فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال دوم، شماره ۶، تابستان ۱۳۹۲، صفحه ۳۱- ۴۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۲۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۵/۱۵

افزایش بازدهی روش طبیعی استفاده از محیط اسپیزیزن برای انتقال پلاسمید به درون باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* با استفاده از یک پپتید کاتیونیک تراوا کننده غشا باکتریایی

حسین آقاملایی: دانشجوی دکتری تخصصی زیست فناوری پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران، aghamolaei22@gmail.com **
محمد هیئت: دانشجوی دکتری تخصصی زیست شناسی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران، mohamad.heiat@gmail.com **
محمد افتخاری شیرکوهی: دانشجوی دکتری تخصصی زیست فناوری پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران، jmhm63@gmail.com **
مهرداد موسی زاده مقدم: دانشجوی دکتری تخصصی مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران، mm.genetics@gmail.com * **

چکیده

مقدمه: تعدادی از گونه‌های باکتریایی قادرند تا مولکول DNA را از محیط اطرافشان دریافت نمایند؛ میزان این دریافت به شرایطی مانند بزرگی پلاسمید و نوع میزبان بستگی دارد. در مورد باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* نیز این امکان البته با میزان انتقال بسیار پایینی وجود دارد. در حال حاضر روش مرسوم برای انتقال پلاسمید خارجی به درون باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* استفاده از روش طبیعی در یک محیط کشت حداقل (اسپیزیزن) است. در این روش نیز میزان انتقال مطلوب و در خور توجه نیست. هدف از این مطالعه، بررسی تکنیکی نوین بر پایه پپتید کاتیونیک CM11 به عنوان یک پپتید تراوا کننده غشاء، برای افزایش مؤثر نرخ ترانسفورماسیون DNA به باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* است.

مواد و روش‌ها: در این روش، از پپتید CM11 به عنوان عاملی برای بهینه‌سازی انتقال pWB980 به باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* استفاده شد. برای این منظور، فرآیند مستعدسازی *باسیلوس سوبتیلیس* با دو روش مجزا و در حضور غلظت‌های مختلف پپتید انجام شد. بدین ترتیب که در روش نخست، باکتری به مدت ۱۴ ساعت در حضور غلظت‌های مختلف پپتید تیمار شد و سپس در معرض پلاسمید قرار گرفت. در روش دوم، غلظت‌های مختلف پپتیدی همراه با پلاسمید به شکل همزمان به باکتری عرضه شد. پس از غربال‌گری باکتری‌های دریافت کننده پلاسیمد بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین تعداد کل باکتری‌های ترانسفورم شده به ازای هر میکروگرم DNA پلاسمیدی محاسبه و با کنترل مقایسه شد.

نتایج: انتقال پلاسمید pWB980 به باکتری در بهترین حالت معادل ۶/۵ برابر بیشتر از شرایط استاندارد (کنترل) گزارش شد که از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی داری بود (P value <0.001).

بحث و نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که پپتید CM11 به عنوان یک پپتید تراوا کننده غشاء سلولی می‌تواند ترانسفورماسیون DNA خارجی به باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* را به طور در خور توجهی بهینه نموده و تا حدود زیادی مشکل نرخ پائین انتقال طبیعی را برطرف نماید.

واژه‌های کلیدی: ترانسفورماسیون، پپتید CM11، پلاسمید pWB980، *باسیلوس سوبتیلیس*

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات
** مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، تهران، ایران

