

شناسایی ژن‌های سیکلوتید در گونه‌های بنفشه و بررسی آثار ضد میکروبی سیکلوتیدهای استخراج شده

محبوبه ضرابی^{۱*}، اکرم روشن^۲، عزت عسگرانی^۳، مونا پاکدل^۴، مهسا رویینی^۲

۱. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران
۳. دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران
۴. کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۰ آبان ۱۳۹۴
تاریخ پذیرش: ۱۸ اسفند ۱۳۹۴

اهداف سیکلوتیدها خانواده بزرگی از پپتیدهای گیاهی با فعالیت زیستی و ویژگی‌های ساختاری متمایز است که در خانواده‌های گیاهی روبیاسه‌ها، کوروبیتاسه‌ها و ویولاسه‌ها بیان می‌شود. سیکلوتیدها به دلیل فعالیت‌های زیستی متعدد از جمله ضد ویروس، ضد باکتری و ضد سرطان، همچنین ساختار منحصر به فردی که پایداری حرارتی و آنزیمی بی نظیری به آن بخشیده است، انتخابی مناسبی برای مهندسی پروتئین در کاربردهای دارویی و کشاورزی است.

مواد و روش‌ها در این پژوهش، استخراج ژن‌های کدکننده سیکلوتیدها از چهار نمونه گیاه بنفشه *V. odorata*، *V. spathulata*، *V. ignobilis* و *V. occulta* انجام شد. به منظور شناسایی ژن سیکلوتید، طراحی پرایمر و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز صورت گرفت. همچنین، آثار ضد میکروبی مجموعه سیکلوتیدها بررسی شد. برای رسیدن به این هدف از روش جزءگیری و استخراج با فاز جامد استفاده شد.

یافته‌ها حضور ژن‌های سیکلوتید در گونه‌های مورد مطالعه به اثبات رسید. بررسی آثار ضد میکروبی سیکلوتیدها نشان داد که از میان باکتری‌های بیماری‌زای انسانی *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین حساسیت را به پپتیدهای مورد مطالعه دارد و در بین مجموعه باکتری‌ها بیشترین حساسیت مربوط به سویه *زانتوموناس اوریزوا* است، چرا که نقش ذاتی سیکلوتیدها در گیاه میزبان دفاع در مقابل آفات است.

نتیجه‌گیری به طور کلی، به نظر می‌رسد که احتمالاً می‌توان از پپتید سیکلوتید حاصل از این گونه‌های بنفشه به دلیل وجود اثر ضد میکروبی در مصارف دارویی استفاده کرد. همچنین، مطالعه توالی سیکلوتیدها نشان می‌دهد، علی‌رغم وجود اسید آمینه‌های حفاظت‌شده در اکثر سیکلوتیدها، تفاوت عملکرد در آن‌ها به دلیل تنوع توالی است.

کلیدواژه‌ها:

اثر ضد میکروبی، سیکلوتید، گیاه بنفشه.

مقدمه

پپتیدهای حلقوی در همه موجودات وجود دارد و غالباً دارای ساختار حلقوی سر-دم و یک یا چند پیوند دی‌سولفید است. به دلیل پایداری منحصر به فرد خود در برابر عوامل شیمیایی، حرارتی و بیولوژیکی، انتخاب مناسبی برای طراحی داروست [۱]. سیکلوتیدها پپتیدهای حلقوی گیاهی با طول ۲۸-۳۷ آمینو اسید و دارای سه پیوند دی‌سولفید با آرایش سیستمین

نوت است [۲]. تاکنون ۲۲ جنس و ۹۰۰ گونه از خانواده ویولاسه‌ها شناسایی شده است که عمدتاً در مناطق معتدله متمرکزند. همه گونه‌های بررسی شده خانواده بنفشه حاوی سیکلوتید است [۳]. نمونه اصلی سیکلوتیدی *kalataB1* است که نخست در برگ‌های گیاه آفریقایی *affinis Oldenlandia* کشف شد [۴]. فعالیت ذاتی سیکلوتید در میزبان گیاهی، دفاع در مقابل آفات و پاتوژن‌هاست. برخی فعالیت‌های زیستی

* نویسنده مسئول: محبوبه ضرابی

نشانی: تهران، دانشگاه الزهراء، دانشکده علوم زیستی

تلفن: ۰۲۱ ۸۵۶۹۲۷۲۲

رایانه: mzarrabi@alzahra.ac.ir

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۴، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۶، ص ۸۹-۹۶.

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

طبیعی با بازده عالی استفاده می‌شود و روش‌های بیان با مداخله اینتین در بیان سیکلوتیدها در *ای کولای*، با بازده تا بیش از ۱-۰/۵ میلی گرم بر لیتر از باکتری کشت داده شده توسعه یافته است [۱۲].

