

همسانه سازی و بیان ژن مولد پپتید AcAMP از قارچ *Aspergillus clavatus* در باکتری *E. coli* و بررسی تیترا آنتی بادی آن در موش سوری

احسان زمانی: دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی مولکولی دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.
جمیل زرگان: استادیار و متخصص سم شناسی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.
*** حسین هنری:** دانشیار و متخصص ژنتیک مولکولی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران (*نویسنده مسئول).
 honari.hosein@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۲

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان منادی تغییر آنتی بیوتیک‌های امروزی مورد توجه قرار گرفته‌اند. پپتید ضد میکروبی AcAMP یکی از این موارد بوده که از قارچ رشته‌ای *Aspergillus clavatus* ES1 استخراج و خواص بیوشیمیایی آن بررسی گردیده و مشخص شد که این پپتید دارای خواص منحصر بفردی می‌باشد. هدف این مطالعه، بیان ژن مولد پپتید AcAMP در باکتری *E. coli* و بررسی تیترا آنتی بادی آن در موش می‌باشد.
روش کار: در این مطالعه تجربی ژن مولد پپتید AcAMP با جایگاه‌های آنزیمی BamHI و SalI از پلاسمید pUC57 با استفاده از PCR، تکثیر و در وکتور بیانی pET28a(+) همسانه‌سازی و به باکتری اشریشیا کولی سویه BL21(DE3) تراریخت شد. بیان پروتئین نوترکیب AcAMP با IPTG القاء و به وسیله کروماتوگرافی تمایلی نیکل تخلیص گردید. به منظور تأیید پروتئین نوترکیب western blotting انجام گرفت. موش‌ها به صورت صفاقی با پروتئین تخلیص شده ایمن شدند و تیترا IgG سرم به روش ELISA مورد سنجش قرار گرفت.
یافته‌ها: عمل همسانه‌سازی در وکتور بیانی pET28a(+) به وسیله واکنش PCR و توالی یابی تأیید گردید. پروتئین نوترکیب ۹ کیلودالتونی تولید شده به وسیله SDS-PAGE و لکه‌گذاری وسترن مورد تأیید قرار گرفت. روند تولید آنتی بادی با استفاده از الیزا غیر مستقیم نشان دهنده ی روند افزایشی آنتی بادی مخصوصاً پس از تزریق چهارم می‌باشد.
نتیجه گیری: از پپتید AcAMP نوترکیب تخلیص شده و آنتی بادی تولید شده می‌توان در تحقیقات ضد میکروبی اعم از بررسی عملکرد ضد میکروبی پپتید نوترکیب و شناسایی پپتید در کاربرد های مختلف استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: قارچ *آسپرژیلوس کلواتوس*، پپتیدهای ضد میکروبی، پپتید AcAMP، موش آزمایشگاهی، تیترا آنتی بادی

مقدمه

پزشکی مقذور بوده و در منابع زیستی طبیعی پیدا شوند (۴). از زمان کشف اولیه پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial Peptides-AMPs) در حشرات و جانوران در سال ۱۹۸۰، این پپتیدها به عنوان منادی تغییر آنتی بیوتیک‌های امروزی مورد توجه قرار گرفته‌اند. در سراسر طبیعت پپتیدهای ضد میکروبی جزئی کلیدی در سیستم ایمنی ذاتی ارگانیسم‌ها محسوب می‌شوند. این پپتیدها به طور معمول دارای طیفی گسترده بر ضد باکتری‌ها و قارچ‌ها بوده و حتی در بعضی موارد طیف کشندگی آن‌ها، ویروس‌های پوشینه‌دار، انگل‌ها و حتی سلول‌های سرطانی را در برمی‌گیرند (۱). قارچ‌های رشته‌ای به طور معمول مولد پپتیدها و پروتئین‌هایی با فعالیت ضد میکروبی می‌باشند (۵). تاکنون مطالعات بسیاری بر روی پپتیدهایی از

ظهور میکروبی‌هایی که دارای مقاومت چندگانه به دارو می‌باشند، زنگ خطری را به منظور توسعه‌ی عوامل ضد میکروبی جدید به صدا درآورده است (۱). از این مقاومت‌های چندگانه می‌توان به مقاومت مخمر به آزول‌ها و پلیین‌ها (۲) و مقاومت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکسی*‌ها و *اشریشیا کولی* به بتالاکتام‌ها اشاره نمود (۳). با توجه به تمایل شرکت‌های داروسازی به حضور در عرصه‌های سودآورتر، تعداد آنتی بیوتیک‌هایی که در خط تولید شرکت‌های داروسازی بزرگ می‌باشند، رویه‌ای رو به کاهش را اتخاذ نموده است (۱). فلذا در سال‌های اخیر یکی از بزرگ‌ترین چالش‌ها، یافتن موادی به عنوان آنتی بیوتیک بوده که امکان استفاده از آن در

این پپتید در پژوهش‌هایی مولکولی از جمله شناسایی مکانیسم‌های عملکردی، نیازی ضروری برای استفاده کاربردی این پپتید است. بدیهی است که به‌منظور شناسایی پپتید با استفاده تکنیک‌های ایمونولوژیک مانند الایزا و ایمونوبلاتینگ، آنتی بادی پلی کلونال، جزئی ضروری در این پروسه می‌باشد (۱۳). هدف از این پژوهش همسانه سازی و بیان ژن مولد پپتید ضد میکروبی AcAMP در باکتری *اشریشیا کولی*، و بررسی روند تولید آنتی بادی و تأیید آنتی بادی تولید شده می‌باشد که با موفقیت صورت پذیرفت.

