



هفتمین کنفرانس علوم دامی ایران



بررسی اثرات ضد باکتریایی پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری بر رشد و تکثیر باکتری های استحصال شده از گاوهای مبتلا به ورم پستان در شرایط آزمایشگاهی

سیده زهرا موسوی^۱، مجتبی طهمورث پور*^۲، محمد هادی سخاوتی^۳، علی جوادمنش^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

۲. هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

۳. هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

۴. هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

ایمیل نویسنده مسئول: Tahmoores@um.ac.ir

چکیده

با توجه به اینکه بیماری ورم پستان خسارات مختلفی را بر صنعت و سلامت می‌گذارد، جایگزین کردن آنتی‌بیوتیک‌ها با ترکیباتی که اثرات جانبی ندارند حائز اهمیت خواهد بود. در این تحقیق از باکتری های سالمونلا و کلی‌فرم استخراج شده از گاو مبتلا به بیماری ورم پستان استفاده شد و اثرات مهارکنندگی پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری بر روی رشد و تکثیر این باکتری بررسی گردید. به منظور بررسی این اثر، از حجم‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ میکرولیتر از مایع سطحی محیط کشت سلول‌های HEK ۲۹۳ تراریخت شده با ژن کد کننده پپتید لاکتوفرین شتری استفاده گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. آنالیز آماری نتایج به دست آمده از روش انتشار از دیسک به منظور بررسی اثرات ممانعت‌کنندگی رشد با نرم افزار SAS اختلاف معنی‌داری را بین میانگین قطر هاله های عدم رشد باکتری برای پپتید نو ترکیب شتری نشان داد. با افزایش میزان حجم از این پروتئین قطر هاله عدم رشد باکتری یا به عبارتی میزان کشندگی افزایش یافت. علاوه بر این محیط کشت های حاوی پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری لئوفلاز گردید و اثرات ضد باکتریایی پودر حاصل پس از رقیق سازی در آب مجدداً بررسی شد که حاکی از فعال بودن این پپتید پس از لئوفلاز شدن داشت. نتایج به دست آمده در این مطالعه پتانسیل پپتیدهای طبیعی و خواص ضد باکتریایی آن‌ها را نشان داد. امید است در آینده بتوان از این ترکیبات به عنوان مکملی برای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد.

واژگان کلیدی: شتر- پپتید نو ترکیب- لاکتوفرین- لئوفلاز

مقدمه

ورم پستان از مهم‌ترین بیماری‌های صنعت گاوهای شیری است که زیان‌های اقتصادی زیادی را در پی دارد و سهم قابل توجهی از هزینه‌های درمانی گاو‌داری‌ها را به خود اختصاص می‌دهد (۵). این بیماری معمولاً در پاسخ به عفونت‌های باکتریایی در داخل پستان رخ می‌دهد (۱۰). به‌طور کلی عوامل ایجادکننده‌ی ورم پستان به دو دسته عوامل واگیردار و عوامل محیطی تقسیم‌بندی می‌شوند که از حیث اپیدمیولوژی با یکدیگر تفاوت دارند (۱). رایج‌ترین راه برای درمان این بیماری در گاو تزریق درون پستانی آنتی‌بیوتیک است (۳، ۶).



هفتمین کنفرانس علوم دامی ایران



متأسفانه امروزه تجویز و استفاده از آنتی بیوتیک ها به صورت ابداعی و خلاف دستورالعمل در درمان گاوها رو به افزایش است که موجب ایجاد پسماند دارویی در شیر آنها شده است. این باقی مانده های دارویی در شیر به یکی از مهم ترین نگرانی های سلامت غذایی در جامعه تبدیل شده است (۱). ازین رو محققان به دنبال یافتن ترکیباتی جایگزین آنتی بیوتیک ها با منشا طبیعی هستند که از این ترکیبات ضد میکروبی می توان به پپتیدهای کاتیونی مانند پروتئین لاکتوفرین اشاره کرد (مارشال، ۲۰۰۳). فعالیت های ضد میکروبی لاکتوفرین مختص به فرم کامل پروتئین نیست، بلکه هریک از لوب ها به تنهایی و همچنین پپتیدهای فعال لاکتوفرین نیز دارای فعالیت های ضد میکروبی می باشند (۹). در این مطالعه سعی خواهد شد اثر پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری بر روی رشد و تکثیر سویه باکتری سالمونلا و کلی فرم استحصال شده از گاوهای مبتلا به ورم پستان بررسی گردد.

