Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Evaluation of the Effect of Less Negatively Charged Amino Acid Substitution in Synthetic Tetramer Peptide S3 Derived from Horseshoe Crab Ambocyte on its Antibacterial Properties

Sakineh Bagh Beheshti[1], Shahin Haddadian[2]*, Akram Eidi[1], Leila Pishkar[3], Hamzeh Rahimi[4]

[1] Dept of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
[2] Dept of Nanotechnology, Dept of New Technologies Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[3] Dept of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Islamshahr Branch, Islamshahr, Iran
[4] Dept of Molecular Medicine, New Technologies Research Group, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 10 April 2021
Revised: 08 May 2021
Accepted: 29 June 2021

**** Correspondence to:***
Shahin Haddadian
Dept of Nanotechnology, Dept of New Technologies Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email: hadadian@yahoo.com

A B S T R A C T

Introduction: The study of the effects of synthetic peptides with antibacterial properties can provide more effective antibiotics. This study designed, expressed, and investigated the Sushi 3 tetramer peptide. Subsequently, it was compared in terms of changing antibacterial properties with another Sushi3 tetramer peptide the aspartic acid and proline amino acids of which were replaced with glycine and serine amino acids.

Material & Methods: First, the mentioned Sushi3 tetramer peptide sequences were designed, constructed, and named Mer1 and Mer 2, respectively, and cloned separately into plasmid pET-26b (+) and finally transferred to *E.coli* BL21 host (DE3). After the expression of the peptides, the presence of peptides was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. Afterward, the antimicrobial activity of Mer1 and Mer 2 was evaluated and compared. Finally, the toxicity of the two tetramers made on the MDA-MB-231 cell line was evaluated and compared.

Findings: Mer1 and Mer 2 had similar protein expression, and the toxic effect of both peptides on the cell line was not significantly different. however, Mer 2 had more effective antimicrobial effects than Mer1 at the same concentrations.

Discussion & Conclusion: Evaluation of the effect of amino acid replacement with less negatively charge on increasing the antimicrobial activity of peptides is a suitable strategy. The above results increase the possibility of designing and producing antimicrobial peptides against antibiotic-resistant strains as the next generation of antibiotics.

Keywords: Antimicrobial peptides, Factor c, Horseshoe crab, Sushi3 tetramer peptide

➢ **How to cite this paper**

Bagh Beheshti S, Haddadian Sh, Eidi A, Pishkar L, Rahimi H. Evaluation of the Effect of Less Negatively Charged Amino Acid Substitution in Synthetic Tetramer Peptide S3 Derived from Horseshoe Crab Ambocyte on its Antibacterial Properties. Journal of Ilam University of Medical Sciences. November 2021;29(4): 103-116.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]

© The Author(s)

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

JIMUS

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

ارزیابی تأثیر جایگزینی اسید آمینه‌هایی با بار منفی کمتر در پپتید ترامر سنتتیک S3 مشتق از آمبوسیت خرچنگ نعل‌اسبی بر خاصیت ضد باکتریایی آن

سکینه باغ بهشتی[۱]، شاهین حدادایان[۲*]، اکرم عیدی[۱]، لیلا پیشکار[۳]، حمزه رحیمی[۴]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

[۲] گروه نانو بیوتکنولوژی، گروه تحقیقات فناوری های نوین، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

[۳] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر،اسلامشهر، ایران

[۴] گروه پزشکی مولکولی، گروه تحقیقات فناوری های نوین، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۱

تاریخ داوری: ۱۴۰۰/۰۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۸

نویسنده مسئول:

شاهین حدادایان

گروه نانو بیوتکنولوژی، گروه تحقیقات فناوری های نوین، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

Email:

hadadian@yahoo.com

چکیده

مقدمه: بررسی آثار پپتیدهای دارای خاصیت ضدباکتریایی می‌تواند راه را برای به‌دست آوردن آنتی‌بیوتیک‌های مؤثرتر هموار سازد. در این تحقیق، پپتید ترامر Sushi3 طراحی و بیان شد؛ سپس با پپتید ترامر Sushi3 دیگری مطالعه و مقایسه گردید که به‌منظور تغییر خواص ضدباکتریایی، اسید آمینه‌های اسپارتیک اسید و پرولین آن با اسید آمینه‌های گلیسین و سرین جایگزین شده بودند.

مواد و روش ها: ابتدا توالی‌های پپتیدی Sushi3 ترامر یادشده، طراحی و ساخته و به‌ترتیب Mer1 و Mer2 نام‌گذاری و به‌طور جداگانه در پلاسمید pET-26b(+) کلون گردید و درنهایت، به میزبان E.coli BL21(DE3) انتقال داده شدند. پس از بیان پپتیدهای بالا، وجود پپتیدها با روش SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید گردید؛ سپس فعالیت ضدمیکروبی Mer1 و Mer2 بررسی و مقایسه شد. درنهایت، سمیت دو ترامر ساخته‌شده بر روی ردهٔ سلولی MDA-MB-231 ارزیابی و مقایسه گردید.

یافته‌ها: Mer1 و Mer2 بیان پروتئینی مشابه داشتند و اثر سمی هر دو پپتید روی ردهٔ سلولی تفاوت معناداری نداشت؛ اما Mer2 نسبت به Mer1، در غلظت‌های یکسان، آثار ضدمیکروبی مؤثرتری دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: ارزیابی تأثیر جایگزینی اسید آمینه با بار منفی کمتر در افزایش فعالیت ضدمیکروبی پپتیدها، راهکار مناسبی است. نتایج بالا امکان طراحی و تولید پپتیدهای ضدمیکروبی علیه سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را به‌عنوان نسل بعدی آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: پپتید ترامر Sushi3، خرچنگ نعل‌اسبی، فاکتور c، پپتیدهای ضدمیکروبی

استناد: باغ بهشتی، سکینه؛ حدادیان، شاهین؛ عیدی، اکرم؛ پیشکار، لیلا؛ رحیمی، حمزه. ارزیابی تأثیر جایگزینی اسید آمینه‌هایی با بار منفی کمتر در پپتید ترامر سنتتیک S3 مشتق از آمبوسیت خرچنگ نعل‌اسبی بر خاصیت ضد باکتریایی آن. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آبان ۱۴۰۰؛۲۹(۴): ۱۱۶-۱۰۳.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]

[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]

حق‌مؤلف © نویسندگان

مقدمه

افزایش عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های چندگانه شامل سویه های مقاوم *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Pseudomonas aeruginosa* و انتروباکتریاسهٔ مقاوم به carbapenem، مثال‌هایی از تهدیدات جدی هستند که امروزه، به یکی از مهم ترین چالش‌های حوزهٔ درمان تبدیل شده است و درنتیجه، تولید نسل جدیدی از ترکیبات ضدمیکروبی ضروری است که به‌راحتی مقاومت دارویی در برابر آن‌ها ایجاد نشود (۱). مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از مهم‌ترین معضلات بهداشتی جامعهٔ امروز است. ایران یکی از کشورهایی است که با تجویز بیش‌ازاندازهٔ آنتی‌بیوتیک روبروست و مصرف آن در این کشور، تقریباً برابر با کل مصرف آن در اروپاست. بر اساس این، مصرف آنتی‌بیوتیک در ایران ۱۶ برابر استاندارد جهانی است (۲). تعداد بسیاری از آنتی بیوتیک های سنتزی با ساختارهای شیمیایی متفاوت، برای کنترل عفونت های بیمارستانی و بیماری های عفونی انسان در سراسر جهان استفاده می شوند. استفادهٔ طولانی‌مدت از این آنتی بیوتیک ها باعث ظهور مقاومت های چندداروییی و باکتری های مقاوم می‌گردد و از سویی، با آثار جانبی باعث بروز مشکلات بالینی فراوانی در بیماران می شود (۳)؛ ازاین‌رو، بایستی تحقیقات گسترده‌ای برای طراحی و سنتز ترکیبات ضد میکروبی و یا کشف مواد ضدمیکروبی جدید از منابع طبیعی ازجمله گیاهان دارویی، جلبک ها و منابع حیوانی صورت گیرد. مقابلـه بـا پدیـدهٔ مقاومـت دارویـی به‌منظور کاهش بروز آن و یا محدود کردن عوامل میکروبی مقاوم اهمیت فراوانی دارد. ازآنجاکه بیماری های عفونی و میکروبی دستهٔ بزرگی از بیماری ها را تشکیل می دهند و از سویی، شمار سویه های میکروبی مقاوم به آنتی بیوتیک ها روزبه‌روز بیشتر می شود؛ بنابراین، نیاز به مواد ضد قارچی و یا ضد باکتریایی جدید و کم‌ضرر هرروز بیشتر نمایان می گردد؛ ازاین‌رو، بررسی آثار پپتیدهای سنتتیک ضد باکتریایی می تواند راه را برای به‌دست آوردن آنتی بیوتیک های جدید هموار سازد. پپتیدهای ضدمیکروبی یکی از گروه‌های متنوع ترکیبات ضدمیکروبی هستند که به علت پیدایش مقاومت باکتری‌های پاتوژن به آنتی‌بیوتیک‌های رایج موردتوجه بسیاری قرار گرفته‌اند. این مولکول‌های شبه‌پروتئینی اغلب دربردارندهٔ اسید آمینه‌های تغییرشکل‌یافته و اصلاح‌شده‌ای هستند که در پلی‌پپتیدهای ساخته‌شده توسط ریبوزوم‌ها یافت نمی‌شوند.

