

بررسی اثر نانوذرات اکسید مس روی ژنوم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از

نشانگرهای مولکولی RAPD

نسرین زارع^۱، بهرام گلستانی ایمانی^{۱*} و فرخ کریمی^۲

^۱ ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، گروه زیست‌شناسی

^۲ مراغه، دانشگاه مراغه، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۲

چکیده

با توجه به مقاومت باکتریها نسبت به آنتی‌بیوتیکها و عوامل ضد میکروبی مرسوم، تحقیقات بسیاری برای یافتن انواع جدید عوامل ضد میکروبی مؤثر انجام شده است. 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 ذرات اکسید مس با اندازه (کمتر از ۲۰ نانومتر) برای بررسی اثر آن روی ژنوم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان مدل برای باکتریهای گرم مثبت استفاده شد. بدین منظور ابتدا باکتریها را با غلظتهای ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با این نانو ذرات تیمار کرده و در فاصله‌های زمانی ۲، ۴ و ۲۴ ساعت خاصیت ضد میکروبی نانوذرات بررسی گردیده و استخراج DNA صورت گرفت. تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز ریپد (RAPD-PCR) جهت بررسی تغییرات DNA ژنومی باکتریهای تیمار شده به کار گرفته شد. با استفاده از نرم افزار NTSYS-PC، نتایج حاصل از الکتروفورزیس محصولات PCR روی ژل آگارز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این تحقیق مشاهده گردید نانو ذرات اکسیدمس علاوه بر اثر مهار کنندگی روی رشد باکتریهای استافیلوکوک اورئوس روی توالی DNA ژنومی آنها اثر گذاشته و باعث تغییر آن در نقاط مختلف گردیده است.

واژه های کلیدی: نانوذرات اکسیدمس، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ریپد (RAPD-PCR)

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

مقدمه

داده‌اند (۵). در میان نانوذرات دیگر، اخیراً به نانو ذرات اکسید 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 شده‌اند (۱۱ و ۲۷). بنا به گفته محققان نانو ذرات اکسید مس می‌توانند با DNA سیتوپلاسمیک باکتری و پروتئینهای باکتریایی به خصوص آنزیمهایی که در مراحل حیاتی سلول همانند زنجیره انتقال الکترون شرکت دارند و همچنین باپپتید و گلیکانهای دیواره سلولی و غشای پلاسمایی واکنش داده و باعث تخریب

باکتریها در برابر آنتی بیوتیکها و بسیاری از عوامل ضد باکتریایی مقاومت پیدا کرده‌اند که این مقاومت قابل توارث بوده و باعث ادامه بیماریهای عفونی می‌شود که یکی از بزرگترین چالشهای سلامتی سراسر جهان است. این پیشرفت متناوب استراتژیهای درمانی باکتریها را بر می‌انگیزد (۳ و ۲۸). در چند دهه اخیر نانو مواد به دلیل ویژگیهای جدید شامل بزرگ بودن نسبت سطح به حجم و فعالیت مهاری بالا علیه باکتریها توجه زیادی پیدا کرده است (۲ و ۲۹). علاوه بر این، گزارش شده که نانوذرات با اندازه کوچک فعالیت ضد میکروبی خوبی از خود نشان

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به methicillin (MRSA) آلوده شدند و بعد از دو ساعت قرارگرفتن این سطوح در برابر MRSA، بازده کشندگی MRSA در روش رسوب گذاری با اسپری سرد به صورت مؤثری کاهش یافت که ناشی از سرعت بالای ذرات اسپری شده است. اثر سرعت بالاروی ذرات به روش اسپری سرد باعث افزایش ساختار ریز اکسید مس و انتشار یونی می‌شود و این یونهای اکسید مس مسئول فعالیت آنتی‌میکروبی هستند (۲۶). نانو ذرات به هنگام استفاده به عنوان ماده ضد باکتریایی بر روی سلولهای یوکاریوتی و سایر ارگانیسمها نیز اثر گذارند. لذا باید برای به دست آوردن غلظتهای مؤثر ضد باکتریایی و تاثیر ژنوتوکسیکی آن به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیکها و مواد ضد عفونی کننده بدون ضرر، بیشتر بررسی گردد (۲۰). از آنجایی که تاکنون اثر ضد باکتریایی از طریق اثر نانو ذرات مس روی ژنوم بررسی نشده است. این تحقیق به منظور بررسی اثر دزهای مختلف در زمانهای متفاوت تیماری نانو ذرات اکسید مس روی ژنوم استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان باکتری مدل صورت گرفت که بدین منظور از تکنیک (RAPD-PCR) در این مطالعه استفاده شده است.

مواد و روشها

کشت باکتری و شرایط کشت، پس از انجام کشت افتراقی روی محیط ائوزین متیلن بلو و انجام تست کاتالاز برای اطمینان از نوع باکتری، باکتری در ۵ میلی لیتر محیط BHBbroth به مدت یک شبانه روز در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با دور rpm ۲۰۰ کشت داده شد و میزان رشد باکتریها از طریق اندازه گیری چگالی نوری (OD) محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر کنترل گردید. (۱)

تهیه نانو ذرات اکسید مس: نانو ذرات اکسید مس با قطر کمتر از ۲۰ نانومتر که توسط گروه بیوتکنولوژی دانشگاه دولتی مراغه سنتز و در اختیار این تحقیق قرار گرفت.

