مجله علوم و فنون شیلات
نسخه ویژه خلیج فارس
دوره ۱۰ شماره ۲، بهار ۱۴۰۰، صفحات ۲۰۳ تا ۲۱۲

شناسایی، کلونینگ و توالی‌یابی ژن پپسیدین ماهی شانک سر طلایی (*Sparus aurata*) در باکتری *Escherichia coli*

نجمه برنجکار[۱]، محمدرضا کلباسی[۱*]، سامان حسینخانی[۲]

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
۲- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکـــــیده

پپسیدین در از بین بردن میکروارگانیسم ها اعم از باکتری، قارچ، ویروس، انگل طیف گسترده ای دارد و دارای فعالیت قوی ضدتوموری است و در افزایش ایمنی ذاتی نقش دارد و لذا در برابر باکتری ها مقاومت ایجاد نمی کند؛ بنابراین از اهمیت بالایی در آبزی پروری برخوردار است. در این پژوهش کلونینگ ژن پپسیدین ماهی شانک سر طلایی (*Sparus aurata*) در وکتور pTZ57R/T صورت گرفت. محصول اتصال به سلول های مستعد باکتری *Escherichia coli* سویه DH5α منتقل شدند. از تک کلنی های مشاهده شده در پلیت آمپی سیلین، استخراج پلاسمید انجام گرفت. تاءیید صحت تک کلنی های رشد یافته در این پژوهش، با روش های PCR مستقیم و تعیین توالی انجام گردید. قطعه تکثیر شده cDNA ژن پپسیدین ماهی شانک سرطلایی متشکل از ۳۱۰ نوکلئوتید و ۵۷ آمینواسید است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ژن پپسیدین در وکتور pTZ57R/T با موفقیت کلون گردیده است. مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن پپسیدین در این پژوهش شباهت بالایی را با پپسیدین ۵ گونه *Morone chrysops* نشان داد. مقایسه توالی آمینواسیدی سیگنال پپتید پپسیدین کاملا مشابه با Dicentracin-like همین گونه ثبت شده در بانک ژنی بوده و توالی پپتید بالغ پپسیدین تنها در سه آمینواسید با Pleorocidin-like گونه *Poesila farmosa* و Dicentracin-like گونه *Sphaeramia orbicularis* شباهت دارد. این پژوهش می تواند گامی برای مطالعات بعدی پپتید پپسیدین باشد.

کـــلید واژه‌ها: پپتید پپسیدین، کلونینگ ژن، ماهی شانک سرطلایی، وکتور pTZ57R/T

نوع مقـاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۵
تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۰/۳/۱۰

***نویسنده مسول:**
kalbassi_m@modares.ac.ir

مقدمه

پژوهش در ویژگی های فارماکولوژیک فرآورده های طبیعی دریایی موجب کشف مواد فعال زیستی، که میتوانند کاربرد بالینی داشته باشند، گردیده است. محیط زیست دریایی، منبع فرآورده های طبیعی زیستی و فعال استثنایی است که خصوصیات ساختاری-شیمیایی آنها در دیگر محصولات طبیعی گیاهان و جانوران خشکی زی دیده نمی شوند. تنوع زیستی اکوسیستم دریا طیف گسترده ای از ترکیبات زیستی از منبع دریا را فراهم آورده است که برای کشف دارو مهم است. تا به امروز، گروه های مختلف تحقیقاتی پتانسیل بیوشیمیایی ترکیبات طبیعی قابل ارزیابی دریا را در بسیاری زمینه ها ارزیابی کرده اند [۱]. محصولات طبیعی جدا شده از محیط دریایی به دلیل دارا بودن پروتئین های دارویی در تنوع درمان بیماری‌ها مانند سرطان یا شرایط التهابی، کاملا شناخته شده هستند. در طب سنتی، موجودات دریایی برای ترمیم زخم و بهبود ضایعه استفاده می شود [۲]. خلیج فارس دارای پتانسیل بالقوه ای به لحاظ تنوع زیستی و دارا بودن این نوع ترکیبات است. از بین این محصولات AMP ها (Antimicrobial

