JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره چهاردهم، شماره دوم، ۱۳۹۷، پیاپی ۳۷: ۴۷-۳۷

بررسی خواص ضد باکتریایی پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری بر روی رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مولد ورم پستان در گاوهای شیری هلشتاین

سیده زهرا موسوی[۱]، مجتبی طهمورث پور[۲*]، محمد هادی سخاوتی[۳] و علی جوادمنش[۳]

۱- کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- استاد تمام گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت:۹۶/۲/۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱/۲۶

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی اثر ضد باکتریایی پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری بر روی رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مولد ورم پستان گاو شیری است. پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری که از مطالعات قبلی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شده بود مورد استفاده قرار گرفت. اثر ضدباکتریایی این پپتید به روش شمارش کلونی بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۲۵۹۲۳) و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (PTCC ۱۷۶۴) انجام گرفت. همچنین بررسی اثر حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد و لئوفلایز کردن این پپتید بر فعالیت ضد باکتریایی آن به روش انتشار از دیسک انجام شد. نتایج نشان داد که پپتید نوترکیب تولیدی در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر ضد باکتریایی داشت ($p < ۰/۰۰۰۱$) ولی بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بی‌تأثیر بود. همچنین بررسی اثر حرارت نشان داد که اعمال حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد تا مدت‌زمان ۴۰ دقیقه تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت این پپتید نداشت ولی در زمان های ۷۰ و ۱۰۰ دقیقه کاهش معنی داری در فعالیت ضد باکتریایی این پپتید مشاهده شد ($p < ۰/۰۰۰۱$). فعالیت ضد باکتریایی پپتید مورد مطالعه در اثر لئوفلایز شدن تغییر نکرد. نتایج به دست آمده در این مطالعه پتانسیل پپتیدهای طبیعی و خواص ضد باکتریایی آن ها را نشان داد. امید است در آینده بتوان از این ترکیبات به عنوان جایگزین یا مکمل درمانی برای آنتی بیوتیک‌ها در بیماری ورم پستان استفاده کرد.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، پپتید نوترکیب، لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین، ورم پستان

* *نویسنده مسئول: مجتبی طهمورث پور*

آدرس: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورز، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران.

پست الکترونیک: Thmoores@um.ac.ir

مقدمه

ورم پستان از شایع‌ترین و پرهزینه‌ترین بیماری‌های صنعت گاوهای شیری است که زیان‌های اقتصادی ناشی از آن چشم‌گیر است و سهم قابل‌توجهی از هزینه‌های درمانی گاوداری‌ها را به خود اختصاص می‌دهد. میزان بروز این بیماری در صنعت گاوداری ایران بین ۰/۵ تا ۲۵ درصد در هر ماه است (۵). بیش از ۱۳۷ نوع میکروارگانیسم مختلف به‌عنوان عامل ورم پستان شناسایی شده است (۷). این بیماری معمولاً در پاسخ به عفونت‌های باکتریایی در داخل پستان رخ می‌دهد (۳۷). *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از عوامل عمده و رایج ورم پستان در گاو، بز، خوک و میش است (۲، ۱۱). این باکتری معمولا در درمان با آنتی بیوتیک دچار مشکل می‌شود. از دلایل ضعف اثر آنتی‌بیوتیک بر درمان *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌توان به این موضوع اشاره کرد که این باکتری قادر است در داخل ماکروفاژها، گلبول‌های سفید و سلول‌های پوششی زنده بماند و از دسترس آنتی‌بیوتیک‌ها در امان باشد. همچنین آنزیم کوآگولاز موجود در این باکتری موجب ایجاد یک لایه در اطراف آبسه *استافیلوکوکی* می‌شود که می‌تواند موجب ایجاد مقاومت و پایداری این باکتری‌ها بعلت جلوگیری از فاگوسیتوز و تخریب آن‌ها شود. تزریق درون پستانی آنتی‌بیوتیک رایج‌ترین راه موجود برای درمان ورم پستان در گاو است (۱۷، ۲، ۱۸). متأسفانه امروزه تجویز و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها رو به افزایش است که این خود عوارضی را در پی دارد. از جمله آن‌ها می‌توان به باقی‌مانده‌های دارویی در شیر و ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های مختلف باکتریایی و انتقال آن‌ها از دام به انسان اشاره کرد. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام یکی از سه دسته‌ی بزرگ آنتی‌بیوتیک‌ها هستند؛ (۱۴) که به طور عمده شامل پنی‌سیلین، سفالوسپورین و ترکیبات مرتبط است (۱۹) که مقاومت باکتری‌ها علیه این آنتی‌بیوتیک‌ها به میزان زیادی افزایش پیدا کرده است. یکی از انواع رایج باکتری‌های مقاوم به بتالاکتام‌ها می‌توان به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (*MRSA*) اشاره کرد که این سویه‌ی باکتری توانایی مقاومت در برابر بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها را دارا است (۳۳). در طول دو دهه‌ی گذشته گروه بزرگی از ترکیبات طبیعی با وزن مولکولی کم، از گیاهان و حیوانات استخراج شدند و فعالیت‌های ضدمیکروبی از خود نشان دادند که اصطلاحاً به برخی از آن‌ها پپتیدهای ضدمیکروبی (AMPs) گفته می‌شود. محققان این پپتیدهای ضدمیکروبی را آنتی‌بیوتیک طبیعی نامیدند که می توانند به‌عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی باشند (۲۱، ۳۶). ازجمله این ترکیبات می‌توان به پروتئین لاکتوفرین (LF) اشاره کرد (۲۲). لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی معادل ۸۰ kda است (۲۰، ۱). رد وان و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثر پروتئین لاکتوفرین شتری و انسانی را بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین بررسی کردند. نتایج نشان داد که لاکتوفرین شتری در غلظت کمتری نسبت به لاکتوفرین انسانی مانع رشد این باکتری می‌شود (۲۶). فعالیت‌های ضدباکتریایی تنها مختص به فرم کامل پروتئین لاکتوفرین نیست، بلکه هریک از لوب‌ها به‌تنهایی و همچنین پپتیدهای فعال لاکتوفرین نیز دارای فعالیت‌های ضدباکتریایی هستند (۲۹). مطالعات نشان داده است که فعالیت ضدباکتریایی دو پپتید لاکتوفرامپین (LFP) و لاکتوفریسین (LFC) که در دومین N_1 لاکتوفرین قرار دارند در مقایسه با لاکتوفرین طبیعی بسیار قوی‌تر است (۳۵، ۶). بولسچر

