مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۶، صفحات ۴۷-۵۱

بررسی تولید نانوساختار S-layer در شرایط بی هوازی و ۵ درصد CO_2 در باکتری *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356

موج خالقی*، روحا کسری کرمانشاهی، سید حمید زرکش اصفهانی

بخش میکروب شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

نویسنده رابط: موج خالقی، بخش میکروب شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

تلفن: ۰۳۴۱-۲۱۱۵۴۱۲ mjkhaleghi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۹/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۱۵

چکیده:

زمینه و اهداف: پروتئین سطحی(S-layer) آرایه‌های کریستالی تک مولکولی ساخته شده از تحت واحدهای پروتئینی یا گلیکوپروتئینی می‌باشد. S-layer بعنوان خارجی‌ترین ساختار پوشش سلولی در بسیاری از ارگانیسم‌ها، باکتری ها و آرکی باکتریا شناخته شده است. به علت خصوصیات ساختاری آنها و توانایی خود تجمعی S-layer بر روی سطوح مختلف، باعث شده این ساختار در نانوبیوتکنولوژی، نانوتکنولوژی، بیوتکنولوژی و علوم پزشکی مورد توجه قرار گیرد. لذا در این تحقیق سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ATCC4356 به دلیل داشتن خواص پروبیوتیکی انتخاب و تولید پروتئین S-layer در آن تحت شرایط بی هوازی و ۵ درصد CO_2 مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: باکتری *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 در محیط MRS broth تحت شرایط بی هوازی و ۵ درصد CO_2 در دمای $37^{\circ}C$ کشت داده شد. پروتئین سطحی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* توسط تیمار سلول ها با هیدروکلراید گوانیدین (۴M) استخراج گردید. سپس پروتئین ها توسط روش SDS-PAGE آنالیز شدند.

یافته ها: پس از استخراج پروتئین های S-layer و آنالیز آنها، ژل مورد نظر به وسیله کوماسی برلیانت بلو، رنگ آمیزی شد و باندهای پروتئین ۴۳ کیلودالتن مشاهده شدند و پروتئین های S-layer باکتری های رشد یافته در شرایط بی هوازی و ۵ درصد CO_2 با یکدیگر مقایسه گردیدند.

نتیجه گیری: نتایج حاصله بیانگر مطلوب بودن شرایط بی هوازی برای جداسازی این پروتئین سطحی نسبت به شرایط ۵ درصد CO_2 می باشد.

