

Cloning and Expression of Two New Recombinant Antimicrobial Dermaseptin B1 Peptides in Tobacco to Control the Growth of Human Bacterial Pathogens

Mitra Khademi¹,
Farhad Nazarian-Firouzabadi²,
Ahmad Ismaili³

¹ PhD Student in Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

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

³ Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

(Received December 10, 2018 ; Accepted July 17, 2019)

Abstract

Background and purpose: Rapid emergence of traditional antibiotic-resistant pathogens is one of the most important global challenges in medical sciences. To this end, substitution of current antibiotics with strong antimicrobial peptides could be of great benefit.

Materials and methods: In this study, the DNA sequence encoding dermaseptin B1 (DrsB1) antimicrobial peptide derived from *Phyllomedusa bicolor* frog species was fused to either N or C terminal end of the sequence encoding the chitin-binding domain of the Avr4 gene from *Cladosporium fulvum*. The recombinant expression vectors containing two separate structures were transferred to *Agrobacterium rhizogenes* bacterium and then used to produce Hairy Roots (HRs) in tobacco plants. Recombinant dermaseptin B1 peptides were extracted from HRs and their antimicrobial activity was evaluated against some important human pathogens.

Results: Transgene integration and expression of recombinant DrsB1 in hairy roots were confirmed by PCR and semi-quantitative RT-PCR analysis, respectively. Antimicrobial activity of the protein extracts from transgenic HRs showed that both recombinant proteins had significant inhibitory effects on the bacterial pathogens growth ($P < 0.01$). CBD-DrsB1 recombinant protein had the highest inhibitory activity against *Enterococcus faecalis* and *Bacillus subtilis*, whereas DrsB1-CBD recombinant protein showed the least antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusion: To the best of our knowledge, this study for the first time showed that the new recombinant peptides possess a high antibacterial activity. Acquiring resistance to antimicrobial peptides in bacteria is not readily feasible, therefore, present findings may find application as suitable alternative for current antibiotic drugs.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, gene expression, dermaseptin B1, antimicrobial

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29(176): 47-60 (Persian).

* Corresponding Author: Farhad Nazarian-Firouzabadi - Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran (E-mail: Nazarian.f@lu.ac.ir)

همسانه سازی و بیان دو پپتید ضد میکروبی نو ترکیب جدید Dermaseptin B1 در گیاه توتون برای مقابله با میکروب های بیماری زای انسانی

میترا خادمی^۱
فرهاد نظریان فیروزآبادی^۲
احمد اسماعیلی^۳

چکیده

سابقه و هدف: بیمارگرهای مقاوم به آنتی بیوتیک های رایج، یکی از مهم ترین چالش های جهانی در علوم پزشکی است. یکی از راه کارهای مناسب در این زمینه، جایگزینی پپتیدهای ضد میکروبی قوی به جای آنتی بیوتیک ها در کنترل بیمارگرهای مهم است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، توالی DNA کد کننده پپتید ضد میکروبی (DrsB1) از Dermaseptin B1 از قورباغه جداسازی و به توالی کد کننده دمین مسئول اتصال به کیتین پروتئین فارچی Avf4 به صورت دو سامانه ژنی متصل شد. ناقل های نو ترکیب به صورت جداگانه به کمک باکتری *Agrobacterium rhizogenes* جهت تولید ریشه های موین به ریزنمونه های برگ توتون منتقل شدند. استخراج پپتیدهای نو ترکیب از ریشه های موین توتون انجام شد و فعالیت ضد میکروبی آن ها علیه تعدادی از بیمارگرهای انسانی مهم مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: آنالیزهای PCR و RT-PCR نیمه کمی به ترتیب انتقال ترانس ژن ها و بیان آن ها را در ریشه های موین توتون مورد تأیید قرار دادند. بررسی اثرات ضد میکروبی پپتیدهای نو ترکیب نشان داد که هر دو پپتید نو ترکیب دارای اثرات بازدارندگی معنی داری ($P < 0.01$) در جلوگیری از رشد بیمارگرهای باکتریایی بودند. بیش ترین اثر مهارکنندگی مربوط به پپتید نو ترکیب CBD-DrsB1 بود و علیه باکتری های *Enterococcus faecalis* و *Bacillus subtilis* مشاهده شد، در صورتی که پپتید نو ترکیب DrsB1-CBD علیه باکتری های *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* دارای کمترین اثر ضد میکروبی بود.

استنتاج: نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان داد که پپتیدهای نو ترکیب دارای فعالیت ضد باکتریایی بالایی هستند. از آن جایی که ظهور مقاومت علیه پپتیدهای ضد میکروبی در باکتری ها به سهولت امکان پذیر نیست، احتمالاً راه کار این مطالعه بتواند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی با خواص آنتی بیوتیکی پیشنهاد کند.

واژه های کلیدی: اگر باکتریوم رایزوژنز، بیان ژن، Dermaseptin B1، خاصیت ضد میکروبی

مقدمه

افزایش روزافزون مقاومت دارویی باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک های رایج (۲،۱) سبب شده است تا داروهای جدیدی جهت درمان عفونت ها عرضه شود (۳-۱). با این وجود، تلاش برای یافتن دسته های جدیدی از

Email: Nazarian.f@lu.ac.ir

مؤلف مسئول: فرهاد نظریان: خرم آباد: دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

۲. استاد بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

۳. دانشیار مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

☞ تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۱۰/۳۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۳/۲۶

