

تولید پپتید ضد میکروبی در ماسپتین B1 نو ترکیب در سیستم کشت ریشه‌های موئین توتون و زیست‌سنجی اثرات ضد باکتریایی

زیبا نظری^۱، فرهاد نظریان فیروز آبادی^{۲*}، احمد اسماعیلی^۳، مصطفی درویش‌نیا^۴

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

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

۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۴- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

یافته / دوره بیستم / شماره ۲ / تابستان ۹۷ / مسلسل ۷۶

چکیده

دریافت مقاله: ۹۷/۱/۱۴ پذیرش مقاله: ۹۷/۲/۳۱

* مقدمه: کشت ریشه‌های موئین راهکاری مناسب برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب در گیاهان است. پپتیدهای ضد میکروبی، بخش حیاتی و مهم از سیستم پاسخ ایمنی ذاتی همه موجودات زنده محسوب می‌شوند. فعالیت انتخابی دقیق و اثرات سمی محدود روی سلول‌های پستانداران، پپتیدهای ضد میکروبی را به کاندیداهای مناسبی برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها در معضل مقاومت‌های دارویی بدل ساخته است. هدف از تحقیق حاضر، تولید پپتید ضد میکروبی نو ترکیب در ماسپتین B1 در ریشه‌های موئین گیاه توتون و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن بود.

* مواد و روش‌ها: توالی کدکننده‌ی در ماسپتین B1 در یک ناقل بیانی همسانه سازی شد و برای تولید ریشه‌های موئین توسط *Agrobacterium rhizogenes* به توتون منتقل گردید. با استفاده از تکنیک‌های PCR و RT-PCR، به ترتیب انتقال ترانسژن و بیان آن در ریشه‌های موئین بررسی شد. فعالیت ضد باکتریایی این پروتئین نو ترکیب علیه باکتری‌های *Enterococcus faecium*، *Enterococcus faecalis* و *Escherichia coli* در غلظت‌های مختلف پروتئین کل، مورد ارزیابی قرار گرفت.

* یافته‌ها: حضور سامانه ژنی و بیان آن در ریشه‌های موئین تراریخت اثبات شد. نتایج آزمون ضد میکروبی نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره پروتئین کل دارای اثرات ضد میکروبی معنی داری ($P < 0.05$) روی رشد هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بود.

* بحث و نتیجه‌گیری: پپتید در ماسپتین فیوژن با موفقیت در ریشه‌های موئین تولید شد و فعالیت ضد باکتریایی آن اثبات گردید. این نتایج نشان می‌دهد پپتید نو ترکیب دارای خواص درمانی در کنترل پاتوژن‌ها می‌باشد؛ بنابراین از ریشه‌های موئین می‌توان برای تولید و خالص‌سازی پروتئین‌های نو ترکیب ارزشمند با کاربردهای دارویی استفاده کرد.

* واژه‌های کلیدی: پپتید ضد میکروبی، *Agrobacterium rhizogenes*، در ماسپتین، بیان ژن.

* آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات.

پست الکترونیک: Nazarian.f@lu.ac.ir

مقدمه

استفاده از گیاهان به عنوان بیورآکتور برای بیان، تولید و خالص‌سازی پروتئین‌های خارجی در تحقیقات پزشکی، صنعتی و کشاورزی مورد توجه ویژه است. از مزایای عمده‌ی سنتز پروتئین‌ها در گیاهان می‌توان به ۱- ایمن و اقتصادی بودن، ۲- تولید در مقیاس زیاد و ۳- انجام تغییرات پس از ترجمه مشابه پستانداران اشاره نمود (۱). تولید و ترشح پروتئین از ریشه‌ها طی فرآیند القای ریشه‌های موئین، تکنولوژی جدیدی است که مبتنی بر تولید پروتئین‌های نو ترکیب در گیاهان است (۲، ۳). ریشه موئین از آلوده کردن ریزنمونه‌های گیاهی با باکتری گرم منفی و خاکزی *Agrobacterium rhizogenes* قابل تولید است. باکتری *A. rhizogenes* قادر است ژن‌های مولد هورمون اکسین و ژن‌های *rol* (Root oncogenic loci) موجود در ناحیه T-DNA ی موجود بر روی پلاسمید Ri خود را در ژنوم سلول‌های میزبان وارد نموده و باعث افزایش تولید هورمون اکسین در سلول‌های تراریخته شود. بدین ترتیب با القای رشد نفوبلاستی در سلول‌ها، ریشه‌های موئین بصورت نابجا و در نزدیکی جایگاه ورود باکتری تولید می‌شوند (۴). با استفاده از فناوری DNA نو ترکیب امکان وارد کردن توالی یک ژن مشخص در ناحیه T-DNA پلاسمید Ri اگروباکتریوم رایزوژنز، انتقال و بیان ژن خارجی در ریشه‌های موئین وجود دارد. به دلیل سهولت تولید و رشد سریع HRS در محیط کشت فاقد هورمون، هزینه کم، پایداری ژنتیکی و بیوشیمیایی در طول دوره کشت و عدم امکان آلودگی به پاتوژن‌ها، سیستم کشت ریشه‌های موئین برای تولید پروتئین‌های خارجی و ترکیبات با ارزش دارویی دارای پتانسیل بالقوه جهت جایگزین کردن روش‌های مرسوم مثل بیان پروتئین در میزبان میکروبی، مخمر و کشت سلول‌های پستانداران می‌باشد (۵، ۶).

سیستم کشت ریشه‌های موئین در گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) به عنوان یک سیستم بیان مدل، برای تولید و ارزیابی پروتئین‌های خارجی و ترکیبات دارویی مثل آنتی‌بادی‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) و متابولیت‌های ثانویه مورد توجه است. القاء ریشه موئین در توتون و تولید در مقیاس زیاد به سادگی امکان پذیر بوده و از طرفی گیاه توتون، به‌صورت طبیعی زیست ایمن است زیرا توتون گیاهی غیر خوراکی است و بکارگیری آن با حداقل ریسک آلودگی در زنجیره غذایی همراه است (۷، ۵). از این رو پس از آن که برای اولین بار پروتئین IgG1 نو ترکیب با موفقیت در سیستم ریشه موئین تولید شد، القای بیان پروتئین‌های نو ترکیب دیگری مثل آنزیم‌ها، فاکتورهای رشد، آلکالین فسفاتاز انسانی و پپتیدهای ضد میکروبی در کشت ریشه موئین صورت گرفت و بعضاً تولید پروتئین بین ۳ تا ۵ برابر بیشتر از تولید در گیاه کامل و سایر روش‌های مورد استفاده گزارش شد (۸).

