گیاه و زیست فناوری ایران
Iranian Journal of Plant & Biotechnology (IJPB)

مقاله پژوهشی

بررسی بیوانفورماتیکی پپتید بتا دفنسین گیاهی و همسانه‌سازی ژن کد کننده‌ی این پپتید در وکتور بیانی pAMJ1653 در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس

فاطمه آخوندی‌توتی[۱]، محمدهادی سخاوتی (نویسنده مسئول)[۲*] و مجتبی طهمورث‌پور[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، tfakhondi@gmail.com

۲*- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، hadisekhavati@gmail.com

۳- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، thmoores@um.ac.ir

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۲

Bioinformatic investigation of plant beta-defensin peptide and cloning of this peptide with pAMJ1653 vector in *Lactococcus lactis*

Fatemeh Akhondi Ghasheh Tuoti[1], Mohammad Hadi Sakhawai (Corresponding author)[2*] and Mojtabi Tahmorthpour [3]

1- M.Sc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi Mashhad University, Mashhad, Iran, tfakhondi@gmail.com

2*- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi Mashhad University, Mashhad, Iran, hadisekhavati@gmail.com

3- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi Mashhad University, Mashhad, Iran, thmoores@um.ac.ir

Received: May 2023 Accepted: October 2023

Abstract

Frequent and excessive use of antibiotics has caused the resistance of pathogenic bacteria to common antibiotics. Considering this issue, researchers are looking for new methods to replace antibiotics, which can be referred to as antimicrobial peptides (AMP). Therefore, the aim of the present study was bioinformatic investigation of the effect of his taq addition on the antibacterial activity of plant beta-defensin peptide and clone this peptide gene in the expression vector pAMJ1653 in *Lactococcus lactis* bacteria. The third structure of beta defensin peptide with his-taq was predicted through I-TASSER and verified by SAVE 6 and prosA software. Finally, molecular docking was performed through Cluspro software between beta defensin with /without his-taq sequence and Escherichia coli LPTD antigen. In the exprimental section, beta defensin gene was used along with his-taq sequence and secretion signal in pGEM-DFF replication vector and DH5α replication host. After plasmid extraction and enzymatic digestion by Sap1 and Sal1 enzymes, plant beta defensin gene was homogenized into pAMJ1653 expression vector and transferred into Lactococcus lactis strain 1543 bacteria using electroporation method. The positive colonies containing the recombinant vector were checked by PCR colony method and finally enzymatic digestion was performed. In the bioinformatics part, the third structure of beta defensin was predicted with acceptable accuracy. Docking results showed that beta defensin peptide with/without his-taq is in contact with LPTD antigen in the right position. In the laboratory section, it was shown that the gene encoding plant beta-defensin was successfully cloned in the pAMJ1653 expression vector.

Key word: Anti-microbial peptides, Gene cloning, *Lactococcus lactis*, Molecular docking, Plant β-defensin

Iranian Journal of Plant & Biotechnology
autumn2023, Vol 18, No 3, Pp 14-26

چکیده

استفاده مکرر و بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها موجب مقاومت باکتری‌های بیماریزا نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌های رایج گردیده است. با توجه به این مسئله، محققان به دنبال روش‌های جدیدی برای جایگزین کردن آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند که می‌توان به پپتید-های ضدمیکروبی (AMP) اشاره کرد. لذا، هدف از مطالعه حاضر بررسی بیوانفورماتیکی اثر افزودن his taq بر فعالیت ضدباکتریایی پپتید بتادفنسین گیاهی و همسانه‌سازی ژن کدکننده آن در ناقل بیانی pAMJ1653 در باکتری لاکتوکوکوس-لاکتیس است. ساختار سوم پپتید بتادفنسین همراه با his-taq از طریق I-TASSER پیش‌بینی شد و توسط نرم افزارهای SAVE 6 و prosA صحت سنجی گردید. در نهایت داکینگ مولکولی از طریق نرم افزار Cluspro بین بتا دفنسین با و بدون توالی his-taq با آنتی‌ژن LPTD باکتری اشرشیاکلای انجام شد. در بخش آزمایشگاهی، ژن بتادفنسین همراه با توالی his-taq و سیگنال ترشحی در ناقل تکثیری pGEM-DFF و میزبان تکثیری DH5α مورد استفاده قرار گرفت. پس از استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Sap1* و ***Sal1*** ژن بتادفنسین گیاهی به داخل ناقل **بیانی** pAMJ1653 همسانه‌سازی گردید و با استفاده از روش الکتروپویشن به داخل باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس سویه ۱۵۴۳ انتقال یافت. کلونی‌های مثبت حاوی ناقل نوترکیب با روش کلونی PCR بررسی و در نهایت هضم آنزیمی صورت گرفت. در بخش بیوانفورماتیک، ساختار سوم ساختار با صحت قابل قبولی پیش‌بینی شد. نتایج داکینگ نشان داد پپتید بتادفنسین با و بدون his-taq به آنتی‌ژن LPTD در موقعیت مناسب در تماس است. در بخش آزمایشگاهی نشان داده شد که ژن کد کننده بتا دفنسین گیاهی با موفقیت در ناقل بیانی pAMJ1653 همسانه‌سازی شد.