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.12.4]

(peptide از جایگاه ویژه ای برخوردار هستند. پپتیدهای ضدمیکروبی علاوه بر مقابله مستقیم با پاتوژن ها، در تحریک سیستم دفاعی میزبان، هدایت کردن سلول های ایمنی به سمت محل عفونت، و حتی تا حدودی در ایجاد ایمنی اکتسابی نیز نقش دارند؛ و البته این پپتیدها برای میکروارگانیسم های مفید بدن مضر نیستند [۳، ۴]. پپتیدهای ضد میکروبی به دلیل طیف وسیعی از فعالیت های ضد میکروبی، پایین بودن فعالیت همولیتیکی، سمیت سلولی آن ها و از آن جایی که در باکتری‌ها ایجاد مقاومت نمی‌کنند، می‌توانند در بحث بیماری ها به صنعت آبزی پروری کمک کنند. از طرفی به علت توانایی بالای این پپتیدها در مهار انواع باکتری ها، مخمرها و کپک ها می توان از آن ها در نگهداری غذا در صنعت آبزی پروری نیز استفاده نمود [۴]. پپتیدهای ضد میکروبی در ماهیان ویژگی های منحصر به فردی دارند که قابلیت جایگزینی با آنتی بیوتیک‌های تجاری مرسوم در صنعت آبزی پروری دارند. به عنوان یک عضو مهم پپتیدهای ضد میکروبی در ماهیان، پیسیدین ها وظایف چندگانه ای در حذف میکروارگانیسم ها و تجزیه سلول های توموری در شرایط *in vitro* دارند. این ژن ها می‌توانند به وسیله محرک‌های متعددی شامل باکتری‌ها، اجزاء تشکیل دهنده باکتری‌ها، انگل ها، ویروس ها و poly I:C؛ تحریک شوند. پیسیدین ها پتانسیل فعالیت ضدمیکروبی بر علیه تعداد زیادی از میکروارگانیزم ها را نشان داد. آن ها به طور گسترده‌ای علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی با بهترین ارزش ضدباکتریایی علیه گونه های استرپتوکوکوس، پزودوموناس، باسیلوس و ویبریو فعال هستند [۵]. پیسیدین ها همچنین نشان دادند که دارای فعالیت ضد قارچی [۶، ۷، ۸]، فعالیت ضد پارازیتی [۶، ۹، ۱۰، ۱۱]، فعالیت ضد ویروسی [۱۲، ۱۳] هستند. تاکنون مطالعه‌ای در مورد کلونینگ ژن پپتید پیسیدین ماهی شانک سر طلایی (*Sparus aurata*) در خلیج فارس صورت نگرفته است. لذا در این مطالعه، ژن کد کننده این ماهی کلون و توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی آن با سایر گونه های ثبت شده در بانک ژنی مقایسه شد.

مواد و روش ها

نمونه برداری و استخراج mRNA

در این پژوهش نمونه برداری با قایق صیادی از قفس های مستقر در خلیج فارس واقع در بندر چارک و با استفاده از تور کیسه ای انجام شد. جداسازی بافت های آبشش، پوست، روده، کبد، کلیه و طحال گونه *Sparus aurata* صورت گرفت؛ این بافت ها بلافاصله بعد از برداشتن در ازت مایع قرار داده شد و سپس به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استفاده در فریزر ۸۰°C- نگهداری شد. RNA کل با استفاده از TRIzol (Invitrogen) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت (شرکت سیناژن) استخراج شد. غلظت mRNA تخلیص شده با دستگاه نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت.

سنتز cDNA

سنتز cDNA و واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای الیگو دی تی و آنزیم Reverse transcriptase انجام شد [۱۴]. این سنتز با استفاده از دستورالعمل شرکت تاکارا (Takara) انجام شد. بدین منظور ۳ میکرومتر از RNA استخراج شده را درون یک میکروتیوپ ۰/۲ میلی لیتری ریخته، ۲ میکرولیتر از آغازگر Oligo dT و ۷/۵ میکرولیتر از آب عاری از RNAase به آن اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.12.4]

۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رشته cDNA سنتز می شود و در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد نیز فعالیت آنزیم رونوشت بردار معکوس متوقف می شود.