کامل غشای باکتری شوند (۸). علاوه بر این نانو ذرات اکسید مس مستقیماً با ارگانهای اکسیداتیو مانند میتوکندری و پروتئینهای فعال واکنش می‌دهند و تولید ROS را در سلولها تحریک می‌کنند. یونهای مس که به وسیله نانو ذرات تولید می‌شوند می‌توانند به وسیله واکنش‌های شیمیایی مختلف، تولید ROS را در سلولها القاء کنند. ROS نیز به نوبه خود می‌تواند شکستن DNA تک رشته‌ای را القاء کرده و در بیان ژن اثر بگذارد (۴ و ۱۲). همچنین بنابه گفته محققان نانو ذرات اکسید مس ممکن است کاتیونهای مس آزاد کند که باعث افزایش غلظت یونهای فلزی در آن محل شود و کاتیونهای فلزی هموستازیس سلول باکتری را مختل کند (۷). نانو ذرات 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 (۱۰). به دلیل اثرات ضد میکروبی نانو ذرات مس، این مواد در بسیاری از محصولات تجاری، بهداشتی، پزشکی و همچنین در صنایع مهندسی مانند کاتالیزورها، وسایل نوری و کاربردهای الکترونیک به کار می‌روند. علاوه بر فعالیت ضد میکروبی این نانو ذرات، اثر ضد ویروس و ضد قارچ این نانو ذرات نیز گزارش شده است (۱۹). نانو ذرات می‌تواند در شرایط نامساعد مانند دمای بالای استریلیزاسیون، که تحت آن آنتی‌بیوتیکهای مرسوم غیرفعال می‌شوند مقاومت کنند. نانومواد که در تحویل آنتی‌بیوتیکها استفاده می‌شود دارای مزیت چندگانه ۱- توزیع شکل یکنواخت در بافت هدف ۲- بهبود قابلیت حل شدن ۳- رهاسازی کنترل شده و تحمیل شده هستند (۱۷). بر روی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات روی باکتریهای بیماریزای انسان مانند اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه زیادی شده است (۲۴). یک مطالعه اثبات مفهوم اثر ضد عفونی کنندگی از اکسید مس در سه سطح انجام شده است. سطوح توسط رسوب اکسید مس با استفاده از سه روش اسپری حرارتی، پلاسما اسپری و اسپری سرد تولید شد. سپس سطوح با باکتری

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

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی پرایمر
OPS13	GTCGTTCTG
OPR12	ACAGGTGCGT
OPA09	GGGTAACGCC
OPT17	TCTGGTGAGG
OPS09	TCCTGGTCCC
OPB08	GTGATCGCAG
OPA11	CAATCGCCGT
OPB07	GGTGACGCAG
OPC09	CTCACCGTCC
OPT14	AATGCCGCAG
OPS11	AGTCGGGTGG
OPA10	GTGATCGCAG
OPQ14	GGACGCTTCA
OPR11	GTAGCCGTCT
OPS03	TCTGGTGAGG

بررسی نتایج PCR - RAPD: بعد از اتمام واکنش PCR، جهت آشکارسازی باندها، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورزیس گردید.

آنالیز داده‌های حاصل از الکتروفورزیس محصولات PCR: باندهای مشاهده شده روی ژل آگارز براساس وجود یا عدم وجود آنها برای هر پرایمر، به ترتیب به صورت یک و صفر امتیازدهی گردید که نتایج در جداول ۳ تا ۵ آمده است. سپس داده‌ها در نرم افزار NTSYS-PC برای مقایسه از رسم ماتریکس تشابه به روش Dic و دندروگرام با روش UPGMA مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

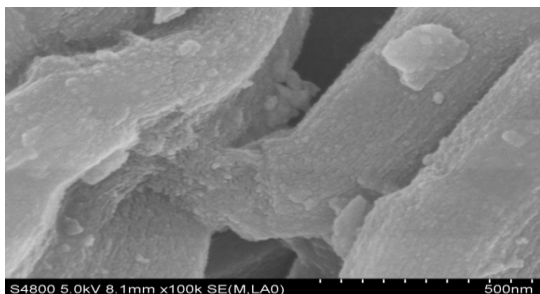
به منظور تأیید صحت نانوذرات اکسید مس، میکروسکوپ الکترونی TEM و SEM استفاده گردید که در این عکسها نانوذرات اکسید مس در نقاط سیاه دیده می‌شود و در

مشخصات آن توسط میکروسکوپ الکترونی آنالیز گردید. برای تهیه محلول استوک از بافر فسفات سالین با PH: 7.4 به عنوان حلال نانوذرات اکسید مس استفاده شد.

بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس: جهت بررسی اثر نانوذرات، باکتریها با غلظتهای ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذره اکسید مس در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰rpm تیمار شدند. چگالی نوری هر کدام از لوله‌های آزمایش در طول موج ۶۰۰ نانومتر و در فاصله‌های زمانی ۴،۲ و ۲۴ ساعت جهت سنجش رشد جمعیت باکتریها اندازه‌گیری شد.

استخراج DNA: DNA ی ژنومی باکتری شاهد و تیمار شده با استفاده از کیت استخراج دی ان ا (شرکت ژن مارک) مطابق با دستورالعمل کیت مذکور استخراج گردیده و کمیت و کیفیت آن با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورزیس روی ژل آگارز ۱ درصد آنالیز گردید.

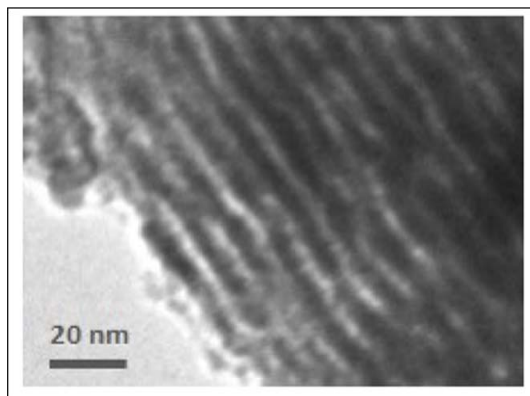
انجام واکنش زنجیره پلیمرز RAPD-PCR DNA ژنومی، با استفاده از ۱۵ پرایمر ۱۰ جفت بازی RAPD-PCR که به طور تصادفی انتخاب شده و از دانشگاه دولتی مراغه تهیه شده بودند، تکثیر شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول (۱)، ذکر شده است. بدین ترتیب که مقدار ۱ میکرولیتر پرایمر، ۲/۵ میکرولیتر (۱۰x) PCRbuffer، ۳ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده و ۰/۳ میکرولیتر TaqDNA polymerase که با ۱۶/۲ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۲۵ میکرو لیتر رسانده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Corbettresearch, Australia) با برنامه زیر انجام گرفت: واسرشت شدن اولیه DNA الگودر دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل به ترتیب، دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه جهت واسرشت شدن رشته‌های DNA الگو، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه جهت



شکل ۲- عکس میکروسکوپی (SEM) Scanning electron microscopy که وجود منافذ در نانوذرات سیلیکا را نشان می‌دهد.

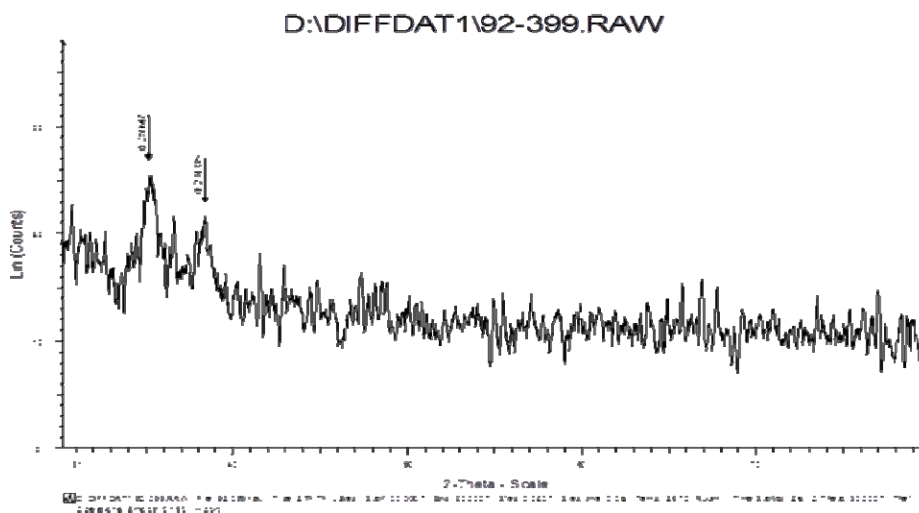
ارزیابی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس: نتایج آزمایش فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس این را ثابت کرد که رشد باکتری بعد از تیمار با نانوذرات با غلظت‌های متفاوت ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در فاصله‌های زمانی ۲ و ۴ ساعت متوقف شد و پس از ۲۴ ساعت رشد جزئی در آنها دیده شد. جدول شماره ۲ گویای این واقعیت می‌باشد.

منافذ سیلیکا ثبت شده‌اند. ذرات سیلیکا سبب پایداری نانو ذرات اکسید مس می‌شود. نانو ذرات اکسید مس در حالب آزاد ناپایدار هستند و بعد از مدتی قرار گرفتن در محیط خاصیت خود را از دست می‌دهند. نتایج در شکل های ۱، ۲ و ۳ آمده است.



شکل ۱- عکس میکروسکوپی (TEM) Transmission electron microscopy از نانو ذرات CuO.

نقاط سیاه نشان دهنده نانو ذرات CuO می‌باشد. که در منافذ سیلیکا ثبت شده‌اند. اندازه نانوذرات اکسید مس کمتر از ۲۰ نانومتر می‌باشد.



