مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۳

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

طراحی روشی نوین بر پایه پپتید های تراوا کننده غشاء جهت افزایش بازدهی انتقال DNA خارجی به باکتری اشرشیاکولی

محمد هیئت[۱]، محمد افتخاری‌شیر کوهی[۲]، حسین آقاملایی[۳]، مهرداد موسی زاده مقدم[۴*]

۱دانشجوی دکتری تخصصی زیست شناسی ملکولی- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) – تهران - ایران
۲دانشجوی دکتری تخصصی زیست فناوری پزشکی- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) – تهران - ایران
۳دانشجوی دکتری تخصصی زیست فناوری پزشکی- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) – تهران – ایران
۴دانشجوی دکتری تخصصی مهندسی بافت - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) – تهران – ایران

چکیده:

سابقه و هدف: انتقال DNA خارجی با بازدهی بالا به داخل باکتری از مهمترین مراحل در زیست فناوری میکروبی می‌باشد. برای این منظور چند روش مرسوم است که در بین آن‌ها روش کلسیم کلراید سرد از جمله مهمترین و ارزان‌ترین روش‌ها جهت انتقال DNA به درون سلول‌های باکتریایی گرم منفی مانند *Escherichia coli* می‌باشد. به طور معمول بازدهی انتقال DNA در این روش 10^{7}- 10^{5} کلونی برای یک میکروگرم از DNA خارجی می‌باشد. با توجه به اهمیت فرایند انتقال DNA، تلاش‌های بسیاری به منظور بهینه‌سازی روش‌های مرسوم همچون کلرید کلسیم صورت گرفته است. در این مطالعه نشان دادیم با استفاده از یک پپتید کاتیونیک تراوا کننده غشاء (CM11) و بر پایه روش استاندارد کلرید کلسیم، می‌توان DNA خارجی را با بازدهی بالاتری به درون باکتری *E.coli* انتقال داد.

مواد و روش ها: سلول‌های باکتریایی توسط غلظت‌های متفاوت پپتید (۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) و به دو روش متفاوت و بر پایه مستعدسازی توسط کلرید کلسیم، تیمار شدند. سپس پلاسمیدهای pET-28a(+), pGEX4T-1 وpUC19 به عنوان مدل و به صورت جداگانه به درون باکتری مستعد شده منتقل گردیدند.

یافته ها: نتایج نشان داد که بالاترین بازدهی انتقال پلاسمید برای باکتری‌های مستعد شده در حضور غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر پپتید بدست می‌آید. در این غلظت افزایش انتقال برای پلاسمیدهای pET-28a(+), pGEX4T-1 وpUC19 به ترتیب ۴/۴، ۴/۷ و ۴ برابر نمونه کنترل بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که پپتید CM11 به عنوان یک پپتید تراوا کننده غشاء سلول می‌تواند باعث افزایش کارامدی انتقال DNA به درون باکتری *E. coli* با استفاده از مستعدسازی به روش شیمیایی کلرید کلسیم گردد.

کلمات کلیدی: ترانسفورماسیون، پپتید CM11، پلاسمید، اشرشیا کولی

مقدمه

از جمله فرایندهایی که به طور گسترده در آزمایشگاه‌های ژنتیک و بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می گیرد فرایند کلونینگ می باشد که در آن انتقال DNA نوترکیب به سلول هدف از اهمیت بسزایی نیز برخوردار است زیرا بازدهی بالای کلونینگ به میزان انتقال DNA نوترکیب انتقال یافته به سلول میزبان وابسته است. بدین مفهوم که هرچه انتقال DNA نوترکیب به سلول هدف با احتمال بالاتری صورت گیرد دستیابی به نتایج بهتر و دریافت محصول نوترکیب نیز بیشتر خواهد بود. در حال حاضر در بیشتر آزمایشگاه های تحقیقاتی حوزه بیوتکنولوژی استفاده از سلول های باکتریایی به عنوان پذیرنده‌ی DNA نوترکیب بسیار متداول می باشد چرا که رشد و تکثیر در باکتری‌ها به سرعت انجام می‌گیرد و کار با آنها در مقایسه با دیگر سلول ها نیز بسیار ساده و ارزان است. اکثر گونه‌های باکتریایی توانایی

آدرس نویسنده مسئول : مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهران ایران
Email :mm.genetics@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۰۱/۱۸
تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۲

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.12.7]

جذب مولکول DNA از محیط اطرافشان را دارند اما قدرت جذب DNA خارجی برای همه باکتری‌ها یکسان نیست، به عنوان مثال باکتری اشرشیاکولی که در مقایسه با دیگر باکتری ها دارای بیشترین کاربرد در بیوتکنولوژی است در شرایط عادی قدرت جذب کمی دارد و در شرایط معمول میزان احتمال تراریخت شدن آن مطلوب کلونینگ نمی باشد، از این رو برای بهینه سازی میزان تراریختی باید باکتری را تحت تیمارهای خاصی قرار داد تا قدرت جذبش افزایش یابد (۸، ۲۶). تا سال ۱۹۷۰ تلاش های اولیه برای وارد کردن DNA به سلول باکتریایی نا موفق بود تا اینکه در این سال مَندل و هیگا دریافتند که اثر دادن کلرید کلسیم سرد بر باکتری باعث ورود DNA فاژ به آن می گردد (۱۳) و به دنبال آن در سال ۱۹۷۲ کوهن نشان داد که این ماده شیمیایی برای ورود DNA پلاسمیدی نیز مؤثر است (۴). از آن زمان تاکنون نیز روش های گوناگونی جهت افزایش بازدهی انتقال DNA نوترکیب به سلول های باکتریایی ابداع و بهینه سازی گردیده است که می توان آن ها را به سه دسته شیمیایی مانند استفاده از کلرید کلسیم، الکتریکی مانند الکتروپوریشن و بیولوژیک که در آن از برخی ویروسها و باکتریوفاژها جهت انتقال DNA استفاده می شود، تقسیم نمود.

