

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 Beheshti¹ , Shahin Haddadian^{2*} , Akram Eidi¹, Leila Pishkar³, Hamzeh Rahimi⁴

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

ABSTRACT

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.

ارزیابی تأثیر جایگزینی اسید آمینه‌هایی با بار منفی کمتر در پپتید تترامر سنتتیک S3 مشتق از آمبوسیت خرچنگ نعل اسبی 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

چکیده

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

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

مواد و روش‌ها: ابتدا توالی‌های پپتیدی Sushi3 تترامر یادشده، طراحی و ساخته و به‌ترتیب Mer1 و Mer2 نام‌گذاری و به‌طور جداگانه در پلاسمید pET-26b(+) کلون گردید و در نهایت، به‌میزبان 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 ضد میکروبی Mer1 و Mer2 بررسی و مقایسه شد. در نهایت، سمیت دو تترامر ساخته‌شده بر روی رده سلولی MDA-MB-231 ارزیابی و مقایسه گردید.

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

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

واژه‌های کلیدی: پپتید تترامر Sushi3، خرچنگ نعل اسبی، فاکتور C، پپتیدهای ضد میکروبی

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

افزایش عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های چندگانه شامل سویه‌های مقاوم *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Pseudomonas aeruginosa* و انتروباکتریاسه مقاوم به carbapenem، مثال‌هایی از تهدیدات جدی هستند که امروزه، به یکی از مهم‌ترین چالش‌های حوزه درمان تبدیل شده است و در نتیجه، تولید نسل جدیدی از ترکیبات ضد میکروبی ضروری است که به راحتی مقاومت دارویی در برابر آن‌ها ایجاد نشود (۱). مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از مهم‌ترین معضلات بهداشتی جامعه امروز است. ایران یکی از کشورهای است که با تجویز بیش از اندازه 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 آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی با ساختارهای شیمیایی متفاوت، برای کنترل عفونت‌های بیمارستانی و بیماری‌های عفونی انسان در سراسر جهان استفاده می‌شوند. استفاده طولانی مدت از این آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ظهور مقاومت‌های چنددارویی و باکتری‌های مقاوم می‌گردد و از سویی، با آثار جانبی باعث بروز مشکلات بالینی فراوانی در بیماران می‌شود (۳)؛ از این رو، بایستی تحقیقات گسترده‌ای برای طراحی و سنتز ترکیبات ضد میکروبی و یا کشف مواد ضد میکروبی جدید از منابع طبیعی از جمله گیاهان دارویی، جلبک‌ها و منابع حیوانی صورت گیرد. مقابله با پدیده مقاومت دارویی به منظور کاهش بروز آن و یا محدود کردن عوامل میکروبی مقاوم اهمیت فراوانی دارد. از آنجاکه بیماری‌های عفونی و میکروبی دسته بزرگی از بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند و از سویی، شمار سویه‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها روز به روز بیشتر می‌شود؛ بنابراین، نیاز به مواد ضد قارچی و یا ضد باکتریایی جدید و کم‌ضرر هر روز بیشتر نمایان می‌گردد؛ از این رو، بررسی آثار پپتیدهای سنتتیک ضد باکتریایی می‌تواند راه را برای به دست آوردن آنتی

بیوتیک‌های جدید هموار سازد. پپتیدهای ضد میکروبی یکی از گروه‌های متنوع ترکیبات ضد میکروبی هستند که به علت پیدایش مقاومت باکتری‌های پاتوژن به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند. این مولکول‌های شبه پروتئینی اغلب در بردارنده اسید آمینه‌های تغییر شکل یافته و اصلاح شده‌ای هستند که در پلی‌پپتیدهای ساخته شده توسط ریبوزوم‌ها یافت نمی‌شوند. سمیت این پپتیدها به علت ظرفیت مداخله گر آن‌ها در غشای میکروبی است که با ایجاد منافذ در غشا، سبب القای مرگ سلولی آن‌ها می‌گردند. بسیاری از گونه‌های گیاهان و حیوانات، از جمله انسان، توانایی تولید چندین نوع پپتید ضد میکروبی را دارند (۴). پپتیدهای ضد میکروب ایمنی ذاتی موجودات را تحریک می‌کنند و فعالیت ضد باکتریایی، ویروسی و قارچی دارند. پپتیدهای ضد میکروبی با اسیدهای آمینه دارای بار مثبت بر روی سطح میکروارگانیسم‌ها به وسیله نیروهای الکترواستاتیک برهم کنش می‌کنند. ساختار دوم پپتید برای اتصال آن به ترکیبات با بار منفی در غشاهای هدف مانند فسفولیپیدهای آنیونی، ضروری است. سازوکارهایی که به وسیله آن‌ها پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند به غشاهای میکروبی نفوذ کنند؛ مانند تشکیل منافذ، ترویج ساختار غیر لیپیدی یا تخریب غشای دولایه، برای همه پپتیدها یکسان نیست و به نظر می‌رسد که به ویژگی‌های مولکولی پپتید و ترکیب لیپیدی غشای هدف بستگی دارد (۵).

پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) به عنوان 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 ضد میکروبی کاربرد آن‌ها در کنترل تشکیل یا حذف بیوفیلم‌ها و استفاده در حذف اندوتوکسین است (۷، ۸). پپتید S3 مشتق شده از فاکتور C موجود در آمبوسیت (*Amoebocyte*) خرچنگ نعل اسبی یکی از این پپتیدهای ضد میکروبی است که تحقیقات متعددی درباره

سازوکار ضد میکروبی آن صورت گرفته است. در داخل همولنف hemolymph (مایع گردشی مشابه خون) گونه های مختلف خرچنگ های نعل اسبی، سلول های گردشی فراوانی به نام آمبوسیت وجود دارند که لیز شدن این آمبوسیت ها توسط اندوتوکسین باکتری های گرم منفی به ایجاد ماده ژل ماندی منجر می شود.

به طور کلی، سنتز پپتیدها فرایند پیچیده، پرهزینه و زمان بری است و جداسازی پپتیدهای ضد میکروبی از منابع طبیعی آن ها نیز علاوه بر زمان بر و پرهزینه بودن (۹)، صرفه اقتصادی و زیست محیطی ندارد. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت، محققان دریافتند که با بیان ژن پپتید S3 به صورت فرم تترامر آن، علاوه بر حفظ فعالیت ضد میکروبی، بیشترین میزان بیان را دارد (۱۰). پپتید SA3 واریانت ارتقایافته پپتید S3 است که در آن، با تغییر دو اسید آمینه G9 و E11 به لیزین، بار مثبت پپتید، خاصیت ضد میکروبی و البته اثر سمیت آن افزایش یافته است. از سویی، تحقیقات نشان داده است که فرم های مولتی مر پپتید S3 نیز خاصیت ضد میکروبی دارند (۱۱).

از آن جاکه پپتیدهای ضد میکروبی از مولکول های مهم ایمنی ذاتی بدن هستند و سمیت سلولی اندکی دارند، می توانند در آینده ای نه چندان دور، به عنوان دارو در درمان بیماری های التهابی و همچنین شوک های سپتیک حاصل از اندوتوکسین باکتری ها استفاده شوند (۱۲). در این تحقیق، به مقایسه میزان بیان واریانت های مختلف پپتید ضد میکروبی S3 در سویه *E. coli* BL 21(DE3) و ارزیابی تأثیر جایگزینی اسید آمینه هایی با بار منفی کمتر دارای گلايسين، در بهبود خواص ضد میکروبی پرداخته شد.

مواد و روش ها

سنتز ژن: جهت تعیین توالی DNA، توالی های پروتئینی

طراحی شده از ترجمه معکوس سایت ExPASy استفاده شد. سایت های برشی NdeI و XhoI به انتهای 3', 5' آن و دنباله هیستیدینی 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 تهیه سلول های مستعد: از باکتری *E. coli* TOP10F به منظور 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 مشاهده کیفیت عمل استخراج، بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شدند.

ابتدا ۱۰ میکرولیتر از استوک میزبان باکتریایی *E. Coli* سویه BL21(DE3) موجود در فریزر منفی ۷۰ درجه، بر روی پلیت آگار (Luria-Bertani medium (LB) کشت داده و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید؛ سپس از پلیت یک کلنی برداشته و در ۵ میلی لیتر از محیط کشت (LB) Luria broth تلقیح شد و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۳ تا ۴ ساعت با سرعت ۱۷۰g کشت گردید. هنگامی که جذب نوری سلول ها در طول موج 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 (CaCl₂) 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 سازنده 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

در دور ۹۰۰۰g 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. در نهایت، سلول‌ها دوباره در دور ۹۰۰۰g 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، سازه ژنی به منظور بیان به باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) منتقل شد. پس از انتقال سازه‌های ژنی به سلول‌های بیانی، مراحل بیان این پروتئین‌ها در باکتری صورت گرفت. بیان پروتئین‌های نوترکیب در دمای ۳۰ درجه 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 به وسیله سانتریفیوژ، دیواره سلولی از طریق حل کردن پلت‌ها به نسبت ۱:۵ وزنی/حجمی در محلول لیزکننده (Tris-HCl) hydrochloride (۲۰ میلی‌مولار pH 7.5) و با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (ده پالس ۳۰ ثانیه - توقف ۳۰ ثانیه) شکسته شد و پس از شستشو و حذف بقایای دیواره سلولی شکسته‌شده، اینکلوژن بادی‌ها با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و دور ۹۰۰۰g به صورت 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 پلت‌ها جمع‌آوری 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 ۹۰۰۰g، مایع رویی حاوی پروتئین حل‌شده جمع‌آوری گردید.

تخلیص پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی یون فلزی (IMAC): برای تخلیص هریک از توالی‌ها،

یک میلی‌لیتر رزین NiNTA (۲ ml سوسپانسیون ۵۰ درصد) درون ستون Hitrap یک میلی‌لیتری ریخته شد و پس از متعادل‌سازی با ۵ میلی‌لیتر 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 مشاهده پیک، فرکشن‌های یک میلی‌لیتری مربوط به مشاهده پیک جمع‌آوری گردید. در نهایت، 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 نمونه خارج‌شده از ستون با استفاده از SDS-PAGE تأیید شد.

