مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر مهاری پروبیوتیک مهندسی شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیان کننده پپتید Tachyplesin I خرچنگ نعل اسبی بر رشد سودوموناس آئروژینوزا

نویسندگان:

مونا ابراهیمی[1]، عباس دوستی[2]*

۱-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲-مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.3, Fall 2022

چکیده:

مقدمه: پروبیوتیک‌ها میکرو ارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف کافی آن ها سبب نمایان شدن اثرات سلامت بخش در بدن میزبان می‌شود. هدف از این پژوهش، بررسی اثرات باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیان کننده پپتید *Tachyplesin I* خرچنگ نعل اسبی بر رشد سودوموناس آئروژینوزا بود.

روش کار: پلاسمید نوترکیب *pNZ8148-Tachyplesin I* حاوی ژن *Tachyplesin I* به روش شوک حرارتی وارد باکتری *E.coli* شده و سپس تخلیص شد. وکتور نوترکیب حاوی ژن *Tachyplesin I* به روش الکتروپوریشن وارد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس شد و غربالگری با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و PCR انجام گرفت. سپس تاثیر مهاری باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مهندسی شده روی رشد سودوموناس آئروژینوزا بررسی و با دیسک‌های آنتی بیوتیکی مقایسه شد.

یافته‌ها: ورود پلاسمید *pNZ8148-Tachyplesin I* درون باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با کلرامفنیکل و توسط واکنش PCR تایید شد. مشخص شد که باکتری مهندسی شده اثر مهاری روی رشد باکتری بیماری‌زای سودوموناس آئروژینوزا دارد، به صورتی که قطر هاله عدم رشد ایجاد شده روی سودوموناس آئروژینوزا تحت تاثیر لاکتوباسیلوس مهندسی شده قابل قبول بود. پس از مقایسه قطر هاله‌های دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی آمپی سیلین و کلرامفنیکل با لاکتوباسیلوس مهندسی شده تفاوت معناداری در هاله عدم رشد مشاهده نشد ($p\text{-value} < 0.05$)، اما قطر هاله حاصل از تتراسایکلین با هاله حاصل از لاکتوباسیل مهندسی شده دارای تفاوت آماری معناداری بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به تایید حضور ژن *Tachyplesin I* درون لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، هاله عدم رشد حاصل از آن در اطراف سودوموناس آئروژینوزا نشان دهنده این است که بیان و ترشح ژن *Tachyplesin I* لاکتوباسیلوس اثری مشابه آنتی‌بیوتیک بر سودوموناس آئروژینوزا دارد.

واژگان کلیدی: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، سودوموناس آئروژینوزا، *Tachyplesin I*، *pNZ8148-Tachyplesin I*

Pars J Med Sci 2022;20(3):50-59

مقدمه:

باکتری‌ها سالیان دراز به عنوان موجودات مضر برای سلامتی انسان شناخته می‌شدند و چنین تصور می‌شد که باید با آن ها مبارزه کرد، اما امروزه میکروارگانیسم‌ها در ساخت داروها، هورمون‌ها، واکسن‌ها، آنزیم‌ها و...، به عنوان یک جزء اصلی فرآیند تولید مطرح هستند. در این میان، پروبیوتیک ها به صورت باکتری‌های مفید با توانایی تغییر فلور میکروبی روده نقش مهمی در بدن ایفا می‌کنند [۳-۱]. پروبیوتیک‌ها شامل طیف وسیعی از میکروب‌ها از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها هستند. جنس‌های باکتریایی پروبیوتیکی شامل لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم و جنس مخمری پروبیوتیکی ساکارومایسس است. سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس، فعالیت مهاری علیه رشد باکتری‌های پاتوژن ایفا می‌کنند. این باکتری‌ها توان مقاومت به

* نویسنده مسئول، نشانی: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

تلفن تماس:۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰ پست الکترونیک:abbasdoosti@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۳۰ اصلاح: ۱۴۰۲/۰۱/۲۹ پذیرش:۱۴۰۲/۲/۱۸

اسید و صفرا، اتصال به سلول‌های اپیتلیوم روده‌ای و همچنین اثرات مفید روی سلامت میزبان خود دارند. انتخاب پروبیوتیک مناسب، یک اصل اساسی در پیشرفت فعالیت درمانی و ویژگی-های عملکردی غذاهای پروبیوتیک و محصولات دارویی به شمار می‌آید [۴ و ۵].

یکی از مهم‌ترین سویه‌های لاکتوباسیلوس، باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس است. این سویه به طور طبیعی در بدن انسان و نیز در بسیاری از غذاهای غنی شده مانند کلم ترش وجود داشته و بسیاری از تولید کنندگان آن را به محصولات لبنی و به ویژه ماست اضافه می‌کنند [۶].