کلمات کلیدی: بتا دفنسین گیاهی، پپتیدهای ضدمیکروبی، داکینگ مولکولی، لاکتوکوکوس لاکتیس، همسانه‌سازی ژن

فصلنامه گیاه و زیست فناوری ایران

سال ۱۴۰۲، دوره ۱۸، شماره ۳، صص ۲۶ -۱۴

بررسی بیوانفورماتیکی پپتید بتا دفنسین گیاهی و همسانه‌سازی ژن کد کننده‌ی این پپتید در وکتور بیانی pAMJ1653 در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس۱۵

مقدمه و کلیات

پپتیدهای ضدمیکروبی (AMPs) به عنوان ترکیبات زیستی ایمن، به طور طبیعی توسط جانوران، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و به طور مستقیم و یا با ایجاد ایمنی ذاتی در بدن موجود زنده از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند. AMPs می‌توانند به عنوان جایگزینی مناسب، برای مقابله با باکتری ها از جمله باکتری‌هایی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند؛ مد نظر قرار گیرند (Mahlapuu *et al.*, ; Hancock *et al.*, 2006 2016). پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی (PAMPs) به دلیل وجود بقایای سیستئین، متفاوت از سایر پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) هستند و پل‌های دی‌سولفیدی متعددی را تشکیل می‌دهند (Olga *et al.*, 2020). PAMPها بخشی از مکانیسم‌های دفاعی گیاهان هستند که از ریشه‌ها، برگ‌ها، گل‌ها، ساقه‌ها و دانه‌های گونه‌های مختلف جدا شده‌اند (Magana *et al.*, 2020). PAMPها دارای چندین ویژگی (وزن مولکولی، بار مثبت و آمفی پاتیک) مشابه سایر پپتیدهای حشرات، میکروب‌ها و حیوانات هستند. این ویژگی‌ها به نقش‌های دفاعی آن‌ها مربوط می‌شود (Wang *et al.*, 2020). با این حال، PAMPها دارای ویژگی‌های منحصر به فرد خاصی هستند، از جمله وزن مولکولی بین ۲-٦ کیلودالتون با دو یا شش پیوند دی‌سولفید درون مولکولی. در بیشتر PAMPها تنوع خانواده بر اساس وجود یا عدم وجود موتیف سیستئین، شباهت توالی و ساختار ثانویه و سوم حفاظت شده طبقه بندی شده است. پتانسیل‌های بیوتکنولوژیکی PAMPها منبع جدیدی برای کشف دارو برای درمان عفونت‌ها فراهم کرده است (Magana *et al.*, 2020). دفنسین‌های گیاهی پپتیدهای بسیار پایدار و غنی از سیستئین بوده که شامل ٤-٤٥ اسید آمینه می‌باشند؛ که بخشی از سیستم ایمنی گیاه را تشکیل می‌دهند و قادرند فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی نشان دهند. این پپتیدها یک ساختار سه بعدی حفظ شده حاوی α-مارپیچ و ورقه‌های β سه رشته‌ای را نشان می‌دهند که از طریق پیوندهای دی سولفید در یک ساختار فشرده تثبیت شده است. این ساختار شبیه پپتیدهای دفاعی در حشرات و پستانداران است و منشا مشترکی را نشان می‌دهد. علاوه بر این، به نظر می رسد تنها یک کلاس، یعنی دفنسین‌ها، بین بی مهرگان، گیاهان و مهره داران حفظ شده است (Magana *et al.*, 2020). امروزه مشخص شده است که این پپتید نقش قابل توجهی در سیستم ایمنی ذاتی گیاهان دارد. گیاهانی که دفنسین‌ها را بیان می‌کنند در برابر حملات میکروبی بسیار مقاوم هستند و رشد و نمو بیشتری نشان می‌دهند. این پپتیدها که در برابر انواع پاتوژن‌ها فعال هستند، کاربرد بالقوه‌ای در درمان، داروها و همچنین کشاورزی دارند. برخی از دفنسین‌ها می‌توانند میکروارگانیسم‌ها را در ۱۵ تا ۹۰ دقیقه با اثرات مخرب خود بر روی غشای سیتوپلاسمی از بین ببرند. مولکول‌های دفنسین از نظر شیمیایی به علت داشتن ساختار فشرده در برابر دماهای شدید و تخریب پروتئازها مقاوم هستند (Rodríguez-Decuadro *et al.*, 2012). ژن‌های

دفنسین‌گیاهی با قرار گرفتن در شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی در همه‌ی بافت‌ها یا اندام‌های خاص بیان و تنظیم می‌شوند (Noonan *et al.*, 2017; Parisi *et al.*, 2019)، بنابراین این امکان وجود دارد که بتوان پپتیدهای دسته دفینسین را به صورت پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس زیاد تولید کرد و با اهداف مختلف مورد استفاده قرارداد (Rodríguez-Decuadro *et al.*, 2019). یکی از روش‌های تولید پپتیدهای ضدمیکروبی، تولید آن‌ها در میزبان‌های باکتریایی می‌باشد. باکتری‌ها با داشتن متابولسیم ساده‌تر می‌تواند، سطح تولید بالاتری از محصول مورد نظر را به عنوان میزبان داشته باشند (Ingham *et al.*, 2015). مطالعات اخیر در ارتباط با باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* نشان داده است که به – دلیل عاری بودن این دسته از باکتری ها از آندوتوکسن‌ها و داشتن یک سیستم بیانی قابل القاء به وسیله تغییرات pH و عدم وجود ژن مقاومت به آنتی بیوتیک، این سیستم باکتریایی می‌تواند به عنوان یک سیستم بیانی کارا در تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار بگیرد. ناقل بیانی pAMJ1653 یک ناقل بیانی خاص *لاکتوکوکوس لاکتیس* است، که جزء ناقلهای القاء شونده در pH پایین می‌باشد. در این سیستم تولید اسید لاکتیک در محیط کشت به وسیله باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* باعث کاهش pH محیط شده و متعاقبا باعث فعال شدن پروموتور حساس به کاهش pH در ناقل pAMJ1653 خواهد شد. سیستم بیان p170 یکی از سیستم‌های بیانی مورد استفاده برای تولید پروتئین نوترکیب در *لاکتوکوکوس لاکتیس* می‌باشد. در این سیستم بیانی از پروموتر القایی p170 استفاده می‌شود (Jørgensen *et al.*, 2014) که با تجمع لاکتات در محیط رشد تنظیم می‌شود. استفاده از توالی his-taq یکی از امکاناتی است که جهت خالص سازی پپتید مورد نظر استفاده می شود که عدم ایجاد تغییر در فعالیت پپتید توسط این توالی یکی از نکات بسیار قابل توجه توسط محققین می باشد. امروزه استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک نظیر پیش بینی ساختار سوم پپتید و داکینگ مولکولی جهت بررسی این موضوع بسیار مورد توجه محققین قرارگرفته است. از اواخر قرن ۲۰، روش های مختلفی جهت پیش بینی ساختار سوم پروتئین ابداع شدند. این روش ها نسبت به کریستالوگرافی X-ray و طیف‌سنجی NMR، نیازمند صرف زمان و نیروی انسانی کمتری در مطالعات دارای محدودیت می باشند. از جمله سروهای مناسب جهت پیش بینی ساختارها می توان به I-tasser اشاره کرد (Mousavi *et al.*, 2020). امروز با پیشرفت علم و پیدایش روش‌های بیوانفورماتیک نظیر داکینگ مولکولی به‌منظور پیش‌بینی برهم‌کنش بین دو مولکول با استفاده از ساختار و فعل و انفعالات الکترواستاتیک، شرایط لازم جهت سرعت بخشیدن به فرآیند تولید دارو را فراهم کرده است. اخیرا، بیش از ٦٠ نرم‌افزار و نرم افزارهای آنلاین متعددی نظیر Hdock, ClusPro, Auto dock و سایر برای انجام داکینگ ایجادشده است که پیش‌بینی برهم‌کنش دو مولکول را در شرایط استاتیک مورد بررسی قرار می‌دهند (Mousavi *et al.*, 2020). باکتری‌های گرم منفی نظیر *اشرشیاکلای* در غشای بیرونی خود دارای ترکیبات لیپوپلی‌ساکاریدی مهمی

