

НАНОТЕХНОЛОГІЇ

© Дибкова С. М.

УДК 577. 352. 3:616-006. 04:57. 02:661. 859

Дибкова С. М.

НАНОЧАСТИНКИ ЗОЛОТА ТА СРІБЛА – ЕФЕКТИВНІ АГЕНТИ ЕЛІМІНАЦІЇ ПЛАЗМІД АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ

Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України

(м. Київ)

Робота виконана в рамках проекту «Розробка та створення високоефективних антимікробних агентів на основі наночастинок металів та їх кон'югатів з антибіотиками для лікування нозокоміальних інфекцій» цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва», державний реєстраційний номер 0112U002927.

Вступ. Вивчення характеру впливу наночастинок золота і срібла на генетичний апарат прокаріотичної клітини відкриває нові перспективи для практичного їх застосування в біотехнології, медицині та ветеринарії [1, 5, 6, 8, 9].

Відомо, що в бактеріальних популяціях розповсюджені екстрахромосомні фактори спадковості – плазміди, які несуть гени антибіотикорезистентності (R-плазміди), деградації хімічних речовин, тощо [4]. Оскільки явище стійкості до антибіотиків являє загрозу для здоров'я людини та тварин, дослідження здатності хімічних речовин до деструкції R-плазмід та їх незворотньої елімінації із бактеріальної клітини є надзвичайно актуальними. Тому вивчення взаємодії наночастинок золота і срібла з плазмідною ДНК бактерій являє значний теоретичний та практичний інтерес.

Мета дослідження полягала у вивченні характеру взаємодії наночастинок золота і срібла з плазмідною ДНК бактерій.

Об'єкт і методи дослідження. Наночастинки золота синтезували шляхом відновлення аурату калію ацетоном або етанолом методом Девіса. Вихідною речовиною виступала золотохлористоводнева кислота $\text{H[AuCl}_4\text{]}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, з якої при взаємодії з карбонатом калію у водному розчині утворювався аурат калію. Наночастинки срібла отримували конденсаційним методом шляхом відновлення солей срібла [3]. Розмір отриманих наночастинок визначали з використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС) за допомогою спектрометра Zetasizer-3 («Malvern Instruments Ltd», Великобританія).

В роботі використано стерильні водні препарати наночастинок металів: золота – розміром 20 та 30

нм у вихідних концентраціях: 20 нм – 11,6 мкг/мл, 30 нм – 19,2 мкг/мл; срібла розміром 30 нм у концентрації 86,0 мкг/мл за металом.

Для вивчення взаємодії плазмідної ДНК з наночастинами золота та срібла були використані рекомбінантні плазміди pUC19 та pBR322, які використовуються для клонування та мають гени антибіотикорезистентності.

Плазміда pUC19 містить 2686 нуклеотидних пар, висококопійна, несе ген, що забезпечує стійкість до антибіотика ампіциліну Amp^r , (GenBank Assession Number LO9137).

Плазміда pBR322 містить 4361 нуклеотидну пару, висококопійна, несе гени ампіцилінової Amp^r та тетрациклінової Tet^r резистентності, (GenBank Assession Number J01749).

Плазміди pUC19 та pBR322 знаходилися в бактеріях *E. coli* XL1-Blue Kan (Stratagene).

Для отримання препаратів плазмідної ДНК використовували метод лужного лізису за Бірнбоймом і Долі [7]. Препарати плазмід розчиняли в стерильній дистильованій воді та зберігали при -20°C .

Інкубацію препаратів плазмідної ДНК з наночастинами золота і срібла проводили при 24°C протягом 30-60 хвилин. Інкубаційна суміш складалася з препарату плазміди, розведеного очищеною стерильною дистильованою водою, та стерильного водного препарату наночастинок металів. Концентрація наночастинок золота в інкубаційних сумішах складала: 20 нм – 5,8 мкг/мл за металом, 30 нм – 9,6 мкг/мл за металом; наночастинок срібла розміром 30 нм – 43,0 та 17,0 мкг/мл за металом.

