

## همسانه‌سازی و بیان موقت و دائم پپتید ضد میکروبی انسانی Cathelicidin LL-37 در توتون و بررسی تاثیر آن روی عامل بیماری شانکر باکتریایی در شرایط *In vitro*

ابوالفضل افتخاری سپس<sup>۱</sup> و فاطمه دهقان نیری<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی و <sup>۲</sup> دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۷

### چکیده

بیماری‌های باکتریایی گیاهی از جمله شانکر باکتریایی عامل کاهش عملکرد و بازدهی در کشاورزی هستند. پپتیدهای ضد میکروبی جزء سیستم دفاعی موجودات زنده در برابر عوامل بیماری‌زای مختلف می‌باشند. در این پژوهش ابتدا سازه بیانی پپتید ضد میکروبی انسانی LL-37 بصورت کدون اپتیمایز شده برای سیستم بیانی گیاهی ساخته و در پلاسمید pCambia1304 همسانه شد. سپس سازه ژنی برای بررسی بیان موقت و دائم با اگروباکتریوم سویه LBA4404 بترتیب با روش ریزترزیقی و غوطه‌ورسازی به رقم Xanthi توتون انتقال داده شد. میزان بیان ژن LL-37 در برگ‌های توتون تراریخت با روش‌های RT-PCR و qRT-PCR بررسی گردید. نتایج نشان دهنده بیان موفقیت‌آمیز ژن LL-37 در توتون در هر دو سیستم بیانی دائم و موقت بود. با استخراج پروتئین از برگ‌های توتون تراریخت و انجام الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید قطعه پروتئینی مربوط به پپتید LL-37 با اندازه ۵ کیلودالتون مشاهده شد. اثر ضد باکتری پروتئین نوترکیب روی باکتری *Xanthomonas citri* با تشکیل هاله عدم رشد باکتری در شرایط *in vitro* مشاهده شد. اثر ضد میکروبی ارزش مطالعه بیشتر این پپتید را به عنوان آنتی‌بیوتیک جدید و تولید گیاهان تراریخت مقاوم به پاتوژن‌های گیاهی نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: اثر مهارکنندگی، بیان ژن LL-37، پپتید ضد میکروبی، توتون.

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: nayeri@eng.ikiu.ac.ir

### مقدمه

با کشف آنتی‌بیوتیک‌ها بسیاری از بیماری‌های باکتریایی درمان شدند. درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها به حدی موفقیت‌آمیز بود که از آنها به عنوان داروهای معجزه‌آسا و بهترین راه حل برای درمان بیماری‌های باکتریایی یاد می‌شود (۲۷). با وجود این، با افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها باکتری‌های بیماری‌زا مقاومت بیشتری به آنها پیدا می‌کنند بطوریکه آنتی‌بیوتیک‌ها در طول زمان اثر مهارکنندگی خود را از دست می‌دهند. مقاومت به آنتی‌بیوتیک، کشاورزی و محیط زیست را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد زیرا از آنتی‌بیوتیک‌ها بطور فراوان در دامداری، پرورش مرغ و طیور، پرورش ماهی و آبزیان، تولید محصولات کشاورزی و در باغ‌های میوه استفاده می‌شود. بنابراین، نیاز فوری به رشد نسل جدید آنتی‌بیوتیک‌ها با شیوه‌های جدید عمل و اثرگذاری بیشتر وجود دارد (۴). پپتیدهای دفاعی میزبان (HDP) جزء سیستم ایمنی ذاتی موجودات هستند که برای اولین بار در پروکاریوت‌ها به عنوان ابزاری برای مقابله با رقبای میکروبی شناسایی شده است. پپتیدهای دفاعی میزبان که اغلب به عنوان پپتیدهای ضد میکروبی (AMP)<sup>۲</sup> نامیده می‌شوند آمفی‌پاتیک، کاتیونی و از نظر اندازه بین ۱۰ تا ۵۰ اسیدآمینو هستند (۸). این پپتیدها بدلیل

<sup>1</sup>Host Defense Peptide

<sup>2</sup>Anti-Microbial Peptides

داشتن خاصیت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی (پپتیدی) نامیده می‌شوند. پپتیدهای ضد میکروبی از زمان کشف در اواخر دهه ۱۹۸۰، به عنوان راه حل جدیدی برای مبارزه با مقاومت آنتی‌بیوتیکی به شمار می‌روند و طیف گسترده‌ای از فعالیت را در برابر باکتری‌های گرم منفی و مثبت، قارچ‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها نشان می‌دهند (۲۵،۳۵). مکانیسم اصلی عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی، نفوذپذیری غشاء و ایجاد اختلال ساختاری در موجود زنده است. همچنین ممکن است عملکرد بیولوژیکی اجزای حیاتی سیتوپلاسمی موجودات میکروبی مانند پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و مولکول‌های DNA و RNA را مختل کنند (۲). از مهمترین پپتیدهای ضد میکروبی انسانی Cathelicidin است که ابتدا در گلوبول‌های سفید گوشت خوک و گاو و سپس در سایر پستانداران شناسایی شد. این پپتید در سلول‌های مختلف بدن انسان از جمله سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی یافت می‌شود. بیشتر جانوران دارای چندین ژن Cathelicidin هستند که بسیاری از آنها عملکردهای مختلفی از جمله اثرات ضد میکروبی دارند (۱۱،۳۵). شکل فعال شده Cathelicidin، پپتید LL-37 است که به عنوان hCAP-18 و FALL-39 نیز شناخته می‌شود. این پپتید دارای ۳۷ اسیدآمینه و وزنی حدود ۵ کیلودالتون است و با اتصال به غشای باکتری‌ها منجر به اختلال در یکپارچگی غشاء و انهدام آنها می‌شود (۲۴). فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای ضد میکروبی با اندازه‌گیری حداقل غلظت مهاري<sup>۱</sup> (MIC) تعیین می‌شود که کمترین غلظت دارو برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها است (۲۳). باکتری‌های جنس *Xanthomonas* از بزرگترین و مهمترین باکتری‌های بیماری‌زا در گیاهان بوده و از عوامل مهم فساد پس از برداشت می‌باشند. این گروه از باکتری‌ها عامل بلایت باکتریایی، لکه نواری و شانکر مرکبات در بسیاری از گیاهان هستند و خسارت قابل توجهی به میزبان خود وارد می‌کنند (۵). توتون (*Nicotiana tabacum*) گیاه عالی گلدار از خانواده Solanaceae است که بدلیل سهولت تراریزش توسط آگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) پژوهش‌های مولکولی زیادی روی آن انجام می‌شود (۱۶). هدف از انجام این پژوهش ساخت سازه ژنی حاوی پپتید ضد میکروبی LL-37، بیان موقت و دائم آن در گیاه توتون و بررسی تاثیر پروتئین نوترکیب روی عامل بیماری شانکر مرکبات (*Xanthomonas citri*) در شرایط *in vitro* می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

گیاه مورد استفاده در انجام این پژوهش گیاه توتون رقم Xanthi بود. دانه‌های توتون برای ضدعفونی، ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و ۱۵ دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۱ درصد به همراه یک قطره Twin80 غوطه‌ور شدند. سپس سه بار شستشو با آب مقطر اتوکلاو شده انجام و دانه‌ها روی کاغذ صافی اتوکلاو شده خشک شدند. تعداد ۳ دانه در شیشه‌های بزرگ حاوی محیط کشت MS بدون هورمون کشت داده شد. به منظور بازایی مستقیم از دو هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) و نفتالین استیک‌اسید (NAA) به ترتیب با غلظت‌های ۲ و ۰/۲ میلی گرم در میلی‌لیتر استفاده شد (۲۶). همچنین از کشت دانه توتون در گلدان و گیاهان رشد کرده در مرحله ۵-۶ برگی برای تزریق سوسپانسیون باکتریایی حاوی سازه ژنی به برگ (ریزتزریقی) و بررسی بیان موقت استفاده شد.

