

مقاله پژوهشی

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ بر باکتری اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) در شرایط آزمایشگاهی

مجید صفری^۱، حمید ابطحی^{۲*}، شیما چهره‌ئی^۳، شهره فهیمی راد^۲^۱گروه میکروبیولوژی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی اراک، اراک، ایران^۲مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران^۳دانشکده علوم پزشکی اراک، دانشگاه آزاد اسلامی اراک، اراک، ایران

*نویسنده‌ی مسئول: مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. تلفن: +۹۸-۸۶۳۴۱۷۳۵۰۲، فکس: +۹۸-۸۶۳۴۱۷۳۵۲۶، ایمیل: abtahi@arakmu.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۳۰ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۲۳

چکیده

مقدمه: از شایع‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو (MDR) است. جهت درمان پاتوژن‌های MDR می‌توان از پپتیدهای ضد میکروبی که مشتق از آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی هستند استفاده نمود.

اهداف: مطالعه حاضر به منظور ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی پروتئین نوترکیب دانه گیاه حنا ($Ib-AMP_4$) علیه اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) در شرایط آزمایشگاهی طراحی شد.

مواد و روش‌ها: جهت بیان پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ ساختار ژنی pET32a- $Ib-AMP_4$ به میزبان بیانی اشرشیاکلی BL21(DE3) منتقل گردید. مراحل خالص‌سازی با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی نیکل بهینه‌سازی گردید و اثربخشی پپتید از طریق تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)، سینتیک باکتری‌کشی و سینتیک رشد علیه اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) ارزیابی گردید.

نتایج: پروتئین نوترکیب با موفقیت در *E. coli* BL21 (DE3) بیان گردید. پروتئین مذکور با خلوص بیش از ۷۰ درصد به دست آمد. سنجش MIC عملکرد ضدباکتریایی مؤثر $Ib-AMP_4$ را علیه اسینتوباکتر بومانی در غلظت ۱۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تأیید نمود. $Ib-AMP_4$ در غلظت دو برابر MIC منجر به کاهش سریع تعداد سلول‌های زنده و کاهش کدورت تلقیح باکتریایی در مطالعات سینتیک باکتری‌کشی و سینتیک رشد گردید.

نتیجه‌گیری: $Ib-AMP_4$ نوترکیب تولیدشده عملکرد ضدباکتریایی علیه اسینتوباکتر بومانی نشان داد. بنابراین، نتایج حاصل از این مطالعه ممکن است جهت توسعه و تولید داروهای ضد میکروبی جدید در درمان عفونت‌های ناشی از اسینتوباکتر بومانی امیدبخش باشد و مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پپتیدهای ضد میکروبی، پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ ، اسینتوباکتر بومانی

۱. مقدمه

مقاوم به کاربا پنم، بار درمانی را در آسیای شرقی و جنوب شرقی تشدید می‌کند (۱).

مشکل جدید در عدم تعادل بین توسعه آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. در گذشته، به دلیل شیوع، باکتری‌های مقاوم به چند دارو افزایش یافته درحالی‌که توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید کاهش یافته است. نگاه به حقایق و آمار این نکته را مطرح می‌کند که اگر چه آنتی‌بیوتیک‌ها نقش خوبی روی کنترل عفونت‌های باکتری‌ها در ۸۰ سال گذشته داشته‌اند ولی تکامل سریع

مقاومت میکروبی به یک نگرانی جهانی تبدیل شده است. براساس آخرین گزارش مرکز کنترل بیماری‌های ایالات متحده در سال ۲۰۱۹، ۳۵۹۰۰ نفر همچنان بر اثر مقاومت به دارو جان خود را در آمریکا از دست داده‌اند. براساس آخرین گزارش مرکز اروپایی پیشگیری از بیماری‌ها، بار تخمینی کنترل عفونت‌های باکتریایی در اتحادیه و منطقه اقتصادی اروپا به‌ویژه قابل توجه است. در آسیا نیز که با باکتری‌های گرم منفی مواجه است، عفونت‌های ناشی از انتروباکتریاسه‌های مقاوم به کارپانم و اسینتوباکتر بومانی

۳. مواد و روش‌ها

۱.۳. مواد

در این مطالعه از نوترینت برات (NB) Nutrint Broth، نوترینت آگار (NA) Nutrint Agar، مولر هینتون آگار (MHA) Muler Hinton Agar، مولر هینتون برات (MHB) Broth تهیه شده از شرکت مرک (آلمان)، نمک سدیم رزاورین تهیه شده از شرکت سیگما (آمریکا) و کیت خالص سازی پروتئین رزین نیکل (Ni-NTA) تهیه شده از شرکت کیژن (آمریکا) و پلی میکسین E، آمپی سیلین تهیه شده از شرکت آلدريج (آمریکا)، استفاده گردید.

۲.۳. کد اخلاق

این مطالعه فاقد ملاحظات کار روی انسان یا حیوان بوده و دارای کد اخلاق به شماره IR.IAU.ARAK.REC.1399.003 است.

۳.۳. سویه باکتریایی

فعالیت ضدباکتریایی پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ علیه باکتری گرم منفی اسینتوباکتریومانی (ATCC19606) با مطالعه تجربی آزمایشگاهی (*in vitro experimental study*) ارزیابی گردید. همچنین از باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) سویه BL21 (DE3) به عنوان میزبان برای بیان پروتئین نوترکیب استفاده گردید (۱۶-۱۹).

۴.۳. بیان و خالص سازی پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$

ابتدا توالی آمینواسیدی پروتئین $Ib-AMP_4$ (UniProt: 024006) از سایت <http://www.uniprot.org> استخراج شد. سپس از سایت <http://www.ebi.ac.uk> برای تبدیل توالی آمینواسید به اسیدنوکلئیک و ایتیمایز کردن براساس تمایل کدونی باکتری اشرشیاکلی که میزبان بیان کننده آن است، استفاده شد. توالی کامل پس از ایتیمایز کردن به قرار ذیل است (۲۰).

ATGCAGTGGGGTCGTCGTTGTTGCGGCTGGGGACCCG
GTCGCCGCTATTGTCGTCGTTGGTGTAA

عملکرد پپتید، طول زنجیره پپتیدی، منشأ پپتید و ... از سایت‌های UniProtKB و ProtParam ارزیابی گردید.

در وکتور بیانی pET32a، ابتدا و انتهای توالی کدکننده پروتئین نوترکیب هدف، توالی‌های BamHI و XhoI برای هر پروتئین به صورت جداگانه طراحی شد.

بر پایه مطالعات آزمایشگاهی و تجربی، وکتور بیانی pET32a برای تولید پروتئین نوترکیب در این باکتری انتخاب

باکتری‌ها یافتن راهبردهای مقابله‌ای بهتر را برای ما ضروری نموده است (۲، ۳). یکی از این راهبردها استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی برای مقابله با باکتری‌های مقاوم به چند دارو است (۴).