مواد و روش ها

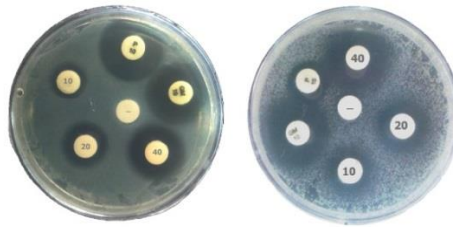
باکتری مورد بررسی: باکتری سالمونلا و کلی فرم از گاوهای مبتلا به ورم پستان از گاوداری اطراف شهر اصفهان استحصال گردید. تهیه پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری: پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری از آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. این پپتید به صورت نو ترکیب در سلول های HEK-۲۹۳ بیان می شود و به نحوی که پس از بیان در سلول های تراریخته به صورت یک پپتید ترشحی از سلول ها به داخل محیط کشت ترشح می شود. محیط کشت DMEM (آلمان-Gibo) حاوی این پپتید به عنوان گروه های تیمار در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. روش انتشار از دیسک: برای انجام این آزمایش از محیط کشت مولر هیتون آگار تهیه شده از شرکت کیولب استفاده شد. از استاندارد نیم مک فارلند تهیه شده از شرکت بهارافشان برای سنجش میزان کدورت باکتری استفاده گردید. برای تهیه دیسک ها، میزان ۴۰،۲۰،۱۰ میکرو لیتر از مایع محیط کشت DMEM حاوی پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری به دیسک های خام اضافه گردید. برای کنترل مثبت از دیسک آماده آنتی بیوتیک جنتامایسین و پنی سیلین و برای کنترل منفی نیز از محیط کشت DMEM فاقد این پروتئین استفاده شد. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. در این آزمایش از طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار، تجزیه و تحلیل به وسیله نرم افزار SAS استفاده شد. در انتها قطر هاله های عدم رشد باکتری بررسی گردید. همچنین محیط کشت DMEM حاوی پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری توسط دستگاه Freez_Dry (آلمان-VACUUBRAND) مطابق دستورالعمل لئوفلایز شد و به میزان ده برابر وزن آن با آب دوبار تقطیر شده مخلوط گردید و مقدار ۴۰ میکرو لیتر از آن به دیسک ها تزریق شد و مطابق با آزمایش قبل بررسی های مورد نظر انجام شد.

نتایج

تجزیه و تحلیل آماری داده های به دست آمده از قطر هاله های عدم رشد به کمک نرم افزار SAS نشان داد اثر کشندگی بین حجم های ۴۰،۲۰،۱۰ میکرو لیتر از محیط حاوی پپتید نو ترکیب شتری بر روی باکتری های سالمونلا و کلی فرم معنی دار می باشد ($p < 0.0001$). مقایسه ی میانگین با استفاده از رویه توکی در هر دو باکتری نشان داد با افزایش میزان حجم از محیط حاوی پروتئین قطر هاله عدم رشد افزایش می یابد در نتیجه اثر ممانعت کنندگی رشد باکتری افزایش یافت (شکل ۱). کشندگی پروتئین لاکتوفرین در طیف گسترده ای از پاتوژن های گرم مثبت و گرم منفی بیماری زا، توسط محققین گزارش شده است (۲،۳).



هفتمین کنفرانس علوم دامی ایران



سالمونلا

کلی فرم

شکل ۱. اثرات ممانعت کنندگی از رشد باکتری سالمونلا و کلی فرم به وسیله حجم های مختلفی از محیط کشت حاوی پپتید نو ترکیب شتری

۱۰، ۲۰، ۴۰: میزان حجم ها از محیط کشت حاوی پپتید نو ترکیب شتری G و P: دیسک های آنتی بیوتیک به ترتیب جنتامایسین و پنی سیلین (۱۰ ng/ml) _: محیط فاقد پپتید نو ترکیب شتری

جدول ۱: نتایج تحلیل آماری داده های حاصل از قطر هاله عدم رشد باکتری های سالمونلا و کلی فرم در حجم های مختلف از محیط کشت حاوی پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری

باکتری	۱۰µl	۲۰ µl	۴۰µl	P	G	
کلی فرم	۱۳.۲±۰.۹۲ ^c	۱۵.۸±۰.۹۲ ^b	۱۸.۴±۰.۹۲ ^a	۱۰.۰۶±۰.۹۲ ^d	۱۹.۰۶±۰.۹۲ ^a	-
سالمونلا	۱۱.۲±۰.۸۸ ^c	۱۳.۹±۰.۸۸ ^b	۱۸.۴±۰.۸۸ ^a	۱۹.۶±۰.۸۸ ^a	۱۹±۰.۸۸ ^a	-

*قطر هاله ها بر مبنای میلی متر می باشد.