هدف از این تحقیق استخراج ژن‌های کدکننده سیکلوتیدها از چهار گونه بنفشه شامل *V. spathulata*، *V. odorata*، *V. ignobilis* و *V. occulta* و بررسی ویژگی‌های ضدمیکروبی پپتیدی آن است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه و استخراج DNA

گونه‌های گیاهی مورد استفاده در این پژوهش از نواحی استان‌های مازندران (*Viola odorata*، *Viola ignobilis*)، زنجان (*Viola occulta*) و ارتفاعات البرز (*V. spathulata*) در کشور ایران، در فصل بهار جمع‌آوری شد. گیاهان در مرکز تحقیقاتی دارو و گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی شناسایی شد (کد هر باریم PNSH-900280). DNA تام با استفاده از بافر C-TAB با پروتکل شرح داده شده پیرتیل و همکاران جدا شد [۱۳]. سپس، کیفیت و غلظت DNA تخلیص شده با استفاده از اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز آگارز ۸ درصد تعیین شد. پرایمرهای مورد استفاده در این واکنش بر اساس توالی‌های سیکلوتیدها طراحی شد که در Genbank موجود است. همچنین، از نرم‌افزار Genrunner در طراحی استفاده شده است (جدول ۱).

طراحی پرایمر و واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز

برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت زیر انجام شد: چرخه واسرشتی اولیه در 94°C به مدت پنج دقیقه، سی سیکل واسرشت در یک دقیقه؛ در 94°C اتصال در یک دقیقه؛ در $52-72^{\circ}\text{C}$ (بر اساس پرایمر) گسترش در یک دقیقه؛ در 72°C مرحله بعد شامل چرخه گسترش نهایی در ۲۰ دقیقه.

سیکلوتید شامل ضدمیکروب [۵]، anti-HIV [۶]، ضدسرطان [۷] و حشره‌کش [۸] است.

در تحقیق تام و همکاران چهار سیکلوتید کاملاً به روش شیمیایی سنتز و فعالیت آن علیه باکتری‌های مختلف (چهار گرم-منفی و دو گرم-مثبت) با استفاده از سنجش انتشار شعاعی (RAD) بررسی شد. سیکلوتیدهای سنتزی شامل *kalataB1* است که علیه باکتری‌های گرم-مثبت مثل *اورئوس* در غلظت‌های زیر میکرومولار فعال است؛ ولی علیه باکتری‌های گرم-منفی نسبتاً غیرفعال است. سازوکار اثر آن از سازوکار تخریب‌کننده غشا تبعیت می‌کند؛ اما سازوکار دقیق عملکرد و ارتباط میان ساختار و توانایی بالقوه آن هنوز به خوبی شناخته نشده است [۹]. با استفاده از این نتایج و بررسی سیکلوتیدهای سنتزی و فولدینگ اکسایشی سیکلوتیدها، چنین برمی‌آید که ساختار منحصر به فرد سیکلوتیدها نقطه قوتی برای طراحی آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی است [۱۰].

مطالعات نشان داده‌اند که ساختار سیکلوتیدها در مقابل جهش‌ها انعطاف‌پذیر است. این امر قابلیت کاربرد دارویی آن را افزایش می‌دهد. سیکلوتیدها موتیف گره سیستینی (cystine knot) ساخته شده از سه پیوند دی‌سولفید حفاظت شده را شامل می‌شود. دو پیوند از این پیوندهای دی‌سولفیدی و بخش‌های ساختمان اصلی متصل‌کننده آن حلقه‌ای را تشکیل می‌دهد که در ساختار پپتید جاسازی شده است و با باند دی‌سولفیدی سوم احاطه می‌شود. ساختار گره سیستین حلقوی (CCK) سبب مقاومت و پایداری منحصر به فرد سیکلوتیدها به حرارت، مواد شیمیایی و آنزیم‌ها شده است [۱۱]. بعضی گیاهان تولیدکننده سیکلوتید به صورت طبیعی، برخی سیکلوتیدها را با بازده تا ۲ گرم از سیکلوتید به ازای هر کیلوگرم از بافت گیاهی، بسیار کارآمد می‌سازد و اگر این را بتوان به تولید سیکلوتیدهای دارویی تغییر یافته در گیاهان تراریخت مبدل کرد، احتمالاً مقرون به صرفه‌ترین راه تولید سیکلوتیدها خواهد بود. سلول‌های گیاهی کشت داده شده *O. affinis* نیز برای تولید سیکلوتیدهای

جدول ۱. توالی و مشخصات پرایمرها در گونه‌های مورد مطالعه

نام پرایمر	توالی	Tm(°C)	طول قطعه تکثیر	نام گونه
Vbc F Vbc R	ACCGTCATCTCAAATCC CGAGAGAGTTCTCTGTAGC	۵۲/۵ ۵۲/۶	۱۵۰ Bp	<i>V. ignobilis</i> <i>V. odorata</i> <i>V. occulta</i>
Forward A Reverse A	GACCTTTGAGAAAGATTTTCATCAC AAGGAGACATCAAACCACGC	۶۴/۲ ۶۳/۸	۵۷۰ bp vsc-1	<i>V. spathulata</i>
Forward B Reverse B	GACCTTTGAGAAAGATTTTCATCAC GCAAAACACACGAGCGGAG	۶۴/۲ ۶۳/۸	۴۴۴ bp vsc-3	
Forward C Reverse C	AGTCTGCACCAGAAACTCTCTTG GGTAAATCCATATGTCACGAGC	۶۵ ۶۳/۶	۴۷۹ bp vsc-1	

