

القای بیان ژن HSP70 در دوکفه‌ای آب شیرین *Anodonta cygnea* ناشی از مواجهه با CuO-NPs

حدیثه کشیری^{۱*}، علی شعبانی^۲، کاوه خسرویانی^۳، امیر قادرمرزی^۴

تاریخ دریافت: بهمن ۹۵

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۹۶

چکیده

دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* به دلیل مقاومت پایین در برابر تغییرات محیطی به عنوان گونه‌ای مناسب در ارزیابی آلودگی اکوسیستم‌های آبی مطرح است. امروزه به دلیل کاربرد گسترده نانومواد در صنایع مختلف، نگرانی‌های زیادی در خصوص اثرات منفی این مواد بر حیات سیستم‌های آبی وجود دارد. در مطالعه حاضر به ارزیابی اثر نانوذرات اکسید مس (II) (CuO-NPs) بر بیان ژن HSP70 در *A. cygnea* پرداخته شد. بدین منظور، دوکفه‌ای‌ها طی ۱۲ روز در معرض CuO-NPs با غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۰/۲۵، ۲/۵ و ۲۵ ppm قرار گرفتند. برای ارزیابی تغییرات بیان ژن HSP70، ابتدا توالی این ژن در گونه مورد نظر تعیین شد. در این راستا، یک قطعه ۵۴۰ نوکلئوتیدی کد کننده HSP70 کلون شد. توالی نوکلئوتیدی HSP70 در *A. cygnea* به ترتیب دارای ۱۹/۸، ۳۰/۷، ۲۶/۷ و ۲۲/۹ درصد از نوکلئوتیدهای A، C، G و T بود. نتایج حاکی از آن بود که مواجهه با CuO-NPs منجر به القای بیان ژن HSP70 در هر دو بافت پا و آبشش شد. اما اختلاف مشاهده شده بین سطح بیان ژن HSP70 در این دو بافت معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). همچنین سطح بیان ژن در بافت‌های مورد بررسی، با افزایش زمان مواجهه تا ۸ روز افزایش یافت اما با گذشت زمان تا روز دوازدهم روند کاهشی نشان داد ($P \leq 0.05$). در مجموع، ژن HSP70 در دوکفه‌ای *A. cygnea* دارای میزان بالاتری از نوکلئوتیدهای GC در مقایسه با سایر گونه‌های مورد بررسی است و سطح بیان این ژن تحت مواجهه با CuO-NPs افزایش می‌یابد، به نحوی که میزان این افزایش وابسته به غلظت و زمان مواجهه است.

واژگان کلیدی: *Anodonta cygnea*، آلودگی، پروتئین شوک حرارتی، نانوذرات اکسید مس.

- ۱- استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۳- کارشناس ارشد آزمایشگاه مرکزی ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- ۴- دانشجوی دکتری شیلات، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

* نویسنده مسئول: hadiskashiri@gmail.com

مقدمه

تکنولوژی یافته‌اند (Moore, 2006). از آنجایی که بخش قابل توجهی از نانومواد و محصولات جانبی آن‌ها همچون اغلب محصولات و پساب‌های صنعتی وارد محیط‌های آبی می‌شود (Daughton, 2004)، نگرانی‌های روزافزونی درباره اثرات احتمالی این مواد بر سلامت محیط زیست آبی ایجاد شده است. بررسی‌ها نشان داده است که بسیاری از نانوذرات به دلیل حلالیت پایین و تمایل به تجمع در محیط‌های آبی، می‌توانند برای آبزیان سمی باشند (Durnev, 2008). در بین نانوذرات مختلف، نانوذرات مبتنی بر مس به دلیل دسترسی ساده، هزینه پایین و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاص به طور گسترده‌ای تولید و مورد استفاده قرار می‌گیرند (Umer et al., 2012). در واقع، این مواد به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی در زمینه کشاورزی، پزشکی و صنعت کاربرد فراوان یافته‌اند (Kasana et al., 2016). با وجود تولید و کاربرد گسترده نانوذرات مس و متعاقب آن رهاسازی پساب‌های حاصل از آن به محیط زیست، اطلاعات اندکی درباره اثرات احتمالی این مواد بر موجودات زنده وجود دارد. دوکفه‌ای‌ها به دلیل ویژگی‌هایی همچون ساکن

صدف *Anodonta cygnea* متعلق به خانواده Unionidae و یکی از بزرگ‌ترین دوکفه‌ای‌های آب شیرین است که پراکنش گسترده‌ای در اکوسیستم‌های آب شیرین و لب‌شور دنیا دارد (Chojnacki et al., 2011). این گونه در ایران در برخی از سیستم‌های آبی شمال ایران نیز وجود دارد (پروانه، ۱۳۷۳). *Anodonta cygnea* دارای دامنه تحمل پایینی نسبت به عوامل محیطی منفی است، از این رو به عنوان یک نشان‌گر زیستی خوب برای آب‌های تمیز با میزان بالای اکسیژن و بستر غنی از مواد غذایی محسوب می‌شود (Chojnacki et al., 2011). در حال حاضر این دوکفه‌ای جزو گونه‌هایی با کمترین خطر تهدید به شمار می‌رود (Lopes-Lima, 2014). با این وجود عواملی همچون آلودگی آب‌ها ناشی از تخلیه پساب‌ها به ویژه انواع صنعتی و شیمیایی، مواد سمی و ورود رواناب‌های حاوی کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها می‌تواند وضعیت این گونه را به مخاطره اندازد (Chojnacki et al., 2011).

امروزه نانوذرات به دلیل اندازه کوچک و ویژگی‌های سطحی خاص خود، کاربرد گسترده‌ای در حوزه‌های مختلف علم و

زیست‌محیطی در نظر گرفته می‌شود (Bierkens, 2000). HSPs خانواده‌ای از پروتئین‌ها است که در برخی فرآیندهای حیاتی در سلول‌ها مشارکت دارند و شرایط استرس‌زا منجر به القای بیان آن‌ها می‌شود (Iwama et al., 1998). در بین پروتئین‌های شوک حرارتی، HSP70 به عنوان پروتئین هدف در بررسی پاسخ‌های استرس در ماسل‌ها، بیش از سایر پروتئین‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Fabbri et al., 2008). به هر حال، مطالعات کمی درباره بیان ژن این پروتئین در ماسل‌ها انجام شده است که به چند گونه خاص همچون *Crassostrea gigas* (Hamdoun et al., 2003) و *Mytilus galloprovincialis* (Franzellitti and Fabbri, 2005; Dutton and Hofmann, 2009; Bebianno et al., 2015) و *Mytilus californianus* (Place et al., 2008) محدود می‌شود. در مطالعه حاضر با در نظر گرفتن کاربرد روزافزون نانومواد و با توجه به اهمیت *Anodonta cygnea* به عنوان یک نشان‌گر زیستی مطرح در آلودگی‌های زیست‌محیطی و همچنین فقدان اطلاعات در سطح مولکولی، به ارزیابی اثر نانوذرات اکسید مس (II) بر بیان ژن HSP70 در دوکفه‌ای *A. cygnea* پرداخته شد.

