ORIGINAL ARTICLE

Cloning and Expression of Two New Recombinant Antimicrobial Dermaseptin B1 Peptides in Tobacco to Control the Growth of Human Bacterial Pathogens

Mitra Khademi[1],
Farhad Nazarian-Firouzabadi[2],
Ahmad Ismaili[3]

[1] PhD Student in Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
[2] Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
[3] Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

(Received December 10, 2018 ; Accepted July 17, 2019)

Abstract

Background and purpose: Rapid emergence of traditional antibiotic-resistant pathogens is one of the most important global challenges in medical sciences. To this end, substitution of current antibiotics with strong antimicrobial peptides could be of great benefit.

Materials and methods: In this study, the DNA sequence encoding dermaseptin B1 (DrsB1) antimicrobial peptide derived from *Phyllomedusa bicolor* frog species was fused to either N or C terminal end of the sequence encoding the chitin-binding domain of the Avr4 gene from *Cladosporium fulvum*. The recombinant expression vectors containing two separate structures were transferred to *Agrobacterium rhizogenes* bacterium and then used to produce Hairy Roots (HRs) in tobacco plants. Recombinant dermaseptin B1 peptides were extracted from HRs and their antimicrobial activity was evaluated against some important human pathogens.

Results: Transgene integration and expression of recombinant DrsB1 in hairy roots were confirmed by PCR and semi-quantitative RT-PCR analysis, respectively. Antimicrobial activity of the protein extracts from transgenic HRs showed that both recombinant proteins had significant inhibitory effects on the bacterial pathogens growth ($P<0.01$). CBD-DrsB1 recombinant protein had the highest inhibitory activity against *Enterococcus faecalis* and *Bacillus subtilis*, whereas DrsB1-CBD recombinant protein showed the least antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa.*

Conclusion: To the best of our knowledge, this study for the first time showed that the new recombinant peptides possess a high antibacterial activity. Acquiring resistance to antimicrobial peptides in bacteria is not readily feasible, therefore, present findings may find application as suitable alternative for current antibiotic drugs.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes,* gene expression, dermaseptin B1, antimicrobial

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29(176): 47-60 (Persian).

*** Corresponding Author: Farhad Nazarian-Firouzabadi -** Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran (E-mail: Nazarian.f@lu.ac.ir)

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و نهم شماره ۱۷۶ شهریور سال ۱۳۹۸ (۶۰-۴۷)

همسانه سازی و بیان دو پپتید ضدمیکروبی نوترکیب جدید Dermaseptin B1 در گیاه توتون برای مقابله با میکروب های بیماری زای انسانی

میترا خادمی[۱]
فرهاد نظریان فیرزآبادی[۲]
احمد اسماعیلی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: بیمارگرهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، یکی از مهم‌ترین چالش‌های جهانی در علوم پزشکی است. یکی از راه کارهای مناسب در این زمینه، جایگزینی پپتیدهای ضدمیکروبی قوی به جای آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل بیمارگرهای مهم است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، توالی DNA کد کننده پپتید ضدمیکروبی(DrsB1) Dermaseptin B1 از قورباغه جداسازی و به توالی کدکننده دمین مسئول اتصال به کیتین پروتئین قارچی Avr4 به صورت دو سامانه ژنی متصل شد. ناقل‌های نوترکیب به صورت جداگانه به کمک باکتری *Agrobacterium rhizogenes* جهت تولید ریشه‌های مویین به ریزنمونه‌های برگی توتون منتقل شدند. استخراج پپتیدهای نوترکیب از ریشه‌های مویین توتون انجام شد و فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها علیه تعدادی از بیمارگرهای انسانی مهم مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: آنالیزهای PCR و RT-PCR نیمه کمی به ترتیب انتقال ترانس ژن‌ها و بیان آن‌ها را در ریشه‌های مویین توتون مورد تائید قرار دادند. بررسی اثرات ضدمیکروبی پپتیدهای نوترکیب نشان داد که هر دو پپتید نوترکیب دارای اثرات بازدارندگی معنی‌داری ($P < ۰/۰۱$) در جلوگیری از رشد بیمارگرهای باکتریایی بودند. بیش ترین اثر مهارکنندگی مربوط به پپتید نوترکیب CBD-DrsB1 بود و علیه باکتری‌های *Enterococcus faecalis* و *Bacillus subtilis* مشاهده شد، در صورتی که پپتید نوترکیب DrsB1-CBD علیه باکتری‌های *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* دارای کمترین اثر ضدمیکروبی بود.

استنتاج: نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان داد که پپتیدهای نوترکیب دارای فعالیت ضدباکتریایی بالایی هستند. از آن جایی که ظهور مقاومت علیه پپتیدهای ضدمیکروبی در باکتری‌ها به سهولت امکان‌پذیر نیست، احتمالاً راه کار این مطالعه بتواند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی با خواص آنتی‌بیوتیکی پیشنهاد کند.

واژه های کلیدی: اگروباکتریوم رایزوژنز، بیان ژن، Dermaseptin B1، خاصیت ضد میکروبی

مقدمه

افزایش روزافزون مقاومت دارویی باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج(۲،۱) سبب شده است تا داروهای جدیدی جهت درمان عفونت‌ها عرضه شود(۳-۱). با این وجود، تلاش برای یافتن دسته‌های جدیدی از

مولف مسئول: فرهاد نظریان: خرم آباد: دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی Email: Nazarian.f@lu.ac.ir
۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۲. استاد بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۳. دانشیار مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی، گروه زراعت و اصلاح نباتات ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۷/۹/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۷/۱۰/۳ تاریخ تصویب : ۱۳۹۸/۳/۲۶

آنتی‌بیوتیک‌ها که با داشتن مکانیسم عمل‌های متنوع بتوانند مانع از رشد باکتری و به دنبال آن عفونت‌های ناشی از آن‌ها شوند از اهمیت فراوانی برخوردار می‌باشد. در میان طیف وسیعی از ترکیبات ضدمیکروبی، پروتئین‌ها و پپتیدهای ضدمیکروبی جایگاه مهمی دارند(۴). پپتیدهای ضدمیکروبی توسط طیف وسیعی از موجودات زنده تولید می‌شوند و به دلیل نقش ضروری آن‌ها در سیستم ایمنی ذاتی، از آن‌ها به عنوان پپتیدهای دفاعی میزبان یاد می‌شود(۷-۵). پپتیدهایی ضدمیکروبی کاتیونی معمولا متشکل از ۵۰-۱۲ اسید آمینه با بار مثبت می‌باشند(۸) که موجودات زنده را در مقابل طیف وسیعی از میکروب‌ها (باکتری، قارچ و پروتوزوا) و ویروس‌ها محافظت می‌کنند(۹). پپتیدها بیشتر غشاهای میکروبی را هدف قرار می‌دهند و مانع توانایی میکروب برای توسعه مقاومت علیه آن‌ها می‌شوند(۱۰). همچنین پپتیدهای ضدمیکروبی را می‌توان به راحتی در شرایط آزمایشگاهی براساس اصول مدلینگ پپتیدها و با اهداف خاصی نظیر درک دقیق مکانیسم عمل، بهبود فعالیت و یا مطالعه کارکرد آن‌ها در حالت هم‌جوشی با شرکای فیوژنی تغییر داد(۱۲،۱۱). سطوح پایداری و تجمع پپتیدها برای بهبود عملکرد واکنش‌های ضدمیکروبی طی حمله بیمارگر ضروری است. به واسطه اندازه کوچک و وزن مولکولی کم، پپتیدهای ضدمیکروبی با شرکای هم‌جوشی به عنوان یک استراتژی موثر برای پایدار کردن پپتید، افزایش تجمع آن و حفاظت محصول نهایی از تجزیه پروتئولیتیک محسوب می‌شود. علاوه بر این می‌توان بر اثرات کشنده پپتیدهای ضدمیکروبی حاصل بر روی سلول‌های میزبان نیز غلبه نمود(۱۴،۱۳).