وسترن بلائینگ (Western Blotting): پروتئین‌هایی که در مرحله پیش در ژل SDS-PAGE، از نظر اندازه از یکدیگر جدا شده بودند، با استفاده از ولتاژ الکتریکی به روی کاغذ نیتروسولوز منتقل گردیدند. کاغذ نیتروسولوز ظرفیت بسیار مناسبی (در حدود $70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 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 نیتروسولوز، 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 دنباله هیستیدینی متصل به آنزیم پراکسیداز با رقت ۱ به ۱۰۰۰ در بافر PBS روی کاغذ نیتروسولوز اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق، روی شیکر قرار داده شد. پس از شستشوی دوباره کاغذ با بافر شستشو، برای تشخیص باندهای پروتئینی سوبسترای آنزیم پراکسیداز یعنی

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

فعالیت ضد میکروبی (حداقل غلظت بازدارندگی MIC50): اثر ضد میکروبی 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* (سویه استاندارد ATCC27853 و سویه کلینیکی مقاوم ایزوله شده در کلینیک طوس) و *Escherichia coli* (سویه استاندارد ATCC25922 و سویه 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 $5 \times 10^5 CFU/ml$ رقیق شد (حصول کدورت مشابه کدورت استاندارد مک فارلند ۰/۵). در شرایط سترون، میزان ۵۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون در هریک از چاهک‌های ستون‌های ۲ الی ۱۰ ریخته شد. در چاهک‌های ستون شماره ۱۲ برای تست سترونی شرایط آزمون، تنها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت ریخته شد. در چاهک‌های ۱، ۱۰۰ میکرولیتر از هریک از پروتئین‌های توالی‌های ژن Mer1 (Seq1) و ژن Mer2 (Seq2) غلظت 20X، با استفاده از محیط کشت مولر هیتون ۱۰ برابر رقیق گردید (غلظت نهایی 2X)؛ سپس ۲۵۰ میکرولیتر از هریک آن‌ها در چاهک‌های ۱ ردیف‌های مربوطه ریخته شد. با کمک سمپلر چند کاناله، ۲۰۰ میکرولیتر از چاهک‌های ۱ به درون چاهک‌های ۲ ریخته شد و با ادامه این کار تا چاهک‌های شماره ۱۰، رقت‌های متوالی با نسبت ۴/۵ تهیه گردید؛ سپس به هریک از چاهک‌های ۱ الی ۱۰ و چاهک‌های ستون ۱۱، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی تهیه شده 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 درجه سانتی‌گراد، جذب چاهک‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید و حداقل غلظتی از پروتئین که جذب آن معادل ۵۰ درصد جذب سلول فاقد پروتئین بود، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی پروتئین (MIC 50) انتخاب شد. آزمون در دو نوبت مستقل از هم و به صورت تکرار سه تایی صورت گرفت.

برای تهیه استاندارد مک فارلند ۰/۵، ابتدا محلول ۰/۰۴۸ مولار کلرید باریوم ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) و محلول ۰/۱۸ مولار اسید سولفوریک (H_2SO_4) ساخته شد؛ سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول کلرید باریوم به ۵/۹۹ میلی لیتر محلول اسید سولفوریک اضافه گردید و به خوبی همزده شد تا حالت سوسپانسیون به دست آید. برای اطمینان از صحت محلول سازی، جذب نوری محلول مک فارلند به دست آمده در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه گیری گردید. محدوده صحیح این جذب بین ۰/۰۸ الی ۰/۱۳ است. استاندارد حاصله در لوله‌های آزمایش در حجم‌های ۵ میلی لیتر تقسیم و دور از نور در دمای محیط نگهداری شد. با استفاده از درون‌یابی مقادیر MIC50 برای همه 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 مقایسه MIC50 پلی‌پپتیدهای مورد مطالعه استفاده گردید.

اثر سمیت پپتید بر سلول‌های یوکاریوتی: رده 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

درصد سلول‌ها زنده بودند، به عنوان غلظت IC50 گزارش گردید. آزمون در دو نوبت مستقل از هم و به صورت تکرار سه تایی صورت گرفت. از منحنی Box-Plot برای تشخیص داده‌های 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) درباره همه پلی‌پپتیدها و پپتید Mer1 به عنوان پپتید مرجع، نتایج بقای سلولی در بیشترین غلظت پلی‌پپتید (200 μM)، انتخاب گردید و برای ارزیابی یکسان بودن واریانس‌ها از آزمون Levene و برای مقایسه 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 مقایسه سمیت هر پپتید در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، از آزمون independent sample T-Test استفاده گردید.

