مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۲، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۳
صفحه: ۹۱۱-۸۹۹

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 22, No. 1, Mar-Apr 2014
Pages: 899-911

معرفی پپتید ضدمیکروبی جدید با نام Buforin–K از ترشحات پوستی وزغ کویری بومی یزد

هادی زارع زردینی[*1]، اعظم السادات هاشمی[2]، بهناز طلوعی نیا[3]، امیر بی طرف[4]

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، باشگاه پژوهشگران و نخبگان جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یزد، یزد، ایران
۲- استادیار گروه داخلی، مرکز تحقیقات خون، سرطان و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی، دانشگاه پیام نور سیستان و بلوچستان، واحد ایرانشهر، ایرانشهر، ایران
۴- دانشجوی کارشناسی زیست شناسی، مؤسسه آموزش عالی جهاد دانشگاهی، یزد، ایران

تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۱/۶ تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۸/۱۶

چکیده

مقدمه: امروزه تحقیق در زمینه پپتیدهای ضدمیکروبی به یک عرصه فعالی بدل شده است. بنابراین، هدف این مطالعه خالص‌سازی و تعیین خواص بیوشیمیایی (به ویژه اثر ضدمیکروبی) پپتیدهای جدید از ترشحات پوستی وزغ کویری است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی ترشحات پوستی وزغ با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی خالص‌سازی گردید و اثرات ضدمیکروبی آن توسط روش نشر شعاعی و حداقل غلظت مهاری مشخص شد. توالی پپتیدها نیز توسط روش اسپکتروسکوپی تعیین شد.

نتایج: یک پپتید ضدمیکروبی جدید از ترشحات پوستی به دست آمد. این پپتید از ۲۰ آمینواسید ساخته شده است. این پپتید با هیچ یک از پپتیدهای ضدمیکروبی از دوزیستان همسانی نداشت. بنابراین این پپتید جدید، Buforin–K نام گرفت. این پپتید از لحاظ فعالیت ضدمیکروبی ارزیابی شد. پپتید Buforin–K فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی را علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت (با حداقل غلظت مهاری در محدوده ۸/۱ تا ۳۵/۶ µg/ml) و همچنین علیه قارچها (حداقل غلظت مهاری این پپتید در محدوده ۲۵/۷ تا ۳۵/۶) از خود نشان داد. این پپتید اثر ضدمیکروبی بیشتری بر روی باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت و قارچها دارد. Buforin–K فعالیت همولیزی پایینی را بر روی اریتروسیت‌ها نشان داد، به طوری که در غلظت ۱۰۰µg/ml، سبب القای ۵ درصد همولیز شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثرات زیستی مفید، MaximinBk می‌تواند یک ماده مستعد برای درمان بیماری‌های عفونی مختلف باشد.

واژه‌های کلیدی: پپتیدهای ضد میکروبی، وزغ کویری، همولیز، حداقل غلظت مهاری

[*](نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۳۵۲-۶۵۲۸۱۴۷، پست الکترونیکی: ha_za63@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

مقدمه

پپتیدهای ضدمیکروبی (AMPs: Antimicrobial peptides) یکی از اعضای عمده سیستم ایمنی ذاتی هستند که از انواع ارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، حشرات، گیاهان و حتی انسان به دست آمده‌اند(۱). اکثر این پپتیدها دارای بار مثبت هستند. بیش از ۶۰۰ پپتید کاتیونیک از موجودات مختلف (از باکتری گرفته تا انسان) خالص‌سازی شده‌اند. این پپتیدها دارای فعالیت ضدمیکروبی وسیعی علیه انواع میکروب‌ها اعم از باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و غیره هستند(۲). به دلیل افزایش روزافزون سویه‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از این ترکیبات طبیعی به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های سنتی مطرح است (۴،۳). پپتیدهای ضدمیکروبی از نظر اندازه در محدوه وسیعی از ۱۲ تا ۵۰ آمینواسید قرار دارند(۳،۲). پوست دوزیستان دارای غددی است که منبع غنی برای پپتیدهای ضدمیکروبی می‌باشد(۴،۵). پپتیدهای ضدمیکروبی توسط این غدد پوستی ترشح می‌شوند و یک سیستم دفاعی مؤثر را بر علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا فراهم می‌آورد(۴،۶). تا به امروز تعداد زیادی پپتیدهای ضدمیکروبی مانند بروینین‌ها، تمپورین‌ها، ماگائینین‌ها و درماسپتین‌ها از دوزیستان جدا و خالص‌سازی شده است که هر یک، اثرات زیستی متفاوتی را از خود نشان داده‌اند(۱۳-۷). این پپتیدها دارای فعالیت‌های متفاوتی مانند ضدمیکروبی، ضدویروسی، ضدسرطانی و اسپرم‌کشی می‌باشند(۱۷-۸،۱۴). در ایران بیست گونه دوزیست وجود دارد: شش گونه سمندر و چهارده گونه قورباغه و وزغ(۲۰). در زمینه پپتیدهای ضدمیکروبی مطالعات محدودی صورت گرفته است. محققین دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی اثر عصاره خام ترشحات پوستی قورباغه مردابی را بر روی باکتری مقاوم بیمارستانی استافیلوکوکوس ارئوس بررسی کردند(۱۸) و چندین پپتید ضدمیکروبی جدید توسط مانند Temporin-Ra و Temporin-Rb(۱۹)، Brevinin-2R(۲۰،۲۱) از این نوع قورباغه خالص‌سازی شده‌اند. در تحقیق جدیدی نیز یک پپتید ضدمیکروبی جدید با عنوان Sarcotoxin Pd از حشره دراکولا خالص‌سازی گردید(۲۲). وزغ‌ها دارای پراکنش وسیعی در سرتا سر جهان هستند. در ایران نیز تنوع و پراکنش وزغ‌ها وسیع است. یکی از انواع وزغ‌های بومی ایران که در دشت کویر ایران و مناطق یزد و کرمان پراکنده هستند، وزغ کویری است که نام این گونه نیز از نام دشت کویر گرفته شده است(۲۳). هیچگونه مطالعه‌ای بر روی ترشحات پوستی این گونه نشده است. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی محتوای ترشحات پوستی این جانور و معرفی پپتیدهای ضدمیکروبی جدید با استفاده از فرایندهای خالص‌سازی می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی مواد و تجهزات مورد استفاده اعم از متانول، اتانول، تری فلورو استیک اسید، استونیتریلف استیک اسید، سدیم کلرید، فرمالدهید، سدیم هیدروکسید، تری کلرو استیک اسید، استون، کلریدریک اسید و گلیسرول از شرکت مرک تهیه شد. محیط کشت‌های مورد استفاده از شرکت Himedia تهیه گردید. ستون‌های مورد استفاده در خالص‌سازی از کمپانی Macherey–Nagel GmbH خریداری شده بود. سایر مواد مورد استفاده در مطالعه، از نوع گریدهای آنالیتیکال بودند.