Tachyplesin یک پپتید ضد میکروبی است که در لوکوسیت خرچنگ نعل اسبی وجود دارد. این پپتید به توالی RGD پپتید اینتگرین متصل شده است و پرولیفراسیون تومور کشت داده شده را به وسیله آپوپتوز خاموش می‌کند. به طور مشابه تمپورین L یک پپتید ۱۳ تایی است که از پوست قورباغه اروپایی جدا شده و در سلول‌های سرطانی نکروز القا می‌کند. پپتید مذکور کاتیونیک هپارین است که حدود ۳۰ سال قبل از هموسیت‌های خرچنگ نعل اسبی کشف شد و به علت طیف وسیع و خواص ضد میکروبی قوی در برابر باکتری‌های مقاوم به داروها معروف است. این پپتید با غشا لیپیدی باکتری‌ها واکنش نشان داده و نفوذ پذیری غشا را افزایش داده که خود سبب مرگ باکتری‌ها می‌شود. به علت طیف وسیع در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به عنوان یک کاندیدا برای داروهای ضد میکروبی، ضد تومور و ضد ویروس پیشنهاد شده است [۷].

سودوموناس‌ها که باکتری‌های گرم منفی میله‌ای شکل یا کمی خمیده هستند، به وسیله یک یا چند فلاژل قطبی متحرکند. این باکتری ها در شرایط ویژه‌ای به حالت فرصت طلب، بیماری‌زا می‌شوند. باکتری در محیط به دلیل عوامل مختلف از جمله توانایی کلونیزه شدن در زیستگاه‌های گوناگون محیطی و نیز امکان استفاده از بسیاری از ترکیبات به عنوان منبع انرژی منتشر می‌شود. عفونت سودوموناس می‌تواند در هر بخشی از بدن و بافت‌ها رخ دهد، سوختگی یا تروما در بخش هایی از گوش میانی، قرنیه، دستگاه ادراری و دستگاه تنفسی شایع است. همچنین می‌تواند باعث اندوکاردیت، اسهال و استفراغ و حتی عفونت شود. سیستم ایمنی بیماران پس از عفونت، می‌تواند آنتی بادی‌های خاص با اثرات ضد التهابی تولید کنند. *سودوموناس آئروژینوزا* از عوامل شایع عفونت بیمارستانی و مقاوم به بسیاری از آنتی بیوتیک‌هاست. *سودوموناس آئروژینوزا* باکتری بیماری‌زا فرصت طلب است که عامل عمده ای در بروز مرگ و میر در بیماران با ضعف سیستم ایمنی محسوب می‌شود. مقاومت ذاتی به مواد ضد میکروبی در این باکتری سبب وخیم‌تر شدن وضعیت درمان عفونت‌های آن می‌شود [۸]. از همین رو، هدف از انجام این پژوهش ایجاد باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بیان کننده پپتید *Tachyplesin II* خرچنگ نعل اسبی و بررسی اثر آن بر میزان رشد *سودوموناس آئروژینوزا* بود.

روش کار:

استخراج پلاسمید

در این مطالعه تجربی، باکتری *E.coli* سویه Top10F تهیه شده از بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد به منظور ترانسفورماسیون و تکثیر سازه ژنی نوترکیب، باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (ATCC 4356) تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران برای بیان پروتئین *Tachyplesin I* و باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 2785) تهیه شده از بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به منظور بررسی اثرات پروبیوتیک استفاده شد. همچنین پلاسمید نوترکیب *pNZ8148-Tachyplesin I* حامل ژن *Tachyplesin I* خرچنگ نعل اسبی طراحی و به شرکت جین‌ری سفارش داده شد.

به منظور استخراج پلاسمید، سلول باکتریایی مستعد آماده شد. برای این کار، باکتری *E.coli* سویه TOP10 یک شب در محیط کشت Luria–Bertani (LB) مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. سلول‌های مستعد به روش کلسیم کلراید با شوک حرارتی (۴۲ درجه سانتی‌گراد) آماده شدند [۹]. از این سلول‌ها برای انتقال پلاسمید نوترکیب *pNZ8148-Tachyplesin I* و پلاسمید خالی *pNZ8148* استفاده شد. پلاسمید حاوی ژن *Tachyplesin I* و پلاسمید خالی به طور جداگانه درون باکتری *E.coli* منتقل شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان انکوبه نمونه‌ها، از تک کلنی‌های رشد یافته ماتریکس تهیه شد (شکل ۱). پلاسمید توسط کیت استخراج پلاسمید شرکت یکتا تجهیز آزما طبق دستورالعمل کیت، استخراج شد. به این منظور، ابتدا از ماتریکس‌ها، درون ۵ میلی‌لیتر محیط کشت یاد شده حاوی کلرامفنیکل ۰/۰۵ گرم در لیتر کشت داده شد و لوله به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور شیکردار قرار داده شد. در ابتدا ۰/۰۵ گرم از پودر کلرامفنیکل در ۱۰ سی سی الکل خالص حل شد، سپس مقدار ۱ سی سی از آن در هر ۱۰۰ سی سی محیط کشت افزوده شد.

