



Increasing the Efficiency of Gene Transfer in *E. coli* Using Cationic Carbon Nanotubes

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Jahazi Sh.¹ MSc,
Yaghoubi H.*¹ PhD

How to cite this article

Jahazi Sh, Yaghoubi H. Increasing the Efficiency of Gene Transfer in *E. coli* Using Cationic Carbon Nanotubes. Pathobiology Research. 2020;23(1): 41-48.

¹Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

*Correspondence

Address: Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran. Postal Code: 5615731567.
Phone: +98 (45) 33728020
Fax: +98 (45) 33727799
yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

Article History

Received: August 07, 2019
Accepted: June 02, 2020
ePublished: June 22, 2020

ABSTRACT

Aims In recent years, carbon nanotubes have attracted the attention of many researchers because of their unique properties. In the present study, carbon nanotubes were coated using PEI. Then, their ability to gene delivery to *E. coli* cells was examined.

Materials & Methods Nanotube-PEI nanoparticles were synthesized by the reaction between amine groups of PEI and carboxyl groups of nanotubes. In order to prepare the appropriate DNA vector for delivering to *E. coli* cells, the *GusA* gene was transferred from pBI121 to PUC18 vector (pUC-Gus). Nanotube-PEI/DNA complexes were prepared by combining different mass ratios of nanotube-PEI (0.5, 1, and 2 w/w%) with the fixed amount of DNA. To the transformation of *E. coli*, the appropriate amount of nanotube-PEI/DNA complexes was added to *E. coli* cells under stirring at 37°C for 7h. The transformation efficiency of *E. coli* was determined by colony counting on LB agar supplemented with Ampicillin. Moreover, Gus staining assay was used to confirm the function of the plasmid. Determination of cytotoxicity of nanotube-PEI was performed using MTT assay at 6, 24, and 72 hours intervals at different concentrations of nanotube-PEI (10, 100, and 500µg/ml).

Findings The nanotube-PEI was synthesized successfully. Nanotube-PEI nanoparticles have a great ability to protect DNA from enzymatic digestion. The percentage of *E. coli* cells viability was decreased by increasing both the concentration of nanotube-PEI nanoparticles and also the duration of incubation. The results of the agarose gel electrophoresis of plasmid extracted from *E. coli* and digested using EcoRI enzyme showed that the pUC-Gus plasmid has been successfully transfected by nanotube-PEI nanoparticles to *E. coli* bacterial cells.

Conclusion Cationic carbon nanotubes have a high ability to gene transfer to *E. coli*.

Keywords Gene Delivery; *E. coli*; PEI; Carbon Nanotubes

CITATION LINKS

[1] Chemistry of carbon ... [2] High efficiency transformation of Salmonella typhimurium ... [3] An improved protocol for the preparation of yeast cells for ... [4] Site-specific gene expression in vivo by direct gene ... [5] Gene transfer into intact plant cells by electroinjection through ... [6] Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed ... [7] Development of novel drug and gene delivery carriers composed of single-walled carbon nanotubes ... [8] Carbon nanotubes part II: A remarkable carrier for drug ... [9] Design of cationic multiwalled carbon nanotubes as efficient ... [10] Carbon nanotubes as molecular ... [11] Principles of nanoparticle design for overcoming ... [12] Polyaniline-coated halloysite nanotubes: Effect of para-hydroxybenzene ... [13] Ultrasound-enhanced gene delivery to alfalfa cells by hPAMAM dendrimer ... [14] Functionalized carbon nanotubes for plasmid ... [15] Endosomes, lysosomes: Their ... [16] PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: Reduced interaction with blood components, extended circulation ... [17] A pH-responsive mesoporous silica nanoparticles-based multi-drug ... [18] A fluorinated dendrimer achieves excellent gene ... [19] Dendrimer biocompatibility ... [20] Toxicity of cationic lipids and cationic polymers ... [21] Biodegradable nanoparticles for drug and ... [22] Differential transformation efficiencies observed ... [23] An improved system for competent cell preparation ... [24] Optimization of bacterial plasmid transformation ... [25] Trafficking and subcellular localization of ... [26] Nanobiotechnology meets plant cell biology: Carbon ... [27] Simple modifications of branched PEI lead to highly ...

افزایش کارایی انتقال ژن به باکتری *E. coli* با استفاده از نانولوله‌های کربنی کاتیونی

شیدا جهازی MSc

گروه زیست‌شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

هاشم یعقوبی* PhD

گروه زیست‌شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

چکیده

اهداف: در سال‌های اخیر نانولوله‌های کربنی به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده‌اند. در مطالعه حاضر، نانولوله‌های کربنی با استفاده از PEI پوشش داده شدند. سپس توانایی آنها برای انتقال ژن به سلول‌های باکتری/شیریشی‌کلی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: نانوذرات نانولوله-PEI از طریق برهمکنش بین گروه‌های آمین موجود در PEI با گروه‌های کربوکسیل نانولوله‌ها سنتز شدند. به منظور تهیه سازه ژنی مناسب برای انتقال به باکتری *E. coli* ژن *Gus A* از وکتور pBI121 به وکتور PUC-18 انتقال یافت (pUC-Gus). سپس کمپلکس‌های نانولوله-PEI با ترکیب نسبت‌های متفاوت وزنی (درصد وزنی/وزنی) از نانوذرات نانولوله-PEI (۱/۵، ۱/۱ و ۲/۱) با مقدار ثابت از وکتور pUC-Gus تهیه شدند و توسط ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* مقدار مناسبی از کمپلکس نانولوله-PEI-DNA به باکتری‌های *E. coli* اضافه شد. سپس به مدت ۷ ساعت در دمای ۳۷°C شیک شدند. بازه ترانسفورماسیون باکتری‌ها از طریق شمارش کلنی و با استفاده از محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بررسی شد. علاوه بر این از رنگ‌آمیزی Gus به منظور تایید عملکرد پلاسمید ترانسفورم‌شده استفاده شد. تعیین سمیت نانولوله-PEI با استفاده از روش MTT و در بازه‌های زمانی ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف ۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نانوذرات نانولوله-PEI با موفقیت سنتز شدند. نانولوله‌های کربنی کاتیونی از قابلیت بالایی برای محافظت از DNA در برابر آسیب‌های ناشی از آنزیم‌های برشی برخوردار بودند. با افزایش غلظت نانوذرات نانولوله-PEI و همچنین مدت زمان آنکوباسیون، درصد زنده‌مانی باکتری‌ها کاهش یافت. نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز از پلاسمید استخراج‌شده از باکتری‌های ترانسفورم‌شده پس از برش توسط آنزیم EcoRI نشان داد که پلاسمید pUC-Gus با موفقیت توسط نانوذرات نانولوله-PEI به سلول‌های باکتری *E. coli* انتقال یافته‌اند.