واکنش PCR

آغازگرهای اختصاصی پیسیدین که از روی توالی های حفاظت شده در سایر گونه ها (*M. saxatilis*، *O. niloticus*، *E. coicodes* و ...) [۱۵] طراحی شد و به شرکت سیناژن سفارش داده شد. توالی آغازگرهای استفاده شده به صورت زیر است:

Forward: 5'- GTTATGATCTTTCTGGTGTTGACAC – 3'

Reverse: 5' – GAGCTTCACCAAAAGTCACTACATC – 3'

جهت انجام PCR برای تکثیر ژن هدف، ۱۲۰ نانو گرم cDNA الگو، ۲۰ پیکو مول از هر آغازگر، ۶۲/۵ نانومولار مسترمیکس و ۳/۶ میکرولیتر آب با حجم ۱۰ میکرولیتر استفاده شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر با مرحله واسرشته سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد آغاز و با انجام ۳۰ چرخه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه ادامه یافت و با مرحله گسترش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به پایان رسید. محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد، باند مورد نظر با استفاده از کیت QIAquick Gel Extraction خالص سازی شد و برای تعیین توالی ارسال گردید.

کلونینگ ژن و استخراج پلاسمید

واکنش اتصال طبق دستورالعمل کیت InSTAclone PCR Cloning Kit ™ انجام شد و ژن پیسیدین در وکتور PTZ57R/T کلون شد. ترکیبات واکنش بر اساس دستورالعمل کیت با هم مخلوط شدند. جهت انجام واکنش اتصال، ۲/۱۵ میکرولیتر از محصول خالص شده PCR ، ۲/۷۳ میکرولیتر پلاسمید PTZ57R/T، ۲ میکرولیترLigase Buffer ۵X ، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم T4 DNA Ligase با آب دوبار تقطیر به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس میکروتیوپ حاوی مخلوط واکنش به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در فرآیند کلون اتصال به نسبت ۱: ۵ انجام شد. محاسبه نسبت ۱: ۵ با استفاده از نرم افزار Nebiocalculator انجام شد.

غلظت Insert : ۴۱/۴ ng/µl

غلظت Vector : ۵۵ ng/µl

طول Insert : ۳۴۳ bp

طول Vector : ۲۸۸۷ bp

Vector volume = ۱۵۰ ng / ۵۵ ng = ۲/۷۳ µl

Ng of Insert DNA = ۱۵۰ ng × ۳۴۳ bp / ۲۸۸۷ bp × ۵/۱= ۸۹/۱۱ ng

۸۹/۱۱ ÷ ۴۱/۴ ng/µl = ۲/۱۵ µl

سپس به روش شوک حرارتی پلاسمید نوترکیب به سلول های میزبان (باکتری *E. coli* سویه DH5α) منتقل شد. در این مرحله میکرولیتر۵۰ از سلول مستعد باکتری را با ۵ µl نمونه لایگیت شده را درون یک تیوپ مخلوط و چندبار پیپت کرده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد، سپس به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده و مجددا به مدت ۱۰–۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت و ۷۰۰ میکرولیتر محیط کشت

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.12.4]

LB به آن اضافه شد. سپس به مدت ۲ ساعت در انکوباتور شیک دار در دمای ۳۷ °C قرار گرفت. سپس با دور ۴۰۰۰–۵۰۰۰ rpm و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت دور ریخته شد و محیط کشت و باکتری های باقی مانده در ته تیوپ پیپتاژ شد و روی پلیت آمپی سیلین کشت داده شد. آن گاه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز قرار داده شد. ۵ عدد از تک کلنی های مشاهده شده در ۳۰ µl آب حل شد. هر کدام از کلنی ها باند مشاهده شد، کلنی را در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت LB به مدت ۱۶–۱۵ ساعت کشت داده شد. استخراج پلاسمید طبق دستورالعمل کیت GTP انجام شد، سپس بر روی ژل آگارز ۱٪ چک شده تا از وجود ژن مورد نظر بر روی پلاسمید اطمینان حاصل کرد. تایید صحت کلون های به دست آمده با روش های PCR مستقیم و تعیین توالی انجام گرفت.