تایید صحت استخراج پلاسمید

به منظور تایید صحت استخراج پلاسمید، واکنش PCR روی پلاسمید استخراج شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *I*

Tachyplesin(جدول ۱) انجام شد. در نهایت، محصول آن روی ژل الکتروفورز برده شد و صحت استخراج پلاسمید بررسی شد.
مواد مصرفی برای واکنش PCR به صورت زیر مخلوط شدند: PCR Master Mix (2x) به میزان ۱۰ میکرو لیتر، پرایمر رفت (Forward) (۰/۰۳ نانو مول) به میزان ۱ میکرو لیتر، پرایمر برگشت (Reverse) (۰/۰۳ نانو مول) به میزان ۱ میکرولیتر، پلاسمید استخراج شده (DNA) به میزان ۳ میکرو لیتر (۲/۵ میکرو گرم) که همگی با آب دو بار تقطیر به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. مواد مذکور به حجم ۲۰ میکرولیتر در میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری مخلوط شده و در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت.
چرخه دمایی برای انجام PCR به شرح زیر در نظر گرفته شد: مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله دناتوراسیون، ۳۵ سیکل به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال پرایمر به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد، مرحله طویل سازی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. پس از پایان مراحل گفته شده، مرحله طویل سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نتایج واکنش PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شده و درون دستگاه مولد نور ماورا بنفش بررسی شدند.

انتقال پلاسمید حاوی ژن *Tachyplesin I* به باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

از واکنش الکتروپوریشین برای این انتقال استفاده شد. باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مورد نظر در محیط Mrs مایع کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سانتریفیوژ با سرعت ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه انجام شد و سلول‌ها دو دفعه با ۱۰۰ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۰/۱ مولار شستشو داده شدند (هر دفعه سلول باکتری به همراه $MgCl_2$ به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد). همین مراحل شستشو دو مرتبه هم با ۱۰۰ میکرولیتر محلول $CaCl_2$ با غلظت ۰/۱ مولار انجام گرفت. سپس باکتری به کمک سمپلر استریل سرد درون کوت استریل ریخته شد و ۲۰ میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب به محیط درون کوت افزوده و ۵ دقیقه روی آب و یخ قرار داده شد. کوت درون دستگاه الکتروپوریشن قرار داده شد و دستگاه روی ۱۵۰۰ ولت تنظیم و سه مرتبه به سلول‌ها پالس داده شد (کوت بین هر دو پالس به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد). سپس به کمک سمپلر محتویات درون کوت به درون میکروتیوب ۱/۵ استریل ریخته و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس در ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ و سوپرناتانت تخلیه شد. سلول‌های باقی مانده روی پلیت حاوی محیط کشت Mrs-Agar دارای آنتی بیوتیک کلرامفنیکل ۰/۰۵ گرم در لیتر کشت داده شد.
پس از اتمام فرآیند الکتروپوریشن، محتویات سلولی روی پلیت Mrs-Agar حاوی ۰/۰۵ گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل انتقال یافت. پلیت به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس برای تایید نهایی صحت الکتروپوریشن، بار دیگر از باکتری‌های انتقال داده شده، پلاسمید استخراج و روی آن‌ها واکنش PCR به کمک پرایمرهای *I Tachyplesin* انجام شد [۱۰].

استخراج RNA، تیمار با آنزیم *DNaseI* و سنتز cDNA

به منظور استخراج RNA، باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نوترکیب درون محیط کشت LB-Broth حاوی ۰/۰۵ گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل کشت داده شد. پس از تایید انتقال پلاسمید درون باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، RNA تام سلولی از باکتری‌ها استخراج شد. برای استخراج RNA از میکروتیوب و سر سمپلرهای RNase Free/DNase Free با کمک محلول RNX-Plus (سیناکلون، تهران، ایران) استفاده شد. همچنین به میزان ۲۵ میکرولیتر آب تزریق به تیوب اضافه شد تا رسوب RNA در آن حل شود، سپس تیمار *DNase* انجام شد.
سنتز cDNA با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزما انجام شد. به این منظور، میزان ۱۰ میکرو لیتر از نمونه RNA برای حصول ۵۰۰ نانو گرم از RNA، ۱ میکرو لیتر از پرایمر Random Hexamer (۷۴ نانو مول)، ۴ میکرو لیتر 5x first-strand buffer، ۱ میکرو لیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرو لیتر RNasin (۴۰ واحد بر میکرو لیتر) و ۱ میکرولیتر M-MLV (۲۰۰ واحد بر میکرو لیتر) طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش RT-PCR