نتیجه‌گیری: نانولوله‌های کربنی کاتیونی توانایی بالایی در انتقال ژن به باکتری *E. coli* دارند.

کلیدواژه‌ها: انتقال ژن، *E. coli*، PEI، نانولوله‌های کربنی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۱۳

نویسنده مسئول: yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

مقدمه

ترانسفورماسیون باکتری با استفاده از روش شوک گرمایی (انجماد و ذوب) یکی از پرستفاده‌ترین روش‌ها در سال‌های گذشته بوده است. اساس و پایه اغلب روش‌های انتقال ژن باکتری‌ها براساس مشاهدات مندل در سال ۱۹۷۰ انجام گرفته است [1]. با این حال

این روش از بازه ترانسفورماسیون پایینی برخوردار است. علاوه بر این برای ترانسفورماسیون در اغلب باکتری‌ها و مخمرها قابل استفاده نیست. از روش‌های دیگری که برای ترانسفورماسیون باکتری استفاده می‌شود می‌توان به استفاده از تفنگ ژنی و روش شوک الکتریکی اشاره کرد [2, 3]. کارایی بالای ترانسفورماسیون در این روش‌ها بالاتر از روش انجماد و ذوب است، با این حال به دلیل نیاز به برخی مواد از جمله نانوذرات طلا و همچنین ابزارهای اختصاصی و فراهم‌نبودن این امکانات در بسیاری از آزمایشگاه‌ها استفاده از آنها مقرون به صرفه نیست. با توجه به محدودیت‌های موجود در روش‌های مختلف پژوهشگران همواره به دنبال روش‌های ارزان و سریع‌تر برای انتقال ژن به سلول‌های حاوی دیواره از جمله سلول‌های باکتری، مخمر و گیاهی بوده‌اند [4, 5]. پیشرفت در علوم مواد منجر به طراحی موادی در ابعاد نانو شده است که با برطرف کردن بسیاری از مشکلات و محدودیت‌های موجود در این زمینه می‌تواند پیشرفتی شگرف در عرصه بیوتکنولوژی به وجود آورد. از جمله مهم‌ترین نانوذرات مورد استفاده برای انتقال ماکرومولکول‌هایی از قبیل DNA و پروتئین به درون سلول می‌توان به نانولوله‌های کربن اشاره کرد. این نانوذرات به صورت لوله‌های سیلندرامندی هستند که در انواع مختلف چند جداره و تک جداره وجود دارند و بسته به نوع آنها از قطرهای متفاوتی برخوردار هستند [6, 7]. از جمله مزایای این نانوذرات می‌توان به سهولت در عملگر بودن (هدف‌مندی) سطح آنها اشاره کرد [8]. با توجه به اینکه نانولوله‌های کربنی نامحلول هستند، لازم است برای اتصال به DNA از تکنیک‌های متفاوتی از جمله استفاده از اولتراسوند، اکسیداسیون نانوذرات، کیسه دیالیز و اصلاح سطحی نانوذرات با استفاده از گروه‌های باردار کاتیونی استفاده کرد [9, 10]. نتایج تحقیقات گذشته نشان داده است که نانولوله‌های کربنی به دلیل مورفولوژی منحصر به فرد خود، همانند یک سوزن در ابعاد نانو عمل می‌کنند و از توانایی ایجاد سوراخ در دیواره و غشای سلول برخوردار هستند. این خصوصیت نانولوله‌های کربنی آنها را از سایر نانوناقل‌ها متمایز کرده است، زیرا اکثر نانوناقل‌های مورد استفاده در ژن و دارورسانی براساس پدیده آندوسیتوز دارو یا ژن را به سلول منتقل می‌کنند در حالی که نانولوله‌های کربنی با ایجاد حفره در دیواره و غشای سلول سبب انتقال DNA به سلول می‌شوند [11, 12]. با توجه به اینکه بسیاری از سلول‌ها به دلیل وجود دیواره سلولی از توانایی آندوسیتوز برخوردار نیستند بنابراین استفاده از نانولوله‌های کربنی برای انتقال DNA به سلول‌های دیواره‌دار از قبیل سلول‌های گیاهی و باکتری‌ها بسیار ارزشمند خواهد بود. با توجه به اهمیت ترانسفورماسیون باکتری‌ها در تولید محصولات تجاری و دارویی و همچنین مزیت و توانایی نانولوله‌های کربنی در انتقال ژن به سلول‌های دیواره‌دار، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر توانایی نانولوله‌های کربنی کاتیونی در انتقال DNA پلاسمید به سلول‌های باکتری *E. coli* انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور سنتز نانولوله‌های کربنی کاتیونی، ۲/۰ گرم N- (۳- دی‌متیل‌آمینوپروپیل)- NO- اتیل‌کربودی‌ایمیدهیدروکلراید به همراه ۲/۰ گرم N- هیدروکسی‌سوکسینیمید به ۱۵۰ میلی‌لیتر متانول حاوی ۳۰ میلی‌گرم نانولوله کربنی حاوی گروه کربوکسیل اضافه و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق مخلوط شد. سپس ۲/۰ گرم پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI) به محلول فوق اضافه و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق مخلوط شد. نانوذرات حاصل توسط سانتریفیوژ جداسازی شدند و به منظور جداسازی پلیمرهای بارگذاری‌نشده چندین بار توسط متانول مورد شست‌وشو قرار گرفتند و نهایتاً در دمای اتاق و تحت خلأ خشک شدند.