شسته شد. در نهایت در ۱ میلی‌لیتر از همان بافر سوسپانسیون گشت. تعداد تقریبی 4×10^4 CFU از باکتری مورد نظر به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت A اضافه شد. این مخلوط خوب به هم زده شد و در پتری دیشی به قطر ۸۵ میلی‌متر اضافه شد به گونه‌ای که لایه یکنواختی ایجاد شود. بعد از بسته شدن محیط کشت در پلیت، چاهک‌هایی به قطر ۳ میلی‌متر تعیین و نمونه‌های پپتیدی به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها در دمای 37°C به مدت سه ساعت انکوبه شد. در این مدت پپتیدها اجازه انتشار پیدا خواهد کرد. سپس، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت B که دمای آن 42°C است به پلیت‌ها افزوده شد، به گونه‌ای که لایه یکنواختی ایجاد شود. بعد از ۱۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در 37°C قطر ناحیه شفاف با خط‌کش اندازه‌گیری شد. سوبه‌های به کار رفته در تعیین آثار ضد میکروبی در این پژوهش در جدول ۲ ذکر شده است.

جدول ۲. سوبه‌های مورد استفاده در تعیین آثار ضد پپتیدی

Escherichia coli ATCC25922	سوبه‌های بیماری‌زای انسانی
Staphylococcus aureus PTCC1431	
Xanthomonas aeruginosa ATCC27853	
Xanthomonas oryzae	باکتری‌های بیماری‌زای گیاهان
Rizobium cicer	باکتری‌های مفید خاک
Bacillus sp.	

سنجش انتشار شعاعی (RDA)

روش انتشار شعاعی به منظور بررسی قدرت ضد میکروبی پپتیدهای استخراج شده استفاده شد. به طور خلاصه، در این روش باکتری‌ها در محیط TSB (Tryptone Soy Broth) رشد کرد تا میزان جذب نوری آن در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۳ برسد. سپس، ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت در 4°C با سرعت ۳۴۰۰ g به مدت ده دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل یک بار با بافر فسفات سدیم SPB ۰/۱ میلی‌مولار و pH ۸ شسته و سرانجام در SPB سرد سوسپانسیون شد. تقریباً 4×10^6 کلونی در لایه زیرین محیط کشت شامل 0.03 W/v درصد TSB، 1 W/v درصد آگارز LE و 0.02 V/v درصد Tween 20 جمع شد. مخلوط به پتری دیش اضافه شد (۸۵ میلی‌لیتر). در نهایت، با استفاده از ژل ۳ میلی‌متری دیواره‌هایی ساخته و ۵ یا ۱۰ میکرولیتر پپتید استخراج (غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) یا کنترل ۵ میکرولیتر DMSO ۱۰ درصد به هر دیواره اضافه شد. مخلوط به مدت سه ساعت در دمای 37°C به منظور انتشار پپتیدها در انکوباتور گذاشته شد. سپس، لایه بالایی کشت (6 W/v درصد TSB، 1 W/v درصد آگارز در ۱۰ میلی‌لیتر SPB) اضافه شد. پلیت‌ها یک شب در دمای 37°C انکوبه شد.

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ژل الکتروفورز تخلیص شده پس از خالص‌سازی باندها به کمک کیت Qiagen، برای تعیین توالی به شرکت Bioneer فرستاده شد.

استخراج پپتید

به منظور حذف پلی‌پپتیدها، باقی‌مانده خشک شده گیاه با محلول اتانول ۵۰ درصد آبی عصاره‌گیری شد. این عصاره در جریان هوا به مدت یک شب تغلیظ و با افزودن استیک اسید به میزان ۲ درصد حجم نهایی عصاره اسیدی شد. با استفاده از ستون پلی‌آمید، پلی‌فنل‌های موجود در عصاره اتانولی حذف شد. سپس، با لیوفیلیزاسیون عصاره را به صورت پودر خشک درآوردیم. برای تکمیل مراحل خالص‌سازی ۱ گرم از پودر به دست آمده در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر حل و سه بار با ۱۰۰ سی‌سی بوتانول عصاره‌گیری شد. در این مرحله، بعد از حذف حلال فاز بوتانولی مرحله قبل، ۲۵ میلی‌گرم از پودر به دست آمده در ۸ میلی‌لیتر بافر استات آمونیم برای حذف ناخالصی‌ها حل شد. نمونه روی ستون سلیکاژل C18 به ترتیب با محلول‌های ۲۰، ۵۰ و ۸۰ درصد اتانول شست‌وشو داده شد (۴ میلی‌لیتر از هر محلول). سپس، سنجش پروتئین با روش بردفورد صورت گرفت. همچنین، میزان خلوص نمونه پپتیدی با روش Tricin-PAGE تعیین شد.

