

Expression and Antimicrobial Activity Assessment of CBD-alfAFP Recombinant Peptide Produced in Tobacco Hairy Roots Against Plant Pathogens

Zahra Zarindast¹, Farhad Nazarian-Firouzabadi^{2,*} and Mitra Khademi³

1-Former M.Sc. Student, Production Engineering and Plant Genetic Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2- Professor, Production Engineering and Plant Genetic Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

3- Assistant Professor, Production Engineering and Plant Genetic Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

*Corresponding author ✉: nazarian.f@lu.ac.ir

Citation: Zarindast, Z., Nazarian-Firouzabadi, F. and Khademi, M. (2023). Expression and antimicrobial activity assessment of CBD-alfAFP recombinant peptide produced in tobacco hairy roots against plant pathogens. *Plant Genetic Researches*, 10(1): 43-60. <http://dx.doi.org/10.22034/pgr.10.1.3>

(Received: June 14, 2023; Final Revised: September 11, 2023; Accepted: September 19, 2023; Published online: September 21, 2023)

Extended abstract

Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) play a major role in almost all living organisms innate immune defenses. AMPs are small proteins with ~10 to 50 amino acids that forms unique 3D structures and mode of action. Acquiring resistance against AMPs for pathogens is difficult because AMPs apply diverse range of activity. The expression of AMPs in plants to resist plant pathogens as well as to produce novel AMPs for pharmaceutical applications has recently received much consideration. Defensins are one of the most important cationic peptide families in plants. Plant defensins are small, low molecular weight, highly stable, amphipathic and cysteine-rich that play a major role plants' innate immune system. Defensins show a broad-spectrum antibacterial and antifungal activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi and etc. Alfalfa seeds express a strong defensin, alfAFP, showing antimicrobial activity *in vitro*. Chitin-binding domains are conserved domain present in some families of animals, plant and fungi proteins, showing high affinity towards chitin as substrate. Fusion of AMPs to different partners may enhance the activity of new recombinant peptides towards host pathogens. To this end, in an attempt to show whether defensins show activity when present as fusion partners, bioinformatics and *in vitro* assays were used. Hairy root systems (HR) are used to produce and study recombinant proteins in plants as a model. Ease of induction and compatibility to different transformation protocols as well as short regeneration period, have made HRs excellent genetics model for production of recombinant proteins in plants.

Material and methods

In the present study, a translationally fusion proteins was made. In order to facilitate alfAFP access to the pathogens' membrane and increase the activity of the peptide, the DNA sequence encoding an alfAFP (GenBank accession No: AF319468.1) antimicrobial peptide derived from *Medicago sativa* seeds was fused the N-terminal end of a chitin-binding domain (CBD) gene sequence from rice chitinase. A helix-forming linker (EAAAK)₈ from a chitinase gene (GenBank:X54367.1) was translationally fused to the sequence of alfAFP peptide. Next, the *NcoI* and *BamHI* restriction sites were designed flanking the recombination peptide sequence for cloning purposes. The recombinant DNA fragment (CBD-alfAFP) was digested and cloned in into corresponding *NcoI* and *BamHI* restriction sites of the binary expression vector, pGSA1285. The antimicrobial properties of CBD-alfAFP



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

recombinant peptide was assessed using bioinformatics tools. pGSA1285/CBD-alfAFP was sanger sequenced to confirm the in frame accuracy of cloning steps. pGSA1285/CBD-alfAFP was introduced to *Agrobacterium rhizogenes* and used for hairy root (HR) production in tobacco. The presence of transgene, transcription, and the expression of recombinant peptide in HRs were confirmed by PCR and semi-quantitative RT-PCR analysis, respectively. CBD-alfAFP recombinant peptide was extracted from HRs and then antimicrobial activity was evaluated against *Ralstonia solanacearum* and *Pseudomonas syringae* bacteria.

Result and discussion

Different bioinformatic analysis was used to predict the antimicrobial activity of the recombinant peptide. The results of the 3D structure analysis revealed a β -sheet and an α -helix structure that corresponded well with the structure of plant defensins. *In silico* analysis showed that both fusion partners were active in a synergistic manner. A Knottin functional domain was also recognized, suggesting that the recombinant peptide retains its antimicrobial activity. In general, the antimicrobial activity of CBD-alfAFP recombinant peptide was assessed by measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) against bacteria. The results of MIC test revealed that the lowest inhibitory concentration was observed against *Ralstonia solanacearum* and *Pseudomonas syringae* with 200 and 100 μ g/ml concentration, respectively. The results of the *in vitro* antimicrobial activity of the recombinant peptide using colony forming units (CFU) test showed that the recombinant peptide had significant inhibitory effects on the *Pseudomonas syringae* pathogen.

Conclusion

Recombinant new AMPs seem to puzzle host pathogens by showing different activity. Equipping AMPs with fusion partners facilitating their activity in controlling pathogens and hinder their invasion. Therefore, in this study, the chitin-binding domain provided alfAFP peptide access to the pathogenic bacterial cell wall through binding to peptidoglycan, and probably the recombinant peptide was able to target the plasma membrane with a better efficiency. The results of this study suggest that the expression of the CBD-alfAFP recombinant peptide in crop plants and HRs can be a promising approach to producing pathogen-resistant plants as well as to produce antimicrobial pharmaceutical new and novel AMPs. Furthermore, it can be anticipated that fusing AMPs to different fusion partners can enhance the activity of AMPs towards non-specific targets.

Keywords: alfAFP peptide, Antimicrobial peptide, Bioinformatics, Hairy root



بیان و بررسی خاصیت ضد میکروبی پروتئین نو ترکیب CBD-alfAFP در کلون‌های ریشه موئین گیاه توتون علیه بیمارگرهای گیاهی

زهرا زرین دست^۱، فرهاد نظریان فیروزآباد^{۲*}، میترا خادمی^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۳- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۴؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۸؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۲/۰۶/۳۰)

چکیده

بیان پپتیدهای ضد میکروبی در گیاهان رویکرد جدیدی برای حفاظت از گیاهان در برابر بیمارگرها و تولید داروهای ضد میکروبی در صنایع داروسازی است. پپتید کاتیونی alfAFP یک دیفنسین گیاهی با فعالیت ضد میکروبی است که توسط بذرها و گیاه یونجه تولید می‌شود. به منظور افزایش کارایی و تسهیل دسترسی پپتید alfAFP به دیواره سلولی بیمارگرها، توالی رمزکننده alfAFP به پایانه C دمین متصل‌شونده به کیتین (CBD) آنزیم کیتیناز برنج متصل شد. ابتدا خواص ضد میکروبی این پپتید نو ترکیب با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، سامانه ژنی پس از انتقال به پلاسمید بیانی pGSA1285 وارد *اگروباکتریوم رایزوترنز (Rhizobium rhizogenes)* و از آن برای تولید ریشه‌های موئین در توتون استفاده گردید. حضور تراژن، رونویسی و بیان آن در کلون‌های ریشه موئین گیاه توتون، به ترتیب با استفاده از روش‌های RT-PCR و PCR نیمه کمی تأیید شد. نتایج حاصل از پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پپتید، یک صفحه β و یک مارپیچ α را نشان داد که با ساختار دیفنسین‌های گیاهی مطابقت داشت. همچنین در این مطالعه، دمین عملکردی Knottin در ساختار پپتید نو ترکیب شناسایی شد که نشان می‌دهد پپتید نو ترکیب فعالیت ضد میکروبی خود را حفظ می‌کند. نتایج خاصیت ضد میکروبی حاصل از آزمایش CFU نشان داد که پپتید نو ترکیب دارای اثرات بازدارندگی معنی‌داری در جلوگیری از رشد بیمارگر باکتریایی *Pseudomonas syringae* بود. بنابراین، دمین متصل‌شونده به کیتین دسترسی پپتید نو ترکیب را به دیواره سلولی بیمارگر باکتریایی از طریق اتصال به پپتیدوگلیکان فراهم کرده و احتمالاً پپتید نو ترکیب توانسته است غشاء پلاسمایی را با کارایی بهتری هدف قرار دهد. معرفی و بیان پپتید نو ترکیب CBD-alfAFP در ریشه‌های موئین و گیاهان زراعی مهم می‌تواند ابزاری امیدبخش برای ایجاد گیاهان مقاوم به بیمارگرهای گیاهی و تولید عوامل ضد میکروبی در صنعت داروسازی باشد.

واژگان کلیدی: بیوانفورماتیک، پپتید alfAFP، خاصیت ضد میکروبی، ریشه موئین

مقدمه

بر اساس پیش‌بینی‌ها، جمعیت کره زمین تا سال ۲۰۵۰ به ۹/۷ میلیارد نفر خواهد رسید (Jafari, 2006; Syed and Tollamadugu, 2019). از این‌رو، تأمین امنیت غذایی برای این جمعیت عظیم مستلزم توسعه بیشتر در بخش کشاورزی خواهد بود. هر ساله بخش قابل توجهی از محصولات کشاورزی در اثر بیماری‌های گیاهی از بین می‌روند (Strange and Scott, 2005). از این‌رو، مقادیر زیادی از آفت‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها و سموم باکتری‌کش برای جلوگیری از کاهش محصول ناشی از بیماری‌های گیاهی و آفات استفاده می‌شود. با این حال، اگرچه سموم شیمیایی در مبارزه با بیماری‌ها در کوتاه مدت نتایج مؤثری به همراه داشته‌اند، اما استفاده بیش از حد از آن‌ها، اثرات مضر روی محیط زیست و سلامت مصرف‌کنندگان دارند (Naik and Prasad, 2006). استفاده مکرر و بی‌رویه از ترکیبات شیمیایی و آفت‌کش‌ها و سیستم تک‌کشتی باعث فشار انتخابی شدیدی بر بیمارگرها می‌شود که به نوبه خود موجب مقاومت بیمارگرها به سموم شیمیایی شده و در نتیجه پتانسیل خسارت آفرینی عوامل بیماری‌زا به شدت افزایش می‌دهد (Ma and Michailides, 2005; Webb and Fellers, 2006).