### تهیه سازه ژنی و انتقال به باکتری

توالی نوکلئوتیدی ژن Cathelicidin با شماره دسترسی NM\_004345.5 از پایگاه داده NCBI بدست آمد. بخشی از این توالی شامل نوکلئوتیدهای ۴۱۷ تا ۵۲۷ مربوط به پپتید ضد میکروبی LL-37 است. برای ساخت سازه ژنی از پلاسمید pCAMBIA1304 حاوی توالی‌های ژن *LL-37*، *KDEL*، *His-tag* و جایگاه برشی آنزیم‌های محدودگر *NcoI/SpeI* با طول

نهایی ۱۷۲ جفت باز استفاده شد. این سازه پس از طراحی، جهت ساخت به شرکت Biogenesis کره جنوبی ارسال شد. پلاسمید حاوی ژن (pCAMBIA1304-LL-37) پس از دریافت با روش شوک الکتریکی به سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5 $\alpha$  انتقال یافت (۳۱). کلونی‌های تراریخت شده روی محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت و پلاسمید از کلونی‌های رشد کرده روی این محیط استخراج شد. پلاسمیدهای نوترکیب حامل ژن LL-37 به روش PCR کلونی، هضم آنزیمی و توالی‌یابی بررسی شدند و پس از استخراج از باکتری *E. coli* به سلول‌های مستعد آگروباکتریوم سویه LBA4404 انتقال یافتند. برای اطمینان از حضور ژن LL-37 در آگروباکتریوم، آغازگر رفت از این ژن و آغازگر برگشت از داخل ژن GFP طراحی و در واکنش PCR کلونی استفاده شد. لازم به ذکر است که ژن GFP در پایین دست ژن LL-37 در سازه ژنی قرار دارد.

### انتقال سازه ژنی به گیاه

برای انتقال دائم سازه ژنی به توتون، نمونه از برگ‌های توتون ۴۵ روزه انتخاب و برای دو روز در محیط پیش تلقیح کشت شد. این محیط برای سازگارسازی ریزنمونه‌ها به محیط هورمونی قبل از تلقیح با باکتری است و حاوی نمک‌های محیط MS، ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و فاقد آنتی‌بیوتیک می‌باشد. ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pCAMBIA1304-LL-37 به روش غوطه‌ورسازی به مدت ۳۰ دقیقه تلقیح شدند. بعد از زمان ذکر شده ریزنمونه‌ها از محیط تلقیح به روی کاغذ صافی منتقل شدند و بعد از خشک شدن به محیط هم‌کشتی دارای ترکیباتی مانند ترکیبات محیط پیش تلقیح بعلاوه ۲۰۰ میکرومولار استوسیرینگون انتقال یافتند. ریزنمونه‌ها به مدت دو روز در اتاق رشد نگهداری شدند تا T-DNA نوترکیب از باکتری به درون سلول‌های گیاهی انتقال یابد. سپس ریزنمونه‌ها از محیط هم‌کشتی به محیط انتخابی منتقل شدند. محیط انتخابی حاوی محیط هم‌کشتی به همراه ۳۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم برای حذف آگروباکتریوم بود. پس از حدود دو ماه از تلقیح ریزنمونه‌ها و واکنش آنها هر ۱۴ روز یک بار، گیاهچه‌های باززا شده از ریزنمونه‌ها جدا و در محیط مستقل انتخابی کشت شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها به اندازه ۱۵-۲۰ سانتی‌متر از بافت برگ آنها DNA و RNA استخراج شد. برای انتقال موقت سازه ژنی از طریق ریزتزریقی، گلدان‌های توتون به آزمایشگاه منتقل و از برگ آنها برای تزریق سوسپانسیون آگروباکتریوم حاوی سازه ژنی با سرنگ استفاده شد. برای این منظور در ۱۰-۸ ناحیه از هر برگ سوسپانسیون باکتریایی تزریق شد تا در کل برگ پخش شود. نمونه برداری از برگ گیاهان از روز اول تا دهم پس از تزریق انجام و DNA و RNA آنها استخراج شد (۱۶).

### استخراج DNA و بررسی انتقال ژن به گیاه با روش PCR

با استفاده از روش مبتنی بر CTAB، از نمونه‌های برگ گیاهان تراریخت شده DNA ژنومی استخراج شد (۱۵). برای بررسی حضور ژن LL-37 و تراریختی گیاهان حاصل، واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی این ژن (جدول ۱) و DNA استخراج شده از گیاهان تراریخت و شاهد انجام شد. واکنش PCR در چرخه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل واسرشته‌سازی ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، گسترش ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) انجام شد (۱۶). در روش PCR از DNA گیاهان تراریخت شده با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید بیانی فاقد ژن موردنظر بعنوان

شاهد منفی و از پلاسمید نو ترکیب pCAMBIA1304-LL-37 برای تکثیر ژن LL-37 بعنوان شاهد مثبت استفاده شد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر، همسانه‌سازی و بیان ژن LL-37

آغازگر	توالی 5' → 3'	Tm
Cat-F	ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA	۶۳
Cat-R	TTAGGCTTCTTTTCATTCGGTTTACTGCAGC	۶۲
Act-F	ATGCCCGATCGAGCTCAAGT	۶۰
Act-R	TCGTCTGGCTGACTTTCGTCATAA	۵۹
GFP-R	TGCTCAGGTAGTGGTTGT	۶۰

### استخراج RNA، ساخت cDNA و بررسی بیان ژن با روش‌های RT-PCR و qRT-PCR

استخراج RNA از برگ گیاهان تراریخت شده با کیت استخراج RNX- Plus و ساخت cDNA با استفاده از دستورالعمل کیت cDNA Synthesis شرکت سیناکلون انجام شد (۱). برای بررسی بیان ژن LL-37 در سطح رونویسی از cDNA ساخته شده و آغازگرهای اختصاصی این ژن (جدول ۱) در واکنش RT-PCR استفاده شد. این واکنش مثل روش ذکر شده در قسمت قبل انجام شد. برای بررسی میزان نسبی بیان ژن LL-37 در گیاهان تراریخت از واکنش qRT-PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر و آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱)، شناساگر سایبرگرین و دستگاه Mic Real-time PCR Magnetic Induction Cycler (Biomolecular Systems، استرالیا) استفاده شد. چرخه‌های حرارتی مورد استفاده در qRT-PCR شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه بود. از RNA نمونه‌های برگ گیاهان تراریخت شده با آگروباکتریوم دارای پلاسمید فاقد ژن موردنظر به عنوان شاهد در روش qRT-PCR استفاده شد. در این روش جهت نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار اکتین برای بدست آوردن میزان نسبی بیان ژن LL-37 استفاده شد. واکنش‌ها برای هر گیاه تراریخت دارای دو تکرار زیستی و هر یک شامل دو تکرار فنی بود. پس از تکثیر فرآورده‌های PCR، منحنی‌های ذوب با افزایش تدریجی دما از ۷۲ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. نتایج حاصل از qRT-PCR با استفاده از روش ذکر شده در (۲۰) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به منظور ارزیابی کمی بیان ژن از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها، ابتدا Ct ژن LL-37 گیاهان تراریخت نسبت به Ct ژن اکتین به طور جداگانه محاسبه شد. تفاوت  $\Delta Ct$  بین مقادیر میانگین CT برای ژن LL-37 و ژن اکتین با استفاده از رابطه زیر به دست آمد:

$$\Delta C_T = C_T (LL-37 \text{ gene}) - C_T (Actin \text{ gene})$$

مقدار  $\Delta\Delta Ct$  با کم کردن  $\Delta Ct$  هر یک از گیاهان تراریخت از  $\Delta Ct$  گیاه تراریختی که کمترین بیان را به عنوان مرجع نسبت به سایر گیاهان تراریخت داشت بدست آمد. نسبت بیان ژن در هر گیاه تراریخت به گیاه مرجع (fold change) با استفاده از رابطه  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه شد.

### استخراج پروتئین کل

برای جدا کردن پروتئین کل گیاهان تراریخت از روش SDS-PAGE استفاده شد (۳۴). ابتدا یک گرم بافت برگ (تزیق شده)

داخل ازت مایع بصورت کامل خرد و سه میلی‌لیتر بافر استخراج (8 Tris-HCl pH ۰/۱ مولار، آسکوربیک اسید ۱۵ میلی‌مولار، دی‌تیوتریتول ۲ میلی‌مولار و پلی‌وینیل‌پروپیلیدین ۳ درصد) به آن اضافه شد. بعد از ورتکس، به مدت یک ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به یک تیوب تازه انتقال یافت و به ازای هر یک میلی‌لیتر از مایع رویی ۳۰۰ میکرولیتر گلیسرول ۵۰ درصد به آن اضافه شد. نمونه حاصل به همراه یک نشانگر مولکولی پروتئینی روی ژل پلی‌اکریلامید (SDS-PAGE) بارگذاری شد.