Візуалізацію препаратів плазмідної ДНК та плазмідної ДНК, обробленої наночастинами золота чи срібла, здійснювали методом електрофорезу в 1 % агарозному гелі в 1xTBE буфері з послідовним фарбуванням бромистим етидієм (0,5 мкг/мл) [2].

Електронно-мікроскопічний аналіз препаратів ДНК з наночастинами золота та срібла здійснювали за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу JEOL JEM-1230 Electron Microscope («Tokyo Boeki Ltd», Японія).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Рис. 1. Електрофоретична картина розподілу ДНК модельних плазмід rUC19 та rBR322, що зазнали впливу наночастинок золота та срібла.

Примітка: 1- плазмід rBR322 не оброблена наночастинами;
2- плазмід rBR322, оброблена наночастинами срібла (43,0 мкг/мл);
3-плазмід rBR322, оброблена наночастинами срібла (17,0 мкг/мл);
4-плазмід rBR322, оброблена наночастинами золота 30 нм(9,6 мкг/мл);
5-плазмід rBR322, оброблена наночастинами золота 30 нм(3,8 мкг/мл);
6-плазмід rUC19, оброблена наночастинами срібла (43,0 мкг/мл);
7-плазмід rUC19, оброблена наночастинами срібла (17,0 мкг/мл);
8-плазмід rUC19, оброблена наночастинами золота(9,6 мкг/мл);
9-плазмід rUC19, оброблена наночастинами золота (3,8 мкг/мл);
10-плазмід rUC19 не оброблена наночастинами

Елімінацію плазмід rUC19 та rBR322 з клітин бактерій *E. coli* здійснювали: шляхом спонтанної елімінації та шляхом обробки плазмідомісних бактерій наночастинами золота та срібла з послідовною контрелекцією.

Результати досліджень та їх обговорення. З метою вивчення характеру впливу наночастинок золота і срібла на структуру плазмідної ДНК здійснювали інкубацію плазмід rUC19 та rBR322 з наночастинами золота розміром 30 нм в концентраціях 9,6 та 3,8 мкг/мл за металом та наночастинами срібла розміром 30 нм в концентраціях 43,0 і 17,0 мкг/мл за металом. Показано, що така інкубація досліджуваних плазмід з наночастинами металів призводить до суттєвих змін у картині електрофоретичного розділення ДНК (**рис. 1**).

Отримані результати свідчать про дію наночастинок золота і срібла на плазміді, проте не слід виключати і впливу на параметри електрофорезу заряджених наночастинок, зв'язаних з ДНК.

Наступний етап вивчення характеру взаємодії досліджуваних наночастинок металів з плазмідною ДНК включав електронно-мікроскопічні дослідження. Препарати для електронної мікроскопії готували з інкубаційних сумішей без додаткового контрастування.