پوست دوزیستانی مانند قورباغه دارای غددی هستند که پیوسته پپتیدهای ضدمیکروبی تولید و ترشح می‌کنند(۱۶،۱۵). این غدد پوستی طیف وسیعی از پپتیدهای ضدمیکروبی را ترشح می‌کنند که یک سیستم دفاعی مؤثر علیه بیمارگرهای بیماری‌زا محسوب می‌شوند(۱۷-۱۵). از آن جایی‌که سطح پوست بدن قورباغه‌ها مرطوب است، بنابراین محل مناسبی برای رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها محسوب می‌شود. با این حال، مواد و پپتیدهای مترشحه از پوست قورباغه‌ها تا حد زیادی از رشد چنین بیمارگرهایی جلوگیری می‌کنند(۱۶،۱۵). از بین طیف وسیعی از انواع پپتیدهای ضدمیکروبی، پپتیدهای کاتیونی خانواده درماسپتین (Dermaseptin) که توسط غدد پوستی برخی از خانواده‌های قورباغه *(Phyllomedusa bicolor)* تولید و ترشح می‌شوند، از ۲۴ تا ۳۴ اسیدآمینه تشکیل شده‌اند و در غشاء سلولی حالت α- هلیکسی به خود گرفته و از این‌رو سبب ایجاد ناپایداری در غشاء میکروب‌های مهاجم می‌شوند(۱۸).

از کشت بافت و سلول گیاهی برای اهداف تولید پروتئین‌های نوترکیب برای صنعت و داروسازی به طور وسیعی استفاده می‌شود. با این حال، بزرگ‌ترین چالش در این زمینه، ناپایداری ژنتیکی، رشد کم و بازده پایین کشت سلول‌های گیاهی است(۱۹). بنابراین برای غلبه بر این محدویت‌ها استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز و کشت ریشه‌های مویین به علت رشد سریع، سهولت نگهداری و توانایی سنتز گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی مزیت‌های بیشتری را به عنوان یک منبع پیوسته برای تولید متابولیت‌های ثانویه و پروتئین‌های نوترکیب ارزشمند ایجاد می‌نماید(۲۱،۲۰). این سیستم با تولید موفقیت آمیز سه شکل فعال پروتئین‌ها و پپتیدهای نوترکیب زایلاناز باکتریایی، آلکالین فسفاتاز انسانی(۲۲) و تائوماتین(۲۳) از ریشه مویین گیاه توتون برتری خود را نشان داده است. به منظور بهبود کارایی خاصیت ضدمیکروبی، پپتید درماسپتین B1 توسط لینکر به دمین متصل شونده به کیتین از افکتور Avr4 قارچ کلادوسپوریوم فلاوم *(Cladosporium fulvum)* متصل شد. این قارچ در جریان حمله با ترشح افکتورهای Avr4 در زمان آلودگی باعث حفاظت دیواره سلولی در برابر آنزیم‌های هیدرولیتیکی گیاه می‌شود. افکتور Avr4 دارای یک دمین اتصال به کیتین است که با اتصال به کیتین موجود در دیواره سلولی قارچ باعث

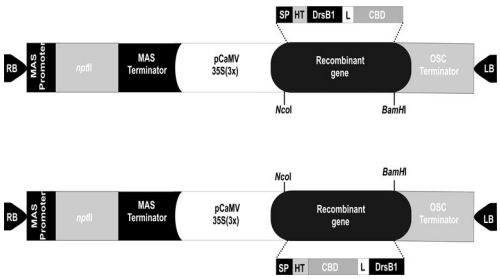
کاهش دسترسی آنزیم‌های هیدرولیتیکی میزبان به کیتین دیواره قارچ می‌شود و از هیدولیز دیواره قارچ جلوگیری می‌کند(۲۴).

در این مطالعه برای اولین بار و با هدف افزایش تراکم پپتید ضدمیکروبی درماسپتین B1 روی دیواره سلولی بیمارگرهای باکتریایی، پپتید ضدمیکروبی درماسپتین B1 به دمین متصل شونده به کیتین (CBD) مربوط به پروتئین قارچی Avr4 متصل گردید. سپس سامانه ژنی در ریشه‌های مویین توتون، بیان و فعالیت ضدمیکروبی آن علیه باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طراحی سازه‌های ژنی

توالی DNA کدکننده پپتید ضدمیکروبی درماسپتین B1(DrsB1) به طول ۹۳ نوکلئوتید (به شماره دسترسی UniProtKB: P80282) از پایگاه داده‌های پپتید (Uniprot) استخراج و به وسیله لینکر کیتیناز برنج (شماره دسترسی GenBank No: X54367.1) و به توالی $(EAAAKEAAAK)_2$ یک بار به پایانه C و بار دیگر به پایانه N توالی کدکننده دمین اتصال به کیتین افکتور Avr4 قارچ کلادوسپوریوم فلاوم (به شماره دسترسی GenBank :CAA69643.1) به طول ۱۹۲ نوکلئوتید به همراه سیگنال پپتید آن متصل شد. هر دو توالی نوترکیب براساس ترجیح کدونی گیاه توتون بهینه‌سازی شدند. همچنین جهت تسهیل همسانه‌سازی، توالی جایگاه‌های برشی مربوط به آنزیم‌های برشی *Nco*I در سر ´۵ و توالی جایگاه برشی *Bam*HI در سر ´۳ سازه‌ها طراحی شدند. سازه‌های ژنی مورد نظر به صورت مصنوعی (شرکت Biomatik کانادا) در ناقل pUCبه صورت جداگانه همسانه‌سازی شدند. در نهایت توالی کدکننده پروتئین‌های نوترکیب توسط آنزیم‌های *Nco*I و *Bam*HI از ناقل pUC جداسازی و در ناقل بیانی pGSA1285 تحت پیش‌بر عمومی(×35S(3 و خاتمه‌دهنده nos جهت بیان در گیاه همسانه‌سازی شدند تا ناقل‌های pGSA1285/CBD-DrsB1 و pGSA1285/DrsB1-CBD تولید شوند (تصویر شماره ۱). هر دو ناقل به صورت جداگانه به اگروباکتریوم رایزوژنز (ATCC15834) به روش شوک الکتریکی منتقل شدند. باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط کشت LB واجد آنتی بیوتیک گزینش گر کلرامفنیکل (۵۰mg/l) به صورت شبانه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و غربال شدند. استخراج پلاسمید از کلونی‌های منتخب با استفاده از کیت (شرکت Thermo Fisher) و همسانه‌سازی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) توسط آغازگرهای اختصاصی مربوط به پپتید DrsB1 انجام شد. صحت توالی همسانه‌سازی شده در ناقل بیانی با ارسال نمونه پلاسمیدی برای توالی یابی، مورد تایید قرار گرفت.