پپتیدهایی ضد میکروبی پروتئین‌های کوچک و حفظ شده هستند (به‌طول کمتر از ۵۰ اسید آمینه) که بصورت طبیعی جزئی از مکانیسم دفاع ذاتی موجودات زنده بوده و توسط موجودات مختلف از جمله گیاهان، حیوانات، خزندگان و حشرات تولید می‌شوند. اغلب این ترکیبات دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ‌ها و ویروس‌ها می‌باشند (۹). مکانیسم اثرات ضد میکروبی AMPs شامل تعامل پپتید بواسطه برهمکنش با بار منفی غشای میکروبی و تشکیل منافذ در آن است که منجر به دپولاریزاسیون غشا، نشت سیتوپلاسمی، کشندگی زیستی و گاهاً آسیب به سنتز ماکرومولکول داخل سلولی می‌گردد (۱۰، ۱۱). یکی از ویژگی منحصر به فرد AMPs این است که بین غشاهای میکروبی مهاجم و غشاهای گیاهان و حیوانات میزبان، تفاوت قائل شده به همین علت بصورت

گزینشی عمل می‌نمایند. از این رو احتمال کمی وجود دارد که سویه‌های مقاوم در برابر این پپتیدها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های متداول ظهور پیدا کنند (۱۲). پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان عناصر با ارزش بیولوژیکی به فراوانی برای محافظت از محصولات زراعی بکار گرفته شده‌اند (۱۳). در حال حاضر این پپتیدهای کوچک به عنوان نسل جدیدی به نام آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی برای سلامت انسان و حیوانات و درمان بیماری‌های میکروبی مطرح هستند (۱۴). علاوه بر این، AMPs 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 (۵، ۱۵). سطوح پایداری و تجمع پپتیدها برای بهبود عملکرد واکنش‌های ضد میکروبی طی حمله پاتوژن ضروری است. بواسطه اندازه کوچک و وزن مولکولی کم، AMPs به هضم پروتئازی حساس هستند. فیوژن یک پپتید ضد میکروبی با شرکای هم‌جوشی به عنوان یک استراتژی مؤثر برای پایداری کردن پپتید، افزایش تجمع آن و حفاظت محصول نهایی از تجزیه پروتئولیتیک محسوب می‌شود. علاوه بر این می‌توان بر اثرات کشنده AMPs حاصل بر روی سلول‌های میزبان نیز غلبه نمود (۱۶، ۱۷). محققین متعدد ضمن تحقیقات مختلف به مطالعه تولید پپتید و بررسی خواص ضد میکروبی آن‌ها در کشت ریشه‌های موئین پرداخته‌اند. از جمله این مطالعات می‌توان به تولید موفقیت‌آمیز پپتیدهای ضد میکروبی نوترکیب تائوماتین، رنالکسین و MAP30 در کشت ریشه موئین توتون اشاره نمود (۸، ۵).

اسیدآمین‌های موجود در جایگاه ۱ تا ۱۸ در قسمت آمفی‌پاتیک سر N-ترمینال پپتید، عمدتاً مسئول اصلی قدرت ضد میکروبی در ماسپتین‌ها هستند (۱۸). نتایج آزمایش سنجش فعالیت ضد میکروبی در ماسپتین در شرایط *in vitro* نشان داده است که این پپتید دارای اثرات ضد میکروبی طیف گسترده علیه پاتوژن‌های مختلف، بدون اثرات سمی بر سلول‌های یوکاریوتی است (۱۹).

این پژوهش برای اولین بار و با هدف تولید یک پروتئین فیوژن نوترکیب متشکل از زیر واحد کاتالیتیک پپتید ضد میکروبی در ماسپتین B1 و یک دمین متصل شونده به کیتین در ریشه‌های موئین توتون بیان و فعالیت ضد میکروبی آن علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی در شرایط *in vitro* مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و ناقل‌ها

از باکتری‌های *Escherichia coli* سویه DH5 α به عنوان میزبان و برای تکثیر سامانه ژنی و از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* سویه ATCC15834 برای تراریزش گیاه توتون و القای ریشه‌های موئین استفاده شد. جهت بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره پروتئینی از باکتری‌های *E. coli* (ATCC25922) و *Enterococcus faecalis* (LUB93101) و *Enterococcus faecium* (KX185054) موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مهندسی ژنتیک دانشکده کشاورزی استفاده شد. همچنین از ناقل ژنتیک TOPO PCR2.1 دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین به عنوان ناقل همسانه‌سازی و از ناقل دوگانه pGSA1285 دارای پیش بر 35S (3x) و ویروس موزائیک گل کلم و ژن مقاومت به کلرامفنیکل به عنوان ناقل بیانی برای انتقال سامانه ژنی به گیاه استفاده شد.

طراحی و سنتز سامانه ژنی CBD/DermB1 و

همسانه سازی در ناقل بیانی pGSA1285

در ماسپتین B1 یک پپتید ضد میکروبی کاتیونی به طول ۳۱ اسید آمینه از خانواده در ماسپتین‌ها است که دارای ساختار آلفا-هلیکسی و از ترشحات پوستی قورباغه (*Phylomedusa bicolor*) جداسازی شده است.

مصنوعی سنتز و در ناقل pCR2.1-TOPO همسانه‌سازی و ناقل pCR/CBD-DermB1 تولید شد (شکل ۱، الف). مقدار ۱۰ نانوگرم از ناقل pCR/CBD-DermB1 حاوی سامانه ژنی به روش الکتروپوراسیون به سلول‌های باکتری مستعد شده *E. coli* سویه DH5α انتقال داده شد. باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط کشت LB واجد آنتی‌بیوتیک گزینشگر آمپی‌سیلین (۵۰ mg/l) بصورت شبانه و در دمای ۳۷ °C کشت و غربال شدند. استخراج پلاسمید از پرگنه‌های منتخب با استفاده از کیت (شرکت Thermo Fisher) انجام گرفت و همسانه‌سازی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) توسط آغازگرهای اختصاصی و هضم آنزیمی تأیید شد (جدول ۱).

توالی متناظر با پپتید ضد میکروبی در ماسپتین B1 (DermB1) از پایگاه Uniprot به شماره دسترسی P80282 استخراج گردید. قطعه توالی کد کننده‌ی پپتید به طول ۹۳ جفت باز به صورت ترجمه‌ای به توالی کد کننده‌ی دمین اتصال به کیتین کیتیناز I برنج (به شماره دسترسی X54367) به همراه سیگنال پپتید آن در سر -N ترمینال و با رعایت چهارچوب خوانش باز (ORF) جمعاً به طول ۳۴۷ جفت باز متصل شد. کل توالی بر اساس ترجیح کدون‌ی توتون بهینه‌سازی شد. همچنین جهت تسهیل همسانه‌سازی، توالی جایگاه‌های برشی مربوط به آنزیم‌های برشی NcoI در سر ۵' و توالی جایگاه برشی BamHI در سر ۳' طراحی شدند. سامانه ژنی طراحی شده توسط شرکت Eurofins کانادا بصورت

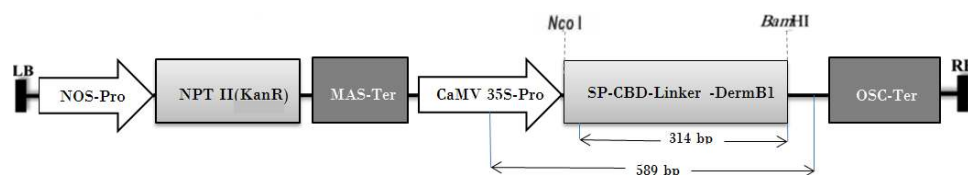
جدول ۱. آغازگرهای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز.

