تولید پپتید ضد میکروبی درماسپتین B1 نوترکیب در سیستم کشت ریشه‌های موئین توتون و زیست‌سنجی اثرات ضد باکتریایی

زیبا نظری[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی*[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 نوترکیب 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 نوترکیب درماسپتین B1 در ریشه‌های موئین گیاه توتون و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن بود.

* **مواد و روش‌ها:** توالی کدکننده‌ی درماسپتین 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 نوترکیب 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 معنی‌داری ($P<0/05$) روی رشد هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بود.

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

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

*آدرس مکاتبه: خرم آباد، 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 مزایایی 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 نوترکیب 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. rhizogenesis* قادر است ژن‌های مولد هورمون اکسین و ژن‌های *rol* (Root oncogenic loci) موجود در ناحیه T-DNAی 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 نئوبلاستی در سلول‌ها، ریشه‌های موئین بصورت نابجا و در نزدیکی جایگاه ورود باکتری تولید می‌شوند (۴). با استفاده از فناوری DNAی نوترکیب 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 (۶،۵).

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 آن‌که برای اولین بار پروتئین *Ig*G1 نوترکیب با موفقیت در سیستم ریشه موئین تولید شد، القای بیان پروتئین‌های نوترکیب 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 (۱۱،۱۰). 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 به‌عنوان 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 به‌عنوان 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 (۱۷،۱۶). 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 ضدمیکروبی نوترکیب تائوماتین، رنالکسین و MAP30 در کشت ریشه موئین توتون اشاره نمود (۵،۸).

درماسپتین B1 یک پپتید ضد میکروبی کاتیونی به طول ۳۱ اسید آمینه از خانواده درماسپتین‌ها است که دارای ساختار آلفا-هلیکسی و از ترشحات پوستی قورباغه (*Phylomedusa bicolor*) جداسازی شده است. اسیدآمینه‌های موجود در جایگاه ۱ تا ۱۸ در قسمت آمفی‌پاتیک سر N-ترمینال پپتید، عمدتاً مسئول اصلی قدرت ضد میکروبی درماسپتین‌ها هستند (۱۸). نتایج آزمایش سنجش فعالیت ضد میکروبی درماسپتین 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 درماسپتین 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 DH5α به‌عنوان 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)، *Enterococcus faecalis* (LUB93101) و *Enterococcus faecium* (KX185054) موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مهندسی ژنتیک دانشکده کشاورزی استفاده شد. همچنین از ناقل pCR2.1 TOPO دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین به عنوان ناقل همسانه‌سازی و از ناقل دوگانه pGSA1285، دارای پیش بر 35S (3x) ویروس موزائیک گل کلم و ژن مقاومت به کلرامفنیکل به‌عنوان ناقل بیانی برای انتقال سامانه ژنی به گیاه استفاده شد.

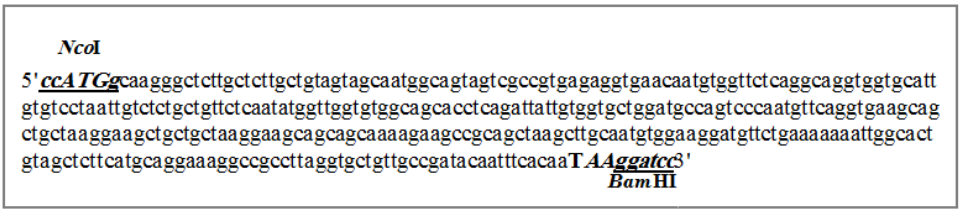
طراحی و سنتز سامانه ژنی CBD/DermB1 و همسانه سازی در ناقل بیانی pGSA1285

توالی متناظر با پپتید ضد میکروبی درماسپتین 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 بهینه سازی شد. همچنین جهت تسهیل همسانه سازی، 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 مصنوعی سنتز و در ناقل pCR2.1-TOPO همسانه‌سازی و ناقل pCR/CBD-DermB1 تولید شد (شکل ۱،الف).

