طراحی، سنتز، همسانه سازی، ارزیابی بیان و بررسی خاصیت ضد میکروبی پروتئین دفنزین گندم(*Triticum aestivum*) در میزبان*E.coli*

سیده مریم مرتضوی[۱]، بهناز صفار[۲*]، ندا میر آخورلی [۳]و محسن مبینی دهکردی[۲]

[۱] شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه بیوتکنولوژی میکروبی

[۲] شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

[۳] شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۲۵

چکیده

دفنزینهای گیاهی، خانواده ای از پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی کوچک و غنی از سیستئین هستند که فعالیتهای ضد میکروبی وسیعی دارند. هدف این مطالعه طراحی، سنتز، همسانه سازی، بیان ژن دفنزین گندم(*Triticum aestivum*) و بررسی خاصیت ضد باکتری پروتئین نوترکیب حاصل بود. توالی ژن دفنزین به همراه ژن سومو (sumo)جهت افزایش حلالییت پروتئین و بیان بیشتر، توسط نرم افزارهای مختلف بهینه سازی شده، سنتز و در وکتور pGH همسانه سازی شد. سپس توالی ترکیبی سومو-دفنزین در ناقل بیانی pET-32a(+) زیر همسانه سازی و به سلولهای باکتریایی (*E.coli* origami) منتقل گردید. بیان ژن تحت القای IPTG یک میلی مولار در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد صورت گرفت و پروتئین نوترکیب توسط SDS-PAGE و وسترن بلات بررسی شد. پروتئین نوترکیب، با وزن مولکولی حدود ۳۸ کیلودالتون روی ژل SDS-PAGE آنالیز شد و توسط وسترن بلات تأیید گردید. پس از برش پروتئین با آنزیم سومو پروتئاز، محصول به دست آمده برای بررسی اثر ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت. اثر پروتئین دفنزین گندم نوترکیب بر باکتریهای بیماریزای گیاهی گرم منفی *زانتوموناس آگزونوپودیس* و *سودوموناس سیرینگه*و بر باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت بیماریزای انسانی مانند *اشریشیا کولای* ، *کلبسیلا پنومونیه* ، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* مورد ارزیابی قرار گرفت که در برابر باکتریهای *زانتوموناس آگزونوپودیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* اثر ضد باکتریایی از خود نشان داد. بر اساس ویژگی ضد میکروبی دفنزین گندم، این مطالعه می تواند در معرفی این پپتید، به عنوان یک عامل ضد میکروبی جدید، مؤثر باشد.

واژه های کلیدی: پپتیدهای ضد میکروبی، پروتئین دفنزین گندم، همسانه سازی و بیان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۱۹ ، پست الکترونیکی: saffar_b@sci.sku.ac.ir

مقدمه

تمام موجودات زنده نیازمند حفاظت در برابر میکروارگانیسم ها هستند و اعتقاد بر این است که توانایی آنها برای جلوگیری از شروع عفونت، به پاسخ ایمنی ذاتی آنها بستگی دارد(۲، ۳، ۹ و ۲۴). ایمنی ذاتی در گیاهان، از طریق مکانیسمهای دقیقی اتفاق می افتد. دیواره سلولی گیاه به عنوان مانعی برای نفوذ میکروبی عمل می کند همچنین ترکیبات ضد میکروبی از فعالیت مهاجمان جلوگیری می کنند(۲۱). پپتیدهای ضد میکروبی فعالیتهای وسیع ضد میکروبی در برابر میکروارگانیسم های مختلف، از جمله باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی، قارچها، و ویروسها نشان می دهند(۲۰). این پپتیدها به سرعت، با هزینه های سوخت و ساز کم، به راحتی و در مقادیر زیاد در مدت

کوتاهی پس از عفونت سنتز شده، به سرعت طیف گسترده ای از میکروبها را از بین می برند(۲۴). مطالعه روی موجودات زنده و مدلهای غشایی نشان داده است که بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی، افزایش نفوذ پذیری غشاء را تحریک می کنند(۴). شواهد نشان می دهند که پپتیدهای ضد میکروبی می توانند از طریق انواع مکانیسمها، به جز اختلال در ساختار غشاء، عمل کنند و نقششان در دفاع میزبان از کشتار مستقیم میکروارگانیسم ها فراتر می رود (۲۴). به طور عمده بخشی از گروههای اصلی پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس ویژگیهای بیوشیمیایی (بار خالص) و ساختار آنها (حلقوی / خطی) و ترکیب آمینو اسیدی طبقه بندی شده اند (۱۵). دفنزینهای گیاهی یک خانواده کوچک از پپتیدهای دفاعی می باشند که برای اولین بار در سال ۱۹۹۰ توسط مندز و همکاران از دانه های گندم و جو جداسازی شدند (۱۹).

این پپتیدها غنی از سیستئین بوده و ویژگیهای عملکردی و ساختمانی آنها مشابه دفنزینهای حشرات و پستانداران می باشد (۵). دفنزینهای گیاهی کوچک بوده (۵۴-۴۵ اسیدآمینه) و معمولاً شامل یک پپتید نشانه در انتهای آمینی و یک زنجیره پپتیدی اصلی هستند. این پپتیدها دارای خاصیت بازی هستند و ۷-۵ کیلودالتون وزن مولکولی دارند. با مقایسه توالی آمینواسیدی دفنزینهای گیاهی مختلف و پپتیدهای مشابه دفنزین جدا شده از ۱۰ گونه گیاهی مختلف مشخص شده است که به طور نسبی ۸ مکان سیستئین محافظت شده در همه دفنزینهای گیاهی وجود دارد و تشکیل ۴ پل دی سولفیدی می دهد که منجر به پایداری دفنزین خواهد شد. به نظر می‌رسد که دفنزینهای گیاهی اساساً در لایه‌های سلولی خارجی بیان می‌شوند که با نقش آنها در خط مقدم دفاع علیه پاتوژنها سازگاری دارد(۱۹).

