

استخراج و خالص‌سازی پپتید ضد میکروبی جدید از گیاه عناب (*Ziziphus Jujuba*)

فاطمه دانشمند

تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۴

چکیده

در این مطالعه، یک پپتید ضد باکتریایی و ضد قارچی جدید با نام Snakin-Z از میوه عناب با استفاده از ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالای فاز معکوس (RP-HPLC)، خالص‌سازی گردید. این پپتید از ۳۱ آمینواسید تشکیل شده است و توالی آن عبارت است از: CARLNCVPGKTSNGNTETPCYASLHSCRKYG. وزن مولکولی این پپتید ۳۳۰۸/۸۲۳ دالتون می‌باشد. هم‌ردیفی این پپتید با پپتیدهای ضد میکروبی موجود در داده پایگاه ضد میکروبی نشان داد که این پپتید بیشترین شباهت را به Snakin-2 دارد؛ ولی این پپتید با هیچیک از پپتیدهای کشف شده همسانی کامل ندارد. مطالعات نشان داد که Snakin-Z دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت و همچنین قارچها است. حداقل غلظت مهارتی این پپتید برای فعالیت ضد میکروبی بسیار مناسب است. این پپتید بیشترین فعالیت را بر روی قارچ *Candida albicans* دارد، به گونه‌ای که حداقل غلظت مهارتی آن برای این قارچ، ۸/۲۳ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد. در بین سویه‌های باکتریایی، *Staphylococcus aureus* مقاومت بیشتری را به عملکرد این پپتید نشان می‌دهد و حداقل غلظت مهارتی برای این سویه، ۲۸/۸ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد. سلولهای خونی انسان به خوبی این پپتید را تحمل می‌کنند و این پپتید در هیچ غلظتی از خود فعالیت همولیزی نشان نمی‌دهد. به دلیل فعالیت ضد میکروبی مؤثر این پپتید بر روی پاتوژنهای مختلف، به نظر می‌رسد که این پپتید، نامزد مناسبی برای کاربردهای درمانی در آینده باشد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، میوه عناب، ژل فیلتراسیون، MIC, RP-HPLC

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۵۲۶۲۳۲۸۰۰، پست الکترونیکی: f.daneshmand@yahoo.com

مقدمه

شده است که بسیاری از ارگانیسرها از این پپتیدها به عنوان بخشی از سیستم دفاعی اولیه در مقابل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا استفاده می‌کنند (۱۴ و ۴۵). گیاهان نیز از این قاعده مستثنی نبوده و می‌توانند با ترشح و تولید پپتیدهای ضد میکروبی در مقابل پاتوژنهای بیماری‌زا مقاومت کنند. بر روی کره زمین در حدود ۵۰۰۰۰۰-۲۵۰۰۰۰ گونه گیاهی وجود دارد (۴). برخی از این گیاهان، بخشی از زنجیره غذایی حیوانات و انسان را تشکیل می‌دهند، در حالی که بسیاری از آنها در اهداف درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۷). در سالهای اخیر، تحقیق بر روی گیاهان دارویی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. پپتیدهای ضد

بیماریهای باکتریایی و قارچی سالانه باعث مرگ و میر بسیار زیادی می‌گردد (۴۷). ظهور باکتریها و قارچهای مقاوم به انواع آنتی‌بیوتیکها، ضرورت تحقیق و معرفی انواع جدیدی از ترکیبات ضد میکروبی را افزایش داده است. در بین انواع ترکیبات معرفی شده در این زمینه، پپتیدهای ضد میکروبی، جایگزین‌های بسیار مناسبی برای داروهای آنتی‌بیوتیکی سنتی هستند (۴۶). پپتیدهای ضد میکروبی توسط طیف وسیعی از جانداران بیان می‌شوند و به عنوان یک سیستم دفاعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این پپتیدها ساختاری کوچک و طیف گسترده و وسیعی از فعالیت ضد میکروبی را دارا هستند (۴۷ و ۴۸). مشخص

سپس در درون یک هاون چینی به طور کامل ساییده شد و در نهایت یک محلول کاملاً هموزن به دست آمد. ترکیبات اضافی توسط سانتریفیوژ (مدل Bandelin Germany) حذف گردید و محلول توسط کاغذ صافی، صاف شد. در ادامه برای به دست آوردن عصاره پروتئینی، محلول حاصل از مرحله قبل توسط شیب غلظتی ۰ تا ۸۵ درصد آمونیوم سولفات و مطابق با استانداردهای موجود، رسوب دهی گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با شیب ملایم نمک اشباع گردید. تحت این شرایط، پروتئین‌های موجود در عصاره گیاهی در محلول به صورت ذرات کلوئیدی در محلول در می‌آید. رسوب حاصل که مجموعه‌ای از پروتئین‌های کوچک و بزرگ است، توسط سانتریفیوژ مجدد (دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه) جمع‌آوری گردید و در بافر فسفات ۵ میلی مولار با pH=6.8 حل شد. برای جدا سازی ترکیبات پپتیدی با وزن کوچک، عصاره پروتئینی حاصل، از غشای ۱۰ کیلو دالتون اولترافیلتراسیون (Amicon, US) عبور داده شد. سپس عصاره فیلتر شده توسط غشای ۱ کیلو دالتون تغلیظ گردید و در نهایت توسط فریز درایر (مدل CPERCN) و نیتروژن مایع به صورت پودر درآمد (۶).

جداسازی و خالص سازی پپتید: برای خالص سازی، پودر حاصل از مرحله قبل در ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات (0.1 M, pH 6.0 + 5mM EDTA) حل گردید. سپس نمونه بر روی ستون ژل فیلتراسیون Sephadex G-50 تزریق گردید و ستون توسط بافر فسفات (1 M, pH 6.0) به تعادل رسید. شستشوی ستون با همان بافر مذکور انجام شد. جذب نمونه‌های جدا شده از ستون توسط دستگاه جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر بررسی گردید و سپس بر طبق جذب در ۲۸۰ نانومتر، فراکشن‌ها جمع‌آوری و خشک گردید. برای خالص سازی بیشتر نمونه‌ها، پیکهای حاصل از ژل فیلتراسیون که دارای اثر ضد میکروبی بودند، در حداقل حجم ممکن از آب دیو نیزه حل شد و روی ستونهای فاز معکوس (مدل KNAUER) دستگاه

میکروبی مختلفی مانند MiAMP2c, thionin, Defensins, viscotoxins و غیره از انواع مختلفی از گیاهان خالص سازی گردیده و اثرات متنوعی از آنها گزارش شده است (۲۳، ۲۴، ۳۵ و ۳۸). گیاه عناب با نام علمی *Zizyphus jujuba* درختی است که بلندی آن به ۲ تا ۸ متر و گاهی تا ۱۲ متر هم می‌رسد (۴۴). میوه عناب خوراکی است و دارای خواص دارویی است. از عناب به عنوان پاد زهر، زیاد کننده ادرار، داروی ملین و خلط آور استفاده می‌شود. میوه‌های خشک شده عناب آرام‌بخش، ضد سرطان، تب بر، مسکن، اشتها آور، بند آورنده خون و مقوی هستند (۱، ۲ و ۱۵). در داروهای چینی، این میوه به عنوان ماده‌ای مقوی در فعال ساختن جگر استفاده می‌شود. خاصیت دارویی این گیاه در مقابله با عفونتها در طب سنتی جایگاه ویژه‌ای دارد (۵ و ۱۹). در طب سنتی ایران نیز از عناب در درمان بیماریهای عفونی و همچنین سرماخوردگی بسیار استفاده می‌شود (۳۰).

