Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 38, No. 4, Oct. – Nov. 2016, Pages: 30-33

Original Article

Nanotechnology is the New Method for Rapid Detection of Vibrio Cholerae

Gholamreza Herfehdoost[1], Mahdi Kamali[1*], Minoo Sadri[2], Davod Zolfagari[1], Asgar Emamgholi[1]

[1]Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Department of Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

Received: 13 Mar, 2014 Accepted: 29 Apr, 2014

Abstract

Backgrounds and Objectives: Rapid identification of Vibrio cholera is important in epidemics and bioterrorism wars. On the other hand, the conventional method is time consuming and costly. The aim of this study was to develop a rapid, inexpensive and high sensitive method based on magnetic nanoparticles for trapping bacterial DNA.

Materials and Methods: In this study, biotinalated probes were used for trapping Vibrio cholerae DNA. Finally designed primers were used to detect bacteria.

Results: According to PCR identified results showed that only Vibrio cholera were identified, and; concluded that the biotinalated probe is specific for bacterium Vibrio choleraecholera.

Conclusions: According to the findings of this study, Sensitive and specific detection of the bacterium Vibrio cholerae is assessed and validated with this method efficiently. And in terms of time and at lowest costs are introduced an efficient method.

Keywords: Magnetic nanoparticles, Vibrio cholera, PCR, biotinalated probe

***Corresponding author:**
E-mail: Nanodrug85@yahoo.com

Citation: Herfehdoost Gh, Kamali M, Sadri M, Zolfagari D, Emamgholi A. Nanotechnology is the New Method for Rapid Detection of Vibrio Cholerae. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2016;38(4):30-33.

مقاله پژوهشی

روشی نوین برای شناسایی سریع باکتری ویبریو کلره آ به کمک فنآوری نانو

غلامرضا حرفه دوست[۱]، مهدی کمالی[۱*]، مینو صدری[۲]، داود ذوالفقاری[۱]، عسگر امامقلی[۱]

[۱*]مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
[۲]مرکز فناوری های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

دریافت: ۹۲/۱۲/۲۲ پذیرش: ۹۳/۲/۹

چکیده

زمینه و اهداف: شناسائی سریع ویبریو کلرا در اپیدمی‌ها و جنگ‌های بیوتروریسمی حائز اهمیّت می‌باشد. و از طرفی متکی به روش‌های مرسوم زمان بر و پر هزینه است. هدف از این مطالعه ابداع روشی سریع، ارزان و با حسّاسیّت بالا و مبتنی بر نانو ذرات مغناطیسی برای به دام انداختن DNA باکتری و شناسایی آن با استفاده از PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از پرو ب بیوتین‌دار برای به دام انداختن DNA باکتری ویبریو کلرا به کمک بید مغناطیسی استفاده شد و در نهایت با کمک پرایمرهای طراحی شده برای شناسائی باکتری به کمک تکنیک PCR بهره گرفته شد.

یافته‌ها: با توجه به نتایج PCR که فقط برای ویبریو کلرا باند داشت، نتیجه گرفته می‌شود که پروب بیوتین‌دار مختص باکتری ویبریو کلرا میباشد.

نتیجه‌گیری: حساسیت و اختصاصی‌بودن شناسایی باکتری ویبریو کلرا با روش‌های مذکور ارزیابی و تائید می‌گردد و از نظر زمان و هزینه، روشی با صرفه معرفی می‌گردد.