یافته‌ها

وسترن بلات برای تأیید بیان پروتئین هدف: با توجه به اینکه در سکانس‌های پروتئین‌های مدنظر، دنباله هیستیدینی تعبیه شده بود، آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی علیه دنباله هیستیدینی انجام شد (شکل ۱). تطابق باندهای مشاهده شده پس از مرحله 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

10% bovine serum حاوی آنتی بیوتیک ($100 \mu\text{g}$ ، 1 ml^{-1} پنی سیلین و $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ استرپتومایسین) در CO_2 5% در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت و تشکیل یک لایه سلولی بر دیواره فلاسک، سلول‌ها دوباره پاساژ گردیدند و دوباره پس از ۲۴ ساعت و تشکیل تک لایه سلول‌ها، به وسیله تیمار ملایم با تریپسین از دیواره کنده شد و با سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور ۱۲۰۰ g به مدت ۲ دقیقه، با تخلیه سوپرناتانت تریپسین از سلول‌ها حذف گردید و سلول‌ها دوباره در محیط کشت بالا حل شد و پس از اطمینان از viability سلول‌ها از طریق رنگ آمیزی با تریپان بلو و شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نتوبار در زیر میکروسکوپ، سلول‌ها به میزان ۳۰۰۰ در ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک میکروپلیت (۹۶ چاهک تخته مخصوص کشت سلولی) توزیع گردید. پس از ۲۴ ساعت و اطمینان از رشد سلول‌ها و اتصال آن‌ها به دیواره، محیط کشت داخل چاهک‌ها از طریق مکش تخلیه شد و غلظت‌های مختلف هریک از پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی (رقت‌های متوالی با نسبت یک دوم رقیق شده در محیط کشت آماده مطابق فوق) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه گردید. همین عملیات پس از ۲۴ ساعت، در میکروپلیت‌های جدید تکرار شد و به این ترتیب سلول‌های پلیت روز اول به مدت ۴۸ ساعت و سلول‌های پلیت روز دوم به مدت ۲۴ ساعت با پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی در تماس قرار گرفتند. در روز سوم، محلول محیط حاوی پپتیدها از چاهک‌ها تخلیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ حیاتی formazon MTT 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 به صورت محلول درآمده و میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر (۵۹۵ nm) اندازه گیری گردید و با تعیین نسبت جذب نوری هر نمونه به جذب نوری نمونه کنترل منفی (viability ۱۰۰ درصد)، نسبت بقای سلول‌ها محاسبه شد و غلظتی از پپتید که در آن ۵۰

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

نتایج آزمون MTT: آزمون MTT با رده سلولی MDA-MB-231 در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. در هریک از میکروپلیت ها میانگین جذب نوری چاهک های بلاتک از جذب نوری هریک از چاهک ها کسر گردید. در هر پلیت، میانگین جذب نوری چاهک های کنترل نیز به عنوان Abs control در نظر گرفته شد و درصد بقای سلولی از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

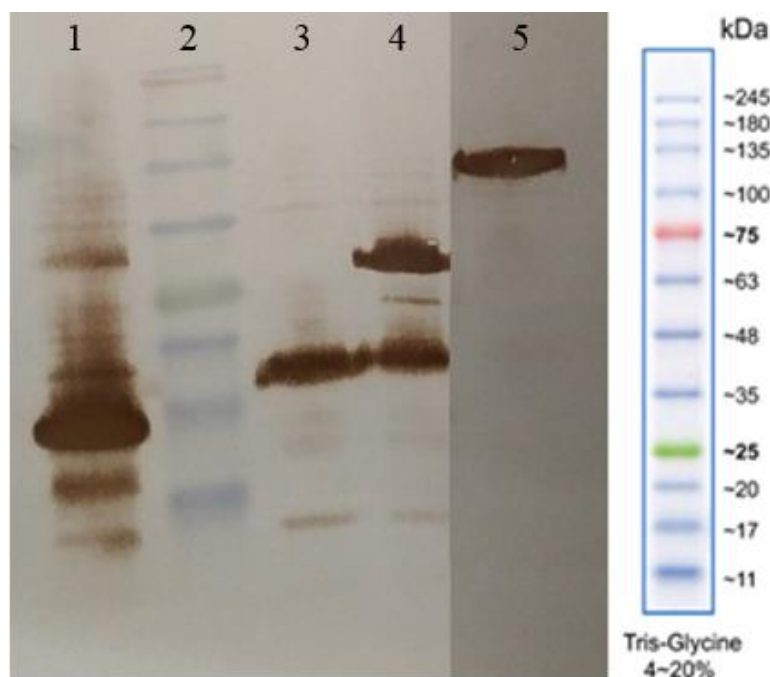
$$\% \text{ Cell Survival} = (\text{Abs sample} - \text{Abs blank}) / (\text{Abs control} - \text{Abs blank}) * 100$$

برای مقایسه سمیت 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 شماره ۲ آورده شده است. در مرحله اول از آزمون Shapiro- Wilk برای ارزیابی نرمال بودن توزیع نتایج استفاده شد. در همه موارد $P.\text{value} > 0.05$ بیانگر توزیع نرمال نتایج بود.

$P.\text{value} > 0.05$ میان نتایج میزان سمیت هریک از سکانس ها در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، بیانگر نبود اختلاف معنا دار در سمیت سکانس ها است.