بررسی آثار ضد میکروبی سیکلوتیدها

به منظور بررسی آثار ضد میکروبی سیکلوتیدها، نخست بافر فسفات سدیم تهیه شد. محیط‌های کشت به کار رفته شامل TSA و TSB و محیط‌های کشت A و B مورد استفاده در سنجش انتشار شعاعی است. محیط کشت A حاوی TSB، آگارز LE (Low Electro density)، و توئین ۲۰ و محیط کشت B حاوی TSB، آگارز LE است که هر دو محیط با بافر فسفات سدیم به حجم مورد نظر رسید. به دلیل اینکه پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی سیکلوتیدها باردار است، برای کاهش میان‌کنش الکترواستاتیکی میان آن و اجزای سولفات رزیدوهای قند آگار و بکتین به جای آگار از ماده ژلاتینی آگارز LE استفاده شد [۱۴].

به منظور سنجش فعالیت ضد میکروبی مجموعه پلی‌پپتیدهای استخراج شده، روش انتشار شعاعی (RDA) استفاده شد [۱۰]. نخست، هر یک از باکتری‌ها در محیط TSB رشد داده شد تا میزان OD آن‌ها در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۳ برسد. سپس، به میزان ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت در دمای 4°C و به مدت ده دقیقه با سرعت ۳۴۰۰ g سانتریفوژ شد. سپس، رسوب سلول‌های باکتریایی یک بار با بافر فسفات سدیم سرد

یافته‌ها

توالی سیکلوتیدها

اطلاعات مربوط به کیفیت DNA استخراج‌شده با روش C-TAB در گونه‌های *V. odorata*، *V. occulta*، *V. ignobilis* و *V. spathulata* در جدول ۳ آمده است.

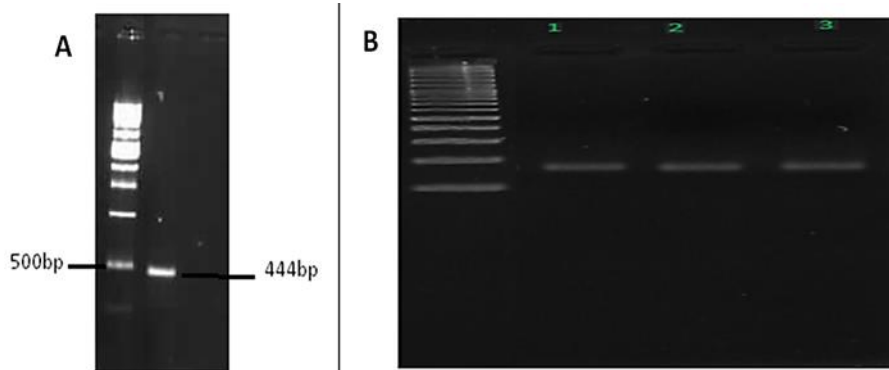
جدول ۳. کیفیت DNA استخراج‌شده

نمونه	غلظت DNA (ng/μl)	۲۶۰/۲۳۰	۲۶۰/۲۸۰
<i>V. ignobilis</i>	۸۲۴/۶	۱/۸	۱/۹۱
<i>V. odorata</i>	۲۰۰	۱/۸	۱/۹
<i>V. occulta</i>	۸۷۲/۶	۱/۹	۲
<i>V. spathulata</i>	۰/۰۸	۱/۳۸	۱/۸۶

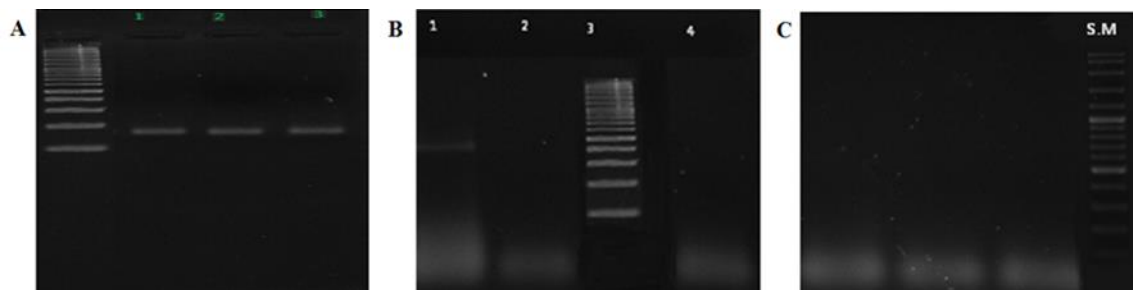
با استفاده از پرایمرهای *mra* باندی رؤیت نشد. بنابراین، ژن سیکلوتید در تمام گونه‌های مورد بررسی مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۴. توالی‌های پپتیدی حاصل از ترجمه ژن *vbc* استخراج‌شده در گونه‌های *V. spathulata*، *V. ignobilis*، *V. occulta*، *V. odorata*

نام گونه	توالی پپتیدی حاصل از ترجمه ژن <i>vbc</i> استخراج‌شده
<i>V. odorata</i>	TVISNPVLEEALLKNSHG VNGIPCGESC V WIP CISA AIGC SCKSKVCYRNSL
<i>V. occulta</i>	IPCGESCVRIPCITAAFGCSCNSKVCYRNSL
<i>V. ignobilis</i>	LLTQSGRYGIPCSESCVFIQCFTAAIGCSCNSKVCYRNSL
<i>V. spathulata</i>	ESAPLSNLMLLEEDVINALLKSKTVISNPIIEALLKNSNGLNGIPCGESC V WIP CISA AIGC SCKNKVCYRNSLDN