## فعالیت زیستی پروتئین کل نوترکیب

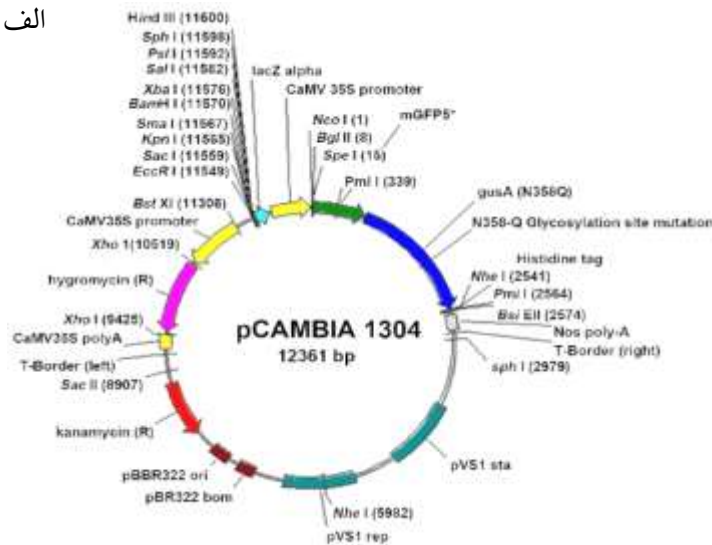
برای بررسی اثر پروتئین کل نوترکیب (حاوی پپتید LL-37) روی باکتری *Xanthomonas citri* از روش انتشار دیسک استفاده شد. برای این منظور دیسک‌های کاغذی با ۱۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آغشته شدند. سپس از کشت ۲۴ ساعته باکتری، استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه شد و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از این استاندارد در محیط کشت جامد مولر هیتتون آگار (MHA) کشت گردید. دیسک‌های تهیه شده در فواصل مناسب روی پلیت حاوی باکتری قرار گرفتند و پلیت‌ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. از دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل مثبت و از آب به عنوان کنترل منفی استفاده شد. این آزمون در سه تکرار انجام شد. فعالیت ضد میکروبی پپتید نوترکیب با مشاهده هاله عدم رشد باکتری ایجاد شده در اطراف دیسک‌ها بررسی گردید (۲۱). تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) به روش رقیق‌سازی در چاهک انجام شد (۲۹). ابتدا ۷-۵ تک کلونی از کشت باکتری روی محیط MHA در محیط کشت مایع مولر هیتتون براث (MHB) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور کشت داده شد. سپس از سوسپانسیون باکتری استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه شد. از عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت محلول استوک با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. با استفاده از روش رقت‌سازی، MIC پروتئین کل نوترکیب در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای تعیین شد. در این روش رقت‌های مختلف پروتئین کل نوترکیب (۱/۶، ۱/۸، ۱/۴، ۱/۲ و ۱/۱) در محیط MHB تهیه گردید. سپس به هر یک از رقت‌ها (چاهک‌ها) ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با  $OD_{600nm}=0.1$  اضافه شد. پلیت‌ها با پارافیلیم پوشانده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ۴۰ میکرولیتر نمک تترازولیوم  $MTT^3$  با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه و در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. رشد باکتری‌ها در هر چاهک با نمایان شدن رنگ بنفش/آبی مشخص گردید. کنترل مثبت ۱۰۰ میکرولیتر استرپتومایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (بجای عصاره) و کنترل منفی ۱۰۰ میکرولیتر پروتئین کل نوترکیب و ۱۰۰ میکرولیتر محیط MHB در نظر گرفته شد. بلانک شامل ۲۰۰ میکرولیتر محیط MHB فاقد سوسپانسیون باکتری بود. چاهک دارای کمترین غلظت پروتئین که باکتری‌ها در آن رشد نکرده بودند، فاقد رنگ بود و بعنوان مقدار MIC در نظر گرفته شد (۲۹، ۳۲).

## نتایج

در پژوهش حاضر ابتدا طراحی سازه و همسازسازی ژن پپتید ضد میکروبی LL-37 در پلاسمید pCAMBIA1304 (شکل ۱) انجام شد. سپس پلاسمید نوترکیب pCAMBIA1304-LL-37 حاصل به رقم *Xanthi* توتون انتقال داده شد. بیان موقت و دائم ژن LL-37 در گیاه توتون انجام شد و تاثیر پروتئین نوترکیب حاصل روی باکتری بیمارگر *Xanthomonas citri* بررسی گردید.

برای این منظور سازه ژنی با استفاده از شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5a منتقل شد. جهت غربال کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، باکتری تراریخت شده روی محیط SOB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت شد. از کشت باکتری مستعد تراریخت شده با آب مقطر استریل روی محیط مذکور بعنوان شاهد منفی و از کشت باکتری تراریخت شده با پلاسمید فاقد ژن موردنظر روی این محیط بعنوان شاهد مثبت استفاده شد. در محیط کشت شاهد منفی هیچ کلونی باکتریایی مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم آلودگی محیط کشت سلول‌های مستعد *E. coli* است.

الف



ب

NcoI      kozak      6 His tag

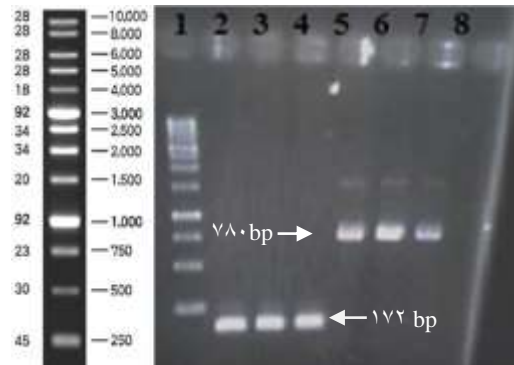
cca tgg gcc aca atg gct cat cac cat cac cat cac atg ctg ctg ggt gat ttc ttc egg aaa tct aaa gag  
aag att ggc aaa gag ttt aaa aga att gtc cag aga atc aag gat ttt ttg egg aat ctt gla ccc agg  
aca gag tcc aag gac gag etc tga act agt

KDEL      \*      SpeI

شکل ۱- الف) پلاسمید pCambia1304 و ب) نمایش خطی ترادف ژن موردنظر در داخل سازه ژنی pCambia1304-LL-37. توالی ژن LL-37 بین توالی‌های His tag و KDEL در این سازه قرار گرفته است. سازه ژنی بالادست ژن GFP در پلاسمید pCambia1304 همسانه‌سازی شد.

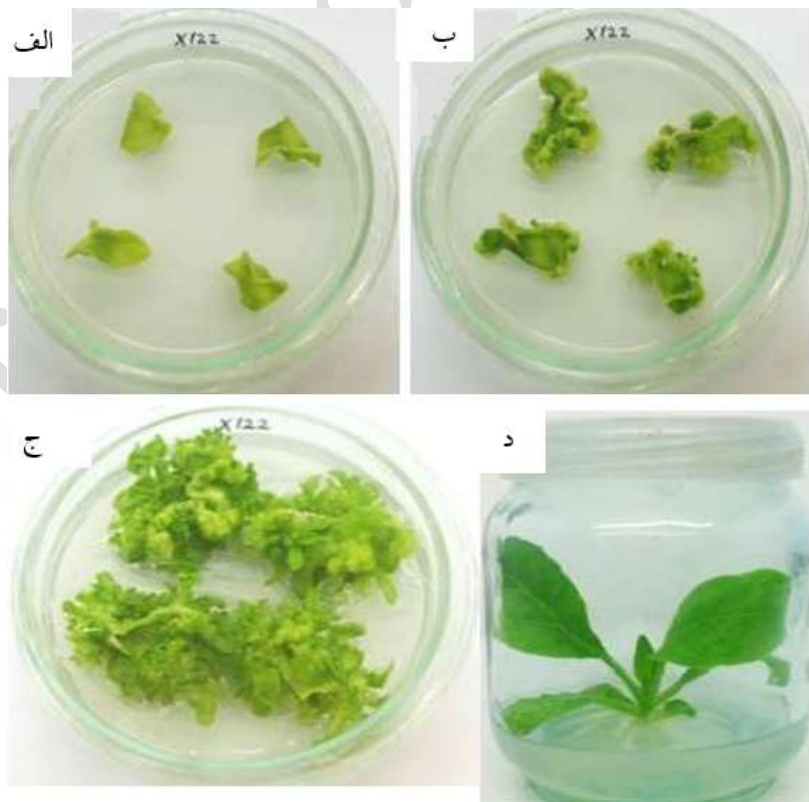
پلاسمید از کلونی‌های نوترکیب *E. coli* استخراج و حضور ژن LL-37 در باکتری با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی این ژن (جدول ۱) مورد بررسی قرار گرفت. محصول PCR روی ژل الکتروفورز بارگذاری شد و قطعه مربوط به ژن LL-37 به طول ۱۷۲ جفت باز مشاهده شد (شکل ۲). پلاسمید نوترکیب بوسیله ستون خالص‌سازی شد و برای توالی‌یابی توسط شرکت پیشگام بیوتکنولوژی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. پس از بررسی نتیجه توالی‌یابی مشخص گردید که همسانه‌سازی به درستی انجام شده است. سپس پلاسمید نوترکیب به روش ذوب و انجماد به آگروباکتریوم تومفاشینس سویه LBA4404 انتقال داده شد. کلونی‌های تراریخت آگروباکتریوم با استفاده از محیط انتخابی جامد حاوی کانامایسین برای پلاسمید نوترکیب و ریفامپسین برای آگروباکتریوم شناسایی شدند. وجود پلاسمید نوترکیب در آگروباکتریوم با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن LL-37 و GFP بوسیله روش کلونی PCR مورد بررسی قرار گرفت و قطعات موردنظر به طول ۱۷۲

