

بررسی اثر نانوذرات اکسید مس روی ژنوم باکتری اشریشیاکلی با استفاده از نشانگرهای

مولکولی RAPD

فریبا امجدی^۱، بهرام گلستانی ایمانی^{۱*} و فرخ کریمی^۲

^۱ ارومیه، دانشگاه آزاداسلامی، واحد ارومیه، گروه زیست‌شناسی

^۲ مراغه، دانشگاه مراغه، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۲

چکیده

با توجه به مقاومت باکتریها نسبت به آنتی‌بیوتیکها و عوامل ضد میکروبی مرسوم، تحقیقات بسیاری برای یافتن انواع جدید عوامل ضد میکروبی موثر انجام شد. با توسعه فناوری نانو، مس به طور فزاینده‌ای به شکل نانوذرات با فعالیتهای ضد میکروبی بالا و قیمت ارزان علیه همه باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت مورد استفاده قرار گرفته است. در این تحقیق از نانو ذره اکسیدمس با اندازه (کمتر از ۲۰ نانومتر) برای بررسی اثر آن روی ژنوم باکتری اشریشیاکلی سویه O157:H7 به عنوان مدل برای باکتریهای گرم منفی استفاده شد. بدین منظور ابتدا باکتریها را با غلظتهای ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر با این نانوذرات تیمار کرده و در فاصله‌های زمانی ۲، ۴ و ۲۴ ساعت خاصیت ضد میکروبی نانوذره بررسی گردیده و استخراج DNA صورت گرفت. تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز پدید (RAPD-PCR) جهت بررسی اثر نانوذره اکسیدمس روی ژنوم به کار گرفته شد. با استفاده از نرم افزار NTSYS-PC، نتایج حاصل از الکتروفورزیز محصولات PCR روی ژل آگارز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این تحقیق مشاهده گردید که علاوه بر اثر مهارکنندگی نانوذرات اکسیدمس، روی رشد باکتریها مشخص شد که این نانوذرات روی توالی DNA ژنومی این باکتری اثر گذاشته و باعث تغییر آن در نقاط مختلف گردید.

واژه‌های کلیدی: نانوذره اکسیدمس، باکتری اشریشیاکلی، واکنش زنجیره ای پلیمرز پدید (RAPD-PCR)

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۲۷۱۹۹۰۰، پست الکترونیکی: golestani_bahram@yahoo.com

مقدمه

در میان نانوذرات دیگر، اخیراً به نانوذره مس توجهات بیشتری شده است. نانوذرات ارزان به جای نانوذرات فلزی گران قیمت در سطح کاربردهای میکروالکتریکی پیشنهاد می‌شوند و احتمالاً آنها آخرین مواد ضد میکروبی کشف شده اند (۲۱). کاربردهای مواد ضد باکتریایی در صنعت منسوجات، ضد عفونی آب، پزشکی و بسته بندیهای غذایی و غیره به خوبی شناخته شده است. برخلاف ضد عفونی کننده های شیمیایی معمول انتظاری نیست که نانومواد ضد میکروبی، ضد عفونی کننده های مضر تولید کنند (۱۱). همچنین قابلیت کنترل آلودگی و عفونت نانوانتی بیوتیکها

باکتریها در برابر آنتی بیوتیکها و بسیاری از عوامل ضد باکتریایی مقاومت پیدا کرده اند که این مقاومت قابل توارث بوده و باعث ادامه بیماریهای عفونی می شود که یکی از بزرگترین چالشهای سلامتی سراسر جهان است. این پیشرفت متناوب استراتژیهای درمانی باکتریها را بر می انگیزد (۴ و ۳۲).

در چند دهه اخیر، نانومواد به دلیل ویژگیهای جدید شامل بزرگ بودن نسبت سطح به حجم و فعالیت واکنشی بالا توجه زیادی پیدا کرده است (۲ و ۳۳).

جلوگیری می‌کند و باعث فعالیت ضد میکروبی می‌شود (۱۴).

به هر حال استفاده هدفمند از نانوذرات اکسید مس با ویژگیهای ضد میکروبی نیازمند توجه بیشتر از نظر سازگاری با محیط زیست نیز می‌باشد. با توجه به اینکه نانوذرات مس دارای خاصیت کشندگی برای ارگانسیمهای دیگر است، برای مثال کشندگی نانوذرات اکسید مس برای سخت پوستان مگنا دافینیا و تامنوس فالئوس پلاتریوس و جلبک *Pseudo-kirchneriella subcapitata* در غلظتهای کم (به ترتیب ۳/۲، ۰/۱۸ و کمتر از ۱ میلی گرم بر لیتر) که در سالهای ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹ گزارش شده است (۳ و ۱۳) و بدین طریق درجه ای از کشندگی نانوذرات برای ارگانسیمهای آبری نشان داده شده است. نانوذرات اکسید مس ممکن است باعث ایجاد جهش در باکتری گردیده و با تغییر در خاصیت جفت شدن بازی بازها در فعالیت ضد باکتریایی شرکت کند. یا نانوذرات با حل شدن در محیط یونهای فلزی آزاد کرده که با غشای باکتری واکنش می‌دهند که این قابلیت حل شدن و واکنش با غشاء یکی از مهم ترین ویژگیهایی است که دلیل اصلی اثر کشندگی روی اکثر موجودات را توضیح می‌دهد (۸ و ۱۲). بنابراین ممکن است به هنگام استفاده به عنوان ماده ضد باکتریایی بر روی سلولهای یوکاریوتی و سایر ارگانسیمها نیز اثر گذارد. لذا باید برای به دست آوردن غلظتهای مؤثر ضد باکتریایی و تأثیر ژنوتوکسیکی آن به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی بیوتیکها و مواد ضد عفونی کننده بدون ضرر، بیشتر بررسی گردد.