کلید واژه ها: لایه سطحی، پروبیوتیک، S-layer ، *Lactobacillus acidophilus*

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

ساختارهای منظمی که خارجی ترین پوشش سلولی بسیاری از باکتری های حقیقی گرم مثبت و گرم منفی و آرکی باکتریا را تشکیل می دهند، تحت عنوان لایه سطحی(S-layer) شناخته شده اند (۱). این لایه های سطحی آرایه های کریستالی مونومولکولی تشکیل شده از تحت واحدهای پروتئینی یا گلیکوپروتئینی می باشند (۴-۱). تحت واحد های پروتئین S-layer به طور غیر کووالانت به یکدیگر و دیواره سلولی متصل شده اند که توسط ترکیبات دناتوره کننده مثل اوره یا هیدروکلراید گوانیدین به مونومرهای سازنده تبدیل می شوند (۲،۵). زیر واحدهای S-layer دارای توانایی خود تجمعی می باشند (۴) که آرایه های منظمی به صورت یک لایه دو بعدی بر روی بستر های جامد، در سطح مشترک هوا_آب، فیلم های لیپیدی و لیپوزوم ها و یا در سوسپانسیونی که عامل دناتوره کننده حذف شده باشد، تشکیل می دهند (۲،۴). عملکردهای مختلفی برای این لایه سطحی گزارش شده است. S-layer بعنوان لایه ای محافظ، همچنین برای حفظ شکل سلولی، برای به دام انداختن یون ها و مولکول ها، جایگاه اتصال برخی از آنزیم ها و نیز در برخی از باکتری ها عامل ویرولانس شناخته شده است (۱،۲،۶). دستگاه گوارش انسان و حیوانات محل زندگی انواعی از میکروارگانیسم ها از جمله گونه های لاکتوباسیلوس می باشد. لاکتوباسیلوس ها یکی از جنس های متعلق به گروه باکتریایی اسید لاکتیک می باشند که به دلیل نقش آنها در تولید و نگهداری بسیاری از محصولات غذایی تخمیر شده از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند(۸ ،۷). بسیاری از گونه های جنس لاکتوباسیلوس دارای S-layer می باشند(۲). لاکتوباسیلوس های متعددی برای سلامتی میزبانشان مفید شناخته شده اند و به طور متداول به عنوان پروبیوتیک استفاده می شوند (۲،۹،۱۰،۱۱). S-layer امروزه بعلت نقش مهم پروبیوتیک ها در سلامت میزبانشان از اهمیت ویژه ای برخوردار گردیده است (۱۱). اهمیت این ساختار در اتصال سویه های *Lactobacillus acidophilus* M92 و ATCC4356 در دستگاه گوارش توسط Frece و همکارانش ثابت شده است (۹). مطالعات مختلفی جهت جداسازی پروتئین S-layer از دیواره سلولی انجام شده است. Lortal و همکارانش در سال۱۹۹۲ برای جداسازی این ساختار در باکتری *L. fermenti* از هیدرولیز آنزیماتیک پپتیدوگلیکان ، در *L. brevis* از هیدروکلراید گوانیدین، اوره و سدیم دودسیل سولفات (SDS) و در *L. helveticus* از لیتیم کلراید استفاده نمودند (۹). Boot و همکارانش در سال ۱۹۹۳ با استفاده از هیدروکلراید گوانیدین و Smit و همکارانش در سال ۲۰۰۱ با استفاده از لیتیم کلراید پروتئین لایه سطحی را در *L. acidophilus* ATCC4356 جداسازی نمودند (۱،۴). در سال ۲۰۰۲ Jakava-Viljanen و همکارانش برروی اثر شرایط هوازی و بی هوازی بر بیان ژن های پروتئین سطحی در *L. brevis* ATCC14869 تحقیق نمودند (۱۲) و در سال ۲۰۰۵ اثر ترکیبات متفاوت محیط کشت بر روی لایه سطحی *L. acidophilus* توسط Schar-Zammartti و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت (۷). به طور کلی تحقیقات نشان می دهند که لایه سطحی در باکتری ها یک ساختار ثابتی نمی باشد و بیان ژن آن تحت شرایط محیطی است. لذا در این تحقیق ما سعی نمودیم تاثیر شرایط بی هوازی و ۵ درصد CO_2 را بر روی نانوساختار خارج سلولی باکتری *L. acidophilus* ATCC4356 بررسی نموده و نیز با جداسازی این ساختار زمینه انجام تحقیقات بعدی بر روی آن در کشور فراهم گردد. جالب توجه اینکه تحقیق حاضر، اولین گزارش علمی در مورد تولید S-layer در این گونه از لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد.

مواد و روش ها:

سویه باکتریایی و شرایط کشت آن: برای فعال نمودن سویه *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 (تهیه شده از کلکسیون میکروبی آلمان)، نمونه لیوفلیزه باکتری فوق در محیط MRS broth (MERCK) تحت شرایط بی هوازی در دمای $37^{\circ C}$ به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. سویه فوق پس از کشت در محیط MRS broth حاوی ۱۰٪ گلیسرول در دمای $-20^{\circ C}$ نگهداری گردید.

تعیین منحنی رشد: به علت اینکه پروتئین S-layer بیش از ده درصد پروتئین کل سلولی را در فاز لگاریتمی رشد شامل می گردد لذا برای جداسازی S-layer بایستی باکتری در فاز لگاریتمی باشد. طبق مطالعات انجام شده برای جداسازی این ساختار در شرایط بی هوازی از *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356، جذب نوری (OD) سوسپانسیون حاوی باکتری با طول موج ۶۹۵nm، برابر ۰/۷ در نظر گرفته شده است (۱،۴). همچنین در این شرایط، انتهای فاز لگاریتمی در *Lactobacillus acidophilus* LA1-1 ۱۴ ساعت گزارش گردیده است (۱۳). لذا در این تحقیق منحنی رشد برای باکتری مورد آزمون در شرایط بی هوازی ترسیم نشد و تنها برای شرایط ۵ درصد CO_2 که با شرایط بی هوازی مورد مقایسه قرار گرفت، این منحنی تعیین و ترسیم گردید. برای

Archive of SID

www.SID.ir

این منظور از کشت شبانه باکتری *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 به اندازه (حجمی/حجمی)۱:۱۰۰ به محیط MRS broth تازه، تلقیح شد و در شرایط ۵ درصد CO_2 در دمای $37^{\circ}C$ گرمخانه گذاری گردید و از زمان صفر (بلافاصله پس از تلقیح) به مدت ۲۴ ساعت، جذب نوری (OD) سوسپانسیون حاوی باکتری با طول موج ۶۹۵nm هر ۲ ساعت یکبار با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Spectronic 210, Milto Roy) بررسی شد.