مشکل ایجاد مقاومت دارویی در مقابل انواع آنتی بیوتیک‌های رایج امروزی، یک مشکل اساسی در زمینه درمان عفونتها می‌باشد. امروزه تحقیق در زمینه پپتیدهای ضد میکروبی به یک عرصه فعال بدل شده است و این مواد نقش مؤثری در مقابله با میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا دارند. از این رو هدف این مطالعه معرفی ترکیبات پپتیدی جدید با اثرات ضد میکروبی می‌باشد. با توجه به خواص ضد میکروبی منحصر به فرد گیاه عناب و جایگاه ویژه آن در طب سنتی بسیاری از کشورها، در این مطالعه با استفاده از تکنیک‌های بیوشیمیایی و مراحل خالص سازی متنوع، پپتیدی جدید با اثرات بیولوژیکی مناسب استخراج و در مراحل بعدی اثرات بیولوژیکی این ماده با استفاده از باکتریها و قارچها بررسی می‌گردد.

مواد و روشها

عصاره گیری و رسوب دهی پروتئینها: برای به دست آوردن عصاره پروتئینی، میوه عناب در آب خیسانده شد و

سنجش اولیه فعالیت ضد میکروبی: اثرات ضد میکروبی پپتیدهای جمع‌آوری شده توسط روش نشر شعاعی (RDA)، مورد بررسی قرار گرفت (۱۸). مقدار 4×10^6 CFU باکتری با ۱۰ میلی لیتر محیط کشت (مشمول بر ۰/۳ درصد TSB و ۱ درصد آگارز) مخلوط گردید و در درون پلیت کشت ریخته شد. با استفاده از پانچر سوراخهایی در محیط کشت ایجاد گردید و نمونه‌های مورد آزمایش در درون چاهکهای ایجاد شده ریخته شد و پلیت به مدت ۳ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از طی این مدت، محیط کشت ثانویه که شامل ۶ درصد TSB و ۱ درصد آگارز بود روی محیط اولیه ریخته شد و پلیت به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت توسط محلول رنگ آمیزی (۱۵ میلی لیتر فرمالدهید ۳۷ درصد، ۲۷ میلی لیتر متانول، ۶۳ میلی لیتر آب و ۲ میلی گرم کوماسی بلو)، رنگ آمیزی شد. پلیت در ادامه به مدت ده دقیقه توسط استیک اسید ۱۰ درصد و دی متیل سولفوکسید ۲ درصد رنگ زدایی شد. فعالیت ضد قارچی عصاره گیاهی و پپتیدهای خالص شده بر روی دو قارچ *Candida albicans* و *Aspergillus niger* بررسی شد. ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون قارچی درون ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت (PDA) Potato dextrose agar تزریق گردید و درون پلیت کشت ریخته شد. با استفاده از پانچر سوراخهایی در درون محیط کشت ایجاد گردید و نمونه‌های مورد آزمایش در این سوراخها ریخته شد. سپس پلیتها به مدت ۷ روز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و پس از طی این مدت، نتایج ثبت گردید (۶). فعالی ضد قارچی نمونه‌ها بر روی دو پاتوژن گیاهی (*Phomopsis azadirachtae* و *Pythium ultimum*) نیز بررسی شد (۹).

تعیین فعالیت ضد میکروبی پپتیدها به صورت کمی: برای تعیین فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای خالص شده به

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (مدل Macherey Nagel GmbH) تزریق شد که مقدار تزریق روی ستون در هر بار ۴۰۰ میکرو لیتر بود. شستشوی ستون توسط محلول A (0.1% TFA in water) انجام شد و در یک بازه زمانی ۷۰ دقیقه با استفاده از اضافه شدن مرحله‌ای محلول B (0.098% TFA in acetonitrile) شیب غلظتی ۵-۶۵ درصد ایجاد گردید تا نمونه‌ها بر اساس میزان هیدرودینامیک از ستون جدا شوند. مطابق با جذب در ۲۲۰ نانومتر، فر اکشنها جمع‌آوری و خشک شد. برای ارزیابی خلوص پپتیدها، مقدار کمی از هر پیک بر روی ستون آنالیتیکال C18 مورد بررسی قرار گرفت. هر فر اکشن از نظر فعالیت ضد میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت (۳).

ارزیابی الگوی الکتروفورزی: آنالیز الگوی الکتروفورزی عصاره خام و پپتیدهای خالص شده با استفاده از Tricine-SDS-PAGE انجام شد (۳۴). از ژل استاکینگ ۶/۵ درصد و یک ژل دو قسمتی جدا کننده ۱۰ و ۱۵ درصد برای بررسی الگوی الکتروفورزی استفاده شد. بعد از اتمام کار، ژل توسط رنگ آمیزی نترات نقره، رنگ آمیزی گردید.

تعیین توالی پپتیدها: تعیین توالی پپتیدهای خالص شده توسط اسپکتروسکوپی جرمی و با استفاده از روش MALDI-TOF/TOF، در دانشگاه York انگلیس انجام شد و اطلاعات مربوط به توالی مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز فیلوژنتیکی: توالی مربوط به پپتید حاصل با توالی پپتیدهای ضد میکروبی که تاکنون کشف شده و در داده پایگاه پپتیدهای ضد میکروبی (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) به ثبت رسیده است، با استفاده از برنامه بلاست، هم ارزی گردید. سپس از روی این هم ارزی، با استفاده از نرم افزار CLC main workbench یک درخت فیلوژنتیکی بین این توالیها ترسیم شد و بدین ترتیب جایگاه این پپتید در بین سایر پپتیدهای موجود در داده پایگاه مشخص شد.

PTCC4533 و قارچ‌های *Phomopsis azadirachtae*، *Candida albicans* و *Aspergillus niger*، *Pythium ultimum* برای اندازه‌گیری MIC استفاده شد. تمامی سنجش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام گردید.