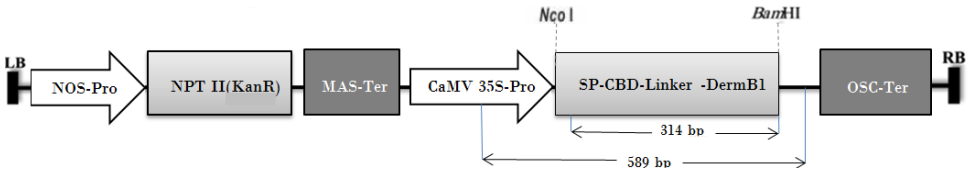
مقدار ۱۰ نانوگرم از ناقل pCR/CBD-DermB1 حاوی سامانه ژنی به روش الکتروپوراسیون به سلول‌های باکتری مستعد شده *E. coli* سویه DH5α انتقال داده شد. باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط کشت LB واجد آنتی‌بیوتیک گزینشگر آمپی‌سیلین (۵۰ mg/l) بصورت شبانه و در دمای ۳۷ °C کشت و غربال شدند. استخراج پلاسمید از پرگنه‌های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

جدول ۱. آغازگرهای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز.

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



(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 درماسپتین 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: نئومایسین 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 نوترکیب متشکل از سیگنال پپتید (SP)، توالی کد کننده دمین اتصال به کیتین (CBD)، توالی لینکر و توالی کد کننده پپتید درماسپتین B1 و Osc: خاتمه دهنده اکتوپین سنتاز

بـــه‌منظور همسانه‌ســـازی ســـامانه در ناقـــل بیـــانی، پلاســـمیدهای pGSA1285 و ناقـل PCR/CBD-DermB1 بصورت جداگانه با آنزیم‌هـای *Nco*I و *BamH*I بـرش داده شدند. قطعات مورد نظر حاصل از هضم آنزیمی از روی ژل آگـارز ۱/۵ درصـد خالص‌سـازی شـدند، سـپس قطعـات DNAی CBD-DermB1 و قطعه ژنی با استفاده از آنـزیم T4 Ligase طی واکنش هم جوشی به ناقـل خطـی شـده pGSA1285 وارد شد. پلاسـمید نوترکیـب بـا اسـتفاده از روش شوک حرارتی بـه سـلول‌های مسـتعد شـده *E. coli* انتقال داده شد. همسانه‌سازی با اسـتفاده از واکـنش PCR روی کلونی‌هـای رشـد یافتـه در محـیط کشـت حـاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکـل (۳۰ mg/l) و هضـم آنزیمـی بـر روی پلاسمیدها استخراج شده مورد تأیید قرار گرفـت. در نهایـت ایـن ناقـل بـه عنـوان pGSA/CBD-DermB1 نامگـذاری (شـکل۱، ب) و بـا روش الکتروپوراسـیون بـه سـلول‌های مسـتعد شـده اگروبـاکتریوم رایزوژنـز سـویه ATCC15834 منتقل شد. صـحت تـوالی همسـانه سـازی شده در ناقل بیانی با ارسال نمونه پلاسمیدی بـرای تـوالی یابی، مورد تأیید قرار گرفت.

مواد گیاهی

بـذور توتـون (*N. tabacum*) رقـم Xanthi از مرکـز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش (اسـتان گرگـان) تهیـه شد. ابتدا مقـدار ۵۰۰ mg بـذر توتـون بـه لولـه اپنـدورف انتقال و به‌مدت ۳۰-۶۰ ثانیه با اتانـل ۷۰ درصـد بصـورت سطحی ضد عفونی شد. در مرحله بعد به‌مـدت ۱۰ دقیقـه در ۱۴۰۰ µl محلول شـامل ۴۵۰ µl سـدیم هیپوکلریـد ۵ درصـد، یـک قطـره 10% Triton X-100 و ۹۵۰ µl آب مقطر استریل غوطه ور و همراه با تکان ضـدعفونی شـدند. بعد از چندین مرتبه شستشو با آب مقطر اسـتریل، بـذرها بر روی کاغذ صافی قرار داده شدند تا کاملاً خشک شـوند. کشت بذور درون شیشه‌های حاوی محیط کشت پایه MS حـاوی ۳ درصـد سـاکارز و ۰/۸ درصـد آگـار (pH= ۵/۸) (۲۰) صورت گرفت و شیشه‌ها به اتـاق کشـت بـا شـرایط دمای ۲۵ °C و با دوره نـوری ۱۶ سـاعت نـور و ۸ سـاعت تاریکی منتقل شدند.