به منظور تهیه سازه ژنی مناسب برای انتقال به باکتری *E. coli* ژن *Gus A* از وکتور pBI121 به وکتور PUC-18 انتقال یافت (pUC-Gus) و به این ترتیب از پلاسمید نوترکیب pUC-Gus استفاده شد. در واقع این پلاسمید از ترکیب دو وکتور pBI 121 و pUC 18 و براساس روش /مانی و همکاران تهیه شد [13].

برای آماده‌سازی کمپلکس نانولوله- PEI- DNA، ابتدا متیل‌الکل نانولوله توسط روتاری حذف شد. سپس یک میلی‌گرم نانولوله در یک میلی‌لیتر بافر فسفات (۲۲ میلی‌مولار Na_2HPO_4 ، ۲۸ میلی‌مولار NaH_2PO_4 با pH= ۷/۴) حل و به منظور همگن شدن ذرات به مدت ۱۰ دقیقه سونیکه شد. کمپلکس نانولوله- PEI- DNA با ترکیب ۵ میکروگرم pUC-Gus DNA در نسبت‌های ۵/۰، ۱ و ۲ نانولوله به DNA و ورتکس به مدت یک دقیقه تهیه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 25°C نگهداری شدند. برای تایید برهمکنش DNA با نانولوله‌ها نمونه‌های حاصل به مدت ۲ ساعت توسط ژل آگارز ۰/۸٪ با ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شدند.

کمپلکس نانولوله- PEI- DNA در نسبت‌های صفر (DNA پوشش‌داده‌نشده با نانولوله- PEI)، نسبت‌های ۵/۰، ۱ و ۲ تهیه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. به هر کدام از تیمارها میزان یک واحد آنزیم EcoRI و همچنین یک واحد آنزیم HindIII اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای 37°C در بن‌ماری نگهداری شدند. به منظور غیرفعال کردن آنزیم‌ها پس از یک ساعت تیمار با DNA، ۲۰ میکرولیتر EDTA ۵/۰ مولار به هر کدام از نمونه‌ها اضافه شد. برای جدا کردن نانولوله- PEI از DNA به هر نمونه ۳۰ میکرولیتر SDS ۱۵٪ اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 25°C نگهداری شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر هیپارین ۳٪ به هر کدام از تیمارها اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای 25°C نگهداری شدند. برای تعیین اثر نانولوله- PEI در محافظت از DNA پلاسمیدی در برابر هضم آنزیمی، هر کدام از نمونه‌های تیمار شده پس از رسوب توسط اتانول و خشک شدن از طریق فریزدراینگ، در ۳۰ میکرولیتر بافر TE حل و به همراه نمونه شاهد، به مدت ۲ ساعت با ولتاژ ۸۰ توسط ژل آگارز ۰/۸٪ الکتروفورز شدند.

کمپلکس نانولوله- PEI- DNA با ترکیب DNA با نانولوله- PEI در

نسبت ۱ به ۲ با کلریدسدیم ۱۵۰ میلی‌مولار تهیه شد. سپس برای مشاهده توسط میکروسکوپ الکترونی روی لامل پخش و توسط فریزدراینگ خشک شد.

به منظور تعیین سمیت نانولوله- PEI با استفاده از تست MTT، یک میلی‌لیتر باکتری *E. coli* با تراکم مناسب به داخل میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شد و در بازه‌های زمانی ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف (۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم) نانولوله- PEI در سه تکرار تیمار شدند. سپس برای محاسبه درصد زنده‌مانی هر یک از تیمارها از تست MTT استفاده شد.

باکتری *E. coli* در مرحله مناسبی از رشد به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شدند. برای ترانسفورماسیون این سلول‌ها با استفاده از نانولوله- PEI، از محیط LB مایع استفاده شد. باکتری‌ها به‌طور جداگانه به ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط LB مایع، به همراه ۵۰۰ میکرولیتر کمپلکس نانولوله- PEI- DNA در نسبت‌های ۱ و ۲ (با غلظت ثابت ۵ میکروگرم DNA برای هر تیمار) منتقل شدند. سپس تیوب‌ها ۷ ساعت در دمای 25°C تکان داده شدند و نهایتاً باکتری‌ها از محلول برداشته شدند و توسط محیط LB مورد شست‌وشو قرار گرفتند.

به منظور تایید ترانسفورماسیون باکتری *E. coli*، ابتدا باکتری‌ها به میزان ۱۰ هزار برابر رقیق شدند. سپس ۵۰ میکرو لیتر از هر کدام از تیمارها روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک گزینشگر (محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) انتقال داده و محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C نگهداری شدند. مقداری از کلونی‌های رشد کرده روی محیط گزینشگر برداشته و به‌طور جداگانه در ۲۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت پلاسمید موجود در باکتری‌ها با استفاده از روش مینی‌پرپ استخراج شد و پس از برش توسط آنزیم EcoRI توسط ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور تایید فعالیت ژن *GUS* از رنگ‌آمیزی باکتری‌ها با استفاده از سوبسترای آنزیم بتا‌گلوکورونیداز استفاده شد. به منظور بررسی درصد ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* از سلول‌های بدون تیمار با نانولوله‌های کربنی و به‌عنوان شاهد استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 و Excel انجام شد. پس از انجام آزمایش از آنالیز واریانس یک‌طرفه برای محاسبه معنی‌داری و همچنین از تست دانکن برای مقایسه معنی‌داری بین میانگین هر کدام از تیمارها با گروه کنترل استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها با حداقل سه تکرار انجام شدند و نتایج به‌صورت میانگین آماری ارائه شد.

