

همسانه‌سازی، بیان و بررسی اثر ضد میکروبی پپتید نو ترکیب (CBD) 2-DrsB1 بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای انسانی

مرضیه وارسته شمس^۱، فرهاد نظریان فیروزآبادی^{۲*}، احمد اسماعیلی^۳

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، 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

چکیده

زمینه به دلیل افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و گسترش مقاومت‌های میکروبی، دستیابی به عوامل ضد میکروبی مؤثر جدید امری گریزناپذیر است. یکی از راه‌های مقابله با طیف وسیعی از بیماری‌زها، بیان پپتیدهای ضد میکروبی قوی است که بخشی از سیستم ایمنی ذاتی همه موجودات زنده محسوب می‌شود. پپتید درماسپتین B1 یک پپتید کاتیونی قوی با اثرات ضد میکروبی بسیار زیاد است.

روش کار در این مطالعه، توالی کدکننده پپتید درماسپتین B1 از قورباغه فیلومدوسا بایکالر به دو تکرار پشت‌سر هم از دمین اتصال به کیتین پروتئین Avr4 قارچ کلادوسپوریوم فلاوم متصل و سازه ژنی (CBD) 2-DrsB1 پس از همسانه‌سازی در ریشه‌های موئین توتون بیان شد. بیان پپتید نو ترکیب به کمک روش‌های مولکولی مورد تأیید قرار گرفت. اثرات ضد میکروبی این پپتید نو ترکیب بر باکتری‌های اشریشیا کولای، سودوموناس آروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس و باسیلوس سوبتیلیس در محیط آزمایشگاهی ارزیابی شد.

یافته‌ها نتایج نشان داد که عصاره پروتئین کل از کلون‌های تراریخت ریشه‌های موئین، اثرات ضد میکروبی معناداری ($P < 0.05$) بر رشد باکتری‌های بیماری‌زا داشتند. نتایج تعیین شاخص MIC نشان داد که جهت بازدارندگی از رشد باکتری‌های گرم منفی غلظت دوبرابری از پپتید نو ترکیب (CBD) 2-DrsB1 در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت مورد نیاز بود.

نتیجه‌گیری بر اساس شواهد این مطالعه، بیان و تولید پپتید نو ترکیب (CBD) 2-DrsB1 در سیستم ریشه‌های موئین می‌تواند راهکاری جهت تولید داروی ضد میکروبی جدید باشد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۴
 تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۳۱

کلیدواژه‌ها:

ریشه موئین، توتون، پپتید ضد میکروبی، Dermaseptin B1، CBD، باکتری‌های بیماری‌زای انسانی.

۱. مقدمه

گسترش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، کنترل مقاومت‌ها و تلاش در جهت دستیابی به عوامل ضد میکروبی و فرمول‌های جدید دارویی امری ضروری و گریزناپذیر باشد [۱]. پپتیدهای

سلامت و بهداشت انسان به دلیل افزایش روزافزون مقاومت‌های میکروبی و ناتوانی در تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید، توسط عوامل میکروبی در معرض تهدید است [۱]. به نظر می‌رسد به دلیل افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و متعاقب آن

* نویسنده مسئول: فرهاد نظریان فیروزآبادی

نشانی: گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

دورنگار: ۰۶۶۳۳۴۳۰۱۶۰

تلفن: ۰۶۶۳۳۴۳۰۱۶۰

رایانه: Nazarian.f@lu.ac.ir

شناسه ORCID: 0000-0002-8291-3887

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0001-6011-0939

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۶، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۸، ص ۴۰۲-۴۱۲
 آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانه: journal@medsab.ac.ir
 شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

نسبی پپتیدهای خانواده درماسپتین در جلوگیری از رشد بیماری‌زاهای قارچی و باکتریایی بررسی شده [۱۵-۱۶]. هنوز اطلاعات کافی در مورد فعالیت پپتید درماسپتین B1 علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی، خصوصاً باکتری‌هایی با مقاومت دارویی از جمله سودوموناس آروژینوزا^۳، استافیلوکوکوس اورئوس^۴، انتروکوکوس فکالیس^۵ و باسیلوس سوبتیلیس^۶ وجود ندارد. این مطالعه برای اولین بار، با هدف بررسی اثرات ضد میکروبی پپتید نو ترکیب درماسپتین B1 همچوش با دو دمین تکراری اتصال به کیتین (CBD)^۷ علیه تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای انسانی در ریشه موئین توتون تولید و اثرات ضد میکروبی آن علیه تعدادی از میکروب‌های بیماری‌زای انسانی بررسی شد. نتایج این مطالعه می‌تواند در راستای تولید داروی ضد میکروبی مناسب مورد توجه واقع شود.

۲. مواد و روش‌ها

سازه ژنی 2-DrsB1 (CBD) متشکل از توالی کدکننده پپتید ضد میکروبی DrsB1 با منشأ ترشحات پوستی قورباغه فیلومدوسا بایکالر^۸ و دو تکرار متوالی از CBD پروتئین افکتور Avr4 قارچ کلادوسپوریوم فلاوم^۹ همراه با توالی برجسب هیستیدینی^{۱۰} در انتهای آمینی سازه ژنی توسط شرکت بیوماتیک کانادا سنتز و در ناقل دوگانه pGSA1285 برای بیان در ریشه‌های موئین توتون همسانه‌سازی شد (شکل ۱). از این سازه به واسطه آگروباکتریوم رایزوزنز^{۱۱} سویه AR15834 برای تراریخته‌سازی گیاه توتون و القای ریشه‌های موئین استفاده شد. ادغام ترانسژن در ژنوم توتون و نسخه‌برداری از آن در ریشه‌های موئین تراریخت، به ترتیب با استفاده از PCR و RT-PCR نیمه کمی مورد تأیید قرار گرفت. همچنین ریشه موئین غیرتراریخت (WT)^{۱۲} حامل ناقل بیانی مورد نظر، فاقد سازه ژنی نیز با همین روش ایجاد شد. لاین‌های تراریخت ریشه موئین بیان‌کننده پپتید DrsB1 نیز به‌عنوان شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۷]. پس از تأیید، تعدادی کلون‌های ریشه موئین تراریخت 2-DrsB1 (CBD) انتخاب و به همراه کلون‌های غیرتراریخت و لاین DrsB1 برای استخراج عصاره پروتئین کل استفاده شد.

