Journal of Military Medicine
2022, Volume 23, Issue 11
Pages: 875-882
doi 10.30491/JMM.23.11.875

Oriented T4 Bacteriophage Immobilization for *E- coli* Bacteria as A Potential Bioterrorism Agent Detection Based on Surface Plasmon Resonance Method

Ramezan-Ali Taheri [1], Naimeh Mahheidari [2], Sharareh Sajjadi [3*], Khadijeh Eskandari [1*]

[1] *Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[2] *Student Research Committee, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran*
[3] *Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran*

Received: 14 July 2021 **Accepted:** 14 February 2022

Abstract

Background and Aim: As a potential biological weapon, Escherichia coli (*E. coli*) is one of the most dangerous types of bacteria used in bioterrorism, which is responsible for many foodborne illnesses. In this study, a surface plasmon resonance biosensor (SPR) was designed to detect *E. coli* using oriented immobilization of T4 bacteriophage.

Methods: The surface of the gold disc was first modified with streptavidin. Then, the T4 bacteriophage was biotinylated. Optimization of biotin levels was performed using bacteriophage activity. After confirmation of bacteriophage biotinylation using the dynamic light scattering (DLS) method, T4 bacteriophage was oriented immobilized on the gold disk through the interactions between streptavidin and biotin.

Results: The equilibrium dissociation constant (KD) was found to be 10^{-17}, which showed the great affinity of bacteriophage to interact with *E. coli*. Using the designed biosensor, *E. coli* was detected in the concentration range of 10^{1} to 10^{9} bacteria per ml.

Conclusion: Label-free and fast detection of *E. coli* are the advantages of the proposed biosensor.

Keywords: *Escherichia coli*, T4 bacteriophage, Surface plasmon resonance, Biosensor.

*Corresponding authors: **Khadijeh Eskandari,** Email: kheskandari@alumni.ut.ac.ir; **Sharareh Sajjadi,** Email: sajadi@riau.ac.ir

مجله طب نظامی
دوره ۲۳، شماره ۱۱، بهمن ۱۴۰۰
صفحات: ۸۸۲-۸۷۵
10.30491/JMM.23.11.875

تثبیت جهت‌دار باکتریوفاژ T4 به‌منظور تشخیص سریع باکتری اشرشیاکلی به‌عنوان یک عامل بالقوه بیوتروریسم با استفاده از روش رزونانس پلاسمون سطحی

رمضانعلی طاهری[۱]، نعیمه ماه حیدری [۲]، شراره سجادی[۳*]، خدیجه اسکندری[۱*]

[۱] مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
[۲] کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران
[۳] گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

چکیده

زمینه و هدف: اشرشیاکلی، به‌عنوان یک سلاح زیستی بالقوه، یکی از خطرناک‌ترین انواع باکتری‌های مورد استفاده در بیوتروریسم است که مسئول بسیاری از بیماری‌هایی است که از طریق غذا منتقل می‌شوند. در این پژوهش، با استفاده از تثبیت جهت‌دار باکتریوفاژ، یک زیست حسگر رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) برای تشخیص باکتری *E. coli* طراحی شد.

روش‌ها: ابتدا سطح دیسک طلا با استرپتاویدین اصلاح گردید. سپس، باکتریوفاژ T4 بیوتیلینه شد. بهینه‌سازی مقادیر بیوتین با استفاده از بررسی فعالیت باکتری‌خواری آن انجام شد. بعد از تأیید بیوتینیله شدن باکتریوفاژها با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS)، باکتریوفاژ T4 از طریق برهم‌کنش میان استرپتاویدین و بیوتین به صورت جهت‌دار روی دیسک طلا تثبیت شد.

یافته‌ها: ثابت تعادل تفکیک (KD) $۱۰^{-۱۷}$ به‌دست آمد که نشان داد که تمایل برهم‌کنش باکتریوفاژ T4- باکتری اشرشیاکلی بسیار زیاد است. با استفاده از حسگر طراحی شده، غلظت باکتری در محدوده $۱۰^{۱}$ تا $۱۰^{۹}$ باکتری در میلی‌لیتر قابل شناسایی است.

نتیجه‌گیری: از مزایای حسگر طراحی شده می‌توان به عدم نیاز به برچسب‌گذاری و شناسایی سریع باکتری اشرشیاکلی اشاره نمود.

کلیدواژه‌ها: اشرشیاکلی، باکتریوفاژ T4، رزونانس پلاسمون سطحی، حسگر زیستی.

*نویسندگان مسئول: **خدیجه اسکندری.** پست الکترونیک: kheskandari@alumni.ut.ac.ir؛ **شراره سجادی.** پست الکترونیک: sajadi@riau.ac.ir
دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۴/۲۳ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۲۵