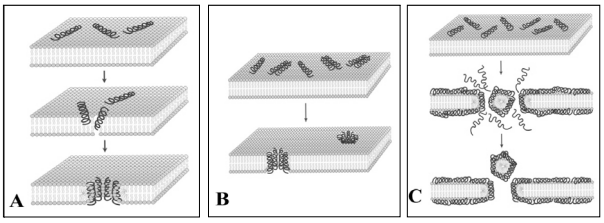
در این میان استفاده از کلسیم کلراید سرد یکی از کاربردی ترین و ارزان ترین روش‌های انتقال DNA نوترکیب به سلول های هدف می باشد که در حال حاضر در خیلی از آزمایشگاه های تحقیقاتی مورد استفاده قرار می گیرد. در این روش کلرید کلسیم به طور مستقیم در جذب DNA نقش ندارد بلکه تنها سبب اتصال DNA به سطح خارجی دیواره باکتری می‌گردد 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 قابل توجهی می یابد. در ادامه به منظور بهبود انتقال این DNA تجمع یافته به درون سیتوپلاسم باکتری آن را در معرض شوک حرارتی قرار می‌دهند، این شوک سبب باز شدن منافذ موجود در غشاء سلول باکتری شده و در نتیجه نفوذپذیری دیواره‌ی باکتری به DNA خارجی افزایش قابل توجهی می یابد (۱۹).

در انتقال DNA خارجی به درون سلول باکتریایی با استفاده از این روش دو نکته قابل توجه است: ابتدا افزایش تجمع DNA در سطح خارجی سلول باکتری با استفاده از کلرید کلسیم و دوم افزودن تراوایی غشاء این سلول ها با استفاده از شوک حرارتی، لذا به نظر می رسد دستیابی به ترکیبی که بتوان توسط آن بازدهی هر یک از این مراحل را افزایش داد در بهینه سازی روش فوق موثر خواهند بود. همانطور که اشاره شد در شرایط عادی قدرت جذب DNA برای تمامی باکتری ها یکسان نمی باشد که علت آن به ماهیت متفاوت ساختارهای موجود در غشاء سلولی آن ها بر می گردد، به عنوان مثال در باکتری های گرم منفی مانند اشرشیاکولی ساختار لیپوپلی ساکاریدی تشکیل دهنده غشاء خارجی سلول یکی از مهمترین موانع ورود آزاد ترکیباتی مانند DNA به درون آن می باشد (۵). لیپوپلی ساکارید دارای ساختاری پلی آنیونیک است که توسط پل های دوگانه کاتیونی ایجاد شده توسط عناصری مانند Mg^{2+} در سطح سلول پایدار گردیده است. مطالعات نشان داده است که ترکیبات پلی کاتیونیک به علت دارا بودن بار مثبت این توانایی را دارند که با عناصر ایجادکننده این پل های کاتیونی رقابت نموده و با حذف این عناصر و پل های نگهدارنده موجود در سطح LPS باعث ناپایداری غشاء سلول و در نتیجه تراوا شدن آن گردند (۱۷، ۱۸). بر پایه عملکرد این ترکیبات کاتیونیک تحقیقات گسترده ای به منظور انتقال و رهاسازی داروها و دیگر ترکیبات بیولوژیک که به علت نوع ساختار ملکولی و نیز سد انتخابی غشاء سلولی، توانایی انتقال به داخل سلول هدف را ندارند صورت گرفته است. پپتیدهای تراواکننده سلول (Cell permeable peptides) از این جمله می باشند. این پپتیدها به طور متوسط از ۲۰ تا ۵۰ اسیدآمینه تشکیل یافته اند و به علت وجود تعداد زیادی از اسیدآمینه های لایزین و آرژنین در توالی خود دارای بار الکتریکی مثبت می باشند و با ساختار آمفی پاتیک و یا هیدروفوب خود این توانایی را دارند که بدون نیاز به رسپتور غشایی از عرض غشاء سلولی عبور نمایند و لذا این پپتیدها می توانند دامنه وسیعی از ملکول های فعال بیولوژیک مانند پروتئین ها، اولیگونوکلئوتیدها و نانوپارتیکل ها را به گستره ای از سلول ها و ارگانل های سلولی در شرایط طبیعی یا آزمایشگاهی منتقل نمایند (۱۰،۱۱،۱۲). در مورد سلول های باکتریایی، CPPs ها با توجه به بار مثبتی که دارند در گرم منفی ها با اتصال به گروه های آنیونی موجود در ساختار غشاء خارجی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.12.7]

مانند فسفولیپیدها و گروه های فسفات موجود در سطح لیپوپلی ساکارید و در باکتری های گرم مثبت با اتصال به تیکوئیک اسیدهای سطحی غشاء سلولی به این ساختار نفوذ کرده و با ناپایدار نمودن آن و ایجاد حفره یا Pore باعث نفوذپذیری غشاء سلول باکتری می گردند (۷، ۲۹). مطالعات نشان داده است که تاثیرگذاری پپتیدهای کاتیونیک و ایجاد تغییر در ساختار غشاء سلول باکتریایی بر اساس سه مدل مختلف ,Barrel-stave Carpet, Torodial صورت می گیرد (تصویر شماره ۱).



