مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۵، شماره ۳/ مرداد و شهریور ۱۳۹۲/ ۹۷-۸۹

مقاله پژوهشی

بهینه سازی بیان، تخلیص و بررسی خاصیت ضد میکروبی پروتئین نوترکیب بتا دیفنسین ۲ نوتروفیل‌های گاو

نفیسه کریمی[۱]، بهناز صفار[۱]*، کامران قائدی[۳]، محسن مبینی دهکردی[۱]

[۱] گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۲] پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۳] گروه سلولی و مولکولی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۵ اصلاح نهایی: ۹۱/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۲۰

چکیده:

زمینه و هدف: **دیفنسین‌ها یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌ی پپتیدهای ضد میکروب می‌باشند که به واسطه‌ی فعالیت بر علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها و بسیاری از ویروس‌ها به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های نسل جدید منفعت بسیاری دارند. هدف از این مطالعه بهینه سازی بیان، تخلیص و بررسی خاصیت ضد میکروبی پروتئین بتا دیفنسین ۲ نوتروفیل‌های گاو (BNBD2) بوده است.**

روش بررسی: **در این مطالعه‌ی تجربی-آزمایشگاهی باکتری *اشرشیاکلی* BL21(DE3) حامل وکتور pET-32a(+) که ژن BNBD2 در آن همسانه سازی شده بود جهت مطالعات مورد استفاده قرار گرفت. بیان پروتئین BNBD2 با تغییر در پارامترهای دانسیته‌ی سلولی، دمای رشد، مدت زمان القاء با استفاده از سیستم الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) و تست برادفورد به صورت کمی و کیفی بررسی گردید. مراحل تخلیص پروتئین نوترکیب با کمک روش شیمیایی شکافت در جایگاه فرمیک اسید و عبور از سانتریکون و اثر ضد باکتری پروتئین تخلیص شده بر چند نمونه‌ی باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار گرفت.**

یافته ها: **با استفاده از محیط کشت Luria–Bertani، شروع القاء در جذب نوری ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت یک میلی مولار ماده‌ی القاء کننده‌ی IPTG، دمای رشد ۳۰ درجه و مدت زمان ٤ ساعت پس از القاء بیشترین میزان بیان پروتئین به دست آمد. پروتئین نوترکیب با استفاده از شکافت در جایگاه فرمیک اسید و عبور از سانتریکون تخلیص گردید. نتایج آزمایش وسترن بلاتینگ نیز نشان داد که پروتئین نوترکیب به طور اختصاصی به آنتی‌بادی mouse anti-(His)6 peroxidase متصل می‌گردد. تشکیل هاله‌ی عدم رشد در محیط‌های کشت مولر هینتون آگار حاوی کشت سطحی باکتری های مورد آزمایش خاصیت ضد باکتری این پروتئین را نشان داد.**

نتیجه گیری: **با توجه به خاصیت ضد میکروبی پروتئین BNBD2 و امکان بیان پروتئین در باکتری *E. coli* می توان به تولید انبوه این پروتئین نوترکیب اقدام نمود.**

واژه‌های کلیدی: بهینه سازی، بیان، تخلیص، پپتیدهای ضد میکروب، شکافت شیمیایی، بتا دیفنسین ۲.

مقدمه:

سیستم ایمنی موجودات چند سلولی دارای پپتیدهایی کمتر از ۱۰۰ آمینو اسید می‌باشد که آن‌ها را از طیف وسیعی از میکروب‌ها (باکتری، قارچ و پروتوزوا) و ویروس‌ها محافظت می‌کند (۱). این پپتیدهای ضد میکروب همچنین به عنوان پپتیدهای دفاعی میزبان نامیده می‌شوند و به عنوان تنظیم کننده‌های سیستم ایمنی، پاسخ سیستم ایمنی را افزایش کننده‌های سیستم ایمنی، پاسخ سیستم ایمنی را افزایش می‌دهند (۲). پپتیدهای ضد میکروب به واسطه‌ی قابلیت کاربرد آن‌ها به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های نسل جدید منفعت بسیار دارند (۴،۳). این پروتئین ها دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های ضد میکروبی می باشند و عمدتاً غشاهای میکروبی را هدف قرار می‌دهند و مانع توانایی میکروب برای توسعه‌ی مقاومت علیه آن‌ها می‌شوند.