شکل ۱. (A) شناسایی ژن سیکلوتید در نمونه *V. spathulata* همراه با شاخص وزن مولکولی ۱۰۰ bp (+) (B) شناسایی ژن سیکلوتید در سه نمونه *V. odorata*، *V. ignobilis* و *V. occulta* همراه با شاخص وزن مولکولی ۱۰۰ bp (+)



شکل ۲. (A) تکثیر PCR از پرایمر *vbc* برای DNA ژنومی. ردیف ۱: *vbc1* از *V. odorata*، ردیف ۲: *vbc* از *V. ignobilis*، ردیف ۳: *vbc3* از *V. occulta* (B) تکثیر PCR از پرایمر *kalata* برای DNA ژنومی. ردیف ۱: *V. ignobilis* (C) تکثیر PCR از پرایمر *mra* برای DNA ژنومی در هر سه گونه

باکتری‌های بیماری‌زا در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج بیانگر این است که محلول اتانول ۵۰ درصد بیشترین اثر ضدباکتری را در مجموعه مورد مطالعه دارد.

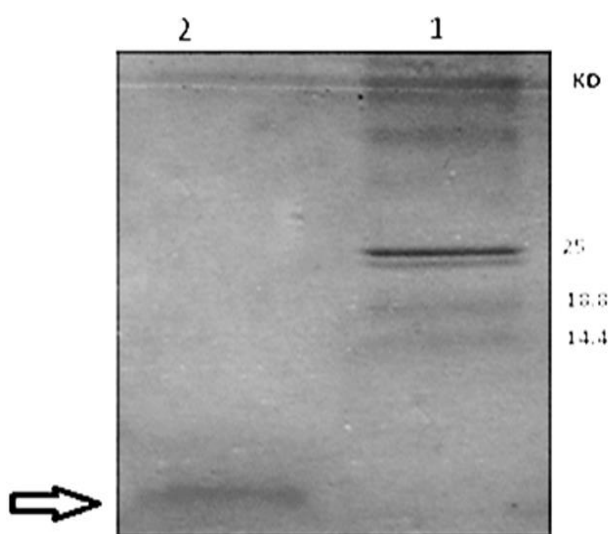
بحث

با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد سیکلوتیدها و قابلیت‌های درمانی آن، اخیراً [۱۸] مطالعات گسترده‌ای در زمینه شناسایی ژن آن‌ها صورت گرفته است، چرا که با به دست آوردن ژن رمزکننده سیکلوتید می‌توان آن را در میزبان مناسب تولید کرد. به تازگی، سیستم‌های بیانی گیاهان در باکتری‌ها برای تولید پپتیدهای حلقوی گسترش یافته است. نخستین مطالعات روی ژن‌های سیکلوتیدها را دوتان و همکاران روی گیاه *O. affinis* و *V. odorata* از خانواده Rubiaceae و ژانگ و همکاران روی گیاه *Viola baoshanensis* با استفاده از تکنیک RACE و RT-PCR انجام دادند [۱۹ و ۲۰]. مطالعات صورت گرفته در ایران روی ژن‌های سیکلوتید محدود به پژوهشی است که دلیر و همکاران روی *V. odorata* انجام دادند [۱۵].

پژوهش حاضر، به منظور شناسایی ژن‌های سیکلوتید از برگ گیاهان بنفشه استفاده شد. لازم به یادآوری است پراکندگی دو گونه *V. ignobilis* و *V. occulta* محدود به ایران و چند کشور همسایه شرقی ایران است. گونه *V. spathulata* نیز از نظر جغرافیایی منحصر به ایران است و تاکنون هیچ گونه مطالعه‌ای روی ژن‌های آن صورت نگرفته است. با استفاده از پرایمر طراحی شده از منطقه ترجمه نشده (NTR) و بخش انتهایی پپتید بالغ، برخی ژن‌های سیکلوتید در گونه‌های مورد مطالعه شناسایی شد. حفاظت شدگی منطقه NTR نقش حیاتی آن را در پیچ‌خوردگی و پردازش سیکلوتید نشان می‌دهد [۱۹]. حضور ژن *kalata* در گونه *V. ignobilis* ژن *vbc* در سه گونه *occulta*، *ignobilis* و *odorata* و ژن *voc3* در *spathulata* به اثبات رسید. همچنین، عدم حضور ژن *mra* در گونه‌های مورد مطالعه مشخص شد.

بررسی وزن مولکولی سیکلوتید استخراج شده

طبق نتایج حاصل از پژوهش‌های انجام شده [۱۵ و ۱۶] بیشترین غلظت سیکلوتید در محلول اتانولی ۵۰ درصد حاصل از شست‌وشوی ستون SPE وجود دارد. برای تأیید حضور سیکلوتید در این محلول از روش Tricine-SDS-PAGE استفاده شد. وزن مولکولی سیکلوتیدها بین ۲۸۰۰ تا ۵۰۰۰ دالتون است (شکل ۳).