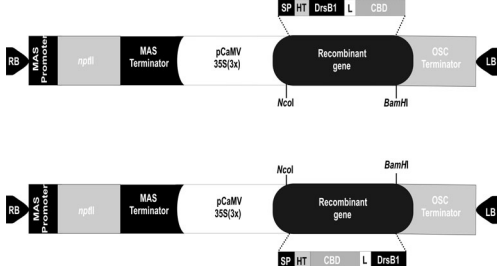
آنتی‌بیوتیک‌ها که با داشتن مکانیسم عمل‌های متنوع بتوانند مانع از رشد باکتری و به دنبال آن عفونت‌های ناشی از آن‌ها شوند از اهمیت فراوانی برخوردار می‌باشد. در میان طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی، پروتئین‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی جایگاه مهمی دارند (۴). پپتیدهای ضد میکروبی توسط طیف وسیعی از موجودات زنده تولید می‌شوند و به دلیل نقش ضروری آن‌ها در سیستم ایمنی ذاتی، از آن‌ها به عنوان پپتیدهای دفاعی میزبان یاد می‌شود (۷-۵). پپتیدهایی ضد میکروبی کاتیونی معمولاً متشکل از ۵۰-۱۲ اسید آمینه با بار مثبت می‌باشند (۸) که موجودات زنده را در مقابل طیف وسیعی از میکروب‌ها (باکتری، قارچ و پروتوزوا) و ویروس‌ها محافظت می‌کنند (۹). پپتیدها بیشتر غشاهای میکروبی را هدف قرار می‌دهند و مانع توانایی میکروب برای توسعه مقاومت علیه آن‌ها می‌شوند (۱۰). همچنین پپتیدهای ضد میکروبی را می‌توان به راحتی در شرایط آزمایشگاهی بر اساس اصول مدلینگ پپتیدها و با اهداف خاصی نظیر درک دقیق مکانیسم عمل، بهبود فعالیت و یا مطالعه کارکرد آن‌ها در حالت هم‌جوشی با شرکای فیوژنی تغییر داد (۱۱، ۱۲). سطوح پایداری و تجمع پپتیدها برای بهبود عملکرد واکنش‌های ضد میکروبی طی حمله بیمارگر ضروری است. به واسطه اندازه کوچک و وزن مولکولی کم، پپتیدهای ضد میکروبی با شرکای هم‌جوشی به عنوان یک استراتژی موثر برای پایدار کردن پپتید، افزایش تجمع آن و حفاظت محصول نهایی از تجزیه پروتئولیتیک محسوب می‌شود. علاوه بر این می‌توان بر اثرات کشنده پپتیدهای ضد میکروبی حاصل بر روی سلول‌های میزبان نیز غلبه نمود (۱۳، ۱۴).

پوست دوزیستانی مانند قورباغه دارای غددی هستند که پوسته پپتیدهای ضد میکروبی تولید و ترشح می‌کنند (۱۵، ۱۶). این غدد پوستی طیف وسیعی از پپتیدهای ضد میکروبی را ترشح می‌کنند که یک سیستم دفاعی مؤثر علیه بیمارگرهای بیماری‌زا محسوب می‌شوند (۱۷-۱۵). از آن جایی که سطح پوست بدن قورباغه‌ها مرطوب است،

بنابراین محل مناسبی برای رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها محسوب می‌شود. با این حال، مواد و پپتیدهای مترشحه از پوست قورباغه‌ها تا حد زیادی از رشد چنین بیمارگرهایی جلوگیری می‌کنند (۱۵، ۱۶). از بین طیف وسیعی از انواع پپتیدهای ضد میکروبی، پپتیدهای کاتیونی خانواده درماسپتین (Dermaseptin) که توسط غدد پوستی برخی از خانواده‌های قورباغه (*Phyllomedusa bicolor*) تولید و ترشح می‌شوند، از ۲۴ تا ۳۴ اسید آمینه تشکیل شده‌اند و در غشاء سلولی حالت α -هلیکسی به خود گرفته و از این رو سبب ایجاد ناپایداری در غشاء میکروب‌های مهاجم می‌شوند (۱۸).

از کشت بافت و سلول گیاهی برای اهداف تولید پروتئین‌های نو ترکیب برای صنعت و داروسازی به طور وسیعی استفاده می‌شود. با این حال، بزرگ‌ترین چالش در این زمینه، ناپایداری ژنتیکی، رشد کم و بازده پایین کشت سلول‌های گیاهی است (۱۹). بنابراین برای غلبه بر این محدودیت‌ها استفاده از آگروباکتريوم رایزوترنز و کشت ریشه‌های مویین به علت رشد سریع، سهولت نگهداری و توانایی سنتز گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی مزیت‌های بیشتری را به عنوان یک منبع پیوسته برای تولید متابولیت‌های ثانویه و پروتئین‌های نو ترکیب ارزشمند ایجاد می‌نماید (۲۰، ۲۱). این سیستم با تولید موفقیت آمیز سه شکل فعال پروتئین‌ها و پپتیدهای نو ترکیب زایلاناز باکتریایی، آلکالین فسفاتاز انسانی (۲۲) و تانوماتین (۲۳) از ریشه مویین گیاه توتون برتری خود را نشان داده است. به منظور بهبود کارایی خاصیت ضد میکروبی، پپتید درماسپتین B1 توسط لینکر به دمین متصل شونده به کیتین از افکتور Avt4 قارچ کلادوسپوریوم فلاوم (*Cladosporium fulvum*) متصل شد. این قارچ در جریان حمله با ترشح افکتورهای Avt4 در زمان آلودگی باعث حفاظت دیواره سلولی در برابر آنزیم‌های هیدرولیتیکی گیاه می‌شود. افکتور Avt4 دارای یک دمین اتصال به کیتین است که با اتصال به کیتین موجود در دیواره سلولی قارچ باعث

nos جهت بیان در گیاه همسانه‌سازی شدند تا ناقل‌های pGSA1285/DrsB1-CBD و pGSA1285/CBD-DrsB1 تولید شوند (تصویر شماره ۱). هر دو ناقل به صورت جداگانه به آگروباکتریوم رایزوزنز (ATCC15834) به روش شوک الکتریکی منتقل شدند. باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط کشت LB واجد آنتی بیوتیک گزینش گر کلرامفنیکل (۵۰ mg/l) به صورت شبانه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و غربال شدند. استخراج پلاسمید از کلونی‌های منتخب با استفاده از کیت (شرکت Thermo Fisher) و همسانه‌سازی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) توسط آغازگرهای اختصاصی مربوط به پپتید DrsB1 انجام شد. صحت توالی همسانه‌سازی شده در ناقل بیانی با ارسال نمونه پلاسمیدی برای توالی‌یابی، مورد تایید قرار گرفت.



تصویر شماره ۱: توالی نوکلئوتیدی و سامانه‌های ژنی طراحی شده برای بیان در سیستم کشت ریشه‌های موئین. MAS Pro: پیش‌بر مانوین سنتاز، mpt II، نومایسین فسفو ترانسفر از II حاوی ژن مقاومت به کانامایسین، MAS-Ter: خاتمه دهنده مانوین سنتاز، CaMV35S: پیش‌بر موزاییک گل کلم توتون، SP-CBD-Linker-DrsB1 و SP-DrsB1-CBD: توالی سامانه‌های فیوژن نوترکیب متشکل از سیگنال پپتید (SP)، توالی کدکننده دمین اتصال به کیتین (CBD)، توالی لینکر و توالی کدکننده پپتید در ماسپتین B1 و OSC: خاتمه دهنده اکتوپین سنتاز.

مواد گیاهی

از بذور توتون (*Nicotiana tabacum*) رقم Xanthi برای تولید گیاهچه استریل جهت تراریزش و تولید ریشه‌های موئین بر اساس روش نظری و همکاران

کاهش دسترسی آنزیم‌های هیدرولیتیکی میزبان به کیتین دیواره قارچ می‌شود و از هیدولیز دیواره قارچ جلوگیری می‌کند (۲۴).