*نویسنده مسئول: شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، گروه ژنتیک، تلفن: ۰۳۸۱٤٤۲٤٤۱۹، E-mail: saffar_b@sci.sku.ac.ir

دیفنسین‌ها یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌ی پپتیدهای ضد میکروبی می‌باشند (۷،۶،۵) که در مهره داران و بی‌مهرگان یافت می‌شوند و در طیفی از موجودات شامل پستانداران، پرندگان و گیاهان گزارش شده‌اند. دیفنسین‌ها بر ضد باکتری، قارچ و حتی ویروس‌های پوشش‌دار و بدون پوشش فعـــال می‌باشند (۸). سایر فعّالیت دیفنسین‌ها شامل خاصیت کیموتاکتیک، اپسونیک و فعال کننده‌ی سلول‌های دندریتیک می‌باشد و یا ممکن است پاسخ هورمون‌ها را تعدیل کنند و نقش اساسی در هر دوی ایمنی ذاتی و اکتسابی ایفا کنند (۹).

ویژگی سلول‌کشی و میکروب‌کشی دیفنسین‌ها در نتیجه توانایی آن‌ها برای داخل شدن به غشاهای بیولوژیکی و واکنش‌های الکترو استاتیک با غشا باکتری و تولید منافذی است که اجازه می‌دهد یون‌های ضروری و مواد غذایی از باکتری به محیط بیرون منتشر شده و در نتیجه سنتز DNA، RNA و پروتئین‌ها متوقف شود (۱۱،۱۰). یک مدل که فعالیت بیشتر پپتیدهای ضد میکروب را نشان می‌دهد مدل Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) است. این مدل واکنش پپتید با غشا، به همراه جا به جایی لیپیدها، تغییر در ساختار غشا، و در نمونه‌های خاص ورود پپتید به درون سلول هدف را پیشنهاد می‌کند (۱۲) و به طور کلی عمل پپتیدهای ضد میکروب با مکانیسم SMH در غلظت میکرو مولار، میکروب‌ها را می‌کشد.

دیفنسین‌ها، پپتیدهای کاتیونیک کوچک (۴۵-۱۸) آمینواسید، با وزن مولکولی ۶-۲ کیلو دالتون و غنی از اسید آمینه‌ی آرژنین با الگوی حفاظت شده‌ای از اتصال دی‌سولفیدی از جمله ۶ تا ۸ ریشه سیستئین می‌باشند. در مطالعات قبلی ۱۳ پپتید کاتیونیک از گرانول‌های سیتوپلاسمی نوتروفیل‌های خون گاو گزارش شده است. این ۱۳ پپتید بسیار کاتیونیک می‌باشند و دارای توالی‌های حفاظت شده‌ای با پپتیدهای ضد میکروبی تولید شده از سلول‌های اپی‌تلیال هستند. همچنین در سال ۱۹۹۸ بتا دیفنسین (EBD) از سلول های اپی‌تلیال درونی گاو جداسازی شده است (۱۴،۱۳). بتا دیفنسین‌های گاو اثرات میکروب کشی قوی در *in vitro* اعمال می کنند و فعالیت ضد میکروبی علیه *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و کاندیدا آلبیکنز دارند (۱۵). پپتیدهای بتا دیفنسین ۱ تا ۱۲ گرانول های سیتوپلاسمی نوتروفیل‌های گاو علاوه بر بیان در مغز استخوان در اپی‌تلیوم غدد پستانی گاوهای شیر دهنده نیز بیان می‌شوند و میزان بیان آن‌ها در غدد پستانی گاو در زمان عفونی شدن با باکتری افزایش می‌یابد (۱۷،۱۶).

تکنولوژی DNA نوترکیب یک وسیله‌ی اقتصادی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب فراهم می‌کند. حقیقتاً بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از طریق تولید نوترکیب در تنوعی از میکرو ارگانیسم‌ها به دست آمده‌اند. در میان سیستم‌های موجود برای تولید پروتئین نوترکیب باکتری *E. coli* بیشتر به عنوان میزبان استفاده می‌شود (۱۹،۱۸). با توجه به این که درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها، هنوز انتخاب اول برای مبارزه با عفونت‌های میکروبی در انسان و حیوانات است شیوع مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم یک نگرانی برای سلامت عمومی می‌باشد. تولید پروتئین نوترکیب با خاصیت ضد میکروبی می‌تواند راهکاری مفید باشد (۲۰)، لذا این مطالعه با هدف بهینه سازی بیان و تخلیص پروتئین ژن BNBD2 به منظور بررسی پتانسیل آن در خاصیت ضد میکروبی این پپتیدها طراحی و اجرا شده است.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی از باکتری *E. coli* L21(DE3) حامل پلاسمید pET-32a(+) که ژن BNBD2 در آن همسانه سازی شده بود جهت مطالعه استفاده گردید (۲۱). جهت بررسی بیان پروتئین نسبت به رشد باکتری اقدام گردید. به این منظور ابتدا از نمونه باکتری های ذخیره شده (که در دمای $-۷۰^{0}C$ نگهداری می‌گردید) در محیط لوریا برتانی (LB)، مایع حاوی ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تلقیح و نسبت به رشد آن در شرایط ۱۵۰ دور و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اقدام شد. میزان