مقدمه

باکتری‌ها در زمینه‌های بسیار متنوع غذایی، زیستی، کشاورزی، بهداشت، نظامی و ... بکار می‌روند. برخی از باکتری‌ها مانند اشرشیاکلی (*Escherichia coli, E. coli*)، سالمونلا (*Salmonella*) و ویبریو کلرا (*Vibrio cholerae*) به عنوان سلاح‌های زیستی بالقوه معرفی شده‌اند. سلاح‌های میکروبی در عرصه میادین جنگی، اجتماعی و اقتصادی وسیله‌ای بسیار مطلوب برای دشمنان محسوب می‌شوند. توان تولید بالا، نگهداری راحت، قابلیت انتشار، قابلیت مصون‌سازی نیروی خودی، قابلیت تکثیر برای عوامل میکروبی زنده، دشواری بسیار در ردیابی فرد یا افراد متخاصم، گستردگی عمل‌کرد از انسان تا دام و محصولات کشاورزی و ... موجب شده گروه‌های تروریستی به این فناوری جدید به‌شدت متمایل شوند. سلاح‌های میکروبی به‌خصوص در عرصه تروریسم دولتی و علیه ساختارهای صنعتی ـ کشاورزی در سالیان اخیر بسیار به‌کار رفته است با این حال کشورهای هدف هرگز نتوانسته ادعا خود را به اثبات برسانند. اروپا شیوع جنون گاوی را متوجه سازمان‌های جاسوسی امریکا و استرالیا می‌داند که با هدف ضربه اقتصادی به صادرات گوشت اروپا انجام داده‌اند. چین در شیوع سارس امریکا را مقصر می‌داند که باعث شد به‌واسطه تعطیلی کارخانه‌هایش از گردونه رقابت تولید ارزان قیمت عقب بیفتد. کره شمالی شیوع وبا در پیونگ یانگ را در اواخر دهه ۸۰ نتیجه فعالیت جاسوس‌های امریکایی می‌داند که با هدف مجبور کردن این کشور به پذیرش شرایط دول اروپایی ـ امریکایی، برای قطع آزمایشات هسته‌ای انجام داده است و در سال‌های اخیر گسترش وبا در یمن همزمان با آغاز جنگ عربستان بر علیه مردم یمن حائز اهمیت است. تمامی این اتهامات در حد اتهامی باقی می‌ماند ولی آن‌چه مسلم است آن است که هر روز بسیاری از مناطق جهان در معرض خطر یک حمله بیوتروریستی هستند. بدیهی است که نیروهای نظامی، تنها جمعیت در معرض خطر برای حملات بیولوژیک نیستند بلکه اقشار مختلف در معرض خطر بوده و به منظور دفاع در مقابل اثرات ناتوان‌کننده بالقوه یک حمله، نیازمند کسب آگاهی و ایجاد ابزارهایی شناسایی سریع و مطمئن جهت خنثی‌سازی بموقع حمله تروریستی می‌باشد. تولید، استفاده و انتشار یک سلاح بیولوژیکی بسیار ارزان‌تر از بمب اتم بوده و کمتر احساسات جهانیان را بر می‌انگیزد و البته استفاده از این سلاح‌ها تا حدودی برای تروریست‌ها بی‌خطر می‌باشد. معمولا مشاهده پاتوژن‌ها و مقابله بر علیه آن‌ها مشکل است به عنوان مثال در صورت انتشار عامل اسهال در آب یک منطقه چند روز طول می‌کشد تا دوره کمون سپری شود و علائم بیماری ظاهر شود و این فرصت مناسبی برای تروریست‌ها است تا به اهداف خود برسند. انتقال عوامل هم از کشوری به کشور دیگر به وسیله مسافرهای معمولی آسان به نظر می‌رسد که همه این موارد نشان می‌دهد لزوم ساخت ابزار و حسگر شناسایی دقیق و سریع چقدر حائز اهمیت است. در این میان باکتری *E. coli* یکی از گونه‌های شناخته شده پروکاریوتی است که قدرت تکثیر بسیار بالایی دارد و به عنوان یک فلور طبیعی در بخش‌های انتهایی روده کوچک انسان زندگی می‌کند. در مدفوع روزانه هر انسان، به‌طور متوسط بین ۱۰۰ میلیارد تا ۱۰ تریلیون باکتری *E. coli* وجود دارد. بر همین اساس، از تست *E. coli* برای سنجش آلودگی آب به مدفوع، استفاده می‌شود. البته زیستگاه *E. coli* به روده پستانداران محدود نمی‌شود و سویه‌های مختلف آن می‌توانند در شرایط زیستی گوناگون رشد کنند. به دلیل جهش و نرخ بالای نوترکیبی، سویه‌های *E. coli* به‌طور روزافزونی در حال گسترش هستند. اگرچه بیشتر این سویه‌ها بی‌خطر و غیربیماری‌زا به شمار می‌روند، اما *E. coli*، به‌طور کلی، یک باکتری فرصت‌طلب محسوب می‌شود و برخی از سویه‌های آن می‌توانند بیماری‌های خطرناکی را در فرد ایجاد کنند و برخی از این سویه‌های بیماری‌زا، در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های رایج، مقاوم شده‌اند. سویه‌های O157-H7، سمی تولید می‌کند که می‌تواند منجر به بروز بیماری‌های خطرناکی شود. این سویه، یکی از اصلی‌ترین عوامل ایجاد مسمویت‌های غذایی به شمار می‌رود. سویه‌های مختلف *E. coli* می‌توانند هم در روده کوچک و هم در بخش‌های دیگر بدن، عفونت ایجاد کنند. بخشی از بیماری‌های ناشی از این عفونت‌ها عبارتند از: عفونت‌های دستگاه گوارش، مننژیت (التهاب پرده مغزی)، پریتونیت (التهاب صفاق)، ماستیت (التهاب پستان)، سپتیس (گندِ خونی) و نومونیای (التهاب ریه) گرم- منفی می‌باشد. عواملی مانند انواع جراحی‌ها و زخم‌های ناشی از پارگی، ممکن است سوراخ‌هایی را در روده کوچک ایجاد کنند. اگر *E. coli* بتواند از طریق این منافذ، از روده خارج شود و خود را به حفره شکمی برساند، معمولا موجب بروز پریتونیت می‌شود که در صورت عدم درمان فوری، منجربه مرگ بیمار خواهد شد. چنانچه این باکتری‌ها به مقدار زیادی در مواد غذایی یا منابع آب وارد شوند، می‌توانند به عنوان سلاح‌های زیستی مورد استفاده قرار گیرند (۱). *E. coli* یکی از خطرناک‌ترین انواع باکتری‌های مورد استفاده در بیوتروریسم است که مسئول بسیاری از بیماری‌هایی است که از طریق غذا منتقل می‌شوند. این باکتری، به ویژه در افراد جوان و دارای نقص سیستم ایمنی، می‌تواند موجب کولیت خونریزی‌دهنده و سندرم همولیتیک اورمیک شود (۲). اگرچه روش‌های گندزدایی در صنایع کشاورزی و صنایع غذایی پیشرفت کرده‌اند، کنترل *E. coli* همچنان یک چالش است (۳). از این رو، ارائه یک روش ساده و مقرون‌به‌صرفه مناسب برای تشخیص این باکتری در غذا، آب و هوا به عنوان نقش حیاتی آن در سلامت عمومی، بسیار مهم است. تشخیص *E. coli*، تنها راه مطمئن در درمان بیماری‌های ناشی از آن است. به‌علاوه، با تشخیص و حتی گاهی شمارش تعداد سلول‌های باکتری، می‌توان شدت آلودگی مدفوعی آب را تخمین زد و راهکارهای موثرتری را پیشنهاد کرد. به دلیل اهمیت تشخیص صحیح *E. coli*، راهکارهای مختلفی برای آن ارائه شده است. گرفتن آزمایش و نمونه مدفوع از بیمار و کشت باکتری یکی از