سمیت این پپتیدها به علت ظرفیت مداخله‌گر آن‌ها در غشای میکروبی است که با ایجاد منافذ در غشا، سبب القای مرگ سلولی آن‌ها می‌گردند. بسیاری از گونه‌های گیاهان و حیوانات، ازجمله انسان، توانایی تولید چندین نوع پپتید ضدمیکروبی را دارند (۴). پپتیدهای ضدمیکروب ایمنی ذاتی موجودات را تحریک می کنند و فعالیت ضدباکتریایی، ویروسی و قارچی دارند. پپتیدهای ضدمیکروبی با اسیدهای آمینه دارای بار مثبت بر روی سطح میکروارگانیسم ها به‌وسیله نیروهای الکترواستاتیک برهم کنش می‌کنند. ساختار دوم پپتید برای اتّصال آن به ترکیبات با بار منفی در غشاهای هدف مانند فسفولیپیدهای آنیونی، ضروری است. سازوکارهایی که به‌وسیلهٔ آن ها پپتیدهای ضدمیکروبی می توانند به غشاهای میکروبی نفوذ کنند؛ مانند تشکیل منافذ، ترویج ساختار غیرلیپیدی یا تخریب غشای دولایه، برای همهٔ پپتیدها یکسان نیست و به‌نظر می رسد که به ویژگی های مولکولی پپتید و ترکیب لیپیدی غشای هدف بستگی دارد (۵).

پپتیدهای ضدمیکروبی (AMPs) به‌عنوان راهکار جدیدی برای عفونت‌های مقاوم در برابر داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شوند و تحقیقات بی‌شماری در این حوزه در دست انجام است (۶). از دیگر مزیت‌های مهم برخی از پپتیدهای ضدمیکروبی کاربرد آن‌ها در کنترل تشکیل یا حذف بیوفیلم‌ها و استفاده در حذف اندوتوکسین است (۷، ۸). پپتید S3 مشتق‌شده از فاکتور C موجود در آمبوسیت (Amoebocyte) خرچنگ نعل‌اسبی یکی از این پپتیدهای ضدمیکروبی است که تحقیقات متعددی دربارهٔ

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]

سازوکار ضدمیکروبی آن صورت گرفته است. در داخل همولنف hemolymph (مایع گردشی مشابه خون) گونه های مختلف خرچنگ‌های نعل‌اسبی، سلول‌های گردشی فراوانی به نام آمبوسیت وجود دارند که لیز شدن این آمبوسیت ها توسط اندوتوکسین باکتری‌های گرم منفی به ایجاد ماده ژل‌مانندی منجر می‌شود.

به‌طورکلی، سنتز پپتیدها فرایند پیچیده، پرهزینه و زمان‌بری است و جداسازی پپتیدهای ضدمیکروبی از منابع طبیعی آن‌ها نیز علاوه بر زمان‌بر و پرهزینه بودن (۹)، صرفهٔ اقتصادی و زیست‌محیطی ندارد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت، محققان دریافتند که با بیان ژن پپتید S3به‌صورت فرم تترامر آن، علاوه بر حفظ فعالیت ضدمیکروبی، بیشترین میزان بیان را دارد (۱۰). پپتید SΔ3 واریانت ارتقایافتهٔ پپتید S3 است که در آن، با تغییر دو اسید آمینهٔ G9 و E11 به لیزین، بار مثبت پپتید، خاصیت ضدمیکروبی و البته اثر سمیت آن افزایش یافته است. از سویی، تحقیقات نشان داده است که فرم‌های مولتی‌مر پپتید S3نیز خاصیت ضدمیکروبی دارند (۱۱).

از آن جاکه پپتیدهای ضد میکروبی از مولکول‌های مهم ایمنی ذاتی بدن هستند و سمیت سلولی اندکی دارند، می توانند در آینده ای نه‌چندان دور، به‌عنوان دارو در درمان بیماری های التهابی و همچنین شوک های سپتیک حاصل از اندوتوکسین باکتری‌ها استفاده شوند (۱۲). در این تحقیق، به مقایسه میزان بیان واریانت‌های مختلف پپتید ضدمیکروبی S3 در سویهٔ *E.coli* BL 21(DE3) و ارزیابی تأثیر جایگزینی اسید آمینه‌هایی با بار منفی کمتر دارای گلایسین، در بهبود خواص ضدمیکروبی پرداخته شد.

مواد و روش ها

سنتز ژن: جهت تعیین توالی DNA، توالی‌های پروتئینی طراحی‌شده از ترجمه معکوس سایت ExPASy استفاده شد. سایت‌های برشی NdeI و XhoI به انتهای '5 ,'3 آن و دنباله هیستیدنی و همچنین سایت برش انتروکیناز به آن اضافه گردید و سفارش سنتز ژن به شرکت Biomatik کانادا داده شد. سازه های ژنی (Mer1 و Mer2) در وکتور pET-26b(+) دریافت گردید.

ساختار توالی پروتئینهای Mer1 و Mer2 (نحوه چیدمان واحدهای پپتیدی و لینکر) در جدول ۱ نشان داده شده است.

تکثیر پلاسمید، تخلیص و تهیهٔ سلول‌های مستعد: از باکتری *E. coli TOP10F* به‌منظور تکثیر پلاسمیدهای مدنظر استفاده شد. پس از انتقال وکتورها به میزبان *E. Coli* TOP10F، فرایند تخلیص پلاسمید با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید Qiagen صورت گرفت و نمونه ها برای مشاهدهٔ کیفیت عمل استخراج، بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شدند.

ابتدا ۱۰ میکرولیتر از استوک میزبان باکتریایی *E. Coli* سویهٔ *BL21(DE3)* موجود در فریزر منفی ۷۰ درجه، بر روی پلیت آگار Luria-Bertani medium (LB) کشت داده و به مدت یک‌شب در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد گرماگذاری گردید؛ سپس از پلیت یک کلنی برداشته و در ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت Luria broth (LB) تلقیح شد و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۳ تا ۴ ساعت با سرعت ۱۷۰g کشت گردید. هنگامی‌که جذب نوری سلول‌ها در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ (فاز لگاریتمی) رسید، سلول ها به کمک سانتریفوژ در دور ۹۰۰۰g به مدت ۳ دقیقه رسوب داده و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب سلولی حاصل در ۹۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ مولار از کلسیم کلراید ($CaCl_2$) سرد حل گردید و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سلول ها

جدول ۱. ساختار توالی پروتئین های **Mer1** و **Mer2**

ردیف	نام پروتئین	واحدهای سازندهٔ پروتئین
۱	Mer1	10His-Entrokinase site-S3-DP-S3-DP-S3-DP-S3
۲	Mer2	10His-Entrokinase site-S3- (GGGGS)3-S3- (GGGGS)3- S3- (GGGGS)3-S3

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]

در دور g۹۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شدند.

