فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۶۲- ۵۳
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۱۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۰۹

بررسی مقایسه‌ای شناسایی *شیگلا فلکسنری* از طریق روش رنگ‌سنجی بر پایهٔ نانوذرات طلا و الکتروفورز

ثریا سلیمی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران، salimi_sorayya@yahoo.com
مجتبی صلوتی*: استاد فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران، saloutim@yahoo.com
سینا میرزا احمدی: استادیار ژنتیک، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران، sinacanmir@yahoo.com
رسول شکری: استادیار میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران، shokrir32@yahoo.com
علی عینلو: کارشناس ارشد قارچ‌شناسی پزشکی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران، ali_einloo@yahoo.com

چکیده

مقدمه: *شیگلا* باسیل گرم‌منفی روده‌ای است که عفونت‌های ناشی از آن مشکلات جدی را در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه ایجاد کرده است. هدف از این مطالعه، به‌کارگیری روش رنگ‌سنجی بر پایهٔ نانوذرات طلا جهت تشخیص سریع *شیگلا فلکسنری* با استفاده از محصول تکثیریافتهٔ ژن *ipaH* است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه برای شناسایی جنس *شیگلا* از یک جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر ژن *ipaH* به‌روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. سپس از پروب تک‌رشته‌ای، جهت اتصال به نواحی اختصاصی محصول این واکنش استفاده شد. در مرحلهٔ بعد نانوذرات طلا به مخلوط واکنش افزوده شدند و تغییر رنگ محلول به‌صورت چشمی و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. جهت بررسی حساسیت این روش، از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با رقت‌های مختلف استفاده شد و نتایج با روش ژل الکتروفورز مقایسه شد.

نتایج: هیبریداسیون پروب با محصول تکثیریافته از ژن *ipaH* باعث تجمع نانوذرات طلا به‌شکل شبکه‌ای متصل به هم شد و درنتیجه منجر به تغییر رنگ مخلوط واکنش از قرمز به بنفش شد که این تغییر رنگ نشان‌دهندهٔ وجود باکتری *شیگلا فلکسنری* در نمونه بود، درحالی‌که هیچ تغییر رنگی در موارد کنترل منفی مشاهده نشد. همچنین تجمع نانوذرات طلا با استفاده از تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی تأیید شد.

بحث و نتیجه‌گیری: به‌دلیل اختصاصی‌بودن ژن *ipaH* در گونهٔ *شیگلا فلکسنری*، روش رنگ‌سنجی بر پایهٔ نانوذرات طلا می‌تواند به‌عنوان روشی سریع و کاربردی با حساسیت بالا، برای شناسایی اختصاصی این باکتری در نمونه‌های بالینی و مواد غذایی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: رنگ‌سنجی، ژن *ipaH*، *شیگلا فلکسنری*، نانوذرات طلا

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

اسهال‌های عفونی یکی از مشکلات مهم بهداشتی در سراسر جهان به شمار می‌روند و هرساله باعث ابتلا و مرگ‌ومیر زیاد مبتلایان در کشورهای جهان سوم می‌شوند. در بین پاتوژن‌های عامل اسهال، *شیگلا*[1] نقش مهمی در ایجاد اسهال‌های خونی و التهابی دارد. این بیماری عمدتاً ازطریق شخص به شخص و یا از طریق آب یا غذا انتقال می یابد (۱). افراد کم‌سن، پیر و یا افرادی که دچار کاهش عملکرد سیستم ایمنی بدن هستند، ممکن است در معرض خطر بیشتری برای عفونت باشند (۲). روش‌های تشخیص *شیگلا* شامل روش‌های رایج کشت، روش‌های ایمونولوژیک و روش های میکروبیولوژی مولکولی هستند. تشخیص این باکتری با روش کشت باکتریایی به‌دلیل وقت‌گیربودن و نیز فقدان محیط کشت انتخابی مناسب، مشکل است (۳). گرچه تاکنون روش‌های ایمونولوژیک نیز برای تشخیص باکتری *شیگلا* محقق شده است، با این حال تنها یک کیت تجاری جهت انجام آزمایش میکروبیولوژیکی در دسترس است. روش‌های میکروبیولوژی مولکولی نیز مانند polymerase chain reaction (PCR)، برای تشخیص و شناسایی *شیگلا* گسترش قابلِ‌توجهی یافته است. با این حال، اشکال عمده در استفاده از PCR، نیاز به تجزیه و تحلیل نتایج پس از انجام آزمایش با استفاده از روش ژل الکتروفورز است که یک فرآیند نسبتاً زمان‌بر است و ممکن است به‌دلیل آلودگی آزمایشگاهی همراه با نتایج مثبت کاذب باشد (۴،۵).

