



هفتمین کنفرانس علوم دامی ایران



بررسی اثر حرارت بر میزان کشندگی پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

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

در طول دو دهه‌ی گذشته گروه بزرگی از ترکیبات طبیعی با وزن مولکولی کم، از گیاهان و حیوانات استخراج شدند و فعالیت‌های ضد میکروبی از خود نشان دادند که اصطلاحاً به آن‌ها پپتیدهای ضد میکروبی گفته می‌شود. محققان اظهار داشتند که آن‌ها می‌توانند به عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی باشند. در میان پپتیدهای ضد میکروبی، پپتیدهای کاتیونی به طور گسترده شناخته شده می‌باشند که از آن‌ها می‌توان به پروتئین لاکتوفرین اشاره کرد. محققان مشاهده کردند که فعالیت ضد باکتریایی پپتیدهای هیدرولیز شده از لاکتوفرین نسبت به لاکتوفرین بومی بسیار قوی‌تر است. در این آزمایش اثر حرارت ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بر میزان کشندگی پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ بررسی شد. آنالیز آماری نتایج به دست آمده از روش انتشار از دیسک با نرم‌افزار SAS عدم اختلاف معنی‌داری را بین میانگین قطر هاله‌های عدم رشد باکتری نشان داد. نتایج به دست آمده در این مطالعه پتانسیل پپتیدهای طبیعی در برابر حرارت و اهمیت آن‌ها برای امر پایداری و نگهداری را نشان داد. امید است در آینده بتوان از این ترکیبات به عنوان جایگزین یا مکملی برای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد.

کلمات کلیدی: شتر - حرارت - لاکتوفرین - انتشار از دیسک

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبتی است که بر روی پوست و لوزه‌ها وجود دارد و نسبتاً بیماری‌زاست. اگر چه در طی ۱۵ سال اخیر شمار سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک این باکتری در اثر استفاده‌ی نادرست از داروها گسترش پیدا کرده است (۲). در طول دو دهه‌ی گذشته گروه بزرگی از ترکیبات طبیعی با وزن مولکولی کم، از گیاهان و حیوانات استخراج شدند و فعالیت‌های ضد میکروبی از خود نشان دادند که اصطلاحاً به آن‌ها پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) گفته می‌شود. محققان این پپتیدهای ضد میکروبی را آنتی‌بیوتیک طبیعی نامیدند و اظهار داشتند که آن‌ها می‌توانند به عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی باشند. (۸، ۴). در میان پپتیدهای ضد میکروبی، پپتیدهای کاتیونی به طور گسترده شناخته شده می‌باشند و از نظر ساختار به سه دسته تقسیم‌بندی می‌شوند: پپتیدهای خطی

تشکیل شده از ساختارهای حلقوی، پپتیدهای غنی از سیستئین و پپتیدهای غنی از اسیدهای آمینه‌های خاص همچون پرولین، گلايسين، هیستیدین و تریپتوفان. از جمله ترکیبات کاتیونی می‌توان به پروتئین لاکتوفرین اشاره کرد (۵). سایتو و همکاران در سال ۱۹۹۴ لاکتوفرین را در دمای ۱۰۰ درجه در $PH=2,3$ هیدرولیز کردند و مشاهده کردند که این پروتئین ظرفیت اتصال به آهن خود را از دست داده است ولی از طرفی فعالیت ضد باکتریایی آن نسبت با لاکتوفرین بومی بسیار قوی‌تر بود (۷). کاپلرو همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که پپتیدهای ضد میکروبی ایجاد شده از آنزیم‌های معده نیز می‌توانند به‌عنوان افزودنی برای نگهداری مواد غذایی استفاده شوند (۳). هدف از این مطالعه بررسی اثر حرارت بر میزان کشندگی پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تست به روش انتشار از دیسک

تهیه ی پروتئین نو ترکیب: پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری از آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. این پپتید به صورت نو ترکیب در سلول‌های HEK-۲۹۳ بیان می‌شود و به نحوی که پس از بیان در سلول‌های تراریخته به صورت یک پپتید ترشحی از سلول‌ها به داخل محیط کشت ترشح می‌شود. محیط کشت DMEM (آلمان-Gibo) حاوی این پپتید به عنوان گروه‌های تیمار در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.