ضرورت تولید ارقام گیاهی مقاوم به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و عدم کارایی روش‌های سنتی به‌نژادی، استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک را به یکی از راهکارهای مهم برای رهایی از این مشکلات تبدیل کرده است (Gururani et al., 2012; Karimi et al., 2022). بنابراین، روش‌های مبتنی بر توسعه گونه‌های گیاهی مقاوم به بیماری با بیان ژن‌های رمزکننده پروتئین‌ها و پپتیدهای طبیعی یا مصنوعی با منشاء گیاهی یا غیرگیاهی، می‌تواند استفاده از مواد شیمیایی در کشاورزی را به میزان قابل توجهی کاهش دهد (Holaskova et al., 2015).

پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial peptides: AMPs) از جمله مهم‌ترین اعضای سیستم ایمنی ذاتی باکتری‌ها، حشرات، گیاهان و حتی انسان محسوب می‌شوند (Zasloff, 2002) و به دلیل نقش ضروری آن‌ها در سیستم ایمنی ذاتی، از آن‌ها به‌عنوان پپتیدهای دفاعی میزبان یاد می‌شود (Nguyen et al., 2011; Zasloff, 2006).

بر اساس متداول‌ترین مدل‌ها برای توضیح نحوه‌ی فعالیت پپتیدهای ضد میکروبی، پپتیدها در غشای میکروبی وارد شده و سبب شکل‌گیری منفذ در غشاء همراه با تشکیل میسل، از بین بردن قطبیت غشاء، نشت سیتوپلاسم و تخریب مارکرومولکول بین سلولی می‌شود (Bogdanova et al., 2020). مکانیسم فعالیت ضد میکروبی اکثر پپتیدهای ضد میکروبی از یک طرف بر اساس میان‌کنش بار مثبت و از طرف دیگر وجود نسبت قابل توجهی از اسید آمینه‌های هیدروفوبیک قابل توجه است. ساختار هیدروفوبیک پپتید، مسئول میان‌کنش با ترکیبات هیدروفوبیک غشاء و الحاق درون آن است. در اثر میان‌کنش پیچیده با غشاء، در ساختار پپتید بازآرایی رخ می‌دهد و منجر به شکل‌گیری میان‌کنش‌های اختصاصی لیپید-پپتید، انتقال پپتید در عرض غشاء و میان‌کنش با اهداف درون‌سلولی و در اغلب موارد منجر به مختل شدن یکپارچگی غشاء، ایجاد منافذ و نفوذ پذیری غشاء و در نهایت لیز شدگی و مرگ سلول می‌شوند (Aslam et al., 2022). در حال حاضر ترکیبات ضد میکروبی که غشاء بیمارگر را هدف قرار می‌دهند به‌عنوان یک گروه امیدوارکننده مد نظر قرار گرفته‌اند. مکانیسم‌های مبتنی بر تأثیر روی غشاء میکروارگانیسم‌ها، ایجاد مقاومت در میکروب‌ها را بسیار مشکل خواهد کرد (Aslam et al., 2022).

پپتید ضد میکروبی کاتیونی alfAFP یکی از اعضای خانواده‌ی دیفنسین‌های گیاهی و دارای فعالیت ضد میکروبی است که در بذور یونجه بیان می‌شود. بر خلاف دیفنسین‌های حیوانی، این پپتید فعالیت ضدباکتریایی خود را به‌طور خاص با نفوذپذیری غشای پلاسمایی نشان می‌دهند (Badrhadad et al., 2018).

امروزه استفاده از گیاهان به‌عنوان بیوراکتورها برای بیان، تولید و خالص‌سازی پروتئین‌های نو ترکیب در تحقیقات پزشکی و کشاورزی مورد توجه قرار گرفته است (Gurusamy et al., 2017). تولید انبوه، افزایش ایمنی و کاهش هزینه تولید و تغییرات پس از ترجمه مشابه سلول‌های پستانداران از جمله مزایای عمده سنتز پروتئین‌های نو ترکیب در گیاهان می‌باشد. تولید و ترشح پروتئین‌های نو ترکیب در ریشه‌های موئین، فناوری نوینی مبتنی بر استفاده از آگروباکتریوم رایزوترنز در شرایط

بلاست، تعداد ۱۲ توالی دیفنسین از گیاهان مختلف که دارای شباهت بالایی با دیفنسین یونجه زراعی بودند، دریافت شدند و برای هم‌ردیفی چندگانه و سایر تجزیه و تحلیل‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. هم‌ردیفی چندگانه پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI (نسخه ۱۱) و با الگوریتم ClustalW انجام شد (Kumar *et al.*, 2018).

برای بررسی وجود یا عدم وجود سیگنال پپتید، توالی سیگنال‌پپتید در پروتئین‌ها و همچنین محل تجمع پروتئین‌ها ابزارهای SignalP, Phobius و CELLO مورد استفاده قرار گرفتند (Nielsen, 2017; Yu *et al.*, 2014). همچنین، دمین‌های عملکردی موجود در توالی‌ها با استفاده از ابزارهای CDD, InterProScan و Pfam مشخص شدند. دمین‌های تأیید شده به‌عنوان دمین‌های اصلی انتخاب شدند (Finn *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2014; Marchler-Bauer *et al.*, 2015; Waghu *et al.*, 2014). به‌علاوه، ساختارهای ثانویه پروتئین‌ها با استفاده از ابزار Phyre2 پیش‌بینی شد. تعیین پارامترهای فیزیکوشیمیایی پروتئین شامل طول، بار خالص، pH ایزوالکتریک، فراوانی اسیدهای آمینه با استفاده از ابزار ProtParam صورت گرفت. به‌منظور تعیین خاصیت ضد میکروبی توالی‌های پروتئینی از پایگاه CAMP استفاده شد. توالی‌های پروتئینی با استفاده از چهار الگوریتم Support Vector Machine, Random Discriminant و Artificial Neural Network.Forest Analysis مورد بررسی قرار گرفتند و خاصیت میکروبی آن‌ها پیش‌بینی شد (Waghu *et al.*, 2014).

طراحی و سنتز سامانه ژنی ژن alfAFP و همسانه‌سازی در ناقل بیانی: توالی رمزکننده پپتید alfAFP به‌وسیله لینکر کیتیناز برنج با شماره دسترسی X54367.1 به پایانه کربوکسیل دمین متصل شونده به کیتین (Citin- Binding Domain: CBD) از همین پروتئین (GenBank accession No.: X54367.1) در ناقل عمومی pBSK همسانه‌سازی شد (Badrhadad *et al.*, 2018). در مرحله بعد، قطعه NcoI-CBD-aflAFP-BamHI در ناقل بیانی pGSA1285 حاوی راه‌انداز 35S(3X) مربوط به ویروس موزائیک گل کلم و خاتمه‌دهنده اکتوپین سنتتاز (Octopine synthase) همسانه‌سازی شد و ناقل بیانی alfAFP/pGSA1285/CBD-alfAFP تولید گردید (شکل ۱).

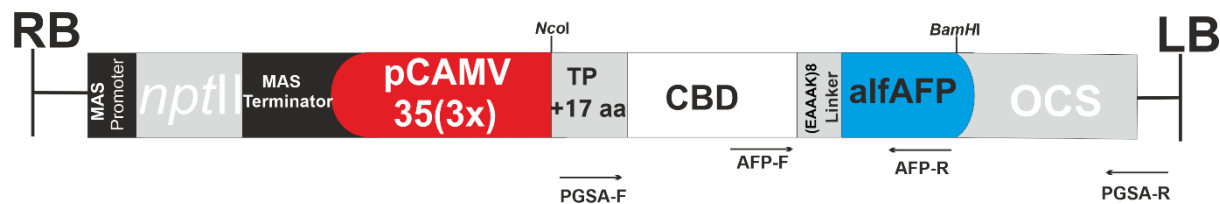
آزمایشگاهی و فرآیند کشت بافت است (Giri and Narasu, 2000; Gurusamy *et al.*, 2017; Hu and Du, 2006; Lee *et al.*, 2004).

ریشه‌های موئین (Hairy roots) از تلقیح سلول‌های گیاهی با آگروباکتریوم ریزوژنز تولید می‌شوند که در صورت همسانه-سازی ژن رمزکننده پروتئین نو ترکیب در ناقل Ri باکتری، پروتئین‌های نو ترکیب و متابولیت‌های ثانویه حاصل از فعالیت ژن یا ژن‌های مورد نظر را در محیط کشت و در ریشه‌های موئین تولید کند. کشت ریشه موئین به دلیل رشد سریع، عدم نیاز به تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، نگهداری آسان و توانایی سنتز طیف گسترده‌ای از ترکیبات مختلف شیمیایی گزینه‌ای ارزشمند جهت تولید پپتیدها، پروتئین‌های نو ترکیب و متابولیت‌های ثانویه می‌باشند (Kim *et al.*, 2002a, b).