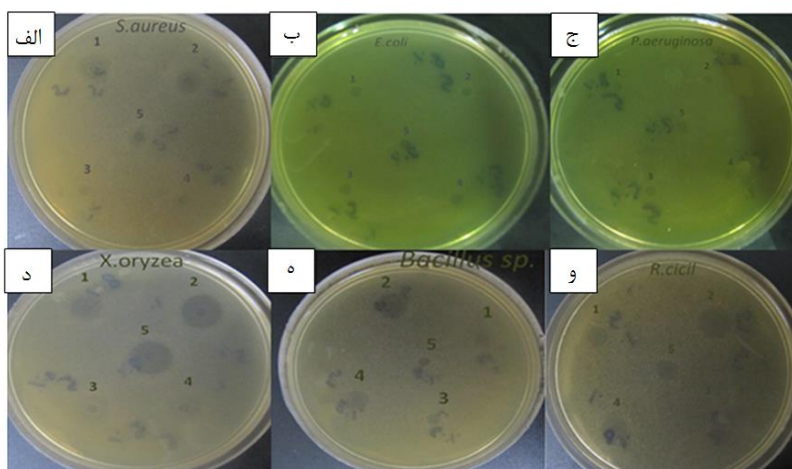
شکل ۳. ستون ۱. مارکر وزن مولکولی، ستون ۲. محلول حاصل از شست‌وشو با اتانول ۵۰ درصد

سنجش RDA در باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

مطالعات گذشته نشان می‌دهد که RDA روش مفیدی برای بررسی فعالیت ضد میکروبی مواد مختلف است [۱۷]. بنابراین، در این مطالعه نیز از این روش در ارزیابی فعالیت مجموعه سیکلوتیدهای نیمه‌خالص شده در محلول اتانول ۲۰، ۵۰ و ۸۰ درصد استفاده شد. فعالیت در برابر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی، باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی و باکتری مفید خاک و قطر مناطق شفاف در جدول ۵ آمده است. اثر پپتیدهای استخراج شده در غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مختلف بر

جدول ۵. قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)

گونه‌ها	محلول اتانول ۲۰ درصد	محلول اتانول ۵۰ درصد	محلول اتانول ۸۰ درصد
<i>S. aureus</i>	۴	۱۰	۰
<i>E. coli</i>	۰	۰	۰
<i>P. aeruginosa</i>	۰	۰	۰
<i>X. oryzae</i>	۱۲	۱۳	۹
<i>Bacillus sp.</i>	۰	۸	۵
<i>Rizobium. cicil</i>	۶	۹	۶



شکل ۴. الف) اثر ضد میکروبی سیکلوتیدها بر *S. aureus*: ۱: ۵ μ و ۲: ۱۰ محلول اتانولی ۵۰ درصد، ۳: ۵ μ و ۴: ۱۰ محلول اتانولی ۸۰ درصد، ۵: ۱۰ μ محلول اتانولی ۲۰ درصد. ب) اثر ضد میکروبی سیکلوتیدها بر *E. coli*: ۱: ۵ μ و ۲: ۱۰ محلول اتانولی ۵۰ درصد، ۳: ۵ μ و ۴: ۱۰ محلول اتانولی ۸۰ درصد، ۵: شاهد سالین. ج) اثر ضد میکروبی سیکلوتیدها بر *P. aeruginosa*: ۱: ۵ μ و ۲: ۱۰ محلول اتانولی ۵۰ درصد، ۳: ۵ μ و ۴: ۱۰ محلول اتانولی ۸۰ درصد، ۵: شاهد سالین. د) اثر ضد میکروبی سیکلوتیدها بر *X. oryzae*: ۱: ۵ μ و ۲: ۱۰ محلول اتانولی ۵۰ درصد، ۳: ۵ μ و ۴: ۱۰ محلول اتانولی ۸۰ درصد، ۵: شاهد سالین. ه) و) اثر ضد میکروبی سیکلوتیدها بر باکتری‌های مفید خاک: ۱: ۵ μ و ۲: ۱۰ محلول اتانولی ۵۰ درصد، ۳: ۵ μ و ۴: ۱۰ محلول اتانولی ۸۰ درصد، ۵: ۱۰ μ محلول اتانولی ۲۰ درصد

جایگزین شده است، هر دو آمینو اسید آب‌گریز است. برهم کنش مجموعه آمینو اسیدهای لوپ ۲ و ۳ تعیین‌کننده نوع فعالیت سیکلوتیدهاست. در توالی پیشگویی شده از *V. ignobilis* در لوپ ۳ فنیل‌آلانین جایگاه ۱۵ با تریپتوفان از cyclotide2d جایگزین شده است. ویژگی زنجیره جانبی این دو آمینو اسید یکسان است. همچنین، فنیل‌آلانین جایگاه ۱۹ با لوسین جایگزین شده است. این آمینو اسیدها آب‌گریز است. با توجه به این تغییرات در پپتید پیشگویی شده حاصل از نمونه *V. ignobilis* احتمالاً ویژگی اتصال به غشای آن تغییر نخواهد کرد.