سنجش فعالیت همولیزی: برای سنجش فعالیت همولیزی، ۵ میلی لیتر از خون تازه انسان به درون یک لوله هپارینه ریخته شد. سپس این نمونه خونی به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۵۰۰ سانتریفیوژ گردید تا سلولهای قرمز خون جدا شود و سپس رسوب حاصل پنج بار با استفاده از ۴ میلی لیتر بافر فسفات سالیین (PBS) شسته شد و بار دیگر در دور ۴۵۰۰ سانتریفیوژ گردید تا محلول رویی کاملاً شفاف شود. در آخرین مرحله از خالص سازی، سلولهای قرمز خون توسط ۲۰ میلی لیتر بافر PBS رقیق گردید. برای سنجش همولیز، ۱۰ میکرو لیتر از سریال غلظتی پیتیداها که در بخش قبل آماده شد به لوله‌های میکروفیوژ که شامل ۱۹۰ میکرو لیتر سلولهای خونی رقیق شده بود، اضافه گردید. میکروفیوژها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ برداشته شد و با PBS رقیق گردید تا حجم نهایی به ۱ میلی لیتر برسد. جذب لوله‌ها در طول موج ۵۶۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. از تریتون X-100 (۱ درصد) که باعث لیز شدن کامل سلولهای قرمز خون می‌شود، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۸). نتایج با نمونه کنترل مقایسه گردید.

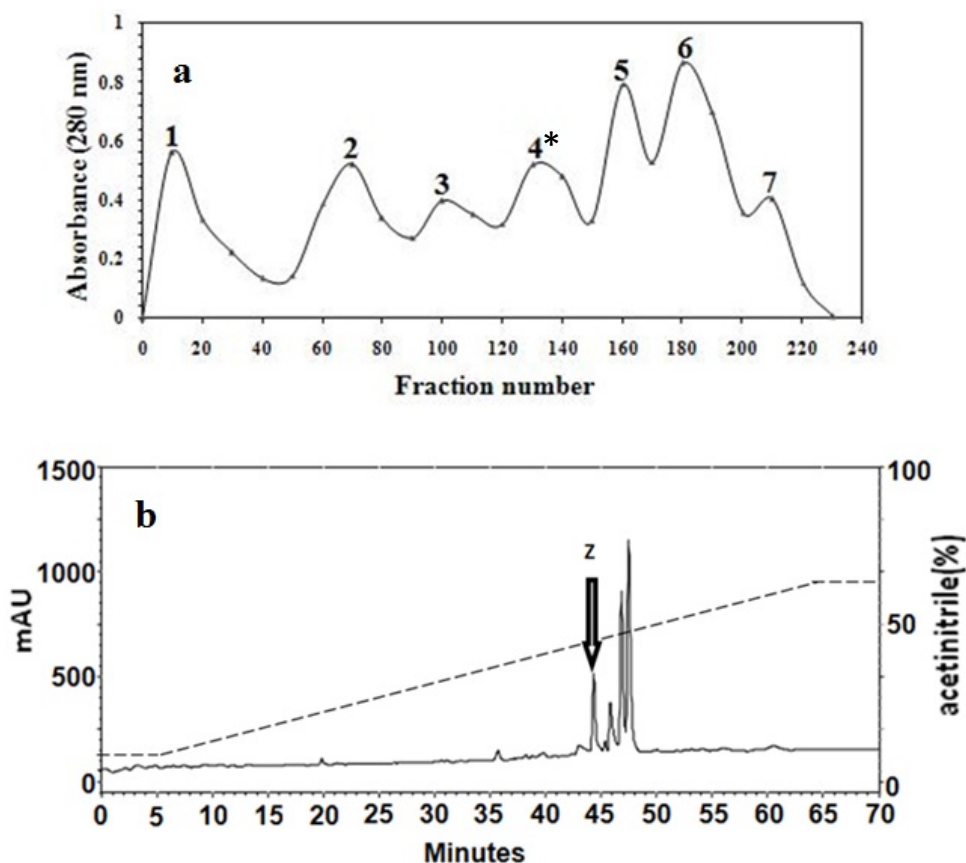
نتایج

خالص سازی و سنجش فعالیت ضد میکروبی: همان‌گونه که در شکل 1a نشان داده شده است، پیک عمده از ستون Sephadex G-50 جمع‌آوری گردید و سنجش فعالیت ضد میکروبی نشان داد که پیک ۴ دارای فعالیت ضد میکروبی بسیار گسترده علیه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی و همچنین قارچها می‌باشد. برای خالص سازی بیشتر، این

صورت کمی، حداقل غلظت مهار (MIC) مربوط به پیتیداها تعیین شد. پیتید وزن شد و غلظتی معادل mg/ml ۰/۶ ساخته شد. پیتید در بافر PBS که حل شد. سپس از این غلظت با رقیق سازی غلظتهای mg/ml ۰/۳ ، mg/ml ۰/۱۵ ، mg/ml ۰/۰۳۷۵ و mg/ml ۰/۰۱۸۷۵ آماده شد. تمامی باکتریها در محیط کشت مولر-هینتون برانث به مدت ۱۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد. ۱ میلی لیتر از این محیط کشت به ۹ میلی لیتر محیط کشت تازه منتقل و برای مدت ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و در نهایت غلظت باکتریها با محیط کشت تعدیل شد تا غلظت نهایی باکتریها CFU/ml 10^6 باشد ۱۰۰ میکرو لیتر از این سوسپانسیون باکتریایی با ۸۰ میکرو لیتر از محیط کشت تازه مخلوط گردید و در داخل چاهکهای میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. سپس از سریالهای رقیق پیتیداها ۲۰ میکرو لیتر برداشت شد و در درون چاهکهای اضافه گردید. بر این اساس غلظت نهایی باکتریها در هر چاهک معادل CFU/ml ۱۰۵ خواهد بود. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از این مدت، جذب چاهک‌ها در ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (مدل OPTIZEN) اندازه‌گیری شد و نتایج با نمونه کنترل مقایسه گردید. برای تعیین حداقل غلظت مهار (مدل OPTIZEN) اندازه‌گیری شد و نتایج با نمونه کنترل مقایسه گردید. برای تعیین حداقل غلظت مهار مربوط به نمونه‌های قارچی، ۱۸۰ میکرو لیتر از محیط کشت Sabouraud Dextrose Agar با ۱۰ میکرو لیتر سوسپانسیون قارچی (CFU/ml 10^6) و ۱۰ میکرو لیتر از سریال غلظتی نمونه‌ها مخلوط گردید و درون میکروپلیت ریخته شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. حداقل غلظت مهار به صورت غلظتی از پیتید تعریف شد که در آن غلظت رشد باکتری به طور کامل مهار شده بود (۱۸ و ۴۲). از دو باکتری گرم منفی *Klebsiella pneumoniae* PTCC1388 و دو باکتری گرم مثبت *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus* PTCC1431

فعالیت ضد میکروبی پیک ۱ (Z) در شکل ۲ نشان داده است. بنابراین، این پیک خشک گردید و جهت تعیین توالی توسط اسپکتروسکوپی جرمی MALDI-TOF آنالیز گردید.