کلید واژه‌ها: نانوذرات مغناطیسی، ویبریوکلرا، PCR، پروب بیوتین‌دار

*ایمیل نویسنده رابط: Nanodrug85@yahoo.com

مقدمه

ویبریوکلرا، از خانوادهٔ ویبریوناسه، باکتری میله‌ای شکل خمیده، بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی و بدون تشکیل اسپور می‌باشد. و در حدود ۱/٤– ۲/٦ میکرون طول دارد. این باکتری قادر به متابولیسم از طریق تنفس و تخمیر است. ویبریوکلرا بر اساس آنتی ژن‌های A,B,C به سروتیپ‌های اگاوا، اینابا و هیکوجیما تقسیم می‌شود (۲-۱). ویبریوکلرا عامل وبا، یک بیماری اسهالی مرگبار است. این بیماری از طریق آب و غذای آلوده منتقل می‌شود و یک مشکل جهانی به حساب می‌آید. این بیماری با اپیدمی‌های سختی که تا به حال داشته است جان انسانهای زیادی را گرفته است. دوره نهفتگی این بیماری چند ساعت تا چند روز و به طور معمول درحدود ۲ تا ۵ روز است (٤-۳). روش‌های مرسوم شناسایی آن، شامل کشت، آزمایشات بیوشیمیایی و ایمونولوژی است که نیاز به وقت و هزینه بالایی دارند. از این رو گرایش به روش های مبتنی بر نانو برای شناسایی، مقرون به صرفه می‌باشد. احتمال گرفتن باند یا جواب مثبت از گذاشتن PCR با حجم پائینی از باکتری در محیط کشت یا نمونه کم می‌باشد. بر این اساس استفاده از پروب بیوتین‌دار برای به دام انداختن DNA باکتری در حجم‌های کمتر و جداسازی آن با استفاده از میدان مغناطیسی به عنوان ابزاری جدید وبا حسّاسیّت بالا برای غلبه به این مشکلات معرفی می‌گردد (۷-۵). هدف از این مطالعه توسعه روشی جدید برای جداسازی DNA اختصاصی ویبریو کلرا از سایر اسیدهای نوکلئیک است. بنابراین هدف طراحی پروب بیوتین‌دار و اختصاصی از ویبریو کلرا است. که با حرارت، DNA در محیط، تک رشته‌ای شده و به پروب بیوتینه متصل می‌گردد، به اویدین با هسته بید مغناطیسی موجود در محیط باند شده که بعد شستشو با پروتکل موجود با کمک میدان مغناطیسی جدا و شناسایی می‌گردد (۹-۸).

مواد و روش‌ها

در مورد باکتری‌ها و شرایط کشت آنها از محیط کشت‌های LB-Agar و LB-Broth از شرکت Merck استفاده گردید. باکتری در شرایط استریل کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه گردید.

جدول ۱: گونه باکتری هایی که در طرح استفاده شده است را با کد بین المللی آنها نشان میدهد.

باکتری	ویبریو کلرا	سودوموناس آئروژینوزا	شیگلا فلکسنری	اشریشیاکولی	کلبسیلا پنومونیه
کد بین المللی	۱٤۰۳۵	۲۷۵۸۳	۲۹۹۰۳	۲۵۹۹۲	۷۸۸۱

بر اساس رفرنس ارائه شده دو آغازگر پیش رو و پس رو طراحی و توالی آن جهت ساخت به شرکت ژن فناوران ارسال گردید (۱۰). توالی آغازگر پیش رو عبارت بود از:

5/-GAGCCGGCATTCATCTGAAT-3/ PRIMER F - (hlyA)

با (Temperature Melting,TM) برابر ۵۷/۳ درجه سانتی‌گراد

و توالی آغازگر پس رو عبارت بود از:

5/-CTCAGTGGACTAATACGGTTCA-3/ PRIMER R - (hlyA)

با TM برابر ۵۸/٤ درجه سانتی گراد

برای طراحی پروب بیوتین‌دار از ژنوم پروتئین سطحی omp ویبریو کلرا استفاده گردید. در قسمت ۵/ پروب به دام اندازنده ٦تا ۱۲ زنجیره CH_2 به عنوان فاصله‌انداز برای کم کردن ممانعت فضایی و در انتهای ۳/ پروتئین بیوتین به منظور اتصال به بید مغناطیسی طراحی و توسط شرکت ژن فناوران سفارش سنتز داده شد.

۵/-biotin-(CH2)-accatttgcctagccgtactt-3/

بید مغناطیسی با نام تجاری Dynabed M-280- Streptavidin توسط شرکت سینا ژن خریداری گردید.

از بافرهای xssc,2xssc,13xscc۱ تحت عنوان با فرهـای شستشـو و هیبرید استفاده گردید (۱۱).

B&w (2x): شامل مواد زیر می‌باشد.

mM tris-Hcl (PH=7.5), 2 M Nacl, 1mM EDTA۱۰

مطـابق جـدول ۲، غلظـت و حجـم‌هـای ذیـل بـرای انجـام PCR استفاده گردید.

جدول ۲: غلظت و حجم‌های مورد نظر برای انجام PCR

نام مواد	بافر x ۱۰	الیگو نوکلئوتید ها	کلرید منیزیم(۲)	پرایمر ۱	پرایمر ۲	آنزیم	آب مقطر	باکتری
غلظت	x ۱۰	۲/۵ میلی مولار	۵۰ میلی مولار	۱۰ پر مولار	۱۰ پر مولار	۵۰۰ واحد	—	—
حجم مورد استفاده برحسب میکرولیتر	۵	۴	۲	۲	۲	۰/۵	۳۳/۵	۱