در سال های اخیر، استفاده از نانوذرات، به‌خصوص نانوذرات فلزی در تحقیقات زیست‌پزشکی گسترش زیادی یافته است (۶). نانوذرات دارای خصوصیات ویژه‌ای از قبیل اندازهٔ بسیار کوچک، نسبت سطح بزرگ به حجم و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاصی هستند که مواد در مقیاس بزرگ‌تر فاقد این ویژگی‌ها هستند (۷). در این میان، نانوذرات طلا بیشترین کاربرد را در علوم پزشکی دارند و در مواردی چون هدفمندسازی ژنی و به‌دلیل سمیت سلولی کم، استفاده شده‌اند (۸). به‌دلیل اینکه روش های اندازه‌گیری متعددی نظیر جذب نوری، فلورسانس و پخش رامان می‌توانند برای تشخیص نانوذرات طلا به کار روند، این ذرات نشانگرهای مناسبی در طراحی زیست‌حسگرها محسوب می‌شوند، به‌طوری‌که تشخیص DNA با استفاده از نانوذرات طلا نسبت به سیستم های معمول تشخیص ژنومی، حدود ده برابر افزایش حساسیت و صدهزار برابر ویژگی بیشتری نشان می‌دهند (۹). هدف از پژوهش حاضر توسعهٔ یک روش سریع با حساسیت و اختصاصیت بالا برای تشخیص باکتری *شیگلا فلکسنری* با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایهٔ نانوذرات طلا است (۱۰). اساس این روش بر پایهٔ اتصال پروب مربوط به محصول PCR به نانوذرات طلا استوار است. بدین‌صورت که در صورت وجود قطعهٔ ژنومی موردنظر در نمونه و تکثیر آن توسط PCR، پروب مربوطه به محصول PCR متصل می‌شود و نانوذرات طلا به‌صورت آزاد و رها در محلول باقی می‌مانند و با اضافه‌کردن محلول نمک تجمع نانوذرات طلا و درنتیجه تغییر رنگ محلول واکنش اتفاق می‌افتد و در نبود این قطعهٔ ژنی اتصال بین پروب و نانوذرات رخ می‌دهد و درنتیجه هیچ تغییر رنگی مشاهده نمی‌شود.

مواد و روش‌ها

کیت استخراج DNA، آنزیم taq polymerase، dNTP، بافر PCR ، نشانگر اندازهٔ DNA (DNA size marker) ، کلرید منیزیم، اتیدیوم بروماید، بافر TBE از شرکت سیناکلون و نانوذرات طلا با اندازه ۱۵ نانومتر از شرکت سیگما تهیه شدند. باکتری شیگلا *فلکسنری* ATCC:12022 از بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه شد و آزمایشات لازم برای تأیید سویهٔ موردنظر صورت گرفت. سپس این باکتری در محیط مولر هینتون آگار ساب کالچر داده شد.

استخراج DNA: به‌منظور استخراج ژنوم باکتری شیگلا *فلکسنری*، باکتری از محیط کشت مولر هینتون آگار به محیط نوترینت براث تلقیح شد و به‌مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس DNA آن با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم‌منفی با کد PR881613C محصول شرکت سینا کلون، استخراج شد و برای استفاده در مراحل بعدی آزمایش داخل فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نحوهٔ استخراج براساس اتصال DNA به ماتریس حاوی فیلتر غشایی سیلیسی در حضور غلظت بالا از نمک و تخلیص و شستشو از ستون در حضور غلظت پایین نمک مثل بافر تخلیص است.

