmand N. Label-free impedance biosensors: opportunities and challenges. *Electroanalysis.* 2007;19(12):1239-57.
- Zhou N, Yang T, Jiang C, Du M, Jiao K. Highly sensitive electrochemical impedance spectroscopic detection of DNA hybridization based on Au-nano-CNT/PAN(nano) films. *Talanta.* 2009;77(3):1021-6.
- Li G, Li X, Wan J, Zhang S. Dendrimers-based DNA biosensors for highly sensitive electrochemical detection of DNA hybridization using reporter probe DNA modified with Au nanoparticles. *Biosen Bioelectron.* 2009;24:3281-7.

A Modified Electrochemical Electrode for Development of Nanobiosensor for the Detection of rfbE Gene of Escherichia Coli O157:H7

* *Mohammad Ebrahim Minaei*

Ph.D Student of Nanobiotechnology, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hosein University, Tehran, Iran

Mojtaba Saadati

Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hosein University, Tehran, Iran

Mostafa Najafi

Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Science, Imam Hosein University, Tehran, Iran

Hossein Honari

Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hosein University, Tehran, Iran

Received:11/03/2015, Revised:27/04/2015, Accepted:09/07/2015

Corresponding author:

Mohammad Ebrahim Minaei,
Department of Biology, Faculty of
Basic Science, Imam Hossein
University, Tehran, Iran
E-mail: mminaii@ihu.ac.ir

Abstract

Background & Objectives: Nanobiosensors could be used instead of traditional detection methods of Escherichia coli O157:H7. In this paper, a nanobiosensor for detection of rfbE gene of the Escherichia coli O157:H7 has been studied by immobilization and hybridization single strand DNA (ssDNA) sequences on the electrode surface modified with gold nanoparticles.

Materials & Methods: Electrochemical impedance spectroscopy technique was used to study the properties of the sensing modified electrode. The working electrode surface was modified by electrochemical method with gold nanoparticles. The single-stranded DNA sequence using self-assembled monolayer was immobilized on the gold electrode for two hours. A mixed monolayer comprising both mercaptohexanol (MCH) and mercaptopropionic acid (MPA) were used as blocking layer. The hybridization DNA/DNA was performed by immersion of the modified gold electrode into ssDNA at a concentration of 1 μ M target DNA.

Results: The results showed that the electrode modified with gold nanoparticles after immobilizing ssDNA effectively detected rfbE gene of Escherichia coli O157:H7 by DNA hybridization. The nanobiosensor showed suitable selectivity for the detection of target DNA complementary sequence compared with the mismatched oligonucleotides sequence and the noncomplementary oligonucleotides sequence.

Conclusion: According to the results obtained and similar studies, the electrochemical nanobiosensor based on DNA hybridization has advantages such as low cost, simplicity, and miniaturization and can provide a basis for the development of genomic detection tools.

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