صحت ساخت cDNA سنتز شده توسط واکنش PCR با پرایمرهای ژن *Tachyplesin I* بررسی شد. پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) به کمک نرم افزار GeneRunner طراحی شدند. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و پس از زمان مقرر با نور ماورابنفش مشاهده شدند [۱۱].

بررسی تاثیر ضد میکروبی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مهندسی شده

برای بررسی اثر ضدمیکروبی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مهندسی شده، باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* روی محیط کشت مولر هینتون آگاردار کشت داده شد. سپس دیسک آنتی‌بیوگرام

بلانک تهیه و به باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مهندسی شده حاوی ژن *Tachyplesin I* و باکتری حاوی وکتور خالی آغشته شد و روی سطح پلیت حاوی سودوموناس آئروژینوزا قرار داده شد. علاوه بر این، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و کرامفنیکل نیز در کنار دو گروه قبلی قرار داده شد. قطر هاله عدم رشد حاصل از باکتری *لاکتوباسیلوس* مهندسی شده با قطر هاله عدم رشد باکتری *لاکتوباسیلوس* سویه استاندارد دست کاری نشده و دیسک‌های آنتی بیوتیکی همچون آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و کرامفنیکل پس از گذشت ۲۴ ساعت مقایسه شد.

تحلیل آماری

قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی آمپیسیلین، کلرامفنیکل، تتراسایکلین و همچنین باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مهندسی شده بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و سپس به کمک نرم افزار GraphPad Prism و با استفاده از آزمون T تحلیل شد.

یافته‌ها:

نتایج استخراج پلاسمید

واکنش PCR روی پلاسمیدهای استخراج شده با پرایمرهای ژن *I Tachyplesin* انجام شد. حضور باند ۱۴۷ جفت بازی *I Tachyplesin*، صحت تکثیر پلاسمید را تایید می کند (شکل ۲).

نتایج انتقال پلاسمید به سلول باکتریایی

صحت انجام واکنش الکتروپوریشن برای باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نوترکیب، با رویت باند ۱۴۷ جفت بازی *Tachyplesin I* تایید می شود (شکل ۳).

نتایج مرتبط با بیان ژن هدف در سلول باکتریایی

نتایج مرتبط با بیان ژن *Tachyplesin I* در باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مهندسی شده با کمک واکنش PCR، نشان دهنده باند ۱۴۷ جفت بازی *Tachyplesin I* است که در نتیجه بیان زهر *I Tachyplesin* تایید می شود (شکل ۴).

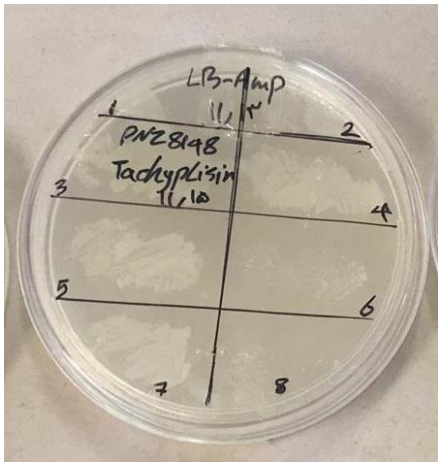
نتایج مرتبط با ایجاد هاله عدم رشد توسط باکتری مهندسی شده

پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون پلیت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* حاوی دیسک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد هاله‌هایی اطراف دیسک ها مشاهده شد. همانطور که در تصویر ۵ مشاهده می‌شود، اطراف دیسک حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مهندسی شده هاله قابل قبولی تشکیل شده است که نشان می‌دهد زهر *Tachyplesin I* تولید شده و پس از ترشح از باکتری لاکتویاسیلوس، روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا (مشابه با آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و کرامفنیکل) اثر مهاری داشته است. این در حالی است که باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مهندسی نشده تاثیری بر رشد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* نداشته است (شکل ۵).