یافته‌ها

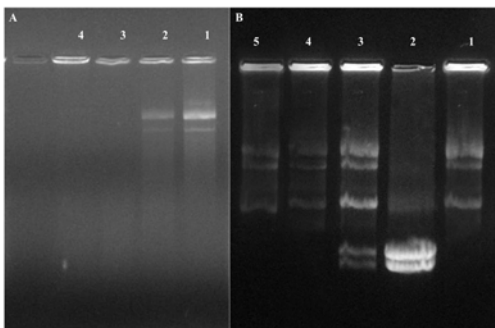
نمودار ۱، طیف‌سنجی FTIR از نانولوله‌های کربنی حاوی گروه کربوکسیلیک‌اسید (نانولوله- COOH) و همچنین نانولوله‌های کربنی اصلاح‌شده توسط PEI (نانولوله- PEI) را نشان می‌دهد.

مدت‌زمان تیمار و غلظت نانوذرات، بازده زنده‌مانی سلول‌های *E. coli* کاهش می‌یابد (نمودارهای A-۲ و B-۲). میزان زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت 10^6 میکروگرم بر میلی‌لیتر برابر با ۲۷/۲۲٪ بود که به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد سبب کاهش زنده‌مانی باکتری شد. بیشترین مرگ باکتری‌ها در تیمار غلظت، در غلظت 10^6 میکروگرم در میلی‌لیتر (۶۸/۵۳٪) مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از درصد مرگ باکتری‌ها در سایر غلظت‌های نانولوله کربنی کاتیونی بود. روند کاهش درصد باکتری‌های زنده در زمان‌های مختلف مشابه کاهش درصد باکتری‌های زنده در غلظت‌های متفاوت نانولوله‌های کربنی کاتیونی بود، به‌طوری که بین افزایش غلظت نانولوله‌ها و مدت‌زمان تیمار، بازنده‌مانی باکتری‌ها رابطه‌ای قابل پیش‌بینی وجود داشت (نمودار B-۲).

مقایسه میانگین درصد باکتری‌های زنده در ترکیب تیماری غلظت نانولوله‌ها و مدت‌زمان تیمار باکتری‌ها نشان داد که بیشترین درصد زنده‌مانی باکتری‌ها در تیمار زمان ۶ ساعت و غلظت 10^6 میکروگرم در میلی‌لیتر (۸۳/۱۳٪) حاصل شد. در صورتی که در تیمار زمان ۷۲ ساعت و غلظت 10^6 میکروگرم در میلی‌لیتر کمترین درصد زنده‌مانی باکتری‌های *E. coli* (۱/۳۶٪) در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد (نمودار C-۲).

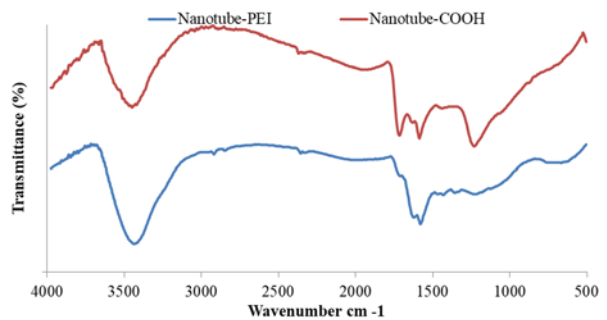
به‌منظور بررسی ساختار مورفولوژی نانولوله-PEI-DNA، از میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده شد. این تصاویر نشان دادند که نانوذرات نانولوله-PEI-DNA از ساختاری لوله‌مانند برخوردار هستند (شکل ۲).

نتایج تصویربرداری ژل آگارز و همچنین رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی بیانگر توانایی نانولوله‌های کربنی کاتیونی در انتقال ژن به باکتری *E. coli* بود. افزایش نسبت نانولوله‌ها و DNA تاثیر معنی‌داری بر بازده ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* داشت، به نحوی که با افزایش نسبت نانولوله به DNA درصد انتقال ژن افزایش یافت. با این حال بیشترین میزان بازده انتقال ژن در نسبت برابر نانولوله به DNA مشاهده شد (۲/۴۶٪). افزایش غلظت نانولوله‌های کربنی به دو برابر غلظت DNA، سبب کاهش بازده انتقال ژن شد (شکل ۳ و نمودار ۳).



شکل ۱ A: تایید برهمکنش بین نانولوله-PEI و DNA؛ چاهک اول؛ DNA؛ چاهک دوم تا چهارم؛ به ترتیب نسبت ۱، ۵/۰ و ۲ نانولوله به DNA؛ B: تعیین اثر نانولوله کربنی در محافظت از هضم آنزیمی DNA پلاسمیدی توسط آنزیم‌های EcoRI و HindIII؛ چاهک اول؛ DNA؛ چاهک دوم تا پنجم؛ نانولوله-PEI-DNA در نسبت‌های صفر، ۱، ۵/۰ و ۲ نانولوله به DNA

طیف مربوط به گروه کربوکسیلیک‌اسید در نانولوله‌های کربنی حاوی کربوکسیلیک‌اسید در محدوده 1716cm^{-1} مشاهده شد. پس از اتصال PEI به نانولوله‌های کربنی پیک‌های جدیدی در محدوده 1632 و 1581cm^{-1} مشاهده شدند که این پیک‌ها به ترتیب نشان‌دهنده گروه آمینوکربونیل و NeH بودند. همچنین پیک‌های دیگر ظاهر شده در محدوده 2921 و 2851cm^{-1} نشان‌دهنده گروه C-H بودند. علاوه بر این شدت پیک مربوط به گروه کربوکسیلیک‌اسید در محدوده 1716cm^{-1} پس از اتصال نانولوله‌های کربنی حاوی گروه کربوکسیلیک‌اسید به PEI به شدت کاهش یافت. بنابراین، این نتایج نشان داد که سنتز نانولوله‌های کربنی حاوی PEI به‌صورت موفق انجام شده است.