روش‌های معمول برای تشخیص آن محسوب می‌شود (۴). زیست حسگرهای نوین برپایه روش رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) می‌تواند به عنوان ابزاری قدرتمند در تشخیص دقیق و سریع عوامل میکروارگانیسم عمل کند.

رزونانس پلاسمون سطحی (Plasmon Resonance Surface) نوسان دانسیته-بار است که ممکن است در حد فاصل فلز و دی الکتریک وجود داشته باشد (۵). سیگنال SPR متکی به تغییرات ضریب شکست در میدان محو شونده (Evanescent Field) در سطح فلز است. با استفاده از این فناوری می‌توان، بدون نیاز به برچسب گذاری (Label free) و سریع، برهمکنش‌های بیوملکول‌ها بر روی سطح و ویژگی‌هایی از جمله سرعت و تمایل برهم کنش را به‌دست آورد (۶،۴).

در پژوهش حاضر، یک زیست حسگر سریع برای تشخیص باکتری *E. coli* بر پایه تثبیت جهت‌دار باکتریوفاژ روی دیسک طلا، طراحی شده است. لازم به ذکر است که این حسگر زیستی برای تشخیص باکتری *E. coli*، به عنوان یک مدل، طراحی شد و می‌تواند در آینده برای سایر عوامل بیماری‌زا نیز ساخته شود.

روش‌ها

مواد

بیوتین N- هیدروکسی سوکسینیمید استر (biotin-NHS)، استرپتاویدین (Streptavidin)، مونومر آنیلین (Aniline)، ۱-اتیل-۳- (۳-دی متیل آمینوپروپیل) کربو دی ایمید (EDC) و بافر ۲-N مورفولینو اتان سولفونیک اسید (MES) از شرکت سیگما آلدریچ آمریکا خریداری شد. محیط کشت LB آگار و نوترینت براث (Nutrient Broth)، پلی اتیلن گلیکول (PEG) ۶۰۰۰، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH2PO4)، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K2HPO4)، هیدروکلریک اسید (HCl) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) از شرکت مرک آلمان خریداری شد. باکتری اشرشیاکلی (*E. coli*) و باکتریوفاژ T4 از مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی (دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران) تهیه شد. برای ساخت تمامی محلول‌ها از آب دیونیزه، که توسط دستگاه آب خالص ساز مدل Milli-Q کمپانی میلیپور (Millipore) (۱۸ MΩ cm، بارنستد (Barnstead)، دوبوک، آمریکا) فوق خالص شده بود، استفاده شد. در تمامی آزمایش‌ها بافر فسفات (۰/۱M، pH = ۷) به عنوان الکترولیت مورد استفاده قرار گرفت. کلیه آزمایش‌ها در دمای اتاق انجام شد.

تهیه بستر زیست حسگر این گونه بود که ابتدا دیسک طلا با استرپتاویدین اصلاح شد. سپس، باکتریوفاژهای بیوتینیله شده از طریق برهم‌کنش استرپتاویدین- بیوتین روی دیسک طلای اصلاح شده تثبیت شد. در مرحله بعد، برهم‌کنش باکتریوفاژ با باکتری *E. coli* توسط حسگر زیستی با استفاده از روش رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) بررسی شد. همچنین، میزان تمایل برهم‌کنش باکتریوفاژ و *E. coli* با استفاده از ثابت تعادل تفکیک (KD) ارزیابی شد.