پیک فعال بر روی ستون RP-HPLC تزریق گردید و در نهایت ۵ پیک از این جداسازی به دست آمد که در شکل 1b نشان داده شده است. در بین این ۵ پیک، اثر ضد میکروبی پیک ۱ در مقایسه با سایر پیکها بیشتر بود.



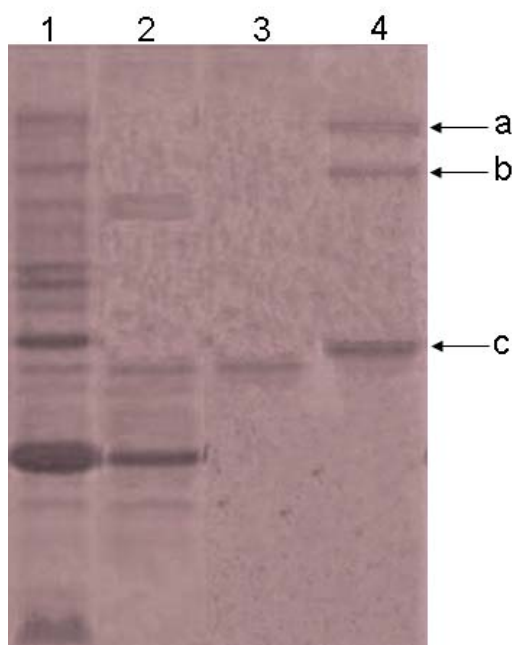
شکل ۱- جداسازی پپتید از گیاه *Zizyphus jujuba* (a): ژل فیلتراسیون عصاره گیاهی که بر روی ستون Sephadex G-50 انجام شد. (b): خالص سازی کامل پیک ۴ حاصل از ژل فیلتراسیون بر روی ستون C18 RP-HPLC. پیک فعال حاصل از ستون C18 RP-HPLC. z نام‌گذاری شده است (z؛ مخفف *Zizyphus*).

تعیین توالی پپتید و خصوصیات ساختاری: پپتید مورد نظر که با پیکان در شکل 1b نشان داده شده است، توسط اسپکتروسکوپی جرمی و توسط دانشگاه یورک تعیین توالی گردید. اطلاعات مربوط به این توالی در جدول ۱ خلاصه شده است. شکل ۴ آنالیز اسپکتروسکوپی پپتید مورد آزمایش را نشان می‌دهد. مطابق با شکل ۴ و جدول ۱، این پپتید از ۳۱ آمینواسید تشکیل شده است که توالی آن عبارت است از:

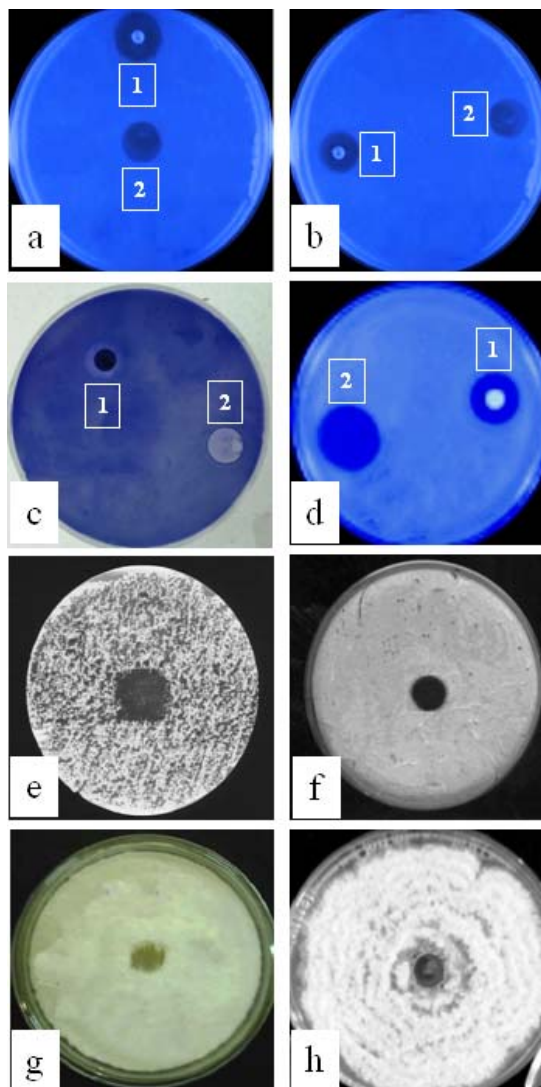
CARLNCVPKGTS GNTETPCPYASLHSCRKYG

الگوی الکتروفورزی: الگوی الکتروفورزی عصاره خام گیاهی و پپتیدهای خالص شده بر روی SDS-PAGE در شکل ۳ نشان داده شده است. بعد از طی فرآیندهای خالص سازی و مطابق با آنالیز SDS-PAGE، یک باند پروتئینی بسیار تیز با وزن مولکولی کمتر از انسولین (۵/۸ کیلو دالتون) به دست آمد. این نتیجه با نتیجه حاصل از تعیین توالی پپتید همخوانی دارد (همان‌گونه که در ادامه ذکر شده است).

طور کامل با این پپتید همولوژی ندارد. از این رو پیشنهاد شد که این پپتید، یک پپتید ضد میکروبی جدید است. آنالیز ساختاری این پپتید توسط ابزار ExPASy MW/Pi (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) نشان داد که این پپتید دارای pH ایزو الکتریک ۸/۷۶ می‌باشد.



شکل ۳- الگوی الکتروفورزی عصاره خام (۱)، فراکشن فعال (پیک ۴) حاصل از ستون ژل فیلتراسیون (۲)، پپتید خالص شده از ستون C18 RP-HPLC (۳) و مارک‌های وزنی (۴). a: تریپسینوژن (۳۳ کیلودالتون); b: لیزوزیم (۱۴ کیلودالتون); c: انسولین (۵/۸ کیلودالتون). آنالیز فیلوژنتیکی: توالی این پپتید جدید با توالی چندین پپتید ضد میکروبی که از منابع مختلف به دست آمده بود، انجام شد. نتایج در شکل ۵a نشان داده شده است. نتایج هم ارزی نشان داد که این پپتید تا حدی به پپتید ضد میکروبی Snakin-2 که از *Solanum tuberosum* به دست آمده است (۲۵)، شباهت دارد. آنالیز فیلوژنتیکی توالی آمینو اسیدی با رسم درخت فیلوژنتیکی انجام شد. این پپتید تا ۳۹/۳۹ درصد با Snakin-2 شباهت توالی دارد (شکل ۵b). بر طبق این داده‌ها، این پپتید، یک پپتید ضد میکروبی جدید است که برای اولین بار در این تحقیق معرفی شده



شکل ۲- نتایج RDA مربوط به پپتید جدید (۱) و نئومایسین (۲) در برابر (a) *E. coli* (b) *K. pneumoniae* (c) *S. aureus* (d) *C. subtilis* (e) *C. albicans* (f) *Pythium A. niger* (g) *Phomopsis azadirachtae* (h) و *Phomopsis ultimum* در هر چاهک ۵ میکروگرم نمونه تزریق گردید.