پروتئینهای سومو (Sumo) یک خانواده پروتئینی بسیار حفاظت شده، موجود در همه یوکاریوتها را تشکیل می دهند و برای زنده ماندن بسیاری از سلولهای یوکاریوتی، از جمله جوانه زدن مخمر، نماتد، مگس میوه، و سلولهای مهره داران در هنگام رشد، مورد نیاز هستند و در پروکاریوتها دیده نمی شوند (۱۱). به تازگی از پروتئین سومو به عنوان یک فیوژن جدید برای تولید پروتئینهای نوترکیب استفاده شده است و ثابت شده است که این پروتئین میزان بیان پروتئین هدف را بیشتر می کند. افزایش بیان توسط سومو به دلیل خاصیت چاپرونی آن و همچنین کمک به ایجاد تاخوردگی مناسب برای پروتئین، افزایش حلالیت پروتئین و افزایش فعالیت بیولوژیکی پروتئین می باشد (۱۳).

سیستمهای بیان باکتریایی برای تولید پروتئین مورد توجه هستند، که توانایی رشد سریع و تولید انبوه از مواد اولیه ارزان از آن جمله است. علاوه بر این ژنتیک اغلب آنها شناخته شده است و تعداد بسیار زیادی از ناقلهای همسانه سازی و سویه های میزبانی موتانت از آنها در دسترس است (۲۳).

امروزه با توجه به افزایش گسترده مقاومت باکتریایی نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیکها، نیاز به جایگزینی عوامل ضد میکروبی جدید بیشتر احساس می شود. دفنزینهای گیاهی به دلیل دارا بودن خاصیت ضد میکروبی علیه طیف گسترده ای از قارچها و باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی بیماریزا می توانند در تولید محصولات بیولوژیک نظیر قارچ کشهای گیاهی و آنتی بیوتیکها در آینده مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به اینکه تولید این پپتیدهای ضد میکروبی در گیاهان هزینه و زمان طولانی را می طلبد، بیان *in vitro* آنها با استفاده ازتکنیکهای بیولوژی مولکولی می‌تواند برای تولید بیشتر آنها با هزینه و زمان کمتر و کاربردشان به عنوان آنتی بیوتیکهای جدید مفید باشد. در نتیجه این مطالعه با هدف همسانه سازی و بیان ژن دفنزین گندم در میزبان پروکاریوتی و بررسی اثرات ضد باکتریایی این پپتید انجام شد.

مواد و روشها

در این پژوهش از باکتری *E. coli* origami به عنوان باکتری میزبان، از پلاسمیدpGH به عنوان ناقل همسانه سازی و از پلاسمید pET-32a (+) به عنوان ناقل بیانی در باکتری استفاده گردید. آنزیمهای محدودالاثر و آنزیم DNA T4 لیگاز از شرکت فرمنتاز تهیه شدند. از محیط کشت لوریا برتانی مایع و جامد و کشت مولر هینتون آگار، جهت کشت باکتری استفاده شد. روشهای مولکولی استفاده شده در این پژوهش بر اساس روشهای استاندارد می باشد (۸).

بهینه سازی کدون، طراحی و همسانه سازی: توالی نوکئوتیدی مورد نظر (ژن دفنزین گندم) با شماره دسترسی Accession N.JQ435849 و توالی نوکلئوتیدی کد کننده پروتئین سومو با شماره دسترسی Accession N.Q12306.1 از پایگاه داده ای NCBI به دست آمد. به علت تأثیرات پروتئین سومو در افزایش رونویسی و بیان، ژن سومو به ژن دفنزین متصل گردید. این توالی با در نظر گرفتن کدونهای ترجیحی در *E.coli* و با استفاده از نرم افزارهای تحت وب طراحی شد. نرم افزارهای تحت وب مورد استفاده جهت بهینه سازی کدون، شامل، نرم افزار تحت وب *E.coli* Codon Usage Analysis2.0 (http://www.faculty.ucr.edu)، نرم افزار تحت وب Optimizer (http://www.genoms.uvr.es) که با توجه به گزینه های موجود، از طریق تغییر کدونهای نادر، توالی را بهینه می‌کند، نرم افزار تحت وب Gene script (http://www.gene script.com) که توالی بهینه شده در مرحله قبل را ارزیابی می‌کند و نرم افزار تحت وب webcutter (https://www.neb.com/external -links/nebcutter که تعداد برشهای آنزیمی توالی را بررسی می کند، بودند.

توالی ترکیبی (ژن دفنزین گندم زراعی به همراه ژن سومو) به نرم افزار تحت وب *E.coli* Codon Usage Analyzer 2.0 داده شد. از طرفی توالی ترکیبی به نرم افزار Gene script داده شد تا میزان CAI (Codon Adaptation Index) و محتوای GC و تعداد Negative CIS elements و Negative Repeat elements به دست آیند. با قرار دادن توالی در نرم افزار تخت وب optimizer، بهینه سازی و اعمال تغییرات توسط نرم افزار انجام پذیرفت. توالی مورد نظر به طول ۴۷۷ جفت باز پس از بهینه سازی کدون، سنتز و در ناقل pGH همسانه سازی گردید (شرکت تکاپو زیست).

زیرهمسانه‌سازی ژن در ناقل(+)pET32a: ابتدا ناقل pGH در میزبان باکتری *E.coli DH5 α*، ترانسفورم گردید. در مرحله بعد به منظور جداسازی قطعه مورد نظر به ترتیب، استخراج پلاسمید و برش پلاسمید استخراج شده توسط آنزیمهای محدود کننده *Xho*I و *BamH*I صورت گرفت و قطعه مورد نظر که شامل ژن سومو به همراه ژن دفنزین گندم زراعی می باشد، توسط کیت استخراج از ژل الکتروفورز(شرکت بایونیر) جدا گردید. در مرحله بعد پلاسمید pET32a(+) نیز توسط همین آنزیمها برش داده شد و سپس ناقل pET32a(+) برش خورده و قطعه مورد نظر، توسط آنزیم T4Ligase به هم اتصال یافتند. در نهایت محصول الحاق با تکنیک شوک حرارتی به باکتری *E.coli* origami منتقل گردید (۸). صحت همسانه سازی، توسط برش آنزیمی و نهایتاً تعیین توالی (توسط شرکت ژن فن آوران) تأیید گردید.