آنالیز ژن تکثیر شده

مقایسه توالی به دست آنده با داده های موجود در بانک ژنی با استفاده از نرم افزار BLAST در NCBI انجام شد. ترجمه توالی نوکلئوتیدی به اسیدهای آمینه، با استفاده از نرم افزار MEGA 5 [۱۶] صورت گرفت. برای شناسایی توالی سیگنال پپتیدی از نرم افزار dttps://www.ebs.dtu.dk/services/SignalIP و ویژگی های توالی پروتئینی به دست آمده با استفاده از برنامه protparam مورد بررسی قرار گرفتند (dttp://www.expasy.ch/tools/ :ExPASY). جهت بررسی و مقایسه توالی های نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای با توالی ای که بیشترین شباهت را با توالی مورد نظر داشتند، از نرم افزار CLC Viewer 6 sequence [۱۷] استفاده شد.

نتایج

تکثیر ژن پیسیدین

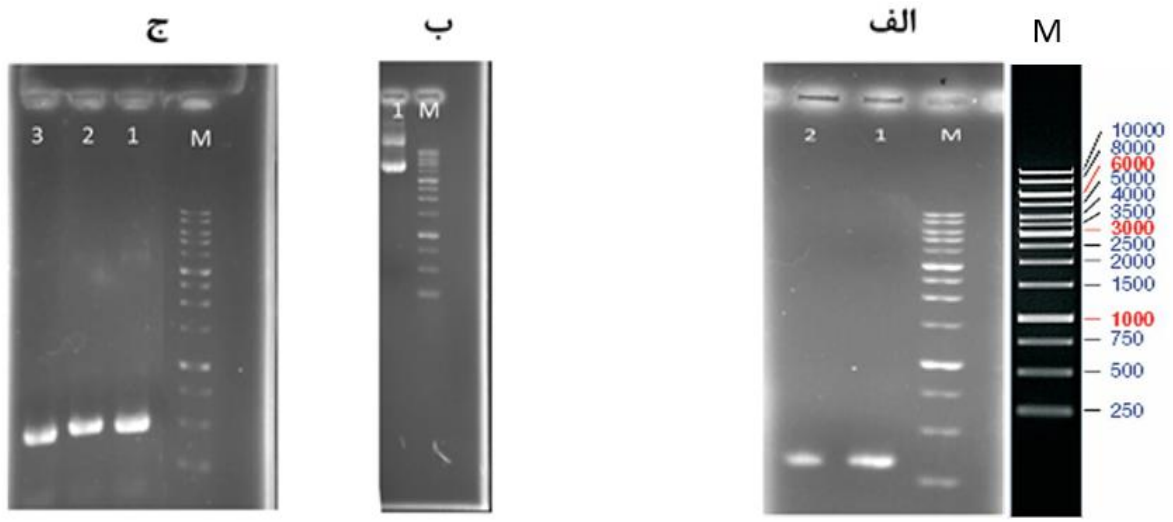
تکثیر ناحیه ای از ژن کد کننده پپتید ضد میکروبی پیسیدین ماهی شانک سرطلایی به صورت باندی به اندازه ۳۴۳ bp صورت گرفت که نتیجه آن در ژل آگارز ظاهر گردید (شکل ۱– الف). برای تایید نهایی، قطعه مورد نظر توالی یابی گردید و نتیجه آن در شکل ۲ آمده است. نتایج تعیین توالی قطعه مورد نظر از ماهی Gilthead seabream (*Sparus aurata*) را تایید کرد.