تجهیزات

مورفولوژی سطح دیسک طلای اصلاح شده با باکتریوفاژ توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM) مدل S-4160 ساخت کشور ژاپن مورد بررسی قرار گرفت. تمامی داده‌های SPR با استفاده از دستگاه Autolab ESPRIT (شرکت Ecochemie B.V. هلند) به‌دست آمد. برای اندازه‌گیری‌های SPR سیستم دو کاناله مورد استفاده قرار گرفت. نتایج اندازه‌گیری SPR به‌طور اتوماتیک با استفاده از نرم‌افزار data acquisition (version 4.3.1) دریافت شد و ارزیابی سینتیکی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار kinetic evaluation (version ۵) صورت گرفت.

روش کار

کشت باکتری *E. coli* و باکتریوفاژ

به منظور کشت باکتری *E. coli*، ابتدا ۲۰۰ mg نوترینت براث به یک لیتر آب دیونیزه اضافه شد. سپس، محلول فوق به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ °C قرار داده شد تا استریل شود. در مرحله بعد، ۲ ml از سوسپانسیون باکتریایی به آن اضافه و مخلوط شد. پس از هم زدن با سرعت ۱۵۰ rpm در دمای ۳۷ °C در فریزر در دمای ۸۰ °C- نگهداری شد (۷).

به منظور کشت باکتریوفاژ، ۲۰۰ µl از باکتریوفاژ T4 به محیط ذکر شده اضافه شد و به مدت یک‌شب در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ °C با سرعت ۱۵۰ rpm قرار داده شد. سپس، محیط مذکور به مدت ۱۰ دقیقه درون سانترفیوژ در ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا لاشه باکتری اشریشیاکلی در ته فالکون‌ها ته نشین شود. مایع رویی نیز حاوی باکتریوفاژ بود. سپس، جهت تغلیظ باکتریوفاژ، ۵۰ ml از محلول تغلیظ (حاوی ۱۰ گرم PEG ۶۰۰۰ و ۷/۵ گرم NaCl در PBS) به ۲۵۰ ml از مایع رویی اضافه شد و محلول نهایی به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ °C قرار داده شد. جهت تخلیص باکتریوفاژ، محلول حاصل با سرعت ۱۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شد. پس از حذف محلول رویی، رسوب فاژی در ۲ µl محلول PBS استریل حل شد و در دمای ۴ °C نگهداری شد (۸،۹).

تثبیت باکتریوفاژ روی دیسک طلا

قبل از تثبیت باکتریوفاژ ابتدا سطح دیسک طلا با محلول پیرانا (piranha) (مخلوط ۳ به ۱ اسید سولفوریک و هیدروژن پراکسید) و سپس آب دیونیزه شسته شد. تثبیت باکتریوفاژها روی الکترود دیسک طلا در سه مرحله انجام شد. در مرحله اول، باکتریوفاژها بیوتینیله شدند. برای این منظور، ۵۰ µL biotin-NHS (حل شده در DMSO با غلظت ۲۲ mg/ml) با ۵۰ µL از باکتریوفاژ مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هم زده شد و درنهایت با بافر اولیه PBS به حجم ۱ ml رسانده شد.

پس از ۴ ساعت هم زدن در دمای اتاق، مخلوط نهایی در دمای ۴ °C و به دور از نور محیط نگهداری شد. به این ترتیب، biotin-NHS به گروه‌های عاملی آمینی (NH_2) موجود در کپسید باکتریوفاژ اتصال می‌یابد (۱۰). در مرحله دوم، استرپتاویدین بر بیوچیپ طلا تثبیت شد. برای این منظور، ابتدا ۲۰ µL NHS با غلظت ۵۰ mg/ml با ۲۰ µL استرپتاویدین با غلظت ۰/۵ mg/ml (حل شده در بافر MES ، ۵۰ mM، pH = ۶) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس ۱۰ µL از EDAC (۱۰ mg/ml در بافرMES) با آن مخلوط شد و ۴۵ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد. ۲۰ µL از مخلوط فوق روی سطح الکترود قرار داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه اجازه داده تا به‌آرامی تبخیر صورت گیرد. سپس، الکترود ۳ بار با بافر MES شستشو داده شد تا EDAC و NHS اضافی شسته شوند. در مرحله سوم، بر روی الکترود حاوی استرپتاویدین مقدار ۳۰۰ µL از محلول باکتریوفاژ بیوتیلینه کپ و به‌دوراز نور به مدت یک شبانه روز در دمای محیط قرار داده شد تا عمل اتصال استرپتاویدین به بیوتین کامل گردد (۱۴-۱۱). در پایان این مرحله باکتریوفاژ به‌صورت جهت‌دار به سطح الکترود اتصال پیدا می‌کند.

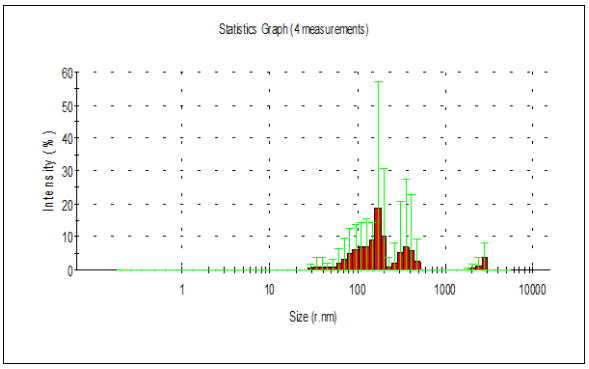
مطالعه برهمکنش باکتری *E. coli* با حسگر و رسم منحنی استاندارد