نتایج تحلیل آماری

قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌های آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل و باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مهندسی شده با خط کش در مقیاس میلی‌متر اندازه‌گیری (جدول ۲) و داده ها به کمک نرم افزار GraphPad Prism و آزمون T تحلیل شدند. آزمون بررسی قطر هاله به صورت دو تکرار انجام شد. از نظر آماری اختلاف بین هاله عدم رشد آمپی‌سیلین با هاله عدم رشد حاصل از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مهندسی شده معنادار نبود ($p\text{-value} < 0.05$). همچنین اختلاف بین هاله عدم رشد کلرامفنیکل با هاله عدم رشد حاصل از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مهندسی شده معنادار نبود. این بدین معنا است که قطر هاله عدم رشد حاصل از باکتری مهندسی شده به اندازه قطر هاله عدم رشد حاصل از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بوده و قابل قبول می‌باشند، اما اختلاف بین هاله عدم رشد حاصل از تتراسایکلین با هاله عدم رشد باکتری مهندسی شده از نظر آماری معنادار بود و هاله باکتری مهندسی شده در مقایسه با تتراسایکلین قابل قبول نبود (شکل ۷).

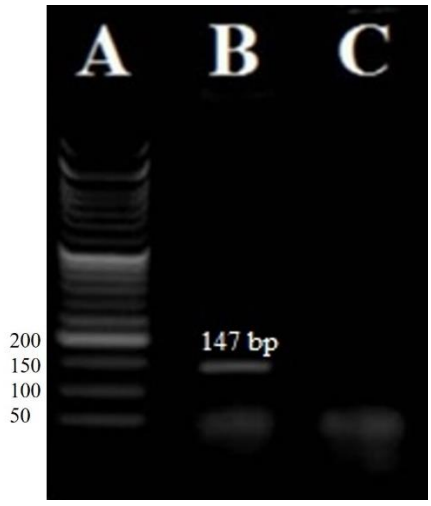
پس از تحلیل اختلاف آماری بین هاله عدم رشد آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل با باکتری مهندسی شده معنادار نبود اما اختلاف آماری بین هاله عدم رشد تتراسایکلین و باکتری مهندسی شده معنادار بود (Blank control باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مهندسی نشده است).



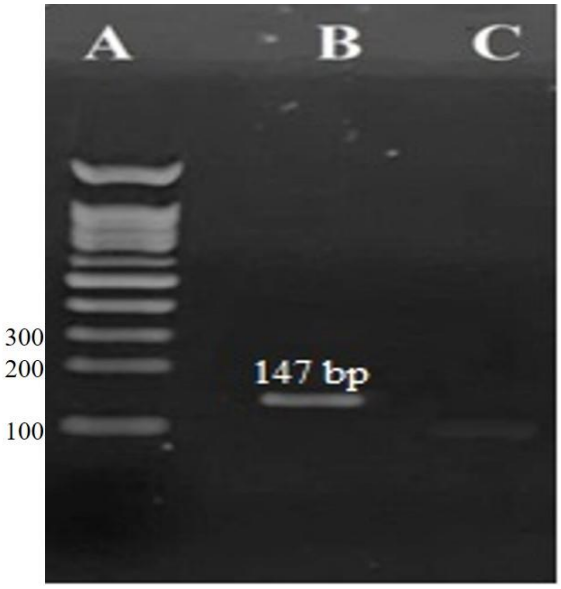
شکل ۱: ترانسفکت پلاسمید و تهیه ماتریکس از تک کلنی‌های رشد یافته.

جدول ۱ اطلاعات پرایمر

Gene	Primer sequence	Size bp
Tachyplesin I	Lp-Tach-F: 5’- ATGCGTAAAAAGTGGCGTTG -3’ Lp-Tach-R: 5’-ACGACAACGACGATAACAAATAC -3’	147

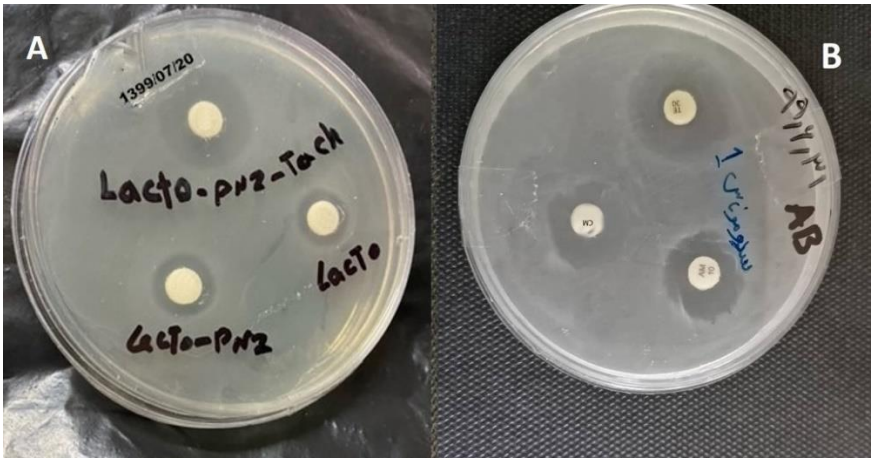


شکل ۲:واکنش PCR بر روی پلاسمید pNZ8148-*Tachyplesin I* استخراج شده.
حضور باند ۱۴۷ جفت بازی مربوط به ژن *Tachyplesin I* (B) در کنار مارکر ۵۰ جفت بازی (A) صحت استخراج پلاسمید را تایید می کند.
چاهک C کنترل منفی است.



