

تولید پپتیدهای نو ترکیب پکسیگانان و ایزگانان در گیاه توتون

الهام عطایی کجویی، علی نیازی* و فرزانه آرام

ایران، شیراز، دانشگاه شیراز، دانشکده کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۸

چکیده

تکامل باکتری‌های بیماری‌زا منجر به توسعه مکانیسم‌های مقاومتی در بسیاری از پاتوژن‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم شده است که منجر به جستجو برای جایگزین‌های درمانی جدید شده است. پپتیدهای ضد میکروبی یکی از امیدوارکننده‌ترین گزینه‌های جایگزین برای غلبه بر تکثیر پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند. پکسیگانان و ایزگانان دو پپتید ضد میکروبی مهم هستند که فعالیت لیتیک سریع و قوی در برابر طیف وسیعی از پاتوژن‌ها از خود نشان می‌دهند. مطالعات نرم افزاری نشان می‌دهد که شکل همجوش دو پپتید به مراتب خاصیت ضد میکروبی قویتری از هر دوی این پپتیدها به تنهایی دارد بنابر این پتانسیل معرفی بعنوان پپتیدی جدید را دار می‌باشد. تولید پپتیدهای ضد میکروبی در مقیاس وسیع همچنان یک چالش مهم است. بیان هترولوگ در سیستم‌های مبتنی بر گیاه، یا همان کشاورزی مولکولی، تولید مقرون به صرفه بسیاری از پروتئین‌های نو ترکیب و پپتیدهای ضد میکروبی را امکانپذیر می‌سازد. در مطالعه حاضر، پکسیگانان و یک پپتید همجوش پکسیگانان-ایزگانان برای اولین بار در گیاه تنباکو بیان شدند. نتایج این مطالعه نشان داد پپتید نو ترکیب پکسیگانان-ایزگانان فعالیت ضد میکروبی قویتری نسبت به پکسیگانان نشان می‌دهد. همچنین هر دو پپتید نو ترکیب در طیف وسیعی از دما خواص ضد میکروبی خود را حفظ می‌کنند که برای خالص سازی پروتئین‌های نو ترکیب تولید شده در گیاه در مقیاس وسیع بسیار مهم است.

واژه های کلیدی: پپتیدهای نو ترکیب پکسیگانان و پکسیگانان-ایزگانان، زراعت مولکولی، فعالیت ضد میکروبی، توتون.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۷۱۳۲۲۷۲۸۰۵، پست الکترونیکی: niazi@shirazu.ac.ir

مقدمه

سلولی خاص را هدف قرار می‌دهند، پپتیدهای ضد میکروبی لایه لیپوپلی ساکاریدی غشای سلولی را مورد هدف قرار می‌دهند. مکانیسم عمل ضد میکروبی پس از نفوذ از غشای سلولی پاتوژن بر اساس نوع پپتید و ویژگی‌های آن می‌تواند، هدف قرار دادن سنتز DNA، سنتز پروتئین یا دیواره سلولی میکروارگانیسم باشد [۲۵، ۲۹]. داشتن سطح بالایی از کلسترول و بار آنیونی پایین، سلول‌های یوکاریوتی را از دامنه هدف بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی خارج می‌کند. قابلیت مهم دیگر پپتیدهای ضد میکروبی اثر کشندگی سریعشان است. برخی از پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند چند ثانیه پس از تماس اولیه با غشای سلول آنرا از بین ببرند. همچنین مشخص

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در میکروب‌ها، نیاز به تولید و توسعه جایگزین برای آن‌ها را روزافزون نموده است. پپتیدهای ضد میکروبی توسط تعداد بسیار زیادی از موجودات تولید می‌شوند و فعالیت گسترده و غیر اختصاصی دارند، این خصوصیت آنها را بعنوان انتخابی قدرتمند برای کاربردهای دارویی و درمانی بسیار مناسب می‌کند [۲۵، ۳۲]. پپتیدهای ضد میکروبی الیگوپپتیدهایی با تعداد متغیر از ۵ تا کمتر از ۱۰۰ اسید آمینه با بار مثبت (عمدتاً اسیدهای آمینه لیزین و آرژینین) و بخش قابل توجهی از اسید آمینه‌های هیدروفوب می‌باشند. پپتیدهای ضد میکروبی دامنه گسترده‌ای از موجودات را مورد هدف قرار می‌دهند [۳]. برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها که فعالیت‌های

دामنه گسترده، فعالیت میکروب‌کشی سریع، احتمال پایین تولید مقاومت و هدفگیری غیر اختصاصی غشاهای میکروبی از جمله مهمترین ویژگی‌های مهم این پپتیدها می‌باشد. پپتیدهای ضد میکروبی Protrgrin مقاوم به نمک هستند و فعالیت آن‌ها در غلظت نمک فیزیولوژیک افزایش می‌یابد و بوسیله کاتیون‌های دو ظرفیتی و ترکیبات سرم تحت تأثیر قرار نمی‌گیرند [۴]. همچنین در دامنه وسیعی از pH فعال باقی می‌مانند. پپتیدهای ضد میکروبی Protegrin طبیعی در اصل از لوکوسیت‌های خوک جدا شده‌اند. تا بحال پنج گروه Protegrin (PG-1 تا PG-5) شناسایی شده است. این پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونیک هستند، غنی از آرژنین و سیستین بوده و حاوی ۱۶-۱۸ باقیمانده آمینو اسیدی می‌باشند. توالی طبیعی Protegrin، بصورت صفحات بتای متشکل از ۱۶-۱۸ اسید آمینه که بوسیله ۲ پل دی‌سولفیدی پایدار شده است می‌باشد [۴]. ساختار صفحات بتا عامل کلیدی پایداری ساختار Protegrin بویژه در حضور نمک فیزیولوژیک است. پپتیدهای ضد میکروبی Protegrin علیه دامنه گسترده‌ای از باکتری‌های گرم مثبت و منفی، قارچ‌ها و انواع ویروس‌ها فعال هستند. ویژگی‌های پپتیدهای ضد میکروبی Protegrin آن‌ها را به انتخاب‌های جذابی برای تحقیق و توسعه جهت کاربردهای ضد میکروبی تبدیل کرده است. ایزگانان (Isegran (IB-367)) یک آنالوگ سنتزی Protegrin است (جدول ۱). ایزگانان فعالیت میکروب‌کشی سریع در بزاق دهان دارد که آن را به یک ترکیب مناسب برای کنترل عفونت‌های دهانی تبدیل کرده است. فعالیت میکروب‌کشی در حضور غلظت‌های نسبتاً بالای نمک و توانایی تولید یک محلول از ایزگانان این پپتید را یک عامل بالقوه جذاب برای درمان عفونت‌های تنفسی مزمن در بیماران فیروز کیستیک (cystic fibrosis) می‌کند [۴]. ایزگانان علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و مخمر کشنده است. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (Minimum (MIC) Inhibitory Concentration) برای ایزگانان از

شده است که پپتیدهای ضد میکروبی فعالیت آنتی بیوتیک‌ها را از طریق اثر هم‌افزایی افزایش می‌دهند. پس از تخریب غشا و یا تشکیل منفذ در غشای سلول باکتری بوسیله پپتید ضد میکروبی نفوذ آنتی بیوتیک درون سلول باکتری افزایش یافته و در نتیجه تأثیر کشندگی آنتی بیوتیک افزایش می‌یابد [۲۳، ۴۱، ۴۹].

در بین صدها پپتید ضد میکروبی سنتز شده و رمز شده بوسیله ژن‌ها، magainin-2 و آنالوگ‌هایش بخوبی مطالعه شده‌اند [۲۳]. magainin-1 و magainin-2 در ۱۹۸۷ از *Xenopus Laevis* جداسازی شدند. زمانیکه این موجود با پوست زخمی در آب حاوی سطوح بالای میکروبی قرار گرفت و دچار عفونت نشد، مشخص شد که magainin-2 با ۲۳ اسید آمینه دارای دامنه گسترده فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی است. نتیجه تحقیقات بر روی خواص دارویی magainin-2 باعث تولید شکل سنتزی آن یعنی MSI-78 یا پکسیگانان (pexiganan) شد. این شکل سنتزی که خواص ضد میکروبی بمراتب قویتری از magainin-2 دارد از جایگزینی اسیدهای آمینه شماره ۲۲، ۲۱، ۱۸، ۸ و ۷ در magainin-2 با اسید آمینه لیزین، جایگزینی اسید آمینه شماره ۱۹ با ایزولوسین و اسید آمینه شماره ۲۰ با لوسین به دست آمده است (جدول ۱). وزن مولکولی پکسیگانان ۲/۴ کیلودالتون می‌باشد. نتایج به‌وضوح، اثر بخشی و دامنه گسترده فعالیت پکسیگانان را در شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهد [۲۳]. فعالیت ضد باکتریایی پکسیگانان علیه طیف گسترده از گونه‌های باکتری آنرا به یک انتخاب امید بخش برای درمان عفونت‌های باکتریایی تبدیل کرده است. بعلاوه در زمینه کاربردهای موضعی پکسیگانان برای درمان زخم‌های دیابتیک در مراحل آخر آزمایشات کلینیکی است و بزودی وارد بازار می‌شود [۲۳، ۲۰، ۴۰].