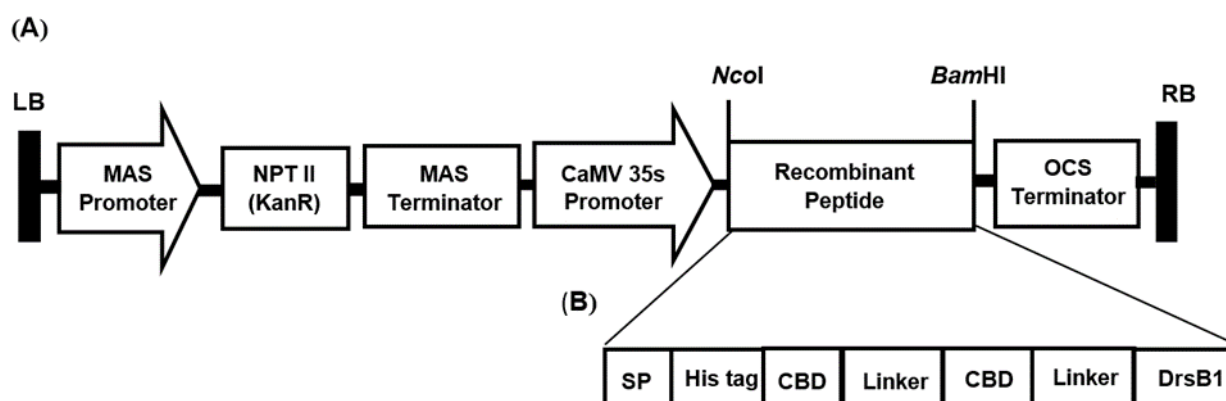
ضدمیکروبی (AMPs)^۱ که تقریباً جزء جدایی‌ناپذیر سیستم ایمنی ذاتی همه موجودات زنده با طیف فعالیت گسترده و سمیت سلولی اندک برای سلول‌های پستان‌داران محسوب می‌شود، به یکی از رویکردهای نوآورانه جهت کنترل عوامل بیماری‌زا تبدیل شده است [۳]. به دلیل فعالیت گزینشی و تمایزی که AMPs بین غشاهای میکروبی و غشاهای میزبان قائل می‌شوند، سویه‌های حساس میکروارگانیسم‌ها در هنگام استفاده از پپتیدها [۴] و پروتئین‌های ضدمیکروبی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های متداول به ندرت مقاوم می‌شوند [۵]؛ بنابراین معرفی چنین پپتیدهایی می‌تواند کاندیداهای دارویی مناسبی برای درمان بیماری‌های عفونی در آینده باشد. سنتز شیمیایی AMPs از لحاظ هزینه و بازده، به‌ویژه در پپتیدهای طولی، با محدودیت‌هایی همراه است [۶] و تخلیص آن‌ها از سلول‌های میزبان مشکل، هزینه‌بر و زمان‌بر است [۷]. در این زمینه، بیان هترولوگ پروتئین‌های نو ترکیب در سیستم‌های مبتنی بر گیاه، ضمن تولید نسبتاً بیشتر، در مقیاس وسیع هزینه کمتری دارد. با وجود این، بیان دائم، پایدار و تجمع AMPs در همه بخش‌های گیاهی ممکن است اثرات منفی در رشد و توسعه گیاهان تراریخت داشته باشد [۳]. با توجه به معضلات بیان دائم در سیستم‌های گیاهی، ریشه‌های موئین به‌منظور تولید پروتئین‌های نو ترکیب در گیاهان بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند [۸-۹]. تولید کارآمد، پایداری طولانی‌مدت ژنوتیپی، فنوتیپی و شیمیایی، تولید سریع بیوماس در سطح تجاری [۱۰] و پایداری در بیان ژن برای مدت زمان طولانی [۱۱]، ریشه‌های موئین را به ابزاری مطلوب برای ارزیابی سریع جنبه‌های مختلف بیان پروتئین‌های نو ترکیب تبدیل کرده است [۱۲].

سنتز کم‌بازده AMPs در درون سلول‌های بیگانه، هضم پروتئولیتیکی پپتیدها به سبب اندازه کوچک و ماهیت کاتیونی آن‌ها و در نتیجه تخلیص مشکل آن‌ها، عملکرد پپتیدهای تولیدشده را کاهش می‌دهد. همچوشی پروتئین ابزاری استاندارد در همسانه‌سازی مولکولی است که از آن در جهت افزایش بیان پپتیدها در میزبان‌های یوکاریوت استفاده می‌شود [۱۳].

پپتید درماسپتین B1 (DrsB1)^۲ پپتید کاتیونی و قوی است که علیه طیف وسیعی از بیماری‌زاهای خود فعالیت ضدمیکروبی نشان داده است [۱۴-۱۵]. اگرچه تاکنون تأثیر

7. chitin binding domain
8. Phyllomedusa bicolor
9. Cladosporium fulvum
10. RGS-(His) 6 tag
11. Agrobacterium rhizogenes
12. Wild Type

1. antimicrobial peptides
2. dermasseptin B1
3. pseudomonas aeruginosa
4. Staphylococcus aureus
5. Enterococcus faecalis
6. Bacillus subtilis



شکل ۱.۱. شکل شماتیک سازه مورد استفاده برای بیان پپتید نو ترکیب

ناحیه T-DNA ناقل دوگانه 2-DrsB1 (CBD) pGSA1285/ مورد استفاده در تراریخته سازی اگروباکتریوم رایزوتنز. NPTII (نئومایسین فسفوترانسفراز II) به عنوان ژن مقاومت به کانامایسین و ژن نو ترکیب Sp- (CBD) 2-DrsB1 توسط پروموتور مانوپین سنناز (MAS) و پروموتور ویروس موزائیک گل کلم (CaMV 35S) بیان شدند.

