AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences
Alborz University of Medical Sciences Journal, Summer 2026, Vol. 15, No 3: 314-327

Investigation of carbonic anhydrase-encoding genes and introduction of β-carbonic anhydrase as a molecular target for the detection of Escherichia coli

Afagh Kiani1
Sara Minaeian[2]
Bijan Bambai[3]
Reza Zolfaghari Emameh[1,*]

1 Department of Energy and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
2 Antimicrobial Resistance Research Center, Institute of Immunology and Infectious Diseases, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 Department of Systems Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

* Correspondong author:
zolfaghari@nigeb.ac.ir

Abstract

Introduction: Escherichia coli is one of the most important bacterial indicators of fecal contamination and is frequently used as a microbiological indicator for assessing the sanitary quality and safety of water, particularly drinking water. Therefore, the development of rapid, reliable, accessible, and specific methods for detecting E. coli contamination in water sources is essential for effective microbiological quality control and the prevention of waterborne infections. Carbonic anhydrases (CAs) are metalloenzymes involved in diverse physiological processes and are classified into several distinct evolutionary families, including the α-, β-, and γ-CA classes. The genes encoding these enzymes exhibit considerable sequence diversity among bacterial genera and species, making them potentially valuable targets for species-specific molecular detection. Polymerase chain reaction (PCR) provides a rapid and sensitive molecular approach for detecting specific microbial genetic targets. This study aimed to identify and evaluate suitable carbonic anhydrase-encoding genes as potential molecular targets for the specific detection of E. coli in water samples.

Methods: Bioinformatic analyses demonstrated that E. coli possesses 19 distinct carbonic anhydrase enzymes, comprising 1 α-CA, 12 β-CAs, and 6 γ-CAs. The corresponding carbonic anhydrase-encoding genes were systematically evaluated to identify suitable targets for molecular detection. Among the identified genes, one α-CA, one β-CA, and one γ-CA gene were selected for experimental evaluation. Specific primers were designed for the selected target sequences, followed by extraction of E. coli genomic DNA and assessment of DNA concentration and purity using a NanoDrop spectrophotometer. PCR reaction mixtures were subsequently prepared, and amplification of the selected target sequences was performed. The resulting PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis, and the amplified bands were subjected to sequencing to confirm the identity and specificity of the detected target sequences. Because the study did not involve human or animal subjects or samples, an institutional ethics approval code was not required. All experimental procedures involving E. coli were conducted under Biosafety Level 1 (BSL-1) conditions. The study was supported by Grants 815 and 847 from the National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB) and Grant 4003899 from the Iran National Science Foundation (INSF). No artificial intelligence tools were used in the design, analysis, or preparation of this study.

Results: Among the three selected carbonic anhydrase gene targets representing the α-, β-, and γ-CA families, the β-CA-encoding sequence demonstrated successful and specific amplification

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]

.Copyright © 2026 The Authors. Published by Alborz University of Medical Sciences
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
.Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences
Alborz University of Medical Sciences Journal, Summer 2026, Vol. 15, No 3: 314-327

Investigation of carbonic anhydrase-encoding genes and introduction of β-carbonic anhydrase as a molecular target for the detection of Escherichia coli

Afagh Kiani[1]
Sara Minaeian[2]
Bijan Bambai[3]
Reza Zolfaghari Emameh[1,*]

for the detection of E. coli. The complete molecular detection procedure could be accomplished within approximately 2–3 hours, providing a considerably shorter turnaround time than conventional microbiological and biochemical identification procedures. These conventional approaches include a combination of biochemical assays, such as Triple Sugar Iron (TSI) agar, Voges–Proskauer (VP), indole production, citrate utilization, and urease tests, which generally require additional time for bacterial growth and phenotypic characterization. Sequencing of the amplified PCR product further confirmed the identity of the target sequence, supporting the suitability of the β-CA-encoding gene as a molecular target for E. coli detection.

Conclusion: The findings of this study suggest that the β-carbonic anhydrase (β-CA)-encoding sequence may serve as a novel, specific, and potentially reliable molecular target for the rapid identification of E. coli in water sources. The successful amplification and subsequent sequence confirmation of this target indicate its potential utility in PCR-based microbiological quality-control assays. Because β-carbonic anhydrase is absent or substantially restricted in vertebrates, targeting the corresponding bacterial gene may provide an additional level of biological specificity for E. coli detection and may reduce the likelihood of nonspecific or false-positive amplification. Further validation using a larger collection of environmental water samples and a broader range of bacterial species is warranted to establish the analytical sensitivity, specificity, and practical applicability of this molecular detection strategy.

Keywords: Escherichia coli; Carbonic Anhydrase; Polymerase Chain Reaction; Molecular Detection; Water Quality

1 Department of Energy and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
2 Antimicrobial Resistance Research Center, Institute of Immunology and Infectious Diseases, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 Department of Systems Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

* Correspondong author:
zolfaghari@nigeb.ac.ir

How to cite this article: Kiani A, Minaeian S, Bambai B, Zolfaghari Emameh R. Investigation of carbonic anhydrase-encoding genes and introduction of β-carbonic anhydrase as a molecular target for the detection of Escherichia coli. Alborz University Medical Journal 2026; 15 (3) : 314-327

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]

AUMJ Journal
Alborz University of Medical Sciences
نشریه دانشگاه علوم‌پزشکی البرز، تابستان ۱۴۰۵، دوره ۱۵، شماره ۳، صفحه‌های ۳۲۷-۳۱۴

بررسی ژن‌های کدکننده کربنیک‌انهیدراز و معرفی بتا - کربنیک‌انهیدراز به‌عنوان هدف مولکولی برای شناسایی اشریشیا کلی

آفاق کیانی[1]
سارا مینائیان[2]
بیژن بمبئی[3]
رضا ذوالفقاری امامه[1,*]

چکیده

مقدمه: باکتری اشریشیا کلی (Escherichia coli) از جمله باکتری‌های آلوده‌کننده منابع آبی خصوصاً آب آشامیدنی است. تست کیفی آب آشامیدنی از نظر عدم وجود آلودگی به باکتری اشریشیا کلی، به یک آزمون کنترل کیفی در دسترس نیازمند است که تست مولکولی یکی از این روش‌هاست. باکتری‌ها دارای ژن‌های کدکننده کربنیک انهیدراز آلفا، بتا و گاما (α-CA, β-CA, γ-CA) هستند که برای تشخیص مولکولی و دقیق آلودگی منابع آبی آلوده به باکتری‌های بیماری‌زا بسیار مناسب هستند. یکی از روش‌های مولکولی رایج، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR (Polymerase Chain Reaction) است.

