

بررسی اثر نانوذرات اکسید مس بر ژنوم باکتری سالمونلاتیفی موریوم با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

افشانه جعفری¹، بهرام گلستانی ایمانی^{2*}، فرخ کریمی³

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه

2- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه

3- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه مراغه

* ارومیه، صندوق پستی 969

golestani_bahram@yahoo.com

(دریافت مقاله: 94/5/4 پذیرش مقاله: 94/10/12)

چکیده- باکتری سالمونلا یکی از شایع ترین و کشنده ترین باکتری هایی است که در عفونت های همه گیر، نقش بسزایی دارد. از طرفی افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها باعث شده است که تحقیقات فراوانی در جهت معرفی روش های جایگزین برای مقابله با باکتری های بیمارزا صورت پذیرد. نانوذرات اکسید مس ترکیباتی هستند که خاصیت ضد باکتریایی آن ثابت شده است. در این تحقیق به منظور مطالعه ای یکی از مکانیسم های مولکولی احتمالی نانوذرات اکسید مس، باکتری سالمونلا تیفی موریوم به عنوان مدل برای باکتری- های گرم منفی انتخاب شده است که تأثیر نانوذرات اکسید مس بر روی ژنوم این باکتری بررسی گردید. ابتدا باکتری سالمونلا در محیط کشت بلاد آگار، سپس جهت تیمار با نانو ذرات اکسید مس در محیط کشت مایع BHB¹، کشت داده شد. تیمار باکتری در غلظت های 30، 60، 90 و 120 میکروگرم بر میلی لیتر انجام گرفته و در فاصله های زمانی 2، 4 و 24 ساعت خاصیت ضد میکروبی نانوذره اکسید مس بررسی گردید. استخراج DNA از نمونه های شاهد و تیمار شده انجام شد و تغییرات توالی ژنوم باکتری با استفاده از تکنیک² PCR-RAPD مورد مطالعه قرار گرفت. با استفاده از نرم افزار⁴ NTSYS-PC، نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات اکسید مس باعث ایجاد تغییر توالی در قسمت های مختلف ژنوم باکتری سالمونلا با غلظت های 90 و 120 میکروگرم بر میلی لیتر گردید. از این تغییرات می توان نتیجه گرفت که یکی از مکانیسم های مولکولی اثر مهارکنندگی رشد باکتریایی این نانوذرات ایجاد تغییر توالی در DNA ژنومی می باشد. نانوذرات اکسید مس احتمالاً باعث تغییر خاصیت جفت شدن بازی بازها و یا باعث ایجاد اختلال در مکانیسم همانندسازی شده است.

کلیدواژگان: باکتری سالمونلا، نانوذرات اکسید مس، واکنش زنجیره ای پلیمرز (RAPD-PCR).

1. Brain Heart Broth
2. Random Amplified Polymorphic DNA
3. Polymerase Chain Reaction
4. Numerical Taxonomy System

1- مقدمه

پتیدوگلیگان اجزای ترکیب کننده اصلی دیواره باکتری هستند که با مس واکنش داده و باعث آسیب دیواره سلول می‌شوند که یکی از مکانیسم‌های ضد میکروبی نانوذرات به شمار می‌آید [6]. البته مکانیسم القاء فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید فلزی به طور کامل شناخته نشده است. اما مقدار رهاسازی یون و در پی آن تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن دلیل اصلی فرض می‌شود [۷،۸]. در محیط‌های کشت حاوی نانوذرات اکسید مس، رشد باکتری‌های مختلف کاهش می‌یابد [9]. همچنین آلیاژی که بیشتر از 65% مس دارند، بعد از 90 دقیقه باکتری‌ها را غیر فعال می‌کنند [10]. هدف این مطالعه، بررسی اثر نانوذرات اکسید مس روی ژنوم باکتری سالمونلا بود تا چنان چه باعث تغییرات توالی DNA ژنومی شود، مشخص گردد و بدین طریق یکی از مکانیسم‌های احتمالی اثر ضد باکتریایی نانوذرات تعیین شود که برای این منظور از RAPD-PCR استفاده گردید، چون پرایمرهای RAPD-PCR، به طور تصادفی به توالی‌های مختلفی روی DNA متصل شده و بطور تصادفی قطعاتی را تکثیر می‌کند که از این روش برای تعیین تفاوت ژنوم دو گروه از موجودات، از نظر توالی DNA ژنومی استفاده می‌کنند [11].