هستند که از بیرونی‌ترین آن‌ها می‌توان به پروتئین های سطحی LptD اشاره کرد. مطالعات بیوانفورماتیکی متعددی برای بررسی اثر پپتیدهای ضدمیکروبی در فعالیت این قبیل پروتئین‌ها صورت گرفته است (Mousavi *et al.*, 2020). لذا؛ هدف از این تحقیق پیش بینی ساختار سوم پپتید بتا دفسین همراه با توالی his-taq و مقایسه ی عملکرد آن با بتا دفسین فاقد توالی his-taq با پروتئین سطحی LptDباکتری اشرشیاکلای از طریق فرآیند داکینگ مولکولی می باشد. سپس همسانه‌سازی ژن کد کننده دفنسین گیاهی با توالی his-taq در داخل ناقل بیانی pAMJ1653 در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* با هدف بیان این پپتید ضدمیکروبی در برنامه‌های آتی صورت پذیرفت.

فرآیند پژوهش

بخش بیوانفورماتیک

مدل‌سازی و ارزیابی ساختار سوم پپتید بتا دفنسین: ساختار کریستالوگرافی پپتید بتادفنسین بدون توالی his-taq از سایت پروتئین دیتا بانک (RCSB) با شماره دسترسی 4uj0.1 تهیه شد. سپس به منظور پیش بینی ساختار سوم این پپتید همراه با توالی his-taq، ابتدا توالی اسیدآمینه‌ای پپتید بتادفنسین از سایت مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI) با شماره دسترسی AGC82207 به دست آمد. سپس پس از افزودن ٦ عدد اسیدآمینه ی هیستیدین در انتهای آن به منظور پیش بینی ساختار سوم (سه‌بعدی) این توالی در سایت I-TASSER بارگزاری گردید. جهت ارزیابی نهایی دقت و صحت پیش‌بینی و انتخاب بهترین ساختار سه‌بعدی دارای C-score مناسب، بهترین فایل‌های PDB حاصل از سرور I-TASSER، توسط سرورهای آنلاین SAVES v6.0 و ProSA مورد ارزیابی قرارگرفتند. ساختار سوم پروتئین LptD با کد دسترسی 4rhb از سرور RCSB جهت انجام داکینگ مولکولی تهیه گردید. برهم‌کنش بین آنتی‌ژن سطحی LptD با پپتید بتادفنسین همراه با و بدون توالی his-taq با استفاده از سرور آنلاین ClusPro صورت گرفت به گونه ای که در آن پپتید به عنوان لیگاند و آنتی‌ژن سطحی LptD به‌عنوان رسپتور انتخاب شدند. درنهایت، ساختارهای منتخب بر مبنای کمترین انرژی اتصال و جهت‌یابی صحیح به‌وسیله‌ی نرم‌افزار Pymol که یک نرم‌افزار سودمند جهت رویت پیوندهای هیدروژنی حاصل از داکینگ است، ارزیابی شدند.

بخش آزمایشگاهی

ناقل و میزبان‌های مورد استفاده: توالی کد کننده پپتید بتا دفنسین از مطالعات قبلی (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013) استحصال شد و به منظور بهینه سازی بیان در سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* و سنتز ژن در ناقل pGEM (pGEM-DEF) به شرکت GeneScript کشور چین ارسال گردید. لازم به ذکر است جایگاه برشی دو آنزیم محدودالاثر *SapI* و *SalI* در دو انتهای ۵ و ۳ پریم توالی در نظر گرفته شد. از سویه DH5α جهت تکثیر ناقل pGEM حاوی ژن بتادفنسین استفاده شد. ناقل بیانی pAMJ1653 و

میزبان بیانی *لاکتوکوکوس لاکتیس* سویه ۱۵۴۳ از شرکت بایونیر دانمارک خریداری گردید.