جهت به دست آوردن عصاره خام ترشحات پوستی، ۲۰ وزغ کویری بالغ از هر دو جنس از مناطق مختلف دشت کویر در یزد جمع‌آوری گردید. جمع‌آوری ترشحات پوستی مطابق با روش توصیف شده در مقالات پیشین انجام شد(۱۹). حیوان با آب مقطر شسته شد. سطح پشتی جانور چندین بار توسط جریان الکتریکی ۶-۴ ولت تحریک گردید و ترشحات حاصل جمع‌آروی گردید. عصاره در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. برای جداسازی ترکیبات پپتیدی با وزن کوچک، محلول رویی حاصل، از غشای ۱۰ کیلودالتون مربوط به اولترافیلتراسیون عبور داده شد. سپس عصاره فیلتر شده توسط غشای ۱ کیلودالتون تغلیظ گردید و در نهایت توسط فریز درایر و نیتروژن مایع به صورت پودر در آمد.

جهت جداسازی و خالص‌سازی پپتید، پودر حاصل از مرحله قبل در حداقل حجم ممکن از آب دیونیزه حل شد و روی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

ستون‌های فاز معکوس C18 Semi-preparative (RP-HPLC) تزریق شد. مقدار تزریق روی ستون در هر بار ۴۰۰ میکرولیتر بود. شستشوی ستون توسط محلول A (۰/۱٪ TFA in Water) انجام شد و در یک بازه زمانی ۷۰ دقیقه با استفاده از اضافه شدن مرحله‌ای محلول B (۰/۰۹۸٪ TFA in acetonitrile) شیب غلظتی ۶۵-۵ درصد ایجاد گردید تا نمونه‌ها بر اساس میزان هیدروفوبیسیته از ستون جدا شوند. مطابق با جذب در ۲۲۰ نانومتر، فراکشن ها جمع‌آوری و خشک شد. برای خالص‌سازی بیشتر، پیک‌های مورد نظر (دارای فعالیت ضدمیکروبی)، با استفاده از روش توصیف شده دوباره روی ستون برده شد، با این تفاوت که با شیب ۰/۵ درصد و در بازه زمانی طولانی‌تر انجام شد. برای ارزیابی خلوص پپتیدها، مقدار کمی از هر پیک بر روی ستون آنالیتیکال C18 مورد بررسی قرار گرفت. هر فراکشن از نظر فعالیت ضدمیکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت.

اثرات ضدمیکروبی پپتیدهای جمع‌آوری شده توسط روش نشر شعاعی(RDA: Radial Diffusioin Assay)، مورد بررسی قرار گرفت(۲۵). بر اساس مقاله Lehrer و همکاران، مقدارCFU ۴×۱۰۶ (این مقدار باکتری بر اساس رابطه جذب باکتری و غلظت مشخص گردید) باکتری با ۱۰ میلی لیتر محیط کشت (مشتمل بر ۰/۰۳ درصد TSB: Trypticase Soy Broth و ۱ درصد آگارز) مخلوط گردید و در درون پلیت کشت ریخته شد. با استفاده از پانچر سوراخ‌هایی در محیط کشت ایجاد گردید و نمونه‌های مورد آزمایش در درون چاهک‌های ایجاد شد ریخته شد و پلیت به مدت ۳ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از طی این مدت، محیط کشت ثانویه که شامل ۶ درصد TSB و ۱ درصد آگارز بود، روی محیط اولیه ریخته شد و پلیت به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت توسط محلول رنگ‌آمیزی (۱۵ میلی‌لیتر فرمالدهید ۳۷ درصد، ۲۷ میلی‌لیتر متانول، ۶۳ میلی‌لیتر آب و ۲ میلی‌گرم کوماسی بلو)، رنگ‌آمیزی شد. پلیت در ادامه به مدت ده دقیقه توسط استیک اسید ۱۰ درصد و دی متیل سولفوکسید ۲ درصد رنگ زدایی شد. برای ارزیابی فعالیت ضد قارچی، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچی درون ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت (PDA :Potato dextrose agar) تزریق گردید و درون پلیت کشت ریخته شد. با استفاده از پانچر سوراخ‌هایی در درون محیط کشت ایجاد گردید و نمونه‌های مورد آزمایش در این سوراخ‌ها ریخته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و پس از طی این مدت، نتایج ثبت گردید(۲۴،۲۵).

تعیین توالی پپتیدهای خالص شده توسط اسپکتروسکوپی جرمی و با استفاده از روش MALDI-TOF/TOF، در دانشگاه York انگلیس انجام شد و اطلاعات مربوط به توالی مورد ارزیابی قرار گرفت. بعد از تعیین توالی، آنالیز توالی توسط سایت ExPASy انجام شد(۲۶).

توالی مربوط به پپتید حاصل با توالی پپتیدهای ضدمیکروبی که تاکنون کشف شده و در داده پایگاه پپتیدهای ضدمیکروبی به ثبت رسیده است، با استفاده از برنامه بلاست هم ارزی گردید(۲۷). سپس از روی این هم ارزی، با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench یک درخت فیلوژنتیکی بین این توالی‌ها ترسیم شد و بدین ترتیب جایگاه این پتید در بین سایر پپتیدهای موجود در داده پایگاه مشخص شد.

برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی پپتیدهای خالص شده به صورت کمی، حداقل غلظت مهاری (MIC: Minimum Inlibitory Comcentration) مربوط به پپتیدها تعیین شد. پپتید وزن شد و غلظتی معادل ۰/۶ mg/ml ساخته شد. پپتید در بافر PBS حل شد. سپس از این غلظت با رقیق‌سازی غلظت‌های ۰/۳ mg/ml، ۰/۱۵ mg/ml، ۰/۰۷۵ mg/ml، ۰/۰۳۷۵ mg/ml و ۰/۰۱۸۷۵ mg/ml آماده شد. تمامی باکتری‌ها در محیط کشت مولر ـ هینتون براث به مدت ۱۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. بر اساس مقالات پیشین ۱ میلی‌لیتر از این محیط کشت به ۹ میلی لیتر محیط کشت تازه منتقل و برای مدت ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و در نهایت غلظت

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

باکتری‌ها با محیط کشت تعدیل شد تا غلظت نهایی باکتری‌ها 10^6 CFU/ml باشد. ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون باکتریایی با ۸۰ میکرولیتر از محیط کشت تازه مخلوط گردید و در داخل چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. سپس از سریال‌های رقتی پپتیدها ۲۰ میکرولیتر برداشت شد و در درون چاهک‌های اضافه گردید. بر این اساس غلظت نهایی باکتری‌ها در هر چاهک معادل 10^5 CFU/ml خواهد بود. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از این مدت، جذب چاهک‌ها در ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری شد و نتایج با نمونه کنترل مقایسه گردید. برای تعیین حداقل غلظت مهاری مربوط به نمونه‌های قارچی، ۱۸۰ میکرولیتر از محیط کشت Sabouraud Dextrose Agar با ۱۰ میکرولیت سوسپانسیون قارچی (10^6CFU/ml) و ۱۰ میکرولیتر از سریال غلظتی نمونه ها مخلوط گردید و درون میکروپلیت ریخته شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. حداقل غلظت مهاری به صورت غلظتی از پپتید تعریف شد که در آن غلظت رشد باکتری به طور کامل مهار شده بود(۲۲،۲۸،۲۹). از باکتری‌های Escherichia coli HP101BA 7601c و Psodomonas ،Klebsiella Pneumonia PTCC1388 aeroginosa PTCC2834، Agrobacterium tumefaciens PTCC1245، Bacillus subtilis PTCC4533، L. mesenteroides PTCC1463، Staphylococcus aureus PTCC1442 و Bacillus cereus PTCC1435 و از قارچ‌های Aspergillus niger، Asperjilus fumigates، Penicillium lilacinum و Candida albicans برای اندازه‌گیری MIC استفاده شد. تمامی سنجش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شد.

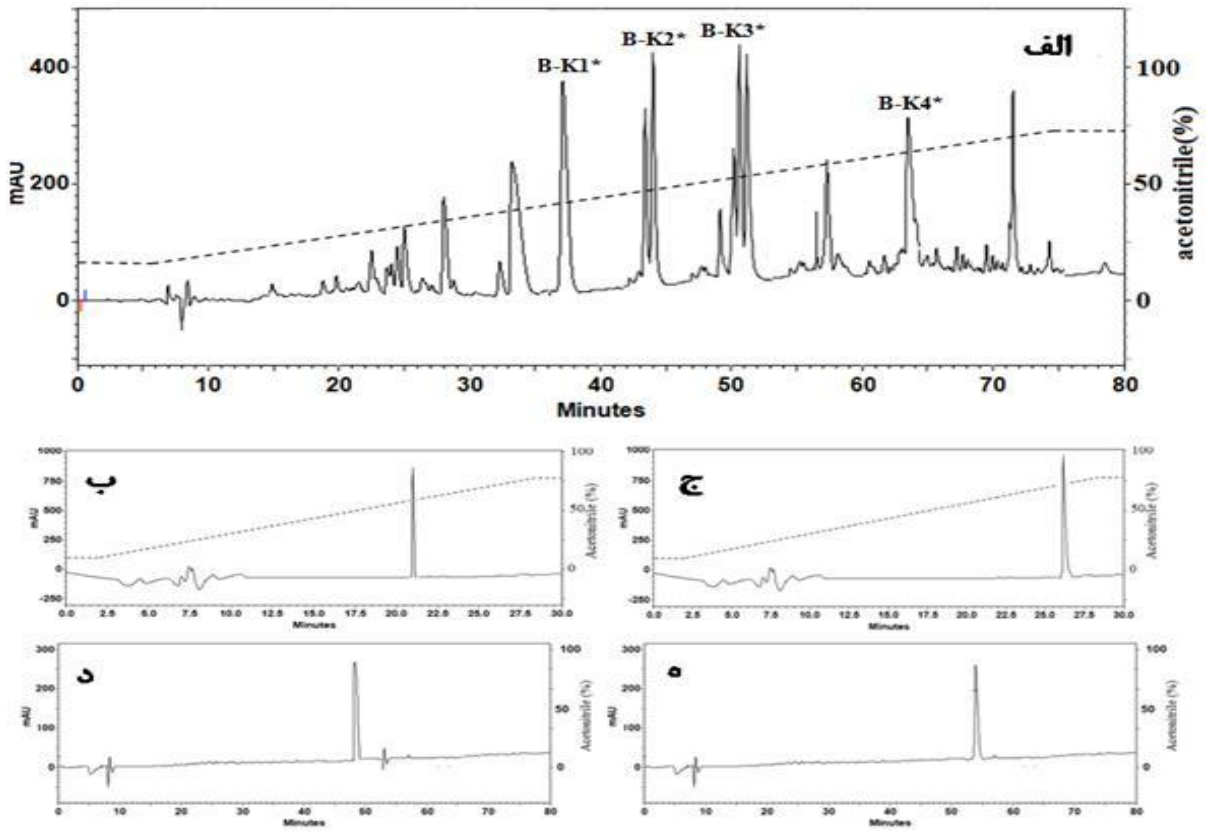
برای سنجش فعالیت همولیزی، ۵ میلی‌لیتر از خون تازه انسان به درون یک لوله هپارینه ریخته شد. سپس این نمونه خونی به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۵۰۰ سانتریفوژ گردید تا سلول‌های قرمز خون جدا شود. سپس رسوب حاصل، پنج بار با استفاده از ۴ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (PBS: Phosphate Bufferd Saline) شسته شد و بار دیگر در دور ۴۵۰۰ سانتریفوژ گردید تا محلول رویی کاملاً شفاف شود. در آخرین مرحله از خالص‌سازی، سلول‌های قرمز خون توسط ۲۰ میلی‌لیتر بافر PBS رقیق گردید. برای سنجش همولیز، ۱۰ میکرولیتر از سریال غلظتی پپتیدها که در بخش قبل آماده شد به لوله‌های میکروفیوژ که شامل ۱۹۰ میکرولیتر سلول‌های خونی رقیق شده بود، اضافه گردید. میکروفیوژها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل از سانترفوژ برداشته شد و با PBS رقیق گردید تا حجم نهایی به ۱ میلی‌لیتر برسد. جذب لوله‌ها در طول موج ۵۶۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. از تریتون X-100 (۱٪) که باعث لیز شدن کامل سلول‌های قرمز خون می‌شود، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد(۱۹،۲۲). و در نهایت نتایج با نمونه کنترل مقایسه گردید.

