طراحی، ساخت، همسانه‌سازی و بیان ژن بتا دیفنسین و تاثیر آن در ترمیم زخم

نفیسه کریمی[۱](M.Sc)، بهناز صفار[۲و۱*](Ph.D)، محسن مبینی دهکردی[۲](Ph.D)، کامران قائدی[۳](Ph.D)

۱- *گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران*

۲- *پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران*

۳- *گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران*

چکیده

سابقه و هدف: در میان پپتیدهای ضد میکروب، دیفنسین‌ها یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌ی پپتیدهای ضد میکروب می‌باشند و به واسطه‌ی فعالیت آن‌ها بر ضد باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها، به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های نسل جدید منفعت بسیار دارند. هدف از این مطالعه طراحی، سنتز، همسانه‌سازی و بیان پروتئین بتادیفنسین نوتروفیل‌های گاو (BNBD2) به منظور بررسی خاصیت ترمیم زخم بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ژن (BNBD2) با توجه به کدون‌های ترجیحی باکتری E.coli بهینه‌سازی و سنتز شد. از ناقل pET-32a(+) به منظور زیر همسانه‌سازی ژن BNBD2 استفاده گردید. بیان پروتئین BNBD2 با ماده‌ی القاکننده (IPTG) با استفاده از سیستم الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) بررسی گردید. خاصیت ترمیم زخم توسط ایجاد زخم بر روی یک گروه از موش‌ها و تیمار آن‌ها با پروتئین بتادیفنسین، در مقایسه با گروه کنترل مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ژن BNBD2 به طور موفقیت‌آمیزی در ناقل pET32a(+) همسانه‌سازی شده است. پروتئین نوترکیب توسط IPTG القا گردید. کاهش معنی‌دار سطح زخم در گروه تیمار در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت.

نتیجه‌گیری: پروتئین نوترکیب BNBD2 با موفقیت در سیستم پروکاریوتی بیان شد. این پروتئین می‌تواند در آینده در ترمیم زخم مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: دیفنسین، التیام زخم، کدون، همانند سازی ملکولی، بیان ژن

مقدمه

پپتیدهای ضد میکروبی، پلی‌پپتیدهایی کم‌تر از ۱۰۰ آمینو اسید می‌باشند که طیف وسیعی از فعالیت‌های ضد میکروبی دارند. این پپتیدها عمدتاً غشاهای میکروبی را مورد هدف قرار می‌دهند، در نتیجه به واسطه‌ی قابلیت کاربرد آن‌ها، به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های نسل جدید به شمار می‌روند [۲،۱]. یک دسته از این پپتیدها دیفنسین‌ها هستند. دیفنسین‌ها به سه گروه آلفا (α)، بتا (ß) و تتا (ø) تقسیم می‌شوند [۳]. بتادیفنسین‌ها یکی از بزرگ‌ترین اعضای این خانواده می‌باشند و رونوشت آن‌ها در بسیاری از مهره‌داران، بی‌مهرگان و گیاهان یافت می‌شود [۴]. بیش‌تر دیفنسین‌ها شش ریشه‌ی سیستئین دارند که برای فعالیت ضد میکروبی ضروری نیست اما مقاومت بالایی نسبت به پروتئولیز باکتریایی را ایجاد می‌کنند [۵]. دیفنسین‌ها در سلول‌ها و بافت‌هایی فراوان می‌باشند که در دفاع میزبان بر

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۳-۲۳۲۴۴۱۹

Email: saffar_b@sci.sku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۴

ضد عفونت‌های میکروبی درگیر می‌باشند [۱]. لوکوسیت‌ها و سلول‌های مخاطی اپی‌تلیال عمده انواع سلول‌هایی هستند که دیفنسین‌ها را تولید می‌کنند [۴].