2- مواد و روش‌ها**2-1- کشت باکتری و شرایط کشت:**

باکتری سالمونلا تیفی موریوم با سوش استاندارد (ATCC14028) از بیمارستان حضرت سیدالشهدا واقع در شهر ارومیه تهیه شد و در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه در محیط کشت بلاد آگار در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت کشت داده شد. باکتری‌های سالمونلا که به خوبی در محیط کشت بلاد آگار رشد کرده بودند، در محیط BHB در انکوباتور شیکردار در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با دور

در سال‌های اخیر باکتری‌ها به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی بسیار مقاوم شده‌اند. از طرفی سرعت ساخت آنتی‌بیوتیک قوی‌تر که جایگزین شوند، به هیچ وجه پاسخ‌گوی سرعت افزایش مقاومت باکتریایی نیست و نیاز مبرم به رویکردهای جدید برای مقابله با عفونت‌های باکتریایی احساس می‌شود. یکی از راه‌های مبارزه با این عوامل میکروبی، جایگزینی عوامل ضدباکتریایی مطمئن است که گونه‌های مختلف میکروبی به این عوامل مقاوم نشوند. از این عوامل ضد میکروبی، می‌توان به نانوذرات فلزی اشاره کرد که بطور رایجی در سال‌های اخیر، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [1]. از میان نانوذرات، اخیراً به نانوذره‌ی مس توجه بیشتری شده است. نانوذرات ارزان به جای نانوذرات فلزی گران‌قیمت در سطح کاربردهای میکروالکترونیک پیشنهاد می‌شوند و احتمالاً آخرین مواد ضد میکروبی کشف شده هستند [2]. در دهه اخیر، خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید مس بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی که سلامت عمومی را به خطر می‌اندازند، ثابت شده است [3]. علاوه بر خواص شیمیایی نانوذرات، دو ویژگی اندازه ذرات و نسبت سطح به حجم بیشتر، ویژگی‌های غیر منتظره‌ای به نانوذرات بخشیده است. هرچه اندازه‌ی ذرات کوچکتر باشد، قدرت آنتی باکتریایی آن قویتر است. این ویژگی نانوذرات، کاربردهای مهمی از جمله نقش کاتالیزوری را به نانوذرات بخشیده است [4]. نانوذرات فلزات اکسید مس دارای ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی منحصر به فردی است که ناشی از تأثیر اندازه‌ی کوانتومی و سطح مؤثر وسیع می‌باشد به گونه‌ای که با حالت توده آنها متفاوت است [5]. اکسید مس ساده‌ترین عضو از خانواده ترکیبات مس است که بصورت نانوذرات مستقیماً روی غشای باکتری اثر کرده و باعث پاره شدن غشای باکتری و کشته شدن باکتری می‌شود. آمین و گروه‌های کربوکسیل لایه‌ی

استخراج نمود که برای این کار ایزوله‌های باکتری کشت و تیمار شده با غلظت‌های 90 و 120 میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط BHB مورد استفاده قرار گرفتند. لازم به ذکر است که استخراج هر سه نمونه‌ی شاهد و تیمار 90 و 120 میکروگرم بر میلی‌لیتر هم زمان در میکروتیوب‌های مجزا و 4 ساعت بعد از تیمار توسط کیت GENE MARK (CAT.NUM DP021)، تهیه شده از شرکت ژن فن آوران صورت گرفت. برای انجام RAPD-PCR، DNA ژنومی با استفاده از 15 پرایمر 10 جفت بازی تصادفی RAPD-PCR، تکثیر شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول 1، ذکر شده است.

جدول 1 توالی پرایمرهای مورد استفاده

توالی نوکلئوتیدی	پرایمر
ACAGGTGCGT	OPR12
TCTCCGCAAC	OPQ11
ACCGCGAAGG	OPD01
CAATCGCCGT	OPA11
GTCGTTCCCTG	OPS.13
TCCTGGTCCC	OPS09
GTGATCGCAG	OPA10
GGTGACGCAG	OPB ۰۸
GGACGCTTCA	OPQ14
AATGCCGCAG	OPT14
GAAGCCCTTG	OPQ17
GGGTAACGCC	OPA09
TTTGGGGCCT	OPS05
TCTGGTGAGG	OPD04
TCTGGTGAGG	OPT17

همه PCRها، در دستگاه ترموسایکلر (Corbett research, Australia) انجام شد. اجزای واکنش PCR عبارتند از: 1 میلی‌لیتر MIX DNTP، 3 میلی‌لیتر $MgCl_2$ ، 2/5 میلی‌لیتر Taq DNA polymerase، 1 میلی‌لیتر primer و حجم نهایی واکنش با 16/2 میلی‌لیتر H_2O استریل در 25 میلی‌لیتر تنظیم گردید. چرخه‌های دمایی PCR شامل دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه جهت واسرشت شدن اولیه DNA الگو و در ادامه، واکنش PCR در 40 چرخه که هر

200rpm کشت شبانه داده شد و رشد آنها از طریق اسپکتوفتومتری در طول موج 600 با تعیین ضریب جذب (OD^{1}) کنترل شد.