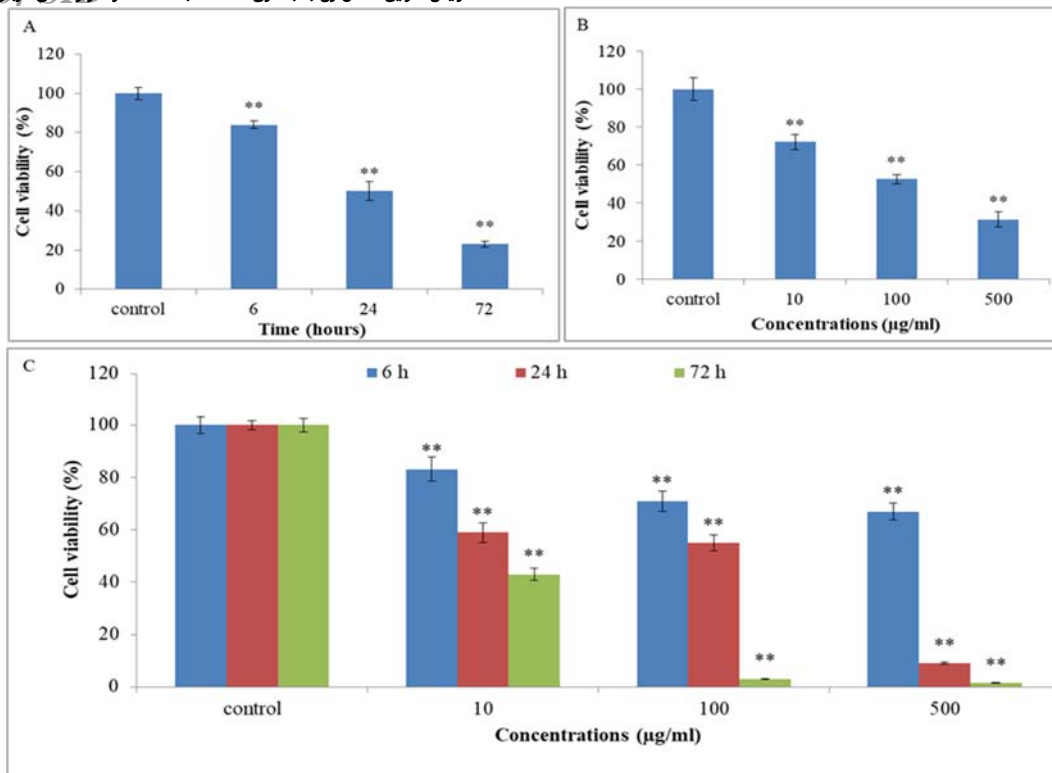


نمودار ۱) طیف‌سنجی FTIR از نانولوله-COOH و نانولوله-PEI

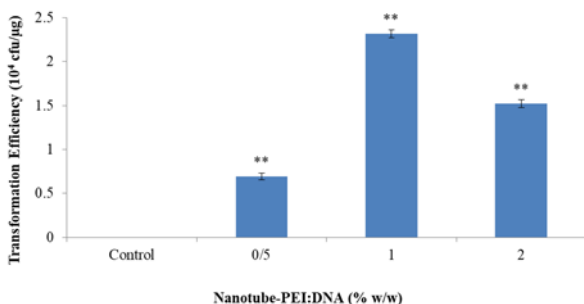
نتایج ژل آگارز حاصل از نمونه‌های نانولوله-PEI-DNA در نسبت‌های مختلف نشان داد که افزایش تدریجی نانولوله-PEI نسبت به DNA، به تدریج از حرکت DNA می‌کاهد، به‌طوری که در نسبت‌های بالاتر یک اختلاف باندهای تیمار شده با نانولوله‌های کربنی نسبت به باندهای DNA شاهد، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و حرکت DNA به‌طور کامل متوقف شد. این نتیجه نشان می‌دهد در اثر افزایش نسبت نانولوله‌های کربنی به DNA به تدریج از میزان بار منفی DNA کاسته می‌شود و با افزایش تدریجی نانولوله‌های کربنی کاتیونی تا خنثی‌شدن کامل بارهای منفی DNA ادامه می‌یابد (شکل A-۱).

پوشش DNA با نانولوله-PEI آن را به‌طور موثری از هضم توسط آنزیم‌های تجزیه‌کننده محافظت می‌کند. تصویر حاصل از ژل آگارز مربوط به DNA و کمپلکس‌های نانولوله-PEI-DNA تیمار شده با آنزیم‌ها نشان داد، این آنزیم‌ها با هضم DNA آن را به دو قطعه تبدیل می‌کنند. این قطعات به دلیل اندازه کوچک خود، با سرعت بیشتری در مقایسه با DNA شاهد به سمت قطب مثبت حرکت کردند که در نتیجه در سطح پایین‌تری از DNA شاهد قرار گرفتند. با مقایسه باندهای حاصل از DNA شاهد و باندهای مربوط به DNA پوشش داده شده توسط نانولوله‌های کربنی در نسبت‌های ۵/۰ تا ۲ نانولوله به DNA مشخص شد، آنزیم‌های برشی به دلیل پوشش DNA توسط نانولوله‌ها از توانایی برش آن برخوردار نبودند (شکل B-۱).

نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت نانولوله‌ها و مدت‌زمان تیمار بر درصد زنده‌مانی باکتری‌ها نشان داد که به‌طورکلی با افزایش



نمودار ۲) مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی باکتری *E. coli* پس از تیمار با نانولوله‌های کربنی کاتیونی در مدت‌زمان‌ها (A) و غلظت‌های متفاوت (B); مقایسه میانگین درصد باکتری‌های زنده در ترکیب تیماری غلظت نانولوله‌ها و مدت‌زمان تیمار باکتری‌ها (C). علامت ** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱% است.

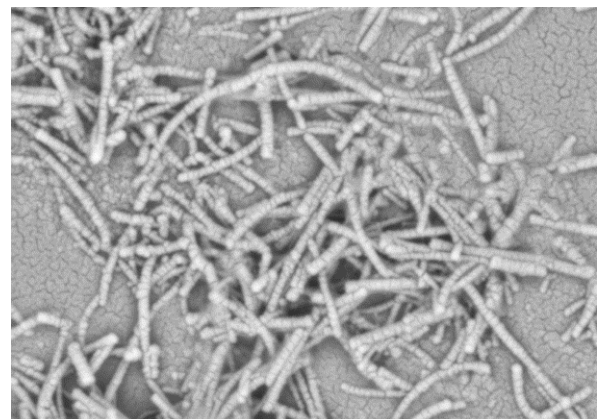


نمودار ۳) مقایسه میانگین بازده ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* پس از تیمار با نانوذرات نانولوله-PEI-DNA حاوی نسبت‌های متفاوت نانولوله به DNA.