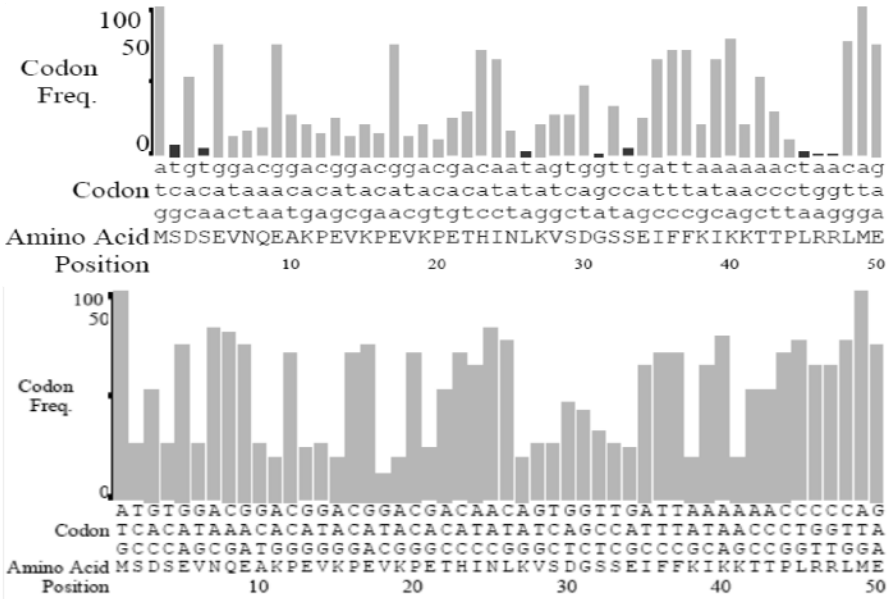
القای بیان و بررسی تولید پروتئین: جهت بررسی بیان، از کلنیهای ترانسفورم شده رشد کرده روی پلیتهای حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، کشت شبانه تهیه شد. به این منظورکلنیها در محیط لوریا برتانی (LB) مایع حاوی 30 میلی گرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک آمپی سیلین، تلقیح شده و در دمای 37 درجه سانتی گراد و دور۱۵۰rpm برای 16 ساعت قرار گرفتند. سپس این کشت به نسبت 1 به ۱۰ به محیط کشت بیانی اضافه شد و پس از اینکه جذب نوری در طول موج 600 نانومتر به ۰/۶-۰/۴ =OD رسید، جهت

القای بیان، IPTG (Isopropyl-β-d-thio-galactoside) با غلظت 1 میلی مولار به محیط کشت اضافه گردید و از این پس در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور rpm ۱۵۰-۱۰۰ قرار گرفت. در زمانهای قبل از القاء و ۲، ۴، ۶ و ۱۶ ساعت پس از القاء، در شرایط استریل، نمونه هایی هم حجم از محیط برداشته و با سانتریفیوژ در g۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سلولها کاملاً از محیط جدا و رسوب داده شدند. در مرحله بعد، به منظور حل کردن رسوبهای باکتریایی حاصل از بیان، ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیز TE (Tris-EDTA) اضافه شد و تحت امواج ماوراءصوت (قدرت ۸۰ درصد، پالس 0/5)قرار گرفت (سونیکاسیون) و سپس در rpm ۱۰۰۰۰ به مدت 20 دقیقه مجددا "سانتریفیوژ شد. و فاز رویی جـهت بررسی الگوی پروتئینهای کل سلول حاوی پروتئـین مـورد نظـر جهت الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد برده شد و با توجه به نتایج بهترین زمان بعد از القاء مشخص گردید. با استفاده از نرم افزار image Jنیز دانسیته نسبی پروتئین بیان شده، روی ژل SDS-PAGE محاسبه گردید. همچنین تست برادفورد برای تعیین غلظت پروتئین انجام شد، که در آن از آلبومین سرم گاوی (BSA)تهیه شده از شرکت سیناژن، به عنوان پروتئین استاندارد استفاده گردید. جهت تأیید بیان پروتئین نوترکیب روش وسترن بلات انجام شد. در روش وسترن بلات، مقدار مساوی از پروتئین قبل و بعد از القاء روی ژل ۱۰ درصد SDS-PAGE برده شد و سپس پروتئینها توسط بافر انتقالی(تریس۲۵ میلی مولار،گلیسین 192 میلی مولار و متانول20 درصد) طی 16 ساعت با شدت 86 میلی آمپر و سپس به مدت ۲ ساعت در ۲۰۰ میلی آمپر از روی ژل به غشای(PVDF (Poly vinylidene difluoride انتقال یافت. کاغذ PVDF با قرار گرفتن در محلول Skim milk ۵ درصد برای 2 ساعت مسدود شده و سپس آنتی بادی-mouse anti (His)6 peroxidase با رقت ۱ به ۲۰۰۰ اضافه گردید. بعد از آن کاغذ با بافر شستشو (NaCl ۰/۵ میلی مولار، Tris ۰/۰۲ میلی مولار، HCl 6 نرمال) 3 بار و هر بار۵ دقیقه شستشو داده شد. در مرحله پایانی TMB(Tetramethyl benzidine) برای ظاهر شدن باند رنگی و شناسایی پروتئین مورد نظر اضافه گردید.