برای مقایسه اثر زمان بر میزان بقای سلولی، برای هریک از پلی پپتیدها به صورت جداگانه میان داده های ۲۴

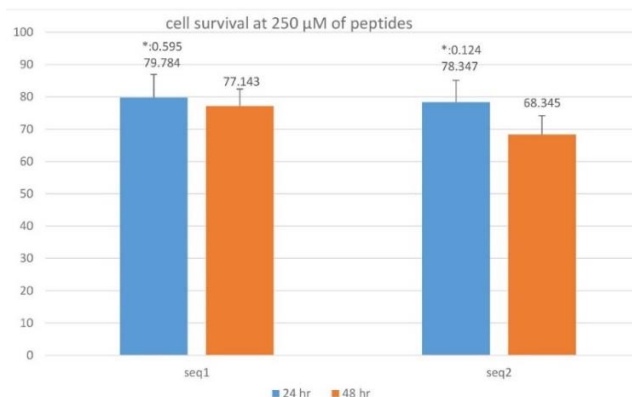


شکل ۱. ایمونوبلاتینگ با استفاده از دنباله هیستیدینی

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

جدول ۲. مقایسه درصد بهبود خاصیت ضد میکروبی 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



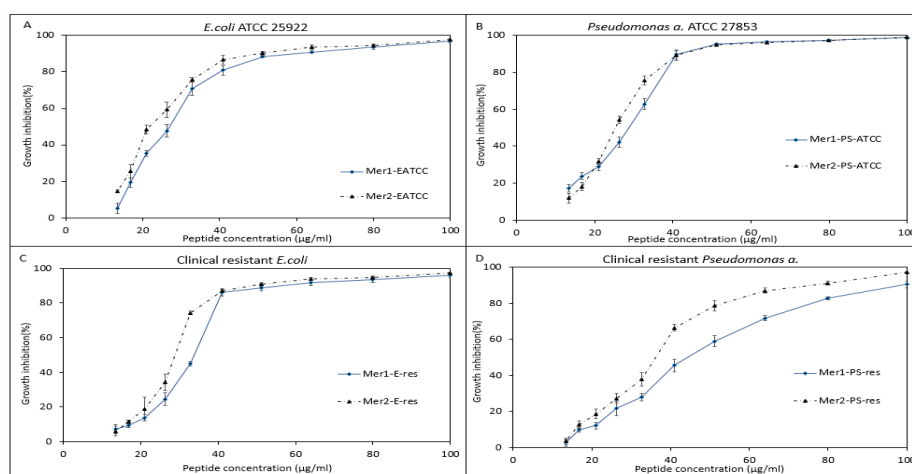
شکل ۲. مقایسه میزان بقای سلولی در ۲۴ و ۴۸ ساعت

Growth Inhibition (%) = (OD maximum growth - OD sample) / OD maximum growth * 100
منحنی بازدارندگی برحسب غلظت پلی پپتید رسم گردید. نتایج مربوط به تکرارهای چهارتایی هریک از پلی پپتیدها برای هریک از باکتری‌های یادشده در شکل شماره ۳ آمده است.

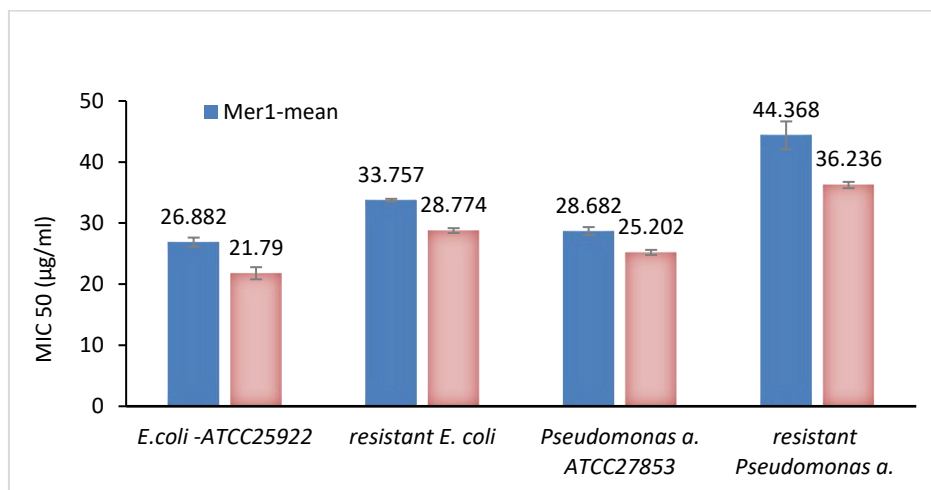
میزان بازدارندگی میانگین غلظت‌های پلی پپتیدها بر هریک از سویه‌های بررسی شده در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. در این شکل سویه‌های ATCC27853 - *Pseudomonas aeruginosa*، *E. coli* - ATCC25922، سویه‌های کلینیکی مقاوم هریک به ترتیب با PS-ATCC، E-ATCC، E-res و PS-res نشان داده شده‌اند.