شکل ۳-: واکنش PCR بر روی پلاسمید استخراج شده از باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نوترکیب.
حضور باند ۱۴۷ جفت بازی مربوط به ژن *Tachyplesin I* (B) در کنار مارکر ۱۰۰ جفت بازی (A) صحت انجام الکتروپوریشن را تایید می کند.
چاهک C کنترل منفی است.

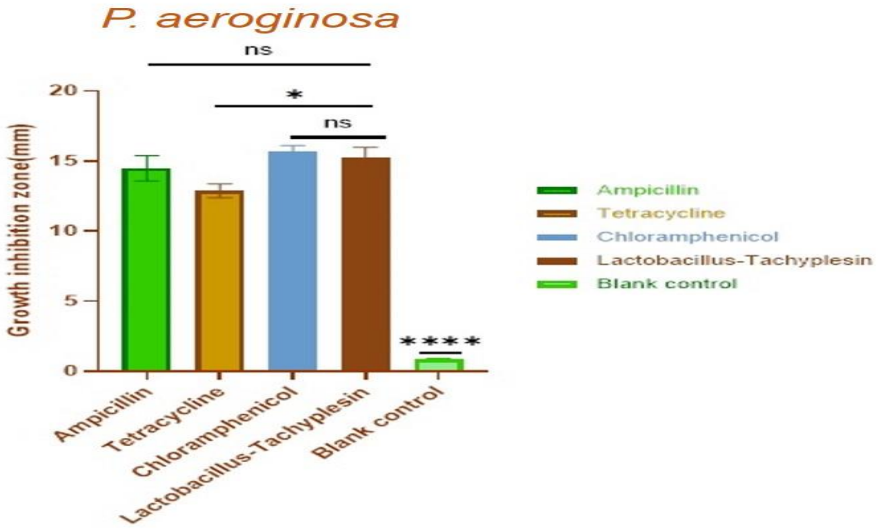
شکل ۴: بررسی صحت سنتز cDNA به روش PCR.
باند ۱۴۷ جفت بازی (B) مربوط به ژن *Tachyplesin I* در کنار مارکر ۱۰۰ جفت بازی (A) صحت سنتز cDNA را تایید کرد.
چاهک C کنترل منفی است.



شکل ۵: تشکیل هاله اطراف دیسک.

A: هاله حاصل از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نوترکیب حاوی ژن *Tachyplesin I* در مقایسه با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* حاوی وکتور خالی.

B: هاله‌های حاصل از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و کرامفنیکل.



شکل ۷: نتایج مربوط به تحلیل آماری قطر هاله‌های عدم رشد.

جدول ۲: قطر هاله‌های عدم رشد بر روی پلیت

باکتری	قطر هاله									
Pseudomonas aeroginosa	**Ampicillin**		**Tetracycline**		**Chloramphenicol**		**Lactobacillus-Tachyplesin I**		**Blank control**	
	15.12	13.84	12.54	13.23	15.43	15.99	14.78	15.78	0.83	0.9

بحث:

پپتیدهای ضد میکروبی برای درمان عفونت های باکتریایی و قارچی متعدد با ساختار و عملکردهای مختلف بوده و بسیار کارآمد هستند[۱۲]. طراحی یک پپتید ضد میکروبی با استفاده از روش‌های کامپیوتری یکی از سریع ترین تکنیک ها در توسعه دارو محسوب می شود. در این مطالعه، پپتید کاتیونی ترکیبی جدید با استفاده از *Tachyplesin I* با کمک نرم افزارهای زیست سنجی طراحی شد که افزایش فعالیت ضد میکروبی را در برابر سلول های باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا نشان داد.

هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مهندسی شده روی رشد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بود. در واقع سوال اصلی این بوده که آیا *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مهندسی شده که پروتئین *Tachyplesin I* را ترشح می‌کند قادر است اثر مهاری بر رشد باکتری بیماری‌زای *سودوموناس آئروژینوزا* داشته باشد یا خیر. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که پروتئین ترشحی *Tachyplesin I* تولید شده توسط باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مهندسی شده، می‌تواند اثر مهاری بر رشد باکتری بیماری‌زای *سودوموناس آئروژینوزا* بگذارد.