در این مطالعه برای اولین بار و با هدف افزایش تراکم پپتید ضد میکروبی در ماسپتین B1 روی دیواره سلولی بیمارگرهای باکتریایی، پپتید ضد میکروبی در ماسپتین B1 به دمین متصل شونده به کیتین (CBD) مربوط به پروتئین قارچی Avr4 متصل گردید. سپس سامانه ژنی در ریشه‌های موئین توتون، بیان و فعالیت ضد میکروبی آن علیه باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طراحی سازه‌های ژنی

توالی DNA کدکننده پپتید ضد میکروبی در ماسپتین (DrsB1) B1 به طول ۹۳ نوکلئوتید (به شماره دسترسی UniProtKB: P80282) از پایگاه داده‌های پپتید (Uniprot) استخراج و به وسیله لینکر کیتیناز برنج (شماره دسترسی GenBank No: X54367.1) و به توالی $EAAAKEAAK$ یک بار به پایانه C و بار دیگر به پایانه N توالی کدکننده دمین اتصال به کیتین افکتور Avr4 قارچ کلادوسپوریوم فلاوم (به شماره دسترسی GenBank: CAA69643.1) به طول ۱۹۲ نوکلئوتید به همراه سیگنال پپتید آن متصل شد. هر دو توالی نوترکیب بر اساس ترجیح کدون گیاه توتون بهینه‌سازی شدند. همچنین جهت تسهیل همسانه‌سازی، توالی جایگاه‌های برشی مربوط به آنزیم‌های برشی *NcoI* در سر ۵' و توالی جایگاه برشی *BamHI* در سر ۳' سازه‌ها طراحی شدند. سازه‌های ژنی مورد نظر به صورت مصنوعی (شرکت Biomatik کانادا) در ناقل pUC به صورت جداگانه همسانه‌سازی شدند. در نهایت توالی کدکننده پروتئین‌های نوترکیب توسط آنزیم‌های *NcoI* و *BamHI* از ناقل pUC جدا سازی و در ناقل بیانی pGSA1285 تحت پیش‌بر عمومی (3×35S) و خاتمه‌دهنده

استخراج RNA و سنتز cDNA

به منظور تأیید بیان سامانه‌های نو ترکیب، استخراج RNA به روش کلرید لیتیم انجام گرفت. سپس برای سنتز cDNA از کیت cDNA synthetase (شرکت Thermo Fisher) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. واکنش RT-PCR بر روی cDNA های سنتز شده، توسط آغازگرهای اختصاصی کنترل داخلی Elongation Factor و پپتید DrsB1 صورت پذیرفت (جدول شماره ۱).

استخراج پروتئین

استخراج پروتئین با استفاده از روش استون و همکاران (۳۱) انجام شد. غلظت پروتئین استخراج شده به روش برادفورد و همکاران (۳۲) اندازه گیری و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد. پروتئین‌های استخراج شده، جهت تخلیص پروتئین به ستون کروماتوگرافی حاوی رزین نیکل (PrepEase Ni-IDA) منتقل شدند. سپس ستون با محلول شستشو (50 mM NaH₂O₄, 300mM NaCl) شستشو داده شد. جهت جداسازی پروتئین‌های نو ترکیب از ستون محلول شستشوی حاوی ۲۵۰ mM ایمیدازول مورد استفاده قرار گرفت (۳۳). پروتئین‌های خروجی از هر بار شستشو به طور جداگانه جمع آوری شده و بر روی ژل ۱۴ درصد اکریل آمید بارگذاری و با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی با ولتاژ ثابت ۱۵۰ از یکدیگر جدا شدند. از روش الکتروبلاتینگ برای انتقال پروتئین‌ها از ژل اکریل آمید به کاغذ نیتروسولوز استفاده شد (BioRad mini-proteinII apparatus). سپس بلاک کردن کاغذ نیتروسولوز با استفاده از بافر TBS^۱ حاوی ۵ درصد شیر خشک به مدت ۱ ساعت انجام شد. نمونه پس از سه بار شستشو با بافر TBS به مدت یک ساعت با رقت ۱:۲۰۰۰ آنتی بادی mouse anti- (His) 6 peroxidase در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت و در نهایت پس

(۱۳۹۷) استفاده شد (۲۵). به طور خلاصه، بذور توتون به مدت ۱۰ دقیقه در محلول شوینده (هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و تریتون X100) ضد عفونی و سپس بر روی محیط کشت MS کشت شدند (۲۶). قطعات برگ (1cm²) سترون از گیاهان توتون سه هفته‌ای برش داده شدند و در مایع تلقیح حاوی آگروباکتريوم رایزوزنز حاوی سامانه‌های ژنی به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها روی محیط هم کشتی MS بدون هورمون و آنتی بیوتیک قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک بار تا زمان تشکیل ریشه‌ها، به طور مرتب واکشت شدند.

استخراج DNA ژنومی و تأیید تراژنی

به منظور تأیید تراژیختی ریشه‌های مویین احتمالی، DNA ژنومی از ریشه‌های مویین به روش CTAB انجام شد (۲۷) و پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های پپتید DrsB1، *rolC* و *VirG* روی DNA ژنومی به عنوان الگو انجام شد (جدول شماره ۱). واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز با یک چرخه و اسرشت‌سازی اولیه یک بار در ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل؛ و اسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای مربوطه (جدول شماره ۱) و برای ۳۰ ثانیه، تکثیر DNA الگو در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برحسب طول قطعه از ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه و یک چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

جدول شماره ۱: آغازگرهای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

نام آغازگرها	توالی (5' به 3')	طول قطعه تکثیری (جفت باز)	دمای (اصلاح °C)	منبع
DersB1-F	GCTAAGGCTATGTGGAAGGATG	۱۰۰	۵۹	مطالعه حاضر
DersB1-R	ATTGAGAAATAGTATCAGCAACAGC			
<i>rolC</i> -F	CTCCTGACATCAAAACTCGTC	۶۲۵	۵۳	
<i>rolC</i> -R	TGCTTCGAGTTATGGGTACA			
Elf-α-F	TGAACCATCCAGGACAGATTG	۱۷۷	۶۰	
elf-α-R	TCTTAACCATACCAGCATCACC			
<i>VirG</i> -F	CCGGCGTCAGCCGAATTCT	۸۱۹	۵۹	
<i>VirG</i> -R	CCTGCACGTCGGGTCAAAGAAATA			