2-2- تهیه نانوذرات اکسید مس و تیمار باکتری‌ها با نانوذرات اکسید مس

نانوذرات اکسید مس با قطر کمتر از 20 نانومتر، توسط گروه بیوتکنولوژی دانشگاه مراغه سنتز و در اختیار این پژوهش قرار گرفت که مشخصات آن توسط میکروسکوپ الکترونی TEM² و SEM³ و اسپکتوفتومتری آنالیز شد. برای تهیه 10 میلی‌لیتر محلول استوک نانوذرات اکسید مس، 0/106 گرم از پودر بافر فسفات سالین را توزین کرده، در 10 میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و سپس در اتوکلاو استریل گردید. پس از تهیه محلول بافر فسفات سالین استریل، 0/01 گرم پودر نانوذره اکسید مس توزین شد و به محلول بافر فسفات سالین استریل، اضافه گردید و سپس بطور کامل تا زمان تشکیل محلول یکنواخت ورتکس گردید.

برای بررسی اثر نانو ذرات بر روی باکتری، نانوذره‌ی اکسید مس با غلظت‌های 30، 60، 90، و 120 میکروگرم بر میلی‌لیتر، به هرکدام از لوله‌های حاوی باکتری تلقیح شد. باکتری‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با دور 200 rpm گذاشته شد و رشد آنها از طریق اسپکتوفتومتری در طول موج 600 با تعیین ضریب جذب (OD) و در فاصله‌های زمانی 2، 4، و 24 ساعت کنترل شد.

2-3- استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز RAPD-PCR

برای انجام تست PCR بایستی DNA باکتری‌ها را

1. Absorbance Density
2. Transmission Electron Microscopy
3. Scanning Electron Microscopy

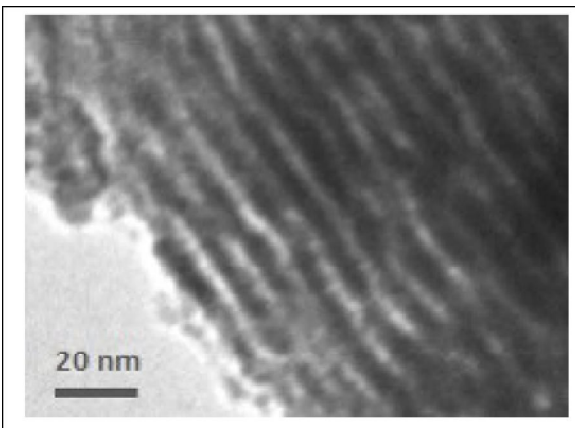
3-1- بررسی الگوی رشد باکتری‌های سالمونلاتیفی-

موریوم در غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس میزان رشد باکتری‌ها از طریق اسپکتوفتومتری در طول موج 600 با تعیین ضریب جذب (OD) و در فاصله‌های زمانی 2، 4، و 24 ساعت کنترل شد و مشاهده گردید که غلظت‌های 30 و 60 میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد باکتری نشد، در حالی که غلظت‌های 90 و 120 میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد باکتری شد که نتایج حاصل در جدول 2 نشان داده شده است.

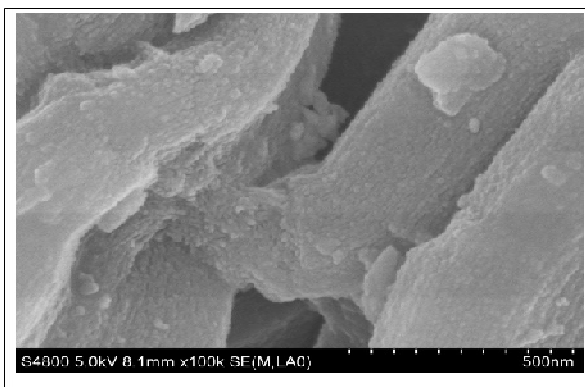
اثر نانوذرات روی ژنوم باکتری سالمونلا

3-2- نتایج آنالیز RAPD-PCR

باند‌های الکتروفورزی حاصل از تکثیر 15 پرایمر به‌وسیله RAPD-PCR در شکل‌های 3 تا 5 نشان داده شده است.



شکل 1 عکس میکروسکوپی (TEM)



شکل 2 عکس میکروسکوپی (SEM)

چرخه شامل: دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 35 ثانیه جهت واسرشت شدن رشته‌های DNA الگو، دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه جهت اتصال پرایمرها به رشته‌های الگو، دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه جهت پلیمریزاسیون رشته جدید از روی رشته الگو انجام گرفت و 7 دقیقه برای تکمیل پلیمریزاسیون نهایی رشته‌های ناقص اعمال گردید.