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

و ۴۸ ساعت، از آزمون Independent T- test (16) استفاده شد. مقایسه میزان بقای سلولی در حداکثر غلظت پلی پپتید (۲۵۰M) برای هریک از پپتیدها در ساعات ۲۴ و ۴۸ ساعت، در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.
نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتریایی (MIC)، تأثیر غلظت‌های مختلف هریک از پلی پپتیدهای Mer1 و Mer2 بر رشد باکتری‌های گرم منفی مختلف *Pseudomonas aeruginosa* (سویه استاندارد ATCC27853 و سویه کلینیکی مقاوم ایزوله شده) و *E. coli* (سویه استاندارد ATCC25922 و سویه کلینیکی مقاوم)، به صورت 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:



شکل ۳. الف. میانگین میزان بازدارندگی غلظت‌های مختلف پلی پپتیدها بر رشد باکتری *E. coli* ATCC 25922، B. *P. aeruginosa* ATCC 27853، C. *E. coli* کلینیکال مقاوم، D. *P. aeruginosa* مقاوم.



شکل ۴. مقایسه MIC50 پلی پپتیدها

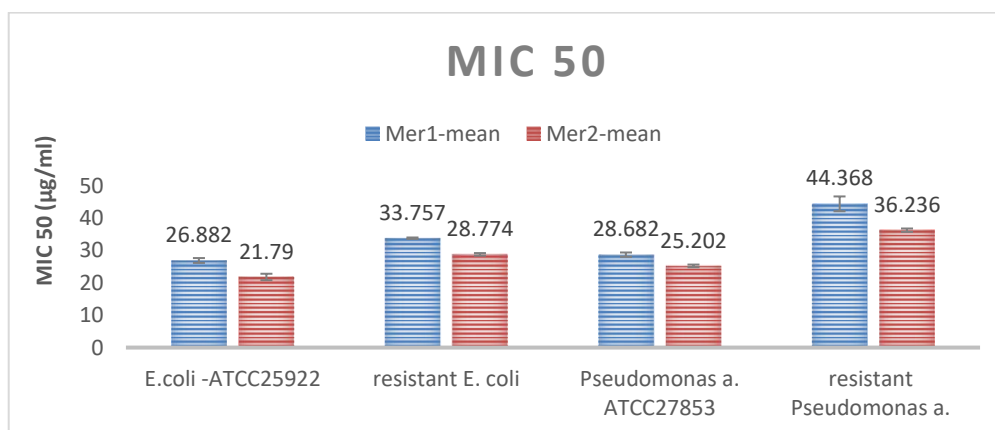
در نتیجه، همه داده‌ها قابل قبول و قابل مقایسه بودند. برای مقایسه MIC هر یک از توالی‌ها روی هر یک از سویه‌ها، از آزمون Independent T test استفاده شد. در همه موارد $P \text{ value} < 0.05$ بود که بیانگر معنادار بودن اختلافات مشاهده شده میان نتایج بود؛ بنابراین، برای بررسی میزان بهبود خاصیت میکروبی از حالت کاهش غلظت MIC بر اساس رابطه زیر استفاده گردید و نتایج در جدول شماره ۳ نشان داده شد.

$$\text{MIC improvement} = (\text{MIC 50 peptide 1} - \text{MIC 50 peptide 2}) / \text{MIC 50 peptide 1} * 100$$

بر اساس نتایج جدول شماره ۳، استفاده از اسید آمینه‌های گلايسين و سرين سبب بهبود ۱۲ الی ۱۹ درصدی حداقل غلظت بازدارندگی رشد میکروبی در سویه‌های مطالعه شده گردید.

پلی پپتیدها 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 شماره ۴ دوباره نمایش داده شده است.

برای بررسی معنادار بودن اختلافات مشاهده شده در شکل شماره ۴، مقادیر MIC50 برای هر یک از تکرارها با استفاده از درون‌یابی تعیین گردید و نتایج از نظر آماری آنالیز شد. در آزمون Shapiro-Wilk، $P \text{ value} > 0.05$ بیانگر نرمال بودن توزیع همه تکرارهای MIC50 بود؛ بنابراین، برای مقایسه آن‌ها از آزمون پارامتری ANOVA استفاده شد. از نمودار BOX plot برای تشخیص داده‌های پرت (outlier) استفاده شد و داده پرتی وجود نداشت و



شکل ۵. مقایسه MIC50 پلی پپتیدها

جدول ۳. مقایسه درصد بهبود خاصیت ضد میکروبی پپتید سکانس ۲ به نسبت سکانس ۱

peptide 1	peptide 2	E.coli - ATCC25922	resistant E. coli	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	resistant <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>
Mer1	Mer2	18.94	14.76	12.13	18.33

بحث و نتیجه گیری

پپتیدهای ضد میکروبی 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 آشفته‌گی لایه لیپیدی و در نهایت، غیرفعال شدن پاتوژن منجر می‌گردد. از آنجاکه به علت تجویز بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری‌های مقاوم به دارو ظهور کرده‌اند، به کلاس‌های جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌ها نیاز است که پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند یکی از این جایگزین‌های ارزشمند باشد.