پپتیدهای ضد میکروبی Protegrin بخشی از خانواده پپتیدهای ضد میکروبی درون‌زاد و منحصر بفرد می‌باشند که بخش مهمی از سیستم دفاعی میزبان را تشکیل می‌دهند.

ایجاد شرایط مناسب برای ایجاد انواع عفونت‌های دهان و دندان می‌کند. کاربرد موضعی ایزگانان هیدروکلراید به شکل قابل توجهی کل باکتری‌های هوازی دهان، استرپتوکوک و مخمر را کاهش می‌دهد و بعنوان یک عامل ضد میکروبی دهان در جلوگیری از عفونت عمل می‌کند [۴].

[۴۶, ۴۲, ۱۱].

آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم کمتر می‌باشد [۴]. ایزگانان فعالیت باکتری‌کشی سریع خود را در بزاق در مقایسه با آنتی-بیوتیک‌های مرسوم حفظ می‌کند [۴]. فرآیندهای فاز III کلینیکال ایزگانان در بیماران در یافت کننده شیمی درمانی Stomatotoxic و بیماران با سرطان گردن و سر تحت درمان با اشعه یا شیمی درمانی در حال انجام است [۴]. درمان‌های فوق در این بیماران فلور دهان را تغییر داده و

جدول ۱- مقایسه توالی آمینواسیدی پپتیدهای ضد میکروبی Isegranin و Protegrin و Pexiganan و Magainin-2

پپتید ضد میکروبی	توالی آمینو اسیدی	منابع
Magainin-2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	۲۳
Pexiganan(MSI-78)	GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKK	۲۳
Protegrin	RGGRLCYCRRRFCVCGR	۴۲
Isegranin	RGGLCYCRGRFCVCGR	۴

پوست قورباغه مراحل چندگانه جداسازی و خالص‌سازی و سپس تست‌های میکروبیولوژیکی برای تعیین خواص میکروب‌کشی آنها نیاز دارد [۱۵]. با استفاده از این روش بیش از ۷۰۰ پپتید کاتیونی کشف شده است. با این وجود این روش‌های جداسازی پپتیدهای ضد میکروبی خسته کننده است، نیاز به مقادیر زیادی از مواد منبع دارد و معمولاً بازده پایینی دارد [۱۵]. از سوی دیگر سنتز شیمیایی پپتیدها با استفاده از تکنیک‌های فاز جامد سریعتر است، بصورت خودکار قابل انجام است و نیاز به مراحل ساده‌تر تخلیص دارند [۱۵]. این تکنیک اجازه مطالعه ارتباطات فعالیت ساختاری را بدون محدودیت‌های بیولوژیکی بدلیل سمیت می‌دهد. این روش امکان تلفیق اسید آمینه‌های غیر طبیعی را می‌دهد در حالیکه پپتیدهای تولید شده بوسیله ریبوزوم‌ها به یک زیرمجموعه از اسیدهای آمینه محدود شده است. با این حال سنتز شیمیایی پپتیدها هنوز گران است و محدودیت‌های مربوط به تغییرات پیچیده پس از ترجمه را دارد [۱۵]. در مورد پپتیدهای مورد بررسی در این پژوهش پپتید پکسیگانان دارای ساختار آلفا هلیکس خطی

اخیراً، شناسایی و معرفی پپتیدهای ضد میکروبی جدید با خواص ضد میکروبی قویتر توجه بسیاری از محققین را بخود جلب کرده است. بر این اساس نرم‌افزار و سایت‌های پیش بینی خواص ضد میکروبی متعددی از جمله، CAMP (Collection of Anti-Microbial Peptides)، AMP perd (Antimicrobial Peptid Prediction)، AMPA ، APD3 (Antimicrobial Peptide Database) (Antimicrobial Sequence Scanning System) برای پیش بینی فعالیت ضد میکروبی توسعه یافته است. بررسی و مقایسه خواص ضد میکروبی پپتیدهای پکسیگانان و ایزگانان با استفاده از این نرم‌افزارها نشان داد که پپتید حاصل از همجوشی پپتیدهای پکسیگانان و ایزگانان (با وزن مولکولی ۴/۴ کیلودالتون) خواص ضد میکروبی قوی-تری نسبت به هرکدام از پپتیدها به تنهایی دارد [۱۴, ۳۱, ۳۵].

دو روش برای بدست آوردن پپتیدهای ضد میکروبی وجود دارد، جداسازی از موجودات میزبان یا سنتز شیمیایی [۱۵]. جداسازی این مولکول‌های دفاعی از بافت‌های میزبان مثل

پروتئین‌ها شده و از تجمع و تشکیل ساختارهای سه بعدی ناصحیح جلوگیری می‌کند. بنابراین قرار گرفتن پروتئین نوترکیب در ER موجب بسته‌بندی صحیح پروتئین شده و در نتیجه پایداری و تجمع آن افزایش می‌یابد. توالی KDEL از جمله توالی‌هایی است که برای قرار گرفتن پروتئین در شبکه آندوپلاسمی در مطالعات متعددی استفاده و کارایی آن به اثبات رسیده است [۹]. علاوه بر تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که وجود توالی حفاظت شده ACCAUGG (توالی کوزاک) در اطراف ناحیه کدون آغاز، اثر مطلوبی بر بیان ژن و کارایی ترجمه دارد [۲۹].

تا کنون هیچ گزارشی مبنی بر بیان پروتئین نو ترکیب پکسیگانان در گیاه و همچنین پپتید حاصل از همجوشی پپتیدهای پکسیگانان و ایزگانان بعنوان یک پپتید جدید وجود ندارد. هدف از این تحقیق انتقال ژن‌های کد کننده پپتید پکسیگانان و پکسیگانان-ایزگانان بعنوان یک پپتید جدید به گیاه توتون با هدف تولید پپتید نوترکیب به منظور بررسی و مقایسه فعالیت ضد باکتریایی این پپتیدها علیه پاتوژن‌های انسانی است.

مواد و روشها

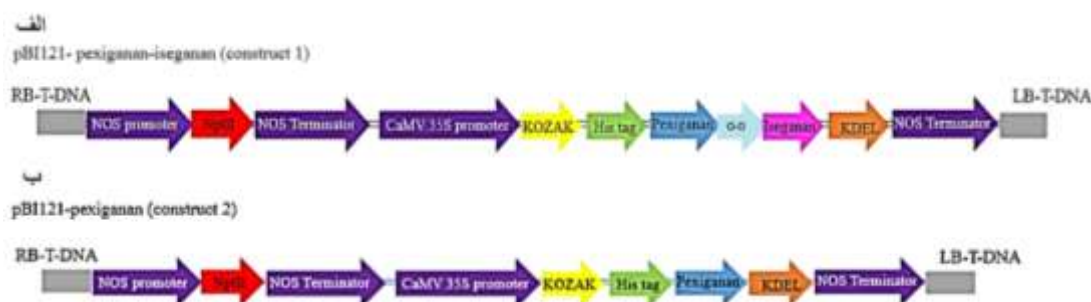
ساخت سازه‌های بیان pBI121-pexiganan و pBI121- pexiganan-iseiganan: توالی نوکلئوتیدی کد کننده پپتید پکسیگانان (22 اسید آمینه: GIGKFLKAKKFGKAFVKI) و ایزگانان (17 اسید آمینه: RGGLCYCRGRFCVC) از پایگاه اطلاعاتی پپتیدهای ضد میکروبی (VGR) از پایگاه اطلاعاتی پپتیدهای ضد میکروبی (APD) بدست آمد. برای هر سازه توالی کوزاک (CCACCAUG)، 6His tag بترتیب به انتهای 5' توالی‌های کد کننده و توالی سیگنال پپتید KDEL به انتهای 3' توالی‌های کد کننده اضافه شد. برای سازه همجوش پکسیگانان-ایزگانان، توالی‌های کد کننده پکسیگانان و ایزگانان با دو کدون کد کننده گلیسین بعنوان اتصال دهنده به یکدیگر متصل شدند (شکل ۱). در نهایت، توالی‌های نوکلئوتیدی طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار Gene Designer 2.0 بر اساس جدول

می‌باشد و در هیچ منبعی اشاره‌ای به تغییرات پس از ترجمه این پپتید نشده است [۲۳]. اما پپتید Iseiganan پپتیدی با ساختار صفحات بتا می‌باشد که دارای دو پل دی سولفیدی بین سیستمین شماره ۵ و ۱۴ و سیستمین شماره ۷ و ۱۲ می‌باشد [۴]. بنابر این بیان ژن‌های ضد میکروبی در میزبان مناسب یک راه حل مؤثر برای این مشکل است [۳۰، ۴۴]. به این منظور سیستم‌های بیان پروکاریوتی و یوکاریوتی تولید پروتئین نوترکیب مثل باکتری‌ها، قارچ‌ها، سلول‌های حشرات و پستانداران و سیستم‌های بیان گیاهی توسعه یافته‌اند [۳۳، ۴۸].