بررسی اثر ات ضد میکروبی: جهت بررسی اثرات ضد میکروبی از روش انتشار از دیسک بر روی پلیت محتوی محیط کشت مولر هینتون آگار، استفاده شد. در این روش، پس از اثر آنزیم Ulp1 (سومو پروتئاز) (Invitrogen) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بر روی پروتئین نوترکیب، محصول برش آنزیمی به همراه کنترل منفی(پروتئین برش نخورده) و کنترل مثبت (آنتی بیوتیک آمپی سیلین) بر روی دیسکهای شاهد در محیط کشت باکتریهای بیماریزای گیاهی و گرم منفی *زانتوموناس آگزونوپودیس* (ATCC51302) و *سودوموناس سیرینگه* (ATCC11528) و باکتریهای بیماریزای انسانی *اشریشیا کولای* (ATCC35218) و *کلبسیلا پنومونیه* (ATTC700603) گرم منفی و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25922) و *باسیلوس سرئوس* (ATCC10987) گرم مثبت انتقال یافتند و با انکوبه شدن در دمای رشد خاص هر باکتری و تشکیل هاله عدم رشد در اطراف دیسک، خاصیت ضد باکتریایی پروتئین نوترکیب ارزیابی شد.

نتایج

بهینه سازی کدون، طراحی و همسانه سازی: توالی ترکیبی (ژن سومو به همراه ژن دفنزین گندم زراعی) قبل از بهینه سازی کدونها به نرم افزار تحت وب *E.coli* Codon Usage Analyzer 2.0 داده شد، همان طور که در شکل۱، نشان داده شده است رنگ تیره نشان دهنده فراوانی کدونهای نادر در توالی مورد نظر می باشد که حتماً باید تعویض شوند. در مرحله بعد توالی ترکیبی توسط نرم افزار تحت وب Optimizer تغییر یافت و سپس مراحل قبلی برای توالی تغییر یافته تکرار شدند. نتایج حاصل از نرم افزار *E.coli* Codon Usage Analyzer 2.0 در شکل ۲ آورده شده‌اند.

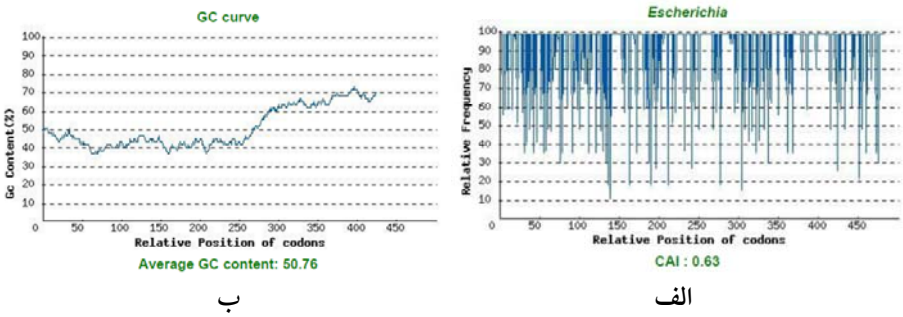


شکل ۱- نتایج تفسیر و بررسی توالی ترکیبی سومو و پروتئین گندم زراعی قبل (الف) و بعد از بهینه سازی کدونها(ب) توسط سرور *E.coli* Codon Usage Analyzer 2.0. رنگ سیاه: کدونهایی از *Triticum aestivum*(گندم زراعی) که برای *E.coli* کدون نادر محسوب می شوند و بهتر است تعویض شوند. رنگ خاکستری: میزان فراوانی کدونها را نشان می دهد. در مقایسه با شکل الف، میزان کدون با رنگ تیره به صفر رسیده است. تنها قسمتی از توالی نشان داده شده است.

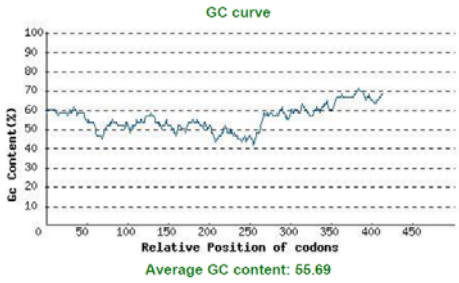
از طرفی توالی ترکیبی قبل از بهینه سازی کدونها به نرم افزار Gene script داده شد، نتایج به قرار زیر است و در شکل ۲ نیز آمده است:

میزان CAI =۰/۶۳ بود، که دربهترین حالت باید بالای ۰/۸۰ باشد، میزان محتوای GC که باید بین ۳۰ تا ۷۰ درصد باشد که در اینجا ۵۰/۷۶ درصد بود و تعداد Negative CIS elements و Negative Repeat elements نیز باید مساوی صفر باشد که در اینجا هم مساوی صفر بود. بعد از بهینه سازی کدونها نتایج حاصل از سرور تحت وب Gene script به شرح زیر می باشد و در شکل ۳ نیز آمده است. میزان CAI به ۰/۸۲ تغییر یافت که مقدار مناسبی جهت بیان است، میزان محتوای GC به ۵۵/۶۹ تغییر یافت که این مقدار نیز مطلوب می باشد.

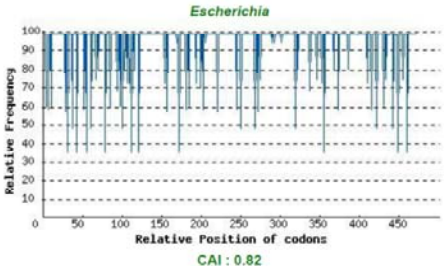
زیرهمسانه‌سازی ژن در ناقل(+)pET32a: در این پژوهش صحت همسانه سازی با برش آنزیمهای محدودالاثر *BamHI/XhoI* و توسط تعیین توالی قطعه همسانه شده مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۴).



شکل ۲- نتایج تفسیر و بررسی توالی ژن ترکیبی قبل از بهینه سازی کدونها توسط سرورGene script. الف) میزان CAI (Codon (Adaptation Index قبل از بهینه سازی برابر با ۰/۶۳ است ب) میزان محتوای GC برابر با ۵۰/۷۶درصد می باشد.