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

درباره پلی‌پپتیدهای مطالعه شده در این طرح نیز، تشکیل پیوند دی‌سولفیدی در تریمر Mer2 از طریق مقایسه 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 به ترتیب معادل ۱/۷۹ μM و ۱/۳۴

محاسبه گردید که نشان‌دهنده بهبود حدود ۲۵ درصدی خاصیت ضد میکروبی Mer2 نسبت به Mer1 است.

بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، توالی Mer2 باعث افزایش میزان بیان پلی‌پپتید S3 و همچنین افزایش خاصیت ضد میکروبی آن شد. به طور مشابه، اثر این پپتید در افزایش فعالیت بیولوژیکی پروتئین بیورژن حاصل از اتصال آنزیم پنی‌سیلین آمیداز (PGA) و چپرون مشتق شده از *Methanocaldococcus jannschii* (rTHS) گزارش گردیده است. تأثیر مثبت Mer2 در افزایش پایداری و تصحیح تاخوردگی در برخی از مطالعات بیان پروتئین‌های نو ترکیب نیز گزارش شده است. در تحقیق دیگری، لی و همکاران در سال ۲۰۱۳، از این اسید آمینه‌ها در بیان هیبرید پپتید ضد میکروبی Attacine و Coleopteracin استفاده کردند و مشاهده شد که خاصیت ضد میکروبی پپتید هیبرید به دست آمده در مقایسه با هریک از پپتیدهای ضد میکروبی به صورت جداگانه، به طور نسبی کمتر بود و این در حالی است که تعویض اسید آمینه‌های گلايسین سرین با گلوتامین، آلانین و لیزین سبب بهبود خاصیت ضد میکروبی هیبرید حاصله می‌شد (۲۴). در مقایسه اثر اسید آمینه‌ها به عنوان اتصال‌دهنده پپتیدها در مطالعه لی و همکاران شاید بتوان بهبود خاصیت ضد میکروبی در جایگزین کردن گلوتامین، آلانین و لیزین به افزایش بار مثبت پپتید در اثر حضور اسید آمینه لیزین در این پپتید نسبت داد. به طور مشابه، در تحقیق حاضر، استفاده از اسید آمینه‌های آسپارتیک اسید پرولین در مقایسه با گلايسین سرین در نواحی اتصال‌دهنده 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 ضد میکروبی سکانس Mer2 نسبت به سکانس Mer1 می‌تواند با حضور ۳ بار مثبت بیشتر و

همچنین افزایش محتوای گلايسيني اين پپتيد ارتباط داشته باشد؛ زیرا خاصیت ضد میکروبی در پپتیدهای غنی از گلايسين جداسازی شده از دستگاه های دفاعی موجوداتی نظیر عقرب و خرچنگ عقربی، در مقالات مختلف گزارش شده است (۲۵-۲۷).

در بیان نو ترکیب پپتیدهای ضد میکروبی اعم از بیان فیوژن یا مولتی مر، بررسی اثر سمیت پروتئین به دست آمده یکی دیگر از نکات حائز اهمیت است. در این تحقیق، از آنجاکه بر اساس آزمون MTT، تفاوت چندانی در میزان سمیت پلی پپتیدها دیده نمی شود (حدود ۲۰ الی ۲۲ درصد سمیت بعد از ۲۴ ساعت در غلظت ۲۵۰ μM)؛ بنابراین می توان نتیجه گرفت که پلی پپتید ضد میکروبی S3 Mer2 نسبت به Mer1 ارجحیت دارد و تغییرات صورت گرفته در بهبود خاصیت ضد میکروبی پلی پپتیدهای طراحی شده تأثیر مثبت داشته و قابل قبول است. لازم به توضیح است که بر اساس نمودارهای میزان بقای سلولی در آزمون MTT، می توان گفت که سمیت جزئی مشاهده شده برای همه سکانس ها وابسته به غلظت و زمان است ($P \text{ value} > 0.05$)؛ اما نکته مهم این است که پلی پپتیدها در غلظت MIC 50 اثر سمیت ندارند. در مطالعه یائو و همکاران در سال ۲۰۰۱، خواص غیرسمی و غیرهمولیتیک پپتید S1 و S3 را کشف شد و این پپتیدها به عنوان کاندیدای مناسبی در سپتیک های میکروبی معرفی گردید و خواص ضد میکروبی پپتیدهای Sushi روی طیف وسیعی از باکتری های 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 در نهایت، از طریق تکه تکه کردن هر دو غشای بیرونی و درونی باکتری گرم منفی، خاصیت ضد میکروبی خود را بروز می دهد. لپتین و همکاران در سال ۲۰۰۹-۲۰۱۰ نیز، با تثبیت پپتید S1 بر نانوذرات طلا و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی توانستند تخریب دیواره سلولی باکتری *E. coli* را به نمایش در آورند (۱۸، ۱۹).