و ۷۸۰ جفت باز روی ژل الکتروفورز مشاهده شد. شاهد منفی (پلاسمید pCAMBIA1304 فاقد ژن *LL-37*) هیچ قطعه‌ای را با اندازه موردنظر نشان نداد که نشان‌دهنده تراریختی موفقیت‌آمیز اگروباکتریوم با پلاسمید نوترکیب بود (شکل ۲).



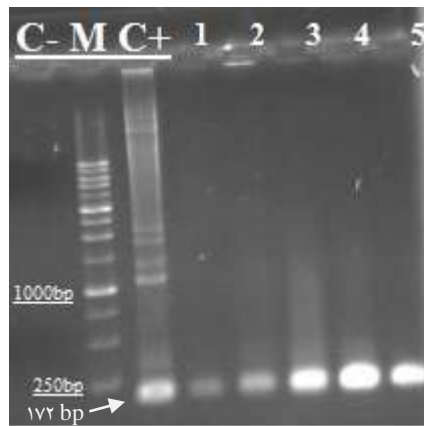
شکل ۲- نتیجه PCR کلونی اگروباکتریوم با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت ژن *LL-37* (قطعه ۱۷۲ bp، چاهک‌های ۲-۴) و با آغازگر رفت ژن *LL-37* و آغازگر برگشت از داخل ژن *GFP* پلاسمید pCAMBIA1304 (قطعه ۷۸۰ bp، چاهک‌های ۵-۷). چاهک ۱ نشانگر مولکولی و چاهک ۸ شاهد منفی (پلاسمید pCAMBIA1304 فاقد ژن *LL-37*) هستند.

جهت انتقال سازه ژنی به توتون، ریزنمونه‌های برگ‌های پیش کشت شده با اگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب با روش غوطه‌ورسازی تلقیح شدند. پس از گذشت دو هفته روی ریزنمونه‌ها، جنین‌های سوماتیکی مقاوم به هیگرومیسین تشکیل شد که مراحل مختلف جنین‌زایی را طی کردند. جنین‌های سوماتیکی مقاوم به آنتی‌بیوتیک در محیط باززایی حاوی هیگرومیسین نوساقه تولید کردند (شکل ۳).



شکل ۳- مراحل مختلف باززایی گیاهان حاصل از جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم در توتون، الف) ریزنمونه‌ها با لبه‌های متورم ۳ روز پس از کشت، ب) افزایش اندازه در ریزنمونه‌ها پس از یک هفته، ج) تشکیل جنین‌های سوماتیکی در مراحل مختلف در هفته دوم، د) نوساقه‌های جدا شده در محیط ریشه‌زایی در هفته چهارم.

گیاهچه‌های مقاوم به هیگرومایسین با سیستم ریشه‌ای توسعه یافته و گیاهچه‌های دارای رشد و نمو طبیعی با ۷-۸ برگ بعنوان گیاهچه‌های تراریخت برای فرآیندهای بررسی مولکولی حفظ شدند. از نمونه‌های برگ گیاهان تراریخت DNA ژنومی استخراج و PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *LL-37* انجام شد. با مشاهده قطعه ۱۷۲ جفت بازی مربوط به ژن *LL-37* روی ژل الکتروفورز ۱/۲ درصد مشخص گردید که این ژن در ژنوم میزبان درج شده است. از گیاهان تراریخت شده با اگروباکتريوم دارای پلاسمید فاقد ژن موردنظر به عنوان کنترل منفی و از پلاسمید نوترکیب *pCambia1304-LL-37* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در نمونه شاهد مثبت قطعات موردنظر تکثیر شدند ولی فرآورده PCR با اندازه ذکر شده در نمونه شاهد منفی مشاهده نشد که بیانگر تراریختی موفقیت‌آمیز توتون با ژن *LL-37* است (شکل ۴).



شکل ۴- در چاهک‌های ۱ تا ۵، حضور قطعه ۱۷۲ جفت بازی روی ژل الکتروفورز ۱/۲ درصد، درج ژن *LL-37* در ژنوم پنج گیاه توتون تراریخت را نشان می‌دهد. چاهک C- نشان‌دهنده کنترل منفی (گیاه تراریخت شده با پلاسمید فاقد ژن *LL-37*) فاقد قطعه روی ژل است، چاهک C+ نشان‌دهنده کنترل مثبت (پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *LL-37*) دارای قطعه ژن روی ژل است و چاهک M نشانگر وزن مولکولی DNA 1Kb است.

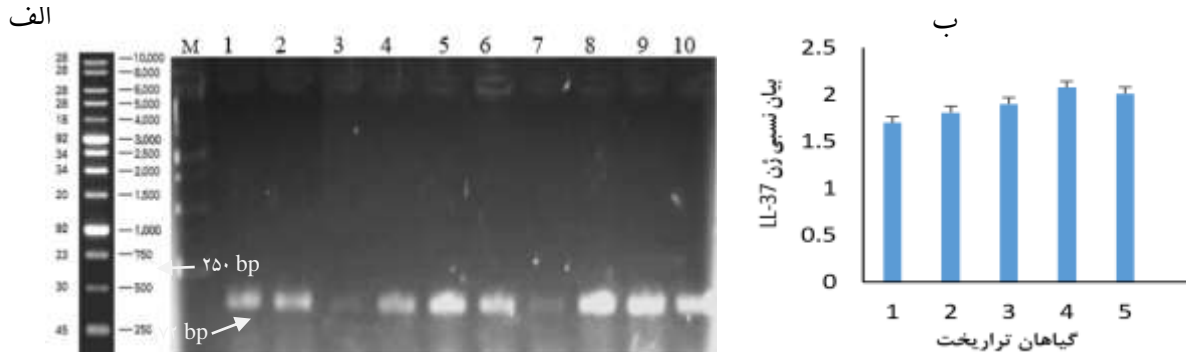
## ارزیابی مولکولی گیاهان تراریخت حاوی ژن *LL-37*

### بیان موقت و دائم ژن *LL-37* در گیاهان توتون تراریخت

به منظور بررسی بیان موقت ژن *LL-37*، از بافت تازه و نرم برگ‌های بالایی و جوان گیاهان توتون داخل گلدان برای تزریق سوسپانسیون اگروباکتريوم حامل پلاسمید نوترکیب استفاده شد. از برگ‌های این گیاهان از روز اول تا روز دهم پس از تزریق نمونه‌برداری، استخراج RNA و ساخت cDNA صورت گرفت. با استفاده از cDNA و آغازگرهای اختصاصی ژن *LL-37* روش RT-PCR نیمه کمی انجام شد. مشاهده قطعه ۱۷۲ جفت بازی روی ژل الکتروفورز ۱/۲ درصد نشان‌دهنده بیان موقت ژن *LL-37* در گیاهان تزریق شده با سوسپانسیون اگروباکتريوم حامل پلاسمید نوترکیب است (شکل ۵).