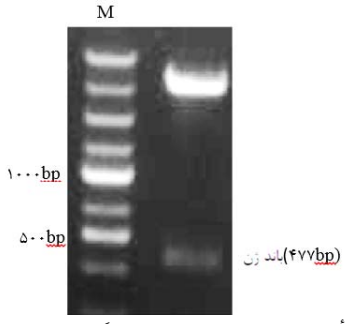


ب

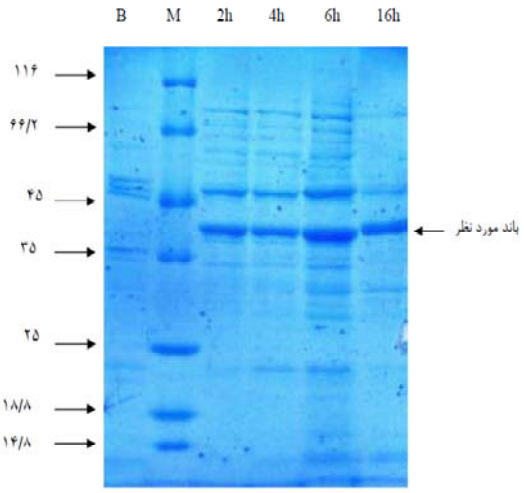


الف

شکل ۳- نتایج تفسیر و بررسی توالی تغییر یافته سومو و پروتئین گندم زراعی بعد از بهینه سازی کدونها توسط توسط سرورGene .script الف) میزان CAI بعد از بهینه سازی به ۰/۸۲ می رسد. ب) میزان محتوای GC به ۵۵/۶۹درصد تغییر یافت.



شکل ۴- تأیید حضور ژن ترکیبی(دفنزین گندم و سومو) در ناقل pET-32a (+)با برش توسط آنزیمهای محدود کننده *BamH*I و *Xho*I. اندازه ناقل pET-32a (+) و اندازه ژن (۴۷۷bp) صحت همسانه سازی را تأیید می کند. M: مارکر S.M0311 (شرکت فرمنتاس).



شکل ۵- شکل ژل SDS-PAGE، بیان پروتئین نوترکیب در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و غلظت یک میلی مولار IPTG . B: نمونه پروتئینی قبل از القاء و نمونه‌های پروتئین ۲، ۴، ۶ و ۱۶ ساعت بعد از القاء. M: مارکر پروتئین SM0431 (شرکت فرمنتاس).

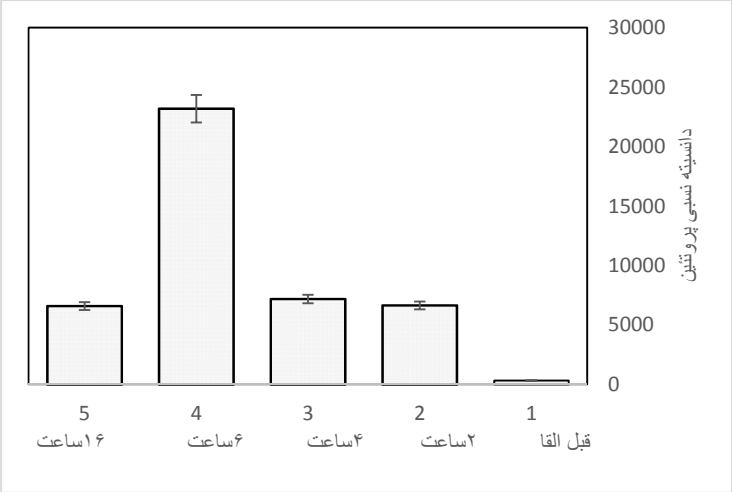
القای بیان و بررسی تولید پروتئین: نمونه‌های پروتئینی قبل از القاء ، ۲، ۴، ۶ و ۱۶ ساعت بعد از القاء بر روی ژل ۱۰ درصد SDS- PAGE برده شد و باندهای مشاهده شده در ساعات مختلف پس از القا، بر روی ژل ۱۰ درصد SDS- PAGE، وزن مولکولی ۳۸ کیلو دالتون(معادل وزن پروتئین نوترکیب) را برای پروتئین بیانی نشان داد و بیشترین غلظت پروتئین نوترکیب در ۳۰ درجه سانتی گراد، در ۶ ساعت بعد از القای بیان دیده شد (شکل ۵). که توسط نرم افزار image j نیز تأییدگردید (شکل ۶).

شکل ۷- وسترن بلات نمونه‌های پروتئینی. B نمونه قبل از القاء، 6h: نمونه پروتئین بیان شده ۶ ساعت پس از القاء، M: مارکر پروتئینی Spectra Multicolor Broad Range(شرکت ترمو). باند پروتئین نوترکیب با علامت فلش نشان داده شده است.

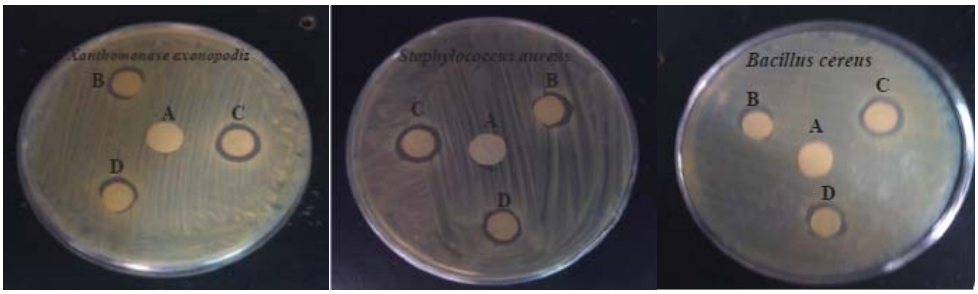
نتایج حاصل از تست برادفورد نشان داد که غلظت پروتئین کل بیان شده ۰/۴۸۶ میکروگرم در یک میکرولیتر محلول

پروتئین می باشد. تأیید باند مشاهده شده در ژل-SDS PAGEنیز با نتایج حاصل از روش وسترن بلات صورت گرفت و در روش وسترن بلات باند رنگی در حدود ۳۸کیلو دالتون مشاهده شد (شکل ۷).

بررسی اثر ات ضد میکروبی: با بررسی هاله عدم رشد در محیط کشت مولر هینتون آگار، اثر میکروب کشی پروتئین بیان شده بر رشد باکتری بیماریزای گیاهی *زانتوموناس آگزونوپودیس* گرم منفی و همچنین بر روی باکتریهای بیماریزای انسانی *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* گرم مثبت، تأیید گردید (شکل ۸).