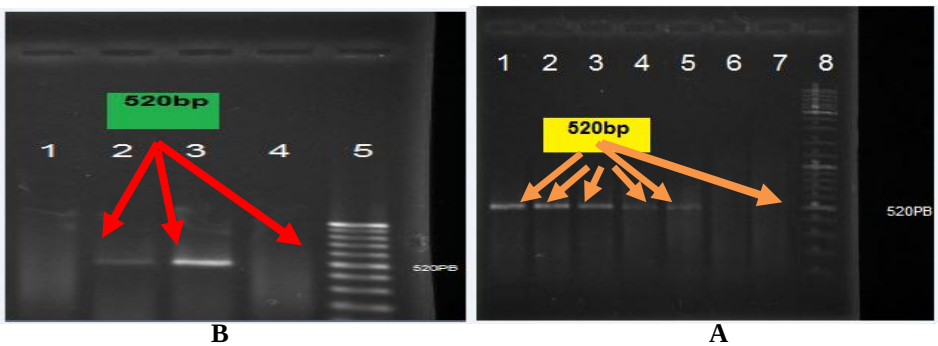
یافته‌ها

شکل شماره ۱ نتایج حاصل از PCR، که نشان‌دهنده اختصاصی‌بودن روش به کار رفته است و به عبارتی پروب به دام اندازنده بین ژنوم باکتری‌های بحث شده در قسمت مواد و روش-ها و نیز ژنوم باکتری ویبریو کلرا به طور اختصاصی فقط به ژنوم باکتری ویبریو متصل شده که با میدان مغناطیسی جدا و با کمک PCR شناسایی می‌گردد. و با توجه به اینکه شاهد باند فقط به کمک ژنوم باکتری ویبریو کلرا هستیم و این نتیجه نشان دهنده اختصاصی بودن پروب طراحی شده برای این باکتری می‌باشد و نمی‌تواند برای باکتری‌های دیگر هم مورد استفاده قرار بگیرد.

نتایج حاصل از PCR

شکل ۱: نتایج PCR (ژنوم باکتری ویبریو کلرا به همراه ژنوم سایر باکتری های معرفی شده در قسمت مواد و روش‌ها)

ستون شماره ۱ تا ۵ به ترتیب شامل باکتری‌های شیگلا، سودوموناس، اشریشیا کولی، مارکر، کلبسیلا، شماره ٦ ویبریو و۷ کنترل منفی، مطابق شکل با توجه به حضور ژنوم باکتری‌های فوق، در نتایج فقط با ویبریو کلرا باندی مشاهده می‌شود و به عبارتی فقط این باکتری شناسایی می‌گردد که نشان می‌دهد پروب طراحی شده فقط با ژنوم باکتری ویبریو کارا باند می‌شود که نشان دهنده اختصاصی بودن این پروب می‌باشد. شکل شماره ۲ برای نشان دادن میزان حسّاسیّت روش به کار رفته است. در این روش از ژنوم استخراج شده به کمک کیت بیوتین، رقت‌های مختلف تهیه شد، از پروب طراحی شده برای به دام انداختن یا اتصال به ژنوم باکتری استفاده و در نهایت از ژنوم جدا شده PCR گذاشته و نتایج بررسی گردید. بررسی حساسیت کار که مطابق شکل‌ها در A از پروب بیوتین دار استفاده شده ولی در B استفاده نشده است.



B A

شکل ۲: نشان دادن حساسیت کار

A: به ترتیب ستون‌های ۱تا۸ شامل مارکر، کنترل منفی، ۰/۳۱۲، ۰/٦۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ نانوگرم در ماکرولیتر می‌باشد.

B: به‌ترتیب ستون‌های ۱ تا ۵ شامل مارکر، ۱/۲۵، ۵، ۲/۵، ۰/٦۲۵ نانوگرم در ماکرولیتر می‌باشد.

در شکل A رقت‌های ۱۰ تا ۰/٦۲۵ دارای باند بود که در مقایسه با شکل B که از پرو ب بیوتین‌داری استفاده نشده است فقط در رقت‌های ۵ و ۲/۵ شاهد باند بودیم.که نشان می‌دهد حساسیت و کیفیت کار در گروه A بالاتر از گروه B است.

بحث

در PCR بدون استفاده از روشی برای به دام انداختن ژنوم باکتری، با توجه به نتایج حاصل در شکل شماره ۲ می‌توان بر این نکته اشاره داشت که با طراحی پرو ب به دام اندازنده نه تنها اختصاصی‌بودن کار ارزیابی می‌شود بلکه حتی با وجود تعداد کم باکتری در نمونه، حساسیت و کیفیت کار بالا می‌رود. و حتی با استفاده از پرو ب بیوتین‌دار قادر خواهیم بود حساسیت و اختصاصی روش شناسایی را خیلی بالاتر از حد انتظار بالا ببریم. با توجه به اینکه اولین فاکتور مهم در شناسائی عوامل عفونی در شرایط بحران تشخیص سریع بوده و از طرفی فاکتور هزینه‌ها هم مطرح می‌باشد فلذا دست‌یابی به روشی که بتواند این دو فاکتور را برای تشخیص حل کند لازم می‌باشد که در طرح انجام گرفته تا حدودی به این مهم دست یافته شده است و امید است بتوان به عنوان روشی نوین از آن بهره گرفت. Amagliani و همکاران برای شناسایی لیستر یا مونوسیتوژنز در آب از دایناپید استفاده کرده‌اند (۱۱). در روشی دیگر که توسط Thompson و همکاران ارائه شده است. شناسایی سالمونلا در آب با کمک پروب به دام اندازنده بوده است (۱۲). در مطالعه‌ای دیگر از نانو ذرات مغناطیسی جهت اتصال به آویدین استفاده کرده و با طراحی پروب بیوتین‌دار اقدام به، به دام انداختن DNA باکتری کرده‌اند (۱۳).