ترانسفورماسیون ناقل pGEM-DEF به سلول های مستعد DH5α: برای انتقال ناقل تکثیری pGEM-DEF به داخل DH5α، سلول‌های مستعد بلافاصله روی یخ قرارگرفتند. سپس ۵ میکرولیتر از ناقل pGEM-DEF (با غلظت ۲۵ ng/ml) به سلول‌های مستعد اضافه و به خوبی پیپت شدند و به مدت ۴۰ دقیقه روی یخ قرارگرفتند. به منظور ایجاد شوک حرارتی، میکروتیوب‌ها ۹۰ ثانیه داخل آب ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس به مدت ۱۰ دقیقه داخل یخ گذاشته شدند و بعد از آن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ ساعت همراه با شیک انکوبه شدند. سوسپانسیون به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ rpm در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. پلت حاصل در محیط کشت LB حل شد و در نهایت بر روی پلیت‌های LB آگار حاوی آمپی‌سیلین اسپریت و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

غربالگری باکتری‌های ترانسفورم شده با ناقل pGEM-DEF به روش کلونی PCR: تک کلونی بر روی محیط جامد LB حاوی آنتی بیوتیک آمپلیسین انتخاب و از آن برای واکنش PCR استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه‌ی مورد نظر از ناقل pGEM-DEF جفت پرایمرهای یونیورسال M13 با توالی‌های زیر بودند. برای انجام واکنش PCR از مسترمیکس شرکت دانمارکی Amplicon استفاده گردید و واکنش با برنامه‌ی زیر اجرا شد (جدول ۱).

M13-F: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3' M13-R: 5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC AC-3'

جدول ۱- برنامه‌ی حرارتی واکنش کلونی PCR برای تکثیر قطعه‌ی مورد نظر در ناقل pGEM-DEF

Table 1- The thermal program of the PCR cloning reaction for the amplification of the desired fragment

مرحله	دما	مدت زمان	سیکل
واسرشت سازی	۹۴ سانتی گراد	۱۰دقیقه	۱
واسرشت سازی	۹۴ سانتی گراد	۳۰ ثانیه	
اتصال	۶۳ سانتی گراد	۳۰ ثانیه	۳۵
تکثیر	۷۲ سانتی گراد	۳۰ ثانیه	
تکثیر نهایی	۷۲ سانتی گراد	۱۰دقیقه	۱

هضم آنزیمی و استخراج ژن از ژل: ناقل تکثیری pGEM-DEF (جهت برش قطعه مورد نظر) و ناقل بیانی pAMJ1653 (جهت خطی شدن برای ورود قطعه‌ی مورد نظر) با آنزیم‌های برشی *SapI* (خریداری شده از شرکت NEB انگلستان) و *SalI* (خریداری شده از شرکت Thermo آمریکا) هضم دو

گانه آنزیمی شدند. استخراج از ژل محصولات هضم، با استفاده از کیت Agarose GEL DNA Extraction شرکت Rosh (Cat#11696505001) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

کلونینگ و همسانه‌سازی ژن کد کننده بتا دفنسین گیاهی در ناقل بیانی pAMJ1653: قطعه کد کننده پپتید بتا دفنسین گیاهی، حاصل از مرحله‌ی استخراج از ژل که هم اکنون دارای دو انتهای چسبنده مکمل است، به داخل ناقل بیانی pAMJ1653 در حضور آنزیم لیگاز بر طبق روش شرکت Rosh آلمان با نسبت مولاری ۱:۳ در دمای ۱۶ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۱۲ساعت منتقل شد.

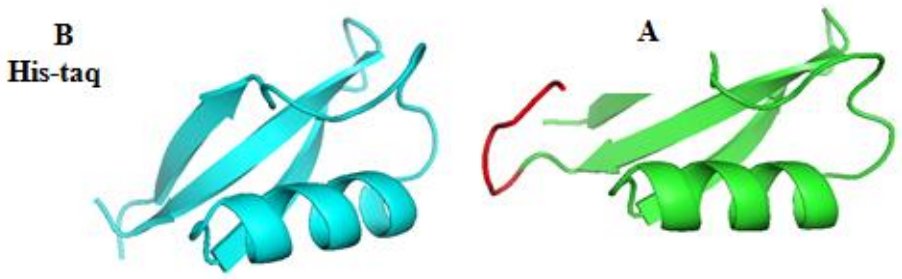
الکتروپوریشن ناقل pAMJ1653 حاوی قطعه‌ی مورد نظر به *لاکتوکوکوس لاکتیس* سویه ۱۵۴۳: ابتدا ۱۰ µl از استوک باکتری و ۲۰ µl از استوک آلانین فیلتر شده در ۲ ml محیط کشت LAPT براث در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و بدون شیک انکوبه شد. پس از گذشت ۱۶ ساعت کشت شبانه مجددا تمامی ۲ ml محیط به ۲۵ ml محیط LAPT براث به اضافه ۲۵۰ µl آلانین به مدت ٤ ساعت بدون شیک کشت داده شد. سپس نمونه‌ها rpm ۱۰۰۰۰سانتریفیوژ شدند و پلت حاصله در ۸ ml محلول لیتیوم استات و DTT با پیپت کردن به طور کامل حل گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس سانتریفیوژ در rpm ۷۰۰۰ و به مدت ۲ دقیقه انجام شد و مایع رویی کاملا جدا گردید. در ادامه شستشوها انجام شد. میزان ۱۰۰ µl از سلول مستعد آماده شده را با ۱۰ µl پلاسمید pAMJ1653 با غلظت ۱۵۰ ng/ml مخلوط کرده به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. مخلوط را داخل کوویت ریخته و تا انجام واکنش الکتروپویشن مخلوط بر روی یخ باقی ماند. با استفاده از دستگاه Bio RedGen Pulser در مدت زمان ۰/۰۰۳ ثانیه با برنامه 25µF:2kv/200Ω الکتروپوریت انجام شد.