بیان دائم ژن *LL-37* در مرحله ۷-۸ برگ گیاهان توتون تراریخت و با استفاده از روش qRT-PCR بررسی شد. برای این منظور از نمونه‌های برگ گیاه پنج گیاه توتون تراریخت که با روش PCR حضور ژن *LL-37* در آنها تایید شده بود استخراج RNA

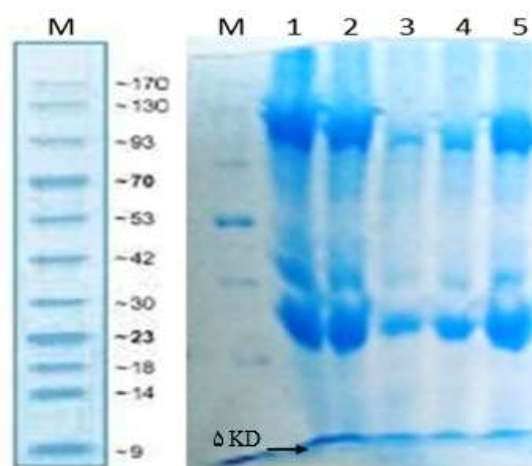
و ساخت cDNA صورت گرفت. براساس روش ذکر شده در قسمت مواد و روش‌ها، بیان نسبی ژن *LL-37* با استفاده از نرمال‌سازی داده‌های Ct این ژن در گیاهان تراریخت با Ct ژن خانه‌دار اکتین اندازه‌گیری و با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  گزارش شد. نتایج این آزمایش حاکی از بیان ژن *LL-37* در سطح رونویسی در گیاهان توتون تراریخت بود (شکل ۵).



شکل ۵- الف) بیان موقت ژن *LL-37* بوسیله روش RT-PCR با مشاهده قطعه ۱۷۲ جفت بازی روی ژل الکتروفورز ۱/۲ درصد تایید شد. چاهک‌های ۱ تا ۱۰ بیان این ژن طی ۱۰ روز از زمان تزریق سوسپانسیون آگروباکتریوم حامل پلاسمید نوترکیب به برگ‌های توتون و چاهک M نشانگر مولکولی را نشان می‌دهند. ب) نمودار بیان نسبی ژن *LL-37* در پنج گیاه توتون تراریخت با استفاده از روش qRT-PCR.

### بررسی پروتئین کل نوترکیب گیاهان توتون تراریخت

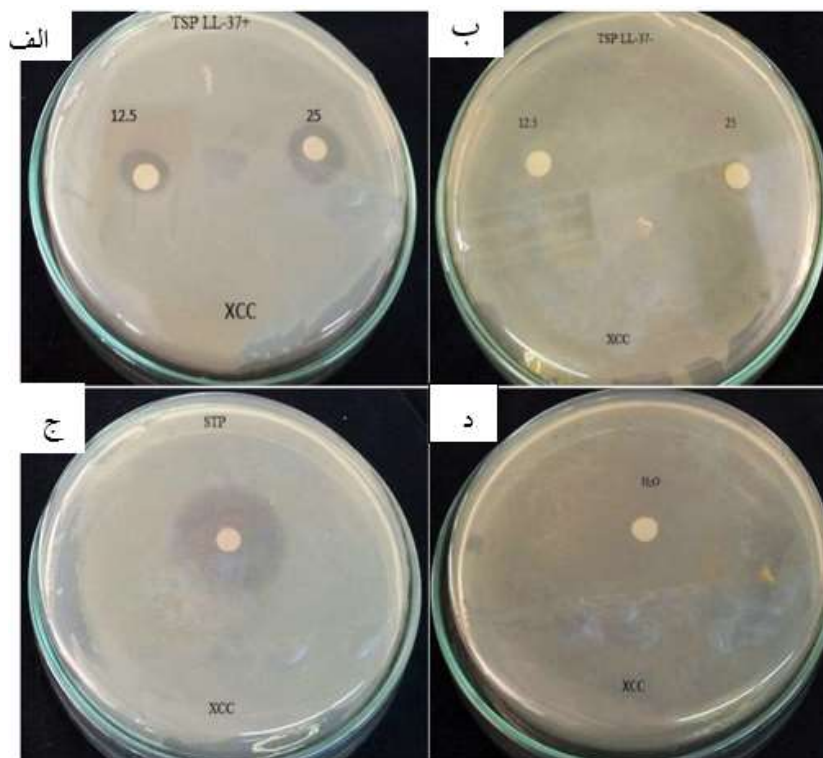
بیان پروتئین نوترکیب حاوی پپتید *LL-37* در گیاهان تراریخت با روش SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. پروتئین کل از گیاهان تراریخت استخراج و روی ژل پلی‌اکریلامید بارگذاری شد. قطعه مربوط به پپتید نوترکیب که حدود ۵ کیلودالتون است زیر آخرین قطعه خط‌کش مولکولی با اندازه ۹ کیلودالتون مشاهده شد (شکل ۶). با این روش مشخص گردید بیان ژن *LL-37* در سطح پروتئین در گیاهان تراریخت صورت گرفته است. با توجه به اندازه کوچک پپتید، مشاهده آن روی ژل پلی‌اکریلامید از طریق SDS-PAGE دشوار است. برای این منظور میتوان بیان پپتید نوترکیب *LL-37* را به صورت کمی بوسیله الیزا ارزیابی کرد. بطورکلی ضعیف بودن قطعه پروتئین موردنظر روی ژل الکتروفورز در گیاهان نوترکیب میتواند دلایل متعددی داشته باشد. یکی از این دلایل کم بودن مولکول‌های پروتئین موردنظر است که میتواند نتیجه پایین بودن بیان ژن آن باشد. برای افزایش تولید پروتئین میتوان از راهکارهایی مثل استفاده از پروموتور القایی، توالی تقویت‌کننده یا توالی ایترون قوی در بالادست ژن در سازه ژنی بهره برد یا سیستم انتقال ژن را با تغییر پلاسمید یا سویه باکتری و شرایط انتقال ژن بهینه‌سازی نمود (۱۷).



شکل ۶- بیان پپتید LL-37 در گیاهان تراریخت توتون. چاهک‌های ۱ تا ۵ پروتئین کل برگ‌های پنج گیاه توتون تراریخت با روش SDS-PAGE و M نشانگر پروتئینی را نشان می‌دهند. قطعه مربوط به پپتید LL-37 در گیاهان تراریخت با اندازه ۵ کیلوالتون در چاهک‌های ۱ تا ۵ با فلش نشان داده شده است.

### بررسی اثر ضد باکتری پروتئین نو ترکیب حاوی پپتید LL-37 به روش انتشار دیسک

اثر ضد باکتریایی پروتئین نو ترکیب حاوی پپتید LL-37 روی باکتری *Xanthomonas citri* به روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. اطراف دیسک حاوی عصاره پروتئینی با غلظت ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هاله عدم رشد باکتری بترتیب با اندازه ۱۱ و ۸ میلی‌متر تشکیل شد که بیانگر اثر مهارکنندگی پروتئین کل گیاهان تراریخت حاوی پپتید LL-37 بر رشد این باکتری است. در این آزمایش از پروتئین گیاه شاهد (فاقد پپتید LL-37) و آب به عنوان کنترل منفی و از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. باکتری در پتری حاوی دیسک پروتئین گیاه شاهد و آب بطور کامل رشد کرد و تمام سطح پتری را در بر گرفت. در اطراف دیسک حاوی استرپتومایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هاله عدم رشد با اندازه ۱۶ میلی‌متر تشکیل شد که بیانگر جلوگیری از رشد باکتری بوسیله این آنتی‌بیوتیک است (شکل ۷).



شکل ۷- بررسی اثر ضد باکتریایی پروتئین نوترکیب حاوی پپتید LL-37 بر باکتری *Xanthomonas citri* به روش انتشار دیسک، الف) پروتئین کل نوترکیب، حاوی پپتید LL-37، ب) پروتئین کل گیاه فاقد پپتید LL-37، ج) آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بعنوان کنترل مثبت و د) آب بعنوان کنترل منفی. در این شکل باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* است.

### تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) پروتئین نوترکیب حاوی پپتید LL-37 به روش رقیق‌سازی در چاهک

فعالیت ضد میکروبی پروتئین کل گیاهان تراریخت علیه باکتری *Xanthomonas citri* با استفاده از روش رقت‌سازی در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای و تعیین مقدار MIC بررسی شد. مقادیر MIC برای پروتئین کل حاوی پپتید LL-37 (TSP LL-37+) ۶/۲۵ و برای آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (STP) ۱۲/۵ تعیین گردید. براساس این آزمایش پروتئین کل دارای پپتید LL-37 در مقایسه با آنتی‌بیوتیک (کنترل مثبت) دارای اثر مهارکنندگی بیشتری روی باکتری *Xanthomonas citri* بود. همچنین مقدار MIC برای پروتئین کل فاقد پپتید LL-37 (TSP LL-37-) بدلیل عدم جلوگیری از رشد باکتری گزارش نشد. همچنین در چاهک‌های آب و بلانک پلیت ۹۶ خانه‌ای (کنترل منفی) که حاوی مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محیط MHB فاقد سوسپانسیون باکتری بود رشد باکتری صورت نگرفت.

### بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان همیشه در معرض تنش‌های مختلفی قرار دارند که رشدونمو آنها را به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهند. در اثر حمله عوامل بیماری‌زا به گیاهان، بیماری‌های مختلفی ایجاد می‌شوند که خسارت زیادی بر گیاهان وارد می‌کنند. محافظت از گیاهان در برابر بیماری‌های باکتریایی و قارچی با استفاده از ترکیبات شیمیایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و قارچ‌کش‌ها صورت می‌گیرد. استفاده گسترده از این ترکیبات از یک طرف تاثیر منفی بر سلامت انسان و محیط زیست دارد و از طرفی دیگر باعث افزایش

مقاومت عوامل بیماریزا به آنت-کش‌های متداول می‌شود (۶). پپتیدهای ضد میکروبی فعالیت ضد عوامل بیماریزای انسانی نیز دارند و جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی محسوب می‌شوند. بعنوان مثال، پپتیدهای هیستاتین، پپتیدهای غنی از اسید آمینه هیستیدین هستند که به یک خانواده از پپتیدهای ضد میکروبی تعلق دارند. هیستاتین ۳ انسانی، از نظر عملکردی هم خاصیت ضد میکروبی و هم خاصیت التیام زخم دارد. براساس نتایج آزمون‌های میکروبی، این پپتید روی باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus*، از پاتوژن‌های بیمارستانی مقاوم به دارو، اثر مهارکنندگی دارد. با توجه به فعالیت ضد میکروبی این پپتید و امکان تولید آن، میتوان از این پپتید در صنایع دارویی و پزشکی، به‌عنوان آنتی‌بیوتیک جدید یا همراه با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها برای افزایش کارایی آنها استفاده نمود (۳۴). ایجاد مقاومت دارویی در مقابل انواع آنتی‌بیوتیک‌های رایج مشکل اساسی در زمینه درمان عفونت‌ها می‌باشد. امروزه تحقیق در زمینه پپتیدهای ضد میکروبی و معرفی ترکیبات پپتیدی جدید با اثرات ضد میکروبی حائز اهمیت زیادی است. از اینرو در پژوهشی یک پپتید ضد باکتریایی و ضد قارچی با نام Snakin-Z از میوه عناب خالص‌سازی گردید. این پپتید دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت و همچنین قارچ‌ها است و بیشترین فعالیت را روی قارچ *Candida albicans* دارد. به دلیل فعالیت ضد میکروبی موثر این پپتید روی پاتوژن‌های مختلف، به نظر می‌رسد نامزد مناسبی برای کاربردهای درمانی باشد (۹).

پپتیدهای ضد میکروبی خانواده Cathelicidin با فعالیت ضد میکروبی به‌عنوان یک جایگزین امیدوارکننده برای آنتی-بیوتیک‌های معمولی محسوب می‌شوند (۳۶). از این پپتید برای ایجاد مقاومت در گیاهان در برابر عوامل بیماریزای گیاهی نیز استفاده شده است. در پژوهش حاضر، ابتدا شرایط جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم و تراریختی توتون به کمک آگروباکتريوم بهینه شد و سپس انتقال و بیان ژن پپتید LL-37 از مشتقات پپتید ضد میکروبی Cathelicidin در این گیاه انجام شد. بعد از گذشت دو هفته جنین‌های سوماتیکی روی ریزنمونه‌های برگ رقم Xanthi گیاه توتون در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین تشکیل شدند که مطابق با گزارش منتشر شده روی چهار ژنوتیپ توتون با هدف جنین‌زایی سوماتیکی است (۲۶). به دلیل حضور ژن مقاومت به هیگرومایسین در سازه ژنی ژن LL-37، گیاهان تراریخت شده رشد مناسبی در محیط گزینشی داشتند، در حالیکه گیاهان شاهد به‌عنوان کنترل منفی فاقد توانایی رشد در محیط MS حاوی هیگرومایسین و سفوتاکسیم بودند. در این مطالعه از سویه LBA4404 آگروباکتريوم برای تراریخت توتون استفاده شد زیرا براساس مطالعات منتشر شده بهترین سویه برای انتقال ژن به توتون است (۳). براساس نتایج حاصل، بیان موقت و دائم این ژن در سطح رونویسی با روش‌های RT-PCR و qRT-PCR و بیان دائم در سطح پروتئین با روش SDS-PAGE در برگ توتون تراریخت تایید گردید. روش PCR کمی روش دقیقی است که با اعمال تغییراتی در واکنش معمولی PCR به ارزیابی میزان رونویسی ژن موردنظر می‌پردازد (۷). بررسی کمی رونویسی ژن LL-37 در پنج گیاه توتون تراریخت با روش qRT-PCR نشان داد رونویسی در همه گیاهان تراریخت در سطح مشابه صورت گرفته است. بطورکلی سطح پایین بیان ژن خارجی در گیاهان تراریخت یکی از عوامل مهم محدودکننده کارایی سیستم‌های گیاهی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب است. از برخی راهکارها با موفقیت برای افزایش سطح بیان یک ژن خارجی استفاده شده است که از آن جمله میتوان به استفاده از توالی سیگنال‌های شبکه آندوپلاسمی (۱۳)، افزایش کارایی ترجمه با استفاده از مکان‌های اتصال ریبوزوم (۱۴) و همچنین بهینه‌سازی ژن براساس ترجیح کدونی گیاهان اشاره کرد. مطالعاتی در مورد افزایش میزان بیان پروتئین نو ترکیب با منشاء متنوع پس از بهینه‌سازی کدون در میزبان‌های مختلف انجام شده است (۳۸). همچنین از پروتئین سومو (sumo) به‌عنوان یک فیورژن جدید برای افزایش بیان پروتئین‌های نو ترکیب استفاده می‌شود. افزایش بیان توسط سومو به دلیل خاصیت چاپرونی آن و کمک به ایجاد تاخوردگی مناسب برای پروتئین، افزایش حلالیت پروتئین و افزایش فعالیت

بیولوژیکی پروتئین است (۲۵).

