مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۹
صفحه ٥٤-٤٠

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 1

طراحی و بیان کایمری پپتید لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین گاوی با هدف تولید نوترکیب این پروتئین در گیاه توتون

Designing and Expression of Bovine Chimeric Lactoferrampine - Lactoferricin Peptide with Aim of Recombinant Protein Production in Tobacco

حمید سرحدی[۱*]، محمد حسن جهاندار[۲]، عباس تنهائیان[۳]

Hamid Sarhadi[1*], Mohammad Hassan Jahandar[2] and Abbas Tanhaeian[3]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد بم، دانشگاه آزاد اسلامی، بم، ایران
۲- گروه کشاورزی، واحد بم، دانشگاه آزاد اسلامی، بم، ایران
۳- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

1-Department of Food Science and Technology, Bam Branch, Islamic Azad University, Bam, Iran
2-Department of Agriculture, Bam Branch, Islamic Azad University, Bam, Iran
3-School of Medicine, Shahrood University of Medical Sciences, Shahrood, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sarhadi@iaubam.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۳/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۲۰)

چکیده

لاکتوفرین که شامل پپتیدهای لاکتوفرامپین و لاکتوفریسین می‌باشد یکی از گلیکوپروتئین‌های شیر با خواص ضد میکروبی است. لاکتوفرین به عنوان جزء ذاتی سیستم ایمنی مطرح بوده و اولین سد دفاعی در برابر حملات میکروبی را نشان می‌دهد. هدف از این پژوهش سنتز کایمری این دو زیر واحد پپتیدی و ارزیابی تاثیر پپتید نوترکیب تولید شده روی پاتوژن‌های شاخص مواد غذایی بود. توالی کایمری لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین پس از بهینه شدن بر اساس کدون ترجیحی بیان شونده در گیاه توتون، به صورت مصنوعی درون وکتور pGH سنتز شد و سپس به وکتور بیانی pBI121 منتقل گردید. پلاسمید بیانی نوترکیب از طریق فرآیند ذوب و انجماد به باکتری *آگروباکتریوم ریزوژنز* منتقل شد. در نهایت با کمک روش دیسک برگ به گیاه توتون منتقل گردید. استخراج پروتئین نوترکیب از گیاه توتون با استفاده از روش Tris-HCl انجام و فرآیند تخلیص با استفاده از کروماتوگرافی ستون‌های نیکل آگارز انجام شد. آزمایش MIC در میکروپلیت ۹٦ خانه استریل و با روش رقیق سازی انجام شد. در نهایت نتایج نشان داد که مقدار پروتئین نوترکیب ۱/۵۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد و کیفیت مطلوبی نیز دارد. همچنین نتایج نشان داد که ترکیب کایمری اثر بازدارندگی خوبی روی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا دارد.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم ریزوژنز،
پروتئین نوترکیب،
گیاه توتون،
لاکتوفرامپین – لاکتوفریسین

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]

مقدمه

امروزه تکنیک‌های مهندسی ژنتیک، که بسیار هم مورد استفاده قرار می‌گیرند، به عنوان یک سطح کنترل سیستم بیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند که امکان بیان اجزای بیولوژیکی موجود در طبیعت مانند آنتی‌ژن‌ها یا پپتیدهای ضد میکروبی را فراهم می‌کند (Jaydari et al. 2019; Nazifi et al. 2019 Tanhaeian et al. 2019;). این روش‌ها شامل تولید یک پروتئین نوترکیب است که می‌تواند به عنوان ماده بیولوژیکی جدید با خواص بهینه شده مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از تکنیک‌های ملکولی در کشاورزی، امکان استفاده از یک پتانسیل بالایی برای تولید نامحدود آنتی‌بادی‌های نوترکیب، واکسن‌ها، جایگزین‌های خون، فاکتورهای رشد و آنزیم‌ها را فراهم می‌کند (Schillberg et al. 2002). از مهمترین مزایای تولید پروتئین نوترکیب در سیستم‌های بیانی گیاهان می‌توان به تولید اقتصادی آن در مقایسه با سیستم‌های صنعتی، تولید اجزای بیولوژیکی فعال و مشابه محصولات طبیعی، بیان بالای ژن و تولید بالای یک پروتئین نوترکیب با پایداری بیشتر و عدم وجود آلودگی و عوارض جانبی اشاره کرد (Ma & Vine 1999). لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین متصل به آهن با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون از خانواده ترانسفرین است که برای اولین بار به عنوان یک جزء قرمز ناشناخته از شیر گاو جدا شد (Wakabayashi et al. 2006). این پروتئین با جذب آهن، آهن آزاد را از باکتری‌ها و پاتوژن‌ها دور می‌کند، چراکه برای ادامه زندگی، رشد و تکثیر به آهن نیاز دارند، در نتیجه قادر به زنده ماندن نیستند. بنابراین لاکتوفرین می‌تواند به طور غیرمستقیم باعث مهار عامل عفونت‌زایی شود (Kozak 1989). ژن لاکتوفرین در بین گونه‌ها محافظت شده می‌باشد. طول mRNA آن ۲۶۰۰–۱۹۰۰ باز حفظ می‌شود، این پروتئین از یک زنجیره پلی پپتیدی منفرد با طول ۷۰۰ اسید آمینه تشکیل شده است (García-Montoya et al. 2012). لاکتوفرین منبع غنی از پپتید ضد میکروبی فعال کاتیونی و هیدروفوبیک است که می‌تواند در مقابل میکروب‌ها مورد استفاده قرار گیرد .(Sinha et al. 2013) در بین این پپتیدها، لاکتوفرامپین (Lactoferrampin) و لاکتوفریسین (Lactoferricin)، که در دامنه I لوب N لاکتوفرین قرار دارند، فعال‌تر هستند (Senkovich et al. 2007).

دامنه N1 از پروتئین لاکتوفرامپین دارای ۲۶۸–۲۴۸ اسید آمینه می‌باشد که فعالیت گسترده ضد میکروبی را در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مانند *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* نشان می‌دهد (van der Kraan et al. 2004). ترمینال C لاکتوفرامپین با داشتن بار مثبت، برای فعالیت ضد میکروبی بسیار مهم است، همچنین اسیدهای آمینه موجود در دامنه ۲۷۰–۲۴۸ از ترمینال N برای ساختار مارپیچی این پپتید ضروری است (van der Kraan et al. 2004). لاکتوفریسین یک پپتید ۲۵ اسید آمینه‌ای چند منظوره است که با تجزیه طبیعی لاکتوفرین توسط آنزیم پپسین به وجود می‌آید. تفاوت اصلی بین این پپتید و لاکتوفرامپین وجود پیوند دی سولفید بین دو اسید آمینه سیستئین موجود در لاکتوفریسین است (Sinha et al. 2013). مکانیسم فعالیت ضد میکروبی این پپتید به ۱۱ اسید آمینه آمفیپاتیک اولیه و بیست و ششمین اسید آمینه پرولین آن نسبت داده شده است (Sinha et al. 2013). در سال ۲۰۰۹، برای اولین بار پپتیدهای لاکتوفرامپین و لاکتوفریسین گاو، که از طریق آمینو اسید لیزین مرتبط بودند، به صورت نوترکیب تولید و فعالیت ضد باکتریایی آنها در برابر برخی باکتری‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج این مطالعه نشان داد که کایمر لاکتوفرامپین – لاکتوفریسین به طور جداگانه فعالیت بالاتری نسبت به لاکتوفرامپین یا لاکتوفریسین ایجاد می‌کند (Bolscher et al. 2009).