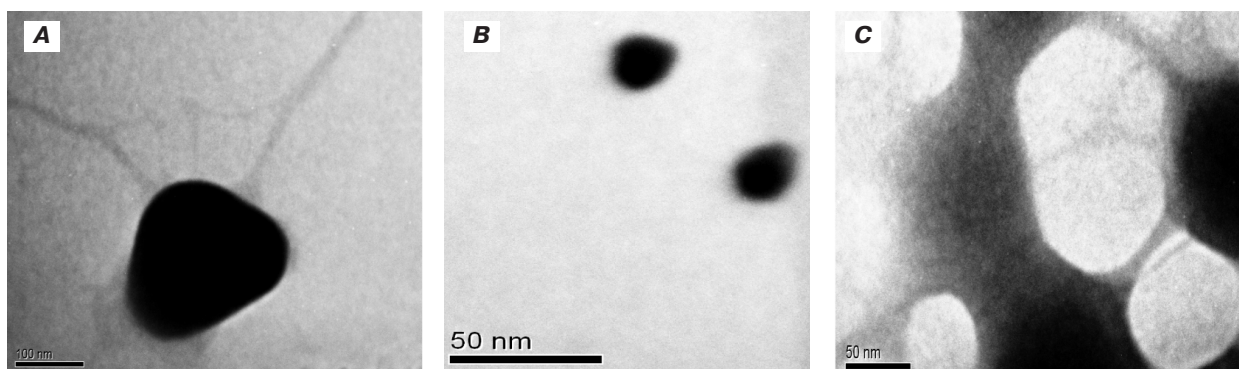


Рис. 2. Електронно-мікроскопічні зображення взаємодії наночастинок золота розміром 20 нм з плазмідною rUC19. А- препарат плазмід rUC19 з наночастинами золота розміром 20 нм; В – контроль, препарат наночастинок золота розміром 20 нм; С- контроль, препарат плазмід rUC19.

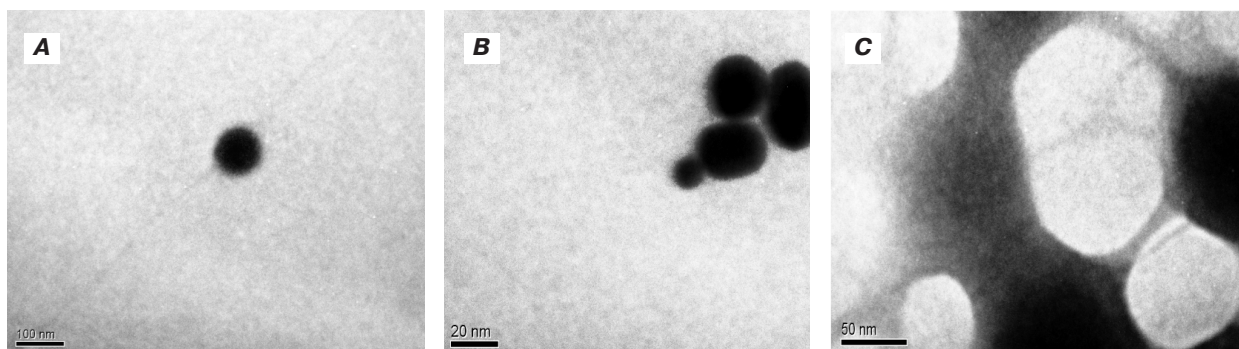


Рис. 3. Електронно-мікроскопічні зображення взаємодії наночастинок золота розміром 30 нм з плазмідною rUC19. А- препарат плазмід rUC19 з наночастинами золота розміром 30 нм; В – контроль, препарат наночастинок золота розміром 30 нм; С- контроль, препарат плазмід rUC19.

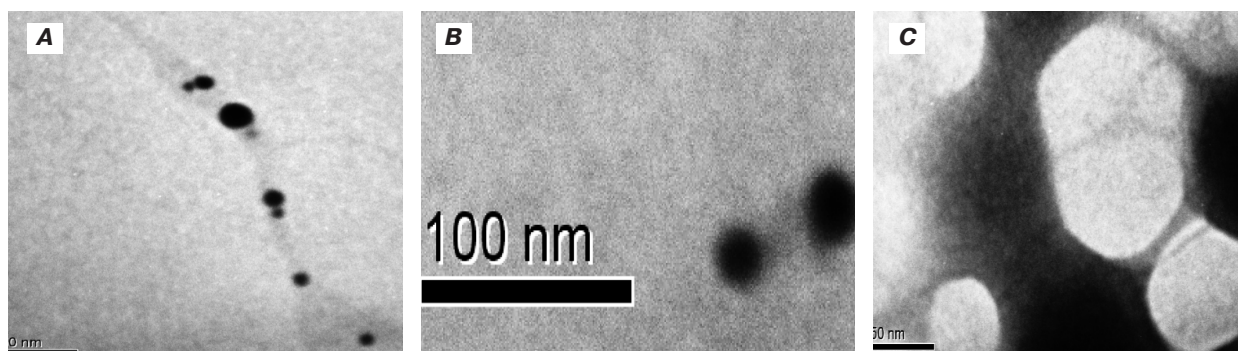


Рис. 4. Електронно-мікроскопічні зображення взаємодії наночастинок срібла розміром 30 нм з плазмідною рUC19. А- препарат плазмідної рUC19 з наночастинками срібла розміром 30 нм; В – контроль, препарат наночастинок срібла розміром 30 нм; С- контроль, препарат плазмідної рUC19.