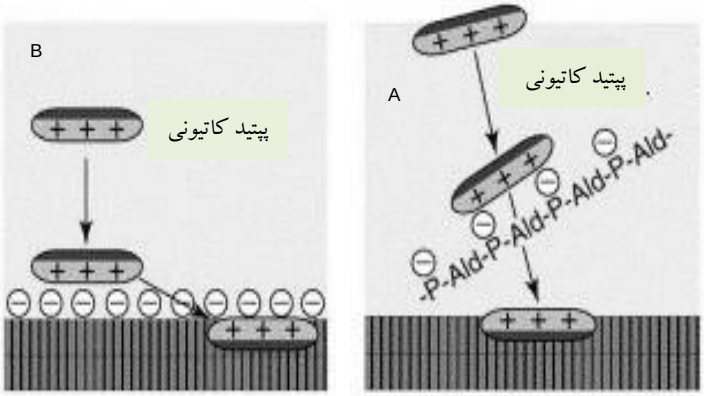
مقدمه

باسیلوس سوبتیلیس[1] باکتری استوانه‌ای شکل گرم مثبتی است که بیشتر در خاک یافت می شود. این باکتری با داشتن یک سیستم ترشحی فعال و کارامد، قادر است پروتئین‌های متنوعی را به محیط پیرامونی خود ترشح نماید. استفاده از این ویژگی در تولید پروتئین‌های نوترکیب باعث تسهیل مراحل تولید این پروتئین‌ها می‌شود (۱). از دیگر مزایای این میکرو ارگانیسم که آن را به عنوان یک میزبان مناسب در تکثیر و بیان ژن‌های هترولوگ معرفی می کند توان رشد سریع، سهولت دستکاری ژنتیکی در ژنوم باکتری، غیر بیماری‌زا بودن، ژنوم مشخص و تعیین ترادف شده و ظرفیت بالا در ترشح پروتئین است (۲). با همه این مزایا استفاده از این باکتری به عنوان میزبان دارای معایبی نیز است. تولید پروتئینازهای داخل و خارج سلولی مثل WPRA که باعث تجزیه پروتئین‌های ترشحی می‌شود از مشکلات بزرگ همسانه سازی و بیان در این باکتری است که این مشکل با ساخت سویه‌هایی مثل WB600 و WB700 که ژن‌های پروتئاز آن‌ها غیر فعال شده و قادرند چپرون‌هایی مثل PRSA را در حد وسیعی تولید کنند حل شده است (۳، ۴ و ۵). از دیگر معایب این باکتری به عنوان میزبان که کار با آن را برای محققان دشوار می‌نماید نرخ بسیار پایین انتقال DNA خارجی به درون سلول باکتری یا در اصطلاح ترانسفورماسیون است. علت این محدودیت وجود دیواره ضخیم پپتیدوگلیکان در اطراف غشاء سلولی *باسیلوس سوبتیلیس* است که مانند یک سد به شدت راه نفوذ ماکرومولکول‌های خارجی به درون سلول باکتری را کاهش می‌دهد.

با توجه به این که فرآیند کلونینگ و انتقال DNA پلاسمیدی از مهم‌ترین فرآیندهای کاربردی در بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک است که طی آن ژن هدف در قالب یک ناقل پلاسمیدی وارد باکتری میزبان می‌شود، بهینه‌سازی آن باعث دستیابی به نتایج اولیه و ثانویه بهتر در طی تراریخت نمودن باکتری هدف خواهد شد که این موضوع در مورد باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* که دارای مزیت‌های بسیاری در حوزه انتقال ژن‌های نوترکیب و بیان آن‌هاست و از طرفی توانایی جذب پایین DNA خارجی را دارد، از اهمیت بسزایی برخوردار است.

در حال حاضر روش‌های متعددی برای انتقال DNA خارجی به درون باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* وجود دارد که مقرون به صرفه و پر کاربردترین آن‌ها انتقال DNA به درون سلول صلاحیت دار شده با روش طبیعی است. هرچند این روش بسیار ساده و در دسترس است، اما انتقال DNA خارجی توسط آن با بهره وری بسیار پایینی انجام می گیرد. اساس این روش استفاده از یک محیط کشت ترکیبی حداقلی (اسپیزیزن)[2] برای رشد و تکثیر باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* است به نحوی که در این محیط سلول‌های باکتریایی به علت نبود برخی از مواد اولیه مورد نیاز برای رشد کامل، توانایی ساخت پپتیدوگلیکان دیواره سلولی خود را به شکل کامل ندارند. بنابراین، سلول رشد یافته به شکل پروتوپلاست است. در این شرایط با توجه به نبود دیواره سلولی کامل در اطراف سلول باکتری، DNA خارجی بیشتری در مجاورت غشاء سلول قرار می گیرد و جذب DNA از محیط پیرامونی افزایش می‌یابد (۶). بنابراین، به نظر می‌رسد اگر بتوان بدون تهدید حیات باکتری ابتدا بر سد ضخیم پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری غلبه نمود و در ادامه تراوایی غشاء سلولی را نیز افزایش داد می‌توان راندمان انتقال DNA خارجی به درون باکتری را به میزان در خور توجهی بهبود بخشید. تاکنون تحقیقات زیادی در مورد پپتیدهای کاتیونیک تراوا کننده غشاء[3] عنوان ابزاری برای انتقال و رهاسازی داروها و دیگر

ترکیبات زیستی در سطح سلول‌های هدف انجام شده است. این پپتیدها به طور میانگین از ۲۰ تا ۵۰ اسید آمینه تشکیل شده اند و به علت دارا بودن تعداد در خور توجهی اسید آمینه‌های لیزین و آرژینین در ساختار خود دارای بار الکتریکی مثبت هستند. همچنین، این پپتیدها در کنار داشتن بار مثبت به علت داشتن ساختارهای آمفی پاتیک قادرند بدون نیاز به گیرنده غشایی در عرض غشاء نفوذ کرده و با ایجاد ساختارهای حفره مانند[۴] غشاء سلول را نسبت به ترکیبات محیط پیرامونی خود بویژه ماکرومولکول‌هایی مانند پروتئین و الیگونوکلئوتیدها نفوذپذیر نمایند. (۷). این دسته از پپتیدها می‌توانند در باکتری‌های گرم مثبت مانند *باسیلوس سوبتیلیس* از طریق میانکنش با تیکوئیک اسید موجود در دیواره سلولی باکتری که دارای بار منفی است به غشاء سلول نفوذ کرده و با ایجاد ناپایداری در ساختار آن موجب نفوذپذیر شدن این غشاء نسبت به ترکیبات پیرامونی سلول باکتریایی شوند (۸ و ۹). (شکل ۱)



شکل ۱- نحوه میانکنش پپتیدهای کاتیونیک با ساختارهای آنیونیک موجود در دیواره سلولی (A) و ساختار غشایی (B) باکتری‌های گرم مثبت

سکروپین[۵] و میلیتین[۶] پپتیدهایی هستند که توانایی در خور توجهی برای ایجاد تغییرات بر روی ساختار غشاء باکتری‌ها دارند و به ترتیب جزو پپتیدهای سیستم ایمنی در نوعی پروانه[۷] و زنبور عسل هستند. پپتیدهای سکروپین از ۳۷ تا ۳۹ اسید آمینه تشکیل شده اند که دارای یک انتهای N به شدت آمفی پاتیک با ساختار آلفا هلیکس هستند که توسط یک قسمت ارتجاعی به انتهای C آبگریز متصل شده است. همچنین، پپتید میلیتین نیز از ۲۶ اسید آمینه تشکیل شده است که بر خلاف سکروپین یک انتهای C به شدت آمفی پاتیک با ساختار آلفا هلیکس دارد که به انتهای N آبگریز متصل شده است (۱۰ و ۱۱).