رسوب سلولی در ۶۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ مولار از $CaCl_2$ سرد حل گردید و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. درنهایت، سلول‌ها دوباره در دور g۹۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی در ۴۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ مولار از $CaCl_2$ سرد حل گردید.

ترانسفورماسیون باکتری BL21 با وکتور نوترکیب: پ‌س از آماده شدن سلول‌های مستعد، سازهٔ ژنی به‌منظور بیان به باکتری E. coli سویهٔ BL21(DE3) منتقل شد. پس از انتقال سازه های ژنی به سلول های بیانی، مراحل بیان این پروتئین ها در باکتری صورت گرفت. بیان پروتئین های نوترکیب در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و زمان انکوباسیون ۴ ساعت پس از القا، در حجم ۵ میلی‌لیتر و ۲۵۰ میلی‌لیتر انجام گردید.

استخراج پروتئین نوترکیب: پس از جداسازی زیست‌توده از محیط کشت به‌وسیلهٔ سانتریفیوژ، دیوارهٔ سلولی از طریق حل کردن پلت ها به نسبت ۱:۵ وزنی/ حجمی در محلول لیزکنندهٔ Tris (tris- HCl) hydrochloride (۲۰ میلی‌مولار pH7.5) و با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (ده پالس ۳۰ ثانیه – توقف ۳۰ ثانیه) شکسته شد و پس از شستشو و حذف بقایای دیوارهٔ سلولی شکسته‌شده، اینکلوژن بادی ها با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و دور g ۹۰۰۰ به‌صورت پلت جداسازی گردید و برای شستشو در بافر tris- HCl ۲۰ میلی‌مولار pH 7.5 حاوی اوره ۲ مولار حل شد و پس از سانتریفیوژ بر اساس شرایط بالا، سوپرناتانت دور ریخته و پلت ها جمع آوری گردید؛ سپس اینکلوژن بادی شسته‌شده با استفاده از بافر tris- HCl ۲۰ میلی‌مولار pH 7.5 حاوی اوره ۶ مولار حل گردید (نسبت ۱:۵ وزنی/ حجمی) و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه با همزن مغناطیسی همزده شد. با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت g۹۰۰۰، مایع رویی حاوی پروتئین حل‌شده جمع‌آوری گردید.

تخلیص پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی یون فلزی (IMAC): برای تخلیص هریک از توالی ها، یک میلی‌لیتر رزین NiNTA (۲ ml سوسپانسیون ۵۰ درصد) درون ستون Hitrap یک میلی لیتری ریخته شد و پس از متعادل‌سازی با ۵ میلی لیتر بافر متعادل‌سازی با شدت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه (ml/min)، نمونه به ستون اعمال گردید؛ سپس ستون با ۱۰ برابر حجم ستون از بافر متعادل‌سازی تا رسیدن جذب A280 به 0.01> و پس از آن، با ۴ برابر حجم ستون از بافر شستشو داده شد؛ سپس ۶ حجم از بافر شویش به ستون اعمال گردید و با مشاهدهٔ پیک، فرکشن های یک میلی‌لیتری مربوط به مشاهدهٔ پیک جمع‌آوری گردید. درنهایت، ستون با استفاده از ۵ حجم محلول بازیابی، برای استفاده مجدد شستشو داده شد و با عبور دادن اتانول ۲۰ درصد (دو حجم ستون) تا استفاده بعدی در یخچال نگهداری گردید. حضور پپتید هدف در نمونهٔ خارج‌شده از ستون با استفاده از SDS-PAGE تأیید شد.

وسترن بلاتینگ (Western Blotting): پروتئین‌هایی که در مرحلهٔ پیش در ژل SDS-PAGE، از نظر اندازه از یکدیگر جداشده بودند، با استفاده از ولتاژ الکتریکی به روی کاغذ نیتروسلولز منتقل گردیدند. کاغذ نیتروسلولز ظرفیت بسیار مناسبی (در حدود ۷۰ $\mu g/cm^2$) برای اتصال پروتئین‌ها نشان می‌دهد (۱۳، ۱۴). در این تحقیق، از دستگاه Semi Dry Bio-rad برای انتقال باندهای پروتئینی استفاده شد. برای جلوگیری از انتقال غیراختصاصی آنتی‌بادی‌ها به سطح کاغذ نیتروسلولز، کاغذ به مدت یک‌شب در بافر Phosphate buffered saline (PBS) حاوی Bovine Serum Albumin (BSA) ۵ درصد قرار داده شد.

روز بعد، پس از ۳ بار شستشوی کاغذ با بافر PBS حاوی Tween 20 ۰/۰۵ درصد ، آنتی‌بادی علیه دنبالهٔ هیستیدینی متصل به آنزیم پراکسیداز با رقت ۱ به ۱۰۰۰ در بافر PBS روی کاغذ نیتروسلولز اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق، روی شیکر قرار داده شد. پس از شستشوی دوبارهٔ کاغذ با بافر شستشو، برای تشخیص باندهای پروتئینی سوبسترای آنزیم پراکسیداز یعنی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]

[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]

Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) حاوی ۲۰ میکرولیتر H_2O_2 به آن اضافه گردید. در اثر واکنش DAB و پراکسیداز روی کاغذ نیتروسلولز، مشاهدهٔ رسوب قهوه‌ای رنگ حضور باند پروتئین مدنظر را تأیید کرد.

فعالیت ضدمیکروبی (حداقل غلظت بازدارندگی MIC50): اثر ضدمیکروبی پروتئین هیبریدی حاصله، از طریق تعیین حداقل غلظت بازدارندگی مطالعه شد. برای این منظور، رقت‌های متوالی از پلی‌پپتید تهیه می‌گردد و به چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی استریل افزوده می‌شود. باکتری های گرم منفی مختلف *pseudomonas aeruginosa* (سویهٔ استاندارد ATTC27853 و سویهٔ کلینکی مقاوم ایزوله‌شده در کلینیک طوس) و *Escherichia coli* (سویهٔ استاندارد ATCC25922 و سویهٔ کلینیکی مقاوم) ابتدا در محیط کشت Mueller Hinton کشت شبانه داده شد و سپس با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه به ۵ میلی‌لیتر محیط تازه تا رسیدن به فاز لگاریتمی (OD_{600nm} 0.6) کشت گردید؛ سپس با استفاده از سرم نمکی سترون تا رسیدن به غلظت سلولی 5×10^5 $CFUml^{-1}$ رقیق شد (حصول کدورت مشابه کدورت استاندارد مک فارلند ۰/۵). در شرایط سترون، میزان ۵۰ میکرولیتر محیط کشت مولرهینتون در هریک از چاهک های ستون های ۲ الی ۱۰ ریخته شد. در چاهک‌های ستون شمارهٔ ۱۲ برای تست سترونی شرایط آزمون، تنها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت ریخته شد. در چاهک های ۱، ۱۰۰ میکرولیتر از هریک از پروتئین های توالی‌های ژن Mer1 (Seq1) و ژن Mer2 (Seq2)غلظت 20X، با استفاده از محیط کشت مولرهینتون ۱۰ برابر رقیق گردید (غلظت نهایی 2X)؛ سپس ۲۵۰ میکرولیتر از هریک آن ها در چاهک‌های ۱ ردیف‌های مربوطه ریخته شد. با کمک سمپلر چندکاناله، ۲۰۰ میکرولیتر از چاهک‌های ۱ به درون چاهک‌های ۲ ریخته شد و با ادامهٔ این کار تا چاهک‌های شمارهٔ ۱۰، رقت های متوالی با نسبت ۴/۵ تهیه گردید؛ سپس به هریک از چاهک‌های ۱ الی ۱۰ و چاهک‌های ستون ۱۱، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی تهیه‌شده اضافه گردید؛ بنابراین، چاهک‌های ۱ الی ۱۰ به رقت‌های متوالی پپتیدها، چاهک‌های ستون ۱۱ به کنترل مثبت باکتری (رشد حداکثر سویه) و چاهک‌های ستون ۱۲ به کنترل منفی باکتری (تست سترونی آزمون) اختصاص داده شد (۱۵). پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، جذب چاهک‌ها در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید و حداقل غلظتی از پروتئین که جذب آن معادل ۵۰ درصد جذب سلول فاقد پروتئین بود، به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی پروتئین (MIC 50) انتخاب شد. آزمون در دو نوبت مستقل از هم و به‌صورت تکرار سه‌تایی صورت گرفت.