تلقیح کشت شبانه به محیط کشت بیانی به نسبت ۱ به ۱۰ صورت گرفت. پس از رسیدن جذب نوری (OD) به ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر القاء بیان ژن به وسیله‌ی Isopropyl-ß-D-thio-galactoside (IPTG) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار صورت گرفت (۲۲،۲۳).

بهینه سازی و تولید پروتئین نوترکیب در وکتور pET-32a(+) برای سه کمیت دانسیته‌ی سلولی در زمان القاء (جذب نوری ۰/۷ تا ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر)، مدت زمان القاء (۱، ۲، ۳، ۴ و۶ ساعت و نیز یک شبانه روز بعد از القاء) و دمای رشد (۲۶، ۲۸، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) ارزیابی گردید. سپس نمونه‌ها در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب سلولی بعد از حل شدن در بافر Tris-EDTA (TE) و تأثیر امواج ماوراء صوت (قدرت ۸۰٪ و پالس ۰/۵) در دور ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع فاز رویی جهت بررسی بیان بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز شد. با توجه به نتایج به دست آمده بهترین دما و مدت زمان بعد از القاء مشخص گردید. تعیین غلظت پروتئین نوترکیب به کمک روش برادفورد انجام شد. در این راستا بعد از تهیه آلبومین سرم گاوی (BSA) از شرکت سینا ژن بر اساس میزان جذب (OD) نمودار استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر رسم گردید و در مرحله‌ی بعد با استفاده از آن غلظت پروتئین نوترکیب تخمین زده شد (۲۴). به منظور انجام وسترن بلات ابتدا مقدار مساوی از پروتئین قبل از القا و بعد از القا با تکرار روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد برده شد به طوری که با نصف کردن ژل SDS-PAGE نیمی از ژل جهت رنگ آمیزی با کوماسی بلو و نیمه دیگر جهت انجام وسترن بلات و مقایسه با الگوی پروتینی ژل پلی اکریل امید به کار گرفته شد. پروتئین ها از ژل پلی اکریل امید توسط بافر انتقال (تریس ۲۵ میلی مولار/ گلیسین ۱۹۲ میلی مولار همراه با متانول ۲۰٪) به مدت یک شبانه روز با شدت ۸۰ میلی آمپر به غشای پلی وینیلیدین دی فلوراید Polyvinylidene Difluoride (PVDF) منتقل شدند.

مرحله مسدود سازی با قرار دادن کاغذ در skim milk۵ درصد به مدت دو ساعت صورت گرفت. سپس آنتی بادی mouse anti- (His)6 peroxidase با رقت ۱ به ۲۰۰۰ اضافه گردید. پس از شست و شوی کاغذ PVDF با بافر شست و شو (Tris ۰/۰۲ مولار، NaCl نیم مولار و HCL ۶ نرمال) ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه سوبسترای تترامتیل بنزدین Tetramethylbenzidine (TMB) اضافه گردید. با ظاهر شدن باند قهوه ای پروتئین مورد نظر شناسایی گردید. به منظور رهایی پروتئین BNBD2 از پروتئین نوترکیب، (پروتئین نوترکیب دارای جایگاه شکافت آسپارتیک-پرولین برای فرمیک اسید می باشد) در محلول ۵۰ درصد فرمیک اسید (۲۶ میلی لیتر فرمیک اسید ۸۰٪ و ۲۰ میلی لیتر پروتئین نوترکیب) و دمای 50^0C به مدت ۲۴ ساعت شکافت یافت. بعد از شکافت، مخلوط واکنش به مدت ۲ ساعت لیوفیلیزه شد تا فرمیک اسید از محلول حاوی پروتئین حذف شود.