بودن و پالایش ذرات معلق و به تبع آن تجمع میزان قابل توجهی از ذرات، به عنوان موجودات بسیار مستعد در برابر خطرات مربوط به آلودگی‌های محیطی ناشی از نانوذرات شناخته شده‌اند (Canesi et al., 2012). بررسی‌ها نشان داده است که نانوذرات اکسید مس (CuO-NPs) می‌توانند در آبشش تجمع یابند و استرس اکسیداتیو را در *Mytilus galloprovincialis* القا کنند (Gomes et al., 2011). همچنین در بررسی دیگری بر روی گونه *M. galloprovincialis* مشخص شد که CuO-NPs باعث القای آسیب به DNA در سلول‌های همولنف می‌شود (Gomes et al., 2013).

روی هم رفته، استرس‌های محیطی می‌توانند باعث القای یک سری تغییرات فیزیولوژیکی در موجودات شوند. در این راستا، تغییر در سطح بیان ژن و ساخت سریع یک سری پروتئین‌ها همچون پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) به عنوان پاسخ‌های معمول در برابر استرس‌های محیطی شناخته شده‌اند (Lakhotia and Prasanth, 2002). از این رو، ارزیابی تغییرات ایجاد شده در سطح بیان mRNA این پروتئین‌ها، به عنوان روشی کارآمد در شناسایی پاسخ‌های فیزیولوژیکی در برابر شرایط نامساعد

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و نگهداری دوکفه‌ای‌ها

دوکفه‌ای‌های *Anodonta cygnea* (ماسل) در مهرماه ۱۳۹۴ از مصب رودخانه تجن واقع در سمس‌کنده استان مازندران (36°48'46"N, 53°6'57"E) جمع‌آوری و به سالن آبی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال داده شدند. متوسط طول و وزن نمونه‌ها به ترتیب $11/5 \pm 0/9$ سانتی‌متر و $84/5 \pm 6$ گرم بود. دوکفه‌ای‌ها به منظور سازگاری به مدت دو هفته در آکواریوم‌های شیشه‌ای با حجم ۶۰ لیتر آب شهری کلرزدایی شده نگهداری شدند. تغذیه به صورت روزانه با استفاده از جلبک *Chlorella vulgaris* ($3 \times 10^6 \text{ cells.L}^{-1}$) انجام گرفت. شاخص‌های فیزیوشیمیایی آب نیز طی مدت نگهداری مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، دما، اکسیژن محلول و pH با استفاده از دستگاه واترچک (Water Checker U-10، ژاپن) و سختی آب با استفاده از دستگاه فتومتر (Wagtech، آلمان) اندازه‌گیری شد.

تهیه محلول نانوذرات اکسید مس (II)

به منظور تهیه محلول ذخیره، نانوذرات اکسید مس (II) (نانوپودر CuO-NPs، ۴۰

نانومتر، ۹۹٪ خلوص؛ US Research Nanomaterials Inc، آمریکا) با استفاده از اولتراسونیک (Top Sonics 400-A، آلمان) در دور ۴۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه در آب مقطر (200 mg.L^{-1}) پخش و به صورت همگن در آمدند. به دلیل این که نانوذرات پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت در محلول آبی رسوب می‌یابند، تعلیق مجدد محلول ذخیره به صورت روزانه با استفاده از هموژنایزر (T25 Digital Homogenizer، JKA Ultra-Turrax، آلمان) در دور ۱۴۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. اندازه و نحوه پراکنش ذرات نیز با استفاده از دستگاه DLS (ZEN 3600، آلمان) تعیین شد.

طرح آزمایش

پس از طی دو هفته دوره سازگاری، ماسل‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: یک گروه به عنوان شاهد (بدون CuO-NPs) در نظر گرفته شد و سه گروه در معرض CuO-NPs قرار گرفتند. بر اساس مطالعات صورت گرفته پیشین، سه غلظت تحت‌کشنده از CuO-NPs شامل ۰، ۲۵، ۲/۵ و ۲۵ppm انتخاب شد (Qadermarzi et al., 2017). برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته

شد (۶ نمونه برای هر تکرار). طول مدت مواجهه ۱۲ روز بود و طی این مدت آب محیط به صورت روزانه تعویض می‌شد. نمونه‌برداری از بافت‌های پا و آبشش طی روزهای ۴، ۸ و ۱۲ مواجهه انجام شد. بدین منظور، ماسل‌ها با استفاده از پودر گل میخک (1g.L^{-1}) بی‌هوش شدند و بافت‌های مورد نظر جمع‌آوری شد. بافت‌ها بلافاصله در حمام اتانول-یخ خشک منجمد قرار داده شد و تا زمان استخراج RNA در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA

RNA کل با استفاده از کیت ترايزول طبق پروتکل شرکت سازنده (Invitrogen، آمریکا) از حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از هر بافت جداسازی شد. از DNase I (GeneAll، کره جنوبی) نیز برای حذف gDNA نمونه‌ها استفاده شد. پس از آن RNA به دست آمده در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کمیت RNA توسط دستگاه نانودراپ (Thermo، 2000c، Fisher Scientific، آمریکا) با خوانش میزان جذب نمونه‌ها در نسبت $260/280$ نانومتر تعیین شد. همچنین کیفیت RNA از طریق الکتروفورز (Bio-Rad، آمریکا) ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد.

ساخت cDNA با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis، Thermo Fisher Scientific، آمریکا) انجام شد. به طور خلاصه، ترکیبی از ۲ میکروگرم RNA و ۱ میکرولیتر آغازگر Oligo dT (تکاپوزیست، ایران)، با استفاده از آب DEPC (تکاپوزیست، ایران) به حجم ۱۲ میکرولیتر رسانده شد و در دمای 65°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور (CM120E، ایران) قرار گرفت. پس از سردسازی روی یخ، ۴ میکرولیتر بافر واکنش RiboLock RNase Inhibitor ($20\text{U}/\mu\text{L}$)، ۲ میکرولیتر dNTP (10mM) و ۱ میکرولیتر RevertAid M- MuLV RT ($200\text{U}/\mu\text{L}$) اضافه و در دمای 42°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. در نهایت واکنش مربوطه با قرار گرفتن در دمای 70°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه خاتمه یافت.

طراحی آغازگر و بررسی بیان ژن

طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن HSP70 با استفاده از توالی‌های گزارش شده در بانک جهانی داده‌های بیوتکنولوژی (NCBI) مربوط به *Dreissena polymorpha*

پیکومولار از هر کدام از آغازگرها و ۰/۵ واحد آنزیم TaqDNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) به صورت ۱۰ دقیقه و اسرشته‌سازی اولیه، ۴۰ چرخه با دمای و اسرشته‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط آنزیمی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه صورت گرفت. در نهایت بسط آنزیمی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت و باند هدف برای تکثیر دوباره برش و در واکنش PCR مجدد شرکت داده شد. محصول PCR با کیفیت مناسب برای توالی‌یابی دو طرفه استفاده شد.