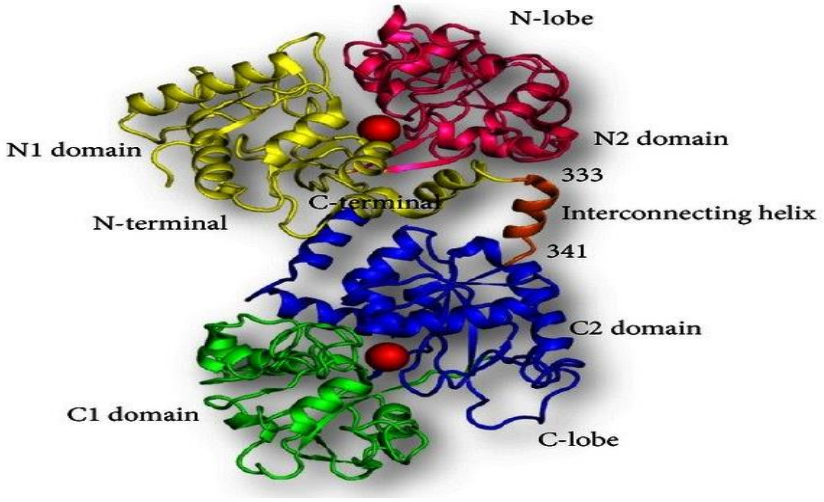
هدف از این مطالعه تولید کایمر نوترکیب لاکتوفرامپین–لاکتوفریسین گاوی در گیاه توتون با استفاده از تراریختگی و همچنین ارزیابی سطح بیان توالی نوکلئوتیدی کد کننده این کایمر می‌باشد. از این رو، با بررسی برخی منابع علمی، ویژگی اتصال لاکتوفرامپین و لاکتوفریسین در شرایط in silico مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه پس از بهینه کردن کدون‌های ترجیحی برای بیان در گیاه توتون، توالی کایمر مورد نظر سنتز شد. این تحقیق حاصل طرح پژوهشی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد بم می‌باشد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]

مواد و روش‌ها

طراحی سازه نوترکیب

در این مطالعه، از نرم افزار CLC Main Workbench برای تعیین محل‌های اثر آنزیم محدود کننده و بررسی سایر عناصر مورد نیاز برای فرآیند همسانه‌سازی استفاده شد. همچنین ساختار بیانی توالی نوترکیب لاکتوفرامپین-اکتوفریسین در سیستم بیانی یوکاریوتی، قبل و بعد از بهینه سازی کدون در گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفت. از نرم افزار آنلاین OptimumGeneTM GenScript به منظور بهینه سازی کدون‌های ژن هدف در سیستم بیانی گیاه توتون، محاسبه شاخص سازگاری کدون، درصد G+C و همچنین ردیابی کدون‌های نادر استفاده شد (https://www.genscript.com/gensmart-free-gene-codon-optimization.html). برای یافتن کدون‌های مورد نظر برای گیاهان، از بانک اطلاعاتی موسسه تحقیقات DNA Kazusa ژاپن (http://www.kazusa.or.jp/codon) استفاده شد. در ادامه نیز توالی سیگنال پپتید KDEL به انتهای ´۵ اضافه شد که هدف از این کار حفظ پروتئین در داخل شبکه آندوپلاسمی سلول‌های گیاهی می‌باشد، علاوه بر این توالی Kozak (GCCACC) نیز قبل از کدون شروع ترجمه (AUG) قرار گرفت. تمامی این بخش‌ها به منظور تضمین تامین اجزا مورد نظر برای ترجمه صحیح یک پروتئین بکار می‌رود. از شش اسید آمینه هیستیدین برای تسهیل در شناسایی و خالص سازی پروتئین‌ها در مراحل آخر نیز استفاده شد. سرانجام، دو جایگاه برشی *BamH*I و *Sac*I به ترتیب در انتهای ´۵ و ´۳ سازه طراحی شده برای تسهیل در روند همسانه‌سازی و الحاق در درون وکتور قرار داده شد. توالی لاکتوفرامپین-لاکتوفرسین کایمری گاوی، که شامل لینکرها، توالی Kozak و SEKDEL بود، درون وکتور pGH توسط شرکت GENEray (چین) سنتز شد.



شکل ۱- نمودار شماتیک مولکول لاکتوفرین گاو. دامنه‌های N1 و N2 به ترتیب در زرد و صورتی رنگ هستند، در حالی که دامنه های C1 و C2 به ترتیب در سبز و آبی رنگ هستند. مارپیچ متصل بین لوب‌ها به رنگ نارنجی رنگ است .دو اتم آهن به صورت کره‌های قرمز نشان داده می‌شوند.

Fig1. Schematic diagram of the bovine lactoferrin molecule. The N1 and N2 domains are colored in yellow and pink, respectively, while the C1 and C2 domains are colored in green and blue, respectively. The interconnecting helix between the lobes is colored in orange. The two iron atoms are shown as red spheres.

هضم آنزیمی و الحاق ژن لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین به پلاسمید بیانی pBI121

در ابتدا وکتور نوترکیب PGH که حاوی توالی سنتز شده لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین بود به باکتری‌های مستعد *E. coli* DH5α از طریق فرآیند شوک حرارتی (۴۰ دقیقه روی یخ <۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد < ۵ دقیقه روی یخ) منتقل شد و پس از آن، به مدت ۲ ساعت در محیط کشت Luria Broth (LB) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. در انتها روی محیط کشت جامد LB حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد پخش شد. کلونی‌های

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]

نوترکیب بر اساس مقاومت به آمپی‌سیلین غربال شدند و تایید نهایی توسط تکنیک کلونی PCR و با استفاده از آغازگرهای M13 صورت گرفت. کلونی‌های مثبت در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شدند. پلاسمیدهای نوترکیب pGH با استفاده از کیت استخراج پلاسمید NC DNA (Plasmid NC DNA isolation kit دنازیست، ایران)، استخراج شدند. صحت انجام این فرآیند از طریق فرآیند PCR و هضم دو آنزیمی، با استفاده از آنزیم های محدود کننده *Sac*I و *BamH*I انجام شد . در مرحله بعد، پلاسمید بیانی pBI121 و پلاسمید نوترکیب pGH با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده *Sac*I و *BamH*I در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد هضم شدند. پلاسمید خطی pBI121 و توالی جدا شده لاکتوفرامپین–لاکتوفریسین، از ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از کیت استخراج از ژل مینی Prep (ترمو، آمریکا) بازیابی شد. فرآیند الحاق محصولات فوق با کمک آنزیم T4 DNA لیگاز در دمای ۸ درجه سانتیگراد با استفاده از دستورالعمل شرکت سازنده کیت (ترمو، آمریکا) انجام گردید. به منظور بهینه‌سازی فرآیند انتقال پلاسمید نوترکیب pBI121 به باکتری بیان کننده، ابتدا پلاسمید با استفاده از فرآیند شوک حرارتی به باکتری کلونینگ DH5α منتقل شد و در محیط کشت حاوی کانامایسین A و دمای ۳۸ درجه سانتیگراد کشت داده شد. پس از آن، پلاسمیدهای نوترکیب pBI121 همان‌طور که در بالا توضیح داده شد، استخراج گردید و برای انتقال به باکتری بیانی در دمای ۲۰– درجه سانتیگراد ذخیره شد.

انتقال پلاسمید pBI121 به باکتری *اگروباکتریوم* سویه LBA4404

در این مطالعه از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 برای انتقال پلاسمید بیانی به گیاهان با روش ذوب و انجماد استفاده شد. به منظور انتقال پلاسمید نوترکیب به سویه *Agrobacterium* LBA4404، یک میکروگرم پلاسمید نوترکیب pBI121 به یک لوله حاوی ۵۰ میکرولیتر سلول‌های مستعد *اگروباکتریوم* اضافه شد و پس از اینکه کاملاً مخلوط شدند به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد. در گام بعدی لوله به مدت ۲ دقیقه در نیتروژن مایع منجمد و بعد از آن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت و سپس به مدت ۵ دقیقه در یخ قرار گرفت. به لوله مذکور، ۱ میلی‌لیتر از محیط LB اضافه شد و مخلوط به مدت دو ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد در انکیباتور شیکردار در ۱۵۰ دور در دقیقه کشت داده شد. لوله حاوی باکتری به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی برداشته شد و پلیت باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حل گردید. سرانجام، ۵۰–۷۰ میکرولیتر از باکتری‌ها در محیط کشت جامد LB حاوی کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، ریفامپیسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و جنتامایسین (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت داده شدند. ٤۸ ساعت بعد، کلونی‌های مورد نظر که روی محیط ظاهر شدند و به محیط مایع منتقل شدند. برای تأیید صحت انجام این فرآیندها، از روش کلونی PCR استفاده گردید.