اسینتوباکتریومانی یک باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های معمولی است و بیشتر در بیمارستان‌ها شناخته می‌شود. این باکتری می‌تواند عفونت‌های خون، مجاری ادراری و ریه (پنومونی)، یا زخم‌ها در دیگر قسمت‌های بدن ایجاد کند. برای درمان عفونت‌های به وجود آمده به وسیله اسینتوباکتریومانی مقاوم به چند دارو (multidrug-resistant) کولیسیتین (پلی میکسین E) از رایج‌ترین داروها است (۵). بروز و گسترش عفونت‌های اسینتوباکتریومانی مقاوم به چند دارو و کاهش گزینه‌های درمانی موجود به بزرگ‌ترین چالش در درمان این عفونت‌ها در سال‌های اخیر، تبدیل گردیده است (۶، ۷). از این رو، محققان وادار به طراحی و توسعه ضد میکروبی‌های جدید شده‌اند (۸، ۹) که یکی از آن‌ها پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) (antimicrobial peptides) هستند (۱۰).

پپتید ضد میکروبی $Ib-AMP_4$ از دانه گیاه حنا (*Impatiens balsamina* (Balsaminaceae) به دست می‌آید. پپتید ضد میکروبی $Ib-AMP_4$ از ۲۰ اسید آمینه تشکیل شده است. پپتیدها از $Ib-AMP_1$ الی $Ib-AMP_4$ نام گذاری شده‌اند حاوی (۵-۶ هیدروکسید آرژنین) و حاوی چهار باقیمانده سیستئین است که دو پیوند دی‌سولفیدی بین مولکولی را تشکیل می‌دهند (۱۱، ۱۲). در یک تحقیق مشخص شد که $Ib-AMP_4$ دارای ساختمان β -sheet بوده که برای نفوذ در چربی خود را تطبیق می‌دهد. طبق تحقیقاتی مشخص گردیده است که $Ib-AMP_4$ به صورت انتخابی غشاهای باکتریایی را هدف قرار می‌دهد (۱۳). در $Ib-AMPs$ واکنش این پپتیدها با ترکیبات غشایی اساساً با فسفولیپیدها بوده که با ایجاد سوراخ در غشای پلاسمایی باعث تخریب باکتری می‌گردند بخش ضد میکروبی این پپتید در قسمت N ترمینال ژن کدکننده آن پپتید بوده و برای افزایش اثر ضد میکروبی آن باید انتهای N ترمینال آن آزاد باشد (۱۴، ۱۵). $Ib-AMP_4$ بومی هیچ فعالیت همولیتیک و سمی تا غلظت ۱۰۰ میلی لیتر نشان نمی‌دهد، این پپتیدها نسبت به سلول‌های انسان، حشرات و سلول‌های گیاهی غیرسمی هستند (۱۴).

۲. اهداف

هدف از این مطالعه، ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ علیه اسینتوباکتریومانی (ATCC19606) در شرایط آزمایشگاهی بود.

پس از ۴ ساعت انکوباسیون توسط سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه جمع‌آوری گردیدند. انتقال پروتئین حاصل به ژل الکتروفورز سدیم‌دودسیل سولفات-پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide) (Gel Electrophoresis) نتایج القایی را تایید کرد. پروتئین نوترکیب تولیدشده با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی رزین آگارز (Ni-NTA) و شرایط دناتوره اوره ۸ مولار خالص‌سازی شد (۲۶). کیفیت پروتئین تخلیص‌شده با استفاده از الکتروفورز عمودی Sodium Dodecyl Sulfate-Page (SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفت و کمیت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد (۱۲).

۵.۳. بهینه‌سازی تاکردن مجدد پروتئین نوترکیب bI-۴PMA

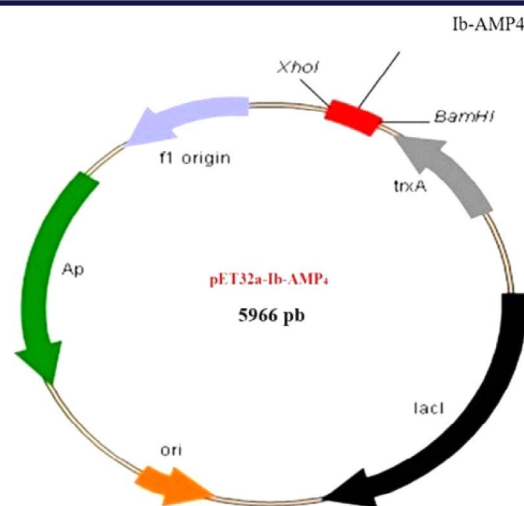
برای از بین‌بردن اوره، از روش دیالیز برای بازیابی مجدد پپتید استفاده شد. بدین جهت بافر فسفات‌سالین (Phosphate buffered saline) همراه با اسیدهای آمینه‌های گلیسین و سیستئین، آل‌پرولین و آرژنین هر کدام با غلظت ۰/۱ مولار و دامنه pH های مختلف ۵، ۵/۵، ۷، ۸/۵، ۹ برای فرایند دیالیز مورداستفاده قرار گرفت (۲۰). دیالیز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. برای بهبود اثربخشی دیالیز، PBS هر ۳ ساعت یکبار تعویض گردید. در نهایت پروتئین دیالیز‌شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت آزمایش‌های بعدی نگهداری گردید غلظت پروتئین نوترکیب تا شده در داخل کیسه دیالیز، توسط یک فیلتر سانتریفیوژ آمیکون با اندازه منافذ ۱۰ کیلودالتون افزایش یافت (۲۰، ۲۶).

۶.۳. ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی پروتئین نوترکیب Ib-AMP₄

از روش میکرو برات‌دایلوژشن و بر پایه دستورالعمل‌های مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی MO7-A10 (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) inhibitory concentration استفاده شد (۲۷، ۲۸). ابتدا کلنی‌های باکتری اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) در محیط کشت مولر هینتون‌براث در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند تا چگالی نوری کشت در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۱ (۱۰^۸ × ۱ سلول در میلی‌لیتر) برسد.

پس از آن با استفاده از محیط کشت مولر هینتون‌براث سوسپانسیون باکتری به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شد تا تعداد سلول‌ها به ۱۰^۶ × ۱ سلول در میلی‌لیتر رسید. ابتدا ۵۰

گردید. سیستم بیانی PET از قدرتمندترین سیستم‌هایی است که به‌منظور کلون و بیان پروتئین‌های نوترکیب در اشرشیاکلی استفاده می‌شود. زمانی که ژن هدف در داخل وکتور کلون می‌شود، رونویسی تحت کنترل پروموتور قوی باکتری‌فاز T7 انجام می‌گیرد. RNA پلی‌مراز T7 در ژنوم باکتری قرار دارد و به‌صورت کاملاً اختصاصی به پروموتور خود متصل و رونویسی انجام می‌گیرد. پلاسמיד pET32a دارای ۵۹۰۰ جفت‌باز است که همراه Ib-AMP₄ (۶۶ جفت‌باز) مجموعاً ۵۹۶۶ جفت‌باز گردید (۲۱-۲۳). سازه ژنی pET32a-Ib-AMP₄ اپتیمایز شده برای میزبان *E. coli* BL21 (DE3) به‌صورت آماده از شرکت بیوماتیک خریداری شد. تصویر شماتیک از پلاسמיד pET32a-Ib-AMP₄ در تصویر ۱ آمده است.