2-4- بررسی نتایج RAPD-PCR

بعد از اتمام واکنش PCR، برای آشکارسازی باندها، 10 میلی‌لیتر از محصول PCR روی ژل آگارز 2% (با اندازه‌ی 14 × 26) که برای رنگ‌آمیزی حاوی 20 میلی‌لیتر red safe بود در بافر TBE (1x) الکتروفورز گردید. به منظور تعیین اندازه‌ی محصول، نشانگر DNA Ladder به اندازه 100-3000 bp استفاده شد.

2-5- آنالیز داده‌های حاصل از الکتروفورز محصولات PCR

باند‌های مشاهده شده روی ژل آگارز براساس وجود یا عدم وجود آنها برای هر پرایمر، به ترتیب بصورت یک و صفر امتیازدهی گردید و سپس داده‌های مذکور در نرم‌افزار NTSYS-PC برای محاسبه ماتریس تشابه به روش Dic و رسم دندروگرام با روش UPGMA¹ آنالیز گردیدند.

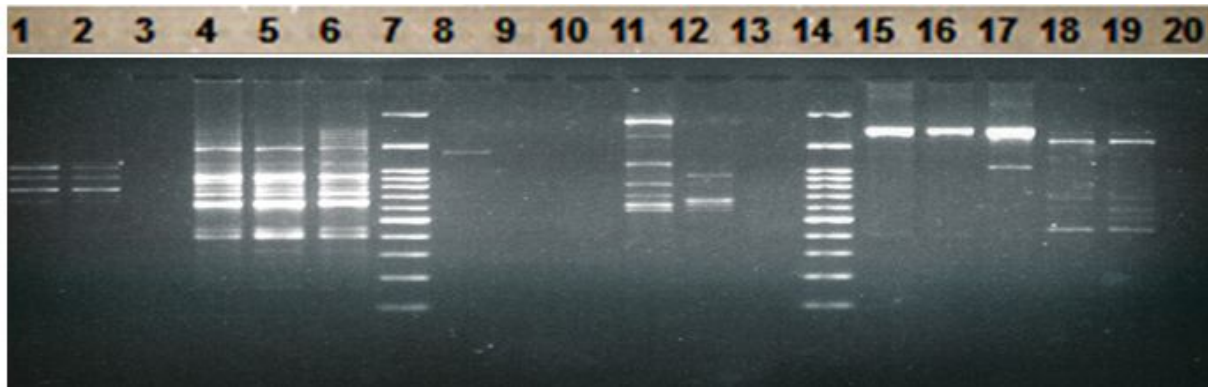
3- نتایج

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 منافذ سلیکا تثبیت شده اند. اندازه‌ی نانوذرات اکسید مس کمتر از 20 نانومتر می‌باشد. نتایج در شکل‌های 1 و 2 آمده است.

1. Un weighted Pair Group Mean Average

جدول 2 اندازه‌گیری میزان رشد باکترها در طول موج 600 نانومتر

غلظت	شماره لوله	قبل از تیمار	2 ساعت بعد از تیمار	4 ساعت بعد از تیمار	24 ساعت بعد از تیمار
شاهد	1	0/7	0/86	0/9	1/2
30 میلی گرم بر میلی لیتر	2	0/7	0/86	0/9	1/2
60 میلی گرم بر میلی لیتر	3	0/7	0/8	0/85	1/1
90 میلی گرم بر میلی لیتر	4	0/7	0/6	0/7	0/8
120 میلی گرم بر میلی لیتر	5	0/7	0/6	0/7	0/75



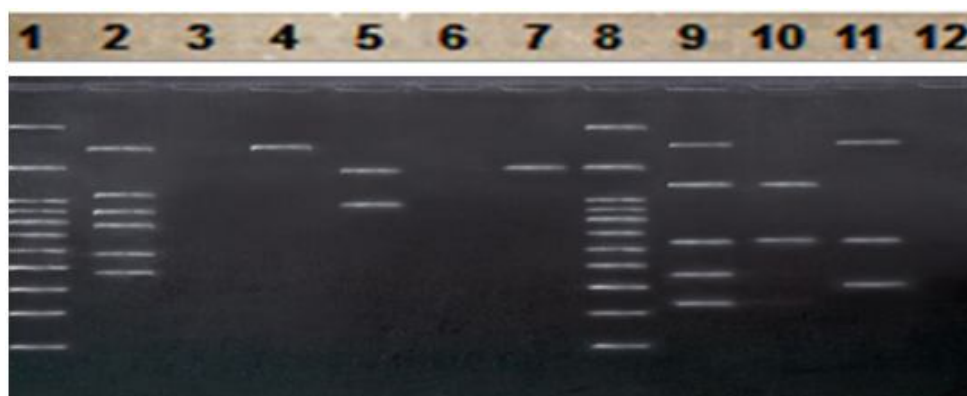
شکل 3 باندهای مربوط به تکثیر محصول PCR روی ژل آگارز.