روش کار: برای شناسایی آنزیم‌های کربنیک انهیدراز اشریشیاکلی از روش بیوانفورماتیک و PCR استفاده شد. کشت میکروبی و آزمون‌های بیوشیمیایی میکروبی از قبیل محیط سه قندی آهن‌دار (Triple Sugar Iron Agar یا TSI)، استفاده از تست VP (وگس پروسکوئر)، ایندول، تولید سیترات و اوره آز نیز برای شناسایی اشریشیا کلی انجام شدند. سپس، طراحی پرایمر، استخراج DNA، سنجش غلظت DNA، آماده‌سازی میکس واکنش برای انجام آزمون PCR، و مشاهده نتیجه بر روی ژل الکتروفورز انجام شد.

یافته‌ها: این تحقیق نشان داد که باکتری اشریشیا کلی دارای ۱۹ آنزیم کربنیک انهیدراز مختلف است که عبارتند از یک آنزیم کربنیک انهیدراز آلفا، ۱۲ آنزیم کربنیک انهیدراز بتا و ٦ آنزیم کربنیک انهیدراز گاما. نتیجه این مطالعه نشان داد که از بین سه ژن کد کننده α-CA, β-CA, γ-CA، تشخیص ژن کد کننده β-CA در باکتری اشریشیا کلی با موفقیت و طی مدت زمان ۲ تا ۳ ساعت انجام شد.

نتیجه‌گیری: توالی کدکننده β-CA دارای این پتانسیل است که به‌عنوان یک هدف نوین و اختصاصی برای شناسایی مولکولی اشریشیا کلی در منابع آبی و بدون نتایج مثبت کاذب مورداستفاده قرار گیرد. ازآنجایی‌که β-CA در مهره‌داران وجود ندارد، می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر زیستی اختصاصی در شناسایی اشریشیا کلی کاربرد داشته باشد.

واژگان کلیدی: اشریشیا کلی، کربنیک انهیدراز، تشخیص مولکولی، شناسایی میکروبی

۱: گروه زیست فناوری انرژی و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۲: مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی، پژوهشکده ایمونولوژی و بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران
۳: گروه زیست فناوری سامانه ای، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

* نویسنده مسئول:
zolfaghari@nigeb.ac.ir

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]

مقدمه

آب برای حیات موجودات زنده بر روی زمین ضروری است. دسترسی به آب آشامیدنی سالم در اروپا و آمریکا وجود دارد در حالی که در کشورهای در حال توسعه ، این دسترسی با محدودیتهای بسیاری مواجه است. حدود ۲,۵ میلیارد نفر در جهان به آب آشامیدنی سالم دسترسی ندارند و حدود ۱,۵ میلیون کودک جان خود را سالانه بر اثر مصرف آب آشامیدنی ناسالم و بیماری های اسهالی از دست می دهند. لذا بخش بزرگی از جمعیت انسانی به منابع آبی سالم دسترسی ندارند و عده ای از آنها بر اثر مصرف آب آلوده به باکتری های بیماریزا فوت می کنند. بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، میزان مرگ و میر ناشی از مصرف آب ناسالم به سالانه ۵ میلیون نفر می رسد که نیمی از این میزان مرگ و میر متعلق به عفونت گوارشی ناشی از مصرف آب آلوده می باشد که در این بین، رتبه اول متعلق به بیماری وبا است. بسیاری از بیماری های عفونی باکتریایی از طریق آب آلوده میکروبی به انسان منتقل می گردند. بسیاری از این منابع آبی با مدفوع انسان و حیوانات آلوده می شوند، لذا نشان دادن آلودگی میکروبی آب از شاخص های بسیار مهم تست سلامت آب محسوب می گردد. همچنین، فاضلاب و نواحی ساحلی دریا از جمله مناطق آلوده به باکتری های مدفوعی تلقی می گردند. عفونت دستگاه گوارش و اسهال با عامل میکروبی اشریشیا کلی یکی از مهمترین مشکلات بهداشت عمومی در کشورهای در حال توسعه می باشد و وقوع بیماری‌های اسهالی رابطه مستقیمی با عواملی مانند وضعیت اقتصادی و امکانات بهداشتی ضعیف دارد. بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، باکتری اشریشیا کلی یکی از مهمترین آلاینده‌های میکروبی آب محسوب می‌گردد (۴-۱) .

بنابراین، تست کیفی آب آشامیدنی از نظر عدم وجود آلودگی به اشریشیا کلی، به یک آزمون کنترل کیفی همیشگی نیازمند است که در همه کشورها در دسترس باشد. روش‌های مختلفی برای تشخیص آلودگی میکروبی آب وجود دارند که عبارت‌اند از:

۱-روش‌های استاندارد: برای تشخیص باکتری اشریشیا کلی در آب به روش استاندارد، به زمان تقریبی ۴۸ الی ۷۲ ساعت نیاز است.

۲-روش فرمانتاسیون چند لوله‌ای (Multiple-tube fermentation or MTF)

۳-روش شمارش کلونی پلیتی (Plate Count Enumeration)

۴-روش سریع مانند روش‌های ایمنولوژیکی، مولکولی و بیوسنسور

از بین روش های فوق، روش تشخیص مولکولی از دقت و سرعت بالایی برخوردار بوده و به نمونه آزمایش کمی نیاز دارد و این در حالی است که آزمایش معمولی میکروبیولوژی و بیوشیمیایی برای تشخیص باکتری اشریشیا کلی بین ۴۸ الی ۷۲ ساعت زمان نیاز دارد. همچنین، توسط یک تکنسین آموزش دیده در آزمایشگاه قابل انجام است. طی یک دهه گذشته، تست مولکولی PCR برای تشخیص مولکولی باکتری های آلوده کننده آب با استفاده از مارکرهای مولکولی مانند ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک، ژن های rfbE، fliC، stx، uidA، ipaB، epsM، lacZ، wecG و ۱۶SrRNA استفاده شده است (۸-۵).

یکی از مارکرهای مولکولی که قبلاً به‌صورت نوآورانه برای تشخیص مولکولی آلودگی انگلی گوشت استفاده شده است، ژن کدکننده آنزیم کربنیک انهیدراز بتا (β-CA) است که برای تشخیص مولکولی انگل Trichinella spp. در سال ۲۰۱۶ مورداستفاده قرار گرفته است. همچنین، کربنیک انهیدرازها در موارد متعدد تحقیقاتی به‌عنوان شاخص زیستی در تشخیص برخی از انواع سرطان نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۹).