شکل۶- نمودار ستونی نمونه ها ی پروتئینی در زمانهای مختلف بعد از القاء با استفاده از برنامه Excel وقله های محاسبه شده توسط نرم افزار image j. همان طور که مشخص شده است بیشترین بیان ۶ ساعت بعد از القاء می باشد.



ج ب الف

شکل ۸- بررسی اثر میکروب‌کشی پروتئین دفنزین گندم بر روی باکتریهای الف)*Bacillus cereus*(ATCC10987) ، ب) (ATCC 25922) *Staphylococcus aureus* و ج)(ATCC51302) *Xanthomonase axonopodis*. ، دیسک A: کنترل منفی (پروتئین برش نخورده)، دیسک B: کنترل مثبت (آنتی بیوتیک آمپی سیلین) و دیسکهای C وD: پروتئین نوترکیب برش خورده با آنزیم سومو پروتئاز به ترتیب به میزان ۷/۵ و ۵ میکروگرم در میکرولیتر.

بحث

از مهم ترین پپتیدهای ضدمیکروبی تولید شده توسط سیستم ایمنی ذاتی گیاهان دفنزینها را می توان نام برد. این پپتیدهای کوچک و کاتیونی در مولکول خود ۸ سیستئین دارند که با آنها ایجاد ۴ پل دی سولفیدی کرده و به این ترتیب ساختاری مستحکم ایجاد می کنند و به گونه ای تا می خورند که حداکثر فعالیت خود را در برابر غشای میکروبها داشته باشند. علاوه برخاصیت ضدمیکروبی می

توانند با اعمال اثر در برابر استرسهای محیطی به حفظ حیات گیاهان نیز کمک کنند(۲۲). ژن دفنزین گندم زراعی، رقم فلات (Accession N.JQ435849) توسط میرآخورلی و همکاران برای بیان در گیاه تراریخته، استخراج و توالی آن در پایگاه دادهای NCBI ثبت شده است (www.ncbi.nlm.nih.gov). این توالی دارای دو دامین می باشد که در انتهای N– ترمینال آن پپتید نشانه قرار دارد و سپس دامین دفنزینی در ادامه ژن قرار دارد (۱).

در این مطالعه ژن دفنزین گندم زراعی (*Triticum aestivum*) که میزبانی یوکاریوت دارد، برای بیان وارد میزبان پروکاریوت یعنی باکتری *E.coli* سویه اریگامی شد. سویه میزبانی اریگامی از سویه k-12 گونه *E.coli* مشتق شده و با جهش در هر دو ژن تیوردوکسین ردوکتاز و گلوتاتیون ردوکتاز، تا حد زیادی تشکیل باند دی سولفید در سیتوپلاسم این سویه افزایش یافته است. تحقیقات نشان می دهند که بیان در سویه اریگامی، ۱۰ برابر پروتئین فعال تری را نسبت به سایر سویه های بیانی، در شرایط مشابه ایجاد می کند. میزبان اریگامی با پلاسمید مقاوم به آمپی سیلین سازگار بوده و این ویژگی آن را برای استفاده از ناقل بیانی pET-32a(+) به میزبانی ایده آل تبدیل کرده است (10). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۲ توسط نانی والنتینا بر روی دفنزینهای انگور و هلو انجام شد، بیان گردیده که استفاده از ناقل pET-32a(+) و سویه اریگامی برای بیان این دفنزینهای گیاهی، راهی کارآمد برای تولید پروتئین نوترکیب محلول با سطح بالایی از خلوص می باشد (۱۶). در این مطالعه جهت بیان ژن دفنزین گندم با ۴ پیوند دی سولفیدی از ناقل بیانیpET-32a(+) استفاده شد. و سویه اریگامی نیز به علت توانایی تشکیل پیوندهای دی سولفیدی، به عنوان میزبان بیانی انتخاب گردید، با توجه به بهینه سازی ژن و همچنین استفاده از ترکیب ژن دفنزین گندم با ژن کد کننده پروتئین سومو، انتظار می رفت که بیان دفنزین گندم افزایش یابد. مطالعات نشان داده است که بهینه سازی کدونها و تغییر مطابق با الگوی کدونهای فراوان در E.coli، باعث افزایش بیان ژن در این میزبان می گردد (۱۴). مشاهده شده است که استفاده از روش پروتئینهای فیوژن برای افزایش بیان، ناشی از ساختارهای بسیار حفاظت شده این پروتئینها باشد. با اتصال این نوع پروتئینها به پایانه N پروتئین ناکارآمد، ممکن است به افزایش بیان پروتئین هدف کمک شایان توجهی بنماید(۶). پروتئین سومو ازجمله پروتئینهای فیوژن است که میزان انحلال پروتئین مورد نظر را بالا می برد و به علت خاصیت چاپرونی، شرایط تا خوردگی مناسب در پروتئین دفنزین را ایجاد می کند تا بهترین عملکرد را داشته باشد. به علاوه آنزیم سومو پروتئاز (که درانسان SENP و در مخمر ULP1 نام دارد) به صورت کاملاً اختصاصی پروتئین سومو را از پروتئین هدف جدا کرده و تولید پروتئین هدف با انتهای N_ترمینال سالم می کند. بنابراین هیچ اسید آمینه ای به ابتدای پروتئین مورد نظر اضافه نمی شود که از مزایای استفاده از توالی سومو می باشد. علاوه براین با توجه به کوچک بودن پروتئین مورد نظر، الحاق آن به صورت پروتئین نوترکیب جهت تشخیص و خالص سازی سهولت می یابد، القای بیان توسط غلظت نهایی یک میلیمولار IPTG انجام شد و پس از القاء، دمای رشد باکتریها از ۳۷ درجه سانتی گراد به ۳۰ درجه سانتی گراد کاهش داده شد، تا از رسوب شدن پروتئین تولیدی در فضای سیتوپلاسمی و کاهش بیان جلوگیری شود و پروتئین به صورت محلول تولید شود. با توجه به نتایج حاصل از SDS-PAGE پروتئین موردنظر در ۲، ۴ و ۶ و ۱۶ ساعت پس از القاء به خوبی بیان شده و باند حدود ۳۸ کیلودالتون به خوبی مشهود است. با توجه به مساوی بودن مقدار پروتئینها بر روی ژل و نتایج حاصل از آنالیز ژل با نرم افزار image j، باند ۶ ساعته نسبت به سایرین دارای شدت بیشتری بود، در نتیجه بیانگر آن است که غلظت پروتئین در ۶ ساعت پس از القاء بیشتر بوده است. برای اطمینان از بیان پروتئین موردنظر و شناسایی اختصاصی باند پروتئینی مشاهده شده در ژل، تکنیک وسترن بلات انجام شد. در این پژوهش، از