تصویر ۱ . سه مدل پیشنهادی چگونگی نحوه اثر پپتیدهای کاتیونیک و آمفی پاتیک را بر ساختار غشاء سلول باکتریها : : A : Barrel-stave ، B : Torodial ، C : Carpet

تغییر ساختار غشاء سلولی و ایجاد pore بر اساس هر یک از این مدل ها به میزان بار الکتریکی مثبت، اندازه، توزیع نواحی آبدوست و آبگریز و ترکیب اسیدآمینه های تشکیل دهنده پپتید بستگی دارد (۲، ۲۵). سکروپین ها و ملیتین از جمله پپتیدهای کاتیونیک می باشند که توانایی قابل توجهی در تاثیرگذاری بر ساختار غشاء باکتریایی دارند. پپتیدهای سکروپین از ۳۹- ۳۷ اسیدآمینه تشکیل یافته اند که در ساختار خود دارای یک انتهای N به شدت آمفی پاتیک با ساختار α-Helix بوده که از طریق یک بخش ارتجاعی به انتهای C هیدروفوب متصل گردیده است (۱۵). پپتید ملیتین نیز از ۲۶ اسیدآمینه تشکیل یافته است که بر خلاف پپتیدهای سکروپین دارای انتهای C به شدت آمفی پاتیک با ساختار α-Helix وانتهای N هیدروفوب می باشد (۲۰). بر اساس توانایی پپتیدهای کاتیونیک در افزایش نفوذپذیری غشاء سلول ها ، در این مطالعه ما تاثیر پپتید کوتاه CM11 را که هیبریدی از این دو پپتید سکروپین و میلیتین می باشد بر تغییرات نرخ انتقال پلاسمید DNA به درون سلول های باکتریایی مورد بررسی قرار دادیم. 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 می باشد (۳، ۱۴). برای این منظور فرایند انتقال پلاسمیدهای pUC19 pET-28a (+), pGEX4T-1 به باکتری *E. coli* مستعد شده در حضور غلظت های مختلف پپتید CM11 مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها :

سنتز پپتید

پپتید هیبرید CM11 بر اساس روش Fmoc در فاز ثابت و به صورت انتهای C کربوکسیماید متصل به رزین متیل بنزهیدریل آمین سنتز گردید. تخلیص پپتید سنتز شده با استفاده از HPLC فاز معکوس و ستون C18 با خلوص بالای ۹۵٪ انجام گرفت (۱).

سویه باکتری و پلاسمید

از باکتری *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, USA) به عنوان میزبان باکتریایی و از پلاسمیدهای pET28a(+)(5.4 kbp)، pGX4T-1(4.9 kbp) و pUC19(2.7 kbp) به عنوان پلاسمید های مدل در این مطالعه استفاده گردید (Amersham, England).

محلول سازی پپتید

محلول پپتید CM11 سنتز شده در بافر فسفات سالین با PH=7.2 و در غلظت 1mg/ml تهیه گردید.

تهیه سلول های مستعد باکتری ***E. coli***

به منظور بررسی تاثیر پپتید CM11 بر افزایش توانایی باکتری *E. coli* در دریافت DNA خارجی، مستعد سازی سلول باکتریایی بر مبنای روش استاندارد کلرید (۲۱) و تیمار توسط پپتید، به دو روش صورت گرفت. در روش اول ابتدا باکتری *E. coli* به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به صورت مجزا در حضور غلظت های (µg/ml) ۰/۵ و ۱، ۲، ۳، ۶ از پپتید CM11 تازه سازی گردید. سپس به ۵ لوله فالکون حاوی ml ۵ محیط کشت مایع LB (Merck) غلظت های (µg/ ml) ۰/۵، ۱، ۲، ۳، و۶ از پپتید اضافه گردید و به هر یک ۵۰ میکرولیتر از محیط حاوی باکتری *E. coli* تازه سازی شده در مرحله قبل تلقیح گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با تکانش ۱۵۰دور در دقیقه گرمادهی گردید تا جذب نوری

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.12.7]

محیط به ۰/۵ تا ۰/۸ رسید. سپس سلولها به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی g ۲۰۰۰ سانتریفوژ و جمع آوری شدند. رسوب‌های سلولی بدست آمده از محیط کشت حاوی غلظت‌های متفاوت پپتید، در تیوب های جداگانه با ml ۴ از کلسیم کلراید mM ۵۰ سرد همراه با غلظت های پپتیدی متناظر سوسپانسیون گردید و در یخ برای مدت ۱ ساعت نگهداری شد. پس از آن تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه با نیروی g ۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید و در نهایت رسوب سلولهای مستعد در کلسیم کلراید mM ۵۰ سرد همراه با غلظت های پپتیدی متناظر دوباره سوسپانسیون شدند. لازم به توضیح است به علت اینکه در مطالعات قبلی ما میزان MIC پپتید برای باکتری *Escherichia coli* غلظت µg/ml ۸ بدست آمد لذا در این مطالعه غلظت بیشینه پپتید مقدار µg/ ml ۶ انتخاب گردید. در روش دوم باکتری *E. coli* بدون حضور پپتید تازه سازی گردید. سپس به ۵ لوله فالکون مجزا حاوی ml ۵ محیط کشت مایع LB، ۵۰ میکرولیتر از محیط حاوی باکتری *E. coli* تازه سازی شده در مرحله قبل تلقیح گردید و در ۳۷ درجه سانتی گراد با تکانش ۱۵۰ دور در دقیقه گرمادهی گردید تا جذب نوری محیط به ۰/۵ تا ۰/۸رسید. سپس سلولها به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی g۲۰۰۰ سانتریفوژ و جمع آوری شدند. رسوب سلولی بدست آمده در ۵ تیوب جداگانه با ml ۴ از کلسیم کلراید mM ۵۰ سرد سوسپانسیون گردید و در یخ برای مدت ۱ ساعت نگهداری شد. پس از آن تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه با نیروی g۲۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند و رسوب سلولی بدست آمده در کلسیم کلراید mM ۵۰ سرد سوسپانسیون شد. سپس به تیوب‌ها غلظت های متفاوت (µg/ml) ۰/۵ ، ۱ ، ۲ ، ۳ ، ۶ از پپتید CM11 اضافه گردید. در نمونه کنترل همه مراحل فرآیند مستعدسازی سلول بدون حضور پپتید و به صورت استاندارد انجام گرفت. همچنین تمامی آزمایش ها جهت بررسی قابلیت تکرار پذیری و مطالعه آماری سه بار تکرار گردید.