و همکاران در سال ۲۰۰۹ برای اولین بار دو پپتید لاکتوفرامپین و لاکتوفریسین گاوی را تحت عنوان لاکتوفرین کایمر که از طریق اسیدآمینه لایزین به یکدیگر متصل هستند به‌صورت تجاری تولید کردند. نتایج نشان داد که کایمر ساخته‌شده لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را نسبت به پپتید لاکتوفرامپین یا لاکتوفریسین یا مخلوط این دو (به نسبت ۱:۱) نشان می‌دهد (۶). تانگ و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین گاوی فعالیت ضد میکروبی زیادی را در برابر باکتری گرم منفی *اشرشیاکلای*، *سالمونلا انتریتیدیس* و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنز* نشان می‌دهد. علاوه بر این اثر دما نیز بر روی این پپتید بررسی شد و گزارش گردید این پپتید در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد تا مدت‌زمان ۱۸۰ دقیقه از خود مقاومت نشان داده است. فلورس و همکاران در سال ۲۰۱۰ آزمایشی را باهدف بررسی اثر لاکتوفرین گاوی، پپتیدهای لاکتوفرامپین و لاکتوفریسین و کایمر حاصل از این دو بر روی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلای* انجام دادند. نتایج نشان می‌دهد که کایمر و پپتیدهای لاکتوفرین رشد هر دو گونه‌ی تحت بررسی را مهار می‌کنند (۱۵). در رابطه با لاکتوفرین شتر تاکنون مطالعات کمی گزارش شده است (۱۳). در رابطه با بررسی اثر پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری بر روی باکتری‌های مولد ورم پستان تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته است. هدف از این پژوهش بررسی اثر ضدباکتریایی پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری بر روی رشد برخی از باکتری‌های مولد ورم پستان گاو شیری هلشتاین است.

مواد و روش‌ها

تهیه پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری

از پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری که قبلا در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد تولید شده استفاده گردید. این پپتید به صورت نوترکیب در سلول های HEK-۲۹۳ بیان شده بود که پس از بیان به‌صورت پپتید ترشحی از سلول ها به داخل محیط کشت DMEM ترشح می شود. به علت عدم وجود توالی His-Tag جهت خالص سازی پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری، محیط کشت DMEM (Gibco-آلمان) حاوی این پپتید جهت بررسی اثرات ضد میکروبی مورداستفاده قرار گرفت. غلظت پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری به روش دانسیتومتری مقایسه ای با استفاده از نرم افزار GelQuantNet تخمین زده شد.