آنتی‌بادی ضد توالی His-tag متصل به آنزیم پراکسیداز استفاده شد و در نهایت تشخیص مکان باند مورد بررسی، توسط سوبسترای TMB صورت پذیرفت. با توجه به نتایج دات بلات و وسترن بلات می توان گفت که پروتئین به خوبی بیان شده است و میزبان *E.coli origami* میزبان مناسبی برای بیان این پروتئین است. همچنین غلظت پروتئین ناخالص با توجه به نتایج تست برادفورد ۰/۴۸۶ میکروگرم در میکرولیتر به دست آمد.

اثرات ضد باکتریایی دفنزینها و شبه دفنزینهای گیاهی بر باکتریهای گرم مثبت و منفی به اثبات رسیده است (۷). دفنزینها این اثرات را با نفوذ در غشای باکتری اعمال می کنند و به طرق مختلف باعث از بین رفتن غشای سلولی می شوند که در نتیجه انهدام سلول میکروارگانیسم را در پی دارد، با توجه به تفاوت محتویات دیواره سلولی باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی، جاذبه الکترواستاتیک در باکتریهای گرم منفی باعث جذب بیشتر دفنزینهای کاتیونی با بار مثبت می شود و انتظار می رود که این پروتئینها بر روی باکتریهای گرم منفی با تأثیر بیشتری عمل کنند. در سال ۱۹۹۵ اوسبورن و همکارانش اعلام کردند که دفنزین CtAMP1 در مقابل باکتری *باسیلوس سابتیلیس* فعال است (۱۷). همچنین سگورا و همکارانش دو دفنزین به نامهای SOD2 و SOD7 را از اسفناج جدا کردند که علیه باکتریهای *کلاوی باکتر میشیگانزیس* و *سودوموناس سولانا سروم* فعال بودند(۱۸). در سال ۲۰۱۲ اثر دفنزین لوبیا بر دو باکتری بیماریزای گیاهی *زانتوموناس آگزونوپودیس* و *سودوموناس سیرینگه* توسط میرآخورلی و همکاران به اثبات رسیده و دفنزین لوبیا علیه هر دو گونه مؤثر بوده است(۱). در همین سال بیان دفنزین گاوی در باکتری *اشریشیا کولای* توسط صفار و همکاران به خوبی انجام شد و خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی این پروتئین هم به اثبات رسید(۱۲). در این مطالعه اثر دفنزین گندم که به صورت نوترکیب در باکتری *اشریشیا کولای* بیان شده است، برای اولین بار بر باکتریهای بیماریزای گیاهی و گرم منفی *زانتوموناس آگزونوپودیس* و *سودوموناس سیرینگه* که هر دو به ترتیب باعث آسیبهای گیاهی مانند سوختگی برگها و یخ زدگی سلولهای گیاهی می شوند و نابودی گیاهان زراعی و ضررهای اقتصادی زیادی را در بر دارند و بر باکتریهای بیماریزای انسانی *اشریشیا کولای* و *کلبسیلا پنومونیه* گرم منفی و *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* گرم مثبت مورد ارزیابی قرار گرفت. در نتیجه پروتئین تولیدی در برابر باکتریهای *اشریشیا کولای*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سودوموناس سیرینگه* اثر ضد باکتریایی از خود نشان نداد، احتمالاً گیرنده ای بر سطح غشای این باکتری برای پروتئین دفنزین گندم وجود نداشته یا میزان پروتئین اثر داده شده روی این سویه باکتری به میزانی نبوده که اثر خود را بر باکتری نشان دهد. اما در برابر باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *زانتوموناس آگزونوپودیس* اثر ضد باکتریایی خود را اعمال کرد. باید گفت که انجام تست ضد میکروبی در این مطالعه صرفا یک کار کیفی بوده و برای انجام کار کمی و آنالیزهای آماری نیاز به کار بیشتر دارد، در ضمن خاصیت میکروب کشی پروتئین ناخالص، مورد ارزیابی قرار گرفته و با توجه به ناخالص بودن نتیجه خوبی داده که به لحاظ اقتصادی در خور توجه و به صرفه می باشد، هر چند می توان در ادامه کار پروتئین را تخلیص کرده و پس از برش با آنزیم سومو پروتئاز میزان فعالیت آن را در حالت خالص نیز بررسی کرد.

نتیجه

امروزه مسئله مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی بیوتیکهای رایج، شکلی جدی پیش روی علم پزشکی است و تلاش برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید که جایگزین آنتی بیوتیکهای رایج شوند، رو به گسترش است. از طرفی توانایی پپتیدهای ضدمیکروبی و به خصوص دفنزینها برای از بین بردن انواع باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی، انگلها،

ویروسها، حشرات و تومورهای سرطانی آنها را مورد توجه قرار داده است. در این تحقیق سعی شد تا با اتصال پروتئین سومو به پروتئین دفنزین گندم و با در نظر گرفتن کدونهای مورد استفاده در باکتری *اشریشیا کولای* و ایجاد سلولهای مستعد بیانی، شرایط برای بیان آن در سویه اریگامی که قادر به تشکیل پیوندهای دی سولفیدی موجود در این پروتئین است، فراهم گردد و سپس تولید آن با تکنیکهای مختلف بررسی شود. با توجه به نتایج حاصل، میزبان اریگامی برای تولید این پروتئین مناسب به نظر می-رسد. در ادامه با انجام تست ضد میکروبی و مشاهده هاله عدم رشد می توان گفت که پروتئین نوترکیب به گونه ای در میزبان اریگامی تولید شده که با حفظ ساختار سه بعدی توانایی میکروب کشی خوبی را اعمال می کند. امید است این مطالعه بتواند در بررسیهای بعدی این پپتیدها به عنوان یک عامل ضد میکروبی جدید، مؤثر باشد.