تصویر ۱. تصویر شماتیک از پلاسמיד نوترکیب pET32a-Ib-AMP₄

جهت پذیرش پلاسמיד نوترکیب تهیه‌شده سازه ژنی pET32a-Ib-AMP₄ طبق پروتکل استاندارد در سلول‌های مستعد *E. coli* BL21(DE3) به روش کلسیم کلراید تحت تیمار قرار گرفت (۲۳). سوسپانسیون فوق روی محیط انتخابی نوترینت‌آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت گردید و سلول‌های ترنسفورم شده که حامل توالی ژن هدف Ib-AMP₄ بودند، طبق پروتکل استاندارد تولید گردیدند (۲۴، ۲۵). سپس دوکلنی نوترکیب حامل سازه pET32a-Ib-AMP₄ که روی پلیت به‌همراه آمپی‌سیلین رشد کرده بودند، در ۲ میلی‌لیتر محیط نوترینت‌براث دارای آمپی‌سیلین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از ۲۴ ساعت، ۳۰۰ میکرولیتر از تلقیح باکتریایی به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت‌براث (X) (۱/۵) دارای آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر اضافه شد و در ۲۲۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. هنگامی که تراکم سلولی در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ رسید، ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپیل تیو-β-D-گالاکتوزیداز (IPTG) ۱ میلی‌مولار برای القای بیان پروتئین اضافه شد. سلول‌ها

به‌عنوان کنترل منفی و کشت باکتری همراه با پلی‌میکسین E (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۳۱). آزمون‌ها با سه تکرار انجام پذیرفت. برای اینکه فعالیت ضدباکتریایی در نظر گرفته شود، باید در مقایسه با تلقیح اصلی، میزان باکتری $10 \geq \log$ کاهش یابد.

۸.۳. سینتیک رشد پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$

تعیین اثر پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ تولیدشده روی الگوی رشدی باکتری اسینتوباکتر بومانی، با استفاده از روش مقایسه منحنی رشد این ماده علیه باکتری مذکور در مقایسه با سلول‌های باکتریایی تیمار نشده با هیچ عامل ضد میکروبی، انجام گرفت. ابتدا کشت باکتری با کدورت ۰/۶ در ۶۰۰ نانومتر تهیه گردید و با محیط مولر هینتون برات رقیق شد تا غلظت سلولی، ۰/۱ در ۶۰۰ نانومتر (1×10^8 سلول در میلی‌لیتر) شود. سپس سوسپانسیون تهیه‌شده در لوله‌های جداگانه ریخته و به هر لوله غلظت دوبرابر MIC از پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ اضافه شد. در فواصل زمانی ۰، ۱، ۵، ۳، ۷، ۱۱ و ۲۰ ساعت، کدورت کشت باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید و منحنی رشد آن با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریزم نسخه ۹ ترسیم شد. پلی‌میکسین E (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌عنوان کنترل مثبت و باکتری تیمار نشده به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردیدند (۲۶). آزمون با سه تکرار انجام گرفت.

۹.۳. تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریزم نسخه ۹ انجام گردید. نتایج با استفاده از تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) مقایسه گردیدند. همه داده‌های آزمایشگاهی به‌صورت میانگین حاصل از سه تکرار $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده‌اند و نتایج با P-value کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

۴. نتایج

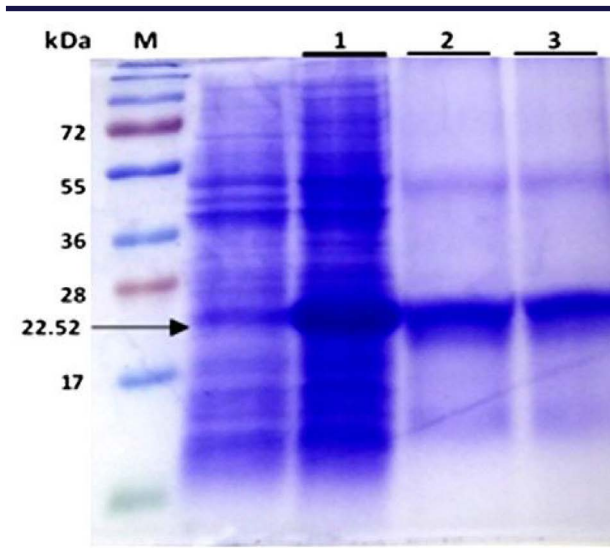
۱.۴. بیان، تخلیص و بهینه‌سازی تا کردن مجدد (Refolding) پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ در اشرشیاکلی

باتوجه به یافته‌های دیالیز در PBS، ترکیب آمینواسیدهای آرژنین و آل-پرولین هر کدام با غلظت ۰/۱ مولار و pH برابر ۷/۲ حداکثر کارایی پروتئین را داشت. پروتئین حاصل

میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون برات استریل ($2 \times$) به تمام چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای از شماره ۱ تا ۱۰ اضافه شد. پس از آن از پروتئین نوترکیب تغلیظ‌شده $Ib-AMP_4$ ۵۰ میکرولیتر در چاهک اول اضافه شد و تا چاهک شماره ۱۰ رقیق‌سازی انجام گردید و ۵۰ میکرولیتر از چاهک شماره ۱۰ دور ریخته شد و بعد از آن ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری به چاهک‌های شماره ۱ تا ۱۰ اضافه گردید. علاوه بر آن ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون برات استریل به چاهک شماره ۱۱ به‌عنوان کنترل منفی و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به چاهک شماره ۱۲ به‌عنوان کنترل مثبت افزوده شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رنگ رزازورین $0.02(W/V)$ درصد به میزان ۲۰ میکرولیتر به هر چاهک افزوده شد و پلیت‌ها به مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند غلظت هر گروه تیمار در آخرین چاهک آبی رنگ به‌عنوان مقدار MIC در نظر گرفته شد (۲۹). حداقل غلظت بازدارنده پلی‌میکسین E بر علیه اسینتوباکتر بومانی به روش میکروبرات دایلویشن مطابق با CLSI نیز تعیین شد (۳۰). جهت ارزیابی حداقل غلظت باکتری‌کشی minimum bactericidal concentration (MBC)، ۱۰۰ میکرولیتر از محتوای چاهک آبی میکروپلیت مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی و چاهک‌هایی با غلظت بالاتر ترکیب ضد میکروبی، در محیط مولر هینتون آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت گردید. حداقل غلظت باکتری‌کشی، کمترین غلظت ترکیب ضد میکروبی که ۹۹/۹ درصد از یک ارگانیسم خاص را می‌کشد، فعالیت باکتری‌کشی براساس نسبت MBC/MIC تقسیم بر MIC تعریف گردید ($MBC/MIC = 2$) (۱۱). اثر باکتری‌کشی، $MBC/MIC = 16$ یا ۴، اثر بازدارندگی رشد باکتری (۲۶، ۳۱).

