

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 پایه نانوذرات طلا و الکتروفورز

ثریا سلیمی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران، salimi_sorayya@yahoo.com
مجتبی سلوتی*: 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، به کارگیری روش رنگ‌سنجی بر پایه نانوذرات طلا جهت تشخیص سریع شیگلا فلکسنری با استفاده از محصول تکثیر یافته *ipaH* است.

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

نتایج: هیبریداسیون پروب با محصول تکثیر یافته از ژن *ipaH* باعث تجمع نانوذرات طلا به شکل شبکه‌ای متصل به هم شد و در نتیجه منجر به تغییر رنگ مخلوط واکنش از قرمز به بنفش شد که این تغییر رنگ نشان‌دهنده وجود باکتری شیگلا فلکسنری در نمونه بود، در حالی که 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: به دلیل اختصاصی بودن ژن *ipaH* در گونه شیگلا فلکسنری، روش رنگ‌سنجی بر پایه نانوذرات طلا می‌تواند به عنوان 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

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

اسهال‌های عفونی یکی از مشکلات مهم بهداشتی در سراسر جهان به شمار می‌روند و هر ساله باعث ابتلا و مرگ و میر زیاد مبتلایان در کشورهای جهان سوم می‌شوند. در بین پاتوژن‌های عامل اسهال، شیگلا^۱ نقش مهمی در ایجاد اسهال‌های خونی و التهابی دارد. این بیماری عمدتاً از طریق شخص به شخص و یا از طریق آب یا غذا انتقال می‌یابد (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 روش‌های میکروبیولوژی مولکولی هستند. تشخیص این باکتری با روش کشت باکتریایی به دلیل وقت‌گیر بودن 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 قابل توجهی 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 به دلیل آلودگی آزمایشگاهی همراه با نتایج مثبت کاذب باشد (۴، ۵).

در سال‌های اخیر، استفاده از نانوذرات، به خصوص

نانوذرات فلزی در تحقیقات زیست‌پزشکی گسترش زیادی یافته است (۶). نانوذرات دارای خصوصیات ویژه‌ای از قبیل اندازه 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 به دلیل سمیت سلولی کم، استفاده شده‌اند (۸). به دلیل اینکه روش‌های 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، به طوری که تشخیص DNA با استفاده از نانوذرات طلا نسبت به سیستم‌های معمول تشخیص ژنومی، حدود ده برابر افزایش حساسیت و صدهزار برابر ویژگی بیشتری نشان می‌دهند (۹). هدف از پژوهش حاضر توسعه یک روش سریع با حساسیت و اختصاصیت بالا برای تشخیص باکتری شیگلا فلکسنری با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه نانوذرات طلا است (۱۰). اساس این روش بر پایه اتصال پروب مربوط به محصول PCR به نانوذرات طلا استوار است. بدین صورت که در صورت وجود قطعه ژنومی مورد نظر در نمونه و تکثیر آن توسط PCR، پروب مربوطه به محصول PCR متصل می‌شود و نانوذرات طلا به صورت آزاد و رها در محلول باقی می‌مانند و با اضافه کردن محلول نمک تجمع نانوذرات طلا و در نتیجه تغییر رنگ محلول واکنش اتفاق می‌افتد و در نبود این قطعه ژنی اتصال بین پروب و نانوذرات رخ می‌دهد و در نتیجه هیچ تغییر رنگی مشاهده نمی‌شود.

مواد و روش‌ها

کیت استخراج DNA، آنزیم *taq polymerase*، dNTP، بافر PCR، نشانگر اندازه 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 سویه موردنظر صورت گرفت. سپس این باکتری در محیط مولر هینتون آگار ساب کالچر داده شد.

استخراج DNA: به منظور استخراج ژنوم باکتری شیگلا فلکسنری، باکتری از محیط کشت مولر هینتون آگار به محیط نوترینت برات تلقیح شد و به مدت 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 سیناکلون، استخراج شد و برای استفاده در مراحل بعدی آزمایش داخل فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نحوه 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 موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. سپس برای اندازه‌گیری کیفی DNA خارج‌شده، از روش الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید استفاده شد.