کلونینگ ژن پیسیدین

پس از رشد باکتری های ترانسفورم شده در پلیت حاوی آمپی سیلین که در انکوباتور معمولی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد، تک کلنی هایی ظاهر شدند که پس از استخراج پلاسمید از آن ها، پلاسمید حاوی ژن پیسیدین بر روی ژل آگارز ران شد (شکل ۱– ب). سپس برای تایید وجود ژن در پلاسمید این تک کلنی ها، واکنش PCR مستقیم پلاسمیدهای استخراج شده با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده این ژن انجام شد. الگوی حرکتی قطعات حاصل از واکنش PCR بر روی ژل آگارز، نشان داد که فرآیند کلونینگ ژن پیسیدین در وکتور pTZ57R/T موفقیت آمیز بوده است (شکل ۱– ج).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.12.4]



شکل ۱. الف- الگوی حرکتی محصول PCR ژن پیسیدین. M: PreciGene 1 kb DNA Ladder . ۱ و ۲ باند bp ۳۱۰ با آنزیم Taq ب- الگوی حرکتی پلاسمید استخراج شده حاوی ژن پیسیدین (M: PreciGene 1 kb DNA Ladder. ۱: پلاسمید نوترکیب حاوی ژن پیسیدین ج-تصویر الکتروفورز محصول PCR مستقیم کلون نوترکیب (M: PreciGene 1 kb DNA Ladder. ۱: محصول PCR مستقیم کلون های نوترکیب (M: PreciGene 1 kb DNA Ladder)

```
1   gttatgatct ttctggtgtt gacactggtc gtcctcatgg ccgaacccgg ggagagtgga
61  gctgtcatgt ctgtaattaa atgtaaggga aaccctccga tctgtgtcca gaccagagga
121 agagcactc gacattgtta aacgtggacg tgatctttat ggacgattgg attgatctata
181 ctatcaggac tgagtctgtt cttgattttg aagatatagt ttgagctata tctttgtgct
241 ttgcaaagca acaaatagtt ggatgagtaa acatgaagctc ttgagatgta gtgacttttt
301 ggtgaagctc
```

شکل ۲- توالی قطعه تکثیر شده از ژن پیسیدین گونه *Sparus aurata*

توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن پیسیدین

cDNA ژن پیسیدین ماهی شانک سرطلایی در قطعه تکثیر شده شامل ۳۱۰ نوکلئوتید و ۵۷ آمینو اسید است. توالی قطعه تکثیر شده cDNA کد کننده پیسیدین ماهی شانک سرطلایی با پیسیدین ۵ گونه *Morone chrysops* شباهت بالایی (۹۸٪/۱۵) دارد. توالی سیگنال پپتیدی دارای ۱۹ آمینو اسید است. توالی آمینواسیدی ماهی شانک سرطلایی با سایر ماهیان مقایسه شد. توالی سیگنال پپتیدی این گونه با Dicentracin-like گونه *Sparus aurata* کاملا مشابه بوده و با بعضی گونه های دیگر در یک یا چند آمینواسید تفاوت دارد (شکل ۳). قطعه تکثیر شده شامل قسمتی از پپتید سیگنال، پپتید بالغ و دنباله کربوکسی ترمینال است. توالی آمینواسیدی قسمت های مختلف این پپتید پیسیدین گونه *Sparus aurata* در زیر آمده است (رنگ زرد: پپتید سیگنال؛ رنگ سبز: پپتید بالغ و رنگ آبی: دنباله کربوکسی ترمینال):

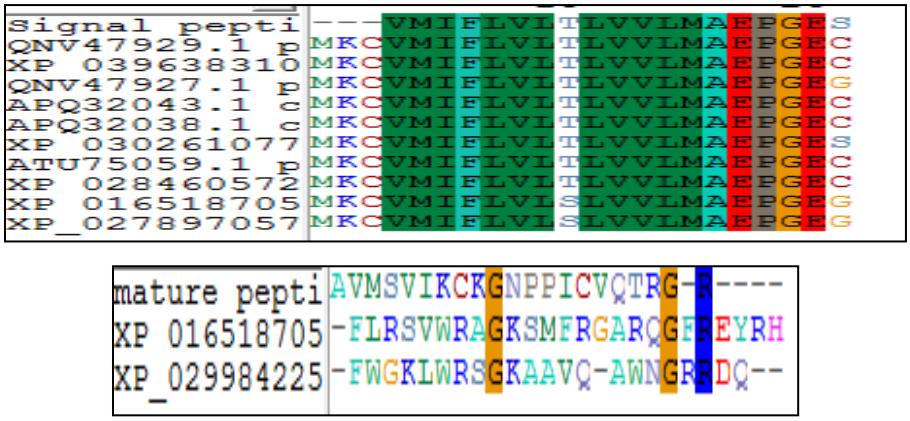
5'-3'