غربالگری باکتری‌های ترانسفورم شده با ناقل pAMJ1653: کلونی‌های ظاهر شده بر روی محیط کشت انتخابی مجددا بر اساس روش شرکت Bioneer کشت داده شده و کلونی PCR با آغازگرهای pAMJ-F و pAMJ-R انجام گرفت با برنامه‌ی جدول (۱) صورت گرفت. علاوه بر این، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم های *SalI* و *SapI* بر روی پلاسمیدهای استخراج شده صورت گرفت و محصول بر روی آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

pAMJ-F: TTAACGCTGCCTCCTCTCC
pAMj-R: GCTTTCGCTAAGGATGATTTCT

نتایج و بحث

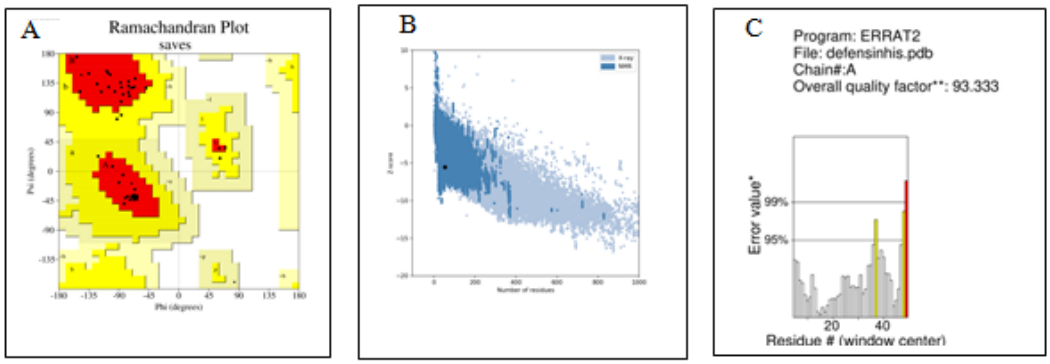
سرور I-TASSER با بهترین میزان C-score برابر با ۰/۳۹ انتخاب شد که نشان از اطمینان از مدل انتخاب شده می باشد (شکل ۱).



شکل ۱- (A) ساختار سوم پپتید بتا دفنسین (کریستالوگرافی) (B) ساختار سوم پپتید بتا دفنسین همراه با توالی his-taq

Fig 1- (A) Tertiary structure of beta-defensin peptide (crystallography) (B) Tertiary structure of beta-defensin peptide with his-taq sequence

صحت پیش‌بینی ساختار سوم پپتید بتا دفنسین حاوی توالی his-taq در چندین مرحله بررسی گردید. بر اساس پلات راماچاندارن گزارش‌شده، حدود ۹۰ درصد اسیدآمینه‌های این ساختار در ناحیه مطلوب، ۱۰ درصد اسیدآمینه‌ها در ناحیه مجاز و صفر اسیدآمینه‌ها در ناحیه غیرمجاز واقع‌شده بودند که نشان از ساختار مطلوب پیش بینی شده است (شکل ۲). مقدار Z-score گزارش شده از سرور ProSA برابر با ۵/۵۵ – می‌باشد و نقطه‌ی مشکی در محدوده ی مجاز در این نمودار واقع شده است (شکل ۲). براساس الگوریتم طراحی سرور ERRAT ضریب کیفیت کلی ساختار پپتید پیش بینی شده در این مطالعه ۹۳/۳۳ بوده که مورد قبول است (شکل ۲).



شکل ۲- (A) پلات راماچاندران مربوط به ساختار سوم پپتید بتا دفنسین (B) نمودار Z-score به‌دست‌آمده از سرور ProSA (C) نمودار ERRAT به‌دست‌آمده توسط سرور SAVE v6.0

Fig 2- (A) Ramachandran plot of beta-defensin peptide (B) Z-score plot obtained from ProSA C) ERRAT plot obtained by SAVE v6.0 server server

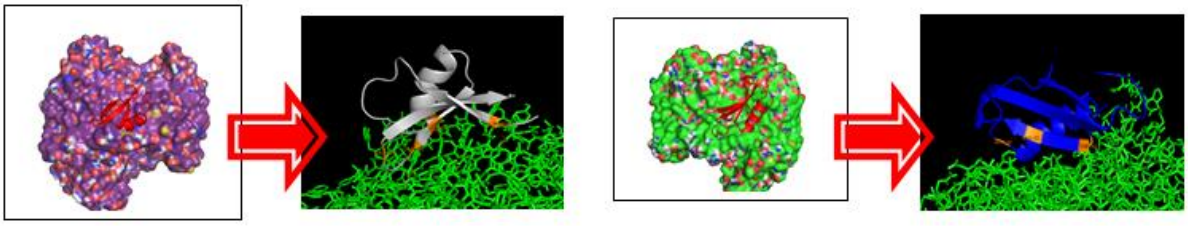
نتایج حاصل از داکینگ مولکولی پپتید بتادفنسین با و بدون his-taq با آنتی‌ژن LPTD موردنظر در شکل ۳ به نمایش گذاشته شده است. تجزیه و تحلیل نتایج حاکی از آن بود که این پپتید در موقعیت مناسب از آنتی ژن LPTD (قسمت سطحی) متصل شده است. اسیدآمینه‌های درگیر در ایجاد پیوند هیدروژنی از این پپتید در جدول ۲ مشخص شده اند. به

طور کلی نتایج نشان داد که پپتید بتادفنسین با توالی his-taq همانند توالی بدون his-taq قادر به اتصال به آنتی ژن LPTD بوده است.