روش کار

مطالعه از نوع تجربی می‌باشد.

ساخت و تراریخت سازه ژنی pET28a-acamp: توالی کامل ژن *acamp* قارچ *Aspergillus clavatus* از بانک ژن NCBI (با شماره: GenBank: GU390689.11) استخراج گردید و با در نظر گرفتن جایگاه‌های برش آنزیمی *BamHI* و *Sall* در وکتور pUC57 جهت سنتز به شرکت سینا کلون سفارش داده شد.

سلول‌های مستعد *اشریشیا کولی* سویه *DH5α* براساس پروتکل استاندارد روش کلرید کلسیم تهیه و پلاسمید با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد تراریخت شد (۱۴).

به‌منظور تکثیر ژن، طراحی پرایمر صورت گرفته و جهت سنتز به شرکت سینا کلون سفارش داده شد (جدول ۲).

پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، قطعه ژنی با استفاده از آنزیم‌های *BamHI* و *Sall* مورد تیمار آنزیمی قرار گرفته و محصولات برش از روی ژل با استفاده از کیت تخلیص DNA، خالص سازی شد. برش آنزیمی وکتور بیانی pET-28a(+) نیز به‌منظور همسانه سازی با آنزیم‌های *BamHI* و

منبع	قارچ مولد	پپتید
[۳۳]	<i>Neosartorya fischeri</i>	NFAP
[۳۴]	<i>Penicillium chrysogenum</i>	PAF
[۳۵]	<i>Penicillium chrysogenum</i>	PgAFP
[۳۶]	<i>Penicillium nalgiovense</i>	NAF
[۳۷]	<i>Aspergillus niger</i>	AnAFP
[۴]	<i>Aspergillus clavatus</i>	AcAFP
[۱۲]	<i>Aspergillus clavatus</i>	AcAMP
[۲۸]	<i>Aspergillus giganteus</i>	AFP
[۳۹]	<i>Fusarium spp</i>	FPAP

این قبیل صورت گرفته و مکانیسم‌های متنوعی برای آن‌ها مطرح گردیده است (جدول ۱). **Error! Reference source not found.** این پپتیدها دارای بار مثبت بوده و پیشنهاد شده است که با بار منفی ترکیبات غشای پلاسمایی مانند لیپیدها و پروتئین‌ها برهمکنش و موجب نفوذپذیری انتخابی غشاء شده و پس از آن منافذ انتقالی را تشکیل می‌دهند. در پی این نفوذپذیری، پپتید وارد سلول شده و موجب فرآیندهای بعدی مانند افزایش سطح اکسیژن فعال می‌گردند (۶ و ۷). مکانیسم پیشنهادی که برای پپتید AFP مطرح شده است، مبین مهار ساخت دیواره سلولی از طریق تداخل در عمل آنزیم کیتین سنتاز بوده که در پی آن دیواره سلولی ناپایدار شده و رشد قارچ متوقف می‌گردد (۸). پپتید PAF پپتید دیگری از این خانواده می‌باشد که از قارچ *Penicillium chrysogenum* جداسازی شده (۹) و بررسی‌های مختلفی مانند بررسی سمیت سلولی آن بر روی سلول‌های پستانداران (۱۰) و کاربرد دارویی آن برای مقابله با آسپرژیلوزیس مهاجم ریوی مورد بررسی قرار گرفته است (۱۱). در سال ۲۰۱۰ آقای Mohamed Hajji موفق به تخلیص و بررسی خواص بیوشیمیایی پپتید ضد میکروبی موسوم به AcAMP از قارچ *Aspergillus clavatus* ES1 گردید. خصوصیات منحصر بفرد این پپتید مانند پایداری در دمای بالا و طیف ضد میکروبی گسترده، موجب شده تا این پپتید به‌عنوان کاندیدی مناسب برای مقابله با عوامل میکروبی مطرح گردد (۱۲). با توجه به این ویژگی‌ها، شناسایی و تخلیص طبیعی این پپتید در قارچ بومی ایران و همچنین شناسایی

نوع پرایمر	توالی	تعداد نوکلئوتید	Tm (C°)
Forward	ACCTCGCGAATGCATCTAG	۱۹	۵۶٫۵
Reverse	ATTACGCCAAGCTTGCATG	۱۹	۵۶٫۱

در دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی با نسبت یک (بافر نمونه) به پنج (نمونه) با بافر نمونه (Sample buffer) دارای غلظت ۵x مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. در نهایت نمونه‌های تیمار شده توسط ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) ۱۵ درصد از لحاظ بیان پروتئین نوترکیب بررسی شدند (۱۵).

تخلیص پپتید نوترکیب: پس از مشاهده ی بیان پروتئین نوترکیب، با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-NAT (شرکت Qiagen) با بکارگیری روش دناتوره اوره دارای شیب کاهشی اسیدیته اقدام به خالص سازی پروتئین نوترکیب شد و در انتها از محلول ۲۰ میلی مولار MES به منظور آماده سازی ستون برای استفاده بعدی استفاده شد. غلظت پروتئین خالص شده با کمک روش میکرو بردفورد با به کار گیری BSA به عنوان استاندارد تعیین گردید.