شکل ۱.۲. اجزای سازه ژنی بین جایگاه های آنزیم های محدودالتر NcoI و BamHI. توالی برچسب هیستیدینی (His tag) در انتهای آمینی ژن

میکرولیترا از عصاره پروتئینی به درون ستون تزریق و به مدت ۲ دقیقه با سرعت $201 \times g$ در دمای $4^\circ C$ سانتریفیوژ شد. ستون ۲ بار با 600 میکرولیترا از بافر LEW شست و شو داده شد و سرانجام پروتئین نو ترکیب با توالی برچسب هیستیدینی، ۳ بار با استفاده از 250 میکرولیترا از بافر آزادسازی (50 mM) Na_2HPO_4 ، 300 mM NaCl، 250 mM Imidazole (8 pH) تخلیص شد. غلظت پروتئین نو ترکیب تخلیص شده و غلظت پروتئین کل استخراج شده از کلون های تراریخت 2-DrsB1 (CBD) و DrsB1 و همچنین ریشه موئن غیر تراریخت با استفاده از روش برادفورد [۱۹] و سرم آلبومین گاوی (BSA)^۴ به عنوان استاندارد تعیین شد.

تولید پروتئین نو ترکیب در کلون های تراریخت با استفاده از لکه گذاری وسترن (WB)^۵ مورد بررسی قرار گرفت. میزان ۲۵ میکرولیترا از پروتئین نو ترکیب تخلیص شده در بافر نمونه SDS حاوی بتا — مرکاپتواتانول ۵٪ (حجمی / حجمی) حل و در ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ الکتروفورز شد. عمل انتقال پروتئین به غشای نیتروسلولوزی با استفاده از دستگاه Mini Trans-Blot (Bio-Rad) Transfer Cell به مدت ۲ ساعت و ولتاژ ۱۰۰ ولت صورت گرفت. پروتئین های نو ترکیب سطح غشای نیتروسلولوزی به آنتی بادی مونوکلونال آنتی پلی هیستیدین پراکسیداز (Sigma-Aldrich, product No. A7058) متصل و توسط دی آمینوبنزیدین تتراهیدروکلراید (DAB) (Sigma-)^۶ توسط دی آمینوبنزیدین تتراهیدروکلراید (Aldrich, Cat. No. 888272-859) با غلظت ۱۰ میلی گرم در

۲.۱. بیان پپتید نو ترکیب 2-DrsB1 (CBD) در ریشه موئن توتون

به منظور استخراج پروتئین کل، ۵ گرم از بافت ریشه های موئن پودر و در بافر فسفات پتاسیم (50 mM) (7 pH) حاوی بازدارنده پروتئاز فنیل متیل سولفونیل فلوراید (1 mM) (PMSF)^۱ کاملاً یک نواخت و به مدت ۵ دقیقه به شدت ورتکس و هموژنیزه شد. عصاره حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت $17900 \times g$ در دمای $4^\circ C$ سانتریفیوژ و رونشین حاصل با استفاده از فیلتر با قطر منافذ 0.45 میکرومتر فیلتر شد. جهت بررسی کیفیت عصاره پروتئین استخراج شده از کلون های تراریخت و غیر تراریخت ریشه موئن، الکتروفورز پلی آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE)^۲ با ژل ۱۲٪ انجام شد. رنگ آمیزی با نیترات نقره به مدت یک ساعت و رنگ بری ژل با اسید استیک ۳۰٪ و متانول ۱۰٪ صورت گرفت [۱۸]. پس از بررسی و مقایسه الگوی الکتروفورزی پروتئین کل کلون های تراریخت، سه کلون انتخاب شد و جهت تخلیص پپتید نو ترکیب از پروتئین کل مورد استفاده قرار گرفت. مراحل تخلیص پروتئین های نو ترکیب با استفاده از ستون نیکل (Ni-IDA)^۳ با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده (USB Corporation) انجام شد. به این منظور پس از آماده سازی ستون با استفاده از 600 میکرولیترا از بافر $1 \times$ LEW (50 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ، 300 mM NaCl، 8 pH) میزان 600

4. bovine serum albumin
5. western blotting
6. diaminobenzidine tetrahydrochloride

1. phenyl methyl sulfonyl fluoride protease
2. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
3. nickel-iminodiacetic acid

سری‌های رقت ۳۶۰، ۱۸۰، ۹۰، ۴۵، ۲۲/۵ و ۱۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پپتیدهای نوترکیب تخلیص شده، در بافر فسفات پتاسیم تهیه شد و ۵۰ میکرولیتر از هر سری رقت با ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 CFU/ml در محیط مولر هینتون آگار ترکیب و میکروپلیت به مدت ۱۶ ساعت در دمای 37°C گرماگذاری شد. در چاهک کنترل مثبت از بافر فسفات پتاسیم به جای پپتید نوترکیب و در چاهک کنترل منفی از پپتید بدون سوسپانسیون باکتری استفاده شد. میکروپلیت از نظر وجود یا نبود کدورت، بررسی و جذب نوری (OD_{600}) چاهک‌های شفاف اندازه‌گیری و کمترین غلظتی از پپتید نوترکیب که از رشد باکتری ممانعت کرده بود، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. از محیط کشت استریل مولر هینتون برات به جای سوسپانسیون باکتری به‌عنوان چاهک بلانک استفاده شد [۱۵، ۲۰].

برای تعیین میزان MBC پپتیدهای نوترکیب، مقدار ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی از تمام چاهک‌هایی که در آن‌ها کدورت ناشی از رشد باکتری مشاهده نشده بود، روی پلیت مولر هینتون آگار کشت شد و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای 37°C ، پلیتی که در آن هیچ کلنی باکتری مشاهده نشد، به‌عنوان MBC پپتید نوترکیب در نظر گرفته شد. از محیط کشت استریل مولر هینتون آگار به جای سوسپانسیون باکتری به‌عنوان چاهک بلانک استفاده شد [۲۲].