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 90 میکروگرم بر میلی لیتر و ردیف سوم محصول PCR حاصل از ژنوم تیمار 120 میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد. ستون 1، 2 و 3 محصول PCR با پرایمر OPT14، ستون 4، 5 و 6 محصول PCR با پرایمر OPR12، ستون 7 (مارکر)، ستون 8، 9 و 10 محصول PCR با پرایمر OPD01، ستون 11، 12 و 13 محصول PCR با پرایمر OPQ14، ستون 14 (مارکر) ستون 15، 16 و 17 محصول PCR با پرایمر OPS09، ستون 18، 19 و 20 محصول PCR با پرایمر OPA09



شکل 4 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 90 میکروگرم بر میلی لیتر و ردیف سوم محصول PCR حاصل از ژنوم تیمار 120 میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد. ستون 1، 2 و 3 محصول PCR با پرایمر OPA10، ستون 4، 5 و 6 محصول PCR با پرایمر OPQ11، ستون 7 (مارکر)، ستون 8، 9 و 10 محصول PCR با پرایمر OPD04، ستون 11، 12 و 13 محصول PCR با پرایمر OPS13، ستون 14 (مارکر)، ستون 15، 16 و 17 محصول PCR با پرایمر OPT17، ستون 18، 19 و 20 محصول PCR با پرایمر OPA11



شکل 5 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 90 میکروگرم بر میلی لیتر و ردیف سوم محصول PCR حاصل از ژنوم تیمار 120 میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. ستون 1 Ladder (مارکر)، ستون 2، 3 و 4 محصول PCR با پرایمر OPB08، ستون 5، 6 و 7 محصول PCR با پرایمر OPQ11، ستون 8 Ladder (مارکر)، ستون 9، 10 و 11 محصول PCR با پرایمر OPS05.

همچنین در پرایمر OPA09، سه قطعه تکثیر شد که همه آنها در گروه های شاهد و تیمار شده ها متفاوت بودند. در هر یک از پرایمرهای OPS09، OPA11، OPQ17، دو قطعه تکثیر شد که هر دو بین گروه شاهد و تیمار شده ها متفاوت بودند. عکس ژل حاصل از پرایمر OPQ14 نشان داد که هفت قطعه تشکیل شده بود که همگی آنها بین گروه شاهد و تیمار شده ها متفاوت بودند. از بین چهار باند حاصل از پرایمر OPD04، سه باند بین گروه شاهد و تیمار شده ها متفاوت بودند. برای پرایمر OPB08 از شش قطعه تکثیر شده، همه آنها بین گروه شاهد و تیمار شده ها تفاوت داشتند.

3-3- آنالیز نتایج الکتروفورز محصولات RAPD-PCR

دندروگرام حاصل از روش UPGMA به منظور مقایسه تفاوت ژنتیک ایجاد شده بین نمونه کنترل و نمونه های تیمار شده با نانوذرات اکسید مس - که نمونه کنترل و نمونه تیمار 1 و نمونه تیمار 2 در شاخه اصلی جداگانه قرار گرفته اند - در شکل 6 نشان داده شده است که بیانگر ایجاد تفاوت ژنتیکی بارز بین نمونه کنترل و تیمار 1 با تیمار 2 بود. براساس داده های RAPD، ماتریکس تشابه

برای هر پرایمر، 3 ستون در نظر گرفته شد. از چپ به راست به ترتیب شامل گروه شاهد، گروه تیمار 1 (90 میکروگرم بر میلی لیتر) و تیمار 2 (120 میکروگرم بر میلی لیتر) می باشد. سپس اندازه های باندهای حاصل از تجزیه RAPD، با استفاده از سایز مارکر تعیین شد. بر اساس وجود یا عدم وجود آنها در نمونه ها، به ترتیب بصورت یک و صفر امتیازدهی گردید که نتایج آنها در جداول 3 تا 5 نشان داده شده است.

اساس نتیجه گیری، تفاوت در باندهایی است که هر پرایمر برای نمونه های کنترل و تیمار شده تشکیل می دهد. برای پرایمر OPT14، چهار باند روی ژل تشکیل گردید که بین نمونه شاهد و تیمار 1 مشابه ولی در تیمار 2 متفاوت بودند. در حضور پرایمر OPR12، پنج باند روی ژل تشکیل گردید که هیچ گونه تفاوتی بین گروه شاهد و تیمار شده ها مشاهده نگردید. در هر یک از پرایمرهای OPD01، OPA10، OPQ11، OPS13، OPT17، یک قطعه تکثیر شد که بین گروه شاهد و تیمار شده ها متفاوت بودند. برای پرایمر OPS05، پنج باند روی ژل تشکیل گردید که چهار باند بین گروه شاهد و تیمار شده ها متفاوت بودند.

برای نمونه‌های کنترل و تیمار شده با روش *Dic* محاسبه شده که در جدول 6 آمده است که فاصله‌ی ژنتیکی بین نمونه‌ها از 0/6 تا 0/8 متغیر بود.