ترانسفورماسیون پلاسمید به میزبان

به منظور انجام فرایند انتقال پلاسمید به داخل باکتری، به طور جداگانه و تحت شرایط استریل µl۱۰۰ از سلول های باکتریایی *E.coli* BL21 (DE3) pLysS که توسط دو روش مورد اشاره و در ۵ غلظت متفاوت پپتید مستعد شده بودند به ۱۰ تیوب با حجم ۱/۵ انتقال داده شدند (۵ ویال برای روش اول و ۵ ویال برای روش دوم مستعد سازی). سپس µl۱ از پلاسمید با غلظت ng/µl۱۰۰ به هر یک از تیوب ها اضافه شد و در ادامه روش معمول برای ترانسفورم باکتریهای گرم منفی انجام گردید. برای

$$\text{کارایی فرایند ترانسفورماسیون} = \frac{\text{تعداد کل کلنی های باکتریایی بر روی LB آگار}}{\text{غلظت DNA بر حسب (µg/ml)}}$$

غربالگری باکتری های دریافت کننده پلاسمید

بعد از ترانسفورماسیون، به منظور تعیین تعداد باکتریهای دریافت کننده پلاسمید، µl ۱ از سلولهای ترسیب شده، بر روی محیط کشت آگار LB دارای µg/ml۸۰ کانامایسین (برای pET-28) و µg/ml ۱۰۰ آمپی سیلین (برای پلاسمیدهای pUC19 و pGEX4T-1) کشت داده شد.

به منظور تعیین کارآمدی انتقال پلاسمید، آزمایشات با ثبت شاخصه های کمی طبق جدول ۱ انجام پذیرفت. سپس کارآمدی انتقال با استفاده از نتایج و فرمول زیر محاسبه شد. هر آزمایش سه بار تکرار گردید و مقدار میانگین باکتری های شمارش شده در هر روش به عنوان شاخصه اصلی انتقال پلاسمید محاسبه گردید.

محاسبه آماری

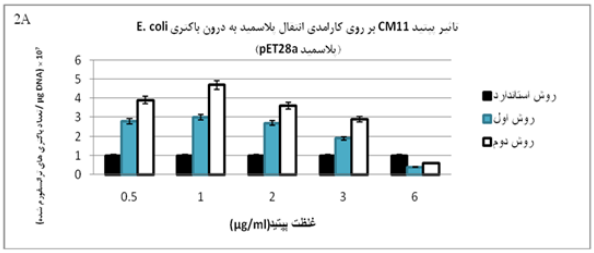
آمارهای توصیفی با استفاده از شاخصه مرکزی میانگین و شاخصه پراکندگی SD تعداد کلونی های باکتریایی گزارش شدند. یک t-test مستقل برای مقایسه امتیازهای در دو نوع روش و مقایسه داده های کمی میان دو گروه در نظر گرفته شد. مدل ANOVA برای آنالیز آماری پارامترهای همه گروه‌ها استفاده شد. احتمال کمتر از ۰/۰۵ (pValue < 0.05) برای معنادار بودن از نظر آماری در نظر گرفته شد. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز شدند.

یافته ها

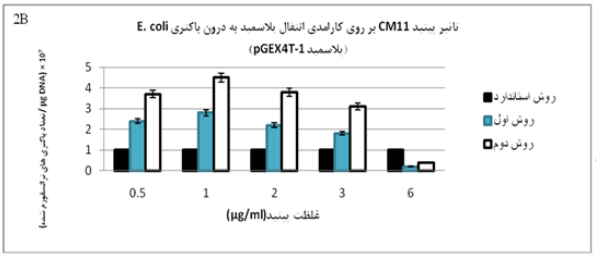
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.12.7]

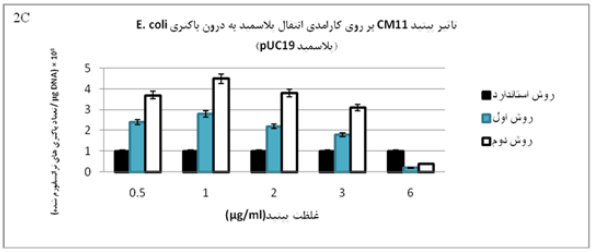
به منظور ارزیابی میزان تاثیرگذاری غلظت‌های متفاوت پپتید بر بازدهی و نرخ دریافت پلاسمید توسط باکتری *E. coli*، پس از ۲۴ ساعت تعداد کلنی های رشد یافته بر روی محیط کشت انتخابی آگار LB مورد شمارش قرار گرفتند و طبق شاخصه های موجود در جدول شماره ۱ (در انتهای مقاله) و فرمول اشاره شده در بخش مواد و روش ها کارایی انتقال پلاسمید (Transformation Efficiency) محاسبه شد و در ادامه با نتایج بدست آمده از گروه‌های کنترل (روش استاندارد کلسیم کلراید) مقایسه گردید. مطالعات نشان داد که نرخ انتقال پلاسمید pET28a(+)به باکتری*E. coli* مستعد شده در حضور غلظت ۱ µg/ml از پپتید در هر دو روش افزایش داشته است. این افزایش در روش اول و دوم به ترتیب حدود ۳ و ۵ برابر بیشتر از گروه کنترل بود ($p<0.001$) (تصویر A۲). همچنین نتایج بدست آمده در غلظت های دیگر پپتید نشان داد که افزایش غلظت پپتید CM11 بیش از ۱µg/ml موجب کاهش فرایند ترانسفورماسیون می گردد، به طوریکه در حضور غلظت µg/