۷.۳. سینتیک باکتری‌کشی پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$

منحنی زمان مرگ باکتری اسینتوباکتر بومانی توسط $Ib-AMP_4$ در زمان با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریزم نسخه ۹ رسم گردید. برای این موضوع تلقیح اولیه از کشت باکتری با چگالی نوری ۰/۱ (1×10^8 سلول در میلی‌لیتر) تهیه شد و سپس به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق گردید. غلظت دوبرابر MIC از پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ تولید شده، به میکروتیوپ‌های جداگانه حاوی باکتری مورد مطالعه، اضافه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در ۰/۵، ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۱ و ۲۰ ساعت روی محیط مولر هینتون آگار کشت شدند و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های هر پلیت شمارش شد. از کشت باکتری بدون هیچ‌گونه افزودنی

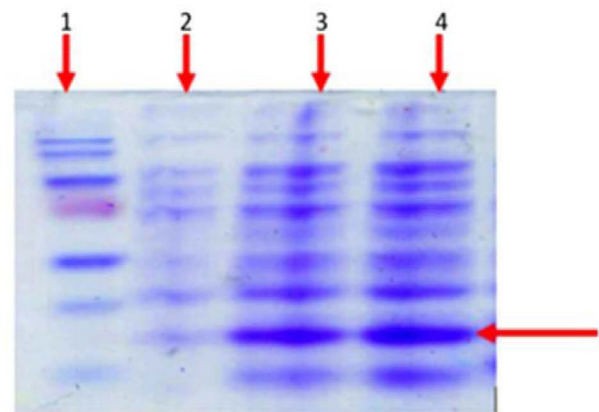


تصویر ۳. نتایج الکتروفورز $Ib-AMP_4$ روی ژل SDS-M-سایز مارکر ۰.۱ بیان $Ib-AMP_4$ در *E. coli* BL21 (DE3) ۴ ساعت پس از انکوباسیون؛ ۰.۲ پروتئین خالص شده توسط کروماتوگرافی تمایلی نیکل؛ ۰.۳ پروتئین پس از بازآرایی مجدد

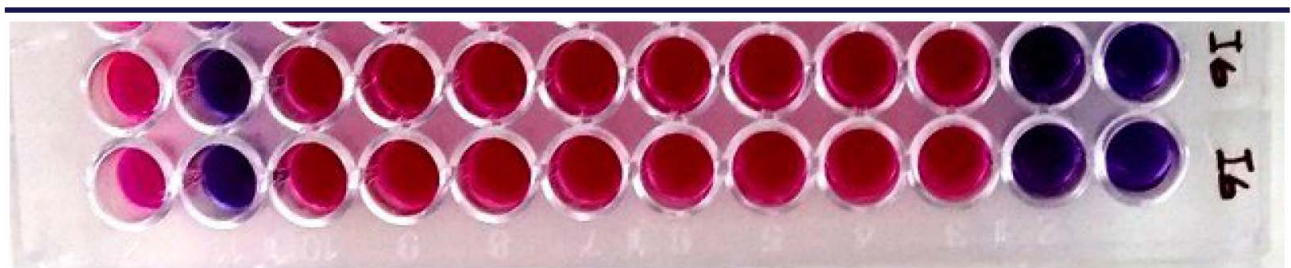
۲.۴. سنجش فعالیت ضدباکتریایی پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$

مقادیر MIC و MBC برای پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ بر علیه اسینتوباکتریومانی ATCC19606 به ترتیب ۱۱۱ میکروگرم بر میلی لیتر و ۲۲۲ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد (تصویر ۴). همچنین مقدار MIC پلی میکسین E نیز ۵/۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. براساس نتایج MBC و نسبت $MBC > 2$ MBC/MIC مشخص شد که $Ib-AMP_4$ اثر باکتریو استاتیک دارد (تصویر ۴).

پس از تغلیظ با استفاده فیلتر سانتریفیوژ آمیکون با اندازه منافذ ۱۰ کیلودالتون، غلظت ۴۴۴ میکروگرم بر میلی لیتر داشت. حضور باندهای خاص در ژل SDS-PAGE نشان داد که پروتئین هدف $Ib-AMP_4$ (کیلودالتون) به طور مؤثر بیان شده است (تصویر ۲). در تصویر ۲ نتایج الکتروفورز بیان پروتئین $Ib-AMP_4$ در مراحل تخلیص، دیالیز و تغلیظ نشان داده شده است. همچنین در تصویر ۳ نتایج الکتروفورز $Ib-AMP_4$ روی ژل SDS و باندهای تشکیل شده در چهار ساعت پس از القاء، پروتئین خالص شده و پروتئین پس از بازآرایی به تصویر کشیده شده است (تصویر ۳).



تصویر ۲. نتایج حاصل از تخلیص، دیالیز و تغلیظ پروتئین نوترکیب روی ژل SDS؛ ۱: چاهک ۱: مارکر پروتئینی رنگی ۱۰ تا ۲۵۰ کیلودالتون؛ چاهک ۲ و ۳: تخلیص پروتئین نوترکیب در فازهای C1 و D1؛ چاهک ۴: دیالیز پروتئین نوترکیب



تصویر ۴. نتایج حاصل از آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برای پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ روی باکتری *A. baumannii* (ATCC19606)

۳.۴. سینتیک باکتری کشی پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$

یافته های سینتیک باکتری کشی علیه اسینتوباکتریومانی در

غلظت دوبرابر MIC از $Ib-AMP_4$ از نظر تغییرات در $log_{10} CFU/mL$ (Colony Forming Unit/milliliter) سلول های زنده در تصویر ۵ ارائه گردیده است.