تصویر شماره ۱: توالی نوکلئوتیدی و سامانه های ژنی طراحی شده برای بیان در سیستم کشت ریشه های موئین.. MAS Pro: پیشبر مانوپین سنتاز، npt II: نئومایسین فسفوترانسفراز II حاوی ژن مقاومت به کانامایسین، MAS-Ter: خاتمه دهنده مانوپین سنتاز، CaMV35S: پیش بر موزاییک گل کلم توتون، SP-CBD-Linker-DrsB1 و SP-DrsB1-CBD: توالی سامانه‌های‌فیوژن‌نوترکیب متشکل از سیگنال پپتید (SP)، توالی کدکننده دمین اتصال به کیتین (CBD)، توالی لینکر و توالی کدکننده پپتید درماسپتین B1 و OSC: خاتمه دهنده اکتوپین سنتاز.

مواد گیاهی

از بذور توتون *(Nicotiana tabacum)* رقم Xanthi برای تولید گیاهچه استریل جهت تراریزش و تولید ریشه‌های مویین بر اساس روش نظری و همکاران

(۱۳۹۷) استفاده شد(۲۵). به طور خلاصه، بذور توتون به مدت ۱۰ دقیقه در محلول شوینده (هیپوکلریت سدیم ۵درصد و تریتون X100) ضدعفونی و سپس بر روی محیط کشت MS کشت شدند(۲۶). قطعات برگی ($1cm^2$) سترون از گیاهان توتون سه هفته‌ای برش داده شدند و در مایع تلقیح حاوی آگروباکتریوم رایزوژنز حاوی سامانه‌های ژنی به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها روی محیط هم کشتی MS بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار تا زمان تشکیل ریشه‌ها، به طور مرتب واکشت شدند.

استخراج DNA ژنومی و تائید تراژنی

به‌منظور تائید تراریختی ریشه‌های مویین احتمالی، DNA ژنومی از ریشه‌های مویین به روش CTAB انجام شد(۲۷) و پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های پپتید DrsB1، *rol*C و *Vir*G روی DNA ژنومی به‌عنوان الگو انجام شد (جدول شماره ۱). واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز با یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه یک‌بار در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل؛ واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای مربوطه (جدول شماره ۱) و برای ۳۰ ثانیه، تکثیر DNA الگو در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برحسب طول قطعه از ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه و یک چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

جدول شماره ۱: آغازگرهای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

نام آغازگرها	توالی (5′ به 3′)	طول قطعه تکثیری (جفت باز)	دمای اتصال (c°)	منبع
DersB1-F	GCTAAGGCTATGTGGAAGGATG	۱۰۰	۵۹	مطالعه حاضر
DersB1-R	ATTGAGAAATAGTATCAGCAACAGC			
*rol*C-F	CTCCTGACATCAAAACTCGTC	۶۲۵	۵۳	۲۸
*rol*C-R	TGCTTCGAGTTATGGGTACA			
Elf-α- F	TGAACCATCCAGGACAGATTG	۱۷۷	۶۰	۲۹
elf-α-R	TCTTAACCATACCAGCATCACC			
*Vir*G-F	CCGCGGTCAGCCGCAATTCT	۸۱۹	۵۹	۳۰
*Vir*G-R	CCTGCACGTCCGCGTCAAAGAAATA			

استخراج RNA و سنتز cDNA

به‌منظور تائید بیان سامانه‌های نوترکیب، استخراج RNA به روش کلرید لیتیم انجام گرفت. سپس برای سنتز cDNA از کیت cDNA synthetase (شرکت Thermo Fisher) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. واکنش RT-PCR بر روی cDNAهای سنتز شده، توسط آغازگرهای اختصاصی کنترل داخلی Elongation Factor و پپتید DrsB1 صورت پذیرفت (جدول شماره ۱).

استخراج پروتئین

استخراج پروتئین با استفاده از روش استون و همکاران(۳۱) انجام شد. غلظت پروتئین استخراج شده به روش برادفورد و همکاران(۳۲) اندازه‌گیری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه داری شد. پروتئین‌های استخراج شده، جهت تخلیص پروتئین به ستون کروماتوگرافی حاوی رزین نیکل (PrepEase Ni-IDA) منتقل شدند. سپس ستون با محلول شستشو ($50\ mM\ NaH_2O_4, 300mM\ NaCl$)، شستشو داده شد. جهت جداسازی پروتئین‌های نوترکیب از ستون محلول شستشوی حاوی ۲۵۰mM ایمیدازول مورد استفاده قرار گرفت(۳۳). پروتئین‌های خروجی از هر بار شستشو به‌طور جداگانه جمع‌آوری شده و بر روی ژل ۱۴درصد اکریل آمید بارگذاری و با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی با ولتاژ ثابت ۱۵۰ از یکدیگر جدا شدند. از روش الکتروبلاتینگ برای انتقال پروتئین‌ها از ژل اکریل آمید به کاغذ نیتروسلولز استفاده شد (BioRad mini-proteinΠ apparatus). سپس بلاک کردن کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر TBS[1] حاوی ۵ درصد شیر خشک به مدت ۱ ساعت انجام شد. نمونه پس از سه بار شستشو با بافر TBS به مدت یک ساعت با رقت ۱:۲۰۰۰ آنتی بادی mouse anti- (His) 6 peroxidase دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در نهایت پس

1- Tris-Buffered saline

از شستشو با بافر TBS، طی مراحل آشکارسازی، واکنش بین آنتی‌بادی و سوبسترا H_2o_2 و DAB[2] انجام شد و باندهای پروتئینی ظاهر شدند.