اندازه‌گیری کمی و کیفی DNA خارج‌شده: برای اندازه‌گیری کمی غلظت DNA خارج‌شده از دستگاه بیوفتومتر ساخت شرکت اپندورف کشور آلمان استفاده شد. ابتدا رقت‌های متوالی از DNA خارج‌شده تهیه شد و میزان غلظت آن‌ها در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. سپس برای اندازه‌گیری کیفی DNA خارج‌شده، از روش الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید استفاده شد.

طراحی آغازگر[۲] برای انجام PCR: در این مطالعه به‌منظور انجام PCR ژن *ipaH*، آغازگرهای جلویی و برگشتی با استفاده از نرم‌افزار ژن‌رانر[۳] طراحی و توسط نرم‌افزار آنلاین بلاست[۴] تأیید شد. سپس سفارش ساخت آغازگرهای طراحی‌شده به شرکت سینا کلون داده شد. توالی آغازگرها و پروب استفاده‌شده در این پژوهش، در جدول ۱ نشان داده شده است.

آزمون PCR: جهت انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر گرادیانت ساخت شرکت اپندورف کشور آلمان استفاده شد. برای تکثیر ژن *ipaH* از زوج آغازگرهای جلویی و برگشتی (طبق جدول شماره ۱) استفاده شد. همچنین برای تکثیر ژن *ipaH* مخلوط واکنش[۵] زیر تهیه و استفاده شد.

بافر ۱X PCR، ۱/۵ mM $MgCl_2$، ۱/۵ mM dNTP، آغازگر جلویی و برگشتی هرکدام ۲۰pmol، پلیمراز 1 µ Taq، DNA الگو ۱۰ng که حجم نهایی برای هر واکنش ۳۰ میکرولیتر و چرخه‌های حرارتی استفاده‌شده به‌صورت جدول ۲ بود.

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده‌شده جهت PCR ژن *ipaH* و پروب برای آزمون رنگ‌سنجی

	Oligonucleotide	Bp
Primers	ipaHF:5′-CAGAAGAGCAGAAGTATGAG-3′ ipaHR:5′-CAGTACCTCGTCAGTCAG-3′	169
Probe	ipaHP: 5’ CAGTCTCACGCATCAC3’	16

جدول ۲- چرخهٔ حرارتی استفاده‌شده جهت انجام PCR

ردیف	مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان	تکرار
۱	واسرشتگی اولیه[۶]	۹۴	۱۰ دقیقه	۱
۲	واسرشتگی[۷]	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
۳	اتصال[۸]	۴۸	۱ دقیقه	۳۰
۴	تکثیر[۹]	۷۲	۴۰ ثانیه	۳۰
۵	تکثیر نهایی[۱۰]	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

اندازه‌گیری کمی و کیفی محصول PCR: برای اندازه‌گیری میزان کمی محصول PCR از دستگاه بیوفتومتر اپندورف استفاده شد و رقت‌های متوالی از محصول PCR تهیه و میزان غلظت آن‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ آنگستروم خوانده شد. سپس جهت بررسی میزان کیفی محصول PCR با ژل آگارز ۲درصد الکترفورز شد. برای رنگ‌آمیزی ژل از اتیدیوم بروماید استفاده شد و سپس توسط دستگاه ژل داک[۱۱] تصویربرداری انجام شد.

انجام آزمون رنگ‌سنجی جهت تشخیص باکتری *شیگلا فلکسنری*: سفارش ساخت پروب استفاده‌شده در آزمون رنگ‌سنجی به شرکت MWG آلمان داده شد. برای اعمال دماهای موردِنیاز در آزمون‌های رنگ‌سنجی از دستگاه PCR گرادیانت استفاده شد. برای این منظور داخل میکروتیوب مقدار ۵ میکرولیتر بافر فسفات با pH=۷، ۲۰۰ pmol/µl محصول PCR و به‌مقدار ۱۰۰pmol/µl پروب اضافه شد. سپس توسط دستگاه ترموسایکلر گرادیان به‌ترتیب دمای ۹۵°C و به منظور دناتوراسیون به‌مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴۳°C و به‌مدت ۱۰ دقیقه جهت واکنش هیبریداسیون اعمال شد. سپس میکروتیوب‌ها از دستگاه خارج شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نانوذرات طلا با OD=۱ اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد تا اتصال پروب به محصول PCR صورت گیرد. سپس به‌تدریج با اضافه‌کردن محلول نمک ۰/۲ مولار به لوله‌ها وقوع یا عدم وقوع تغییر رنگ به‌صورت چشمی ثبت شد.

