مقاله اصیل

الکترود اصلاح شده الکتروشیمیایی جهت توسعه نانوبیوسنسور برای تشخیص ژن rfbE باکتری اشریشیاکولی O157:H7

محمد ابراهیم مینایی[۱]*، مجتبی سعادتی[۲]، مصطفی نجفی[۳]، حسین هنری[۴]

[۱] دانشجوی دکترای نانوبیوتکنولوژی، 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، دکترای شیمی تجزیه، گروه و مرکز علم و فناوری شیمی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

[۴] دانشیار، دکترای 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، محمدابراهیم مینایی

E-mail: mminaii@ihu.ac.ir

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

چکیده

زمینه و هدف: نانوبیوسنسورها می‌توانند به‌جای روش‌های تشخیص قدیمی باکتری اشریشیاکولی O157:H7 مورد استفاده قرارگیرند. در این تحقیق، یک نانوبیوسنسور برای تشخیص بخشی از ژن rfbE باکتری اشریشیا کولی O157:H7 توسط تثبیت و هیبریداسیون توالی تک رشته DNA (ssDNA) در سطح الکترود اصلاح شده با نانو ذرات طلا مورد بررسی قرارگرفته است.

موادّ و روش‌ها: روش طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی برای بررسی خواص حسگری الکترود اصلاح شده مورد استفاده قرارگرفته است. سطح الکترود کار با روش الکتروشیمیایی توسط نانوذرات طلا اصلاح شد. توالی تک رشته‌ی DNA تیوله با روش تک لایه‌ی خود تجمعی، روی سطح الکترود طلا به‌مدت دو ساعت تثبیت شد. تک لایه‌ی مخلوط، شامل مرکاپتوهگزانول و مرکاپتوپروپیونیک اسید به‌عنوان یک لایه‌ی مسدودکننده استفاده گردید. هیبریداسیون DNA/DNA با غوطه‌ورسازی الکترود طلای اصلاح شده با ssDNA در غلظت ۱ میکرومولار DNA هدف انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که الکترود اصلاح شده با نانوذرات طلا پس از تثبیت ssDNA، به‌طور مؤثری ژن rfbE باکتری اشریشیا کولی O157:H7 را ازطریق هیبریداسیون DNA تشخیص می‌دهد. نانوبیوسنسور گزینش‌پذیری بسیار خوبی در تشخیص توالی DNA هدف نسبت به توالی دارای باز ناجور و توالی غیر مکمل نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده و بررسی مطالعات مشابه، نانوبیوسنسور الکتروشیمیایی مبتنی بر هیبریداسیون DNA، دارای مزایایی ازجمله هزینه‌ی کم، سادگی و کوچک سازی می‌باشد و می‌تواند زمینه‌ای برای توسعه‌ی ابزار تشخیص ژنومی را فراهم آورد.

واژه‌های کلیدی: *باکتری اشریشیاکولی O157:H7، نانوبیوسنسور، هیبریداسیون DNA*

مقدمه

باکتری اشریشیاکولی سروتیپ O157 به‌دنبال دو واقعه‌ی اپیدمیولوژیکی شناسایی شد. اولین گزارش درسال ۱۹۸۳ توسط ری‌لی و همکارانش براثر شیوع

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 درنظرگرفتند (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 پلیمراز (PCR) می باشد. 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 زمینه‌ی تجزیه و تحلیل ژن، تشخیص اختلالات ژنتیکی، تشخیص عوامل بیولوژیک، تطبیق بافت، کاربردهای پزشکی و پزشکی قانونی توسعه‌ی قابل توجهی داشته است(٤). 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 معمولا به ثابت کردن پروب DNA تک رشته‌ای (ssDNA) روی یک سطح برای تشخیص توالی هدف DNA مکمل خود از طریق هیبریداسیون متکی است (٤، ٥).