درباره پپتیدهای خطی S1 یا S3، در همه مطالعات موجود از روش سنتز فاز جامد این پپتیدها استفاده شده و تنها گزارش تولید نو ترکیب آن ها، مربوط به بیان مولتی مر S3 در میزبان *E. coli* BL21 (DE3) است (۲۰). دینگ و همکاران در سال ۲۰۱۰، با بیان ژن پپتید S3 به صورت مونومر، دایمر، تترامر و اکتامر دریافتند که فرم تترامر آن بیشترین میزان بیان را دارد (۲۸، ۲۹). رائو و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵، پپتید ضد میکروبی hPAB-β را به صورت مولتی مر در *E. coli* BL21(DE3) بیان کردند و دریافتند که از میان حالات دایمر تا اکتامر آن، بیشترین میزان بیان در حدود ۲۷/۸ درصد مربوط به بیان ژن این پپتید به صورت تراپمر بود (۳۰). در این تحقیق، با توجه به اینکه بیشترین فعالیت برای فرم تترامر پپتید S3 گزارش شده است (۲۸، ۲۹)، بیان نو ترکیب پپتید S3 به صورت تریمر و همچنین S3 تریمری که در آن اسید آمینه های گلايسين و سرین در نواحی محدودی جایگزینی اسپارتيك اسید و پرولين شده اند، در سویه باکتری *E. coli* BL21(DE3) بررسی گردید، به این صورت که ژن مربوط به توالی های مدنظر پس از سنتز و تکثیر، به باکتری *E. coli* BL21 منتقل شد و پس از القای باکتری با IPTG، بیان پروتئین های هدف با استفاده از آزمون های SDS-PAGE و وسترن (علیه دنباله هیستیدینی) انجام و بیان آن ها تأیید گردید.

در مقایسه میزان بیان واریانت های مختلف پپتید تریمر سنتتیک S3 در سویه *E. coli* BL 21(DE3) و ارزیابی تأثیر جایگزینی اسید آمینه هایی با بار منفی کمتر این پپتید در بهبود خواص ضد میکروبی، 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 ضد میکروبی پلی پپتید ضد میکروبی S3 Mer2 در مقایسه با Mer1 و همچنین با توجه به افزایش نداشتن معنادار خاصیت سمیت آن، می توان نتیجه گرفت که جایگزینی اسید آمینه با بار منفی کمتر در بیان تترامر پپتید ضد میکروبی S3 استراتژی مناسبی است.

کد اخلاق

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

تعارض منافع

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

References

- 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.
- 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 India*2008;2:620 4.
- 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.
- Evelien Berends. Role of antimicrobial peptides in human innate defense against bacteria master program Infection and Immunity. *Msc Thes Uni Med Cent Utrech Heidelberglaan*2010;1-70.
- Guilhelmell N, Vilel F. Antibiotic development challenges the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol*2013; 4:353. doi. 10.3389/fmicb.2013.00353.
- Engler AC, Wiradharma N, Ong ZY, Coady DJ, Hedrick JL, Yang YY. Emerging trends in macromolecular antimicrobials to fight multi drug resistant infections. *Nan Tod*2012;7:201-22. doi. 10.1016/j.nantod.2012.04.003.
- 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.
- Mansour SC, Hancock RE. Peptide idr1018 modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *J Pept Sci* 2015;21:323-9. doi. 10.1002/psc.2708.
- Li Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* a review. *Protein Exp Pur*2011;80:260-7. doi:10.1016/j.pep.2011.08.001.
- Ding J L, Ho B. inventors; Google Patents, assignee. Sushi peptide multimer patent. 2010;US7763704B2.
- Leptihn S, Guo L, Frecker 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.
- 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 Sci*2012; 18:10-6. doi:10.1002/psc.1409.
- Přistoupil Tl, Kramlova M, Štěrbíková J. On the mechanism of adsorption of proteins to nitrocellulose in membrane chromatography. *J Chromatograph*1969; 42:367-75. doi:10.1016/S0021-9673(01)80636-1.
- 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. *Cellulose*2020;27:3835-46. doi:10.1007/s10570-020-03031-x.
- 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.
- 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.
- Ding JL, Li P, Ho B. The Sushi peptides structural characterization and mode of action against Gram negative bacteria. *Cell Mol Life Sci*2008;65:1202-19. doi:10.1007/s00018-008-7456-0.
- Leptihn S, Guo L, Frecker V, Ho B, Ding JL, 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.
- 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 .
- Li P, Sun M, Wohland T, Ho B, Ding JL. The molecular mechanism of interaction between sushi peptide and *Pseudomonas* endotoxin. *Cell Mol Immunol*2006;3:21-8.
- 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.
- Ding J, Ho B, Tan N, inventors. Recombinant proteins and peptides for endotoxin biosensors endotoxin removal and anti microbial and anti endotoxin. *Therapeutics*2003;3:213-8.
- 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.
- Lee M, Bang K, Kwon H, Cho S. Enhanced antibacterial activity of an attacin-coleopteracin hybrid protein fused with a helical linker. *Mole Biol Rep* 2013;40:3953-60. doi:10.1007/s11033-012-2472-4
- 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 Immunol*2018 ;27:781-91.

- 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 Biol*2000;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. 1th 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