طراحی آغازگر^۲ برای انجام PCR: در این مطالعه به منظور انجام PCR ژن *ipaH*، آغازگرهای جلویی و برگشتی با استفاده از نرم‌افزار ژن‌رانر^۳ طراحی و توسط نرم‌افزار آنالین بلاست^۴ تأیید شد. سپس سفارش ساخت آغازگرهای طراحی‌شده به شرکت سیناکلون 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 گرایانت 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 PCR ۱X، ۱/۵ mM MgCl₂، ۱/۵ mM dNTP، آغازگر جلویی و برگشتی هر کدام ۲۰ pmol، پلیمراز Taq 1 μ، DNA الگو ۱۰ ng که حجم نهایی برای هر واکنش ۳۰ میکرولیتر و چرخه‌های حرارتی استفاده‌شده به صورت 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- چرخه حرارتی استفاده شده 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

به محصول PCR صورت گیرد. سپس به تدریج با اضافه کردن محلول نمک ۰/۲ مولار به لوله‌ها وقوع یا عدم وقوع تغییر رنگ به صورت چشمی ثبت شد.

تعیین حساسیت و اختصاصیت آزمون رنگ‌سنجی:

برای سنجش اختصاصیت این آزمون به جای شیگلا فلکسنری از باکتری *E. coli* 0157 استفاده شد و برای نشان دادن 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 الکتروفورز سنجیده شد.

تصویربرداری SEM: تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی با استفاده از دستگاه SEM به منظور نشان دادن تجمع نانوذرات طلا در حضور باکتری شیگلا فلکسنری و یا عدم تجمع آن در صورت فقدان باکتری ذکر شده 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 خارج شده 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:

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 ۲ درصد الکتروفورز شد. برای رنگ‌آمیزی ژل از اتیدیوم بروماید استفاده شد و سپس توسط دستگاه ژل داک^{۱۱} تصویربرداری انجام شد.

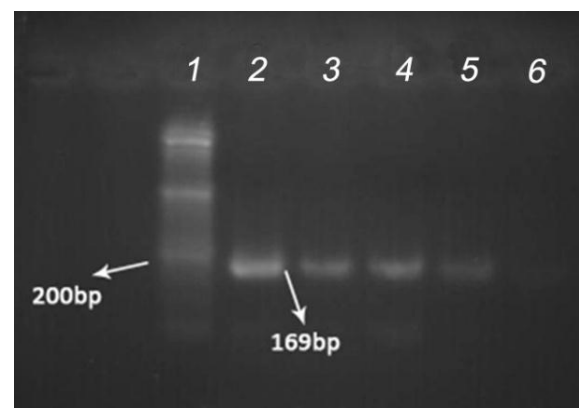
انجام آزمون رنگ‌سنجی جهت تشخیص باکتری

شیگلا فلکسنری: سفارش ساخت پروب استفاده شده در آزمون رنگ‌سنجی به شرکت MWG آلمان داده شد. برای اعمال دماهای مورد نیاز در آزمون‌های رنگ‌سنجی از دستگاه PCR گرادیانت استفاده شد. برای این منظور داخل میکروتیوب مقدار ۵ میکرولیتر بافر فسفات با $\text{pH}=7$ ، $200 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ محصول PCR و به مقدار $100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ پروب اضافه شد. سپس توسط دستگاه ترموسایکلر گرادیان به ترتیب دمای 95°C و به منظور دناتوراسیون به مدت ۲۰ دقیقه و دمای 43°C و به مدت ۱۰ دقیقه جهت واکنش هیبریداسیون اعمال شد. سپس میکروتیوب‌ها از دستگاه خارج شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نانوذرات طلا با $\text{OD}=1$ اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد تا اتصال پروب