Modiolus modiolus (EF526096)
Perna indica (EU050640)
Sinonovacula constricta (GU391233)
Mytilus edulis (JF748730)
Mytilus galloprovincialis (AF172607) و (AY861684) انجام گرفت. آغازگر اولیه برای توالی‌یابی و به دست آوردن توالی ژن HSP70 استفاده شد. ویژگی آغازگرهای طراحی شده برای دستیابی به توالی ژن‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. در نهایت آغازگرهای طراحی شده برای ارزیابی اختصاصی بودن در ابزار Primer-BLAST سایت NCBI مورد آزمون قرار گرفت. واکنش تکثیر تصادفی این جفت آغازگر در دستگاه ترموسایکلر (PeQlab، آلمان) با حجم ۳۰ میکرولیتری شامل ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۱۰

جدول ۱: ویژگی آغازگرهای مورد استفاده برای دستیابی به توالی ژن‌های مورد مطالعه

نام آغازگر	توالی	طول قطعه (جفت باز)	قطعه
HSP-seqf	GGTGAAGA(T,C)TTTGA(T,C)AA(T,C)(C,A)GAATGGT	۲۶	۶۴۰
HSP-seqr	TGAATG(G,A)(T,A)(G,T,C)AC(G,C)(G,C)C(C,A)GGCTGGTTGTC	۲۶	
ASHSP-F	GACAAGAAGGACCTCACCTCAATGC	۲۵	۱۲۴
ASHSP-R	CCCTCAAACAGCGAGTCAATCTCAATC	۲۷	
Bactin-F	CCTCACCTCAAGTACCCCAT	۲۱	۱۵۳
Bactin-R	TTGGCCTTTGGGTTGAGTG	۱۹	

استفاده از مدل دلتا ($\Delta\Delta Ct$) Livak and Schmittgen, 2001) پس از تجزیه و تحلیل، در نرم افزار Microsoft Excel 2007 وارد شد. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به گروه‌های مختلف (تیمارهای مختلف غلظت، بافت‌های مختلف و زمان‌های مختلف نمونه برداری) با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ تحت آنالیز واریانس یک طرفه فاکتوریل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها در گروه‌های مختلف نیز با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفت ($P < 0.05$).

نتایج

شاخص‌های فیزیوشیمیایی آب

شاخص‌های فیزیوشیمیایی آب طی مدت نگهداری به این شرح بود: $pH = 7.42 \pm 0.35$ ، دما 22 ± 1 درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول 7.6 ± 0.36 میلی‌گرم بر لیتر و سختی آب $256 \pm 5/8$ میلی‌گرم بر لیتر.

اندازه نانوذرات اکسید مس (II)

اندازه ذرات در نمونه محلول نانو اکسید مس در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به شکل، ۹۵ درصد حجمی ذرات در محلول کلوییدی دارای قطر ۸۵ نانومتر هستند که این امر نشان دهنده نانو بودن اندازه ذرات به کار

Real Time PCR با استفاده از روش مبتنی بر رنگ فلورسنس سایبرگرین انجام گرفت. در این روش ابتدا در دستگاه ترموسایکلر معمولی شرایط انجام واکنش PCR شامل حجم واکنش، غلظت آغازگر، دمای اتصال آغازگرها، مدت زمان لازم برای بسط قطعه، غلظت کلرید منیزیم و سایر عوامل موثر بر تکثیر بهینه شد. شرایط بهینه به دست آمده در دستگاه StepOne Real Time PCR (ABI، آمریکا) اجرا شد. برای بهینه کردن دمای اتصال آغازگرها از روش Gradient PCR استفاده شد. همچنین صحت و درستی cDNA ساخته شده با استفاده از PCR ژن کنترل در همه نمونه‌های مورد مطالعه بررسی شد. برای انجام واکنش Real Time PCR از پلیت ۴۸ چاهکی مخصوص دستگاه با حجم واکنش نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA ($50 \text{ ng}/\mu\text{L}$)، ۳ میکرولیتر Ex Taq، SYBR Premix II Mix (Takara، ۱X)، ژاپن) 0.8 میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پسین و پیشین ($0.5 \mu\text{M}$) و آب مقطر استریل تا رسیدن به حجم نهایی، استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از بررسی بیان ژن با

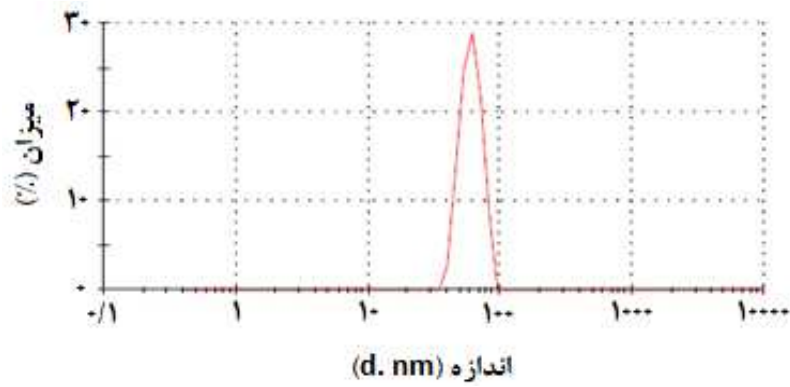
طراحی آغازگر

نتیجه توالی‌یابی ژن HSP70 در NCBI با کد دسترسی KX758099 گزارش و الگوی هم‌ردیف شده آن در مقایسه با توالی این ژن در سایر گونه‌های این خانواده به طول ۵۴۰ جفت باز در شکل ۳ نشان داده شده است. درخت فیلوژنی ترسیم شده و جایگاه توالی *A. cygnea* در مقایسه با سایر گونه‌ها نیز به ترتیب در شکل ۴ و جدول ۱ نشان داده شده است. با توجه به نتایج، توالی نوکلئوتیدی HSP70 در *A. cygnea* دارای ۱۹/۸ درصد نوکلئوتید A، ۳۰/۷ درصد نوکلئوتید C، ۲۶/۷ درصد نوکلئوتید G و ۲۲/۹ درصد نوکلئوتید T بود. همچنین ژن HSP70 این گونه دارای ۵۷/۴ درصد از نوکلئوتیدهای GC بود. نتایج حاصل از ترسیم درخت فیلوژنی نیز حاکی از قرار گرفتن *A. cygnea* در کلادی جداگانه نسبت به سایر گونه‌ها بود.