در حال حاضر، مطالعات و تحقیقات زیادی به ارتقای حساسیّت تشخیص و انتخاب‌گری بیوحسگرهای الکتروشیمیایی DNA معطوف شده است (٦). ازآنجاکه 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.

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 حدّ تشخیص DNA استفاده شده است (۷). اگرچه تحقیقات زیادی در مورد اصلاح الکترود توسط نانومواد‌های مختلف برای بهبود عملکرد بیوحسگر DNA گزارش شده، اما آماده سازی نانومواد و یا استراتژی اصلاح الکترود اغلب پیچیده است. علاوه بر این، برخی از حسگرهای زیستی DNA مبتنی بر نانومواد اصلاح شده هنوز هم برای بهبود عملکرد بیوحسگر DNAمحدودیت‌هایی دارند(۸).

در این کار تحقیقاتی، پس از اصلاح سطح الکترود با نانوذرات طلا به تشخیص اولیگونوکلئوتید ژن rfbE باکتری اشریشیا 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 Accession No:CP008957.1)، استخراج شد و آغازگرها و اولیگونوکلئوتیدها توسط نرم‌افزار Oligo 7 و Primer 3، طراحی و از شرکت Bioneer Corporation کشور کره جنوبی خریداری شد. این اولیگونوکلئوتیدها شامل آغازگرهای پیشرو و پیرو، توالی ۲۳ مری تیوله شده در انتهای ′۵ به همراه فضاساز C_6، توالی ۲۳ مری کاملا 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 براث، تلقیح و ٢٤ ساعت در گرمخانه‌ی ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از محیط فوق، برداشته و با دور ۵۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه، سانتریفیوژگردید. مایع رویی دور ریخته شد و به

رسوب حاصل، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش جوشانده شد. مقدار ۱ میکرولیتر از این محلول به‌عنوان الگو در آزمایش PCR توسط آنزیم pfu DNA پلیمراز (تهیه‌شده از شرکت تکاپوزیست) مورد استفاده قرارگرفت. آغازگرهای پیشرو و پیرو هر کدام به میزان ٤ دهم پیکومول، نمک $MgSO_4$ با غلظت ۲ میلی‌مولار، dNTP با غلظت ۲ دهم میلی‌مولار و ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم پلیمراز با غلظت 10X برای حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتری مورد استفاده واقع شدند. فرآیند بهینه‌سازی و اتصال آغازگرها در واکنش PCR انجام شد (جدول ۲).

تشخیص ژن rfbE با روش طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی

رسوب الکتروشیمیایی نانوذرات طلا روی الکترود

محلول ۵ میلی‌مولار $HAuCl_4$ برای pH برابر ۵ با محلول سود و هیدروکلراید تنظیم شد و برای حدود ۱۲ ساعت در این شرایط باقی ماند. نانوساختارهای طلا روی الکترود مسطح طلا با قطر ۲ میلیمتر در پتانسیل ثابت ۵ دهم ولت در دمای اتاق به‌مدت 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 استراتژی‌های تابع سطح و سهولت کار و همچنین زیست سازگاری خوب، از نانوذرات طلا استفاده می‌شود (١٦). نانوذرات طلا به‌راحتی بر روی سطح الکترود توسط برخی از استراتژی‌ها نظیر روش‌های تجمع الکترواستاتیک مستقیم (direct electrostatic assembly)، اتصال کووالانسی (covalent linking)، به دام افتادن پلیمر (polymer entrapment) و رسوب الکتروشیمیایی (گالوانوتکنیک، آبکاری یا electrodeposition) متصل می‌شود. روش رسوب الکتروشیمیایی به‌طور گسترده برای اصلاح بستر استفاده می‌گردد. نانوساختارهای طلا با مورفولوژی‌های مختلف توسط روش آب‌کاری به‌دست آمده است. مورفولوژی نهایی نانوذرات طلا می‌تواند به‌راحتی توسط تغییرات ساده‌ی 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 الکترود اصلاح شده