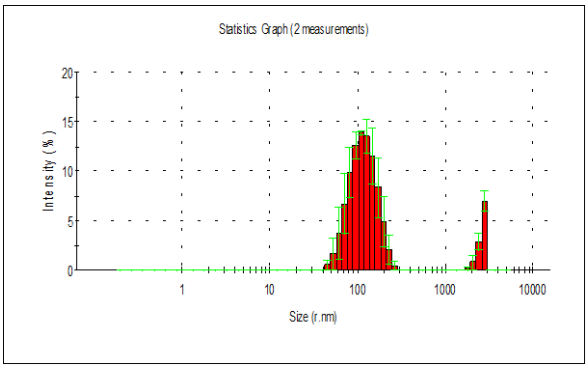
اندازه‌گیری کمی باکتری *E. coli* بر اساس تغییرات زاویه SPR انجام شد. برای اندازه‌گیری‌های SPR سیستم دو کاناله مورد استفاده قرار گرفت. به صورتی که کانال ۱ (کانال نمونه) شامل دیسک طلا/استرپتاویدین/باکتریوفاژ و کانال ۲ (کانال مرجع) شامل دیسک طلا بود که به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. سپس، رقت‌های سریالی از باکتری با غلظت‌های ۰ تا ۱۰×۱۰^{۱۰} باکتری در میلی‌لیتر به کانال ۱ تزریق شد و تغییر زاویه SPR ثبت شد و از روی پاسخ دریافت‌شده هر رقت، منحنی استاندارد مربوطه رسم شد. کلیه داده‌های سنتیکی تحت عنوان ارزیابی سنتیکی SPR در نرم‌افزار نسخه 5.4 (Ecochemie B.V) محاسبه شد (۱۵).

نتایج

بررسی بیوتینیله شدن باکتریوفاژ

همانطور که اشاره شد اولین مرحله تثبیت باکتریوفاژ بیوتینیله کردن آن است. پس از انجام مراحل بیوتینیله کردن باکتریوفاژ، انتظار می‌رفت که biotin-NHS به گروه‌های عاملی آمینی (NH2) موجود در کپسید باکتریوفاژ اتصال یابد. برای اطمینان از بیوتینیله شدن باکتریوفاژها ابتدا اندازه باکتریوفاژها قبل و پس از بیوتینیله شدن با استفاده از DLS بررسی شد. در شکل ۱ نتایج آزمایش DLS باکتریوفاژ عامل‌دار نشده (چپ) و عامل‌دار شده با بیوتین (راست) را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، اندازه باکتریوفاژهای بیوتینیله شده از باکتری‌های عامل‌دار نشده بیشتر بود که نمایانگر این است که بیوتینیله کردن باکتریوفاژها با موفقیت انجام شده است.

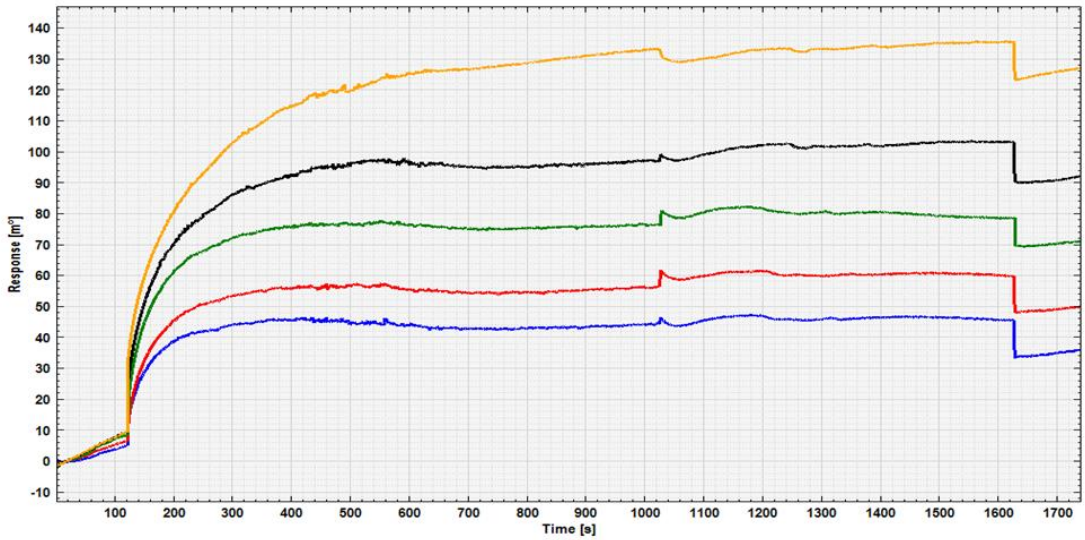




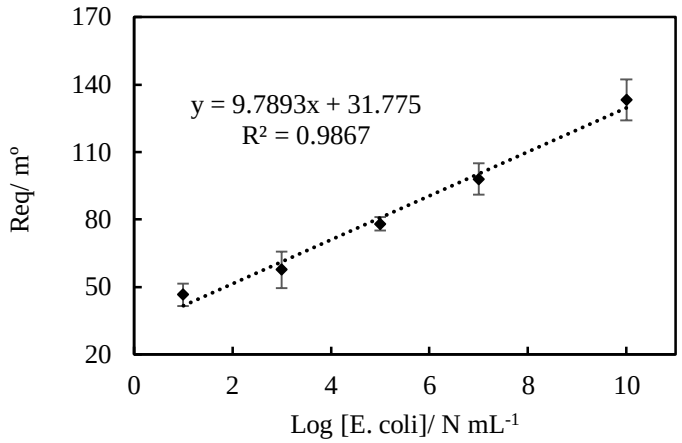
شکل-۱. طیف DLS باکتریوفاژ عامل‌دار نشده (چپ) و عامل‌دار شده با بیوتین (راست).