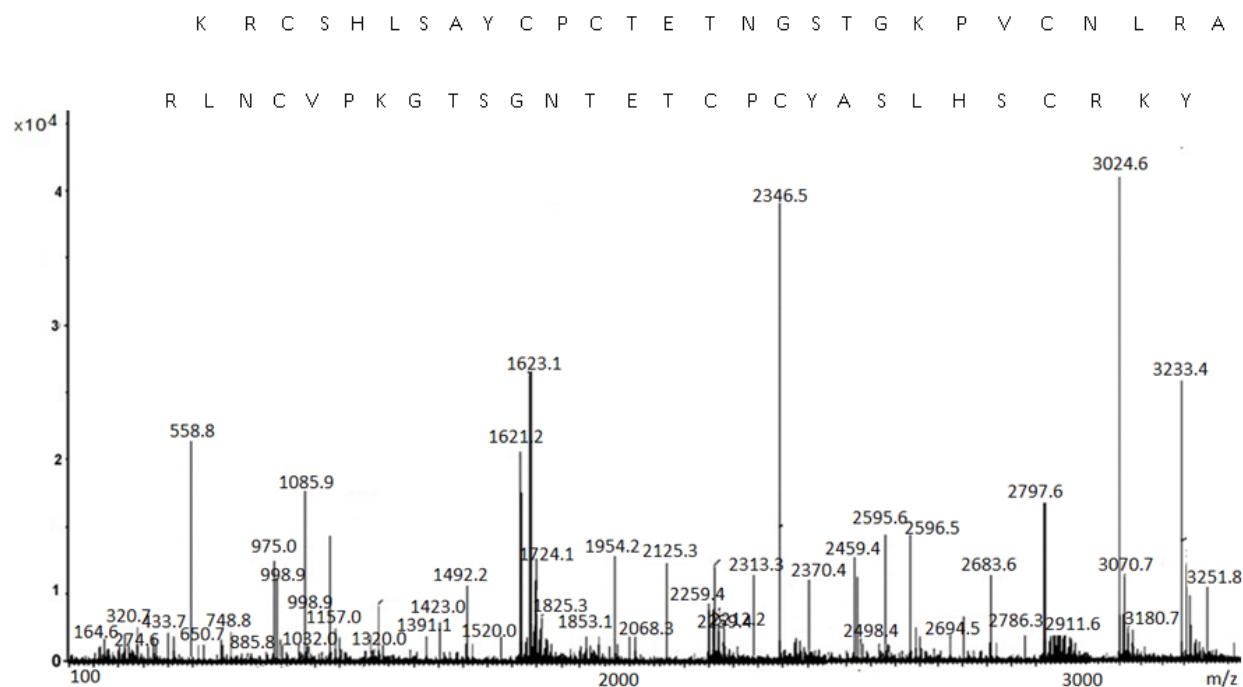
وزن مولکولی این پپتید ۳۳۰۸/۸۳ دالتون به دست آمده است که با وزن تئوری آن همسانی دارد. چندین آمینو اسید بازی در ساختار این پپتید وجود دارد که سبب شده است تا بار خالص این پپتید +۴ باشد. این حالت در بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی دیگر نیز مشاهده شده است. پپتید حاصل با پپتیدهای موجود در داده پایگاه پپتیدهای ضد میکروبی مقایسه گردید و مشخص شد که هیچ پپتیدی به

است. از این رو این پپتید جدید بر اساس سیستم نام‌گذاری پپتیدهای ضد میکروبی، Snakin-Z نام‌گذاری شد (۲۶).

جدول ۱- ساختار اولیه، وزن مولکولی و pH ایزو الکتریک پپتید خالص شده از گیاه *Zizyphus jujuba*

Peptide	Sequence	Mass(Da)	pH	Homology peptide
Z	CARLNCVPKGTS GNTETPCYASLHSCR KYG	3308.823	8.76	None found

* Z مخفف *Zizyphus* می‌باشد.

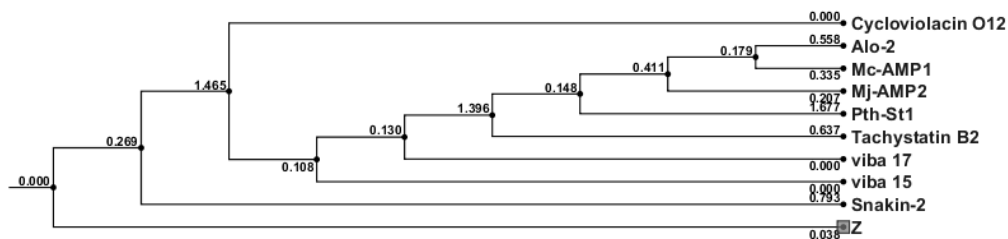
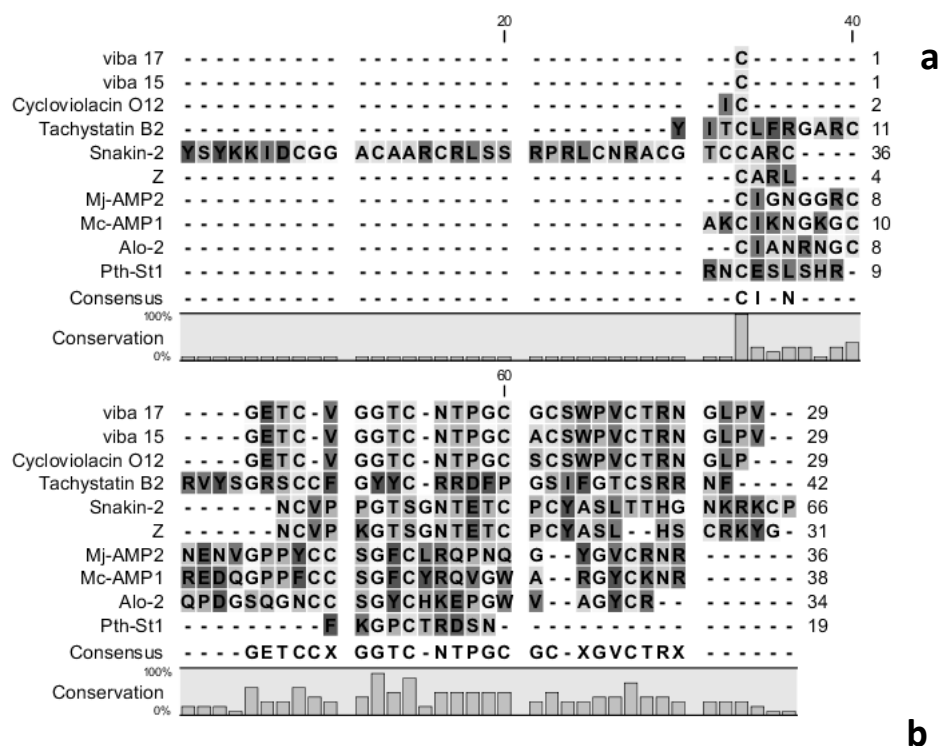


شکل ۴- تعیین وزن مولکولی و توالی آمینواسیدی پپتید جدید توسط اسپکتروسکوپی MALDI-TOF.