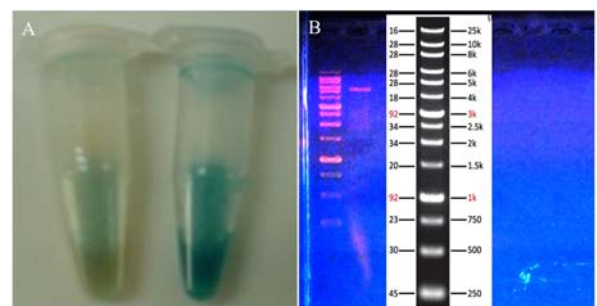
بحث

نانولوله‌های کربنی ویژگی و معماری منحصر به فردی دارند که این نانوذرات را به مواد مناسبی برای انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی تبدیل کرده است. از ویژگی‌های مهم این نانوذرات نسبت به سایر نانوناقل‌ها، می‌توان به معماری متفاوت، نسبت بالای سطح به حجم، توانایی این نانوذرات در ایجاد حفره و همچنین توانایی نانولوله‌های کربنی برای هدفمند کردن اشاره کرد [14].

با توجه به مکانیزم عمل نانولوله‌های کربنی به نظر می‌رسد فشرده‌سازی DNA توسط این نانوذرات، سبب کاهش سطح تماس DNA با آنزیم‌های برشی می‌شود که در نتیجه DNA پوشش‌دار شده با نانولوله‌های کربنی نسبت به DNA فاقد پوشش (DNA شاهد) آسیب کمتری می‌بیند. طبق نتایج گزارش شده بیش



شکل ۲) تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از کمپلکس نانولوله-PEI-DNA تهیه‌شده در نسبت ۲ نانولوله-PEI به DNA



شکل ۳) A: رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی باکتری ترانسفورم شده توسط نانولوله‌های کربنی و باکتری تیمار شده با DNA بدون استفاده از نانولوله‌های کربنی؛ B: ژل آگارز از پلاسمید برش‌یافته باکتری *E. coli* توسط آنزیم EcoRI پس از ترانسفورماسیون توسط نانولوله‌های کربنی

باردار و نهایتاً تغییر خاصیت باری در هر پلیمر می‌شود، به طوری که می‌تواند رفتار آن را نسبت به DNA تغییر دهد.

مطالعات گذشته نشان داده‌اند که اغلب نانوذرات کاتیونی در نسبت استوکیومتری ۱:۱ آمین به فسفات، توانایی اتصال به DNA را دارند. اما این نسبت DNA به نانوناقل‌های کاتیونی برای ترانسفکشن مناسب نیست، زیرا کمپلکس ایجاد شده در این نسبت بسیار ناپایدار است و اغلب تشکیل کمپلکس پایدار و کارا در نسبت‌های استوکیومتری بالاتر از ۱:۱ آمین به فسفات قابل تشکیل است. اگرچه برهمکنش بین نانوذرات کاتیونی یا تثبیت متعادل DNA در نسبت استوکیومتری کمتر از ۱ نیز مشاهده می‌شود، با این وجود در نسبت‌های بالاتر از ۱ نانوذره و DNA کمپلکس‌های مناسب‌تری از لحاظ پایداری، اندازه و شکل را تشکیل می‌دهند که این کمپلکس‌ها مناسب‌ترین ترکیبات برای انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی هستند^[18]. با توجه به اینکه اتصال PEI به نانولوله‌های کربنی سبب به هم خوردن تعادل بین وزن نانوذرات و میزان آمین موجود در سطح نانوذرات می‌شود، محاسبه نسبت نیتروژن به فسفات (N/P) مشکل است. بنابراین در مطالعه حاضر به نتایج ژل آگارز برای تشخیص نسبت استوکیومتری مناسب به منظور تشکیل کمپلکس پایدار استناد شد (شکل ۱- A).

با وجود کارایی بالای نانوناقل‌های کاتیونی از مشکلات اصلی آنها می‌توان به سمیت بالا و زیست‌تخریب‌پذیری کمتر در مقایسه با سایر نانوحامل‌ها اشاره کرد. نتایج تحقیقات گذشته نشان داده است که تعامل‌های الکترواستاتیکی بین نانوناقل‌های کاتیونی و سطح آنیونی غشای سلولی، از اهمیت بالایی برای جذب کمپلکس‌های DNA- نانوناقل به سلول‌ها برخوردار است. با این حال، این برهمکنش‌های غشایی از لحاظ سمیت بسیار مهم هستند، زیرا سبب آسیب مستقیم به سلول‌های هدف می‌شوند^[19]. نانولوله‌های کربنی در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با پلیمرهای کاتیونی مانند PEI، PLL و یا دکستران، از سمیت کمتری برخوردار هستند^[20]. در گذشته از چهار جزئی‌سازی (تبدیل به ترکیب چهار جزئی) به منظور کاهش سمیت نانوناقل‌ها استفاده می‌شد. با این حال این استراتژی برای کمپلکس‌ها پیچیده است و می‌تواند برخی فاکتورها از قبیل مورفولوژی، پایداری و برخی دیگر از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کمپلکس از قبیل رهایش را دستخوش تغییر قرار دهد. نانوناقل‌های آنیونی برخلاف انواع کاتیونی آنها، از سمیت کمتری برخوردار هستند، به طوری که عدم سمیت آنها بر روی سلول‌های یوکاریوتی در طول یک محدوده وسیع از غلظت نانوناقل، گزارش شده است. با این حال حتی نانوناقل‌های آنیونی نیز در وزن‌های مولکولی بالا می‌توانند از سمیت قابل ملاحظه‌ای برخوردار باشند^[21].