حجم بالای اطلاعات ژنومی موجود در پایگاه‌های داده و دسترسی به ابزارهای بیوانفورماتیکی مختلف، شناسایی، پیش‌بینی و بررسی خصوصیات ژن‌ها و پروتئین‌های مختلف را تسهیل کرده است. بنابراین با استفاده از داده‌ها و ابزارهای بیوانفورماتیکی می‌توان پیش از انجام هر آزمایشی به‌صورت *in silico* ضمن شناسایی ژن‌ها مورد نظر، خصوصیات و عملکرد آن‌ها را پیش‌بینی و بررسی نمود. پیش‌بینی و شبیه‌سازی‌های بیوانفورماتیکی با احتمال بسیار بالا به آنچه در واقعیت می‌گذرد نزدیک هستند و معمولاً به‌وسیله آزمایش‌های *in vitro* مورد تأیید قرار می‌گیرند. در این مطالعه با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی برخی از اعضای خانواده دیفنسین از جمله alfAFP یونجه از نظر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، شناسایی دمین‌های عملکردی و خاصیت ضد میکروبی بررسی شدند. سپس، بررسی بیان سنتز پپتید نو ترکیب CBD-alfAFP در ریشه-های موئین گیاه توتون، اثر ضدباکتریایی آن در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد روش‌ها

تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی: ابتدا توالی پپتید alfAFP از خانواده دیفنسین‌های ضد میکروبی گیاهی از بانک ژن (به شماره دسترسی AF319468) دریافت شد و با استفاده از ابزار BLASTp پایگاه NCBI با پروتئین‌های پایگاه مربوطه بلاست صورت گرفت. پس از بررسی نتایج



شکل ۱- شماتیک سامانه ژنی CBD-alfAFP که از آن برای تراریزش گیاه توتون استفاده شد. MAS Pro: راه انداز مانوپین سنتاز؛ *npt II*: نومایسین فسفوترانسفراز II (ژن مقاومت به کانامایسین)؛ MAS-Ter: خاتمه دهنده مانوپین سنتاز؛ CaMV35S: راه انداز ژن 35S RNA ویروس موزائیک گل کلم؛ OSC-Ter: خاتمه دهنده اکتوپین سنتاز؛ محل نشستن آغازگرها برای کلونی PCR و غربال گیاهان تراریخت به صورت فلش کوچک سیاه رنگ نشان داده شده است.

Figure 1. The schematic representation of CBD-alfAFP construct used for *Nicotiana tabacum* transformation. MAS Pro: Mannopine synthase promoter; *npt II*: Neomycin phosphotransferase II; MAS Ter: Mannopine synthase terminator; CaMV35S: Cauliflower mosaic virus 35S promoter; OCS: Octopine synthase terminator; The small black arrows show the location of primers used for colony PCR and PCR-based screening of transgenic plants.

موئین براساس روش هورش و همکاران (Horsch *et al.*, 1985) استفاده شد. به طور خلاصه، بذور توتون به مدت ۱۰ دقیقه در محلول شوینده (هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و ترتیون X100) ضد عفونی و پس از سه بار شست و شو با آب مقطر استریل، روی محیط کشت MS کشت شدند. بعد از سه هفته، قطعات برگ سترن حدود ۱ سانتی متر مربع از گیاهان برش داده شدند و در مایع تلقیح آگروباکتریوم راینزورنر حاوی سامانه های ژنی به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه هم کشت شدند (Horsch *et al.*, 1985). ریزنمونه ها روی محیط هم کشتی MS بدون هورمون و آنتی بیوتیک در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. بعد از گذشت سه روز، ریزنمونه ها به محیط کشت انتخابی حاوی MS، آنتی بیوتیک های کانامایسین (۵۰ میلی گرم بر لیتر) و سفوتاکسیم (۳۰۰ میلی گرم بر لیتر)، به ترتیب جهت گزینش ریشه های موئین تراریخته و حذف آگروباکتریوم راینزورنر، منتقل شدند و تا ظهور ریشه های موئین هر ۲ هفته یکبار در محیط انتخابی و با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در شرایط تاریکی واکشت شدند. بعد از تشکیل ریشه های موئین، ریشه های از پایه به اندازه طول ۲ تا ۳ سانتی متری برش و به محیط MS مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم بر لیتر) منتقل شدند. جهت تولید زیست توده کافی، ریشه ها هر ۳ هفته یکبار در محیط کشت جدید واکشت شدند. برای تولید ریشه های موئین شاهد، تلقیح ریزنمونه های برگ با آگروباکتریوم راینزورنر بدون سامانه ژنی انجام شد.

پلاسمید نو ترکیب با استفاده از روش شوک حرارتی به سلول مستعد شده به باکتری *Escherichia coli* سویه DH5a انتقال داده شد. همسان سازی با استفاده از واکنش PCR توسط آغازگرهای مبتنی بر ناقل pGSA-R و pGSA-F روی کلونی های رشد یافته در محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک گزینش گر کلرامفنیکل (۵۰ میلی گرم بر لیتر) و هضم آنزیمی بر روی پلاسمیدها استخراج شده مورد تأیید قرار گرفت. در نهایت ناقل بیانی pGSA1285 توسط روش الکتروپوریشن (دستگاه Multiporator شرکت Eppendorf) به آگروباکتریوم راینزورنر سویه ATCC15834 انتقال داده شد. باکتری های ترانسفورم شده روی محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک گزینش گر کلرامفنیکل (۵۰ میلی گرم بر لیتر) و ریفامپسین (۵۰ میلی گرم بر لیتر) به صورت شبانه و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد کشت و غربال شدند. به منظور تأیید حضور پپتید نو ترکیب CBD-alfAFP، واکنش کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای AFP-F و AFP-R انجام شد (جدول ۱). از کلونی های مثبت تأیید شده توسط واکنش زنجیره ای پلی مرز طبق شیوه نامه کیت (شرکت Thermo Fisher)، استخراج پلاسمید صورت گرفت. هضم آنزیمی توسط دو آنزیم برشی *BamHI* و *NcoI* انجام شد و با ارسال نمونه پلاسمیدی برای توالی یابی، مورد تأیید قرار گرفت.

مواد گیاهی: از بذور توتون (*Nicotiana tabacum*) رقم Xanthi برای تولید گیاهچه جهت تراریزش و تولید ریشه های

جدول ۱- توالی، اندازه قطعه آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. The sequence, amplicon size (bp) and Tm of primers used in this study

آغازگر Primer	توالی (5'-3') Sequence (5'-3')	طول قطعه (جفت‌باز) Fragment length (bp)	دمای اتصال (°C) Tm (°C)
<i>pGSA-F</i>	TATCCTTCGCAAGAGACCCTTCC	653	60
<i>pGSA-R</i>	GAGCTACACATGCTCAGGTT		
<i>AFP-F</i>	TGTAGTCAATATGGCTGGTGTG	170	60
<i>AFP-R</i>	GCATGGTCCTCTGTAATTATCG		
<i>rolC-F</i>	CTCCTGACATCAAACCTCGTC	626	58
<i>rolC-R</i>	TGCTTCGAGTTATGGGTACA		
<i>virG-F</i>	CCGCGGTCAGCCGCAATTCT	819	59
<i>virG-R</i>	CCTGCACGTCCGCGTCAAAGAAATA		
<i>Elongation factor-F</i>	TGAACCATCCAGGACAGATTG	177	57
<i>Elongation factor-R</i>	TCTTAACCATACCAGCATCACC		

شد (داده‌ها نشان داده نشده است). جهت سنتز cDNA از کیت cDNA synthetase (شرکت Thermo Fisher) و مطابق شیوه‌نامه شرکت سازنده استفاده شد. واکنش RT-PCR بر روی cDNAهای سنتز شده، توسط آغازگرهای اختصاصی ژن کنترل داخلی *Elongation Factor* و پپتید *AFP-F* و *AFP-R* صورت گرفت (جدول ۱). کمی‌سازی داده‌ها و شدت نسبی باندها با نرم‌افزار ImageJ اندازه‌گیری شد.

استخراج پروتئین: برای استخراج پروتئین‌های نوترکیب از کلون‌های ریشه موئین، ابتدا مقدار یک گرم بافت ریشه موئین از کلون‌های ریشه موئین تراریخت و شاهد هر کدام به صورت جداگانه در هاون با استفاده از ازت مایع پودر و هموژنیزه شد. سپس به مقدار مساوی به آن بافر فسفات (حاوی 1mM PMSF) اضافه شد و بعد از سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، فاز بالایی جدا شد. غلظت پروتئین‌ها به روش برادفورد و همکاران (Bradford, 1976) اندازه‌گیری شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی پروتئین نوترکیب: به منظور سنجش فعالیت ضد میکروبی پروتئین‌های نوترکیب از روش شمارش واحدهای تشکیل کلونی (CFU) استفاده شد. در این راستا، از بیمارگرهای باکتریایی گیاهی *Ralstonia solanacearum* و *Pseudomonas syringae* کشت شبانه تهیه شد. از کشت شبانه، کشت جدیدی تهیه و وقتی چگالی نوری آن در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۴ رسید، مقدار ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پروتئین استخراج شده کلون

آنالیز ریشه‌های موئین تراریخت به وسیله PCR: به منظور تأیید تراریختی کلون‌های ریشه‌های موئین احتمالی، استخراج DNA از کلون‌های ریشه‌های موئین تراریخت و شاهد به روش CTAB، انجام شد (Richards *et al.*, 1994). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. سپس حضور قطعه ژن نوترکیب CBD-alfAFP، با استفاده از واکنش PCR توسط آغازگرهای اختصاصی *AFP-F* و *AFP-R* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* برای تأیید القای ریشه موئین استفاده شد (جدول ۱). به علاوه، برای تأیید عدم وجود هر گونه آلودگی باکتریایی کلون‌های ریشه موئین، از آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* استفاده شد (جدول ۱).