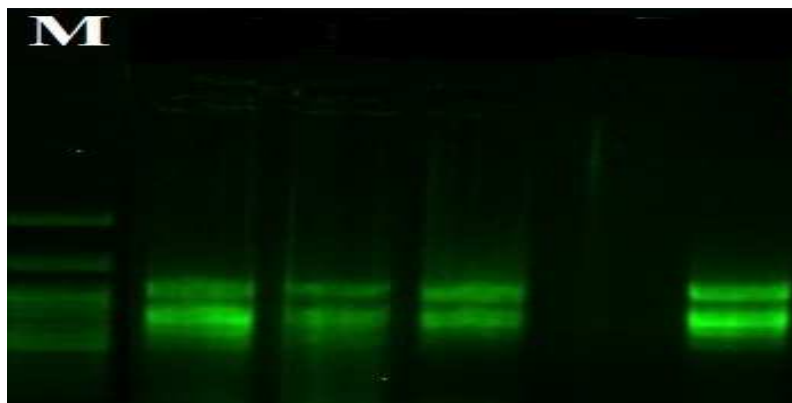
گرفته شده است. بر این اساس، نحوه پراکنش نانوذرات اکسید مس (II) در آب آکواریوم حاوی دوکفه‌ای‌ها یکسان بود و تمامی دوکفه‌ای‌ها به طور یکنواخت در مواجهه با نانوذرات اکسید مس (II) قرار گرفتند. همچنین با توجه به گراف می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات در کف مخازن رسوب نیافتند.

کیفیت و کمیت RNA استخراج شده

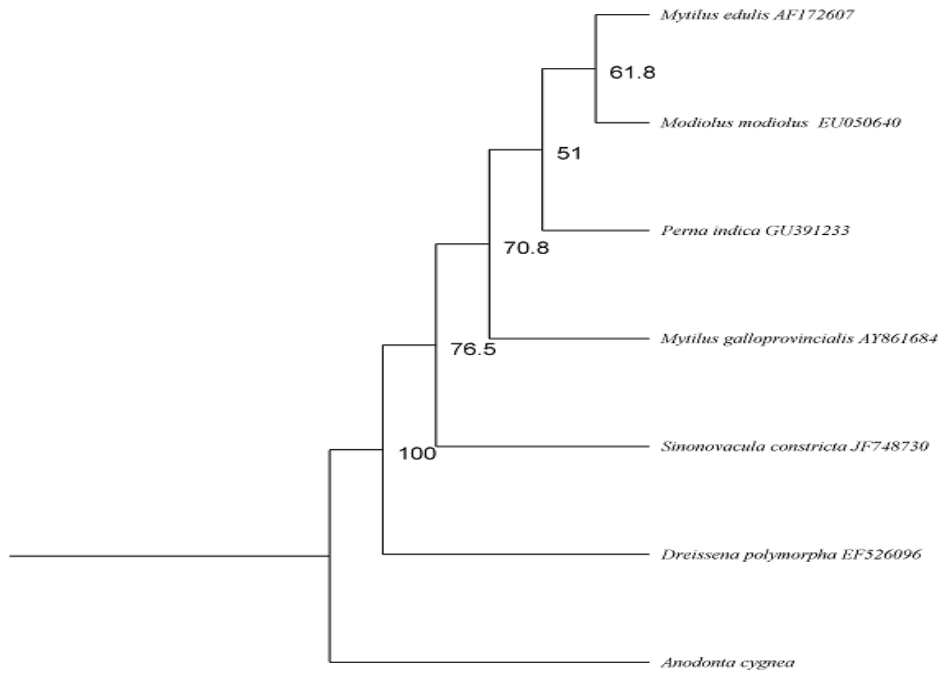
شدت جذب در نسبت ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر در نمونه‌های RNA استخراج شده از بافت‌های پا و آبشش در دامنه ۲/۱-۱/۹ به دست آمد. در مجموع، میزان جذب در طول موج‌های مورد بررسی، حاکی از قابلیت مناسب RNA استخراجی در تیمارهای مورد نظر بود. همچنین الکتروفورز ژل آگارز نشان داد که RNA به دست آمده از بافت‌های مختلف از کیفیت مطلوبی برخوردار بود (شکل ۲).



شکل ۱: توزیع اندازه‌های نانوذرات اکسید مس (II) در آکواریوم‌های آب حاوی دوکفه‌ای‌ها



شکل ۲: تصویر ژل به دست آمده از الکتروفورز آگارز ۱ درصد برای گونه *Anodonta cygnea*



شکل ۴: درخت فیلوژنی ترسیم شده برای گونه *Anodonta cygnea* روابط فیلوژنی برای ژن HSP70 پس از هم‌ترازی چندگانه به روش حداکثر درست‌نمایی با ۱۰۰۰ بار خودراه‌اندازی ترسیم شده است.

جدول ۱: اطلاعات مربوط به مقایسه توالی ژن HSP70 در گونه‌های مختلف

هم‌ردیفی	مقایسه طول ژن (نوکلئوتید)	درصد GC در گونه مقایسه شده (%)	حداکثر شباهت با گونه مقایسه شده (%)
<i>Anodonta cygnea/Dressina polymorpha</i>	۵۴۰/۹۴۳	۵۵/۶	۶۵/۷۳
<i>Anodonta cygnea/Modiolus modiolus</i>	۵۴۰/۵۰۱	۴۲/۷	۶۶/۲۵
<i>Anodonta cygnea/Mytilus edulis</i>	۵۴۰/۵۷۰	۴۰	۲۶/۴۷
<i>Anodonta cygnea/Mytilus galloprovincialis</i>	۵۴۰/۲۳۹۶	۳۸/۹	۶۶/۸۵
<i>Anodonta cygnea/Perna indica</i>	۵۴۰/۹۲۰	۴۲/۷	۷۰/۱

چندانی بین غلظت‌های مختلف مورد بررسی مشاهده نشد. این در حالی بود که در روز هشتم، بالاترین سطح بیان در تیمار ۲/۵ppm مشاهده شد که البته از این نظر اختلاف موجود بین تیمارهای مواجهه یافته با غلظت‌های مختلف نانوذرات معنی‌دار نبود ($P > 0/05$). همچنین طی روز هشتم، سطح بیان ژن HSP70 در تیمار شاهد به طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر تیمارها بود ($P \leq 0/05$; شکل ۵).

بیان نسبی ژن HSP70 در بافت آبشش در

Anodonta cygnea

سطح بیان نسبی ژن HSP70 در بافت آبشش در شکل ۶ نشان داده شده است. در تمامی تیمارهای مورد بررسی، مواجهه با CuO-NPs منجر به افزایش بیان ژن HSP70 در مقایسه با تیمار شاهد شد که تفاوت مشاهده شده از این نظر تنها در روز هشتم مواجهه معنی‌دار بود ($P \leq 0/05$). در ارزیابی تغییرات وابسته به زمان، روند مشابهی در بین تیمارهای مورد بررسی مشاهده شد به نحوی که سطح بیان ژن مورد نظر با گذشت زمان و رسیدن به روز هشتم مواجهه افزایش و پس از آن در روز دوازدهم مجدداً کاهش یافت ($P \leq 0/05$). در بررسی تغییرات وابسته به