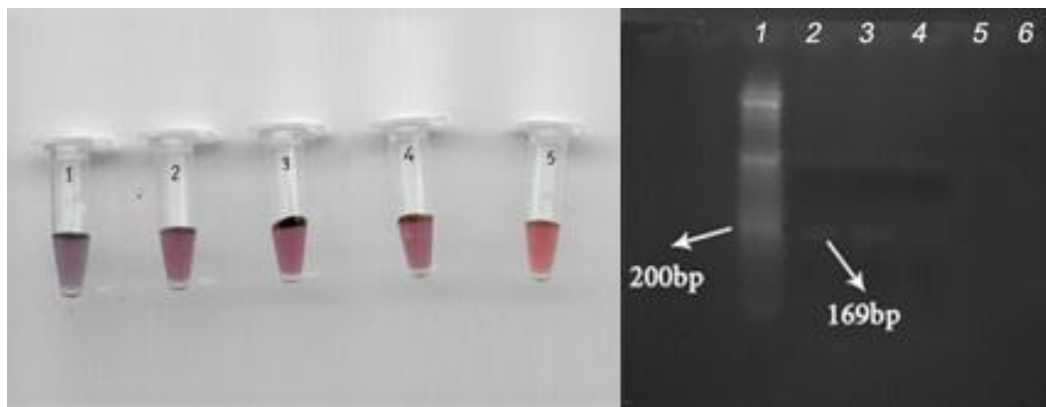
تشخیص باکتری شیگلا فلکسنری با روش رنگ‌سنجی: به تدریج پس از افزودن ۹ میکرولیتر محلول نمک ۰/۲ مولار به مخلوط واکنش حاوی نانوذرات طلا، بافر فسفات، محصول PCR و پروب، تجمع نانوذرات طلا با تغییر رنگ محلول حاوی باکتری شیگلا فلکسنری از قرمز به بنفش مشاهده شد. در حالی که در نمونه کنترل منفی هیچ تغییر رنگی مشاهده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

تعیین میزان حساسیت روش رنگ‌سنجی: آزمون رنگ‌سنجی و همچنین ژل الکتروفورز بر روی رقت‌های مختلف محصول PCR صورت گرفت و حساسیت این آزمون در مقایسه با ژل الکتروفورز سنجیده شد. بدین صورت که در ژل الکتروفورز رقت‌های ۱:۱۰ و ۱:۲ باندها 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 الکتروفورز است (شکل ۲).

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 ذکر شده دارای ۱۶۹ جفت باز بود (شکل ۱).



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



شکل ۲- سمت راست تصویر الکتروفورز، شماره ۱ مربوط به نشانگر، شماره (۲-۵) رقت‌های ۱:۲، ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۵۰ محصول PCR ژن *ipaH* باکتری شیگلا فلکسنری که فقط رقت‌های ۱/۲ و ۱/۱۰ باندها بسیار ضعیفی ایجاد کرده است. شماره ۶ کنترل منفی است. سمت چپ: لوله‌های آزمون رنگ‌سنجی؛ شماره ۱-۴ به ترتیب 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.

انجام نگرفته بود (شکل ۴).



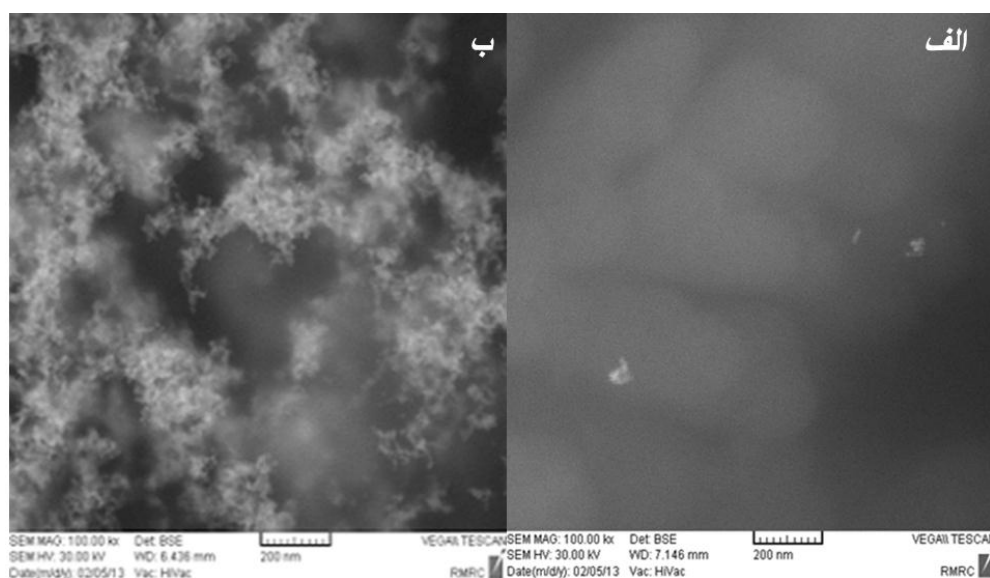
شکل ۳- لوله سمت راست تغییر رنگ نانوذرات طلا از رنگ قرمز به بنفش یعنی حضور باکتری شیگلا فلکسنری را نشان می‌دهد ولی در لوله سمت چپ به دلیل نبود باکتری شیگلا فلکسنری هیچ تغییر رنگی مشاهده نمی‌شود.