برای تهیهٔ استاندارد مک فارلند ۰/۵، ابتدا محلول ۰/۰۴۸ مولار کلرید باریم ($BaCl_2.2H_2O$) و محلول ۰/۱۸ مولار اسید سولفوریک (H2SO4) ساخته شد؛ سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول کلرید باریم به ۵/۹۹ میلی لیتر محلول اسید سولفوریک اضافه گردید و به‌خوبی همزده شد تا حالت سوسپانسیون به‌دست آید. برای اطمینان از صحت محلول سازی، جذب نوری محلول مک فارلند به‌دست‌آمده در طول‌موج ۶۲۵ نانومتر اندازه گیری گردید. محدودهٔ صحیح این جذب بین ۰/۰۸ الی ۰/۱۳ است. استاندارد حاصله در لوله های آزمایش در حجم های ۵ میلی‌لیتر تقسیم و دور از نور در دمای محیط نگهداری شد. با استفاده از درون‌یابی مقادیر MIC50 برای همهٔ تکرارها تعیین گردید و آنالیزهای آماری بر روی این مقادیر صورت گرفت. از منحنی Box- Plot برای تشخیص داده‌های پرت (Outlier) و از آزمون Shapiro- Wilk برای بررسی توزیع نرمال نتایج MIC50 استفاده شد. برای ارزیابی یکسان بودن واریانس‌ها از آزمون Levene و از آزمون independent sample T-Test برای مقایسهٔ MIC50 پلی‌پپتیدهای موردمطالعه استفاده گردید.

اثر سمیت پپتید بر سلول‌های یوکاریوتی: ردهٔ سلولی MDA-MB-231 (ATCC: HTB-26) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در فلاسک کشت سلولی ۲۵ میلی لیتر دارای محیط DMEM حاوی FBS (Fetal

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]

10% (bovine serum حاوی آنتی بیوتیک (.100 µg
ml^{-1}پنی‌سیلین و $100\ \mu g\ ml^{-1}$استرپتومایسین) در CO_2 5% در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت و تشکیل یک لایهٔ سلولی بر دیوارهٔ فلاسک، سلول ها دوباره پاساژ گردیدند و دوباره پس از ۲۴ ساعت و تشکیل تک لایهٔ سلول ها، به‌وسیلهٔ تیمار ملایم با تریپسین از دیواره کنده شد و با سانتریفیوژ در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و دور ۱۲۰۰ g به مدت ۲ دقیقه، با تخلیهٔ سوپرناتانت تریپسین از سلول ها حذف گردید و سلول ها دوباره در محیط کشت بالا حل شد و پس از اطمینان از viability سلول ها از طریق رنگ‌آمیزی با تریپان بلو و شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار در زیر میکروسکوپ، سلول ها به میزان ۳۰۰۰ در ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک میکروپلیت (۹۶ چاهکه تخت مخصوص کشت سلولی) توزیع گردید. پس از ۲۴ ساعت و اطمینان از رشد سلول ها و اتصال آن ها به دیواره، محیط کشت داخل چاهک ها از طریق مکش تخلیه شد و غلظت های مختلف هریک از پلی پپتیدهای ضدمیکروبی (رقت‌های متوالی با نسبت یک‌دوم رقیق‌شده در محیط کشت آماده مطابق فوق) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه گردید. همین عملیات پس از ۲۴ ساعت، در میکروپلیت های جدید تکرار شد و به این ترتیب سلول های پلیت روز اول به مدت ۴۸ ساعت و سلول های پلیت روز دوم به مدت ۲۴ ساعت با پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی در تماس قرار گرفتند. در روز سوم، محلول محیط حاوی پپتیدها از چاهک ها تخلیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ حیاتی formazonMTT با غلظت 0.5 mg/ml به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه و CO_2 5%، کریستال‌های formazan با افزودن 100 µl DMSO به‌صورت محلول درآمده و میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر (۵۹۵ nm) اندازه گیری گردید و با تعیین نسبت جذب نوری هر نمونه به جذب نوری نمونهٔ کنترل منفی (viability ۱۰۰ درصد)، نسبت بقای سلول‌ها محاسبه شد و غلظتی از پپتید که در آن ۵۰ درصد سلول‌ها زنده بودند، به‌عنوان غلظت IC50 گزارش گردید. آزمون در دو نوبت مستقل از هم و به‌صورت تکرار سه‌تایی صورت گرفت. از منحنی Box- Plot برای تشخیص داده های پرت (Outlier) و از آزمون Shapiro- Wilk برای بررسی توزیع نرمال نتایج درصد بقای سلولی استفاده شد. با توجه به مشاهده نشدن سمیت ۵۰ درصد (IC50) دربارهٔ همهٔ پلی پپتیدها و پپتید Mer1 به‌عنوان پپتید مرجع، نتایج بقای سلولی در بیشترین غلظت پلی پپتید (200 µM)، انتخاب گردید و برای ارزیابی یکسان بودن واریانس‌ها از آزمون Leveneو برای مقایسهٔ میزان سمیت پپتیدها در هریک از زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، از آزمون one way ANOVA و آزمون LSD و post -hoc (در شرایط برابری واریانس‌ها) و آزمون Games-Howell (در شرایط واریانس‌های نامساوی) استفاده شد. برای مقایسهٔ سمیت هر پپتید در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت، از آزمون independent sample T- Test استفاده گردید.

یافته ها

وسترن بلات برای تأیید بیان پروتئین هدف: با توجه به اینکه در سکانس های پروتئین های مدنظر، دنبالهٔ هیستیدینی تعبیه‌شده بود، آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی علیه دنبالهٔ هیستیدینی انجام شد (شکل ۱). تطابق باندهای مشاهده‌شده پس از مرحلهٔ القای باکتری با باندهای آزمون وسترن، بیان پروتئین هدف را تأیید نمود. پروتئین Mer2 در کلونهای متفاوت بصورت تک باند و دو باند مشاهده شد که با توجه به اینکه باند سنگین تر از نظر وزنی تقریباً دو برابر باند سبکتر بود و در آزمون وسترن هر دو باند دارای دنباله هیستیدینی بودند. همچنین باند سنگینتر در شرایط احیاء آزمون SDS-PAGE از نظر وزنی در جایگاه باند اول قرار گرفت. به نظر میرسد در کلونهای متفاوت از سکانس ۲، دو پروتئین Mer2 از طریق باند دی سولفیدی به صورت دایمر تبدیل شده و در نتیجه در شرایط غیر احیاء و در آزمون وسترن در جایگاه باند سنگین تر قرار گرفتند. در ادامه تحقیق پروتئینهای Mer1 و Mer2 (حاصل

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]

از کلون تک باند) تخلیص گردیده و برای آزمونهای مختلف مورد استفاده قرار گرفتند.