از آنجایی که تاکنون اثر ضد باکتریایی از طریق اثر نانوذرات مس روی ژنوم بررسی نشده است. لذا این تحقیق به منظور بررسی اثر دُزهای مختلف در زمانهای متفاوت تیماری نانوذرات اکسید مس روی ژنوم باکتری اشیریشیاکلی به عنوان باکتری مدل صورت گرفت که بدین

در محیط آزمایشگاهی و سلول زنده کشف و اثبات شده است. تهیه نانوذرات ضد میکروبی می‌تواند تأثیر ارزشمندی در مقایسه با سنتز آنتی بیوتیکها داشته باشد زیرا آنها پایداری بیشتر و طولانی مدت دارند (۳۰). نانوذرات می‌تواند در شرایط نامساعد مانند دمای بالای استریلیزاسیون، که تحت آن آنتی بیوتیکهای مرسوم غیرفعال می‌شوند مقاومت کنند. نانو موادی که در تحویل آنتی بیوتیکها استفاده می‌شود دارای مزیت چندگانه ۱- توزیع شکل یکنواخت در بافت هدف ۲- بهبود قابلیت حل شدن ۳- رهاسازی کنترل شده و تحمیل شده را دارند (۱۷ و ۲۷).

علاوه براین، گزارش شده که نانوذرات با اندازه کوچک فعالیت ضد میکروبی خوبی نشان داده است (۱۵). بر روی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات روی باکتریهای بیماری زای انسان مانند اشیریشیاکلی (۳۴) و استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه زیادی شده است (۲۳). تشکیل بیوفیلم در باکتریها مشکل مهم شناخته شده است زیرا از باکتریها علیه آنتی بیوتیکها حفاظت می‌کند و به همین دلیل یکی از علل اصلی توسعه عفونتهای مزمن به شمار می‌رود (۱۶). ویژگیهای الکترواستاتیکی نانوذره و بیوفیلم روی چگونگی واکنش آنها اثر می‌گذارد (۲۸). نانوذرات از طریق واکنش الکترواستاتیکی می‌توانند به غشای باکتری متصل شوند و با غشای باکتری تداخل ایجاد کند و باعث تخریب کامل غشای باکتری شوند (۳۱). آمین و گروههای کربوکسیل لایه پپتیدوگلیگان اجزاء ترکیب کننده اصلی دیواره باکتری هستند که با مس واکنش داده و باعث آسیب دیواره سلول می‌شوند که یکی از مکانسیمهای ضد میکروبی نانوذرات به شمار می‌آید (۶). البته مکانسیم القای فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید فلزی به طور کامل شناخته نشده است. اما مقدار رهاسازی یون و متعاقباً تولید ROS دلیل اصلی فرض می‌شود (۵ و ۱۴). که هر دو مکانسیم از همانندسازی DNA و سنتز آمینو اسید در میکروبوها

کیفیت آن با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورزیس روی ژل آگارزا ۱ درصد آنالیز گردید.

برای بررسی اثر نانوذرات روی ژنوم باکتری از روش نشانگر مولکولی RAPD-PCR استفاده شد. که به منظور انجام روش RAPD-PCR ابتدا پرایمرهای ۱۰ بازی رپید از شرکت سیناژن تهیه گردید. توالی و مشخصات پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی پرایمر
OPR12	ACAGGTGCGT
OPS11	AGTCGGGTGG
OPA11	CAATCGCCGT
OPS.13	GTCGTTCTG
OPS-09	TCCTGGTCCC
OPA10	GTGATCGCAG
OPB-7	GGTGACGCAG
OPQ-14	GGACGTTCA
OPT14	AATGCCGCAG
OPS14	AAAGGGGTCC
OPA09	GGGTAACGCC
OPS05	TTTGGGGCCT
OPD04	TCTGGTGAGG
OPT17	TCTGGTGAGG

برای انجام واکنش PCR جهت تکثیر نمونه‌ها در حجم ۲۵ میکرولیتر مواد زیر در غلظتهای ذکر شده تهیه گردید. ۱ میکرولیتر پرایمر، ۲/۵ میکرولیتر (۱۰x) PCR buffer، ۳ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر dNTP mix، ۰/۳ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده و ۱۶/۲ میکرولیتر DNA polymerase Taq که با ۱۶/۲ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط این مواد در دستگاه ترموسایکلر (Corbett research, Australia) با برنامه زیر قرار داده شد: و اسرشت شدن اولیه DNA الگو در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه، واکنش PCR در ۴۰ سیکل و به ترتیب زیر انجام گرفت: دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه جهت و اسرشت شدن رشته‌های DNA الگو، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به

منظور از تکنیک (RAPD-PCR) در این مطالعه استفاده شده است.

مواد و روشها

کشت باکتری و شرایط کشت ویژگیهای باکتری (ATCC) (*Escherichia coli* 0157:H7 25922) بر روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار مشخص شد. باکتری در ۵ میلی لیتر محیط BHB broth کشت داده شد و قبل از تیمار به مدت یک شبانه روز در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دور ۲۰۰ rpm گذاشته شد و میزان رشد باکتریها از طریق اندازه‌گیری چگالی نوری (OD) محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر کنترل گردید. (۱)

بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس:
جهت بررسی اثر نانوذره بر روی باکتری غلظتهای ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذره اکسید مس با قطر کمتر از ۲۰ نانومتر که توسط گروه شیمی دانشگاه دولتی مراغه سنتز و در اختیار تحقیق حاضر قرار گرفت، مشخصات و آنالیز آن توسط میکروسکوپ الکترونی در بخش نتایج در شکلها آورده شده است. و از بافر فسفات سالین با PH: 7.4 به عنوان حلال نانوذرات اکسید مس استفاده شد.

سپس نانوذرات اکسید مس، به هرکدام از لوله‌ها تلقیح شد. لوله‌های آزمایش در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دور ۲۰۰ rpm گذاشته شد و چگالی نوری هر کدام از لوله‌های آزمایش در طول موج ۶۰۰ نانومتر و در فاصله‌های زمانی ۴،۲ و ۲۴ ساعت جهت سنجش رشد باکتریها اندازه‌گیری شد.

استخراج DNA و واکنش زنجیره پلیمرز RAPD:
DNA باکتری شاهد و تیمار شده با استفاده از کیت استخراج دی ان ا (شرکت اکسیر آزما) مطابق با دستورالعمل کیت مذکور استخراج گردیده و کمیت و

گرفته شد. پس از بهینه‌سازی شرایط PCR، این ترکیبات و پروفایل دمایی برای تمامی ۱۴ پرایمر مورد استفاده قرار گرفت.