نام آغازگر	توالی (5'-3')	طول قطعه (bp)	دمای اتصال (°C)
Derb1-F	TGTAGTAGCAATGGCAGTAGTC	۳۰۰	۵۸
Derb1-R	ATTGTGAAATTGTATCGGCAACAGC		
roIC-F	CTCCTGAATCAAACCTCGTC	۶۳۰	۵۳
roIC-R	TGCTTCGAGTTTGGGTA		

NcoI

```
5' ccATGgcaaggcctctgctctgctgtagtagcaatggcagtagtgcgctgagaggtgacaatgtggtctcaggcaggtggtgcatt
gtgtcctaattgtctctgtgttctcaataggttgggtggcagca cctcagattatgtggtgctggatgccagtccaatgttcagggaagcag
ctgctaaggaaagctgctgctaaaggaa gca gca gca aaagaagccgca gctaa gctgcaatgtggaaggatgttctgaaaaaattggca ct
gtagctctcatgca ggaaggccgcttaggtgctgtgccgata caattcaca TAAggatc3'
BamHI
```

(الف)



(ب)

شکل ۱. توالی نوکلئوتیدی و شماتیک سامانه ژنی طراحی شده برای بیان در سیستم کشت ریشه‌های موئین. (الف) توالی نوکلئوتیدی پپتید نشانه (SP)، دمین اتصال به کیتین (CBD)، لینکر و پپتید در ماسپتین B1 (DermB1) در قالب یک ORF: حروف کدون‌های شروع (ATG) و خاتمه (TAA) به شکل بزرگ و خطوط زیر توالی مشخص شده محل جایگاه برشی آنزیم‌هاست. (ب) شماتیک سامانه ژنی از ناحیه T-DNA پلاسمید بیانی pGSA/CBD-DerB1. NOS-Pro: پیش بر نوسکاپین سنتاز، NPTII: نوئومایسین فسفوترانسفراز II حاوی ژن مقاومت به کانامایسین، MAS-Ter: خاتمه دهنده مانوپین سنتاز، CaMV35S-Pro: پیش بر موزاییک کلم توتون، SP-CBD-Linker-DermB1: توالی سامانه فیوژن نو ترکیب متشکل از سیگنال پپتید (SP)، توالی کد کننده دمین اتصال به کیتین (CBD)، توالی لینکر و توالی کد کننده پپتید در ماسپتین B1 و Ose: خاتمه دهنده اکتوپین سنتاز

(۲۰) صورت گرفت و شیشه‌ها به اتاق کشت با شرایط دمای °C ۲۵ و با دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

تراریزش ژنتیکی توتون با *A. rhizogenes*

به منظور ترانسفورماسیون ژنتیکی توتون، ابتدا *آگروباکتریوم رایزوژنز* (سویه ATCC15834) دارای پلاسمید pGSA-CBD-DerB1 در محیط کشت LB مایع (g/l ۱۰ تریپتون، g/l ۵ عصاره مخمر و g/l ۱۰ سدیم کلرید) حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپسین (۵۰ mg/l) و کلرامفنیکل (۳۰ mg/l) کشت شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای °C ۲۸ و در شرایط تاریکی درون یک شیکر-انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. کشت‌های باکتری (OD_{۶۰۰}=۱) توسط سانتریفوژ، با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه (۴ °C) رسوب گذاری شدند. پس از حذف روشناور، رسوب باکتری در محیط MS مایع تازه حل گردید. سپس سوسپانسیون به مدت ۴ ساعت، با تکان آرام در دمای اتاق قرار داده شد تا به OD_{۶۰۰}=۱ برسد و آماده تلقیح شود. جهت تهیه ریزنمونه از برگ‌های گیاهچه‌های ۸-۶ هفته‌ای توتون استفاده گردید. ریزنمونه‌ها (در ابعاد یک سانتی متر مربع) برش و درون مایع تلقیح باکتری *آگروباکتریوم رایزوژنز* منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شدند.

برگ‌های آلوده به باکتری روی کاغذ صافی سترون خشک شدند، سپس بر روی محیط هم‌کشتی حاوی MS بدون تنظیم کننده رشد و آنتی‌بیوتیک در تاریکی در دمای °C ۲۵ قرار داده شدند. بعد از گذشت ۳ روز، ریزنمونه‌ها به محیط کشت انتخابی حاوی MS پایه، آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۵۰ mg/l) و سفوتاکسیم (۳۰۰ mg/l)، به ترتیب جهت گزینش ریشه‌های موئین تراریخته و حذف باکتری، منتقل شدند و تا ظهور ریشه‌های موئین هر ۲ هفته یک بار در محیط انتخابی واگشت شدند. بعد از تشکیل ریشه‌های موئین اولیه (طول

به منظور همسانه‌سازی سامانه در ناقل بیانی، پلاسمیدهای pGSA1285 و ناقل PCR/CBD-DermB1 بصورت جداگانه با آنزیم‌های *NcoI* و *BamHI* برش داده شدند. قطعات مورد نظر حاصل از هضم آنزیمی از روی ژل آگارز ۱/۵ درصد خالص‌سازی شدند، سپس قطعات DNAی CBD-DermB1 و قطعه ژنی با استفاده از آنزیم T4 Ligase طی واکنش هم جوشی به ناقل خطی شده pGSA1285 وارد شد. پلاسمید نو ترکیب با استفاده از روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد شده *E. coli* انتقال داده شد. همسانه‌سازی با استفاده از واکنش PCR روی کلونی‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۳۰ mg/l) و هضم آنزیمی بر روی پلاسمیدها استخراج شده مورد تأیید قرار گرفت. در نهایت این ناقل به عنوان pGSA/CBD-DermB1 نامگذاری (شکل ۱، ب) و با روش الکتروپوراسیون به سلول‌های مستعد شده *آگروباکتریوم رایزوژنز* سویه ATCC15834 منتقل شد. صحت توالی همسانه سازی شده در ناقل بیانی با ارسال نمونه پلاسمیدی برای توالی یابی، مورد تأیید قرار گرفت.

مواد گیاهی

بذور توتون (*N. tabacum*) رقم Xanthi از مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش (استان گرگان) تهیه شد. ابتدا مقدار ۵۰۰ mg بذور توتون به لوله اپندورف انتقال و به مدت ۳۰-۶۰ ثانیه با اتانل ۷۰ درصد بصورت سطحی ضد عفونی شد. در مرحله بعد به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰ μl محلول شامل ۴۵۰ μl سدیم هیپوکلرید ۵ درصد، یک قطره ۱۰% Triton X-100 و ۹۵۰ μl آب مقطر استریل غوطه ور و همراه با تکان ضد عفونی شدند. بعد از چندین مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، بذرها بر روی کاغذ صافی قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند. کشت بذور درون شیشه‌های حاوی محیط کشت پایه MS حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار (pH= ۵/۸)

گرفت. بدین منظور از ریشه‌های موئین تراریخت و شاهد، RNA کل با استفاده از روش کلراید لیتیم استخراج شد (۲۲). کیفیت سنجی RNA استخراجی با الکتروفورز مقدار ۵ میکرولیتر از RNA روی ژل آگارز و مشاهده باندهای 28S و 18S rRNA و کمیت سنجی غلظت RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری صورت گرفت. حذف آلودگی ژنومی با تیمار آنزیم DNaseI صورت گرفت و عدم حضور DNA با استفاده از واکنش PCR (جدول ۱) بر روی RNA استخراجی تأیید شد. سپس سنتز رشته اول cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت Thermo Fisher) و آغازگرهای OligodT، مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای تأیید بیان ژن در ریشه‌های تراریخت، واکنش RT-PCR در حجم نهایی ۲۰ μ l انجام گرفت.