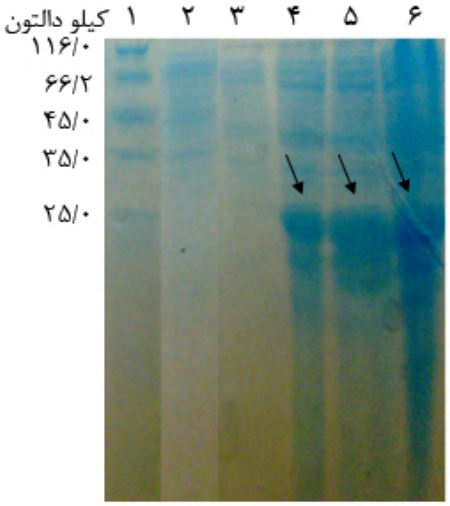
برای تخلیص و تغلیظ پروتئین BNBD2، از سانتریکون با غشای سلولزی (Vivaspin2 از شرکت Sartorius آلمان) استفاده شد. پس از اضافه نمودن حداکثر ۲ میلی لیتر محلول حاوی پروتئین BNBD2، سانتریکون به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه و ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول عبور کرده از غشا سلولزی، حاوی پروتئین تخلیص شده BNBD2 بود که جهت بررسی خاصیت ضد میکروبی استفاده شد.

به منظور بررسی اثر ضد باکتریائی پروتئین تخلیص شده، در محیط کشت Tryptone Soya Broth (TSB)، کشت شبانه از باکتری‌های *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، Klebsiella pneumonia و Pseudomanas aeruginosa تهیه گردید. بعد از یک شبانه روز پس از ایجاد چاهک بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار، به میزان ۸۰ میکرولیتر از نمونه پروتئینی تخلیص شده در زمان‌های مختلف بعد از القاء به عنوان کنترل مثبت و ۸۰ میکرولیتر از نمونه‌ی فیوژن پروتئین به عنوان کنترل منفی استفاده گردید و در

دمای ۳۷ درجه یک شبانه روز برای بررسی خاصیت میکروب کشی این پپتید، انکوبه شد.

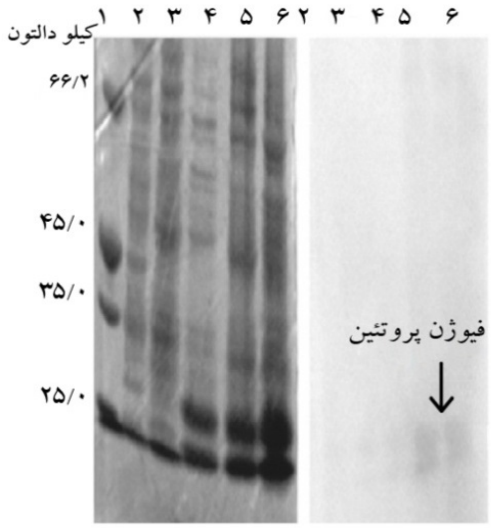
یافته‌ها:

در این مطالعه، بیشترین غلظت پروتئین بیانی در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد مشاهده شد. بررسی بیان پروتئین، وجود یک باند پروتئینی با اندازه‌ی حدود ۲۵ کیلو دالتون، معادل با وزن مولکولی پروتئین نوترکیب BNBD2 در الگوی پروتئین‌های باکتریایی القاء شده نشان داد؛ در حالی که باند پروتئینی مذکور در الگوی پروتئینی سلول‌های باکتریایی القاء نشده وجود نداشت و مشخص شد که بیشترین بیان در مدت زمان ۴ ساعت بعد از القاء بوده است (تصویر شماره ۱) و نتایج حاصل از انجام SDS-PAGE با روش وسترن بلاتینگ تایید شد به طوری که در ستون مربوط به نمونه قبل از القـاء



تصویر شماره ۱: تصویر ژل SDS-PAGE، بیان پروتئین نوترکیب بتا دیفنسین ۲ نوتروفیل‌های گاو (BNBD2) در دمای ۳۰ درجه و غلظت یک میلی مولار IPTG

۱: مارکر پروتئین، ۲: سلول لیز شده E. coli BL21(DE3). ۳: سلول لیز شده E. coli BL21(DE3) ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب قبل از القا، ٦-٤: بیان پروتئین نوترکیب به ترتیب ۲ ، ۳ و ٤ ساعت بعد از القاء با IPTG، علامت پیکان نشان دهنده پروتئین نوترکیب قبل از القاء.