باکتری‌های مورداستفاده در این مطالعه

در این مطالعه از باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (PTCC۱۷۶۴) از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC۲۵۹۲۳) از مجموعه کشت باکتریایی آمریکا استفاده شد.

شمارش باکتری

شمارش باکتری به منظور بررسی کمی تعداد باکتری های زنده مانده تحت تأثیر تیمار پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ۱۷۶۴ PTCCو استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳ ATCC انجام شد. ۱۰ فالکون ۱۵ میلی لیتری در نظر گرفته شد. به ۵ فالکون میزان ۵۰۰ میکرولیتر از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و در پنج فالکن دیگر نیز ۵۰۰

میکرولیتر از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با غلظت مشابه ریخته شد. از محیط کشت حاوی پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری با حجم‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌لیتر به ۳ فالکن افزوده شد. یک فالکن فاقد محیط کشت حاوی پپتید نوترکیب به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. به یک فالکون دیگر میزان ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت فاقد پپتید نوترکیب به عنوان شاهد منفی اضافه گردید. در انتها همه فالکون‌ها به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

سپس رقت های ۱/۱۰۰۰۰ از هر فالکون ایجاد شد و به میزان ۵۰ میکرولیتر از آن بر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار تلقیح گردید. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. این آزمایش برای هر تیمار با سه تکرار انجام شد (۹).

بررسی اثر اعمال حرارت و لئوفلایز کردن این پپتید بر فعالیت ضدباکتریایی به روش انتشار از دیسک

برای انجام این آزمایش از محیط کشت مولر هینتون آگار (QUELAB-کانادا) استفاده شد. از دستگاه اسپکتوفتومتر (Bimetra، آلمان) برای سنجش میزان کدورت باکتری استفاده گردید. برای کنترل مثبت از دیسک آماده‌ی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (پادتن طب-ایران) و برای کنترل منفی نیز از محیط کشت DMEM فاقد این پپتید استفاده شد. برای بررسی اثر حرارت بر میزان فعالیت این پپتید میزان ۴۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی پپتید نوترکیب شتری در مدت‌زمان‌های ۱۰، ۴۰، ۷۰، ۱۰۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و فعالیت ضد باکتریایی آن مورد بررسی قرار گرفت.

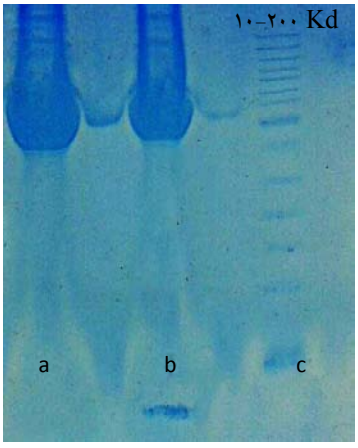
همچنین اثر لئوفلایز کردن بر فعالیت این پپتید نیز مورد آزمایش قرار گرفت. در این مرحله محیط کشت DMEM حاوی پپتید نوترکیب شتری توسط دستگاه لئوفلایزر (Vacuubrand-آلمان) پودر شد. سپس به میزان ده برابر وزن آن با آب دوبار تقطیرشده مخلوط گردید و به دیسک‌ها تزریق شد.

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و نتایج با استفاده از رویه GLM و آزمون مقایسه میانگین دانکن (نرم افزار SAS نسخه ۹) آنالیز شدند.

نتایج و بحث

وجود پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری در محیط کشت DMEM

پپتید نوترکیب تولیدی پس از رنگ آمیزی با کوماسی بلو بر روی ژل آکریل آمید به صورت باند ۴ Kd مشاهده شد که نشان از این داشت که پپتید مورد نظر به درستی بیان شده ا ست. باندهای بالایی آن نیز مربوط به پروتئین‌های دیگر موجود در محیط کشت DMEM از جمله FBS می باشند، که نشان از عدم خلوص پپتید مورد مطالعه دارد (شکل ۱). با استفاده از نرم افزار GelQuantNet میزان غلظت ۰/۳ میکروگرم در میلی لیتر تخمین زده شد.