بررسی توسعه تجاری پپتیدهای ضد میکروبی در کشورهای مختلف نشان می‌دهد که می‌توان از داروهای پپتیدی در مراحل مختلف درمان و برای درمان موارد مختلف ابتلا به عفونت مانند زخم پای بیماران دیابتی، جوش صورت، عفونت غشای مخاطی، ورم لثه یا مننژیت به صورت موضعی، خوراکی یا سیستمیک استفاده کرد [۶]. مطالعات نشان می‌دهد که غلظت دیفنسین‌ها در پلاسما، خون و مایعات بدن در بیماران با عفونت باکتریایی افزایش می‌یابد و اهمیت فیزیولوژیکالی دیفنسین‌ها را در عفونت مشخص می‌کند. در کنار اثر دیفنسین‌ها بر روی دفاع میزبان و تنظیم ایمنی، هم‌چنین نقش مهمی در بهبود زخم ایفا می‌کنند. به عبارت دیگر دیفنسین‌ها با غیر فعال کردن باکتری‌ها، ویروس‌ها و مخمرها، باعث تسریع در بهبودی زخم می‌گردند [۷]. دیفنسین‌ها در فرایندهای سلولی متعدد مانند مهاجرت سلول یا تکثیر سلولی شرکت می‌کنند و به عنوان عاملی در بهبود زخم پوست پستانداران توصیف شده‌اند. فاکتورهای مشتق شده از کراتینوسیت‌ها و پپتیدهای ضد میکروب باعث تحریکات هورمون‌های اتوکراین و پیشبرد مهاجرت کراتینوسیت‌ها و سنتز کلاژن می‌شوند. کاهش در میزان پپتیدهای ضد میکروب مشتق شده از کراتینوسیت‌ها با افزایش ریسک عفونت هم‌راه است. برای نمونه کاهش در پپتیدهای ضد میکروب می‌تواند توضیحی برای افزایش خطر در عفونت‌های پزودوموناس در بیماران سوختگی باشد [۷]. پپتیدهای ضد میکروب چندین مزیت بیش‌تر از آنتی‌بیوتیک‌ها دارند: ۱- به واسطه‌ی مکانیسم‌های اختصاصی پپتیدهای ضد میکروب، مقاومت کم‌تری در برابر آن‌ها به وجود می‌آید. ۲- پپتیدهای ضد میکروب طیف وسیعی از میکروب‌ها را مورد هدف قرار می‌دهند. ۳- فعالیت پپتیدهای ضد میکروب، در غلظت نانومولار انجام می‌گیرد. ۴- امکان سنتز شیمیایی آنالوگ‌های پپتیدهای ضد میکروب با ویژگی تغییر یافته‌ی زیستی و کاهش سمیت برای سلول یوکاریوت وجود دارد [۶]. با توجه به طیف وسیع خاصیت ضد میکروبی بتادیفنسین نوتروفیل گاو در مقایسه با سایر دیفنسین‌ها، این تحقیق، با هدف طراحی، بهینه‌سازی کدون، همسانه‌سازی و بیان ژن BNBD2 در ناقل pET-32a(+) و بررسی خواص ترمیمی آن صورت گرفت تا گامی جهت تولید یک پپتید دارویی با خاصیت ترمیمی و ضد میکروبی برداشته شود.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، ناقل‌ها و مواد. باکتری‌های استفاده شده شامل سویه‌های آزمایشگاهی همسانه‌سازی و بیانی باکتری E.coli به ترتیب با نام‌های DH5α و BL21 (DE3) و پلاسمیدهای pGH و pET-32a(+) جهت همسانه‌سازی و بیان ژن هدف به ترتیب مورد استفاده قرار گرفتند. از محیط‌های کشت لوریا برتانی مایع و آگاردار جهت رشد باکتری E.coli استفاده گردید. آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به منظور غربالگری، از شرکت سیگما خریداری شد. آنزیم‌های محدودالاثر BamHI و HindIII و RNase H از شرکت سیناژن و آنزیم DNA T4لیگاز، از شرکت تاکارا تهیه شدند. روش‌های ملکولی استفاده شده در این پژوهش بر اساس روش‌های استاندارد می‌باشد [۸].

طراحی، ساخت، بهینه کردن و همسانه‌سازی ژن BNBD2. ژن بتادیفنسین ۲- β BNBD2: Bovine neutrophil (defensin 2) با طول ۱۲۰ جفت باز، کدکننده‌ی پپتیدی با ۴۰ آمینو اسید در بردارنده‌ی ۶ ریشه‌ی سیستئین با سه باند دی‌سولفید درون مولکولی ما بین ریشه‌های ۳۶-۷، ۴۹-۱۴ و ۳۷-۱۹ می‌باشد. توالی ژن از بانک اطلاعاتی NCBI ,Ensemble با شماره (P 46160.1) گرفته شد. در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار Clustalw میزان شباهت توالی مورد نظر با توالی آمینواسیدی دیفنسین‌های انسانی و سایر دیفنسین‌های موجود در گاو مقایسه گردید. به منظور همسانه‌سازی و بیان ژن BNBD2 در باکتری E.coli، توالی ژن هدف BNBD2 بر اساس توالی آمینواسید آن و کدون‌های ترجیحی مورد استفاده

در باکتری E.coli و با در نظر گرفتن جایگاه‌های محدودکننده‌ی آنزیم‌های BamHI/HindIII طراحی گردید (بیش‌ترین کدون‌های مورد استفاده در E.coli، agg، aga، cga، cgg برای آرژنین، ata، برای ایزولوسین، cta، برای لوسین، gga، برای گلیسین و ccc، برای پرولین می‌باشد). نرم‌افزارهای مورد استفاده جهت بهینه‌سازی کدون شامل Optimizer, Genescript و E.coli rare codon analyzer2می‌باشند. جهت جدا کردن پپتید مورد نظر از پروتئین نوترکیب، جایگاه شکافت فرمیک اسید به صورت آسپارتیک اسید-پرولین در سمت N- ترمینال ژن BNBD2قرار گرفت. توالی مذکور سنتز و در وکتور pGH درج گردید (شرکت بیونیرکره). اندازه‌ی ژن مذکور به همراه انتهاهای چسبنده ۱۴۸ جفت باز می‌باشد. توالی الیگو نوکلئوتید (جایگاه BamHI و جایگاه HindIII در رشته DNAنشان داده شده است) و توالی آمینو اسید مربوط به ژن BNBD2در زیر آمده است. توالی پپتید در کادر خاکستری و جایگاه محل برش توسط فرمیک اسید به صورت خط در زیر توالی مشخص شده است.

5'CGGATCCGACGATGACGATCCTATTGTCCG
TAACCATGTAACCTGCCGTATTAATCGTGGTT
TCTGTGTACCTATTCGTTGCCCTGGTCGCACT
CGTCAGATCGGTACGTGTTTTGGTCCGCGTAT
TAAATGCTGCCGTAGTTGGTAGAAGCTT3'

GSDDDDPIVRNHVTCRINRGFCVPIRCPGRTRQI
GTCFGPRIKCCRSW

زیرهمسانه‌سازی ژن BNBD2 در ناقل pET32a(+).