باکتری ها دارای ژن های کد کننده کربنیک انهیدراز از سه خانواده آلفا، بتا و گاما (α-CA, β-CA, γ-CA) می باشند که توالی ژنتیکی آنها در جنس و گونه های باکتریایی گوناگون متفاوت است (۱۱ ,۱۰). طی چند سال اخیر، توجه ویژه ای به آنزیم های β-CA و γ-CA در باکتری ها، قار چها و انگل ها شده است که هدف مهار کننده های دارویی جدید بعنوان نسل جدید آنتی بیوتیک ها قرار گرفته اند (۱۲) و این در حالی است که کاربرد توالی ژنتیکی کد کننده این خانواده های آنزیمی برای امور تشخیصی تا به حال مغفول واقع شده اند که سعی بر این شده است تا در این تحقیق به این جنبه موضوع نیز جامه عمل پوشانده شود و باکتری اشریشیا کلی با استفاده از بیومارکر CA مورد تشخیص قرار گرفته و نتیجه حاصل، با روش کشت میکروبی و شناسایی بیوشیمیایی مورد مقایسه قرار گیرد.

با توجه به اهمیت شناسایی سریع و اختصاصی اشریشیا کلی در منابع آبی و محدودیت‌های زمانی روش‌های متداول کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی، استفاده از اهداف مولکولی اختصاصی می‌تواند رویکردی مؤثر برای بهبود فرایند تشخیص باشد. ازاین‌رو، هدف از مطالعه حاضر بررسی توالی ژنتیکی کدکننده آنزیم بتا - کربنیک انهیدراز در اشریشیا کلی و ارزیابی قابلیت آن به‌عنوان یک نشانگر مولکولی برای شناسایی سریع و اختصاصی این باکتری است.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]

روش کار

مطالعه بیوانفورماتیک

در این روش و با استفاده از پایگاه داده UniProt (https://www.uniprot.org/)، اقدام به شناسایی سه خانواده آلفا، بتا و گاما کربنیک انهیدراز (α–CA, β–CA, γ–CA) در باکتری اشریشیا کلی شد. در این مطالعه، از α–CA باکتری انتروباکتر کلوآکه (UniProt ID: A0A6S5KGI1) بعنوان الگو برای تایید α–CA باکتری اشریشیا کلی، از β–CA باکتری انتروباکتر کلوآکه (UniProt ID: A0A7H8UIL3) بعنوان الگو برای تایید β–CA باکتری اشریشیا کلی، و از γ–CA باکتری انتروباکتر کلوآکه (UniProt ID: A0A7H8UC79) بعنوان الگو برای تایید γ–CA باکتری اشریشیا کلی استفاده شد. α–CA دارای سه اسید آمینه H حفاظت شده، β–CA دارای اسید آمینه C, D, R, H, C حفاظت شده، و γ–CA دارای دو اسید آمینه H، به علاوه اسید آمینه N و Q ، به صورت حفاظت در توالی اسید آمینه ای خود می باشند(۱۱).

طراحی پرایمر

در این مرحله و به نمایندگی از کل ۱۹ توالی کد کننده آنزیم کربنیک انهیدراز، یک جفت پرایمر برای یک α–CA، یک جفت پرایمر برای یک β–CA و یک جفت پرایمر برای یک γ–CA متعلق به باکتری اشریشیا کلی با استفاده از از ابزار Primer Design Tool یا Primer Blast در پایگاه: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/(۱٤) طراحی شد که به شرح جدول ۱ در زیر می باشند:

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده برای توالی ژنتیکی کد کننده یک α–CA، β–CA و γ–CA

CAs	Primers
α–CA (UniProt ID: A۰A۳۷٦HU۰۷)	٥'– TGGAACTGTTGGAGGATGAATG –۳' ٥'– ATTGGAGCTATGAAGGAGAAGG –۳'
β–CA (UniProt ID: A۰A٥E٨FYU۱)	٥'– TTATTTGTGGTTGGCGTGTTTC –۳' ٥'– TCTGGATACCTTGTGTGAACTG –۳'
γ–CA (UniProt ID: A۰A٦D۰EMB٦)	٥'– AAGAGGCCGTATCTGCTTTATC –۳' ٥'– ACCCACAAATCCTCTTACAACC –۳'

پارامترهای طراحی پرایمر به شرح جدول ۲ می باشند.

جدول ۲- پارامترهای طراحی پرایمر برای یک α–CA، یک β–CA و یک γ–CA متعلق به باکتری اشریشیا کلی

پارامتر	مقدار
T_m	۶۲–۵۴ درجه سانتیگراد
GC content	۶۰–۴۰درصد
GC clamp	۱
Max poly-x	۳
Max ۳' stability	۹
Max GC in primer ۳' end	۳
Product size	۱۰۰۰–۲۰۰
Primer size	۲۵–۱۵

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]

استخراج DNA

استخراج DNA از کشت باکتری اشریشیا کلی در مرکز تحقیقات مقاومت دارویی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی ایران و با روش جوشاندن انجام شد. برای این منظور، نمونه اشریشیا کلی که در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری می شدند به دمای محیط رسیده و در محیط کشت Nutrient Agar کشت داده شدند. سپس پلیت به مدت ۲٤ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد. پس از گذشت این مدت زمان، DNA باکتری ها رشد کرده بر روی پلیت با روش جوشاندن استخراج شده و برای نگهداری در فریزر(دمای ۲۰- درجه سانتیگراد) قرار داده شدند(۱۵).

کشت باکتری و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی

مورداستفاده در این پژوهش از مرکز تحقیقات مقاومت دارویی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه شد و در دمای C۸۰° نگهداری گردید. برای انجام آزمایش‌ها، نمونه‌ها ابتدا به دمای محیط رسانده شده و سپس بر روی محیط Nutrient Agar کشت داده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور با دمای C۳۷° قرار گرفتند. پس از رشد باکتری، شناسایی فنوتیپی بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی متداول میکروبی شامل TSI (Triple Sugar Iron Agar)، VP (Voges-Proskauer)، ایندول، سیترات و اوره آز انجام شد (۱٦).

بررسی DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری نانودراپ

نمونه‌های DNA از فریزر خارج شده و داخل باکس یخ قرار داده می‌شوند تا از حالت انجماد خارج شوند. در صورت نیاز می‌توان نمونه‌ها را به مدت چند ثانیه در دستگاه اسپین قرار داد تا کاملاً ته‌نشین شوند. بعد از روشن‌کردن دستگاه، روی پدال‌ها حدود ۲ میکرولیتر آب با سمپلر قرار داده شد تا از تمیزی آن اطمینان حاصل شود. آب را خشک کرده و ۲ میکرولیتر از حلال روی پدال قرار داده می‌شود تا دستگاه بلانک شود. پس از پاک‌کردن حلال از روی پدال، ۱ میکرولیتر از نمونه برداشته و روی پدال قرار داده شد و غلظت DNA تخلیص شده باکتری اشریشیا کلی بررسی شد (۱۷).