به منظور مقایسه بهتر بازده ترانسفورماسیون نسبت به مطالعات گذشته، درصد بازده انتقال ژن براساس تعداد باکتری‌های ترانسفورم شده نسبت به یک میکروگرم DNA بیان شد. بازده

از ۹۹% DNA منتقل شده به سلول توسط مکانیزم دفاعی سلول از بین می‌رود^[15].

در مطالعه حاضر، نتایج نشان داد که نانولوله‌های کربنی کاتیونی از توانایی بالایی در محافظت از DNA در برابر آنزیم‌های برشی برخوردار هستند (شکل ۱- B). به نظر می‌رسد این نانوذرات با اتصال به DNA اجازه اتصال آنزیم مخرب به رشته DNA را نمی‌دهند که در نتیجه آنزیم از توانایی اتصال به DNA و برش آن برخوردار نخواهد بود.

با توجه به وجود گروه فسفر در ساختار DNA، حرکت DNA در ژل آگارز به سمت قطب مثبت انجام می‌گیرد. زمانی که اندازه DNA در تمامی تیمارها یکسان باشد می‌توان چنین گفت که علت اختلاف بین حرکت DNA با اندازه یکسان در ژل آگارز ناشی از خنثی شدن بار منفی آن توسط ترکیبات متفاوتی از جمله کلسیم و نانوذرات کاتیونی است. با توجه به آنچه گفته شد می‌توان چنین نتیجه گرفت که اختلاف سطح باندهای DNA بر روی ژل آگارز در DNA تیمار شده با نانولوله-PEI، ناشی از کاهش بار منفی DNA توسط بار مثبت PEI متصل شده به نانولوله است. تصاویر مربوط به ژل آگارز از کمپلکس نانولوله DNA نشان داد که در نتیجه افزایش نانولوله‌های کربنی نسبت به DNA از سرعت حرکت DNA تیمار شده با نانولوله-PEI نسبت به DNA شاهد (DNA فاقد پوشش توسط نانولوله‌های کربنی)، بر روی ژل آگارز کاسته شد، به طوری که DNA در نسبت وزنی/وزنی برابر نانولوله به DNA به طور کامل از حرکت بازمی‌ایستد (شکل ۱- A). فرآیند ایجاد کمپلکس بین نانولوله‌های کربنی کاتیونی و DNA مشابه سایر پلیمرهای کاتیونی از قبیل PAMAM و PLL و براساس برهمکنش‌های الکترواستاتیکی بین بار منفی گروه فسفر در DNA و بار مثبت گروه آمین در نانوناقل‌های کاتیونی است. بنابراین به نظر می‌رسد ایجاد برهمکنش بین DNA و نانولوله‌های کربنی کاتیونی براساس تعامل الکترواستاتیکی بین DNA و PEI موجود در سطح نانولوله‌های کربنی باشد و فاقد هر گونه اختصاصیت توالی در DNA است^[16].

نتایج تحقیقات گذشته نشان داده است در طول ایجاد کمپلکس DNA با نانوذرات کاتیونی، بار منفی DNA خنثی و به یک پیکربندی فشرده‌تری تبدیل می‌شود. این فرآیند با گروه‌های آمین موجود در سطح نانوذرات کاتیونی که دارای بار مثبت هستند و همچنین گروه‌های فسفات اسیدنوکلیتیک که دارای بار منفی هستند انجام می‌پذیرد. ماهیت کمپلکس نانوذرات با DNA نه تنها بستگی به غلظت فسفات‌های DNA، استوکیومتری و گروه‌های آمینی سطح نانوذرات دارد بلکه به ویژگی‌های توده‌ای و عمومی حلال مورد استفاده (از قبیل pH، غلظت نمک و قدرت بافر) و حتی دینامیک ترکیب بستگی زیادی دارد^[17]. با توجه به اینکه PEI موجود در سطح نانولوله‌های کربنی سنتز شده در مطالعه حاضر از گروه نانوذرات حساس به pH هستند، تغییر یون هیدروژن در بافر کمپلکس، سبب تغییر تعداد گروه‌های آمین

منابع

- 1- Tasis D, Tagmatarchis N, Bianco A, Prato M. Chemistry of carbon nanotubes. Chem Rev. 2006;106(3):1105-36.
- 2- O'Callaghan D, Charbit A. High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation. Mol Gen Genet MGG. 1990;223(1):156-8.
- 3- Thompson JR, Register E, Curotto J, Kurtz M, Kelly R. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. Yeast. 1998;14(6):565-71.
- 4- Nabel EG, Plautz G, Nabel GJ. Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall. Science. 1990;249(4974):1285-8.
- 5- Hiromichi M, Asako I, Chiaki M, Masato I, Yasuyuki Y. Gene transfer into intact plant cells by electroinjection through cell walls and membranes. Gene. 1986;41(1):121-4.
- 6- Kwak SY, Lew TT, Sweeney CJ, Koman VB, Wong MH, Bohmert-Tatarev K, et al. Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers. Nat Nanotechnol. 2019;14(5):447-55.
- 7- Ohta T, Hashida Y, Yamashita F, Hashida M. Development of novel drug and gene delivery carriers composed of single-walled carbon nanotubes and designed peptides with PEGylation. J Pharm Sci. 2016;105(9):2815-24.
- 8- Karimi M, Solati N, Ghasemi A, Estiar MA, Hashemkhani M, Kiani P, et al. Carbon nanotubes part II: A remarkable carrier for drug and gene delivery. Expert Opin Drug Deliv. 2015;12(7):1089-105.
- 9- Guo Ch, Al-Jamal WT, Toma FM, Bianco A, Prato M, Al-Jamal KT, et al. Design of cationic multiwalled carbon nanotubes as efficient siRNA vectors for lung cancer xenograft eradication. Bioconjugate Chem. 2015;26(7):1370-9.
- 10- Liu Q, Chen B, Wang Q, Shi X, Xiao Z, Lin J, et al. Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. Nano Lett. 2009;9(3):1007-10.
- 11- Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. Nat Biotechnol. 2015;33(9):941-51.
- 12- Razak SI, Sharif NF, Muhamad II. Polyaniline-coated halloysite nanotubes: Effect of para-hydroxybenzene sulfonic acid doping. Compos Interfaces. 2014;21(8):715-22.
- 13- Amani A, Zare N, Asadi A, Asghari Zakaria R. Ultrasound-enhanced gene delivery to alfalfa cells by hPAMAM dendrimer nanoparticles. Turk J Biol. 2018;42(1):63-75.
- 14- Pantarotto D, Singh R, McCarthy D, Erhardt M, Briand JP, Prato M, et al. Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. Angewandte Chemie. 2004;116(39):5354-8.
- 15- Wattiaux R, Laurent N, Wattiaux-De Coninck S, Jadot M. Endosomes, lysosomes: Their implication in gene transfer. Adv Drug Deliv Rev. 2000;41(2):201-8.
- 16- Ogris M, Brunner S, Schüller S, Kircheis R, Wagner E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: Reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. Gene Ther. 1999;6(4):595-605.
- 17- He Q, Gao Y, Zhang L, Zhang Z, Gao F, Ji X, et al. A pH-responsive mesoporous silica nanoparticles-based multi-