جدول ۲- آمینواسیدهای درگیر در پیوند هیدروژنی بین بتادفنسین با و بدون توالی his-taq با آنتی ژن سطحی LptD باکتری *اشرشیاکلای*

Table 2- Amino acids involved in hydrogen bonding between betadefensin peptide with and without his-taq sequence and Escherichia coli surface antigen LptD

پپتید بتا دفنسین حاوی his-taq	LPTD	طول پیوند (آنگستروم)	تعداد پیوند	انرژی اتصال
R16	S559	1.7	1	-973.5
T30	S640	2	1	
R33	Y656	2.1	1	
پپتید بتادفنسین فاقد his-taq	LPTD	طول پیوند (آنگستروم)	تعداد پیوند	
T3	Y363, A370	2.3, 1.9	2	-935.2
S19	H317	2.9	1	
R33	F359, V372	2.8,1.8	2	
Q36	E391	2.3	1	
R39	E391	1.8	1	



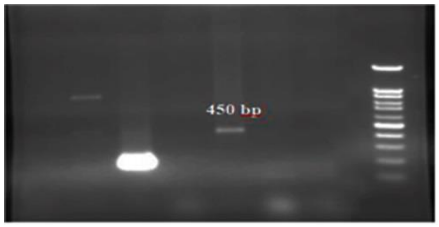
شکل ۳- داکینگ مولکولی پپتید بتا دفنسین با و بدون توالی his-taq با آنتی‌ژن LptD از باکتری *اشرشیاکلای* توسط سرور ClusPro

Fig 3- Molecular docking of beta-defensin peptide with and without his-taq sequence with LptD antigen from Escherichia coli by ClusPro server

نتایج بخش آزمایشگاهی

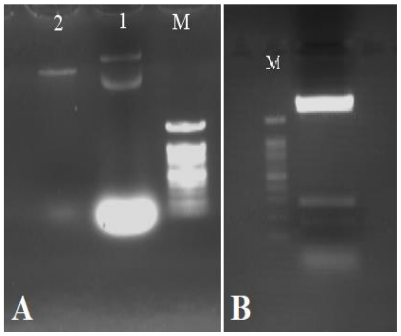
انتقال ناقل PGEM-DEF به باکتری DH5α: سلول‌های ترنسفرم شده حاصل از انتقال ناقل PGEM-DEF به باکتری DH5α بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپسلین رشد کردند که نشان از این موضوع است که انتقال به خوبی انجام گردیده است. مورفولوژی و شکل کلونی‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. کلونی‌های گرد با رنگ سفید و به شکل محدب در پلیت حاوی آمپیسیلین پس از کشت شبانه رشد کرده بودند.

نتیجه کلونی PCR ناقل PGEM-DEF حامل ژن و هضم آنزیمی: نتایج کلونی PCR نشان داد که قطعه‌ی ٤٦٥ bp با موفقیت تکثیر شده است که نشان دهنده صحت فرآیند کلون می‌باشد (شکل ٤).



شکل ٤- کلونی PCR کلونی رشد یافته روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک حاوی ناقل PGEM-DEF

Fig 4- PCR colonyof single colony grown on LB agar containing antibiotics including PGEM-DEF vector



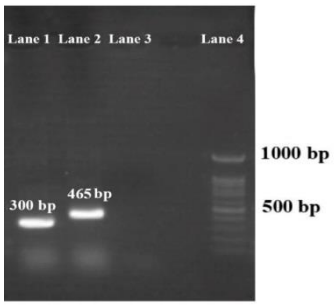
شکل ٥- هضم دوگانه با آنزیم‌های *SapI* و *SalI* روی دو ناقل pAMJ1653 (A) ستون ۲ و ناقل pGEM-DEF (B) ستون ۱

Fig 5- Double digestion with *SapI* and *SalI* enzymes on two pAMJ1653 vectors (A) column 2, and pGEM-DEF vector (B) column 1

هضم آنزیمی PGEM-DEF: نتایج هضم آنزیمی با *SapI* و *SalI* بر روی دو ناقل pAMJ1653 و ناقل pGEM-DEF در شکل (٥) قابل مشاهده است که نشان از موفقیت آمیز بودن این فرآیند داشت.

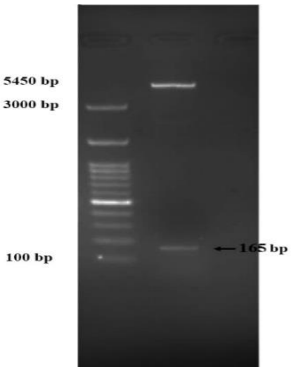
لایگیشن و انتقال ناقل به باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* با روش الکتروپوریشن: پس از انجام دستورالعمل لایگیشن چند کلونی احتمالا مثبت بر روی پلیت فاقد آلانین رشد کردند. این کلونی‌ها به لحاظ شکل و مورفولوژی کاملا شبیه به کلونی‌های باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* بودند. ناقل بیانی pAMJ1653 خریداری شده از کمپانی Bioneer با موفقیت به داخل باکتری مستعد شده *لاکتوکوکوس لاکتیس* موتانت انتقال یافت. به نحوی که بعد از الکتروپویشن تعداد قابل توجهی از باکتری‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* روی محیط فاقد آلانین رشد کردند. این نتایج نشان دهنده‌ی راندمان مناسب ساخت سلول مستعد و همچنین دستورالعمل الکتروپویشن داشت.

کلونی PCR بر روی باکتری‌های مثبت بر روی پلیت فاقد آلانین: باند ٤٦٥ bp در کلونی‌های رشد یافته با موفقیت تکثیر گردید که نشان از صحت دستورالعمل مستعدسازی و الکتروپویشن در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* داشت (شکل ٦). در نهایت از کلونی مثبت استخراج پلاسمید به عمل آمد و نتیجه هضم آنزیمی در شکل ۷ قابل مشاهده است.