1- Tris-Buffered saline

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) با استفاده از روش رقت‌سازی میکرودايلوشن تعیین شد. تهیه سریال رقت با استفاده از پلیت ۹۶ خانه انجام شد. بدین منظور، ۵ سطح شامل غلظت‌های ۲۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروتئین خالص شده (از ستون گذرانده) در حجم نهایی ۲۰۰ μ l، در مقابل سوسپانسیون باکتری قرار داده شد و رشد باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۵ چاهک برای رقت‌های مختلف در نظر گرفته شد و از چاهک اول که غلظت اولیه پروتئین معادل ۲۰۰ μ g/ml بود، سریال رقت‌های بعدی تهیه شد. یک چاهک به عنوان کنترل منفی حاوی ترکیب محیط کشت و پروتئین و یک چاهک به عنوان کنترل مثبت حاوی محیط کشت، در نظر گرفته شد. سپس به همه چاهک‌ها مقدار ۱۰ μ l از سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ سلول) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دماهای ۳۷°C قرار داده شدند. سپس مقدار MIC پروتئین‌های نو ترکیب با مقایسه کیفی چاهک‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی شدند. با مشاهده ایجاد کدورت در هر چاهک، چاهک قبلی به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد. در مورد چاهک کنترل مثبت، کدورت نشان دهنده رشد کافی باکتری می‌باشد. چاهک کنترل منفی باید بدون رشد و شفاف باشد. برای هر باکتری این آزمایش به صورت جداگانه در سه تکرار طراحی و اجرا شد.

آنالیز آماری داده‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل بر اساس طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار صورت گرفت و داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار MSTATC تجزیه و تحلیل شدند. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها و انحراف معیار برای عصاره‌های پروتئینی نو ترکیب محاسبه شد.

از شستشو با بافر TBS، طی مراحل آشکارسازی، واکنش بین آنتی‌بادی و سوبسترا H_2O_2 و DAB^۲ انجام شد و باندهای پروتئینی ظاهر شدند.

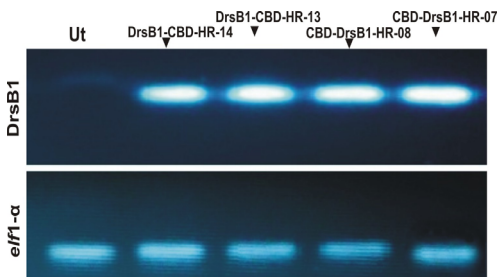
آزمایش فعالیت ضد میکروبی

فعالیت ضدباکتریایی پروتئین‌های نو ترکیب تولید شده با استفاده از بررسی فعالیت پروتئین کل از ریشه‌های موین تراریخت علیه بیمارگرهای انسانی؛ *Staphylococcus aureus* (PTCC 1330)، *Escherichia coli* (PTCC 1112)، *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1074)، *Enterococcus faecium* (KX185054)، *Bacillus subtilis* (PTCC 1715) و *faecalis* (PTCC 1393) به روش بررسی هاله ممانعت رشد و با استفاده از انتشار در دیسک (۳۵،۳۴) طبق دستورالعمل CLSI انجام شد (Clinical and Laboratory Standard Institute) برای این منظور، باکتری‌ها به طور جداگانه بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هیتون آگار کشت سطحی داده شدند. غلظت تمامی باکتری‌ها، ۰/۵ مک فارلند معادل $1/5 \times 10^8$ تنظیم شد و باکتری‌ها توسط سوآپ استریل به صورت چمنی روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شدند سپس میزان ۳۰ میکرولیتر از پروتئین‌های استخراج شده (۶۰ μ g/ml) به دیسک‌های ۶ mm افزوده شد. سپس دیسک‌های حاوی پروتئین‌های نو ترکیب روی محیط کشت باکتری قرار داده شدند. پتری‌دیش‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای تثبیت پروتئین در دیسک و سپس به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. فعالیت ضد میکروبی پروتئین با مشاهده هاله عدم رشد باکتری و اندازه‌گیری میانگین قطر هاله‌های ایجاد شده در اطراف دیسک‌ها بررسی شد. در هر تکرار از یک دیسک آنتی‌بیوتیک به عنوان کنترل مثبت (جنتامایسین - ونکومایسین) و یک دیسک تیمار شده با عصاره پروتئینی ریشه‌های موین غیر تراریخت به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

مورد نظر. M: نشان گر وزن مولکولی از بالا به پائین به ترتیب 100 و 1 kb و P: تکثیر ژن شاهد مثبت با استفاده از پلاسمید pGSA/CBD-DrsB1 یا pGSA/CBD-DrsB1-W: گیاه غیرتراریخت، C: کنترل منفی (استفاده از آب به جای الگو).

بیان پپتیدهای نو ترکیب در ریشه‌های مویین

بیان هر دو پپتید نو ترکیب این مطالعه در ریشه‌های مویین تراریخت با روش RT-PCR نیمه کمی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن DrsB1 (جدول شماره ۱) مورد مطالعه قرار گرفت. همان طوری که مشاهده می‌شود یک باند به طول تقریبی ۱۰۰ جفت باز در کلون‌های تراریخت مشاهده شد که نشان می‌دهد ژن‌های مورد نظر به خوبی در کلون‌های تراریخت نسخه برداری می‌شوند (تصویر شماره ۳).



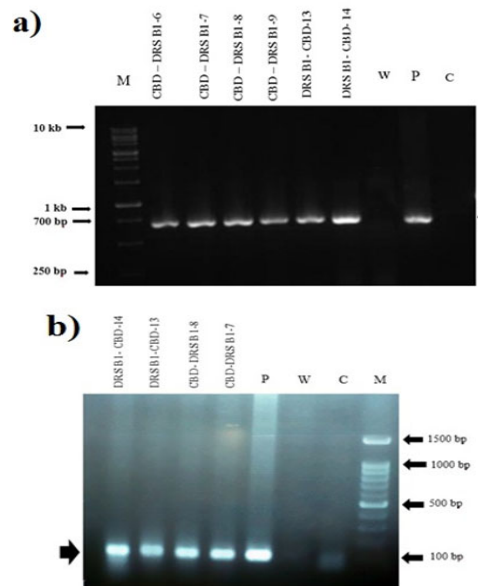
تصویر شماره ۳: آنالیز RT-PCR نیمه کمی روی گیاه تراریخت و شاهد. پیل بالایی محصول PCR حاصل از تکثیر ژن خانه دار elf و پیل پائینی محصول PCR مربوط به رونویسی ژن‌های نو ترکیب DrsB1-CBD و CBD- DrsB1 را در ریشه‌های مویین انتخابی نشان می‌دهد.