روش‌های مختلفی برای استخراج سیکلوتید از گیاه به کار می‌رود. تا سال ۲۰۰۵ روش Cleason با کمی تغییرات استفاده می‌شده است [۲۱]. روش کروماتوگرافی سفادکس، پارتیشن‌بندی حلال-حلال و کروماتوگرافی تعویض یونی روش‌هایی بود که در سال‌های بعد استفاده شد [۲۲]. تست Tricine-SDS-PAGE نشان داد غلظت سیکلوتید در محلول اتانولی ۵۰ درصد حاصل از شست‌وشوی ستون SPE نسبت به دو محلول دیگر بیشتر است. مطالعات آثار ضد میکروبی این محلول‌ها را نشان داد. اثر ضد میکروبی محلول اتانولی ۵۰ درصد بیشتر است که تأییدکننده یافته‌های مطالعه‌های هاشم‌پور و همکاران [۱۶] و دلیر و همکاران [۱۵] است.

فعالیت‌های مختلف سیکلوتیدها از جمله فعالیت‌های ضد ویروسی، ضد میکروبی، ضد کرمی و ضد سرطانی موضوع

با توجه به نتایج تعیین توالی ژن و ترجمه آن به توالی آمینو اسیدی و سپس مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی مشخص شد، پپتید پیشگویی شده از گونه *V. odorata* شباهت را به پپتید vbc6 و پپتیدهای پیشگویی شده از نمونه‌های *V. ignobilis* و *V. occulta* بیشترین شباهت را به پپتید سیکلوتید 2d ثبت شده در Gene Bank داشت.

در مورد پپتید پیشگویی شده از گونه *spathulata*، نتایج ۹۶ درصد شباهت را با پپتید سیکلوویولاسین ۱۳۰ نشان می‌دهد. در پپتید پیشگویی شده از نمونه *Viola odorata* در لوپ ۳ آلانین جایگاه ۳۶ با سرین جایگزین شده است. با توجه به خاصیت آب‌گریزی آلانین این پپتید نسبت به vbc6 که شبیه‌ترین پپتید به خود است، قابلیت اتصال بیشتری به غشا دارد. بنابراین، احتمالاً قابلیت درمانی بالاتری دارد. البته، سیکلوتید c3 استخراج شده از *V. odorata* نیز در این جایگاه آلانین دارد. به علاوه، در این لوپ سرین جایگاه ۳۵ با ترئونین جایگزین شده است که به دلیل ویژگی‌های یکسان زنجیره جانبی این دو آمینو اسید، تغییری در توانایی اتصال پپتید ایجاد نمی‌کند. همچنین در توالی پیشگویی شده از *Viola occulta* در لوپ ۲ آرژنین جایگاه ۹ با تریپتوفان در cyclotide2d جایگزین شده است. با توجه به بیشتر بودن خاصیت آب‌گریزی در تریپتوفان احتمالاً توانایی کمتری برای اتصال به غشا دارد. در لوپ ۳ نیز فنیل‌آلانین با ایزولوسین

میلی‌متر) آشکارا از سایر باکتری‌های به‌کاررفته بیشتر است. این یافته با نتایج دلیر و همکاران [۱۵] مطابقت دارد. با توجه به نقش ذاتی سیکلوتیدها در دفاع میزبان این یافته توجیه می‌شود. در بررسی امکان آفت‌کشی سیکلوتید، باکتری‌های مفید خاک تحت تأثیر سیکلوتیدهای استخراج‌شده قرار گرفت. حساسیت این باکتری‌ها از باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی کمتر است.

این نتایج نشان می‌دهد استفاده از سیکلوتید در آفت‌کشی نیاز به تغییرات لازم از طریق مهندسی پروتئین دارد تا اثر آن روی باکتری‌های مفید خاک به حداقل برسد. با توجه به انعطاف‌پذیری ساختار سیکلوتید که در قسمت اول به آن اشاره کردیم، انجام چنین تغییراتی امکان‌پذیر است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه الزهرا (س) برای حمایت مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنیم.

References

- [1] Mousavi Nejad SZ, Mousavi F, Shakib H. Antimicrobial peptides. Biochemistry. Tehran, 2011. [in Persian]
- [2] Jennings CV, Rosengren KJ, Daly NL, Plan M, Stevens J, Scanlon MJ and et al. Isolation, solution structure, and insecticidal activity of kalataB2, a circular protein with a twist: do Möbius strips exist in nature. Biochemistry. 2005; 44(3): 851-60.
- [3] Daly NL, Rosengren KJ, Craik DJ. Discovery, structure and biological activities of cyclotides. Adv Drug Deliv Rev, 2009; 61(11): 918-30.
- [4] Gran L. On the isolation of tetramethylputrescine from Oldenlandiaaffinis. Lloydia, 1973; 36(2): 209-10.
- [5] Ovesen RG, Brandt KK, Göransson U, Nielsen J, Hansen HC, Cedergreen N. Biomedicine in the environment: cyclotides constitute potent natural toxins in plants and soil bacteria. Environ Toxicol Chem. 2011; 30(5): 1190-6.
- [6] Gustafson KR, Sowder RC, Henderson LE, Parsons IC, Kashman Y, et al. Novel Hiv-inhibitory macrocyclic peptides from the tropical tree *Chassalia parvifolia*. J Am Chem Soc, 1994. 116(20): 9337-9338.
- [7] Lindholm P, Göransson U, Johansson S, Claesson P, Gullbo J, Larsson R, et al. Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents. Mol Cancer Ther, 2002; 1(6): 365-9.
- [8] Jennings C, West J, Waite C, Craik D, Anderson M. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from Oldenlandiaaffinis. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001; 98(19): 10614-9.
- [9] Henriques ST, Craik DJ. Cyclotides as templates in drug design. Drug Discov Today, 2010; 15(1-2): 57-64.
- [10] Pránting M1, Lööv C, Burman R, Göransson U, Andersson DI. The cyclotide cycloviolacin O₂ from *Viola odorata* has potent bactericidal activity against Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother, 2010; 65(9): 1964-71.