نتایج

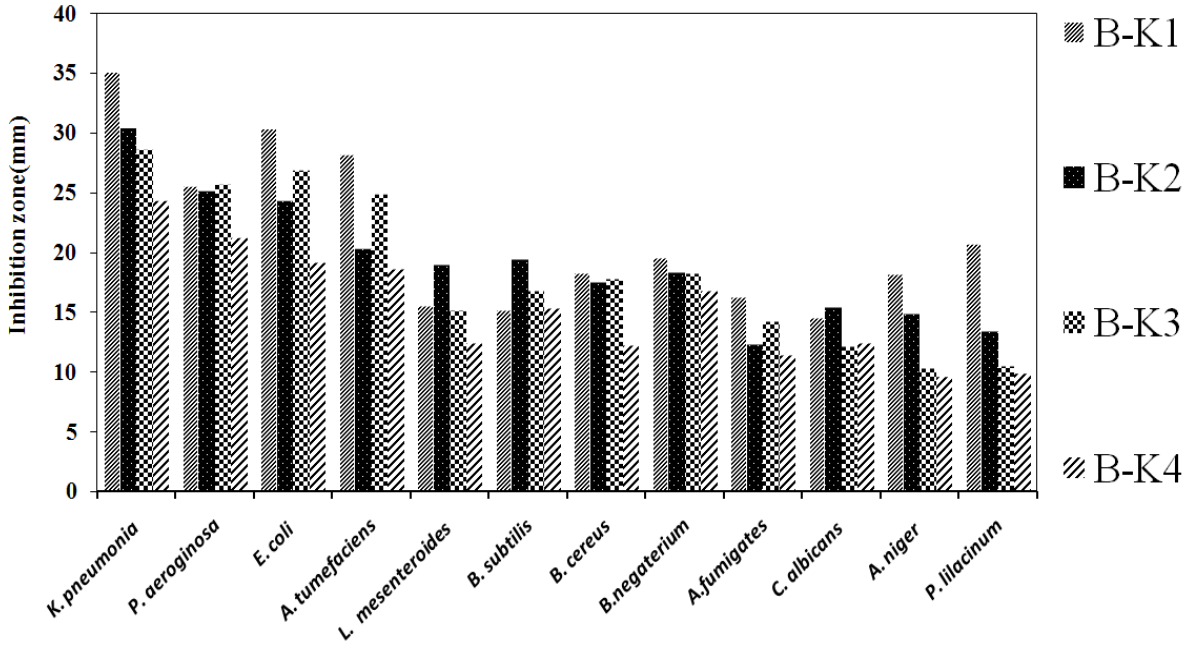
ترشحات پوستی وزغ کویری توسط RP-HPLC به ۱۶ پیک عمده تقسیم شد که در شکل ۱ نشان داده شده است. سنجش فعالیت ضدمیکروبی نشان داد که عمده‌ترین پیک فعال، پیک B-K1 تا B-K4 می‌باشد. همانگونه که در شکل ۱ الف نشان داده شده است، بیش از ۱۶ پیک از ستون جمع‌آوری گردید. پیک‌هایی که با علامت ستاره مشخص شده‌اند، دارای فعالیت ضدمیکروبی بودند (اشکال ۱ و ۲). بنابراین، این پیک‌ها برای خالص‌سازی بیشتر بار دیگر روی ستون برده شد که نتایج خالص‌سازی در شکل‌های ۱ ب، ۱ج، ۱ د و ۱ ه نشان داده شده است. این چهار پیک برای تجزیه و تحلیل بیشتر توسط اسپکتروسکوپی جرمی و تعیین توالی آنها به انگلیس ارسال گردید.

فعالیت ضدمیکروبی پیک‌های B-K1-4 توسط سنجش هاله عدم رشد بررسی شد. نتایج در شکل ۲ نشان داده است. این پپتیدها فعالیت ضدمیکروبی مناسبی را علیه میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش مشتمل بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت و قارچها از خود نشان دادند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]



شکل ۱: خالص‌سازی پپتیدهای ضدمیکروبی از ترشحات پوستی وزغ کویری بومی یزد توسط کروماتوگرافی RP-HPLC و ستون C18.



شکل۲: فعالیت ضدمیکروبی پپتیدهای خالص شده علیه باکتری‌ها و قارچ‌ها توسط روش هاله عدم رشد.
قطر هاله اندازه‌گیری شد و به صورت دیاگرام نشان داده شده است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

هر چهار پیک مذکور توسط روش اسپکتروسکوپی جرمی تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد که وزن مولکولی پیک‌های B-K1، B-K2، B-K3 و B-K4 به ترتیب ۲۶۷۵/۳، ۴۲۶۲/۹، ۲۲۷۹/۶ و ۲۰۱۲/۲ می‌باشد. وزن‌های مشاهده شده با وزن مولکولی که به صورت تئوری محاسبه می شود، یکسان است. توالی آمینواسیدی پپتیدها در جدول ۱ نشان داده است. با استفاده از روش هم ارزی توالی، سه پپتید B-K1، B-K2 و B-K3 به ترتیب توالی یکسانی با پپتیدهای Maximin 1(۳۰)، Buforin I(۳۱) و Alyteserin-1a(۳۲) داشتند؛ اما پیک B-K4 با هیچ یک از پپتیدهای گزارش شده یکسان نبود و این پپتید به عنوان یک پپتید جدید معرفی گردید. بر اساس سیستم نامگذاری پپتیدهای ضدمیکروبی، این پپتید Buforin–K نامگذاری گردید(۳۳). در ساختار این پپتید، چندین آمینواسید بازی وجود دارد که مشابه با بسیاری از پپتیدهای ضدمیکروبی است. تجزیه و تحلیل توالی نشان داد که این پپتید جدید دارای نقطه ایزوالکتریک ۱۱/۰۸ می‌باشد.