انتقال باکتری *اگروباکتریوم* به ژنوم هسته‌ای گیاه توتون

برای انتقال *اگروباکتریوم* به توتون از روش دیسک برگی و هم‌کشتی با *اگروباکتریوم* استفاده شد. برای این منظور، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون *اگروباکتریوم* حاوی پلاسمید نوترکیب pBI121 به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی کانامایسین (mg/l50)، ریفامپیسین (mg/l50) و جنتامایسین (mg/l20) انتقال یافته و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد شیکر انکوباتور قرار داده شد. سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد (در دمای ٤ درجه سانتیگراد). مایع رویی حذف گردید و به سلولهای باکتری ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تلقیح اضافه شد. محیط کشت تلقیح شامل سه قسمت محیط MS و یک قسمت LB و ۱۵۰ میکرومولار استوسیرینگون بود. محلول نهایی به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در فاز دیگر تکه‌های ۰/۵×۰/۵ سانتیمتر از برگ توتون به مدت ۱۰ دقیقه در محیط کشت تلقیح قرار داده شده و سپس بر روی کاغذ صافی انتقال داده شدند تا سوسپانسیون باکتری از اطراف ریزنمونه‌ها بطور کامل حذف گردد. ریزنمونه‌ها به محیط هم‌کشتی (محیط MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA فاقد آنتی‌بیوتیک) منتقل شد و برای ٤۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]

نگهداری گردید. پتری‌های مذکور در فویل آلومینیوم پیچیده شدند تا هم‌کشتی دیسک‌های برگی و *اگروباکتریوم* در تاریکی انجام شود. وجود تاریکی باعث افزایش نفوذ *اگروباکتریوم* به بافت گیاهی می‌شود. پس از انجام هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط شاخه‌زایی شامل نمک‌های MS، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین منتقل گردید. از نقاط زخم خورده و همچنین از قاعده محل برش ریزنمونه‌های توتون، شاخساره‌های تراریخته ظاهر گردید و هنگامی که به اندازه مناسبی (در حدود ۰/۵ سانتیمتر) رسیدند با یک اسکالپل تیز از ریزنمونه جدا شده و به محیط جدید (محیط MS حاوی ۱۵ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار ،۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین) انتقال داده شدند. هنگامی که طول شاخه‌های تراریخته به ۵ سانتیمتر رسید، به محیط القاء ریشه (فاقد BAP و حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA) انتقال داده شدند. سپس گیاهچه‌های تراریخته شده به گلدان‌ها منتقل شدند. گلدان شامل پیت و پرلایت (۱:۱) بوده که برای تامین رطوبت، به اندازه کافی آبیاری شد. جهت جلوگیری از تبخیر آب و تحمیل تنش به گیاهچه‌ها، یک لیوان پلاستیکی شفاف روی لیوان‌های حاوی گیاهچه قرار داده شد. سه روز بعد سوراخ‌هایی روی لیوان بالایی ایجاد شد تا رطوبت فضای رشد گیاه تعدیل گردد. هر دو روز یکبار، بخشی از لیوان بالایی جدا شد تا اینکه در نهایت لیوان بالایی بطور کامل حذف شد. این فرآیند را سازگار نمودن (Acclimatization) می‌نامند. در نهایت گیاهان جهت بررسی بیشتر و بدست آوردن بذور نسل اول به گلخانه انتقال یافتند.

بیان موقت توالی کدکننده لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین گاوی در توتون

علاوه بر ترانسفورماسیون پایدار به گیاه توتون، از روش اگروانفیلتریشن برای بیان موقت توالی کد کننده لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین گاوی در گیاه توتون استفاده گردید. بدین منظور، یک کلونی از *اگروباکتریوم* حاوی پلاسمید نوترکیب برداشته شد و به مدت ٤٨ ساعت در محیط LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر جنتامایسین، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین کشت داده شد. پس از رسیدن غلظت محیط کشت به OD_{600}=5.1، محلول سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت حذف شد، رسوب باکتریایی در محیط اینفیلتریشن (حاوی $MgCl_2$ ۱۰ میلی‌مولار، MES ۱۰ میلی‌مولار و استوسیرینگون ۱۵۰ میکرومولار) حل شد و تراکم سلولی در OD_{600}=5.0 تنظیم شد. سپس سوسپانسیون حاصله به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. برای انتقال سوسپانسیون *اگروباکتریوم* به برگ توتون از سرنگ فاقد سوزن استفاده گردید (Sparkes et al. 2006). با فشار سرنگ، سوسپانسیون باکتری به درون بافت برگی نفوذ کرد. آنالیز بیان ژن سه روز پس از انتقال باکتری به گیاه شروع شد.

استخراج پروتئین کل

روش Tris-HCl برای استخراج پروتئین از بافت گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های یک گرمی از برگ توتون در ازت مایع پودر شدند. پودر حاصله با سه میلی‌لیتر بافر استخراج (محلول آبی با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH=8، ۱۰ میلی‌مولار EDTA با PH=8، نیم درصد بتا مرکاپتواتانول،۵۰ میکرومولار PMSF) سرد شده روی یخ مخلوط گردید. سپس با دور g ۱۱۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد و فاز رویی دور ریخته شد. باقی‌مانده در حجم های ۵۰۰ میکرولیتر در تیوب‌های اپندرف جدید توزیع گردید و به هر یک ۵۰۰ میکرولیتر بافر نمونه (محلول آبی با ترکیب ۱/۲۵ میلی‌لیتر Tris-HCl با pH=۸/٦ و نیم مولار، ۲ میلی‌لیتر SDS ۱۰ درصد، یک میلی‌لیتر گلیسرول،۲۵۰ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول، یک میلی‌گرم برومونفل بلو در حجم ۵ میلی‌لیتر) افزوده شد و ۳ دقیقه در آب جوش انکوبه شده و پس از ۵ دقیقه قرار گرفتن در یخ، در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند. جهت تخلیص پپتید کایمری از پروتئین کل از کیت حاوی ستون نیکل (ترمو، آمریکا) و ایمدازول ۲۵۰ میلی‌مولار بر اساس پروتکل شرکت سازنده استفاده گردید. به دلیل اینکه توالی کایمری دارای افزونه هیس تگ بود قابل اتصال به ستون نیکل بوده و امکان تخلیص پپتید نوترکیب فراهم گردید. بعد از خالص سازی پپتید نوترکیب،

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]

الکتروفورز پروتئین خالص شده روی ژل SDS-PAGE انجام شد.

بررسی پروتئین نوترکیب به روش وسترن بلاتینگ

در ابتدا کاغذ نیتروسلولز را به اندازه ژل برش داده و در بافر وسترن کاملا خیسانده شد همچنین چند عدد کاغذ صافی به اندازه ژل برش زده و همراه با لایه‌های اسفنجی در مقداری بافر وسترن به مدت ۱۰ دقیقه خیس گردید در مرحله بعد صفحه مشبک سبد پلاستیکی مخصوص انتقال را باز کرده و اسفنج خیس شده را روی آن قرار داده شد سپس کاغذهای صافی را نیز تک تک روی اسفنج گذاشته در مرحله بعد ژل را روی کاغذ صافی قرار داده و کاغذ نیتروسلولز را روی آن گذاشته همانند مراحل قبل کاغذ صافی‌ها روی کاغذ نیتروسلولز قرار داده و اسفنج بر روی آن گذاشته شد. سپس توسط میله حباب بین لایه‌ها را گرفته شد و گیره‌های به هم وصل گردید و در نهایت مجموعه ساندویچ شده به گونه‌ای در داخل تانک وسترن بلاتینگ قرار داده شد که غشاء به سمت قطب مثبت و ژل به سمت قطب منفی قرار گرفت و به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز گردید.