شکل ۱. SDS-PAGE پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری A: شاهد منفی B: پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری C: مارکر

شمارش باکتری

نتایج شمارش کلونی های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از اعمال مقادیر مختلف از پپتید لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین و تیمار شاهد مثبت و منفی اختلاف معنی داری را نشان داد($p < ۰/۰۰۰۱$) (شکل ۲)، ولی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین* پس از اعمال این پپتید نوترکیب در شمار کلونی ها اختلاف معنی داری مشاهده نشد (شکل ۳). مقایسه‌ی میانگین با استفاده از رویه دانکن بر روی تعداد کلونی‌های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد با افزایش میزان حجم از محیط حاوی پپتید تعداد کلونی‌های باکتری کاهش، درنتیجه قدرت آنتی باکتریایی افزایش می‌یابد. همچنین نتایج نشان داد که این مقادیر از پپتید نوترکیب شتری بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین بی‌تاثیر است. این باکتری اغلب به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج مثل اکسی سیلین، پنی‌سیلین و آموکسی سیلین و... مقاومت نشان می‌دهد (۳). محققان در مطالعات مختلف اثر لاکتوفرین را بر روی گونه‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک بررسی کردند و اثر ضد باکتریایی مشاهده کردند (۱۲، ۲۶). همچنین محققین در سال ۲۰۱۰ اثر کایمر گاوی را بر روی باکتری MRSA بررسی کردند و فعالیت ضدباکتریایی مشاهده کردند. این محققین نشان دادند که کایمر گاوی موجب ایجاد اختلال در غشا باکتری و لیز شدن آن شده است (۱۵). از جمله دلایل متفاوت بودن نتایج آزمایش در این مطالعه با محققین دیگر می توان به موارد زیر اشاره کرد: ۱- این باکتری به علت مقاومت بالا برای کشندگی احتمالاً احتیاج به غلظت‌های بالاتری از این پپتید نوترکیب دارد. ۲- عدم خالص بودن پپتید نوترکیب تولیدی و وجود مواد مغذی محیط کشت DMEM این پپتید. ۳- با توجه به اثر لاکتوفرین و پپتیدهای آن بر بهبود سیستم ایمنی، ممکن است این پپتید در شرایط تجربی موجب کشندگی این باکتری شود.

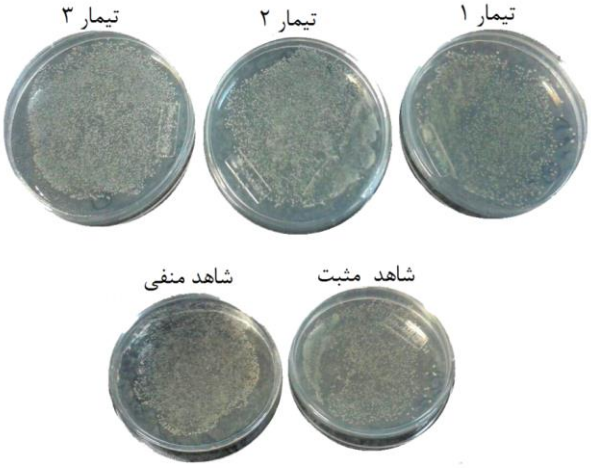
نتایج شمارش باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در رقت ۱/۱۰۰۰۰ به‌صورت زیر می‌باشد (جدول ۱):

جدول ۱. تعداد کلونی‌های حاصل از کشت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ تحت تیمارهای پپتید نوترکیب شتری

تیمار	تعداد کلونی (میانگین سه پلیت)	SEM	P
۱	^{b}۵۴		
۲	^{c}۱۰		<۰/۰۰۰۱
۳	^{d}۰	۰/۸۴	
شاهد مثبت	^{a}>۱۰۰۰		
شاهد منفی	^{a}>۱۰۰۰		

شکل۲. شمارش کلونی از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳

تیمارهای ۱، ۲، ۳ به ترتیب کشت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تحت تیمار ۱، ۲، ۳ میلی لیتر از محیط کشت حاوی پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری بر روی محیط کشت نوتریئنت آگار است. شاهد منفی شامل ۳ میلی لیتر از محیط کشت فاقد پپتید نوترکیب و شاهد مثبت فاقد محیط کشت حاوی پپتید نوترکیب است.



شکل۳. شمارش کلونی از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین PTCC ۱۷۶۴

تیمارهای ۱، ۲، ۳ به ترتیب کشت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین تحت تیمار ۱، ۲، ۳ میلی لیتر از محیط کشت حاوی پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری بر روی محیط کشت نوتریئنت آگار است. شاهد منفی شامل ۳ میلی لیتر از محیط کشت فاقد پپتید نوترکیب و شاهد مثبت فاقد محیط کشت حاوی پپتید نوترکیب است.