۴.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

همهٔ آزمون‌ها به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام و انحراف استاندارد از میانگین آن‌ها محاسبه شد. یافته‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه در نرم‌افزار SAS 9.1 (SAS, Inc., North Carolina, USA) بررسی و مقایسه‌های میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $P < 0.05$ انجام شد.

۳. یافته‌ها

آنالیز PCR روی تعداد پنج کلون ریشهٔ مؤئین تراریخت (T1-T5) با استفاده از آغازگر اختصاصی 2-DrsB1 (CBD) نشان داد که توالی کدکنندهٔ پپتید نوترکیب 2-DrsB1 (CBD) در ژنوم توتون الحاق شده است (شکل ۲.A). همچنین آنالیز RT-PCR نیمه‌کمی نیز نسخه‌برداری از توالی کدکنندهٔ پپتید نوترکیب 2-DrsB1 (CBD) را در این کلون‌ها مورد تأیید قرار داد (شکل ۲.B). مقایسهٔ نتایج الکتروفورز محصول RT-PCR ژن 2-DrsB1 (CBD) با محصول RT-PCR ژن $\text{elf1}\alpha$ به‌عنوان

۱۵ میلی‌لیتر از بافر TBS 1X (50 mM Tris، pH ۷/۶، ۱۵۰ mM NaCl) و ۱۲ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰٪ شناسایی شد [۱۸].

۲.۲. بررسی فعالیت ضد میکروبی پپتید نوترکیب 2-DrsB1 (CBD)

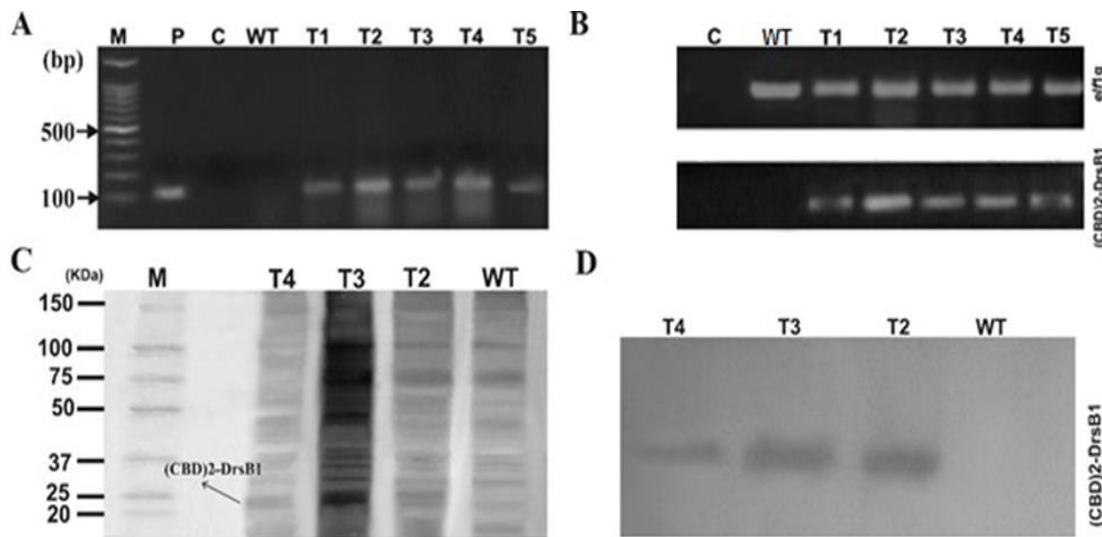
باکتری‌های بیماری‌زای انسانی اشیریشیا کولای^۱ (PTCC 1330)، سودوموناس آروژینوزا (PTCC 1074)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112)، انتروکوکوس فکالیس (PTCC 1393) و باسیلوس سوبتیلیس (PTCC 1715) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند و جهت بررسی اثرات ضد میکروبی پپتید نوترکیب 2-DrsB1 (CBD) مورد استفاده قرار گرفتند.

فعالیت ضد میکروبی پروتئین کل استخراج‌شده از کلون‌های تراریخت ریشهٔ مؤئین علیه باکتری‌های مورد نظر با استفاده از روش انتشار در دیسک طبق استاندارد CLSI تعیین شد [۲۰-۲۱]. به این منظور، مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های باکتریایی در اوایل فاز لگاریتمی رشد (10^8 CFU/ml، $OD_{600} = 0.1$) به‌وسیلهٔ سوآپ استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار تازه به‌صورت سطحی کشت و سپس دیسک‌های بلانک استریل (قطر ۶ میلی‌متر) بر روی سطوح کشت چمنی باکتری‌ها قرار داده شدند. مقدار ۳۰ میکرولیتر از عصارهٔ کلون‌های تراریخت حاوی پروتئین‌های 2-DrsB1 (CBD)، DrsB1 و عصارهٔ کلون غیرتراریخت با غلظت نهایی $90 \mu\text{g/ml}$ و همچنین بافر فسفات پتاسیم به‌عنوان شاهد به دیسک‌های مربوطه تزریق شدند. در پلیت انتروکوکوس فکالیس از دیسک آنتی‌بیوتیک ونکومایسین ($30 \mu\text{g/disc}$) و در سایر کشت‌های باکتری از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ($10 \mu\text{g/disc}$) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای 4°C گرماگذاری و سپس به مدت ۱۸ ساعت در دمای 37°C قرار گرفتند و سپس قطر هالهٔ عدم رشد به‌وسیلهٔ کولیس با دو رقم اعشار اندازه‌گیری و به‌صورت میانگین \pm انحراف استاندارد و برحسب میلی‌متر ارائه شدند.