برای تثبیت توالی DNA روی الکترود طلای اصلاح شده، اولیگومر ssDNA تیوله در موقعیت′۵ (۱ میکرومولار) به همراه الکترود طلا درون بافر تثبیت، به‌مدت دو ساعت غوطه‌ور شد. بافرِ تثبیت شامل Tris–HCl ۱۰ میلی‌مولار، EDTA ۱ میلی‌مولار و KH_2PO_4 ۱ مولار، pH برابر ۷ می‌باشد (۱۰). توالی ssDNA تیوله یک تک‌لایه‌ی خودتجمعی را به دلیل تمایل بالای گروه تیول نسبت به طلا، روی سطح الکترود تشکیل می‌دهد. پس از فرایند جذب شیمیایی، الکترود با آب دوبار تقطیر شستشو داده تا رشته‌هایی که به‌صورت ضعیف متصل شده‌اند حذف شوند. پس ازآن، برای تشکیل تک‌لایه‌های تیول مخلوط، الکترود اصلاح شده در محلول مرکاپتوهگزانول و مرکاپتوپروپیونیک اسید (۲ میلی مولار) در بافرِ سیترات (۱۰۰ میلی‌مولار، pH برابر ٢/٤) به‌مدت ۱ ساعت غوطه‌ور شد.

هیبریداسیون DNA روی الکترود اصلاح شده

پس از تثبیت ssDNA روی سطح الکترود طلای اصلاح شده، برای هیبریداسیون با DNA مکمل، الکترود طلای آماده شده مرحله‌ی قبل در بافر هیبریداسیون به‌مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شد. پس ازآن، الکترود با بافر فسفات شستشو داده شد. بافر هیبریداسیون شامل Tris–HCl ۱۰ میلی‌مولار، EDTA ۱ میلی‌مولار و NaCl ۱ مولار، pH برابر ۷ به همراه ۱ میکرومولار DNA مکمل می‌باشد. 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 ردوکس $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ در غلظت‌های ۲ میلی‌مولار و با استفاده از سه الکترود متشکل از یک الکترود مرجع AgCl/Ag (در KCl ۳ مولار)، یک الکترود کمکی سیم پلاتین و الکترود اصلاح شده طلا به‌عنوان الکترود کار، ثبت شد. پتانسیل DC ثابت (۲۲۰ میلی‌ولت در مقابل AgCl/Ag) استفاده شده است. فرکانس مدولاسیون (تعدیل) AC از ۱ کیلوهرتز تا ۱۰ مگا هرتز با ٦۰ نقطه اندازه‌گیری شده انتخاب شد. بررسی‌های الکتروشیمیایی با استفاده از دستگاه پتانسیواستا/گالوانواستا μAutolab III FAR 2 دارای آنالیزکننده‌ی پاسخ فرکانسی ساخت شرکت Eco Chemie هلند انجام گرفت (شکل ۱).

یافته‌ها

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 پلیمراز انجام شد (شکل ۲).

بررسی الکترود اصلاح شده با نانوساختار طلا

الکترود 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 الکترود مشاهده می‌شود. با استفاده از نرم‌افزار Measurement ابعاد نانوساختار طلا به‌صورت میانگین حدود ۳۰ ±۱۰۰ نانومتر تعیین شد. الکترود اصلاح شده با نانوساختارهای طلای به‌دست آمده در pH برابر ۵ به مدت ۳۰۰ ثانیه برای ساخت نانوبیوحسگر DNA مورد استفاده قرارگرفت.