با این حال، هیچ قطعه‌ای در شاهد‌های غیر تراریخت مشاهده نشد. از بین لاین‌هایی که تصادفی برای مطالعه بیان پروتئین‌های نو ترکیب انتخاب شده بودند، تفاوتی از نظر سطح بیان با توجه به ژن کنترل داخلی مشاهده نشد. با این حال به نظر می‌رسد که کلون تراریخت DrsB1-CBD-14 بیان بیش تری نسبت به سه کلون دیگر داشته باشد، زیرا شدت باند ژن کنترل داخلی آن کم تر و شدت باند خود ژن نیز تا حدودی بیش تر است. به منظور بررسی تولید پروتئین‌های نو ترکیب در ریشه‌های

یافته‌ها

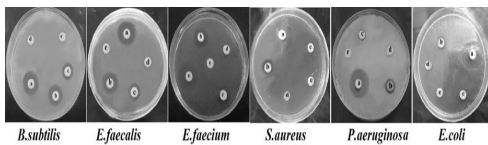
تعدادی ریشه تراریخت تولید گردید که برای سهولت بررسی نتایج، ریشه‌های تراریخت حاصل بر حسب نوع پپتید نو ترکیب به اسامی DrsB1-CBD-XX و CBD-DrsB1-XX نام گذاری شدند که XX نماینده شماره کلون ریشه مویین تراریخت است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* و پپتید DrsB1 به ترتیب منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۶۰۰ bp و ۱۰۰ bp شد (تصویر شماره ۲) که وجود باندهای مشخص از ژن *rolC* و پپتید DrsB1 در ژنوم ریشه‌های مویین حاکی از تراریخته شدن ریزنمونه‌های گیاهی بود. همچنین عدم حضور ژن *virG* در ریشه‌های مویین، نشان داد که ریشه‌های مویین فاقد آلودگی باکتریایی هستند (داده‌ها نشان داده نشده است).



تصویر شماره ۲: غربال ریشه مویین به ظاهر تراریخت به کمک PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *rolC* و پپتید DrsB1. (a) حضور سامانه‌های ژنی نو ترکیب با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* و مشاهده قطعه مورد نظر. (b) حضور سامانه‌های نو ترکیب با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای اختصاصی پپتید DrsB1 و مشاهده قطعه

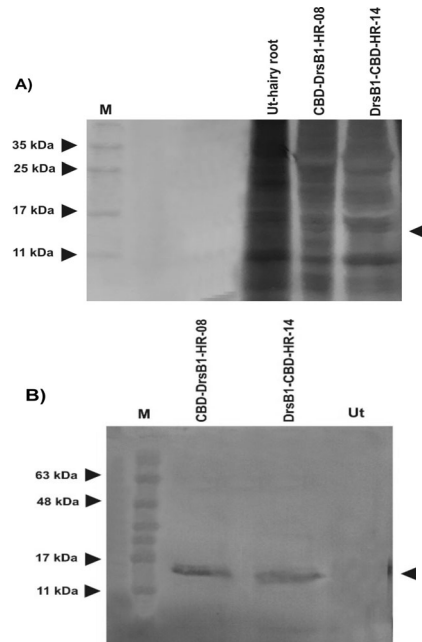
طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پپتیدهای نو ترکیب مختلف اثر معنی داری ($P=0/096$) روی رشد باکتری‌ها دارند. اثر متقابل دو گانه باکتری × نوع پپتیدهای نو ترکیب معنی دار ($P=0/045$) بود. همچنین نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. همچنین قدرت مهارکنندگی هر دو پروتئین نو ترکیب در همه باکتری‌ها نسبت به کنترل مثبت (آنتی بیوتیک) کم تر بود در حالی که نسبت به پروتئین گیاه غیر تراریخت (پروتئین استخراج شده از ریشه غیر تراریخت) قدرت مهارکنندگی بیشتری داشتند (تصویر شماره ۵).



تصویر شماره ۵: هاله عدم رشد باکتری‌ها در تیمار با عصاره‌های پروتئینی نو ترکیب و شاهد. (a) آنتی بیوتیک جنتامیسین (b) پروتئین نو ترکیب CBD-DrsB1-8، (c) CBD-DrsB1-14، (d) پروتئین‌های گیاه غیر تراریخت و (e) بافر فسفات

نتایج مقایسه قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌ها نشان داد که باکتری *B. subtilis* با قطر هاله عدم رشد ۱۰/۸۶ با بیش ترین حساسیت و باکتری *E. coli* با قطر هاله عدم رشد ۱ میلی متر کم ترین حساسیت را نشان دادند. به طور کلی، از نظر میزان فعالیت بازدارندگی از بین دو پپتید نو ترکیب، پپتید نو ترکیب CBD-DrsB1 قدرت مهارکنندگی بیش تری نسبت به پپتید نو ترکیب CBD-DrsB1-14 از خود نشان داد.

مویین لاین‌های انتخابی آزمایش SDS-PAGE (تصویر شماره ۴ A) و وسترن بلات (تصویر شماره ۴ B) صورت گرفت. همان طوری که ملاحظه می‌شود، هر دو پروتئین نو ترکیب به خوبی در ریشه‌های مویین تولید می‌شوند و اثری از این پروتئین‌ها در ریشه‌های مویین غیر تراریخت وجود ندارد.



تصویر شماره ۴: آنالیز بیان پپتیدهای نو ترکیب CBD-DrsB1 و DrsB1-CBD با استفاده از روش SDS-PAGE (A) و وسترن بلات (B). M: نشان گر پروتئینی (Tris Glycine) بر حسب کیلو دالتون (kDa). Ut: نشان گر پروتئینی، پروتئین غیر تراریخت

فعالیت ضد باکتریایی پپتیدهای نو ترکیب

به منظور بررسی آماری اثرات ضد میکروبی عصاره پروتئین حاصل از لاین‌های تراریخت (CBD-DrsB1، DrsB1-CBD)، آزمایشی به صورت

جدول شماره ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در تیمار با عصاره‌های پروتئینی نو ترکیب

Vancomycin (30 µg)	Gentamicin (10 µg)	Ut	Mean diameter (± SD) of the inhibition zone (mm)		Pathogens
			DrsB1-CBD	CBD-DrsB1	
	14.23±0.5	.	7.73±0.05	10.86±0.05	<i>B. subtilis</i>
11.5±0.35	-	.	6.30±0.05	8.7±0.05	<i>E. faecium</i>
11.35±0.05	-	.	3.73±0.62	6.60±0.41	<i>E. faecalis</i>
	11.31±0.05	.	2.00±0.28	6.01±0.28	<i>S. aureus</i>
	15.33±0.28	.	1.3±0.02	4.06±0.2	<i>P. aeruginosa</i>
	15±0.0	.	1±0.07	3±0.01	<i>E. coli</i>

میانگین قطر هاله ممانعت از رشد در سه تکرار با آزمون دانکن با هم مقایسه شده‌اند. Ut: شاهد غیر تراریخت