شکل ۳- آنالیز XRD که تأیید کننده حضور نانو ذرات CuO می‌باشد. 2-Theta های ۳۶، ۳۹ مربوط به ذرات CuO می‌باشد که در کریستالوگرافی کاملاً مشخص است.

جدول ۲- میزان تغییرات جذب نوری (OD) نمونه‌ها در طول موج (600 nm)

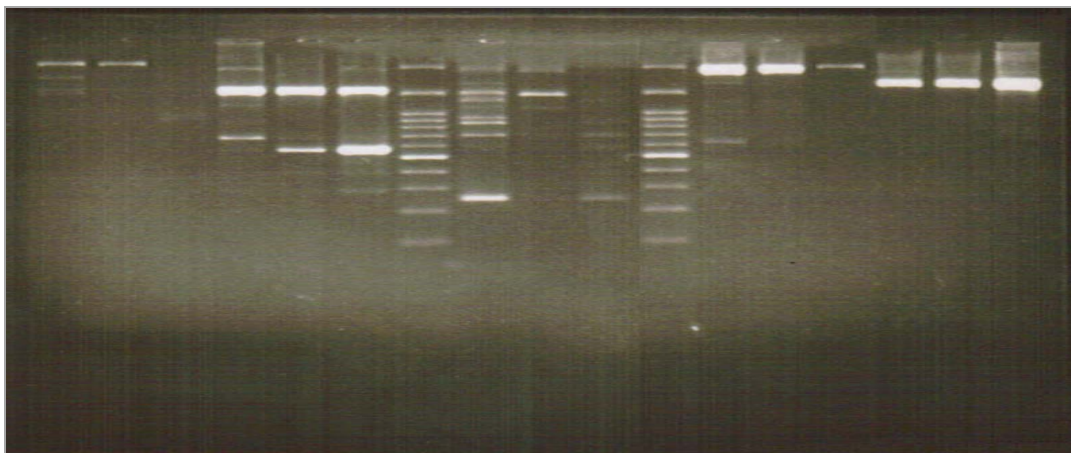
غلظت	شماره لوله	قبل از تیمار	بعد از ۲ ساعت	بعد از ۴ ساعت	بعد از ۲۴ ساعت
شاهد	۱	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۸	۱/۳۹
۳۰ μg/ml	۲	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۱/۰
	۳	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۱/۲
۶۰ μg/ml	۴	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۱/۲
	۵	۰/۸۲	۰/۸۲	۰/۸۲	۱/۰

08. ۵ باند روی ژل تشکیل شد که تمامی باندها بین گروه شاهد و تیمار شده‌ها متفاوت بودند. برای پرایمر OPB-07، فقط یک باند روی ژل تشکیل گردید که هیچ گونه تفاوتی بین گروه شاهد و تیمار شده‌ها مشاهده نگردید. از بین ۴ قطعه تکثیر شده توسط پرایمر OPC-09، ۲ قطعه بین گروه‌های شاهد و تیمار شده متفاوت بودند. در پرایمر OPT-14، ۶ باند تشکیل شد که ۵ باند بین گروه شاهد و تیمار شده‌ها متفاوت بودند. از بین ۸ قطعه تکثیر شده توسط پرایمر OPA-10، ۷ قطعه بین گروه شاهد و تیمار شده‌ها متفاوت بودند. برای پرایمر OPQ-17، ۳ قطعه تکثیر شد که یک قطعه بین گروه شاهد و تیمار شده‌ها متفاوت بود. در پرایمر OPS-03، از ۵ قطعه تکثیر شده، ۳ قطعه آنها بین گروه شاهد و تیمار شده‌ها تفاوت داشتند. برای پرایمر OPR-11 فقط یک باند روی ژل تشکیل گردید که این باند بین گروه شاهد و تیمار شده‌ها متفاوت بود.

ماتریکس تشابه: براساس وجود یا عدم وجود باند، ماتریکس تشابه برای نمونه‌های کنترل و تیمار شده با روش Dic محاسبه شده که در جدول ۷ بدست آمده است. فاصله ژنتیکی بین نمونه‌ها از ۱/۰۰۰۰۰۰ تا ۰/۴۸۰۰۰۰۰ متغیر بوده که هر چه اعداد به ۱ نزدیک تر، شباهت ژنتیکی بین نمونه‌ها بیشتر شده است.