آزمایش فعالیت ضدمیکروبی

فعالیت ضدباکتریایی پروتئین‌های نوترکیب تولید شده با استفاده از بررسی فعالیت پروتئین کل از ریشه‌های مویین تراریخت علیه بیمارگرهای انسانی؛ *Escherichia coli*(PTCC 1330)، *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112)، *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1074)، *Enterococcus faecium* (KX185054)، *Enterococcus faecalis*(PTCC 1393) و *Bacillus subtilis*(PTCC 1715) به روش بررسی هاله ممانعت رشد و با استفاده از انتشار در دیسک(۳۵،۳۴) طبق دستورالعمل CLSI انجام شد (Clinical and Laboratory Standard Institute) برای این منظور، باکتری‌ها به‌طور جداگانه بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار کشت سطحی داده شدند. غلظت تمامی باکتری‌ها، ۰/۵ مک فارلند معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ تنظیم شد و باکتری‌ها توسط سواپ استریل به‌صورت چمنی روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند سپس میزان ۳۰ میکرولیتر از پروتئین‌های استخراج شده (۶۰µg/ml) به دیسک‌های mm ۶ افزوده شد. سپس دیسک‌های حاوی پروتئین‌های نوترکیب روی محیط کشت باکتری قرار داده شدند. پتری‌دیش‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای تثبیت پروتئین در دیسک و سپس به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند. فعالیت ضدمیکروبی پروتئین با مشاهده هاله عدم رشد باکتری و اندازه‌گیری میانگین قطر هاله‌های ایجاد شده در اطراف دیسک‌ها بررسی شد. در هر تکرار از یک دیسک آنتی‌بیوتیک به‌عنوان کنترل مثبت (جنتامایسین- ونکومایسین) و یک دیسک تیمار شده با عصاره پروتئینی ریشه‌های مویین غیرتراریخت به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) با استفاده از روش رقت‌سازی میکرودایلوشن تعیین شد. تهیه سریال رقت با استفاده از پلیت ۹۶ خانه انجام شد. بدین منظور، ۵ سطح شامل غلظت‌های ۲۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروتئین خالص شده (از ستون گذرانده) در حجم نهایی µl ۲۰۰، در مقابل سوسپانسیون باکتری قرار داده شد و رشد باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۵ چاهک برای رقت‌های مختلف در نظر گرفته شد و از چاهک اول که غلظت اولیه پروتئین معادل µg/ml ۲۰۰ بود ، سریال رقت‌های بعدی تهیه شد. یک چاهک به‌عنوان کنترل منفی حاوی ترکیب محیط کشت و پروتئین و یک چاهک به عنوان کنترل مثبت حاوی محیط کشت، در نظر گرفته شد. سپس به همه چاهک‌ها مقدار µl ۱۰ از سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ سلول) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دماهای $۳۷^{\circ}C$ قرار داده شدند. سپس مقدار MIC پروتئین‌های نوترکیب با مقایسه کیفی چاهک‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی شدند. با مشاهده ایجاد کدورت در هر چاهک، چاهک قبلی به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد. در مورد چاهک کنترل مثبت، کدورت نشان دهنده رشد کافی باکتری می‌باشد. چاهک کنترل منفی باید بدون رشد و شفاف باشد. برای هر باکتری این آزمایش به‌صورت جداگانه در سه تکرار طراحی و اجرا شد.

آنالیز آماری داده‌ها

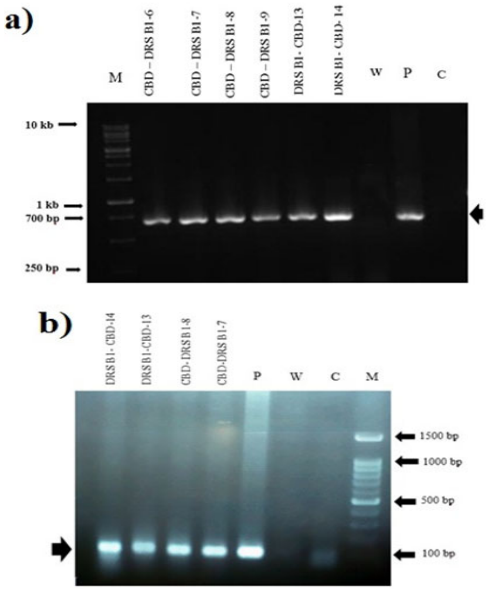
آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر اساس طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار صورت گرفت و داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار MSTATC تجزیه و تحلیل شدند. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها و انحراف معیار برای عصاره‌های پروتئینی نوترکیب محاسبه شد.

2- Diaminobenzidine

یافته‌ها

تعدادی ریشه تراریخت تولید گردید که برای سهولت بررسی نتایج، ریشه‌های تراریخت حاصل برحسب نوع پپتید نوترکیب به اسامی CBD-DrsB1-XX و DrsB1-CBD-XX نام‌گذاری شدند که XX نماینده شماره کلون ریشه مویین تراریخت است.

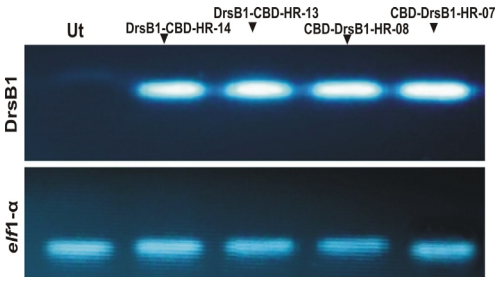
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rol*C و پپتید DrsB1 به ترتیب منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۶۰۰ bp و ۱۰۰ bp شد (تصویر شماره ۲)که وجود باندهای مشخص از ژن *rol*C و پپتید DrsB1 در ژنوم ریشه‌های مویین حاکی از تراریخته شدن ریزنمونه‌های گیاهی بود. همچنین عدم حضور ژن *vir*G در ریشه‌های مویین، نشان داد که ریشه‌های مویین فاقد آلودگی باکتریایی هستند (داده‌ها نشان داده نشده است).



تصویر شماره ۲: غربال ریشه مویین به ظاهر تراریخت به کمک PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *rol*C و پپتید DrsB1. a) حضور سامانه های ژنی نوترکیب با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز با آغازگر های اختصاصی ژن *rol*C و مشاهده قطعه مورد نظر. b) حضور سامانه های نوترکیب با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز با آغازگرهای اختصاصی پپتید DrsB1 و مشاهده قطعه مورد نظر. M: نشان گر وزن مولکولی از بالا به پائین به ترتیب 100 bp و 1kb، P: تکثیر ژن شاهد مثبت با استفاده از پلاسمید pGSA/CBD-DrsB1 یا pGSA/CBD-DrsB1، W: گیاه غیرتراریخت، C: کنترل منفی (استفاده از آب به جای الگو).