مدت ۴۵ ثانیه جهت اتصال پرایمرها به رشته‌های الگو، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه جهت پلیمریزاسیون رشته جدید از روی رشته الگو. ۷ دقیقه جهت تکمیل پلیمریزاسیون رشته‌های ناقص به کار

جدول ۲- فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس

غلظت	شماره لوله	قبل از تیمار	بعد از ۲ ساعت	بعد از ۴ ساعت	بعد از ۲۴ ساعت
شاهد	۱	۰/۷	۰/۸	۰/۸۵	۱/۱
۳۰ μg/ml	۲	۰/۶	۰/۶	۰/۶	۰/۸
	۳	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸
۶۰ μg/ml	۴	۰/۷	۰/۷	۰/۷	۰/۸
	۵	۰/۶	۰/۶	۰/۷	۰/۷

جدول ۳- نتایج باندهی مربوط به پرایمرهای تصویر ۴

پرایمر	باند (bp)	c	T1	T2
OPR12	1000	1	0	0
	900	1	1	0
	800	1	1	1
	700	1	0	0
	650	1	1	1
	500	1	1	1
	450	1	1	1
	350	0	0	1
OPS11	170	1	1	1
	950	1	0	0
	900	1	0	0
	600	1	1	1
	700	1	1	1
	500	0	1	0
OPA11	450	1	1	1
	950	0	0	1
	850	0	0	1
	800	1	1	1
	650	0	1	1
	550	1	1	1
OPS-13	500	0	1	1
	900	1	0	0
	800	1	0	0
	250	1	0	1

بررسی نتایج RAPD - PCR: بعد از اتمام واکنش PCR، جهت آشکارسازی باندها، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد (با اندازه ۱۴ × ۲۶) که حاوی red safe بود در بافر TBE (1x) به مدت ۴ ساعت با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز گردید. و به منظور تعیین اندازه محصول از نشانگر DNA Ladder به اندازه bp - ۱۰۰ استفاده شده و با دستگاه عکسبرداری از ژل (Uvitec, France) عکس تهیه گردید.

آنالیز داده‌های حاصل از الکتروفورزیس: باند های حاصل از تجزیه RAPD براساس وجود یا عدم وجود آنها، به ترتیب به صورت یک و صفر امتیازدهی گردید که داده‌ها در جدولهای ۳ تا ۵ آمده است. سپس داده‌ها بر اساس مولکولی در نرم افزار وارد گردید. ماتریس تشابه با روش Dic محاسبه شده و دندروگرام با روش UPGMA در نرم افزار NTSYS-PC رسم گردید.

نتایج

جهت مطالعه مورفولوژی و تخمین اندازه نانوذرات اکسید مس تولیدی از میکروسکوپ الکترونی TEM و SEM، استفاده شد. که نتایج آنها در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ آمده است.

مسیر علیه باکتری اش‌ریشیاکلی در جدول ۲ آمده است که به روشنی اثبات شد که رشد باکتری بعد از تیمار با نانوذره با غلظت‌های متفاوت ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر، در فاصله‌های زمانی ۲ و ۴ ساعت متوقف شد و پس از ۲۴ ساعت تنها رشد جزئی در آنها دیده شد.

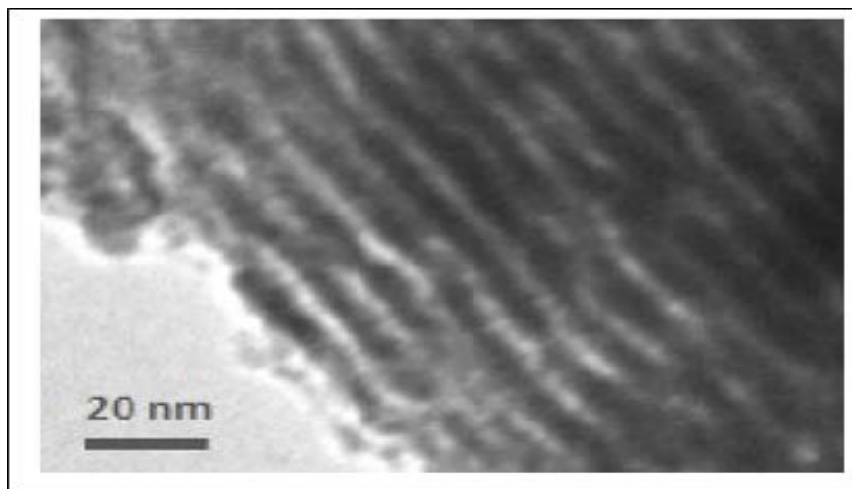
جدول ۵- نتایج باندهی مربوط به پرایمرهای تصویر ۶

پرایمر	باند (bp)	C	T1	T2
OPS-14	950	1	0	0
	900	1	0	0
	800	1	0	0
	600	1	1	0
	175	1	0	0
OPA-09	950	1	0	1
OPS-05	800	1	0	0
	700	1	0	0
OPD-04	900	0	1	0
	500	0	1	1
OPT-17	500	1	1	1

جدول ۴- نتایج باندهی مربوط به پرایمرهای تصویر ۵

پرایمر	باند (bp)	C	T1	T2
OPS-09	1000	1	0	0
	650	0	1	0
OPA-10	950	1	0	0
	900	1	0	0
	750	1	1	0
	650	1	1	0
	600	1	0	0
OPB-7	800	1	0	0
OPQ-14	850	1	1	0
	750	1	1	1
	450	0	1	1
OPT-14	1000	1	1	0
	950	1	0	0
	800	0	1	1
	700	0	1	1
	650	0	1	1
	400	0	1	0
	350	0	1	0

ارزیابی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس: خلاصه نتایج آزمایش فعالیت ضد میکروبی نانوذره اکسید