تشکر و قدر دانی

این پژوهش باحمایت مالی دانشگاه شهرکرد انجام شده است.

منابع

۱ – نور الله، ز، ۱۳۹۲، بررسی اثرات ضد باکتریایی پروتئین دفنزین حاصل از بیان موقت ژن در لوبیا، پایان نامه کارشناسی ارشد. شهرکرد: دانشگاه شهرکرد.

2. Aderem A, Ulevitch RJ, 2000, Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature, 406:782-787.

3. Akira S, Takeda K, Kaisho T, 2001, Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nature immunology, 2:675-680.

4. Andreu D, Rivas L,1998, Animal antimicrobial peptides: an overview. Biopolymers, 47:415-433.

5. Broekaert WF, Terras F, Cammue B, Osborn RW,1995, Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant physiology, 108:1353.

6. Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, Mattern MR,2005, SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. Protein expression and purification, 43:1-9.

7. Daneshmand F, 2014 Identification and purification of a new antimicrobial peptide from ziziphus jujuba. Journal of cellular and molecular researches (Iranian journal of biology), 27:211-223.

8. Green MR, Sambrook J,2012, Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.

9. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz R,1999, Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science, 284:1313-1318.

10. Jianming Wu, Changfa W, Hongbin H. 2011, Molecular analysis and recombinant expression of bovine neutrophil b-defensin 12 and its antimicrobial activity. Molecular Biology Report, 38:429–436.

11. Johnson ES,2004, Protein modification by SUMO. Annual review of biochemistry, 73:355-382.

12. Karimi N, Saffar B, Ghaedi K , Mobini-Dehkordi M, 2012,Optimization of expression, purification and handling anti bacteria feature protein of bovine neutrophil B-defensing BNBD2. J Shahrekord Univ Med S,15:89-97.

13. Li Y,2011, Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli: A review. Protein expression and purification, 80:260-267.

14. Mansouri M, Mousavi SJ, Nazarian Sh, Ehsaee Z, Jafari F and Khalesi R, 2013 Amplification, cloning and expression assay of the minor subunit colonization factot antigen I (CFaE) from enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). Journal of cellular and molecular researches (Iranian journal of biology),26:221-228.

15. Marshall SH, Arenas G,2003, Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. Electronic Journal of Biotechnology, 6:271-284.

16. Nanni V, Bertolini p, Baraldi E, Zanetti M, Dalla Serra M, Bellucci M, Mose C, 2013, Peach *(Prunus persica*) defensin PPDFN1 displays antimicrobial activity against fungal pathogens through specific lipid binding and membrane permeabilization. Acta horticulturae, 1012: 699-704

17. Osborn RW, De Samblanx GW, Thevissen K, Goderis I, Torrekens S, Van Leuven F, Attenborough S, Rees SB, Broekaert WF,1995, Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. FEBS letters, 368:257-262.

18. Segura A, Moreno M, Molina A, García-Olmedo F,1998, Novel defensin subfamily from spinach (Spinacia oleracea). FEBS letters, 435:159-162.

19. Sels J, Mathys J, De Coninck B, Cammue B, De Bolle MF,2008, Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry, 46:941-950.

20. Seo M-D, Won H-S, Kim J-H, Mishig-Ochir T, Lee B-J,2012, Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. Molecules, 17:12276-12286.

21. Silverstein KA, Graham MA, Paape TD, VandenBosch KA,2005, Genome organization of more than 300 defensin-like genes in Arabidopsis. Plant Physiology, 138:600-610.

22. Stotz HU, Thomson J, Wang Y,2009, Plant defensins: defense, development and application. Plant signaling & behavior, 4:1010-1012.

23. Terpe K,2006, Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Applied microbiology and biotechnology, 72:211-222.

24. Zhao H, Mattila JP, Holopainen JM, Kinnunen PKJ, 2001 Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin. Biophys. J, 81:2979-2991.

Design, synthesis, cloning, expression and evaluation of the antibacterial effect of wheat defensin *(Triticum aestivum)* in *E.coli* host

Mortazavi S.M.[1], Saffar B.[2], Mirakhorli N.[3] and Mobini Dehkordi M.[2]

[1] **Microbial Biotechnology Dept., Faculty of Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran**

[2] **Genetics Dept., Faculty of Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran**

[3] **Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran**

Abstract

Plant defensins are a family of cationic antimicrobial peptides, small and cysteine rich that have a broad range of antibacterial effects. The aim of this study was designed, synthesis, cloning, expression of wheat defensin *(Triticum aestivum)* gene and evaluation of the antibacterial effect of recombinant protein. The defensin gene was fused to sumo gene for more expression and solubility and then was optimized by some software and was synthesized and cloned in pGH vector. Then sumo_defensin sequence was sub cloned into pET-32a (+) vector and transformed into bacterial cells (*E.coli* origami). Gene expression was induced by 1mM IPTG in 30°C and proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. The fusion protein with a molecular weight of approximately 38 kDa was analyzed on SDS-PAGE gel and confirmed by western blotting. After digestion of protein by Sumo protease, the antibacterial effect of the recombinant wheat defensin was evaluated on the plant pathogenic Gram-negative bacteria *Xanthomonase axonopodi*s, *Pseudomonas syringae* and some human pathogenic Gram-negative and Gram-positive bacteria such as *E.coli* and *Klebsiella pneumoniae* , *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. In the end, recombinant wheat defensin had an antibacterial effect against *Xanthomonase axonopodi*s, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus.* Based on the antimicrobial characteristics of wheat defensin, this study can be effective to introduce a new antimicrobial agent.

Key words: antimicrobial peptides, wheat defensin protein, cloning and expression.