تعیین میزان اختصاصیت آزمون رنگ‌سنجی: برای

نشان‌دادن اختصاصی بودن آزمون رنگ‌سنجی از محصول PCR اختصاصی (باکتری شیگلا فلکسنری) و محصول PCR غیراختصاصی (باکتری *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، 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



شکل ۴- الف: به دلیل پخش بودن نانوذرات طلا تصویر به صورت یکنواخت است و هیچ گونه تجمعی مشاهده نمی‌شود ب: کتراست تصویر به دلیل 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 به دلیل بیماری‌زایی این باکتری حتی با مقادیر کم ارگانیزم و همچنین انتقال آسان آن از فردی به فرد دیگر و نیز آلوده شدن غیرمستقیم افراد از طریق مصرف مواد غذایی و آب آلوده بسیار آسان است (۱۱). با توجه به اهمیت درمان مؤثر بیماری که به شیگلوزیس مبتلا شده‌اند شناسایی زودهنگام عامل این بیماری بسیار ضروری است. در ایران طی سال‌های گذشته میزان شیوع باکتری شیگلا فلکسنری نسبت به سایر گونه‌ها بیشتر بود و به این دلیل مطالعه 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 مطالعه حاضر آزمایش PCR با اعمال گرادیانت دمایی در دماهای مختلف انجام شد و دمای بهینه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در گرادیانت دمایی 48°C به دست آمد. محصول PCR به اندازه ۱۶۹ bp ایجاد شد که از این محصول برای انجام آزمون رنگ‌سنجی استفاده شد. نانوذره استفاده شده در این بررسی دارای اندازه 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 عامل‌دار کردن 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 مطالعه حاضر نیز حساسیت و اختصاصیت این آزمون در مقایسه با ژل الکتروفورز 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 به شکل شبکه‌ای متصل به هم و در نتیجه تغییر رنگ مخلوط واکنش شد که این تغییر رنگ نشان‌دهنده وجود مولکول هدف در نمونه بود که به روش چشمی هم قابل تشخیص بود (۱۴). برای نشان دادن اختصاصیت آزمون رنگ‌سنجی از محصول PCR اختصاصی (باکتری شیگلا فلکسنری) و محصول PCR غیراختصاصی (*E coli 0157*) 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 نشان دادن 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 الکتروفورز سنجیده شد. بدین صورت که در ژل الکتروفورز رقت‌های ۱:۲ و ۱:۱۰ باند بسیار ضعیفی

- their biomedical applications. *Nanomaterials*. 2011; 1(1): 31-63.
- (7) Kazemi J, Ahmadi M, Dastmalchi Saeed 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 *Enterobacteriaceae*. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 4 (13) :139-160
- (12) Thong KL, Hoe SL, Puthuchery 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.
- 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 الکتروفورز است. با استفاده از میکروسکوپ SEM تجمع نانوذرات طلا در حضور باکتری *شیگلا فلکسنری*، و عدم تجمع آن در فقدان باکتری مشاهده شد. در مطالعه حاضر استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه 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 الکتروفورز انجام گیرد. همچنین می‌توان از این روش برای تشخیص باکتری ذکر شده 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

- (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 nanoparticles. *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* Identification 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