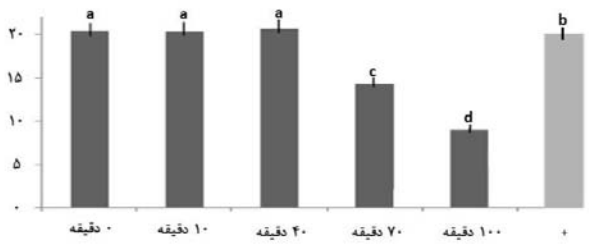
اثر حرارت و لئوفلایز کردن پپتید بر فعالیت ضد باکتریایی

آنالیز قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری با نرم افزار SAS نشان از عدم تفاوت معنی‌دار اثر حرارت بر فعالیت این پپتید تا مدت‌زمان ۴۰ دقیقه نسبت به تیمار بدون حرارت داشت. اما در مدت‌زمان‌های ۷۰ و ۱۰۰ دقیقه کاهش معنی‌داری در فعالیت ضد باکتریایی این پپتید مشاهده شد ($p < ۰/۰۰۰۱$) (شکل ۴).

A

قطر هاله ی عدم رشد باکتری (میلی متر)

B



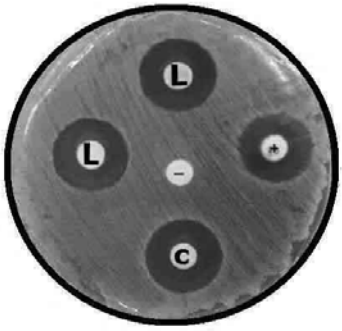
مدت زمان انکوباسیون در ۱۰۰ درجه سانتی گراد

شکل۴. آزمایش سنجش مقاومت حرارتی A: فعالیت ضد باکتریایی بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳. دیسک ها شامل ۴۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی پپتید لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری تحت حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد در مدت زمان های ۱۰۰،۷۰،۴۰،۱۰،۰ دقیقه هستند. همچنین دیسک آماده ی جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت (+) و میزان ۴۰ میکرولیتر از محیط کشت فاقد پپتید نوترکیب شتری به عنوان کنترل منفی (-) مورد استفاده قرار گرفت. B: قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری. قطر هاله ها بر اساس میلی‌متر می باشد و نتیجه به صورت میانگین± خطای میانگین گزارش شد.

فرآیندهای حرارتی معمولاً برای استریل کردن، پاستوریزاسیون و... استفاده می‌شوند که مقاومت بالای لاکتوفرین ازجمله مزایای آن محسوب می گردد (۲۸). پایداری حرارتی لاکتوفرین در گونه‌های مختلف گزارش شده است (۴، ۱۰، ۲۳، ۲۴، ۲۵).

اسردهارا و همکاران (۲۰۱۰) اثر حرارت بر روی لاکتوفرین گاو و بز را مقایسه کردند و نشان دادند که لاکتوفرین بز مقاومت حرارتی کمتری را نسبت به لاکتوفرین گاو دارد. پیوند غیرکووالانسی بین لوب N و C بستگی به موقعیت آمینواسیدهای مختلف داخل توالی لاکتوفرین دارد؛ که این فاکتور بر مقاومت حرارتی و ساختار لاکتوفرین مؤثر است (۳۱). در مطالعه‌ی دیگری اثر مقاومت به حرارت بر روی لاکتوفرین گوسفند، بز، انسان، شتر و فیل انجام شد و مشاهده شد که اشکال اشباع‌شده از آهن لاکتوفرین نسبت به شکل بومی مقاومت حرارتی بیشتری را نشان می‌دهد و لاکتوفرین انسانی بیشترین مقاومت را نسبت به حرارت نشان داد که این نشان‌دهنده‌ی اختلاف ظریف میان ساختمان لاکتوفرین‌های گونه‌های مختلف است (۱۰). همچنین واکنش‌های هیدروفوبیک و یونی در مقاومت پروتئین مؤثر هستند (۱۶). لاکتوفرین یک پروتئین گلیکولیزه است که موقعیت و تعداد جایگاه‌های بالقوه گلیکولیزاسیون آن میان گونه‌های مختلف متفاوت است. پایداری حرارتی تحت تأثیر گلیکان‌های موجود قرار می‌گیرد (۳۰، ۳۴). برخی از محققین گزارش کردند احتمالاً مقاومت حرارتی لاکتوفرین ناشی از متراکم شدن به‌وسیله‌ی باند دی سولفیدی بین‌مولکولی است (۸).