در خصوص شرایط بی هوازی، پس از کشت باکتری فوق به مدت ۱۴ ساعت، جذب نوری آن در طول موج ۶۹۵ nm خوانده شد.

جداسازی پروتئین: برای جداسازی پروتئین لایه سطحی *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 ، ۵ ml از کشت شبانه باکتری فوق به ۵۰۰ ml محیط کشت تازه MRS broth تلقیح گردید. زمانیکه جذب نوری نمونه کشت شده در شرایط بی هوازی و ۵ درصد CO_2 در $37^{\circ}C$ در طول موج ۶۹۵nm به ۰/۷ رسید، سلول ها به وسیله سانتریفوژ با دور ۱۵۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه در $4^{\circ}C$ رسوب داده شدند. رسوب سلولی دو مرتبه با آب سرد شسته و تحت تیمار ۱۰ml هیدروکلرایدگوانیدین ۴ مولار(pH ۷/۰) به مدت یک ساعت در دمای $37^{\circ}C$ قرار گرفتند. پس از آن در ۱۸۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی در دمای $4^{\circ}C$ در آب مقطر دیالیز شدند. نمونه دیالیز شده لیوفلیزه شده و مجدداً در ۱ ml بافر Q (۱) به صورت سوسپانسیون درآمدند.

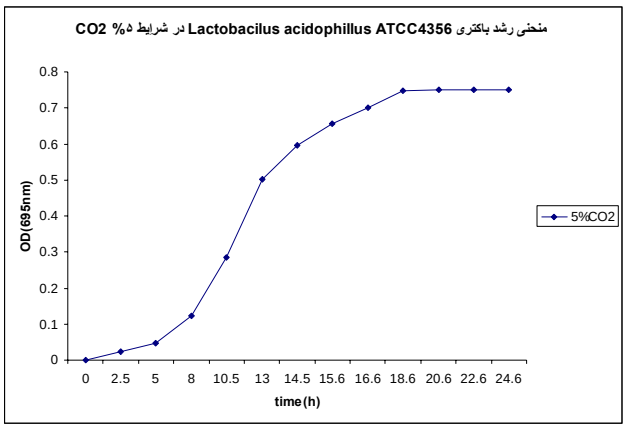
آنالیز پروتئین های لایه سطحی توسط SDS-PAGE : برای انجام آنالیز پروتئین لایه سطحی توسط SDS-PAGE، ۱۵ µli نمونه پروتئین با ۵µli بافر نمونه مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در $100^{\circ}C$ جوشانده و سپس نمونه ها (۲۰µli) روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ در ولتاژ ۱۰۰ ولت جریان یافتند. ژل با استفاده از کوماسی بلو رنگ آمیزی شده و برای حذف رنگ های اضافی بر روی ژل و تشخیص باندهای پروتئینی، توسط محلول رنگ بر رنگ زدایی گردید.

یافته ها:

منحنی رشد *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 در شرایط ۵ درصد CO_2 برای تعیین زمان رسیدن به OD_{695} برابر ۰/۷ محاسبه گردید. بر اساس اندازه گیری های انجام شده، حدود ۱۷ ساعت برای رسیدن به جذب نوری مورد نظر لازم می باشد (شکل ۱). در نمونه کشت شده در شرایط بی هوازی، جذب نوری نمونه مورد آزمون در طول موج ۶۹۵nm پس از ۱۴ ساعت گرمخانه گذاری نمونه در شرایط فوق در دمای $37^{\circ}C$، بررسی گردید. که در این مدت، نمونه به جذب نوری مورد نظر نرسیده بود و مجدداً آن را در شرایط اولیه قرار داده تا به جذب نوری ۰/۷ رسید.