سنجش غلظت کلی پروتئین با روش بردفورد

سنجش غلظت پروتئین با استفاده از روش بردفورد و رنگ کوماسی بلو انجام شد. برای تهیه محلول استوک رنگ، ۰/۱ گرم از کوماسی بلو G ۲۵۰ در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول حل شد و پس از عبور از کاغذ صافی، ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد به آن اضافه شد و حجم نهایی آن با استفاده از آب مقطر به ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در ادامه، این محلول به نسبت یک به چهار آب مقطر استفاده شد. برای استفاده از غلظت‌های مختلف سرم آلبومین گاوی (BSA) از کیت تجاری بردفورد (ترمو، امریکا) استفاده گردید. میزان ٦٠ میکرولیتر از استانداردهای بیان و میزان جذب در ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. لازم بذکر است که اندازه‌گیری جذب نوری باید ۵ دقیقه پس از اضافه کردن نمونه به محلول سنجش انجام شود و بر اساس آن منحنی استاندارد ترسیم می‌شود.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration)

آزمایش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در میکروپلیت ۹٦ خانه استریل و با روش براث میکرودایلوشن (Microdilution broth) انجام شد. برای این منظور ابتدا از باکتری‌ها کشت ٢٤ ساعته تهیه شد. پس از تهیه ۰/۵ مک فارلند (محیطی که کدورت آن معادل محیط حاوی $۱۰^۸$ × ۱/۵ باکتری است) از باکتری‌ها در محیط مولر هینتون براث (مرک، آلمان)، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده به هر یک ازچاهک‌های پلیت ۹٦ خانه اضافه شد، سپس به اولین چاهک ردیف اول ۱۰۰ میکرولیتر از پروتئین کایمری، اضافه گردید و پس از چند بار پیپت کردن از چاهک دوم به سوم و به همین ترتیب تا چاهک ۱۱ رقیق شد (غلظت‌های هر چاهک به ترتیب در هر ردیف نسبت به ردیف بالایی به نصف تقلیل یافت. چاهک شماره ۱۱ هر ردیف به عنوان شاهد تیمار (کنترل منفی)، فقط حاوی محیط کشت، DMSO و ترکیب مورد استفاده بود و باکتری در آن کشت نگردید تا آلودگی احتمالی سبب بروز خطا نشود، چاهک شماره ۱۲ هر ردیف به عنوان شاهد باکتری (کنترل مثبت) استفاده شد تا از شرایط مناسب کشت و رشد نرمال باکتری اطمینان حاصل شود، که برای تعیین کدورت باکتری حاوی محیط کشت، DMSO و باکتری بود. بعد از تلقیح باکتری، میکروپلیت بر روی دستگاه چرخاننده قرار گرفت و ١٦ تا ١٨ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بعد از اتمام انکوباسیون، کدورت یا عدم کدورت در چاهک به صورت چشمی مشاهده و جذب نوری توسط دستگاه خوانش‌گر پلیت الیزا (STAT FAX 2100) در طول موج ٦٣٠ نانومتر خوانده شد. برای تعیین MIC از کمترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید، استفاده شد (Wiegand et al.2008).

حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration)

برای اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از چاهک‌های فاقد کدورت ارزیابی حداقل بازدارندگی، مقدار ۱۰ میکرولیتر در شرایط استریل برداشته شد و بر روی محیط آگار غذایی (NA)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]

کشت داده شد. پس از انکوباسیون ۲٤ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، کمترین رقتی که توانسته ۹۹/۹ درصد از باکتری‌ها را بکُشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. کلیه مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین ارائه گردید.

نتایج و بحث

بهینه سازی *in silico* توالی DNA مبتنی بر ترجیح کدون در گیاه توتون با استفاده از نرم افزار آنلاین GenScript انجام شد. سپس با استفاده از نرم افزار CLC WorkBench، توالی Kozak به عنوان محل اتصال ریبوزومی در یوکاریوت‌ها و منطقه کدگذاری سیگنال پپتید SEKDEL با موفقیت اضافه شدند (شکل ۲).

همسانه‌سازی سازه ژنی

پس از طراحی و سنتز مصنوعی ژن مورد نظر، وکتور حاوی ژن مصنوعی در باکتری *E.coli* سویه DH5α با موفقیت همسانه‌سازی گردید و صحت انجام این فرآیند، توسط آزمون کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تأیید شد. نمونه‌های مثبت، دوباره کشت داده شدند و پلاسیمدهای pGH نوترکیب با راندمان بالاتر استخراج شدند. این فرآیند توسط آزمون کلونی PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی و همچنین هضم دو آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده *Sac*I و *BamH*I تأیید شد. قطعه‌ای به طول ۱٤٦ جفت باز (ژن لاکتوفرامپین–لاکتوفریسین) و پلاسمید خطی pGH به طول ۳ Kb حاصل شد (شکل ۳– A). هضم دو آنزیمی پلاسمید pBI121 توسط آنزیم‌های محدود کننده *Sac*I و *BamH*I با موفقیت انجام شد (شکل ۳– B) و الحاق ژن هدف درون وکتور بیانی pBI121 با استفاده از آنزیم T4 نیز به طور صحیح انجام گردید. پلاسمیدهای نوترکیب به باکتری DH5α منتقل شدند. غربالگری، براساس رشد باکتری در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین و فرآیند کلونی PCR انجام گردید (شکل ۳– C). پلاسمیدهای pBI121 پس از ۱٦ ساعت کشت باکتری‌های DH5α در محیط کشت LB مایع، استخراج شدند و صحت انجام این فرآیند توسط آنزیم‌های محدود کننده هضم دو آنزیمی تأیید شد. نتایج روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند و ژن لاکتوفرامپین – لاکتوفریسین را با طول ۱٤٦ جفت باز مشاهده شد (شکل ۳– D). در نهایت پلاسمیدها توالی‌یابی شدند و نتایج، صحت توالی هدف را در پلاسمید بیانی تأیید کرد.

انتقال پلاسمید به *اگروباکتریوم*

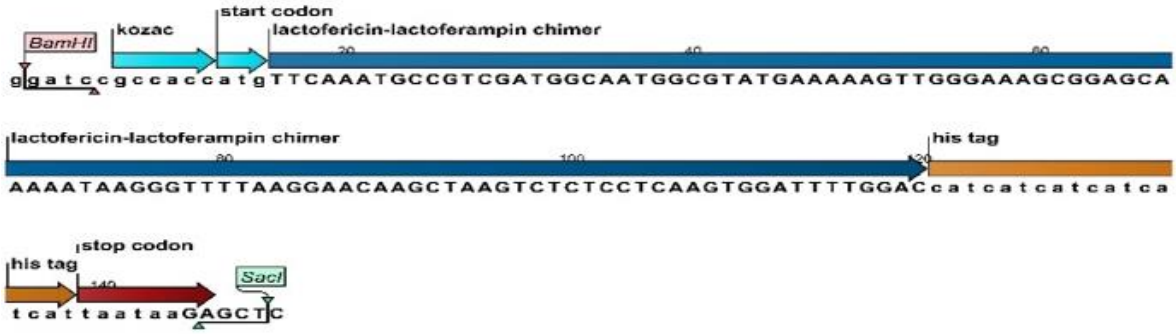
پلاسمید pBI121 نوترکیب از طریق فرآیند ذوب–انجماد به درون باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA 4404 انتقال داده شد. برای غربال سلول‌های تراریخت، از محیط کشت حاوی سه آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین، جنتامایسین و کانامایسین استفاده شد. تمامی سویه‌های مهندسی شده *اگروباکتریوم* به دلیل وجود ژن مقاومت در ژنوم، نسبت به ریفامپیسین مقاوم هستند، مقاومت به کانامایسین توسط ژن nptII موجود در پلاسمید pBI121 ایجاد می‌شود و سویه LBA4404 به طور خاص به جنتامایسین مقاوم است. استفاده توام از سه آنتی‌بیوتیک باعث اطمینان از فرآیند گزینش سلول‌های تراریخته شده و خطر فرار سلول‌های تراریخت نشده از فشار گزینشی را به حداقل می‌رساند. با این وجود، حضور پلاسمید حاوی ژن هدف (bp ۱٤٦) در باکتری‌های تراریخته توسط کلونی PCR (شکل ۳– D) تأیید گردید. از باکتری‌های منتخب برای انتقال دادن به گیاه استفاده شد.