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعات اخیر و کارهایی که در امر شناسائی عوامل عفونی مطرح بوده است و به خصوص با ظهور علوم جدیدی چون نانو فناوری و کاربردهای فراوانی که این علم در کلیه علوم به خصوص زیستی و پزشکی دارد و نیز با توجه به هدفی که از ارائه و انجام این تحقیق دنبال می‌کند. می‌توان با بررسی نتایج حاصل به این باور دست پیدا کرد که با تکیه بر این علوم می‌توان به توانایی‌هایی وسیع در کلیه علوم پزشکی به خصوص در تشخیص و درمان بیماریها دست یافت، بسا که شناسایی باکتری ویبریو کلرا در تحقیق حاضر و یا سایر عوامل عفونی با این روش به صورت سریعتر و قابل اعتمادتر شناسایی می‌گردند و می‌توان امیدوار بود که در مواقع بحران یا عوامل تهدید بیولوژی بتوان قدمی محکم و وسیع در جهت مهار و درمان آن برداشت.

References

1. Scott Vw. Microbial Identification in the Pharmaceutica. Industry pharmacopeial Sept.-Oct. 2004; **30**(5): 16-23.
2. Faruque SM, Naser IB, Islam MJ, Faruque A, Ghosh A, Nair GB, et.al. Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; **102**(5): 1702.
3. Carlos Seas, Eduardo Gotuzzo. Cholera: Overview of Epidemiologic, herapeutic, and Preventive Issues Learned from Recent Epidemics. *International Journal of Infectious Diseases* 1996; **1**(1): 78-85.
4. Margaret Das. Antisera to selected outer membrane proteins of Vibrio cholerae protect against challenge with homologous and heterologous strains of V. cholera. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1998; **22**: 303-308.
5. Yang H, Li H, Jiang X. Detection of foodborne pathogens using bioconjugated nanomaterials. *Microfluidics and nanofluidics* 2008; **5**(5): 571-583.
6. Chatterjee a SN, Keya Chaudhuri. Lipopolysaccharides of Vibrio cholerae. *Biological functions, Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1762: 1-16.
7. Stefan Schild, Eric J. Nelson, Anne L. Bishop, Andrew Camilli. Characterization of Vibrio cholerae Outer Membrane Vesicles as a Candidate Vaccine for Cholera. *Infection and Immunity* 2009; **77**(1): 472-484.
8. Hyun Jung chung, Cesar M, Castro, Hyungsoon Im, Hakho Lee & Ralph Weissleder. A magneto – DNA nanoparticle system for rapid detection and phenotyping of bacteria. *Jornal of nature nanotechnology* 2013; **8**(2): 369-375.
9. Gopal H, Hassan H. K, Rodriguez Perez M.A, Toe L.D, Lustigman S, Unnasch T. R. Oligonucleotide based magnetic bead capture of Onchocerca volvulus DNA for PCR pool screening of vector black flies. *PLoS neglected tropical diseases* 2012; **6**(6): 85-99.
10. Singh D, Matte MH, Matte G, Jiang S, Sabeena F, Shukla B, et.al. Molecular Analysis of Vibrio choleraeO1, O139, non-O1, and non-O139 Strains: Clonal Relationships between Clinical and Environmental Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; **67**(2): 910-921.
11. Amagliani G, E. "Development of a magnetic capture hybridization PCR assay for Listeria monocytogenes direct detection in milk samples." *Journal of Applied Microbiology* 2006; **100**(2): 375-383.
12. Thompson D.E, Rajal V.B. "Detection of Salmonella spp. in water using magnetic capture hybridization combined with PCR or real-time PCR."*Journal of Water and Health* 2006.
13. Peijun Gong, Zheyang Peng, Yao Wang, Ru Qiao, Weixing Mao, Haisheng Qian and atal. Synthesis of streptavidin-coungucated magnetic nanoparticles for DNA detection. *J nanopart Res* 2013; **15**(1558): 1.