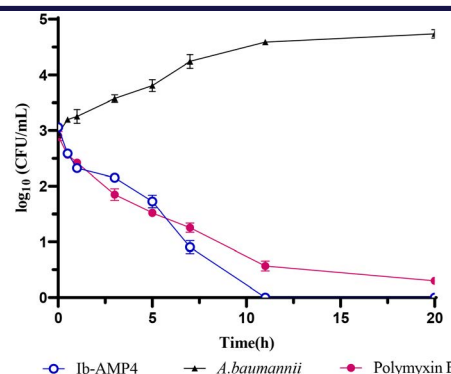
۵. بحث

سازمان بهداشت جهانی، مقاومت میکروبی را به عنوان یک نگرانی مهم در حوزه بهداشت جهانی به رسمیت شناخته است که به تبع آن تأثیر مالی قابل توجهی بر جهان دارد. افزایش مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های قدیمی، توسعه داروهای جدید را ضروری می سازد (۳۲) و یکی از گزینه ها، استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی علیه پاتوژن ها است که از منابع مختلفی استخراج می شود. جداسازی پپتیدهای ضد میکروبی از منابع طبیعی آن ها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست. برای تولید این عوامل، روش های نو ترکیب بالاترین بازده را دارند. مهندسی ژنتیک به عنوان ابزاری مناسب برای تولید مقادیر بالای پپتیدهای طبیعی پذیرفته شده است. *E. coli* شناخته شده ترین سیستم بیان را دارد و معمولاً برای تولید پپتیدهای ضد میکروبی استفاده می شود (۳۳). پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان آنتی بیوتیک های جدید، با ویژگی هایی چون فعالیت وسیع الطیف، سرعت عمل بالا و عدم ایجاد مقاومت، به عنوان ترکیبات نوین معرفی شده اند (۳۴).

در این تحقیق، ما برای نخستین بار فعالیت ضد میکروبی این پپتید را بر علیه باکتری اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی کردیم.

بررسی فعالیت ضد میکروبی پروتئین نو ترکیب Ib-AMP₄ نشان داد که هنگامی که پروتئین در سالیان بافر فسفات با pH برابر با ۷/۲ مجدد تا گردد و اسیدهای آمینه آرژنین و آل-پرولین با غلظت ۰/۱ مولار به آن اضافه شود، منجر به تولید پروتئین فعال می شود. این نتایج در مطالعات قبلی نیز تأیید شده است (۱۶، ۳۵). آرژنین از طریق تعامل با بخش آب دوست پپتید، از رسوب و تجمع پروتئین جلوگیری می کند و شکل محلول پروتئین را حفظ می نماید. آل-پرولین هم با اتصال به سطح آب گریز پروتئین، چین خوردگی پروتئین را تسهیل کرده و از تداخل آن جلوگیری می کند، که به پایداری پروتئین کمک می کند. چین خوردگی پپتیدهای ضد میکروبی ارتباط مستقیمی با نقطه ایزوالکتریک آن ها دارد و وجود اسیدهای آمینه آرژنین و آل-پرولین موجب می شود که پروتئین نو ترکیب در pH بهینه خود جمع شود (۲۶، ۳۶).

برای بررسی نتایج MIC و تحلیل نتایج سینتیک رشد و سینتیک باکتری کشی Ib-AMP₄ از غلظت دوبرابر MIC علیه باکتری اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) استفاده شد و نتایج هر سه تست یکدیگر را تأیید کردند. با توجه به نتایج می توان نتیجه گرفت در طی پنج ساعت پپتید ضد میکروبی Ib-AMP₄ علاوه بر اینکه دارای اثرات بازدارندگی روی رشد باکتری اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) است دارای اثرات کشندگی بر این باکتری نیز است و با توجه به زمان می توان نتیجه گرفت که اثر

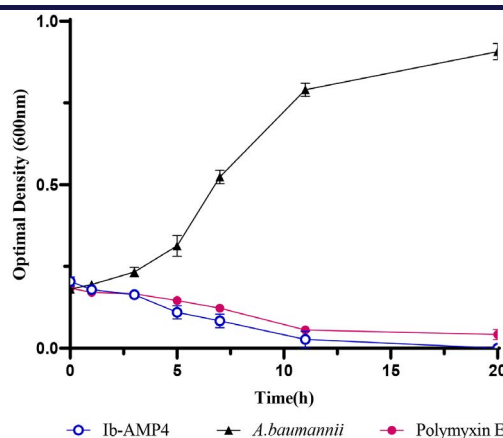


تصویر ۵. نتایج سینتیک باکتری کشی علیه باکتری (*A. baumannii* (ATCC19606) در غلظت دوبرابر MIC از پروتئین نو ترکیب Ib-AMP₄. مثلث های سیاه نشان دهنده کنترل، دایره های قرمز نشان دهنده پلی میکسین E (۱ میکروگرم بر میلی لیتر)، دایره های آبی نشان دهنده Ib-AMP₄ (۲۲۲ میکروگرم بر میلی لیتر) است.

Ib-AMP₄ باعث بیش از پنج کاهش در log₁₀ CFU/mL طی هفت ساعت و مرگ سلولی طی ۱۱ ساعت شد. همچنین پلی میکسین E در غلظت دوبرابری MIC خود، پس از ۱۱ ساعت log₁₀ CFU/mL را کاهش داده است و در طول زمان و ادامه آن تغییر قابل توجهی در تعداد کلنی ها ایجاد نکرد. تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین بین پلی میکسین E و Ib-AMP₄ تفاوت معنی داری را نشان نداد (تصویر ۵).

۴.۴. سینتیک رشد باکتری تیمار شده با پروتئین نو ترکیب Ib-AMP₄

همان گونه که در تصویر ۶ نشان داده شده است، پروتئین نو ترکیب Ib-AMP₄ کدورت کشت سلولی اسینتوباکتر بومانی را تا ۹۵ درصد پس از پنج ساعت کاهش داده است. علاوه بر این، پلی میکسین E در غلظت دوبرابری MIC خود باعث کاهش کدورت سلولی پس از ۱۱ ساعت گردید. نتایج تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که بین تمام گروه های مورد آزمایش از نظر آماری تفاوت معنی داری وجود دارد ($P < 0.05$) (تصویر ۶).



تصویر ۶. نتایج سینتیک رشد علیه باکتری (*A. baumannii* (ATCC19606) در غلظت دوبرابر MIC از پروتئین نو ترکیب Ib-AMP₄. مثلث های سیاه نشان دهنده کنترل، دایره های قرمز نشان دهنده پلی میکسین E (۱ میکروگرم بر میلی لیتر)، دایره های آبی Ib-AMP₄ (۲۲۲ میکروگرم بر میلی لیتر) است.

مقاوم در برابر چند دارو و سویه‌های حساس به دارو مشاهده شده است. این حساسیت مشابه به آنتی‌میکروبیال پپتیدها نسبت داده می‌شود (۱۰، ۱۲، ۱۶).

در مطالعه‌ای که توسط فرشادزاده و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام شد، مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی کولیستین در برابر سویه مرجع (ATCC 19606) و ایزوله‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی برابر با ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین، نتایج بررسی کشتن در زمان نشان داد که کولیستین در غلظت برابر با حداقل غلظت مهارکنندگی، موجب کاهش ۵ log در تلقیح باکتری پس از ۳۰ دقیقه شد که این نتایج با نتایج به دست آمده در مطالعه ما مطابقت داشت (۴۰).