پلاسمیدهای pGH حاوی ژن مورد نظر و وکتور(+)pET32a با آنزیم‌های محدودالاثر BamHI و HindIII مورد هضم قرار گرفتند. برای جداسازی قطعات مورد نظر محلول‌های واکنش برش بر روی ژل آگارز ۱ درصد با دمای ذوب پایین الکتروفورز گردید. سپس توسط کیت استخراجDNA از ژل آگارز مورد جداسازی قرار گرفتند. باند مربوط به ژن و ناقل برش یافته، از ژل جدا شدند. سپس واکنش الحاق قطعه ژن و وکتور برش‌خورده با نسبت مولی ۱ به ۳ با کمک آنزیم T4 لیگاز در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت انجام پذیرفت. محصول الحاق به باکتری‌های مستعد شده BL21 (DE3)به روش شوک حرارتی انتقال یافت. سویه میزبان نوترکیب بر روی محیط LB حاوی عامل انتخابی آمپی‌سیلین به مدت یک شب کشت گردید. بنابراین کلنی‌های نوترکیب با غربالگری آنتی‌بیوتیک جدا شدند. حضور پلاسمید نوترکیب با هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های BamHI و HindIII و انجام توالی‌یابی، تاییدگردید (شرکت ژن فن آوران).

القای بیان و بررسی تولید پروتئین. به منظور بررسی بیان ژن، یک تک همسانه از باکتری تراریخت، در محیط LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت µg/m ۱۵۰ کشت شبانه داده شد و سپس ۵ میلی‌لیتر از آن به ۵۰ میلی‌لیتر از همان محیط تلقیح و پس از رسیدن OD به حد مطلوب القا توسط IPTG با غلظت یک میلی‌مولار انجام شد. نمونه‌برداری قبل از القا و در زمان‌های مختلف پس از القا صورت گرفت. بدین نحو که هر بار ۵ میلی‌لیتر از محیط جدا و مورد سانترفیوژ قرار گرفت. نمونه‌ها در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانترفیوژگردید و رسوب سلولی بعد از حل شدن در بافر TE و تاثیر امواج ماوراء صوت (قدرت ۸۰درصد و پالس ۰/۵) در دور ۱۳۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانترفیوژ شد. جهت بررسی بیان، مایع فازرویی، برروی ژل اکریل امید SDS-PAGE برده شد. تعیین غلظت پروتئین نوترکیب به کمک روش برادفورد انجام شد [۱۳]. بهینه‌سازی بیان در شرایط مختلف دانسیته سلولی در زمان القا، مدت زمان القا و دمای رشد در مطالعه قبلی صورت گرفته است [۹]. به منظور تایید اختصاصی پروتئین بیان شده از تکنیک حساس وسترن‌بلات استفاده گردید. جهت جدا کردن پروتئین دیفنسین از پروتئین نوترکیب از اسید فرمیک استفاده شد و سانتریکون با غشای سلولزی جهت خالص‌سازی پروتئین مورد نظر مورد استفاده قرار گردید [۹].

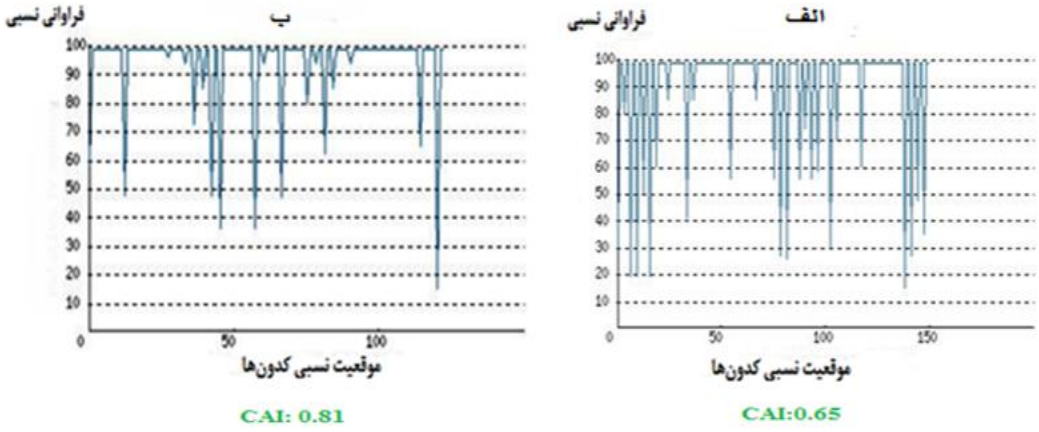
اثر دیفنسین در ترمیم زخم. جهت بررسی نقش پروتئین دیفنسین در ترمیم زخم از تعداد ۱۰ موش سفید ۱۰-۸ هفته‌ای نژاد BalbC استفاده شد (موش‌ها از دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد خریداری و ملاحظات اخلاقی در زمینه استفاده از حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید). بعد از

بی‌هوشی موش‌ها، قسمتی از موهای سطح پشتی تراشیده و ناحیه پوست تراشیده شده با الکل ۷۰ درصد تمیز گردید. از یک پانچ بیوپسی ۵ mm برای ایجاد زخم پوستی در شرایط استریل استفاده گردید و روی زخم‌ها پوشانده نشد [۱۱،۱۰]. سپس حیوانات به دو گروه کنترل و تیمار تقسیم شدند. مقدار ۵۰ میکرولیتر از بافر حل‌کننده پروتئین به عنوان کنترل برای یک بار در روز و ۵۰ میکرولیتر از پروتئین دیفنسین ۱۰ میکروگرم در ۵۰ میکرولیتر به عنوان غلظت تیمار (این غلظت از پروتئین دارای خواص ترمیمی و باکتری کشی می‌باشد غلظت‌های بیش‌تر واکنش‌های التهابی را تحریک می‌کند) استفاده شد [۱۸]. جهت بررسی روند ترمیم زخم روزهای اول، سوم، ششم و نهم مساحت زخم بر حسب ۲mm اندازه‌گیری شد [۱۲]. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده، از آزمون ANOVA و نرم‌افزار SPSS (version,17) استفاده گردید.