هم‌کشتی و باززایی گیاهان تراریخته

ترانسفورماسیون گیاه از طریق هم‌کشتی دیسک‌های برگی گیاه با سوسپانسیون *Tumefaciens* A استرین LB4404 صورت گرفت. تیمار هورمونی شامل ۰/۱۱ میلی‌گرم از هورمون BAP و ۱/۱۰ میلی‌گرم هورمون NAA با موفقیت انجام شد. هجده روز پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط شاخه‌زایی، نخستین آغازه‌های شاخه بر روی ریزنمونه ظاهر شدند. این آغازه‌ها به صورت بافت متراکم کالوس مانندی بودند که به فاصله کوتاهی نخستین برگ‌های سبز بر روی آن ها پدیدار شدند. بیشترین میزان شاخه‌ها در محل برش و همچنین در محل زخم خوردگی نمونه (ناشی از کاربرد پنس) ایجاد شد (شکل ٤– A). شاخه‌های تراریخته به محیط طویل شدن منتقل شدند و سپس به محیط ریشه‌زایی انتقال داده شدند و در انتها به گلدان‌هایی حاوی پیت و پرلایت انتقال داده شدند (شکل ٤– B).

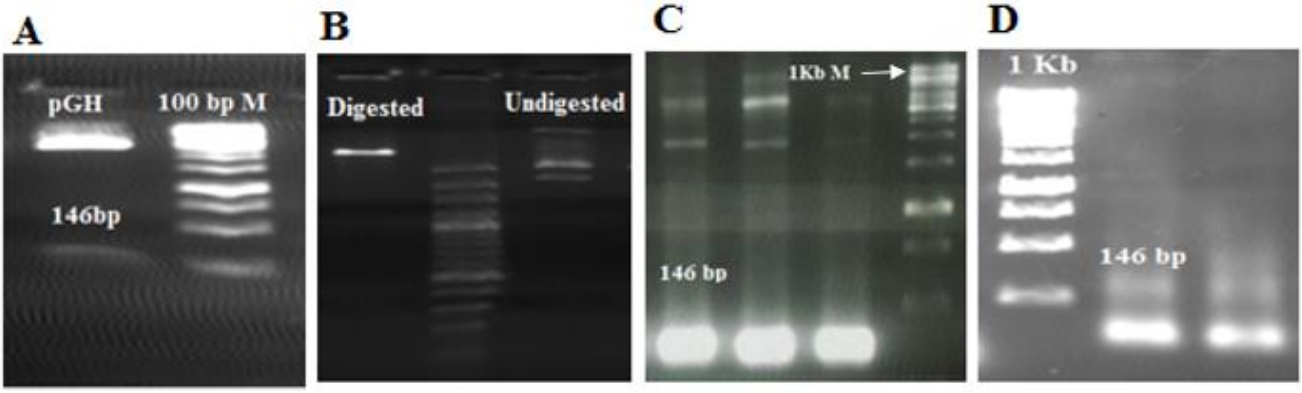
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]



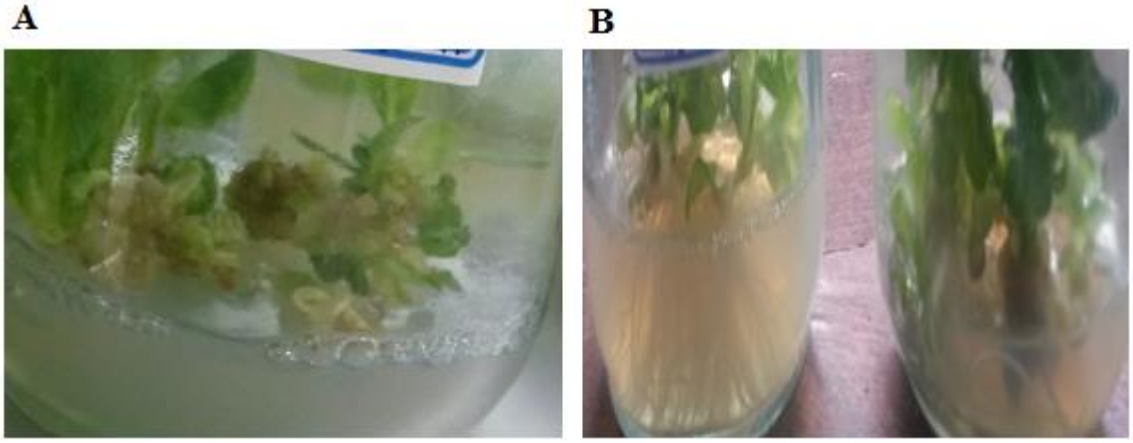
شکل ۲- سازه کایمری لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین پس از بهینه شدن کدون‌ها برای بیان این پروتئین در گیاه توتون

Fig2. Construct of chimeric lactoferrampine - lactoferricin after codon optimization for protein expression in tobacco



شکل ۳- A: الکتروفورز محصولات هضم دو آنزیمی پلاسمید pGH که حاوی توالی لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین است توسط دو آنزیم *Sac*I و *BamHI*. B: الکتروفورز هضم دو آنزیمی پلاسمید pBI121 توسط دو آنزیم *Sac*I و *BamHI*. C: نتایج کلونی PCR روی باکتری DH5α حاوی پلاسمید pBI12. D: نتایج کلونی PCR انتقال پلاسمید pBI121 به باکتری *Agrobacterium*، با استفاده از پرایمر M13

Fig3. A: Electrophoresis of pGH vector digestion products containing chimeric lactoferrampine-lactoferricin fragment with *SacI* and *BamHI* restriction enzymes. B: Electrophoresis of pBI121 vector digestion using *SacI* and *BamHI* restriction enzymes. C: Colony-PCR results of target gen of the pBI121 vector using specific primers. D: Colony-PCR test to confirm the transforming the pBI121 plasmid into *Agrobacterium* using M13 primer.



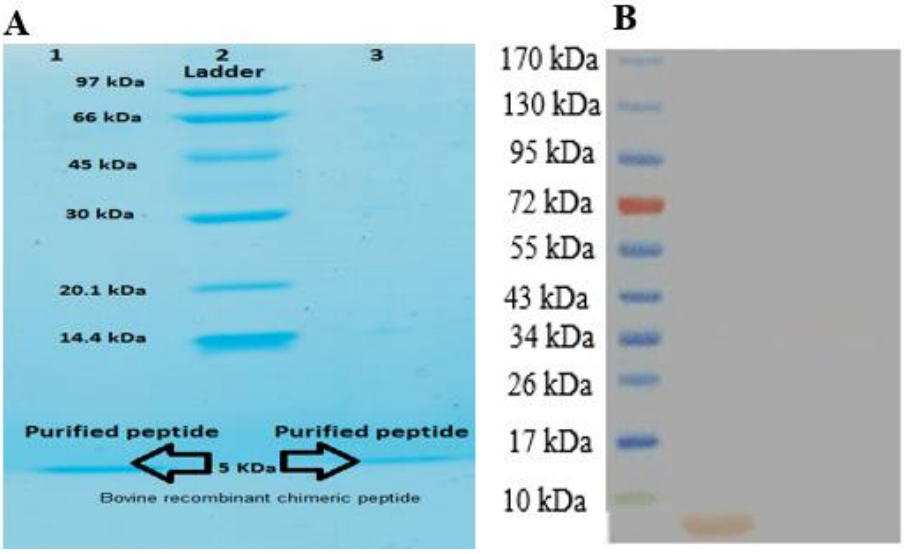
شکل ٤- A: آغازه‌ها به صورت بافت متراکم کالوس مانندی که نخستین برگ‌ها بر روی آنها قابل رویت می‌باشد. B: تشکیل ریشه بسیار مطلوب در محیط ریشه‌زایی از بافت کامل شاخساره

Fig4. A: The beginnings with callus-like texture which are visible on the first leaves. B: Desirable root formation.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]