بررسی برهم‌کنش باکتریوفاژ با باکتری *E. coli*

به‌منظور بررسی سینتیک برهم‌کنش باکتری *E. coli* با باکتریوفاژ، ابتدا باکتریوفاژها روی دیسک طلا تثبیت شدند. سپس، غلظت‌های مختلف باکتری *E. coli* از روی دیسک طلای حاوی باکتریوفاژ عبور داده شد و زاویه رزونانس نسبت به زمان توسط دستگاه SPR ثبت شد. میزان تمایل برهم‌کنش باکتریوفاژ و *E. coli* با استفاده از ثابت تعادل تفکیک (KD)ارزیابی شد. KD با برازش پاسخ نمودارهای جابجایی زاویه‌ای (شکل ۲) در نرم افزار ارزیابی سینتیکی نسخه ۵. ۴ به‌دست آمد. داده‌ها بر اساس مدل ساده لانگمویر (Langmuir) ۱:۱ (A + B → AB) برازش (fit) شد، که در آن ملکول‌های A و B کمپلکس AB را تشکیل می‌دهند. A نمونه تزریقی باکتری، B نمونه تثبیت شده فاژ و AB بیوکمپلکسی است که در اثر بر هم‌کنش فاژ با باکتری ایجاد می‌شود (۱۶،۱۷). در طیف‌سنجی رزونانس پلاسمون سطحی، پاسخ با میزان کمپکس AB تشکیل شده و حداکثر پاسخ با نمونه باکتریوفاژ تثبیت شده متناسب است. KD برهم‌کنش باکتری *E. coli* و باکتریوفاژ $۱۰^{-۱۷}$ به‌دست آمد، که با برهم‌کنش‌های قوی نظیر آویدین- بیوتین قابل مقایسه است. لازم به ذکر است که به علت وجود جایگاه‌های بسیار زیاد اتصال اختصاصی فاژ به باکتری، میزان تمایل برهم‌کنش بسیار بالا (KD بسیار منفی) است.



شکل-۲. نمودار برهم‌کنش غلظت‌های مختلف باکتری *E.coli* (به ترتیب از پایین به بالا ۱۰^۱، ۱۰^۳، ۱۰^۵، ۱۰^۷، ۱۰^۹ باکتری در میلی‌لیتر) با باکتریوفاژ که توسط اسپکتروسکوپی پلاسمون رزونانس سطحی بررسی شده است.



شکل-۳. منحنی کالیبراسیون اندازه‌گیری غلظت باکتری *E. coli* توسط باکتریوفاژ با اسپکتروسکوپی پلاسمون رزونانس سطحی (داده‌ها میانگین سه بار تکرار هستند). لگاریتم تعداد باکتری *E. coli* در میلی‌لیتر: y، زاویه رزونانس پلاسمون سطحی: Req/ m°

منحنی کالیبراسیون تشخیص باکتری *E. coli*

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت باکتری (به ترتیب از پایین به بالا ۱۰^۱، ۱۰^۳، ۱۰^۵، ۱۰^۷، ۱۰^۸ × ۳ باکتری در میلی‌لیتر) پاسخ تغییرات زاویه رزونانس افزایش یافت. در شکل ۳ ارتباط میزان تغییر زاویه رزونانس با غلظت باکتری، به عنوان منحنی کالیبراسیون تشخیص باکتری، نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود نمودار کالیبراسیون در محدوده ۱۰^۱ تا ۱۰^۹ باکتری در میلی‌لیتر خطی بود (شکل ۳).

بحث

باکتری‌ها عملکرد و کاربرد متنوعی در زمینه‌های مختلف زندگی انسان دارند که مهمترین آن در بخش سلامت است. قابلیت تکثیر سریع و ارزان، حمل و نگهداری راحت و شیوع گسترده و همگانی آن موجب شده تا باکتری‌ها از دیرباز مورد توجه دشمن واقع شود.

عوامل سلاح میکروبی از طریق جنگ‌افزارهای گوناگون منتشر می‌شوند که از جمله آن بسته‌های مراسلاتی، هواپیماهای سبک سمپاش یا بدون سرنشین مخزن‌دار، اشیا و وسایل مصرفی- بهداشتی و آرایشی، آفات نباتی، حشرات و جوندگان ناقل و تنقلاتی مانند شکلات‌ها یاد می شود. اصولاً جاسوسان و عوامل خود فروخته داخلی می‌توانند با هر وسیله‌ای به انتشار میکروب‌ها یا فرآورده‌های کشنده آن‌ها مبادرت نمایند و با تأثیر آنی یا دراز مدت در محیط اجتماعی یا مواد غذایی و آب امنیت نظامی و اقتصادی کشور را به مخاطره بیندازند (۱۸).

