A non-invasive electrochemical genosensensor for detection of c. *difficile*

ABSTRACT

Antibiotic-associated diarrhea refers to diarrhea that develops in a person who takes antibiotics. Clostridioides difficile is the most serious causes of antibiotic-associated diarrhea infection. C. difficile causes antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis mostly by secreting two major toxins called toxin A (TcdA) and toxin B (TcdB). These toxins commonly have been used as targets for the detection of C. difficile infection (CDI) in both conventional diagnostic methods and biosensors. In the present work a non-invasive electrochemical genosensor is proposed for detection of bacterium. At first step, the genome is extracted from C. difficile-infected fecal specimens. Guanidium thiocyanate, sarkosyl, and 2-mercaptoethanol are used to lysis the bacterial cell wall. Then, silica nanoparticles are used to separate DNA from the lysate. Thereafter, a glassy carbon electrode coated with gold nanoparticle-reduced graphene oxide nanocomposite is used as the working electrode. Then, its surface is modified using a simple thiolated linear oligonucleotide as the bioreceptor. An electroactive complex molecule namely hexaferrocenium tri-hexa-isothiocyanato iron (III) trihydroxonium (HxFc) is used as an intercalator so that its redox signal is directly dependent to the concentration of target. The electrochemical signal is detected by using differential pulse voltammetry. Scan rate studies indicated an irreversible single electron transfer kinetics for HxFc. This genosensor is highly sensitive with a limit of detection of 0.2 femto-molar, and a linear response range of 0.5–1900 femto-molar. Also, the genosensor indicates the responses in the mentioned linear range toward the genome extracted from either toxigenic or non-toxigenic strains of C. difficile.

Keywords: Clostridioides difficile, Electrochemical genosensor, Hexaferrocenium cation, Reduced graphene oxide, Surface layer protein

ژنوسنسور الکتروشیمیایی غیر تهاجمی برای تشخیص باکتری سی دیفیسیل

به طور کلی، ممکن است کلستریدیوم دی فیسیل در افرادی که آنتی بیوتیک مصرف می کنند موجب عفونت و اسهال گردد. به همین دلیل به این نوع اسهال، اسهال مرتبط با آنتی بیوتیک گفته می شود. بدین ترتیب، این باکتری باعث اسهال مرتبط با آنتی بیوتیک و کولیت کاذب غشایی می شود که عمدتاً با ترشح دو سم اصلی به نام های سم الف و سم ب، همراه می باشد. معمولاً در روش‌های تشخیصی مرسوم و همچنین در حسگرهای زیستی، برای تشخیص این باکتری از این سموم به عنوان مارکر استفاده می‌شود. در کار حاضر یک ژنوسنسور الکتروشیمیایی غیر تهاجمی برای تشخیص باکتری پیشنهاد شده است. در مرحله اول، ژنوم از نمونه های مدفوع آلوده به باکتری استخراج می شود. گوانیدیم تیوسیانات، سارکوزیل و ۲- مرکاپتواتانول برای لیز دیواره سلولی باکتری استفاده می شود. سپس از نانوذرات سیلیکا برای جداسازی DNA استفاده می شود. پس از آن، یک الکترود کربن شیشه ای پوشش داده شده با نانوکامپوزیت اکسید گرافن احیا شده با نانوذرات طلا به عنوان الکترود کار استفاده می شود. سپس، سطح آن با استفاده از یک الیگونوکلئوتید خطی تیوله ساده به عنوان گیرنده زیستی اصلاح می‌شود. یک مولکول کمپلکس الکترواکتیو به نام هگزافروسنیوم تری-هگزا-ایزوتیوسیاناتو آهن (III) تری هیدروکسونیوم به عنوان یک اینترکلیتور استفاده می شود به طوری که سیگنال ردوکس آن مستقیماً به غلظت هدف بستگی دارد. سیگنال الکتروشیمیایی با استفاده از ولتامتری پالس تفاضلی تشخیص داده می شود. این ژنوسنسور با حد تشخیص ۰.۲ فمتومولار، و گستره پاسخ خطی ۰.۵ تا ۱۹۰۰ فمتومولار، دارای حساسیت بالایی در تشخیص باکتری است. همچنین، ژنوسنسور در محدوده خطی ذکر شده به ژنوم استخراج‌شده از سویه‌های سمی یا غیرسمی باکتری پاسخ می‌دهد.

کلستریدیوم دی فیسیل، ژنوسنسور الکتروشیمیایی، کاتیون هگزافروسنیوم، اکسید گرافن احیا شده، پروتئین لایه سطحی