در این پژوهش بدلیل منشاء جانوری ژن *LL-37* بهینه‌سازی توالی نوکلئوتیدی آن براساس ترجیح کدون گیاه توتون صورت گرفت و توالی *Kozak* (محل اتصال ریبوزوم در موجودات یوکاریوتی) در بالادست ژن، قبل از کدون شروع طراحی شد. یکی از پارامترهای بسیار مهم در تولید پروتئین‌های نوترکیب پایدار پروتئین نوترکیب بیان شده است. موقعیت نهایی پروتئین نوترکیب درون سلول، پیامدهای مهمی روی عملکرد، میزان پایداری، تغییرات پس از ترجمه و بازیافت آن دارد و متابولیسم سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۲). شبکه آندوپلاسمی یک جایگاه مهم برای فرآوری، تشکیل پیوندهای دی-سولفیدی، تشکیل ساختار سه‌بعدی صحیح، سرهم‌بندی و گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد. شبکه آندوپلاسمی سلول‌های گیاهی معمولاً می‌تواند تجمع بالای پروتئین را بدون آنکه رشد و نمو گیاه را تحت تاثیر قرار دهد تحمل کند. این ویژگی شبکه آندوپلاسمی موجب شده است که این اندامک جهت تولید و انباشت پروتئین‌های نوترکیب به طور وسیع مورد استفاده قرار بگیرد (۳۳). افزودن پپتید راهنمای ویژه شبکه آندوپلاسمی منجر به افزایش تجمع پروتئین نوترکیب درون شبکه آندوپلاسمی می‌شود (۳۰). برای این منظور در این پژوهش توالی سیگنال شبکه آندوپلاسمی (KDEL) در انتهای کربوکسیلی پپتید و درست قبل از کدون توقف طراحی شد (۳۱). در مطالعه حاضر پروتئین کل نوترکیب حاوی پپتید *LL-37* گیاهان توتون تراریخت اثر مهارکنندگی روی رشد باکتری *X. citri* در شرایط *in vitro* نشان داد. اثر ضد میکروبی پپتید *LL-37* روی این باکتری که از باکتری‌های بیماریزای مقاوم به آنتی‌بیوتیک است، ارزش مطالعه بیشتر روی این پپتید را نشان می‌دهد. پتانسیل پپتید ضد میکروبی *LL-37* در تولید گیاهان تراریخت مقاوم به بیماری در چند مطالعه دیگر نیز گزارش شده است. براساس نتایج این مطالعات میتوان از این پپتید برای ایجاد مقاومت به عوامل بیماریزای مختلف در گیاهان استفاده کرد. بعنوان مثال، در پژوهشی بیان پپتید ضد میکروبی *LL-37* در گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخت و مقاومت آنها در برابر پاتوژن باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخت مقاومت قابل توجهی در برابر پوسیدگی نرم باکتریایی و لکه باکتریایی نشان دادند بطوریکه پروتئین کل برگ گیاهان تراریخت، رشد باکتری *Pectobacterium carotovorum* را محدود کرد (۱۹). مقاومت در برابر پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی با بیان پپتید ضد میکروبی *LL-37* در کلم چینی نیز مورد بررسی قرار گرفته است. گیاهان تراریخت کلم سطوح مختلف مقاومت در برابر پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی را نشان دادند و آثار بیماری در گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان شاهد کاهش چشمگیری داشته است. نتایج نشان داد که پپتید ضد میکروبی *LL-37* در مقاومت گیاهان تراریخت علیه طیف گسترده‌ای از پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی نقش دارد (۱۸). در تحقیق دیگری ژن پپتید ضد میکروبی انسانی *LL-37* در کلم چینی بیان شد. به منظور افزایش بیان این پپتید، از توالی اینترون *Roa* در بالادست ژن *LL-37* در سازه ژنی استفاده شد. گیاهان تراریختی که بیان بیشتری از پپتید *LL-37* داشتند مقاومت بیشتری در برابر پاتوژن‌های مختلف نشان دادند (۱۷). از پپتید *LL-37* همچنین برای ایجاد مقاومت در برنج در برابر بیماری بلایت و بلاست برگ باکتریایی استفاده شده است. براساس نتایج، گیاهان تراریخت نسبت به گیاه شاهد در برابر بیماری‌های مذکور بسیار مقاوم بودند (Lee et al. 2017). فعالیت ضد میکروبی بالای پپتید *LL-37* در برابر میکروارگانیسم‌های گرم منفی و گرم مثبت اثبات شده است. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین شده برای ایکولای ۱/۶۵ میکرومولار، برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲/۳۱ میکرومولار و برای انتروکوکوس فکاليس ۵/۵۴ میکرومولار گزارش شده است (۲۲). پژوهشگران کارایی پپتید *LL-37* علیه باکتری *Acinetobacter baumannii* مقاوم به داروی چندگانه را با روش MIC مورد بررسی قرار دادند. براساس نتایج، حداقل غلظت مهارکنندگی *LL-37* برای این باکتری ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. پروتئین *LL-37* در مقایسه با سایر پپتیدها و داروها در غلظت کم می‌تواند باعث از بین رفتن این باکتری شود (۳۹). نتایج مقایسه فعالیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی

چهار پپتید مشتق شده از Cathelicidin از جمله LL-37 نشان داد که هر چهار پپتید فعالیت ضد باکتریایی در برابر پاتوژن‌های مختلف باکتریایی نشان دادند و بطور مؤثر از تشکیل بیوفیلم جلوگیری کردند. این پپتید و مشتقات آن یک راهکار مؤثر در برابر عفونت‌های باکتریایی هستند (۳۷). پپتید ضد میکروبی LL-37 روی باکتری‌های عفونت‌زای انسانی نیز نقش بازدارندگی از تولید بیوفیلم و مهار رشد دارد. در مطالعه‌ای اثر مهارکنندگی این پپتید روی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، که اغلب مسئول عفونت زخم هستند، گزارش شده است (۱۰). در اثر حمله باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* (Xcc) به مرکبات، بیماری شانکر مرکبات ایجاد می‌شود که باعث خسارت اقتصادی قابل توجه در مناطق تولید مرکبات است. در پژوهشی برای تولید گیاهان مرکبات تراریخت مقاوم در برابر شانکر مرکبات، دو ژن پپتید ضد میکروبی، *PR1aCB* و *AATCB*، از طریق انتقال ژن متوالی به پرتقال انتقال داده شد. پس از بررسی مشخص گردید که گیاهان تراریخت مقاومت بیشتری به این باکتری در مقایسه با گیاهان شاهد داشتند. این نتایج ثابت کرد که انتقال ژن‌های پپتیدهای ضد باکتریایی راهکار مؤثری برای افزایش مقاومت مرکبات به بیماری شانکر مرکبات است (۲۸). نتایج مطالعات انجام شده روی پپتید ضد میکروبی LL-37 نشان دهنده پتانسیل بالقوه این پپتید بعنوان یک آنتی‌بیوتیک پپتیدی در ایجاد مقاومت علیه پاتوژن‌های گیاهی است. استفاده از پپتیدهای نو ترکیب ضد میکروبی در برابر پاتوژن‌های گیاهی امیدوارکننده است بطوریکه میتوان به کمک آنها استفاده از سموم شیمیایی در کشاورزی را کاهش داد. با مطالعه بیشتر روی پپتیدهای ضد میکروبی میتوان گام مؤثری برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید جهت کاهش آثار منفی ناشی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی برداشت.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) در انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

## فهرست منابع

۱. Abdolmajidi, S. and Dehghan Nayeri, F. (2022) Investigation of transformation and expression of roselotide *rTI* gene in wheat. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, **11**, 85-96.
۲. Agrawal, P., Bhalla, S., Chaudhary, K., Kumar, R., Sharma, M. and Raghava, G.P. (2018) In silico approach for prediction of antifungal peptides. *Frontiers in microbiology*, **9**, 323.
۳. Bakhsh, A., Anayol, E. and Ozcan, S.F. (2014) Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 259-264.
۴. Barriere, S.L. (2015). Taylor & Francis.
۵. Behlau, F., Gochez, A.M. and Jones, J.B. (2020) Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. *Tropical Plant Pathology*, **45**, 200.۲۱۲-
۶. Boccoardo, N.A., Segretin, M.E., Hernandez, I., Mirkin, F.G., Chacón, O., Lopez, Y., Borrás-Hidalgo, O. and Bravo-Almonacid, F.F. (2019) Expression of pathogenesis-related proteins in transplastomic tobacco plants confers resistance to filamentous pathogens under field trials. *Scientific reports*, **9**, 2791.
۷. Chen, Z., Halford, N.G. and Liu, C. (2023) Real-time quantitative PCR: primer design, reference gene selection, calculations and statistics. *Metabolites*, **13**, 806.