عوامل و ابعاد سلاح های میکروبی بسیار متنوع هستند و از این‌رو شناسایی این عوامل همواره دشوار و پیچیده بوده و روش‌های بسیار متنوعی برای آن‌ها وجود دارد. برخی از روش‌ها از سال‌های پیش مورد استفاده قرار گرفته‌اند، اما برخی همچنان در حال توسعه هستند. روش‌های سنتی مبتنی بر کشت باکتری و شمارش کلونی‌ها روش‌های میکروبیولوژیکی حساس و قابل اعتمادی هستند، این روش‌ها زمان‌بر بوده و علاوه‌بر این، اغلب قبل از شناسایی یک

سری از آزمایش‌های پیچیده لازم است. استفاده از آنتی‌بادی ثانویه و/ یا مراحل نشاندار کردن نیز گرچه حساس‌اند، لیکن زمان‌بر و گران هستند (۱۹). برای شناسایی و تشخیص سریع و بموقع عوامل بیوتروریسم مشکلات بسیار زیادی وجود دارد که مستلزم طراحی روش‌های نوین و دقیق است. لازم به ذکر است که امروزه روش‌هایی مورد توجه قرار گرفته‌اند که توانایی شناسایی طیف وسیعی از عوامل بیولوژیک با پتانسیل کاربرد در بیوترویسم به صورت همزمان داشته باشد. این وسایل بایستی قابل حمل بوده، کاربری ساده داشته باشند و پیچیده نباشند. در بین این روش‌ها زیست حسگرهایی مانند SPR جایگاه ویژه‌ای در شناسایی سریع و دقیق عوامل میکروبی دارند که با به کار بردن آن می‌توان بر بسیاری از مشکلات فائق آمد. این زیست حسگرها قابلیت حمل در محل دارند و سادگی استفاده از آن‌ها برای کاربر موجب شده افراد عادی غیر متخصص هم به‌راحتی استفاده کنند و نیز پرتابل بوده و قابلیت شناسایی همزمان چندین عامل مهاجم را دارد. از این‌رو تحقیق و طراحی این زیست حسگرهای نوین و به روز امری مهم و اجتناب ناپذیر است. روش SPR روشی نوین با دقت و حساسیت بسیار بالا می‌باشد که مبتنی بر تکنیک برچسب آزاد است و می‌تواند همزمان چندین عامل میکروبی را شناسایی کند. در این تحقیق از ویروس باکتریوفاژ جهت شناسایی باکتری *E. coli* به روش SPR استفاده می شود. ویروس باکتریوفاژ نسبت به شناسایی این سویه بیماریزا از باکتری *E. coli* گزینشی عمل نموده و البته تکثیر آن بسیار راحت و ارزان است لذا از نظر هزینه و تولید بسیار مقرون به صرفه‌تر از آنتی‌بادی می‌باشد. برای این منظور ابتدا دیسک طلا با استرپتاویدین اصلاح گردید سپس باکتریوفاژ بهینه شده با بیوتین به آن متصل شد و به همین سادگی و سرعت بستری جهت شناسایی باکتری *E. coli* مهیا شد. سپس با دستگاه SPR حضور باکتری *E. coli* کنکاش گردید. همان‌طور که ذکر شد این زیست حسگر قابلیت شناسایی $۱۰^{۱}$ تا $۱۰^{۹}$ باکتری در میلی‌لیتر را دارد که نسبت به سایر زیست حسگرهای شناسایی باکتری *E. coli* قابل قبول است و حساسیت بسیار مناسبی دارد برای این منظور مقایسه‌ای در جدول ۱ آورده شده است.

جدول-۱. مقایسه گستره تشخیصی زیست حسگرهای مختلف تشخیص باکتری *E. coli* با روش حاضر

بستر	روش	گستره تشخیصی	مرجع
نانوذرات طلا	آمپرومتری	بالای ۰/۰۱ pM	۲۰
سیلیکون	امپدانس	$۱۰^{۴}$–$۱۰^{۷}$ CFU/ml	۲۱
آپتامر	ولتامتری	$۱۰^{۱}$–$۱۰^{۵}$ CFU/ml	۲۲
نانوذرات طلا	امپدانس	$۱۰^{۷}$ CFU/ml^{-1}	۲۳
تیول	امپدانس	۱۱۲ CFU/ml^{-1}/milk	۲۴
دیسک طلا	SPR	$۱۰^{۱}$-$۱۰^{۹}$ N.ml^{-1}	این پژوهش

نتیجه‌گیری

با استفاده از تثبیت جهت‌دار باکتریوفاژ زیست حسگر رزونانس پلاسمون سطحی برای تشخیص باکتری *E. coli* زیست حسگری با حساسیت قابل قبول طراحی شد. بررسی ثابت تعادل تفکیک (KD)، که با استفاده از SPR به‌دست آمد، نشان داد که تمایل برهم‌کنش باکتریوفاژ- باکتری بسیار زیاد است. زیست حسگر ساخته شده بر اساس رزونانس پلاسمون سطحی از مزایایی مانند توان عملیاتی بالاتر نسبت به حسگرهای دیگر، حداقل دخالت انسان و مصرف نمونه کمتر برخوردار است. این زیست حسگر می تواند آلودگی باکتریایی آب، مواد غذایی و نمونه های دیگر را با سرعت و حساسیت بسیار بالا شناسایی کند لذا برای مقابله با بیوتروریسم بسیار مناسب است و بدون نیاز به کاربر متخصص، به‌خوبی توسط افراد مبتدی جهت ایمن سازی محیط عملیاتی استفاده می شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از موسسه ملی توسعه تحقیقات پزشکی ایران (نیماد) برای ارائه کمک‌های مالی برای انجام این کار سپاسگزارند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

نکات بالینی کاربردی برای جوامع نظامی

- این زیست حسگر قابلیت تعمیم به سایر عوامل میکروبی را دارد و می‌تواند همزمان ده‌ها مورد را شناسایی کرده و گزارش دهد. با توسعه و عملیاتی کردن این زیست حسگر می‌توان آب و مواد غذایی سربازان مرزی را به‌طور مستمر کنترل کرد و حمله بیوتروریسمی دشمن را خنثی کرد همچنین در بحث پدافند غیرعامل نیز بسیار موثر است و با رصد دائمی میکروارگانیسم‌های خطرناک می‌توان امنیت غذایی و بهداشتی جامعه را تامین نمود.