تانگ و همکاران در سال ۲۰۱۲ پپتید لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین گاوی را در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد مورد بررسی قرار دادند. نتیجه نشان داد این پپتید تا مدت‌زمان ۱۸۰ دقیقه از خود مقاومت نشان داده است (۳۲) که با نتیجه‌ی حاصل از این مطالعه تفاوت داشت که این امر را می‌توان به این دلایل نسبت داد: ۱. متفاوت بودن توالی DNA پپتید مورد استفاده در این مطالعه ۲. حضور پروتئین‌ها و مواد دیگر در محیط کشت DMEM ۳. عدم وجود باند دی سولفیدی ۴. عدم وجود جایگاه‌های گلیکولیزاسیون. همچنین نتایج نشان داد که لئوفلایز کردن این پپتید و محلول کردن مجدد آن با آب مقطر، فعالیت ضدباکتریایی آن را از بین نبرده است و این پپتید به این شرایط نیز مقاومت دارد (شکل ۵). روش لئوفلایز کردن برای اولین بار در سال ۱۹۰۶ توسط دی آرسونوال و همکارش بورداس در آزمایشگاه بیوفیزیک در فرانسه انجام شد. این روش در طول جنگ جهانی دوم گسترش پیدا کرد و برای طیف گسترده‌ای از محصولات کاربرد دارد. ازجمله این محصولات می‌توان به مواد غذایی، مواد دارویی و... اشاره کرد. این روش به‌عنوان یک روش تجاری و کم هزینه است که برای افزایش ماندگاری و پایداری پپتیدهای داروها حائز اهمیت است (۲۷).



شکل۵. اثر لئوفلایز کردن پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری بر فعالیت ضدباکتریایی آن بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳

C: تیمار لئوفلایز نشده L: تیمار لئوفلایز شده +: شاهد مثبت (دیسک آنتی بیوتیک جنتامایسین)

نتیجه گیری

با توجه به اثرات مخرب بیماری ورم پستان بر سلامت انسان از طریق امکان انتقال سویه‌های باکتریایی مقاوم شده به آنتی‌بیوتیک از دام به انسان؛ جایگزین کردن آنتی‌بیوتیک‌ها با ترکیباتی که اثرات جانبی ندارند حائز اهمیت است. با توجه به پتانسیل پپتیدهای طبیعی و خواص ضد باکتریایی آن‌ها علیه باکتری‌ها می‌توان در آینده آن‌ها را به‌عنوان کاندیدای مناسب برای جایگزینی یا مکمل با آنتی‌بیوتیک‌ها پیشنهاد داد. این پژوهش اولین مطالعه در رابطه با بررسی فعالیت ضدباکتریایی پپتید نوترکیب لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین شتری بر روی برخی از باکتری‌های مولد ورم پستان در گاو شیری هلشتاین بود. نتایج این آزمایش فعالیت ضد باکتریایی، همچنین مقاوم بودن به دما و لئوفلایز شدن این پپتید را نشان داد، که در آینده ممکن است در درمان گاو مبتلا به ورم پستان به صورت جایگزین یا مکمل آنتی بیوتیک ها استفاده شود.

منابع

1- Baker, E.N., Baker, H.M., Kidd, R.D. (2002). Lactoferrin and transferrin: Functional variations on a common structural framework. *Journal of Biochemistry and Cell Biology,* **80**: 27-34.

2- Barkema, H.W., Green, M.J., Bradley, A.J., Zadoks, R.N. (2009). Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of Dairy Science,* **92**: 4717-4729.

3- Bartlett, J.G. (2008). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. *Journal of Topics in Antiviral Medicine*, **16**:151-155.

4- Bezwoda, W.R., Mansoor, N. (1989). Lactoferrin from human breast milk and from neutrophil granulocytes. Comparative studies of isolation, quantitation, characterization and iron binding properties. *Journal of Biomedical Chromatography*, **3**:121-126.

5- Bolourchi, M., Mokhber, D.M.R., Kasravi, R., Moghimi, E.A., Hovareshti, P. (2008). An estimation of national average of milk somatic cell count and production losses due to subclinical mastitis in commercial dairy herds in Iran. *Journal of Veterinary Research,* **63**:263-266.

6- Bolscher, J.G., Adao, R., Nazmi, K., van den Keybus, P.A., van 't Hof, W., Nieuw Amerongen, A.V., Bastos, M., Veerman, E.C. (2009). Bactericidal activity of Lfchimera is stronger and less sensitive to ionic strength than its constituent lactoferricin and lactoferrampin peptides. *Journal of Biochimie,* **91**:123-132.

7- Bradley, A. J. (2002). Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal,* **164**:116-128.