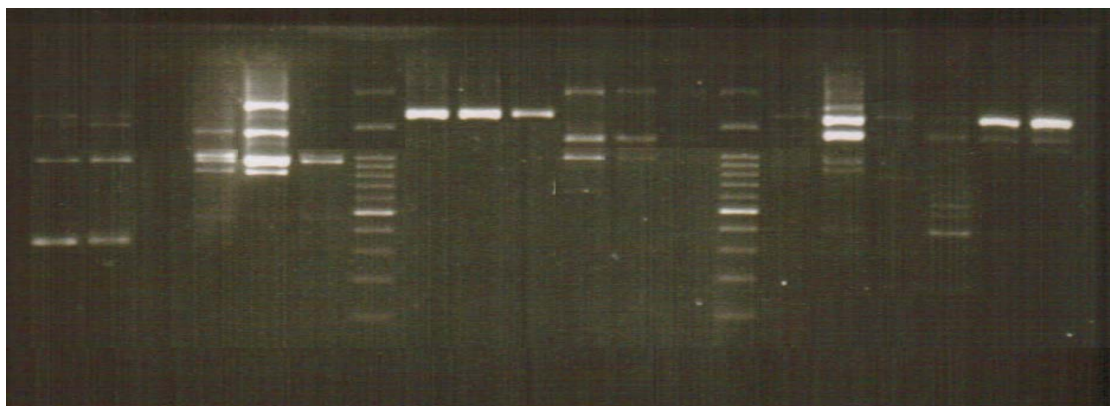
آنالیز محصولات RAPD-PCR: باندهای مربوط به قطعات تکثیر یافته توسط ۱۵ پرایمر به وسیله RAPD-PCR براساس وجود یا عدم وجود آنها در نمونه‌ها، به ترتیب به صورت یک و صفر امتیازدهی گردید که نتایج در شکل‌های ۴، ۵، ۶ و جداول ۳ تا ۶ آمده است. اساس نتیجه‌گیری تفاوت در باندهایی است که هر پرایمر برای نمونه‌های کنترل و تیمار شده تشکیل می‌دهد. هر ستون به ترتیب از سمت چپ، ردیف اول محصول PCR حاصل از ژنوم نمونه شاهد، ردیف دوم محصول PCR حاصل از ژنوم تیمار ۱ و ردیف سوم محصول PCR حاصل از ژنوم تیمار ۲ می‌باشد. تفسیر شکل به شرح ذیل می‌باشد: برای پرایمر OPS-13، ۳ باند روی ژل تشکیل گردید که ۳ باند بین گروه شاهد و تیمار شده‌ها متفاوت بود. از ۵ قطعه تکثیر شده برای پرایمر OPA-11، OPS-11 و OPR-12، ۴ قطعه بین گروه‌های شاهد و تیمار شده متفاوت بودند. در پرایمر OPA-09، ۸ باند تشکیل شد که تمامی باندها بین گروه شاهد و تیمار شده‌ها متفاوت بودند. همچنین در پرایمر OPT-17، هر ۴ قطعه تکثیر شده بین گروه‌های شاهد و تیمار شده‌ها متفاوت بودند. در پرایمر OPB-07 و OPS-09، یک قطعه تکثیر شد که هیچ گونه تفاوتی بین گروه شاهد و تیمار شده‌ها مشاهده نگردید. برای پرایمر OPB-

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ ۱۱ ۱۲ ۱۳ ۱۴ ۱۵ ۱۶ ۱۷



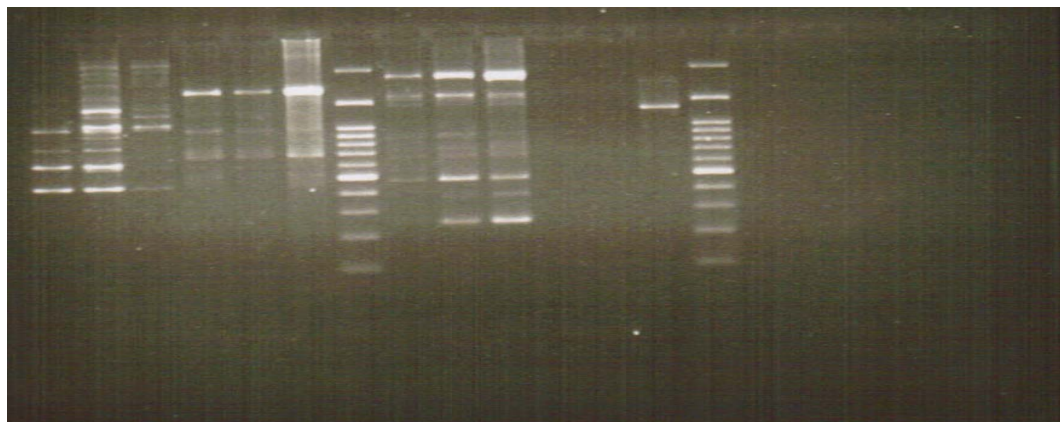
تصویر ۴- باندهای مربوط به تکثیر محصول PCR روی ژل آگارز. هر ستون برای یک پرایمر به ترتیب از سمت چپ، ردیف اول محصول PCR حاصل از ژنوم نمونه شاهد، ردیف دوم محصول PCR حاصل از ژنوم تیمار اول و ردیف سوم محصول PCR حاصل از ژنوم تیمار دوم می‌باشد. ستونهای شماره ۱-۳: پرایمر OPS-13، ستونهای ۴-۶: پرایمر OPR-12، ستون ۷: مارکر، ستونهای شماره ۸-۱۰: پرایمر OPA-09، ستون ۱۱: مارکر، ستونهای شماره ۱۲-۱۴: پرایمر OPT-17، ستونهای شماره ۱۵-۱۷: پرایمر OPS-09