برابر این پپتید، باکتری *Staphylococcus aureus* بود که MIC مربوط به آن $2.8/8 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد.

سنجش فعالیت همولیزی: همان‌گونه که در شکل ۶ نشان داده است، سلولهای خونی انسان به خوبی غلظتهای متفاوت پپتید Snakin-Z را تحمل می‌کنند، به گونه‌ای که در بالاترین غلظت مورد استفاده ($100 \mu\text{g/ml}$)، هیچ‌گونه فعالیت همولیزی مشاهده نمی‌شود و در مقایسه با تریتون X-100، پپتید جدید هیچ‌گونه فعالیت همولیزی بر روی سلولهای خونی انسان نشان نمی‌دهد.

تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC): نتایج ارزشیابی کمی فعالیت ضد میکروبی پپتید Snakin-Z در جدول ۲ خلاصه شده است. نتایج نشان دهنده فعالیت ضد میکروبی بسیار مؤثر این پپتید علیه سویه‌های باکتریایی و قارچها مطالعه شده است. همان‌گونه که در جدول ۲ نشان داده است، نتایج حاصل از تست کمی به خوبی با نتایج حاصل از تست کیفی (RDA) همپوشانی دارد. بیشترین اثر ضد میکروبی پپتید جدید بر روی قارچ *Phomopsis azadirachtae* مشاهده گردید که MIC مربوط به آن $7/65 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد؛ در حالی که مقاوم‌ترین سویه در



شکل ۵- هم‌ارزی و درخت فیلوژنتیکی Snakin-Z. (a): هم‌ارزی توالی آمینواسیدی Snakin-Z با توالی سایر پپتیدهای ضد میکروبی. هم‌ارزی توسط نرم افزار CLC Main Work Bench Ver.5.5 انجام شد. (b): درخت فیلوژنتیکی Snakin-Z. توالی آمینواسیدی ۱۰ پپتید ضد میکروبی از داده پایگاه ضد میکروبی با پپتید جدید در این درخت درج شده است. نام هر توالی در انتهای شاخه نوشته شده است. طول خطوط میزان شباهت را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

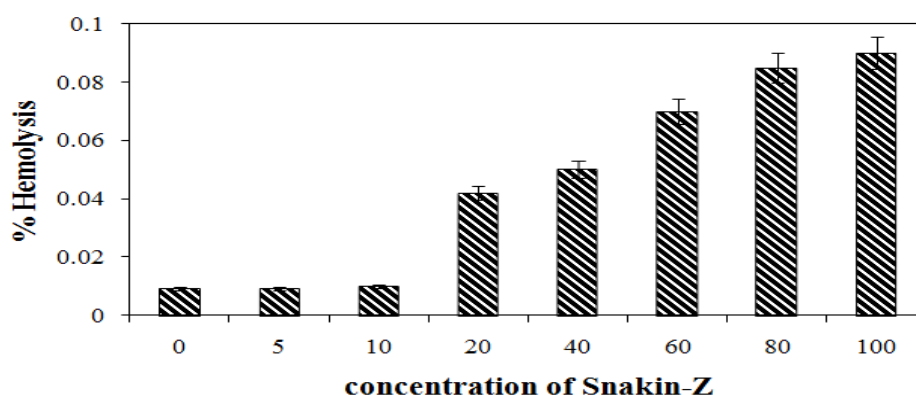
عملکردهای مختلف مثل cyclotides، پروتئینهای غنی از گلیسین، snakins و purothionin از گیاهان گزارش شده است (۱۲، ۱۷ و ۳۶). در این مطالعه، یک پپتید ضد میکروبی جدید کشف گردید که با هیچیک از پپتیدهایی که تاکنون گزارش شده است شباهت ساختاری ندارد.

پپتیدهای ضد میکروبی ابزار بسیار جالب و کارآمدی برای درمان عفونتهای باکتریایی و قارچی هستند (۱۳، ۱۶، ۲۹ و ۳۶). پپتیدهای ضد میکروبی بسیار متعددی با ساختارها و

جدول ۲- حداقل غلظت مهار پیپتید Snakin-Z بر علیه میکروبه‌های مختلف

Microorganism	MIC for natural peptide ($\mu\text{g/ml}$)*
<i>Escherichia coli</i>	13.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14.1
<i>Bacillus subtilis</i>	24.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	28.8
<i>Aspergillus niger</i>	9.3
<i>Candida albicans</i>	8.23
<i>Phomopsis azadirachtae</i>	7.65
<i>Pythium ultimum</i>	8.36

* هر آزمایش حداقل سه بار تکرار گردیده است.

شکل ۶- بررسی فعالیت همولیزی پیپتید ضد میکروبی Snakin-Z در غلظتهای مختلف (۵-۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$) (داده‌ها میانگین سه تکرار هستند).

پیپتید جدید نشان می‌دهد که این پیپتید از اعضای خانواده پیپتیدهای Snakin-2 (شبه دیفنسین‌ها) می‌باشد. بنابراین بر طبق سیستم نام‌گذاری پیپتیدها، این پیپتید Snakin-Z نامیده شد (۸، ۲۰ و ۲۱). Snakin ها برای اولین بار از گیاه *Solanum tuberosum* جداسازی و شناسایی گردیدند (۲۲ و ۲۵). Snakin-Z فعالیت ضد میکروبی بسیار گسترده‌ای را علیه باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت و همچنین قارچها نشان می‌دهد. قارچها در مقایسه با باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت، نسبت به عملکرد این پیپتید جدید حساس‌تر هستند و در این بین قارچهای بیماری‌زای گیاهی، حساسیت بیشتری را از خود نشان می‌دهند. این خصوصیت مشابه با سایر پیپتیدهای موجود در خانواده دیفنسین‌ها می‌باشد (۱۱، ۳۶ و ۴۰). Snakin-Z همانند