۲.۲. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

در این مطالعه، مقدار MIC پپتید نوترکیب با استفاده از روش میکرودیالوشن برات در پلیت ۹۶ چاهکی در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر با رعایت اصول CLSI تعیین شد [۲۱]. ابتدا

داد و مشخص شد که پپتید نو ترکیب 2-DrsB1 (CBD) با غلظت مناسبی در عصاره پروتئینی کلون‌های تراریخت وجود دارد (شکل ۲.C). با توجه به وجود توالی برچسب هیستیدینی در انتهای آمینی سازه ژنی پپتید نو ترکیب 2-DrsB1 (CBD) آنالیز لکه گذاری و سترن با استفاده از آنتی بادی ضد توالی برچسب هیستیدینی صورت گرفت. نتایج این آنالیز نیز گویای آن است که پپتید نو ترکیب 2-DrsB1 (CBD) به خوبی در ریشه‌های موئین بیان شده است (شکل ۲.D). از بین کلون‌های تأیید شده، کلون T3 با بیشترین میزان بیان پپتید نو ترکیب جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت



شکل ۲. آنالیز مولکولی ریشه‌های موئین تراریخت

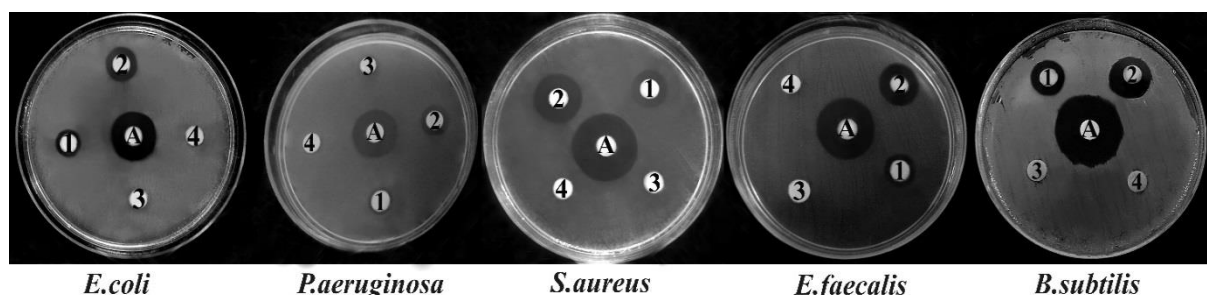
A: آنالیز PCR ریشه‌های موئین با استفاده از آغازگر اختصاصی (CBD) 2-DrsB1 و تکثیر قطعه ۱۰۰bp در کلون‌های تراریخت 2-DrsB1 (CBD); B: آنالیز RT-PCR ریشه‌های موئین با استفاده از آغازگر اختصاصی (CBD) 2-DrsB1 و آغازگر $\text{elf}1\alpha$ به عنوان ژن کنترل داخلی و به ترتیب تکثیر قطعه ۱۰۰bp و ۱۷۷bp; C: الگوی الکتروفورزی SDS-PAGE کلون‌های تراریخت ریشه موئین و مشاهده باند 2-DrsB1 (CBD) با وزن مولکولی ۲۵kDa; D: آنالیز و سترن بلاتینگ ریشه‌های موئین تراریخت. M: به ترتیب مارکر مولکولی ۱۰۰bp (CinnaGen Co.) و مارکر پروتئینی (Precision plus protein unstained protein standards, Bio-Rad); P: کنترل مثبت (پلاسمید (CBD)2-DrsB1/pGSA1285 استخراج شده از *A. rhizogenes*); C: کنترل منفی (آب); T1-T5: عصاره پروتئینی کلون‌های تراریخت 2-DrsB1 (CBD); WT: عصاره پروتئینی غیر تراریخت.

فسفات (بدون عصاره پروتئینی) فاقد فعالیت بازدارندگی علیه باکتری‌ها بود و سایر پروتئین‌های موجود در ترکیب عصاره پروتئینی کل اثر بازدارندگی را بر رشد باکتری‌های مورد نظر نداشتند (شکل ۳، جدول ۱). فعالیت بازدارندگی عصاره پروتئینی 2-DrsB1 (CBD) علیه باکتری‌های گرم مثبت به طور معناداری نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر بود. بیشترین فعالیت ضد میکروبی 2-DrsB1 (CBD) به ترتیب علیه باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فکالیس و با اثر یکسان بر سودوموناس آروژینوزا و اشریشیا کلای بود (شکل ۳، جدول ۱).

نتایج آزمون انتشار در دیسک نشان داد که عصاره پروتئینی حاوی پپتید نو ترکیب 2-DrsB1 (CBD) و همچنین پپتید 2-DrsB1 بدون دمین اتصال به کیتین به عنوان شاهد توانست از رشد ۵ گونه باکتری بیماری‌زا جلوگیری کند؛ اما فعالیت بازدارندگی 2-DrsB1 (CBD) با اختلاف معناداری نسبت به شاهد بیشتر بود (شکل ۳، جدول ۱). بیشترین فعالیت بازدارندگی علیه رشد باکتری‌ها مربوط به آنتی بیوتیک‌ها بود و فعالیت عصاره 2-DrsB1 (CBD) نو ترکیب اختلاف معناداری با اثر آنتی بیوتیک بر رشد باکتری‌ها نشان داد (شکل ۳، جدول ۱). عصاره پروتئینی ریشه موئین غیر تراریخت نیز همانند بافر

نتایج تعیین شاخص MIC نشان داد که جهت بازدارندگی از رشد باکتری‌های گرم منفی سودوموناس آروژینوزا و اشریشیا کلای غلظت دوبرابری ($90 \mu\text{g/ml}$) از پپتید نوترکیب 2-DrsB1 (CBD) در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فکالیس از

نتایج تعیین شاخص MIC نشان داد که جهت بازدارندگی از رشد باکتری‌های گرم منفی سودوموناس آروژینوزا و اشریشیا کلای غلظت دوبرابری ($90 \mu\text{g/ml}$) از پپتید نوترکیب 2-DrsB1 (CBD) در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فکالیس از



شکل ۳. فعالیت ضدباکتریایی پپتید نوترکیب 2-DrsB1 (CBD) علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

در هر پلیت به ترتیب A: آنتی‌بیوتیک (کنترل مثبت): ۱. عصاره پروتئینی کلون تراریخت DrsB: ۲. عصاره پروتئینی کلون تراریخت 2-DrsB1 (CBD): ۳. عصاره پروتئینی کلون غیر تراریخت: ۴. بافر فسفات پتاسیم

عفونی محسوب می‌شود. اگرچه کنترل بیماری‌زاها با آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی امکان‌پذیر است، صنایع داروسازی جهت کنترل میکروب‌های بیماری‌زا باید به‌طور مداوم به دنبال توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید باشند. نتایج این مطالعه نشان داد که همجوشی پپتید ضد میکروبی در ماسپتین B1 به دو کپی از دامین اتصال به کیتین ژن Avt4 قارچ کلاوسوپوریوم فلاوم می‌تواند به‌طور موفقیت‌آمیزی در ریشه‌های موئین توتون بیان شود و پپتید نوترکیب حاصل، اثرات ضد میکروبی مؤثری علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی به‌ویژه باکتری‌های گرم مثبت داشت (شکل ۳).