بیان پپتیدهای نوترکیب در ریشه‌های مویین

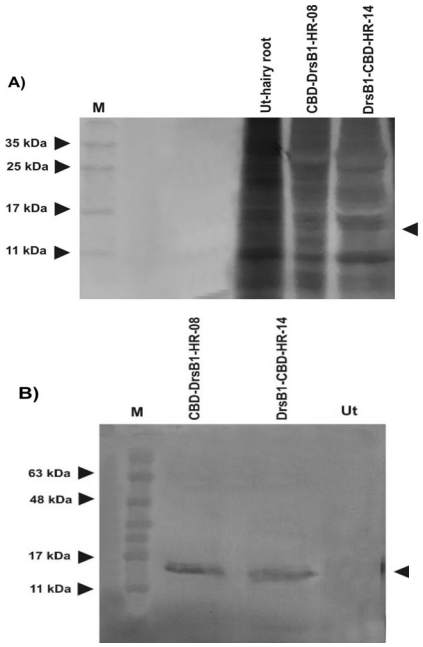
بیان هر دو پپتید نوترکیب این مطالعه در ریشه‌های مویین تراریخت با روش RT-PCR نیمه کمی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن DrsB1 (جدول شماره ۱) مورد مطالعه قرار گرفت. همان‌طوری که مشاهده می‌شود یک باند به طول تقریبی ۱۰۰ جفت باز در کلون‌های تراریخت مشاهده شد که نشان می‌دهد ژن‌های موردنظر به‌خوبی در کلون‌های تراریخت نسخه‌برداری می‌شوند (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: آنالیز RT-PCR نیمه کمی روی گیاه تراریخت و شاهد. پنل بالایی محصول PCR حاصل از تکثیر ژن خانه دار elf و پنل پائینی محصول PCR مربوط به رونویسی ژن های نوترکیب CBD- DrsB1 و DrsB1-CBD را در ریشه های مویین انتخابی نشان می دهد.

با این حال، هیچ قطعه‌ای در شاهدهای غیرتراریخت مشاهده نشد. از بین لاین‌هایی که تصادفی برای مطالعه بیان پروتئین‌های نوترکیب انتخاب شده بودند، تفاوتی از نظر سطح بیان با توجه به ژن کنترل داخلی مشاهد نشد. با این حال به نظر می‌رسد که کلون تراریخت DrsB1-CBD-14 بیان بیش‌تری نسبت به سه کلون دیگر داشته باشد، زیرا شدت باند ژن کنترل داخلی آن کم‌تر و شدت باند خود ژن نیز تا حدودی بیش‌تر است. به منظور بررسی تولید پروتئین‌های نوترکیب در ریشه‌های

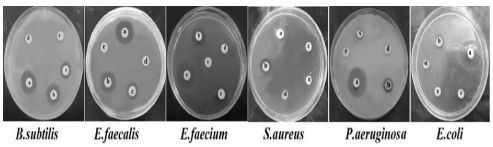
مویین لاین‌های انتخابی آزمایش SDS-PAGE (تصویر شماره ۴ A) وسترن بلات (تصویر شماره ۴ B) صورت گرفت. همان طوری که ملاحظه می‌شود، هر دو پروتئین نوترکیب به خوبی در ریشه‌های مویین تولید می‌شوند و اثری از این پروتئین‌ها در ریشه‌های مویین غیرتراریخت وجود ندارد.



تصویر شماره ۴: آنالیز بیان پپتیدهای نوترکیب CBD-DrsB1 و DrsB1-CBD با استفاده از روش SDS-PAGE (A) و وسترن بلات (B). M: نشان گر پروتئینی (Tris Glycine) بر حسب کیلو دالتون (kDa). M: نشان گر پروتئینی، Ut: پروتئین غیرتراریخت

فعالیت ضدباکتریایی پپتیدهای نوترکیب

به‌منظور بررسی آماری اثرات ضدمیکروبی عصاره پروتئین حاصل از لاین‌های تراریخت (CBD-DrsB1, DrsB1-CBD)، آزمایشی به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پپتیدهای نوترکیب مختلف اثر معنی‌داری (P =۰/۰۹۶) روی رشد باکتری‌ها دارند. اثر متقابل دوگانه باکتری× نوع پپتیدهای نوترکیب معنی‌دار (P =۰/۰۴۵) بود. همچنین نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. همچنین قدرت مهارکنندگی هر دو پروتئین نوترکیب در همه باکتری‌ها نسبت به کنترل مثبت (آنتی‌بیوتیک) کم‌تر بود در حالی که نسبت به پروتئین گیاه غیرتراریخت (پروتئین استخراج شده از ریشه غیرتراریخت) قدرت مهارکنندگی بیشتری داشتند (تصویر شماره ۵).



تصویر شماره ۵: هاله عدم رشد باکتری‌ها در تیمار با عصاره‌های پروتئینی نوترکیب و شاهد. a) آنتی بیوتیک جنتامایسین b) پروتئین نوترکیب CBD-DrsB1-8، c) DrsB1-CBD-14، d) پروتئین‌های گیاه غیرتراریخت و e) بافر فسفات

نتایج مقایسه قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌ها نشان داد که باکتری *B. subtillis* با قطر هاله عدم رشد ۱۰/۸۶ با بیش‌ترین حساسیت و باکتری *E.coli* با قطر هاله عدم رشد ۱ میلی‌متر کم‌ترین حساسیت را نشان دادند. به طورکلی، از نظر میزان فعالیت بازدارندگی از بین دو پپتید نوترکیب، پپتید نوترکیب CBD-DrsB1 قدرت مهارکنندگی بیش‌تری نسبت به پپتید نوترکیب DrsB1-CBD از خود نشان داد.

جدول شماره ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری ها در تیمار با عصاره های پروتئینی نوترکیب

Mean diameter (± SD) of the inhibition zone (mm)					
Vancomicin (30 µg)	Gentamicin (10 µg)	Ut	DrsB1-CBD	CBD-DrsB1	Pathogens
	14.23±0.5	۰	۷/۷۳ ± ۰/۵	۱۰/۸۶ ± ۰/۵	*B. subtillis*
۱۱/۵ ± ۰/۳۵	-	۰	۶/۳۰ ± ۰/۵	۸/۷ ± ۰/۵	*E. faecium*
۱۱/۳۵ ± ۰/۵	-	۰	3.73±0.62	6.60±0.41	*E. faecalis*
	۱۱/۳۱ ± ۰/۵	۰	2.00±0.28	6.01±0.28	*S. aureus*
	15.33±0.28	۰	1.3±0.02	4.06±0.2	*P. aeruginosa*
	۱۵ ± ۰۰	۰	1±0.07	۳ ± ۰/۵۱	*E.coli*

میانگین قطر هاله ممانعت از رشد در سه تکرار با آزمون دانکن با هم مقایسه شده‌اند. Ut: شاهد غیر تراریخت

حداقل غلظت مهارکنندگی

حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظتی از پروتئین‌های نوترکیب است که می‌تواند به میزان ۹۰ درصد رشد باکتری‌ها را مهار کند. نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی پپتیدهای نوترکیب در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. طبق نتایج این آزمایش بیشترین میزان MIC در پپتیدهای نوترکیب مربوط به باکتری‌های *P.aeruginosa* و *E.coli* با غلظت ۱۰۰ µg/ml بود. با توجه به این نتایج مشخص شد که مقدار غلظت بیشتری از پپتیدهای نوترکیب برای مهار این باکتری‌ها در مقایسه سایر باکتری‌ها مورد نیاز است. مقدار MIC برای باکتری‌های *B.subtilis* و *E.faecalis* غلظت ۵۰ µg/ml بود. شایان ذکر است که عصاره پروتئین ریشه موبین غیرتراریخت، هیچ‌گونه اثر بازدارندگی روی رشد هیچ یک از باکتری‌های مورد مطالعه نداشت. محیط درون چاهک کنترل منفی به‌صورت کاملاً شفاف بود و در چاهک کنترل مثبت کدورت کافی حاصل از رشد باکتری مشاهده شد.