شکل ٦- کلونی PCR کلونی رشد یافته بر روی محیط M17 فاقد آلانین بعد از الکتروپویشن محصول لایگیشن به داخل باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس (ستون ۱ ناقل سلف، ستون ۲ کلونی‌های مثبت، ستون ۳ گروه شاهد)

Fig 6- Colony PCR of a colony grown on M17 medium without alanine after electroporation of the ligation product into Lactococcus lactis bacteria (column 1 self vector, column 2 positive colonies, column 3 control group)



شکل ۷- نتیجه هضم آنزیمی بر روی ناقل pAMJ1653 نوترکیب حاوی قطعه‌ی مورد نظر

Fig 7- The result of enzymatic digestion on pAMJ1653 recombinant vector containing the desired fragment

بررسی های بیوانفورماتیک پیش از شروع یک آزمایش به یکی از ملزومات کار محققین تبدیل شده است. اینکه افزودن توالی همچون his taq به منظور خالص سازی یک پپتید می تواند بر فعالیت ضد میکروبی آن موثر باشد یا خیر نیازمند بررسی های in silico می باشد. در مطالعه ی حاضر پیش بینی می شود که افزودن his taq مانع از فعالیت ضد باکتریایی پپتید بتا دفنسین نشده است. اگرچه تعداد پیوند هیدروژنی در حالت بدون his-taq بیشتر می باشد اما انرژی پیوند در حالت وجود his-taq منفی‌تر و قوی‌تر می‌باشد که می‌تواند اثر وجود این توالی باشد. به طور کلی نتایج نشان می دهد؛ این توالی تداخلی را در فعالیت این پپتید ایجاد نکرده است. در مطالعه ی حاضر بتادفنسین با و بدون توالی his taq از طریق آرژینین موقعیت ۳۳ به LPTD متصل شده اند. مطالعات نشان داده اند که اسیدآمینه ی آرژینین موقعیت ۳۳ پپتید دفنسین جزء جایگاه فعال این پپتید در نظر گرفته شده است. در واقع آرژینین (Arg)،

به‌عنوان یک اسیدآمینه ضروری، مسئول بار پپتید و برهمکنش‌های پیوند هیدروژنی است که برای اتصال با دیواره‌ی آنیونی باکتری ضروری می‌باشد (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013). AMP ها به روش‌ها و میزبان‌های مختلفی تولید و بیان می‌شوند، مانند سنتز شیمیایی، این روش گرچه امکان تولید پپتید طبیعی طراحی شده را فراهم می‌کند، اما تولید در این روش مستلزم هزینه بالا می‌باشد. موجودات تراریخته نیز برای تولید پروتئین‌های بسیار پیچیده بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. بیان هترولوک که در میزبان‌های میکروبی مانند باکتری، مخمر و پروبیوتیک تولید می‌شوند. در این مطالعه برای بیان و تولید پپتید بتادفنسین گیاهی از باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* استفاده شد. علت انتخاب این سویه این است که باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* به دلیل عاری بودن از آندوتوکسین ها یک باکتری ایمن به شمار می آید و یکی از مهمترین ارگانیسم‌ها در سیستم بیانی با گرید خوراکی می‌باشد. این باکتری در تحقیقات متعدد در صنایع غذایی، دارویی و تولید پروتئین‌های نوترکیب، ایمن در نظر گرفته شده و سابقه طولانی در به کارگیری آن در صنایع غذایی وجود دارد. عملکرد بالای *لاکتوکوکوس لاکتیس* برای تولید پروتئین، اعم از ترشحی و سیتوپلاسمی، فقدان آندوتوکسین و دست کاری آسان توالی ژن از جمله ویژگی‌های این پروبیوتیک می‌باشد (Parisi *et al.*, 2019). سیستم بیانی P170 یک سیستم بیانی مناسب در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* می‌باشد که دارای پروموتور القاء شونده با تغییرات pH می‌باشد (Chauhan *et al.*, 2014). تا به حال پروتئین‌های زیادی به صورت نوترکیب در این سیستم تولید و خالص سازی شده اند (Jørgensen *et al.*, 2014)، علارغم مزایای ذکر شده در ارتباط با استفاده از سیستم بیانی باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* که در بالا به آن اشاره شد، یکی از مشکلات استفاده از این سیستم بخصوص ناقل بیانی pAMJ1653 دشواری ساب کلونینگ قطعات مورد نظر در داخل این ناقل می‌باشد. دلیل این امر را می‌توان به مواردی همچون ناقل pAMJ1653 جزء ناقلهای با کپی پائین بوده و بنابراین دست یابی به مقادیر مناسب از ناقل در فرایند استخراج پلاسمید سخت و از راندمان کمی برخوردار می باشد. این موضوع در نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر با توجه به غلظت پایین پلاسمید استخراج شده و کیفیت باندهای پلاسمید در ژل نیز کاملا مشهود می باشد. به دلیل اینکه ناقل بیانی در داخل باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* تکثیر می‌شود و استخراج پلاسمید از باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* به علت وجود آلودگی پروتئینی و RNA در پروسه استخراج پلاسمید و عدم حذف این آلودگی‌ها فرآیندهای هضمی بر روی این ناقل از راندمان پائینی برخوردار بود. این حقیقت در نتایج مربوط به عکس‌های ژل پلاسمیدهای خالص شده از باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* مشخص می‌باشد (در قسمت پائین ژل باندهای مربوط به RNA و پروتئین مشخص است). لازم به ذکر است به دلیل اینکه *لاکتوکوکس لاکتیس* یک سویه وحشی می‌باشد، این آلودگی‌ها ناچارا وجود دارد در حالی که در سویه باکتری DH5α که برای کاهش این آلودگی‌ها مهندسی شده است، این آلودگی‌ها در فرآیند