با توجه به نقش و پتانسیل پپتیدهای کاتیونیک در افزایش تراوایی غشاء سلول‌های باکتریایی، در این مطالعه، نحوه اثر پپتید CM11 که هیبریدی مشتق شده از پپتیدهای سکروپین و میلیتین است بر میزان انتقال پلاسمید DNA خارجی به درون سلول‌های *باسیلوس سوبتیلیس* بررسی شد. این پپتید (CM11) با توالی $WKLFKKILKVL\text{-}NH_2$ تشکیل یافته از نواحی Cecropin A (1-7 residues) -Mellitin (5-8 residues) است که با تعداد اسیدآمینه کمتر دارای عملکردی مشابه با پپتیدهای سکروپین و ملیتین است (۱۲ و ۱۳). بر این اساس از پپتید CM11 به عنوان یک پپتید تراواکننده غشاء باکتریایی به منظور بررسی و ایجاد تغییر در راندمان انتقال پلاسمید pWB980 به درون باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* استفاده شد.

مواد و روش‌ها

سنتز پپتید

پپتید هیبرید CM11 بر پایه کربوکسیماید انتهای C متصل شده به رزین اختصاصی[۸] در فاز جامد و با استفاده از روش استاندارد سنتز شد (آزمایشگاه سنتز دارو، گروه زیست شناسی دانشگاه امام حسین (ع)). پپتید سنتز شده توسط HPLC فاز معکوس بر روی ستون C18 با استفاده از یک شیب غلظتی از استونیتریل ۱۰ تا ۶۰ درصد در آب با ۰/۱ درصد تری فلورواستیک اسید با خلوص بالای ۹۰ درصد خالص‌سازی شد. در انتها برای تأیید صحت و همسانی پپتید از آزمون طیف سنجی جرمی[۹] استفاده شد (۱۴).

سویه باکتریایی و پلاسمید

سویه *باسیلوس سوبتیلیس* WB600[۱۰] (دریافت شده ازگروه تحقیقاتی دکتر یخچالی، پژوهشگاه ملی ژنتیک) به عنوان میزبان استاندارد برای بررسی انتقال پلاسمید استفاده شد. همچنین، از پلاسمید pWB980[۱۱] (3.8 kbp) حاوی نشانگر انتخابی آنتی بیوتیکی کانامایسین به عنوان DNA خارجی استفاده شد. این ناقل مشتقی از پلاسمیدpUB110، دارای پروموتر P43 و همچنین یک توالی دنباله مشتق از پلاسمید pUC18 است که برای کلونینگ در باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* زیاد استفاده می‌شود.

تهیه محلول پپتیدی

پپتید لیوفیلیز شده در بافر فسفات سالین با اسیدیته ۷/۲ با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیترحل و از آن استوک تهیه شد.

تهیه محیط کشت ترکیبی اسپیزیزن

به منظور تهیه و آماده‌سازی محیط کشت حداقلی اسپیزیزن (۶) از ترکیبات زیر استفاده می‌شود(گرم بر لیتر):

K_2HPO_4 : ۶ ؛ $K_2HPO_4.\ 3H_2O$: ۲۵؛ Na_2SO_4 : ۲ ؛ $FeCl_3$: ۰/۰۱۳۵ ؛ $MnSO_4$: ۰/۰۰۰۳۴؛ $MgSO_4.\ 7H_2O$: ۰/۳ ؛ $Na_3C_6H_5O_7$: ۱؛ Glucose : ۴؛ Glutamate : ۲ و L-Tryptophane : ۰/۰۴؛

مستعدسازی سلول‌های باکتریایی *باسیلوس سوبتیلیس* WB600

برای بررسی تاثیر پپتید هیبریدی CM11 بر توانایی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* WB600 در جذب و دریافت DNA خارجی از دو روش مختلف برای تهیه سلول‌های مستعد این باکتری استفاده شد. در روش اول سوش مورد نظر باکتری از طریق انکوباسیون ۱۸ ساعته بر روی محیط کشت آگار لوریا برتانی احیا شد. سپس ۵ ویال استریل شامل: یک میلی‌لیتر محیط کشت حداقلی اسپیزیزن تهیه و به هر ویال غلظت مختلفی از پپتید که شامل: ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، اضافه شد. سپس به هر ویال یک کلونی از باکتری احیا شده تلقیح و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با تکانش ۱۵۰ دور در دقیقه گرمادهی شد تا در OD_{600} دانسیته سلولی برابر ۰/۵ شود. در روش دوم، آماده‌سازی اولیه باکتری‌ها در محیط کشت اسپیزیزن و بدون استفاده از پپتید انجام شد و پپتید در مرحله نهایی ترانسفورماسیون به همراه پلاسمید به محیط حاوی باکتری اضافه شد.