استخراج RNA و سنتز cDNA: برای تأیید و بررسی بیان سامانه نوترکیب CBD-alfAFP، استخراج RNA و سپس سنتز cDNA صورت گرفت. برای این منظور از کلون‌های ریشه‌های تراریخت و شاهد، RNA کل با استفاده از روش کلراید لیتیم استخراج شد (Chang *et al.*, 1993). کیفیت-سنجی RNA استخراجی با الکتروفورز RNA روی ژل آگارز ۱ درصد و کمیت‌سنجی غلظت RNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر صورت گرفت. حذف آلودگی ژنومی با تیمار آنزیم DNaseI صورت گرفت و عدم حضور DNA با استفاده از واکنش PCR بر روی RNA استخراجی تأیید

مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مکفارلند ($10^8 \times 1/5$ سلول) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت بر حسب دمای رشد باکتری‌ها قرار داده شدند. سپس چاهک‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری‌ها تلقیح شده بررسی گردیدند. با مشاهده ایجاد کدورت در هر چاهک، چاهک قبلی به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد. چاهک مربوط به کنترل منفی باید بدون رشد و شفاف باشد. در چاهک کنترل مثبت، کدورت نشان‌دهنده رشد کافی باکتری‌ها می‌باشد.

نتایج و بحث

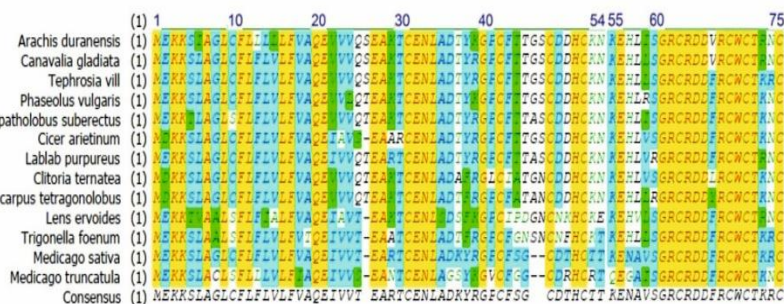
تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی: به منظور بررسی بیوانفورماتیکی پپتید alfAFP، از ابزارهای متعددی استفاده شد. نتایج بلاست پپتید alfAFP نشان داد که پپتید ضد میکروبی alfAFP تحت عنوان دیفنسین گیاهی ضد میکروبی در گیاهان متعددی مانند نخود، لوبیا، عدس و یونجه بیان می‌شود. پپتید بالغ بدون سیگنال پپتید به طول ۴۵ اسید آمینه به توالی RTCENLADKYRGPCFSGCDTHCTTKENAVSG RCRDDFRCWCTKRC برای اولین بار از بذر یونجه جداسازی شد (Gao *et al.*, 2000). نتایج هم‌ردیفی توالی اسید آمینه‌ای پپتید alfAFP یونجه و سایر پپتیدهای هم‌خانواده در گونه‌های گیاهی مختلف نشان داد که این پپتیدها از حفاظت‌شدگی بسیار بالایی بین گونه‌های مختلف گیاهی برخوردار هستند (شکل ۲- الف).

غیرتراریخت (کنترل منفی) و کلون‌های تراریخت به یک میلی‌لیتر از کشت اضافه و به مدت ۲ ساعت در دور ۲۵۰ شیک شد تا چگالی نوری کنترل منفی در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۸ تا ۱ برسد. سپس از هر دو نمونه سریال رقت تهیه و روی محیط LB آگار پخش شد و روز بعد میزان CFU طبق رابطه ۱ برای هر پروتئین نو ترکیب و عصاره ریشه موئین غیرتراریخت محاسبه و مقایسه انجام شد. که در این رابطه، In: درصد بازدارندگی، Ut: تعداد کلونی پروتئین غیرتراریخت و T: تعداد کلونی پروتئین نو ترکیب (تیمار) را نشان می‌دهد. در ضمن تمامی مراحل آزمایش از سه تکرار استفاده شد.

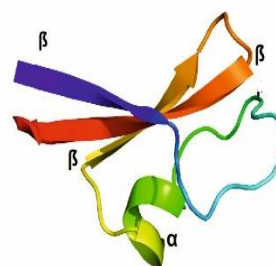
$$\text{In} (\%) = \frac{\text{CFU/ml (Ut)} - \text{CFU/ml (T)}}{\text{CFU/ml (Ut)}} \times 100 \quad (\text{رابطه ۱})$$

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC): حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) با استفاده از روش رقت‌سازی تعیین شد. برای این منظور، ۵ سطح شامل غلظت‌های، ۱۲/۵، ۶۲۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میکرولیتر در حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر، در مقابل سوسپانسیون باکتری قرار داده شد و رشد باکتری‌های مورد بررسی قرار گرفت. یک چاهک به عنوان کنترل منفی حاوی ترکیب محیط کشت و پروتئین نو ترکیب و یک چاهک به عنوان کنترل مثبت حاوی محیط کشت به علاوه باکتری‌های مورد نظر، در نظر گرفته شد. سپس به همه چاهک‌ها

الف) الف



ب) ب



شکل ۲- هم‌ردیفی چندگانه پپتیدهای ضد میکروبی alfAFP در گونه‌های گیاهی مختلف. الف: توالی‌های پپتیدی از پایگاه NCBI استخراج شدند و توسط ClustalW هم‌ردیف گردیدند؛ ب: ساختار سه‌بعدی پپتید alfAFP توسط Phyre2 ترسیم گردید.

Figure 2. Multiple sequence alignment of the alfAFP antimicrobial peptides from different plant species. a: Peptide sequences were extracted from the NCBI database and aligned by ClustalW; b: The 3D structure of the alfAFP peptide was predicted by Phyre2 software.

شده‌اند. بنابراین به نظر می‌رسد که با وجود صفحه‌های بتا، این پپتید انعطاف‌پذیری ناچیزی داشته باشد. پیوندهای هیدروژنی بین رشته‌ای که میان گروه‌های کربوکسیل یک رشته بتا و آمین رشته بتای مجاور ایجاد می‌شوند، به صفحات بتا پایداری می‌بخشند و باعث می‌شوند که این صفحات ظاهری زیگزاگ داشته باشند. فضای داخل این پپتید در حالت کروی کوچک است و گروه‌های غیرقطبی به سمت داخل مولکول و گروه‌های قطبی در سمت خارج سلول واقع شده‌اند.

قسمت اول و دوم صفحه بتا توسط یک پیچش (turn) به یکدیگر متصل شده‌اند و این دو صفحه از طریق یک لوپ طویل به مارپیچ آلفا متصل هستند. مارپیچ آلفا نیز با واسطه یک پیچش دیگر به صفحه سوم بتا ارتباط پیدا کرده است (شکل ۲-ب). وجود چنین ساختار سه‌بعدی متشکل از صفحات آلفا و بتا موجب خاصیت آمفی‌پاتیک پپتید alfAFP می‌شود. این خاصیت، با افزایش آبگریزی و افزایش تعداد اسیدآمینه‌های آروماتیک در نواحی پیچش و لوپ و با افزایش بار کاتیونی ناحیه مارپیچ آلفا تقویت می‌شود و این موضوع می‌تواند با بهبود فعالیت ضد میکروبی این پپتید ارتباط داشته باشد (Landon et al., 2004). مطالعات نشان داده‌اند که یک ارتباط قوی بین توزیع واحدهای آبگریز و شارژ در سطح مولکول و فعالیت ضد میکروبی پپتید وجود دارد (Landon et al., 2004). وجود پیوندهای دی‌سولفیدی متعدد در ساختار پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی انرژی پایداری این پپتیدها را افزایش می‌دهد (Landon et al., 2004).

پپتیدهای دیفنسین دارای جرم مولکولی بسیار پایینی بوده و این جرم مولکولی باعث تسریع تولید، انتقال و عملکرد آن‌ها می‌شود. محدوده‌ی pH ایزوالکتریک محاسبه شده نشان دهنده‌ی خاصیت اسیدی کم و خاصیت بازی بالای این پپتیدهاست. دیفنسین‌ها به علت فراوانی وجود اسیدهای آمینه‌ای مانند سیستئین، پپتیدهایی با خاصیت بازی هستند. شاخص آلیفاتیک محاسبه شده برای پپتیدها خانواده دیفنسین گیاهی، نشان دهنده مقاومت نسبتاً

سیگنال‌پپتید یک توالی کوتاه (معمولاً ۳۰-۱۶ اسیدآمینه) است که در پایانه‌ی آمینی اکثر پروتئین‌ها وجود دارد و پروتئین را به سمت مسیر ترشحی خاصی مانند اندامک‌ها، غشاء سلول هدایت می‌کند (Kapp et al., 2009). نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی در پژوهش حاضر نشان داد که پپتید ضد میکروبی alfAFP پس از سنتز در سلول‌های بذر یونجه، به خارج از سلول ترشح می‌شود که با نقش دفاعی آن‌ها رابطه مستقیمی دارند. همچنین توالی و طول سیگنال‌پپتیدها و محل تجمع پروتئین ترشحی در ۱۳ گونه گیاهی مختلف پیش‌بینی شد.