بررسی بیان ژن در سطح پروتئین

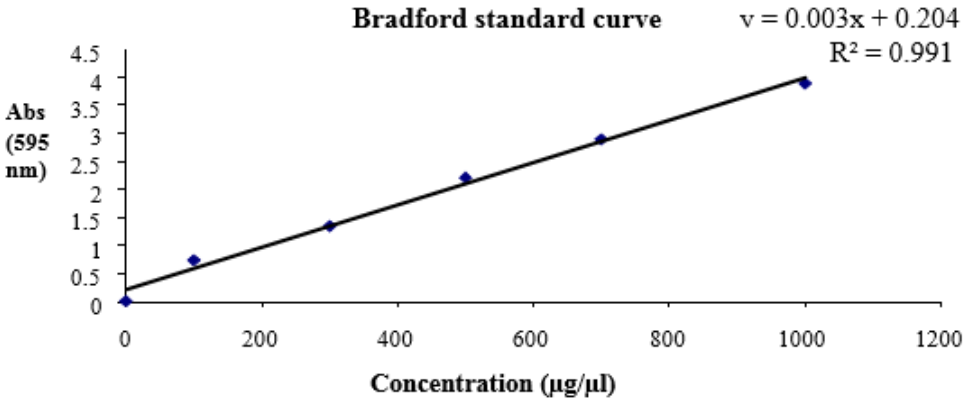
استخراج پروتئین کل از بافت گیاهی به روش Tris-HCl انجام شد. پس از تخلیص پپتید کایمری نوترکیب لاکتوفرامپین – لاکتوفریسین گاوی توسط ستون نیکل و ایمیدازول انجام شد. محصولات، بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شدند که نتایج نشان داد که پروتئین‌های تخلیص شده در محدوده وزنی ۵ کیلو دالتون قرار گرفتند (شکل ۵– A). در ادامه فرآیند وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی ضد پلی آنتی‌هیستیدین–HRP نیز با موفقیت انجام شد و نتایج نشان داد که واکنش فعال و اختصاصی بین آنتی‌بادی ضد پلی‌هیستیدین–HRP و تگ هیستیدین رخ داده است (شکل ۵– B). غلظت پروتئین نوترکیب با استفاده از روش براد فورد تخمین زده شد. این تخمین با توجه به معادله رگرسیون بین غلظت پروتئین استاندارد BSA با میزان جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر به دست آمد که عبارت بود از V=0.003x + 0.204 (شکل ٦). از آنجا که میزان جذب نوری مربوط به نمونه پروتئین برابر ۰/۹۷ بود، غلظت پروتئین نوترکیب حدود ۱/۵۲ mg/ml برآورد شد که با توجه به پارامتر R^2=0.991 می‌توان دقت این برآورد را بسیار بالا در نظر گرفت.



شکل ۵– A: الکتروفورز پروتئین خالص شده روی ژل SDS-PAGE که حضور فقط یک باند ۵ کیلو دالتونی، کیفیت مناسب پروتئین خالص شده را تایید می‌کند.

B: نتیجه وسترن بلات پروتیئن لاکتروفرامپین–لاکتوفریسین

Fig5. A: Electrophoresis of purified protein on SDS-PAGE. The presence of only one band in the 5 kDa band indicates a good quality of protein purification. B: Western blotting result of Lactoferrampin-Lactoferricin protein.



شکل ٦- منحنی استاندارد از چندین غلظت مختلف پروتئین BSA بر اساس جذب نوری در طول موج ۵۹۵ در آزمون بردفورد

Fig6. Standard curve of different concentration of BSA protein in 595 absorbance in Bradford assay

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی پاتوژن‌های شاخص غذایی

پاتوژنهای عامل فساد میکروبی مواد غذایی مورد ارزیابی در این مطالعه از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شده که لیست آنها در جدول ۱ آورده شده است لازم به ذکر است غلظت برآورد شده برای استخراج این پپتید بعد از تخلیص با ستون نیکل به روش برادفورد ۹٦۸ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد.

نتایج حداقل غلظت کشندگی پاتوژن‌های شاخص غذایی

حداقل غلظت کشندگی که به جز *Escherichia coli* در مورد بقیه یک رقت بیشتر از حداقل غلظت بازدارندگی بود (جدول ۲).

جدول ۱- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) پپتید نوترکیب لاکتوفرین در مهار پاتوژن های شاخص غذایی

Table1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of chimeric bovine lactoferrin in Inhibition of major food-borne pathogenic microorganisms

شماره	نام باکتری غذا زاد	ATCC	برحسب میکروگرم بر میلی لیتر
۱	*Escherichia coli*	ATCC 2592	۳۰/۲۵
۲	*Staphylococcus aureus*	ATCC 25923	۱۵/۱۲۵
۳	*Salmonella typhimurium*	ATCC 14028	۷/۵٦۲
٤	*Enterococcus faecalis*	ATCC 29212	۱۵/۱۲۵
۵	*Listeria monocytogenes*	ATCC 19111	۷/۵٦۲

جدول ۲- حداقل غلظت کشندگی (MBC) پپتید نوترکیب لاکتوفرین در مهار پاتوژن‌های شاخص غذایی

Table2. Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the chimeric bovine lactoferrin in inhibition of major food-borne pathogenic microorganisms

شماره	نام باکتری غذا زاد	ATCC	برحسب میکروگرم بر میلی لیتر
۱	*Escherichia coli*	ATCC 25922	۳۰/۲۵
۲	*Staphylococcus aureus*	ATCC25923	۳۰/۲۵
۳	*Salmonella typhimurium*	ATCC 14028	۱۵/۱۲۵
٤	*Enterococcus faecalis*	ATCC 29212	۳۰/۲۵
۵	*Listeria monocytogenes*	ATCC 19111	۱۵/۱۲۵

محصولات کشاورزی به طور مداوم در معرض تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی قرار دارند که به طوری جدی رشد و بهره‌برداری آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Rejeb et al. 2014). امروزه در رابطه با حفاظت محصولات کشاورزی در برابر عوامل بیماریزایی، به کارگیری سموم شیمیایی به دست بسیار گسترده شده است سلامت انسان را به مخاطره می‌اندازد و تهدیدی بر سلامت و محیط زیست نیز محسوب شده و همچنین سبب ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن ها می‌شود (Fairchild et al. 2013; Popp et al. 2013). به همین علت، استراتژی‌های مبتنی بر استفاده از ترکیبات مؤثر جایگزین با سمیت پایین و بهبود مقاومت بیماری از طریق توسعه گونه‌های تراریخته گیاهی به عنوان استراتژی‌های جدید برای مدیریت پاتوژن‌های گیاهی معرفی می‌شود (Agrios 2005). حفاظت از گیاهان، با استفاده از این پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان نوعی کنترل بیولوژیکی به عنوان جایگزینی برای مواد شیمیایی سمی در کشاورزی و همچنین توسعه گیاهان تراریخته، بیان انواع طبیعی یا نوترکیب پپتیدهای ضد میکروبی می‌تواند به عنوان راهکارهای امیدوار کننده برای کاهش آسیب‌های ناشی از بیماری‌ها و توسعه مقاومت در برابر

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]

بیماری‌های مختلف گیاهی به شمار روند. در پژوهش حاضر هر دو راهکار یعنی هم تولید و تخلیص شکل نوترکیب یک پپتید ضدمیکروبی و هم تولید یک گیاه تراریخت مسیر روشنی را برای استمرار پژوهش و معرفی راهکاری جایگزین فراهم ساخته است. پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها و همچنین ویروس‌ها (Bulet et al. 2004) و عوامل بیماری‌زای قارچی را مهار و از بین می‌برند (De Lucca & Walsh 1999) و علاوه بر این، آنها سمیت سلولی کمتری نسبت به سلول‌های پستاندار دارند و خطر ابتلا به بیماری پاتوژن را پایین می‌آورند، زیرا به نوع خاصی سیستم دفاعی میزبان را تقویت می‌کنند (Da Costa et al. 2015)، بنابراین، می‌توانند یک جایگزین مناسب برای سموم شیمیایی برای حفاظت از گیاهان تلقی شوند (Montesinos & Bardaji 2008).