در طی پیشرفت زیست‌فناوری و توسعه روش‌های ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، میزبان‌های مختلفی مانند باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها، سلول‌های پستانداران، جلبک‌ها، حشرات، سلول‌های سوسپانسیون گیاهی، ریشه‌های موین، جانوران و گیاهان تراژن برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است [۱۷، ۱۸]. سیستم‌های بیان مبتنی بر گیاه بعنوان ابزار ارزشمندی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب یوکاریوتی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲۱، ۳۸]. سیستم‌های تولید پروتئین نوترکیب بر مبنای گیاهان نسبت به سیستم‌های تولید مرسوم بدلیل عدم آلودگی آن‌ها با ویروس‌های حیوانی یا باکتریایی ایمن‌تر است [۲۲، ۳۹، ۴۴]. از دیگر مزایای تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های بیان گیاهی می‌توان به اقتصادی بودن تولید آن‌ها نسبت به سیستم‌های صنعتی، تولید فرآورده‌های زیستی فعال و مشابه شکل طبیعی تولید بالای پروتئین نوترکیب و پایداری بیشتر و همچنین عدم وجود خطرات ناشی از آلودگی اشاره کرد [۶، ۱۰، ۱۷]. از طرفی، امکان هدایت پروتئین سنتز شده به اجسام داخل سلولی با هدف پایداری بیشتر، وجود دارد [۱۰]. با استفاده از توالی‌های هدف‌گیری کننده به جایگاه‌های مناسب در سلول نیز می‌توان موجبات افزایش تجمع پروتئین نوترکیب را فراهم آورد [۴۷]. شبکه آندوپلاسمی سلول (ER) حاوی پروتئین‌های چاپرونی مختلف است که موجب بسته‌بندی صحیح

سازه‌های نوترکیب pBI121-pexiganan-iseganan (سازه ۱) و pBI121-Pexiganan (سازه ۲) بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های Pexiganan- و Pexiganan Iseganan و همچنین جفت آغازگرهای مربوط به ناقل pBI121 (جدول ۲) تأیید شدند.

ترجیح کدون‌ی موجود در نرم‌افزار برای گیاه توتون بهینه‌سازی شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی به شکل مصنوعی توسط شرکت General Biosystems آمریکا سنتز شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی سنتز شده پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی BamH I و SaC I در ناقل بیان pBI121 هضم شده با این دو آنزیم همسانه‌سازی گردیدند. سپس



شکل ۱- نقشه (الف) pBI121-pexiganan-iseganan (سازه ۱) و (ب) pBI121-pexiganan (سازه ۲). توالی 6His-tag و سیگنال شبکه آندوپلاسمی (KDEL) بترتیب به انتهای C- ترمینال و N- ترمینال ژن‌ها اضافه شدند. ژن‌های بهینه‌سازی شده pexiganan-iseganan و pexiganan تحت کنترل پروموتور 35S و ترمیناتور NOS در وکتور pBI121 همسانه‌سازی شدند. وکتور pBI121 حامل کننده ژن مقاومت به کانامایسین (NptII) تحت کنترل پروموتور NOS می‌باشد.

جدول ۲- لیست و توالی آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش.

Primers	Sequence	Product length (bp)	Ta (Annealing Temperature) (C°)
virG-F	CCTTGGGCGTCGTCATAC		
virG-R	TCGTCCTCGGTCGTTTCC	529	55
Pex-isF	CCAGGGAGGAATTGGAAAGTT		
Pex-isR	GCCACACAAACGCAAAA	127	49
PexF	CCATCATCATGAAAACCTAT		
PexR	CTATAGCTCATCCTTGGTA	109	49

Ta, temperature annealing; F, Forward; R, Reverse.

آغازگرهای اختصاصی توالی پکسیگانان و پکسیگانان-ایزگانان (جدول ۲) استفاده شد. سپس از کلون‌های تأیید شده با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت VIVANTIS (UK) [۲۸] انجام شد. پلاسمید استخراج شده با روش الکتروپوریشن به سلول‌های مستعد *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58 با استفاده از دستگاه Xcell™ GenePulser منتقل شد و روی محیط انتخابی LB جامد

انتقال ناقل بیان به باکتری و شناسایی کلون‌های نوترکیب: از سلول‌های مستعد باکتری *Escherichia coli* سویه DH5α جهت ترانسفورماسیون به روش الکتروپوریشن با استفاده از دستگاه Xcell™ GenePulser استفاده شد. باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط انتخابی LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کشت شدند. بمنظور تأیید کلون‌های نوترکیب از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از

۲۸ درجه سانتیگراد و چرخه نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. واکنش مرتب ریزنمونه‌ها روی این محیط انتخابی تا تشکیل گیاهچه روی ریزنمونه‌های برگ‌ی انجام گرفت. پس از ظهور گیاهچه اطراف ریزنمونه‌ها، گیاهچه‌های تشکیل شده از روی ریزنمونه‌ها جداسازی شد و به محیط جدید حاوی ترکیب آنتی‌بیوتیک و هورمون مشابه قبل منتقل شدند. پس از رسیدن ارتفاع گیاهچه‌ها به ۲ سانتی‌متر گیاهچه‌ها به محیط انتخابی حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و مروپنم با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر و NAA (Naphthylacetic Acid) ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر جهت هدایت ریزنمونه‌ها به تشکیل ریشه، منتقل شدند. پس از تشکیل ریشه و رسیدن ارتفاع گیاهچه‌های حاصل به ۵ سانتی‌متر، گیاهچه‌ها به گلدان‌های حاوی پرلیت و خاک به نسبت مساوی منتقل شدند. پس از استقرار گیاهان در خاک برداشت ریزنمونه‌های برگ‌ی از گیاهان تراژن حاصل جهت آنالیزهای بعدی انجام شد.

استخراج DNA ژنومی و تأیید تراژنی: بمنظور تأیید وجود ژن Pexiganan-Iseganan در گیاهان تراژن حاصل از سازه ۱ و ژن Pexiganan در گیاهان تراژن حاصل از سازه ۲، استخراج DNA از برگ گیاهان بروش CTAB (trimethylammonium bromide Cetyl) انجام شد [۱۳]. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی DNA استخراج شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های Pexiganan-Iseganan (جدول ۲) انجام شد و سپس محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد. بمنظور اطمینان از عدم حضور آلودگی به آگروباکتریوم واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی DNA استخراج شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژنوم آگروباکتریوم، VirG (جدول ۲)، انجام شد و سپس محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد.

حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و ریفاپیسین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر قرار داده شد. کلون‌های نوترکیب تأیید شده بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های pexiganan-iseiganan و pexiganan برای انتقال به ریزنمونه‌های برگ‌ی گیاه توتون انتخاب شدند.