تراریزش ژنتیکی توتون با *A. rhizogenes*

بـه‌منظور ترانسفورماسـیون ژنتیکـی توتـون، ابتـدا *آگروبـاکتریوم رایزوژنـز* (سـویه ATCC15834) دارای پلاسمیدpGSA-CBD-DerB1 در محیط کشت LB مایع (۱۰ g/l تریپتـون، ۵ g/l عصـاره مخمـر و ۱۰ g/l سـدیم کلریـد) حـاوی آنتی‌بیوتیـک ریفامپسـین (۵۰ mg/l) و کلرامفنیکل (۳۰ mg/l) کشت شدند و به‌مدت ۴۸ سـاعت در دمای ۲۸ °C و در شـرایط تـاریکی درون یـک شـیکر-انکوباتور با سـرعت ۱۲۰ دور در دقیقـه قـرار داده شـدند. کشـت‌های بـاکتری (OD۶۰۰=۱) توسـط سـانتریفوژ، بـا سـرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقـه به‌مـدت ۱۰ دقیقـه (۴ °C) رسوب‌گذاری شدند. پس از حذف روشناور، رسوب باکتری در محیط MS مایع تازه حل گردید. سپس سوسپانسـیون به مدت ۴ ساعت، با تکان آرام در دمای اتاق قرار داده شد تا به OD۶۰۰=۱ برسد و آمـاده تلقـیح شـود. جهـت تهیـه ریزنمونه از بـرگ‌هـای گیاهچـه‌های ۸-۶ هفتـه‌ای توتـون استفاده گردید. ریزنمونه‌ها (در ابعاد یک سانتی‌متر مربـع) برش و درون مایع تلقـیح بـاکتری *آگروبـاکتریوم رایزوژنـز* منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شدند.

برگ‌های آلوده به بـاکتری روی کاغـذ صـافی سـترون خشک شدند، سپس بر روی محیط هم‌کشتی حـاوی MS بدون تنظیم کننـده رشـد و آنتـی‌بیوتیـک در تـاریکی در دمای ۲۵ °C قرار داده شدند. بعـد از گذشـت ۳ روز، ریـز نمونـه‌ها بـه محـیط کشـت انتخـابی حـاوی MS پایـه، آنتی‌بیوتیک‌هـای کانامایسـین (۵۰ mg/l) و سفوتاکسـیم (۳۰۰ mg/l)، به ترتیب جهت گـزینش ریشـه‌های مـوئین تراریختـه و حـذف بـاکتری، منتقـل شـدند و تـا ظهـور ریشه‌های موئین هر ۲ هفته یـک بـار در محـیط انتخـابی واکشت شدند. بعد از تشکیل ریشه‌های موئین اولیه (طول

تقریبی cm ۵-۴)، 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 واکشت شدند. ریشه‌های موئین شاهد (WT) نیز به‌وسیله تلقیح ریزنمونه‌های برگی با *آگروباکتریوم رایزوژنز* (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 نوترکیب 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 *rol*B، *rol*A و *rol*C بررسی نمود. در این پژوهش از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C برای تأیید القای ریشه موئین استفاده شد (جدول ۱). ترکیبات واکنش PCR شامل ۵/۲ µl بافر کامل (۱۰x)، ۰/۵ µl (۱۰۰mM) dNTP، ۷۵/۰ µl هرکدام از آغازگرهای رفت و برگشتی (۱۰ pm)، ۳/۰ µl آنزیم Taq DNA polymerase (۵u/µl) و مقدار ۲ µl DNA (۴۰ ng/µl) الگو بود که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ µl رسانده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با یک چرخه واسرشت سازی اولیه (۹۴°C) به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی (۹۴ °C) به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر به رشته الگو به‌مدت ۴۵ ثانیه (۵۳ و ۵۸ °C)، تکثیر DNA الگو به‌مدت ۶۰ ثانیه (۷۲ °C) و یک چرخه تکثیر نهایی (۷۲°C) به‌مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

برای تأیید و بررسی بیان سامانه نوترکیب CBD-DerB1، استخراج RNA و سپس سنتز cDNA صورت 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 rRNA 18S 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 µl 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) (۵۰mM 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 ۴ °C و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. روشناور 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 ۲۰- °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.