4- بحث

کشندگی نانوذرات اکسید مس عموماً در غلظت‌های بین 10 تا 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر برای طیف وسیعی از

باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت گزارش شده است و با توجه به اینکه براساس مطالعات زیادی اثر نانوذرات اکسید مس به عنوان ماده ضد میکروبی به اثبات رسیده است [۱۲،۱۳]. در این مطالعه غلظت مشخصی از نانوذرات اکسید مس برای تیمار باکتری‌ها و بررسی یکی از مکانیسم‌های احتمالی خاصیت ضد میکروبی به کار برده شد.

جدول 3 عدد یک نشانگر وجود باند و عدد صفر نشانگر عدم وجود باند. C نشانگر نمونه شاهد، T نشانگر تیمارها

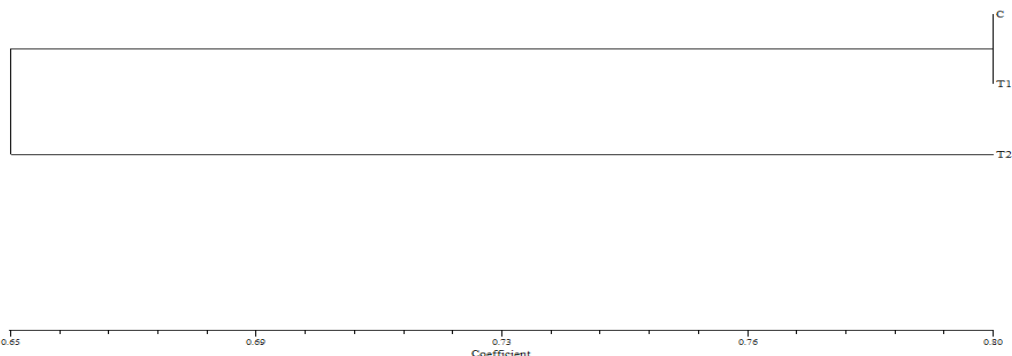
پرایمر	OPT14				OPR12					OPD01		OPS09				OPA09			
	650	800	1000	1200	400	600	800	900	1500	1400	1000	2000	450	600	700	1800			
باند	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0			
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0			
T1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0			
T2	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0			

جدول 4 عدد یک نشانگر وجود باند و عدد صفر نشانگر عدم وجود باند. C نشانگر نمونه شاهد، T نشانگر تیمارها

پرایمر	OPQ14							OPA10	OPQ11	OPD04				OPS13
	650	700	800	950	1200	2000	2900	1400	1400	450	500	650	1400	1500
باند	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0
C	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0
T1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
T2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

جدول 5 عدد یک نشانگر وجود باند و عدد صفر نشانگر عدم وجود باند. C نشانگر نمونه شاهد، T نشانگر تیمار

پرایمر	OPT17		OPB08						OPA11		OPS05				
	600	600	450	500	600	800	900	1800	200	2900	200	450	600	1200	2800
باند	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
C	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
T2	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	



شکل 6 دندروگرام حاصل از تجزیه بر اساس آزمون ریپید با روش UPGMA توسط نرم‌افزار NTSYS-PC

جدول 6 ماتریس تشابه

Case	Dice (Czekanowski or Sorenson) Measure		
	1:ctr	2:t90	3:t120
1:ctr	1.000000		
2:t90	0.8000000	1.000000	
3:t120	0.6000000	0.7058824	1.000000

نانوذرات نقره نه تنها با این پروتئین‌ها، بلکه با ترکیبات حاوی فسفر از جمله DNA، واکنش می‌دهند. نانوذرات اکسید فلزی مکانیسم اثر مشابهی دارند [16,15]. همان‌طور که در تحقیقات پیشین بیان شده است نانوذرات اکسید فلزی در رونویسی و ترجمه اختلال ایجاد می‌کنند [17]. همچنین نانوذرات می‌توانند شکستگی DNA تک رشته‌ای را القاء کرده و در بیان ژن اثر بگذارند [18]. این تحقیق نیز به منظور تعیین اثر ژنوتوکسیک نانوذرات اکسید مس بر روی باکتری سالمونلا تیفی موریوم به عنوان مدل برای باکتری‌های گرم منفی صورت گرفت. در این راستا از مجموع 15 پرایمر به کار رفته در واکنش RAPD-PCR وجود یا فقدان باند در تصاویر ژل (شکل‌های 1، 2 و 3) حاکی از ایجاد تغییر روی توالی DNA توسط نانوذرات اکسید مس می‌باشد. بطوری که تعداد زیادی از پرایمرها توالی‌های هدف را شناسایی نکرده و دلیل این موضوع می‌تواند احتمالاً ناشی از ایجاد جهش مستقیم یا غیرمستقیم روی DNA، توسط نانوذرات اکسید مس بوده و یا همان‌طور که پال و همکارانش در سال 2007 گزارش کرده‌اند به خاطر ایجاد اختلال در مکانیسم همانندسازی توسط DNA polymerase می‌شود. بطوری 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 می‌شود [19]. بر همین اساس با توجه به اینکه در این تحقیق باکتری‌های در حال رشد و همانندسازی با نانوذرات اکسید مس 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؛ لذا می‌توان نتیجه گرفت که با ایجاد جهش روی توالی ژن‌های درگیر در کنترل چرخه سلولی موجب کاهش بیان