مواد گیاهی: بذرهای توتون (*Nicotiana tabacum* Cv.turkish) به مدت ۱۰ دقیقه در محلول شوینده (۳۰۰ μL هیپوکلریت سدیم ۰.۵٪، ۶ μL تریتون ۱۰٪ و ۷۰۰ μL آب مقطر) غوطه‌ور شده تا ضدعفونی شوند و سپس پنج بار با آب مقطر استریل شسته شدند. بذرها بصورت فاصله‌دار بر روی محیط MS (۴ گرم از پودر MS و ۱۰ گرم پودر آگار در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب) [۳۷] قرار داده شد و در شرایط نوری ۱۰۰۰۰ لوکس و در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتیگراد در اتاق کشت نگهداری شدند. نمونه برگ‌ی سترون از گیاهان رشد یافته از این بذرها تهیه شد. برگ‌ها در عرض به فواصل یک سانتی‌متر برش داده شدند، سپس درون مایع تلقیح *A. tumefaciens* حاوی سازه ۱ و سازه ۲ بصورت جداگانه منتقل شده و ۵ دقیقه تکان داده شدند. ریزنمونه‌های برگ‌ی آلوده به باکتری روی کاغذ صافی سترون قرار داده شدند تا خشک شوند. سپس روی محیط هم‌کشتی MS بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک قرار داده شدند بطوریکه سطح فوقانی برگ روی محیط کشت قرار گرفت. هم‌کشتی به مدت ۲ تا ۳ روز در شرایط تاریکی و در دمای ۲۲ تا ۲۶ درجه سانتیگراد انجام شد و سپس ریزنمونه‌ها به محیط انتخابی حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و مروپنم با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر جهت حذف آلودگی آگروباکتریوم و رشد انتخابی ریزنمونه‌های ترانسفورم و BAP (6-Benzylaminopurine) ۲ میلی‌گرم بر لیتر و NAA (Naphthylacetic Acid) ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر جهت هدایت ریزنمونه‌ها به تشکیل شاخساره، در دمای ۲۵ تا

Bradford [۵] اندازه‌گیری و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

آزمایش فعالیت ضد میکروبی: بررسی فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان نوترکیب تولید شده با استفاده از بررسی فعالیت پروتئین کل استخراج شده از برگ گیاهان علیه میکروارگانیسم‌های انسانی شامل باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) PTCC1112، باکتری گرم منفی *Escherichia coli* PTCC 1330 (ATCC 8739) استرین، قارچ *Aspergillus niger* PTCC 5010 (ATCC 10864) و مخمر *Candida albicans* PTCC5027 (ATCC 10231) با استفاده از روش انتشار دیسکی [۴۵] انجام شد. بدین منظور میکروارگانیسم‌های مورد نظر تا $OD_{600nm}=0.4$ در محیط LB مایع رشد داده شدند و به میزان ۵۰ میکرولیتر به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت LB جامد که دمای آن پایین آمده بود اضافه شدند و در پتری دیش ریخته شدند. بعد از بستن محیط، با استفاده از تیپ استریل در محیط داخل پتری‌دیش‌ها چاهک‌هایی تعبیه شد و در هر چاهک به میزان ۵۰ میکروگرم از پروتئین استخراج شده از گیاهان اضافه شد. پتری دیش‌ها بمدت ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه برای رشد میکروارگانیسم‌ها قرار داده شدند. میزان فعالیت ضد میکروبی پروتئین‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف چاهک‌ها بررسی گردید. میکروارگانیسم‌های استفاده شده در این پژوهش از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شدند. در تست بررسی خواص ضد میکروبی $250 \mu g$ از آنتی بیوتیک کانامایسین بعنوان کنترل مثبت و پروتئین استخراج شده از گیاهان توتون غیر تراژن بعنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

بررسی پایداری دمایی پپتیدهای نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان تولید شده: بمنظور مطالعه پایداری دمایی پپتیدهای نوترکیب تولید شده در این پژوهش،

استخراج RNA و سنتز cDNA: بمنظور تأیید بیان ژن‌های Pexiganan-Isegaran و Pexiganan در گیاهان تراژن حاصل، استخراج RNA مطابق با روش کیت دنایزیت (Column RNA Isolation kit I DNaseI (شرکت ThermoScientific) آلودگی ژنومی حذف شد و سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA synthetase (شرکت ThermoScientific) با مقدار ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده و با استفاده از آغازگر OligodT انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از cDNA: بمنظور تأیید بیان ژن‌های Pexiganan-Isegaran و Pexiganan در گیاهان تراژن تولید شده در این پژوهش، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی cDNA سنتز شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های Pexiganan-Isegaran و Pexiganan در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر (از استوک با غلظت ۱۰ پیکو مول) از هر آغازگر اختصاصی ژن‌ها $10 \mu l$ از PCR master mix (Amplicon) انجام شد. حجم کل به منظور تکثیر در ۱ چرخه دمایی ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه، ۴۹ درجه سانتیگراد بمدت ۴۵ ثانیه برای ژن Pexiganan-Isegaran و ۴۹ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه برای ژن Pexiganan، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه و نهایتاً چرخه ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد قرار داده شد.

استخراج پروتئین: استخراج پروتئین با استفاده از روش استون و همکاران [۴۳] انجام گردید. به این ترتیب که ۱۰ گرم از بافت برگ گیاه در ۵۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات (PBS (Na₂HPO₄ 4.3 mM, KCl 2.7mM, NaCl 137mM) در هاون کاملاً کوبیده و همگن شد و سپس در سانتریفیوژ با سرعت ۸۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه روشن‌شین حاوی پروتئین از بافت برگ‌گی جداسازی شد. غلظت پروتئین استخراج شده بروش

استفاده از ستون آگارز-نیکل آزمون الیزا با استفاده از آنتی بادی ضد His-tag انجام شد. پروتئین استخراج شده از گیاهان غیر تراژن بعنوان کنترل منفی استفاده شد و یک پروتئین حاوی سیگنال پپتید His-tag بعنوان کنترل مثبت استفاده شد. بمنظور انجام آزمون الیزا، ۵۰ میکروگرم از پروتئین‌های خالص شده در چاهک‌های پلیت الیزا (با سه تکرار) بارگذاری شد و بمدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس چاهک‌ها دو بار با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBS-T (0.144% KCl, 0.02% NaHPO₄, 0.024% KH₂PO₄, 0.8% NaCl, and 50% Tween 20, PH 7.4) شستشو داده شدند و مجدداً دو بار با محلول PBS (0.02% KCl, 0.144% NaHPO₄, 0.024% KH₂PO₄, and 0.8% NaCl, PH 7.4) شستشو داده شدند. پس از آخرین مرحله شستشو، ۲۰۰ میکرولیتر از ۲٪ BSA (Bovine Serum Albumin solved in PBST) درون هر چاهک اضافه شد و بمدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس چاهک‌ها با PBS-T و PBS بترتیب مجدداً شستشو داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی ۲mg/ml His-tag به هر چاهک اضافه شد و بمدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس مجدداً چاهک‌ها با PBS-T و PBS بترتیب شستشو داده شدند و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول TMB (50 μl TMB A+) (50 μl TMB B) به هر چاهک اضافه شد و بمدت ۱ ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد. سپس بمنظور متوقف کردن واکنش ۳۰ میکرولیتر از H₂SO₄ ۵ مولار به هر چاهک اضافه شد. در نهایت جذب نوری هر چاهک با استفاده از اسپکتوفتومتر در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد و ۲ BSA % بعنوان بلانک مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها

آنالیز آماری داده‌ها بوسیله آزمون یکطرفه (ANOVA) انجام شد. بمنظور مقایسه میانگین داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و Graphpad Prism5 و آزمون دانکن استفاده شد.

پروتئین کل استخراج شده از گیاهان تراژن و گیاه غیرتراژن توتون در معرض دماهای ۵۰°C، ۷۵°C و ۱۰۰°C به مدت ۱ ساعت قرار داده شد و سپس فعالیت ضد میکروبی ۵۰ μg از پروتئین‌ها علیه باکتری *E. coli* بمدت ۱۵ ساعت در دمای ۳۷°C با روش انتشار دیسکی مورد بررسی قرار گرفت.

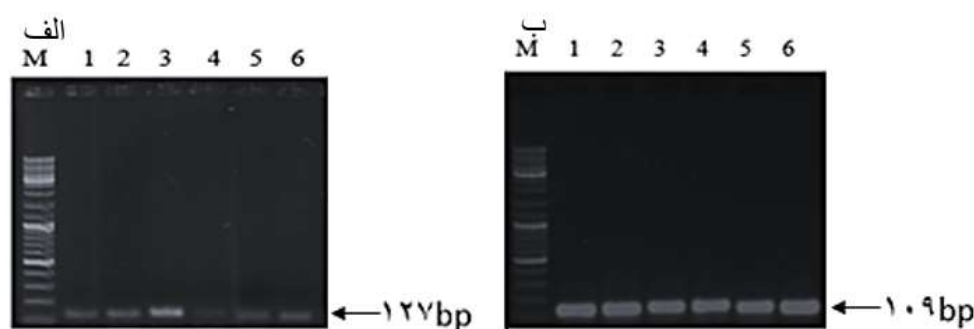
خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از ستون آگارز-نیکل: پروتئین‌های نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان با استفاده از ستون آگارز-نیکل (cat. No. 31014، شرکت کیاژن) خالص‌سازی شدند. در ابتدا، بمنظور متعادل سازی ستون آگارز-نیکل ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات 100mM با pH ۷ به مدت یک ساعت روی ستون بارگذاری شد. پس از خروج بافر فسفات از ستون ۰/۵ mg/ml از پروتئین استخراج شده از گیاهان حاوی پروتئین‌های نوترکیب روی ستون‌ها بارگذاری شد و ستون‌ها بمدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از ۱۲ ساعت اجازه داده شد تا محتوای ستون خارج شود. سپس هر ستون دو بار با ۱۰۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو (50mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) شستشو داده شد. در نهایت بمنظور استخراج پپتیدهای خالص از ستون بافر پاک کننده (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8.0) مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت پپتیدهای خالص شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. جهت تأیید حضور پپتیدهای نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان در محصول نهایی خالص سازی آزمون الیزا با استفاده از آنتی بادی ضد His-tag انجام شد.