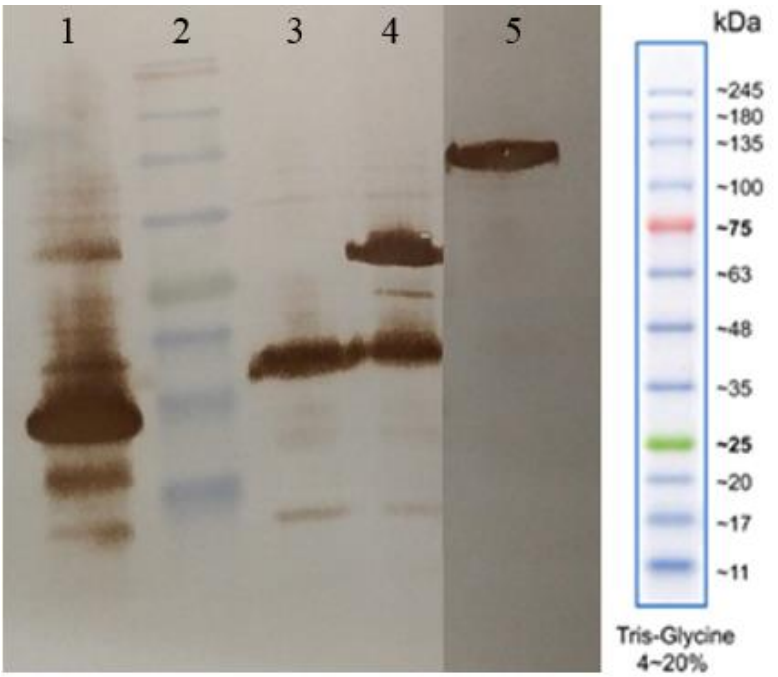
نتایج آزمون MTT: آزمون MTT با ردهٔ سلولی MDA-MB-231 در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. در هریک از میکروپلیت‌ها میانگین جذب نوری چاهک‌های بلانک از جذب نوری هریک از چاهک‌ها کسر گردید. در هر پلیت، میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل نیز به‌عنوان Abs control در نظر گرفته شد و درصد بقای سلولی از طریق رابطهٔ زیر محاسبه گردید:

$$\%\ \text{Cell Survival} = (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) * 100$$

برای مقایسه سمّیت سلولی پروتئینهای Mer1 و Mer2، نتایج درصد بقای سلولی بعد از تماس با غلظت ۲۵۰ میکرومولار هر یک از این دو پروتئین با استفاده از آزمون آماری Independent T- test با یکدیگر مقایسه شد. نتایج مربوطه در جدول شمارهٔ ۲ آورده شده است. در مرحله اول از آزمون Shapiro- Wilk برای ارزیابی نرمال بودن توزیع نتایج استفاده شد. در همهٔ موارد P.value>0.05 بیانگر توزیع نرمال نتایج بود.

P value> 0.05 میان نتایج میزان سمیت هریک از سکانس ها در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، بیانگر نبودِ اختلاف معنا دار در سمیت سکانس ها است.

برای مقایسهٔ اثر زمان بر میزان بقای سلولی، برای هریک از پلی‌پپتیدها به‌صورت جداگانه میان داده‌های ۲۴



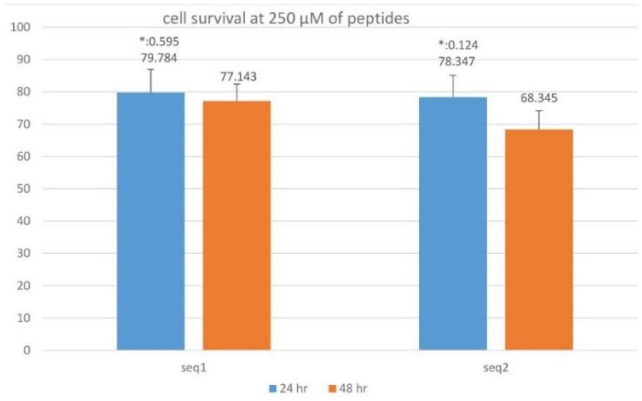
شکل ۱. ایمونوبلاتینگ با استفاده از دنبالهٔ هیستیدینی

شمارهٔ ۱. پروتئین Mer1 (۱۸ کیلودالتون)؛ شمارهٔ ۲: مارکر پروتئینی؛ شمارهٔ ۳. پروتئین Mer2 کلون تک باند (۲۱ کیلودالتون)؛ شمارهٔ ۴. پروتئین Mer2 کلون دو باند(دایمر)؛ شمارهٔ ۵. نمونهٔ پروتئینی کنترل مثبت حاوی دنبالهٔ هیستیدینی (۴۳ کیلودالتون) که با توجه به دو برابر بودن وزن مولکولی آن، در فضای بالاتر از محل قرارگیری پپتید Mer1 و Mer2 قرار می‌گیرد.

جدول ۲. مقایسهٔ درصد بهبود خاصیت ضدمیکروبی پپتید سکانس ۲ به نسبت سکانس ۱

peptide 1	peptide 2	E.coli - ATCC25922	resistant E. coli	*P. aeruginosa* ATCC27853	resistant *P. aeruginosa*
Mer1	Mer2	18.94	14.76	12.13	18.33

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]



شکل ۲. مقایسهٔ میزان بقای سلولی در ۲۴ و ۴۸ ساعت

و ۴۸ ساعت، از آزمون Independent T- test(16) استفاده شد. مقایسهٔ میزان بقای سلولی در حداکثر غلظت پلی‌پپتید (µ۲۵۰M) برای هریک از پپتیدها در ساعات ۲۴ و ۴۸ ساعت، در شکل شمارهٔ ۲ نشان داده‌شده است.

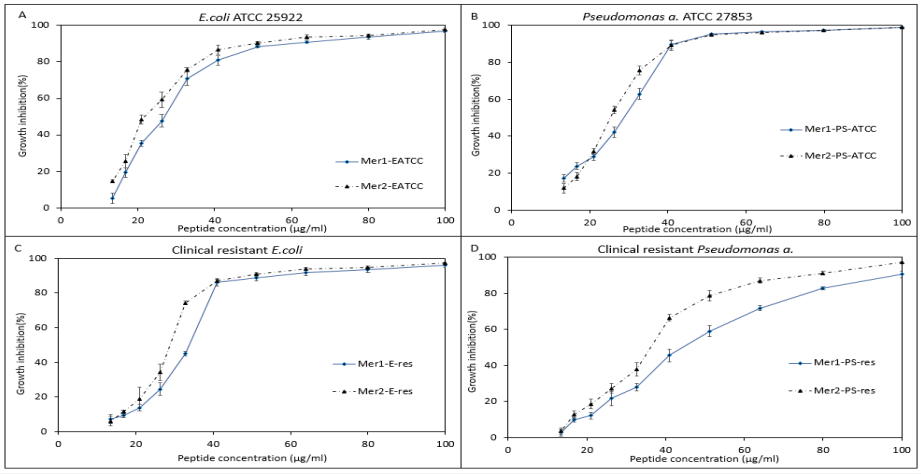
نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتریایی (MIC): تأثیر غلظت‌های مختلف هریک از پلی‌پپتیدهای Mer1 و Mer2 بر رشد باکتری‌های گرم منفی مختلف *Pseudomonas aeruginosa* (سویهٔ استاندارد ATCC27853 و سویهٔ کلینکی مقاوم ایزوله‌شده) و *E. coli* (سویهٔ استاندارد ATCC25922 و سویهٔ کلینیکی مقاوم)، به‌صورت تکرارهای چهارتایی بررسی شد. در هر میکروپلیت، میانگین چاهک‌های بلانک از میانگین چاهک‌های حداکثر رشد کسر گردید و میزان بازدارندگی بر اساس رابطه زیر محاسبه شد:

Growth Inhibition (%) = (OD maximum growth -OD sample)/ OD maximum growth *100

منحنی بازدارندگی برحسب غلظت پلی‌پپتید رسم گردید. نتایج مربوط به تکرارهای چهارتایی هریک از پلی‌پپتیدها برای هریک از باکتری‌های یادشده در شکل شمارهٔ ۳ آمده است.