تزریق پپتید نوترکیب به موش سوری و بررسی روند تولید آنتی بادی: به منظور تولید آنتی بادی پلی کلونال، با توجه به رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات، از ۵ عدد موش به عنوان تست و ۴ عدد به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای هر موش، ۲۰ میکروگرم پروتئین تخلیص شده با PBS استریل به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. جهت آماده سازی نمونه‌ها برای تزریق، هم حجم آن ادجوانت روغن در آب اضافه گردید (حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر برای هر سر موش) و پس از همگن سازی محتویات، به صورت داخل صفاقی به موش‌ها در ۴ نوبت تزریق و پس از هر تزریق (به جز تزریق اول) به منظور بررسی میزان آنتی بادی تولیدی، خون گیری صورت پذیرفت (جدول ۳

SalI صورت پذیرفت. پس از هضم آنزیمی، وکتور pET-28a(+) برش خورده نیز با استفاده از کیت، از روی ژل آگارز خالص سازی شد (۱۴).

واکنش الحاق به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و بمدت ۱۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد توسط آنزیم T4 DNA Ligase شرکت فرمنتاز صورت گرفت. محصول الحاق، با روش شوک حرارتی به سلول‌های سلول‌های مستعد (تهیه شده به روش شیمیایی) /شریشیا کولی سویه BL21 DE3 تراریخت گردیده و کلنی‌های نوترکیب با غربال‌گری آنتی‌بیوتیکی کانامایسین جدا شدند و حضور پلاسمید حاوی acamp با استفاده از PCR و توالی یابی ژنی، مورد تأیید قرار گرفت (۱۴)

بیان ژن مولد پپتید نوترکیب: به منظور بیان ژن acamp از کشت شبانه ی کلون‌های تراریخت کشت شبانه صورت پذیرفته و سپس کشت شبانه به ۱۰۰ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین تلقیح و پس از رسیدن OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰٫۸ ماده القا کننده پروموتور (IPTG) فرمنتاز با غلظت نهایی ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده شد. کشت حاصل، به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به منظور تولید پروتئین نوترکیب قرار گرفت (۱۳ و ۱۴). سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری شده در مرحله فوق به روش دناتوره با به کار گیری اوره ۸ مولار تیمار شدند. به این صورت که به رسوب باکتری، ۵ میلی لیتر محلول دارای اوره با غلظت ۸ مولار افزوده شده و پس از همگن سازی، دیواره سلولی با به کارگیری سونیکاسیون شکسته شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور

جدول ۳- برنامه زمانی و نحوه تزریقات و خونگیری

شماره تزریق/خون گیری	روز	مقدار AG / موش	همراه
تزریق اول	۱	۲۰ میکروگرم	ادجوانت روغن در آب
تزریق دوم	۱۴	۲۰ میکروگرم	ادجوانت روغن در آب
خونگیری اول	۲۱	***	***
تزریق سوم	۲۸	۲۰ میکروگرم	ادجوانت روغن در آب
خون گیری دوم	۳۵	***	***
تزریق چهارم	۴۲	۲۰ میکروگرم	ادجوانت روغن در آب
خون گیری سوم	۴۹	***	***

در هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر بارگذاری شد. به محض ظهور رنگ در نمونه‌های کنترل، واکنش با اسید سولفوریک ۲،۵ مولار متوقف و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. تأیید آنتی بادی تولید شده با استفاده از لکه گذاری وسترن: به‌منظور تأیید تولید آنتی بادی توسط پپتید نوترکیب، از تکنیک وسترن بلات (Western Blotting) استفاده شد. بلاتینگ

نمونه‌ها، روی کاغذ PVDF انجام شد. ۱۰ میکروگرم از پروتئین در الکتروفورز پلی آکریل آمید ۱۵٪ بارگذاری شده و ژل اجرا شد. از محلول شامل تریس ۲۵ میلی مولار، گلیسین ۱۹۲ میلی مولار و اتانول ۲۰ به‌منظور بافر بلاتینگ استفاده شد. فرآیند بلاتینگ در آمپر ثابت ۲۰۰ به مدت ۲ ساعت انجام شد. به‌منظور پرکردن جایگاه‌های خالی کاغذ، پس از اتمام عمل بلاتینگ به مدت یک شب در محلول ۵ درصد شیرخشک در PBST در ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شد. کاغذ با آنتی بادی‌های پلی کلونال حاصل از خونگیری نهایی با رقت ۱:۱۰۰۰ در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت گرماگذاری شد. کونژوگه موشی با رقت ۱:۲۵۰۰ بعنوان آنتی بادی ثانویه تشخیص دهنده بکار رفت. همانند مرحله قبل گرماگذاری انجام شد. در حدفاصل تمامی مراحل کاغذ PVDF سه مرتبه با محلول PBST به مدت ۱۰ دقیقه شستوشو داده شد. نهایتاً، کاغذ نیتروسولوز در محلول سوبسـترای رنگ زای DAB (Diaminobenzidine) (۶۰ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۷،۸) تا ظهور باند پروتئینی، قرار داده شد. برای توقف واکنش، آب مقطر اضافه شد (۱۸).

آنالیز آماری: به‌منظور بررسی نتایج حاصل از الایزا، از آنوای یک طرفه برای اندازه گیری های مکرر استفاده شده و میزان $P < 0/05$ به‌عنوان سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد. به‌منظور انجام محاسبات از بسته های نرم افزار آماری R نسخه ۳،۴،۱ (۱۹) با رابط کاربری R Studio نسخه ۱،۱،۴۲۳ استفاده شد.