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 µg/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 µg/ml بود سریال رقت‌های بعدی تهیه شد. یک چاهک به‌عنوان کنترل منفی حاوی ترکیب محیط کشت و پروتئین و یک چاهک به‌عنوان کنترل مثبت حاوی محیط کشت، در نظر گرفته شد. سپس به همه چاهک‌ها مقدار ۵ µl از سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک‌فارلند (دارای $۱/۵\times۱۰^{۸}$ سلول) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °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 (۲۵،۲۴). 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 $OD_{600}nm=۰/۴$ برسد. مقدار ۶۰ µl از کشت تازه باکتری به ۶۰ ml محیط کشت LB اتوکلاو 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 µg/ml از پروتئین استخراج شده به دیسک‌ها اضافه شد. برای رشد باکتری، پتری دیش‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ °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

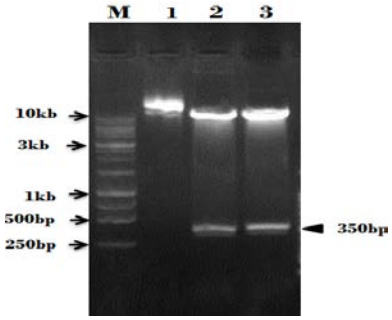
صحت همسانه‌سازی سامانه ژنی CBD-DermB1 در ناقل بیانی pGSA1285 با واکنش PCR و هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های NcoI و BamHI تأیید شد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، هضم ناقل pGSA/CBD-DermB1 منجر به تولید دو قطعه DNA شده است و قطعه‌ای به طول حدود ۳۵۰ جفت باز مطابق با انتظار با طول قطعه‌ی یکسان بود؛ بنابراین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

تأیید ریشه‌های موئین تراریخته

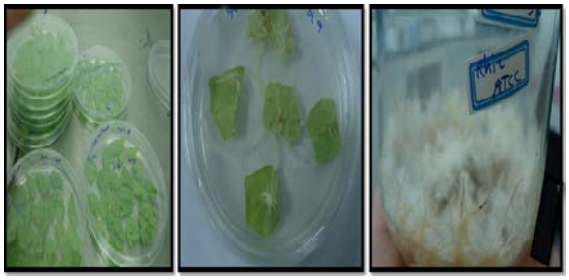
ریشه‌های موئین در حدود ۱۰ روز بعد از انتقال به محیط حاوی آنتی‌بیوتیک بر روی ریزنمونه‌های تلقیح

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 ۵-۴ 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 واکشت شدند و توده‌ای در هم تنیده از ریشه‌های ریز تشکیل دادند.

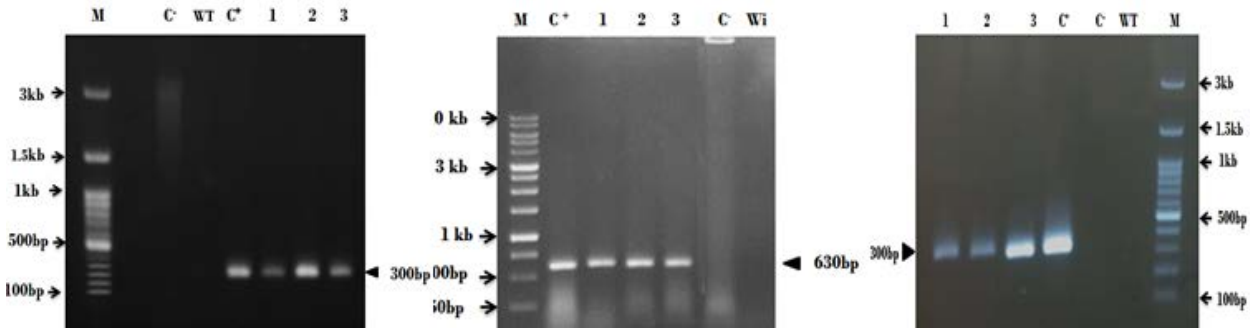
برای اثبات انتقال ژنتیکی و تأیید نسخه‌برداری از سامانه ژنی به ترتیب از روش‌های PCR و RT-PCR استفاده شد که نتایج آن در شکل ۴ نمایش داده شده است. حضور ژن‌های درماسپتین B1 و *rolC* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بر روی DNA استخراج شده از ریشه‌های موئین به ظاهر تراریخت به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به تأیید رسید. مشاهده قطعه‌ای به طول حدود ۳۰۰ جفت باز نشان داد که سامانه ژنی نوترکیب 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 رایزوژنز 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 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 kb ۱، چاهک ۱: پلاسمید بدون هضم آنزیمی و چاهک‌های ۲ و ۳ کلنی‌های نوترکیب 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