8- Brisson, G., Britten, M., Pouliot, Y. 2007. Heat-induced aggregation of bovine lactoferrin at neutral pH: Effect of iron saturation. *Journal of International Dairy*, **17**: 617-624.

9- Chirag, s., Yagnik, B.N. (2014). Determination of Thermal Sensitivity of

Staphylococcus aureus isolate CHK3. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, **2**:887-890.

10- Conesa, C., Sanchez, L., Rota, C., Perez, M., Calvo, M., Farnaud, S., Evans, R.W. (2008). Isolation of lactoferrin from milk of different species: calorimetric and antimicrobial studies. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. *Journal of Biochemistr and Molecular Biology*, **150**:131-139.

11- Deleo, F.R., Chambers, H.F. (2009). Chambers. Reemergence of antibiotic-resistant Staphylococcus aureus in the genomics era. *Journal of Clinical Investigation,* **119**: 2464-2474.

12- Diarra, M.S., Petitclerc, D., Lacasse, P., (2002). Effect of lactoferrin in combination with penicillin on the morphology and the physiology of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science,* **85**:1141-1149.

13- Ereifej, K.I., Alu'datt, M.H., AlKhalidy, H.A., Alli, I., Rababah, T. (2011). Comparison and Characterization of Fat and Protein Composition for Camel Milk from Eight Jordanian Locations. *Journal of Food Chemistry,* **127**: 282-289.

14- Fisher, J.F., Meroueh, S.O., Mobashery, Sh. (2005). Bacterial Resistance to B-Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunit. *Journal of Chemical Reviews,* **105**:395-424.

15- Flores-Villasenor, H., Canizalez-Roman, A., Reyes-Lopez, M., Nazmi, K., de la Garza, M., Zazueta Beltran, J., Leon-Sicairos, N., Bolscher, J.G. (2010). Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Journal of Biometals,* **23**:569-578.

16- Grimsley, G.R., Shaw, K.L., Fee, L.R., Alston, R.W., Huyghues-Despointes, B.M.P., Thurlkill, R.L. (1999). Increasing protein stability by altering long-range coulombic interactions. *Journal of Protein Science*, **8**:1843-1849.

17- Guler, L., Ok, U., Gunduz, K., Gulcu, Y., Hadimli, H. H. (2005). Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *Journal of Dairy Science,* **88**:3149-3154.

18- Kalmus, P., Aasmae, B., Karssin, A., Orro, T., Kask, K. (2011). Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Journal of Acta Veterinaria Scandinavica,* **53**:4.

19- Keith, B., Holten, M.D., Edward, M., onusko, M.D. (2000). Appropriate Prescribing of Oral Beta Lactam Antibiotics. University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio. *Journal of American Academy of Family Physicians,* **62**:611-620.

20- Khan, J.A, Kumar, P., Paramasivam, M., Yadav, R.S., Sahani, M.S., Sharma, S., Srinivasan, A., Singh, T.P. (2001). Camel Lactoferrin, a Transferrin-cum-Lactoferrin: Crystal Structure of Camel Apolactoferrin at 2.6 A Resolution and Structural Basis of its Dual Role. *Journal of Molecular Biology,* **309**: 751-761.

21- Liu, Y., luo, J., xu, C., ren, F., peng, C., wu, G., zhao, J. (2000). Purification, characterization, and molecular cloning of the gene of a seed-specific antimicrobial protein from pokeweed. *Journal of Plant Physiology,* **122**:1015-1024.

22- Marshall, S.H., Arenas, G. (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*, **6**.

23- Mata, L., Sanchez, L., Headon, D. R., Calvo, M. (1998). Thermal denaturation of human lactoferrin and its effect on the ability to bind iron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 3964-3970.

24- Nam, M. S., Shimazaki, K., Kumura, H., Lee, K. K., & Yu, D. Y. (1999). Characterization of Korean native goat lactoferrin. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology B*, **123**:201-208.

25- Paulsson, M.A., Svensson, U., Kishore, A.R., Naidu, A.S. (1993). Thermal behavior of bovine lactoferrin in water and its relation to bacterial interaction and antibacterial activity. *Journal of Dairy Science*, **76**:3711-3720.

26- Redwan, E.M., El-Baky, N.A., Al-Hejin, A.M., Baeshen, M.N., Almehdar, H.A., Elsaway, A., Gomaa, A.B., Al-Masaudi,

S.B., Al-Fassi, F.A., AbuZeid, I.E., Uversky, V.N. (2016). Significant antibacterial activity and synergistic effects of camel lactoferrin with antibiotics against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Journal of Research Microbiology*, **167**:480-91.