ترانسفورماسیون B.subtillis WB600

در روش اول برای انتقال پلاسمید به باکتری، ابتدا ۱۰میکرولیتر از پلاسمید pWB98 با غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر ماکرولیتر به هر یک از ۵ ویال حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت اسپیزیزن حاوی باکتری و مقادیر متفاوت از پپتید (۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه شد و ۱۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در روش دوم انتقال پلاسمید به شکل هم‌زمان با غلظت‌های مورد نظر پپتید تلقیح شد. بنابراین، به هر یک از

ویال‌های حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت اسپیزیزن و باکتری مستعد شده، ۱۰ ماکرولیتر از پلاسمید pWB980 با غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر به همراه غلظت‌های مورد نظر پپتید (۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه شد و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۴ ساعت گرمادهی شد. به منظور مقایسه میان راندمان انتقال پلاسمید در روش طبیعی و روش استفاده از پپتید از نمونه‌های کنترل استفاده شد. برای این منظور در نمونه کنترل همه مراحل از قبیل فرآیند مستعدسازی سلول و ترانسفورماسیون در عدم حضور پپتید انجام شد. آزمایش‌ها برای بررسی قابلیت تکرار پذیری و مطالعه آماری سه بار تکرار شد.

غربال‌گری و محاسبه تعداد باکتری‌های دریافت کننده پلاسمید

پس از اتمام فرآیند ترانسفورماسیون برای مشخص نمودن تعداد باکتری‌های ترانسفورم شده، ویال‌ها به مدت ۵ دقیقه و با نیروی ۲۰۰۰ در مقیاس نیروی گرانش[۱۲] سانتریفیوژ شدند. رسوب‌های حاصل در ۲۰ میکرولیتر محیط کشت تازه LB مایع به شکل سوسپانسیون درآمدند و بر روی محیط آگار LB دارای ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین کشت داده شدند. برای بررسی عملکرد و نحوه تاثیرگذاری غلظت‌های متفاوت پپتید بر فرآیند ترانسفورماسیون، شاخص‌هایی طبق جدول ۱ بررسی و محاسبه و در ادامه تغییر و کارآمدی انتقال پلاسمید با استفاده از نتایج و فرمول زیر ارزیابی شد. بررسی‌ها سه بار تکرار شده و مقدار میانگین باکتری‌های شمارش شده در هر روش به عنوان شاخصه اصلی انتقال پلاسمید در نظر گرفته شد.

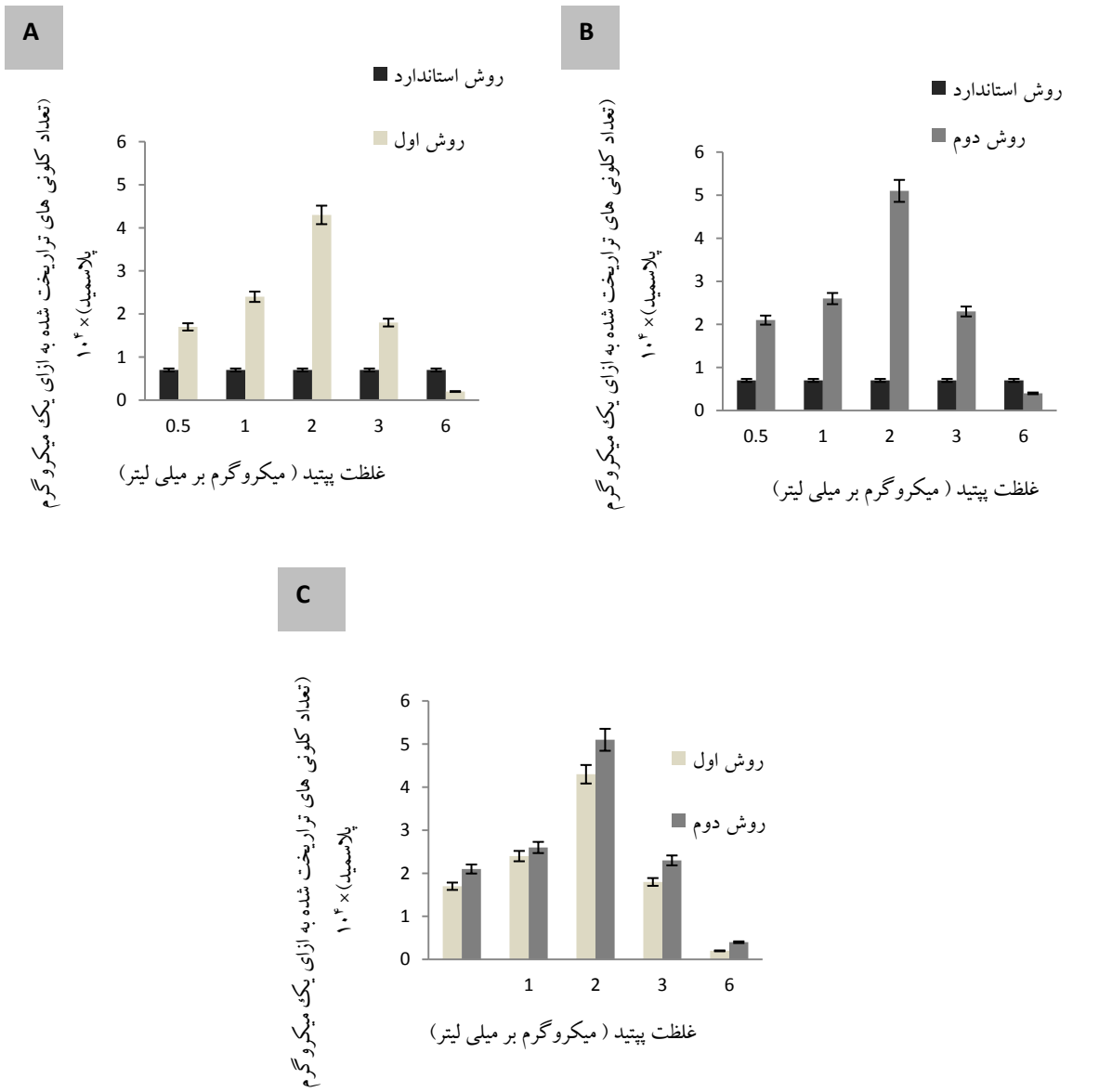
$$\text{ransformation efficiency} = \frac{\text{Total of clony (B.Subtilis)on LB agar}}{\text{Amount of DNA concentration } (\frac{\text{ug}}{\text{ml}})}$$