بررسی تثبیت ssDNA روی سطح الکترود

پس از اصلاح الکترود توسط نانوذرات طلا، تثبیت ssDNA روی سطح الکترود اصلاح شده با روش طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی مطالعه شد. طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی، روشی مناسب برای تثبیت و هیبریداسیون DNA/DNA روی سطح الکترود 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 الکترود برای زوج رودکس را نشان می‌دهد و بنابراین می‌تواند به‌عنوان علامتی برای مشخص‌کردن تغییر در مراحل تثبیت و هیبریداسیون مورد استفاده قرارگیرد. اندازه‌گیری‌های امپدانس الکتروشیمیایی یک الکترود طلای اصلاح شده با نانوذرات طلا و تثبیت شده با ssDNA درشکل ٤ نشان داده شده است. همانگونه که در شکل ٤ الف مشاهده می‌شود، نمودار نایکوئیست الکترود طلای 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 ناجور و توالی غیرمکمل

نوع الیگونوکلئوتید	توالی $5' \rightarrow 3'$
Primer F	TAACTGATGCTATATATGTCAGTG
Primer R	CGGTTGCTCTTCATTTAGCTTTG
Prob1	SH-$(CH_2)_6$-CGGTTGCTCTTCATTTAGCTTTG
complementary	GCCAACGAGAAGTAAATCGAAAC
Mismaich	GCTAACGAGAAGTACATCGAAAC
Non complementary	ATGCAGTCTCCTACGCGATCGCA

جدول ۲: برنامه زمانی برای انجام واکنش PCR

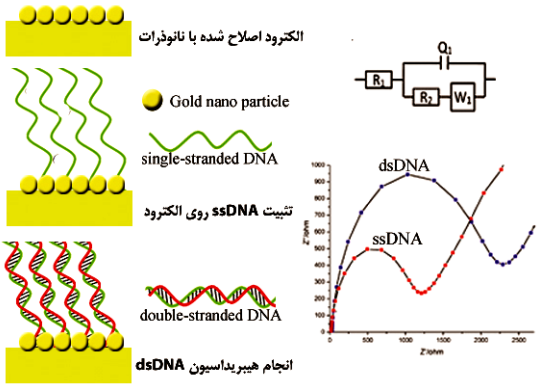
مراحل	دما (°C)	زمان	سیکل
تقلیب اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
تقلیب	۹٤	٤۵ ثانیه	۳۰
اتصال	۵۸	٤۵ ثانیه	
طویل شدن	۷۲	٤۵ ثانیه	
طویل شدن نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

صورت یک خط مستقیم است که نشان‌دهنده‌ی کنترل فرآیند با انتشار است. لایه‌ی خودتجمعی ssDNA و MCH/MPA بر روی الکترود به‌عنوان یک لایه‌ی عایق عمل کرده و مانع انتقال الکترون در سطح الکترود می‌شود که نتیجه‌ی آن مشاهده‌ی یک نیم‌دایره در فرکانس‌های بالاتر می‌باشد (شکل ٤ ب). نتایج به‌دست آمده از روش طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی تایید می‌کند که تثبیت ssDNA و MCH/MPA روی سطح الکترود طلا به‌خوبی انجام شده است.

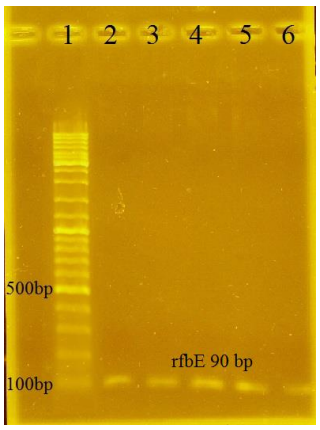
بررسی هیبریداسیون DNA/DNA روی الکترود اصلاح شده

روی الکترود اصلاح شده با نانوذرات طلا، رشته‌های ssDNA ، تثبیت و پس از هیبریداسیون با اولیگونوکلئوتید مکمل، طیف امپدانس الکتروشیمیایی بررسی شد. مقاومت انتقال بار در نمودار نایکوئیست در الکترود اصلاح شده با نانوذرات بعد از هیبریداسیون DNA مکمل، افزایش یافته است. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که بر هم کنش بین ssDNA تثبیت شده روی سطح الکترود 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 ٥).