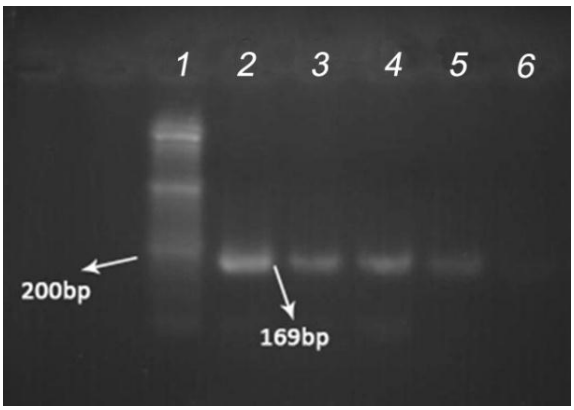
تعیین حساسیت و اختصاصیت آزمون رنگ‌سنجی: برای سنجش اختصاصیت این آزمون به جای *شیگلا فلکسنری* از باکتری *E coli* o_{157} استفاده شد و برای نشان‌دادن حساسیت آزمون، از سری رقت‌های ۱:۲، ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۵۰ از محصول PCR تهیه شد و حساسیت آزمون رنگ‌سنجی در مقایسه با ژل الکترفورز سنجیده شد.

تصویربرداری SEM: تصویر برداری میکروسکوپ الکترونی با استفاده از دستگاه SEM به‌منظور نشان‌دادن تجمع نانوذرات طلا در حضور باکتری *شیگلا فلکسنری* و یا عدم تجمع آن در صورت فقدان باکتری ذکرشده انجام گرفت. در این پژوهش از دستگاه SEM مرکز پژوهش متالوژی رازی، ساخت کشور جمهوری چک استفاده شد.

نتایج

اندازه‌گیری کمی و کیفی DNA استخراج شده: در این مطالعه غلظت DNA خارج‌شده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر ۵۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد و نتایج حاصل از الکتروفورز، وجود باندهای سالم با درصد خلوص بالا را نشان دادند.

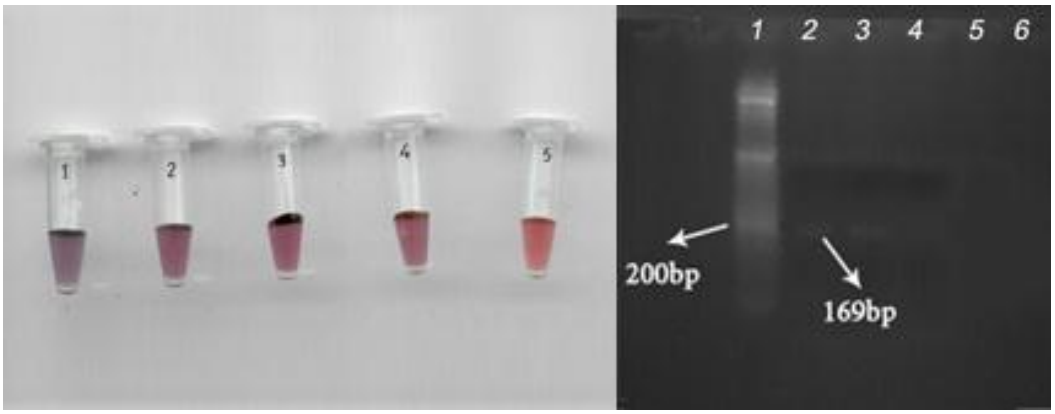
اندازه‌گیری کمی و کیفی محصول PCR : میزان کمی محصول PCR با استفاده از دستگاه بیوفتومتر و در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت ۱۷/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین با استفاده از الکتروفورز محصول PCR ژن *ipaH* بر روی ژل آگارز طبق انتظار، محصول ذکرشده دارای ۱۶۹ جفت باز بود (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR. ردیف ۱ نشانگر، ردیف ۵-۲ محصول PCR ژن *ipaH* باکتری *شیگلا فلکسنری*، ردیف ۶ کنترل منفی.