استخراج بسیار کم مشاهده شد که با تیمار RNAas کاملا حذف گردید؛ در حالیکه این آلودگی‌ها بعد از تیمار با RNAas برای ناقل pAMJ1653 کماکان باقی ماند. محصول لیگیشن مستقیما باید برای الکتروپویشن استفاده می‌شد و یک سوش حدواسط برای تکثیر ناقل مورد نظر به دلیل اینکه ناقل pAMJ1653 یک شاتل ناقل نیست، وجود نداشت. عدم سازگار بودن آنزیم‌های *SalI* و *SapI* در یک بافر. فرآیند هضم به صورت ترتیبی انجام شد. بدین نحو که ابتدا با آنزیم *SalI* و بعد از خالص سازی باند هضم شده با آنزیم *SapI* برش انجام گردید که باتوجه به غلظت پایین پلاسمید میزان ناقل هضم شده و خالص شده بسیار محدود بود و در نهایت که البته مختص مطالعه‌ی حاضر بود، کوچک بودن قطعه‌ی مورد نظر برای کلون در ناقل بود. در این مطالعه سعی شد تا یک قطعه ۱٦٥ bp را در یک ناقل ٥٤٥۰ bp کلون کرد که این موضوع هم به نوبه خود کار دشواری بود. ولی با توجه به تمامی مشکلات ذکر شده در مطالعه‌ی حاضر کلون قطعه کد کننده پپتید بتادفنسین گیاهی در ناقل بیانی pAMJ1653 صورت پذیرفت. در مطالعات قبلی نیز این موفقیت حادث شده و حتی در مرحله بیان نیز پپتید در این سوش با موفقیت بیان شده است. از جمله این مطالعات بیان پپتید کایمریک لاکتوفرین گاوی و شتری در دو مطالعه مجزا را می توان نام برد (Soto *et al.*, 2020؛ Rodríguez-Decuadro *et al.*, 2019).

نتیجه‌گیری کلی

در بخش بیوانفورماتیک نتایج داکینگ مولکولی حاکی از آن بود که پپتید بتا دفنسین با و بدون توالی his taq فعالیت ضد باکتریایی علیه آنتی ژن LptD باکتری اشرشیاکلای نشان می دهد. در بخش آزمایشگاهی قطعه کدکننده پپتید بتادفنسین گیاهی حاوی his taq با موفقیت در ناقل بیانی pAMJ1653 کلون گردید. این کانستراکت تولید شده می‌تواند در تولید پپتید ضدمیکروبی در یک سویه باکتری با گرید خوراکی مفید و کاربردی باشد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی عملکردی بودن این ناقل در بیان موفق پپتید و ترشح پپتید به محیط کشت مورد ازریابی و بررسی قرار گیرد.

منابع

1) Chauhan, A.S., Badle, S.S., Ramachandran, K.B. and G, Jayaraman. 2014. The P170 expression system enhances hyaluronan molecular weight and production in metabolically-engineered Lactococcus lactis. *Biochemical engineering journal*. 90: 73-78.
2) Guzmán-Rodríguez, J.J., López-Gómez, R., Suárez-Rodríguez, L.M., Salgado-Garciglia, R., Rodríguez-Zapata, L.C., Ochoa-Zarzosa, A. and J.E, López-Meza. 2013. Antibacterial activity of defensin PaDef from avocado fruit (Persea americana var. drymifolia) expressed in endothelial cells against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *BioMed Research International*. 2013.
3) Hancock, R.E. and H.G, Sahl. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*. 24(12): 1551-1557.

4) Ingham, A.B. and R.J, Moore. 2007. Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnology and applied biochemistry*. 47(1): 1-9.
5) Jørgensen, C.M., Vrang, A. and S.M, Madsen. 2014. Recombinant protein expression in Lactococcus lactis using the P170 expression system. *FEMS microbiology letters*. 351(2): 170-178.
6) Magana, M., Pushpanathan, M., Santos, A.L., Leanse, L., Fernandez, M., Ioannidis, A. and G.P, Tegos. 2020. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases.* 20(9): e216-e230.
7) Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L. and C, Björn. 2016. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 6:194.
8) Mousavi, Z., Rashidian, Z., Zeraatpisheh, Y. and A, Javadmanesh. 2022. Molecular docking of bacteriocin enterocin P peptide with mastitis-causing E. coli antigen in cattle. *Veterinary Research and Biological Products*. 35(4): 114-122.
9) Noonan, J., Williams, W.P. and X, Shan. 2017. Investigation of antimicrobial peptide genes associated with fungus and insect resistance in maize. *International Journal of Molecular* Sciences. 18(9): 1938.
10) Olga, K., Marina, K., Alexey, A., Anton, S., Vladimir, Z. and T, Igor. 2020. The role of plant antimicrobial peptides (AMPs) in response to biotic and abiotic environmental factors. *Biological Communications.* 65(2): 187-199.
11) Parisi, K., Shafee, T.M., Quimbar, P., Van der Weerden, N.L., Bleackley, M.R. and M.A, Anderson. 2019. The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *In Seminars in cell and developmental biology, Academic Press*. pp. 107-118.
12) Rodríguez-Decuadro, S., Dans, P.D., Borba, M.A., Benko-Iseppon, A.M. and G, Cecchetto. 2019. Gene isolation and structural characterization of a legume tree defensin with a broad spectrum of antimicrobial activity. *Planta*, 250(5): 1757-1772.
13) Soto, N., Hernández, Y., Delgado, C., Rosabal, Y., Ortiz, R., Valencia, L. and G.A, Enríquez. 2020. Field resistance to Phakopsora pachyrhizi and Colletotrichum truncatum of transgenic soybean expressing the NmDef02 plant defensin gene. *Frontiers in Plant Science.* 11: 562.
14) Wang, M., Odom, T. and J, Cai. 2020. Challenges in the development of next-generation antibiotics: Opportunities of small molecules mimicking mode of action of host-defense peptides. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 30(5): 303-305.