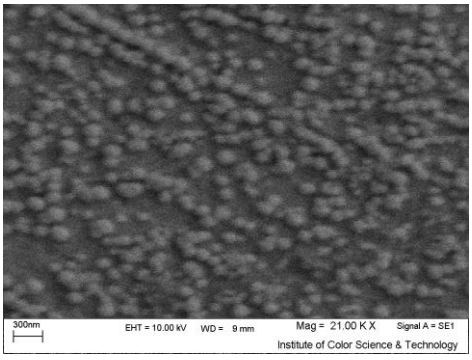
کارآیی و انتخاب‌گری نانوبیوسنسور با استفاده از هیبریداسیون ssDNA تثبیت شده روی سطح الکترود اصلاح شده با سایر اولیگونوکلئوتیدها نظیر اولیگونوکلئوتید غیر مکمل و اولیگونوکلئوتید دارای ناجوری بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوبیوسنسور در هیبریداسیون ssDNA با اولیگونوکلئوتید مکمل، باعث افزایش مقاومت انتقال بار می‌شود و اولیگونوکلئوتید هدف را شناسایی می‌کند. از طرفی دیگر، نانوبیوسنسور در هیبریداسیون ssDNA با اولیگونوکلئوتید غیر مکمل و اولیگونوکلئوتید دارای ناجوری، تغییر قابل ملاحظه‌ای را در طیف امپدانس الکتروشیمیایی نشان نمی‌دهد (شکل٦).



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



شکل۲: محصول PCR ژن rfbE روی ژل آگاروز ۲ درصد. ردیف ۱: نشانگر مولکولی DNA، ردیف ۲ تا ۵ محصول PCR در گرادیان دمایی.



شکل ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از سطح الکترود. 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

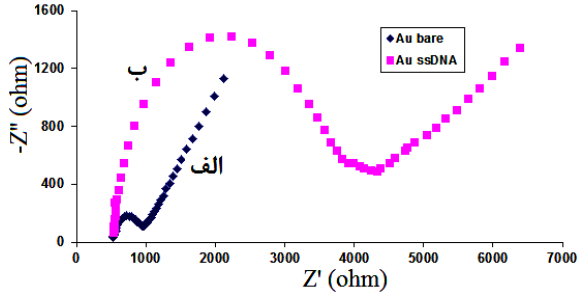
نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های این تحقیق نشان داد که الکترود اصلاح شده با نانوذرات طلا که روی سطح آن ssDNA تثبیت شده است می‌تواند براساس

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 کانکی آگار، انجام آزمایش‌های سرولوژیک و روش‌های ژنتیکی وجود دارد (۱۱). روش‌های متداول قدیمی دقت و سرعت شناسایی مطلوبی ندارند. روش‌های ژنتیکی مانند PCR، دارای حساسیّت 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.

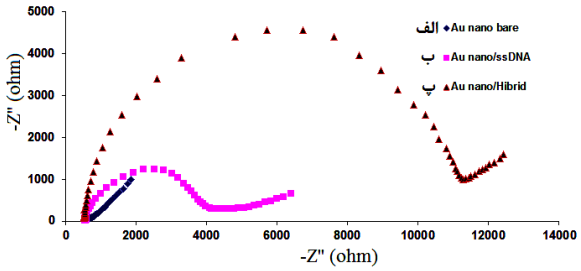
حسگر بیولوژیک، تلفیقی از زیست شناسی و الکترونیک است. با به‌کارگیری گیرنده‌های اختصاصی که می‌تواند مبتنی بر سیستم‌های آنزیمی، واکنش‌های آنتی‌ژن- آنتی‌بادی و یا هیبریداسیون DNA باشد، استفاده از گیرنده‌ی بسیار اختصاصی عوامل بیولوژیک و پیوند آن با نشانگرهای الکترونیک می‌تواند به‌عنوان یک شناساگر فوق حساس 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 درنتیجه 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 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 (٤).