تشخیص باکتری *شیگلا فلکسنری* با روش رنگ‌سنجی: به تدریج پس از افزودن ۹ میکرولیتر محلول نمک ۰/۲ مولار به مخلوط واکنش حاوی نانودرات طلا، بافرفسفات، محصول PCR و پروب، تجمع نانوذرات طلا با تغییر رنگ محلول حاوی باکتری *شیگلا فلکسنری* از قرمز به بنفش مشاهده شد. درحالی‌که در نمونهٔ کنترل منفی هیچ تغییر رنگی مشاهده نشد.

تعیین میزان حساسیت روش رنگ‌سنجی: آزمون رنگ‌سنجی و همچنین ژل الکترفورز بر روی رقت‌های مختلف محصول PCR صورت گرفت و حساسیت این آزمون در مقایسه با ژل الکترفورز سنجیده شد. بدین صورت که در ژل الکتروفورز رقت‌های ۱:۲ و ۱:۱۰ باند بسیار ضعیفی تشکیل دادند ولی تمام رقت‌ها با آزمون رنگ‌سنجی و تغییر رنگ مخلوط واکنش از قرمز به بنفش حضور باکتری را نشان دادند که این بررسی نشان از حساسیت بالای آزمون رنگ‌سنجی در مقایسه با ژل الکترفورز است (شکل ۲).



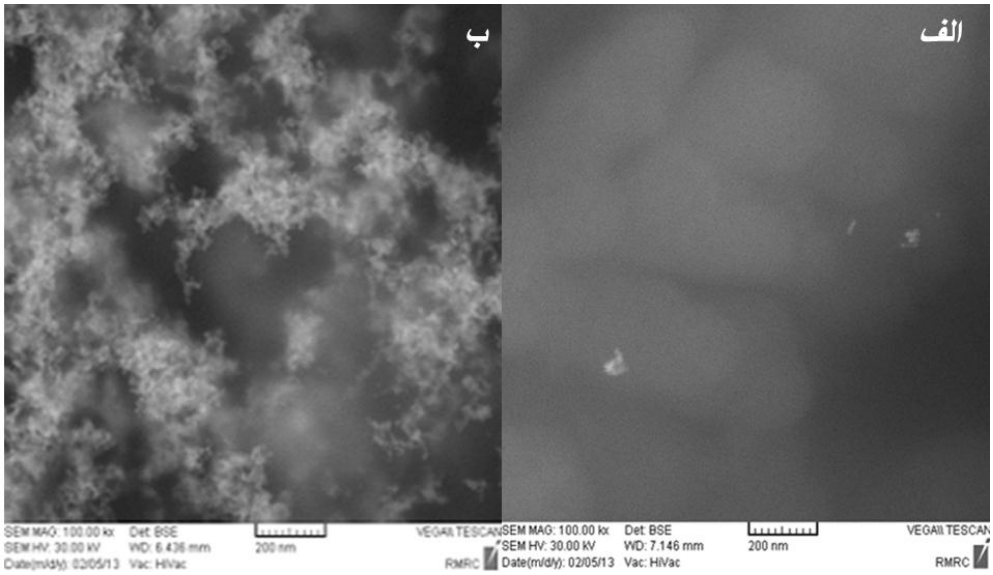
شکل ۲- سمت راست تصویر الکتروفورز، شماره ۱ مربوط به نشانگر، شماره (۵-۲) رقت‌های ۱:۲، ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۵۰محصول PCR ژن *ipaH* باکتری *شیگلا فلکسنری* که فقط رقت‌های ۱/۲ و ۱/۱۰ باند بسیار ضعیفی ایجاد کرده است. شماره ۶ کنترل منفی است.