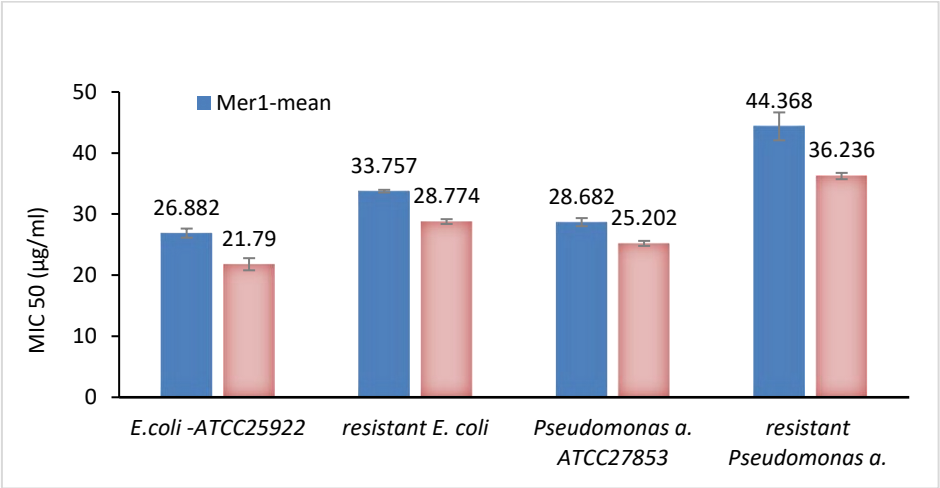
میزان بازدارندگی میانگین غلظت‌های پلی‌پپتیدها بر هریک از سویه‌های بررسی‌شده در شکل شمارهٔ ۳ نشان داده‌شده است. . در این شکل سویه‌هایATCC27853 – *Pseudomonas aeruginosa* ، *E. coli* - ATCC25922 سویه‌های کلینیکی مقاوم هر یک به ترتیب با PS-ATCC، E-ATCC، E-res و PS-res نشان داده شده‌اند.

در شکل شمارهٔ ۳، با توجه به میانگین نتایج و با استفاده از روش درون‌یابی، میزان بازدارندگی ۵۰ درصد محاسبه گردیده است. در همهٔ این شکل‌ها، غلظت‌های مختلف



شکل ۳. الف. میانگین میزان بازدارندگی غلظت های مختلف پلی‌پپتیدها بر رشد باکتری *E.coli* ATCC 25922، A. *P. aeruginosa* ATCC 27853، B. *E.coli* کلینیکال مقاوم، C. *P. aeruginosa* مقاوم، D.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]



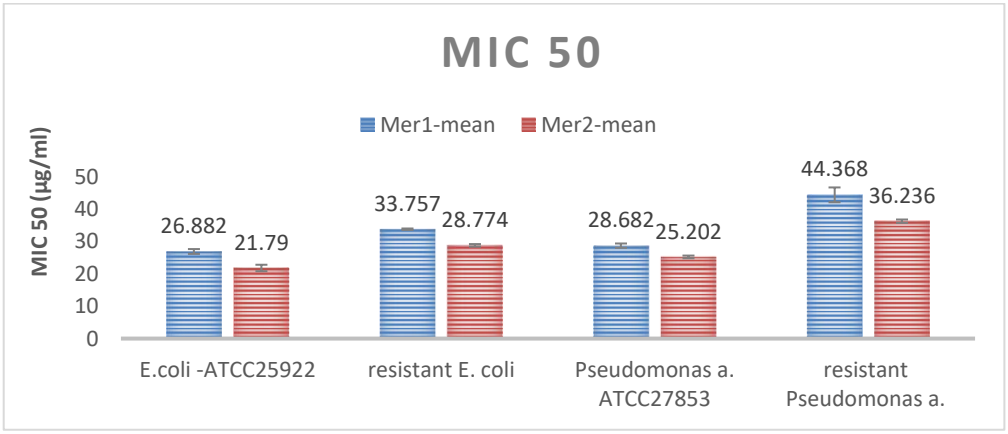
شکل ٤. مقایسه MIC50 پلی‌پپتیدها

پلی‌پپتیدها با نسبت رقت‌های ۰/۸ شامل ۱۰۰، ۸۰، ۶۴، ۵۱.۲، ۴۰/۹۶، ۳۲/۷۶۸، ۲۶/۲۱۴، ۲۰/۹۷۱، ۱۶/۷۷۷ و ۱۳/۴۲۲ µg/ml تهیه شده‌اند. برای سهولت مقایسه، اطلاعات MIC 50 برحسب µg/ml در شکل شمارهٔ ۴ دوباره نمایش داده‌شده است.

برای بررسی معنادار بودن اختلافات مشاهده‌شده در شکل شمارهٔ ۴، مقادیر MIC50 برای هریک از تکرارها با استفاده از درون‌یابی تعیین گردید و نتایج از نظر آماری آنالیز شد. در آزمون Shapiro- Wilk، P value>0.05 بیانگر نرمال بودن توزیع همهٔ تکرارهای MIC50 بود؛ بنابراین، برای مقایسهٔ آن‌ها از آزمون پارامتری ANOVA استفاده شد. از نمودار BOX plot برای تشخیص داده های پرت (outlier) استفاده شد و دادهٔ پرتی وجود نداشت و درنتیجه، همهٔ داده‌ها قابل‌قبول و قابل‌مقایسه بودند. برای مقایسهٔ MIC هریک از توالی ها روی هریک از سویه ها، از آزمون Independent T test استفاده شد. در همهٔ موارد P value<0.05 بود که بیانگر معنادار بودن اختلافات مشاهده‌شده میان نتایج بود؛ بنابراین، برای بررسی میزان بهبود خاصیت میکروبی از حالت کاهش غلظت MIC بر اساس رابطهٔ زیر استفاده گردید و نتایج در جدول شمارهٔ ۳ نشان داده شد.

MIC improvement = (MIC 50 peptide 1-(MIC 50 peptide 2) / MIC 50 peptide 1* 100

بر اساس نتایج جدول شمارهٔ ۳، استفاده از اسید آمینه‌های گلایسین و سرین سبب بهبود ۱۲ الی ۱۹ درصدی حداقل غلظت بازدارندگی رشد میکروبی در سویه‌های مطالعه‌شده گردید.



شکل ۵. مقایسه MIC50 پلی‌پپتیدها

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]

جدول ۳. مقایسهٔ درصد بهبود خاصیت ضدمیکروبی پپتید سکانس ۲ به نسبت سکانس ۱

peptide 1	peptide 2	E.coli - ATCC25922	resistant E. coli	*P. aeruginosa* ATCC27853	resistant *P. aeruginosa*
Mer1	Mer2	18.94	14.76	12.13	18.33

بحث و نتیجه‌گیری

پپتیدهای ضدمیکروبی بخش مهمی از دستگاه ایمنی ذاتی یوکاریوت‌ها هستند و جایگزینی احتمالی برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج ارائه می‌دهند؛ بنابراین، درک عملکرد آن‌ها اهمیت بالایی دارد. بسیاری از آن‌ها با غشای باکتری‌ها در تعامل هستند که به آشفتگی لایهٔ لیپیدی و درنهایت، غیرفعال شدن پاتوژن منجر می‌گردد. ازآنجاکه به علت تجویز بیش‌ازحد آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری‌های مقاوم به دارو ظهور کرده‌اند، به کلاس‌های جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌ها نیاز است که پپتیدهای ضدمیکروبی می‌توانند یکی از این جایگزین‌های ارزشمند باشد.