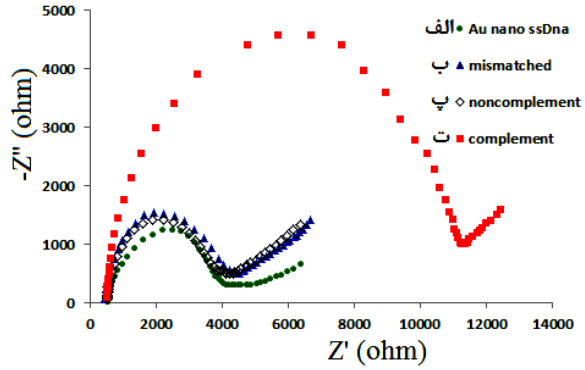
با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه مشخص‌می‌شود که برای مطالعه‌ی فرآیند هیبریداسیون



شکل ۴: طیف امپدانس الکتروشیمیایی: الف) الکترود طلای اصلاح شده با نانوذرات ب) تثبیت ssDNA روی سطح الکترود در حضور زوج ردوکس K3[Fe(CN)6]/K4[Fe(CN)6] در غلظت‌های ۲ میلی مولار.



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



شکل ۶: طیف امپدانس الکتروشیمیایی: الف) تثبیت ssDNA روی سطح الکترود، ب) هیبریداسیون با اولیگونوکلئوتید دارای باز ناجور، پ) هیبریداسیون با اولیگونوکلئوتید غیر مکمل، ت) هیبریداسیون با اولیگونوکلئوتید مکمل.

DNA/DNA روش طیف بینی امپدانس الکتروشیمیایی، یک تکنیک مناسب با حساسیت و کارآیی بالا می‌باشد. حسگرهای DNA براساس تشخیص EIS، بدون برچسب هستند و بنابراین، دارای مزایای استفاده ازجمله هزینه‌ی کم، سادگی، سهولت و کوچک‌سازی می‌باشند. با این‌حال، حسگرهای زیستی DNA برای تشخیص عوامل بیولوژیک دارای محدودیت‌هایی هستند (۱٤، ۱۵). استفاده از نانوذرات برای ساخت الکترود اصلاح شده با نانوساختار طلا، یک استراتژی ساده برای بهبود حساسیت تشخیص DNA می‌باشد (۱٦). در این مطالعه، توالی تثبیت شده ssDNA روی سطح الکترود اصلاح شده با نانوذرات طلا، اولیگونوکلئوتید 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 می-شود.

References

1. 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.
2. 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.
3. Sanvicens N, Pastells C, Pascual N, Marco MP. Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria. Anal Chem. 2009;28(11) 1243-52.
4. 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.
5. 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]
6. 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.
7. Katz E, Willner I, Wang J, Electroanalytical and bioelectroanalytical systems based on metal and semiconductive nanoparticles. Electroanalysis. 2004;16(1-2), 19–44.
8. 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.
9. 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.
10. Steel AB, Herne TM, Tarlov MJ. Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold. Anal Chem. 1998; 70(2): 4670 -7.
11. Deisingh AK, Thompson M. Strategies for the detection of Escherichia coli O157:H7 in foods. J Appl Microbiol. 2004;96(3):419–29.
12. Oda M, Morita M, H U, Tanji Y. Rapid Detection of Escherichia coli O157:H7 by Using Green Fluorescent Protein-Labeled PP01 Bacteriophag. Appl Environ Microbiol. 2004; 70(1): 527–34.
13. Pohanka M, Skladai P. Electrochemical biosensors—principles and applications. J Appl Biomed. 2008;6:57–64.
14. Daniels JS, Pourmand N. Label-free impedance biosensors: opportunities and challenges. Electroanalysis. 2007;19(12):1239–57.
15. 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.
16. 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. Biosens Bioelectron. 2009;24:3281–7.

Original Article

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 µM 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 nanobiosiosensor 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.*