استخراج عصاره پروتئین کل از ریشه‌های موئین

عصاره پروتئین کل از ریشه‌های موئین تراریخت و شاهد با استفاده از بافر پتاسیم فسفات (PBS) (۵۰ mM و pH=۷) استخراج شد. مقدار یک گرم بافت ریشه موئین توسط ازت مایع کاملاً پودر شد و به لوله انتقال داده شد. به هر نمونه به نسبت ۱:۱ وزنی/حجمی (w/v)، بافر استخراج PBS اضافه شد و به مدت ۱۰-۵ دقیقه ورتکس شدید صورت گرفت. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 4°C و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. روشنای حاوی عصاره پروتئینی به لوله جدید انتقال داده شد و غلظت عصاره پروتئین کل به روش براد فورد (۲۳) با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان پروتئین استاندارد جهت ترسیم نمودار منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد. عصاره پروتئین به منظور استفاده در مراحل بعدی در دمای 20°C ذخیره‌سازی شد.

تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC)

شاخص MIC عبارت است از حداقل غلظتی که از رشد ۹۹ درصد جمعیت باکتری ممانعت به عمل آورد.

تقریبی ۴-۵ cm)، ریشه‌ها از پایه‌ها برش و به محیط جدید منتقل شدند. جهت تکثیر و تولید بیومس کافی، ریشه‌ها هر ۳ هفته یک بار در محیط کشت جدید واکنش شدند. ریشه‌های موئین شاهد (WT) نیز به‌وسیله تلقیح ریزنمونه‌های برگی با *آگروباکتریوم ریزوژنز* (بدون سامانه ژنی) به روش بالا تهیه شدند.

آنالیز ریشه‌های موئین تراریخت به‌وسیله روش

PCR

پس از اطمینان از حذف باکتری، DNA ژنومی از ریشه‌های موئین تراریخت و شاهد به کمک روش CTAB استخراج شد (۲۱). به‌منظور تأیید حضور قطعه ژن نو ترکیب CBD-DermB1، واکنش PCR توسط آغازگرهای اختصاصی انجام شد. جهت تأیید الحاق ترانس ژن در ریشه‌های موئین به ظاهر تراریخت از آغازگرهای Derb1 استفاده شد (جدول ۱). ریشه‌های موئین تولید شده را می‌توان با ردیابی ژن‌های القاء کننده ریشه موئین مانند *rolA*، *rolB* و *rolC* بررسی نمود. در این پژوهش از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* برای تأیید القای ریشه موئین استفاده شد (جدول ۱). ترکیبات واکنش PCR شامل ۲/۵ μ l بافر کامل (۱۰x)، ۰/۵ μ l dNTP (۱۰۰ mM)، ۰/۷۵ μ l هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشتی (۱۰ pm)، ۰/۳ μ l آنزیم Taq DNA polymerase (۵۰ μ l) و مقدار ۲ μ l DNA (۴۰ ng/ μ l) الگو بود که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ μ l رسانده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با یک چرخه واسرشت سازی اولیه (94°C) به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی (94°C) به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر به رشته الگو به‌مدت ۴۵ ثانیه (53°C و 58°C)، تکثیر DNA الگو به‌مدت ۶۰ ثانیه (72°C) و یک چرخه تکثیر نهایی (72°C) به‌مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

برای تأیید و بررسی بیان سامانه نو ترکیب CBD-DermB1، استخراج RNA و سپس سنتز cDNA صورت

شده که دمای آن پایین آمده بود افزوده و در پتری دیش تقسیم شد (تعداد ۳ پتری دیش معادل ۳ تکرار). بعد از بستن محیط کشت، دیسک‌ها روی آن قرار داده شده و سه سطح غلظت ۳۰، ۶۰ و ۹۰ $\mu\text{g/ml}$ از پروتئین استخراج شده به دیسک‌ها اضافه شد. برای رشد باکتری، پتری دیش‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای 37°C قرار داده شدند. فعالیت ضد میکروبی پروتئین با مشاهده هاله عدم رشد باکتری و اندازه‌گیری میانگین قطر هاله‌های ایجاد شده در اطراف دیسک‌ها بررسی گردید. در هر تکرار از یک دیسک آنتی‌بیوتیک به عنوان کنترل مثبت و یک دیسک تیمار شده با عصاره پروتئینی ریشه‌های موئین غیر تراریخت به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

آنالیز آماری

آزمایش بصورت فاکتوریل بر اساس طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها و انجام مقایسات میانگین (بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۰/۰۵) با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۳ و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل انجام گرفت.

یافته‌ها

صحت همسانه‌سازی سامانه ژنی CBD-DermB1 در ناقل بیانی pGSA1285 با واکنش PCR و هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های NcoI و BamHI تأیید شد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، هضم ناقل pGSA/CBD-DermB1 منجر به تولید دو قطعه DNA شده است و قطعه‌ای به طول حدود ۳۵۰ جفت باز مطابق با انتظار با طول قطعه‌ی یکسان بود؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که سامانه‌ی ژنی به درستی همسانه سازی شده است و آماده‌ی انتقال به توتون است.

تأیید ریشه‌های موئین تراریخته

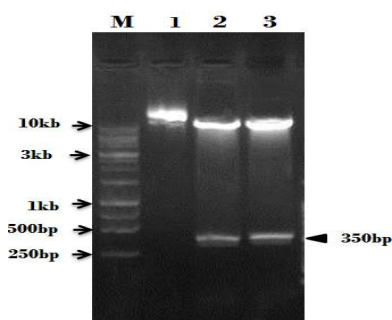
ریشه‌های موئین در حدود ۱۰ روز بعد از انتقال به محیط حاوی آنتی‌بیوتیک بر روی ریزنمونه‌های تلقیح

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد عصاره پروتئین حاوی پپتید نوترکیب به روش رقت سازی میکرودایلوشن و تهیه سریال رقت با استفاده از میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه انجام گرفت (۲۴). بدین منظور ۶ سطح شامل غلظت‌های ۹۰، ۴۵، ۲۲/۵، ۱۱/۲۵، ۵/۶۲ و ۲/۸۱ $\mu\text{g/ml}$ در حجم نهایی ۲۴۵ μl ، در مقابل باکتری قرار داده و رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفت. ۶ چاهک برای رقت‌های مختلف در نظر گرفته شد و از چاهک اول که غلظت اولیه پروتئین معادل ۹۰ $\mu\text{g/ml}$ 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 ۵ μl از سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک‌فارلند (دارای $10^8 \times 1/5$ سلول) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C قرار داده شد. برای هر باکتری این آزمایش بصورت جداگانه طراحی و اجرا شد. مقدار MIC عصاره پروتئین با مقایسه کیفی میزان کدورت ناشی از رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفت. بدین صورت که با مشاهده کدورت در یک چاهک، چاهک قبلی به عنوان حداقل غلظت مهارکننده در نظر گرفته شد. انتظار می‌رفت که در چاهک کنترل مثبت، کدورت کافی دلیل بر رشد کافی باکتری باشد و در چاهک کنترل منفی رشدی صورت نگرفته و کاملاً شفاف باشد.