آزمون PCR

نمونه های مورد نظر برای انجام تست PCR، شامل نمونه های DNA باکتری اشریشیا کلی، محلول های آماده سازی پرایمر های Forward و Reverse برای DNA استخراج شده، مسترمیکس و آب تزریقی (۱۸)، با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر و طبق جدول ۳ آماده شدند:

جدول ۳- مقادیر مورد استفاده در ترکیب اصلی PCR برای باکتری اشریشیا کلی

۵ میکرولیتر	Master mix
۲ میکرولیتر	H۲O
۱ میکرولیتر	Forward primer
۱ میکرولیتر	Reverse primer
۱ میکرولیتر	Template (DNA)

پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، میکروتیوب‌ها داخل دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad) قرار داده شدند. تست PCR برای سه ژن کدکننده α-CA, (β-CA, γ-CA)) طبق برنامه زیر انجام شد:

۹۵ درجه سانتیگراد (۵ دقیقه)، [۹۵ درجه سانتیگراد (۳۰ ثانیه)، ۵۵ درجه سانتیگراد (۳۰ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتیگراد (٤۰ ثانیه)] (۳۰ چرخه تکرار)، ۷۲ درجه سانتیگراد (۵ دقیقه)

با توجه به اینکه دمای Tm برای پرایمرهای ژن‌های کدکننده α-CA و γ-CA یکسان بود از دمای ۵۵ درجه سانتیگراد برای هر دو ژن استفاده شد. در مقابل، از دمای Tm به میزان ٥٤ درجه سانتیگراد برای ژن‌های کدکننده β-CA استفاده شد.

الکتروفورز محصول PCR

در این آزمون از نمونه‌های PCR شده، ژل آگارز الکتروفورز آماده شده، محلول بافر TBE ۱۰X ، رنگ (loading dye)، نشانگر مولکولی (Ladder) و آب دیونیزه استفاده شد (۹). به منظور مشخص شدن حضور یا عدم حضور ژن های کد کننده α-CA, β-CA, γ-CA در محصول های PCR، نمونه ها روی ژل آگاروز برده شدند. برای مشاهده ی باند محصول PCR، ابتدا ژل به مدت ۱۰ دقیقه داخل اتیدیوم برماید (EtBr) قرار داده شد. این ماده به اسیدهای نوکلئیک متصل شده و تحت اثر نور فرابنفش (UV) باعث رؤیت DNA می شود. سپس ژل را داخل De stain به مدت ۱۰-۱۵ ثانیه قرارداده و سپس ژل الکتروفورز زیر نور فرابنفش مشاهده شد. مشاهده باند محصول PCR نشانه حضور توالی کد کننده ژن CA مدنظر از باکتری اشریشیا کلی است.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]

توالی‌یابی محصول PCR

به‌منظور اطمینان از صحت توالی‌های تکثیر شده در فرایند PCR، محصول مربوطه به همراه پرایمر Forward توالی کدکننده CA موردنظر، به آزمایشگاه تعیین توالی مام ژن (https://momgene.ir/) ارسال شد. حجم محصول PCR ارسالی برای تعیین توالی به میزان ۱۵ –۲۰ میکرولیتر و حجم پرایمر Forward ارسالی به میزان ۵ میکرولیتر بود.

یافته‌ها

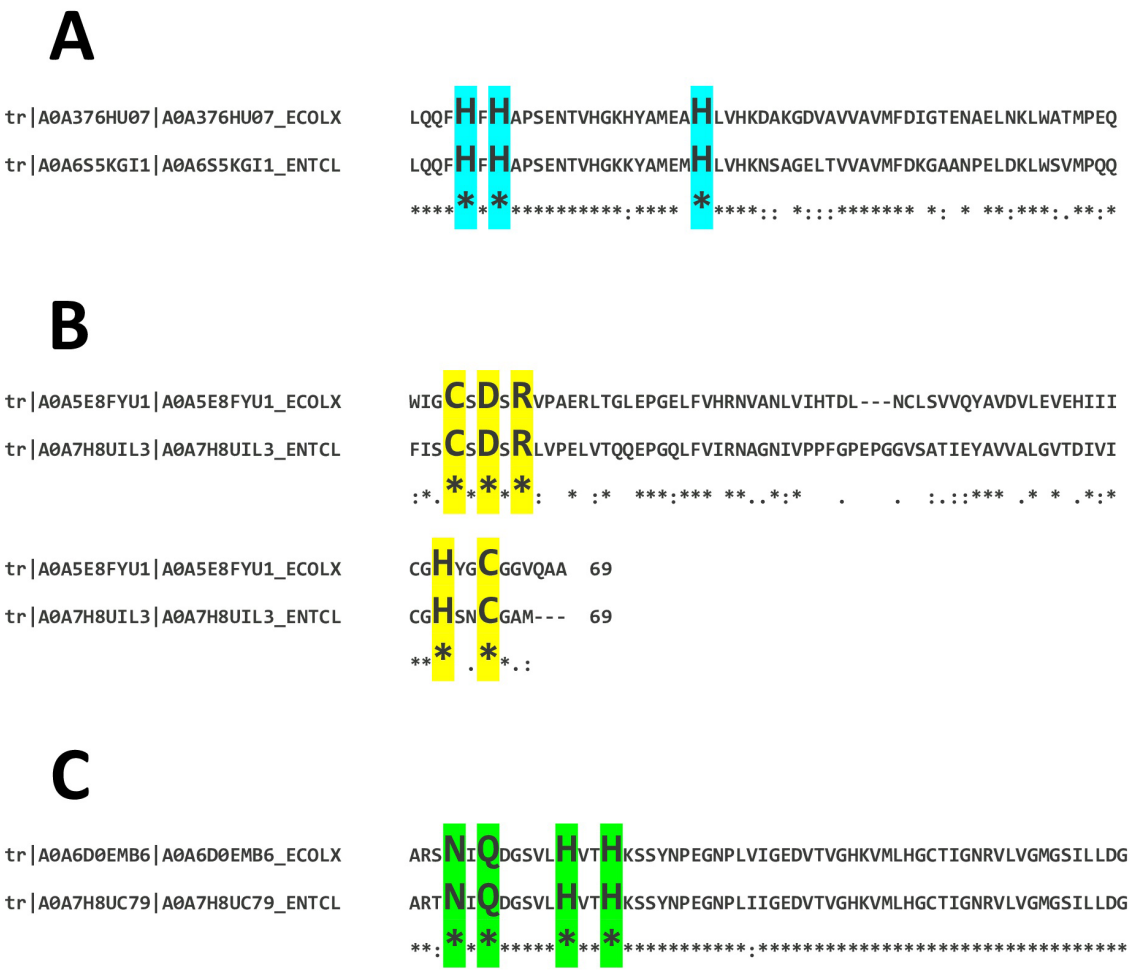
مطالعه بیوانفورماتیک

در تحلیل‌های بیوانفورماتیک انجام‌شده، موتیف‌های حفاظت‌شده مربوط به سه خانواده کربنیک‌انهیدراز در اشریشیا کلی شناسایی شدند:

α–CA: این توالی‌ها دارای موتیف سه‌گانه حفاظت‌شده H به فرم HxHxxxxxxxxxxxxxxxxH بودند.