محاسبه آماری

آمارهای توصیفی با استفاده از شاخصه پراکندگی انحراف معیار و شاخصه مرکزی میانگین تعداد کلونی‌های *باسیلوس سوبتیلیس* رشد یافته بر روی محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین گزارش شدند. یک آزمون آماری تی-تست[۱۳] مستقل برای مقایسه دو نوع روش و مقایسه داده‌های کمی میان دو گروه در نظر گرفته شد. مدل آنالیز واریانس[۱۴] برای تحلیل آماری شاخصه‌های دیگر مانند تاثیر دوزهای پپتیدی استفاده شد و احتمال کمتر از ۰/۰۵ ($P\ value < 0.05$) برای معنادار بودن از نظر آماری در نظر گرفته شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ تحلیل شدند.

نتایج

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، کارایی فرآیند انتقال پلاسمید به باکتری در روش اول و با استفاده از غلظت پپتیدی ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به میزان ۴/۲ X ۱۰^{۴} CFU/µg DNA است که این میزان ۵ برابر نمونه کنترل (۰/۷ X ۱۰^{۴} CFU/µg DNA) است. همچنین، نتایج نشان دادند که کارآمدترین حالت انتقال پلاسمید به باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* هنگامی رخ می‌دهد که سلول‌های باکتری با استفاده از روش دوم و با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتید تیمار شوند. به طوری که با استفاده از این روش تعداد CFU/µg DNA ۵/۱ X ۱۰^{۴} از باکتری‌ها پلاسمید pWB980 را دریافت نمودند که این میزان در حدود ۷ برابر گروه کنترل است. طبق نتایج به دست آمده میزان ترانسفورماسیون در حضور غلظت‌های ۰/۵ و ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر از پپتید در هر دو روش تقریبا مشابه بود. محاسبات آماری نشان دادند که تعداد باکتری‌های دریافت کننده پلاسمید در هر دو روش دارای اختلاف آماری معناداری با گروه کنترل هستند ($P\ value < 0.001$). همچنین، یافته‌ها مشخص نمودند که با افزایش غلظت پپتید در هر دو روش، کاهش معناداری در تعداد باکتری‌های دریافت کننده پلاسمید روی می‌دهد ($P\ value < 0.001$).



شکل ۲- نمودار مقایسه میزان نرخ انتقال پلاسمید *pWB980* به باکتری *باسیلوس سوبتیلیس WB600* در حضور پپتید *CM11*، در روش اول سلول‌های باکتریایی در تمامی مراحل رشد و آماده‌سازی در محیط اسپیزیزن و همچنین، مرحله انتقال پلاسمید توسط پپتید تیمار شدند اما در روش دوم فقط در مرحله انتقال پلاسمید این تیمار انجام شد.

A: مقایسه تغییر در میزان نرخ انتقال پلاسمید در روش آماده‌سازی نوع اول و روش استاندارد

B: مقایسه تغییر در میزان نرخ انتقال پلاسمید در روش آماده‌سازی نوع دوم و روش استاندارد