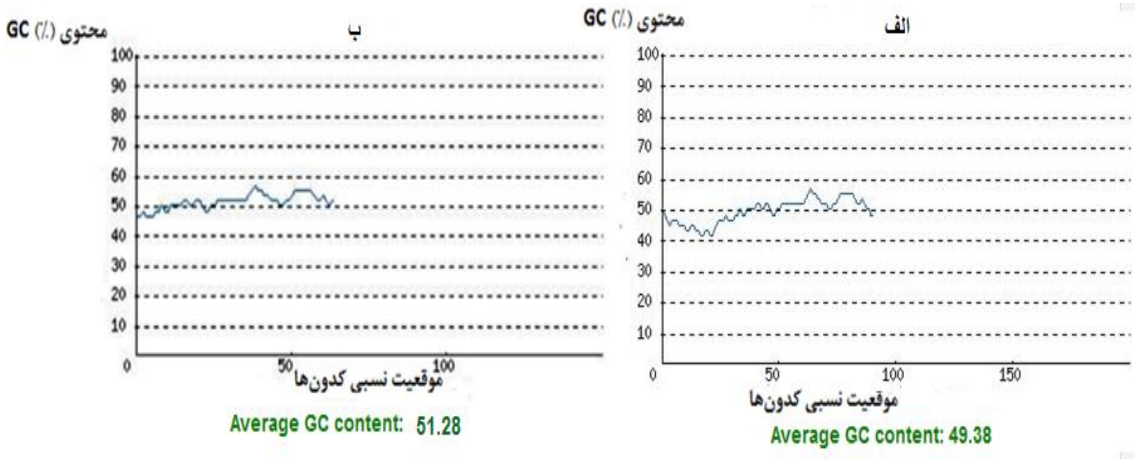
نتایج

بررسی هم‌ردیفی پروتئین BNBD2: نتایج حاصل از هم‌ردیفی این پپتید با دیفنسین‌های انسانی و سایر دیفنسین‌ها نشان‌دهنده وجود شش ریشه سیستئین حفاظت شده در این ترکیب می‌باشد.

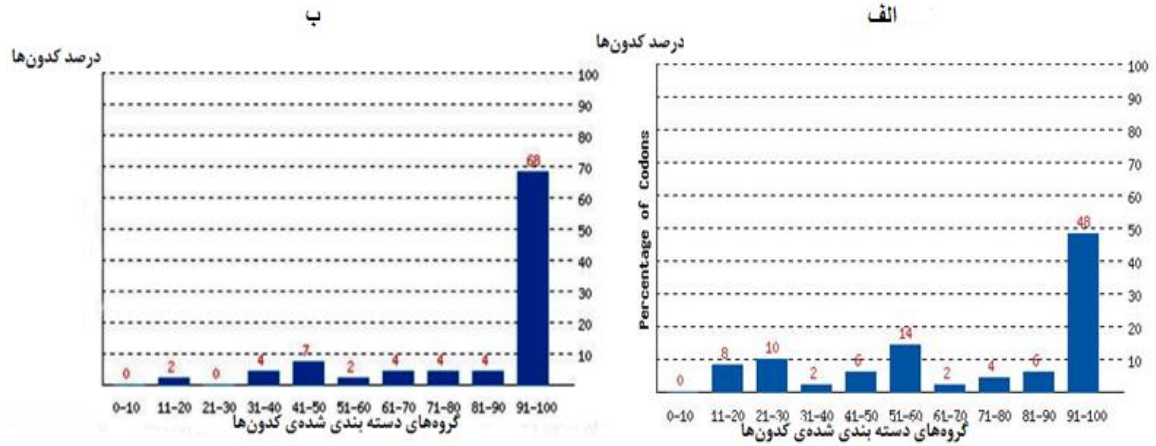
بهینه‌سازی و همسانه‌سازی توالی ژن BNBD2. ترادف کد کننده ژن BNBD2 با توجه به عوامل متعددی از جمله Codon usage bias و افزایش درصد محتوای سایتوزین و گوانین که می‌تواند بر روی بیان پروتئین در باکتری Ecoli تاثیرگذار باشد بهینه گردید. بررسی کدون‌های موجود در توالی نوکلئوتیدی کمک بزرگی در پیش‌بینی میزان بیان و انتخاب میزبان مناسب به منظور بیان پروتئین می‌کند. افزایش شاخص CAI (Codon Adaptation index) نشان‌دهنده‌ی افزایش کدون‌های مورد استفاده برای بیان این ژن در باکتری است (شکل۱). احتمال بیان بالا با میزان CAI رابطه مستقیم دارد. CAI بالای ۰/۸ از بیان بالای پروتئین در میزبان مورد نظر حکایت می‌کند. CAI برای پپتید BNBD2 بعد از بهینه‌سازی کدون‌ها، ۰/۸۱ می‌باشد. بنابراین بیان این پروتئین در میزبان اشریشیاکولی بعد از بهینه‌سازی کدون‌ها می‌تواند افزایش یابد. در منحنی درصد بازهای سیتوزین و گوانین، محدوده‌ی ایده‌آل درصد C و G بین ۳۰درصد تا ۷۰درصد است و پیک‌های خارج از این محدوده بر کارایی بیان اثر معکوس می‌گذارد. درصد محتوای سایتوزین و گوانین برای ژن BNBD2، بعد از بهینه‌سازی کدون‌ها، ۵۱/۲۸درصد می‌باشد (شکل ۲). درصد توزیع کدون‌ها در گروه‌های دسته‌بندی شده نیز محاسبه گردیده است. ارزش ۱۰۰ برای کدون‌هایی با بالاترین فراوانی برای بیان در ارگانیسم مورد نظر داده می‌شود. کدون‌هایی با ارزش کم‌تر از ۳۰ برای بیان مناسب نیستند (شکل ۳). ژن BNBD2 پس از بهینه‌سازی، سنتز و در ناقل pGH توسط شرکت سازنده همسانه‌سازی شد.