با توجه به نتایج این مطالعه، انجام کارآزمایی بالینی و تحقیقات بیشتر ضروری است که می‌تواند منجر به استفاده از پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ به عنوان آنتی‌بیوتیک جدید، به تنهایی یا به عنوان کمک‌کننده به آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده برای کنترل و درمان عفونت‌های مقاوم به چند دارو ناشی از اسینتوباکتر بومانی گردد و از جنبه‌های نوآوری این تحقیق محسوب می‌گردد.

۱.۵. محدودیت‌های پژوهش

مطالعات بسیار کمی در زمینه ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ بر باکتری اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) در شرایط آزمایشگاهی انجام پذیرفته است که امکان مقایسه را فراهم سازد و از چالش‌های و محدودیت‌های کار تحقیقاتی انجام شده است از طرف دیگر از جنبه‌های نوآوری این تحقیق نیز محسوب می‌گردد.

۲.۵. نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از آزمون‌های حداقل غلظت مهارکنندگی، سینتیک باکتری‌کشی و سینتیک رشد، در این پژوهش نشان داد که پروتئین نوترکیب $Ib-AMP_4$ به‌طور بالقوه دارای اثر ضدباکتریایی قوی و سریع روی باکتری اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) در مقایسه آنتی‌بیوتیک پلی‌میکسین E بود.

بنابراین این امکان وجود دارد که پپتید ضدباکتریایی $Ib-AMP_4$ را بتوان به عنوان آنتی‌بیوتیک جدید، به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر یا به عنوان مکمل آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده، برای کنترل و درمان عفونت‌های باکتری اسینتوباکتر بومانی استفاده کرد. این یافته‌ها باید هنگام بهینه‌سازی درمان آنتی‌بیوتیکی در نظر گرفته شوند. علاوه بر این، به نظر می‌رسد که آزمایشات بالینی برای تعیین ارزش واقعی درمان‌های جایگزین و پتانسیل درمانی این پپتیدها مورد نیاز است. تجاری‌سازی فناوری این پپتیدهای ضد میکروبی، گام بعدی است که بایستی محک زده شود (۴۱).

بازدارندگی پپتید ضد میکروبی $Ib-AMP_4$ (که در طی حدود پنج ساعت زمان تأثیر است) نسبت به پلی‌میکسین E (که در طی حدود ۱۱ ساعت زمان تأثیر است)، سریع‌تر بوده است. همچنین در بررسی اثر کشندگی پپتید ضد میکروبی $Ib-AMP_4$ (که در طی حدود هفت ساعت به بعد حادث و شدت می‌گیرد) نسبت به زمان پلی‌میکسین E (که در طی حدود ۱۱ ساعت به بعد حادث و شدت می‌گیرد) سریع‌ال‌اثر بوده است. لذا با توجه به نتایج، پروتئین نوترکیب دارای اثر ضدباکتری قوی و مؤثر علیه اسینتوباکتر بومانی بود (در مقایسه با آنتی‌بیوتیک پلی‌میکسین E به عنوان کنترل در این مطالعه) و پتانسیل باکتری‌کشی قابل توجه‌تری را در زمان کوتاه‌تری نشان داد.

تحقیقات قبلی نیز خواص ضدباکتریایی این پپتیدها را نشان داده است. به عنوان مثال، Fan و همکاران، نشان داده‌اند که $Ib-AMP_4$ عملکرد ضدباکتریایی خود را با اتصال به غشای سلولی باکتری و ایجاد لیز سلولی با برهم‌زدن یکپارچگی غشاء اعمال می‌کند (۱۴). به همین ترتیب، ساده لجی و همکاران، پتانسیل سریع ضدباکتریایی $Ib-AMP_4$ نوترکیب را در درمان عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به چند دارو را اعلام کرده‌اند (۳۵).

Liu و همکاران در سال ۲۰۲۴ نشان داده‌اند که پپتید ضد میکروبی CRAMP-34 توانایی قوی در پاکسازی بیوفیلم *Acinetobacter lwoffii* دارد و بهتر از پپتید ضد میکروبی LL-37 در از بین بردن بیوفیلم این باکتری عمل می‌کند (۳۷).

در مطالعه‌ای که توسط صفری و همکاران در سال ۲۰۲۲ انجام پذیرفته است نشان داده شده است که پپتید نوترکیب LL-37 روی باکتری اسینتوباکتر بومانی ATCC19606 اثر باکترسیدالی داشته و نسبت به پپتید نوترکیب انکورسین II روی همین باکتری مؤثرتر عمل می‌کند و در قیاس با اثر پلی‌میکسین E (به عنوان کنترل) روی همین باکتری، این دو پپتید نوترکیب مؤثرتر عمل می‌نمایند و در زمان کوتاه‌تری تأثیر خود را می‌گذارند (۱۷).

در سال ۲۰۱۸ مطالعه‌ای که توسط Jasim انجام شد، اعلام گردید که پروتئین $Ib-AMP_4$ تأثیر مشابهی روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارد (۳۸). سال ۲۰۱۹ پژوهش Fan و همکاران نشان دادند که $Ib-AMP_4$ در مقابل باکتری‌های گرم مثبت به‌طور مؤثری عمل می‌کند، در حالی که در برابر گونه‌های گرم منفی مانند *E. coli*، اثربخشی ضدباکتریایی کمتری دارد (۳۹). این یافته‌ها با نتایج Jasim مغایرت دارد؛ به خصوص که او از همان محیط آزمایش و همان باکتری‌ها استفاده کرده ولی نتوانسته نتایج اصلی را تکرار کند (۳۸).

به‌طور کلی، آنتی‌میکروبیال پپتیدها معمولاً به‌طور مؤثری باکتری‌های گرم مثبت یا گرم منفی را هدف قرار می‌دهند $Ib-AMP_4$ در برابر هر دو نوع باکتری، شامل استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و اشرشیاکلی تولیدکننده بتا لاکتاماز وسیع طیف، فعال است. علاوه بر این، مقادیر MIC مشابهی در میان سویه‌های