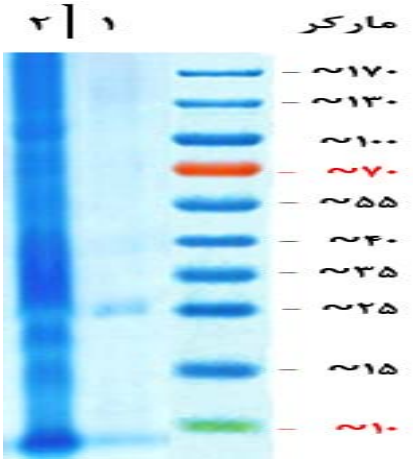


تصویر شماره ۲: آنالیز وسترن بلاتینگ

۱: مارکر پروتئینی، ۲: سلول لیز شده‌ی E. coli BL21(DE3) ۳: سلول لیز شده E. coli BL21(DE3) ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب قبل از القاء با IPTG. ٦-٤: سلول لیز شده E. coli BL21(DE3) ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب بعد از القاء با IPTG در زمان‌های مختلف ۲،۳ و ٤ ساعت بعد از القاء؛ علامت پیکان نشان دهنده پروتئین نوترکیب قبل از القاء.

هیچ باندی مشاهده نمی‌شود ولی در سایر ستون‌ها بیان پروتئین نوترکیب با وزن مذکور مشاهده گردید (تصویر شماره ۲).

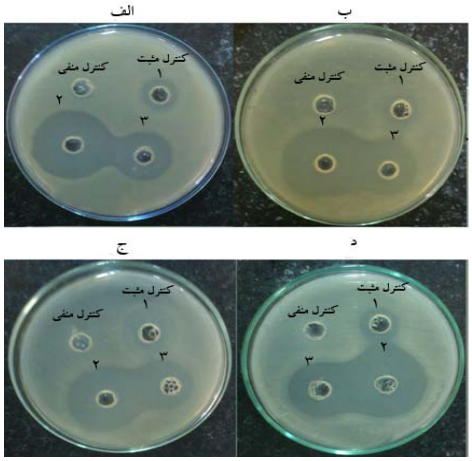
با استفاده از روش برادفورد غلظت پروتئین نوترکیب برابر ۱۹/۲۹۵۴ میکرو گرم در ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت تعیین گردید. با اضافه نمودن فرمیک اسید ۵۰ درصد به محلول حاوی پروتئین نوترکیب و نگهداری آن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز، شکافت در جایگاه آسپارتیک-پرولین مربوط به فرمیک اسید انجام و پس از لیوفیلیزه کردن محلول به مدت ۲ ساعت به منظور حذف اثر فرمیک اسید در بررسی خاصیت ضد باکتری و عبور محلول پروتئین از سانتریکون، اندازه باند پروتئین تخلیص شده به روی ژل تریسین ۱۶ درصد مطابق با اندازه پیش بینی شده(معادل با ۴۰ اسید آمینه) حدود ۴/۶ کیلودالتون تعیین گردید (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: ژل تریسین ۱۶ درصد برای تعیین حضور پروتئین نوترکیب بتا دیفنسین ۲ نوتروفیل‌های گاو (BNBD2)

۱: کنترل مثبت (پروتئین هایی با وزن های مشخص ۲۵ و ۵ کیلو دالتون)، ۲: پروتئین برش یافته شده با وزن مولکولی ٤/٦ کیلو دالتون پس از عبور از سانتریکون؛ علامت پیکان نشان دهنده پروتئین نوترکیب قبل از القاء.

با بررسی هاله‌ی عدم رشد در محیط کشت مولر هینتون آگار، اثر میکروب کشی این پروتئین تخلیص شده بر رشد باکتری‌های *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Klebsiella pneumonia* و *Pseudomanas aeruginosa* تأیید گردید (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره‌ی ۴: بررسی فعالیت ضد باکتری پروتئین نوترکیب بتا دیفنسین ۲ نوتروفیل‌های گاو (BNBD2) با روش agar gel diffusion

الف: Pseudomonas aeruginosa (ATCC27853)، ب: Klebsiella pneumonia (ATTC700603)، ج: Escherichia coli (ATCC35218)، د: Staphylococcus aureus (25922).