شکل۱. توزیع فراوانی کدون‌های مورد استفاده برای بیان در میزبان مورد نظر (اشریشیا کولی). (الف) شاخص CAI قبل از بهینه سازی کدون ۶۵/. و(ب) بعد از بهینه سازی کدون شاخص مورد نظر به ۰/۸۱ می رسد.



شکل ۲. منحنی درصد محتوی بازهای GC. محدوده‌ی ایده آل درصد GC بین ۳۰٪ تا ۷۰٪ است و پیک‌های خارج از این محدوده بر کارایی بیان اثر معکوس می‌گذارد. الف) درصد GC برای ژن BNBD2، قبل ازبهینه سازی کدون ۴۹/۳۸ درصد ب) بعد از بهینه سازی به ۵۱/۲۸ درصد می رسد.

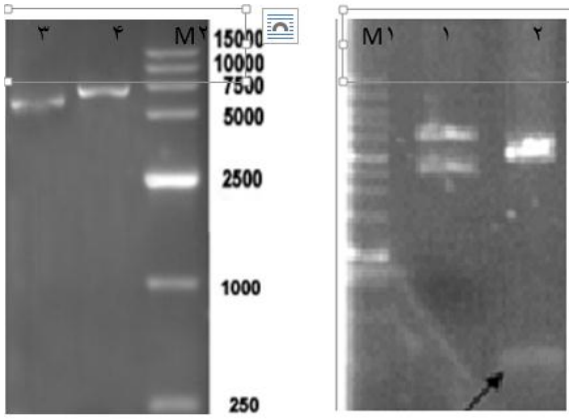


شکل ۳. درصد توزیع کدون‌ها در گروه‌های دسته بندی شده. الف) درصد توزیع کدون‌ها قبل از به‌ینه سازی. همانطور که در شکل مشخص شده است، ۱۸ درصد از کدون‌ها، ارزش کمتر از ۳۰ در گروه های دسته بندی شده دارند که کارایی ترجمه را کاهش می دهد. ب) درصد توزیع کدون‌ها بعد از به‌ینه سازی . ای‌ن می‌زان به ۲٪ کاهش می ی‌ابد.

زیر همسانه‌سازی در **PET-32a(+)**: قطعات حاصل از برش وکتورهای pET-32a(+) و pGH از روی ژل بازیافت شدند و قطعات ژن و ناقل با یک‌دیگر الحاق شدند (شکل ۴). الحاق ژن BNBD2 به پلاسمید PET-32a(+) با موفقیت انجام شد. کلونی‌های حاوی پلاسمید بیانی نوترکیب BNBD2- pET-32a(+) مورد استخراج پلاسمید قرار گرفتند. غربالگری با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده‌ی BamHI/HindIII صورت گرفت و پلاسمید نوترکیب BNBD2- pET-32a(+) مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. صحت برش با استفاده از الکتروفورز تایید شد. مشاهده‌ی قطعه خارج شده با اندازه مورد انتظار نشان‌دهنده صحت همسانه‌سازی می‌باشد (شکل ۵). نتایج تعیین توالی صحت توالی به دست آمده را تایید نمود.

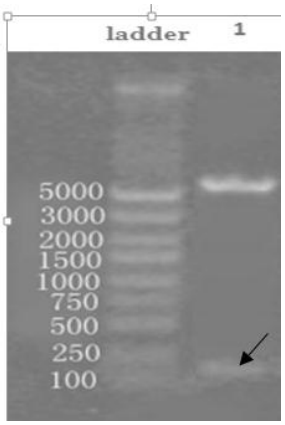
بیان ژن BNBD2 و تایید آن. ژن BNBD2 همسانه‌سازی شده در ناقل pET32a توسط IPTG یک میلی‌مولار القا شد و نمونه‌های پروتئینی تحت شرایط دناتوره به همراه نشانگر پروتئینی (SM0671) روی ژل پلی‌آکریل آمید الکتروفورز شدند (شکل ۶). بیش‌ترین بیان ۴ ساعت بعد از القا می‌باشد. پروتئین فیوژن (پپتید BNBD2 به همراه هگزا هیستیدین و سایر دنباله‌های پروتئینی موجود در ناقل pET32 مانند تیرودوکسین) وزنی حدود ۲۵ کیلو دالتون دارد. نتایج مربوط به بهینه‌سازی بیان، خالص‌سازی پروتئین و تایید آن توسط

وسترن‌بلات در مطالعه قبلی آمده است [۹]. وزن مولکولی پروتئین، ۴/۶ کیلودالتون بعد از جداسازی از پروتئین فیوژن می‌باشد.