پس از رنگ آمیزی ژل و رنگ زدایی آن، یک باند مشخص با وزن ۴۳ کیلودالتون که بعنوان پروتئین S-layer شناخته شده است(۱) مشاهده گردید (شکل ۲). نکته جالب توجه اینکه در نمونه حاصل از رشد باکتری در شرایط بی هوازی شدت رنگ و ضخامت باند مورد نظر حاکی از میزان بیشتر تولید پروتئین های S-layer نسبت به شرایط ۵ درصد CO_2 می باشد (شکل ۲، ردیف ۳، ۵). برای مطالعه بهتر باند پروتئینی حاصل از کشت باکتری در شرایط بی هوازی و مقایسه آن با باند پروتئینی حاصل از شرایط ۵ درصدCO_2، از نمونه پروتئینی مورد آزمون هم به صورت خالص و هم با رقت ۰/۱ مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از رسوب سلولی باکتری ها پس از تیمار، آنالیز بعمل آمد که میزان پروتئین S-layer در این سلول ها بسیار کم می باشد (شکل ۲، ردیف ۲).

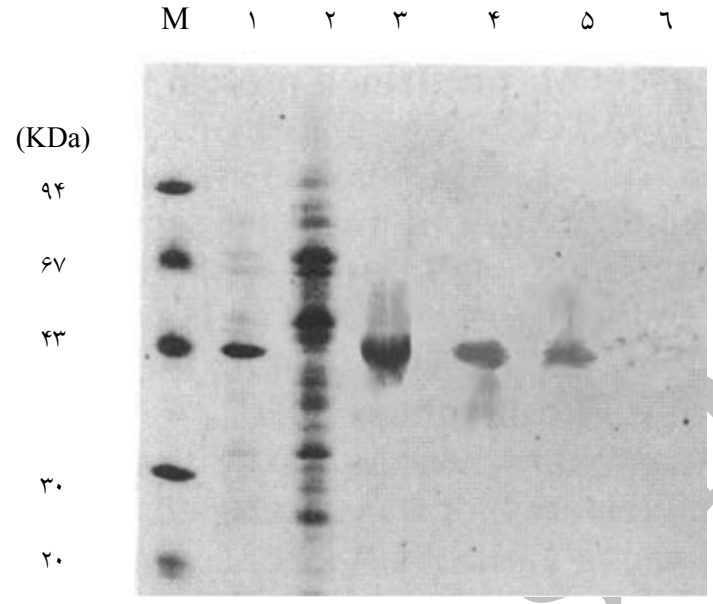
شکل ۱: منحنی رشد باکتری *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 در شرایط ۵ درصد CO_2



Archive of SID

www.SID.ir

شکل۲: نتایج SDS-PAGE باکتری *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356



۱: مایع رویی دیالیز نشده نمونه تحت تیمار هیدروکلراید گوانیدین ۴M در شرایط بی هوازی،۲: رسوب سلولی نمونه تحت تیمار هیدروکلراید گوانیدین ۴M در شرایط بی هوازی، ۳: مایع رویی دیالیز شده نمونه تحت تیمار هیدروکلراید گوانیدین ۴M در شرایط بی هوازی، ۴: مایع رویی دیالیز شده نمونه تحت تیمار هیدروکلراید گوانیدین ۴M در شرایط بی هوازی (با رقت ۰/۱)، ۵: مایع رویی دیالیز شده نمونه تحت تیمار هیدروکلراید گوانیدین ۴M در شرایط ۵ درصد CO_2 ، ۶: نمونه شاهد منفی (*Lactobacillus casei*)

بحث:

محققین یکی از الزاماتی را که برای تقسیم بندی میکروارگانیسم ها به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته اند توانایی اتصال آنها به بافت اپی تلیال روده و تجمع در دستگاه گوارشی است. در لاکتوباسیلوس ها، S-layer واسطه اتصال به سلول های اپی تلیال شناخته شده است(۱۴). این امر توسط Frece و همکارانش ثابت گردید و دیده شد لاکتوباسیلوس هایی که تحت تیمار عوامل تقلیب کننده مختلف قرار گرفته اند وS-layer خود را از دست داده اند، قابلیت ضعیفی جهت اتصال به سلول های اپیتلیال روده دارا می باشند (۹). Boot و Smit و همکارانشان بر روی جداسازی لایه سطحی باکتری *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 در شرایط بی هوازی، با استفاده از هیدروکلرایدگوانیدین و لیتیم کلراید مطالعاتی انجام داده اند (۱،۴). نتایج به دست آمده در این تحقیق کاملا" با نتایج آنها مطابقت داشته است. Schar-Zammartti و همکارانش تاثیر ترکیبات محیط های کشت تخمیری مختلف را برروی این لایه سطحی در *Lactobacillus acidophilus* مورد بررسی قرار دادند (۷). Jakava-Viljanen و همکارانش نیز بر روی اثر شرایط بی هوازی و هوازی در بیان ژن پروتئین لایه سطحی در *Lactobacillus brevis* ATCC14869 تحقیق نموده اند (۱۲).

نتیجه گیری:

بطور کلی در بررسی های انجام شده توسط محققین مختلف، مشخص شده که لایه سطحی یک ساختار غیر ثابت در باکتری ها می باشد و بیان ژن آن وابسته به شرایط محیطی است. نتایج حاصله در این تحقیق نیز بیانگر آن است که شرایط گرمخانه گذاری بی هوازی در مقایسه با شرایط ۵ درصد CO_2 برای جداسازی پروتئین لایه سطحی، مطلوب تر می باشد و از طرفی به نظر می رسد که میزان تولید این پروتئین در شرایط بی هوازی نسبت به شرایط ۵ درصد CO_2 بیشتر باشد که شدت رنگ و ضخامت باند مورد نظر دلیلی بر صحت این امر می باشد(شکل ۲). تصور می شود که شرایط گرمخانه گذاری بر روی بیان ژن *slpA* تاثیر گذار باشد و نیز احتمال می رود که در شرایط بی هوازی پیوندهای بین تحت واحدهای S-layer با دیواره سلولی باکتری، سست تر از زمانی است که باکتری در شرایط ۵ درصد CO_2 گرمخانه گذاری می شود، البته این مسئله نیازمند تحقیقات بیشتری می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست مراجع:

1. Boot HJ, Kolen CPA, van Noort JM, and Pouwels PH. S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: purification, expression in *Escherichia coli* and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J Bacteriol* 1993; **175**:6089–6096.
2. Avall-Jaaskelainen S, and Palva A. *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEM Microbiol* 2005; **29**:511–529.
3. Debabov VG. Bacterial and archaeal S-layers as a subject of nanobiotechnology. *Mol Biol* 2004; **38**:578-591.
4. Smit E, Oling F, Demel R, Martinez B, and Pouwels PH. The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356: identification and characterization of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. *J Mol Biol* 2001; **305**: 245-257.
5. Sara M, and Sleytr UB. S-layer proteins. *J Bacteriol* 2000; **182**:859–868.
6. Boot HJ, Kolen CP, Andreadaki FJ, Leer RJ, and Pouwels PH. The *Lactobacillus acidophilus* S-layer protein gene expression site comprises two consensus promoter sequences, one of which directs transcription of stable mRNA. *J Bacteriol* 1996; **178**:5388-5394.
7. Schar-Zammartti P, Dillmann ML, D'Amico N, Affolter M, and Ubbink J. Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 2005; **71**: 8165-8173.
8. Tomas MSJ, Ocana VS, Wiese B, and Nader-Macias ME. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Medical Microbiol* 2003; **52**:1117-1124.
9. Frece J, Kos B, Svetec IK, Zgaga Z, Mrsa V, and Suskovic J. Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* 2005; **98**:285-292.
10. Kim WS, Perl L, Park JH, Tandianus JE, and Dunn NW. Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiol* 2001; **43**:346-350.
11. Sanders ME, and Klaenhammer TR. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J Dairy Sci* 2001; **84**: 319-331.
12. Jakava-Viljanen M, Jaaskelainen SA, Messner P, Sleytr UB, and Palva A. Isolation of three new surface layer protein genes (*slp*) from *Lactobacillus brevis* ATCC14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions. *J Bacteriol* 2002; **184**:6786-6795.
13. Kim WS, Perl L, Park JH, Tandianus JE, and Dunn NW. Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiol* 2001; **43**:346-350.
14. Avall-Jaaskelainen S, and Palva A. *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol* 2005; **29**:511–529.

Archive of SID

www.SID.ir