شکل ۱- عکس میکروسکوپی (TEM) از نانوذرات CuO

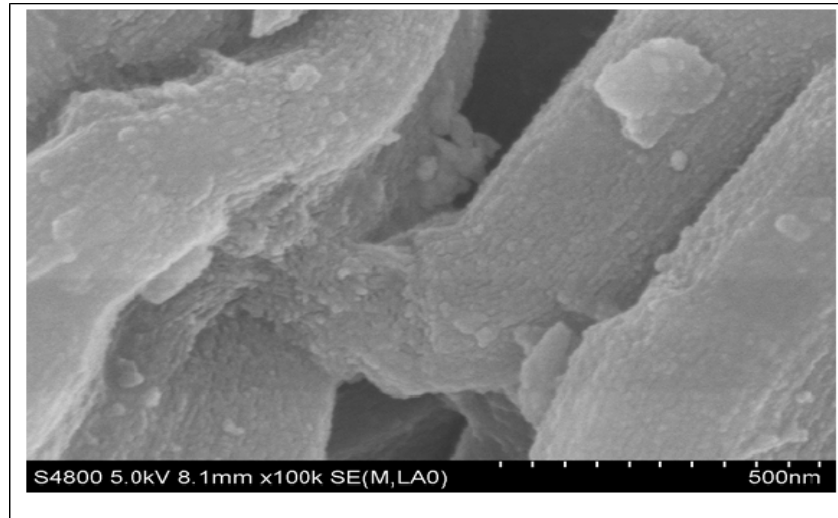
نقاط سیاه نشان دهنده نانوذرات CuO می باشد. که در مناد سلیکا تثبیت شده اند. اندازه نانوذرات اکسید مس کمتر از ۲۰ نانومتر می باشد.

نمونه تیمار اول با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر، نمونه تیمار دوم با غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. سپس اندازه باندهای حاصل از تجزیه RAPD، با استفاده از مارکر تعیین شد. براساس وجود یا عدم وجود

آنالیز محصولات RAPD-PCR: باندهای الکتروفورزی حاصل از تکثیر ۱۴ پرایمر به وسیله RAPD-PCR در شکل‌های ۴، ۵ و ۶ آمده است. که در هر شکل به ترتیب برای هر پرایمر از سمت چپ به راست شامل نمونه کنترل،

هر پرایمر برای نمونه‌های کنترل و تیمار شده‌ها تشکیل می‌دهد.

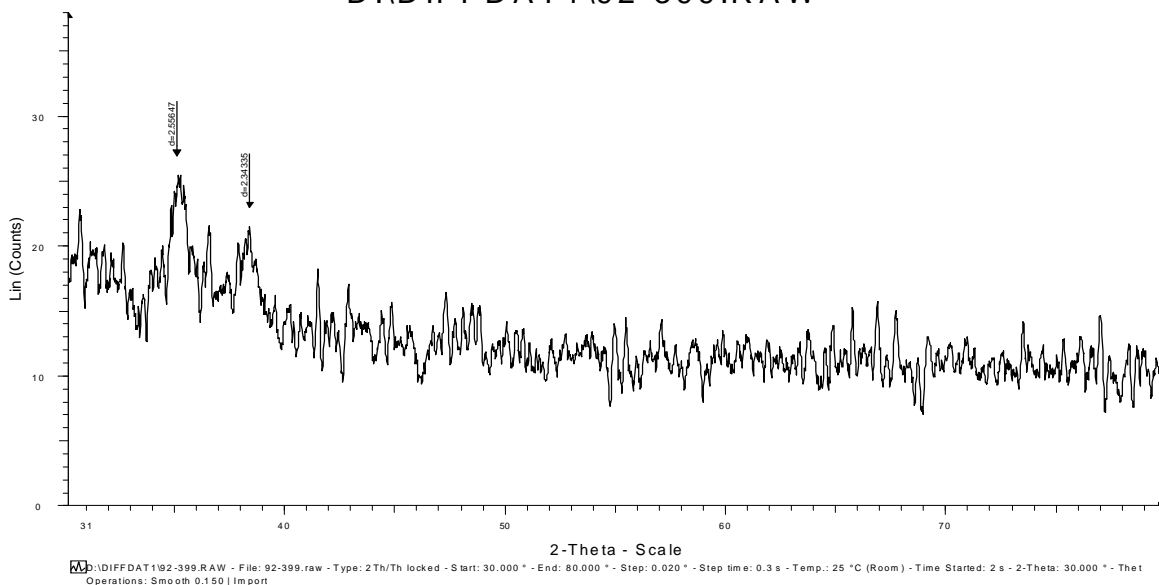
آنها در نمونه‌ها، به ترتیب به صورت یک و صفر امتیازدهی گردید که نتایج آنها در جدول‌های ۳ تا ۵ آمده است. که اساس نتیجه‌گیری تفاوت در باندهایی هست که



شکل ۲- عکس میکروسکوپی که وجود مافذ نانوذرات را نشان می‌دهد

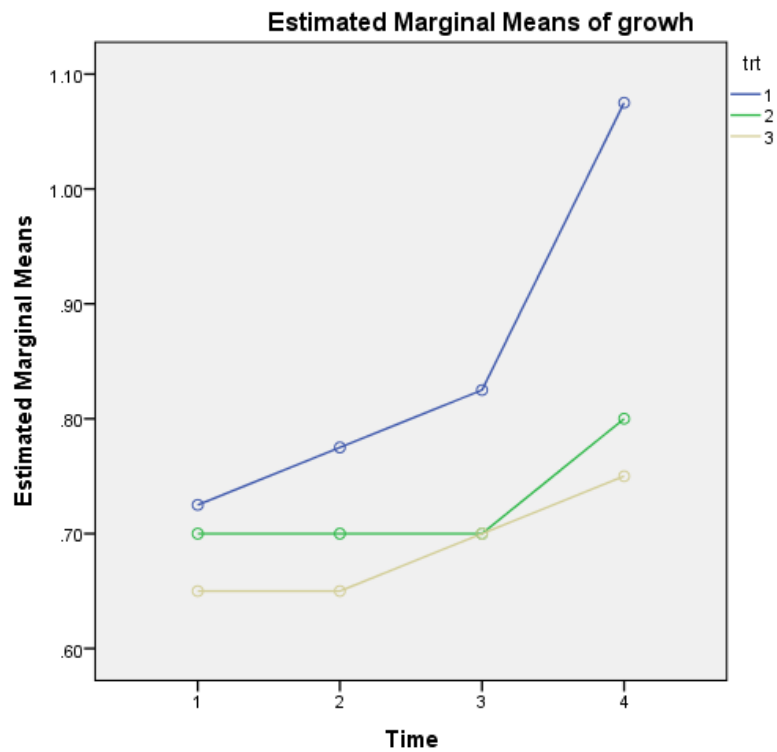
عکس میکروسکوپی (SEM) Scanning electron microscopy که وجود منافذ در نانوذرات سلیکا را نشان می‌دهد.