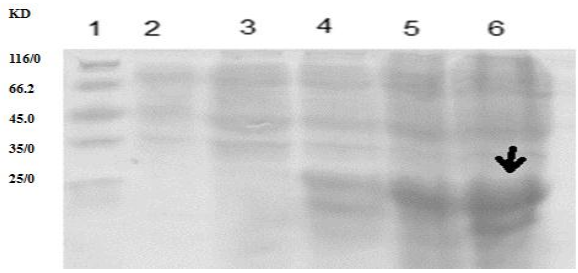


الف ب

شکل ۴. الگوی حرکت قطعات حاصل از برش وکتور های (pET-32a(+و pGH روی ژل آگارز. الف) M1مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی SM0312شماره ۱ : وکتور pGHبرش نخورده . شماره ۲ وکتور pGHبرش خورده با آنزیم‌های BamHI/ HindIII، قطعه حدود ۱۴۸ جفت بازی حاوی ژن مورد نظر خارج شده است. ب)شماره‌ی ۳: وکتور (pET-32a(+ برش نخورده که دارای ۵۹۰۰ جفت باز می‌باشد. شماره‌ی ۴: وکتور (pET-32a(+برش خورده با آنزیم‌های BamHI/ HindIII و شامل دو قطعه می‌باشد. یک قطعه‌ی کوچک‌تر که از ژل خارج می‌شود و در حدود ۲۶ جفت باز است و قطعه‌ی بزرگ‌تر به عنوان DNA ناقل می‌باشد که در حدود ۵۸۷۵ جفت باز است. M2 مارکر۱۵ Kb DNA (Rovalab)

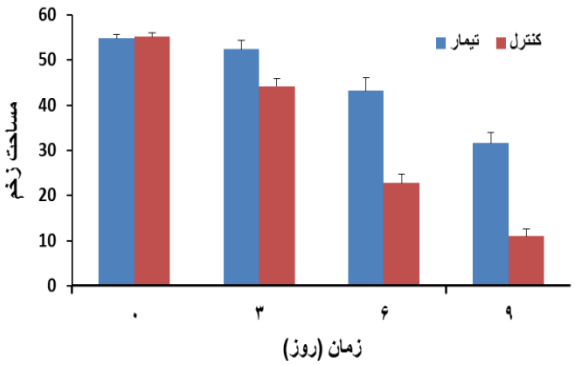


شکل ۵: الگوی حرکت قطعات حاصل از برش وکتور بیانی نوترکیبpET-32a. (BNBD2 - (+بعد از برش پلاسمید نوترکیب (pET-32a BNBD2 - (+ با آنزیم‌های BamHI/ HindIII ، یک قطعه حدود ۱۴۸ جفت بازی معادل با ژن مورد نظر و یک قطعه‌ی حدود ۵۸۰۰ جفت بازی معادل با پلاسمید برش خورده بر روی ژل مشخص گردید.(مارکر وزن ملکولی SM0321)



شکل ۶: تصویر ژل SDS-PAGE جهت بررسی بیان پروتئینBNBD2 در زمان‌های مختلف. چاهک ۱: مارکر پروتئینSM0671 چاهک ۲: سلول لیز شده‌یE. coli BL21(DE3) چاهک ۳: سلول لیز شده‌ی E. coli BL21(DE3) ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب قبل از القا. چاهک ۴: پروتئین نوترکیب ۲ ساعت بعد از القا با IPTG. چاهک ۵: پروتئین نوترکیب ۳ساعت بعد از القا با IPTG. چاهک ۶: پروتئین نوترکیب ۴ساعت بعد از القا با IPTG. فلش باند مورد نظر را نشان می دهد.

بررسی تاثیر پروتئین بر روی روند ترمیم زخم. ابتدا اندازه زخم بر روی دو گروه تیمار و کنترل یکسان بود. بر اساس آزمون ANOVA در در روزهای سوم، ششم و نهم تفاوت معنی‌داری از جهت مساحت زخم بین گروه‌های کنترل و تیمار دیده شد. کاهش معنی‌دار مساحت زخم بر اساس آزمون ANOVA در سطوح مختلف تیمار و بین کنترل و تیمار در هر زمان نشان داده شده است (P<۰/۰۵) (شکل ۷).



شکل ۷. میانگین میزان کاهش مساحت زخم در روزهای سوم، ششم و نهم بعد از ایجاد زخم به همراه انحراف معیار. کاهش معنی دار مساحت زخم بر اساس آزمون ANOVA در سطوح مختلف تیمار و بین کنترل و تیمار در هر زمان نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

آنتی‌بیوتیک‌ها هنوز به عنوان انتخاب اول درمانی برای مبارزه با عفونت‌های میکروبی در انسان‌ها و حیوانات مورد

مصرف قرار می‌گیرند. شیوع مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها یک نگرانی برای سلامت عمومی ایجاد می‌کنند. در نتیجه کشف و گسترش پپتیدهای ضد میکروب منجر به بهبود بیماری‌های عفونی می‌شود. پپتیدهای ضد میکروب بر طیف وسیعی از باکتری‌ها، قارچ‌ها، انگل‌ها و ویروس‌های غشادار عمل می‌کنند و بر خلاف آنتی‌بیوتیک‌ها که عموماً یک آنزیم متابولیک را هدف قرار می‌دهند و ممکن است مقاومت در میکروارگانیسم‌ها القا کنند، پپتیدهای ضد میکروب عمدتاً با مکانیسم‌های تشکیل‌دهنده‌ی منفذ در غشاء هدف، عمل می‌کنند که مقاومت در برابر آن مشکل می‌باشد [۱۶،۱۵]. در پستانداران، دیفنسین‌ها در میان فراوان‌ترین طیف وسیع آنتی‌بیوتیک‌ها هستند و در سلول‌های هماتوپویتیک و اپی‌تلیال بیان می‌شوند [۱۶]. دیفنسین‌ها به ویژه در نوتروفیل‌ها فراوان هستند هر چند بیان ژن به نوتروفیل‌ها محدود نمی‌شود [۱۷].