Рисунок 2 відображає особливості взаємодії наночастинок золота розміром 20 нм з плазмідною рUC19.

На **рисунку 2 (А)** показано характер локалізації наночастинок золота на ДНК плазмідної рUC19.

На **рисунку 3** наведені електронно-мікроскопічні зображення взаємодії наночастинок золота розміром 30 нм з плазмідною рUC19.

Особливості взаємодії препаратів плазмідної рUC19 з наночастинками срібла розміром 30 нм відображені на **рисунку 4**.

Аналізуючи електронно-мікроскопічні зображення взаємодії наночастинок золота та срібла з плазмідною рUC19, можна констатувати наявність структурних змін плазмідної рUC19 від глобул (2(С), 3(С), 4(С)), до релаксованих форм (2(А), 3(А), 4(А)).

У випадку взаємодії плазмідної рUC19 з наночастинками золота розміром 20 нм є характерною агрегація наночастинок золота. Це може бути наслідком присутності невеликої кількості білка, яка залишилася після виділення плазмідної ДНК, що може призводити до модифікації поверхні досліджуваних наночастинок. У випадку взаємодії плазмідної рUC19 з наночастинками золота 30 нм та срібла (30 нм) наночастинки не мають тенденції до агрегації.

Наночастинки золота 20 і 30 нм розміщуються не періодично на нитках плазмідної рUC19, а наночастинки срібла 30 нм розміщуються на ній з певною періодичністю, призводячи до релаксації такої плазмідної.

У випадку плазмідної рBR322 також мають місце її структурні зміни від глобул **рис. 5(Д)** до релаксованих форм **рис. 5(А, В, С)**.

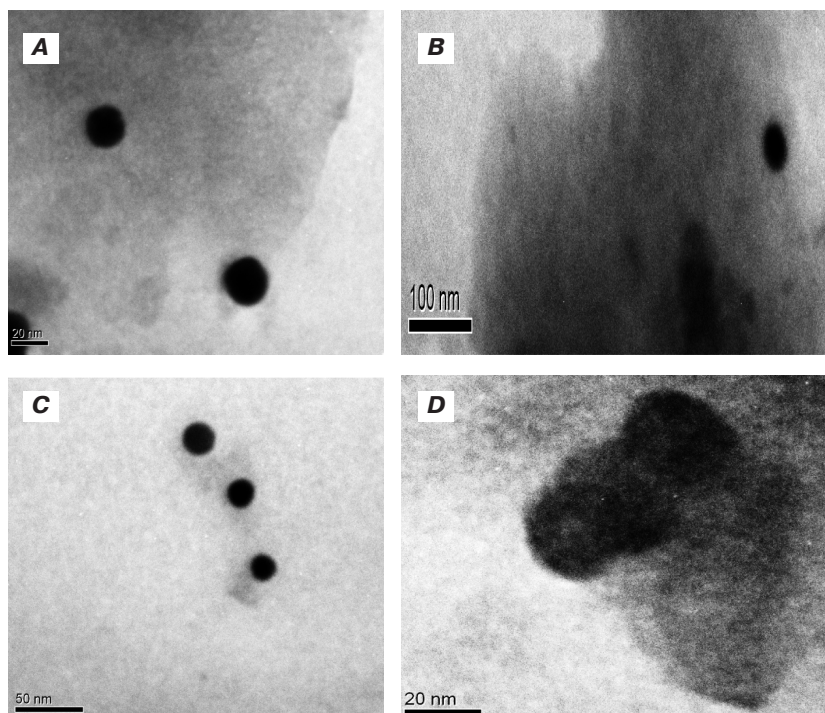


Рис. 5. Електронно-мікроскопічні зображення взаємодії наночастинок золота і срібла з плазмідною рBR322: А-препарат плазмідної рBR322 з наночастинками золота розміром 20 нм; В- препарат плазмідної рBR322 з наночастинками золота розміром 30 нм; С- препарат плазмідної рBR322 з наночастинками срібла розміром 30 нм; Д- контроль, препарат плазмідної рBR322.