برای این پلاسمید نیز نرخ انتقال به درون سلولهای مستعد شده در حضور غلظت ۱µg/m پپتید در روش اول و دوم به ترتیب حدود ۳ و ۵ برابر بیشتر از گروه کنترل بود ($p<0.001$)



بهترین و بیشترین نرخ انتقال پلاسمید pUC19 نیز برای سلولهای مستعد شده در حضور غلظت ۱µg/ml پپتید بدست آمد. در این غلظت نرخ ترانسفورماسیون به ترتیب ۳ و ۴ برابر برای روش اول و دوم در مقایسه با گروه کنترل بود (تصویر C۲).



ارتباط معکوس میان کاهش میزان نرخ ترانسفورماسیون سلول ها و افزایش غلظت پپتید نیز برای پلاسمید pUC19 مشاهده گردید. همچنین مقایسه نتایج بدست آمده در مورد ۳ نوع پلاسمید pET-28a (+), pGEX4T-1 و PUC19 در هر دو روش مورد بررسی نشان داد که تغییر در نرخ انتقال آن ها به درون سلول باکتری در غلظت های ۲ µg/ml و ۰/۵ µg/ml یکسان می باشد و تفاوت معنی داری را نشان نداد. با توجه به نتایج بدست آمده در روش اول و دوم مستعدسازی سلول های باکتری و مقایسه آن ها با یکدیگر مشخص گردید که کارایی روش دوم از روش اول بیشتر می باشد. در آزمایشگاه های بیوتکنولوژی میکروبی و مهندسی ژنتیک از جمله روشهایی که به طور گسترده جهت افزایش بازدهی انتقال DNA خارجی به درون سلول های باکتریایی میزبان مورد استفاده قرار می گیرند روش شیمیایی کلسیم کلراید و الکتروپوریشن می باشند. در هر دو روش آماده سازی سلولها و مستعد سازی آن ها جهت انتقال و دریافت DNA خارجی ضروری است. استفاده از الکتروپوریشن دارای محدودیت هایی است که از آنجمله می توان نیاز به آماده سازی مقادیر زیاد سلول و DNA و عدم توانایی بسیاری از آزمایشگاه ها در تهیه تجهیزات مرتبط با آن اشاره نمود. اما روش های شیمیایی مانند استفاده از کلرید کلسیم به خاطر هزینه های پایین و دسترسی آسان در بیشتر آزمایشگاه ها مورد توجه و کاربرد می باشد.در سالهای اخیر مطالعات بسیاری جهت بهبود روشهای مرسوم انتقال DNA یا ارایه روشهایی جدید صورت پذیرفته است. بر این اساس در سال ۲۰۰۱ یوشیدا و همکارانش یک روش انتقال جدید بر پایه نانوفیبر های معدنی ارایه دادند که در سال ۲۰۱۰ توسط ویلهارم توسعه پیدا کرد (۲۸، ۳۰). اما تن و همکاران نشان دادند که استفاده از این روش دارای محدودیت ها و مشکلاتی است (۲۴). طبق تحقیقات تن فقط تعداد کمی از سلول های ترانسفورم شده حتی در حضور

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.12.7]