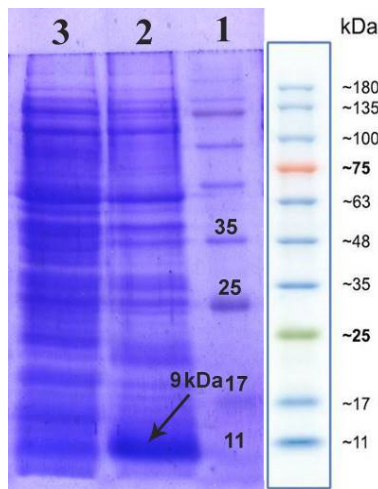
یافته‌ها

شماره تزریق/خون گیری	روز	مقدار Ag / موش	همراه
تزریق اول	۱	۲۰ میکروگرم	ادجوانت روغن در آب
تزریق دوم	۱۴	۲۰ میکروگرم	ادجوانت روغن در آب
خونگیری اول	۲۱	***	***
تزریق سوم	۲۸	۲۰ میکروگرم	ادجوانت روغن در آب
خون گیری دوم	۳۵	***	***
تزریق چهارم	۴۲	۲۰ میکروگرم	ادجوانت روغن در آب
خون گیری سوم	۴۹	***	***

(۱۶ و ۱۷).

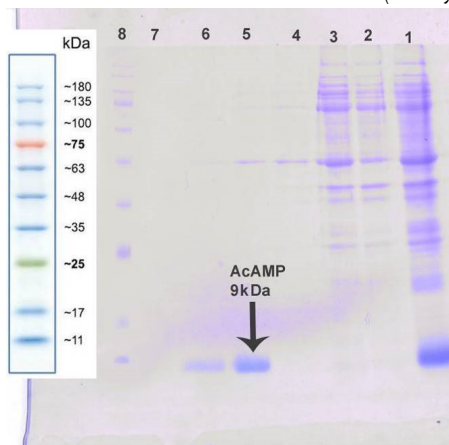
بررسی روند تولید آنتی بادی: به‌منظور بررسی روند تولید آنتی بادی از الایزا غیر مستقیم، همان طور که توسط (۱۷) گفته شده است، استفاده شد. به‌طور مختصر، مقدار ۲،۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب محلول در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ (Cotting Buffer) داخل هر یک از چاهک‌های الایزا ریخته شد. سپس میکروپلیت به مدت یک شب در دمای ۴ درجه قرار داده شد. پس از آن چاهک‌ها با بافر PBST (-Phosphate Buffered Saline-Tween) شستشو شد. به‌منظور مسدود سازی قسمت‌های خالی چاهک از محلول ۵ درصد شیر خشک در PBST به حجم ۲۰۰ میکرو لیتر در چاهک و گرماگذاری در انکوباتور ۳۷ درجه دارای شیکر به مدت ۱ ساعت استفاده شد. سریال رقت سرم از ۱ میکرولیتر در ۱۰۰ میکرو لیتر PBST در چاهک اول شروع شد و تیتراسیون تا ۶ مرحله ادامه یافت، به چاهک کنترل حاوی آنتی ژن، ۱۰۰ میکرولیتر PBST و به چاهک کنترل حاوی آنتی بادی، ۱۰۰ میکرولیتر از سرم با رقت چاهک اول افزوده شد. سپس، میکروپلیت به مدت ۱ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. کونژوگه موشی با رقت ۱:۲۵۰۰ محلول در PBST به‌عنوان آنتی بادی ثانویه مورد استفاده قرار گرفته و در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر بارگذاری گردید. سپس پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. از ماده ی OPD محلول در بافر سیترات به‌عنوان ماده رنگ زا استفاده شده و

گرفت و قطعه مورد نظر (۲۳۰ جفت باز) از لحاظ اندازه با ژن هدف ما همخوانی داشت (شکل ۲). بیان پپتید نو ترکیب: برای بررسی بیان ژن *acamp* در وکتور pET28a(+) پس از کشت سلول‌ها و القاء با IPTG بیان ژن صورت پذیرفت و پس از تیمار خام بر روی ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). با توجه به شکل بانده پروتئینی مورد نظر در محدوده ۹



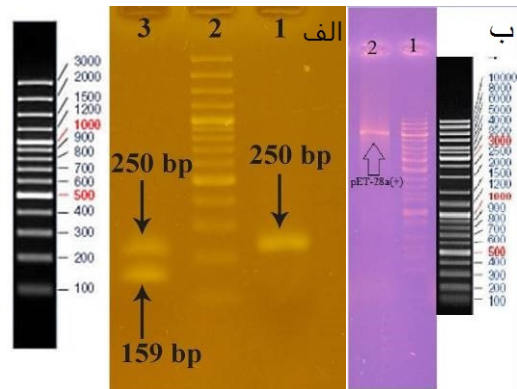
شکل ۱- الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE به منظور بررسی بیان پروتئین نو ترکیب

ردیف ۱: مارکر پروتئینی ۳۱۰۰۰۳، ردیف ۲: محتوی پروتئینی باکتری‌هایی که پس از رسیدن جذب نوری آنها به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ماده IPTG القا شده‌اند (بافر لیزکننده B). ردیف ۳: کنترل منفی که در آن باکتری‌ها پس از رسیدن جذب نوری به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ماده IPTG القا نشده‌اند (بافر لیزکننده B).