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.12.4]

VMIFLVLTLVVLMAEPGESGAVMSVIKCKGNPPICVQTRGRALDIVKRGRDLYGRLD

نتایج حاصل از بلاست پروتئینی پپتید بالغ این قطعه با سایر گونه ها نشان داد که تنها در سه آمینواسید با Pleorocidin-like گونه *Poesila farmosa* و Dicentracin-like گونه *Sphaeramia orbicularis* شباهت دارد (شکل ۳).



شکل ۳- بلاست توالی آمینواسیدی پپتید سیگنال و پپتید بالغ قطعه تکثیر شده از ژن پیسیدین گونه *Sparus aurata* با سایر گونه های ثبت شده در NCBI.

بحث

بی مهرگان و ماهیان دریایی عمدتا به سیستم ایمنی ذاتی برای جلوگیری از پاتوژن های میکروبی وابستگی دارند. حضور آن ها بیش از میلیون‌ها سال در محیط دریایی مملوء از پاتوژن نشان می دهد که در آن ها احتمالا ابزارهای شیمیایی از جمله پپتیدهای ضدمیکروبی برای مقابله با بیماری ها، تکامل یافته است. بنابراین کاوش پپتیدهای ضدمیکروبی از ارگانیسم های دریایی ارزش هزینه کردن را دارد [۱۸،۱۹،۲۰،۲۱،۲۲،۲۳،۲۴]. ماهی شانک سرطلایی (*Sparus aurata*) از خانواده شانک ماهیان (Sparidae) می باشد که طبق تحقیقات انجام شده دارای پیسیدین می باشد که از گونه های پرورشی و تجاری در خلیج فارس است. در تحقیق حاضر ژن پیسیدین این گونه انتخاب شد و کلونینگ cDNA آن با استفاده از وکتور pTZ57R/T در باکتری *E. coli* سویه DH5α انجام گرفت. توالی نوکلئوتیدی، آمینواسیدی، پپتید سیگنال، پپتید بالغ ژن پیسیدین این گونه بررسی شد. در این تحقیق، مقایسه توالی نوکلئوتیدی این گونه با سایر ماهیان انجام شد، توالی cDNA کد کننده پیسیدین ماهی شانک سرطلایی در قطعه تکثیر شده ۳۱۰ bp بوده که با پیسیدین ۵ گونه *Morone chrysops* شباهت بالایی (۹۸٪/۱۵) دارد. در تحقیق حاضر، ژن پیسیدین گونه شانک سرطلایی از نظر ساختار ژن و پروتئین مشابه با *Morone chrysops* ثبت شده در بانک ژنی است [۲۵]. ژن پیسیدین ماهی شانک سرطلایی ORF (Open Reading Frame) نسبتا کوتاهی دارد که دارای ۱۸۳ باز است که با کدون پایان TGA خاتمه می یابد. توالی پروتئینی پری پروپیسیدین ماهی شانک سرطلایی به طور کلی دارای ۶۰ آمینواسید است که ۲۲ آمینواسید پپتید سیگنال، ۲۲ آمینواسید پپتید بالغ و ۱۶ آمینواسید مربوط به دنباله کربوکسی ترمینال است. باتوجه به مطالعات Salger و همکاران در سال ۲۰۱۶ پیسیدین ها در سه کلاس دسته

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.12.4]