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ ۱۱ ۱۲ ۱۳ ۱۴ ۱۵ ۱۶ ۱۷ ۱۸ ۱۹ ۲۰



تصویر ۵- باندهای مربوط به تکثیر محصول PCR روی ژل آگارز. هر ستون برای یک پرایمر به ترتیب از سمت چپ، ردیف اول محصول PCR حاصل از ژنوم نمونه شاهد، ردیف دوم محصول PCR حاصل از ژنوم تیمار اول و ردیف سوم محصول PCR حاصل از ژنوم تیمار دوم می‌باشد. ستونهای شماره ۱-۳: پرایمر OPB-08، ستونهای ۴-۶: پرایمر OPA-11، ستون ۷: مارکر، ستونهای شماره ۸-۱۰: پرایمر OPB-07، ستونهای شماره ۱۱-۱۳: پرایمر OPC-09، ستون ۱۴: مارکر، ستونهای شماره ۱۵-۱۷: پرایمر OPT-14، ستونهای شماره ۱۸-۲۰: پرایمر OPS-11

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ ۱۱ ۱۲ ۱۳ ۱۴



تصویر ۶- باندهای مربوط به تکثیر محصول PCR روی ژل آگارز. هر ستون برای یک پرایمر به ترتیب از سمت چپ، ردیف اول محصول PCR حاصل از ژنوم نمونه شاهد، ردیف دوم محصول PCR حاصل از ژنوم تیمار اول و ردیف سوم محصول PCR حاصل از ژنوم تیمار دوم می‌باشد. ستونهای شماره ۱-۳: پرایمر OPA-10، ستونهای ۴-۶: پرایمر OPQ-17، ستون ۷: مارکر، ستونهای شماره ۸-۱۰: پرایمر OPS-03، ستونهای شماره ۱۱-۱۳: پرایمر OPR-11، ستون ۱۴: مارکر

جدول ۳- نتایج باندهی مربوط به پرایمرها

OPA- 09							OPR- 12					OPS- 11			پرایمر	
۲۵۰	۷۰۰	۸۵۰	۹۵۰	۱۴۰۰	۱۵۰۰	۱۷۰۰	۳۰۰۰	۶۰۰	۹۰۰	۷۰۰	۱۶۰۰	۳۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۳۰۰	اندازه قطعه (bp)
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	شاهد
۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۱	تیمار ۱
۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	تیمار ۲

جدول ۴- نتایج باندهی مربوط به پرایمرها

OPS- 07	OPA- 11					OPB- 08					OPS- 09	OPT- 17				پرایمر
۱۸۰۰	۴۵۰	۸۰۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۳۵۰	۱۰۰۰	۱۴۰۰	۱۸۰۰	۲۵۰۰	۱۷۰۰	۶۰۰	۱۷۰۰	۲۸۰۰	۳۰۰۰	اندازه قطعه (bp)
۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	شاهد
۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۰	تیمار ۱
۱	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۱	تیمار ۲

جدول ۵- نتایج باندهی مربوط به پرایمرها

OPR-11	OPS-11						OPT-14						OPC-09				پرایمر
	۱۴۰	۴۰	۵۰	۱۳۰	۱۴۰	۱۷۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۴۰	۱۸۰	۱۹۰	۷۰	۹۰	۱۴۰	۲۰۰	اندازه قطعه (bp)
	۰	۱	۱	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۱	۱	۱	۱	شاهد
	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	تیمار ۱
	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۱	۱	تیمار ۲

جدول ۶- نتایج باندهی مربوط به پرایمرها

OPS-03					OPQ-17			OPA-10							پرایمر	
۲۵	۴۰	۵۰	۱۸۰	۲۸۰	۷۰	۱۰۰	۱۸۰	۵۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	۱۴۰	۲۸۰	۳۰۰	اندازه قطعه (bp)
۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۰	۰	۳۰	شاهد
۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	تیمار ۱
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۱	تیمار ۲

جدول ۷- ماتریکس تشابه

Case	Dice (Czekanowski or Sorenson) Measure		
	کنترل	تیمار ۱	تیمار ۲
کنترل	۱/۰۰۰۰۰۰۰		
تیمار ۱	۰/۶۵۹۰۹۰۹	۱/۰۰۰۰۰۰۰	
تیمار ۲	۰/۴۸۰۰۰۰۰	۰/۵۶۸۳۳۸۰۳	۱/۰۰۰۰۰۰۰

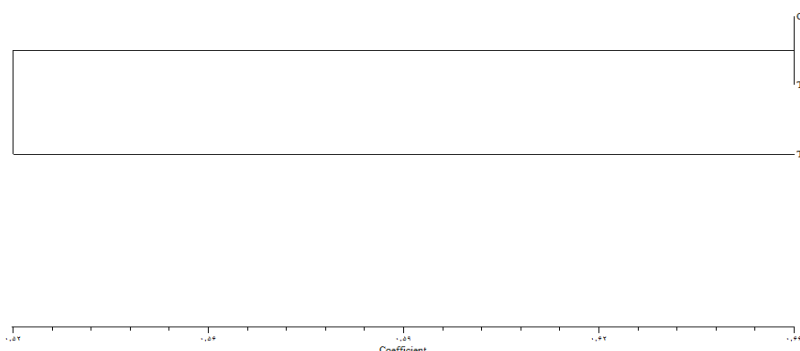
بحث

در این تحقیق مشاهده شد که رشد باکتری بعد از ۲ و ۴ ساعت تیمار با غلظت ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات اکسید مس به طور کامل متوقف گردید پس با توجه به این تحقیقات می توان نتیجه گرفت که نانوذرات مس با این غلظت بیشترین فعالیت ضد میکروبی را در کمترین زمان از خود نشان می دهند. همچنین در مقاله