جدول ۱: ساختار اولیه، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک پپتید خالص شده از وزغ کویری

پپتیدها	توالی	جرم (Da)	pI	همسانی پپتید
B-K1	GIGTKILGGVKTALKGALKELASTYAN	۲۶۷۵/۱۳	۱۰/۱۹	Maximin 1
B-K2	AGRGKQGGKVRAKAKTRSSRAGLQFP VGRVHRLLRKGNY	۴۳۶۲/۹	۱۲/۴۱	Buforin I
B-K3	GLKDIFKAGLGSLVKGIAAHVAN	۲۲۷۹/۶	۱۰/۲۵	Alyteserin-1a
B-K4	ILGPVLGLVGRLAGGLIKRE	۲۰۱۲/۲۲	۱۱/۰۸	None found

* B-KX: B. kavirensis and X: number of peak)

تجزیه و تحلیل فعالیت ضدمیکروبی به صورت کمی بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت و همچنین قارچ‌ها در جدول ۲ خلاصه شده است. همانگونه که این جدول نشان می‌دهد، پپتید Buforin–K باعث مهار کامل رشد باکتری‌ها در غلظت‌های بسیار پایین می‌شود (کمتر ازµg/ml ۲۱). این پپتید در غلظت‌های پایین، رشد چهار قارچ مورد مطالعه را نیز مهار می‌کند (در غلظت کمتر ازµg/ml ۳۶). این داده‌ها نشان داد که این پپتید جدید بر روی باکتری‌های گرم منفی اثر بیشتری دارد. در بین میکروارگانیسم‌های مورد بررسی، پپتید جدید بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را بر روی E. coli و K. pneumonia نشان داد. حداقل غلظت مهاری این پپتید برای E. coli و K. pneumonia کمتر از µg/ml ۹ است. این پپتید همچنین فعالیت ضدمیکروبی مؤثری را علیه سویه مقاوم S. aureus نشان داد.

جدول ۲: مقادیر حداقل غلظت مهاری (MIC) مربوط به پپتید Buforin–K بر علیه باکترمیکروب‌های مختلف

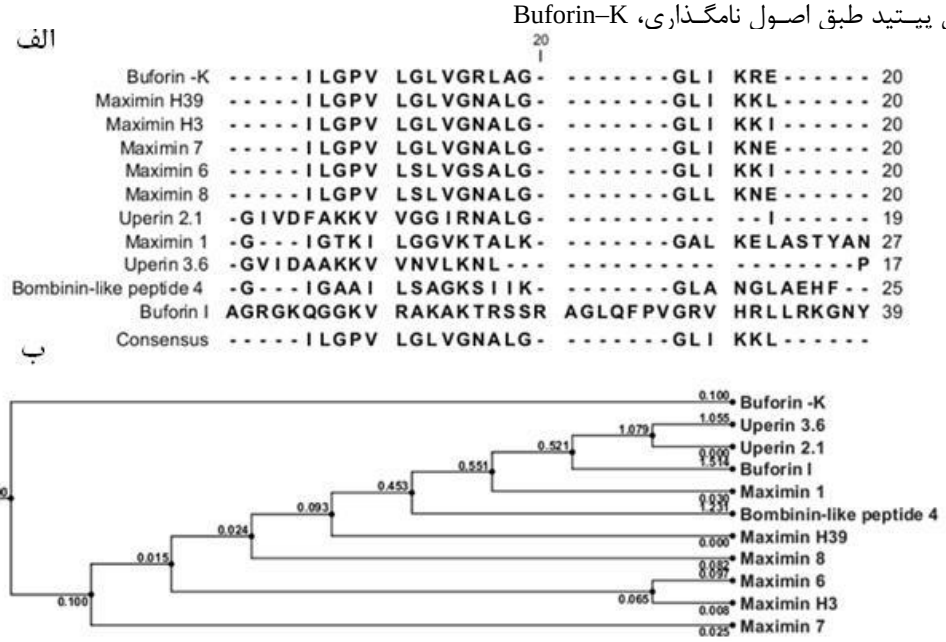
نوع ارگانیسم	MIC(µg/ml)*
باکتری‌های گرم مثبت	
L. mesenteroides	۲۰/۷۸±۱
B. subtilis	۱۹/۴±۰/۹
B. cereus	۱۸/۵±۱/۲
S.aureus	۱۶/۳±۱/۱
باکتری‌های گرم منفی	
K. pneumonia	۸/۹±۰/۸
P. aeroginosa	۱۰/۳±۰/۶
E. coli	۸/۱±۰/۷
A. tumefaciens	۱۲/۱±۰/۸
قارچ	
A.fumigates	۳۵/۶±۱/۵
C. albicans	۳۲/۱±۱/۱
A. niger	۲۸/۶±۱/۵
P. lilacinum	۲۵/۷±۱/۲

*غلظت پپتید ضدمیکروبی که به طور کامل رشد میکروب را مهار می‌کند

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

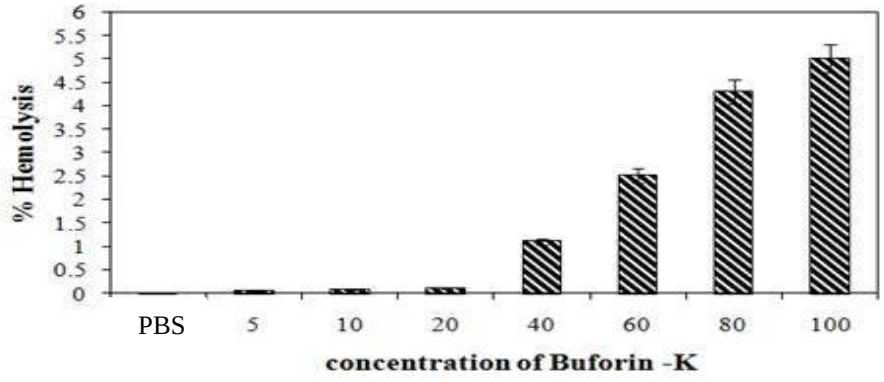
هم ارزی توالی این پپتید با ۱۲ پپتید به دست آمده از داده پایگاه پپتیدهای ضدمیکروبی انجام شد. نتایج نشان داد که Buforin–K بیشترین شباهت توالی را به پپتید Maximin 7 دارد که از وزغ Bombina maxima به دست آمده است (شکل ۳ الف). تجزیه و تحلیل فیلوزنتیکی توالی آمینواسیدی با رسم درخت فیلوژنتیکی انجام شد. درخت فیلوزنتیکی نیز نشان داد که این پپتید جدید بیشترین شباهت توالی را به Maximin 7 دارد(۳۰،۳۱). علی‌رغم این شباهت، Buforin–K به دلیل عدم همسانی کامل، این پپتید به عنوان یک پپتید جدید در نظر گرفته می‌شود که متعلق به خانواده Maximin است (شکل ۳ ب). بنابراین، ایـن پیـتید طبق اصـول نامگـذاری، Buforin–K نامیده می‌شود(۳۳).