در مطالعه حاضر به ظرفیت کم نظیر پروتئین ضد میکروبی شیر گاو توجه ویژه‌ای شده است که از مهمترین عوامل داشتن چنین خاصیتی، حضور پروتئین لاکتوفرین (LF) است که یک پروتئین ضد میکروبی که دارای فعالیت‌های گسترده در برابر هر دو نوع باکتری گرم منفی و گرم مثبت است و همراه با AMP ها برای ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به پاتوژن‌های باکتریایی مورد توجه خاص قرار گرفته‌اند (Mourgues et al. 1998). لاکتوفریسین (LFcin) و لاکتوفرامپین (LFampin) دو پپتید ضد میکروبی واقع در N-terminus لاکتوفرین شیر گاو هستند که در اثر هضم آنزیمی لاکتوفرین حاصل شدند و فعالیت‌های ضد باکتری، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد تومور را نشان می‌دهند (Gifford et al. 2005). در پژوهش حاضر، از بخش‌های ضد میکروبی هر دو پپتید برای داشتن سودمندی هر دو در کنار هم بهره برده شده است. به منظور بهینه کردن بیان پروتئین مورد مطالعه و فولدینگ مناسب آن، برخی توالی‌های ضروری به توالی ژن هدف اضافه شدند. ازجمله توالی کزاک (GCCACC)، که جایگاه اتصال ریبوزم به توالی محسوب می‌شود و سطح بیان را تا ده برابر افزایش می‌دهد (Kozak 1989). این توالی در مطالعات تولید واکسن نوترکیب نیز مورد استفاده قرار گرفته است و نشان داده شده است که سبب افزایش قابل توجهی در بیان ژن می‌شود (Habibi-Pirkoohi et al. 2014). توالی افزوده شده دیگر به این پروتئین، ٦ اسید آمینه هیستیدین می‌باشد که ما را قادر به ردیابی و خالص سازی پروتئین نوترکیب می‌کند. تحقیقات نشان داده‌اند که پروتئین‌های کایمری که دارای تگ هیستیدین می‌باشند، در مهار پاتوژن‌ها موثرتر هستند (Gifford et al. 2005). استفاده از توالی سیگنال پپتیدی یکی دیگر از استراتژیک‌های افزایش راندمان بیان و فولدینگ ژن‌ها در سیستم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی می‌باشد (Nielsen et al. 1997; Jahandar & Forouharmehr 2019; Nazifi et al. 2019). برخی از سیگنال پپتیدها، پروتئین تولید شده را از سیتوپلاسم به شبکه آندوپلاسمی منتقل می‌کنند. در شبکه آندوپلاسمی، چپرون‌ها و سایر آنزیم‌های موجود برای فولدینگ صحیح پروتئین وجود دارد (Sehnke et al. 2000). سیگنال پپتیدها معمولا به انتهای کربوکسیل پروتئین نوترکیب متصل می‌شوند و با هدایت پروتئین به فضای اکسیداتیو و ایجاد شرایط مطلوب برای تشکیل باندهای دی سولفیدی سبب تاشدگی صحیح پروتئین و در نتیجه عملکردی شدن پروتئین می‌شود (Forouharmehr et al. 2018). پپتید SEKDEL شامل شش اسید آمینه (Ser-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu) است که سال-هاست به عنوان عامل مهمی در انتقال پروتئین از سیتوپلاسم به شبکه آندوپلاسمی شناخته شده است (He et al. 2012). در مطالعه حاضر، بستری را برای تولید پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین – لاکتوفریسین در گیاه توتون، با هدف بررسی پتانسیل ضد میکروبی این پپتید در ارزیابی‌های آینده ایجاد گردید. با توجه به این استراتژی ایجاد گیاهان مقاوم در برابر بیماری در بسیاری از مطالعات دیگر نظیر بیان مطلوب AMPs با موفقیت در محصولات مختلف مهم از قبیل توتون (Portieles et al. 2010)، گوجه فرنگی (Jha & Chattoo 2010)، سیب زمینی (Zakharchenko et al. 2007)، برنج (Jha & Chattoo 2010)، پنبه (Rajasekaran et al. 2005) و جو (Rahnamaeian et al. 2009) گزارش شده است. بیان AMP در گیاه علاوه بر اینکه آنها را در برابر پاتوژن‌ها مقاوم می‌کند، می‌تواند سبب مقاومت آنها به سایر عوامل استرسی، مانند پاتوژن های حشرات (Choi et al. 2009) و حتی برخی از استرس‌های غیر عادی مانند استرس نمک‌های اکسیداتیو شود (Rukavtsova et al. 2013).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]

جدول ۳- میانگین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) پپتید نوترکیب لاکتوفرین در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری روی پنج باکتری بیماریزا (CLSI).

Table3. The average values of MIC and MBC for chimeric bovine lactoferrin in comparison with commercial antibiotics against five pathogenic bacteria (CLSI).

Bacteria	حداقل غلظت کشندگی MBC (µg/ml)		حداقل غلظت بازدارندگی MIC (µg/ml)					
	LFA-LFC	LFA-LFC	Caftazidime	Vancomycin	Piperacillin	Gentamicin	Ciprofloxacin	Ampicillin
***Staphylococcus aureus* ATCC25923**	30.25	15.125	-	≥16	-	≥16	≥16	0.5-2
***Salmonella typhimurium* ATCC 14028**	15.125	7.652	≥16	-	≥128	≥16	≥4	≥32
***Enterococcus faecalis* ATCC 29212**	30.25	15.125	-	4	-	4	1	4
***Listeria monocytogenes* ATCC 19111**	15.125	7.562	-	-	≥128	≥16	-	≥32
***Escherichiacoli* ATCC 25922**	30.25	30.25	≥16	-	≥128	≥16	≥4	≥4

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی شکل نوترکیب پپتید کایمری شیر روی پنج باکتری پاتوژن به ترتیب در جدول شماره ۱ و ۲ آورده شده است .ضمن اینکه این نتایج و اثر پنج آنتی‌بیوتیک استاندارد روی این باکتری‌های پاتوژن در جدول شماره ۳ داده شده. اثر مهارکنندگی ترکیب کایمری روی *استافیلوکوکوس اورئوس* مشابه اثر مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سیپروفلاکساسین و ونکومایسین بود و از اثر مهارکنندگی آمپی‌سیلین کمتر شد. در یک تحقیق دیگر که در سال ۲۰۱۳ روی سویه *استافیلوکوک* مورد آزمایش انجام شد از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و مخلوط آنتی‌بیوتیک و زردچوبه استفاده شد که در نتیجه اثر بازدارندگی ترکیب کایمری از مخلوط زردچوبه و آنتی‌بیوتیک‌های نورفلاکساسین و سیپروفلاکساسین بیشتر شد و اثر بازدارندگی معادل مخلوط زردچوبه و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بود و از اثر بازدارندگی مخلوط زردچوبه و آنتی‌بیوتیک اکساسیلین کمتر شد. همچنین اثر مهارکنندگی ترکیب کایمری روی باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* به مراتب از اثر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامایسین، کافتازیدیم و بخصوص پیپراسیلین بهتر بود. اثر مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک‌های داده شده روی *انتوکوکوس فکالیس* از ترکیب کایمری موثرتر بود. در خصوص میکروارگانیزم *لیستریا مونوسیتوژنز* نیز اثر مهارکنندگی ترکیب کایمری تولید شده با MIC برابر با (۷/۵۶۲ µg/ml) به مراتب از اثر مهارکنندگی سایر آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد بهتر بود (پیپراسیلین µg/ml ۱۲۸، جنتامایسین µg/ml ۱۶، و آمپی‌سیلین ۳۲µg/ml). اثر مهارکنندگی ترکیب کایمری روی *اشریشیاکلی* از آنتی‌بیوتیک پیپراسیلین بهتر بود و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها اثر مهارکنندگی ضعیف‌تری داشت (Mun et al. 2013).

اگروباکتریوم و متعاقبا گیاه توتون به دلیل ارزانی و کاربر پسند بودن، میزبان‌های بیانی مناسبی از نظر اقتصادی و کاربر پسندی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب، نظیر لاکتوفرامپین– لاکتوفریسین می‌باشند زیرا علاوه بر اینکه ایمن هستند و مخاطرات زیست محیطی ندارند، محصول پروتئینی مناسب و خالصی را تولید می‌کنند. بنابراین پپتید نوترکیب می‌تواند برای تعیین مطالعات ضد میکروبی نیز در آینده مورد استفاده قرار گرفته و با توجه به در دسترس بودن میزبان بیانی آن، در سطح کلان نیز تولید شود.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]

منابع

Agrios GN. 2005. Plant diseases caused by fungi. Plant pathology 4.

Bolscher JG, Adão R, Nazmi K et al. 2009. Bactericidal activity of LFchimera is stronger and less sensitive to ionic strength than its constituent lactoferricin and lactoferrampin peptides. Biochimie 91**,** 123-132.