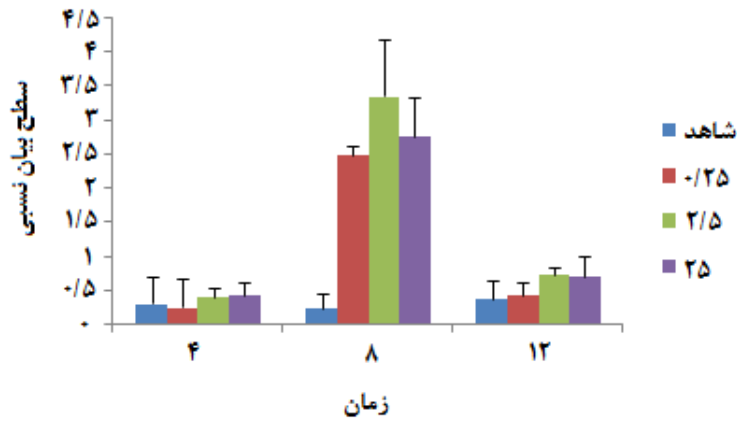
بیان نسبی ژن HSP70 در بافت پا در

Anodonta cygnea

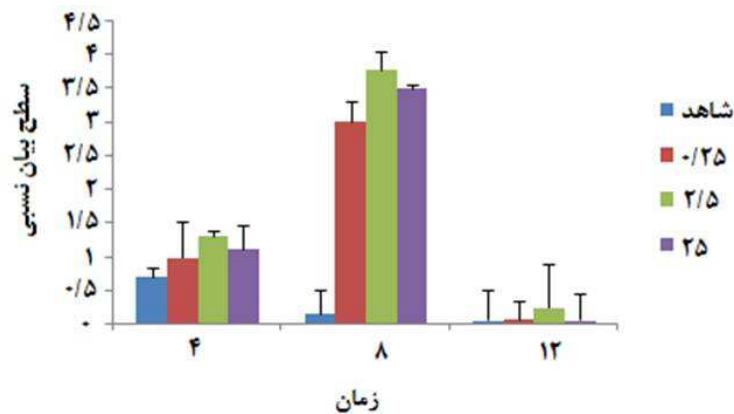
بیان نسبی ژن HSP70 در بافت‌های پا در دوکفه‌ای *A. cygnea* تحت غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس (II) در روزهای ۴، ۸ و ۱۲ مواجهه ارزیابی شد. با توجه به شکل ۵، مواجهه با غلظت‌های مختلف CuO-NPs، منجر به القای بیان ژن HSP70 در بافت پا شد. در روز هشتم مواجهه، افزایش قابل توجهی از سطح بیان ژن مورد نظر در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد ($P \leq 0/05$). در بررسی پروفایل وابسته به زمان، بیان نسبی ژن مورد نظر در پایین‌ترین غلظت مورد بررسی (۲/۵ppm)، از روز چهارم تا روز هشتم مواجهه افزایش و پس از آن مجدداً در روز دوازدهم کاهش یافت ($P \leq 0/05$) که البته به میزان مشاهده در روز چهارم نرسید ($P > 0/05$). تغییرات میزان بیان نسبی ژن HSP70 در غلظت ۲/۵ppm نیز به‌گونه‌ای بود که پس از افزایش در روز هشتم مواجهه، در روز دوازدهم مجدداً کاهش یافت ($P \leq 0/05$). تیمار ۲۵ppm نیز روند مشابه با سایر تیمارها نشان داد (شکل ۵).

در بررسی پروفایل وابسته به غلظت، طی روزهای چهارم و دوازدهم مواجهه، تفاوت

غلظت نیز، میزان بیان ژن طی روزهای چهارم و هشتم مواجهه، در تیمار ۰/۲۵ppm پایین‌تر از سایر تیمارها بود. این در حالی بود که بالاترین میزان بیان در تیمار ۲/۵ppm مشاهده شد ($P > 0.05$). همچنین در روز هشتم مواجهه، سطح بیان نسبی HSP70 در تیمار شاهد به طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر تیمارها بود. تیمارها در حالی که بین تیمارهای مواجهه شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات تفاوت چندانی وجود نداشت ($P > 0.05$).



شکل ۵: تغییرات بیان نسبی ژن HSP70 در بافت پا در دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* طی مواجهه با غلظت‌های متفاوت نانوذرات اکسید مس (II) در روزهای مختلف (میانگین \pm انحراف معیار)

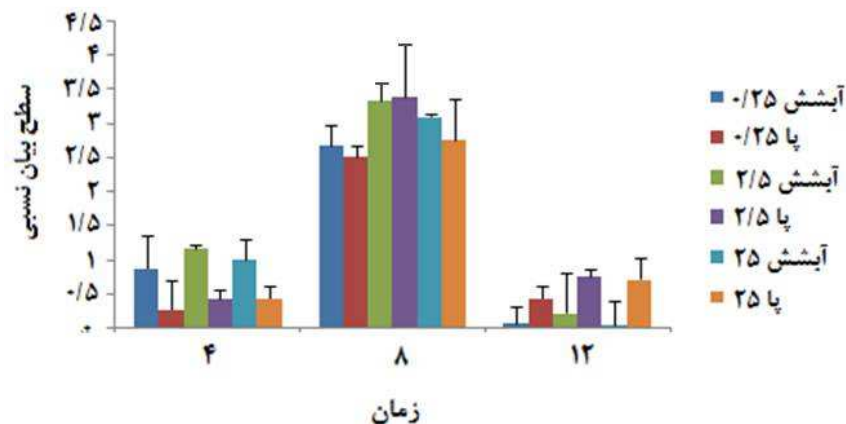


شکل ۶: تغییرات بیان نسبی ژن HSP70 در بافت آبشش در دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* طی مواجهه با غلظت‌های متفاوت نانوذرات اکسید مس (II) در روزهای مختلف (میانگین \pm انحراف معیار)

مقایسه بیان نسبی ژن HSP70 در بافت‌های مختلف

اندازه‌گیری سطح بیان پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) به عنوان یک ابزار کارآمد در بررسی‌های مربوط به سم‌شناسی محیطی مطرح است. این پروتئین‌ها در شرایط معمول نیز بیان می‌شوند، اما میزان بیان ژن آن‌ها در شرایط مواجهه با استرس‌های محیطی افزایش می‌یابد (Tedeschi et al., 2015). در مطالعه حاضر یک قطعه ۵۴۰ نوکلئوتیدی کد کننده HSP70 در دوکفه‌ای آب شیرین *A. cygnea* کلون شد. ژن HSP70 این گونه دارای ۵۷/۴ درصد نوکلئوتیدهای GC بوده که در مقایسه با سایر گونه‌های دوکفه‌ای مورد بررسی، مقدار بیشتری GC نشان داد.

مقایسه سطح بیان نسبی ژن HSP70 در بین بافت‌های مورد بررسی در شکل ۷ نشان داده شده است. با توجه به شکل، میزان بیان ژن مورد نظر در روز چهارم مواجهه در بافت آبشش در تمامی غلظت‌های مورد بررسی بالاتر از بافت پا بود. این در حالی بود که در روز هشتم تفاوت چندانی بین بافت‌های مورد بررسی مشاهده نشد ($P > 0.05$). در روز دوازدهم مواجهه نیز سطح بیان ژن HSP70 در بافت آبشش در تمامی غلظت‌ها کمی پایین‌تر از بافت پا بود که اختلاف مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).