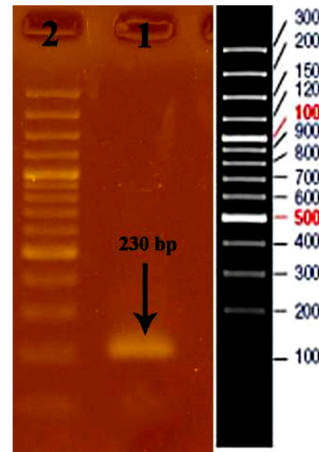
شکل ۲- خالص سازی پپتید نو ترکیب AcAMP با استفاده از ستون نیکل

ستون ۱: پروتئین کروم، ستون ۲: محلول flow، ستون ۳: محلول اوره ۸ مولار با pH ۳، ستون ۴: محلول اوره ۸ مولار با pH ۵، ستون ۵: محلول اوره ۸ مولار با pH ۴، ستون ۶: محلول ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار، ستون ۷: بافر MES ۲۰ میلی مولار، ستون ۸: مارکر پروتئینی



شکل ۳- آماده سازی قطعات به منظور الحاق

الف (تکثیر قطعه ژنی *acamp* از وکتور pUC57 و برش آنزیمی آن بر روی ژل آگارز ۲ درصد. الف) چاهک ۱: محصول PCR قطعه ژنی. چاهک ۲: مارکر DNA #SM0323. چاهک ۳: برش آنزیمی محصول PCR. ب) الکتروفورز واکنش هضم دوگانه پلاسمید pET-28a(+)- الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی وکتور pET28a بر روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک ۱: مارکر اسید نوکلئیک #SM0311، چاهک ۲: پلاسمید پرش خورده



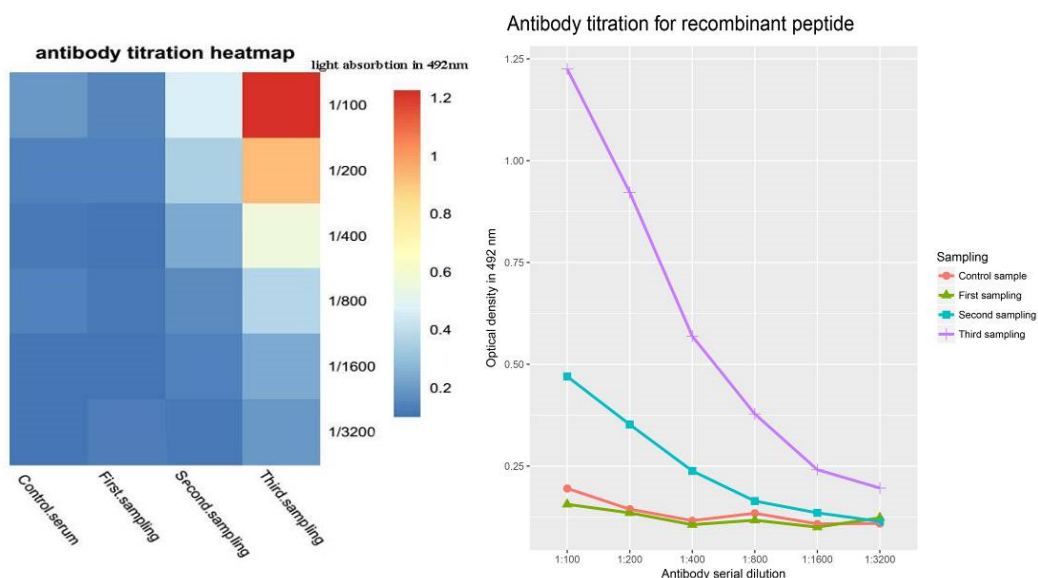
شکل ۴- تأیید زیرهمسانه‌سازی ژن هدف در pET-28a(+)

از راست به چپ: چاهک ۱: محصول PCR قطعه ژنی *acamp*-pET28a، چاهک ۲: نشانگر DNA ۱۰۰ جفت بازی #SM0323

ساخت سازه ژنی: به منظور همسانه سازی،

قطعه ژنی *acamp* (۱۵۹ جفت باز) از وکتور pUC57 بوسیله دستگاه PCR تکثیر و مورد هضم دوگانه آنزیمی قرار گرفت. همان طور که در تصویر مشخص است بازدهی برش ۱۰۰ درصد نبوده و همچنان قسمتی از آن برش نخورده باقی مانده است (شکل ۱- الف). وکتور بیانی pET-28a(+) بعد از برش آنزیمی خالص سازی شد (شکل ۳- ب).

برای تأیید همسانه سازی از روش PCR به وسیله پرایمرهای عمومی و توالی یابی استفاده شد. پس از تکثیر ژن *acamp* به روش PCR، محصول روی ژل ۲٪ آگارز مورد ارزیابی قرار



نمودار ۱- بررسی روند تولید آنتی بادی. از راست به چپ به ترتیب ۱- نمودار heatmap تولید آنتی بادی ۲- نمودار خطی تولید آنتی بادی در موش آزمایشگاهی

بررسی روند تولید آنتی بادی: به منظور ارزیابی آنتی بادی تولید شده از روش الایزای غیر مستقیم استفاده شد. یک هفته بعد از هر بار تزریق (به استثنای تزریق اول) از موش‌های تست و شاهد خونگیری به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آن‌ها، آزمایش الایزا انجام شد. نمودار heatmap و نمودار خطی تیتراژ آنتی بادی در نمودار ۱ نشان داده شده است. تحلیل آماری نتایج، فرض یکسان بودن تیتراژ آنتی بادی در نمونه‌گیری‌ها را رد کرده و تولید افزایشی آنتی بادی ($P=0.00148$) را تایید می‌نماید.