D:\DIFFDAT1\92-399.RAW



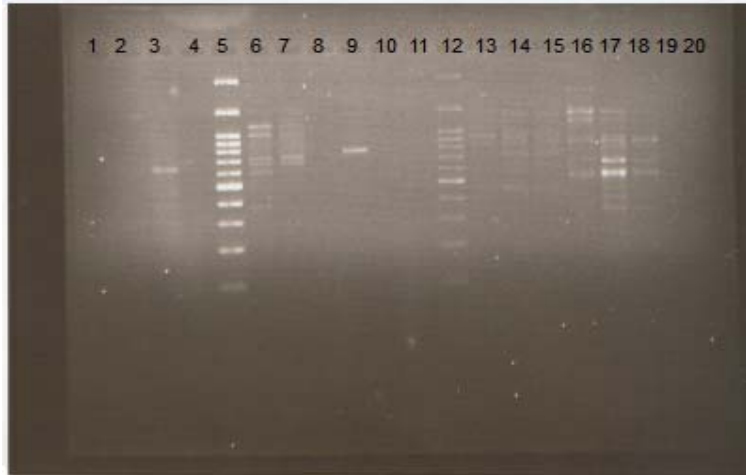
شکل ۳- آنالیز XRD

آنالیز XRD که ثابت کننده حضور ذرات CuO می‌باشد 2-Theta های ۲۶، ۲۸ مربوط به ذرات CuO می‌باشد.



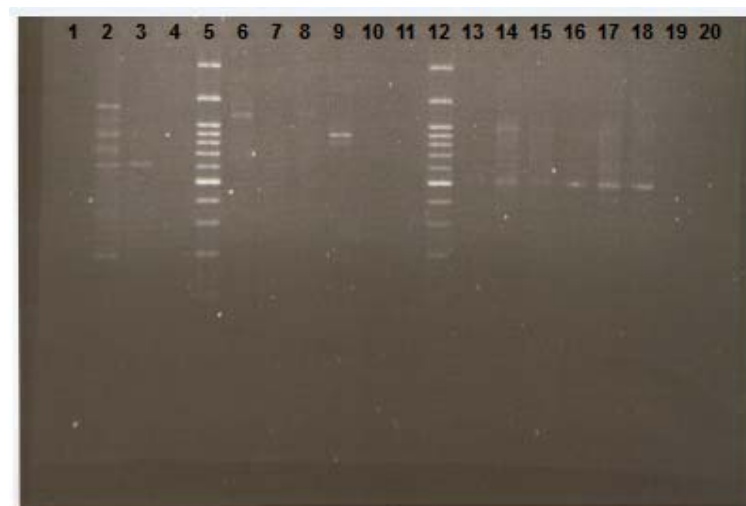
تصویر ۴- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز

۱-۲: خالی، ۳-۵: پرایمر OPR12، ستون ۶: مارکر، ۷-۹: پرایمر OPS11، ۱۰-۱۲: پرایمر OPA11، ستون شماره ۱۳: مارکر، ۱۴-۱۶: پرایمر OPS-13، ۱۷-۲۰: خالی.



تصویر ۵: عکس الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز

۱: خالی، ۲-۴: پرایمر OPS-09، ۵: مارکر، ۶-۸: پرایمر OPA-10، ۹-۱۱: پرایمر OPB-7، شماره ۱۲: مارکر، ۱۳-۱۵: پرایمر OPQ-14، ۱۶-۱۸: پرایمر OPT-14، ۱۹-۲۰: خالی.



تصویر ۶: عکس الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز

۱: خالی، ۲-۴: پرایمر OPS-14، ۵: مارکر، ۶-۸: پرایمر OPA-09، ۹-۱۱: پرایمر OPS-05، ۱۲: مارکر، ۱۳-۱۵: پرایمر OPD-04، ۱۶-۱۸: پرایمر OPT-17، ۱۹-۲۰: خالی.

هم بین گروه شاهد و تیمار شده ها تفاوت داشت. از بین ۳ قطعه تکثیر شده توسط پرایمر OPQ-14، ۲ قطعه بین گروه شاهد و تیمار شده ها متفاوت بودند. برای پرایمر OPT-14 از ۷ قطعه تکثیر شده همه آنها بین گروه شاهد و تیمار شده ها تفاوت داشتند. برای پرایمر OPT-17 فقط یک باند روی ژل تشکیل گردید که هیچگونه تفاوتی بین گروه شاهد و تیمار شده ها مشاهده نگردید.

همچنین در پرایمر OPS-13، ۳ قطعه تکثیر شد که همه آنها در گروه‌های شاهد و تیمار شده ها متفاوت بودند. در هر یک از پرایمرهای OPS-09، OPS-05، OPD-04، ۲ قطعه تکثیر شد که هر دوی آنها بین گروه شاهد و تیمار شده ها متفاوت بودند. برای پرایمرهای OPA-10 و OPS-14، ۵ باند روی ژل تشکیل شد که همه آنها بین گروه شاهد و تیمار شده ها متفاوت بودند. در پرایمرهای OPA-09، OPB-7، فقط یک قطعه تکثیر شد که آن

در شکل ۷، دندروگرام که با روش *UPGMA* در نرم افزار *NTSYS-PC* به منظور مقایسه تنوع ژنتیکی ایجاد شده بین نمونه کنترل و نمونه های تیمار شده با نانوذرات اکسید مس رسم گردید. و مشاهده شد که نمونه کنترل و نمونه های تیمار شده در دو شاخه اصلی جداگانه قرار گرفته اند که این بیانگر ایجاد تفاوت ژنتیکی بین آنها می باشد.