از گلبول‌های قرمز خون انسان برای ارزیابی فعالیت همولیزی این پپتید استفاده شد. Buforin–K فعالیت همولیزی پایینی را از خود نشان داد. در غلظت µg/ml ۱۰۰، این پپتید تنها باعث القای ۵ درصد همولیز می‌شود. مشاهدات نشان داد که این پپتید در منطقه حداقل غلظت مهاری (µg/ml ۳۶≤)، این پپتید اثر همولیزی بسیار کمی دارد. سنجش همولیز توسط روش نشر شعاعی نیز این داده‌ها را تأیید کرد (شکل ۴). بنابراین این پپتید جدید فعالیت همولیزی ناچیزی بر علیه اریتروسیت‌های انسانی دارد.



شکل ۳: هم ارزی توالی پپتید خالص سازی شده با توالی پپتیدهای ثبت شده در داده پایگاه پپتیدهای ضدمیکروبی و رسم درخت فیلوزنتیکی

الف) هم ارزی توالی پپتید خالص شده (Buforin–K) با ده پپتید دیگر. ب) رسم درخت فیلوزنتیکی توسط نرم افزار CLC Main Work Bench Ver.5.5.



شکل۴: تعیین فعالیت همولیزی Buforin–K

شکل درج شده نشان‌دهنده بررسی فعالیت همولیزی Buforin–K در محدوده غلظتی ۵ تا ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر با روش هاله می‌باشد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

بحث

پپتیدهای ضدمیکروبی نقش کلیدی در سیستم ایمنی ذاتی بر علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا ایفا می‌کنند(۱). پوست دوزیستان یک منبع غنی و بالقوه برای خالص‌سازی این پپتیدها می‌باشد. پوست آنها به عنوان یک سیستم دفاعی مؤثر عمل می‌کند. زمانی که این جانوران در معرض میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا قرار می‌گیرند، از طریق پوست خود پپتیدهای ضدمیکروبی مختلفی را ترشح می‌کنند(۳۴،۳۵). محققین مختلفی از ترشحات پوستی انواع وزغ‌ها مثل Bombina orientalis(۳۱)، Bombina maxima(۳۶)، Bufo bufo gargarizans(۳۷) و Yellow-bellied toad(۳۸)، پپتیدهای ضدمیکروبی خالص‌سازی کردند. وزغ کویری یکی از گونه‌های وزغ می‌باشد و بومی نواحی کویری ایران است(۲۳). در این مطالعه، پپتدی ضدمیکروبی جدیدی از ترشحات پوستی این وزغ خالص‌سازی گردید. این پپتید Buforin–K نامیده شد. بر طبق الگوی کروماتوگرام، این پپتید جدید هیدروفوب است (شکل ۱). این حالت توسط سایر مولفین نیز توصیف شده است(۱۴). توالی آمینواسیدی پپتید خالص شده، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک آن در جدول ۱ خلاصه شده است. بر اساس جدول ۱ این پپتید مانند بسیاری از پپتیدهای ضدمیکروبی، وزن مولکولی پایینی دارد(۳۸-۳۶). اکثر پپتیدهای ضدمیکروبی ۱۰ تا ۵۰ آمینواسید طول دارند و پپتید جدید این مطالعه دارای ۲۰ آمینواسید است(۱۴،۳۹). بار خالص و نسبت هیدروفوبیسیته این پپتید جدید ۲+ و ۵۰ درصد است. بار خالص و شمار آمینواسیدهای Buforin–K مشابه با برخی پپتیدهای ضدمیکروبی گزارش شده از وزغ است(۳۲،۳۳،۴۱). همانگونه که در شکل ۳ نشان داده شده است، هم ارزی این پپتید با توالی سایر پپتیدهای منتشر شده، نشان داد که این پپتید در بخشی از ساختار مشابه با Maximin 7 است(۳۲،۳۳). این پپتید جدید متعلق به خانواده Maximin است. پپتیدهای Maximins خانواده‌ای از پپتیدهای ضدمیکروبی هستند که از ترشحات پوستی وزغ قرمز چینی (Bombina maxim) جدا شده‌اند(۴۰). همه پپتیدهای maximins به جز Maximin 9(۴۱) و Maximin S4(۳۶)، فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارند، برای سلول‌های سرطانی سمی هستند و فعالیت اسپرم کشی نیز دارند(۱۵،۳۴،۳۱). Buforin–K نیز فعالیت ضدمیکروبی مؤثری علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت و همچنین قارچ‌ها دارد (جدول ۲). بر طبق داده‌های شکل ۲، در بین این چهار پپک، پپتید B-K4 در مقایسه با سه پپتید دیگر فعالیت ضدمیکروبی مؤثرتری دارد. تمامی پپتیدها بر روی باکتری‌های گرم منفی اثر بیشتری را نشان دادند. فعالیت‌های ضدمیکروبی این پپک‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک نئومایسین بیشتر است. علاوه بر این، این پپتیدها توانایی از بین بردن سویه مقاوم استافیلوکوکوس ارئوس را نیز دارند.

فرضیات متعددی در ارتباط با این که پپتیدهای ضدمیکروبی چگونه میکروب‌ها را می‌کشند، وجود دارد. این پپتید جدید احتمالاً مشابه با بسیاری از پپتیدها، دیواره سلولی، غشای سلولی، سیتوپلاسم و سایر جایگاه‌ها را مورد هدف قرار می‌دهد(۱۶). مقایسه حداقل غلظت مهاری بین این پپتید جدید و سایر پپتیدهای گزارش شده، نشان داد که این پپتید دارای مقدار پایینی است. مقدار حداقل غلظت مهاری Buforin–K پایین‌تر از پپتیدهای Ascaphins(۴۲)، Odorranain-HP(۴۳)، Brevinin-1CDYa، Brevinin-2GHa، Temporin-GH، Japonicin(۴۴-۴۹)، Dybowskin-112(۳۲) و غیره می‌باشد. علاوه بر این Buforin–K درصد پایینی از همولیز را نشان داد. با توجه به مطالعات ذکر شده، پپتید معرفی شده در این مطالعه یک پپتید ضدمیکروبی جدید است که در اولین مطالعه بر روی وزغ کویری که یک دوزیست بومی ایران می‌باشد، به دست آمده است. اثرات زیستی مؤثر این پپتید این امکان را ایجاد می‌کند که Buforin–K نامزد مناسبی برای درمان عفونت‌های موضعی است. هرچند، تحقیقات بیشتری مورد نیاز است تا در محیط بدن موجود زنده نیز ارزیابی گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان از باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی یزد به دلیل حمایت مالی کمال تشکر را دارند. همچنین

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

نویسندگان از مرکز تحقیقات خون، سرطان و ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی یزد نیز به دلیل همکاری صمیمانه کمال قدردانی را دارند.