شکل ۷: مقایسه بیان نسبی ژن HSP70 در بافت‌های پا و آبشش در دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* طی مواجهه با غلظت‌های متفاوت نانوذرات اکسید مس (II) در روزهای مختلف (میانگین \pm انحراف معیار)

بر اساس مقادیر مربوط به حداکثر شباهت، بیش از ۶۵ درصد شباهت بین *A. cygnea* با گونه‌های *Dreissena polymorpha*، *Modiolus Mytilus galloprovin* و *Sinonovacula constricta modiolus* (بالاترین شباهت حداکثری) مشاهده شد که در این میان بالاترین شباهت حداکثری مربوط به گونه *P. indica* بود. همچنین *A. cygnea* پایین‌ترین میزان شباهت حداکثری را با گونه *Mytilus edulis* نشان داد. نتایج حاصل از درخت فیلوژنی نشان داد که گونه *A. cygnea* در کلادی جداگانه نسبت به سایر گونه‌های مورد بررسی قرار دارد. بررسی‌ها نشان داده است که نانوذرات مس تمایل بالایی به رسوب دارند (Bondarenko et al., 2013; Conway et al., 2015). بنابراین کفزیان در سیستم‌های آبی ممکن است تا حد زیادی در معرض این نانوذرات قرار گیرند (Griffitt et al., 2009). احتمالاً دوکفه‌ای‌ها با رفتار تغذیه‌ای خاص خود می‌توانند تا حد زیادی تحت تاثیر این مواد قرار گیرند چرا که این موجودات توانایی پالایش بیش از یک لیتر آب در هر ساعت را داشته، از این روی، پتانسیل استفاده از میزان قابل توجهی از نانوذرات وارد شده به محیط آبی را دارند

(Hanna et al., 2014). در مطالعه حاضر، قرار گرفتن دوکفه‌ای *A. cygnea* در معرض غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس (II) منجر به القای بیان mRNA پروتئین شوک حرارتی شد. تاکنون مطالعه‌ای درباره اثر نانوذرات مس بر بیان HSP70 این گونه دوکفه‌ای صورت نگرفته است. در بررسی‌های صورت گرفته روی گونه‌های *Crassostrea gigas* (Zapata et al., 2009) و *Argopecten purpuratus* (David et al., 2012) مشخص شده است که مواجهه با یون مس به ترتیب به مدت ۷۲ ساعت و ۸ روز باعث افزایش قابل توجه mRNA HSP70 در بافت آبشش شد. بررسی‌ها نشان داده است که پاسخ پروتئین‌های استرس در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف مواجهه با آلودگی‌ها می‌تواند متفاوت باشد (Kohler et al., 2001; Lewis et al., 1999). در این راستا، Luo و همکاران (۲۰۱۴) افزایش بیان نسبی mRNA پروتئین‌های شوک حرارتی در اویستر *Crassostrea hongkongensis* طی روزهای اولیه و سپس کاهش آن با گذشت زمان را در مواجهه با عوامل استرس‌زا گزارش کردند. همچنین در مطالعه دیگری میزان بیان ژن پروتئین‌های شوک حرارتی در بافت آبشش صدف *Dreissena polymorpha* تحت شرایط

مواجهه با مس به طور معنی‌داری پس از ۲۴ ساعت افزایش یافت که پس از گذشت ۷ روز از زمان مواجهه، سطح بیان ژن مورد نظر به میزان مشاهده شده در تیمار شاهد نزدیک شد (Navarro et al., 2011). پژوهشگران مربوطه نوسانات بیان ژن را با گذشت زمان به عنوان یک مکانیسم دفاعی اولیه در ممانعت از دنا توره شدن پروتئین‌ها عنوان کردند. در مطالعه‌ای دیگر روی خورشید ماهی *Lepomis macrochirus* نیز افزایش سطح HSP70 در دو هفته اول پس از مواجهه با رسوبات آلوده و سپس کاهش چشمگیر آن پس از ۱۶ هفته مشاهده شد (Theodorakis et al., 1992). در پژوهش حاضر، میزان بیان نسبی ژن HSP70 در غالب موارد طی نخستین روز مورد بررسی تا حدی افزایش نشان داد، هر چند تفاوت مشاهده شده در مقایسه با تیمار شاهد معنی‌دار نبود. در این راستا، سطح بیان پایین‌تر در نخستین روز مورد بررسی در مقایسه با روز هشتم مواجهه را می‌توان به اثرات متقابل کورتیزول و HSP نسبت داد. مشخص شده است که افزایش سطح کورتیزول تحت شرایط استرس‌زا می‌تواند دارای اثرات مستقیم روی پاسخ‌های استرس سلولی باشد (Boone and Vijayan, 2002) از جمله این تاثیرات می‌توان به اثرات متقابل کورتیزول و HSPs (Sathiyaa and Vijayan, 2001) اشاره کرد که باعث تعدیل برخی واکنش‌های ایمنی می‌شود (Whitesell and Cook, 1996). تعدیل بیان ژن HSP70 در نخستین روزهای مواجهه با شرایط استرس‌زا ناشی از افزایش سطح کورتیزول در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (Celi et al., 2012; Safari et al., 2014). در مطالعه حاضر، سطح بیان ژن HSP70 در بافت‌های مورد بررسی طی روز هشتم مواجهه با نانوذرات اکسید مس (II) افزایش قابل توجهی در مقایسه با شاهد نشان داد. افزایش مشاهده شده در میزان mRNA پروتئین‌های شوک حرارتی، احتمالاً به دلیل عملکرد این پروتئین‌ها از طریق اتصال موقت به بخش‌های آبگریز برای ممانعت از تا خوردگی اشتباه پروتئین‌ها و تجمع آن‌ها است. با گذشت زمان مواجهه تا روز دوازدهم، سطح بیان نسبی ژن HSP70 رو به کاهش رفت. کاهش سطح بیان ژن HSP70 تحت مواجهه با شرایط استرس‌زا با گذشت زمان در مطالعات قبلی بر سایر گونه‌ها نیز گزارش شده است (Singer et al., 2005; Safari et al., 2014). در پژوهش حاضر، دلیل احتمالی کاهش مشاهده شده در سطح بیان ژن مربوطه در روز دوازدهم را