مقایسه فعالیت ضدباکتریایی پپتید نوترکیب 2-DrsB1 (CBD) در مقایسه با پپتید DrsB1 بدون دامین اتصال به کیتین نشان داد که پپتید نوترکیب فعالیت دوبرابری علیه باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با پپتید شاهد دارد. با این حال، به نظر می‌رسد که هر دو پپتید فعالیت مشابهی علیه باکتری‌های گرم منفی داشته باشند (شکل ۳، جدول ۱-۲).

۴. بحث و نتیجه گیری

میکروب‌های بیماری‌زا علیه آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاومت پیدا می‌کنند که این موضوع یکی از چالش‌های درمان بیماری‌های

جدول ۱. فعالیت ضد میکروبی پروتئین نوترکیب 2-DrsB1 (CBD) به‌روش انتشار در دیسک

	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)				
	B	A	(CBD) 2-DrsB1	DrsB1	WT
<i>E. coli</i>	1 6 ± 0/00	f 0/76 ± 16/83	i 0/60 ± 9/07	k 0/76 ± 7/17	l 6 ± 0/00
<i>P. aeruginosa</i>	6 ± 0/00	g 0/60 ± 10/8	i 0/35 ± 9/13	k 0/70 ± 7/10	l 6 ± 0/00
<i>S. aureus</i>	6 ± 0/00	b 0/35 ± 29/07	e 0/60 ± 19/00	i 0/60 ± 9/10	l 6 ± 0/00
<i>E. faecalis</i>	6 ± 0/00	c 0/40 ± 22/93	fg 0/50 ± 16/00	j 0/65 ± 8/10	l 6 ± 0/00
<i>B. subtilis</i>	6 ± 0/00	a 0/50 ± 30/00	d 0/55 ± 21/03	h 0/50 ± 10/00	l 6 ± 0/00

قطر هاله عدم رشد با احتساب قطر دیسک (۶ میلی‌متر)، داده‌های مقادیر میانگین سه تکرار با انحراف استاندارد نمایش داده شده است. میانگین با حروف مشترک اختلاف معناداری براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن ندارند ($\alpha = 0/05$). B: بافر فسفات پتاسیم (کنترل منفی برای عصاره غیر تراریخت): A: آنتی‌بیوتیک (کنترل مثبت): (CBD) 2-DrsB1: پروتئین در ماسپتین نوترکیب با دامین اتصال به کیتین: DrsB1: پروتئین در ماسپتین بدون دامین اتصال به کیتین: WT: عصاره پروتئینی غیر تراریخت.

در ریشه موئین توتون گزارش شده است [۸، ۹، ۲۳-۲۴].

تاکون تولید و بیان چندین پروتئین ضد میکروبی با کارایی بالا

و گرم مثبت با همدیگر مقایسه شده است. در این مطالعات، مقادیر ۱-۷۵ میکرومولار برای MIC علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی اش‌ریشیا کلای، سودوموناس آروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فکالیس ذکر شده است [۱۵-۲۸، ۲۹].

شارژ مثبت خالص پپتیدهای ضدباکتریایی نقش مؤثری در اتصال آن‌ها به دیواره سلولی باکتری‌ها دارد و اتصال غیرمشارکتی پپتید روی سطح خارجی، انتشار به درون غشای داخلی و نفوذپذیری غشا را تسهیل می‌کند [۳۰]. در مطالعه‌ای که فردریچ و همکاران [۳۱] درباره اثر ضد میکروبی چند پپتید کاتیونی سنتتیک با اختلافات ساختاری و شارژ متفاوت انجام دادند، پپتید CP26 با بیشترین شارژ مثبت بیشترین اثر را بر ایجاد نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم مثبت اعمال کرد. در مطالعه دیگری، با ایجاد تغییر در سر N پپتید تغییر یافته موسوم به تمپورین A (MsfA3)^۱، شارژ پپتید افزایش و فعالیت ضدباکتریایی آن علیه اش‌ریشیا کلای و اروینیا کاروتوروا^۲ به میزان دو تا چهار برابر افزایش یافت [۱۴].

بررسی مطالعات درباره پپتیدهای ضد میکروبی نشان داد که اثرات ضدباکتریایی این پپتیدها علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی بسیار مورد توجه است. برای مثال بررسی اثر پپتید ضد میکروبی مصنوعی OP-145 علیه سویه‌های کلینیکالی چندمقاومتی نشان داد که این پپتید رشد و تشکیل بیوفیلم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را به شدت کاهش می‌دهد [۲۵]. همچنین اثر ضد میکروبی پپتید Buwchitin نیز علیه باکتری‌های اش‌ریشیا کلای، استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فکالیس اثبات شده است [۲۶]. در مطالعه‌ای دیگر، با معرفی پپتید ضد میکروبی BLS p34 نشان داده شد که این پپتید از تشکیل بیوفیلم در سویه‌های استافیلوکوکوس و انتروکوکوس جلوگیری می‌کند [۲۷].