References:

1- Zasloff M. ***Antimicrobial peptides of multicellular organisms***. Nature 2002; 415(6870): 389-95.

2- Mookherjee N, Hancock RE. ***Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections***. Cell Mol Life Sci 2007; 64(7-8): 922-33.

3- Ganz T. ***Chemistry: Rings of destruction***. Nature 2001; 412: 392-93.

4- Barra D, Simmaco M. ***Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides***. Trends Biotechnol 1995; 13(6): 205-9.

5- Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N. ***Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents***. Biochem Biophys Acta 2004; 1696(1): 1-14.

6- Nicolas P, Mor A. ***Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates.*** Annu Rev Microbiol 1995; 49: 277-304.

7- Ali MF, Knoop FC, Vaudry H, Conlon JM. ***Characterization of novel antimicrobial peptides from the skins of frogs of the Rana esculenta complex.*** Peptides 2003; 24(7): 955-61.

8- Clara A, Manjramkar DD, Reddy VK. ***Preclinical evaluation of magainin-a as a contraceptive antimicrobial agent.*** Fertil Steril 2004; 81(5): 1357-65.

9- Lequin O, Ladram A, Chabbert L, Bruston F, Convert O, Vanhoye D, et al. ***Dermaseptin S9, an alpha-helical antimicrobial peptide with a hydrophobic core and cationic termini.*** Biochem 2005; 45(2): 468-80.

10- Marenah L, Flatt PR, Orr DF, Shaw C, Abdel-Wahab YH. ***Skin secretions of Rana saharica frogs reveal antimicrobial peptides esculentins-1 and -1B and brevinins-1E and -2EC with novel insulin releasing activity***. J Endocrinol 2006; 188(1): 1-9.

11- Mor A, Hani K, Nicolas P. ***The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms***. J Biol Chem 1994 ; 269(50): 31635-41.

12- Rozek T, Bowie JH, Wallace JC, Tyler MJ. ***The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs Litoria aurea and Litoria raniformis. Part 2. Sequence determination using electrospray mass spectrometry 1.*** Rapid Commun Mass Spectrom 2000; 14(21): 2002-11.

13- Zasloff M. ***Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor.*** Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84(15): 5449-53.

14- Cudic M, Bulet P, Hoffmann R, Craik DJ, Otvos L Jr. ***Chemical synthesis, antibacterial activity and conformation of diptericin, an 82-mer peptide originally isolated from insects.*** Eur J Biochem 1999; 266(2): 549-58.

15- Li J, Xu X, Xu C, Zhou W, Zhang K, Yu H, et al. ***Anti-infection peptidomics of amphibian skin.*** Mol Cell

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

Proteomics 2007; 6(5): 882-94.

16- Van Compernolle SE, Taylor RJ, Oswald-Richter K, Jiang J, Youree BE, Bowie JH, et al. ***Antimicrobial peptides from amphibian skin potently inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells***. J Virol 2005; 79(18): 11598-606.

17- Zairi A, Tangy F, Bouassida K, Hani K. ***Dermaseptins and magainins: antimicrobial peptides from frogs' skin-new sources for a promising spermicides microbicides-a mini review***. J Biomed Biotechnol 2009; 2009: 452567.

18- Abbasi MA, Mosaffa N, Taheri S, Molla Jaafari Kh. ***Effect of Antibacterial skin secretion of "Rana ridibanda" frog on methycillin resistant Staph aureus.*** Cell J (Yakhteh) 2007; 9(3): 208-300. [Persian]

19- Asoodeh A, Zardini HZ, Chamani J. ***Identification and characterization of two novel antimicrobial peptides, temporin-Ra and temporin-Rb, from skin secretions of the marsh frog (Rana ridibunda).*** J Pept Sci 2011; 18(1): 10-16.

20- Ghavami S, Asoodeh A, Klonisch T, Halayko AJ, Kadkhoda K, Kroczak TJ, et al. ***Brevinin-2R(1) semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway.*** J Cell Mol Med 2008; 12(3): 1005-22.

21- Mehrnejad F, Naderi-Manesh H, Ranjbar B, Maroufi B, Asoodeh A, Doustdar F. ***PCR-based gene synthesis, molecular cloning, high level expression, purification, and characterization of novel antimicrobial peptide, Brevinin-2R, in Escherichia coli.*** Appl Biochem Biotech 2008; 149(2): 109-18.

22- Memarpoor-Yazdi M, Zare-Zardini H, Asoodeh A. ***A novel antimicrobial peptide derived from the insect paederus dermatitis.*** Int J Pept Res Ther 2013; 19(2): 99-108.

23- Andrén C, Nilson G. ***A new species of toad (amphibia, anura, bufonidae) from the kavir desrt, Iran.*** Jour Herpetol 1979; 13(1): 93-100.

24- Schagger H. ***Tricine-SDS-PAGE.*** Nat Protoc 2006; 1(1): 16-22.

25- Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, Jackson R, Eisenhauer P. ***Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides.*** J Immunol Methods 1991; 137(2): 167-73.

26- ExPASy. ***Compute PllMw.*** ExPASy: Bionformatics Resource Portal. [Cited 2 Jan 2014]. Available from: . http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html

27- ***The Antimicrobiol peptide database.*** Department of Pathology & Microbiology, UNMC. [Cited 2 Jan 2014]. Available from: http://aps.unmc.edu/AP/main.php

28- Amiri A, Zare Zardini H, Shanbedi M, Maghrebi M, Baniadam M. ***Efficient method for functionalization of carbon nanotubes by lysine and improved antimicrobial activity and water-dispersion.*** Mater Lett 2012; 72(8): 153-56.

29- Zare Zardini H, Amiri A, Shanbedi M, Maghrebi M, Baniadam M. ***Enhanced antibacterial activity of amino acids-functionalized multi walled carbon nanotubes by a simple method.*** Colloids Surf B Biointer Faces 2012; 92: 196-202.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

30- Lai R, Liu H, Hui Lee W, Zhang Y. ***An anionic antimicrobial peptide from toad Bombina maxima.*** Biochem Biophys Res Commun 2002; 295(4): 796-99.

31- Gibson BW, Tang DZ, Mandrell R, Kelly M, Spindel ER. ***Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of the Asian toad, Bombina orientalis.*** J Biol Chem 1991; 266(34): 23103-11.

32- Kim SS, Shim MS, Chung J, Lim DY, Lee BJ. ***Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretion of Rana dybowskii.*** Peptides 2007; 28(8): 1532-39.

