

## همسانه‌سازی و بیان یک پپتید ضد میکروبی امیگانان در توتون و سیب زمینی برای مقابله با میکروب‌های بیماری‌زای انسانی

فرهاد نظریان فیروزآبادی<sup>۱،۲\*</sup> اعظم بدرحداد<sup>۳</sup>، علی شیخیان<sup>۴</sup>

۱-مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۲-استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۳-دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۴-دانشیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

یافته / دوره بیستم / شماره ۴ / زمستان ۹۷ / مسلسل ۷۸

### چکیده

دریافت مقاله: ۹۷/۲/۲۵ پذیرش مقاله: ۹۷/۹/۱۲

مقدمه: پپتیدهای ضد میکروبی یکی از اجزاء مهم سیستم ایمنی ذاتی گیاهان و جانوران محسوب می‌شوند. شناسایی، انتقال و بیان پپتیدهای ضد میکروبی جدید با استفاده از فن‌آوری‌های DNA نوترکیب در گیاهان، یک راهکار مقرون به صرفه برای تولید ترکیبات ضد میکروبی با مصارف دارویی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، یک سامانه‌ی ژنی حاوی یک ژن پپتید ضد میکروبی امیگانان به کمک اگروباکتریوم تومفاشینز به دو گیاه توتون و سیب زمینی انتقال داده شد. پس از کشت بافت، حضور ژن کد کننده‌ی پپتید ضد میکروبی به کمک PCR اثبات و تعدادی گیاه تراریخت از هر دو گیاه انتخاب شدند. پروتئین کل از گیاهان تراریخت انتخابی استخراج و تاثیر آن بر برخی میکروب‌های مهم انسانی: *Escherichia coli*، *Staphylococcus epidermis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Salmonella typhi*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* و *Candida albicans* به روش انتشار در دیسک بررسی شد.

یافته‌ها: پروتئین کل گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاه غیر تراریخت، به طور معنی‌داری ( $P < 0/01$ ) مانع رشد بیشتر میکروب‌ها شد. تفاوت معنی‌داری ( $P < 0/01$ ) بین گیاهان تراریخت از نظر میزان بازدارندگی از رشد میکروب‌ها مشاهده شد. برخلاف باکتری‌های گرم منفی، حضور پپتید امیگانان در عصاره گیاهان تراریخت تاثیر معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) روی باکتری‌های گرم مثبت نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری: عصاره پروتئینی گیاهان بیان کننده‌ی پپتید امیگانان از رشد میکروب‌های بیماری‌زای انسانی جلوگیری کرد. با خالص سازی پپتید می‌توان از این پپتید به عنوان یک پپتید با توانایی ضد میکروبی استفاده کرد. این روش فرصتی را فراهم می‌آورد تا پپتیدهای ضد میکروبی را در گیاهان برای مصارف در صنایع داروسازی تولید نمود.

واژگان کلیدی: اگروباکتریوم تومفاشینز، پاتوژن، پپتید ضد میکروبی، پروتئین نوترکیب، توتون.

\*آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی.

پست الکترونیک: Nazarian.f@lu.ac.ir

## مقدمه

پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial Peptides) مولکول‌های فعال زیستی هستند که بخشی از سیستم دفاع ذاتی موجودات زنده محسوب می‌شوند. این مولکول‌های مهم حیاتی، در طیف وسیعی از جانداران از باکتری‌ها تا موجودات عالی تولید می‌شوند و بخش مهمی از سیستم پاسخ ایمنی جانداران محسوب می‌شوند (۱). پپتیدهای ضد میکروبی دارای اثرات متعددی از جمله اثرات ضد اندوتوکسین، اثرات آنتی بیوتیکی و ضد قارچی هستند (۲). اگرچه هنوز مکانیسم دقیق عمل پپتیدهای ضد میکروبی معلوم نیست، اما به نظر می‌رسد که به دلیل میزان کم کلاسترول و بار منفی دیواره سلولی در غشا پلاسمایی موجودات هدف، یک برهمکنش الکترواستاتیک بین پپتید و دیواره صورت می‌گیرد که این موضوع به روش‌های مختلفی سبب تخریب دیواره سلول هدف و در نهایت مرگ آنها می‌شود. از این رو، به نظر می‌رسد که این مکانیسم عمل منحصر بفرد، بتواند بسیاری از خواص بالینی مطلوب پپتیدهای ضد میکروبی را از نظر زیست‌شناسی توضیح دهد (۳).

در یک دهه گذشته، محققان و شرکت‌های داروسازی مهم بین‌المللی، از توانایی پپتیدهای ضد میکروبی برای مهار عوامل بیماری‌زا در ترکیب مواد دارویی استفاده کرده‌اند. تاکنون از تعدادی از این پپتیدها و آنالوگ‌های مصنوعی آنها برای درمان برخی از بیماری‌ها استفاده شده است. برای مثال، از پپتیدهای امیگانانی مانند MBI-226 و MBI-594AN در عفونت‌های بیمارستانی، آکنه و سایر بیماری‌های میکروبی استفاده شده است. به علاوه، از پپتید PG-1 در درمان بیماری‌های حاصل از باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (با خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک) و پپتید P-113 به عنوان دهان‌شویه و مؤثر در درمان پلاک‌های دندانی و ژئوویت نیز استفاده

شده است. همه این پپتیدها پس از گذر از آزمایش‌های بالینی مورد تأیید، وارد بازار دارویی بین‌المللی شده‌اند (۲).

بیماری‌های عفونی و گسترش روزافزون مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک‌ها، از چالش‌های بزرگ علم پزشکی است و به طبع آن، جست و جو برای منابع جدید آنتی بیوتیکی و تولید آنتی بیوتیک‌های جدید روز به روز در حال افزایش است. از این رو، محققین به سمت جایگزین‌هایی مانند پپتیدهای ضد میکروبی روی آورده‌اند که ضمن برخورداری از اثرات ضد باکتریایی، فاقد عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی باشند و میکروب‌های بیماری‌زا نتوانند به راحتی بر آنها غلبه کنند (۴). گستردگی طیف فعالیت و عمل انتخابی پپتیدهای ضد میکروبی نسبت به غشاء میکروبی، دو ویژگی مهم این پپتیدها است که سبب علاقه دانشمندان به پپتیدهای ضد میکروبی به شکل مولکول‌های جدید آنتی بیوتیکی شده است. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی، سرعت آسیب به سلول‌های میکروبی و تأثیر مستقیم روی فسفولیپیدها، سبب می‌شود تا پاتوژن‌ها به کندی به این پپتیدها مقاوم شوند (۵).

پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی امیگانان MBI-226 و MBI-594AN آنالوگی‌هایی از گروه پپتیدهای ایندولیسیدین (Indolicidin) هستند (۶). امیگانان‌های MBI-226 و MBI-594AN در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌های گرم مثبت و منفی و قارچ‌ها فعالیت می‌کنند. بررسی‌های آزمایشگاهی و بالینی نشان می‌دهند که هر دو امیگانان MBI-226 و MBI-594AN از خاصیت ضد میکروبی بالایی برخوردار هستند، با این حال، توانایی ضد میکروبی MBI-226 از MBI-594AN بیشتر است (۱). امیگانان‌ها مولکولی‌های آمفی‌پاتیک هستند که در مجموع دارای بار مثبت بوده و به همین دلیل تمایل فراوانی برای غشاهای دارای بار منفی

*Candida albicans* و قارچ *cereus* (PTCC 1181) استفاده شد. میکروپها از دانشگاه علوم پزشکی همدان تهیه شدند. قارچ انسانی *Candida albicans* نیز از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به شکل لیوفلیزه خریداری شد. لازم به ذکر است، تلاش‌های تیم تحقیقاتی برای دریافت باکتری *Propionibacterium acnes* با مشکل مواجهه شد. در ضمن در یک مورد این باکتری از محققان داخلی دریافت شد که کشت آن هم علی‌رغم تغییر در محیط‌های مختلف با موفقیت همراه نبود.

### آماده‌سازی سازه ژنی

در این مطالعه از توالی کد کننده‌ی یک پپتید امیگانان MBI-226 (۱۲ اسید آمینه) با جایگاه برش آنزیم‌های محدودگر *NcoI* و *BamHI* به ترتیب در سر ۵' و ۳' با توجه به ترجیح کدونی گیاه به صورت دو الیگو نوکلئوتید کوتاه (با احتساب جایگاه آنزیم‌های برشی و کدون شروع به طول ۶۵ نوکلئوتید) به شکل مصنوعی سنتز و در جایگاه همان آنزیم‌های محدودگر در ناقل همسانه سازی pUC19 همسانه سازی گردید (۸). در مرحله بعد، قطعه *NcoI*-MBI-226-*BamHI* در ناقل بیانی pGSA1285 حاوی پروموتور 35S(3x) مربوط به ویروس موزائیک گل کلم و خاتمه دهنده اکتوپین سنتتاز (Octopine synthase) همسانه‌سازی شد (شکل ۱) و ناقل بیانی pGSA1285/MBI-226 تولید گردید (۹). این ناقل توسط روش الکتروپوراسیون (Electroporation) به اگروباکتریوم تومفاشینز سویه GV1303 منتقل گردید. ناقل بیانی حاوی ژن برای صحت توالی ژن کد کننده‌ی پپتید امیگانان MBI-226، به روش سانگر توالی‌یابی شد (۹).



شکل ۱. سازه بیانی حاوی ژن کد کننده پپتید MBI-226. ژن گزینگر *nptII* مقاومت به کانامایسین برای انتخاب گیاهان

نشان می‌دهند. این موضوع سبب می‌شود که غشاء پلاسمایی را دچار تلاطم نمایند و در نهایت باعث مرگ سریع سلول گردند (۷). امیگانان‌های طبیعی در ریبوزوم‌ها سنتز می‌شوند. برای مثال، امیگانان MBI-226 را می‌توان از دانه‌های نوتروفیل گاو خالص‌سازی کرد. علاوه بر اهمیت بالینی امیگانان‌ها به خصوص در پیشگیری از عفونت‌های بیمارستانی، امیگانان‌ها را می‌توان از جمله اولین آنتی‌بیوتیک‌های مرتبط با پپتید ضد میکروبی ریبوزومی دانست که تایید بازار را بدست آورده‌اند (۳).

از آنجا که گیاهان زیست توده‌ای زیادی تولید می‌کنند و قادرند پروتئین‌های یوکاریوتی را به شکل اصلی خود و با تغییرات پس از ترجمه صحیح تولید کنند، لذا هدف از این مطالعه جداسازی و همسانه‌سازی ژن کد کننده‌ی یک پپتید ضد میکروبی امیگانان و انتقال آن به گیاهان توتون و سیب زمینی برای بررسی اثرات ضد میکروبی آن بود. با بیان این پپتیدها، عصاره خام گیاهی مربوط به گیاهان تراریخت دارای این پپتیدها خواهد بود، به گونه‌ای که در صورت حمله پاتوژن‌های بیماری‌زا، گیاه قادر به محدود کردن رشد آنها خواهد بود.

### مواد و روش‌ها

در این تحقیق از باکتری‌های *Escherichia coli* سویه DH5 $\alpha$  و *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV1303. به ترتیب جهت همسانه‌سازی ژن کد کننده‌ی پپتید امیگانان MBI-226 و انتقال این ژن به گیاهان توتون و سیب زمینی استفاده شد. در مطالعه حاضر از ناقل بیانی pUC19 برای کارهای همسانه‌سازی و از ناقل بیانی pGSA1285 جهت انتقال ژن به روش اگروباکتری استفاده شد. همچنین برای آزمایش‌های میکروبی از باکتری‌های *Staphylococcus*, *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Pseudomonas aeruginosa*; *epidermis* (PTCC 1436) *Salmonella typhi* (PTCC 1639) (ATCC 27883) *Bacillus* *Staphylococcus aureus* (ATCC 1189)

محیط تازه هم‌کشتی به همراه کانامایسین ( $50 \text{ mgL}^{-1}$ ) و سفوتاکسیم ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ ) به منظور باززایی در  $25 \pm 3^\circ \text{C}$  برای مدت یک ماه منتقل شدند. سپس جوانه‌های ۲-۳ سانتی متری دارای کالوس در حاشیه ریز نمونه‌ها به محیط محرک ریشه‌زایی شامل محیط پایه MS به همراه ( $1 \text{ mgL}^{-1}$ ) NAA، کانامایسین ( $75 \text{ mgL}^{-1}$ ) و سفوتاکسیم ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ ) منتقل شدند. پس از ظهور ریشه‌ها، گیاهچه‌ها به محیط پایه MS فاقد هورمون انتقال یافتند. پس از رشد ریشه‌ها، گیاهان جوان به گلدان حاوی مخلوط ۵۰٪ پرلایت بعلاوه ۵۰٪ پیتماس منتقل شدند. تمامی گلدان‌ها با پوشش پلاستیکی پوشانده شدند و آبیاری آن‌ها با MS مایع نصف غلظت بدون قند، به صورت منظم انجام شد.

### آنالیز PCR

به منظور غربال گیاهان توتون و سیب زمینی به ظاهر تراریخت مقاوم به کانامایسین و بررسی وجود توالی کدکننده‌ی ژن پپتید امیگانان، استخراج DNA ژنومی به روش CTAB صورت گرفت (۱۳). در مرحله‌ی بعد، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت: MBI-226F: 5'-TCATTTGGAGAGGACACGCT-3' و برگشت: MBI-226R: 5'-CACCAGGGCCCAACGC-3' امیگانان و نواحی اطراف تکثیر شد (شکل ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به شرح زیر انجام شد؛ واسرشتی اولیه در  $94^\circ \text{C}$  به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه مداوم با واسرشتی در  $94^\circ \text{C}$  برای مدت ۱ دقیقه، آنیلینگ در  $56^\circ \text{C}$  برای مدت ۴۵ ثانیه و بسط در  $72^\circ \text{C}$  برای مدت ۷۲ ثانیه صورت گرفت. در نهایت بسط نهایی در  $72^\circ \text{C}$  برای مدت ۷ دقیقه انجام شد.