جدول شماره ۳: حداقل غلظت مهارکنند گی پروتئین های نوترکیب علیه باکتری ها

MIC(µg/l)		
DrsB1-CBD	CBD-DrsB1	Pathogens
۵۰	۵۰	*Bacillus subtillis*
۱۰۰	۵۰	*Enterococcus faecium*
۵۰	۵۰	*Enterococcus faecalis*
۱۰۰	۵۰	*Staphylococcus aureus*
۱۰۰	۱۰۰	*Pseudomonas aeruginosa*
۱۰۰	۱۰۰	*Escherichia coli*

بحث

مشکلات جدی ناشی از ظهور باکتری‌های مقاوم به دارو، نیاز فوری به توسعه درمان‌های جایگزین را دو چندان کرده است. در این راستا، پپتیدها به عنوان عوامل ضدمیکروبی امید بخش برای تولید نسل جدید آنتی‌بیوتیک‌ها حائز اهمیت هستند(۳۷،۳۶). طراحی دوباره پپتیدهای ضدمیکروبی جدید برای استفاده و افزایش کارایی در صنعت دارویی و کشاورزی، تولید هم‌جوشی یا فیوژن بین مولکول‌های مختلف با فعالیت ضدمیکروبی یکی از زمینه‌های جدید برای تولید مولکول‌های جدید ضدمیکروبی است(۴۰-۳۸). فناوری مهندسی ژنتیک به کمک استفاده از بیوراکتورهای گیاهی برای تولید تجاری پپتیدها، پروتئین‌ها و داروها برای مقابله با بیمارگرهای باکتریایی و قارچی به منظور درمان بیماری‌های انسانی و ایجاد گیاهان مقاوم بسیار نوید بخش است(۴۱). بنابراین، محققین به مطالعه تولید پپتیدهای مختلف و بررسی خواص ضدمیکروبی آن‌ها در کشت ریشه‌های مویین و گیاهان پرداخته‌اند. از جمله این مطالعات می‌توان به القای بیان موفقیت آمیز پروتئین ضدویروس HIV و ضدتومور MAP30 به عنوان پروتئین‌های مهارکننده ریبوزومی (RIP: Ribosome-Inactivating Protein)، در ریشه مویین توتون اشاره کرد. در این مطالعات، تجزیه و تحلیل پروتئین کل استخراج شده از ریشه‌های مویین تراریخته اثرات ضدمیکروبی قوی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ‌ها نشان داد(۴۲).

پپتیدهای ضدمیکروبی Cecropins، یکی از مهم‌ترین اجزای سیستم دفاعی حشرات علیه عفونت باکتری است. مطالعات نشان داده‌اند که cecropins نوترکیب با تخریب یکپارچگی غشای باکتری، خاصیت مهارکنندگی قوی علیه باکتری‌های *E.coli*، *P.aeruginosa*، *B.megaterium* و *M.luteus* دارد(۴۳، ۴۴). زانگ و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی تأثیر پپتید ضدمیکروبی LZ1 با ۱۵ آمینواسید علیه بیمارگرهای *Acne vularis* شامل *Propionibacterium acnes*، *Staphylococcus epidermidis* و *Staphylococcus aureus* به این نتیجه رسیدند کاربرد حداقل غلظت (0.6 µg/ml) از این پپتید تعداد کلونی‌های باکتری را کاهش می‌دهد و این پپتید در پلاسمای خون به‌طور پایدار باقی مانده و داروی مناسبی برای درمان آکنه می‌باشد(۴۵).

جنسن و همکاران (۲۰۰۶)، اثرمتقابل بین پپتیدهای کاتیونی و ترکیباتی با بار منفی در سطح غشای بیرونی باکتری از قبیل لیپوپلی ساکارید در باکتری‌های گرم

منفی یا لیپوتیکوئیک (Lipoteichoic Acid) باکتری‌های گرم مثبت را مطالعه نمودند(۴۶). نتایج مطالعات نشان داد که اثر متقابل الکترواستاتیک باعث حذف کاتیون‌های دو ظرفیتی (Mg^{+2}, Ca^{2+}) از سطح غشا سلول می‌شود که در نهایت سبب بی‌ثباتی لایه بیرونی غشا و تسهیل ورود پپتید می‌شود(۴۷، ۴۸). در همین راستا، برای افزایش فعالیت ضدمیکروبی پپتید، اسوسکی و همکاران (۲۰۰۴) با تغییر ناحیه N ترمینال پپتید درماسپتین(MsrA2) B1 تمایل پپتید را برای اتصال به لیپیدهایی با بار منفی افزایش دادند. بیان این پپتید تغییر یافته در گیاه توتون منجر به تولید کلون‌های تراریختی با مقاومت قوی علیه برخی بیمارگرهای گیاهی شد(۴۹) نتایج حاصل نشان داد که گیاه توتون تراریخت حاوی آنالوگ درماسپتین B1 (MsrA2) به بیمارگرهایی مانند قارچ‌های *Pythium sp* ،*Fusarium* , *Alternaria*, *Phytophthora* و باکتری *Erwinia Carotovora* مقاوم هستند(۵۰).

علی بخشی و همکاران (۲۰۱۸) با اضافه کردن توالی His-tag به پپتید درماسپتین B1 و انتقال آن به ریشه مویین گیاه توتون به بررسی خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های بیمارگر گیاهی پرداختند. نتایج حاصل از آنالیز توالی در پایگاه ProtParam نشان دهنده افزایش بار کاتیونی و نیمه عمر این پپتید نسبت به شاهد بود. هم چنین نتایج بررسی خاصیت ضدمیکروبی این پپتید نشان داد که پپتید بیان شده مانع رشد بیمارگرهای باکتریایی گیاهی از قبیل *Pectobacterium carotovorum*، *Erwinia amylovora* و *Xanthomonas citri* شد(۵۱).