ng ۱۰۰ از پلاسمید بدست می آید و تکرارپذیری نتایج نیز مداوم نیست. بر این اساس آنها ساختار نانو لوله های معدنی ارایه شده توسط یوشیدا را بر پایه نانو لوله های کربنی (CNTs) تغییر دادند که نتیجه آن افزایش کارایی ترانسفورماسیون به میزان بیشتر از ۱۵ هزار ترانسفورمنت در هر ۱۰۰ نانوگرم پلاسمید در مقایسه با ترانسفورماسیون با استفاده از کلسیم کلراید بود (۸۰۰۰ ترانسفورمنت در هر۱۰۰ نانوگرم پلاسمید) که افزایش دو برابری را نشان می دهد. اما اگرچه نتایج این روش قابل توجه می باشد اما در حال حاضر استفاده گسترده از نانو لوله ها به عنوان یک روش جدید با محدودیتهایی روبرو است و به نظر می رسد در آینده قابلیت استفاده به صورت تجاری را داشته باشند.همچنین Zhiming Tu و همکارانش در سال ۲۰۰۵ استفاده از سوش های متفاوت *E. coli* همراه با بهینه سازی برخی از فاکتورهای قابل در تغییر در روش شیمیایی کلسیم کلراید را به منظور افزایش نرخ انتقال پلاسمید مورد ارزیابی قرار دادند (۲۷). در مطالعه آن ها فاکتور هایی مانند OD_{600} محیط کشت، غلظت کلسیم کلراید و ترکیبات محیط کشت باکتریها برای سه سوش مختلف *E. coli* (DH5α, TG, XL1 blue) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که روش بهینه شده آنها می تواند بازدهی انتقال را در حدود ۱۰۳ برابر افزایش دهد، همچنین بهترین نتایج برای سوش *E. coli* XL1 blue بدست آمد. اما نکته ای که قابل توجه است استفاده گسترده از سوش *E. coli* DH5α در بسیاری از آزمایشگاهای تحقیقاتی است و این در حالی است که در این مطالعه بالاترین نرخ انتقال پلاسمید (برای پنج پلاسمید مدل) برای سوش *E. coli* XL1 blue و در حدود ۱۰۸ x ۸ گزارش گردید در صورتیکه برای سوش *E. coli* DH5α میزان انتقال پایین تر و در حدود ۱۰۸ x ۴ بود که نصف نرخ انتقال پلاسمید در مقایسه با سوش *E. coli* XL1 blue می باشد. مطالعه دیگری نیز در سال ۲۰۱۰ توسط سینگ و همکارانش بر اساس تغییرات در شاخصه های مورد استفاده در پروسه کلسیم کلراید/شوک حرارتی به منظور دستیابی به بهترین شرایط بهینه صورت پذیرفت که در آن نرخ انتقال پلاسمید pUC19 به سوش *E. coli* DH5α-T1R به عنوان مدل مورد ارزیابی قرار گرفتند (۲۳). بر اساس نتایج بدست آمده آنها پیشنهاد کردند که وجود شوک حرارتی ۳۰ ثانیه ای در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به دنبال ۱۰ دقیقه انکوبه کردن در یخ اثر قابل توجهی در جهت افزایش کارایی انتقال پلاسمید در سوش *E. coli* DH5α-T1R دارند. همچنین آنها پیشنهاد کردند که شوک حرارتی پیش از مرحله انکوباسیون سرد عامل مهمی می باشد که ترانسفورماسیون *E. coli* را به طور معنی داری افزایش می دهد. لذا از آنجا که در بسیاری از آزمایشگاهای تحقیقاتی کاربرد سویه *E. coli* DH5α و روش مستعد سازی با استفاده از کلسیم کلراید بسیار معمول است، در این مطالعه بر پایه روش شیمیایی کلرید کلسیم پیشنهاد شده توسط سینگ، ما تاثیرگذاری یک پپتید تراوا کننده غشاء سلولی(CPPs) را در بهبود کارایی و بازدهی این روش مورد بررسی قرار دادیم. برای این منظور ما از پپتید کاتیونیک CM11 به عنوان یک پپتید تراوا کننده غشاء سلولی استفاده نمودیم. پپتید CM11 مانند دیگر پپتیدهای کاتیونیک و آمفی پاتیک این توانایی را دارد که در غشاء باکتری ایجاد حفره نموده و باعث نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی نسبت به ملکول های خارجی گردد. با استناد به مطالعات صورت گرفته توسط Yechiel Shai از آنجا که پپتید CM11 کوچک و از ۱۱ اسیدآمینه تشکیل شده است لذا توانایی این را ندارد که در غشاء به صورت کامل نفوذ کرده و در آن تشکیل یک حفره (Pore) کامل را بدهد و لذا مکانیسمی به نام فرش برای آن قابل ارایه است. در این مدل برهمکنش میان فسفولیپید های غشایی با بار منفی و پپتید کاتیونیک (بار مثبت) منجر به فرش شدگی و پوشش کامل سطح غشاء سلولی با لایه ای از پپتید و در ادامه باعث ناپایداری غشاء می گردد (۶، ۲۲). طبق این مکانیسم در یک غلظت آستانه، پپتید به صورت موقت و ناپایدار سوراخ هایی در غشاء ایجاد می کند و در صورت ادامه افزایش غلظت با پوشش سطح داخل غشاء سلول باکتریایی باعث جداشدن نواحی از غشاء به صورت ساختارهای میسلی می گردد که در نهایت منجر به از هم پاشیدگی ساختار غشاء و مرگ سلول خواهد شد (۹). همچنین آنالیز ها توسط X-ray نشان داده است که در ابتدا پپتید با اتصال به غشاء باعث ناپایداری اولیه در ساختار آن گردیده و در ادامه با افزایش غلظت پپتید و رسیدن به یک آستانه موجب ایجاد حفره یا سوراخ در غشاء می گردد. نکته قابل توجه این است که اتصال اولیه و در ادامه توانایی تشکیل

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.12.7]