تهیه ی دیسک‌ها: در ابتدا برای بررسی میزان کشندگی پپتید نو ترکیب لاکتوفرین شتری میزان‌های ۱۰،۲۰،۴۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی این پروتئین بر روی دیسک‌ها تلقیح شد. برای بررسی اثر حرارت بر میزان فعالیت این پروتئین، میزان ۴۰ میکرولیتر از مایع سطحی این پروتئین در مدت‌زمان‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و به دیسک‌های مربوطه اضافه گردید. برای کنترل مثبت از دیسک آماده‌ی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین خریداری شده از شرکت پادتن طب استفاده شد. برای کنترل منفی نیز از محیط کشت فاقد پروتئین استفاده گردید.

طرح آزمایشات: پس از اینکه کدورت محیط مایع بر اساس استاندارد نیم مک فارلند کنترل گردید، سوپ پنبه‌ای را داخل محیط مایع باکتریایی کرده و آن را بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار تلقیح شد. سپس دیسک‌ها بر روی محیط کشت تلقیح شده با فواصل مناسب در هر پلیت قرار گرفتند. پلیت‌ها را برگردانده و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در انتها پلیت‌ها بر روی سطحی تیره که نور منعکس نمی‌کند قرار داده شد و در حضور نور مناسب قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شد. این آزمایش در یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۲ انجام شد و آنالیز به وسیله ی نرم افزار SAS انجام شد.

نتایج

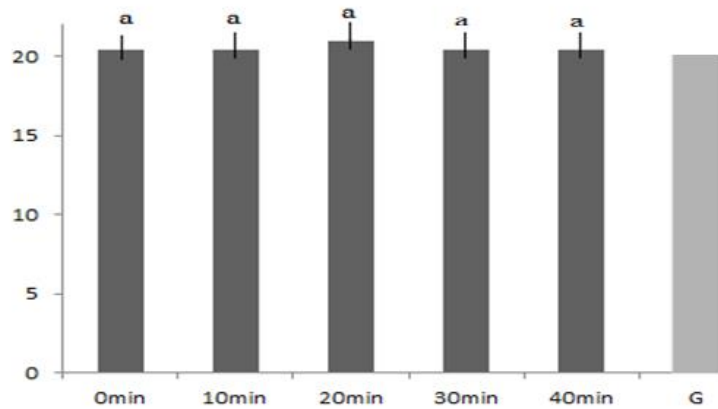
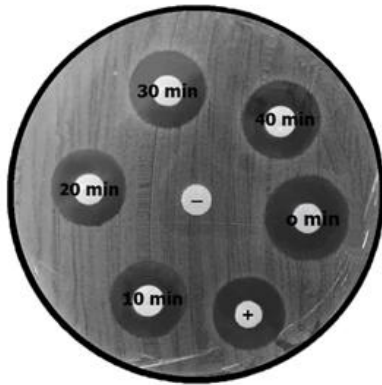
آنالیز آماری بررسی میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان از اختلاف معنی‌دار داشت؛ یعنی با افزایش میزان این پروتئین کشندگی نیز افزایش میابد (جدول ۱). همچنین بررسی نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد مربوط به تیمارهای تحت حرارت نشان از عدم تفاوت معنی‌دار اثر آنتی‌باکتریال آن‌ها نسبت به تیمار بدون حرارت داشت، یعنی حرارت بر کاهش فعالیت

این پروتئین تا مدت زمان ۴۰ دقیقه بی تاثیر بود (شکل ۱). تانگ و همکاران در سال ۲۰۱۲ پپتید نوترکیب لاکتوفرین گاوی را در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار دادند. نتیجه نشان داد این پروتئین تا مدت‌زمان ۱۸۰ دقیقه از خود مقاومت نشان داده است (۷). چهاردلی و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر حرارت لاکتوفرین نوترکیب گاوی را بر روی باکتری اشرشیاکلاهی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد بررسی کردند و نتایج نشان داد که این پروتئین در دوره‌های زمانی متفاوت تا ۸۰ دقیقه از خود مقاومت نشان می‌دهد (۱). سایتو و همکاران در سال ۱۹۹۴ آزمایشی را طراحی کردند که در آن میزان مقاومت لاکتوفرین را در برابر حرارت و PH بررسی کردند. این پروتئین مقاومت بالایی را در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و PH=۴ از خود نشان داد که این ویژگی موجب شد تا در برابر پاستوریلیزه و استریل شدن مقاوم و بدون کاهش فعالیت باشد (۶).