### استخراج پروتئین کل

به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی پپتید بیان شده در گیاهان مورد مطالعه، مقدار یک گرم از بافت تازه گیاهان توتون و سیب زمینی تراریخت و شاهد در

تراریخت در سازه ژنی قرار گرفته است. پروموتور قدرتمند  $3 \times$  موزائیک گل کلم برای بیان پپتید در تمام اندام‌های گیاه در سر ۵' ژن قرار گرفته است. محل نشستن آغازگرها برای غربال گیاهان تراریخت به صورت دو فلش نشان داده شده‌اند.

### گیاه و شرایط رشد

از بذر توتون (*Nicotiana tabacum*) رقم زانتای (Xanthi) و میانگره‌های سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) رقم تجاری آگریا به عنوان ریز نمونه برای تولید گیاهان تراریخت استفاده شد. به طور خلاصه، ابتدا بذور توتون به مدت ۳۰ ثانیه با اتانول ۷۰٪ و برای ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ حاوی تریتون تیمار شدند. در مرحله بعد ریزنمونه‌ها به تعداد ۳-۵ بار با آب مقطر استریل شستشو و ضدعفونی شدند. بذرها با استفاده از کاغذ صافی استریل خشک و برای جوانه زنی بر روی محیط MS حاوی  $20 \text{ gL}^{-1}$  ساکارز (۱۰) کشت شدند. پلیت‌ها در دمای  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  قرار داده شدند و پس از جوانه زنی به شیشه‌های مربا برای تولید گیاهچه منتقل شدند. در مورد تهیه ریز نمونه‌های سیب زمینی، از روش نظریان فیروزآبادی و همکاران استفاده شد (۱۱).

### تراریزش و باززایی توتون و سیب زمینی

ریزنمونه‌های دیسک برگ توتون و میانگره‌های سیب زمینی به وسیله اگروباکتري تومفاشینز حامل ناقل pGSA1285/MBI-226 تراریزش شدند (۱۲). از باکتري‌های کشت داده شده‌ای با  $OD_{600}$  برابر با ۰/۵ برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا دیسک‌های به اندازه تقریبی  $1 \text{ cm}^2$  از برگ‌های جوان توتون و همچنین میانگره‌های سیب زمینی به اندازه تقریبی ۱ تا ۵ cm تهیه گردیدند و جداگانه و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتري قرار داده شدند. سپس ریزنمونه‌های آلوده به محیط هم‌کشتی، یعنی محیط پایه MS همراه با  $30 \text{ gL}^{-1}$  ساکارز، ( $2 \text{ mgL}^{-1}$ ) BA و ( $1 \text{ mgL}^{-1}$ ) NAA برای ۳ تا ۴ روز در تاریکی و دمای  $25 \pm 3^\circ \text{C}$  منتقل شدند. پس از گذشت سه روز، ریز نمونه‌ها به

مدت ۲۴ ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. پس از طی زمان آنکوباسیون لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی گردیدند. به محض مشاهده ایجاد کدورت در هر لوله، لوله قبلی به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد. در مورد لوله کنترل مثبت، کدورت نشان دهنده‌ی رشد کافی باکتری می‌باشد. لوله کنترل منفی، از نظر عدم وجود رشد، بررسی شد، در این لوله نباید رشدی صورت گیرد و از این رو باید شفاف باشد (۱۵).

به منظور بررسی تاثیر پپتید بر *Candida albicans*، ابتدا مقدار یک میلی لیتر بافر فسفات سالیین (PBS;  $\text{pH}=7.2$ ) در یک میکروتیوب یک و نیم میلی لیتری استریل ریخته شد. سپس با آنس استریل، مقدار کمی از کلونی‌های رشد یافته روی محیط PDA در محلول PBS مخلوط شد. پس از مخلوط شدن قارچ در بافر، با استفاده از لام نئوبار سوسپانسیونی معادل  $1 \times 10^6$  سلول در هر میلی لیتر تهیه شد (۱۶). درون هر لوله ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت سابرو دکستروز برات ریخته شد. غلظت‌های متوالی از عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲، ۱/۶ و ۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در هر لوله اضافه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی *Candida albicans* با تراکم  $1 \times 10^6$  سلول در هر میلی لیتر به آن اضافه گردید. لوله‌ها در آنکوباتور شیکردار  $25^{\circ}\text{C}$  با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت گذاشته شدند. پس از طی زمان آنکوباسیون، میزان رشد *Candida albicans* بر اساس تعیین کدورت چاهک‌ها ارزیابی شد. این آزمایش در سه تکرار صورت گرفت.

#### انتشار در آگار با استفاده از دیسک

به منظور سنجش مقاومت عصاره پروتئینی گیاهان حاوی پپتید ضد میکروبی در برابر باکتری‌ها و قارچ *Candida albicans* از روش دیسک دیفیوژن با استفاده از روش کربی بائر (Kirby-Bauer)، طبق دستورالعمل Clinical

مجاورت ازت مایع به خوبی پودر و هموژن شد. سپس به مقدار یک میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ( $\text{pH}=7$ ،  $50\text{ mM}$ ) به آن اضافه و در  $4^{\circ}\text{C}$  با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد، روشناور حاوی پروتئین‌ها با احتیاط جمع‌آوری و غلظت آن با روش برادفورد (۱۴) اندازه‌گیری و در دمای ۴ یا  $-20^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

#### بررسی اثر ضد میکروبی پپتید

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) با استفاده از روش رقت‌سازی در لوله (Broth Macro dilution susceptibility assay) تعیین گردید (۱۵). در این آزمایش از یک سری ۱۲ تایی از لوله‌های آزمایش استفاده شد. از تعداد ۹ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف (۶۰، ۳۰، ۱۵، ۷/۵، ۳/۷۵ و ۰ میکروگرم بر میلی لیتر) هر عصاره و یک لوله به عنوان کنترل مثبت (حاوی عصاره رقیق شده به علاوه محیط کشت) و یک لوله به عنوان کنترل منفی (حاوی سوسپانسیون میکروبی به علاوه محیط کشت) در نظر گرفته شد.

غلظت اولیه عصاره  $60\ \mu\text{g mL}^{-1}$  بود. لوله اول تنها حاوی عصاره با غلظت اولیه بود که با افزودن مقدار یک میلی لیتر از عصاره به لوله دوم حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت، غلظت  $30\ \mu\text{g mL}^{-1}$  به دست آمد. به همین ترتیب ۱ میلی لیتر از لوله دوم برداشته و به لوله سوم که حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت بود انتقال داده و این کار تا لوله شماره ۱۰ انجام گرفت و از لوله آخر ۱ میلی لیتر برداشته و بیرون ریخته شد که در نهایت هر لوله نصف رقت لوله قبلی شد. سپس به لوله‌ها به جز لوله شماره ۱۰ (کنترل مثبت) به میزان ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند دارای  $10^8 \times 1/5$  CFU/ml باکتری انتقال داده شد. رقت‌سازی عصاره‌ها برای هر باکتری به صورت جداگانه انجام شد. در جریان آزمایش، همه لوله‌های آزمایش برای

به عنوان کنترل روی پلیت‌ها قرار داده شد. پلیت‌ها برای ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند و سپس قطر هاله عدم رشد در مقایسه با شاهد اندازه گیری شد (۱۸).

### آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها با ۳ تکرار صورت گرفتند و میانگین‌گیری صورت گرفت. آنالیز واریانس یک سوپه (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SAS9.1 و مقایسه میانگین به روش چند دامنه‌ای دانکن در سطوح معنی‌داری مربوطه انجام شد.

### یافته‌ها

همسانه‌سازی ژن کد کننده‌ی پپتید در ناقل‌های

### pGSA1285 و pUC19

ژن کد کننده‌ی پپتید امیگانان به کمک روش‌های مهندسی ژنتیک در ناقل‌های همسانه‌سازی pUC19 و بیانی pGSA1285 همسانه‌سازی گردید. از روش‌های PCR و هضم آنزیمی برای اطمینان از همسانه‌سازی صحیح پپتید امیگانان در ناقل بیانی استفاده شد. الکتروفورز محصول هضم آنزیمی ناقل با آنزیم‌های *SacI* و *BamHI*، یک قطعه در حدود ۱۳۰ جفت بازی را نشان داد که با اندازه مورد انتظار هماهنگی داشت. این موضوع صحت همسانه‌سازی پپتید امیگانان را در این ناقل نشان داد (شکل ۲).

### بررسی گیاهان تراریخت

پس از انجام تراریزش و انتقال سازه حاوی ژن کدکننده پپتید امیگانان، جوانه‌هایی از کناره ریز نمونه‌های برگ‌ی توتون و گیاهچه‌های کوچکی از کالوس دوسر میانگره‌های سیب زمینی پدیدار شدند. این جوانه‌ها برای باززایی و تولید گیاهچه، به محیط ساقه‌زایی و سپس ریشه‌زایی انتقال یافتند (شکل ۳). علی‌رغم تلاش فراوان برای تولید غده از گیاهان تراریخت سیب زمینی، متأسفانه هیچ یک از گیاهان تراریخت در مدت ۶ ماه در گلخانه غده‌ای مناسب برای جداسازی پپتید تولید نکردند. با این حال، احتمالاً در آینده از گیاهان درون شیشه‌ای بتوان ریزغده تولید و اثرات ضد میکروبی آن را بررسی کرد. پس از تولید گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین، تعدادی گیاهچه‌های به ظاهر تراریخت در

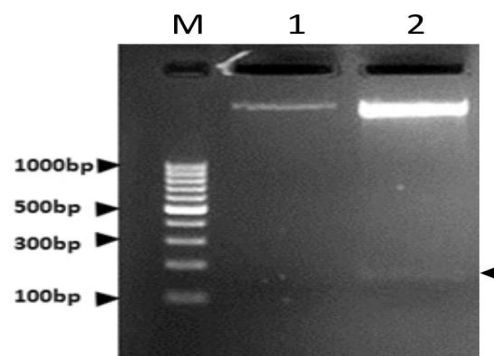
and Laboratory Standards Institute (CLSI) بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد. در آغاز، دیسک‌های بلانک (۵mm) توسط عصاره‌های پروتئینی اشباع گردیدند. در هر سری آزمایش یک دیسک حاوی عصاره پروتئینی گیاه غیر تراریخت با غلظت مذکور به عنوان کنترل منفی بکار برده شد. از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ µg)، پنی سیلین (۲۰ µg) تتراسایکلین (۱۰ µg) به منظور جلوگیری از رشد باکتری‌ها و دیسک‌های فلوکونازول ۲۵ میکروگرمی به هدف مهار رشد قارچ جهت مقایسه‌ی هاله‌های عدم رشد به عنوان کنترل مثبت بر اساس دستورالعمل CLSI استفاده گردید. قطر هر یک از دیسک‌های مورد استفاده ۵ میلی‌متر بود که از قطر هاله‌های رشد اندازه‌گیری شده کسر گردید. هر یک از این آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت و میانگین‌گیری صورت گرفت. به منظور بررسی اثر ممانعت‌کننده حلال (بافر فسفات) دیسک حاوی حلال نیز مورد بررسی قرار گرفت.

از محیط کشت مولر هینتون آگار برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند دارای  $10^8$  cfu/ml روی محیط کشت ریخته شد و با سوآپ پنبه‌ای استریل سوسپانسیون باکتری به صورت یکنواخت در سطح محیط پخش گردید. سپس دیسک‌های تهیه شده از عصاره‌های مختلف با استفاده از پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده شدند. پلیت‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. سپس قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری و میانگین مربوطه گزارش گردید (۱۷).

برای بررسی مقاومت به *Candida albicans* نیز در این روش پس از آماده‌سازی پلیت‌های محتوی محیط کشت PDA مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده با تراکم  $1 \times 10^6$  سلول به پلیت‌های مذکور تلقیح شد. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، دیسک‌های آغشته به عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت به همراه دیسک‌های فلوکونازول (۱۰ µg)

غیرتراریخت (کنترل)، آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی مربوط به سازه ژنی (MBI\_F:5'-TTTCATTTGGAGAGGACACGCT-3'; MBI\_R:5'-CACCAGGGCCAACGCAA-3') و با توجه به موقعیت نشستن این آغازگرها (شکل ۱) روی آنها صورت گرفت. آنالیز PCR این گیاهان نشان داد که در تعدادی از گیاهچه‌ها، ژن کدکننده پپتید امیگانان وارد ژنوم گیاهان شده است، به طوری که در گیاهان تراریخت قطعه‌ای به طول حدود ۱۲۰bp معادل طول ژن کدکننده امیگانان به علاوه بخش‌های از پروموتور و خاتمه دهنده تکثیر گردید. این حالی بود که در گیاه شاهد هیچ بانده مشاهده نشد. در ادامه، از بین گیاهان تراریخت، تعدادی گیاه به تصادف انتخاب شدند. برای توتون گیاهان تراریخت NtMBI-02، NtMBI-04، NtMBI-07، NtMBI-09، NtMBI-10، NtMBI-13 و برای سیب زمینی گیاهان تراریخت StMBI-01، StMBI-03 و StMBI-05 به همراه شاهد‌های مربوطه انتخاب شدند.

هر دو گیاه برای آزمون‌های مولکولی انتخاب شدند. گیاهچه‌های این مرحله به اسامی NtMBI-xx و StMBI-xx نامیده شدند که در این نامگذاری، MBI معرف نام پپتید، xx شماره لاین تراریخت، Nt و St به ترتیب معرف نام علمی توتون و سیب زمینی هستند.



شکل ۲. الکتروفورز محصول هضم آنزیمی ناقل نو ترکیب- MBI pGSA1285/226 با استفاده از آنزیم‌های برشی *SacI* و *BamHI*. شماره چاهک‌ها به ترتیب، ناقل هضم نشده و ناقل هضم شده را نشان می‌دهند. M: بیانگر سایز مارکر ۱۰۰bp است. محل قطعه ژن کدکننده پپتید MBI-226 به طول تقریبی ۱۳۰ bp به صورت یک مثلث توپر در سمت راست تصویر مشخص شده است.