β–CA: این توالی‌ها توسط پنج اسیدآمینه حفاظت‌شده C, D, R, H, C در موتیف‌های CxDxR و HxxC مشخص شدند.

γ–CA: این توالی‌ها نیز با چهار اسیدآمینه حفاظت‌شده N, Q, H, H در موتیف‌های NxQ و HxxH در توالی آمینواسیدی آنزیم مربوطه شناسایی شدند (شکل ۱).



شکل ۱– آنالیز بیوانفورماتیکی توالی های CA متعلق به باکتری اشریشیا کلی. (A) : توالی α–CA متعلق به باکتری اشریشیا کلی، (B) : توالی β–CA متعلق به باکتری اشریشیا کلی، (C) : توالی γ–CA متعلق به باکتری اشریشیا کلی. اسیدهای آمینه حفاظت شده در α–CA به رنگ فیروزه ای، در β–CA به رنگ زرد و در γ–CA به زنگ سبز و با بزرگنمایی نشان داده شده اند.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]

تحلیل بیوانفورماتیکی ژنوم اشریشیا کلی، وجود ۱۹ آنزیم کربنیک‌انهیدراز را نشان داد که از این تعداد، یک آنزیم متعلق به خانواده α–CA، دوازده آنزیم متعلق به خانواده β–CA و شش آنزیم متعلق به خانواده γ–CA بودند (جدول ٤).

جدول ٤- لیست آنزیم های CA متعلق به باکتری اشریشیا کلی

شماره	نوع کربنیک انهیدراز	تعداد اسیدهای آمینه	نام ژن	کد در UniProt	کد در GeneBank	تعداد کل
۱	آلفا (α)	۲۴۶	cah ۲	A0A376HU07	STE15016.1	۱
۲	بتا (β)	۲۲۰	can	P61517	AAC73237.1	۱۲
۳		۲۱۹	cynT	P0ABE9	AAA23625.1	
۴		۲۰۴	can	A0A5E8FYU1	CDU40735.1	
۵		۲۲۳	cynT	A0A7L7E9V3	QMO40716.1	
۶		۱۸۳	cynT	A0A447XAN9	VED12516.1	
۷		۲۱۰	yadF	A0A376VYR0	STJ16693.1	
۸		۱۳۲	cynT_۲	A0A377DH88	STM20347.1	
۹		۲۲۳	cynT	A0A7L7E9V3	QMO40716.1	
۱۰		۱۵۰	cynT	A0A376SUH9	STI67839.1	
۱۱		۱۴۷	yadF_۱	A0A377CWB2	STM08157.1	
۱۲		۲۱۱	cynT	A0A376HZC8	STE15643.1	
۱۳		۱۷۴	G5632 24580	A0A6M1HV68	NGH40896.1	
۱۴	گاما (γ)	۲۳۰	-	C0J1H9	ACI01744.1	۶
۱۵		۲۵۶	CCU0I 002670	A0A4V1DQZ1	QCH91895.1	
۱۶		۱۸۴	yrdA	A0A8F2R0S2	QWV79561.1	
۱۷		۱۸۸	G4V03 13415	A0A6M0PXB5	NEY29124.1	
۱۸		۱۷۴	GUB08 24345	A0A6N9LZ31	MZU80573.1	
۱۹		۱۶۳	GQM09 29060	A0A6D0EMB6	MWL74428.1	
تعداد کل						۱۹

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]

کشت باکتری اشریشیا کلی و انجام تست‌های بیوشیمیایی

پس از کشت نمونه‌های اشریشیا کلی بر روی محیط کشت Nutrient Agar و طی کردن دوره انکوباسیون استاندارد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت، رشد کلونی‌های خالص مشاهده شد. جهت تأیید فنوتیپی سویه‌های جداسازی شده، تست‌های بیوشیمیایی به ترتیب زیر انجام و نتایج آن‌ها در جدول ۵ گزارش شد:

۱. تست TSI: نتیجه مشاهده شده A/A (اسید/اسید) در قسمت شیب‌دار و عمقی محیط بود که نشان‌دهنده تخمیر قندها است.

۲. تست‌های بیوشیمیایی تکمیلی:

VP: معرفVP به میزان ۰,۵ میلی‌لیتر به محیط کشت MRVP افزوده می‌شود که بعد از مخلوط‌کردن و پس از طی ۱۰ تا ۳۰ دقیقه رنگ قرمز محیط گویای تولید استوئین یا استیل متیل کربونیل است که در بررسی اشریشیا کلی، رنگ قرمز تولید نشد.

تولید ایندول (Indole production): برای آزمون اندول، پس از افزودن معرف کواکس، تشکیل حلقه قرمز در سطح محیط به‌عنوان نتیجه مثبت در بررسی اشریشیا کلی مشاهده شد.

استفاده از سیترات (Citrate utilization): مصرف سیترات نیز تغییر رنگ محیط از سبز به آبی، نشان‌دهنده استفاده باکتری از سیترات به‌عنوان منبع کربن و نتیجه مثبت بود. ولی در بررسی اشریشیا کلی، با عدم مصرف سیترات، رنگ آبی تولید نشد.

تست اوره‌آز (Urease test): به دلیل عدم توانایی هیدرولیز اوره، نتیجه تست اوره‌آز در اشریشیا کلی منفی شد.

جدول ۵- نتایج تست های بیوشیمیایی انجام شده روی باکتری اشریشیا کلی

نام آزمون	نتیجه
TSI	A/A واکنش اسید/اسید (سطح زرد/عمق زرد) نشان‌دهنده تخمیر دکستروز، لاکتوز و یا ساکارز
Indol	عدم توانایی کاهش گوگرد تولید ایندول مثبت حرکت مثبت
SIM	مثبت
MR	منفی
Simmons Citrate Agar	منفی
Urease	منفی

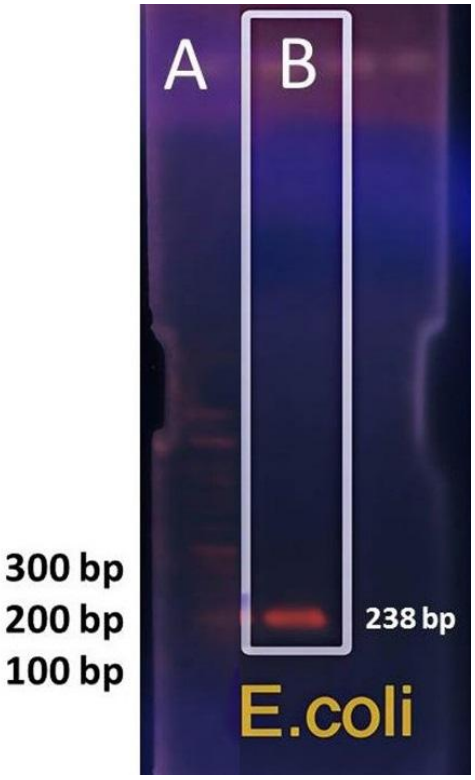
[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]

بررسی DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری نانودراپ

آنالیز اسپکتروفتومتری با نانودراپ بر روی DNA استخراج‌شده از اشریشیا کلی، غلظت ۱۰۵۲٫۱ ng/µl، نسبت برابر A۲۶۰/A۲۸۰ برابر ۲٫۰۱ و نسبت A۲۶۰/A۲۳۰ برابر ۱٫۲۸ بود.