جدول ۱. قطر هاله ی عدم رشد باکتری بر مبنای میلی متر

| Bacteria | ۱۰μl | ۲۰μl | ۴۰μl | G | - |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| <i>S. aureus</i> ATCC ۲۵۹۲۳ | ۱۱.۱±۱.۱ ^a | ۱۵.۸±۱.۱ ^b | ۲۱.۱±۱.۱ ^c | ۲۰.۱±۱.۱ ^d | - |

داده‌های حاضر در جدول شامل ارزش میانگین و خطای استاندارد می‌باشند. *حروف غیر مشابه معنی دار است



شکل ۱. اثر حرارت بر میزان کشندگی پپتید نوترکیب لاکتوفرین شتری بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳

منابع

- ۱- Chahardooli, M., Niazi, A., Aram, F., Sohrabi, S.M. ۲۰۱۵. Expression of recombinant Arabian Camel lactoferricin-related peptide in pichia pastoris and its antimicrobial identification. Journal of the Science of Food and Agriculture, ۹۶:۵۶۹-۷۵.
- ۲- Gaudreaux, M.C., Lacasse, P., Talbot, B.G. ۲۰۰۷. Protective immune responses to a multi-gene DNA vaccine against *Staphylococcus aureus*. Journal of Vaccine, ۲۵ : ۸۱۴-۸۲۴.

- ۳- Joslin, R. S., Erickson, P. S., Santoro, H. M., Whitehouse, N. L., Schwab, C. G., Rejman, J. J. ۲۰۰۲. Lactoferrin supplementation to dairy calves. *Journal of Dairy Science*, ۸۵:۱۲۳۷-۱۲۴۲.
- ۴- Kappeler, S. R., Ackermann, M., Farah, Z., Puhan, Z. ۱۹۹۹. Sequence analysis of camel (*Camelus dromedarius*) lactoferrin. *Journal of International Dairy*, ۹: ۴۸۱,۴۸۶.
- ۵- Liu, Y., Luo, J., Xu, C., Ren, F., Peng, C., Wu, G., Zhao, J. ۲۰۰۰. Purification, characterization, and molecular cloning of the gene of a seed-specific antimicrobial protein from pokeweed. *Journal of Plant Physiology*, ۱۲۲: ۱۰۱۵-۱۰۲۴.
- ۶- Robblee, E. D., Erickson, P. S., Whitehouse, N. L., McLaughlin, A. M., Schwab, C. G., Rejman, J. J., Rompala, R. E. ۲۰۰۳. Supplemental lactoferrin improves health and growth of holstein calves during the preweaning phase. *Journal of Dairy Science*. ۸۶:۱۴۵۸-۱۴۶۴.
- ۷- Saito, H., Takase, M., Tamura, Y., Shimamura, S., & Tomita, M. ۱۹۹۴. Physicochemical and antibacterial properties of lactoferrin and its hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. *Journal of Advances in Experimental Medicine and Biology*, ۳۵۷:۲۱۹-۲۶.
- ۸- Tang, X.S., Tang, Z.R., Wang, S.P., Feng, Z.M., Zhou, D., Li, T.J., Yin, Y.L. ۲۰۱۲. Expression, Purification, and Antibacterial Activity of Bovine Lactoferrin-Lactoferricin in *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology*, ۱۶۶:۶۴۰-۶۵۱.

The effect of temperature on camel's recombinant lactoferrin peptide fatality rate on *Staphylococcus aureus* bacteria

abstract

Over the past two decades a large group of natural compounds with low molecular weight was extracted from plants and animals that called antimicrobial peptides and showed antimicrobial activities. Scientists state these compounds could be classified as an alternative to chemical antibiotics. Cationic peptides are widely known among the antimicrobial peptides, in which lactoferrin protein can be noted. Researchers observed that antibacterial activity of hydrolyzed lactoferrin peptides is much stronger than native lactoferrin. The effects of temperature as ۱۰۰°C on fatality rate of camel's recombinant lactoferrin peptide was evaluated in the current study, which performed as a completely randomized design with three replications of *Staphylococcus aureus* ATCC ۲۵۹۲۳. Results of disk diffusion method were analyzed by SAS software and demonstrated no significant differences between mean inhibition zone diameter indicated. In addition, results of this study illustrated the potential of natural peptides against heat and their importance for the stability and maintenance. Thus, considerable potential of these compounds should be considered in future as an alternative or supplement to antibiotics.

Keywords: camel- recombinant peptides- lactoferrin- disk diffusion