نسبت داد. همچنین در روز دوازدهم مواجهه، میزان بیان ژن در بافت آبشش کمی پایین‌تر از بافت پا بود ($P > 0.05$). این امر نیز می‌تواند ناشی از این موضوع باشد که با افزایش مدت زمان مواجهه به دلیل حساسیت بالاتر بافت آبشش به حضور آلاینده‌ها، برخی فرآیندهای سلولی همچون بیوسنتز پروتئین‌ها دچار آسیب بیشتری می‌شود (Rao et al., 2003). بنابراین کاهش سطح بیان ژن در بافت آبشش نسبت به بافت پا با گذشت زمان مواجهه محسوس‌تر است. افزایش میزان بیان متفاوت HSP70 در بافت‌های مختلف در مطالعات پیشین نیز گزارش شده بود (Venkatesan et al., 2014). در مقایسه بین غلظت‌های مورد بررسی، پایین‌ترین و بالاترین میزان سطح بیان ژن HSP70 به ترتیب در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۲/۵ppm مشاهده شد. این در حالی بود که با افزایش غلظت نانوذرات اکسید مس (II) تا ۲۵ppm بیان ژن مورد نظر در غالب موارد اندکی کاهش نشان داد ($P > 0.05$). Zapata و همکاران (۲۰۰۹) حداکثر بیان ژن HSP70 در صدف *Crassostrea gigas* تحت شرایط مواجهه با مس را در غلظت ۲/۵ میکروگرم بر لیتر مشاهده کردند در حالی که میزان mRNA در غلظت‌های بالاتر (۵ و ۱۰ میکروگرم بر لیتر)

می‌توان به آسیب‌های وارد شده به بافت‌های مورد بررسی با گذشت زمان و خاموش شدن این ژن دانست. در واقع، عوامل استرس‌زا می‌توانند از طریق القای آسیب‌های سلولی باعث محدود شدن ساخت HSP70 با گذشت زمان شوند (Chen et al., 2012). به هر حال، تاثیرگذاری عوامل استرس‌زا روی تغییرات سطح بیان ژن HSP70 با گذشت زمان می‌تواند بسته به نوع عامل و آستانه تحمل گونه، متفاوت باشد (Singer et al., 2005).

مقایسه بافت‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر حاکی از آن بود که اگرچه بیان ژن HSP70 در هر دو بافت پا و آبشش روند افزایشی و کاهشی مشابهی را با گذشت زمان نشان داد اما تفاوت‌هایی از این نظر بین دو بافت وجود داشت. به نحوی که در روزهای چهارم و هشتم مواجهه در غالب موارد سطح بیان نسبی ژن در بافت آبشش بالاتر از بافت پا بود. اگرچه تفاوت مشاهده شده در بین بافت‌های مورد بررسی از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). اما تغییرات محسوس‌تر سطح بیان ژن در بافت آبشش در مقایسه با بافت پا را می‌توان به حساسیت بالاتر این بافت به دلیل قرارگیری مستقیم در معرض آب و آلاینده‌های موجود در آب و همچنین فراوانی هموسیت‌ها

پیامدهای زیست‌محیطی ناشی از رهاسازی این مواد در طبیعت وجود ندارد. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که مواجهه با نانوذرات اکسید مس (II) باعث القای بیان ژن *HSP70* در دوکفه‌ای *Anodonta cygnea* می‌شود. همچنین سطح بیان این ژن در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس (II) نوساناتی نشان داد که احتمالاً ناشی از پتانسیل تطابق و فرآیندهای جبران کننده در شرایط مواجهه با استرس ناشی از آلودگی در جاندار است.

در سطح پایین‌تری قرار داشت. به هر حال، کاهش ظرفیت متابولیک موجود در اثر سمیت ایجاد شده می‌تواند نقش اساسی در این امر داشته باشد. بررسی‌ها نشان داده است که نانوذرات فلزی توانایی القای استرس اکسیداتیو را از طریق تولید مهارکننده‌های رادیکال اکسیژن داشته، موجودات نیز تحت شرایط استرس بالای اکسیداتیو توانایی دستیابی به سطوح مناسبی از عملکرد متابولیک را ندارند (Cheng et al., 2007).

با وجود کاربرد گسترده نانومواد در صنایع مختلف، متأسفانه آگاهی چندانی درباره

منابع

- گزارش نهایی پروژه، مرکز تحقیقات شیلاتی استان گیلان، ۴۲ص.
- Bebiano M.J., Gonzalez-Rey M., Gomes T., Mattos J.J. Flores-Nunes F. and Bainy A.C.D. 2015.** Is gene transcription in mussel gills altered after exposure to Ag nanoparticles? *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22): 17425–17433.
- Bierkens J.G.E.A. 2000.** Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology*, 153: 61–72.
- Bondarenko O., Juganson K., Ivask A., Kasemets K., Mortimer M. and Kahru A. 2013.** Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review. *Archives of Toxicology*, 87(7): 1181–1200.
- Boone A.M. and Vijayan M.M. 2002.** Glucocorticoid mediated attenuation of the HSP70 response in trout hepatocytes involves the proteasome. *American Journal of Physiology*, 283: R680–R687.
- Canesi L., Ciacci C., Fabbri R., Marcomini A., Pojana G. and Gallo G. 2012.** Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research*, 76: 16–21.
- Celi M., Vazzana M., Sanfratello M.A. and Parrinello N. 2012.** Elevated cortisol modulates Hsp70 and Hsp90 gene expression and protein in sea bass head kidney and isolated leukocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 175(3): 424–431.
- Chen X., Zhu Y.H., Cheng X.Y., Zhang Z.W. and Xu S.W. 2012.** The protection of selenium against cadmium-induced cytotoxicity via the heat shock protein pathway in chicken splenic lymphocytes. *Molecules*, 17: 14565–14572.
- Cheng P., Liu X., Zhang G. and He J. 2007.** Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Fish and Shellfish Immunology*, 22: 77–87.
- Chojnacki J.C., Rozinska B., Rudkiewics J. and Smola M. 2011.** Biometrics of the swan mussel *Anodonta cygnea*. *Polish Journal of Environmental Studies*, 20(1): 225–230.
- Conway J.R., Adeleye A.S., Gardea-Torresdey J. and Keller A.A. 2015.** Aggregation, dissolution, and transformation of copper nanoparticles in natural waters. *Environmental Science and*

- Technology, 49(5): 2749–2756.
- Daughton C.G. 2004.** Non-regulated water contaminants: Emerging research. *Environmental Impact Asses Review*, 24: 711–732.
- David C., Metzger Pratt P. and Roberts S.B. 2012.** Characterizing the effects of heavy metal and *Vibrio* exposure on Hsp70 expression in *Crassostrea gigas* gill tissue source. *Journal of Shellfish Research*, 31(3): 627–630.
- Durnev A.D. 2008.** Toxicology of nanoparticles. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 145(1): 72–74.
- Dutton J.M. and Hofmann G.E. 2009.** Biogeographic variation in *Mytilus galloprovincialis* heat shock gene expression across the eastern Pacific range. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 376: 37–42.
- Fabbri E., Valbonesi P. and Franzellitti S. 2008.** HSP expression in bivalves. *Invertebrate Survival Journal*, 5: 135–161.
- Franzellitti S. and Fabbri E. 2005.** Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336: 1157–1163.
- Gomes T., Araujo O., Pereira R., Almeida A.C., Cravo A. and Bebianno M.J. 2013.** Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 84: 51–59.
- Gomes T., Pinheiro J.P., Cancio I., Pereira C.G., Cardoso C. and Bebianno M.J. 2011.** Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science and Technology*, 45(21): 9356–9362.
- Griffitt R.J., Hyndman K., Denslow N.D. and Barber D.S. 2009.** Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicology Sciences*, 107: 404–415.
- Hamdoun A.M., Cheney D.P. and Cherr G.N. 2003.** Physiology and biomechanics-phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *Biological Bulletin*, 205(2): 160–174.
- Hanna S.K., Miller R.J. and Lenihan H.S. 2014.** Accumulation and toxicity of copper oxide engineered nanoparticles in a marine mussel. *Nanomaterials*, 4: 535–547.
- Iwama G.K., Thomas P.T., Forsyth R.B. and Vijayan M.M. 1998.** Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8: 35–56.
- Kasana R.C., Panwar N.R., Kaul R.K. and Kumar P. 2016.** Copper