آزمون PCR

الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز، یک باند با اندازه موردانتظار ۲۳۸ جفت‌باز مربوط به ژن کدکننده β–CA با شناسه‌های UniProt: A۰A۵E۸FYU۱ و GenBank: CDU۴۰۷۳۵٫۱ را در اشریشیا کلی نشان داد؛ درحالی‌که برای توالی‌های هدف α–CA و γ–CA هیچ باند قابل‌تشخیصی مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۲– شناسایی توالی کد کننده β–CA در باکتری اشریشیا کلی. (A) سایز مارکر (B) ،DNA باند ۲۳۸ جفت باز مربوط به توالی کد کننده β–CA در باکتری اشریشیا کلی.

توالی‌یابی محصول PCR

تعیین توالی محصول PCR، تعلق آن به توالی ژن کدکننده β–CA در اشریشیا کلی را تأیید کرد (شکل ۳، جدول ٦).

>Sequenced PCR Product_β-CA coding sequence from *E. coli*

CCATTATGCAATCAGCGTGGAAACGCGGGCAGAAAGTCACCATTCACGGCTGGGCCTACGGCATTCACGACGGCTTGCTGCGTG ATCTGGATGTCACAGCGACCAACCGCGAAACTCTTGAGCAACGTTACCGTCACGGGATTTCCAATCTCAAGCTGAAACACGCCA ACCACAAATA

شکل ۳– توالی یابی محصول PCR. توالی بدست آمده از محصول PCR، به ژن کد کننده β–CA در باکتری اشریشیا کلی تعلق دارد.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]

جدول ٦- نتیجه توالی یابی محصول PCR

Max Score	Total Score	Query Cover	E-value	Per. Ident	Acc. Len	Accession in NCBI
۳۲۹	۳۲۹	۱۰۰ درصد	۲/۰۰E-۹۰	۱۰۰ درصد	۱۷۸	CP۱۳۶۹۱۳/۱

بحث

بیماری‌های میکروبی منتقله از آب به‌عنوان یک نگرانی عمده برای سلامت عمومی در نظر گرفته می‌شود، به‌ویژه در کشورهایی با بهداشت ضعیف، فقدان آگاهی اجتماعی و مشکلات مرتبط با وضعیت اجتماعی – اقتصادی پایین. شناسایی پاتوژن موجود در آب با استفاده از روش‌های کشت سنتی زمان‌بر و کار فشرده است. در نتیجه، تقاضای فزاینده‌ای برای فناوری‌های تشخیص سریع پاتوژن وجود دارد. حساسیت، ویژگی و سرعت بالا همگی از مزایای استفاده از تکنیک‌های مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در چنین مواردی است. هنگام طراحی تست‌های تشخیصی، درنظرگرفتن نسبت هزینه به سود بسیار مهم است. علاوه بر این، استراتژی‌های بازاریابی و دردسترس‌بودن مواد در منطقه استقرار باید در نظر گرفته شود (۱۹).

در حال حاضر تشخیص باکتری‌های بیماری‌زا در آب عمدتاً بر اساس کشت انتخابی و روش‌های استاندارد بیوشیمیایی است. بااین‌حال، این روش دارای عیوب بسیاری است. اول اینکه، عدم وجود کلونی‌ها ممکن است در طی کشت انتخابی رخ دهد، اما این بدان معنا نیست که سلول‌های زنده وجود ندارد و ممکن است سلول‌هایی وجود داشته باشند که به حالت زنده اما غیرقابل‌کشت (VBNC) باشند. دوم اینکه، گونه‌های سلول‌های شناسایی شده را نمی‌توان دقیقاً مکان‌یابی کرد و مراحل بیشتری لازم است. سوم اینکه، بسیار وقت گیراست. در مقایسه با روش‌های کشت سنتی و بیوشیمیایی، qPCR دارای مزایای سرعت تشخیص سریع و محدودیت تشخیص کم است. یکی از این روش‌های بیولوژیکی مولکولی PCR کمی است و این تکنیک همراه با پروب‌ها و پرایمرها به طور گسترده برای پایش بیواندیکاتورهای مختلف مدفوع و باکتری‌های بیماری‌زای موجود در آب مورداستفاده قرار گرفته است. درعین‌حال، مطالعات بیشتر مرتبط با کشت باکتریایی و نتایج qPCR نشان داده است که qPCR می‌تواند به‌عنوان جایگزین بهتری برای کشت باکتری در موارد تشخیصی استفاده شود (۲۰).

روش‌های تشخیص مولکولی به دلیل دقت بالا قابل‌توجه هستند، اما با موانعی مانند خلوص نمونه‌های DNA یا RNA نیز مواجه می‌شوند. آلاینده‌های مانند اسیدهای هیومیک و ترکیبات فنلی می‌توانند واکنش‌های آنزیمی را مهار کنند. علاوه بر این، تعیین کمیت دقیق پاتوژن‌ها مملو از چالش‌هایی است، به‌ویژه عوامل محیطی مانند دما و کدورت تشخیص باکتری‌های بیماری‌زا را پیچیده‌تر می‌کنند (۲۱).

حساسیت تکنیک‌های تشخیصی یکی دیگر از موانع است. غلظت کم پاتوژن‌ها در نمونه‌های آب می‌تواند تشخیص را چالش‌برانگیز نماید. حساسیت بالا مهم است، اما روش‌های خاصی مانند سنجش ایمنی به دلیل واکنش متقابل با مواد نامرتبط، خطر ایجاد نتایج مثبت کاذب را دارند. در همین حال، برخی از باکتری‌ها می‌توانند به حالت زنده اما غیرقابل‌کشت (VBNC) تبدیل شوند، و با روش‌های مرسوم غیرقابل‌شناسایی شوند، درعین‌حال می‌توانند تحت شرایط مساعد فعال شوند (۲۱).