حفره توسط پپتید فرایندهایی مستقل اما پیوسته می باشند که وابسته به غلظت پپتید است. بر این اساس بروز و تشدید فعالیت ضد میکروبی این نوع از پپتید بر پایه یک منحنی سیگموئیدی وابسته به غلظت است به نحوی که در زیر آستانه غلظت پپتید فقط باعث تراوا شدن و ناپایداری ساختار غشاء شده اما به ساختار کلی سلول باکتریایی صدمه ای وارد نمی گردد. در غلظت آستانه که می تواند همان حداقل غلظت مهاری باشد (Minimal Inhibitory Concentration) تخریب ساختار غشاء تشدید شده که در نهایت منجر به صدمه و مرگ سلول می گردد (۹، ۱۱). بنابراین زیر غلظت آستانه علیرغم متصل شدن اولیه پپتید فعالیت ضد میکروبی پپتید کم می باشد اما با نزدیک شدن غلظت پپتید به غلظت آستانه، فعالیت ضد میکروبی به سرعت به بیشینه خود می رسد که نتیجه آن مرگ باکتری است. مطالعات قبلی ما نشان داده است که میزان MIC پپتید برای باکتری *E. coli* در بیشتر موارد ۸ µg/ml می باشد که در واقع همان غلظت آستانه پپتید می تواند باشد (۱۶). بر این اساس در این مطالعه اثر پپتید CM11 بر افزایش نرخ انتقال پلاسمید در یک سریال غلظتی از ۰/۵ تا ۶ (نزدیک غلظت به MIC) میکروگرم در میلی لیتر مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بالاترین نرخ ترانسفورم شدن *E. coli* در غلظت ۱µg/ml رخ می دهد و با افزایش غلظت پپتید و نزدیک شدن به غلظت MIC تعداد باکتری های ترانسفورم شده کاهش می یابد. همچنین میزان نرخ انتقال پلاسمید به باکتری در غلظت (µg/ml)های ۰/۵ و ۲ تقریبا یکسان بود. تمامی این یافته ها در هر دو روش قابل مشاهده بود اما در روش دوم بازدهی انتقال مقدار بیشتری را نشان می داد. بر پایه مباحث مورد اشاره در بالا می تواند نتیجه گرفت که در روش اول چون باکتری ها مدت زمان طولانی تری در معرض پپتید قرار گرفته اند لذا مرگ باکتری ها در طی فرایند مستعد سازی به مراتب بیشتر خواهد بود و بنابراین میزان نرخ ترانسفورماسیون در مقایسه با روش دوم کاهش می یابد. همچنین باکتریهایی که در معرض غلظت های ۲ ، ۳ و ۶µg/ml پپتید تیمار شده اند در مقایسه با باکتری های تیمار شده توسط غلظت ۱µg/ml پپتید، نرخ ترانسفورماسیون پایین تری دارند که نشان دهنده یک رابطه معکوس میان میزان غلظت پپتید و نرخ انتقال پلاسمید است زیرا افزایش غلظت منجر به نزدیک تر شدن به حد MIC شده و این یعنی مرگ سلول. در غلظت ۶µg/ml که نزدیک به MIC می باشد نرخ انتقال حتی پایین تر از نمونه های استانداری است که در نتیجه رسیدن غلظت پپتید به نقطه آستانه می باشد. همچنین نتایج نشان است که اختلاف قابل توجهی در نرخ انتقال پلاسمید در غلظت های ۰/۵ µg/ml و ۲ پپتید وجود ندارد. به نظر می رسد این عدم اختلاف در میزان نرخ ترانسفورماسیون برای باکتری های مستعد شده ناشی از یک توازن و تعادل میان شدت بخشیدن پپتید در دریافت DNA و مرگ سلول باکتریایی توسط پپتید می باشد به طوریکه در غلظت ۰/۵ µg/ml نرخ دریافت DNA پایین تر از دریافت در غلظت های ۲ µg/ml است اما در مقابل نیز مرگ باکتری ها به میزان کمتری رخ می دهد. همچنین مطالعات ما نشان داد که پپتید به تنهایی و مستقل از کلرید کلسیم و شوک حرارتی توانایی تشدید و تسهیل انتقال DNA به درون سلول باکتریایی را ندارد به طوریکه با حذف این دو عامل ما در مرحله غربالگری کلونی قابل توجهی مشاهده نکردیم. به نظر می رسد حضور پپتید فقط منجر به افزایش نرخ ترانسفورماسیون از طریق تغییرات در باز آرایی ساختار غشاء می گردد و افزایش نفوذپذیری و انتقال DNA بدون برهمکنش با آن انجام می گیرد. در نهایت، در این مطالعه نتایج بدست آمده نشان داده است که میزان نرخ انتقال پلاسمید pUC19 (۴/۱ x ۱۰^{۸} cfu/µg DNA) ۴ برابر گروه کنترل است (۰/۹ x ۱۰^{۸}) و برای دو پلاسمید pET28a و pGEX4T-1 (۴/۴ X ۱۰^{۷} cfu/µg DNA و ۴/۷ X ۱۰^{۷}) این افزایش نرخ انتقال در مقایسه با گروه کنترل (۰/۸ x ۱۰^{۷}) ۴/۴ و۴/۷ برابر می باشد. با توجه به اندازه پلاسمیدها و ضریب ۱۰^{n} که برای پلاسمید pUC19، ۱۰^{۸} و برای دو پلاسمید دیگر ۱۰^{۷} می باشد لذا می توان نتیجه گرفت که یک ارتباط معکوس بین اندازه پلاسمید و افزایش نرخ انتقال وجود دارد. این مطالعه نشان داد که پپتید کاتیونی CM11 به عنوان یک پپتید تراوا کننده غشاء سلولی می تواند موجب افزایش بازدهی انتقال پلاسمید به درون باکتریها شود. بنابراین مطالعه فوق می تواند به عنوان شروعی جهت مطالعات و شناخت بیشتر این نوع پپتیدها به منظور افزایش هرچه بیشتر و موثرتر بازدهی انتقال پلاسمید در باکتریها باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.12.7]

منابع

1. Badosa, E., Ferre, R., Planas, M., Feliu, L., Besalu, E., Cabrefiga, J., Bardaji, E., and Montesinos, E. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. Peptides. 2007, 28(12): 2276-2285.
2. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. Nat. Rev. Microbiol. 2005, 3(3): 238-250.
3. Cavallarin, L., Andreu, D., San, and Segundo, B. Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. Molecular plant-microbe interactions. 1998, 11(3): 218-227.
4. Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1972, 69(8): 2110-2114.
5. Dubnau, D. DNA uptake in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 1999, 53: 217-244.
6. Ferre, R., Badosa, E., Feliu, L., Planas, M., Montesinos, E., and Bardaji, E. Inhibition of Plant-Pathogenic Bacteria by Short SyntheticCecropin A-Melittin Hybrid Peptides. Appl. Environ. Microbiol. 2006, 72(5): 3302-3308.