در این تحقیق به منظور تولید و بیان پروتئین BNBD2، ابتدا با در نظر گرفتن کدون‌های مورد استفاده در باکتری اشریشیاکولی، طراحی و سنتز شیمیایی ژن BNBD2 صورت گرفت و شرایط لازم جهت بیان این پروتئین با ساخت سلول‌های مستعد به بیان ژن فراهم شد و طی بررسی‌های مختلف این پروتئین تولید گردید. نحوه‌ی به کارگیری کدون‌ها ممکن است روی میزان بیان پروتئین اثر بگذارد. در صورتی که ژن مورد نظر حاوی کدون‌هایی باشد که به طور معمول در باکتری به کار نمی‌رود به دلیل کمبود tRNA برای کدون‌های کمیاب احتمال کاهش میزان بیان وجود دارد. هنگام برخورد با یک یا دو کدون کمیاب امکان وقفه در ترجمه و به دنبال آن کاهش سرعت ساخت پروتئین و در معرض تخریب قرار گرفتن mRNA وجود دارد. با این وجود حضور یک کدون کمیاب لزوماً منجر به کاهش بیان نخواهد شد [۱۴]. در این پژوهش از سویه‌ی E. coli BL21 (DE3) استفاده شد و ژن BNBD2 با در نظر گرفتن کدون‌های بیانی در این سویه طراحی و سنتز گردید. این سویه با داشتن tRNAهایی که اسید آمینه را برای کدون‌های کمیاب فراهم می‌کنند برای بررسی بیان پروتئین BNBD2 مناسب‌تر است. وکتور BNBD2- pET-32a(+) تقریباً دارای ۵۹۰۰ جفت باز و ژن انتخاب‌گر آمپی‌سیلین (بتالاکتاماز) است. پروموتور T7در این وکتور مسئول کنترل بیان ژن وارد شده است که القا این پروموتر توسط IPTG صورت می‌گیرد. وکتور pET-32a(+) حاوی ژن Lac I می‌باشد که پروتئین مهارکننده‌ی Lac I را کد می‌کند. القا IPTG، مهارکننده را از اپراتور Lac بر می‌دارد، بنابراین زمانی که IPTG که یک آنالوگ برای لاکتوز است به سلول اضافه می‌شود رونویسی پلی‌مراز T7 و بنابراین رونویسی ژن هدف انجام می‌شود. مزیت IPTG برای مطالعات در In vivo این است که به وسیله E.coli متابولیزه نمی‌شود و غلظت آن ثابت و پایدار می‌ماند و سرعت بیان ژن تحت کنترل در آزمایش متغییر نمی‌باشد. سویه DE3 میزبانی از فاژ لیزوژن DE3 می‌باشد که حامل یک نسخه کروموزومی از ژن T7 RNA polymerase تحت کنترل پروموتور LacUV5 است. چنین سویه‌های برای تولید پروتئین ژن‌های هدف که در وکتور pET تحت القای IPTG همسانه‌سازی شده‌اند مناسب است. علاوه بر این به دلیل خاصیت باکتری‌کشی پروتئین دیفنسین باید این پروتین به صورت فیوژن باپروتئین‌های دیگر بیان شود تا باعث مرگ سلول میزبان نشود از این رو ناقل pET 32a به دلیل داشتن ژن تیرودوکسین ناقل مناسبی برای این پروتئین می‌باشد. در مطالعه قبلی توسط این تیم تحقیقاتی، پروتئین مورد نظر توسط سانتریکون Vivaspin2 که حاوی غشای تری‌استات‌سلولز و یا هیدروسارت است خالص‌سازی شد و با استفاده از جایگاه برش اسپارتیک- پرولین پروتئین مورد نظر از توالی‌های اضافه مانند پروتئین تیوردوکسین جدا گردید [۱۴]. از آن‌جایی که فاکتورهای مولکولی مهم برای قدرت ضد میکروبی یک پپتید بار و هیدرو فوبیسیتی آن می‌باشد و با در نظر گرفتن خاصیت کاتیونیک ناحیه‌ی c- ترمینال پپتید BNBD2، به نظر می‌رسد بیان بالای این ژن می‌تواند فعالیت ضد میکروبی بهتری بر ضد باکتری داشته باشد. بررسی اثر باکتری کشی روی تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نشان‌دهنده قدرت باکتری کشی این