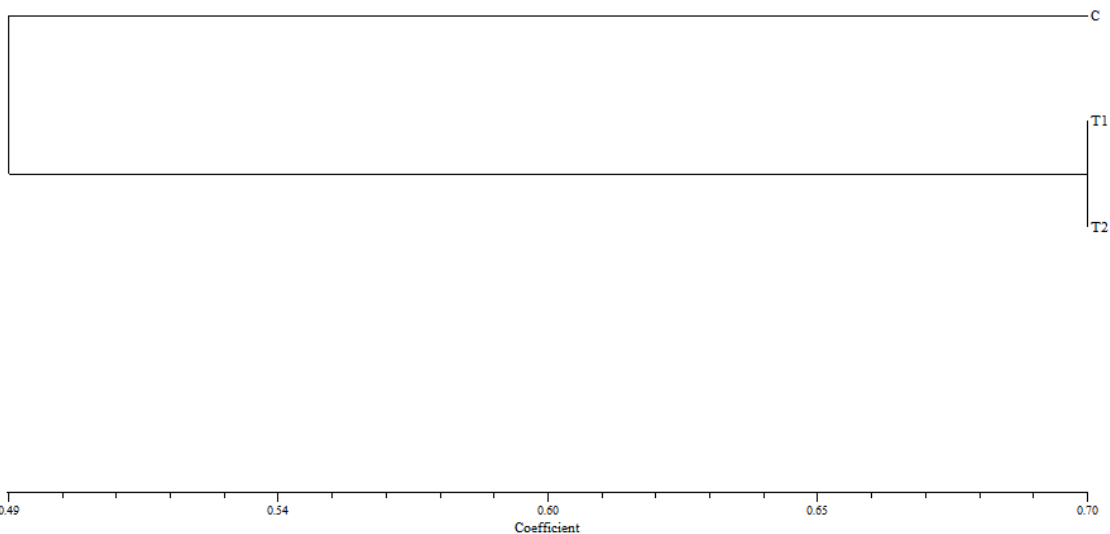
براساس داده های *RAPD*، ماتریکس تشابه برای نمونه های کنترل و تیمار شده با روش *Dic* محاسبه شده که در جدول ۶ آمده است. فاصله ژنتیکی بین نمونه ها از ۱/۰۰۰ تا ۰/۴۵۱۶۱۶ متغیر بوده که هر چه اعداد به ۱ نزدیک تر، شباهت ژنتیکی بین نمونه ها بیشتر شده است. که نشان می دهد با افزایش غلظت نانوذرات اکسید مس فاصله ژنتیکی ایجاد شده بین نمونه بیشتر شده است.

جدول ۶- ماتریکس تشابه برای نمونه های کنترل و تیمار شده

Proximity Matrix

Case	Dice (Czekanowski or Sorenson) Measure		
	1:ctr	2:t30	3:t60
1:ctr	1.000		
2:t30	0.5294118	1.000	
3:t60	0.4516129	0.7037037	1.000

This is a similarity matrix



شکل ۷- دندروگرام حاصل از تجزیه بر اساس آزمون ریپید با روش *UPGMA* توسط نرم افزار *NTSYS-PC*

باکتریایی و ضد عفونی کننده استفاده می شده است. امروزه نیز با پیشرفت مقاومت باکتریها نسبت به آنتی بیوتیکها و ضد عفونی کننده های معمول، باعث توجه روز

بحث

در زمانهای گذشته، از فلز مس به عنوان یک عامل ضد

می‌شوند. همچنین نانوذرات، یون نقره آزاد می‌کنند که این خود منجر به افزایش فعالیت ضدباکتریایی آنها می‌شود (۱۰ و ۲۰).

نانوذرات اکسید فلزی مکانیسم اثر مشابهی دارند همان‌طور که در تحقیقات پیشین بیان شده است نانوذرات اکسید فلزی در رونویسی و ترجمه اختلال ایجاد می‌کنند (۲۵). همچنین نانوذرات می‌توانند شکستگی DNA تک رشته‌ای را القاء کرده و در بیان ژن اثر بگذارند (۹). این تحقیق نیز به منظور تعیین اثر ژنوتوکسیک نانوذرات اکسید مس بر روی باکتری اشریشیاکلی سویه O157:H7 به عنوان مدل برای باکتریهای گرم منفی صورت گرفت.

در این راستا از مجموع ۱۴ پرایمر به کار رفته در واکنش RAPD-PCR وجود یا فقدان باند در تصویر ژل (شکلهای ۴ و ۵ و ۶) حاکی از ایجاد تغییر روی توالی DNA توسط نانوذرات اکسید مس می‌باشد. به طوری که تعداد زیادی از پرایمرها توالیهای هدف را شناسایی نکرده و لذا قطعه مربوطه تکثیر پیدا نکرد و فقدان باند روی ژل آگارز در تحقیق حاضر موجود بود. تفاوت بین باندهای مشاهده شده در گروههای تیمار شده و کنترل باکتریها حاکی از آن است که توالیهای هدف پرایمرها دستخوش تغییراتی در باکتریهای تیمار شده، گردیده اند که باعث تفاوت در اتصال پرایمرها و تکثیر قطعات در PCR به واسطه آنها شده است که دلیل این موضوع می‌تواند احتمالاً ناشی از ایجاد جهش مستقیم یا غیرمستقیم روی DNA، توسط نانوذرات اکسید مس بوده و یا همان طوری که پال و همکارانش در سال ۲۰۰۷ گزارش کرده اند بخاطر ایجاد اختلال در مکانیسم همانندسازی توسط DNA پلیمرز می‌شود. بطوریکه احتمالاً صحت همانندسازی را مختل می‌نماید تا بدین گونه در خلال همانندسازی تغییراتی در توالیهای DNA ایجاد شود که منجر به بروز تفاوت در توالیهای هدف مورد اتصال پرایمرهای RAPD می‌شود (۱۹). نانوذرات اکسید مس

افزون به نانوذرات مس و اکسید مس با فعالیت واکنشی و ضد میکروبی بالا و قیمت ارزان شده است. نانوذرات اکسید مس در غلظتهای کم برای سلولهای بدن سمی نمی‌باشد. در این مطالعه غلظت مشخصی از نانوذرات اکسید مس جهت تیمار باکتریها و بررسی خاصیت ضد میکروبی به کار برده شد و با توجه به اینکه براساس مطالعات زیادی اثر نانوذرات اکسید مس به عنوان ماده ضد میکروبی به اثبات رسیده است (۱۸ و ۲۴). پس هدف اصلی این تحقیق بررسی اثر نانوذرات اکسید مس روی ژنوم باکتری بود.