سمت چپ: لوله‌های آزمون رنگ‌سنجی؛ شماره ۴-۱ به‌ترتیب رقت‌های ۱:۲، ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۵۰ محصول PCR ؛ که در تمام رقت‌ها تغییر رنگ قرمز به بنفش مشاهده می‌شود. شماره ۵ کنترل منفی است.

تعیین میزان اختصاصیت آزمون رنگ‌سنجی: برای نشان‌دادن اختصاصی‌بودن آزمون رنگ‌سنجی از محصول PCR اختصاصی (باکتری *شیگلا فلکسنری*) و محصول PCR غیراختصاصی (باکتری *E.coli* O_{157}) استفاده شد. بدین صورت که با انجام آزمون رنگ‌سنجی در حضور باکتری *شیگلا فلکسنری* نانوذرات طلا تجمع یافت و رنگ مخلوط واکنش از قرمز به بنفش تغییر کرد ولی در حضور محصول PCR غیراختصاصی، تغییر رنگی مشاهده نشد (شکل ۳).

بررسی نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی SEM: با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM مشاهده شد که نانوذرات طلا در مخلوط واکنش حاوی باکتری *شیگلا فلکسنری* تجمع یافته بود ولی در مخلوط واکنشی که باکتری *شیگلا فلکسنری* وجود نداشت هیچ گونه تجمعی انجام نگرفته بود (شکل ۴).

شکل ۳- لولهٔ سمت راست تغییر رنگ نانوذرات طلا از رنگ قرمز به بنفش یعنی حضور باکتری *شیگلا فلکسنری* را نشان می‌دهد ولی در لولهٔ سمت چپ به‌دلیل نبودِ باکتری *شیگلا فلکسنری* هیچ تغییر رنگی مشاهده نمی‌شود.



شکل ۴- الف: به‌دلیل پخش‌بودن نانوذرات طلا تصویر به‌صورت یکنواخت است و هیچ‌گونه تجمعی مشاهده نمی‌شود ب: کنتراست تصویر به‌دلیل تجمع نانوذرات طلا و ایجاد توده است.

بحث و نتیجه‌گیری

شیگلا باسیل گرم منفی روده‌ای است که عفونت‌های ناشی از آن مشکلات جدی را در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه ایجاد کرده است. شیوع عفونت‌های ناشی از شیگلا به‌دلیل بیماری‌زایی این باکتری حتی با مقادیر کم ارگانیسم و همچنین انتقال آسان آن از فردی به فرد دیگر و نیز آلوده‌شدن غیرمستقیم افراد از طریق مصرف مواد غذایی و آب آلوده بسیار آسان است (۱۱). با توجه به اهمیت درمان مؤثر بیمارانی که به شیگلوزیس مبتلا شده‌اند شناسایی زودهنگام عامل این بیماری بسیار ضروری است. در ایران طی سال های گذشته میزان شیوع باکتری شیگلا *فلکسنری* نسبت به سایر گونه ها بیشتر بود و به این دلیل مطالعهٔ حاضر بر روی این باکتری صورت گرفت. در این پژوهش برای شناسایی باکتری شیگلا *فلکسنری* از ژن اختصاصی *ipaH* که عامل بیماری‌زایی[۱۲] نیز هست استفاده شد (۱۲).