C: مقایسه تغییر در میزان نرخ انتقال پلاسمید در روش آماده‌سازی نوع اول و نوع دوم

بحث و نتیجه‌گیری

در مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی انتقال DNA خارجی به درون سلول‌های باکتریایی یکی از مهم‌ترین فرآیندهایی است که استفاده می‌شود. از آن‌جایی که این فرآیند یکی از کلیدی‌ترین مراحل تولید پروتئین نوترکیب است، بهینه‌سازی و بهبود راندمان آن مورد توجه بسیاری از محققان و شرکت‌های مرتبط با این حوزه است. در باکتری‌های گرم منفی از جمله روش‌هایی که به طور گسترده برای افزایش بازدهی این فرآیند استفاده می‌شود، روش شیمیایی کلسیم کلراید است. در این روش کلرید کلسیم به طور مستقیم در جذب DNA خارجی نقشی ندارد بلکه تنها با اتصال به DNA سبب تجمع بیشتر آن در سطح خارجی دیواره باکتری شده که در این حالت به علت قرارگیری DNA در سطح سلول هدف و افزایش غلظت آن در فضای پیرامونی آن، استعداد و توانایی سلول در جذب و انتقال DNA به درون سیتوپلاسم، افزایش در خور توجهی می‌یابد. همچنین، وجود کاتیون موجود در این ترکیب شیمیایی (Ca^{2+}) به عنوان یک عامل رقابتی برای پل‌های Mg^{2+} پایدارکننده موجود در LPS غشایی خارجی باکتری عمل کرده و باعث بروز ناپایداری در این ساختار می‌شود که نتیجه آن افزایش تراوایی این غشاء نسبت به ماکرو مولکول‌های پیرامونی سلول باکتری است. اما در مورد باکتری‌های گرم مثبت مانند *باسیلوس سوبتیلیس* که دارای یک دیواره سلولی تشکیل یافته از پپتیدوگلیکان و تیکوئیک اسید در اطراف خود است استفاده از روش شیمیایی کلرید کلسیم مؤثر و کارامد نیست، زیرا این دیواره بسیار ضخیم‌تر غشاء خارجی موجود در باکتری‌های گرم منفی بوده و همچنین، حتی با داشتن ساختارهایی با بار منفی مانند تیکوئیک اسید، کلرید کلسیم فاقد قابلیت لازم است که همانند LPS بتواند در آن باعث بروز ناپایداری و تراوایی شود.

همان‌طور که قبلا اشاره شد در حال حاضر برای انتقال DNA خارجی به درون باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* از روش طبیعی در درون محیط کشت حداقلی اسپیزیزن استفاده می‌شود. در این روش که در سال ۱۹۵۸ ارایه شد از محیط کشت حداقلی استفاده می‌شود که موجب ایجاد ساختار پروتوپلاست یا سلول‌هایی با دیواره ناقص در *باسیلوس سوبتیلیس* شده و به علت فقدان یا ناقص بودن این سد پپتیدوگلیکانی، در صورت وجود DNA خارجی میزان جذب آن توسط باکتری افزایش می‌یابد. البته در این شرایط تیکوئیک‌اسید موجود در غشاء سلولی باکتری نیز می‌تواند از طریق میانکنش با پپتید به عنوان یک عامل تشدید کننده فعالیت پپتید در سطح غشاء سلول عمل کند. تیکوئیک اسید در ساختار سلولی باکتری‌های گرم مثبت به دو صورت حضور دارد؛ یا به شکل متصل به غشاء سیتوپلاسمی است که لیپوتیکوئیک اسید نامیده می‌شود و یا متصل به مورین است که به عنوان تیکوئیک‌اسید دیواره سلولی شناخته می‌شود. در شرایط پروتوپلاست یا وجود دیواره ناقص در اطراف سلول باکتریایی وجود لیپوتیکوئیک اسید با بار الکتریکی منفی می‌تواند به عنوان یک هدف اولیه برای جذب، هدایت و تجمع پپتیدهای کاتیونیک مانند CM11 در سطح غشاء سلول عمل کند (۱۵). به نظر می‌رسد این تجمع اولیه به تسهیل میانکنش پپتید با فسفولیپیدهای غشایی و ایجاد حفره در آن منجر شود (شکل ۲).

بر این اساس در این مطالعه، ما از پپتید کاتیونیک CM11 به عنوان یک پپتید تراوا کننده غشاء سلولی استفاده نمودیم. پپتید CM11 به علت دارا بودن ساختار

آمفی پاتیک این توانایی را دارد که در غشاء سلول باکتریایی نفوذ کرده و با ایجاد حفره در این ساختار باعث نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی آن نسبت به مولکول‌های خارجی شود. با استناد به مطالعات انجام شده توسط دکتر یچیل شای[15] از آن‌جا که پپتید CM11 از ۱۱ اسیدآمینه تشکیل شده است، به علت کوتاهی توانایی این را ندارد که در غشاء به شکل کامل نفوذ کرده و در آن یک حفره کامل ایجاد نماید. بنابراین، پیشنهاد شده است که این پپتید بر اساس مکانیسمی به نام فرش[16] با غشاء میانکنش داده و باعث بروز اختلال در آن می‌شود. در این مکانیسم برهم‌کنش میان فسفولیپیدهای غشایی با بار منفی و پپتید کاتیونیک (بار مثبت) به فرش شدگی و پوشش کامل سطح غشاء سلولی با لایه ای از پپتید شده که در ادامه باعث ناپایداری غشاء منجر می‌شود (۱۶ و ۱۷).

طبق این مکانیسم در یک غلظت آستانه، پپتید به شکل موقت و ناپایدار سوراخ‌هایی در غشاء ایجاد می‌کند و در صورت ادامه افزایش غلظت، پپتید با پوشاندن سطح داخلی غشاء سلول باکتریایی باعث جداشدن نواحی از غشاء به شکل ساختارهای میسلی می‌شود که در نهایت به از هم پاشیدگی ساختار غشاء و مرگ سلول منجر خواهد شد (۱۸).