پس از استخراج DNA ژنومی از برگ گیاهچه‌های توتون و سیب زمینی به ظاهر تراریخت و یک نمونه گیاهچه



شکل ۳. مراحل تهیه ریز نمونه، تشکیل جوانه و باززایی توتون و سیب زمینی پس از تراریخت. (A) ردیف بالا به ترتیب از چپ به راست نشان دهنده قطعات برگ توتون تلقیح شده با اگروباکتریوم، ظهور جوانه‌ها و گیاه کامل تراریخت در محیط دارای آنتی بیوتیک (B) ردیف پایین به ترتیب از چپ به راست نشان دهنده قطعات میانگه سیب زمینی تلقیح شده با اگروباکتریوم، ظهور کالوس و گیاه کامل تراریخت در محیط دارای آنتی بیوتیک.

جدول ۱. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) مربوط به عصاره پروتئینی توتون‌ها و سیب زمینی‌های تراریخت.

لاین تراریخت	باکتری بیماریزا					
	<i>S. epidermis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
NtMBI-02	>۶۰	>۶۰	۶۰	۶۰	۳۰	۳۰
NtMBI-04	>۶۰	>۶۰	>۶۰	>۶۰	>۶۰	>۶۰
NtMBI-07	۳۰	>۶۰	>۶۰	>۶۰	۳۰	۶۰
NtMBI-09	>۶۰	>۶۰	>۶۰	>۶۰	۶۰	۳۰
NtMBI-10	>۶۰	>۶۰	>۶۰	>۶۰	۳۰	>۶۰
NtMBI-13	>۳۰	>۶۰	۶۰	۶۰	۳۰	۳۰
NtMBI-Ut	-	-	-	-	-	-
StMBI-01	۵۰	>۶۰	>۶۰	>۶۰	۳۰	۵۰
StMBI-03	>۵۰	>۶۰	>۶۰	>۶۰	>۶۰	>۵۰
StMBI-05	>۵۰	>۲۵	>۶۰	>۶۰	>۶۰	>۲۵
StMBI-Ut	-	-	-	-	-	-

Ut: گیاه شاهد غیر تراریخت. اعداد بر حسب  $\mu\text{gml}^{-1}$  بیان شده‌اند

## ارزیابی فعالیت ضد میکروبی پپتید آمیگانان

حداقل غلظت بازدارندگی، غلظتی از عصاره پروتئینی است که بتواند به میزان ۹۰ درصد از رشد باکتری‌ها جلوگیری کند. نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های توتون‌ها و سیب زمینی‌های تراریخت در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی در فاصله غلظت‌های  $30 \mu\text{gml}^{-1}$  و  $60 \mu\text{gml}^{-1}$  بود. در حالی که عصاره پروتئینی گیاه غیر تراریخت مانع رشد هیچ یک از باکتری‌های مورد مطالعه نشد (جدول ۱: برخی از داده‌های این جدول از منبع ۹ برای مقایسه اقتباس شده است).

همان طوری که از جدول ۱ مشاهده می‌شود، برای کنترل رشد باکتری *Bacillus cereus*، *Salmonella typhi* و *Staphylococcus aureus* به غلظت بیشتری از پپتید نیاز است. صرف نظر از نوع گیاه تراریخت، حداقل غلظت بازدارندگی برای این باکتری‌ها،  $60 \mu\text{gml}^{-1}$  بود. به نظر می‌رسد که برای کنترل میکروب‌های گرم منفی به غلظت کمتری در پاره‌ای از مواقع نیاز باشد. در بین گیاهان توتون تراریخت، دو گیاه NtMBI-02 و NtMBI-13 و از بین گیاهان سیب زمینی تراریخت دو گیاه StMBI-01 و StMBI-05 از قدرت مهار کنندگی بیشتری علیه دو باکتری *E. coli* و *Pseudomonas aeruginosa* برخوردار بودند.

(جدول ۱). در باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* اثر عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت مشابه *Salmonella typhi* بود، اما در *Bacillus cereus* در غلظت اصلی نیز اثر بازدارندگی مشاهده نشد و غلظت‌های بالاتر عصاره مورد بررسی قرار نگرفت. همچنین نتایج جدول ۱ نشان می‌دهند که باکتری‌های مختلف به غلظت یکسان یک گیاه تراریخت واکنش متفاوتی نشان می‌دهند. اگرچه به دلیل محدودیت در تولید عصاره امکان بررسی غلظت‌های بیشتری علیه میکروب‌ها فراهم نشد، اما به نظر می‌رسد که گیاهان تراریخت سیب زمینی پپتید بیشتری در مقایسه با گیاهان توتون تراریخت تولید می‌کنند. با این حال، این موضوع نیاز به بررسی بیشتری دارد.

## انتشار در آگار با استفاده از دیسک

نتایج حاصل از آزمون انتشار در آگار با استفاده از دیسک نشان داد که در باکتری *E. coli* بیشترین قطر هاله مهار رشد مربوط به عصاره پروتئینی گیاه توتون تراریخت NtMBI-07 و پس از آن لاین تراریخت NtMBI-13 به ترتیب با ایجاد هاله‌های با قطر تقریبی ۱۵ و ۱۴ میلی‌متری بود. دیسک حاوی حلال بافر فسفات هیچ گونه اثر ممانعت‌کنندگی بر رشد باکتری‌ها نداشت و هاله‌ای تشکیل نگردید. در مقابل، دیسک حاوی آنتی بیوتیک به عنوان کنترل مثبت در مقایسه با تمام تیمارها بیشترین قطر هاله را ایجاد کرد.



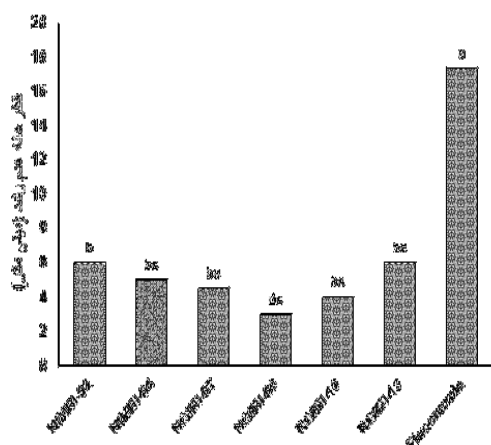
مقایسه میانگین‌ها تاثیر پپتید روی رشد میکروب‌ها به روش دانکن نشان داد که عصاره دو گیاه NtMBI-07 و NtMBI-13 اثر مهارکنندگی معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) نسبت به عصاره سایر گیاهان شاهد غیر تراریخت داشتند (جدول ۲: برخی از داده‌های این جدول از منبع ۹ برای مقایسه اقتباس شده است). همین موضوع در مورد گیاهان تراریخت سیب زمینی در مقایسه با شاهد وجود داشت. به طور کلی، نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که تاثیر عصاره گیاهان تراریخت بر باکتری‌های گرم منفی بیش از باکتری گرم مثبت بود.