تأیید حضور پپتیدهای نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان در محصول نهایی خالص سازی با استفاده از آزمون الیزا: بمنظور بررسی حضور پپتیدهای نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان پس از خالص سازی با

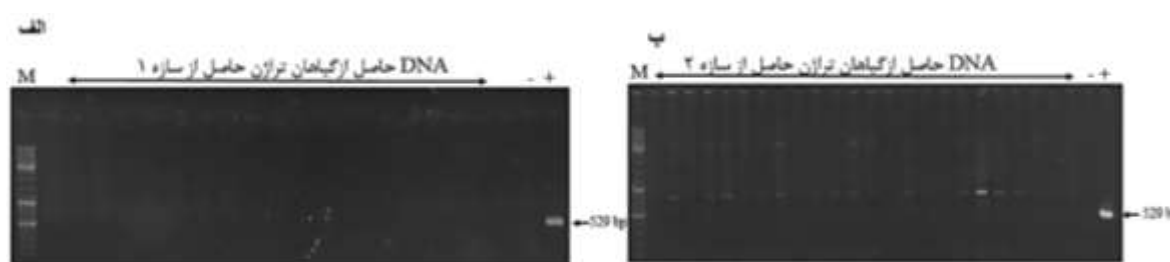
نتایج و بحث

(شکل ۲). همچنین عدم حضور آلودگی به آگروباکتریوم با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی DNA استخراج شده از گیاهان تراژن حاصل با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژنوم آگروباکتریوم انجام شد. عدم حضور قطعه ۵۲۹ جفت بازی مربوط به ژنوم آگروباکتریوم عدم آلودگی نمونه‌ها را اثبات کرد (شکل ۳).

صحت همسانه‌سازی سازه‌های طراحی شده در باکتری *A. tumefaciens* با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن Pexiganan- Isegranin و Pexiganan به ترتیب با مشاهده قطعه ۱۲۷ جفت بازی مربوط به ژن Pexiganan و قطعه ۱۰۹ جفت بازی مربوط به ژن Pexiganan روی ژل آگارز اثبات شد



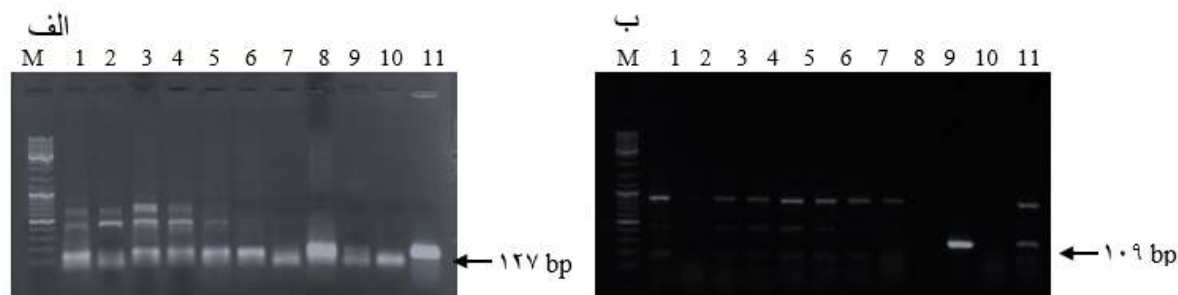
شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصول PCR از *A. tumefaciens* ترانسفورم شده با سازه ۱ (شکل الف) و سازه ۲ (شکل ب) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های Pexiganan-isegranin، pex-isF/pex-isR، pexiganan-pexF/pexR، در هر کدام از شکل‌ها، M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ bp، چاهک‌های ۱ تا ۶: نمونه‌های باکتری ترانسفورم شده با سازه ۱ (محصول ۱۲۷ جفت بازی در شکل الف) و سازه ۲ (محصول ۱۰۹ جفت بازی در شکل ب)، چاهک‌های ۷: نمونه کنترل منفی PCR (H₂O). M: Gene Ruler TMDNA Ladder Mix 1kb (Fermentas).



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول PCR از DNA استخراج شده از گیاهان تراژن ترانسفورم شده با سازه ۱ (شکل الف) و سازه ۲ (شکل ب) با آغازگرهای اختصاصی ژنوم آگروباکتریوم (*virG*). در هر کدام از شکل‌ها، M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ bp، راهک‌های با علامت - : نمونه کنترل منفی PCR (H₂O)، چاهک‌های با علامت + : کنترل مثبت PCR (آگروباکتریوم). M: Gene Ruler TMDNA Ladder Mix 1kb (Fermentas)

به ژن Pexiganan-Isegranin در گیاهان تراژن با سازه ۱ و قطعه ۱۰۹ جفت بازی مربوط به ژن Pexiganan در گیاهان تراژن با سازه ۲ را مورد تأیید قرار داد (شکل ۴).

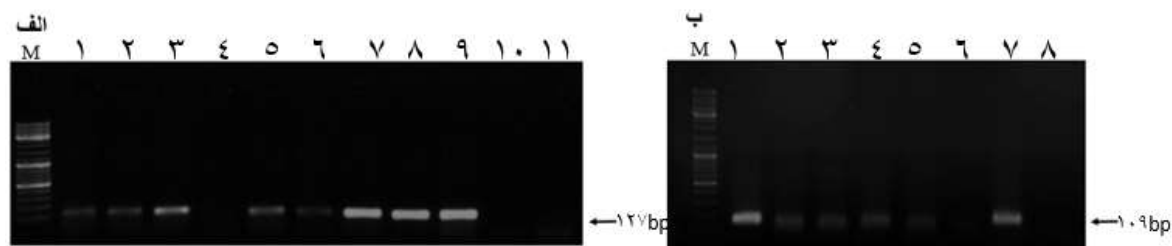
انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی DNA استخراج شده از گیاهان تراژن حاصل با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن Pexiganan و Pexiganan-Isegranin و الکتروفورزی محصول بدست آمده وجود قطعه ۱۲۷ جفت بازی مربوط



شکل ۴- نقوش الکتروفورزی محصول PCR از DNA استخراج شده از گیاهان تراژن ترانسفورم شده با سازه ۱ (شکل الف) و سازه ۲ (شکل ب) با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *pexF/pexR*، *pexiganan* و *pex-isF/pex-isR*، *pexiganan-iseiganan*، *pexF/pexR*، *pexiganan* و *pex-isF/pex-isR* در هرکدام از شکل‌ها، M: نشانگر مولکولی ۱۰۰bp، چاهک‌های ۱ تا ۶: نمونه‌های باکتری ترانسفورم شده با سازه ۱ (محصول ۱۲۷ جفت بازی در شکل الف) و سازه ۲ (محصول ۱۰۹ جفت بازی در شکل ب)، چاهک‌های ۱۱ (شکل الف) و ۹ (شکل ب): کنترل مثبت PCR (آگروباکتریوم) چاهک‌های ۷ نمونه کنترل منفی PCR . Gene Ruler TMDNA Ladder Mix 1kb (Fermentas): M(H₂O).

حاصل با انجام PCR روی cDNA حاصل از گیاهان تراژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *Pexiganan-Iseiganan* و *Pexiganan* با تکثیر قطعه قطعه ۱۲۷ جفت بازی مربوط به ژن *Pexiganan-Iseiganan* در گیاهان تراژن با سازه ۱ و قطعه ۱۰۹ جفت بازی مربوط به ژن *Pexiganan* در گیاهان تراژن با سازه ۲ تایید شد (شکل ۵).