За наявності експериментальних доказів безпосередньої дії наночастинок золота і срібла на плазмідну рBR322 та рUC19 з детермінантами антибіотикостійкості було проведено дослідження щодо здатності досліджуваних наночастинок металів еліминувати R-плазмідні клітини. Елімінацію плазмід рUC19 та рBR322 з клітин плазмідовмісних бактерій *E. coli* здійснювали шляхом обробки клітин наночастинками золота та срібла.

Рівень спонтанної елімінації оцінювали при культивуванні плазмідовмісних бактерій *E. coli* на середовищі МПА без антибіотика. Встановлено, що при культивуванні бактерій *E. coli* XL1-Blue (рUC19) та *E. coli* XL1-Blue (рBR322) в МПБ без антибіотика

Таблиця
Частота елімінації плазмід pUC19 і pBR322
із штамів *E. coli* XL1-Blue (pUC19) та *E. coli*
XL1-Blue (pBR322) при обробці бактерій
наночастинками золота та срібла

Тип елімінації плазмід	Плазмидовмісний штам	Частота елімінації (%)
Спонтанна елімінація	<i>E. coli</i> XL1-Blue (pUC19)	37
	<i>E. coli</i> XL1-Blue (pBR322)	34
Елімінація наночастинками золота 20нм	<i>E. coli</i> XL1-Blue (pUC19)	89
	<i>E. coli</i> XL1-Blue (pBR322)	86
Елімінація наночастинками золота 30нм	<i>E. coli</i> XL1-Blue (pUC19)	91
	<i>E. coli</i> XL1-Blue (pBR322)	90
Елімінація наночастинками срібла 30нм	<i>E. coli</i> XL1-Blue (pUC19)	98
	<i>E. coli</i> XL1-Blue (pBR322)	96

протягом 18 годин частота спонтанної елімінації складала: у випадку плазмід pUC19 – 37 %, а у випадку плазмід pBR322 – 34 %.

При обробці плазмидовмісних бактерій *E. coli* XL1-Blue (pUC19) та *E. coli* XL1-Blue (pBR322) наночастинками золота розміром 20 нм в концентрації 5,6 мкг/мл за металом протягом 18 годин частота елімінації становила 89 % та 86 % відповідно (табл.).

У випадку використання наночастинок золота розміром 30 нм (9,6 мкг/мл за металом) як елімінуючого агента, частота елімінації складала для pUC19 – 91 %, а для pBR322 – 90 %.

Наночастинки срібла в концентрації 17 мкг/мл ефективно елімінували плазмід pUC19 і pBR322 із штамів *E. coli* XL1-Blue (pUC19) та *E. coli* XL1-Blue (pBR322) з частотою: pUC19 – 98 % та pBR322 – 96 %.

Таким чином, показано високу ефективність наночастинок золота і срібла як елімінуючих агентів плазмід антибіотикорезистентності. Для остаточного висновку щодо елімінуючих властивостей досліджених наночастинок металів потрібно провести подальші дослідження із залученням плазмидовмісних резистентних клінічних ізолятів патогенних мікроорганізмів.

Висновки. Наночастинки золота розмірами 20 і 30 нм та наночастинки срібла розміром 30 нм змінюють структуру плазмід pUC19 і pBR322 шляхом релаксації. Досліджувані наночастинки металів викликають високу частоту елімінації плазмід pUC19 і pBR322 із бактерій штамів *E. coli* XL1-Blue (pUC19) *E. coli* XL1-Blue (pBR322).

Перспективи подальших досліджень. Виконані дослідження щодо характеру взаємодії наночастинок золота і срібла з плазмідами та їх елімінуючих властивостей відкривають перспективи подальших досліджень щодо подолання антибіотикорезистентності у збудників захворювань людини та тварин.