در مطالعه حاضر که برای اولین بار بر روی باکتری سالمونلا تیفی موریوم انجام شده است، غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس بر باکتری سالمونلا تیفی موریوم تأثیر داده شده تا اثر این ماده ضد میکروبی روی ژنوم این میکروارگانیسم با استفاده از تکنیک RAPD-PCR مورد بررسی و ارزیابی قرار بگیرد.

نتایج حاضر نیز نشان داد، نانوذرات اکسید مس با قطر کمتر از 20 نانومتر در غلظت‌های 30 و 60 میکروگرم بر میلی‌لیتر با توجه به جدول 2، مانع رشد باکتری‌ها حتی بعد از 24 ساعت تیمار نشد. به همین دلیل باکتری‌ها با غلظت‌های 90 و 120 تیمار گردیدند و مشاهده گردید که نانوذرات اکسید مس در این غلظت‌ها دارای خواص ضد میکروبی به نسبت خوبی بود و توانست تقریباً رشد تمامی باکتری‌های موجود در نمونه را حتی بعد از 24 ساعت مهار کند. لازم به ذکر است که با گذشت زمان و افزایش غلظت توقف بیشتری در رشد باکتری‌ها مشاهده گردید. همچنین در طی آزمایش‌ها فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مس، و گدانویکد و همکارانش به روشنی اثبات کردند که فقط بعد از 2 ساعت تماس باکتری اشرشیاکلی با نانوذرات مس با غلظت 32 ppm، باکتری‌ها به بیش از 99% کاهش پیدا کردند [6]. سوبحانکاری و همکارش پس از سنتز نانوذرات اکسید مس در اندازه‌های 25 و 40. مشاهده کردند که رشد باکتری اشرشیاکلی متوقف گردید [14]. گزارش‌هایی نیز مبتنی بر اثر نانوذرات بر روی ژنوم باکتری‌ها 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

بدن انسان می‌طلبد و با توجه به اهمیت نانوذرات مس در عصر کنونی بررسی اثرات این ذرات بر سیستم بدن انسان اهمیت بسزایی دارد و نیاز به تحقیقات بیشتری می‌باشد. پژوهش حاضر تنها به بررسی یکی از اثرات این ذرات پرداخته که حاکی از فعالیت ضد میکروبی بالای نانوذرات اکسید مس و تأثیر آن بر ژنوم باکتری سالمونلا می‌باشد و دیگر ویژگی مهم نانوذرات اکسید مس تعیین سرنوشت بیولوژیکی آنها در شرایط زنده، مسمومیت با این مواد و توانایی هدف قرار دادن آنها می‌باشد. بدیهی است برای رسیدن به تأثیرات استفاده از این نانوذرات در یوکاریوت-ها آزمایش‌های بیشتری را می‌طلبد و نیاز به تحقیقات بیشتری است.

6- تقدیر و تشکر

بدین وسیله از گروه بیوتکنولوژی دانشگاه دولتی مراغه به دلیل همکاری صمیمانه در تأمین پرایمرها و نانوذرات مورد استفاده و گروه میکروبیولوژی آزمایشگاه بیمارستان حضرت سیدالشهدا ارومیه به دلیل همکاری در تهیه باکتری سالمونلاتیفی‌موریوم با سوش استاندارد، سپاس‌گزاری می‌شود.

7- منابع

- [1] M. Selvarani, P. Prema, (2013). "Evaluation of antibacterial efficacy of chemically synthesized copper and zerovalent Iron nanoparticle", Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 0974-2442
- [2] Sondi I., Salopek-Sondi B. (2004). "Silver nanoparticles as antimicrobial agent", A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. J. Colloid Interface Science. 275:177-82.
- [3] Victor K. Champagne and Dennis J. Helfritch A (2013). "Demonstration of the antimicrobial effectiveness of various copper surfaces". Champagne and Helfritch, Journal of Biological Engineering 7:8.
- [4] Azam, A., Arham S. Ahmed and Mohammad and Mohammad S Khan and Sami S Habib

آنها شده و در نتیجه چرخه سلولی متوقف می‌گردد که نتیجه مشاهده شده در این تحقیق نیز کاهش رشد باکتری‌ها را نشان داد. همچنین با توجه به نتیجه حاصل از ماتریس تشابه که فاصله ژنتیکی بین نمونه‌ها را از 0/6 و 0/8 نشان داده که بیانگر ایجاد تفاوت و کاهش شباهت ژنتیکی است، چرا که در ماتریس تشابه هر چه اعداد از یک کمتر باشد شباهت ژنتیکی هم کمتر است.