پپتیدهای خانواده درماسپتین به خصوص درماسپتین S و درماسپتین B نیز به عنوان داروی ضد میکروبی با طیف وسیع فعالیت بسیار مورد توجه بوده و تاکنون مطالعات متعددی درباره اثرات ضد میکروبی این پپتیدها و آنالوگ‌های آن‌ها با تغییرات ساختاری متفاوت صورت گرفته و فعالیت ضد میکروبی این پپتیدها علیه گونه‌هایی از مخمر، قارچ، باکتری‌های گرم منفی

جدول ۲. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) پپتید نو ترکیب (CBD) 2-DrsB1

	MIC (µg/ml)		MBC (µg/ml)	
	(CBD) 2-DrsB1	DrsB1	(CBD) 2-DrsB1	DrsB1
<i>E. coli</i>	۹۰	≥ ۹۰	۱۸۰	≥ ۱۸۰
<i>P. aeruginosa</i>	۹۰	≥ ۹۰	۱۸۰	≥ ۱۸۰
<i>S. aureus</i>	۴۵	۹۰	۹۰	۱۸۰
<i>E. faecalis</i>	۴۵	۹۰	۹۰	۱۸۰
<i>B. subtilis</i>	۴۵	۹۰	۹۰	۱۸۰

غلظت‌ها مقادیر میانگین (± ۳۰٪) دو آزمایش مستقل با دو تکرار را نشان می‌دهند. (CBD) 2-DrsB1: پپتید درماسپتین نو ترکیب با دمین اتصال به کیتین؛ Control: پپتید درماسپتین بدون دمین اتصال به کیتین.

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پپتید نو ترکیب 2-DrsB1 (CBD) و پپتید DrsB1 با استفاده از امکانات نرم‌افزار Protparam مطالعه شد. میزان شارژ الکتریکی تک تک پپتیدها و شارژ خالص آن‌ها نشان داد که همجوشی دو دمین اتصال به کیتین (CBD) به پپتید DrsB1 شارژ خالص پپتید را از ۳+ به ۸+ افزایش داد. با افزایش شارژ، فعالیت ضدباکتریایی (CBD) 2-DrsB1 در مقایسه با پپتید DrsB1 علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی افزایش یافت (شکل ۳، جدول ۲-۱).

همجوشی پپتید ضد میکروبی کاتیونی با دمین اتصال به کربوهیدرات موجب افزایش ظرفیت اتصال پپتید به دیواره

تراکم پپتید DrsB1 به واسطه اتصال به پپتیدوگلیکان دیواره

سلولی باکتری‌ها باشد.

تیکوئیک دیواره و اسید لیپوتیکوئیک و تشکیل یک راهنمای پلی‌آنیونی، نفوذ و ورود پپتید به غشای سیتوپلاسمی را بدون دیپولاریزه کردن آن تسهیل می‌کنند [۳۶].

به‌طور کلی از سیستم کشت ریشه مؤنث می‌توان درجهت تولید پپتیدهای ضد میکروبی، ارزیابی بیان و فعالیت آن به‌صورت سریع، ساده، کم‌هزینه و کارآمد استفاده کرد. این موضوع امکان تجزیه و تحلیل ساختاری و عملکردی پروتئین‌های نوترکیب را فراهم می‌سازد [۹]. با توجه به شواهد حاصل از این مطالعه، از پپتید نوترکیب (CBD) 2-DrsB1 می‌توان علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی استفاده کرد و با توجه به عملکرد گزینشی این پپتید می‌توان آن را به‌عنوان یک مدل مولکولی در طراحی داروهای آنتی‌بیوتیکی به‌کار بست.

در مطالعه حاضر، پپتید (CBD) 2-DrsB1 فعالیت ضد میکروبی مؤثرتری علیه باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی از خود نشان داد (شکل ۳، جدول ۱-۲). عملکرد بهتر پپتید (CBD) 2-DrsB1 در باکتری‌های گرم مثبت ممکن است به این دلیل باشد که باکتری‌های گرم منفی، برخلاف باکتری‌های گرم مثبت، علاوه بر لایه پپتیدوگلیکان یک لایه غشای خارجی در دیواره سلولی خود دارند. سطح هیدروفیلیک این لایه و همچنین آنزیم‌های موجود در فضای پری‌پلاسمیک دو غشای مانعی در مقابل عوامل ضد میکروبی محسوب می‌شوند [۳۵]. همچنین پپتیدهای ضد میکروبی پلی‌کاتیونی در مقابله با باکتری‌های گرم مثبت با اتصال به اسید