همچنین، باید توجه داشت که اتصال اولیه و در ادامه توانایی تشکیل حفره توسط پپتیدها فرآیندهایی مستقل اما پیوسته است که وابسته به غلظت پپتید می‌باشد. بر این اساس بروز و تشدید فعالیت ضد میکروبی این نوع از پپتیدها وابسته به غلظت و بر پایه یک منحنی سیگموئیدی است به نحوی که در زیر آستانه غلظت، پپتید فقط باعث تراوا شدن و ناپایداری غشاء شده اما به ساختار کلی سلول باکتریایی صدمه ای وارد نمی‌شود. در غلظت آستانه که می‌تواند همان حداقل غلظت مهاری[17] باشد تخریب ساختار غشاء افزایش یافته که در نهایت منجر به صدمه و مرگ سلول می‌شود (۱۸).

بنابراین، در غلظتی پایین‌تر از غلظت آستانه با وجود متصل شدن پپتید به غشاء باکتریایی، به علت عدم پوشش کافی، فعالیت ضد میکروبی آن کم است اما با نزدیک شدن غلظت پپتید به غلظت آستانه، فعالیت ضد میکروبی به سرعت به بیشینه خود می‌رسد که نتیجه آن مرگ باکتری است. در این مطالعه، اثر پپتید CM11 بر تغییر و افزایش نرخ انتقال پلاسمید در یک سریال غلظتی از ۰/۵ تا ۶ (نزدیک غلظت به MIC) میکروگرم در میلی‌لیتر بررسی شد. مطالعات ما نشان داد که میزان MIC پپتید برای سویه مورد نظر *باسیلوس سوبتیلیس* ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر است که در واقع همان غلظت آستانه پپتید است (۱۹).

همانطور که اشاره شد، به طور کلی ترانسفوراسیون در باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* ناکارآمد و در میزان پایینی انجام می‌شود، این یافته به وضوح در نمونه‌های کنترل این آزمایش مشهود بود. در صورتی‌که نتایج حاصل از نمونه‌های آزمایش، این موضوع را اثبات نمود که با استفاده از پپتید CM11 می‌توان بازدهی انتقال پلاسمید pWB980 را به درون باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* را به میزان معنی‌داری افزایش داد.

نتایج نشان داد که بالاترین نرخ ترانسفورماسیون باکتری در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر رخ می‌دهد (۶/۵ برابر نسبت به کنترل) که با افزایش غلظت پپتید و نزدیک شدن به غلظت MIC تعداد باکتری‌های ترانسفورم شده کاهش می‌یابد. همچنین، میزان نرخ انتقال پلاسمید به باکتری در غلظت‌های ۰/۵ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر تقریبا یکسان بود. تمامی این

یافته‌ها در هر دو روش ترانسفورماسیون قابل مشاهده بود؛ اما در روش دوم بازدهی انتقال مقدار بیشتری را نشان می‌داد. بر پایه مباحث اشاره شده در بالا می‌تواند نتیجه گرفت که در روش اول چون باکتری‌ها مدت زمان طولانی‌تری در معرض پپتید قرار گرفته اند، مرگ باکتری‌ها در طی فرآیند مستعدسازی به مراتب بیشتر خواهد بود و بنابراین، میزان نرخ ترانسفورماسیون در مقایسه با روش دوم کاهش می‌یابد. همچنین، باکتری‌هایی که در معرض غلظت‌های ۱، ۳ و ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتید تیمار شده اند در مقایسه با باکتری‌های تیمار شده توسط غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتید، نرخ ترانسفورماسیون پایین‌تری دارند که نشان دهنده یک رابطه معکوس میان میزان غلظت پپتید و نرخ انتقال پلاسمید است زیرا افزایش غلظت به نزدیک‌تر شدن به حد MIC منجر شده که در این غلظت مرگ سلولی اتفاق می‌افتد. در غلظت ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر که نزدیک به MIC است نرخ انتقال حتی پایین‌تر از نمونه‌های استانداری است که علت آن نزدیک شدن غلظت پپتید به حد آستانه است. همچنین، نتایج نشان است که در غلظت‌های ۰/۵ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتید اختلاف در خور توجهی در نرخ انتقال پلاسمید وجود ندارد. به نظر می‌رسد این عدم اختلاف در میزان نرخ ترانسفورماسیون ناشی از یک توازن و تعادل میان تشدید دریافت DNA و مرگ سلول‌های باکتریایی توسط پپتید است به طوری‌که در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نرخ دریافت DNA پایین‌تر از میزان دریافت آن در غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر است اما در مقابل نیز مرگ باکتری‌ها در مقیاس کمتری رخ می‌دهد.

این مطالعه نشان داد که پپتید CM11 به عنوان یک پپتید کاتیونی تراوا کننده غشاء سلولی می‌تواند موجب افزایش بازدهی انتقال پلاسمید به درون باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* شود. بنابراین، مطالعه فوق می‌تواند به عنوان مقدمه ای برای شناخت بیشتر این نوع پپتیدها به منظور کاربرد مؤثرتر آن‌ها برای افزایش بازدهی انتقال پلاسمید به درون سلول‌های باکتریایی باشد.

References

(1) Wong SL. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Curr Opin Biotechnol* 1995; (6): 517–22.

(2) Harwood CR, Wipat A. Functional analysis of the *B.subtilis* genome. *Methods microbial* 2002; (33): 336-67.