انجام این تحقیق از این نظر حائز اهمیت بود که با تأثیر نانوذرات اکسید مس بر روی ژنوم باکتری سالمونلا به عنوان مدل برای باکتری‌های گرم منفی، یکی از مکانیسم‌های احتمالی اثر نانوذرات اکسید مس بر این باکتری مشخص شده و دریچه جدیدی را برای بررسی‌های تکمیلی اثر این نانوذرات روی انواع باکتری‌ها و همچنین استفاده از نانوذرات اکسید مس با فعالیت ضد میکروبی بالا با غلظت‌های نسبتاً بالا به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها و ضد عفونی‌کننده‌های معمول با مضرات پایین بگشاید. 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. بنابراین ممکن است به هنگام استفاده به عنوان ماده ضد باکتریایی بر روی سلول‌های یوکاریوتی و سایر ارگانیزم‌ها نیز اثر گذارد. همچنین در تحقیقات مریم شفق سیتوتوکسیسیته نانوذرات اکسید مس در سلول‌های سرطانی 562K (سلول لوسمی میلوئیدی مزمن انسان بررسی شده است که هیچ سمیتی روی سلول‌های نرمال با استفاده از سنجش MTT نشان داده نشده است [20].

5- نتیجه‌گیری و پیشنهاد

کاربرد بسیار زیاد نانوذرات مختلف در کل جهان و به خصوص در کشور ما مطالعات دقیقتری را برای شبیه‌سازی مدل حیوانی و کاربرد در سلول‌های یوکاریوتی پیرامون تأثیرات این نانو ذره بر روی سیستم‌های مختلف

- copper nanoparticles". *Materials Letters*.
- [13] Murugan, V., Sadhasivam, S. (2012). "Glucosamine functionalized copper nanoparticles: preparation, characterization and enhancement of anti-bacterial activity by Itraviolet irradiation", *Chemical Engineering*.
- [14] Ipsa Subhankari and 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.
- [15] Damm, C., Münstedt, H., Rosch, A. (2008) "The antimicrobial efficacy of polyamide /silvernano- and microcomposites". *Mater Chem Phys*; 108(1): 61-6.
- [16] Panacek, A., Kvittek, S.L., Pucek, R., Kolgr, M., Vecerova, R., Pizurova, N. (2006). "Silver colloid nano particles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity". *J. Phys Chem B*; 110(33): 16248-53.
- [17] Soenen, S.J.H., Himmelreich, U., Nuytten, N., Pisanic, T.R., Ferrari, A., De Cuyper, M. (2010), "Intracellular nano particle coating stability determines nano particle diagnostics efficacy and cell functionality". *Small* 6, 2136–2145.
- [18] Chang, Y., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., Xing, G. (2012). "The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nano particles". *Materials* 2012, 5, 2850-2871; doi:10.3390/ma5122850.
- [19] Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M. (2007), "Does the antibacterial activity of nano particles depend on the shape of the nano particles A study of the gramnegative bacterium *Escherichia coli*". *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1712-1720.
- [20] شفق، م. رحمانی، ف. دلیرژ، ن. (1393). "تأثیر ضد تکثیر نانوذرات اکسید مس بر روی رده سلولی تواموری 562K"، *مجله زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس*.
- and Adnan Memic, (2012). "Antimicrobial activity of metal oxide nano particles against Gram-positive and Gram-negative bacteria a comparative study". *International Journal of Nanomedicine*. 6003-6009
- [5] Zhanhu Guo et al., (2007). Strengthening and thermal stabilization of polyurethane nanocomposites with silicon carbide nanoparticles by a surface-initiated-polymerization approach *Composites. Composites Science and Technology* 68 (2008) 164–170
- [6] Bogdanovića, U., Lazić, B. V., Vodnik, V. (2014). "Copper nanoparticles with high antimicrobial activity". *Materials Letter*.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] T. Theivasanthi and M. Alagar. (2012). "Studies of Copper Nanoparticles Effects on Micro-organisms". Centre for Research and P.G. Department of Physics, Ayya Nadar Janaki Ammal College Sivakasi, Tamilnadu, India - 626124.
- [10] Whitesides, G.M. (2005). "Nanoscience, nanotechnology, and chemistry *Small*" 1, 172–179.
- [11] نقوی، م. قره‌یاضی ب. حسینی سالکده، ق. (1392). "نشانگرهای مولکولی". *موسسه انتشارات دانشگاه تهران*.
- [12] Shankar, Sh., Jong-Whan, R. (2014). "Effect of copper salts and reducing agents on characteristics and antimicrobial activity of