خاصیت ضدمیکروبی پپتید Sushi1 مشتق‌شده از جایگاه اتصال فاکتور C آمبوسیت خرچنگ نعل‌اسبی، در مطالعه‌ای به‌وسیلهٔ روش لیز باکتری‌های گرم منفی زندهٔ فلورسنت به اثبات رسیده است. در این روش، با استفاده از Sushi1 نشان‌دارشده با نانوذرات، روند فرایند ضدمیکروبی پپتید در سطح تک‌مولکولی مشاهده‌شده است (۱۷-۲۰). در میان این پپتیدها، پپتید خطی S3 مشتق‌شده از دمین Sushi3 فاکتور C به سبب خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های گرم منفی، قدرت بالای اتصال به LPS و همچنین سمیت پایین آن، کاندیدای مناسبی برای استفاده به‌عنوان داروی ضدمیکروبی، کیت تشخیص و ستون حذف اندوتوکسین است(۲۱، ۲۲).

دربارهٔ پلی‌پپتیدهای مطالعه‌شده در این طرح نیز، تشکیل پیوند دی‌سولفیدی در تریمر Mer2 از طریق مقایسهٔ نتایج آزمون SDS-PAGE آن‌ها در حالت احیا و غیر احیا تأیید گردید.

برای بررسی اثر استفاده از Mer1 در مقایسه با Mer2، نتایج میانگین ژئومتریک غلظت‌های مولی MIC50 (۲۳) در این دو توالی با یکدیگر مقایسه شدند. GM MIC 50 برای Mer1 و Mer2 به‌ترتیب معادل ۱/۷۹ µM و ۱/۳۴ محاسبه گردید که نشان‌دهندهٔ بهبود حدود ۲۵ درصدی خاصیت ضدمیکروبی Mer2 نسبت به Mer1 است.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، توالی Mer2 باعث افزایش میزان بیان پلی‌پپتید S3 و همچنین افزایش خاصیت ضدمیکروبی آن شد. به‌طور مشابه، اثر این پپتید در افزایش فعالیت بیولوژیکی پروتئین بیوژن حاصل از اتصال آنزیم پنی‌سیلین آمیداز (PGA) و چپرون مشتق‌شده از Methanocaldococcus jannschii (rTHS) گزارش گردیده است. تأثیر مثبت Mer2 در افزایش پایداری و تصحیح تاخوردگی در برخی از مطالعات بیان پروتئین‌های نوترکیب نیز گزارش‌شده است. در تحقیق دیگری، لی و همکاران در سال ۲۰۱۳، از این اسید آمینه‌ها در بیان هیبرید پپتید ضدمیکروبی Attacineو Coleoptericin استفاده کردند و مشاهده شد که خاصیت ضدمیکروبی پپتید هیبرید به‌دست‌آمده در مقایسه با هریک از پپتیدهای ضدمیکروبی به‌صورت جداگانه، به‌طور نسبی کمتر بود و این در حالی است که تعویض اسید آمینه‌های گلایسین سرین با گلوتامین، آلانین و لیزین سبب بهبود خاصیت ضدمیکروبی هیبرید حاصله می‌شد (۲۴). در مقایسهٔ اثر اسید آمینه‌ها به‌عنوان اتصال‌دهندهٔ پپتیدها در مطالعه لی و همکاران شاید بتوان بهبود خاصیت ضدمیکروبی در جایگزین کردن گلوتامین، آلانین و لیزین به افزایش بار مثبت پپتید در اثر حضور اسید آمینهٔ لیزین در این پپتید نسبت داد. به‌طور مشابه، در تحقیق حاضر، استفاده از اسید آمینه‌های آسپارتیک اسید پرولین در مقایسه با گلایسین سرین در نواحی اتصال‌دهندهٔ پپتیدها، به سبب وجود آسپارتیک اسید دارای بار منفی، باعث کاهش بار مثبت کلی پروتئین از +۹ به +۶ می‌شود؛ بنابراین، به نظر می‌رسد افزایش خاصیت ضدمیکروبی سکانس Mer2 نسبت به سکانس Mer1 می‌تواند با حضور ۳ بار مثبت بیشتر و

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]

[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]

همچنین افزایش محتوای گلایسینی این پپتید ارتباط داشته باشد؛ زیرا خاصیت ضدمیکروبی در پپتیدهای غنی از گلایسین جداسازی‌شده از دستگاه‌های دفاعی موجوداتی نظیر عقرب و خرچنگ عقربی، در مقالات مختلف گزارش‌شده است (۲۵-۲۷).

در بیان نوترکیب پپتیدهای ضدمیکروبی اعم از بیان فیوژن یا مولتی‌مر، بررسی اثر سمیت پروتئین به‌دست‌آمده یکی دیگر از نکات حائز اهمیت است. در این تحقیق، ازآنجاکه بر اساس آزمون MTT، تفاوت چندانی در میزان سمیت پلی‌پپتیدها دیده نمی‌شود (حدود ۲۰ الی ۲۲ درصد سمیت بعد از ۲۴ ساعت در غلظت ۲۵۰Mμ)؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پلی‌پپتید ضدمیکروبی S3 Mer2 نسبت به Mer1 ارجحیت دارد و تغییرات صورت گرفته در بهبود خاصیت ضدمیکروبی پلی‌پپتیدهای طراحی‌شده تأثیر مثبت داشته و قابل‌قبول است. لازم به توضیح است که بر اساس نمودارهای میزان بقای سلولی در آزمون MTT، می‌توان گفت که سمیت جزئی مشاهده‌شده برای همهٔ سکانس‌ها وابسته به غلظت و زمان است (P value >0.05)؛ اما نکتهٔ مهم این است که پلی‌پپتیدها در غلظت MIC 50 اثر سمیت ندارند. در مطالعهٔ یائو و همکاران در سال ۲۰۰۱، خواص غیرسمی و غیرهمولیتیک پپتید S1 و S3 را کشف شد و این پپتیدها به‌عنوان کاندیدای مناسبی در سپتیک های میکروبی معرفی گردید و خواص ضدمیکروبی پپتیدهای Sushi روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی بررسی شد (۱۷). در بررسی های کارلیر و همکاران در سال ۲۰۱۵، با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) نشان داده است که پپتید S3 از طریق تخریب غشای بیرونی و نفوذپذیر ساختن غشای درونی و درنهایت، از طریق تکه‌تکه کردن هر دو غشای بیرونی و درونی باکتری گرم منفی، خاصیت ضدمیکروبی خود را بروز می‌دهد. لپتین و همکاران در سال ۲۰۰۹ -۲۰۱۰ نیز، با تثبیت پپتید S1 بر نانوذرات طلا و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی توانستند تخریب دیوارهٔ سلولی باکتری *E. coli* را به نمایش درآورند (۱۸، ۱۹).

دربارهٔ پپتیدهای خطی S1 یا S3، در همهٔ مطالعات موجود از روش سنتز فاز جامد این پپتیدها استفاده شده و تنها گزارش تولید نوترکیب آن‌ها، مربوط به بیان مولتی‌مر S3 در میزبان E.coli (DE3) BL21 است (۲۰). دینگ و همکاران در سال ۲۰۱۰، با بیان ژن پپتید S3 به‌صورت مونومر، دیمر، تترامر و اکتامر دریافتند که فرم تترامر آن بیشترین میزان بیان را دارد (۲۸، ۲۹). رائو و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵، پپتید ضدمیکروبی hPAB-β را به‌صورت مولتی‌مر در*E.coli BL21(DE3)* بیان کردند و دریافتند که از میان حالات دیمر تا اکتامر آن، بیشترین میزان بیان در حدود ۲۷/۸ درصد مربوط به بیان ژن این پپتید به‌صورت ترایمر بود (۳۰). در این تحقیق، با توجه به اینکه بیشترین فعالیت برای فرم تترامر پپتید S3 گزارش‌شده است (۲۸، ۲۹)، بیان نوترکیب پپتید S3 به‌صورت تریمر و همچنین S3 تریمری که در آن اسید آمینه‌های گلایسین و سرین در نواحی محدودی جایگزین اسپارتیک اسید و پرولین شده‌اند، در سویهٔ باکتری *E.coli BL21(DE3)* بررسی گردید، به این صورت که ژن مربوط به توالی‌های مدنظر پس از سنتز و تکثیر، به باکتری E.coli BL21 منتقل شد و پس از القای باکتری با IPTG، بیان پروتئین‌های هدف با استفاده از آزمون‌های SDS-PAGE و وسترن (علیه دنبالهٔ هیستیدینی) انجام و بیان آن‌ها تأیید گردید.