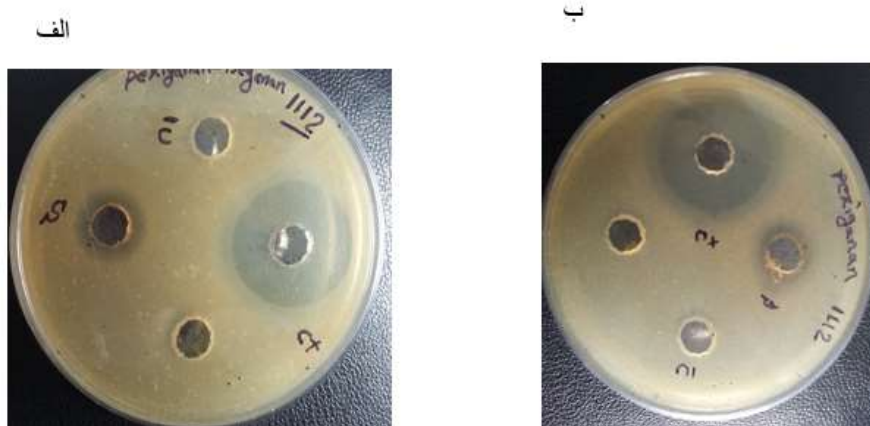
در فرآیند انتقال ژن جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب، ترجیح کدونی بین گونه‌های مختلف از اهمیت بالایی برخوردار است و موفقیت یا شکست بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب تا حد زیادی به این مورد وابسته است [۲۷]. در این پژوهش توالی مربوط به ژن‌های *Pexiganan* و *Pexiganan-Iseiganan* بر اساس گیاه توتون بهینه‌سازی شد. بیان ژن‌های مورد نظر در گیاهان تراژن



شکل ۵- نقوش الکتروفورزی محصول PCR از cDNA سنتز شده از گیاهان تراژن حاصل سازه ۱ (شکل الف) و سازه ۲ (شکل ب) با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *pexF/pexR*، *pexiganan* و *pex-isF/pex-isR*، *pexiganan-iseiganan*، *pexF/pexR*، *pexiganan* و *pex-isF/pex-isR* در هرکدام از شکل‌ها، M: نشانگر مولکولی ۱۰۰bp، چاهک‌های ۱ تا ۸: گیاهان ترانسفورم شده با سازه ۱ (محصول ۱۲۷ جفت بازی در شکل الف) و چاهک‌های ۱ تا ۶: گیاهان ترانسفورم شده با سازه ۲ (محصول ۱۰۹ جفت بازی در شکل ب)، چاهک‌های ۱۰ در شکل الف و ۸ در شکل ب نمونه: کنترل منفی PCR (H₂O)، چاهک ۱۱ در شکل الف و ۷ در شکل ب: کنترل مثبت (آگروباکتریوم). Gene Ruler TMDNA Ladder Mix 1kb (Fermentas): M.

پپتیدهای تولید شده به اثبات رسید (شکل ۶).

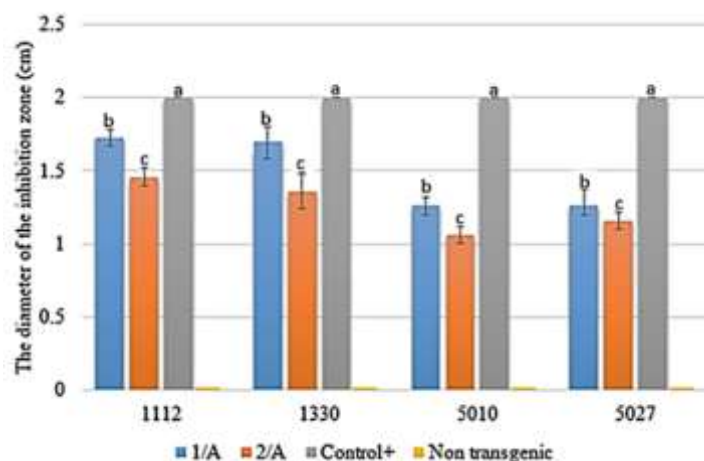
تولید پپتیدهای نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان در گیاهان تراژن حاصل با بررسی فعالیت ضد میکروبی



شکل ۶- فعالیت ضد میکروبی پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان ترانسفورم شده با سازه ۱ (شکل الف) و سازه ۲ (شکل ب). فعالیت ضد میکروبی پروتئین کل (۵۰ µg) حاصل از گیاهان تراژن علیه *E. coli* در شکل‌های الف و ب، S: ۵۰ µg از پروتئین کل استخراج شده از گیاهان ترازیخت با سازه ۱ و سازه ۲. C: پروتئین استخراج شده از گیاهان غیرترازیخت، C+: ۲۵۰ µg آنتی بیوتیک کانامایسین.

تخریب و مرگ سلول باکتری می‌شود [۱۹، ۲۳]. در این مطالعه برای نخستین بار بررسی فعالیت ضدقارچی پپتیدهای نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان انجام شد. مطالعات بسیاری روی نحوه فعالیت ضدقارچی پپتیدهای ضد میکروبی انجام شده است. در مورد پپتیدهای پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان نحوه فعالیت ضد قارچی همچنان نیاز به مطالعه دارد. بعلاوه نتایج این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین فعالیت ضد میکروبی پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان نوترکیب تولید شده وجود دارد. بر اساس نتایج (نمودار ۱) پپتید نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان خواص ضد میکروبی قویتری از پکسیگانان به تنهایی نشان می‌دهد. نتایج بررسی خواص ضد میکروبی این پپتیدها با نرم افزارهای CAMP، AMPA و APD3، AntiBP2 نیز نشان داده بود که پکسیگانان-ایزگانان خواص ضد میکروبی قویتری نسبت به پکسیگانان دارد. این نتایج احتمالاً به علت نحوه عمل منحصربفرد این پپتیدها در تخریب اختصاصی باکتری‌ها است. عمل تخریبی پکسیگانان و ایزگانان با اتصال این پپتیدها به دیواره لیپوپلی ساکاریدی غشای سلولی باکتری و در نهایت تخریب سلول باکتری اتفاق می‌افتد.

نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت ضد میکروبی پروتئین استخراج شده از گیاهان تراژن حاصل نشان دهنده اثر ضد میکروبی بالای پپتیدهای پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان نسبت به نمونه کنترل منفی (پروتئین استخراج شده از گیاهان توتون غیر تراژن) بود (نمودار ۱). مقایسه نتایج تست‌های ضد میکروبی علیه پاتوژن‌ها باکتریایی شامل *E. coli* و *S. aureuse*، پاتوژن قارچی *A. niger* و مخمر *C. albicans* نشان داد این پپتیدهای نوترکیب اثر ضد باکتریایی قویتری نسبت به اثر ضد قارچ و مخمر دارند (نمودار ۱). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که پکسیگانان و ایزگانان دامنه فعالیت گسترده‌ای علیه باکتری-های گرم مثبت و گرم منفی و مخمر دارند [۴، ۱۶، ۲۳]. این نتایج ممکن است مربوط به نحوه عمل تخریبی پپتیدهای کاتیونیک تولید شده توسط موجودات متفاوت مانند باکتری‌ها، گیاهان و حیوانات روی غشای سلولی باکتری‌ها باشد [۱، ۲]. پپتیدهای ضد میکروبی با اتصال به لیپوپلی ساکارید موجود در غشای سلول باکتری باعث تشکیل منافذی در غشای سلولی و سپس مختل شدن سنتز DNA و پروتئین درون سلول باکتری می‌شوند. این فرآیند به همراه بهم ریختن نیروی اسمزی در سلول باکتری باعث



شکل ۷- مقایسه فعالیت ضد میکروبی پروتئین نوترکیب استخراج شده از گیاهان تراژن حاصل از دو سازه. اختلاف معناداری بین فعالیت ضدباکتریایی دو سازه وجود دارد. قطر هاله ممانعت‌کنندگی به سانتیمتر در محور Y و پاتوژن‌ها شامل *E. coli* (1112), *S. aureus* (1330), *A. niger* (5010) و *C. albicans* (5027) در محور X نشان داده شده است. در تمام موارد P value of ≤ 0.05 معنادار در نظر گرفته شده است.