پروتئین بود [۹]. با توجه به نتایج بـه دسـت آمـده از مطالعـه قبلی برآن شدیم تا خاصیت ترمیمی پروتئین تولید شده را نیـز مطالعه کنیم. نتایج حاکی از خاصیت ترمیمی پـروتئین مـذکور دارد. به طوری‌که میزان بهبودی زخـم در روزهـای ۳، ۶ و ۹ نسبت به هم اختلاف معنی‌داری را نشان داد. مطالعـات نشـان داده است که در هنگام زخم میزان بیان بتادیفنسین‌ها افـزایش می‌یابد. بتادیفنسین‌ها باعث تکثیر و حرکت کراتینوسـیت‌هـای پوست و رگزایی می‌شوند که در ترمیم زخم نقش دارند. علاوه بر این با تحریک فیبروبلاست‌ها باعث سنتز پروتئوگلیکان‌های خارج سلولی می‌گردند [۱۹،۱۸]. هر چنـد خاصـیت بـاکتری کشی و جلوگیری از عفونت می‌تواند نیز می تواند عامل مهمی در افزایش قدرت ترمیم باشد. بنابراین با توجه به نقش دوگانه این پپتیدها بی‌شک نتایج این تحقیق می‌تواند در بررسـی ایـن پپتیدها به عنوان عوامل درمانی جدید در ترمیم و بهبود زخـم مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشـگاه شـهرکرد در قالـب طرح پژوهشی انجام شده است.

منابع

[1] Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nature 2003; 3: 710-720.

[2] Li Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in escherichia coli: A review. Protein Expres Purif 2011; 80: 260-267.

[3] Aono S, Li C, Zhang G. Molecular and functional characterization of bovine beta-defensin. Vet Immunol Immunopathol 2006; 113: 181-190.

[4] Klotman ME, Chang TL. Defensins in innate antiviral immunity. Nat Rev Immunol 2006; 6: 447-456.

[5] De Smet K, Contreras R. Human Antimicrobial Peptides: Defensins, Cathelicidins and Histatins. Biotechnol. Lett 2005, 7: 1337-1347.

[6] Lazarev VN. Antimicrobial peptides and their use in medicine. Appl Biochem Micro 2010; 46: 803-814.

[7] Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sørensen O, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. J Invest Dermatol. 2003,120 (3):379-89.

[8] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning; a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 2001.

[9] Karimi N, Saffar B, Ghaedi K, Mobini-Dehkordi M. Optimization of expression, purification and handling anti bacteria feature protein of bovine neutrophil B-defensing BNBD2. J Shahrekord Univ Med Sci 2013; 15: 89-97. (Persian).

[10] Akila S, Nanda A. In-vivo wound healing activity of silver nanoparticles: an investigation. Intern J Sci Res 2012; 3: 1208-1212.

[11] Heydarnejad MS, Yarmohammadi-Samani P, Mobini- Dehkordi M, Rahnama S. The influence of topical treatment of dermal wounds with silver nanoparticles on ALT and AST enzymes and hemoglobin in mice (Mus Musculus). ZUMS J 2013; 21: 35-44 (Persian).

[12] Heydarnejad MS, Yarmohammadi-Samani P, Mobini- Dehkordi M, Rahnama S. Assessing the effects of silver nanoparticles on some hematological parameters during the wound healing in mice. Feyz J Kashan Univ Med Sci 2013; 12: 359-365 (Persian).

[13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities ofprotein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.

[14] Sørensen H. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in E.coli. J Biotechnol 2005; 115: 113-128.

[15] Brogden KA, Ackermann M: Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. Int J Antimicrob Ag 2003; 22: 465-478.

[16] Hajikhani B, Peerayeh SN. Cloning, expression, purification and antigenicity of recombinant UreB332-HpaA fusion protein from Helicobacter pylori. MJMS 2010; 13: 1-10 (Persian).

[17] Cormican P, Meade KG. Evolution, expression and effectiveness in a cluster of novel bovine B-defensin. Immunogenetics 2008; 60: 147-156.

[18] Steinstraesser L, Koehler T, Jacobsen F et al. Host defense peptides in wound healing. I Mol Med 2008; 14: 528-537.

[19] Bradan A, Nizet V, Gallo RH. Antimicrobial peptide and the skin. Expert Opin Biol Ther 2004; 4: 543-549.

Design, construction, cloning and expression of beta Defensin and its effect on wound healing

Nafiseh Karimi (MSc) [1], Behnaz Saffar (Ph.D)[1,2], Mohsen Mobini(Ph.D)[1], Kamran Ghaedi (Ph.D)[3]
1 - Department of Genetics, Faculty of Sciences, Shahrekord University, Shahrekord
2 - Research Institute of Biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord
3 - Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan

(Received: 13 Apr 2015; Accepted: 26 Jul 2015)

Introduction*:* Defensins are members of the largest family of antimicrobial peptides and due to their activity against bacteria, fungi, and viruses are very profitable as new antibiotics. The aim of this study was to design, synthesis, clone and expression of BNBD2 (Bovine Neutrophil Beta-Defensin2) gene to investigate the wound healing process.

Materials and Methods*:* In this study, according to the preferred codon in E. coli, the BNBD2 gene was optimized and synthesized. The BNBD2 gene was sub cloned in vector pET-32a (+). The BNBD2 protein expression was assessed; using Isopropyl-ß-D-thio-galactoside (IPTG) as an inducer and evaluating by SDS-PAGE. The potency of BNBD2 protein for healing was studied by creating a wound on a group of mice and treating them with BNBD2 protein in comparison with the control group.

Results*:* The results showed that BNBD2 gene was successfully cloned into pET32a (+) vector. The expression of protein was induced by IPTG. There was a significant reduction in wound area in the treatment group in compare to the control group.

Conclusiosn*:* Recombinant protein (BNBD2) was expressed successfully in prokaryotic system. This protein might be potentially beneficial for wound healing procedures in the future.

Keywords*:* Defensins, Wound Healing, Codon, Molecular Cloning, Gene Expression

❋ Corresponding author. Tel: +98 383 2324419
saffar_b@sci.sku.ac.ir