نیایج مطالعه بهفرنیا و همکارش در سال ۱۳۹۴ روی مصرف ماست پروبیوتیک در مدت زمان مشخص حاکی از آن بود که مصرف فرآورده‌های پروبیوتیک می‌تواند به عنوان یک روش مؤثر برای بهبود هالیتوزیس با منشاء دهانی در نظر گرفته شود [۱۳]. در مطالعه جوادی‌منش و همکاران در سال ۲۰۲۱ در مشهد روی پپتید کاتیونی تاناتین برای باکتری‌های گرم منفی حساسیت در رقت‌های ۶/۲۵ تا ۲۵ گزارش شد [۱۴]. در مطالعه عربستانی و همکاران در سال ۲۰۱۶ در لرستان، رقت حساسیتی برای عصاره متانولی و آبی گیاه بن سرخ برای سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس و سویه مقاوم به دارو ۱۴ تا ۳۲ و برای سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* و سویه مقاوم به دارو ۱۴ تا ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد [۱۵]. پپتید ترکیبی BMAP-27 و LL-32 در مطالعه تال و همکاران در سال ۲۰۱۹ در اردن حساسیت برای باکتری‌های گرم مثبت از جمله استافیلوکوکوس اورئوس ۲۰µM و برای *سودوموناس آئروژینوزا* ۱۰µM گزارش شد [۱۶]. پپتید ترکیبی LH28 و CL23 در مطالعه تیان و همکاران در سال ۲۰۰۹ در چین، حساسیت ۱۳/۳ µMz برای هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش کردند[۱۷]. در مطالعه اینتوراسوت و همکاران در سال ۲۰۱۸، حساسیت پپتید کاتیونی ترکیبی برای باکتری گرم مثبت ۶۶/۶ و برای باکتری گرم منفی ۴۱/۶ گزارش شد [۱۸]. باکتری نوترکیب *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مورد بررسی در این مطالعه نیز اثری مهاری مشابه آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل روی باکتری بیماری‌زای *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد.

نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج حاصل از تحلیل آماری و همچنین مشاهدات میکروسکوپی کشت سلولی، می‌توان چنین بیان کرد که ژن *Tachyplesin I* پس از بیان شدن درون باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، توانایی ترشح به خارج از سلول را پیدا کرده و روی رشد باکتری بیماری‌زای سودوموناس آئروژینوزا اثر می‌گذارد. در واقع، بر طبق نتایج این پژوهش، بیان ژن زهر *Tachyplesin I* در باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، قادر است این رشد باکتری بیماری‌زای *سودوموناس آئروژینوزا* را مهار کرده و تاثیری شبیه به آنتی‌بیوتیک‌هایی همچون آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل داشته باشد. ترکیب این پپتید با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند در کاهش عوارض جانبی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی موثر باشد. پژوهش‌های دقیق‌تری در این زمینه پیشنهاد می‌شود.

تعارض منافع:

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1. Venugopalan V, Shriner KA, Wong-Beringer A. Regulatory oversight and safety of probiotic use. Emerging infectious diseases. 2010;16(11):1661.
2. Reid G, Gadir AA, Dhir R. Probiotics: reiterating what they are and what they are not. Frontiers in microbiology. 2019 Mar 12;10:424.
3. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature reviews Gastroenterology & hepatology. 2014.
4. Berger B, Pridmore RD, Barretto C, Delmas-Julien F, Schreiber K, Arigoni F, et al. Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. Journal of bacteriology. 2007;15;189(4):1311-21.
5. Imperial IC, Ibana JA. Addressing the antibiotic resistance problem with probiotics: reducing the risk of its double-edged sword effect. Frontiers in microbiology. 2016 Dec 15;7:1983.
6. Ranjbar R, Owlia P, Saderi H, Mansouri S, Jonaidi-Jafari N, Izadi M, et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burned patients hospitalized in a major burn center in Tehran, Iran. Acta medica Iranica. 2011; 49(10): 675-9.
7. Shin DM, Jo EK. Antimicrobial peptides in innate immunity against mycobacteria. Immune Network. 2011;11(5):245-52.
8. Amiel E, Lovewell RR, O'Toole GA, Hogan DA, Berwin B. *Pseudomonas aeruginosa* evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming

motility and is independent of flagellum expression. Infection and immunity. 2010;78(7):2937-45.
9. Dehkordi MS, Doosti A, Arshi A. Deletion of *Salmonella enterica* serovar typhimurium sipC gene. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2015 Dec 1;5(12):987-91.
10. Safarpour M, Kazemi Z, Doosti E, Doosti A. Cloning tagD gene from helicobacter pylori in PFLAG-CMV-3 eukaryotic vector to generate a DNA vaccine. J Jahrom Uni Med Sci. 2016 Dec 10;14:43-50.
11. Safarpour-Dehkordi M, Doosti A, Jami MS. Impacts of the Staphylococcal Enterotoxin H on the Apoptosis and lncRNAs in PC3 and ACHN. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2020 Jul;35(3):180-8.
12. Modaresi F, Jafarinia M. Antibacterial performance of MELITININ-BMAP27 hybrid peptide against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. Journal of Jahrom University of Medical Sciences. 2022 Mar 10;20(1):0-.
13. Mahfoud M, Al Najjar M, Hamzeh AR. Multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from nosocomial respiratory and urinary infections in Aleppo, Syria. JIDC. 2015; 9(02): 210-213.
14. Javadmanesh M, Tanhayan A. Comparison of antibacterial effects of tanatine peptide with two essential oils of cinnamon and oregano on isolates of pathogenic bacteria. VJ. 2020; 33 (1): 47-53. (Persian)
15. Gholami A, Ahmadi M. Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanol extracts of Allium Jesdianum plant on a number of pathogenic bacteria resistant to antibiotics. psj. 2016; 14 (4): 18-26.(Persian)
16. Al Tall Y, Abualhaijaa A, Alsaggar M, Almaaytah A, Masadeh M, Alzoubi KH. Design and characterization of a new hybrid peptide from LL-37 and BMAP-27. Infect. Drug Resist. 2019; 12: 1035
17. Tian ZG, Dong TT, Teng D, Yang YL, Wang JH. Design and characterization of novel hybrid peptides from LFB15 (W4, 10), HP (2-20), and cecropin A based on structure parameters by computer-aided method. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009; 82(6): 1097-1103
18. Wanmakok M, Orrapin S, Intorasoot A, Intorasoot S. Expression in *Escherichia coli* of novel recombinant hybrid antimicrobial peptide AL32-P113 with enhanced antimicrobial activity in vitro. Gene. 2018; 671: 1-9

Original Article

Investigation of the inhibitory effect of Lactobacillus acidophilus engineered probiotic expressing Tachyplesin I horseshoe peptide on the growth of Pseudomonas aeruginosa

Mona Ebrahimi[1], Abbas Doosti[2*]

Received:2023-2-19 Revised:2023-04-18 Accepted: 2023-5-8

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.3, Fall 2022

Pars J Med Sci 2022;20(3):50-59

Abstract:

Introduction:
Probiotics are living micro-organisms whose sufficient consumption causes health-giving effects to appear in the host's body. The purpose of this research is to produce the effects of Lactobacillus acidophilus probiotic bacteria expressing horseshoe crab *Tachyplesin I* on the growth of Pseudomonas aeruginosa.

Methods:
Plasmid *pNZ8148-Tachyplesin I* containing *Tachyplesin I* gene was introduced into *E.coli* by heat shock method. The recombinant vector was introduced into Lactobacillus acidophilus bacteria by electroporation and screening was done by chloramphenicol antibiotic and PCR. Then, the inhibitory effect of the engineered Lactobacillus acidophilus bacteria on the growth of Pseudomonas aeruginosa was investigated and compared with antibiotic discs.

Results:
Plasmid *pNZ8148-Tachyplesin I* entry into Lactobacillus acidophilus was confirmed by chloramphenicol and PCR. Then it was determined that the engineered bacteria had an inhibitory effect on the growth of the pathogenic bacterium Pseudomonas aeruginosa, so that the diameter of the halo of non-growth created on Pseudomonas aeruginosa under the influence of the engineered Lactobacillus was acceptable. After comparing the halo diameters of ampicillin and chloramphenicol antibiotic discs with engineered Lactobacillus and conducting statistical analysis, no significant difference was reported in the non-growth halo (pvalue<0.05), but the halo diameter of tetracycline with The aura obtained from the engineered lactobacillus had a statistically significant difference.

Conclusion:
The presence of *Tachyplesin I* gene in Lactobacillus acidophilus was confirmed, the halo of lack of growth around Pseudomonas aeruginosa indicates that the expression and secretion of Lactobacillus Tachyplesin I gene has an antibiotic-like effect on Pseudomonas aeruginosa.

Keywords: Lactobacillus Acidophilus, Pseudomonas Aeruginosa, *Tachyplesin I*, *pNZ8148-Tachyplesin I*

* Corresponding author Email: Abbasdoosti@yahoo.com