Література

1. Кундієв Ю. І. Проблема оцінки потенційних ризиків наноматеріалів та шляхи її вирішення / Ю. І. Кундієв, З. Р. Ульберг, М. І. Трахтенберг [та ін.] // Доповіді НАНУ. – 2013. – № 1. – С. 177-183.
2. Маниатис Е. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Е. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – Москва: Мир, 1984. – 479 с.
3. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / Под ред. А. В. Перцова – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 132 с.
4. Пехов А. П. Основы плазмидологии / А. П. Пехов – Москва, Издательство Российского Университета Дружбы Народов, 1996 г. – 230 с.
5. Чекман І. С. Нанофармакологія / І. С. Чекман. – Київ: ПВП “Задруга”, 2011. – 422 с.
6. Чекман І. С. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація / І. С. Чекман, З. Р. Ульберг, В. О. Маланчук – К.: Поліграф плюс, 2012. – 328 с.
7. Birnboim H. C. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA / H. C. Birnboim, J. Doly // Nucleic Acids Res. – 1979. – Vol 7, №6. – P. 1513-1523.
8. Sahoo S. K. The present and future of nanotechnology in human health care / S. K. Sahoo, S. Parveen, J. J. Panda // Nanomedicine. – 2007. – № 3. – P. 20-31.
9. West J. L. Application of nanotechnology to biotechnology / J. L. West, N. J. Halas // Curr. Opin. Biotechnol. – 2000. – Vol. 11. – P. 215-217.

УДК 577.352.3:616-006.04:57.02:661.859

НАНОЧАСТИНКИ ЗОЛОТА ТА СРІБЛА – ЕФЕКТИВНІ АГЕНТИ ЕЛІМІНАЦІЇ ПЛАЗМІД АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ

Дибкова С. М.

Резюме. Вивчення характеру впливу наночастинок золота та срібла на генетичний апарат прокаріотичної клітини відкриває нові перспективи для їх практичного застосування у біотехнології, медицині та ветеринарії. Метою роботи було визначення характеру взаємодії наночастинок золота (20 і 30 нм) та срібла (30нм) з плазмідами pUC19 і pBR322, які несуть гени антибіотикорезистентності. Показано, що наночастинки золота розмірами 20 і 30 нм та наночастинки срібла розміром 30 нм змінюють структуру плазмід pUC19 і pBR322 шляхом релаксації. Досліджувані наночастинки металів викликають високу частоту елімінації плазмід pUC19 і pBR322 із бактерій штамів *E. coli* XL1-Blue (pUC19) і *E. coli* XL1-Blue (pBR322). Для остаточного висновку

щодо елімінуючих властивостей досліджених наночастинок металів потрібно провести подальші дослідження із залученням плазмідовмісних резистентних клінічних ізолятів патогенних мікроорганізмів.

Ключові слова: наночастинок золота і срібла, плазмиди, ДНК, елімінація.

УДК 577. 352. 3:616-006. 04:57. 02:661. 859

НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА ТА СЕРЕБРА – ЭФФЕКТИВНЫЕ АГЕНТЫ ЭЛИМИНАЦИИ ПЛАЗМИД АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Дыбкова С. Н.

Резюме. Изучение характера влияния наночастиц золота и серебра на генетический аппарат прокариотической клетки открывает новые перспективы для их практического применения в биотехнологии, медицине и ветеринарии. Целью работы было определение характера взаимодействия наночастиц золота (20 и 30 нм) и серебра (30 нм) с плазмидами pUC19 и pBR322, несущими гены антибиотикорезистентности. Показано, что наночастицы золота размерами 20 и 30 нм и наночастицы серебра размером 30 нм изменяют структуру плазмид pUC19 и pBR322 путем релаксации. Исследуемые наночастицы металлов вызывают высокую частоту элиминации плазмид pUC19 и pBR322 из бактерий штаммов *E. coli* XL1 -Blue (pUC19) и *E. coli* XL1 -Blue (pBR322). Для окончательного заключения об элиминирующих свойствах исследованных наночастиц металлов нужно провести дальнейшие исследования с привлечением плазмидосодержащих антибиотикорезистентных клинических изолятов патогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: наночастицы золота и серебра, плазмиды, ДНК, элиминация.