مهارکنندگی گیاه NtMBI-13 بر روی *Salmonella typhi* با ایجاد هاله مهار کننده‌ی به قطر ۱۸ میلی‌متری قابل توجه بود. در بررسی باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* کمترین قطر هاله در تیمار تمامی عصاره‌های گیاهی توتون مشاهده شد، به ویژه در *Bacillus cereus* تقریباً هیچ اثر ممانعت کننده‌ای نداشتند. این در حالی بود که عصاره پروتئینی سیب زمینی‌های تراریخت اثر مهارکنندگی قوی تری در مقایسه با توتون‌های تراریخت داشتند.

جدول ۲. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در تیمار با عصاره‌های پروتئینی لاین‌های توتون و سیب زمینی تراریخت و شاهد.

لاین آنتی بیوتیک	میکروب‌های بیماریزا					
	<i>S. epidermis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
NtMBI-07	۱۱/۱۳ ± ۰/۵۱	.	۰/۶۸ ± ۰/۱۱	۵/۶۶ ± ۰/۵	۱۳/۲۶ ± ۰/۵	۱۵/۳ ± ۰/۵
NtMBI-13	۸/۹۳ ± ۰/۴۰	.	۰/۴۱ ± ۰/۱	۱۸/۶ ± ۰/۵	۲۰ ± ۰	۱۴/۳ ± ۰/۱
NtMBI-Ut	.	.	.	.	.	.
StMBI-01	۱۴/۰۳ ± ۰/۴	.	۱۶/۳۶ ± ۰/۶	۱۰/۳۶ ± ۰/۴	۱۱/۳۶ ± ۰/۶	۱۴/۳ ± ۰/۵
StMBI-05	.	.	۱۳/۳۶ ± ۰/۶	.	۱۵ ± ۰/۵	۱۳/۶ ± ۰/۱
StMBI-Ut	.	.	.	.	.	.
Gentamicin(10µg)	-	-	-	-	۳۰ ± ۰/۵	۳۰/۰ ± ۰/۲
Cefotaxime(30µg)	۲۴/۹ ± ۰/۳۲	۰ ± ۰/۲۰	۰ ± ۰/۳۲	۲۹/۰ ± ۰/۲	-	-

هاله عدم رشد ۱۷ میلی‌متر اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) با تیمارهای مورد آزمون نشان داد.



شکل ۴. قطر هاله عدم رشد قارچ *Candida albicans* پس از تیمار با عصاره پروتئینی لاین‌های توتون تراریخت حاوی پپتید امیگانان.

#### ارزیابی اثر ضد قارچی پپتید امیگانان بر *Candida albicans*

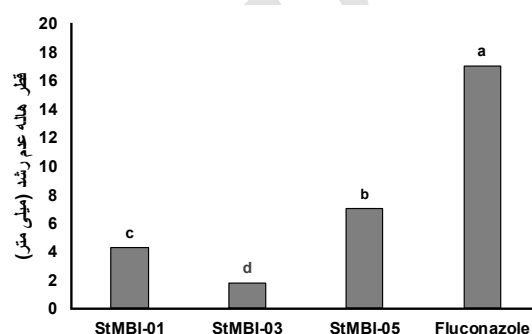
در مطالعه حاضر اثر عصاره پروتئینی لاین‌های توتون و سیب زمینی تراریخت بر قارچ *Candida albicans* مورد بررسی قرار گرفت. همان طوری که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، بیشترین قطر مهار کنندگی در تیمار با عصاره پروتئینی لاین تراریخت NtMBI-02 و سپس NtMBI-07 به ترتیب با قطر ۶ و ۵/۷ میلی‌متر مشاهده شد. همچنین لاین NtMBI-09 با ۳ میلی‌متر کمترین تاثیر را در جلوگیری از رشد قارچ از خود نشان داد. مقایسه میانگین داده‌های مربوط به هاله عدم رشد روش دانکن نشان داد که هیچ گونه اختلاف معنی‌داری ( $P > 0.05$ ) بین عصاره گیاهان تراریخت در مهار قارچ *Candida albicans* مشاهده نشد (شکل ۴)، در صورتی که فلوکونازول با قطر

مقاومت به باکتری پاتوژن گیاهی زانتوموناس کامپسترینس (*Xanthomonas campestris*) در مقایسه با گیاه شاهد شد (۲۱). به علاوه، بدرحداد و همکاران با بیان این پپتید در توتون و سنجش خواص ضد میکروبی عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت علیه باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی به این نتیجه رسیدند که توقف رشد باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی در غلظت‌های کمتری از عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت در مقایسه با میکروب‌های انسانی اتفاق می‌افتد (۹).

اغلب پپتیدهای کاتیونی، از جمله امیگانان‌ها در شرایط آزمایشگاهی فعالیت قابل توجهی علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا و مقاوم از خود نشان می‌دهند (۲۲). اگرچه، مکانسیم دقیق عمل پپتیدهای ضد میکروبی چندان مشخص نیست، ولی به نظر می‌رسد که نحوه عمل اولیه پپتیدهای خانواده امیگانان روی باکتری‌های گرم منفی به توانایی اثر پپتید بر غشاء سیتوپلاسمی و در باکتری‌های گرم مثبت و مخمر به دیولاریزه کردن غشاء و مهار سنتز ماکرومولکول‌ها و در نهایت مرگ سلول مرتبط است (۲۳). از این رو به زمان بیشتری برای ایجاد مقاومت باکتری‌ها به پپتیدهای ضد میکروبی نیاز است، زیرا برای ظهور سویه‌های مقاوم به جهش‌های مهم و تاثیرگذاری در ساختار و عملکرد غشاء باکتری‌ها نیاز است تا آنها را از گزند این پپتیدها در امان نگه دارد (۲۴، ۲۳).

در این تحقیق تاثیر پپتید امیگانان روی باکتری *E. coli* معنی‌دار بود (جدول ۱). سادر و همکاران نیز فعالیت ضد میکروبی پپتید امیگانان را علیه ۱۴۳۷ باکتری و ۲۱۴ مخمر مورد بررسی قرار دادند. میزان MIC برای باکتری *E. coli* در حدود  $32 \mu\text{gml}^{-1}$  بود (۲۵) که با نتایج این مطالعه مشابه بود. با این حال، در تعدادی از گیاهان تراریخت توتون و سیب زمینی، میزان MIC بالاتر از  $60 \mu\text{gml}^{-1}$  بود. این موضوع نشان می‌دهد که میزان پپتید تولیدی در برخی از گیاهان تراریخت در مقایسه با سایر

بررسی آماری تاثیر عصاره پروتئینی لاین‌های تراریخت سیب زمینی بر مهار قارچ *Candida albicans* نشان داد که بین لاین‌ها از نظر تاثیر در جلوگیری از رشد قارچ اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) وجود دارد (شکل ۵). حداکثر قطر هاله عدم رشد مربوط به لاین تراریخت StMBI-05 با قطر ۷ میلی‌متر و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به لاین StMBI-03 با  $1/8$  میلی‌متر بود. در تمام تکرارهای تیمار شاهد هیچ گونه هاله عدم رشدی مشاهده نشد.