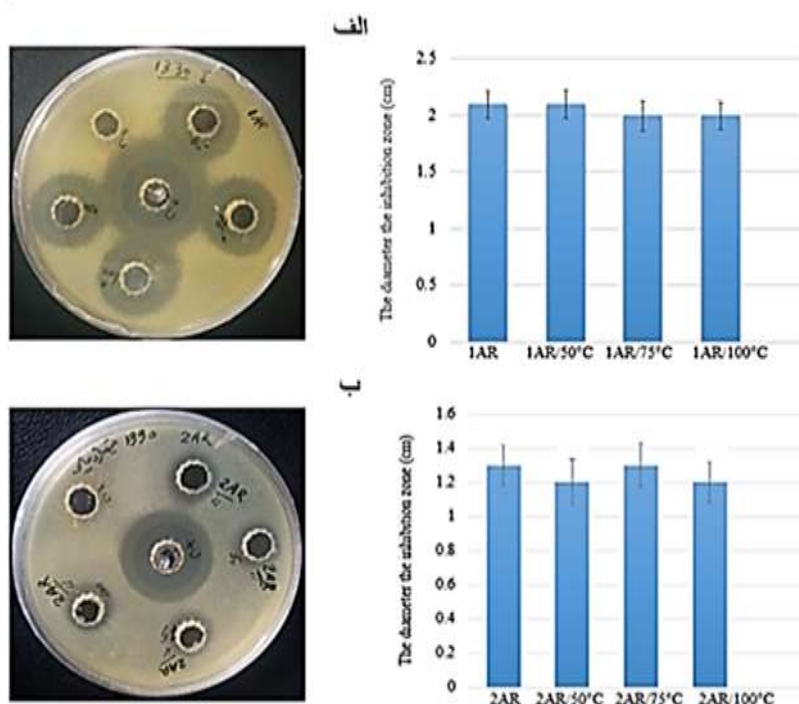
احتمالی برای قویتر بودن خواص ضد میکروبی پپتید نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان نوترکیب تولید شده در این پژوهش نسبت به پپتید نوترکیب پکسیگانان تولید شده باشد.

پایداری دمایی پپتیدهای نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان تولید شده: نتایج تست پایداری دمایی پپتیدهای نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان نشان داد که این پپتیدها خواص ضد میکروبی خود را تا دمای $^{\circ}\text{C}$ ۱۰۰ به خوبی حفظ می‌کنند (شکل ۸). و از آنجایی که استفاده از این پپتیدها بعنوان دارو نیازمند استفاده از میزان معین از پپتید خالص می‌باشد بنابراین خالص‌سازی یکی از مراحل بسیار مهم تولید این پپتیدهای نوترکیب بعنوان دارو می‌باشد. مراحل خالص‌سازی پپتیدهای نوترکیب تولید شده در گیاهان شامل مراحل با شرایط خالص‌سازی ویژه از جمله دمای بالا می‌باشد [۱۲]. بعلاوه یکی از راهکارهای پیشنهادی برای کاهش پروتئین‌های میزبان تا ۹۰٪ رسوب دمایی در ۶۵-۷۰ درجه سانتیگراد در پروسه بازیابی پروتئین نوترکیب تولید شده است [۷]. بنابراین استفاده از دمای بالا برای استخراج و خالص‌سازی

حتی اگر پپتیدهای ضد میکروبی اثر خود را از طریق مسیرهای داخل سلولی مانند اثر روی مسیرهای سنتز DNA, RNA و پروتئین اعمال کنند بازهم میانکنش اولیه پپتید با غشای سلولی برای فعالیت ضد میکروبی نیاز است و این میانکنش دامنه سلول‌های هدف پپتیدها را تعیین می‌کند. اکثر پپتیدهای ضد میکروبی که غشای میکروارگانیسم‌ها را هدف قرار می‌دهند، آمفی‌پاتیک هستند، بدین معنا که آن‌ها کاتیونیک و هیدروفوب می‌باشند. این ویژگی باعث ایجاد میانکنش الکترواستاتیک اولیه با غشای سلولی با بار منفی می‌شود. عمل پپتیدهای ضد میکروبی پس از میانکنش اولیه متوقف نمی‌شود. بخش هیدروفوب یک پپتید ضد میکروبی به ورود پپتید ضپد میکروبی داخل غشای سلولی کمک می‌کند. بنابراین میانکنش اصلی شامل میانکنش‌های یونی و هیدروفوبیک است و این میانکنش‌ها بیشتر وابسته به دو ویژگی کاتیونیک و هیدروفوبیک بودن پپتید است [۲۴, ۳۴]. بررسی ویژگی‌های هیدروفوبیسی و کاتیونیک پپتیدهای پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان با استفاده از APD3 [۲۶] نشان داد که پپتید حاصل از همجوشی پکسیگانان و ایزگانان (پکسیگانان-ایزگانان) قدرت کاتیونی بالاتری دارد که می‌تواند یکی از دلایل

نوترکیب تولید شده در دمای بالا یکی از ویژگی‌های مهم در خالص‌سازی پپتیدهای نوترکیب تولید شده در گیاه می‌باشد.

پپتیدهای نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان راهکاری مفید و قابل اجرا می‌باشد و هیچگونه تأثیری بر خاصیت ضد میکروبی آنها ندارد. پایداری دمایی پپتیدها



شکل ۸- پایداری دمایی پپتیدهای نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان. پایداری دمایی پپتیدهای نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان. شکل الف: تست ضد میکروبی و نمودار مربوط به پروتئین استخراج شده از گیاهان تراریخت حاوی سازه ۱ در دماهای ۱۰۰°C، ۷۵°C و ۵۰°C. بمدت ۱ علیه باکتری *E. coli*. شکل ب: تست ضد میکروبی و نمودار مربوط به پروتئین استخراج شده از گیاهان تراریخت حاوی سازه ۲ در دماهای ۱۰۰°C، ۷۵°C و ۵۰°C به مدت ۱ ساعت علیه باکتری *E. coli*. کنترل منفی: پروتئین استخراج شده از گیاهان غیر تراژن و کنترل مثبت: ۲۵۰ μg از آنتی بیوتیک کانامایسین. در تمام موارد $P \text{ value} \leq 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

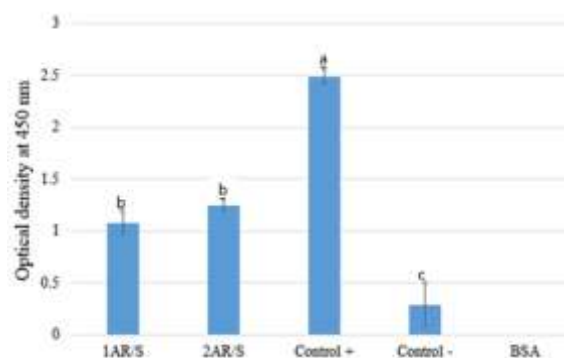
نشان داد که میانگین جذب نوری نمونه‌های پپتید خالص شده (با سه تکرار برای هر نمونه) برای هر دو سازه ۱ (IAR (pBI121-pexiganan-izeganan)) و سازه ۲ (2AR (pBI121-pexiganan-peixiganan)) بطور معنی داری ($P \text{ value} \leq 0.05$) بیشتر از نمونه‌های پروتئین خالص شده از گیاهان غیر تراژن است. همچنین نتایج الیزا نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار ($P \text{ value} \leq 0.05$) بین میزان پپتید خالص شده از گیاهان حاصل از دو سازه بود (شکل ۹).

تأیید حضور پپتیدهای نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان در پروتئین استخراج شده از گیاهان با استفاده از آزمون الیزا: بررسی حضور پپتیدهای نوترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان در پروتئین استخراج شده از گیاهان تراژن حاصل پس از خالص‌سازی پروتئین استخراج شده با استفاده از ستون His-tag و با انجام آزمون الیزا صورت گرفت. پروتئین خالص شده از گیاه غیر تراژن بعنوان کنترل منفی و یک پروتئین دارای سیگنال پپتید His-tag بعنوان کنترل مثبت آزمون الیزا استفاده شدند. نتایج

با توجه به نتایج الیزا نمونه‌های پروتئین استفاده شده جهت آزمون‌های ضد میکروبی حاوی میزان تقریباً یکسانی از پپتیدهای نو ترکیب پکسیگانان-ایزگانان و پکسیگانان بودند. بعلاوه، نتایج نشان‌دهنده کارآمدی سیستم خالص‌سازی با استفاده از ستون His-tag می‌باشد. گزارشات متعددی در استفاده موفقیت آمیز از سیستم خالص‌سازی با استفاده از ستون His-tag در خالص‌سازی پروتئین‌هایی مانند MAP30 و لاکتوفرین وجود دارد [۸، ۳۶].

سپاسگزاری

بدینوسیله از حمایت مالی ستاد توسعه زیست فناوری در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را داریم.