نتایج خاصیت ضد میکروبی مطالعه حاضر نیز نشان داد، نانوذره اکسید مس با قطر کمتر از ۲۰ نانومتر در دزهای ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر دارای خواص ضد میکروبی به نسبت خوبی بود و توانست تقریباً رشد تمامی باکتریهای موجود در نمونه را مهار کند. همچنین در طی آزمایشات فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مس، بوگدانویکد و همکارانش به روشنی اثبات کردند که فقط بعد از ۲ ساعت تماس باکتری اشریشیاکلی با نانوذرات مس با غلظت ۳۲ ppm، باکتریها به بیش از ۹۹ درصد کاهش پیدا کردند (۶). در این تحقیق نیز مشاهده شد که رشد باکتری بعد از ۲ ساعت تیمار با غلظت ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذره اکسید مس به طور کامل متوقف گردید پس با توجه به این تحقیقات می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات مس با کمترین غلظت نیز بیشترین فعالیت ضد میکروبی را در کمترین زمان از خود نشان می‌دهند. علاوه بر اینکه خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید فلزی به اثبات رسیده است. گزارشاتی نیز مبتنی بر اثر نانوذرات بر روی ژنوم باکتریها نیز گزارش شده است. نانوذرات به غشای باکتری متصل شده و همچنین به داخل سلول باکتری نفوذ می‌کنند. غشای باکتری دارای پروتئینهای حاوی گروه سولفور می‌باشد و نانوذرات نقره نه تنها با این پروتئینها، بلکه با ترکیبات حاوی فسفر از جمله DNA، واکنش می‌دهند. نانوذرات همچنین به زنجیره تنفسی که در تقسیم سلولی مؤثر است حمله می‌کنند و منجر به مرگ سلولی

در سال ۲۰۰۴، Sondi و همکارانش نشان داده‌اند که نانوذرات بر روی آنزیم‌های دخیل در همانندسازی اثر می‌گذارند (۲۶). بر همین اساس باتوجه به اینکه در این تحقیق باکتری‌های در حال رشد و همانندسازی با نانوذرات اکسیدمس تیمار شده‌اند، می‌توان چنین استدلال کرد که احتمالاً در حین همانندسازی و همچنین در مکانیسم‌های ترمیمی که توسط آنزیم‌های مرتبط انجام می‌گیرد اختلال ایجاد می‌کند تا موجب جهش‌های متعدد در توالی بازی DNA شود. فلذا می‌توان نتیجه گرفت که با ایجاد جهش روی توالی ژن‌های درگیر در کنترل چرخه سلولی موجب کاهش بیان آنها شده و در نتیجه چرخه سلولی متوقف می‌گردد که نتیجه مشاهده شده در این تحقیق نیز کاهش رشد باکتریها را نشان داده و مطلب فوق را تأیید می‌نماید.

اما درمورد استفاده از نانوذرات نیاز به تحقیقات بیشتری است. و پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده تأثیرات استفاده از نانوذرات در سلول‌های یوکاریوتی، اثرات نانوذرات بر روی ژنوم یوکاریوتها و تأثیر نانوذرات بر روی سلول‌های سرطانی بررسی شود تا نانوذرات بتواند به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیکها و ضد عفونی کننده‌های معمول با مضرات پایین باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از گروه بیوتکنولوژی دانشگاه دولتی مراغه به دلیل همکاری صمیمانه در تامین پرایمرها و نانوذرات مورد استفاده سپاسگزاری می‌گردد.

می‌تواند باعث القای شکستگی در DNA تک رشته‌ای شده و در بیان ژن اثر بگذارند (۷). بنابراین نانوذرات سبب تغییرات گسترده‌ای در ساختار DNA کروموزومی باکتری که شکستگی‌هایی در مولکول DNA ایجاد کند می‌شود و از آنجایی که این قطعات به صورت تصادفی ایجاد شده‌اند بسیاری از این قطعات توسط پرایمرها شناسایی نشده و تکثیر نشدند. نانوذرات همچنین سبب اختلال در ژن‌های می‌شوند که سازوکارهای رونویسی و همانندسازی را کنترل می‌کنند. فعالیت و توالی بازهای پروموتورها نیز تحت تأثیر نانوذرات قرار گرفته و خصوصاً می‌تواند بر روی توانایی RNA پلیمراز برای باز کردن مارپیچ و انجام نسخه برداری تأثیر بگذارد. در واقع هر عاملی که به DNA آسیب زند اساساً می‌تواند سبب مرگ آن موجود زنده شود.

Bondarenko و همکارانش در سال ۲۰۱۲ میلادی، در تحقیق خود بیان نمودند نانوذرات اکسید مس، با آمین و گروه‌های کربوکسیل روی سطح سلول‌های میکروبی واکنش داده و همچنین در طی واکنش اکسیداسیون مس Cu(I) به Cu(II)، Ros تولید می‌کنند که باعث آزاد شدن رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود که به پروتئین‌های ضروری و DNA آسیب رسانده و باعث فعالیت ضد باکتریایی می‌شود (۷ و ۲۲).

تغییرات مشاهده شده در توالی DNA در این تحقیق همچنین می‌تواند عاملی برای بازدارندگی رشد و چرخه سلولی از طریق بروز جهشها و به دنبال آن تغییر بیان ژن‌های مرتبط با رشد و کنترل چرخه سلولی باشند (۲۹).

منابع

- ۱- براون، ت. (۱۳۹۰)، مراد پور، ز، قاسمیان، ع، مقدمه‌ای بر کلون‌سازی ژن و بررسی DNA، انتشارات خسروی با همکاری نشر دیباچ.
- ۲- Amelia, M., Lincheneau, C., Silvi, S., Credi, A. (2012), Electrochemical properties of CdSe and CdTe quantum dots. Chem. Soc. Rev. 2012; 41: 5728–5743.
- ۳- Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasemets, K., Kahru, A. (2009), Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae

- Pseudokirchneriella subcapitata. Sci. Total Environ. 407, 1461e1468.
- 4- Baker-Austin, C., Wright, MS., Stepanauskas, R., McArthur, JV. (2006), Co-selection of antibiotic and metal Resistance. Trends Microbiol. ;14:176–18.
 - 5- Beranova, J., Seydlova, G., Kozak, H., Benada, O., Fiser, R., Artemenko, A., Konopasek, I., Kromka, A. (2014), Sensitivity of bacteria to diamond nanoparticles of various size differs in gram-positive and gram-negative cells, FEMS Microbiol. Lett. doi:http://dx.doi.org/10.1111/1574-1111/6968.
 - 6- Bogdanovića, U., Lazić, V., Vodnik, V. (2014), Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. Materials Letter.
 - 7- Bondarenko, O., Ivask, A., Käkinen, A., Kahru, A. (2012), Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: Kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. Environ. Pollut., 169, 81–89.
 - 8- Brunner, T.J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., Bruinink, A., Stark, W.J. (2006), *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. Environ. Sci. Technol. 40, 4374–4381.
 - 9- Chang, Y., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., Xing, G. (2012), The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. Materials 2012, 5, 2850-2871; doi:10.3390/ma5122850.
 - 10- Damm, C., Münstedt, H., Rosch, A. (2008) The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silvernano- and microcomposites. Mater Chem Phys; 108(1): 61-6.
 - 11- Fahmy, B., Cormier, S.A. (2009), Copper oxide nanoparticle induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells, Toxicol. In Vitro 7 1365-1371.
 - 12- Gong, P., Li, H., He, X., Wang, K., Hu, J., and Tan, W. (2007), Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles. Nanotechnology, Vol.18, P.604–11.
 - 13- Heinlaan, H., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C., Kahru, A. (2008), Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus paltyurus*. Chemosphere 71, 1308e1316.
 - 14- Huh, A.J. and Kwon, Y.J. (2011), Nanoantibiotics: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. J. Control. Release 156, 128–145.
 - 15- Jones, N., Ray, B., Ranjit, K.T., Manna, AC. (2008), Antibacterial activity of ZnO. FEMS Microbiol Lett. 297:71-76.
 - 16- Landini, P., Antoniani, D., Burgess, J.G., Nijland, R. (2010), Molecular mechanisms of compounds affect bacterial biofilm formation and dispersal. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86, 813–823.
 - 17- Mansour, H.M., Rhee, Y.S., Wu, X. (2009), Nanomedicine in pulmonary delivery. Int. J. Nanomedicine ; 4 :299–319
 - 18- Murugan, V., Sadhasivam, S. (2012), Glucosamine functionalized copper nanoparticles: preparation, characterization and enhancement of anti-bacterial activity by ultraviolet irradiation. chemical engineering.
 - 19- Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M. (2007), Does the antibacterial activity of nanoparticles depend on the shape of the nanoparticles A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 1712-1720.
 - 20- Panacek, A., Kvitek, S.L., Prucek, R., Kolgr, M., Vecerova, R., Pizurova, N. (2006) Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. J Phys Chem B; 110(33): 16248-53.
 - 21- Rispoli, F., Angelov, A., Badia, D., Kumar, A., Seal, S., Shahb, V. J. (2010), Hazard Mater.180:212–6.
 - 22- Robert, Y., Pelgrift Adam, J., Friedman, M. (2013), "Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance". Advanced Drug Delivery Reviews.
 - 23- Ruparelia, J.P., Chatterjee, A.K., Duttagupta, S.P. (2008), Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomater. 2008;4:707-716.
 - 24- Shankar, Sh., Jong-Whan, R. (2014), Effect of copper salts and reducing agents on characteristics and antimicrobial activity of copper nanoparticles. Materials Letters.
 - 25- Soenen, S.J.H., Himmelreich, U., Nuytten, N., Pisanic, T.R., Ferrari, A., De Cuyper, M. (2010), Intracellular nanoparticle coating stability determines nanoparticle diagnostics efficacy and cell functionality. *Small* 6, 2136–2145.
 - 26- Sondi, I. and Sondi, S.B. (2004), Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case

- study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. *Colloid Interf. Sci.* 275: 77-182.
- 27- Sosnik ,A., Carcaboso, A.M., Glisoni, R.J., Moretton , D., Chiappetta A. (2010), New old challenges in tuberculosis: potentially effective nanotechnologies in drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 : 547–559.
- 28- Sutherland, I. (2001), Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky Framework. *Microbiology*; 147: 3–9
- 29- Turner, Philips, *Molecular biology*, 2nd, 2000. ISBN: 8397-36-8.
- 30- Weir, E, A. Lawlor, A. Whelan, F. Regan .(2008), The use of nanoparticles in antimicrobial materials and their characterization. *Analyst* 133 835–845.
- 31- Whitesides, G.M. (2005), Nanoscience, nanotechnology, and chemistry *Small.* 1, 172–179
- 32- Witte, W. (2004), International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Infect. Genet. Evol.* 4, 187–191
- 33- Yan, L., Zhao, F., Li, S., Hu, Z., Zhao, Y. (2011), Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes. *Nanoscale*, 3, 362–382
- 34- Yoon. KY., Byeon, JH., PARK, JH., Hwang, J., (2007), constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci Total Environ.* 373:572-575

An investigation of the effect of copper nanoparticles on *E.coli* genome by RAPD molecular markers

Amjady F.¹, Golestani emani B.¹ and Karimi F.²

¹ Biology Dept., Urmia Branch, Islamic Azad University, URMIA, I.R. of Iran

² Biothechnology Dept., University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran

Abstract

Regarding the bacterial resistance of common antibiotics and anti-microbial agents , a great number of studies have been conducted to discover the recent types of anti-microbial agents. With the recent developments in nanotechnology, copper has been extensively used as nanoparticles against all positive-gram and to negative-gram particles due to its low price and high anti-microbial activity. In the present study, copper oxide nanoparticles of (<20 nm) have been used to study its effect on the genome of *Escherichia coli* strain O157: H7 as a model for Gram-negative bacteria. To this end, the bacteria were first treated with 30 and 60 µg/mL copper oxide nanoparticles at the intervals of 2, 4, and 24 hours. and then their DNA were extracted. In order to investigate the effects of copper oxide nanoparticles on the genome, the chain reaction techniques of (RAPD-PCR) was employed. Using the software NTSYS-PC, the results obtained from electrophoresis of PCR products on agaros gel were analyzed. The results of the study revealed that copper oxide nanoparticles not only affects the growth of bacteris but also affect the sequencing of genomic DNA and leads to the changes of them in different points.

Key words: nanoparticles copper oxide , *Escherichia coli* , Rapid polymerase chain reaction (RAPD-PCR)