شکل ۵. قطر هاله عدم رشد قارچ *Candida albicans* پس از تیمار با عصاره پروتئینی لاین‌های سیب زمینی تراریخت حاوی پپتید امیگانان.

## بحث و نتیجه‌گیری

انتقال ژن کدکننده پپتیدهای ضد میکروبی در گیاهان، روشی برای تولید پروتئین‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی است که ضمن جداسازی آنها برای مصارف دارویی، سبب ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از پاتوژن‌های گیاهی می‌شوند. برای مثال، مطالعات متعددی بیان پپتیدهای ضد میکروبی مانند، cecropin و sacrotoxin در توتون و گوجه فرنگی، MsA3 سیب زمینی (۱۹) و پپتید کایمیریک cecropin-melittin در سیب زمینی (۲۰) را گزارش کرده‌اند. در تمام این قبیل مطالعات، گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان غیر تراریخت، افزایش مقاومت قابل توجهی نسبت به پاتوژن‌ها نشان داده‌اند. برای مثال، بیان پپتید ضد میکروبی SP1 در گوجه فرنگی سبب

به طور کلی، به نظر می‌رسد که پپتید امیگانان بیان شده در گیاهان تراریخت این مطالعه، تاثیر چندانی در مهار دو باکتری گرم مثبت *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* نداشته باشند (جدول ۱ و ۲). با این حال چون پپتید این مطالعه همراه با سایر پروتئین‌های گیاهی در پروتئین کل وجود دارد و خالص نیست، ممکن است در مقایسه با پپتیدهای مصنوعی، فعالیت متفاوتی در محیط *In vitro* از خود نشان دهد. به علاوه، تفاوت اثر ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت را می‌توان در مکانیسم‌های متفاوت عمل آنها در برابر پپتیدها است. مکانیسم‌های مقاومت در باکتری‌ها ممکن است شامل تخریب کامل پپتیدهای ضد میکروبی با عمل پروتئولیز، حذف و بیرون راندن پپتیدهای ضد میکروبی از سلول از طریق انتقال فعال و تغییر ساختار سطح سلول برای جلوگیری از تعامل پپتیدهای ضد میکروبی با اجزا سلولی باشد (۲۷). برای مثال، پروتئازهای درون سلولی در *Staphylococcus aureus* سبب تخریب پپتید ۳۷-LL می‌شوند (۲۸). همچنین باکتری *Staphylococcus aureus* از طریق افزایش کاروتنوئید و افزایش اسید چرب در غشاء خود سبب کاهش حساسیت به پپتیدهای ضد میکروبی و افزایش سختی دیواره سلول و کاهش ورود پپتیدها به غشا می‌گردد (۲۹). با این حال، در مورد نحوه عمل امیگانان‌ها و پپتید این مطالعه، به بررسی‌های بیشتری در این زمینه نیاز است.

به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که با بیان یک پپتید امیگانان در گیاهان توتون و سیب زمینی می‌توان مانع از رشد باکتری‌های بیماری‌زای انسانی در محیط آزمایشگاهی شد. در صورت فراهم شدن شرایط می‌توان این پپتید را خالص سازی کرد و از آن در فرمولاسیون‌های دارویی استفاده نمود. به علاوه، چون این قبیل پپتیدها قادر به کنترل باکتری *Propionibacterium acnes* عامل آکنه هستند، لذا بررسی اثرات ضد میکروبی آن علیه این باکتری می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. همچنین با بیان

لاین‌های تراریخت کمتر بود. این موضوع از این نظر می‌تواند حائز اهمیت باشد که میزان فعالیت پپتید با میزان دوز مصرفی آن در ارتباط است. در مورد باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Salmonella typhi* و به ویژه *Bacillus cereus* میزان MIC آستانه بالاتری را نشان داد. برای مثال، سادر و همکاران با استفاده از پپتید امیگانان میزان MIC را برای باکتری *Staphylococcus aureus*  $16 \mu\text{gml}^{-1}$  گزارش نمودند که اثر مهار کنندگی قوی‌تری را نسبت به نتایج این مطالعه نشان می‌دهد. همچنین برای باکتری سودوموناس میزان MIC را در حدود  $64 \mu\text{gml}^{-1}$  گزارش کردند که اثر مهار کنندگی کمتری را نسبت به لاین‌های تراریخت این مطالعه نشان می‌دهد. یکی از دلایل این اختلاف نتایج، می‌تواند به تفاوت شرایط متفاوت انجام آزمون ارتباط داشته باشد. به علاوه استفاده از پپتید خالص در بررسی سادر و همکاران در مقایسه با استفاده از عصاره پروتئینی در تحقیق حاضر هم می‌تواند منجر به نتایج متفاوتی شود.

به نظر می‌رسد که پپتید این مطالعه فعالیت میکروبی بیشتری از پپتید ایندولیسیدین (نوعی آنالوک امیگانان) داشته باشد. برای مثال، سوبلاکشمی و همکاران اثر بازدارندگی پپتید ایندولیسیدین را بر *E. coli* بررسی نمودند. نتایج این مطالعه همانند نتایج این تحقیق نشان داد که ایندولیسیدین می‌تواند در غلظت  $50 \mu\text{gml}^{-1}$  سبب مهار ۸۴-۹۰ درصدی باکتری *E. coli* شود ( $1 \mu\text{gml}^{-1}$  MIC=۵۰) که در مقایسه با  $30 \mu\text{gml}^{-1}$  MIC=۳۰ این مطالعه میزان فعالیت ایندولیسیدین به وضوح کمتر از امیگانان است (۲۶). در مورد باکتری *Bacillus cereus*، مقدار MIC این مطالعه بیش از  $60 \mu\text{gml}^{-1}$  بود که در حدود ۴ برابر کمتر ( $16 \mu\text{gml}^{-1}$  MIC=۱۶) از میزان تاثیر ایندولیسیدین بر همین باکتری بود (۲۵).

اگرچه گزارش‌های در مورد تاثیر یکسان این پپتید روی هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی وجود دارد،

این قبیل پپتیدها به کمک روش‌های مهندسی ژنتیک در گیاهان زراعی، می‌توان گیاهان تراریخت مقاوم به بیمارگرهای بیماری‌زای گیاهی تولید نمود که دیگر نیازی به استفاده از سموم شیمیایی برای کنترل آنها نباشد.

#### تشکر و قدردانی

این پژوهش به کمک حمایت مالی مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان در قالب یک طرح تحقیقاتی به شماره ۲۰۰/۹۴/۲۰۳۶۶ صورت گرفت. به این وسیله پژوهشگران این تحقیق مراتب تشکر و قدردانی خود را از حمایت کننده مالی به عمل می‌آورند.