در هر پلیت کنترل منفی: فیوژن پروتئین قبل از در معرض قرار گرفتن با فرمیک اسید، ۳-۱ به ترتیب پروتئین BNBD2 تخلیص شده ۲٤ و ٤۲ ساعت بعد از القاء).

بحث:

از آن جایی که مقدار کم دیفنسین‌های طبیعی در حیوانات وجود دارد و ارزش استخراج بالا است و صنعتی کردن و کاربرد دیفنسین‌های طبیعی در مهار و کنترل بیماری‌ها در حیوانات اهلی و ماکیان محدود است کلونینگ دیفنسین‌ها با استفاده از تکنیک‌های بیولوژی مولکولی و توسعه حیوانات ترانس ژنیک وسیله اصلی برای به دست آوردن دیفنسین‌ها می‌باشد. فعالیت بالای پپتیدهای ضد میکروبی در *in vitro* این هدف را در بر دارد که این پپتیدها ممکن است درآینده‌ی نزدیک در معالجه عفونت‌های باکتریایی در *in vivo* موثر باشند.

هر پروتئین با توجه به مقدار بیان و ساختار و توالی آن شرایط بیانی خاص خود را دارا می‌باشد در نتیجه برای دستیابی به شرایط بهینه‌ی بیان پروتئین نوترکیب، نیاز به بهینه سازی شرایط است. به منظور بهینه سازی بیان پروتئین نوترکیب BNBD2 چندین پارامتر از مجموعه پارامترهای موثر در میزان بیان پروتئین نوترکیب تغییر داده شد. فاکتورهایی که مورد بررسی قرار گرفتند شامل دانسیته‌ی سلولی در زمان القاء، مدت زمان القاء و دمای رشد بود. نتایج نشان داد که بهترین بیان هنگام استفاده از محیط کشت LB و جذب نوری ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر اتفاق افتاده است. در باره‌ی مدت زمان القاء و دمای رشد مشاهده گردید که هنگامی که محیط کشت القاء شده در دمای ۳۰ درجه انکوبه می‌شد؛ بعد از القاء میزان بیان پروتئین نوترکیب بالا بود. در تحقیقی مشابه، جهت کلونینگ بیان و تخلیص LL-37 (پروتئینی مشابه دیفنسین‌ها با خاصیت ضد میکروبی)، از وکتور pET-32a(+) استفاده شد. در آن تحقیق پروتئین LL-37 به وسیله‌ی فیوژن شدن با تیرودوکسین و His tag و دارا بودن جایگاه شکافت آسپارتیک-پرولین، بعد از شکافت جایگاه با فرمیک اسید تحت کروماتوگرافی تمایلی کبالت قرار گرفت و تخلیص پپتید با تکنیک HPLC صورت پذیرفت. برای

تولید پپتیدهای ضد میکروبی در *E. coli* و حفاظت از تأثیرات کشنده این پپتیدها برای میزبان و نیز حفاظت آنها از تخریب پروتولیتیک، پپتیدها را به یک حامل پروتئینی متصل می کنند و پپتید هدف در مرحله بعدی توسط برش آنزیمی یا شیمیایی جدا می‌شود. این پروتئین های حامل پپتید را از پروتئازهای سلولی و میزبان را از پپتید توکسیک حفظ می‌کند. از پروتئین‌های حامل مانند گلوتاتیون ترانسفراز و تیوردوکسین برای اتصال به پپتیدهای آنتی باکتریال به وفور استفاده شده است که از بین این دو تیوردوکسین به دلیل اندازه کوچک (۱۱ کیلو دالتون) و افزایش حلالیت پروتئین نوترکیب در *E. coli*، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲۵). علاوه بر این دیفنسین‌ها در ساختمان خود دارای اسید امینه سیستئین بوده و باند دی سولفیدی تشکیل می دهند ولی عدم تشکیل آنها در عملکردشان یعنی تخریب غشا نقشی ندارد و آنچه در فعالیت ضد میکروبی دیفنسین ها نقش دارد بار و هیدرو فوبیسیتی آنها می‌باشد (۲۷،۲۶). بنابراین امکان بیان این پروتئین در فضای سیتوپلاسمی باکتری *E. coli* ممکن می شود.