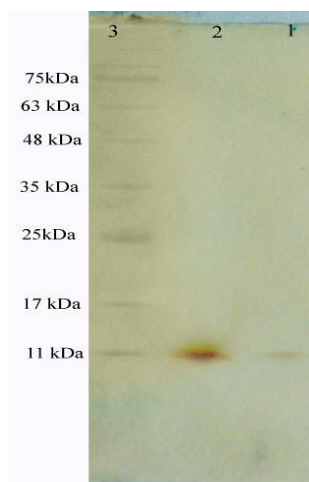
تأیید آنتی بادی تولید شده با استفاده از لکه گذاری وسترن: به منظور تأیید نهایی آنتی بادی تولید شده از لکه گذاری وسترن استفاده شده و تولید آنتی بادی مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۵).

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر مقاومت‌های میکروبی به چالشی بزرگ و تهدیدی برای جامعه‌ی انسانی تبدیل شده فلذا توجه بسیاری از پژوهش‌ها به توسعه‌ی موادی با فعالیت ضد میکروبی معطوف شده است (۲۰). در این میان پپتیدهایی با فعالیت ضد میکروبی و بعضاً ضد سرطانی توجه ویژه‌ای را به خود جلب نموده و این امید وجود دارد تا با

کیلو دالتون مشاهده شد.

تخلیص پپتید نو ترکیب: به منظور خالص سازی پپتید نو ترکیب از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل استفاده شد و ستون با محلول‌های اوره ۸ مولار که دارای شیب اسیدیته افزایشی بودند شست و شو شد. در انتها به منظور شست و شوی کامل ستون و آماده سازی ستون برای استفاده‌های بعدی به ترتیب از محلول ایمیدازول با غلظت ۲۵۰ میلی مولار pH 8 و بافر MES با غلظت ۲۰ میلی مولار استفاده شد (شکل ۲)



شکل ۵- تأیید آنتی بادی تولید شده با لکه گذاری وسترن. (۱) باکتری القا نشده با IPTG (۲) نمونه القا شده با IPTG (۳) مارکر پروتئینی

اینکلوژن بادی ها می باشد (۲۵) همچنین با توجه به ناشناخته بودن مکانیسم سمیت آن این احتمال وجود دارد که سمیت آن از طریق خارج سلولی اعمال می شود (۲۶). بیان پروتئین نوترکیب در *شریشیا کولی* به عنوان ابزاری کاربردی و مستمر در تولید پروتئین های که توسط ژن های موجودات از سلسله های مختلف کد می شود محسوب گردیده و به همین علت این سیستم بیانی در راستای تولید آنتی ژن به منظور تولید آنتی بادی به طور گسترده مطالعه شده است (۲۷). هدف اصلی این پژوهش تولید نوترکیب پپتید AcAMP به عنوان منبع آنتی ژن و تولید آنتی بادی برای آن می باشد؛ با این حال ایمنی زایی پایین این پپتید را می توان به عنوان یافته ای جانبی، جالب توجه و بسیار پر اهمیت در نظر گرفت که زمینه را برای بررسی های آتی مانند اثر تولید پادتن بر ضد دارو (Antidrug antibody) فراهم نماید. همان گونه که در مورد plectasin، دیفنسین جدا شده از قارچ *Pseudoplectania nigrella* این تداخل بررسی و نتایج جالب توجهی را به همراه داشته است (۲۸). این یافته منطبق بر گزارش های دیگر مبنی بر پایین بودن ایمنی زایی پپتید های میکروبی می باشد (۲۹). بررسی روند تولید آنتی بادی پپتید نوترکیب نشان دهنده ی تولید ناچیز آنتی بادی در تزریقات دوم و سوم می باشد که احتمالاً به علت ایمنی زایی کم این پپتید می باشد. با این حال افزایش میزان تولید آنتی بادی پس از تزریق چهارم نکته ای حائز اهمیت می باشد. با توجه به اینکه استفاده از ادجوانت و نوع آن نقش بسزایی در تولید آنتی بادی دارد (۳۰)، استفاده از سایر ادجوانت ها می تواند به عنوان گزینه ای قابل تغییر برای افزایش یا کاهش میزان آنتی بادی مورد توجه قرار گیرد. به منظور اطمینان بیشتر از آنتی بادی تولید شده، و جلوگیری از پاسخ های کاذب، از لکه گذاری وسترن استفاده و تولید آنتی بادی مورد تأیید قرار گرفت. با توجه به کاربردهای روز افزون آنتی بادی هایی از این قبیل در شناسایی پپتیدها در پژوهش های مختلف مانند تولید پپتید در گیاهان تراریخته (۳۱) و شناسایی مکانیسم های مولکولی این پپتیدها (۳۲) این امید وجود دارد تا