27- Roy, I., Gupta, M.N.(2004). Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Journal of Biotechnology and Applied Biochemistry*, **39**:165–177.

28- Saito, H., Takase, M., Tamura, Y., Shimamura, S., Tomita, M. (1994). Physicochemical and antibacterial properties of lactoferrin and its hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. *Journal of Advances in Experimental Medicine and Biology*, **357**:219-26.

29- Sinha, M., Kaushik, S., Kaur, P., Sharma, S., Singh, T.P. (2013). Antimicrobial Lactoferrin Peptides: The Hidden Players in the Protective Function of a Multifunctional Protein. *International Journal of Peptides,* 2013.

30- Spik, G., Coddeville, B., Montreuil, J. (1988). Comparative study of the primary structures of sero lacto-and ovotransferrin glycans from different species. *Journal of Biochimie*, **70**:1459-1469.

31- Sreedhara, A., Flengsrud, R., Prakash, V., Krowarsch, D., Langsrud, T., Kaul, P., Devold T.G., Vegarud, G. E. (2010). A comparison of effects of pH on the thermal stability and conformation of caprine and bovine lactoferrin. *International Dairy Journal*, **20**:487-494

32- Tang, X.S., Tang, Z.R., Wang, S.P., Feng, Z.M., Zhou, D., Li, T.J., Yin, Y.L. (2012). Expression, Purification, and Antibacterial Activity of Bovine Lactoferrampin–Lactoferricin in Pichia pastoris. *Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology,* **166**:640-651.

33- Taponen, S., Pyorala, S. (2008). Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis – not so different from Staphylococcus aureus. *Journal of Veterinary Microbiology,* **16**:29-36.

34- Van Berkel, P.H.C., van Veen, H.A., Geerts, M.E.J., de Boer, H.A., Nuijens, J.H. (1996). Heterogeneity in utilization of N-glycosylation sites Asn624 and Asn138 in human lactoferrin: a study with glycosylation-site mutants. *Biochemical Journal*, **319**:117-122.

35- Van der Kraan, M.I.A., Groenink, J., Nazmi, K., Veerman, E.C.I., Bolscher, J.G.M., Nieuw Amerongen, A.V. (2004). Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N_1-domain of bovine lactoferrin. *Journal of Peptides,* **25**: 177-183.

36- Vizioli, J., Salzet, M. (2003). Antimicrobial peptides: new weapons to control parasitic infections. *Journal of Trends in Parasitology,* **18**.

37- Zhao, X., Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *Journal of animal Science,* **86**:57-65.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 14, Issue 2, 2018

Evaluation of antibacterial properties of camel lactoferrampin-lactoferricin recombinant peptide on the growth rate of *Staphylococcus aureus* bacteria causes of mastitis in Holstein dairy cows

Mousavi, S.Z.[1], Tahmoorespoor, M.[2]*, Sekhavati, M.H.[2], Javadmanesh, A.[2]

1- M.Sc. student of Animal Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Professor of Animal Breeding, department of Animal Science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3- Assistant Professor of Animal Breeding, department of Animal Science, Faculty of agriculture, , Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 21 April2017 Accepted: 17 April2018

Abstract

The aim of this study was to investigate the antibacterial effect of the recombinant camel Lactoferrampin-Lactoferricin on the growth rate of Staphylococcus aureus bacteria, one of the causes of mastitis in dairy cows. This peptide, which was prepared through a previous study in Biotechnology Laboratory of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad .Antibacterial effects of this peptide was assessed by Count Colonies on Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (PTCC 1764)and Staphylococcus aureus (ATCC 25923). Heat resistance properties and freeze drying process of the peptide were evaluated by disk diffusion method in triplicate. The results showed that this recombinant peptide had an antibacterial effect on Staphylococcus aureus (p<0/0001), but had no effect on methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Heat resistant of the recombinant peptide also showed that 100 °C temperature for 40 minutes had no significant effect on the anti-bacterial properties of this protein (p<0/0001). This protein showed no loss of activity after freeze drying process. The results obtained from this study proved the stable activity of natural peptides as well as antibacterial properties. This recombinant peptide can be used as an alternative to antibiotics or a therapeutic supplement to cure mastitis in dairy cows.

Keywords: Camel, Lactoferrampin-Lactoferricin, Lyophilizing, Mastitis, Recombinant peptide, Staphylococcus aureus

**Corresponding author: Tahmoorespoor, M.*
Address: Department of Animal Science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashahd, Iran.
E-mail address: Thmoores@um.ac.ir