در مطالعهٔ حاضر آزمایش PCR با اعمال گرادیانت دمایی در دماهای مختلف انجام شد و دمای بهینه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در گرادیانت دمایی ۴۸°C به دست آمد. محصول PCR به اندازهٔ ۱۶۹ bp ایجاد شد که از این محصول برای انجام آزمون رنگ‌سنجی استفاده شد. نانوذرهٔ استفاده‌شده در این بررسی دارای اندازهٔ ۱۵ نانومتر و به رنگ قرمز بود و حداکثر جذب را در طول موج ۵۲۰ نانومتر نشان داد. این مطالعه برای اولین بار برای شناسایی باکتری شیگلا *فلکسنری* استفاده شد و نتایج آن در مقایسه با PCR و ژل الکتروفورز در زمان کمتر و با حساسیت و اختصاصیت بالا به دست آمد. در این مطالعه برخلاف پوریا گیل و همکارانش که از نانوذرات طلای عامل‌دار برای تشخیص *مایکوباکتریوم* استفاده کرده بودند از نانوذرات طلای غیرعامل‌دار به دلیل نیازنداشتن به تجهیزات پیچیده برای عامل‌دارکردن استفاده شد (۱۳). آزمون رنگ‌سنجی همانند مطالعه دنیش پراساد و همکارانش که از نانوذرات طلا، پروب، مولکول DNA، بافر فسفات و نمک ۰/۲ مولار برای شناسایی گونه‌های *سالمونلا* در مواد غذایی استفاده شده بود انجام گرفت و مطابق با آزمون ایشان، در مطالعهٔ حاضر نیز حساسیت و اختصاصیت این آزمون در مقایسه با ژل الکترفورز بسیار بالا بود (۱۰). همچنین در این روش همانند مطالعه هیوکسینگ لی[۱۳] و همکارانش که براساس تفاوت در ویژگی‌های الکترواستاتیک الیگونوکلئوتیدهای تک‌رشته‌ای و دورشته‌ای بود، هیبریداسیون پروب با DNA باکتری موردنظر، باعث تجمع نانوذرات طلا به‌شکل شبکه ای متصل به هم و درنتیجه تغییر رنگ مخلوط واکنش شد که این تغییر رنگ نشان‌دهندهٔ وجود مولکول هدف در نمونه بود که به‌روش چشمی هم قابلِ‌تشخیص بود (۱۴). برای نشان‌دادن اختصاصیت آزمون رنگ‌سنجی از محصول PCR اختصاصی (باکتری شیگلا *فلکسنری*) و محصول PCR غیراختصاصی (*E coli* $_{O157}$) استفاده شد بدین صورت که با انجام آزمون رنگ‌سنجی در حضور باکتری شیگلا *فلکسنری*، نانوذرات طلا تجمع یافت و رنگ مخلوط واکنش از قرمز به بنفش تغییر کرد ولی در حضور محصول PCR غیراختصاصی چنین تغییر رنگی مشاهده نشد (۱۵). برای نشان‌دادن حساسیت آزمون رنگ‌سنجی نیز از سری رقت‌های ۱:۲، ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۵۰ از محصول PCR تهیه شد و حساسیت این آزمون در مقایسه با روش ژل الکترفورز سنجیده شد. بدین صورت که در ژل الکتروفورز رقت‌های ۱:۲ و ۱:۱۰ باند بسیار ضعیفی

تشکیل دادند ولی تمامی رقت‌ها با آزمون رنگ‌سنجی و تغییر رنگ مخلوط واکنش از قرمز به بنفش حضور باکتری را نشان دادند. این بررسی نشان از حساسیت بالای آزمون رنگ‌سنجی در مقایسه با روش ژل الکترفورز است. با استفاده از میکروسکوپ SEM تجمع نانوذرات طلا در حضور باکتری *شیگلا فلکسنری*، و عدم تجمع آن در فقدان باکتری مشاهده شد. در مطالعهٔ حاضر استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایهٔ نانوذرات طلا برای اولین بار برای شناسایی *شیگلا فلکسنری* انجام گرفته است. نتایج این مطالعه نشان داد که این روش می‌تواند برای شناسایی سریع و با حساسیت بالا نسبت به روش ژل الکترفورز انجام گیرد. همچنین می‌توان از این روش برای تشخیص باکتری ذکرشده در نمونه‌های بالینی و در مواد غذایی استفاده کرد.

References

(1) Niyogi SK. Shigellosis. *Journal of microbiology* (Seoul, Korea). 2005; 43(2): 133-43.

(2) Galanakis E, Tzoufi M, Charisi M, Levidiotou S, Papadopoulou Z. Rate of seizures in children with shigellosis. *Acta Paediatrica*. 2002; 91(1): 101-2.

(3) Pawlowski SW, Warren CA, Guerrant R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea.*Gastroenterology*. 2009; 136(6): 1874-86.

(4) Espy M, Uhl J, Sloan L, Buckwalter S, Jones M, Vetter E, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical microbiology reviews*. 2006; 19(1): 165-256.

(5) Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*. 2003; 4(11): 1120-8.

(6) Tiwari PM, Vig K, Dennis VA, Singh SR. Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomaterials*. 2011; 1(1): 31-63.