References

- [1]. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New microbes and new infections* 2015; 6:22-9.
- [2]. Lee S, Siddiqui R, Khan NA. Animals living in polluted environments are potential source of antimicrobials against infectious agents. *Pathogens and global health* 2012; 106(4): 218-23.
- [3]. 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 Pt 2): 1005-23.
- [4]. Alpizar E, Dechamp E, Lapevre-Montes F, Guilhaumon C, Bertrand B, Jourdan C, et al. Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. *Ann Bot* 2008; 101(7): 929-40.
- [5]. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *nature biotechnology* 2002; 415: 389-95.
- [6]. Li C, Blencke HM, Paulsen V, Haug T, Stensvag K. Powerful workhorses for antimicrobial peptide expression and characterization. *Bioeng Bugs* 2010; 1(3): 217-20.
- [7]. Kuo Y-C, Tan C-C, Ku J-T, Hsu W-C, Su S-C, Lu C-A, et al. Improving Pharmaceutical Protein Production in *Oryza sativa*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14(5): 8719-39.
- [8]. Aleinein R, Schäfer H, Wink M. Rhizosecretion of the recombinant antimicrobial peptide ranalexin from transgenic tobacco hairy roots. *RRJBS Phytopathol Gene Diseases* 2015; 1: 45-55.
- [9]. 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.
- [10]. Carlin AP, Tafava F, Alpuche Solís AG, Pérez-Molphe-Balch E. Effects of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six Mexican cactus species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2015; 51(3): 332-9.
- [11]. Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* 2004; 7(2): 152-8.
- [12]. Ron M, Kajala K, Pauluzzi G, Wang D, Reynoso MA, Zumstein K, et al. Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model. *Plant physiology* 2014; 166(2): 455-69.
- [13]. Skosvrev VS, Rudenko NV, Yakhnin AV, Zagranichny VE, Popova LI, Zakharov MV, et al. EGFP as a fusion partner for the expression and organic extraction of small polypeptides. *Protein Expression and Purification* 2003; 27: 55-62.
- [14]. Osusky M, Osuska L, Kay W, Misra S. Genetic modification of potato against microbial diseases: in vitro and in planta activity of a dermaseptin B1 derivative, MsrA2. *Theor Appl Genet* 2005; 111(4): 711-22.
- [15]. Mor A, Amiche M, Nicolas P. Structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. *Biochemistry* 1994; 33(21): 6642-50.
- [16]. Mor A, Nicolas P. The NH2-terminal a-Helical Domain 1-18 of Dermaseptin Is Responsible for Antimicrobial Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(3): 1934-9.
- [17]. 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): 87-97.
- [18]. Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. *Protein methods*. A John Wiley-liss, Inc, New York 1996; second edition.
- [19]. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976; 72(1-2): 248-54.
- [20]. Che YZ, Li YR, Zou HS, Zou LF, Zhang B, Chen GY. A novel antimicrobial protein for plant protection consisting of a *Xanthomonas oryzae* harpin and active domains of cecropin A and melittin. *Microb Biotechnol* 2011; 4(6): 777-93.
- [21]. Wayne P. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute 2018; 28th edition.
- [22]. EUCAST. EUCAST. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clinic Microbiol Infect* 2000; 6: 503-8.
- [23]. Chahardoli M, Fazeli A, Ghabooli M. Recombinant production of bovine Lactoferrin-derived antimicrobial peptide in tobacco hairy roots expression system. *Plant Physiology and Biochemistry* 2018; 123: 414-21.
- [24]. Gaume A, Komarnytsky S, Borisjuk N, Raskin I. Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. *Plant Cell Rep* 2003; 21(12): 1188-93.
- [25]. Ming L, Huang J-A. The antibacterial effects of antimicrobial peptides OP-145 against clinically isolated multi-resistant strains. *Japanese journal of infectious diseases* 2017; 70(6): 601-3.

- [26]. Ovama LB, Crochet J-A, Edwards JE, Girdwood SE, Cookson AR, Fernandez-Fuentes N, et al. Buwchitin: A Ruminal Peptide with Antimicrobial Potential against *Enterococcus faecalis*. *Frontiers in chemistry* 2017; 5: 51.
- [27]. Costa AA, Rossatto FCP, Medeiros AW. Evaluation antibacterial and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P34 against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *An Acad Bras Cienc* 2018; 90(1): 73-84.
- [28]. Mor A, Hani K, Nicolas P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(50): 31635-41.
- [29]. Nicolas P, El Amri C. The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2009; 1788(8):1537-50.
- [30]. Strahilevitz I, Mor A, Nicolas P, Shai Y. Spectrum of antimicrobial activity and assembly of dermaseptin-b and its precursor form in phospholipid membranes. *Biochemistry* 1994; 33(36): 10951-60.
- [31]. Friedrich CL, Movles D, Beveridge TJ, Hancock RE. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2000; 44(8): 2086-92.
- [32]. Willmann R, Lajunen HM, Erbs G, Newman M-A, Kolb D, Tsuda K, et al. Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108(49): 19824-29.
- [33]. Wong JEMM., Alsarraf HMAB, Kaspersen JD, Pedersen JS, Stougaard J, Thirup S, et al. Cooperative binding of LysM domains determines the carbohydrate affinity of a bacterial endopeptidase protein. *FEBS Journal* 2013; 281 1196-208.
- [34]. Svitil AL, Kirchman DL. A chitin-binding domain in a marine bacterial chitinase and other microbial chitinases: implications for the ecology and evolution of 1, 4- β -glucanases. *Microbiology* 1998; 144(5): 1299-308.
- [35]. Basile A, Sorbo S, Giordano S, Lavitola A, Cobianchi RC. Antibacterial activity in *Pleurochaete squarrosa* extract (Bryophyta). *International journal of antimicrobial agents* 1998; 10(2): 169-72.
- [36]. Schneewind O, Missiakas D. Lipoteichoic acids, phosphate-containing polymers in the envelope of gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology* 2014; 196(6): 1133-42.

Cloning, Expression and Antimicrobial Activity of a Recombinant (CBD)2-DrsB1 Peptide Against Human *Microbial Pathogens*

Marzieh Varasteh Shams¹, Farhad Nazarian-Firouzabadi^{2,*}, Ahmad Ismaili³

1. Ph.D student in plant Biotechnology, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
2. Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
3. Associate Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

Abstract

New and effective antimicrobial agents are inevitable because of the increased use of antibiotics and spread of microbial resistance. The expression of antimicrobial peptides that are part of the inherent immune system of all organisms, is a novel approach of confronting a wide range of pathogens. Among the wide range of antimicrobial peptides, Dermaseptin B1 is a potent cationic peptide with strong antimicrobial activity. In this study, Dermaseptin B1 (DrsB1) coding sequence from *Phyllomedusa bicolor* frogs was fused to a tandem repeat of a chitin-binding domain (CBD) from *Cladosporium fulvum* Avr4 effector protein and expressed in tobacco Hairy Roots (HRs). The expression of recombinant (CBD) 2-DrsB1 peptide was confirmed, using molecular methods and its antimicrobial activity was evaluated against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Bacillus subtilis* bacteria. The results of antimicrobial activity analysis demonstrated that the recombinant protein had a significant ($P < 0.05$) effect on pathogenic bacteria growth. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of recombinant peptide revealed that more than two-fold concentration of recombinant peptide was needed to control gram-negative bacteria in comparison to that of gram-positive bacteria. It is evident from the results of this study that the expression and production of a recombinant (CBD)2-DrsB1 peptide in tobacco hairy roots can be used as an approach to produce new antimicrobial agents.

Received: 2018/05/14

Accepted: 2018/07/22

Keywords: Antimicrobial peptide, CBD, Dermaseptin B1, Hairy Root, Human pathogenic bacteria, Tobacco.