تکیه بر آن ها بتوان با مقاومت های میکروبی و شاید سرطان مقابله نمود (۲۱). تولید نوترکیب این پپتیدها، به علت کوچک بودن ژن، سمیت برای میزبان و بعضاً حضور کدون های کمیاب همواره با چالش هایی رو برو بوده و به همین دلیل استراتژی های مختلفی مانند امتزاج آن به تیوردوکسین (Thioredoxin-Trx) در حامل بیانی pET32 که برای بیان بسیاری از پپتید های ضد میکروبی استفاده می شود (۲۲)، و یا نامحلول سازی پپتید با استفاده از امتزاج آن به کتوستروئید ایزومراز (Ketostroid isomerase-KSI) در حامل بیانی pET31 به همان شکلی که برای تولید نوترکیب سکروپین (cecropin) استفاده شد (۲۳). برای بیان نوترکیب آن ها به کار گرفته می شود تا بر اساس هدف پروژه، پپتید به شکلی مطلوب بیان شود. با توجه به کوتاه بودن دنباله ی هیستیدین، ایمنی زایی پایین و بعضاً عدم نیاز به جداسازی دنباله ی هیستیدین در حامل بیانی pET28a، این حامل برای بیان انتخاب گردیده و پپتید نوترکیب AcAMP با موفقیت درون حامل بیانی pET28a بیان شد. در ابتدا سعی شد تا قطعه ژنی با استفاده از هضم آنزیمی دوگانه جداسازی شده و همسازسازی صورت پذیرد اما به علت کوچک بودن اندازه قطعه (۱۵۹ جفت باز) و همچنین کم بودن بازدهی برش، این عمل میسر نشد به همین دلیل قطعه با به کار گیری PCR تکثیر و همسازسازی صورت پذیرفت. باکتری *شریشیا کولی* به علت سادگی نسبی، ارزان قیمت بودن، ترکم بالای کشت و ژنتیک شناخته شده اش، در بسیاری از مطالعات به منظور تولید پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار می گیرد. مخصوصاً تنوع پلاسمید های موجود و سویه های جهش یافته، موجبات پیشرفت در توانایی بیان با این باکتری را فراهم نموده و باعث شده که این باکتری در اکثر مواقع برای تولید پروتئین نوترکیب انتخاب گردد (۲۴). گزارش ها حاکی از سمیت پپتید طبیعی AcAMP برای باکتری ها از جمله *شریشیا کولی* می باشد (۱۲) با این وجود در پروسه ی بیان پپتیدی نوترکیب تداخل و سمیتی برای *شریشیا کولی* دیده نشد که احتمالاً به علت تشکیل

chrysogenum-derived antifungal peptide shows no toxic effects on mammalian cells in the intended therapeutic concentration. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*; 2005. 371: 122-32.

11. Palicz Z, Gáll T, Leiter E, Kollár S, Kovács I, Misztai-Blasius K, et al. Application of a low molecular weight antifungal protein from *Penicillium chrysogenum* (PAF) to treat pulmonary aspergillosis in mice. *Emerg Microbes Infect*; 2016. 5:e114.

12. Hajji M, Jellouli K, Hmidet N, Balti R, Sellami-Kamoun A, Nasri M. A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: biochemical and molecular characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 2010. 37:805-13.

13. Barrell PJ, Liew OW, Conner AJ. Expressing an antibacterial protein in bacteria for raising antibodies. *Protein Expr Purif*; 2004. 33:153-9.

14. Joseph S, David WR. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Gold Spring Harbor; 2001.

15. Bollag D, Rozycki M, Edelstein S. *Protein methods*. 2nd eds. USA.: Wiley-Liss Press; 1996.

16. Masoudi Kerahroudi M, Honari M, Abdollahi M. Expression of B1f1-Stx B gene cassette in *E. coli* and investigation antibody titer in mice. *USA. SSU J*; 2017. 24:876-86.

17. Abdollahi M, Honari H, Nazarian S, Masoudi kerahroudi M. Subcloning and expression of SO6 gene, *Saponaria officinalis* plant in *E. coli* and investigation of antibody titer in rats. *USA. J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci*; 2017. 24:1024-33.

18. Tonello F, Pellizzari R, Pasqualato S, Grandi G, Peggion E, Montecucco C. Recombinant and truncated tetanus neurotoxin light chain: cloning, expression, purification, and proteolytic activity. *Protein Expr Purif*; 1999. 15:221-7.

19. Team RC. R: A language and environment for statistical computing," Vienna, Austria 2013.

20. Singh N, Abraham J. Ribosomally synthesized peptides from natural sources. *J Antibiot*; 2014. 67:277.

21. Gaspar D, Veiga AS, Castanho MA. From antimicrobial to anticancer peptides: A review. *Front Microbiol*; 2013 - frontiersin.org.

22. Xu X, Jin F, Yu X, Ji S, Wang J, Cheng H, et al. Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*; 2007. 53:293-301.

23. Zorko M, Japelj B, Hafner-Bratkovič I, Jerala R. Expression, purification and structural studies of a short antimicrobial peptide. *Biochim Biophys Acta*; 2009. 1788:314-23.

24. Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotech*; 2005. 115:113-28.

با استفاده از آنتی بادی تولید شده بتوان به شناسایی پپتید طبیعی در قارچ *A.clavatus* بومی ایران پرداخته و مسیر همواری برای مطالعات بعدی فراهم گردد. همچنین امید است که این پژوهش توانسته باشد به عنوان گامی مؤثر در تولید و استفاده کاربردی دانش در این مرز و بوم رسالت خود را به انجام رسانیده باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از اساتید، پژوهشگران و کارکنان مرکز و گروه زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) که در این پژوهش از لحاظ علمی و مالی ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر می شود.