(3) Doi RH, Wong S, and Kawamura, F. potential use of *bacillus subtilis* for secretion and production of foreign protein. *Trend Biotechnol* 1984; (4): 232-5.

(4) Wu XC, Lee W, Tran L, and Wong SL. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *J Bacteriol* 1991; 173(16): 4952-8.

(5) Ye R, Yang P, Wong S. Construction of protease deficient *Bacillus subtilis* strains for expression studies: inactivation of seven extracellular proteases and the intracellular LonA protease. Proceedings of the International Symposium on Recent Advances in Bioindustry; The Korean Society for Applied Microbiology, Seoul, Korea. 1996; 160-9.

(6) Spizizen, J. Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus Subtilis* by Deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci* 1958; 44(10): 1072-8.

(7) Lundberg P, Langel U. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit* 2003; 16(5): 227-33.

(8) Friedrich CL, Moyles D, Beveridge T, and Hancock E. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(8): 2086-92.

(9) Torcato IM, Huang YH, Franquelim HG, Gaspar D, Craik DJ, and et al. Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2013 Mar; 1828(3):944-55.

(10) Moore AJ, Beazley WD, Bibby MC, and Devine DA. Antimicrobial activity of cecropins. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37(6): 1077-89.

(11) Raghuraman H, Chattopadhyay A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep* 2007; 27(4-5): 189-223.

(12) Cavallarin L, Andreu D, and Segundo B. Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol plant-microbe interact* 1998; 11(3): 218-27.

(13) Montesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS microbiol lett*. 2007; 270(1): 1-11.

(14) Badosa E. Ferre R, Planas M, Feliu L, Besalu E, and et al. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides* 2007; 28(12): 2276-85.

(15) Pesche A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiol* 2002; 10 (4):179- 86.

(16) Shai Y. Mode of Action of Membrane Active Antimicrobial Peptides. *Pep Sci* 2002; 66(4):236-48.

(17) Ferre R, Badosa E, Feliu L, Planas M, Montesinos E, Bardaji E. Inhibition of Plant-Pathogenic Bacteria by Short Synthetic Cecropin A-Melittin Hybrid Peptides. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(5): 3302-3308.

(18) Lee MT, Hung WC, Chen FY, Huang HW. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105(13): 5087-92.

(19) Moosazadeh MM, Abolhassani F, Babavalian H, Mirnejad R, Azizi BA, and Amani J. Comparison of in vitro antibacterial activities of two cationic peptides CM15 and CM11 against five pathogenic bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli*. Probiotics Antimicrob Proteins 2012; 4(7): 133-9.

---

[1]. Bacillus subtilis
[2]. Spizizen
[3]. Cell Permeable Peptides
[4]. Pore
[5]. Cecropin
[6]. Melittin
[7]. Hyalophora cecropia
[8]. p-methyl-benzhydrylamine
[9]. Electrospray ionization mass spectrometry
[10]. Amersham, England
[11]. Invitrogen, USA
[12]. g
[13]. t-Test
[14].ANOVA
[15]. Yechiel Shai
[16]. Carpet Model
[17]. Minimal Inhibitory Concentration

Increasing plasmid transformation efficiency of natural spizizen method in *Bacillus Subtilis* by a cell permeable peptide

Hossein Aghamollaei [**]
Ph.D student of Medicine Biotechnology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran, aghamolaei22@gmail.com
Mohammad Heiat [**]
Ph.D student of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran, mohamad.heiat@gmail.com
Mohammad Eftekhari [**]
Ph.D student of Medicine Biotechnology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran, jmhm63@gmail.com
Mehrdad Moosazadeh Moghaddam [*] [**]
Ph.D student of Tissue Engineering, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran, mm.genetics@gmail.com

Abstract

Introduction: Some of bacterial species are able to uptake DNA molecule from environment, the yield of this process depends on some conditions such as plasmid size and host type. In the case of *Bacillus subtilis*, DNA uptake has low efficacy. Using Spizizen minimal medium is common method in plasmid transformation into *B. subtilis*, but rate of this process is not suitable and noteworthy. The aim of this study was investigation of novel method for improvement of DNA transformation into *B. subtilis* based on CM11 cationic peptide as a membrane permeable agent.

Materials and methods: In this study, for optimization of pWB980 plasmid transformation into *B. subtilis*, the CM11 cationic peptide was used. For this purpose, *B. subtilis* competent cell preparation in the present of different concentration of peptide was implemented by two methods. In the first method, after treatment of bacteria with different amount of peptide for 14h, plasmid was added. In the second method, several concentration of peptide with plasmid was exposed to bacteria simultaneously. Bacteria that uptake DNA were screened on LB agar medium containing kanamycin. The total transformed bacteria per microgram of DNA was calculated and compared with the control.

Results: Plasmid transformation in best conditions was 6.5 folds higher than the control. This result was statistically significant (P value <0.001).

Discussion and conclusion: This study showed that CM11 cationic peptide as a membrane permeable agent was able to increase plasmid transformation rate into *B. subtilis*. This property was useful for resolution of low transformation efficacy.

Key words: Transformation, CM11 Peptide, pWB980, *Bacillus subtilis*

[*] Corresponding Author
[**] Applied Biotechnology Research Center, Tehran, Iran
Received: May 13, 2013/ **Accepted:** August 6, 2013