پپتید ضد میکروبی alfAFP در گونه‌های مختلف گیاهی حاوی یک سیگنال‌پپتید به طول ۲۸-۲۷ اسیدآمینه در پایانه‌ی آمینی است. بعد از سیگنال‌پپتید، یک ناحیه شدیداً حفاظت‌شده به‌عنوان دمین Scorpion toxin-like متعلق به خانواده دمین گیاهی Plant Gamma-thionin وجود دارد که دارای یک موتیف حفاظت‌شده موسوم به Knottin است که در انتها به یک C ترمینال متغیر متصل شده است. موتیف Kontin دارای اسیدآمینه‌های محافظت‌شده آروماتیک می‌باشد که امکان اتصال دیفنسین‌ها به کیتین دیواره سلولی عوامل بیماری‌زا را فراهم می‌سازد و به فعالیت ضد میکروبی از طریق مکانیسم ناشناخته کمک می‌کند (Yokoyama et al., 2009). طول این دمین در خانواده لگوم‌ها، ۴۷-۴۴ اسیدآمینه است. با این وجود طول آن در خانواده‌های مختلف گیاهی به ۱۰۴ اسیدآمینه هم می‌رسد. نتایج بررسی‌های عملکردی با استفاده از ابزارهای مختلف، وجود دمین عملکردی با Scorpion toxin-like را در ساختار تمامی پپتیدهای مورد بررسی نشان داد. دمین عملکردی مورد نظر طولی در حدود ۴۵ اسیدآمینه دارد و از محافظت‌شدگی بالایی بین گونه‌های مختلف برخوردار است.

پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی این پپتید (شکل ۲-ب) در گیاه یونجه به فرم تاخوردده شامل یک صفحه بتا سه تایی (دو صفحه همسو و یک صفحه ناهمسو) و یک زنجیره مارپیچ آلفا نشان داد که توسط چهار پل دی‌سولفیدی تثبیت

خوب این پروتئین در برابر حرارت است که احتمالاً به علت نسبت بالای اسیدهای آمینه والین، لوسین و آلانین و همچنین وجود ساختارهای ثانویه و پل های دی سولفیدی موجود در این پپتیدهاست. محدوده ی شاخص آلیفاتیک در پروتئین های مختلف متفاوت بوده و حدود ۶۲ تا ۶۹ است.

بررسی خاصیت ضد میکروبی پپتید alfAFP با پپتید نو ترکیب CBD-alfAFP در پایگاه CAMP، وجود خاصیت ضد میکروبی بالا پپتید نو ترکیب را نشان داد. در جدول ۲ احتمالات بین ۰/۵ تا ۱ نشان دهنده ی خاصیت ضد میکروبی پپتیدها هستند. هر چه احتمال به ۱ نزدیکتر باشد نشان دهنده ی فعالیت ضد میکروبی بالاتر در پپتید مورد نظر است. آنالیزهای بیوانفورماتیک مطالعه حاضر بر روی پپتید نو ترکیب CBD-alfAFP نشان دهنده اثرات ضد میکروبی این پپتید علیه بیمارگرهای قارچی و باکتریایی است. مطالعه پپتیدهای ضد میکروبی و آگاهی از ویژگی ها و عملکردی خاص توالی این پپتیدها در تشخیص و بررسی نحوه عمل فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی آنها اهمیت زیادی دارد. این ترکیبات پپتیدی به عنوان یکی از نوآورانه ترین عوامل ضد میکروبی در طی دو دهه گذشته

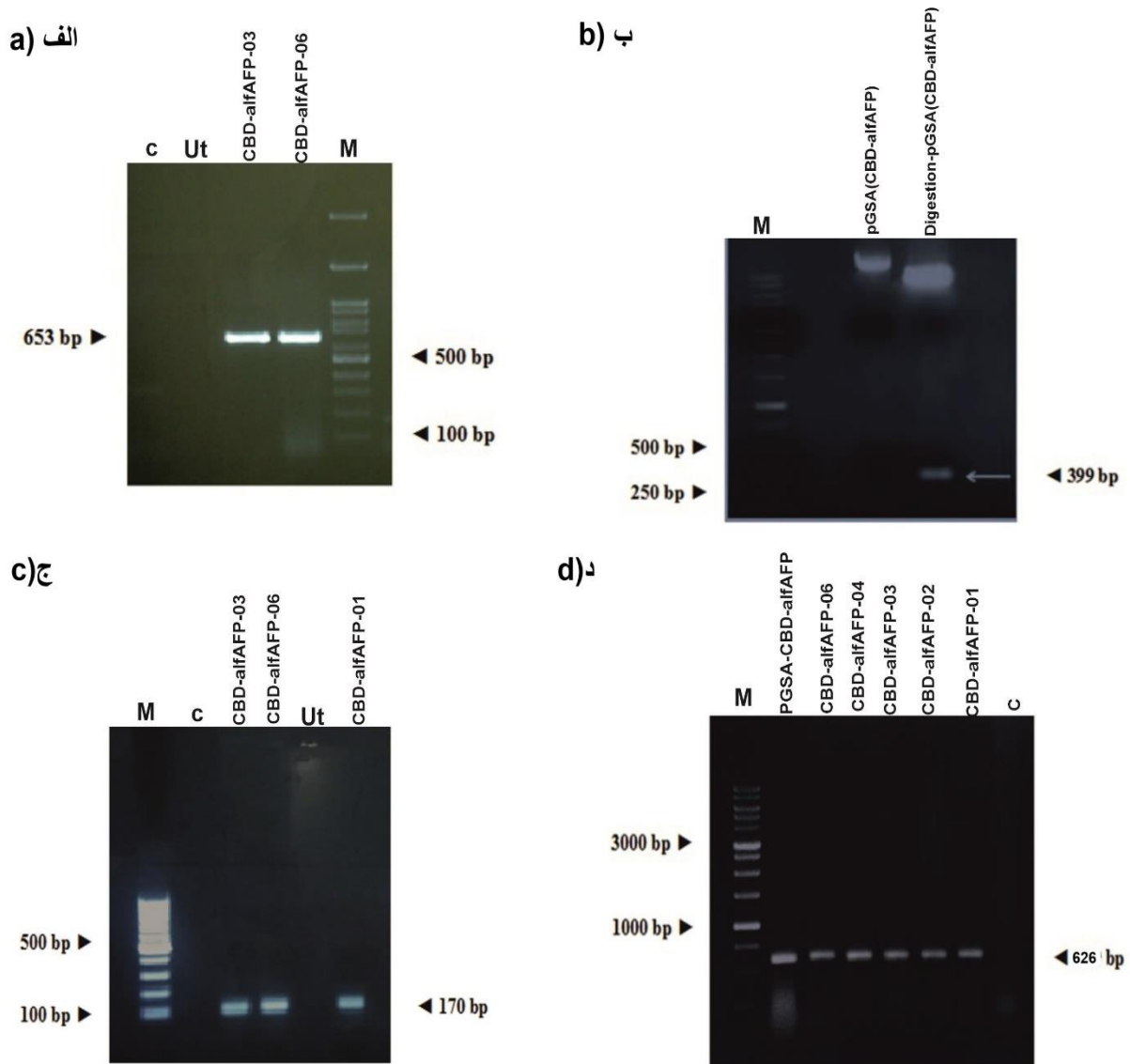
شناخته شده اند و از این رو منبع مهمی برای طراحی داروهای جدید هستند. تجزیه و تحلیل مقایسه ای ساختار سه بعدی پپتیدها، تأثیر مستقیم تغییر در خصوصیات آمفی پاتیک بر قدرت ضد میکروبی پپتید را برجسته می کند. علاوه بر این امکان سازمان دهی مطلوبی در نواحی کاتیونی و آبگریز را با هدف دستیابی به بهترین فعالیت ضد میکروبی فراهم می کند (Landon et al., 2004).

بررسی بیان ژن در ریشه های تراریخت: صحت همسانه - سازی سامانه ی ژنی CBD-alfAFP در ناقل بیانی pGSA1285 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی pGSA-F و pGSA-R بر روی پلاسمید استخراج شده، واکنش PCR تأیید شد (شکل ۳- الف). مشاهده محصول PCR به طول ۶۵۳ bp و همچنین هضم آنزیمی ناقل نو ترکیب توسط آنزیم های BamHI و NcoI منجر به تولید قطعه مورد نظر با اندازه صحیح شد (شکل ۳- ب). همانطور که در شکل ۳- ب مشاهده می شود، هضم آنزیمی ناقل pGSA1285/CBD-alfAFP منجر به تولید دو قطعه DNA شد که قطعه ای به طول ۳۹۹ bp با اندازه مورد انتظار پپتید نو ترکیب مطابقت داشت (شکل ۳- ب). بنابراین می توان نتیجه گرفت که سامانه ژنی نو ترکیب به درستی همسانه سازی شده بود.