(ج) (ب) (الف)

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 rolC . (الف) الکتروفورز محصول PCR روی DNA ژنومی و مشاهده قطعه مورد انتظار در حدود bp ۳۰۰، (ب) نتایج آنالیز PCR تأیید تراریختی با استفاده از آغازگرهای ژن rolC و مشاهده قطعه مورد انتظار در حدود bp ۶۳۰ و (ج) الکتروفورز محصول RT-PCR و تأیید بیان ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی روی cDNA و مشاهده باند bp ۳۰۰ مورد انتظار. چاهک M: نشانگر مولکولی 100bp یا ۱ 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

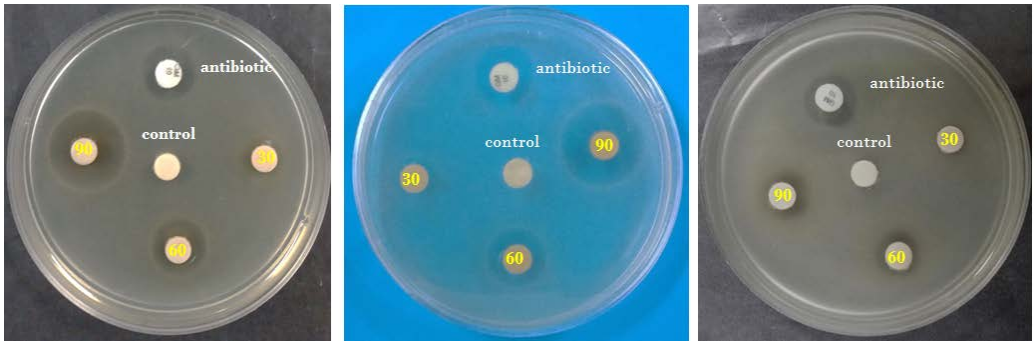
حداقل غلظت مهار کننده

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 اشریشیاکلی با غلظت µ ۹۰g/ml بود. مقدار MIC ثبت شده برای هر دو باکتری گرم مثبت انتروکوک غلظت µ ۴۵g/ml عصاره پروتئینی بود. با توجه به این نتایج مشخص شد که مقدار غلظت بیشتری از پروتئین برای مهار باکتری گرم منفی اشریشیاکلی در مقایسه با دو باکتری *E. faecalis* و *E. faecium* 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 درماسپتین نوترکیب در ریشه‌های موئین توتون تراریخت

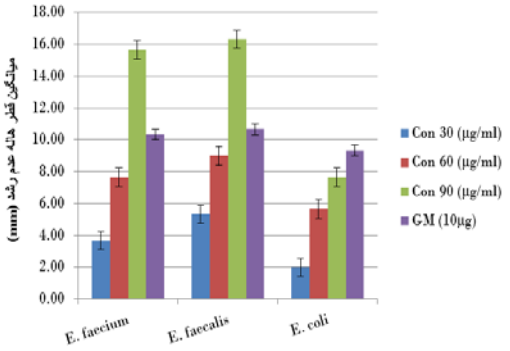
آزمایش بررسی فعالیت ضد میکروبی پپتید درماسپتین نوترکیب بصورت فاکتوریل، بر اساس طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام گرفت. آنالیز تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثر ضد میکروبی عصاره پروتئین استخراج شده از ریشه‌های موئین روی باکتری‌ها نشان داد که به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف عصاره پروتئینی بر روی سه باکتری مورد آزمایش وجود دارد (P<۰/۰۵). 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 نوترکیب µ ۳۰g/ml، دارای اثر بازدارندگی کمتری نسبت به غلظت‌های بالاتر بود و با افزایش غلظت، اثر مهارکنندگی بیشتر و در نتیجه هاله‌های عدم رشد