هزینه انجام آزمون‌ها یکی دیگر از موانع مهم است. روش‌های تشخیص پیشرفته دقت بالاتری دارند، اما با هزینه‌های قابل‌توجهی همراه هستند. هزینه‌ها می‌تواند از خرید تجهیزات پیچیده تا تهیه معرف‌های تخصصی و آموزش متغیر باشد، به‌خصوص اینکه این تجهیزات برای مناطق درحال‌توسعه می‌توانند بسیار گران باشند. درعین‌حال، روش‌های سنتی مقرون‌به‌صرفه‌تر هستند، بااین‌حال زمان‌بر هستند که ممکن است منجر به تأخیر در درمان و افزایش خطرات سلامتی برای بیمار شود. تلاش‌های تحقیقاتی و نوآوری‌های مستمر باید بر روی توسعه روش‌هایی متمرکز شود که بین حساسیت، ویژگی، هزینه و به‌موقع بودن تعادل ایجاد کند (۲۱).

PCR دیجیتال (dPCR) که طی آن واکنش‌های PCR مثبت/منفی در هزاران محفظه با حجم قطرات نانولیتری انجام می‌شود، برای تعیین کمیت باکتری‌ها در محیط‌های آبی استفاده شده است که دارای حساسیت بیشتری نسبت به qPCR باشد (۲۲).

تراشه دیجیتال PCR (cdPCR)، یک زیرمجموعه‌های PCR دیجیتال با ddPCR است که دارای دقت و بازده بالاتری در تعیین کمیت DNA

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]

است. باتوجه‌به افزایش حساسیت، دقت و تکرارپذیری آزمایش، ddPCR به‌عنوان یک فناوری جایگزین بالقوه برای غلبه بر اثرات بازدارندگی qPCR طراحی شده است. از این تکنیک در سال ۲۰۲۰ برای شناسایی سریع باکتری های موجود در آب مانند Legionella pneumophila استفاده شد. همچنین، محققین به تازگی dPCR را به عنوان یک ابزار تشخیص مولکولی نسل سوم برای تعیین کمیت میکروارگانیسم ها در اکوسیستم های آبی و خشکی پذیرفته اند. استفاده از dPCR رشد سریعی را تجربه کرده است، که عمدتاً به دلیل کاربرد روزافزون آن در نظارت بر محیط زیست است (۲۱).

در نتیجه، در حالی که طیف گسترده ای از تکنیک‌ها برای تشخیص باکتری‌های بیماری‌زای موجود در آب وجود دارد، هر کدام مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند. تکنیک‌های مرسوم مانند روش‌های مبتنی بر کشت و تکنیک‌های PCR، پایه‌های تشخیص سنتی را ایجاد کرده‌اند، اما فناوری‌های نوظهور مانند dPCR و Next Generation Sequencing (NGS)، مرزهای تشخیصی را جابجا نموده اند. محدودیت‌های روش‌های مولکولی شامل وجود بازدارنده‌ها در نمونه‌های آب مانند اسیدها و فلزات سنگین، و تکنیک‌های خالص‌سازی قابل تکرار بر روی DNA یا RNA می باشند (۲۳ ,۲۱). در حال حاضر، هیچ روش واحدی برای جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل یک نمونه آب برای همه گونه های میکروارگانیسم‌های بیماریزا وجود ندارد. مهم ترین الزامات برای تجزیه و تحلیل قابل اعتماد عبارتند از: ویژگی، حساسیت، تکرارپذیری نتایج، سرعت، اتوماسیون و هزینه کم (۲۴).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، امکان استفاده از توالی کدکننده آنزیم کربنیک انهیدراز از نوع بتا به‌عنوان نشانگر مولکولی برای شناسایی اشریشیا کلی بررسی شد. در آزمون PCR انجام شده بر روی کشت اشریشیا کلی، یک باند اختصاصی با اندازه موردانتظار ۲۳۸ جفت‌باز مشاهده شد که با توالی کدکننده β–CA این باکتری مطابقت داشت. همچنین، برای توالی‌های کدکننده کربنیک انیدراز نوع آلفا (α–CA) و نوع گاما (γ–CA) باند قابل تشخیصی مشاهده نشد. محصول PCR حاصل نیز برای بررسی صحت توالی تکثیرشده، جهت تعیین توالی ارسال شد.

بر اساس نتایج این پژوهش، شناسایی مولکولی اشریشیا کلی با هدف‌گیری توالی β–CA در نمونه بررسی‌شده، در حدود ۲ تا ۳ ساعت امکان‌پذیر بود؛ درحالیکه شناسایی این باکتری با روش متداول کشت، جداسازی و تأیید بیوشیمیایی، شامل آزمون‌های TSI، وگس–پروسکاور، اندول، سیترات و اوره‌آز، به حدود ۴۸ تا ۷۲ ساعت زمان نیاز داشت. بنابراین، یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که توالی β–CA می‌تواند به‌عنوان یک هدف مولکولی مناسب برای تشخیص سریع اشریشیا کلی، به‌ویژه در پایش آلودگی میکروبی منابع آب، مورد توجه قرار گیرد.

بااین‌حال، از آنجا که این مطالعه بر روی نمونه یا کشت مورد بررسی انجام شده و ارزیابی گسترده‌ای از تعداد زیاد نمونه‌های آب محیطی، کنترل‌های منفی متنوع، حساسیت، ویژگی و میزان نتایج مثبت کاذب ارائه نشده است، برای تأیید اختصاصیت و قابلیت کاربرد این نشانگر در شرایط مختلف، انجام مطالعات تکمیلی با تعداد نمونه بیشتر و مقایسه با روش‌های مرجع ضروری است. در مجموع، نتیجه اصلی این مطالعه آن است که توالی β–CA در کشت بررسی‌شده اشریشیا کلی با PCR به‌صورت یک محصول ۲۳۸ جفت‌بازی شناسایی شد و در مقایسه با روش کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی، امکان تشخیص سریع‌تر این باکتری را فراهم کرد.

اعلان‌ها

تشکر و قدردانی: از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (NIGEB) و بنیاد ملی علم ایران (INSF) بابت حمایت مالی از این طرح پژوهشی تشکر و قدردانی می‌گردد.

حمایت مالی: پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (NIGEB) با تخصیص گرنت به شماره ۸۱۵ و ۸۴۷، و بنیاد ملی علم ایران (INSF) با تخصیص گرنت به شماره ۴۰۰۳۸۹۹ از این طرح پژوهشی حمایت نمودند. لازم به ذکر است که حامیان مذکور، در طراحی، اجرا، جمع آوری نتایج، تفسیر، نگارش و چاپ این مقاله هیچ نقشی نداشته اند.

تعارض منافع: نویسندگان این مقاله اظهار و تأیید می‌نمایند که هیچ‌گونه تعارض منافعی با یکدیگر و مرتبط با این مقاله ندارند.