7. Friedrich, C. L., Moyles, D., Beveridge, T.J., and Hancock, R. E. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. Antimicrob. Agents. Chemother. 2000, 44(8): 2086-2092.
8. Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F. R. Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria. Methods. Enzymol. 1991, 204: 63-113.
9. Lee, M. T., Hung, W. C., Chen, F. Y., and Huang, H. W. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008, 105(13): 5087-5092.
10. Lundberg, P., and Langel, U. A brief introduction to cell-penetrating peptides. J. Mol. Recognit. 2003, 16(5): 227-233.
11. Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S., and Graslund, A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. J. Biophys. 2011, 2011:1-10.
12. Mae, M., and Langel, U. Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. Curr. Opin. Pharmacol. 2006, 6(5): 509-514.
13. Mandel, M., and Higa, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 1970, 53(1): 159-162.
14. Montesinos, E. Antimicrobial peptides and plant disease control. FEMS microbiology letters. 2007, 270(1): 1-11.
15. Moore, A. J., Beazley, W. D., Bibby, M. C., and Devine, D. A. Antimicrobial activity of cecropins. J. Antimicrob. Chemother. 1996, 37(6): 1077-1089.
16. Moosazadeh, M. M., Abolhassani, F., Babavalian, H., Mirnejad, R., Azizi, B. A., 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): 133-139
17. Panja, S., Aich, P., Jana, B., and Basu, T. How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of Escherichia coli?. Mol. Memb.r Biol. 2008, 25(5): 411-422
18. Panja, S., Aich, P., Jana, B., and Basu, T. Plasmid DNA binds to the core oligosaccharide domain of LPS molecules of E. coli cell surface in the $CaCl_2$-mediated transformation process. Biomacromolecules. 2008, 9(9): 2501-2509.
19. Panja, S., Saha, S., Jana, B., and Basu, T. Role of membrane potential on artificial transformation of E. coli with plasmid DNA. J. Biotechnol. 2006, 127(1): 14-20.
20. Raghuraman, H., and Chattopadhyay, A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. Biosci. Rep. 2007, 27(4-5): 189-223
21. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. New york, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 18. 2001.
22. Shai, Y. Mode of Action of Membrane Active Antimicrobial Peptides. Pep. Sci. 2002, 66(4):236-248.
23. Singh, M. YA., Ma, X., and Amoah., E. Plasmid DNA transformation in Escherichia coli: Effect of heat shock temperature, duration, and cold incubation of $CaCl_2$ treated cells. Int. J. Biotech. Biochem. 2010, 69: 561-568.
24. Tan, H., Fu, L., and Seno, M. Optimization of bacterial plasmid transformation using nanomaterials based on the yoshida effect. Int. J. Mol. Sci. 2010, 11(12): 4961-4972.
25. Trabulo, S. C. A., Mano, M., and Lima, M. C. Cell-penetrating peptides—mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems. Pharmaceuticals. 2010, 3(32).
26. Tsen, S.D., Fang, S. S., Chen, M. J., Chien, J. Y., Lee, C. C., and Tsen, D. H. Natural plasmid transformation in Escherichia coli. J. Biomed. Sci. 1992, 9(3): 246-252.
27. Tu, Z. HG., Li, K. X., Chen, M.J., Chang, J., Chen, L., Yao, Q., and Liu, D. P. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different Escherichia coli strains, Electron. J. Biotech. 2005, 8: 114-120.
28. Wilharm, G., Lepka, D., Faber, F., Hofmann, J., Kerrinnes, T., and Skiebe, E. A simple and rapid method of bacterial transformation. J. Microbiol. Methods. 2010, 80(2): 215-216.
29. Yeaman, M. R., and Yount, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol. Rev. 2003, 55(1): 27-55.
30. Yoshida, N., and Sato, M. Plasmid uptake by bacteria: A comparison of methods and efficiencies. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009, 83(5): 791-798

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.12.7]

جدول ۱. شاخصه های مورد بررسی و استفاده جهت محاسبه تغییرات در بازدهی انتقال پلاسمید به درون باکتری

شاخصه های محاسبه کارامدی انتقال پلاسمید					پلاسمید های *E. coli*		
					pET28a(+)	pGEX4T-1	pUC19
1	غلظت DNA مورد استفاده در فرایند انتقال بر حسب (µg/µl)				۱	۱	۱
2	حجم DNA اضافه شده به مخلوط ترانسفورماسیون بر حسب (µl)				۱	۱	۱
3	حجم کل سلول: مستعد+ DNA + محیط کشت (مخلوط ترانسفورماسیون) برحسب (µl)				۱۰۰ +۱ +۱۰۰۰	۱۰۰ +۱ +۱۰۰۰	۱۰۰ +۱ +۱۰۰۰
3	حجم واقعی کشت داده شده از مخلوط ترانسفورماسیون برای هر پلیت بر حسب(µl)				۱۰	۱۰	۱۰
4	میانگین سه بار تکرار کلنی ها ترانسفورم شده بر روی پلیت ها	روش اول	غلظت پپتید	۰/۵ µg/ml	۲۳۵	۱۹۸	۱۷۱
				۱µg/ml	۲۵۴	۲۲۹	۲۱۶
				۲ µg/ml	۲۲۰	۱۸۰	۱۶۱
				۳ µg/ml	۱۵۵	۱۴۷	۱۳۵
				۶ µg/ml	۳۲	۱۶	۱۲
		روش دوم	غلظت پپتید	۰/۵ µg/ml	۳۲۲	۳۰۴	۲۸۷
				۱ µg/ml	۳۸۴	۳۶۰	۳۳۲
				۲ µg/ml	۲۹۴	۲۸۱	۲۵۶
				۳ µg/ml	۲۳۷	۲۴۴	۱۸۵
				۶ µg/ml	۴۹	۳۶	۳۳
		کنترل		بدون پپتید	۷۹	۸۸	۹۵

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.12.7]