این پیپتید فعالیت بسیار بالایی در مهار رشد باکتریها و قارچها دارد. پیپتید جدید دارای آمینواسیدهای کاتیونیک و هیدروفوبیک است؛ همان‌گونه که این خصوصیات در سایر پیپتیدهای ضد میکروبی نیز مشاهده شده است (۱۴ و ۳۲). همان‌گونه که در شکل ۴ نشان داده شده است، با شکست پیپتید در نقاط مختلف توالی و تولید قطعات a و b و همپوشانی قطعات تولید شده و با توجه به وزن قطعات و آمینواسیدها، توالی کامل پیپتید تعیین گردید (جدول ۱). این پیپتید تا ۳۹/۳۹ درصد با پیپتید Snakin-2 (۲۵) شباهت ساختاری دارد، اما شمار آمینواسیدهای این پیپتید در مقایسه با Snakin-2 کمتر است و در بخشی از توالی نیز با این پیپتید تفاوت دارد. از این رو پیپتید این مطالعه، یک پیپتید ضد میکروبی جدید است. خصوصیات ساختار اولیه این

فعالیت ضد میکروبی علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی هستند و در موارد نادر، این پپتیدها علیه سویه‌های باکتریایی نیز فعالیت دارند (۱۹ و ۳۳). پپتید Snakin Z جزء پپتیدهای نادر حاصل از گیاهان است که علاوه بر فعالیت ضد قارچی علیه پاتوژن‌های گیاهی، دارای اثر ضد باکتریایی نیز می‌باشد. اکثریت پپتیدهای ضد میکروبی دارای فعالیت همولیز بالایی هستند و برخی دارای حداقل میزان کمی فعالیت همولیزی هستند (۳۷ و ۴۹). اما پپتید ضد میکروبی جدید معرفی شده در این مطالعه هیچ‌گونه فعالیت همولیز بر روی سلول‌های خونی انسان ندارد؛ به طوری که نشان می‌دهد این پپتید با غشای گلبول‌های قرمز خون میانکنشی ندارد. در بالاترین غلظت مورد استفاده برای سنجش فعالیت همولیزی ($100 \mu\text{g/ml}$)، این پپتید کمتر از ۰/۱ درصد از خود فعالیت همولیزی نشان می‌دهد. با توجه به خصوصیات منحصر به فرد، یعنی فعالیت ضد میکروبی بسیار بالا و عدم فعالیت همولیزی، Snakin-Z می‌تواند برای اهداف درمانی مورد استفاده قرار بگیرد. مطالعات بیشتر روی این پپتید در مدل‌های حیوانی می‌تواند این پپتید را به عنوان یک داروی جدید برای مقابله با عفونت‌ها معرفی کند.

اکثر پپتیدهای ضد میکروبی حاصل از گیاهان (۱۰، ۱۴ و ۳۹)، یک پپتید بازی و غنی از آمینواسید سیستئین است. در ساختار این پپتید ۵ آمینواسید سیستئین وجود دارد و با توجه به این امر این امکان وجود دارد که پلهای دی‌سولفیدی بین این آمینواسیدها می‌تواند باعث پایداری این پپتید شود. بر اساس متداول‌ترین مدل، مکانیسم فعالیت ضد میکروبی اکثر پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس میان‌کنش با مثبت پپتید با فسفولیپیدهای غشایی میکروب‌ها می‌باشد که سبب برهم خوردن تمامیت غشای میکروب و تخریب غشاء و در نهایت از بین رفتن آن می‌شود (۲۷، ۲۸، ۳۱، ۴۰ و ۴۳). با توجه به وجود چندین آمینواسید بازی در ساختار پپتید Snakin-Z (دو آمینواسید لیزین و دو آمینواسید آرژنین)، این پپتید در pH خنثی دارای بار خالص مثبت می‌باشد و این خصوصیت ساختاری توجیه می‌کند که این پپتید از طریق همان مکانیسم ذکر شده یعنی با میانکنش با غشاء و تخریب غشاء، سبب از بین رفتن میکروب‌ها می‌شود. پپتید جدید حاصل از این مطالعه در مقایسه با بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی موجود در داده پایگاه ضد میکروبی اثرات بیولوژیکی مؤثرتری را از خود نشان می‌دهد (۲۸، ۴۱ و ۵۰). پپتیدهای حاصل از گیاهان نشان می‌دهد که اکثر پپتیدهای حاصل از گیاهان دارای

منابع

- Al-Reza SM, Rahman A, Lee J et al. 2010. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens. *Food Chem.* 119:981-986.
- Al-Reza SM, Yoon JI, Kim HJ et al. 2010. Anti-inflammatory activity of seed essential oil from *Zizyphus jujuba*. *Food Chem Toxicol.* 48:639-643.
- Asoodeh A, Zardini HZ, Chamani J. 2010. Identification and characterization of two novel antimicrobial peptides, temporin-Ra and temporin-Rb, from skin secretions of the marsh frog (*Rana ridibunda*). *J. Pept. Sci.* 18:10-16.
- Borris R P. 1996. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J Ethnopharmacol.* 51:29-38.
- Cyong J-C, Takahashi M. 1982. Identification of guanosine 3':5'-monophosphate in the fruit of *Zizyphus jujuba*. *Phytochemistry.* 21:1871-1874.
- Daneshmand F, Zare-Zardini H, Tolueinia B, Hasani Z, Ghanbari T. 2013. Crude extract from *Zizyphus jujuba* fruits, a weapon against pediatric infectious disease. *IJPHO.* 3: 35-40
- Daniel E M. 1996. An analysis of the food plants and drug plants of native North America. *J Ethnopharmacol.* 52:1-22.
- De Lucca AJ. 2000. Antifungal peptides: potential candidates for the treatment of fungal infections. *Expert Opin. Invest. Drugs.* 9:273-299.
- De Caleyá RF, González-Pascual B, García-Olmedo F et al. 1972. Susceptibility of