References

- Oliveira M, Antunes W, Mota S, Madureira-Carvalho A, Dinis-Oliveira RJ, Dias da Silva D. An Overview of the Recent Advances in Antimicrobial Resistance. *Microorganisms*. 2024;**12**(9). [PubMed ID:39338594]. [PubMed Central ID:PMC11434382]. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12091920>.
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012;**67**(11):2640-4. [PubMed ID:22782487]. [PubMed Central ID:PMC3468078]. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.
- Soltani M. [Incidence, risk factors and prognosis of nosocomial pneumonia in adult patients admitted in the intensive care unit]. *Koomesh*. 2024;**23**(1):e153242. Persian.
- Zarei-Mehrvarz E, Fahimirad S, Ghaznavi-Rad E, Abbasian SS, Abtahi H. The LL-37 Antimicrobial Peptide as a Treatment for Systematic Infection of *Acinetobacter baumannii* in a Mouse Model. *Protein Pept Lett*. 2023;**30**(1):44-53. [PubMed ID:36177621]. <https://doi.org/10.2174/0929866529666220929160704>.
- Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis*. 2010;**51**(1):79-84. [PubMed ID:20504234]. <https://doi.org/10.1086/653120>.
- Butler DA, Biagi M, Tan X, Qasmieh S, Bulman ZP, Wenzler E. Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: Resistance by Any Other Name Would Still be Hard to Treat. *Curr Infect Dis Rep*. 2019;**21**(12):46. [PubMed ID:31734740]. <https://doi.org/10.1007/s11908-019-0706-5>.
- Eliopoulos GM, Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*. 2008;**46**(8):1254-63. [PubMed ID:18444865]. <https://doi.org/10.1086/529198>.
- Yousefi M, Dadashpour M, Hejazi M, Hasanzadeh M, Behnam B, de la Guardia M, et al. Anti-bacterial activity of graphene oxide as a new weapon nanomaterial to combat multidrug-resistance bacteria. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;**74**:568-81. [PubMed ID:28254332]. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.125>.
- Rezayi M, Mahmoodi P, Langari H, Behnam B, Sahebkar A. Conjugates of Curcumin with Graphene and Carbon Nanotubes: A Review on Biomedical Applications. *Curr Med Chem*. 2020;**27**(40):6849-63. [PubMed ID:31724497]. <https://doi.org/10.2174/092986732666619113145745>.
- Satei P, Fahimirad S, Ghaznavi-Rad E, Abtahi H. In Vitro and In Vivo Synergistic Antibacterial Functions of the Recombinant Ib-AMP4 and E50-52 Antimicrobial Peptides against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Jundishapur J Microbiol*. 2023;**16**(6). <https://doi.org/10.5812/jjm-136280>.
- Fan X, Korytowski A, Makky A, Tanaka M, Wink M. Ib-AMP4 insertion causes surface rearrangement in the phospholipid bilayer of biomembranes: Implications

تشکر و قدردانی:

این مقاله برگرفته از رساله دکتری تخصصی نویسنده اول در گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد واحد اراک است. نویسندگان مقاله از همکاری دانشگاه علوم پزشکی اراک در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

مشارکت نویسندگان:

ح.ا. ش.ج.، ش.ف.، طراحی مطالعه، آنالیز نتایج و داده‌ها، نگارش و ویراستاری مقاله؛ م.ص.، انجام آزمون‌های مطالعه، نگارش مقاله. همه نویسندگان مقاله را بررسی نموده و نسخه نهایی را تایید کرده‌اند.

تضاد منافع:

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

بازیابی داده‌ها:

داده‌های ارائه‌شده در این مطالعه در حین ارسال به عنوان یک فایل تکمیلی بارگذاری می‌شوند و بنا به درخواست خوانندگان، به صورت آزاد در دسترس قرار می‌گیرند.

کد اخلاق:

این مطالعه شامل بررسی انسانی یا حیوانی نمی‌شود و مطابق با کد اخلاق IR.IAU.ARAK.REC.1399.003 انجام شد.

حمایت مادی و معنوی:

این مطالعه هیچگونه حمایت مادی دریافت نکرده است.

- from quartz-crystal microbalance with dissipation. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2018;**1860**(2):617-23. [PubMed ID:29106975]. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2017.10.025>.
- Safari M, Abtahi H, Chehreii S, Fahimirad S. Recombinant Production of Ib-AMP(4) and Oncorhynchin II Antimicrobial Peptides and Antimicrobial Synergistic Assessment on the Treatment of *Staphylococcus aureus* Under In vitro Condition. *Protein Pept Lett*. 2025;**32**(1):34-43. [PubMed ID:39601172]. <https://doi.org/10.2174/010929866532747424112093601>.
 - Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol*. 2011;**29**(9):464-72. [PubMed ID:21680034]. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>.
 - Fan X, Schafer H, Reichling J, Wink M. Bactericidal properties of the antimicrobial peptide Ib-AMP4 from *Impatiens balsamina* produced as a recombinant fusion-protein in *Escherichia coli*. *Biotechnol J*. 2013;**8**(10):1213-20. [PubMed ID:23713064]. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>.