۱. Dahl, S., Anders, E., Gidlöf, O., Svensson, D. and Nilsson, B.-O. (2018) The host defense peptide LL-37 triggers release of nucleic acids from human mast cells. *Peptides*, **109**, 39-45.
۲. Daneshmand, F. (2014) Identification and purification of an antimicrobial peptide from *Ziziphus jujuba*. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, **27**, 211-223.
۳. Demirci, M., Yigin, A. and Demir, C. (2022) Efficacy of antimicrobial peptide LL-37 against biofilm forming *Staphylococcus aureus* strains obtained from chronic wound infections. *Microbial Pathogenesis*, **162**, 105368.
۴. Dürr, U.H., Sudheendra, U. and Ramamoorthy, A. (2006) LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1758**, 1408-1425.
۵. Egelkrou, E., Rajan, V. and Howard, J.A. (2012) Overproduction of recombinant proteins in plants. *Plant science*, **184**, 83-101.
۶. Gomez, N., Wigdorovitz, A., Castanon, S., Gil, F., Ordá, R., Borca, M. and Escribano, J. (2000) Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus. *Archives of Virology*, **145**, 1725-1732.
۷. Habibi, M., Malekzadeh-Shafaroudi, S., Marashi, H., Moshtaghi, N., Nasiri, M. and Zibae, S. (2014) The transient expression of coat protein of Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) in spinach (*Spinacia oleracea*) using Agrobacterium-mediated transformation. *Journal of Plant Molecular Breeding*, **2**, 18-27.
۸. Heidari Japelaghi, R., Haddad, R. and Garoosi, G.-A. (2011) Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Molecular biotechnology*, **49**, 129-137.
۹. Heidari Japelaghi, R., Haddad, R., Valizadeh, M., Dorani Uliarie, E. and Jalali Javaran, M. (2018) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco *Journal of Plant Molecular Breeding*, **6**, 38-50.
۱۰. Ishvaanjil, B., Jung, Y.-J., Temuujin, U., Lee, S.-Y. and Kang, K.-K. (2014) Heterologous expression of antimicrobial peptide LL-37 in Chinese cabbage with enhanced resistance to pathogens. *Mongolian Journal of Agricultural Sciences*, **13**, 124-130.
۱۱. Jung, Y.-J., Lee, S.-Y., Moon, Y.-S. and Kang, K.-K. (2012) Enhanced resistance to bacterial and fungal pathogens by overexpression of a human cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18/LL-37) in Chinese cabbage. *Plant biotechnology reports*, **6**, 39-46.
۱۲. Jung, Y.-J. (2013) Enhanced resistance to bacterial pathogen in transgenic tomato plants expressing cathelicidin antimicrobial peptide. *Biotechnology and bioprocess engineering*, **18**, 615-624.
۱۳. Kaldis, A., Berbati, M., Melita, O., Reppa, C., Holeva, M., Otten, P. and Voloudakis, A. (2018) Exogenously applied dsRNA molecules deriving from the Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) genome move systemically and protect cucurbits against ZYMV. *Molecular plant pathology*, **19**, 883-895.
۱۴. Khademi, M. and Nazarian-Firouzabadi, F. (2019) Expression and antimicrobial activity analysis of dermaseptin B1 recombinant peptides in tobacco transgenic plants. *Plant Genetic Researches*, **6**, 139-150.

- ۲۲ Krahulec, J., Hyršová, M., Pepeliaev, S., Jílková, J., Černý, Z. and Machálková, J. (2010) High level expression and purification of antimicrobial human cathelicidin LL-37 in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, **88**, 167-175.
- ۲۳ Maróti, G., Kereszt, A., Kondorosi, E. and Mergaert, P. (2011) Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in microbiology*, **162**, 363-374.
- ۲۴ Moreno-Angarita, A., Aragón, C.C. and Tobón, G.J. (2020) Cathelicidin LL-37 :A new important molecule in the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Journal of translational autoimmunity*, **3**, 100029.
- ۲۵ Mortazavi, S., Saffar, B., Mirakhorli, N. and Mobini, D.M. (2016) Design, synthesis, cloning, expression and evaluation of the antibacterial effect of wheat defensin (*Triticum aestivum*) in *E. coli* host. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, **1**, 114-125.
- ۲۶ Pathi, K.M., Tula, S. and Tuteja, N. (2013) High frequency regeneration via direct somatic embryogenesis and efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of tobacco. *Plant signaling & behavior*, **8**, e24354.
- ۲۷ Penesyán, A., Gillings, M. and Paulsen, I.T. (2015) Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*, **20**, 5286-5298.
- ۲۸ Peng, A., Zhang, J., Zou, X., He, Y., Xu, L., Lei, T., Yao, L., Li, Q. and Chen, S. (2021) Pyramiding the antimicrobial *PR1aCB* and *AATCB* genes in 'Tarocco' blood orange (*Citrus sinensis* Osbeck) to enhance citrus canker resistance. *Transgenic Research*, **30**, 635-647.
- ۲۹ Pourkhosravani, E., Dehghan Nayeri, F. and Mohammadi Bazargani, M. (2021) Decoding antibacterial and antibiofilm properties of cinnamon and cardamom essential oils: a combined molecular docking and experimental study. *AMB Express*, **11**, 1-18.
- ۳۰ Rozov, S.M. and Deineko, E.V. (2022) Increasing the efficiency of the accumulation of recombinant proteins in plant cells: the role of transport signal peptides. *Plants*, **11**, 2561.
- ۳۱ Sahandi Khalifeh-Kandy, A. and Dehghan Nayeri, F. (2021) Bioinformatics design and cloning of *Hibiscus sabdariffa rT1* gene for construction of pBI121-rT1 recombinant vector in order to expression in plants. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, **10**, 47-57.
- ۳۲ Sarker, S.D., Nahar, L. and Kumarasamy, Y. (2007) Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, **42**, 321-324.
- ۳۳ Sharma, A.K. and Sharma, M.K. (2009) Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology advances*, **27**, 811-832.
- ۳۴ Tavakoli, Z., Saffar, B., Mahnam, K. and Hemmati, R. (2022) Design, cloning, expression and purification of mutated Histatin3 and investigation of its antimicrobial effects. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, **35**, 75-88.
- ۳۵ Umnyakova, E.S., Zharkova, M.S., Berlov, M.N., Shamova, O.V. and Kokryakov, V.N. (2020) Human antimicrobial peptides in autoimmunity. *Autoimmunity*, **53**, 137-147.

- ۳۶ Wang, S., Fan, L., Pan, H., Li, Y., Zhao, X., Qiu, Y. and Lu, Y. (2023) Identification and characterization of a novel cathelicidin from hydrophis cyanocinctus with antimicrobial and anti-inflammatory activity . *Molecules*, **28**, 2082.
- ۳۷ Xie, F., Zan, Y., Zhang, X., Zhang, H., Jin, M., Zhang, W., Zhang, Y. and Liu, S. (2020) Differential abilities of mammalian cathelicidins to inhibit bacterial biofilm formation and promote multifaceted immune functions of neutrophils. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 1871.
- ۳۸ Yu, J. and Langridge, W. (2003) Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice. *Transgenic research*, **12**, 163-169.
- ۳۹ Zarei-Mehrvarz, E., Ghaznavi-Rad, E., Fahimi-Rad, S. and Abtahi, H. (2017) Cloning, expression, and purification of antimicrobial peptide LL-37 and assessment of its antimicrobial effectiveness on multiple-drug-resistant acinetobacter Baumannii. *Journal of Isfahan Medical School*, **35**, 954-960.

## Cloning and transient and constitutive expression of human antimicrobial peptide Cathelicidin LL-37 in tobacco for its influence on bacterial canker agent in *in vitro* condition

Aboalfazl Eftekhari Cis<sup>1</sup> and Fatemeh Dehghan Nayeri<sup>\*2</sup>

1- MSc in Agricultural Biotechnology and 2- Associate Prof., Biotechnology Department, Faculty of Agriculture and Natural Sciences, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran. Tel: 02833901232, corresponding author email: nayeri@eng.ikiu.ac.ir

### Abstract

Plant bacterial diseases, including bacterial canker, are the cause of reduced yields in agriculture. Antimicrobial peptides are among the defense lines of living organisms against various pathogens. In this study, first the human antimicrobial peptide LL-37 was synthesized as an optimized codon for the plant expression system and cloned into pCAMBIA1304 plasmid. Then the gene construct was expressed transiently and constitutively in tobacco, variety Xanthi, using *Agrobacterium* LBA4404 respectively by leaf microinjection and agroinfiltration methods. The expression level of LL-37 gene in transgenic tobacco leaves was

measured by RT-PCR and qRT-PCR methods. The results showed the successful expression of *LL-37* gene in tobacco plant in both transient and constitutive gene expression systems. Polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant protein revealed a protein fragment related to peptide *LL-37* with a size of 5 kilodaltons. The antibacterial effect of recombinant protein on *Xanthomonas citri* was confirmed by the formation of growth inhibition zone *in vitro* condition. The antimicrobial effect shows the value of further study on this peptide as a new antibiotic and for the production of transgenic plants resistant to plant pathogens.

**Keywords:** Antimicrobial peptide, *LL-37* gene expression, Tobacco, Inhibition effect

Preproof of Article