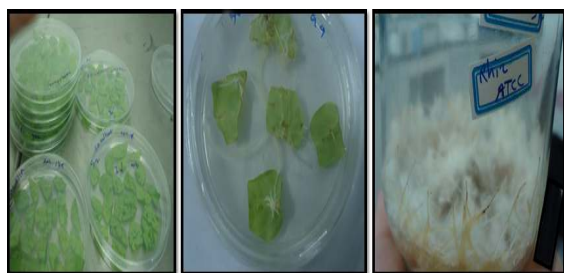
ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی

زیست‌سنجی فعالیت ضد باکتریایی با استفاده از بررسی فعالیت عصاره پروتئین کل علیه باکتری‌ها به روش بررسی هاله ممانعت رشد و با استفاده از انتشار در دیسک انجام شد (۲۴، ۲۵). در این روش، ابتدا میکروارگانیسم‌های مورد نظر در محیط LB مایع بصورت شبانه کشت داده شدند. سپس در روز انجام آزمایش مجدداً یک کشت تازه صورت گرفت تا $OD_{600\text{nm}}=0/4$ برسد. مقدار ۶۰ μl از کشت تازه باکتری به ۶۰ ml محیط کشت LB اتوکلاو

واکنش PCR و RT-PCR بر روی DNA و cDNA ریشه‌های موئین غیر تراریخت، هیچ گونه قطعه‌ای مشاهده نشد.



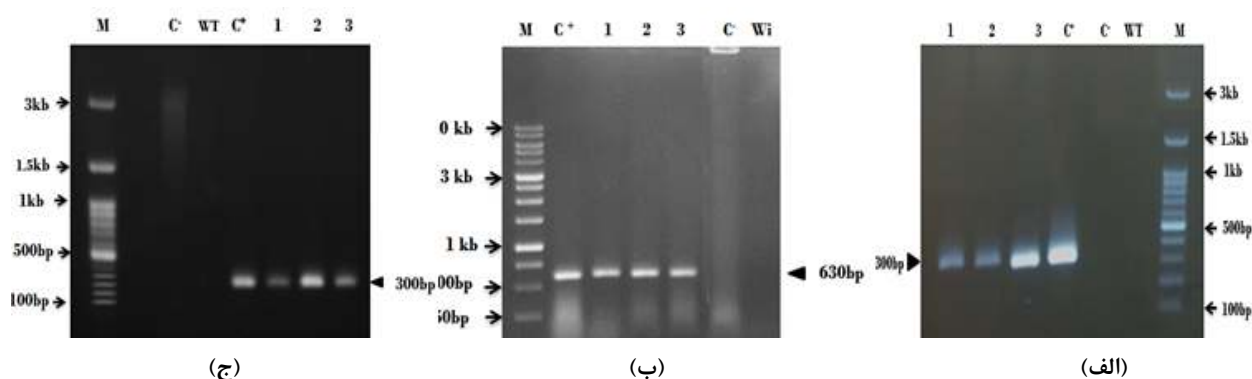
شکل ۲. تأیید همسانه‌سازی سامانه ژنی در ناقل pGSA/CBD- DermB1 با استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های NcoI و BamHI. چاهک M: نشانگر ۱ kb، چاهک ۱: پلاسمید بدون هضم آنزیمی و چاهک‌های ۲ و ۳ کلنی‌های نو ترکیب مثبت و خروج قطعه مورد انتظار ۳۵۰ جفت بازی



شکل ۳. مراحل هم‌کشتی، ظهور و تکثیر ریشه‌های موئین. (الف) انتقال ریزنمونه‌های برگ‌ی بعد از تلقیح با سوسپانسیون باکتری به محیط هم‌کشتی، (ب) ظهور ریشه‌هایی موئین در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک انتخابی کانامایسین و (ج) تکثیر انبوه ریشه‌های موئین

شده با سوسپانسیون باکتری شروع به ظهور کردند (شکل ۳). ریشه‌های موئین دارای ویژگی‌های اختصاصی مثل رشد سریع و بدون تمایل زمین‌گرایی همراه با انشعابات جانبی فراوانی هستند و با توجه به این مشخصات از ریشه‌های معمولی تمیز داده می‌شوند. زمانی که طول ریشه‌های موئین بطور تقریبی به ۴-۵ cm رسید از پایه جدا و به محیط جدید انتقال داده شدند. برای تکثیر و تولید مقادیر کافی، ریشه‌های موئین ۳ تا ۴ مرتبه و با فواصل ۳ هفته یک بار به محیط جدید واگشت شدند و توده‌ای در هم تنیده از ریشه‌های ریز تشکیل دادند.

برای اثبات انتقال ژنتیکی و تأیید نسخه‌برداری از سامانه ژنی به ترتیب از روش‌های PCR و RT-PCR استفاده شد که نتایج آن در شکل ۴ نمایش داده شده است. حضور ژن‌های در ماسپتین B1 و *rolC* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بر روی DNA استخراج شده از ریشه‌های موئین به ظاهر تراریخت به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به تأیید رسید. مشاهده قطعه‌ای به طول حدود ۳۰۰ جفت باز نشان داد که سامانه ژنی نو ترکیب با موفقیت در ژنوم ریشه‌های موئین وارد شده است. همچنین مشاهده قطعه تکثیر شده به طول تقریبی ۶۳۰ جفت باز نشان دهنده القای موفقیت‌آمیز ریشه‌های موئین توسط آگروباکتریوم رایزوزنز بود. نتایج واکنش RT-PCR نیز تکثیر یک قطعه به طول تقریبی ۳۰۰ جفت باز را نشان داد و بدین ترتیب بیان موفق در سطح ترانسکریپتوم به تأیید رسید. شایان ذکر است که در



شکل ۴. نتایج الکتروفورز محصول PCR و RT-PCR، تأیید تراریختی و بیان سامانه ژنی در ریشه‌های موئین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و ژن roIC. (الف) الکتروفورز محصول PCR روی DNA ژنومی و مشاهده قطعه مورد انتظار در حدود ۳۰۰ bp، (ب) نتایج آنالیز PCR تأیید تراریختی با استفاده از آغازگرهای ژن roIC و مشاهده قطعه مورد انتظار در حدود ۶۳۰ bp و (ج) الکتروفورز محصول RT-PCR و تأیید بیان ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی روی cDNA و مشاهده باند ۳۰۰ bp مورد انتظار. چاهک M: نشانگر مولکولی 100bp یا 1 kb، چاهک C+ کنترل مثبت (پلاسمید)، چاهک C- کنترل منفی (آب) و چاهک‌های ۱ تا ۳ نمونه‌های مثبت (در شکل الف و ب از DNA و در شکل ج از cDNA به عنوان الگو استفاده شده است). wi: ریشه‌های معمولی و wt: ریشه‌های غیر تراریخت