در همین راستا، به منظور افزایش خاصیت ضدمیکروبی افزایش تعداد و تراکم پپتید DrsB1 روی غشای بیمارگرهای انسانی مهاجم، پپتید DrsB1 توسط یک لینکر به دمین متصل شونده به کیتین از ژن Avr4 قارچ کلادوسپوریوم فلاوم متصل شد تا علاوه بر افزایش بار مثبت، پروتئین نوترکیب بتواند به دیواره سلولی باکتری‌ها متصل شود و از این طریق بتواند آن‌ها را کنترل نماید. پیش از انجام کارهای آزمایشگاهی، کارایی و فعالیت پپتیدهای طراحی شده به صورت In silico به کمک الگوریتم‌های پایگاه CAMP بررسی شد. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که به دلیل اضافه کردن اسید آمینه ناشی از دمین اتصال به کیتین و His-tag میزان بار مثبت این پپتیدهای نوترکیب نسبت به پپتید بدون دمین افزایش یافت. افزایش بار مثبت این پپتیدهای نوترکیب باعث اثر متقابل بار مثبت پپتیدهای نوترکیب با بار منفی غشای باکتری و در نتیجه سبب اختلال در غشا و لیز شدن باکتری می‌شود و همین امر باعث افزایش میزان بازدارندگی این پروتئین‌ها نسبت به شاهد (DrsB1) شد. بار مثبت در بخش هیدروفوبیک پپتید برای فعالیت ضدمیکروبی آن ضروری است. هم‌چنین اضافه کردن دمین اتصال به کیتین از ژن Avr4 نیز به دلیل اثر متقابل Avr4 با N – استیل گلوکزآمین از پپتیدوگلیکان باعث افزایش فعالیت این پپتیدهای نوترکیب علیه بیمارگرهای باکتریایی می‌شود(۲۴). همچنین یوشنکو و همکاران (۲۰۰۷) در راستای مهندسی ژنتیک مقاومت به بیماری‌ها در آزمایشگاه به ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی دو پپتید سنتز شده تمپورین و آنالوگ درماسپتین (MsrA2) B1 پرداختند. نتایج نشان داد که بیمارگرهای قارچی و باکتری مورد مطالعه به غلظت‌های (بین ۲/۵ تا ۲۵ µM) میکرومولار پپتیدهای سنتتیک حساسیت نشان دادند(۵۲).

در مطالعه حاضر نیز، پروتئین‌های نوترکیب استخراجی از ریشه‌های تراریخت در محیط آزمایشگاه از خود فعالیت ضدباکتری معنی‌داری علیه باکتری‌های بیماری‌زا انسانی نشان دادند. بیش‌ترین اثر ضدمیکروبی مربوط به پپتید نوترکیب حاصل از کلون تراریخت CBD-DrsB1-8 روی *B.subtillis* بود. نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی پروتئین‌های توتون‌های تراریخت نشان داد که حداقل غلظتی از پروتئین‌ها که موجب جلوگیری از رشد ۹۰ درصد باکتری‌ها می‌شود در فاصله غلظت‌های ۵۰ µg/ml و ۱۰۰ بود، در حالی که عصاره گیاه غیرتراریخت مانع رشد هیچ یک

از باکتری‌ها نشد. برای کنترل رشد باکتری‌ها *S. aeruginosa* و *E.coli* به غلظت بیش‌تری از پروتئین نوترکیب (۱۰۰ µg/ml) در مقایسه با *B.subtillis* (۵۰ µg/ml) نیاز بود.

در مطالعات مختلف اثرات ضدمیکروبی آنالوگ و فیوژن درماسپتین علیه بیمارگرهای باکتریایی و قارچی مختلف به اثبات رسیده است. در مقایسه با مطالعات دیگر، لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر از غلظت‌های میکروگرم عصاره پروتئین کل برای ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی استفاده شد و تفاوت در نتایج گزارش شده میزان غلظت‌های مهارکننده، ناشی از این مسئله می‌باشد. همان‌گونه که در تصویر شماره ۵ مشاهده می‌شود میزان حساسیت باکتری‌ها نسبت به پپتید با هم متفاوت بود. به نظر می‌رسد این مسئله به نحوه عملکرد پپتید ضدمیکروبی و اثر متقابل پپتید کاتیونی با بار منفی گروه‌های فسفولیپیدها و لیپوتیچویک (Lipoteichoic Acid) غشاهای میکروبی باکتری برمی‌گردد. نتایج حاصل از این مطالعه ضمن تایید صحت کارایی بیان پپتید نوترکیب درماسپتین B1 طی فرآیند دست کاری و مهندسی ژنتیک، اطلاعات با ارزشی برای آزمایشات هدفمند در صنعت داروسازی و مقابله با باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها را فراهم می‌کند. همچنین استفاده از پپتید درماسپتین B1 به دلیل عدم تماس با بیمارگرهای انسانی برای القاء مکانیسم مقاومتی در آن‌ها، می‌تواند جایگزین مناسبی برای پپتیدهای انسانی باشد. بنابراین در این مطالعه سعی شد تا با اتصال دمین مسئول اتصال به کیتین از پروتئین Avr4 قارچ کلادوسپوریوم فلاوم *(Cladosporium fulvum)* ضمن افزایش بار مثبت پپتید و همچنین تمایل به سمت دیواره غشا باکتری، شرایطی برای فعالیت پپتید درماسپتین B1 فراهم شود.

سپاسگزاری

این مقاله با کد اخلاق LU.ECRA . 2018.10 حاصل پایاننامه دکتری مربوط به خانم میترا خادمی بوده که بخشی از منابع مالی آن توسط دانشگاه لرستان تامین شده است.

References

1. Moosazadeh Moghaddam M, Aghamollaei H, Kooshki H, Azizi H, Mirnejad R, Choopani A. The development of antimicrobial peptides an approach to prevention of antibiotic resistance. J Medical Microbiology 2015; 26(3): 98-110.
2. Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, Pozzi E, Cauda R. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother 2008; 61(1): 26-38.
3. Holaskova E, Galuszka P, frebort I, Tufan M. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. J Biotechnology Advances 2015; 33: 1005-1023.
4. Peschel A, Sahl HG. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. Nat Rev Microbiol 2006; 4(7): 529-536.
5. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends Biotechnol 2011; 29(9): 464-472.
6. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 2002; 415(6870): 389-395.
7. Zasloff M. Defending the epithelium. Nat Med 2006; 12(6): 607-608.
8. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends Immunol 2009; 30(3): 131-141.

9. Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. Lancet Infect Dis 2001; 1(3): 156-164.
10. Hancock RE, Sahl H-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat Biotechnol 2006; 24(12): 1551-1557.
11. Aleinein RA, Schäfer H, Wink M. Rhizosecretion of the recombinant antimicrobial peptide ranalexin from transgenic tobacco hairy roots. RRJBS 2015; 1: 45-55.
12. Marcos JF, Muñoz A, Pérez-Payá E, Misra S, López-García B. Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. Annu Rev Phytopathol 2008; 46: 273-301.
13. Li Z, Zhou M, Zhang Z, Ren L, Du L, Zhang B, et al. Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to Fusarium graminearum and Rhizoctonia cerealis. Funct Integr Genomics 2011; 11(1): 63-70.
14. Flavia Cancado Viana J, Campos Dias S, Luiz Franco O, Lacorte C. Heterologous production of peptides in plants: fusion proteins and beyond. Curr Protein Pept Sci 2013; 14(7): 568-579.
15. Barra D, Simmaco M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. Trends Biotechnol 1995; 13(6): 205-509.
16. Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. Biochim Biophys Acta 2004; 1696(1): 1-14.
17. Nicolas P, Mor A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. Annu Rev Microbiol 1995; 49(1): 277-304.
18. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, αhelical antimicrobial peptides. Biopolymers 2000; 55(1): 4-30.
19. Borisjuk NV, Borisjuk LG, Logendra S, Petersen F, Gleba Y, Raskin I. Production of recombinant proteins in plant root exudates. Nat Biotechnol 1999; 17(5): 466-469.
20. Kim Y, Wyslouzil BE, Weathers PJ. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. In Vitro Cell Develop Biol-Plant 2002; 38(1): 1-10.
21. Kim YJ, Weathers PJ, Wyslouzil BE. Growth of Artemisia annua hairy roots in liquidand gas hase reactors. Biotechnol Bioeng 2002; 80(4): 454-464.
22. Gaume A, Komarnytsky S, Borisjuk N, Raskin I. Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. Plant Cell Rep 2003; 21(12): 1188-1193.
23. Pham NB, Schäfer H, Wink M. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures. Biotechnol J 2012; 7(4): 537-545.
24. Van den Burg HA, Spronk CA, Boeren S, Kennedy MA, Vissers JP, Vuister GW, et al. Binding of the Avr4 elicitor of Cladosporium fulvum to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein-protein interactions: the chitin-binding site of AVR4 represents a novel binding site on the folding scaffold shared between the invertebrate and the plant chitin-binding domain. J Biol Chem 2004; 279(16): 16789-16796.
25. Nazari Z, Nazarian Firouzabadi F, Ismaili A, Darvishnia M. Production of a recombinant antimicrobial Dermaseptine B1 peptide in *Nicotiana tabacum* L. hairy roots with antibacterial activity. Yafte 2017; 20(2): 103-118 (Presian).

26. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 1962; 15(3): 473-497.
27. Gawel NJ, Jarret RL. A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea. Plant Molecular Biol Rep 1991; 9(3): 262-266.
28. Jalilian A, Ismaili A, Nazarian Firouzabadi F, Hosseini Z. Optimization of hairy root induction and transformation,and cloning of over-expression of 4´OMT gene construct in opium poppy. Ms Thesis, Khoram Abad; Lorestan University, 2015. (Presian).
29. Badrhadad A, Nazarian-Firouzabadi F, Ismaili A. Fusion of a chitin-binding domain to an antibacterial peptide to enhance resistance to Fusarium solani in tobacco (*Nicotiana tabacum*). 3 Biotech 2018; 8(9): 391.
30. Kortstee A, Khan SA, Helderman C, Trindade LM, Wu Y, Visser RG, et al. Anthocyanin production as a potential visual selection marker during plant transformation. Transgenic Res 2011; 20(6): 1253-1264.
31. Stone SL, Gifford DJ. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda L*.) seeds during germination and early-seedling growth. I. Storage protein reserves. Intl J Plant Sci 1999; 160(4): 663-671.
32. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72(1-2): 248-254.
33. Bollag DM, Edelstein SJ, Rozycki MD. Proteins methods. 2nd ed. New Yourk: Wiley; 1996.
34. Bauer A, Kirby W, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; 45(4): 493-496.
35. Mangena T, Muyima NY. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of Artemisia afra, Pteronia incana and Rosmarinus officinalis on selected bacteria and yeast strains. Lett Appl Microbiol 1999; 28(4): 291-296.
36. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? Arch Med Res 2005; 36(6): 697-705.
37. Lata S, Sharma B, Raghava GP. Analysis and prediction of antibacterial peptides. BMC Bioinformatics 2007; 8(1): 263.
38. Melo MN, Ferre R, Castanho MA. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. Nat Rev Microbiol 2009; 7(3): 245-250.
39. Yevtushenko DP, Misra S. Transgenic expression of antimicrobial peptides in plants: strategies for enhanced disease resistance, improved productivity, and production of therapeutics. Small wonders: peptides for disease control: ACS Publications; 2012.
40. Yevtushenko DP, Romero R, Forward BS, Hancock RE, Kay WW, Misra S. Pathogen-induced expression of a cecropin A-melittin antimicrobial peptide gene confers antifungal resistance in transgenic tobacco. J Exp Bot 2005; 56(416): 1685-1695.
41. Holaskova E, Galuszka P, Frebort I, Oz MT. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. Biotechnol Adv 2015; 33(6): 1005-1023.
42. Moghadam A, Niazi A, Afsharifar A, Taghavi SM. Expression of a recombinant anti-HIV and anti-tumor protein, MAP30, in nicotiana tobacum hairy roots: A pH-stable

and thermophilic antimicrobial protein. PloS One 2016; 11(7): e0159653.

43. Andreu D, Merrifield RB, Steiner H, Boman HG. N-terminal analogs of cecropin A: synthesis, antibacterial activity, and conformational properties. Biochemistry 1985; 24(7): 1683-1688.
44. Hoffmann JA. Innate immunity of insects. Curr Opin Immunol 1995; 7(1): 4-10.
45. Zhang Z, Mu L, Tang J, Duan Z, Wang F, Wei L, et al. A small peptide with therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. PloS One 2013; 8(8): e72923.
46. Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 2006; 19(3): 491-511.
47. Moghaddam MM, Barjini KA, Ramandi MF, Amani J. Investigation of the antibacterial activity of a short cationic peptide against multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae and Salmonella typhimurium strains and its cytotoxicity on eukaryotic cells. World J Microbiol Biotechnol 2014; 30(5): 1533-1540.
48. Moghaddam MM, Abolhassani F, Babavalian H, Mirnejad R, Barjini KA, Amani J. Comparison of in vitro antibacterial activities of two cationic peptides CM15 and CM11 against five pathogenic bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli*. Probiotics Antimicrob Proteins 2012; 4(2): 133-139.
49. Powers JP, Hancock RE. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. Peptides 2003; 24(11): 1681-1691.
50. Osusky M, Osuska L, Hancock RE, Kay WW, Misra S. Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. Transgenic Res 2004; 13(2): 181-190.
51. Alibakhshi A, Nazarian Firouzabadi F, Ismaili A. Expression and antimicrobial activity analysis of a Dermaseptin B1 antibacterial peptide in tobacco hairy roots. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture) 2018; 41(3): 87-96 (Presian).
52. Yevtushenko DP, Misra S. Comparison of pathogeninduced expression and efficacy of two amphibian antimicrobial peptides, MsrA2 and temporin A, for engineering widespectrum disease resistance in tobacco. Plant Biotechnol J 2007; 5(6): 720-734.