شکل ۹- نمودار مربوط به نتایج آزمون الیزا (خوانش چگالی نوری نتایج آزمون الیزا در طول ۴۵۰nm) نمونه‌های پپتید خالص شده از گیاهان تراژن حاصل از سازه ۱ (pBI121-pexiganan- (1AR/S) (iseganan) و گیاهان تراژن حاصل از سازه ۲ (pBI121-pexiganan) (2AR/S) که با برنامه ANOVA استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism5 ترسیم شده است. کنترل-: پپتید خالص شده از گیاهان غیر تراژن، کنترل+: پروتئین حاوی سیگنال پپتید His-tag و BSA: بلانک. در تمام موارد $P \text{ value} \leq 0.05$ معنادار در نظر گرفته شده است.

منابع

- ۱- غلامی، د.، امین زاده، س.، علوی، م.، کاظمی پور، ن.، ولیزاده، ج.، گوردزی، ط. ۱۳۹۳. شناسایی و بررسی برخی فعالیت‌های آنتی میکروبی باکتری بومی *Enterobacter sp. DGH3*. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۲۷: ۲۷۶-۲۶۹.
- ۲- دانشمند، ف. ۱۳۹۳. استخراج و خالص‌سازی پپتید ضد میکروبی جدید از گیاه عناب (*Ziziphus Jujuba*). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۲۷: ۲۲۳-۲۱۱.
- 3- Bahar, A. and D. Ren. 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6: 1543-1575.
- 4- Bellm, L., et al. 2002. Isegaran HCl: a novel antimicrobial agent. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 11: 1161-1170.
- 5- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- 6- Burnett, M.J. and Burnett, A.C. 2020. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet*, 2(2): 121-132.
- 7- Buyel, J.F., et al. 2014. Rational design of a host cell protein heat precipitation step simplifies the subsequent purification of recombinant proteins from tobacco. *Biochemical Engineering Journal*, 88: 162-170.
- 8- Chahardoli, M., et al. 2018. Recombinant production of bovine Lactoferrin-derived antimicrobial peptide in tobacco hairy roots expression system. *Plant physiology and biochemistry*, 123:414-421.
- 9- Conrad, U. and U. Fiedler. 1998. Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant molecular biology*, 38: 101-109.
- 10- Daniell, H., S.J. Streatfield, and K. Wycoff. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in plant science*, 6: 219-226.

- 11- Elad, S., et al. 2012. The antimicrobial effect of Iseganan HCl oral solution in patients receiving stomatotoxic chemotherapy: analysis from a multicenter, double blind, placebo-controlled, randomized, phase III clinical trial. *J Oral Pathol Med*, 41: 229-234.
- 12- Flamm, R.K., et al. 2015. In vitro spectrum of pexiganan activity when tested against pathogens from diabetic foot infections and with selected resistance mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother*, 59: 1751-4.
- 13- Gawel, N.J. 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomea. *Plant Mol. Biol. Report*, 9: 292-296.
- 14- Gautam, A., et al. 2016. Development of Antimicrobial Peptide Prediction Tool for Aquaculture Industries. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 8: 141-9.
- 15- Gaiser, R.A., L. Rivas, and P. López. 2011. Production of eukaryotic antimicrobial peptides by bacteria A review, 992-1002.
- 16- Ge, Y., et al. 1999. In Vitro Antibacterial Properties of Pexiganan, an Analog of Magainin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 782-788.
- 17- Gecchele, E., et al. 2015. A comparative analysis of recombinant protein expression in different biofactories: bacteria, insect cells and plant systems. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, e52459.
- 18- Geisse, S., et al. 1996. Eukaryotic expression systems: a comparison. *Protein expression and purification*, 8: 271-282.
- 19- Giles, F.J., et al. 2002. Iseganan HCl: a novel antimicrobial agent. *Expert Opin Investig Drugs*, 11: 1161-70.
- 20- Gomes, D., et al. 2020. Pexiganan in combination with nisin to control polymicrobial diabetic foot infections. *Antibiotics*, 9: 128.
- 21- Gomord, V.r. and L. Faye. 2004. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current opinion in plant biology*, 7: 171-181.
- 22- Gomord, V.r., et al. 2005. Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *TRENDS in Biotechnology*, 23: 559-565.
- 23- Gottler, L.M. and A. Ramamoorthy. 2009. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan — A highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788: 1680-1686.
- 24- He, K., et al. 1996. Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophysical journal*, 70: 2659-2666.
- 25- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H. and Yi, H. 2020. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in microbiology*, 11: 2559.
- 26- http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php.
- 27- Kang, T.-J., et al. 2004. Enhanced expression of B-subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 117: 175-187.
- 28- Kotchoni, S.O., et al. 2003. A home made kit for plasmid DNA mini-preparation. *African Journal of Biotechnology*, 2: 87.
- 29- Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research*, 15: 8125-8148.
- 30- Kuo, Y.-C., et al. 2013. Improving pharmaceutical protein production in *Oryza sativa*. *International journal of molecular sciences*, 14: 871-879.
- 31- Lira, F., et al. 2013. Prediction of antimicrobial activity of synthetic peptides by a decision tree model. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79: 3156-9.
- 32- López-Meza, J.E., et al. 2015. Antimicrobial peptides: Current and potential applications in biomedical therapies. *BioMed research international*, 2015 : 2015.
- 33- Ma, J.K.C., P.M.W. Drake, and P. Christou. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, 4: 794-805.
- 34- Madani, F., et al. 2011. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys*, 2011: 414729.

- 35- Meher, P.K., et al. 2017. Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. *Sci. Rep.*, 7: 42362.
- 36- Moghadam, A., et al. 2016. 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*, 11(7): e0159653.
- 37- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- 38- Owczarek, B., Gerszberg, A. and Hnatuszko-Konka, K. 2019. A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. *BioMed research international*.
- 39- Peterson, R.K.D. and C.J. Arntzen. 2004. On risk and plant-based biopharmaceuticals. *TRENDS in Biotechnology*, 22: 64-66.
- 40- pexiganan.
<http://www.dipegiumpharmaceuticals.com/locale/x/overview> .
- 41- Pushpanathan, M., P. Gunasekaran, and J. Rajendhran. 2013. Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. *International Journal of Peptides*, 2013: 15.
- 42- Soundrarajan, N., et al. 2019. Protegrin-1 cytotoxicity towards mammalian cells positively correlates with the magnitude of conformational changes of the unfolded form upon cell interaction. *Scientific reports*, 9: 1-12.
- 43- Stone, S.L. and D.J. Gifford. 1997. Structural and Biochemical Changes in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) Seeds During Germination and Early-Seedling Growth. I. Storage Protein Reserves. *International Journal of Plant Sciences*, 158: 727-737.
- 44- Swartz, J.R. 2001. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current opinion in biotechnology*, 12: 195-201.
- 45- Tendencia, E.A. 2004. Disk diffusion method. In *Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment*. 13-29.
- 46- Trotti, A., et al. 2004. A multinational, randomized phase III trial of iseganan HCl oral solution for reducing the severity of oral mucositis in patients receiving radiotherapy for head-and-neck malignancy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 58: 674-681.
- 47- Van Droogenbroeck, B., et al. 2007. Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic *Arabidopsis* seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 1430-1435.
- 48- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-395.
- 49- Zhang, Q.Y., et al. 2021. Antimicrobial peptides: Mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, 8:1-25.

Production of pexiganan-iseganan and pexiganan recombinant peptides in tobacco plants

Ataie-Kachoe E., Niazi A. and Aram F.

Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, I.R. of Iran.

Abstract

The evolution of pathogenic bacteria has led to the development of resistance mechanisms in many pathogens against conventional antibiotics, leading to the search for new therapeutic alternatives. Antimicrobial peptides (AMPs) are among the most promising alternative options to overcome the proliferation of antibiotic resistant pathogens. Pexiganan and Iseganan are two important antimicrobial peptides that exhibit rapid and potent lytic activity against a broad spectrum of pathogens. Software studies show that the fusion form of two peptides has much stronger antimicrobial properties than both of these peptides alone, so it has the potential to be introduced as a new peptide. The large-scale production of antimicrobial peptides remains a significant challenge. Heterologous expression in plant-based systems, also called plant molecular farming, offers cost-effective large-scale production of recombinant proteins and AMPs. In the present study, Pexiganan and a fusion peptide of Pexiganan-Iseganan are expressed in tobacco plants for the first time. The results of this study showed that Pexiganan-Iseganan recombinant peptide shows stronger antimicrobial activity than Pexiganan. Also, both recombinant peptides maintain their antimicrobial properties in a wide range of temperatures, which is very important for the purification of recombinant proteins in large-scale production in plant.

Key words: Pexiganan-Iseganan and Pexiganan recombinant peptides, molecular farming, antimicrobial activity, tobacco.