33- Conlon JM. ***Reflections on a systematic nomenclature for antimicrobial peptides from the skins of frogs of the family Ranidae.*** Peptides 2008; 29(10): 1815-19.

34- Lai R, Zheng YT, Shen JH, Liu GJ, Liu H, Lee WH, et al. ***Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad Bombina maxima.*** Peptides 2002b; 23(3): 427-35.

35- Lee WH, Li Y, Lai R, Li S, Zhang Y, Wang W. ***Variety of antimicrobial peptides in the Bombina maxima toad and evidence of their rapid diversification.*** Eur J Immunol 2005 ; 35(4): 1220-29.

36- Wang T, Zhang J, Shen JH, Jin Y, Lee WH, Zhang Y. ***Maximins S, a novel group of antimicrobial peptides from toad Bombina maxima.*** Biochem Biophys Res Commun 2005; 327(3): 945-51.

37- Park CB, Kim MS, Kim SC. ***A novel antimicrobial peptide from Bufo bufo gargarizans.*** Biochem. Biophys Res Commun 1996; 218(1): 408-13.

38- Bevins CL, Zasloff M. ***Peptides from frog skin.*** Annu Rev Biochem 1990; 59: 395-414.

39- Zhou M, Wang L, Owens DE, Chen T, Walker B, Shaw C. ***Rapid identification of precursor cDNAs encoding five structural classes of antimicrobial peptides from pickerel frog (Rana palustris) skin secretion by single step "shotgun" cloning.*** Peptides 2007; 28(8): 1605-10.

40- Boman HG. ***Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts.*** J Intern Med 2003; 254(3): 197-215.

41- Lee WH, Zhang J, Zhang YX, Jin Y, Lai R, Zhang Y. ***Maximin 9, a novel free thiol containing antimicrobial peptide with antimycoplasma activity from frog Bombina maxima.*** FEBS Lett 2005; 579(20): 4443-48.

42- Conlon JM, Sonnevend A, Davidson C, Smith DD, Nielsen PF. ***The ascaphins: a family of antimicrobial peptides from the skin secretions of the most primitive extant frog, Ascaphus truei.*** Biochem Biophys Res Commun 2004; 320(1): 170-75.

43- Tennessen JA, Blouin MS. ***Selection for antimicrobial peptide diversity in frogs leads to gene duplication and low allelic variation.*** J Mol Evol 2007; 65(5): 605-15.

44- Wang H, Lu Y, Zhang X, Hu Y, Yu H, Liu J, et al. ***The novel antimicrobial peptides from skin of Chinese broad-folded frog, Hylarana latouchii (Anura:Ranidae).*** Peptides 2009; 30(2): 273-82.

45- Chen L, Li Y, Li J, Xu X, Lai R, Zou Q. ***An antimicrobial peptide with antimicrobial activity against Helicobacter pylori.*** Peptides 2007; 28(8): 1527-31.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

46- Jin LL, Song SS, Li Q, Chen YH, Wang QY, Hou ST. ***Identification and characterisation of a novel antimicrobial polypeptide from the skin secretion of a Chinese frog (Rana chensinensis).*** Int J Antimicrob Agents 2009; 33(6): 538-42.

47- Zhou JW, McClean S, Thompson A, Zhang Y, Shaw C, Rao P, et al. ***Purification and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretion of Hylarana guentheri.*** Peptides 2006; 27(12): 3077-84.

48- Zhou J, Meng QF, Xu XS, Tian XL, Jiang FJ, Li QS, et al. ***Purification and in vitro activity of an antimicrobial peptide from skin of Rana temporaria chensinensis, David.*** Chem Res Chinese Univ 2007 ; 23(4): 433-36.

48- Wang MJ, Wang Y, Wang A, Song Y, Ma D, Yang H, et al. ***Five novel antimicrobial peptides from skin secretions of the frog, Amolops loloensis.*** Comp Biochem Phys B Biochem Mol Biol 2010; 155(1): 72-76.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

Purification and Characterization of a New Antimicrobial Peptide from Skin Secretions of Bufo Kavirensis

Zareh-Zardini H(MSc)[*1], Hashemi A(MD)[2], Tooloeinia B(MSc)[3], Bitaraf A(BSc)[4]

[1]*Department of Biochemistry, Young Research Club, Islamic Azad University, Yazd Branvh, Yazd, Iran*

[2]*Department of Internal Medical, Hematology, Oncology and Genetic Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

[3]*Department of Biology, Payam Noor University, Iranshahr Branch, Iranshahr, Iran*

[4]*Department of Biology, Academic Center of Education, Culture & Research, Yazd, Iran*

Received: 26 Mar 2013 ***Accepted:*** 7 Nov 2013

Abstract

Introduction: Today, research in the field of antimicrobial peptides is active. Thus, the aim of this study is to purify and determine biochemical properties (especially antimicrobial effect) of new antimicrobial peptides from skin secretions of bufo kavirensis.

Methods: This is a descriptive study. The skin secretions of bufo was purified by biochemical manners and antimicrobial effects was characterized by radial dffusion assay and minimal inhibitory concentration. The sequence of peptides was also determined by using MS/MS.

Results: A novel antimicrobial peptide was obtained from skin secretions. This peptide is composed of 20 amino acids. This peptide does not present any similarity with the other antimicrobial peptides from the amphibians. Thus, it was named Maximin Bk. The peptide was subjected to antimicrobial activity assays. The Buforin–Kpeptide showed considerable antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria (minimum inhibitory concentrations (MIC), 8.1 to 20.78 µg/ml) as well as fungi (MIC, 25.7 to 35.6 mg/ml). Moreover, this peptide showed higher antimicrobial activity against Gram-negative than against Gram-positive bacteria and fungi. Maximin Bk showed virtually low hemolytic activity, which, at a concentration of 100 µg/mL, induced 5% hemolysis. Thus, a very slight haemolytic activity was obtained against human erythrocytes.

Conclusion: On the basis of the biological effects, Buforin–Kcan can be regarded as the potent agent for treatment of various microbial diseases.

Keywords: Antimicrobial Peptides; Bufo Kavirensis; Hemolysis; MIC

This paper should be cited as:
Zareh-Zardini H, Hashemi A, Tooloeinia B, Bitaraf A. ***Purification and characterization of a new antimicrobial peptide from skin secretions of bufo kavirensis***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 22(1): 899-911.

****Corresponding author: Tel: +98 325 6228147, Email*: *ha_za63@yahoo.com***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]