در شکل شماره ۷، دندروگرام که با روش UPGMA در نرم افزار NTSYS-PC به منظور مقایسه تنوع ژنتیکی ایجاد شده بین نمونه کنترل و تیمار شده با نانوذرات اکسید مس رسم گردید. مشاهده شد که نمونه کنترل و نمونه تیمار ۱ در یک شاخه و تیمار ۲ در شاخه جداگانه قرار گرفته اند که این بیانگر ایجاد تفاوت ژنتیکی بین آنها می باشد.

تحقیقی دکترنایاک و همکاران در سال (۲۰۱۳) میلادی نیز از غلظت‌های ۲۵ و ۴۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات

اکسید مس استفاده شده است (۱۶).



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

پرایمر به کار رفته در واکنش RAPD-PCR وجود یا فقدان باند در تصویر ژل حاکی از ایجاد تغییر 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 نکرده و فقدان باند روی ژل آگاررز گردید. 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، گردیده‌اند که باعث تفاوت در اتصال پرایمرها و تکثیر قطعات در PCR به واسطه آنها شده است. دلیل این موضوع می‌تواند احتمالاً ناشی از ایجاد جهش مستقیم یا غیرمستقیم روی DNA، توسط نانوذرات اکسید مس بوده و یا همان‌طوری که پال و همکارانش در سال (۲۰۰۷) گزارش کرده‌اند به خاطر ایجاد اختلال در مکانیسم همانندسازی توسط DNA polymerase می‌شود. به طوری که 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 شود (۱۹). بوندانکو 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

سلولهای و همکارانش در سال (۲۰۱۳) میلادی از نانوذرات اکسید مس با اندازه های ۱۷،۸۵ و ۴۴ استفاده نمودند و در این بررسی بیشترین اثر مهار کنندگی برای باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* نشان داده شد (۱۵). 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 ۲۳). بنابراین هدف اصلی این تحقیق بررسی اثر نانوذرات اکسید مس روی ژنوم باکتری می باشد که تفاوت ژنتیکی بین تیمار ۱ با نمونه کنترل در یک شاخه و نمونه تیمار ۲ در شاخه جداگانه در دندروگرام حاصل از تجزیه بر اساس آزمون RAPD-PCR مشاهده می گردد، به عبارتی یعنی غلظت ۶۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بیشترین اثر مهار کنندگی را از طریق تاثیر روی ژنوم دارا می باشد. همان طور که در جدول ۶ دیده شد فاصله ژنتیکی بین نمونه ها از ۱/۰۰۰۰۰۰ تا ۰/۴۸۰۰۰۰۰ متغیر بوده که هر چه اعداد به ۱ نزدیک تر، شباهت ژنتیکی بین نمونه‌ها بیشتر شده است. همچنین این بررسی به منظور تعیین اثر ژنوتوکسیک نانوذرات اکسید مس بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان مدل برای باکتریهای گرم مثبت صورت گرفت. در این راستا از مجموع ۱۵

مهار فعالیتها منجر به لیز سلولی خواهد شد (۱۳). در بررسیهای صورت گرفته توسط آقای مارتل که مصادف با ۲۰۰۵ میلادی بود، نشان داده شد که نانو مواد، چسبیدن سلولهای باکتری و تشکیل بیوفیلم را به تأخیر می‌اندازد که این عمل باعث می‌شود گروهی از باکتریها نتوانند تثبیت شوند و تکثیر یابند (۱۴). بر همین اساس و باتوجه به اینکه در این تحقیق باکتریهای در حال رشد و همانندسازی با نانوذرات اکسید مس تیمار داده شد، 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. لذا می‌توان نتیجه گرفت که با ایجاد جهش در ژنهای درگیر در کنترل چرخه سلولی موجب توقف چرخه سلولی می‌گردد که نتیجه مشاهده شده در این تحقیق نیز کاهش رشد باکتریها را نشان داده و مطلب فوق را تأیید می‌نماید.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از گروه بیوتکنولوژی دانشگاه دولتی مراغه به دلیل همکاری صمیمانه در تأمین نانوذرات و پرایمرهای مورد استفاده سپاسگذاری می‌گردد.