ترانسفورماسیون در باکتری‌ها بسته به نوع باکتری، اندازه DNA، روش ترانسفورماسیون و غلظت مواد مورد استفاده متفاوت است [22-24]. به‌عنوان مثال همان‌طور که در نتایج مطالعه حاضر مشاهده شد، بازده ترانسفکشن بین نانولوله‌های کربنی کاتیونی حاوی DNA به‌طور معنی‌داری با افزایش نسبت نانولوله‌ها به DNA تغییر می‌کند. از این رو نتیجه‌گیری در ارتباط با بررسی کارایی روش‌های مختلف برای انتقال ژن به باکتری مشکل و نیازمند انجام آزمایش‌های بیشتر و دقیق‌تری است. با این حال ذکر این نکته که نانولوله‌های کربنی از جمله نانوذرات محدودی هستند که توانایی انتقال به سلول‌های دیواره‌دار از قبیل سلول‌های باکتریایی و حتی سلول‌های گیاهی که دیواره بسیار ضخیم‌تری در مقایسه با پروکاریوت‌ها را دارند، ضروری به نظر می‌رسد [25, 26]. این توانایی منحصر به فرد نانولوله‌های کربنی می‌تواند در انتقال ژن به باکتری و مخمرهایی که انتقال ژن به آنها براساس روش‌های مرسوم مشکل به نظر می‌رسد، مفید واقع شود. اگرچه در این مطالعه با افزایش غلظت نانولوله‌های کربنی کاتیونی و همچنین مدت‌زمان تیمار این نانوذرات با باکتری *E. coli*، میزان سمیت نیز افزایش یافت (نمودار ۲)، با این حال با توجه به تحقیقات گذشته میزان سمیت این نانوذرات در غلظت‌های مورد استفاده در مقایسه با پلیمر PEI بسیار کم است [27]. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از کمپلکس نانولوله-DNA-PEI نشان داد که این نانوذرات از ساختار لوله‌مانند برخوردار هستند. این نتایج با نتایج لیو و همکاران مطابقت داشت [10]. این ساختار این امکان را به نانوذرات می‌دهد تا همانند سوزن‌هایی در ابعاد نانو عمل کنند و از دیواره و غشای سلول عبور کنند. علاوه بر نسبت نانوناقل به DNA، مورفولوژی و شرایط محیط ترانسفورماسیون (از قبیل دما، pH و غیره)، عوامل متعدد دیگری نیز از قبیل خصوصیات فیزیولوژیکی سلول و اندازه DNA بر بازده انتقال ژن با استفاده از نانوذرات تأثیرگذار هستند.

نتیجه‌گیری

نانولوله‌های کربنی کاتیونی در ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* توانایی بالایی دارند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل که در اجرای هر چه بهتر مطالعه یاری کردند صمیمانه سپاسگزاری می‌کنند.

تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: شیدا جهازی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ هاشم یعقوبی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۶۰٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل و فاقد حمایت مالی است.

- improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electron J Biotechnol.* 2005;8(1):113-20.
- 24- Tan H, Fu L, Seno M. Optimization of bacterial plasmid transformation using nanomaterials based on the Yoshida effect. *Int J Mol Sci.* 2010;11(12):4962-72.
- 25- Serag MF, Kaji N, Gaillard C, Okamoto Y, Terasaka K, Jabasini M, et al. Trafficking and subcellular localization of multiwalled carbon nanotubes in plant cells. *ACS Nano.* 2011;5(1):493-9.
- 26- Serag MF, Kaji N, Habuchi S, Bianco A, Baba Y. Nanobiotechnology meets plant cell biology: Carbon nanotubes as organelle targeting nanocarriers. *RSC Adv.* 2013;3(15):4856-62.
- 27- Zintchenko A, Philipp A, Dehshahri A, Wagner E. Simple modifications of branched PEI lead to highly efficient siRNA carriers with low toxicity. *Bioconjugate Chem.* 2008;19(7):1448-55.
- drug delivery system for overcoming multi-drug resistance. *Biomaterials.* 2011;32(30):7711-20.
- 18- Wang M, Liu H, Li L, Cheng Y. A fluorinated dendrimer achieves excellent gene transfection efficacy at extremely low nitrogen to phosphorus ratios. *Nat Commun.* 2014;5(1):3053.
- 19- Duncan R, Izzo L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(15):2215-37.
- 20- Lv H, Zhang Sh, Wang B, Cui Sh, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Controll Release.* 2006;114(1):100-9.
- 21- Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(3):329-47.
- 22- Lim G, Lum D, Ng B, Sam Ch. Differential transformation efficiencies observed for pUC19 and pBR322 in *E. coli* may be related to calcium chloride concentration. *J Exp Microbiol Immunol.* 2015;20:1-6.
- 23- Tu Z, He G, Li KX, Chen MJ, Chang J, Chen L, et al. An