در مقایسهٔ میزان بیان واریانت‌های مختلف پپتید تریمر سنتتیک S3 در سویهٔ E.coli BL 21(DE3) و ارزیابی تأثیر جایگزینی اسید آمینه‌هایی با بار منفی کمتر این پپتید در بهبود خواص ضدمیکروبی، پس از طراحی و بیان پپتیدهای مدنظر، پپتید حاصل از توالی Mer1 و سکانس Mer2 با یکدیگر مقایسه شدند. با توجه به افزایش بیان و همچنین خاصیت ضدمیکروبی پلی‌پپتید ضدمیکروبی S3 Mer2 در مقایسه با Mer1 و همچنین با توجه به افزایش نداشتن معنادار خاصیت سمیت آن، می‌توان نتیجه گرفت که جایگزینی اسید آمینه با بار منفی کمتر در بیان تترامر پپتید ضدمیکروبی S3 استراتژی مناسبی است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که تضاد منافعی در این مطالعه وجود ندارد.

کد اخلاق

این مطالعه فاقد کارآزمایی بالینی بوده و کد اخلاق در مورد آن کاربرد نداشت.

References

1. Kaye KS, Pogue JM. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. 2015;35:949-62. doi.10.1002/phar.1636.
2. Jenkinez V, Ranjitha K. Phytochemical and antibacterial studies of chicory a multipurpose medicinal plant stress physiology and medicinal plant biotechnology unit. Sch Life Sci Bharathidasan Uni Nadu India2008;2:620 4.
3. Moniri R, Mosayebi Z, Movahedian AH, Mossavi GhA. Increasing trend of antimicrobial drug-resistance in Pseudomonas aeruginosa causing septicemia. Iranian J Pub Health 2006;35:58-62.
4. Evelien Berends. Role of antimicrobial peptides in human innate defense against bacteria master program Infection and Immunity. Msc Thes Uni Med Cent Utrech Heidelberglaan2010;1-70.
5. Guilhelmell N, Vilel F. Antibiotic development challenges the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. Front Microbiol2013; 4:353. doi. 10.3389/fmicb.2013.00353.
6. Engler AC, Wiradharma N, Ong ZY, Coady DJ, Hedrick JL, Yang YY. Emerging trends in macromolecular antimicrobials to fight multi drug resistant infections. Nan Tod2012;7:201-22. doi. 10.1016/j.nantod.2012.04.003.
7. Maisetta G, Grassi L, Di Luca M, Bombardelli S, Medici C, Brancatisano FL, et al. Anti biofilm properties of the antimicrobial peptide temporin 1Tb and its ability, in combination with EDTA, to eradicate Staphylococcus epidermidis biofilms on silicone catheters. Biofouling 2016;32 :787-800. doi. 10.1080/08927014.2016.1194401.
8. Mansour SC, Hancock RE. Peptide idr1018 modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibioticresistant bacterial infections. J Pept Sci 2015;21:323-9. doi. 10.1002/psc.2708.
9. Li Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli a review. Protein Exp Pur2011;80:260-7. doi.10.1016/j.pep.2011.08.001.
10. Ding J L, Ho B. inventors; Google Patents, assignee. Sushi peptide multimer patent. 2010;US7763704B2.
11. Leptihn S, Guo L, Frecer V, Ho B, Ding J L, Wohland T. One step at a time action mechanism of Sushi1 antimicrobial peptide and derived molecules. Virulence 2010;1:42-4. doi.10.4161/viru.1.1.10229.
12. Asoodeh A, Zardini H Z, J C. Identification and characterization of two novel antimicrobial peptides, temporin-Ra and temporin Rb from skin secretions of the marsh frog rana ridibunda. J Pept Sci2012; 18:10-6. doi.10.1002/psc.1409.
13. Přistoupil TI, Kramlova M, Štěrbíková J. On the mechanism of adsorption of proteins to nitrocellulose in membrane chromatography. J Chromatograph1969; 42:367-75. doi.10.1016/ S0021-9673(01)80636-1.
14. Tang RH, Li M, Liu LN, Zhang SF, Alam N, You M, Ni YH, Li ZD. Chitosan modified nitrocellulose membrane for paper based point of care testing. Cellulose2020;27:3835-46. doi.10.1007/s10570-020-03031-x.
15. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration of antimicrobial substances. Nature Prot 2008 ;3:163-75. doi. 10.1038/nprot.2007.521.
16. Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, et al. Assay guidance manual bethesda. 1th ed. Comp National Cent Adv Trans Sci Publication. 2004;P.33-86.
17. Ding JL, Li P, Ho B. The Sushi peptides structural characterization and mode of action against Gram negative bacteria. Cell Mol Life Sci2008;65:1202-19. doi.10.1007/s00018-008-7456-0.
18. Leptihn S, Guo L, Frecer V, Ho B, Ding JL, Wohland T. One step at a time: Action mechanism of Sushi1 antimicrobial peptide and derived molecules. Virulence2010;1:42-4. doi. 10.4161/viru.1.1.10229.
19. Leptihn S, Har JY, Chen J, Ho B, Wohland T, Ding JL. Single molecule resolution of the antimicrobial action of quantum dot labeled sushi peptide on live bacteria. BMC Biolo 2009;7:1-3. doi.10.1186/1741-7007-7-22 .
20. Li P, Sun M, Wohland T, Ho B, Ding JL. The molecular mechanism of interaction between sushi peptide and Pseudomonas endotoxin. Cell Mol Immunol2006;3:21-8.
21. Ding JL, Zhu Y, Ho B. High-performance affinity capture removal of bacterial pyrogen from solutions. J Chromatograph Biomed Sci Appl 2001;759:237-46. doi.10.1016/S0378-4347(01)00227-4.
22. Ding J, Ho B, Tan N, inventors. Recombinant proteins and peptides for endotoxin biosensors endotoxin removal and anti microbial and anti endotoxin. Therapeutics2003;3:213-8.
23. Zhang SK, Song JW, Gong F, Li SB, Chang HY, Xie HM, et al. Design of an αhelical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti biofilm activity. Sci Rep 2016;6:1-3. doi.10.1038/srep27394.
24. Lee M, Bang K, Kwon H, Cho S. Enhanced antibacterial activity of an attacin-coleoptericin hybrid protein fused with a helical linker. Mole Biol Rep 2013;40:3953-60. doi.10.1007/s11033-012-2472-4
25. Lorenzini DM, Silva JRPI, Fogaça AC, Bulet P, Daffre S. Acanthoscurrin a novel glycine rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider acanthoscurria gomesiana. Deve Comp Immunol2018 ;27:781-91.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]

doi.10.1016/S0145-305X(03)00058-2.
26. Park CJ, Park CB, Hong SS, Lee HS, Lee SY, Kim SC. Characterization and cDNA cloning of two glycine and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse Capsella bursa pastoris. Plant Mole Biol2000;44:187-97. doi:10.1023/a:1006431320677.
27. Sperstad SV, Haug T, Vasskog T, Stensvåg K. Hyastatin, a glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (Hyas araneus) hemocytes. Molecular Immunology. 2009 Aug 1;46(13):2604-12. doi: https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.05.002.
28. Ding JL, Ho B. Inventors assignee sushi peptides. 1 th ed. Multimer Publication. 2005;P.245-66.
29. Ding JL, Ho B, Inventors assignee sushi peptides. 3th ed. Multimer Publication. 2010;P.133-72.
30. Rao X, Hu J, Li S, Jin X, Zhang C, Cong Y, et al. Design and expression of peptide antibiotic hPAB-β as tandem multimers in Escherichia coli. Peptides 2005;26:721-9. doi. 10.1016/j.peptides.2004.12.016

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.4.8.6]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.4.103]