ملاحظات اخلاقی: با توجه به اینکه در این تحقیق از هیچ نمونه انسانی و حیوانی استفاده نشده است، لذا نیازی به کد اخلاق نبود. طبق شرایط ایمنی زیستی تعریف شده در طرح‌های شماره ۸۱۵ و ۸۴۷ از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری و ۴۰۰۳۸۹۹ از بنیاد علم ایران، در این تحقیق، با اشریشیا کلی در شرایط ایمنی زیستی BSL–۱ کار شد.

مشارکت نویسندگان: نویسندگان مشارکت یکسانی در تدوین و ویرایش این مقاله داشته‌اند.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]

References

1. Xue J, Zhang B, Lamori J, Shah K, Zabaleta J, Garai J, et al. Molecular detection of opportunistic pathogens and insights into microbial diversity in private well water and premise plumbing. J Water Health. 2020;18(5):820-34. [DOI:10.2166/wh.2020.271]
2. Ding T, Suo Y, Xiang Q, Zhao X, Chen S, Ye X, et al. Significance of Viable but Nonculturable Escherichia coli: Induction, Detection, and Control. J Microbiol Biotechnol. 2017;27(3):417-28. [DOI:10.4014/jmb.1609.09063]
3. Kaur H, Wang B, Ruehling K, Collins SM, Ghorbani Tajani A, Bisha B. Identification and characterization of Escherichia coli isolated from the surface water of the Laramie River, Wyoming. J Water Health. 2026;24(2):93-108. [DOI:10.2166/wh.2026.091]
4. Kumari R, Ghosh C, Kumar R, Shakya R, Kumar S, Saini AK. Assessment of water quality and microbial contamination in institutional water resources: a necessity to understand health risks. Sci Rep. 2026. [DOI:10.1038/s41598-026-53672-4]
5. Abada E, Al-Fifi Z, Al-Rajab AJ, Mahdhi M, Sharma M. Molecular identification of biological contaminants in different drinking water resources of the Jazan region, Saudi Arabia. J Water Health. 2019;17(4):622-32. [DOI:10.2166/wh.2019.019]
6. Wang YC, Tsai YH, Shen CF, He MY, Fu YC, Sang CY, et al. Turntable Paper-Based Device to Detect Escherichia coli. Micromachines (Basel). 2021;12(2). [DOI:10.3390/mi12020194]
7. 7. Lasch P, Beyer W, Bosch A, Borriss R, Drevinek M, Dupke S, et al. A MALDI-ToF mass spectrometry database for identification and classification of highly pathogenic bacteria. Sci Data. 2025;12(1):187. [DOI:10.1038/s41597-025-04504-z]
8. Hu B, Cui C, Bo J, Li Q, Wang S. Recent advances in PCR-based detection of Escherichia coli. Lett Appl Microbiol. 2026;79(5). [DOI:10.1093/lambio/ovag045]
9. Zolfaghari Emameh R, Kuuslahti M, Nareaho A, Sukura A, Parkkila S. Innovative molecular diagnosis of Trichinella species based on beta-carbonic anhydrase genomic sequence. Microb Biotechnol. 2016;9(2):172-9. [DOI:10.1111/1751-7915.12327]
10. Zolfaghari Emameh R, Kuuslahti M, Nosrati H, Lohi H, Parkkila S. Assessment of databases to determine the validity of beta- and gamma-carbonic anhydrase sequences from vertebrates. BMC Genomics. 2020;21(1):352. [DOI:10.1186/s12864-020-6762-2]
11. Zolfaghari Emameh R, Hosseini SN, Parkkila S. Application of beta and gamma carbonic anhydrase sequences as tools for identification of bacterial contamination in the whole genome sequence of inbred Wuzhishan minipig (Sus scrofa) annotated in databases. Database (Oxford). 2021;2021. [DOI:10.1093/database/baab029]
12. Capasso C, Supuran CT. Bacterial, fungal and protozoan carbonic anhydrases as drug targets. Expert Opin Ther Targets. 2015;19(12):1689-704. [DOI:10.1517/14728222.2015.1067685]
13. UniProt C. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. Nucleic Acids Res. 2025;53(D1):D609-D17.
14. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 2012;13:134. [DOI:10.1186/1471-2105-13-134]
15. Hao R, Li X, Wang N, Zhang M, Li M, Xu Y, et al. Optimized plasmid extraction through controlled temperature, prolonged alkaline lysis, and gentle mixing. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2025;1262:124646. [DOI:10.1016/j.jchromb.2025.124646]
16. Hariri S. Detection of Escherichia coli in Food Samples Using Culture and Polymerase Chain Reaction Methods. Cureus. 2022;14(12):e32808. [DOI:10.7759/cureus.32808]
17. Garcia-Alegria AM, Anduro-Corona I, Perez-

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]

Martinez CJ, Guadalupe Corella-Madueno MA, Rascon-Duran ML, Astiazaran-Garcia H. Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. Int J Anal Chem. 2020;2020:8896738. [DOI:10.1155/2020/8896738]

18. Li Z, Yang X, Yang B, Yang J, Tao C, Zhang D, et al. A comprehensive review of methodological and technological advancement in PCR during the last 15 years. Biotechnol Adv. 2025;85:108719. [DOI:10.1016/j.biotechadv.2025.108719]
19. Sebastian D. Evaluation of sensitivity and cost-effectiveness of molecular methods for the co-detection of waterborne pathogens in India. Marine Biotechnology. 2021;23(6):955-63. [DOI:10.1007/s10126-021-10078-9]
20. Gao M, Tan F, Shen Y, Peng Y. Rapid detection method of bacterial pathogens in surface waters and a new risk indicator for water pathogenic pollution. Sci Rep. 2024;14(1):1614. [DOI:10.1038/s41598-023-49774-y]
21. Oon YL, Oon YS, Ayaz M, Deng M, Li L, Song K. Waterborne pathogens detection technologies: advances, challenges, and future perspectives. Front Microbiol. 2023;14:1286923. [DOI:10.3389/fmicb.2023.1286923]
22. Jikumaru A, Ishii S, Fukudome T, Kawahara Y, Iguchi A, Masago Y, et al. Fast, sensitive, and reliable detection of waterborne pathogens by digital PCR after coagulation and foam concentration. J Biosci Bioeng. 2020;130(1):76-81. [DOI:10.1016/j.jbiosc.2020.02.004]
23. Rainbow J, Sedlackova E, Jiang S, Maxted G, Moschou D, Richtera L, et al. Integrated Electrochemical Biosensors for Detection of Waterborne Pathogens in Low-Resource Settings. Biosensors (Basel). 2020;10(4). [DOI:10.3390/bios10040036]
24. Feleni U, Morare R, Masunga GS, Magwaza N, Saasa V, Madito MJ, et al. Recent developments in waterborne pathogen detection technologies. Environ Monit Assess. 2025;197(3):233. [DOI:10.1007/s10661-025-13644-z]

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-06]