Bulet P, Stöcklin R, Menin L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunological reviews 198**,** 169-184.

Choi S, Isaacs A, Clements D et al. 2009. De novo design and in vivo activity of conformationally restrained antimicrobial arylamide foldamers. Proceedings of the National Academy of Sciences 106**,** 6968-6973.

Da Costa JP, Cova M, Ferreira R et al. 2015. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? Applied microbiology and biotechnology 99**,** 2023-2040.

De Lucca AJ, Walsh TJ. 1999. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. Antimicrobial agents and chemotherapy 43**,** 1-11.

Fairchild G, Van Goozen SH, Calder AJ et al. 2013. Research review: evaluating and reformulating the developmental taxonomic theory of antisocial behaviour. Journal of Child Psychology and Psychiatry 54**,** 924-940.

Forouharmehr A, Nassiri M, Ghovvati S et al. 2018. Evaluation of different signal peptides for secretory production of recombinant bovine pancreatic ribonuclease A in Gram negative bacterial system: an in silico study. Current Proteomics 15**,** 24-33.

García-Montoya IA, Cendón TS, Arévalo-Gallegos S et al. 2012. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 1820**,** 226-236.

Gifford JL, Hunter HN, Vogel H. 2005. Lactoferricin. Cellular and molecular life sciences 62**,** 2588.

Habibi-Pirkoohi M, Malekzadeh-Shafaroudi S, Marashi H et al. 2014. Expression of foot and mouth disease virus (FMDV) capsid protein VP1 in Chlamydomonas reinhardtii as a possible source of recombinant vaccine. International journal of plant, animal and environmental science 4**,** 644-648.

He X, Haselhorst T, von Itzstein M et al. 2012. Influence of an ER-retention signal on the N-glycosylation of recombinant human α-L-iduronidase generated in seeds of Arabidopsis. Plant molecular biology 79**,** 157-169.

Jahandar MH, Forouharmehr A. 2019. Optimization of human serum albumin periplasmic localization in Escherichia coli using in silico evaluation of different signal peptides. International Journal of Peptide Research and Therapeutics 25**,** 635-643.

Jaydari A, Barzegar PEF, Forouharmehr A et al. 2019. Engineering, Cloning and Expression of Interleukin 2–Com1 Chimera with Aim of Recombinant Subunit Vaccine Production Against Coxiella burnetii. International Journal of Peptide Research and Therapeutics 25**,** 1127-1133.

Jha S, Chattoo BB. 2010. Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. Transgenic research 19**,** 373-384.

Kozak M. 1989. The scanning model for translation: an update. The Journal of cell biology 108**,** 229-241.

Ma J-C, Vine N. 1999. Plant expression systems for the production of vaccines. In: Defense of Mucosal Surfaces: Pathogenesis, Immunity and Vaccines. Springer. pp. 275-292.

Montesinos E, Bardaji E. 2008. Synthetic antimicrobial peptides as agricultural pesticides for plant-disease control. Chemistry & biodiversity 5**,** 1225-1237.

Mourgues F, Brisset M-N, Chevreau E. 1998. Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. Trends in Biotechnology 16**,** 203-210.

Mun S-H, Joung D-K, Kim Y-S, Kang O-H, Kim S-B, Seo Y-S, et al. 2013. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Phytomedicine. 20(8-9):714-8

Nazifi N, Tahmoorespur M, Sekhavati MH et al. 2019. Assessment of signal peptides to optimize interleukin 2 (IL-2) folding and expression. Current Proteomics 16**,** 188-198.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S et al. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein engineering 10**,** 1-6.

Popp J, Pető K ,Nagy J. 2013. Pesticide productivity and food security. A review. Agronomy for sustainable development 33**,** 243-255.

Portieles R, Ayra C, Gonzalez E et al. 2010. NmDef02, a novel antimicrobial gene isolated from Nicotiana megalosiphon confers high-level pathogen resistance under greenhouse and field conditions. Plant biotechnology journal 8**,** 678-690.

Rahnamaeian M, Langen G, Imani J et al. 2009. Insect peptide metchnikowin confers on barley a selective capacity for resistance to fungal ascomycetes pathogens. Journal of experimental botany 60**,** 4105-4114.

Rajasekaran K, Cary JW, Jaynes JM et al. 2005. Disease resistance conferred by the expression of a gene encoding a synthetic peptide in transgenic cotton (Gossypium hirsutum L.) plants. Plant Biotechnology Journal 3**,** 545-554.

Rejeb IB, Pastor V, Mauch-Mani B. 2014. Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. Plants 3**,** 458-475.

Rukavtsova E, Lebedeva A, Zakharchenko N et al. 2013. The ways to produce biologically safe marker-free transgenic plants. Russian journal of plant physiology 60**,** 14-26.

Schillberg S, Emans N, Fischer R. 2002. Antibody molecular farming in plants and plant cells. Phytochemistry reviews 1**,** 45-54.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]

Sehnke PC, Henry R, Cline K et al. 2000. Interaction of a plant 14-3-3 protein with the signal peptide of a thylakoid-targeted chloroplast precursor protein and the presence of 14-3-3 isoforms in the chloroplast stroma. Plant Physiology 122**,** 235-242.

Senkovich O, Cook WJ, Mirza S et al. 2007. Structure of a complex of human lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein a provides insight into microbial defense mechanism. Journal of molecular biology 370**,** 701-713.

Sinha M, Kaushik S, Kaur P et al. 2013. Antimicrobial lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein. International journal of peptides 2013.

Sparkes IA, Runions J, Kearns A et al. 2006. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. Nature protocols 1**,** 2019.

Tanhaeian A, Mohammadi E, Mansury D et al. 2019. Assessment of a Novel Antimicrobial Peptide Against Clinically Isolated Animal Pathogens and Prediction of Its Thermal-Stability. Microbial Drug Resistance.

Van der Kraan MI, Groenink J, Nazmi K et al. 2004. Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. Peptides 25**,** 177-183.

Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M. 2006. Lactoferrin research, technology and applications .International Dairy Journal 16**,** 1241-1251.

Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature protocols. 3(2):163

Zakharchenko N, Rukavtsova E, Gudkov A et al. 2007. Expression of the artificial gene encoding anti-microbial peptide cecropin P1 increases the resistance of transgenic potato plants to potato blight and white rot. In: Doklady Biological Sciences. Springer. pp. 267-269.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 1

Designing and Expression of Bovine Chimeric Lactoferrampine-Lactoferricin Peptide with Aim of Recombinant Protein Production in Tobacco

Hamid Sarhadi[1*], Mohammad Hassan Jahandar[2] and Abbas Tanhaeian[3]

1-Department of Food Science and Technology, Bam Branch, Islamic Azad University, Bam, Iran
2-Department of Agriculture, Bam Branch, Islamic Azad University, Bam, Iran
3-School of Medicine, Shahrood University of Medical Sciences, Shahrood, Iran

*Corresponding Author, Email: sarhadi@iaubam.ac.ir

Abstract

Lactoferrin, which consists of lactoferampin and lactoferricin peptides, is one of the milk glycoproteins with anti-microbial properties. Lactoferrin is known as a component of intrinsic immunity which points to first barrier against microbes. The aim of this study was the chimeric synthesis of this two peptides and also producing transgenic product. One of the desired methods to produce recombinant peptides is by transferring their genes to plant cells and producing hairy roots. In this study, the sequence of chimeric Lfampin-Lfcin was codon optimized based on Tobacco expression system. The target sequence was artificially synthesized in pGH vector and then sub-cloned into the pBI121 expression vector. The expression vector was transferred to *Agrobacterium rhizogenes* through freez- defreezing process. Then it was transferred to Tobacco plant using leaf disc method. Extraction of recombinant protein was done using Tris-HCl method and purification process was accomplished by chromatography Ni-agarose columns. Finally, the results showed that the amount of recombinant protein was 1.52 mg/ml and its quality was also desirable. The results also showed that chimeric composition has a good inhibitory effect on pathogenic microorganisms.

Key words: Lactoferrampine - Lactoferricin, Recombinant protein, Tobacco, *Agrobacterium rhizogenes*

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.8.1]