- nanoparticles in agriculture: Biological synthesis and antimicrobial activity. *Nanoscience in Food and Agriculture*, 3(23): 129–143.
- Kohler H.R., Knodler C. and Zanger M. 1999.** Divergent kinetics of HSP70 induction in *Onniscus asellus* (Isopoda) in response to four environmentally relevant organic chemicals (B[a]P, PCB52, HCH, PCP): Suitability and limits of a biomarker. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36: 179–185.
- Lakhotia S.C. and Prasanth K.V. 2002.** Tissue- and development-specific induction and turnover of hsp70 transcripts from loci 87A and 87C after heat shock and during recovery in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 205: 345–358.
- Lewis S., Donkin M.E. and Depledge M.H. 2001.** Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquatic Toxicology*, 51 (3): 277–291.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402–408.
- Lopes-Lima M. 2014.** *Anodonta anatine*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014. e. T155667A21400363. Retrieved October 23, 2013, from <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T155667A21400363.en>.
- Luo L., Ke C., Guo X., Shi B. and Huang M. 2014.** Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. *Fish and Shellfish Immunology*, 38(2): 318–329.
- Moore M.N. 2006.** Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 32: 967–976.
- Navarro A., Faria M., Barata C. and Pina B. 2011.** Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environmental Pollution*, 159: 100–107.
- Place S.P., O'Donnell M.J. and Hofmann G.E. 2008.** Gene expression in the intertidal mussel *Mytilus californianus*: Physiological response to environmental factors on a biogeographic scale. *Marine Ecology Progress Series*, 356: 1–14.
- Qadermarzi A., Hedayati A.A., Hossaini A., Moezi F. and Mosavi Sabet H. 2017.** Effects of exposure to copper oxide nanoparticles on histopathological and ultrastructural lesions of gills and

- mantle organs in freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Journal of Cell and Tissue*, 7(2): 81–88.
- Rao J.V., Rani C.H., Kavitha P., Rao R.N. and Madhavendra S.S. 2003.** Toxicocity of chlorpyrifos to the fish *Oreochromis mossambicus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70: 985–992.
- Safari R., Shabani A., Ramezanpour S., Imanpour M.R. and Rezvani S. 2014.** Alternations of heat shock proteins (hsp70) gene expression in liver and gill of Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1987) exposed to cadmium chloride. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(4): 979–997.
- Sathiyaa R. and Vijayan M.M. 2001.** Autoregulation of glucocorticoid receptor by cortisol in rainbow trout hepatocytes. *Cell Physiology*, 284: C1508–C1515.
- Singer C.H., Zimmermann S. and Sures B. 2005.** Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to palatinium group metals (palatinium, palladium and rhodium): Comparison with lead and cadmium exposure. Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel. *Aquatic Toxicology*, 75: 65–75.
- Tedeschi J.N., Kennington W.J., Berry O., Whithing S., Meekan M. and Mitchell N.J. 2015.** Increased expression of HSP70 and HSP90 mRNA as biomarkers of thermal stress in logger head turtle embryos (*Caretta caretta*). *Journal of Thermal Biology*, 74: 42–50.
- Theodorakis C.W., D'Surney S.J., Bickman J.W., Lyne T.B., Bradley B.P., Hawkins W.E., Farkas W.L., Mc-Carthy J.F. and Shugart L.R. 1992.** Sequential expression of biomarkers in bluegill sunfish exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology*, 1: 45–73.
- Umer A., Naveed S. and Ramzan N. 2012.** Selection of a suitable method for the synthesis of copper nanoparticles. *NANO: Brief Reports and Reviews*, 7(5): 1–18.
- Venkatesan C., Sahul Hameed A.S., Sundarraj N., Rajkumar T. and Balasubramanian G. 2014.** Analysis of immune genes and heat shock protein genes under exposure to white spot syndrome virus (MSSV) and herbal immune stimulant in *Ltopenaeus vannamei*. *Journal of Bacteriology and Parasitology*, 5(205): 216–227.
- Whitesell L. and Cook P. 1996.** Stable and specific binding of heat shock protein 90 by geldanamycin disrupts glucocorticoid receptor function in intact cells. *Molecular Endocrinology*, 10: 705–712.
- Zapata M., Tanguy A., David E.,**

Moraga D. and Riquelme C.
2009. Transcriptomic response of
Argopecten purpuratus post-larvae
to copper exposure under
experimental conditions. *Gene*,
442: 37–46.



Induction of HSP70 gene expression in freshwater bivalve, *Anodonta cygnea*, caused by exposing to CuO-NPs

Hadiseh Kashiri^{1*}, Ali Shabani², Kaveh Khosraviani³, Amir Ghadermarzi⁴

Received: February 2017

Accepted: May 2017

Abstract

Anodonta cygnea is considered as a suitable species in evaluating the pollution of aquatic ecosystems because of the low resistance to changes in environmental conditions. Nowadays, due to the wide application of nanomaterials in different industries, the negative effect of these materials on aquatic life is of great concern. In the present study, the effect of copper oxide nanoparticles (II) (CuO-NPs) on HSP70 gene expression was evaluated in *A. cygnea*. For this purpose, the mussels were exposed to the concentrations of 0 (control), 0.25, 2.5 and 25ppm of CuO-NPs during 12 days. To analyze the changes in HSP70 gene expression, the sequence of this gene was determined in this species. In this regard, a fragment of 540 nucleotide coding HSP70 was cloned. The nucleotide sequence of HSP70 in *A. cygnea* contained 19.8, 30.7, 26.7 and 22.9 percent of A, C, G and T, respectively. The results indicated that exposing to CuO-NPs induced HSP70 gene expression in both tissues of foot and gill. Hereof, there was no significant difference ($P > 0.05$) in gene expression level of HSP70 among foot and gill tissues. Also, the gene expression level in the studied tissues increased with increasing exposure time up to 8 days while it showed decrease over the time up to 12th day ($P \leq 0.05$). In conclusion, the HSP70 gene in *A. cygnea* showed higher level of GC nucleotides in comparison to the other studied species and the expression level of this gene increases under exposing to CuO-NPs so that this increase is dependent on the concentration and time.

Key words: *Anodonta cygnea*, Pollution, Heat Shock Protein, Copper Oxide Nanoparticles.

1- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2- Associate Professor of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran.

3- Research Assistant of Central Laboratory of Genetic and Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Tehran University, Tehran, Iran.

4- Ph.D. Student in Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran.

*Corresponding Author: hadiskashiri@gmail.com