حداقل غلظت مهار کننده

در آزمایشات رقت‌سازی در پلیت ۹۶ خانه، حداقل غلظت بازدارنده غلظت‌های مختلف عصاره پروتئین بر روی سه گونه باکتری تعیین شد. طبق نتایج این آزمایش بیشترین میزان MIC عصاره پروتئینی مربوط به باکتری اشیشیاکلی با غلظت ۹۰ $\mu\text{g/ml}$ بود. مقدار MIC ثبت شده برای هر دو باکتری گرم مثبت انتروکوک غلظت ۴۵ $\mu\text{g/ml}$ عصاره پروتئینی بود. با توجه به این نتایج مشخص شد که مقدار غلظت بیشتری از پروتئین برای مهار باکتری گرم منفی اشیشیاکلی در مقایسه با دو باکتری *E. faecium* و *E. faecalis* مورد نیاز است. شایان ذکر است که عصاره پروتئین ریشه موئین غیر تراریخت، اثر بازدارندگی رشد بروی هیچ یک از سه باکتری مورد مطالعه نداشت، محیط درون چاهک کنترل منفی بصورت کاملاً شفاف بود و در چاهک کنترل مثبت کدورت کافی حاصل از رشد باکتری مشاهده شد.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی پپتید در ماسپتین

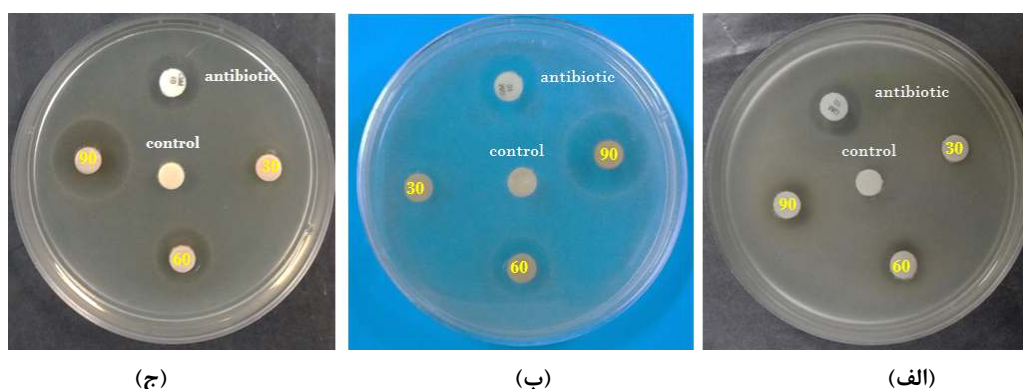
نو ترکیب در ریشه‌های موئین توتون تراریخت

آزمایش بررسی فعالیت ضد میکروبی پپتید در ماسپتین نو ترکیب بصورت فاکتوریل، بر اساس طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام گرفت. آنالیز تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثر ضد میکروبی عصاره پروتئین استخراج شده از ریشه‌های موئین روی باکتری‌ها نشان داد که به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف عصاره پروتئینی بر روی سه باکتری مورد آزمایش وجود دارد ($P < 0.05$). نتایج مقایسه میانگین (دانکن) حاصل از آزمایش انتشار در دیسک در نمودار ۱ نمایش داده شده است. طبق نتایج به دست آمده بین سطح غلظت‌های بکار رفته و اثر بازدارندگی رشد روی سه باکتری، رابطه مستقیمی وجود دارد. تیمار عصاره کل

حاوی پروتئین نو ترکیب ۳۰ $\mu\text{g/ml}$ ، دارای اثر بازدارندگی کمتری نسبت به غلظت‌های بالاتر بود و با افزایش غلظت، اثر مهارکنندگی بیشتر و در نتیجه هاله‌های عدم رشد

در سایر تیمارها این مقدار از قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اثر آنتی‌بیوتیک کمتر بود. در مجموع این نتایج *E. faecalis* با قطر هاله عدم رشد ۱۶/۳۳ در غلظت ۹۰ $\mu\text{g/ml}$ با بیشترین حساسیت و *E. coli* با قطر هاله عدم رشد ۲ mm در غلظت ۳۰ $\mu\text{g/ml}$ کمترین حساسیت را نشان دادند. به‌طوریکه از نظر میزان اثر بازدارندگی یا به عبارت دیگر میزان حساسیت در هر سه غلظت عصاره پروتئین، *E. faecalis*، *E. faecium* و *E. coli* به ترتیب در جایگاه اول تا سوم قرار گرفتند.

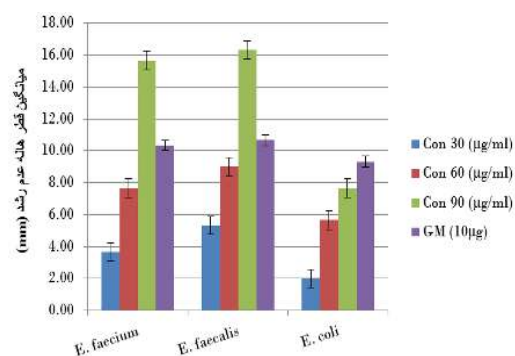
بزرگتری مشاهده شد. در تیمار ۳۰ $\mu\text{g/ml}$ *E. faecalis* با قطر هاله ۵/۳۳ mm، بیشترین حساسیت و *E. coli* با قطر هاله ۲ mm، کمترین حساسیت را نشان داد (شکل ۵). در هر دو غلظت ۶۰ و ۹۰ $\mu\text{g/ml}$ نیز قطر هاله عدم رشد در *E. coli* کمتر و در *E. faecalis* بیشتر بود. در این بین قطر هاله عدم رشد تولید شده از غلظت ۹۰ $\mu\text{g/ml}$ بزرگتر از دو غلظت دیگر بود. از بین غلظت‌های پروتئین استفاده شده برای سه باکتری، قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *E. faecium* و *E. faecalis* در غلظت ۹۰ $\mu\text{g/ml}$ نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ۱۰ μg (کنترل مثبت) بیشتر و



شکل ۵. آزمایش ضد میکروبی عصاره پروتئین حاوی پروتئین نو ترکیب در تیمار با عصاره پروتئینی ریشه‌های موئین توتون تراریخت و شاهد و تشکیل هاله عدم رشد در سه نوع باکتری. (الف) باکتری اشریشیاکلی، (ب) انتروکوکوس فکالیس و (ج) انتروکوکوس فاسیوم. ۳۰، ۶۰ و ۹۰ به ترتیب مقادیر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ اضافه شده به هر دیسک. از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ μg) به عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی ۹۰ $\mu\text{g/ml}$ از عصاره پروتئین ریشه موئین غیر تراریخت به عنوان شاهد منفی (control) استفاده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

به تازگی، تمایل برای بیان پپتیدهای ضد میکروبی در گیاهان به دو دلیل اصلی، یعنی نیاز به رویکردهای جدید در حفاظت از گیاهان و تقاضای آنتی‌بیوتیک‌های جدید در پزشکی، به طور قابل توجهی افزایش یافته است. از جمله ویژگی‌های منحصر به فرد پپتیدهای ضد میکروبی این است که می‌توان ژن‌های کدکننده پپتیدها را از منابع متفاوت استخراج و با استفاده از فناوری مهندسی ژنتیک برای مقابله با میکروارگانیسم‌های باکتریایی و قارچی (یا هر دو) و به منظور درمان بیماری‌های انسانی و ایجاد گیاهان مقاوم بکار گرفت (۲۷).



نمودار ۱. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شده در نتیجه غلظت‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ $\mu\text{g/ml}$ عصاره پروتئین حاوی پروتئین در ماسپتین نو ترکیب روی سه نوع باکتری *E. faecium*، *E. faecalis* و *E. coli*: جنتامایسین (۱۰ μ) به عنوان کنترل مثبت، مقدار ۹۰ $\mu\text{g/ml}$ عصاره پروتئینی ریشه موئین غیر تراریخت به عنوان کنترل منفی. میله بار بالای هر ستون نشان دهنده خطای معیار می‌باشد.