جدول ۲- پیش بینی خاصیت ضد میکروبی پپتید alfAFP و پپتید نو ترکیب CBD-alfAFP توسط الگوریتم های مختلف

Table 2. Prediction of antimicrobial properties of alfAFP and CBD-alfAFP recombinant peptides using different algorithms

نام پپتید Peptide Name	ANN algorithm	DA algorithm	RF algorithm	SVM algorithm
alfAFP	Antimicrobial Activity	0.808	0.7	0.865
CBD-alfAFP	Antimicrobial Activity	0.8	0.72	1



شکل ۳- مراحل مختلف همسانه‌سازی و تأیید مولکولی پپتید نو ترکیب CBD-alfAFP. الف: الکتروفورز محصول کلونی PCR جهت تأیید همسانه‌سازی ژن CBD-alfAFP در ناقل pGSA1285 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای اختصاصی pGSA-F و pGSA-R؛ ب: هضم آنزیمی ناقل pGSA1285/CBD-alfAFP با آنزیم‌های برشی *NcoI* و *BamHI*؛ ج: تأیید همسانه‌سازی ژن نو ترکیب با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای اختصاصی AFP-F و AFP-R؛ د: آنالیز PCR کلون‌های ریشه موئین با استفاده از آغازگرهای ژن *rolC*: نشانگر مولکول ۱۰۰ bp و ۱ kb؛ pGSA1285-CBD-alfAFP: پلاسمید هضم نشده؛ Digestion-pGSA1285: پلاسمید هضم شده؛ Ut: ریشه گیاه غیرتراریخت؛ c: کنترل منفی (بدون الگو).

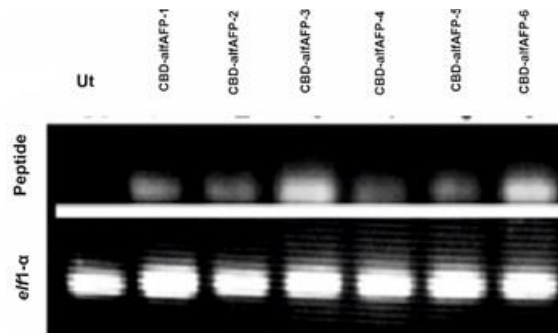
Figure 3. Different stages of cloning and molecular confirmation of CBD-alfAFP recombinant peptide. a: Agarose gel electrophoresis of the PCR products confirming cloning of CBD-alfAFP recombinant gene in pGSA1285 vector using PCR with pGSA-F and pGSA-R primers; b: Enzymatic digestion of pGSA1285/CBD-alfAFP vector with *NcoI* and *BamHI* restriction enzymes; c: Confirmation of recombinant peptide cloning using polymerase chain reaction with specific primers AFP-F and AFP-R; d: PCR analysis of hairy roots using the *rolC* gene-specific primer. Lane M: 1kb and 100 bp DNA Marker, pGSA1285/CBD-alfAFP: undigested, Digestion pGSA1285/CBD-alfAFP: Digestion, Ut: non-transgenic control hairy roots, C: negative control.

تأیید حضور ژن **CBD-alfAFP** در کلون‌های ریشه موئین تراریخت: برای سهولت بررسی نتایج، کلون‌های ریشه موئین به ظاهر تراریخت به اسامی **CBD--XX** alfAFP نام‌گذاری شدند که **XX** نماینده شماره کلون تراریخت است. از برخی گیاهان به ظاهر تراریخت و شاهد، DNA ژنومی به روش CTAB استخراج گردید. جهت تأیید نهایی حضور ژن مورد نظر، آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی **AFP-F** و **AFP-R** بر روی کلون‌های ریشه موئین شاهد و تراریخت انجام شد و محصول واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد (شکل ۳-ج). در کلون‌های ریشه موئین تراریخت بانندی به اندازه ۱۷۰ bp مشاهده شد. به منظور اثبات این موضوع که ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح ریزنمونه گیاهی تراریخت هستند، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۶۲۶ bp گردید (شکل ۳-د). وجود باندهای مشخص از ژن *rolC* و پیتید نو ترکیب در ژنوم ریشه‌های موئین حاکی از تراریخته شدن ریزنمونه‌های گیاهی بود (شکل ۳-ج و د). همچنین برای اطمینان از عدم وجود آلودگی باکتریایی و بقایای ژن‌های باکتریایی در کلون‌های تراریخت، آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* صورت گرفت. عدم تکثیر ژن *virG* در کلون‌های ریشه موئین نشان داد که آلودگی باکتریایی در کلون‌های ریشه موئین و گیاهان تراریخت وجود ندارد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

بررسی بیان ژن CBD-alfAFP و تولید پروتئین نو ترکیب CBD-alfAFP: استخراج RNA کل از کلون‌های تراریخت و شاهد صورت گرفت. الکتروفورز RNA استخراجی روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد و با مشاهده دو باند 28S و 18S مشخص شد که RNA استخراج شده از کیفیت مناسب برخوردار است. پس از تأیید کیفیت و کمیت مناسب RNA استخراج شده، آلودگی DNA با استفاده از آنزیم DNaseI حذف و سپس سنتز cDNA انجام شد. جهت تأیید و بررسی بیان ژن **CBD-alfAFP** واکنش RT-PCR نیمه کمی با

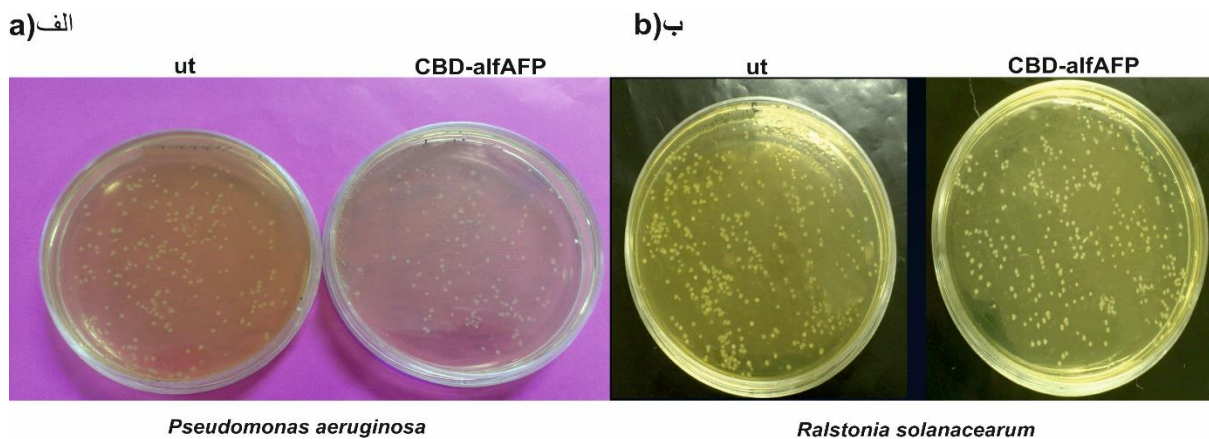
آغازگرهای ژن کنترل داخلی و آغازگرهای اختصاصی ژن روی cDNA سنتز شده از کلون‌های ریشه موئین انجام شد و بیان ژن در کلون‌های تراریخت به اثبات رسید (شکل ۴). همانطوری که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، کلون‌های ریشه موئین تراریخت از نظر میزان بیان ژن هدف با همدیگر اختلاف بیان نشان دادند. کلون‌های شماره ۳ و ۶ بیان بیشتری نسبت به سایر کلون‌ها نشان دادند. بیان کلون‌های ۱، ۲، ۴ و ۵ تقریباً در یک سطح بود.

فعالیت ضدباکتریایی پروتئین نو ترکیب: به منظور بررسی تأثیر پروتئین نو ترکیب استخراج شده از کلون‌های ریشه موئین تراریخت، آزمایش خاصیت ضد میکروبی با دارندگی بر رشد و تشکیل کلونی باکتری‌های *Ralstonia solanacerarum* و *Pseudomonas syringae* در شرایط آزمایشگاهی انجام شد (شکل ۵). نتایج آزمایش CFU نشان داد که پروتئین نو ترکیب از رشد و تشکیل کلونی بیمارگر *Pseudomonas syringae* به میزان ۶۰ درصد جلوگیری کرد، در حالی که روی باکتری *Ralstonia solanacerarum* تأثیری با دارنده‌ی کمتری داشت (شکل ۵). حداقل غلظت با دارندگی، حداقل غلظتی از پروتئین است که می‌تواند به میزان ۹۰ درصد از رشد بیمارگرها جلوگیری کند. روش رقت‌سازی در لوله برای تعیین خواص ضد میکروبی پروتئین‌های گیاهی استفاده شده است. نتایج حاصل از غلظت مهارکنندگی (MIC) فعالیت ضد میکروبی پروتئین نو ترکیب علیه بیمارگرهای باکتریایی نشان داد که هر دو باکتری به غلظت‌های استفاده شده در آزمایش واکنش متفاوتی نشان دادند. به طور کلی، برای کنترل رشد باکتری *P. syringae* به غلظت کمتری (۱۰۰ میکروگرم بر لیتر) از پروتئین نو ترکیب نیاز بود. این در حالی بود که باکتری *Ralstonia solanacerarum* در برابر پروتئین نو ترکیب مقاوم‌تر و دارای حداقل غلظت با دارندگی به میزان ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین پروتئین کلون ریشه موئین گیاه غیر تراریخت در غلظت بالاتر از ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد هیچ یک از باکتری‌ها نشد.