در این مطالعه از وکتور pET32a، دارای توالی کد کننده پروتئین تیوردوکسین جهت جلوگیری از اثر باکتری کشی پروتئین دیفنسین استفاده گردید. پس از بیان پروتئین نوترکیب BNBD2 به صورت سیتوپلاسمی با برش در جایگاه شکافت آسپارتیک-پرولین پروتئین مورد نظر از توالی های اضافه مانند تیوردوکسین و هگزا هیستیدین جدا شده استفاده و با عبور از سانتریکون خالص گردید. یکی از جنبه‌های مهم که باید هنگام طراحی یک سیستم بیان ژن و تهیه پروتئین نوترکیب در نظر داشت مرحله‌ی خالص سازی پروتئین می‌باشد. با توجه به این که هر مرحله‌ی خالص سازی هزینه‌های خاص خود را دارا می‌باشد بنابراین هر چه مراحل خالص سازی کمتر باشد به همان اندازه روش تخلیص مناسب‌تر است (۲۹،۲۸).

نتیجه گیری:

پپتیدهای ضد میکروب، دارای مکانیسم‌های ضد میکروبی ویژه ای هستند که فشار انتخابی در طی سال‌های تکامل را تحمل کرده و یک پایگاه برای توسعه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های جدید می‌باشند. هر پروتئین شرایط بیان مخصوص به خود را دارا می‌باشد که شرایط دمایی، غلظت IPTG و طول زمان القاء سلول‌ها در مقدار تولید پروتئین موثر است. براساس نتایج این مطالعه دمای رشد ۳۰ درجه، مدت زمان ۴ ساعت و غلظت ۱ میلی مولار ماده القاء کننده در محیط LB بیشترین میزان بیان پروتئین BNBD2 را نشان داد که می توان برای تولید انبوه و صنعتی پروتئین مورد استفاده قرار داد.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش تحت حمایت مالی دانشگاه شهرکرد در قالب طرح پژوهشی با شماره ۱۴۰/۸۹ مورخ ۹۱/۲/۲۷ و با راهنمایی‌های اساتید محترم از دانشگاه های شهرکرد و اصفهان انجام گردیده است؛ لذا از آن مدیریت محترم و اساتید بزرگوار تقدیر و تشکر به عمل می آید.

منابع:

1.Bowie AG, Haga IR. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. Mol Immunol. 2005 May; 42(8): 859-67.

2. Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. Defensins. Eur J Haemato. 1990 Jan; 44(1): 1-8.

3. Brogden KA, Ackermann M, McCray PB Jr, Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. Int J Antimicrob Agents. 2003; 22(5): 465-78.

4. Lazarev VN, Govorun VM. Antimicrobial peptides and their use in medicin. Appl Biochem and Microbiol. 2012; 46(9): 803-14.

5. Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat Biotechnol. 2006 Dec; 24(12): 1551-7.

6. Mookherjee N, Hancock RE. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. Cell Mol Life Sci. 2007 Apr; 64(7-8): 922-33.

7. Schutte BC, McCray PB, Jr. [beta]-defensins in lung host defense. Annu Rev of Physiol. 2002; 64: 709-48.

8. Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. Blood. 2001; 97(12): 3951-9.

9. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. J Clin Invest. 1985; 76(4): 1427-35.

10. Matsuzaki K. Why and how is peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. Biochim Biophys Acta. 1999; 1462(1-2): 1-10.

11. Yang L, Weiss TM, Lehrer RI, Huang HW. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. Biophys J. 2000; 79(4): 2002-9.

12. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. Biochim Biophys Acta. 1999; 1462(1-2): 55-70.

13. Tarver AP, Clark DP, Diamond G, Russell JP, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. Enteric beta-defensin: molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with Cryptosporidium parvum infection. Infect Immun. 1998; 66(3): 1045-56.

14. Cormican P, Meade KG, Cahalane S, Narciandi F, Chapwanya A, Lloyd AT, et al. Evolution, expression and effectiveness in a cluster of novel bovine beta-defensins. Immunogenetics. 2008; 60(3-4): 147-56.

15. Zhao P, Bai R, Chen L, Hu W, Wen S, mi Y, et al. Prokaryotic expression of antimicrobial bovine β-defensin-1 in *Escherichia coli*. Afr J Biotechnol. 2011; 10(50): 10212-17.

16. Wu J, Wang C, He H, Hu G, Yang H, Gao Y, et al. Molecular analysis and recombinant expression of bovine neutrophil beta-defensin 12 and its antimicrobial activity. Mol Biol Rep. 2011; 38(1): 429-36.

17. Campanelli D, Detmers PA, Nathan CF, Gabay JE. Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. J Clin Invest. 1990; 85(3): 904-15.