UDC 577. 352. 3:616-006. 04:57. 02:661. 859

Gold and Silver Nanoparticles – Effective Agents for Elimination the Plasmids of Antibiotic Resistance Dybko S. M.

Abstract. Unique properties of metal nanoparticles and their biological activity open wide perspectives for their using in medicine. Studies of the peculiarities of metal's nanoparticles interaction with nucleic acids of plasmids has fundamental importance in the investigation of metal's nanoparticles influence on genetic complex of cells.

The research has been performed with using model systems of nucleic acids such as plasmids pUC19 and pBR322. These plasmids (R-plasmids) have genes of resistance to antibiotics: plasmid pUC19 have gene Amp^r (GenBank Assession Number L09137); plasmid pBR322 have gene Amp^r and Tet^r (GenBank Assession Number J01749). The plasmids pUC19 and pBR322 were living in bacterias of strain *E. coli* XL1-Blue Kan (Stratagene). Plasmids obtained by method of Birnboim&Doly and stored at – 20°C.

This plasmids were influenced by gold and silver nanoparticles in different concentrations: gold nanoparticles 30 nm – 9,6 and 3,8 mkg/ml, silver nanoparticles 30 nm – 43,0 and 17,0 mkg/ml. By electrophoresis method it has been shown the changes in electrophoretic mobility of plasmids pUC19 and pBR322. These results indicate the changes in the structure of the model plasmids.

Interaction of gold and silver nanoparticles of different size with plasmids pUC19 and pBR322 has been performed by the method of electron microscopy. Nanoparticles concentration in incubation mixtures: gold nanoparticles 20 nm – 5,8 mkg/ml, 30 nm – 9,6 mkg/ml; silver nanoparticles 30 nm – 43,0 and 17,0 mkg/ml.

Gold nanoparticles (20 and 30 nm) causing relaxation of plasmids placed not sorted on it's threads. Moreover, gold nanoparticles with size 20 nm, in contrast to the 30 nm nanoparticles, aggregated an untwisted plasmids. Silver nanoparticles with size 30 nm leads to destructive changes of plasmid DNA, while being located on it at regular intervals. Thus, interaction of gold (20 and 30 nm) and silver nanoparticles (30 nm) with plasmids pUC19 and pBR322 resulting in plasmid's relaxation.

Elimination of the plasmids pUC19 and pBR322 was performed by culturing the bacteria *E. coli* XL1-Blue (pUC19) and *E. coli* XL1-Blue (pBR322) with gold and silver nanoparticles within 18 hours. Gold (20 and 30 nm) and silver (30 nm) nanoparticles cause a high frequency of plasmid's pUC19 and pBR322 elimination. In processing the plasmids of bacteria *E. coli* XL1-Blue (pUC19) and *E. coli* XL1-Blue (pBR322) gold nanoparticles of 20 nm at a concentration of 5. 6 mg / ml elimination rate was 89 % and 86 % respectively. In the case of gold nanoparticles of 30 nm (9. 6 mg/ml) rate of elimination was: pUC19 – 91 %, and pBR322 – 90 %. Silver nanoparticles at concentration of 17 mg/ml eliminate plasmids from strains of *E. coli* XL1-Blue (pUC19) and *E. coli* XL1-Blue (pBR322) with frequency: pUC19 – 98 % and pBR322 – 96 %. Frequency of spontaneous elimination was: in the case of plasmid pUC19 – 37 %, pBR322 – 34 %.

Thus, effectively eliminates of plasmid's pUC19 and pBR322 has been performed by gold (20 and 30 nm) and silver (30 nm) nanoparticles.

For a final conclusion about gold and silver nanoparticles' properties to effectively elimination of R-plasmids to need hold in further studies involving the plasmids of clinical isolates of bacterias

Key words: gold nanoparticles; silver nanoparticles; plasmids; DNA; elimination.

Рецензент – проф. Непорада К. С.

Стаття надійшла 27. 05. 2014 р.