منابع

1. Tumbarski YD. Foodborne zoonotic agents and their food bioterrorism potential: A review. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 2020;23(2):147-59. doi:10.15547/bjvm.2232
2. Zhang X, Shi C, Liu Z, Pan F, Meng R, Bu X, et al. Antibacterial activity and mode of action of ε-polylysine against Escherichia coli O157: H7. Journal of Medical Microbiology. 2018;67(6):838-45. doi:10.1099/jmm.0.000729
3. Laster BA, Harris KB, Lucia LM, Castillo A, Savell JW. Efficacy of trimming chilled beef during fabrication to control Escherichia coli O157: H7 surrogates on subsequent subprimals. Meat science. 2012;90(2):420-5. doi:10.1016/j.meatsci.2011.08.011
4. Torun Ö, Boyacı İH, Temür E, Tamer U. Comparison of sensing strategies in SPR biosensor for rapid and sensitive enumeration of bacteria. Biosensors and Bioelectronics. 2012;37(1):53-60. doi:10.1016/j.bios.2012.04.034
5. Homola J, Yee SS, Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors. Sensors and actuators B: Chemical. 1999 Jan 25;54(1-2):3-15. doi:10.1016/S0925-4005(98)00321-9
6. Tassa C, Duffner JL, Lewis TA, Weissleder R, Schreiber SL, Koehler AN, et al. Binding affinity and kinetic analysis of targeted small molecule-modified nanoparticles. Bioconjugate chemistry. 2010;21(1):14-9. doi:10.1021/bc900438a
7. Morales-Morales HA, Vidal G, Olszewski J, Rock CM, Dasgupta D, Oshima KH, et al. Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water. Applied and Environmental Microbiology. 2003;69(7):4098-102. doi:10.1128/AEM.69.7.4098-4102.2003
8. Tolba M, Minikh O, Brovko LY, Evoy S, Griffiths MW. Oriented immobilization of bacteriophages for biosensor applications. Applied and environmental microbiology. 2010;76(2):528-35. doi:10.1128/AEM.02294-09
9. Favrin SJ, Jassim SA, Griffiths MW. Development and optimization of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for detection of Salmonella enterica serovar Enteritidis in broth. Applied and Environmental Microbiology. 2001; 67(1):217-24. doi:10.1128/AEM.67.1.217-224.2001
10. Gervais L, Gel M, Allain B, Tolba M, Brovko L, Zourob M, et al. Immobilization of biotinylated bacteriophages on biosensor surfaces. Sensors and Actuators B: Chemical. 2007;125(2):615-21. doi:10.1016/j.snb.2007.03.007
11. Pantůček R, Doškař J, Růžičková V, Kašpárek P, Oráčová E, Kvardová V, et al. Identification of bacteriophage types and their carriage in Staphylococcus aureus. Archives of virology. 2004; 149(9):1689-703. doi:10.1007/s00705-004-0335-6
12. Kahánková J, Španová A, Pantůček R, Horák D, Doškař J, Rittich B. Extraction of PCR-ready DNA from Staphylococcus aureus bacteriophages using carboxyl functionalized magnetic nonporous microspheres. Journal of Chromatography B. 2009; 877(7):599-602. doi:10.1016/j.jchromb.2009.01.006
13. Závěta K, Lančok A, Maryško M, Pollert E, Horák D. Superparamagnetic properties of γ-Fe2O3 particles: Mössbauer spectroscopy and dc magnetic measurements. Czechoslovak Journal of Physics. 2006;56(3):E83-91. doi:10.1007/s10582-006-0474-y
14. Barrangou R, Yoon SS, Breidt Jr F, Fleming HP, Klaenhammer TR. Characterization of six Leuconostoc fallax bacteriophages isolated from an industrial sauerkraut fermentation. Applied and Environmental Microbiology. 2002;68(11):5452-8. doi:10.1128/AEM.68.11.5452-5458.2002
15. Saberi F, Kamali M, Taheri RA, Ramandi MF, Bagdeli S, Mirnejad R. Development of surface plasmon resonance-based immunosensor for detection of Brucella melitensis. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2016;27:1960-5. doi:10.5935/0103-5053.20160085
16. Feng YE, Chen CJ, Su LH, Hu S, Yu J, Chiu CH. Evolution and pathogenesis of Staphylococcus aureus: lessons learned from genotyping and comparative genomics. FEMS microbiology reviews. 2008;32(1):23-37. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00086.x
17. Bae T, Baba T, Hiramatsu K, Schneewind O. Prophages of Staphylococcus aureus Newman and their contribution to virulence. Molecular microbiology. 2006;62(4):1035-47. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05441.x
18. Hadian B, Moghasemi A. Bioterrorism, A Threat to General Health. Yafteh. 2017;19(3):33-40. [In Persian]
19. Ashiani D, Keihan AH, Rashidiani J, Dashtestani F, Eskandari K. Oriented t4 bacteriophage immobilization for recognition of escherichia coli in capacitance method. International Journal of Electrochemical Science. 2016;11(12):10087-95. doi:10.20964/2016.12.16