همچنین اثر لئوفلازیز کردن پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری بررسی شد (شکل ۲) و مشاهده گردید که لئوفلازیز کردن فعالیت ضدباکتریایی این پروتئین را از بین نبرده که این امر برای افزایش ماندگاری و پایداری پپتیدهای داروها حائز اهمیت است (۸).



شکل ۲: نتایج حاصل از اثرات لئوفلازیز کردن محیط کشت حاوی پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری

L: محیط کشت حاوی پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری لئوفلازیز شده N: محیط کشت پپتید نو ترکیب لئوفلازیز نشده G: آنتی بیوتیک های جنتامایسین (۱۰ ng/ml) _: محیط کشت فاقد پروتئین



نتایج به دست آمده در این مطالعه پتانسیل پپتیدهای طبیعی و خواص ضد باکتریایی آن‌ها را نشان داد. امید است در آینده بتوان از این ترکیبات به عنوان مکملی برای آنتی بیوتیک‌ها استفاده کرد.

منابع

۱. بلوئی راجر و ادموندسون پیتر. (۲۰۱۰). کنترل ورم پستان در گله‌های گاو شیری. تهران: پرتو واقعه. صفحه ۱۹.
۲. Antonini, G., Catania, M. R., Greco, R., Longhi, C., Pisciotta, M. G., Seganti, L., Valenti, P. ۱۹۷۷. Anti-invasive activity of bovine lactoferrin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, ۶۰: ۲۶۷-۲۷۱.
۳. Barkema, H.W., M.J. Green, A.J. Bradley, and R.N. Zadoks. ۲۰۰۹. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of Dairy Science*. ۹۲: ۴۷۱۷-۲۹.
۴. Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M. ۱۹۹۲. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Journal of Applied Microbiology*. ۷۳: ۴۷۲-۴۷۹.
۵. Bolourchi, M., Mokhber, DMR., Kasravi, R., Moghimi, EA., Hovareshti, P., et al. ۲۰۰۸. An estimation of national average of milk somatic cell count and production losses due to subclinical mastitis in commercial dairy herds in Iran. *Journal of Veterinary Research*, ۶۳:۲۶۳-۶.
۶. Guler, L., Ok, U., Gunduz, K., Gulcu, Y., Hadimli, H. H. ۲۰۰۵. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *Journal of Dairy Science*, ۸۸: ۳۱۴۹-۳۱۵۴.
۷. Marshall, S. H., Arenas, G. ۲۰۰۳. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*, ۶.
۸. Roy, I and Gupta, MN. ۲۰۰۴. Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Journal of Biotechnology and Applied Biochemistry*, ۳۹: ۱۶۵-۱۷۷.
۹. Sinha, M., Kaushik, S., Kaur, P., Sharma, S., and Singh, T.P. ۲۰۱۳. Antimicrobial Lactoferrin Peptides: The Hidden Players in the Protective Function of a Multifunctional Protein. *International Journal of Peptides*, ۳۹:۲۳۰.
۱۰. Zhao, X., Lacasse, P. ۲۰۰۸. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *Journal of animal Science*, ۸۶:۵۷-۶۵.



Study on the antibacterial effects of recombinant peptide of camel's lactoferrin on the growth and proliferation of in_vivo derived bacteria from mastitic cows

Abstract

mastitis have a different effects on industry's costs and health, replacing antibiotics with compounds without side effects is very important. In this study, Salmonella and coliform bacteria was extracted from cows mastitis and the effects of recombinant camel lactoferrin peptide inhibitory on the growth and proliferation of this bacteria was investigated. To study this effect, ۱۰, ۲۰, ۴۰ μl volumes of supernatant culture medium of HEK ۲۹۳ cells transfected with the gene encoding the peptide of camel lactoferrin was used. Then we obtained Statistical analysis for disk diffusion method using SAS software, and the results showed significant difference between the mean inhibition zone diameters growth of bacteria for camel recombinant peptide. By increasing the amount of protein the inhibition zone, diameters growth of bacteria or the fatality rate increased. In addition culture medium containing recombinant camel lactoferrin peptide was lyophilized and resulting of antibacterial effects of peptide powder was assessed after dilution in water, that indicated the activity of this peptide was then lyophilize latest. The results obtained in this study showed the potential activity of natural peptides and antibacterial properties. It is hoped that in the future these compounds can be used as an alternative or supplement to antibiotics.

Key words: camel- recombinant peptide - Lactoferrin- lyophilize