حداقل غلظت مهارکنندگی

یا فیوژن بین مولکول‌های مختلف با فعالیت ضد میکروبی یکی از زمینه‌های جدید برای تولید مولکول‌های جدید ضد میکروبی است (۴۰-۳۸). فناوری مهندسی ژنتیک به کمک استفاده از بیوراکتورهای گیاهی برای تولید تجاری پپتیدها، پروتئین‌ها و داروها برای مقابله با بیمارگرهای باکتریایی و قارچی به منظور درمان بیماری‌های انسانی و ایجاد گیاهان مقاوم بسیار نوید بخش است (۴۱). بنابراین، محققین به مطالعه تولید پپتیدهای مختلف و بررسی خواص ضد میکروبی آن‌ها در کشت ریشه‌های موین و گیاهان پرداخته‌اند. از جمله این مطالعات می‌توان به القای بیان موفقیت آمیز پروتئین ضد ویروس HIV و ضد تومور MAP30 به عنوان پروتئین‌های مهارکننده ریبوزومی (RIP: Ribosome-Inactivating Protein)، در ریشه موین توتون اشاره کرد. در این مطالعات، تجزیه و تحلیل پروتئین کل استخراج شده از ریشه‌های موین تراریخته اثرات ضد میکروبی قوی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ‌ها نشان داد (۴۲).

پپتیدهای ضد میکروبی Cecropins، یکی از مهم‌ترین اجزای سیستم دفاعی حشرات علیه عفونت باکتری است. مطالعات نشان داده‌اند که cecropins نو ترکیب با تخریب یکپارچگی غشای باکتری، خاصیت مهارکنندگی قوی علیه باکتری‌های *B. megaterium*، *P. aeruginosa*، *E. coli* و *M. luteus* دارد (۴۳، ۴۴). زانگ و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی تأثیر پپتید ضد میکروبی LZ1 با ۱۵ آمینواسید علیه بیمارگرهای *Acne vulgaris* شامل *Staphylococcus epidermidis*، *Propionibacterium acnes* و *Staphylococcus aureus* به این نتیجه رسیدند کاربرد حداقل غلظت (0.6 µg/ml) از این پپتید تعداد کلونی‌های باکتری را کاهش می‌دهد و این پپتید در پلاسما خون به‌طور پایدار باقی مانده و داروی مناسبی برای درمان آکنه می‌باشد (۴۵).

جنسن و همکاران (۲۰۰۶)، اثر متقابل بین پپتیدهای کاتیونی و ترکیباتی با بار منفی در سطح غشای بیرونی باکتری از قبیل لیپوپلی ساکارید در باکتری‌های گرم

حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظتی از پروتئین‌های نو ترکیب است که می‌تواند به میزان ۹۰ درصد رشد باکتری‌ها را مهار کند. نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی پپتیدهای نو ترکیب در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. طبق نتایج این آزمایش بیشترین میزان MIC در پپتیدهای نو ترکیب مربوط به باکتری‌های *E. coli* و *P. aeruginosa* با غلظت ۱۰۰ µg/ml بود. با توجه به این نتایج مشخص شد که مقدار غلظت بیشتری از پپتیدهای نو ترکیب برای مهار این باکتری‌ها در مقایسه سایر باکتری‌ها مورد نیاز است. مقدار MIC برای باکتری‌های *B. subtilis* و *E. faecalis* غلظت ۵۰ µg/ml بود. شایان ذکر است که عصاره پروتئین ریشه موین غیر تراریخت، هیچ‌گونه اثر بازدارندگی روی رشد هیچ یک از باکتری‌های مورد مطالعه نداشت. محیط درون چاهک کنترل منفی به‌صورت کاملاً شفاف بود و در چاهک کنترل مثبت کدورت کافی حاصل از رشد باکتری مشاهده شد.

جدول شماره ۳: حداقل غلظت مهارکنندگی پروتئین‌های نو ترکیب علیه باکتری‌ها

MIC (µg/l)		Pathogens
DrsB1-CBD	CBD-DrsB1	
۵۰	۵۰	<i>Bacillus subtilis</i>
۱۰۰	۵۰	<i>Enterococcus faecium</i>
۵۰	۵۰	<i>Enterococcus faecalis</i>
۱۰۰	۵۰	<i>Staphylococcus aureus</i>
۱۰۰	۱۰۰	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
۱۰۰	۱۰۰	<i>Escherichia coli</i>

بحث

مشکلات جدی ناشی از ظهور باکتری‌های مقاوم به دارو، نیاز فوری به توسعه درمان‌های جایگزین را دو چندان کرده است. در این راستا، پپتیدها به عنوان عوامل ضد میکروبی امید بخش برای تولید نسل جدید آنتی‌بیوتیک‌ها حائز اهمیت هستند (۳۷، ۳۶). طراحی دوباره پپتیدهای ضد میکروبی جدید برای استفاده و افزایش کارایی در صنعت دارویی و کشاورزی، تولید هم‌جوشی

کارایی و فعالیت پپتیدهای طراحی شده به صورت *In silico* به کمک الگوریتم‌های پایگاه CAMP بررسی شد. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که به دلیل اضافه کردن اسید آمینه ناشی از زمین اتصال به کیتین و His-tag میزان بار مثبت این پپتیدهای نو ترکیب نسبت به پپتید بدون زمین افزایش یافت. افزایش بار مثبت این پپتیدهای نو ترکیب باعث اثر متقابل بار مثبت پپتیدهای نو ترکیب با بار منفی غشای باکتری و در نتیجه سبب اختلال در غشا و لیز شدن باکتری می‌شود و همین امر باعث افزایش میزان بازدارندگی این پروتئین‌ها نسبت به شاهد (DrsB1) شد. بار مثبت در بخش هیدروفوبیک پپتید برای فعالیت ضد میکروبی آن ضروری است. هم‌چنین اضافه کردن زمین اتصال به کیتین از ژن Avt4 نیز به دلیل اثر متقابل Avt4 با N-استیل گلوکز آمین از پپتید و گلیکان باعث افزایش فعالیت این پپتیدهای نو ترکیب علیه بیمارگرهای باکتریایی می‌شود (۲۴). هم‌چنین یوشنکو و همکاران (۲۰۰۷) در راستای مهندسی ژنتیک مقاومت به بیماری‌ها در آزمایشگاه ارزیابی فعالیت ضد میکروبی دو پپتید سنتز شده تمپورین و آنالوگ درماسپتین B1 (MsrA2) پرداختند. نتایج نشان داد که بیمارگرهای قارچی و باکتری مورد مطالعه به غلظت‌های (بین ۲/۵ تا ۲۵ μM) میکرومولار پپتیدهای سنتتیک حساسیت نشان دادند (۵۲).