همچنین در طی واکنش اکسیداسیون مس Cu(I) به Ros.Cu(II) تولید می‌کنند که باعث آزاد شدن رادیکالهای هیدروکسیل می‌شود که به پروتئینهای ضروری و DNA آسیب رسانده و باعث فعالیت ضد باکتریایی می‌شود (۶ و ۲۱). دکتر جوانگ نینگ و همکارانش در سال (۲۰۱۱) میلادی، اثر نانو ذرات اکسید مس در غلظتهای بین ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به طیف گسترده ای از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی از جمله باسیلوس سوبتیلیس، پسودوموناس آئروژنیوزا، اشیریشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس گزارش کردند (۹). 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 (۲۵). در سال ۲۰۰۴، سوندی و همکارانش نشان داده‌اند که نانوذرات در روی آنزیمهای دخیل در همانند سازی اثر می‌گذارند (۲۲). در تحقیقات صورت گرفته توسط دکتر کینگ در سال ۲۰۰۶ میلادی، مشخص شده است که اتصال قوی نانوذرات به غشای بیرون باکتریها، می‌تواند مانع از عملکرد آنزیم دهیدروژناز گردد. جلوگیری از فعالیت آنزیمهای پری پلاسمیک باکتری و در نتیجه جلوگیری از فعالیت و عملکرد DNA، RNA و سنتز پروتئین نیز دیده شده است. در مجموع این

منابع

- ۱- براون، ت، (۱۳۹۰)، مراد پور، ز، قاسمیان، ع، مقدمه‌ای بر کلون سازی ژن و بررسی DNA، انتشارات خسروی با همکاری نشر دیباج.
- 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 Witte, W. (2004), International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. Infect. Genet. Evol. 4, 187–191
- ۳- Baker-Austin, C., Wright, MS., Stepanauskas, R., McArthur, JV. (2006) , Co-selection of antibiotic and metal Resistance. Trends Microbiol. ;14:176–18
- ۴- Beranva , 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.
- ۵- Bogdanovića, U., Lazić, b V., Vodnik, V. (2014), Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. Materials Letter
- ۶- 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.
- 7- 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 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
 - 8- Fahmy, B., Cormier, S.A. (2009), Copper oxide nanoparticle induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells, *Toxicol. In Vitro* 7 1365-1371
 - 9- Guang-Ning Ye, Minou Hemmat, Muhammad A. Lodhi, Norman F. Weeden and Bruce I. Reisch (1996). Department of Horticultural Sciences, New York State; Agricultural Experiment Station, Cornell University, Geneva, New York 14456, USA.
 - 10- 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 paltryurus*. *Chemosphere* 71, 1308e1316.
 - 11- Jones, N., Ray, B., Ranjit, K.T., Manna, A.C. (2008), Antibacterial activity of ZnO. *FEMS Microbiol Lett.* 297:71-76.
 - 12- 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.
 - 13- King M D, Humphrey B J, Wang Y F, Kourbatova E V, Blumberg H M. Emergence of community-acquired methicillin-resistant staphylococcus aureus USA 300 clone as The predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Ann Intern Med.* 2006;144:309-317.
 - 14- Martel S. Method and system for controlling micro-objects or micro-particles. United States patent US 20100215785. 2005; Appl. 11/145,007.
 - 15- M. SELVARANI, P. PREMA (2013). EVALUATION OF ANTIBACTERIAL EFFICACY OF CHEMICALLY SYNTHESIZED COPPER AND ZEROVALENT IRON NANOPARTICLES. *ASIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND CLINICAL RESEARCH.*
 - 16- P.L.Nayak, 2013. Antimicrobial Activity of Copper Nanoparticles Synthesised by Ginger (*Zingiber officinale*) Extract. *World Journal of Nano Science & Technology* 2(1): 10-13, 2013.
 - 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- Rispoli, F., Angelov, A., Badia, D., Kumar, A., Seal, S., Shahb, V. J. (2010), *Hazard Mater.* 180:212–6.
 - 21- Robert, Y., Pelgrift Adam, J., Friedman, M. (2013), "Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance". *Advanced Drug Delivery Reviews.*
 - 22- 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.
 - 23- Shankar, Sh., Jong-Whan, R. (2014), Effect of copper salts and reducing agents on characteristics and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials Letters.*
 - 24- 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.
 - 25- Turner, Philips, *Molecular biology*, 2nd, 2000. ISBN: 8397-36-8
 - 26- Turner, Philips, *Molecular biology*, 2nd, 2000. ISBN: 8397-36
 - 27- Victor K Champagne¹ and Dennis J Helfrich^{2*}. A demonstration of the antimicrobial effectiveness of various copper surfaces. *Champagne and Helfrich Journal of Biological Engineering* 2013, 7:8
 - 28- Whitesides, G.M. (2005), Nanoscience, nanotechnology, and chemistry *Small*. 1, 172–179

29- Witte, W. (2004), International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens.

Infect. Genet. Evol. 4, 187–191

An investigation of the effect of copper nanoparticles on *Staphylococcus aureus* genome by RAPD molecular markers

Zare N.¹, Golestani Emani B.¹ and Karimi F.²

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

² Biotechnology 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 *Staphylococcus aureus* as a model for Gram-positive 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 Agarose gel were analyzed. The results of the study revealed that copper oxide nanoparticles not only effect the growth of Bacteria but also affect the sequencing of genomic DNA and leads to the changes of them in different points.

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