میکروبی قوی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ‌ها نشان داد (۸).

یوتوشنکو و همکاران (۲۰۰۷) به منظور ارزیابی فعالیت میکروبی در محیط آزمایشگاهی و کسب اطلاعات اولیه در مورد این که آیا پپتیدها برای ایجاد مقاومت در گیاهان مناسب هستند از آنالوگ در ماسپتین (به نام MsfA2) و تمپورین A سنتتیک استفاده کردند. نتایج نشان داد که پاتوژن‌های قارچی و باکتری مورد مطالعه به غلظت‌های میکرومولار (بین ۲/۵ تا ۲۵ μM) پپتیدهای سنتتیک حساسیت نشان دادند (۲۷). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر از غلظت‌های میکروگرم عصاره پروتئین کل (نه پپتید خالص) برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی استفاده شد، به نظر می‌رسد تفاوت در نتایج گزارش شده میزان غلظت‌های مهارکننده، ناشی از این مسئله می‌باشد. همانگونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود میزان حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد آزمایش، نسبت به پپتید با هم متفاوت بود. این مسئله به نحوه عمل پپتید ضد میکروبی و البته تفاوت‌های ساختاری دیواره باکتری‌های گرم مثبت و منفی برمی‌گردد. تحقیقات نشان داده است که دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی دارای غشای دو لایه بوده و ساختار پیچیده‌تری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت دارند. بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش مشخص شد که اثر ضد میکروبی در ماسپتین نو ترکیب روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی بود. در ماسپتین جزء پپتیدهای کاتیونی است که گیرنده خاصی را هدف گذاری نمی‌کنند بلکه ویژگی‌های ساختاری اصلی غشاهای میکروبی را از هم تشخیص می‌دهد (۹). این پپتید کاتیونی با بار منفی گروه‌های فسفولیپید غشاهای میکروبی میانکنش انتخابی داشته که موجب تجمع پپتیدهای ضد میکروبی در سطح غشای سلولی، ایجاد منافذی و موجب اختلال در

سیستم کشت ریشه موئین یک پلتفورم ارزشمند، کارآمد، ساده و کم هزینه برای تولید انواع پروتئین‌های نو ترکیب ایجاد نموده است و امکان تجزیه و تحلیل ساختاری و عملکردی پروتئین‌های نو ترکیب را فراهم آورده است. تحقیقات صورت گرفته از تولید موفقیت‌آمیز پپتیدهای ضد میکروبی در ریشه‌های موئین حاکی از این مسئله است که می‌توان از این سیستم برای تولید، ارزیابی سریع فعالیت ضد میکروبی و کارایی پپتیدهای نو ترکیب بهره جست. در مطالعه‌ای که با هدف تولید پپتید تائوماتین در ریشه‌های موئین توتون صورت گرفت، مقایسه نتایج حاصل از انتقال ژنتیکی دو سامانه ژنی شامل پپتید تائوماتین و سامانه پپتید تائوماتین فیوز شده به توالی سیگنال نشانه شبکه آندوپلاسمی، مشخص شد که حضور پپتید نشانه برای ترشح تائوماتین ضروری است. نتایج نشان داد که مقدار تولید تائوماتین در ریشه‌های موئین بیشتر از مقادیر تولید شده در گیاه تراریخت بود (۲۸). آلینین و همکاران ضمن بیان موفق پپتید فیوژن رنالکسین در کشت ریشه موئین توتون، گزارش دادند که پپتید نو ترکیب تولید شده علیه باکتری‌های پاتوژن چندمقاومتی گرم مثبت و منفی شامل *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus pyogenes*، *E. coli* و *Acinetobacter bauman* و سویه‌های مقاوم به ونکومایسین دارای اثرات ضد میکروبی است. بر این اساس عنوان شد که بیوسنتز رنالکسین در ریشه موئین و ترشح درون محیط کشت می‌تواند ضمن تسهیل خالص‌سازی پروتئین نو ترکیب، جایگزین خوبی برای تولید انبوه این ماده باشد (۵). القای بیان موفقیت‌آمیز پروتئین ضد ویروس HIV و ضد تومور MAP30 از جمله پروتئین‌های مهارکننده ریبوزومی (RIP)، در ریشه موئین توتون گزارش شده است. تجزیه و تحلیل پروتئین کل استخراج شده از ریشه‌های موئین تراریخته اثرات ضد

انجام آزمایشات هدفمند انتقال ژنتیکی دائم در جهت توسعه مقاومت گیاهان زراعی به فیتوپاتوژن‌هاست را فراهم نمود. همچنان که عنوان شد علی‌رغم فعالیت قوی در ماسپتین بر روی غشای باکتری، این پپتید تأثیر بر روی اریتروسیت‌ها یا سایر سلول‌های پستانداران ندارند (۳۱). بنابراین در ماسپتین با فعالیت ضد میکروبی گسترده می‌تواند یک کاندید آنتی‌بیوتیک امید بخش برای استفاده تجاری برای مصارف پزشکی باشد. با این وجود نیاز به انجام مطالعات بیشتری جهت تعیین فعالیت این پپتید در برابر میکروارگانیسم‌های مهم بیماری‌زا ضروری است.

تشکر و قدردانی

از کلیه افرادی که ما را در انجام این پروژه یاری کردند خصوصاً اساتید راهنما و مشاور کمال تقدیر و سپاسگزاری را داریم.

یکپارچگی و تداخل در نفوذ پذیری شده و نهایتاً به مرگ سلول منجر می‌شود (۲۶،۱۲).

نکته قابل تأمل دیگر میزان پایداری اثر ضد باکتریایی در غلظت‌های مختلف پروتئینی بود که با نگهداری پلیت‌ها طی ۷۲ ساعت و در شرایط دمایی مشابه قبل، همچنان بدون هیچگونه کاهش در هاله ممانعت رشدی در همه تیمارها مشاهده شد. پایداری AMPها نسبت به تخریب پروتئولیتیک توسط پروتئازهای پاتوژن یا میزبان برای ایجاد اثرات ضد میکروبی در طول تعامل پپتید-پاتوژن بسیار حیاتی است (۲۷) نتایج مطالعات نشان داده است که در ماسپتین به تخریب پروتئازهای پاتوژن و میزبان مقاوم است، به طوری که انکوباسیون طولانی مدت با پاتوژن‌ها، حتی جوشاندن پپتید باعث کاهش فعالیت ضد میکروبی آن نشده است. همچنین از آنجاکه مقاومت میکروارگانیسم‌ها مستلزم طراحی مجدد غشای میکروبی و تغییر در ترکیب لیپیدی غشاء است (۲۹)، ظهور پاتوژن‌های مقاوم به این AMPs بسیار غیر محتمل است. بطوریکه این مکانیسم دفاعی برای سال‌هاست که به ادامه حیات گونه‌ی تولید کننده این پپتیدها (قورباغه‌ها) در محیط مملو از انواع پاتوژن‌ها کمک می‌کند.