منابع

1. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol*; 2011. 29:464-72.

2. Akkam Y. A review of antifungal peptides: Basis to new era of antifungal drugs. *JJPS*; 2016. 9.

3. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *PMC*; 2014. 6:25.

4. Skouri-Gargouri H, Gargouri A. First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. *Peptides*; 2008. 29:1871-7.

5. Marx F. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. *Appl Microbiol Biotechnol*; 2004. 65:133-42.

6. Meyer V. A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl Microbiol Biotechnol*; 2008. 78:17-28.

7. Hegedüs n, Marx F. Antifungal proteins: more than antimicrobials?. *Fungal Biol Rev*; 2013. 26:132-45.

8. Hagen S, Marx F, Ram AF, Meyer V. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Appl Environ Microbiol*; 2007. 73:2128-34.

9. Marx F, Haas H, Reindl M, Stöffler G, Lottspeich F, Redl B. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* paf gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene*; 1995. 167:167-71.

10. Szappanos H, Szigeti GP, Pál B, Rusznák Z, Szűcs G, Rajnavölgyi E, et al. The *Penicillium*

JG.Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol*; 1997. 1340:81-7.

39. Galgóczy L, Virágh M, Kovács L, Tóth B, Papp T, a Vágvölgyi C. Antifungal peptides homologous to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) are widespread among *Fusaria*. *Peptides*; 2013. 39:131-7.

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

26. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front Cell Infect Microbiol*; 2016. 6:194.

27. Rancour DM, Backues SK, Bednarek SY. Protein antigen expression in *Escherichia coli* for antibody production. *Immunoelectron Microscop*; 2010. 3-20.

28. Brinch KS, Frimodt-Møller N, Høiby N, Kristensen HH. Influence of antidrug antibodies on plectasin efficacy and pharmacokinetics. *Antimicrob Agents Chemother*; 2009. 53:4794-800.

29. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*; 2002. 415:389.

30. Fogg CN, Americo JL, Lustig S, Huggins JW, Smith SK, Damon I, et al. Adjuvant-enhanced antibody responses to recombinant proteins correlates with protection of mice and monkeys to orthopoxvirus challenges. *Vaccine*; 2007. 25:2787-99.

31. Coca M, Bortolotti C, Rufat M, Penas G, Eritja R, Tharreau D, et al. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *J Plant Mol Biol*; 2004. 54:245-59.

32. Oberparleiter C, Kaiserer L, Haas H, Ladurner P, Andratsch M, Marx F. Active internalization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF in sensitive aspergilli. *Antimicrob Agents Chemother*; 2003. 47:3598-601.

33. Kovács L, Virágh M, Takó M, Papp T, Vágvölgyi C, Galgóczy L. Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). *Peptides*; 2011. 32:1724-31.

34. Batta G, Barna T, Gaspari Z, Sandor S, Kövér KE, Binder U, et al. Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF—a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. *Febs J*; 2009. 276:2875-90.

35. Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito MJ, Asensio MA. Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides*; 2010. 31:541-547.

36. Geisen RP. *nalgiovense* carries a gene which is homologous to the *paf* gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. *Int J Food Microbiol*; 2000. 62:95-101.

37. Lee DG, Shin SY, Maeng CY, Jin ZZ, Kim KL, Hahm KS. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem Biophys Res Commun*; 1999. 263:646-51.

38. Martínez-Ruiz A, del Pozo AMN, Lacadena J, Mancheño JM, Oñaderra M, Gavilanes

Cloning and expression of AcAMP *Aspergillus clavatus* in *E. coli* and investigation of its antibody titration in mice

Ehsan Zamani, MSc student of Cellular and Molecular Biology, Department of Biological Science, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran.

Jamil Zargan, PhD, Assistant Professor of Toxicology, Department of Biological Science, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran.

***Hossein Honari**, PhD, Associate Professor of Molecular genetics, Department of Biological Science, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran (*Corresponding author).
honari.hosein@gmail.com

Abstract

Background: Antimicrobial peptides have been considered as the key to change in the current antibiotics. AcAMP, Antimicrobial peptide is one of them, which has been purified from the *Aspergillus clavatus* ES1 fungus, and its biochemical properties and characterization indicate that this peptide has unique properties. The aim of this study was to express the gene of AcAMP peptide in *Escherichia coli* (*E. coli*) and investigate its antibody titration in mice.

Methods: In this experimental study, the AcAMP peptide-producing gene with BamHI and Sall enzymes was amplified from pUC57 containing gen using PCR and cloned to pET28a expression vector (+) and transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3) in the next step. The expression of the AcAMP recombinant protein was induced by IPTG and purified by the affinity Ni-NTA chromatography. The recombinant protein was confirmed using Western blotting. Mice were intraperitoneally immunized with purified protein, and IgG titration was measured by ELISA method.

Results: The recombinant pET28a (+) expression vector was confirmed by PCR and sequencing. The 9 kDa produced protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. Antibody production process, using indirect ELISA, indicates the increasing trend of antibodies titration, especially after the fourth injection.

Conclusion: Purified recombinant AcAMP peptide and produced antibody can be used in antimicrobial research such as antimicrobial activity characterization of recombinant peptide and peptide identification in various applications.

Keywords: *Aspergillus clavatus*, Antimicrobial peptides, AcAMP peptide, Laboratory mice, Antibody titration