شکل ۴- تجزیه و تحلیل RT-PCR نیمه کمی کلون ریشه موئین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن هدف (۱۷۰ جفت‌باز) و ژن کنترل داخلی (۱۷۷ جفت‌باز) بررسی شدند. Ut: کلون ریشه موئین شاهد غیرتراریخت.

Figure 4. Semi-quantitative RT-PCR analysis of root clones using specific primers of the target gene (170 bp) and internal control (177 bp). Ut: non-transgenic control hairy roots.



شکل ۵- اثر ممانعت کنندگی پپتید نو ترکیب علیه بیمارگرهای باکتری. الف: *Pseudomonas syringae*؛ ب: *Ralstonia solanacearum*.
Figure 5. The inhibitory effect of the recombinant peptide against bacterial pathogens. a: *Pseudomonas syringae*; b: *Ralstonia solanacearum*.

(al., 2017). نتایج حاصل از آزمایش *in vitro* و گلخانه‌ای نشان داد که دیفنسین alfAFP خاصیت ضدقارچی دارد (Gao et al., 2000). پپتید alfAFP از خانواده دیفنسین‌های گیاهی فعالیت ضد میکروبی خود را به‌طور خاص به‌وسیله متابولیزه کردن غشاء سلول نشان می‌دهند. این پپتید در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع طویل شدن اسپور قارچ *Verticillium dahliae* و در غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب مهار کامل قارچ می‌شود و همچنین مانع رشد سایر عوامل بیماری‌زای قارچی از جمله *Alternaria solani* و *Fusarium culmorum* می‌گردد ولی فاقد فعالیت ضدقارچی در مقابل عامل مهم بیماری‌زای سیب زمینی *Phytophthora infestans* است (Gao et al., 2000). نتیجه این بررسی حاکی

از روش‌های متعددی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب استفاده شده است که هر روش دارای محدودیت‌های خاص خود است. برخی از این محدودیت‌ها شامل عدم توانایی در تولید و یا ترشح پروتئین‌های عملکردی (سیستم‌های باکتریایی)، خطر انتقال ویروسی و مولکول‌های سمی (سیستم‌های باکتریایی و سلول‌های پستانداران) و یا هزینه‌های تولید بسیار بالا (استفاده از سلول‌های پستانداران) است (Cardon et al., 2019). ریشه‌های موئین به‌دلیل نگهداری آسان و سازگار با سیستم‌های راکتوری، تولید ترکیبات فعال زیستی با ثبات ژنتیکی و بیوشیمیایی و همچنین امکان تولید پروتئین‌های نو ترکیب دارویی و نگهدارنده‌ها در صنایع غذایی، یک ابزار جدید در مهندسی ژنتیک محسوب می‌شود (Gurusamy et

از اهمیت ژن دیفنسین برای کنترل بیماری‌ها در سطح تجاری در محصولات کشاورزی بود (Gao *et al.*, 2000). در این مطالعه، بررسی اولیه فعالیت ضد میکروبی پروتئین نو ترکیب به روش CFU نشان داد که پروتئین نو ترکیب دارای فعالیت ضد باکتریایی معنی داری است و در مرحله بعدی آزمایش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی پروتئین ثابت کرد که برخی باکتری‌های بیماری‌زا در مقابل پروتئین‌های نو ترکیب حساس هستند. جالب توجه است که نتایج این قسمت از مطالعه با یافته‌های بدرحداد و همکاران (Badrhaddad *et al.*, 2018) در رابطه با اثرات متفاوت فعالیت ضد میکروبی پروتئین نو ترکیب مورد نظر مطابقت داشت. با نتایج حاصل از این مطالعه و یافته‌های مطالعه بدرحداد و همکاران (Badrhaddad *et al.*, 2018) می‌توان به این نکته اشاره نمود که پپتید نو ترکیب دارای موتیف‌های موسوم به knottin است که دارای اسیدهای آمینه محافظت شده سرین و آروماتیک هستند که به پپتید کمک می‌کنند تا به کیتین دیواره‌ی سلولی بیمارگرها متصل شده و به فعالیت ضد میکروبی از طریق یک مکانیسم ناشناخته کمک می‌کنند. آزمایش‌های حاصل از طراحی پپتیدهای سنتزی منجر به پیدا کردن پپتیدهایی با فعالیت ضد میکروبی بهبود یافته شده است. برای مثال، در مطالعه علی بخشی و همکاران (Alibakhshi *et al.*, 2018) اثر ضد میکروبی پپتید درماسپتین B1 (DrsB1) علیه برخی از باکتری‌ها و قارچ‌های مهم بیماری‌زا گیاهی به صورت *in vitro* و *in silico* بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه به صورت *in silico* نشان داد که سازه طراحی شده دارای خاصیت ضد میکروبی بالایی در مقایسه با پپتیدهای مشتق شده از آن است. نتایج تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی در مطالعه علی بخشی و همکاران (Alibakhshi *et al.*, 2018) نشان می‌دهد که افزودن RGS (His)₆ و فاکتور Xa، پارامترهای ضد باکتریایی پپتید نو ترکیب از جمله افزایش بار کاتیونی از +2 به +6، نیمه عمر پپتید DrsB1 از 4 ساعت به بیش از 30 ساعت و نقطه ایزوالکتریک را بهبود می‌بخشد که در نهایت منجر به

افزایش مدت زمان تأثیر پپتید نو ترکیب می‌شود. همچنین نتایج حاصل از مطالعه *in vitro* این پپتید نو ترکیب نشان داد که بیان پپتید DrsB1 در ریشه موئین توتون سبب ایجاد مقاومت به برخی از قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا گیاهی می‌شود (Alibakhshi *et al.*, 2018). در بررسی دیگری اثر ضد میکروبی پپتید DrsB1 همجوش با یک دمین اتصال به کیتین از فاکتور Avr4 با تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی در محیط *in silico* به کمک الگوریتم‌های پایگاه CAMP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده افزایش بار مثبت پپتید، تغییر آرایش شارژ، افزایش خاصیت آمفی پاتیک و نیمه عمر پپتید نو ترکیب بود. بعد از تأیید خاصیت ضد میکروبی پپتیدهای نو ترکیب با نرم افزارهای بیوانفورماتیکی، نیاز است بررسی خاصیت ضد میکروبی در محیط این ویتر و انجام شود. برای مثال، خادمی و همکاران (Khademi *et al.*, 2019, 2022) پپتیدهای نو ترکیب درماسپتین B1 (CBD-DrsB1 و DrsB1-CBD) را در ریشه موئین و گیاهان کامل توتون تولید و خاصیت ضد میکروبی آن‌ها علیه بیمارگرهای مختلف مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعات از موفقیت کنترل عوامل بیماری‌زا حکایت داشت (Khademi *et al.*, 2019, 2022). نتایج حاصل از مطالعات مختلف ذکر شده در بالا نشان می‌دهد که نتایج تجزیه و تحلیل *in silico* با *in vitro* پپتیدهای مختلف با همدیگر همخوانی دارد. در مطالعه حاضر، کارایی و فعالیت پپتیدهای طراحی شده به صورت *in silico* به کمک الگوریتم‌های پایگاه CAMP بررسی شد. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که اضافه کردن دمین متصل به کیتین باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی پپتید مورد نظر شده است. اضافه کردن دمین اتصال به کیتین از ژن کیتیناز برنج به دلیل مشابه بودن ساختار بین کیتین و پپتیدو گلیکان و همچنین اثر متقابل کیتیناز با N-استیل گلوکز آمین از پپتیدو گلیکان باعث افزایش فعالیت این پپتیدهای نو ترکیب علیه بیمارگرهای باکتریایی می‌شود (Chiche *et al.*, 2004; Makarova *et al.*, 2006; Schleifer and Kandler, 1972).

آلینین و همکاران (Aleinein *et al.*, 2015) ضمن بیان موفق پپتید فیوژن رنالکسین در ریشه‌های موئین گیاه توتون، گزارش دادند که پپتید نوترکیب تولید شده علیه باکتری‌های بیماری‌زا *Streptococcus aureus* و *Staphylococcus aureus* و *E. coli pyogenes* و *Acinetobacter bauma* مقاوم به و نکومایسین دارای اثرات ضد میکروبی است. بر این اساس عنوان شد که بیوسنتز رنالکسین در ریشه موئین و ترشح آن، جایگزین خوبی برای تولید انبوه این ماده باشد (Aleinein *et al.*, 2015). در تحقیقات مختلف اثرات ضد میکروبی آنالوگ و فیوژن پپتید alfAFP علیه بیمارگرهای باکتریایی و قارچی مختلف به اثبات رسیده است. اما طبق بررسی‌های انجام شده، تاکنون گزارشی در زمینه تولید پروتئین نوترکیب در سیستم کشت ریشه موئین صورت نگرفته است.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فعالیت ضد میکروبی پپتید نوترکیب CBD-alfAFP به طور معنی داری از فعالیت پپتید alfAFP بیشتر بود. نتایج حاصل ضمن تأیید بر صحت کارایی بیان پروتئین نوترکیب طی فرآیند دست‌ورزی و ترانسفورماسیون ژنتیکی، اطلاعات با ارزش و پیش‌نیاز برای دست‌ورزی پپتیدها و تطابق شرایط *in vitro* و *in silico* برای آزمایش‌های هدفمند در جهت توسعه مقاومت گیاهان زراعی به بیمارگرهای مختلف را فراهم می‌کند.