بندی می شوند که کلاس ۱ آن دارای ۲۲ آمینواسید در پپتید بالغ است که طبق این مطالعه پیسیدین گونه *Sparus aurata* جزء پیسیدین کلاس ۱ محسوب می شود [۲۵]. بلاست توالی سیگنال پپتید نشان می دهد که کاملا مشابه با Dicentracin-like همین گونه ثبت شده در بانک ژن است [۲۶]. کلاس ۱ پیسیدین طیف گسترده ای از فعالیت علیه باکتری ها و تک یاخته های سیلیات دارد [۲۵]. از آن جایی که پپتید بالغ پیسیدین ماهی شانک سر طلایی در این مطالعه توالی پروتئینی آن، تفاوت های آمینواسیدی با سایر پیسیدین های کلاس ۱ دارد، این پپتید احتمالا در کارایی ضد میکروبی نیز تفاوت هایی داشته باشد. الگوی پپتید بالغ پیسیدین ماهی شانک سر طلایی به صورت X-R-X است که دو عدد آمینواسید سیستئین در زنجیره آمینواسیدی خود دارد که تشکیل پیوند دی سولفیدی می دهد و نقش مهمی در تاخوردگی (folding) و فعالیت بیولوژیک پپتید دارد [۲۷]. هم ردیف سازی چندگانه (Maltiple alignment) پپتید پیسیدین ماهی شانک سر طلایی با سایر ماهیان نشان داد که پپتید پیسیدین ماهیان در طی تکامل آن ها نسبتا حفاظت شده می باشد به ویژه پپتید سیگنال بسیار محافظت شده است. اما موتیف های مشاهده شده در پپتید بالغ می تواند نشان از کارایی های متفاوت و یا احتمالا قوی تر پیسیدین این گونه داشته باشد.

نتیجه گیری

کلون ژن پیسیدین در pTZ57R/T روشی مناسب برای حفظ این ژن می باشد و شناسایی ژن و پروتئین پیسیدین گونه *Sparus aurata* می تواند در تولید پیسیدین در تحقیقات پایه به کار رود.

تشکر و قدردانی: نگارندگان این تحقیق از دکتر امیری مقدم و شرکت نیکسا کمال تقدیر و تشکر را دارند.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: در مطالعه حاضر هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی: از محل کمک هزینه انجام پایان‌نامه نویسنده اول مقاله، نجمه برنجکار تامین شده است.

منابع

1- Mayer AM, Lehmann VK. Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, anthelmintic, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities; with actions on the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems; and other miscellaneous mechanisms of action. Pharmacologist. 2000;42:62-9.

2- Saunders FR, Wallace HM. On the natural chemoprevention of cancer. Plant Physiology and Biochemistry. 2010 Jul 1;48(7):621-6.

3- Brown KL, Hancock RE. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. Current Opinion in Immunology. 2006 Feb 1;18(1):24-30.

4- Douglas SE. Antimicrobial peptides and their potential as therapeutants in aquaculture. Aquaculture Biotechnology. 2011 Oct 12:105-20.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.12.4]