- Phytopathogenic Bacteria to Wheat Purothionins In Vitro. *Appl Microbiol.* 23:998-1000.
10. Garcí-a-Olmedo F, Rodriguez-Palenzuela P, Molina A et al. 2001. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxyxynitrite in plant defence. *FEBS Lett.* 498:219-222.
 11. García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM et al. 1998. Plant defense peptides. *Peptide Science.* 47:479-491.
 12. Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO et al. 2010. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol.* 135:1-11.
 13. Hancock RE. 2000. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin. Invest. Drugs.* 9:1723-1729.
 14. Hans G B. 1991. Antibacterial peptides: Key components needed in immunity. *Cell.* 65:205-207.
 15. Hung CF, Hsu BY, Chang SC et al. 2012. Antiproliferation of melanoma cells by polysaccharide isolated from *Zizyphus jujuba*. *Nutrition.* 28:98-105.
 16. Kim SS, Shim MS, Chung J et al. 2007. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretion of *Rana dybowskii*. *Peptides.* 28:1532-1539.
 17. Kovaleva V, Kiyamova R, Cramer R et al. 2009. Purification and molecular cloning of antimicrobial peptides from Scots pine seedlings. *Peptides.* 30 (12), 2136-2143.
 18. Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SSSL et al. 1991. Ultrasensitive Assays for Endogenous Antimicrobial Polypeptides. *J Immunol Methods.* 137:167-173.
 19. Li J, Liu Y, Fan L et al. 2011. Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of *Zizyphus Jujuba* cv. Jinsixiaozao. *Carbohydr Polym.* 84:390-394.
 20. Liang J, Han Y, Li J et al. 2006. A novel bradykinin-like peptide from skin secretions of rufous-spotted torrent frog, *Amolops loloensis*. *Peptides.* 27:2683-2687.
 21. Lu Y, Li J, Yu H et al. 2006. Two families of antimicrobial peptides with multiple functions from skin of rufous-spotted torrent frog, *Amolops loloensis*. *Peptides.* 27:3085-3091.
 22. Manners J. 2009. Primitive Defence: The MiAMP1 Antimicrobial Peptide Family. *Plant Mol Biol Rep.* 27:237-242.
 23. Marcus JP, Goulter KC, Green JL et al. 1997. Purification, Characterisation and cDNA Cloning of an Antimicrobial Peptide from *Macadamia Integrifolia*. *Eur J Biochem.* 244:743-749.
 24. Mariana SC, Wagner F. 2005. Plant Defense and Antimicrobial Peptides. *Protein Peptide Lett.* 12:11-16.
 25. Moreno M, Segura A, Moreno M et al. 2002. Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection. *Plant Physiol.* 128: 951-961.
 26. Michael C. 2008. Reflections on a systematic nomenclature for antimicrobial peptides from the skins of frogs of the family Ranidae. *Peptides.* 29:1815-1819.
 27. Oard S, Enright F. 2006. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Cell Rep.* 25:561-572.
 28. Park JM, Jung JE, Lee BJ. 1995. Antimicrobial Peptide from the Skin of a Korean Frog, *Rana-Rugosa* (Vol 205, Pg 948, 1994). *Biochem Bioph Res Co.* 209:775-775.
 29. Park S, Park SH, Ahn H-C et al. 2001. Structural study of novel antimicrobial peptides, nigrocins, isolated from *Rana nigromaculata*. *FEBS Lett.* 507:95-100.
 30. Pawlowska AM, Camangi F, Bader A et al. 2009. Flavonoids of *Zizyphus jujuba* L. and *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits. *Food Chem.* 112:858-862.
 31. Pelegrini PB, Franco OL. 2005. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 37:2239-2253.
 32. Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C. 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Ag.* 24 (6), 536-547.
 33. Ribeiro SFF, Carvalho AO, Da Cunha M et al. 2007. Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: Antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon.* 50 (5), 600-611.
 34. Schagger H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc.* 1:16-22.
 35. Segura A, Moreno M, Madueño F et al. 1999. Snakin-1, a Peptide from Potato That Is Active Against Plant Pathogens. *Mol Plant-Microbe In.* 12:16-23.

36. Selitrennikoff CP. 2001. Antifungal Proteins. *Appl Environ Microb.* 67:2883-2894.
37. Suzuki. 1995. Isolation and characterization of novel antimicrobial peptides rugorsins A,B and C from the skin of the frog, *Rana rugosa*. *Biochem Biophys Res Commun.* 212:249-254.
38. Terras F, Schoofs H, De Bolle M et al. 1992. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J Biol Chem.* 267:15301-15309.
39. Thevissen K, Terras FRG, Broekaert WF. 1999. Permeabilization of Fungal Membranes by Plant Defensins Inhibits Fungal Growth. *App Environ Microb.* 65:5451-5458.
40. Tran D, Tran PA, Tang Y-Q et al. 2002. Homodimeric θ -Defensins from Rhesus macaque Leukocytes. *J Biol Chem.* 277:3079-3084.
41. Urbán E, Nagy E, Pál T et al. 2007. Activities of four frog skin-derived antimicrobial peptides (temporin-1DRa, temporin-1Va and the melittin-related peptides AR-23 and RV-23) against anaerobic bacteria. *Int J Antimicrob Ag.* 29 (3), 317-321.
42. Xu C, Ma D, Yu H et al. 2007. A bactericidal homodimeric phospholipases A2 from *Bungarus fasciatus* venom. *Peptides.* 28:969-973.
43. Yechiel S. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *BBA- Biomembranes.* 1462:55-70.
44. Yoon JI, Al-Reza SM, Kang SC. 2010. Hair growth promoting effect of *Zizyphus jujuba* essential oil. *Food Chem Toxicol.* 48:1350-1354.
45. Yu D, Sheng Z, Xu X et al. 2006. A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Peptides.* 27:31-35.
46. Zasloff M. 2002. Antimicrobial Peptides in Health and Disease. *N Engl J Med.* 347:1199-1200.
47. Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415:389-395.
48. Zasloff M. 2006. Defending the epithelium. *Nat Med.* 12:607-608.
49. Zhang, Y. and K. Lewis 1997. "Fabatins: new antimicrobial plant peptides." *Fems Microbiol Lett* 149(1): 59-64.
50. Zhao J, Guo L, Zeng H et al. 2012. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from *Brevibacillus laterosporus* strain A60. *Peptides.* 33 (2), 206-211.

Identification and purification of a new antimicrobial peptide from *Zizyphus jujuba*

Daneshmand F.

Biology Dept., Payame Noor University, Tehran, I. R. of Iran.

Abstract

In this study, an antibacterial and antifungal peptide named; Snakin-Z was identified and purified from the fruit of *Zizyphus jujuba*, using gel filtration and reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). This peptide is composed of 31 amino acids with the sequence of: CARLNCVPKGTSNGTETPCYASLHSCRKYG. The molecular weight of this peptide was found to be 3308.823 Da. By multiple sequence alignment, Snakin-Z was seen to have highest similarity to antimicrobial peptide (AMP) Snakin-2, but this peptide shows no sequence homology to any AMP in the peptide database. Studies have shown that Snakin-Z has potent antimicrobial activity both against Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as fungi. Minimum inhibition concentration (MIC) value of this peptide is suitable for potent antimicrobial peptides. Significant antifungal activity of Snakin-Z was seen to have a greatest effect on *Phomopsis azadirachtae* with the MIC value of 7.65 µg/ml; While, among bacterial strains, *Staphylococcus aureus* was investigated to be the most resistant one with the MIC of 28.8 µg/ml. Human red blood cells showed good tolerance while exposed to the Snakin-Z. Regarding its antimicrobial activities and its effect against various pathogens and no hemolytic activity, we believe that Snakin-Z is appropriate candidate for the therapeutic applications in the future.

Key words: Antimicrobial peptides, *Zizyphus jujuba*, Gel filtration, RP-HPLC, MIC