بسیاری از پژوهش‌ها قرار گرفته است. سیکلوتیدهای سنتزی شامل kalataB1 است علیه باکتری‌های گرم- مثبت مثل *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت‌های زیر میکرومولار فعال است، ولی علیه باکتری‌های گرم- منفی نسبتاً غیرفعال است، که با نتایج ذکرشده در این بخش سازگار است [۲۳].

پرانیتینگ و همکاران اثر cycloviolacin O₂ را علیه طیفی از باکتری‌های گرم- مثبت و گرم- منفی مطالعه کردند و دریافتند این سیکلوتید علیه سویه‌های گرم- منفی اثر بیشتری دارد [۱۰]. سیکلوتیدهای مورد استفاده در این پژوهش در بین باکتری‌های بیماری‌زای انسانی بیشترین اثر را روی *Staphylococcus aureus* دارد، به‌طوری که تأثیر آن روی *اشرشیا کولی* و *سودوموناس آئروجینوزا* تقریباً صفر است.

مطالعه اثر ضد میکروبی روی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی و مفید خاک محدود به پژوهشی است که دلیر و همکاران [۱۵] انجام داد.

مجموعه پپتیدی به‌کاررفته در این مطالعه بیشترین اثر را روی *زانتوموناس اوریزوا* دارد. قطر هاله عدم رشد (۱۳)

- [11] Clark RJ, Daly NL, Craik DJ. Structural plasticity of the cyclic-cystine-knot framework: implications for biological activity and drug design. Biochem J., 2006; 394(1): 85-93.
- [12] Qin Q, McCallum EJ, Kaas Q, Suda J, Saska I, Craik DJ and et al. Identification of candidates for cyclotide biosynthesis and cyclisation by expressed sequence tag analysis of Oldenlandiaaffinis. BMC Genomics, 2010; 11(111): 1-11.
- [13] Pirttilä A.N, Hirsikorpi M, Kamarinen T, Jaakola L, Hohtola A. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plant. Plant Molecular Biology Reporter, 2001; 19(3): 273-273.
- [14] Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, Jackson R, Eisenhauer P. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. J Immunol Methods, 1991; 137(2): 167-73.
- [15] Zarrabi M, Dalirfardouei R, Sepehrizade Z, Kermanshahi RK. Comparison of the antimicrobial effects of semi-purified cyclotides from Iranian *Viola odorata* against some of plant and human pathogenic bacteria. Journal of Applied Microbiology, 2013; 115(2): 367-57.
- [16] Hashempour H, Ghassempour A, Daly NL, Spengler B, Römpp A. Analysis of cyclotides in *Viola ignobilis* by Nano liquid chromatography fourier transform mass spectrometry. Protein Pept Lett, 2011; 18(7): 747-52.
- [17] Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, Jackson R, Eisenhauer P. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. J Immunol Methods, 1991; 137(2): 167-73.
- [18] Biomedicine in the environment: cyclotides constitute potent natural toxins in plants and soil bacteria. Ovesen RG, Brandt KK, Göransson U, Nielsen J, Hansen HC, Cedergreen N. Environ Toxicol Chem. 2011; 30(5): 1190-6.
- [19] Dutton JL, Renda RF, Waite C, Clark RJ, Daly NL, Jennings CV, et al. Conserved structural and sequence elements implicated in the processing of gene-encoded circular proteins. Journal of Biology and Chemistry. 2004;

- 279(45), 46858-67.
- [20] Zhang J, Liao B, Craik DJ, Li JT, Hu M, Shu WS. Identification of two suites of cyclotide precursor genes from metallophyte *Viola baoshanensis*: cDNA sequence variation, alternative RNA splicing and potential cyclotide diversity. *Gene*. 2009; 431(1-2): 23-32.
- [21] Claeson P, Göransson U, Johansson S, Luijendijk T, Bohlin L. Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. *J Nat Prod*. 1998; 61(1): 77-81.
- [22] Svargarda E, Göransson U, Smithb D, Vermab C, Backlunda A, Bohlina L, et al. Primary and 3-D modelled structures of two cyclotides from *Viola odorata*. *Phytochemistry*, 2003; 64(1): 135-42.
- [23] Tam Jp, Lu YA, Yang JL, Chiu KW. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc Natl AcadSci USA*, 1999; 96(16): 8913-8918.