Archive of SID

## References

1. Midura-Nowaczek K, Markowska A. Antimicrobial peptides and their analogs: searching for new potential therapeutics. *Perspectives in medicinal chemistry*. 2014;6:73-80.
2. Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology*. 2010;135(1):1-11.
3. Zhang L-j, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Current Biology*. 2016;26(1):R14-R19.
4. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International journal of food microbiology*. 2004;94(3):223-253.
5. Oard S, Enright F. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant cell reports*. 2006;25(6):561-572.
6. Isaacson R. MBI-226. *Micrologix/Fujisawa*. Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000). 2003;4(8):999-1003.
7. Castanho M, Santos N. Peptide drug discovery and development: translational research in academia and industry: John Wiley & Sons; 2011.
8. Nazarian-Firouzabadi F, Trindade LM, Visser RG. Production of small starch granules by expression of a tandem-repeat of a family 20 starch-binding domain (SBD3-SBD5) in an amylose-free potato genetic background. *Functional Plant Biology*. 2012;39(2):146-155.
9. Badr Hadad A, Nazarian Firouzabadi F, Ismaili A, Bagheri H. Cloning and expression of an omiganan pentahydrochloride (MBI226) antimicrobial peptide in tobacco (*Nicotiana tabacum*) confers resist to bacterial pathogens. *Crop Biotechnology*. 2017;7(19):1-13 (In Persian).
10. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962;15(3):473-497.
11. Nazarian Firouzabadi F, Vincken J-P, Ji Q, Suurs LC, Buléon A, Visser RG. Accumulation of multiple-repeat starch-binding domains (SBD2–SBD5) does not reduce amylose content of potato starch granules. *Planta*. 2007;225(4):919-933(In Persian).
12. Phan HT, Hause B, Hause G, Arcalis E, Stoger E, Maresch D, et al. Influence of elastin-like polypeptide and hydrophobin on recombinant hemagglutinin accumulations in transgenic tobacco plants. *PLoS One*. 2014;9(6):e99347.
13. Richards E, Reichardt M, Rogers S. Preparation of genomic DNA from plant tissue. *Current protocols in molecular biology*. 1994:2.3.1-2.3.7.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72(1-2):248-254.
15. Elisha IL, Botha FS, McGaw LJ, Eloff JN. The antibacterial activity of extracts of nine

- plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC complementary and alternative medicine*. 2017;17(1):2-10.
16. Furletti V, Teixeira I, Obando-Pereda G, Mardegan R, Sartoratto A, Figueira G, et al. Action of *Coriandrum sativum* L. essential oil upon oral *Candida albicans* biofilm formation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011;2011:1-10.
  17. Bakal SN, Bereswill S, Heimesaat MM. Finding novel antibiotic substances from medicinal plants—Antimicrobial properties of *Nigella sativa* directed against multidrug resistant bacteria. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2017;7(1):92-98.
  18. Jain J, Tikare S, Mahuli A. Antifungal activity of ginger extract on *Candida albicans*: an in-vitro study. *Journal of Dental Sciences and Research*. 2011;2(2):18-21.
  19. Osusky M, Osuska L, Hancock RE, Kay WW, Misra S. Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. *Transgenic research*. 2004;13(2):181-190.
  20. Osusky M, Zhou G, Osuska L, Hancock RE, Kay WW, Misra S. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology*. 2000;18(11):1162-1166.
  21. Diaz AH, Kovacs I, Lindermayr C. Inducible Expression of the De-Novo Designed Antimicrobial Peptide SP1-1 in Tomato Confers Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *PloS one*. 2016;11(10):e0164097.
  22. Fritsche TR, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Antimicrobial activity of omiganan pentahydrochloride tested against contemporary bacterial pathogens commonly responsible for catheter-associated infections. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;61(5):1092-1098.
  23. Melo MN, Dugourd D, Castanho MA. Omiganan pentahydrochloride in the front line of clinical applications of antimicrobial peptides. *Recent patents on anti-infective drug discovery*. 2006;1(2):201-207.
  24. Melo MN, Castanho MA. Omiganan interaction with bacterial membranes and cell wall models. Assigning a biological role to saturation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2007;1768(5):1277-1290.
  25. Sader HS, Fedler KA, Rennie RP, Stevens S, Jones RN. Omiganan pentahydrochloride (MBI 226), a topical 12-amino-acid cationic peptide: spectrum of antimicrobial activity and measurements of bactericidal activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(8):3112-3118.
  26. Subbalakshmi C, Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS microbiology letters*. 1998;160(1):91-96.
  27. Nawrocki KL, Crispell EK, McBride SM. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of gram-positive bacteria. *Antibiotics*. 2014;3(4):461-492.

28. Sabat A, Kosowska K, Poulsen K, Kasproicz A, Sekowska A, van den Burg B, et al. Two allelic forms of the aureolysin gene (aur) within *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*. 2000;68(2):973-976.
29. Subczynski WK, Wisniewska A. Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions. *Acta Biochimica Polonica* 2000;47(3):613-626.

Archive of SID

## Cloning and *in planta* expression of an omiganan antimicrobial peptide in tobacco and potato plants to control the growth of human bacterial pathogens

Nazarian Firouzabadi F<sup>1,2\*</sup>, Badrhadad A<sup>3</sup>, Sheikhian A<sup>4</sup>

1. Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Science, Khorramabad, Iran  
Nazarian.f@lu.ac.ir

2. Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

3. Ph.D. Student, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

4. Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

**Received:** 17 Oct 2018    **Accepted:** 3 Dec 2018

### Abstract

**Background:** Antimicrobial peptides are one of the vital components of innate immunity in plants and animals. The identification and introduction of novel and effective peptide molecules to plants is a cost-effective way both to improve the resistance of crop plant species to pathogens, and to produce peptides for pharmaceutical applications by using recombinant DNA technology.

**Material and Methods:** An expression construct containing the omiganan (MBI-226) antimicrobial gene sequence was cloned and used for tobacco and potato *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Following tissue culture, Polymerase chain reaction analysis (PCR) confirmed that some kanamycin resistant plants are transgenic. A number of transgenic plants, along with a non-transgenic control, were selected. Total protein was extracted from the transgenic plants, and the non-transgenic control, and was used for antimicrobial activity assay against some human pathogens, including; *Escherchia coli*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* using the disc diffusion method.

**Results:** Total protein extract from transgenic plants was significantly ( $P < 0.05$ ) able to inhibit the majority of bacteria growth, whereas non-transgenic total protein extract did not inhibit human pathogens growth. There was a significant difference ( $P < 0.05$ ) between transgenic lines with respect to omiganan peptide activity. In contrary to gram-negative bacteria, omiganan peptide did not have a significant effect ( $P > 0.05$ ) on human gram-positive pathogenic bacteria.

**Conclusion:** The total protein from the omiganan-expressing peptide had a strong antibacterial activity against some human bacterial pathogens. By expression and purification of the omiganan peptide, the peptide could be used as an antibiotic to destroy pathogenic bacteria. This approach could open an opportunity to produce antibacterial peptides in plants for pharmaceutical applications.

**Keywords:** Antimicrobial peptides, *Agrobacterium tumefaciens*, Pathogen, Recombinant protein, Tobacco.

\***Citation:** Nazarian Firouzabadi F, Badrhadad A, Sheikhian A. The cloning and *in planta* expression of an omiganan antimicrobial peptide in tobacco and potato plants to control human bacterial pathogens growth. *Yafte*. 2019; 20(4):14-29.