(7) Kazemi J, Ahmadi M, Dastmalchi Saee H, Adibhesami M. Antibacterial effect of silver nanoparticles along with protein synthesis-inhibiting antibiotics on *Staphylococcus aureus* isolated from cattle mastitis. *Biological Journal of Microorganism*. 2014; 2(8): 15-22.

(8) Daniel M-C, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews*. 2004; 104(1): 293-346.

(9) Glynou K, Ioannou PC, Christopoulos TK, Syriopoulou V. Oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for DNA analysis by hybridization. *Analytical Chemistry*. 2003; 75(16): 4155-60.

(10) Prasad D, Vidyarthi AS. Gold nanoparticles-based colorimetric assay for rapid detection of Salmonella species in food samples. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011; 27(9): 2227-30.

(11) Emami Z, Khalilian E, Shahsanaei M. Isolation of Lactobacillus plantarum from different varieties of Iranian native olives and investigation of their antimicrobial activity against two pathogenic members of Entrobacteriaceae. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 4 (13) :139-160

(12) Thong KL, Hoe SL, Puthucheary SD, Yasin RM. Detection of virulence genes in Malaysian Shigella species by multiplex PCR assay. *BMC Infectious Diseases.* 2005; 5(1): 8.

(13) Gill P, Alvandi A-H, Abdul-Tehrani H, Sadeghizadeh M. Colorimetric detection of Helicobacter pylori DNA using isothermal helicase-dependent amplification and gold nanoparticle probes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2008; 62(2): 119-24.

(14) Li H, Rothberg L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101(39): 14036-9.

(15) Einloo A, Dehghan P, Salouti M, Mirzaahmadi S. Specific Identification of Candida Glabrata via colorimetric assay based on gold nanopartcles. *Journal of Isfahan Medical School*.2015; 33(325): 231-241.

---

[1]- *Shigella*
[2]- Primers
[3]- Gene Runner
[4]- Blast
[5]- PCR Mixture
[6]- Primary Denaturation
[7]- Denaturation
[8]- Annealing
[9]- Extention
[10]- Final Extention
[11]- Gel Documentation
[12]- virulence
[13]- Li H

Comparative Study of *Shigella flexneri* Identiefication with Colorimetric Assay Based on Gold Nanoparticles and Electrophoresis Method

Sorraya Salimi
M.Sc. of microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran, salimi_sorayya@yahoo.com
Mojtaba Salouti *
Associate professor of Medical Physics, Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran, saloutim@yahoo.com
Sina Mirzaahmadi
Assistant professor of Genetics, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran, sinacanmir@yahoo.com
Rasoul Shokri
Assistant professor of microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran, shokrir32@yahoo.com
Ali Einloo
Msc of medical mycology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran, ali_einloo@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Shigella* is a Gram-negative enteric bacilli that causes serious problems in advanced and developing countries. The purpose of this study was to evaluate colorimetric assay based on gold nanoparticles for rapid detection of *S. flexneri* using *ipaH* gene amplification products.

Materials and methods: To identify the genus *Shigella*, the specific primers were used to amplify *ipaH* gene with polymerase chain reaction (PCR) method. Then, single-stranded probe was used to connect to the specific region of the PCR product. After addition of gold nanoparticles, the color changing was observed visually in the solution and imaged with scanning electron microscope (SEM). To examine the sensitivity of new method, a range of different concentrations of PCR products was used and the results were compared with gel electrophoresis method.

Results: The hybridization of probes with amplified products of *ipaH* gene caused the accumulation of gold nanoparticles which resulted in color changing in the reaction solution from red to purple, but no color changing was observed in the negative control. Then, the accumulation of gold nanoparticles was approved with SEM.

Discussion and conclusion: Because of the specificity of *ipaH* gene in *S. flexneri*, the colorimetric assay with high sensitivity can be used for specific detection of *S. flexneri* in the clinical specimen and food samples.

Key words: *Shigella flexneri*, *ipaH* gene, colorimetric assay, gold nanoparticles

* Corresponding author
Received: June 1, 2015 / **Accepted:** December 30, 2015