بزرگتری مشاهده شد. در تیمار ۳۰µg/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 ۹۰µg/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 ۹۰µg/ml بزرگتر از دو غلظت دیگر بود. از بین غلظت‌های پروتئین استفاده شده برای سه باکتری، قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *E.faecalis* و *E. faecium* در غلظت ۹۰µg/ml نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ۱۰µg (کنترل مثبت) بیشتر و 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 ۹۰µg/ml با بیشترین حساسیت و *E. coli* با قطر هاله عدم رشد ۲ mm در غلظت ۳۰µg/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.



(الف) (ب) (ج)

شکل ۵. آزمایش ضد میکروبی عصاره پروتئین حاوی پروتئین نوترکیب 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 µg/ml اضافه شده به هر دیسک. از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰µg) به عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی ۹۰µg/ml از عصاره پروتئین ریشه موئین غیر تراریخت به عنوان شاهد منفی (control) استفاده شد.



نمودار ۱. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شده در نتیجه غلظت‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰µg/ml عصاره پروتئین حاوی پروتئین درماسپتین نوترکیب روی سه نوع باکتری E. faecium، E. faecalis و E. coli. GM: جنتامایسین (۱۰µ) به عنوان کنترل مثبت، مقدار ۹۰µg/ml عصاره پروتئینی ریشه موئین غیر تراریخت به عنوان کنترل منفی. میله بار بالای هر ستون نشان دهنده خطای معیار می‌باشد.

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).

سیستم کشت ریشه موئین یک پلتفورم ارزشمند، کارآمد، ساده و کم هزینه برای تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب ایجاد نموده است و امکان تجزیه و تحلیل ساختاری و عملکردی پروتئین‌های نوترکیب 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 نوترکیب 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 نوترکیب تولید شده علیه باکتری‌های پاتوژن چندمقاومتی گرم مثبت و منفی شامل *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus pyogenes*، *E. coli*، *Acinetobacter bauman* و سویه‌های *Enterococcus* 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 نوترکیب، 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 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 درماسپتن (به نام MsrA2) و تمپورین A سنتتیک استفاده کردند. نتایج نشان داد که پاتوژن‌های قارچی و باکتری مورد مطالعه به غلظت‌های میکرومولار (بین ۲/۵ تا ۲۵ Mμ) 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 درماسپتین نوترکیب روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی بود. درماسپتین 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

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

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 کاهشی 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 درماسپتین به تخریب پروتئازهای پاتوژن و میزبان مقاوم است، به‌طوری‌که انکوباسیون طولانی‌مدت 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 درماسپتین علیه پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی مختلف به اثبات رسیده است (۳۰،۲۷،۱۹)، اما طبق بررسی‌های انجام شده، تاکنون گزارشی در زمینه تولید پروتئین فیوژن درماسپتین در سیستم کشت ریشه‌های موئین صورت نگرفته است. همانگونه که ملاحظه گردید تولید پپتید درماسپتین نوترکیب در ریشه موئین توتون به تأیید رسید و به‌خوبی 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 نوترکیب AMPs طی فرآیند دستوری و ترانسفورماسیون ژنتیکی، اطلاعات با ارزش که پیش نیازی برای اطمینان از انجام آزمایشات هدفمند انتقال ژنتیکی دائم در جهت توسعه مقاومت گیاهان زراعی به فیتوپاتوژن‌هاست را فراهم نمود. همچنان که عنوان شد علیرغم فعالیت قوی درماسپتین بر روی غشای باکتری، این پپتید تأثیر بر روی اریتروسیت‌ها یا سایر سلول‌های پستانداران ندارند (۳۱). بنابراین درماسپتین 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.

References

1. Ma JK, Drake PM, Christou P. The productionof recombinant pharmace utical proteins plants. Nature Rev Genet. 2003; 4(10): 794-805.
2. Schaèfer 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 tobacum* 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 Undangewandte Genetik. 2005; 111(4): 711-722.
20. Murasnige T, Skoog F.A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Agsays with Tohaoco 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 Z[1], Nazarian Firouzabadi F [*2], Ismaili A[3], Darvishnia M[4]

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.