در تحقیقات مختلف اثرات ضد میکروبی آنالوگ و فیوژن در ماسپتین علیه پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی مختلف به اثبات رسیده است (۱۹،۲۷،۳۰)، اما طبق بررسی‌های انجام شده، تاکنون گزارشی در زمینه تولید پروتئین فیوژن در ماسپتین در سیستم کشت ریشه‌های موئین صورت نگرفته است. همانگونه که ملاحظه گردید تولید پپتید در ماسپتین نو ترکیب در ریشه موئین توتون به تأیید رسید و به خوبی رشد باکتری‌های مورد آزمایش را مهار نمود که در تطابق با یافته‌های سایر مطالعات بود. نتایج به دست آمده ضمن تأیید بر صحت کارایی بیان نو ترکیب AMPs طی فرآیند دستوری و ترانسفورماسیون ژنتیکی، اطلاعات با ارزش که پیش‌نیازی برای اطمینان از

References

1. Ma JK, Drake PM, Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Rev Genet.* 2003; 4(10): 794-805.
2. Schaëfer H, Ramamoorthy S, Wink M. Biologically active recombinant human erythropoietin expressed in hairy root cultures and regenerated plantlets of *Nicotiana tabacum* L. *PLoS one.* 2017; 12(8): e0182367.
3. Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnol.* 2004; 22(11): 1415-1422.
4. Gaume A, Komarnytsky S, Borisjuk N, Raskin I. Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. *Plant Cell Rep.* 2003; 21(12): 1188-1193.
5. Aleinein RA, Schäfer H, Wink M. Rhizosecretion of The Recombinant Antimicrobial Peptide Ranalexin from Transgenic Tobacco Hairy Roots. *RRJBS Phytopathol Gene Dis.* 2015; 12(3): 45-55.
6. Merlin M, Gecchele E. Comparative evaluation of recombinant protein production in different biofactories: The Green Perspective. 2014; 7(2): 136419.
7. Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnol.* 2003; 21(12): 570-578.
8. 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.
9. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 2002; 415(6870): 389-395.
10. Melo MN, Ferre R, Castanho MA. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Rev Microbiol.* 2009; 7(3): 245-250.
11. Straus SK, Hancock RE. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochimica et biophysica acta.* 2006; 1758(9): 1215-1223.
12. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnol.* 2011; 29(9): 464-472.
13. Keymanesh K, Soltani S, Sardari S. Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009; 25(6): 933-944.
14. Peters BM, Shirtliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens.* 2010; 6(10): e1001067.
15. Marcos JF, Muñoz A, Pérez-Payá E, Misra S, López-García B. Identification and Rational Design of Novel Antimicrobial Peptides for Plant Protection. *Annual Rev Phytopathology.* 2008; 46(1): 273-301.
16. Li Z, Zhou M, Zhang Z, Ren L, Du L, Zhang B. Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased

- resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis*. *Functional & Integrative Genomics*. 2011; 11(1): 63-70.
17. Viana JF, Dias SC, Franco OL, Lacorte C. Heterologous production of peptides in plants: fusion proteins and beyond. *Current Protein Peptide Sci*. 2013; 14(7): 568-579.
 18. Mor A, Amiche M, Nicolas P. Structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. *Biochemistry*. 1994; 33(21): 6642-6650.
 19. Osusky M, Osuska L, Kay W, Misra S. Genetic modification of potato against microbial diseases: in vitro and in planta activity of a dermaseptin B1 derivative, MsrA2. *TAG Theoretical and applied Genetics Theoretische Und angewandte Genetik*. 2005; 111(4): 711-722.
 20. Murasnige T, Skoog F.A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962; 15: 473-475.
 21. Richards E, Reichardt M, Rogers S. Preparation of plant DNA using CTAB. *Short Protocols in Mol Biol*. 1997; 2(3): 17-22.
 22. Channuntapipat C, Sedgley M, Collins G. Sequences of the cDNAs and genomic DNAs encoding the S1, S7, S8, and Sf alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001; 103(6): 1115-1122.
 23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem*. 1976; 72: 248-254.
 24. Vanden DA, Vlietinck AJ. *Methods in plant biochemistry: screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants*. London: Academic Press. 1991; 4(2): 47-69.
 25. Rios JL, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *J Ethnopharmacology*. 1988; 23(2): 127-149.
 26. Bechinger B. Structure and Function of Membrane-Lytic Peptides. *Critical Rev Plant Sci*. 2004; 23(3): 271-292.
 27. Yevtushenko DP, Misra S. Comparison of pathogen-induced expression and efficacy of two amphibian antimicrobial peptides, MsrA2 and temporin A, for engineering wide-spectrum disease resistance in tobacco. *Plant Biotechnol J*. 2007; 5(6): 720-734.
 28. Pham NB, Schafer H, Wink M. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures. *Biotechnol J*. 2012; 7(4): 537-545.
 29. Holaskova E, Galuszka P, Frebort I, Oz MT. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnol Advan*. 2015; 33(6): 1005-1023.
 30. Rivero M, Furman N, Mencacci N, Picca P, Toum L, Lentz E. Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *J Biotechnol*. 2012; 157(2): 334-343.

31. Strahilevitz J, Mor A, Nicolas P, Shai Y. Spectrum of Antimicrobial Activity and Assembly of Dermaseptin b and Its Precursor Form in Phospholipid Membranes. *Biochemistry*. 1994; 33(36): 1951-1960.

Production of a recombinant antimicrobial Dermaseptine B1 peptide in *Nicotiana tabacum* L. hairy roots with antibacterial activity

Nazari Z¹, Nazarian Firouzabadi F^{*2}, Ismaili A³, Darvishnia M⁴

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

2. Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Nazarian.f@lu.ac.ir

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

4. Associate Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

Received: 3 April 2018 Accepted: 21 May 2018

Abstract

Background: Root hair culture is a valuable system to produce recombinant proteins in planta. Antimicrobial peptides (AMPs) are vital parts of the innate immune response found in almost all forms of life. Precise target activity and limited toxicity towards mammalian cells make them suitable candidate molecules to combat evolving drug-resistant microorganisms. The aim of the present study was to produce a Dermaseptin B1 recombinant antimicrobial peptide in *Nicotiana tabacum* root hair and assess the antibacterial activity of the protein extract from transgenic root hairs.

Materials and Methods: A Dermaseptin B1 encoding gene sequence was C-terminally fused to a Chitin Binding Domain (CBD) encoding sequence and cloned in a plant binary vector used for *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation to generate root hairs in tobacco. Transgenic root hairs were produced, and protein extracts were used to assess antimicrobial activity against a number of microbes.

Results: PCR and RT-PCR analysis confirmed the integration of the Dermaseptin B1 gene in a root hair cell genome and the presence of Dermaseptin B1 mRNA transcripts, respectively. Recombinant protein had a significant ($P < 0.05$) antibacterial effect towards gram-positive and gram-negative bacteria.

Conclusion: Dermaseptine B1 recombinant peptide was successfully produced in tobacco root hair cells and its antibacterial effects was confirmed. These results suggest that the recombinant protein may have a therapeutic effect to control bacterial pathogens. It can be concluded that root hair cells can be used to produce and purify valuable recombinant proteins with pharmaceutical applications.

Keywords: Antimicrobial Peptides, *Agrobacterium rhizogene*, Dermaseptine, Gene Expression.

***Citation:** 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*. 2018; 20(2):103-118.