همچنین افزایش بار مثبت در پپتید CBD-alfAFP نسبت به پپتید alfAFP از +۹ به +۱۵ و نیمه‌عمر پپتید از ۱ ساعت به بیش از ۳۰ ساعت در سلول‌های یوکاریوتی است. از آنجایی که تراکم و مدت زمان تأثیر از جمله عوامل کارایی خاصیت پپتید ضد میکروبی است؛ بنابراین به نظر می‌رسد که پپتید نوترکیب از فعالیت بالاتری به دلیل اتصال آن‌ها به دیواره سلولی باکتری و در نتیجه اختلال در غشاء و لیز شدن باکتری برخوردار باشد و احتمالاً همین امر باعث افزایش میزان بازدارندگی این پپتید نسبت به شاهد گردید. همچنین پروتئین نوترکیب CBD-alfAFP ضمن برخورداری از خاصیت ضد-میکروبی پپتید alfAFP، به کمک دمین اختصاصی (CBD) به کیتین متصل شده و به عنوان یک لنگر به پپتید alfAFP کمک می‌کند تا ضمن تمرکز روی دیواره‌ی سلولی، فعالیت بهتری از خود نشان دهد؛ بنابراین با توجه به مطالب بالا و افزایش فعالیت ضد میکروبی پپتید نوترکیب نسبت به پپتید alfAFP، این گونه می‌توان نتیجه گرفت که افزایش تراکم پپتید نوترکیب روی غشای بیمارگرهای گیاهی باعث بهبود کارایی خاصیت ضد میکروبی شده است. همچنین نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی حاصل از پپتیدها می‌توان درک ما را برای بررسی و نحوی عملکرد فعالیت ضد میکروبی پپتیدها افزایش داده است.

References

- Aleinein, R., Schäfer, H. and Wink, M. (2015). Rhizosecretion of the recombinant antimicrobial peptide ranalexin from transgenic tobacco hairy roots. *RRJBS Phytopathol Gene Diseases*, **1**: 45-55.
- Aslam, M.Z., Firdos, S., Li, Z., Wang, X., Liu, Y., Qin, X., Yang, S., Ma, Y., Xia, X., Zhang, B. and Dong, Q. (2020). Detecting the Mechanism of Action of Antimicrobial Peptides by Using Microscopic Detection Techniques. *Foods*, **11**: 2809.
- Alibakhshi, A., Nazarian-Firouzabadi, F. and Esmaili, A. (2018). Expression and antimicrobial activity analysis of a Dermaseptin B1 antibacterial peptide in tobacco hairy roots. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, **41**: 87-97.
- Badrhadad, A., Nazarian-Firouzabadi, F. and Ismaili, A. (2018). Fusion of a chitin-binding domain to an antibacterial peptide to enhance resistance to *Fusarium solani* in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *3 Biotech*, **8**: 1-10.
- Bogdanova, L., Valiullina, Y., Faizullin, D., Kurbanov, R.K. and Ermakova, E.A. (2020). Spectroscopic, zeta potential and molecular dynamics studies of the interaction of antimicrobial peptides with model bacterial membrane. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **242**: 118785.

- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Cardon, F., Pallisse, R., Bardor, M., Caron, A., Vanier, J., Ele Ekouna, J.P., Lerouge, P., Boitel-Conti, M. and Guillet, M.** (2019). Brassica rapa hairy root based expression system leads to the production of highly homogenous and reproducible profiles of recombinant human alpha-L-iduronidase. *Plant Biotechnology Journal*, **17**: 505-516.
- Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J.** (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*. **11**: 113-116.
- Chiche, L., Heitz, A., Gelly, J.C., Gracy, J., Chau, P.T., Ha, P.T., Hernandez, J.F. and Le-Nguyen, D.** (2004). Squash inhibitors: from structural motifs to macrocyclic knottins. *Current Protein and Peptide Science*, **5**: 341-349.
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M. and Sangrador-Vegas, A.** (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, **44**: 279-285.
- Gao, A.G., Hakimi, S.M., Mittanck, C.A., Wu, Y., Woerner, B.M., Stark, D.M., Shah, D.M., Liang, J. and Rommens, C.M.** (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology*, **18**: 1307-1310.
- Giri, A. and Narasu, M.L.** (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, **18**: 1-22.
- Gururani, M.A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C.P., Nookaraju, A., Pandey, S.K. and Park, S.W.** (2012). Plant disease resistance genes: current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **78**: 51-65.
- Gurusamy, P.D., Schäfer, H., Ramamoorthy, S. and Wink, M.** (2017). Biologically active recombinant human erythropoietin expressed in hairy root cultures and regenerated plantlets of *Nicotiana tabacum* L. *PloS One*, **12**: e0182367.
- Holaskova, E., Galuszka, P., Frebort, I. and Oz, M.T.** (2015). Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology Advances*, **33**: 1005-1023.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L. and Eichholtz D.** (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, **227**: 1229-1231
- Hu, Z.B. and Du, M.** (2006). Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, **48**: 121-127.
- Jafari, M.** (2006). Tohidfar M. Bt transgenic plants: safety advantages and potential impacts in control insect pests. Paper presented at the *First Agricultural Biotechnology Conference*. Kermanshah, Iran.
- Jones, P., Binns ,D., Chang, H.Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A. and Nuka, G.** (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, **30**: 1236-1240.
- Kapp, K., Schrepf, S., Lemberg, M.K. and Dobberstein, B.** (2009). Post-targeting functions of signal peptides. In: Zimmermann R., Ed., *Madame Curie Bioscience Database*, pp.1-16. Austin, TX: Madame Curie Bioscience Database: Landes Bioscience, Austin, Texas, USA.
- Karimi, S., Pazhouhandeh, M. and Azizpour, K.** (2022). Evaluation of some characteristics of substantial equivalence of a salinity-resistant transgenic potato. *Plant Genetic Researches*, **9(1)**: 43-56 (In Persian).
- Khademi, M., Nazarian-Firouzabadi, F., Ismaili, A. and Shirzadian Khorramabad, R.** (2019). Targeting microbial pathogens by expression of new recombinant dermaseptin peptides in tobacco. *MicrobiologyOpen*, **8(11)**:1-11.

- Khademi, M., Varasteh-Shams, M. and Nazarian-Firouzabadi, F.** (2022). Induction of DrsB1-CBD_{Avr4} Recombinant Protein in Hairy and Adventitious Roots of T1 Transgenic Plants. *Plant Genetic Researches*, **9**: 27-42 (In Persian).
- Kim, Y., Wyslouzil, B.E. and Weathers, P.J.** (2002a). Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **38**: 1-10.
- Kim, Y.J., Weathers, P.J. and Wyslouzil, B.E.** (2002b). Growth of *Artemisia annua* hairy roots in liquid-and gas-phase reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **80**: 454-464.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K.** (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**: 1547-1549.
- Landon, C., Barbault, F., Legrain, M., Menin, L., Guenneugues, M., Schott, V., Vovelle, F. and Dimarcq, J.L.** (2004). Lead optimization of antifungal peptides with 3D NMR structures analysis. *Protein Science*, **13**: 703-713.
- Lee, M., Yoon, E., Jeong, J. and Choi, Y.** (2004). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters. *Plant Cell Reports*, **22**: 822-827.
- Ma, Z. and Michailides, T.J.** (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, **24**: 853-863.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V. and Polouchine, N.** (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**: 15611-15616.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M. and Hurwitz, D.I.** (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, **43**: 222-226.
- Naik, S. and Prasad, R.** (2006). Pesticide residue in organic and conventional food-risk analysis. *Journal of Chemical Health and Safety*, **13**: 12-19.
- Nguyen, L.T., Haney, E.F. and Vogel, H.J.** (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, **29**: 464-47.
- Nielsen, H.** (2017) Predicting secretory proteins with SignalP. In: Kihara D., Ed., *Protein Function Prediction*, pp. 59–73. Springer, New York, USA.
- Richards, E., Reichardt, M. and Rogers, S.** (1994). Preparation of genomic DNA from plant tissue. *Current Protocols in Molecular Biology*, **2(1)**: 2-3.
- Schleifer, K.H. and Kandler, O.** (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, **36**: 407-477.
- Strange, R.N. and Scott, P.R.** (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology*, **43**: 83-116.
- Syed, S. and Tollamadugu, N.P.** (2019). Microbes in the generation of genetically engineered plants for disease resistance. In: Viswanath, B., Ed., *Recent Developments in Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, pp. 235-248. Academic Press, Cambridge, UK.
- Waghu, F.H., Gopi, L., Barai, R.S., Ramteke, P., Nizami, B. and Idicula-Thomas, S.** (2014) . CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, **42**: 1154-1158.
- Webb, C.A. and Fellers, J.P.** (2006). Cereal rust fungi genomics and the pursuit of virulence and avirulence factors. *FEMS Microbiology Letters*, **264**: 1-7.
- Yokoyama, S., Iida, Y., Kawasaki, Y., Minami, Y., Watanabe, K. and Yagi, F.** (2009). The chitin-binding capability of Cy-AMP1 from cycad is essential to antifungal activity. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, **15**: 492-497.

- Yu, C.S., Cheng, C.W., Su, W.C., Chang, K.C., Huang, S.W., Hwang, J.K. and Lu, C.H.** (2014). Cello2go: a web server for protein subCellular Localization prediction with functional gene ontology annotation. *PloS One*, **9**: e99368.
- Zasloff, M.** (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**: 389.
- Zasloff, M.** (2006). Defending the epithelium. *Nature Medicine*, **12**: 607-60.