- org/10.1002/biot.201300121.
15. Slezina MP, Odintsova TI. Plant Antimicrobial Peptides: Insights into Structure-Function Relationships for Practical Applications. *Curr Issues Mol Biol*. 2023;**45**(4):3674-704. [PubMed ID:37185763]. [PubMed Central ID:PMC10136942]. <https://doi.org/10.3390/cimb45040239>.
16. Satei P, Ghaznavi-Rad E, Fahimirad S, Abtahi H. Recombinant production of Trx-Ib-AMP4 and Trx-E50-52 antimicrobial peptides and antimicrobial synergistic assessment on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* under in vitro and in vivo situations. *Protein Expr Purif*. 2021;**188**:105949. [PubMed ID:34324967]. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105949>.
17. Safari M, Rafiei Tabatabaei R, Abtahi H, Fahimirad S, Alimoradian A. In Vitro Pharmacokinetics of LL-37 and Oncorhycin II Combination Against *Acinetobacter baumannii*. *Jundishapur J Microbiol*. 2023;**15**(11). <https://doi.org/10.5812/jjm-131299>.
18. Hallaji M, Parhamfar M, Raoufi E, Abtahi H. [Cloning, expression and purification of *Escherichia coli* modified phytase]. *Koomesh*. 2018;**20**(1). Persian.
19. Honari H, Minaei ME. [Investigating the Immunogenicity of PA63 Antigen in Free form and Loaded in PLGA Nanoparticle in Mice]. *Koomesh*. 2024;**26**(26). Persian.
20. Fahimirad S, Abtahi H, Razavi SH, Alizadeh H, Ghorbanpour M. Production of Recombinant Antimicrobial Polymeric Protein Beta Casein-E 50-52 and Its Antimicrobial Synergistic Effects Assessment with Thymol. *Molecules*. 2017;**22**(6). [PubMed ID:28561787]. [PubMed Central ID:PMC6152712]. <https://doi.org/10.3390/molecules22060822>.
21. Molaee N, Abtahi H, Mosayebi G. Expression of recombinant streptokinase from *Streptococcus pyogenes* and its reaction with infected human and murine sera. *Iran J Basic Med Sci*. 2013;**16**(9):985-9. [PubMed ID:24171077]. [PubMed Central ID:PMC3804847].
22. Rezaei L, Ayat HA, Ahadi AM. [Design and construction of pET32b(+)-Rh expression vector based on pET system to facilitate purification]. *Cell Mol Res (Iran J Biol)*. 2021;**34**(2):208-18. Persian.
23. Mirjamali NA-S, Soufian S, Molaee N, Sadoogh Abbasian S, Abtahi H. Cloning and expression of the enzymatic region of *Streptococcal hyaluronidase*. *Iran J Basic Med Sci*. 2014;**17**(9):667-72. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2014.3329>.
24. Jafari SF, Ghaznavi-Rad E, Fahimirad S, Abtahi H. Recombinant Oncorhycin II Effect on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Skin Infection. *Jundishapur J Microbiol*. 2020;**13**(4). <https://doi.org/10.5812/jjm.95948>.
25. Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Sci*. 2009;**18**(5):936-48. [PubMed ID:19384993]. [PubMed Central ID:PMC2771296]. <https://doi.org/10.1002/pro.102>.
26. Fahimirad S, Razavi SH, Abtahi H, Alizadeh H, Ghorbanpour M. Recombinant production and antimicrobial assessment of beta casein-IbAMP4 as a novel antimicrobial polymeric protein and its synergistic effects with thymol. *Int J Peptide Res Therapeutics*. 2018;**24**(1):213-22.
27. Standard Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSIM07; Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. Available from: <https://clsi.org/shop/standards/m07/>.
28. Hajinourmohammadi A, Zargan J, Ebrahimi M-MS. [Comparison of the Essential Oil and the Purified Thymoquinone in Different Varieties of *Nigella sativa* L. Cultivated in the Different Regions of Iran and Investigation of Their Antibacterial Activity]. *Koomesh*. 2024;**27**(27):e164790. Persian.
29. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett*. 2016;**38**(6):1015-9. [PubMed ID:26969604]. [PubMed Central ID:PMC4853446]. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>.
30. Abtahi H, Ghazavi A, Karimi M, Mollaghase S, Mosayebi G. [Antimicrobial Activities of Water and Methanol Extracts of Bitter Apricot Seeds]. *J Med Sci*. 2008;**8**(4):433-6. Persian. <https://doi.org/10.3923/jms.2008.433.436>.
31. Gopal R, Kim YG, Lee JH, Lee SK, Chae JD, Son BK, et al. Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric peptides against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;**58**(3):1622-9. [PubMed ID:24366740]. [PubMed Central ID:PMC3957903]. <https://doi.org/10.1128/AAC.02473-13>.
32. Ajulo S, Awosile B. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS 2022): Investigating the relationship between antimicrobial resistance and antimicrobial consumption data across the participating countries. *PLoS One*. 2024;**19**(2):e0297921. [PubMed ID:38315668]. [PubMed Central ID:PMC10843100]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297921>.
33. Rosano GnL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;**5**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.
34. Deo S, Turton KL, Kainth T, Kumar A, Wieden HJ. Strategies for improving antimicrobial peptide production. *Biotechnol Adv*. 2022;**59**:107968. [PubMed ID:35489657]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107968>.
35. Sadelaji S, Ghaznavi-Rad E, Sadoogh Abbasian S, Fahimirad S, Abtahi H. Ib-AMP4 antimicrobial peptide as a treatment for skin and systematic infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Iran J Basic Med Sci*. 2022;**25**(2):232-8. [PubMed ID:35655604]. [PubMed Central ID:PMC9124539]. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.61043.13508>.
36. Li J, Garg M, Shah D, Rajagopalan R. Solubilization of aromatic and hydrophobic moieties by arginine in aque-

- ous solutions. *J Chem Phys*. 2010;**133**(5):054902. [PubMed ID:20707549]. <https://doi.org/10.1063/1.3469790>.
37. Liu L, Li H, Ma C, Liu J, Zhang Y, Xu D, et al. Effect of anti-biofilm peptide CRAMP-34 on the biofilms of *Acinetobacter lwoffii* derived from dairy cows. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;**14**:1406429. [PubMed ID:39211795]. [PubMed Central ID:PMC11358070]. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1406429>.
38. Jasim RNJ. Investigation of the effects of polymyxins on sub-proteome and lipidome of *K. pneumonia* [thesis]. Clayton, Australia: Monash University; 2018.
39. Fan X, Xu W, Han J, Jiang X, Wink M, Wu G. Antimicrobial peptide hybrid fluorescent protein based sensor array discriminate ten most frequent clinic isolates. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2019;**1863**(6):1158-66. [PubMed ID:30986507]. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.04.010>.
40. Farshadzadeh Z, Modaresi MH, Taheri B, Rahimi S, Bahador A. In Vitro Antimicrobial Activity of Dermcidin-1L Against Extensively-Drug-Resistant and Pandrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Jundishapur J Microbiol*. 2017;**10**(5). <https://doi.org/10.5812/jjm.13201>.
41. Tavani ME, Poursaki T, Gharibi F. [The Necessity of Promoting Technology Commercialization in Iran's Universities of Medical Sciences: A Policy Brief]. *Koomesh*. 2024;**26**(1). Persian.

Research Article

Assessment of the Antibacterial Activity of the Recombinant Protein Ib-AMP₄ on *Acinetobacter baumannii* (ATCC19606) Under in vitro Conditions

MMajid Safari¹, Hamid Abtahi^{2,*}, Shima Chehrei³, Shohreh Fahimirad²

¹Department of Microbiology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

²Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

³Faculty of Medical Sciences, Islamic Azad University, Arak, Iran

*Corresponding Author: Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. Tel, -98+ 8634173502; Fax, 4173526 863-98+; Email: abtahi@arakmu.ac.ir

Received 20/08/2024; Accepted 14/10/2024

Abstract

Background: *Acinetobacter baumannii* is a common pathogen found in hospital settings, recognized for its significant resistance to various antibiotics. In the fight against multidrug-resistant (MDR) pathogens, researchers are investigating the potential of antimicrobial peptides sourced from natural antibiotics.

Objectives: This study aimed to evaluate the antibacterial efficacy of the recombinant protein Impatiens balsamina-Antimicrobial Peptide (IbAMP₄) against *A. baumannii* (ATCC 19606) in a controlled laboratory environment.

Methods: The recombinant protein Ib-AMP₄ was synthesized by inserting the gene responsible for encoding Ib-AMP₄ into the *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain through transformation using the pET32a vector. The purification of the protein was optimized using Nickel-Nitrilotriacetic Acid (Ni-NTA) affinity chromatography. The efficacy of Ib-AMP₄ was assessed by determining its minimum inhibitory concentration (MIC), analyzing bacterial growth kinetics, and evaluating its antibacterial activity against *A. baumannii* (ATCC19606).

Results: The recombinant Ib-AMP₄ produced in *E. coli* BL21 exhibited notable antimicrobial efficacy against *A. baumannii*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) established at 111 µg/mL. When applied at a concentration twice that of the MIC, Ib-AMP₄ markedly decreased both viable cell counts and turbidity, as demonstrated by bacterial growth kinetics and antibacterial assays, achieving a purity level greater than %70.

Conclusion: The research illustrated the antibacterial efficacy of the recombinant protein Ib-AMP₄ against *A. baumannii*. These results offer encouraging opportunities for the development and production of novel antimicrobial agents aimed at addressing infections induced by *A. baumannii*.

Keywords: Antibacterial Peptides, Recombinant Proteins, Ib-AMP₄ peptide, *Acinetobacter baumannii*, Antimicrobial Peptides