در مطالعه حاضر نیز، پروتئین‌های نو ترکیب استخراجی از ریشه‌های تراریخت در محیط آزمایشگاه از خود فعالیت ضد باکتری معنی‌داری علیه باکتری‌های بیماری‌زا انسانی نشان دادند. بیش‌ترین اثر ضد میکروبی مربوط به پپتید نو ترکیب حاصل از کلون تراریخت CBD-DrsB1-8 روی *B. subtilis* بود. نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی پروتئین‌های توتون‌های تراریخت نشان داد که حداقل غلظتی از پروتئین‌ها که موجب جلوگیری از رشد ۹۰ درصد باکتری‌ها می‌شود در فاصله غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بود، در حالی که عصاره گیاه غیر تراریخت مانع رشد هیچ یک

منفی یا لیپوتیکونیک (Lipoteichoic Acid) باکتری‌های گرم مثبت را مطالعه نمودند (۴۶). نتایج مطالعات نشان داد که اثر متقابل الکترواستاتیک باعث حذف کاتیون‌های دو ظرفیتی (Mg^{+2} , Ca^{2+}) از سطح غشا سلول می‌شود که در نهایت سبب بی‌ثباتی لایه بیرونی غشا و تسهیل ورود پپتید می‌شود (۴۷، ۴۸). در همین راستا، برای افزایش فعالیت ضد میکروبی پپتید، اسوسکی و همکاران (۲۰۰۴) با تغییر ناحیه N ترمینال پپتید در ماسپتین B1 (MsrA2) تمایل پپتید را برای اتصال به لیپیدهایی با بار منفی افزایش دادند. بیان این پپتید تغییر یافته در گیاه توتون منجر به تولید کلون‌های تراریختی با مقاومت قوی علیه برخی بیمارگرهای گیاهی شد (۴۹) نتایج حاصل نشان داد که گیاه توتون تراریخت حاوی آنالوگ درماسپتین B1 (MsrA2) به بیمارگرهایی مانند قارچ‌های *Pythium sp*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Phytophthora* و باکتری *Erwinia Carotovora* مقاوم هستند (۵۰).

علی بخشی و همکاران (۲۰۱۸) با اضافه کردن توالی His-tag به پپتید درماسپتین B1 و انتقال آن به ریشه موین گیاه توتون به بررسی خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های بیمارگر گیاهی پرداختند. نتایج حاصل از آنالیز توالی در پایگاه ProtParam نشان دهنده افزایش بار کاتیونی و نیمه عمر این پپتید نسبت به شاهد بود. هم‌چنین نتایج بررسی خاصیت ضد میکروبی این پپتید نشان داد که پپتید بیان شده مانع رشد بیمارگرهای باکتریایی گیاهی از قبیل *Pectobacterium carotovorum* و *Erwinia amylovora* شد (۵۱).

در همین راستا، به منظور افزایش خاصیت ضد میکروبی افزایش تعداد و تراکم پپتید DrsB1 روی غشای بیمارگرهای انسانی مهاجم، پپتید DrsB1 توسط یک لینکر به زمین متصل شونده به کیتین از ژن Avt4 قارچ کلادوسپوریوم متصل شد تا علاوه بر افزایش بار مثبت، پروتئین نو ترکیب بتواند به دیواره سلولی باکتری‌ها متصل شود و از این طریق بتواند آن‌ها را کنترل نماید. پیش از انجام کارهای آزمایشگاهی،

پپتید نو ترکیب در ماسپتین B1 طی فرآیند دست کاری و مهندسی ژنتیک، اطلاعات با ارزشی برای آزمایشات هدفمند در صنعت داروسازی و مقابله با باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها را فراهم می‌کند. همچنین استفاده از پپتید در ماسپتین B1 به دلیل عدم تماس با بیمارگرهای انسانی برای القاء مکانیسم مقاومتی در آن‌ها، می‌تواند جایگزین مناسبی برای پپتیدهای انسانی باشد. بنابراین در این مطالعه سعی شد تا با اتصال دمین مسئول اتصال به کیتین از پروتئین Avr4 قارچ کلادوسپوریوم فلاوم (*Cladosporium fulvum*) ضمن افزایش بار مثبت پپتید و همچنین تمایل به سمت دیواره غشا باکتری، شرایطی برای فعالیت پپتید در ماسپتین B1 فراهم شود.

سپاسگزاری

این مقاله با کد اخلاق 2018.10 . LU.ECRA حاصل پایاننامه دکتری مربوط به خانم میترا خادمی بوده که بخشی از منابع مالی آن توسط دانشگاه لرستان تامین شده است.

References

1. Moosazadeh Moghaddam M, Aghamollaei H, Kooshki H, Azizi H, Mirnejad R, Choopani A. The development of antimicrobial peptides an approach to prevention of antibiotic resistance. *J Medical Microbiology* 2015; 26(3): 98-110.
2. Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, Pozzi E, Cauda R. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(1): 26-38.
3. Holaskova E, Galuszka P, Fiebort I, Tufan M. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *J Biotechnology Advances* 2015; 33: 1005-1023.
4. Peschel A, Sahl HG. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(7): 529-536.
5. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol* 2011; 29(9): 464-472.
6. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; 415(6870): 389-395.
7. Zasloff M. Defending the epithelium. *Nat Med* 2006; 12(6): 607-608.
8. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 2009; 30(3): 131-141.

از باکتری‌ها نشد. برای کنترل رشد باکتری‌ها *E.coli* و *S. aeruginosa* به غلظت بیش تری از پروتئین نو ترکیب (۱۰۰ µg/ml) در مقایسه با *B.subtillis* (۵۰ µg/ml) نیاز بود.

در مطالعات مختلف اثرات ضد میکروبی آنالوگ و فیوژن در ماسپتین علیه بیمارگرهای باکتریایی و قارچی مختلف به اثبات رسیده است. در مقایسه با مطالعات دیگر، لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر از غلظت‌های میکروگرم عصاره پروتئین کل برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی استفاده شد و تفاوت در نتایج گزارش شده میزان غلظت‌های مهارکننده، ناشی از این مسئله می‌باشد. همان گونه که در تصویر شماره ۵ مشاهده می‌شود میزان حساسیت باکتری‌ها نسبت به پپتید با هم متفاوت بود. به نظر می‌رسد این مسئله به نحوه عملکرد پپتید ضد میکروبی و اثر متقابل پپتید کاتیونی با بار منفی گروه‌های فسفولیپیدها و لیپو تیچویک (Lipoteichoic Acid) غشاهای میکروبی باکتری برمی‌گردد. نتایج حاصل از این مطالعه ضمن تایید صحت کارایی بیان

9. Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* 2001; 1(3): 156-164.
10. Hancock RE, Sahl H-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 2006; 24(12): 1551-1557.
11. Aleinein RA, Schäfer H, Wink M. Rhizosecretion of the recombinant antimicrobial peptide ranalexin from transgenic tobacco hairy roots. *RRJBS* 2015; 1: 45-55.
12. Marcos JF, Muñoz A, Pérez-Payá E, Misra S, López-García B. Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. *Annu Rev Phytopathol* 2008; 46: 273-301.
13. Li Z, Zhou M, Zhang Z, Ren L, Du L, Zhang B, et al. Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis*. *Funct Integr Genomics* 2011; 11(1): 63-70.
14. Flavia Cancado Viana J, Campos Dias S, Luiz Franco O, Lacorte C. Heterologous production of peptides in plants: fusion proteins and beyond. *Curr Protein Pept Sci* 2013; 14(7): 568-579.
15. Barra D, Simmaco M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends Biotechnol* 1995; 13(6): 205-509.
16. Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1696(1): 1-14.
17. Nicolas P, Mor A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49(1): 277-304.
18. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, α helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2000; 55(1): 4-30.
19. Borisjuk NV, Borisjuk LG, Logendra S, Petersen F, Gleba Y, Raskin I. Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nat Biotechnol* 1999; 17(5): 466-469.
20. Kim Y, Wyslouzil BE, Weathers PJ. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell Develop Biol-Plant* 2002; 38(1): 1-10.
21. Kim YJ, Weathers PJ, Wyslouzil BE. Growth of *Artemisia annua* hairy roots in liquidand gas hase reactors. *Biotechnol Bioeng* 2002; 80(4): 454-464.
22. Gaume A, Komarnytsky S, Borisjuk N, Raskin I. Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. *Plant Cell Rep* 2003; 21(12): 1188-1193.
23. Pham NB, Schäfer H, Wink M. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures. *Biotechnol J* 2012; 7(4): 537-545.
24. Van den Burg HA, Spronk CA, Boeren S, Kennedy MA, Vissers JP, Vuister GW, et al. Binding of the Avr4 elicitor of *Cladosporium fulvum* to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein-protein interactions: the chitin-binding site of AVR4 represents a novel binding site on the folding scaffold shared between the invertebrate and the plant chitin-binding domain. *J Biol Chem* 2004; 279(16): 16789-16796.
25. Nazari Z, Nazarian Firouzabadi F, Ismaili A, Darvishnia M. Production of a recombinant antimicrobial Dermaseptine B1 peptide in *Nicotiana tabacum* L. hairy roots with antibacterial activity. *Yafte* 2017; 20(2): 103-118 (Presian).

26. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 1962; 15(3): 473-497.
27. Gawel NJ, Jarret RL. A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea. *Plant Molecular Biol Rep* 1991; 9(3): 262-266.
28. Jalilian A, Ismaili A, Nazarian Firouzabadi F, Hosseini Z. Optimization of hairy root induction and transformation, and cloning of over-expression of 4'OMT gene construct in opium poppy. Ms Thesis, Khoram Abad; Lorestan University, 2015. (Presian).
29. Badrhadad A, Nazarian-Firouzabadi F, Ismaili A. Fusion of a chitin-binding domain to an antibacterial peptide to enhance resistance to *Fusarium solani* in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *3 Biotech* 2018; 8(9): 391.
30. Kortstee A, Khan SA, Helderman C, Trindade LM, Wu Y, Visser RG, et al. Anthocyanin production as a potential visual selection marker during plant transformation. *Transgenic Res* 2011; 20(6): 1253-1264.
31. Stone SL, Gifford DJ. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda L.*) seeds during germination and early-seedling growth. I. Storage protein reserves. *Intl J Plant Sci* 1999; 160(4): 663-671.
32. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(1-2): 248-254.
33. Bollag DM, Edelstein SJ, Rozycki MD. *Proteins methods*. 2nd ed. New Yourk: Wiley; 1996.
34. Bauer A, Kirby W, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45(4): 493-496.
35. Mangena T, Muyima NY. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Lett Appl Microbiol* 1999; 28(4): 291-296.
36. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* 2005; 36(6): 697-705.
37. Lata S, Sharma B, Raghava GP. Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC Bioinformatics* 2007; 8(1): 263.
38. Melo MN, Ferre R, Castanho MA. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(3): 245-250.
39. Yevtushenko DP, Misra S. Transgenic expression of antimicrobial peptides in plants: strategies for enhanced disease resistance, improved productivity, and production of therapeutics. *Small wonders: peptides for disease control*: ACS Publications; 2012.
40. Yevtushenko DP, Romero R, Forward BS, Hancock RE, Kay WW, Misra S. Pathogen-induced expression of a cecropin A-melittin antimicrobial peptide gene confers antifungal resistance in transgenic tobacco. *J Exp Bot* 2005; 56(416): 1685-1695.
41. Holaskova E, Galuszka P, Frebort I, Oz MT. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnol Adv* 2015; 33(6): 1005-1023.
42. Moghadam A, Niazi A, Afsharifar A, Taghavi SM. Expression of a recombinant anti-HIV and anti-tumor protein, MAP30, in *nicotiana tabacum* hairy roots: A pH-stable

- and thermophilic antimicrobial protein. *PloS One* 2016; 11(7): e0159653.
43. Andreu D, Merrifield RB, Steiner H, Boman HG. N-terminal analogs of cecropin A: synthesis, antibacterial activity, and conformational properties. *Biochemistry* 1985; 24(7): 1683-1688.
 44. Hoffmann JA. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol* 1995; 7(1): 4-10.
 45. Zhang Z, Mu L, Tang J, Duan Z, Wang F, Wei L, et al. A small peptide with therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. *PloS One* 2013; 8(8): e72923.
 46. Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(3): 491-511.
 47. Moghaddam MM, Barjini KA, Ramandi MF, Amani J. Investigation of the antibacterial activity of a short cationic peptide against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella typhimurium* strains and its cytotoxicity on eukaryotic cells. *World J Microbiol Biotechnol* 2014; 30(5): 1533-1540.
 48. Moghaddam MM, Abolhassani F, Babavalian H, Mirnejad R, Barjini KA, Amani J. Comparison of in vitro antibacterial activities of two cationic peptides CM15 and CM11 against five pathogenic bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2012; 4(2): 133-139.
 49. Powers JP, Hancock RE. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 2003; 24(11): 1681-1691.
 50. 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 Res* 2004; 13(2): 181-190.
 51. Alibakhshi A, Nazarian Firouzabadi F, Ismaili A. Expression and antimicrobial activity analysis of a Dermaseptin B1 antibacterial peptide in tobacco hairy roots. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)* 2018; 41(3): 87-96 (Presian).
 52. Yevtushenko DP, Misra S. Comparison of pathogeninduced expression and efficacy of two amphibian antimicrobial peptides, MsrA2 and temporin A, for engineering widespectrum disease resistance in tobacco. *Plant Biotechnol J* 2007; 5(6): 720-734.