18. Li Y, Chen Z. RAPD: a database of recombinantly-produced antimicrobial peptides. FEMS Microbiol Lett. 2008; 289(2): 126-9.

19. Figueredo S, Mastroianni JR, Tai KP, Ouellette AJ. Expression and purification of recombinant alpha-defensins and alpha-defensin precursors in *Escherichia coli*. Methods Mol Biol. 2010; 618: 47-60.

20. Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. Curr Eye Res. 2005; 30(7): 505-15.

21. Karimi N. Cloning and expression of BNBD2 in *Escherichia coli*. [Dissertation]: Univ Shahrekord; 2012.

22. Hajikhani B, Najar Peerayeh SH, Soleimanjahi H, Zuhair H. Cloning, expression, purification and antigenicity of recombinant UreB332-HpaA fusion protein from *Helicobacter pylori* Modares J Med Sci Pathol. 2010; 13(2): 1-10.

23. Ebrahimipour Gh, Bambai B, Khodabande M, Torkynejad F. Cloning and expression of Penicillin acylase from *Arthrobacter viscosus* in *E. coli*. Iran Biology. 2009 spring; 22(1): 1-11.

24. 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: 248-54.

25. Li Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. Protein Expr Purif. 2011; 80(2): 260-7.

26. Suresh A, Verma C. Modelling study of dimerization in mammalian defensins. BMC Bioinformatics. 2006; 7(Suppl 5): 17.

27. Sahl HG, Pag U, Bonness S, Wagner S, Antcheva N, Tossi A. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. J Leukoc Biol. 2005; 77(4): 466-75.

28. Clark ED. Protein refolding for industrial processes. Curr Opin Biotechnol. 2001; 12(2): 202-7.

29. Rastgar Jazii F, Karkhane AA, Yakhchali B, Fatemi SS, Deezagi A. A simplified purification procedure for recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor from periplasmic space of *Escherichia coli*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007; 856(1-2): 214-21.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2013 Aug, Sep; 15(3):89-97.

Original article

Optimization of expression, purification and handling anti bacteria feature protein of bovine neutrophil B-defensing BNBD2

Karimi N (MSc) [1], Saffar B (PhD)*[1,2], Ghaedi K (PhD)[3], Mobini-Dehkordi M (PhD)[1]
[1]Genetic Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran; [2]Biotechnology Research Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran; [3]Biology Dept., Isfahan University, Isfahan, I.R. Iran.
Received: 6/ Oct/2012 Revised: 3/ Dec/2012 Accepted: 20/ Dec/2012

Background and aims: Defensins are one of the largest families of antimicrobial peptides and, because of their activity against bacteria, fungi, and many coated and uncoated viruses, are very profitable as new antibiotics. This study was done to evaluate the optimization of expression, purification and handling antibacterial features of BNBD2 protein.

Methods: In this experimental laboratory study, *E. coli* BNBD2 (DE3) carrying pET-32a(+) vector in which BNBD2 was homogenized was used. BNBD2 expression was evaluated through changes in cell density, growth temperature, the duration of induction using vertical electrophoresis (SDS-PAGE) and Bradford test both qualitatively and quantitatively. The purification of recombinant protein was done by chemical method of fission in the position of formic acid and passing Centricon, and anti-bacterial effect of the purified protein on some gram negative and gram positive bacteria was examined

Results: By induction start in optical absorption of 0.8 in wave length of 600 nm and inducing IPTG in concentration of 1 milimolar, growth temperature of 30^0C, and duration of 4h after induction, the highest expression was obtained in Luria-Bertani culture medium. The recombinant protein was purified by fission in formic acid and passing centricon. Western blot test results indicated that the recombinant protein was specifically connected to mouse anti-(His) 6 peroxidase antibody. The formation of inhibition zone in culture media of Hinton agar containing culture swab of the studied bacteria indicated this protein's antibacterial property.

Conclusion: BNBD2 protein has antibacterial effects and can be expressed in *E .coli* and this protein has antibacterial effects.

Keywords: **Antimicrobial peptides, BNBD2, Chemical fission, Expression, Optimization, Purification.**

Cite this article as: Karimi N, Saffar B, Ghaedi K, Mobini-Dehkordi M. The Optimization of expression, purification and handling anti bacteria feature protein of bovine neutrophil B-defensing BNBD2. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013 Aug, Sep; 15(3): 89-97.

*Corresponding author:
Genetic Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00983814424419, E-mail: saffar_b@sci.sku.ac.ir