5- Pinzón-Arango PA, Nagarajan R, Camesano TA. Interactions of antimicrobial peptide chrysophsin-3 with *Bacillus anthracis* in sporulated, germinated, and vegetative states. The Journal of Physical Chemistry B. 2013 May 30;117(21):6364-72.
6- Niu SF, Jin Y, Xu X, Qiao Y, Wu Y, Mao Y, Su YQ, Wang J. Characterization of a novel piscidin-like antimicrobial peptide from *Pseudosciaena crocea* and its immune response to *Cryptocaryon irritans*. Fish & shellfish Immunology. 2013 Aug 1;35(2):513-24.
7- Cho J, Lee DG. Oxidative stress by antimicrobial peptide pleurocidin triggers apoptosis in *Candida albicans*. Biochimie. 2011 Oct 1;93(10):1873-9.
8- Jung HJ, Park Y, Sung WS, Suh BK, Lee J, Hahm KS, Lee DG. Fungicidal effect of pleurocidin by membrane-active mechanism and design of enantiomeric analogue for proteolytic resistance. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2007 Jun 1;1768(6):1400-5.
9- Pan CY, Chen JY, Lin TL, Lin CH. In vitro activities of three synthetic peptides derived from epinecidin-1 and an anti-lipopolysaccharide factor against *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans*, and *Trichomonas vaginalis*. Peptides. 2009 Jun 1;30(6):1058-68.
10- Colorni A, Ullal A, Heinisch G, Noga EJ. Activity of the antimicrobial polypeptide piscidin 2 against fish ectoparasites. Journal of Fish Diseases. 2008 Jun;31(6):423-32.
11- Zahran E, Noga EJ. Evidence for synergism of the antimicrobial peptide piscidin 2 with antiparasitic and antioomycete drugs. Journal of Fish Diseases. 2010 Dec;33(12):995-1003.
12- Wang YD, Kung CW, Chen JY. Antiviral activity by fish antimicrobial peptides of epinecidin-1 and hepcidin 1–5 against nervous necrosis virus in medaka. Peptides. 2010 Jun 1;31(6):1026-33.
13- Chinchar VG, Bryan L, Silphadaung U, Noga E, Wade D, Rollins-Smith L. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. Virology. 2004 Jun 1;323(2):268-75.
14- Shirdel I, Kalbassi MR, Hosseinkhani S, Paknejad H, Wink M. Cloning, characterization and tissue-specific expression of the antimicrobial peptide hepcidin from caspian trout (*Salmo caspius*) and the antibacterial activity of the synthetic peptide. Fish & Shellfish Immunology. 2019 Jul 1;90:288-96.
15- Li ZP, Chen DW, Pan YQ, Deng L. Two isoforms of piscidin from Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*: Expression and functional characterization. Fish & Shellfish Immunology. 2016 Oct 1;57:222-35.
16- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. 2007 Aug 1;24(8):1596-9.
17- Siepel A, Haussler D. Combining phylogenetic and hidden Markov models in biosequence analysis. Journal of Computational Biology. 2004 Mar 1;11(2-3):413-28.
18- Tincu JA, Taylor SW. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004 Oct 1;48(10):3645-54.
19- Patrzykat A, Douglas SE. Gone gene fishing: how to catch novel marine antimicrobials. Trends in Biotechnology. 2003 Aug 1;21(8):362-9.
20- Smith VJ, Desbois AP, Dyrynda EA. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. Marine Drugs. 2010 Apr;8(4):1213-62.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.12.4]

21- Otero González A, Francisco AD, Gayoso P, García F. Prevalencia de la insuficiencia renal crónica en España: Resultados del estudio EPIRCE. Nefrología (Madrid). 2010;30(1):78-86.
22- Sperstad SV, Haug T, Blencke HM, Styrvold OB, Li C, Stensvåg K. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. Biotechnology Advances. 2011 Sep 1;29(5):519-30.
23- Sathyan N, Philip R. *Molecular and Functional Characterization of Histone Derived Antimicrobial Peptides from Marine Organisms* (Doctoral dissertation, Cochin University of Science and Technology).
24- Otero-Gonzáiez AJ, Magalhaes BS, Garcia-Villarino M, López-Abarrategui C, Sousa DA, Dias SC, Franco OL. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. The FASEB Journal. 2010 May;24(5):1320-34.
25- Salger SA, Cassady KR, Reading BJ, Noga EJ. A diverse family of host-defense peptides (piscidins) exhibit specialized anti-bacterial and anti-protozoal activities in fishes. PLoS One. 2016 Aug 23;11(8):e0159423
26- Dray L, Neuhof M, Diamant A, Huchon D. The complete mitochondrial genome of the gilthead seabream *Sparus aurata* L.(Sparidae). Mitochondrial DNA Part A. 2016 Jan 2;27(1):781-2.
27- Gong LC, Wang H, Deng L. Molecular characterization, phylogeny and expression of a hepcidin gene in the blotched snakehead *Channa maculata*. Developmental & Comparative Immunology. 2014 May 1;44(1):1-1.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.12.4]

Journal of Fisheries Science and Technology
Special issue on Persian Gulf ecosystem
Volume10, Issue 2, Spring 2021
Pages: 203 - 212

Identification, cloning and sequencing of piscidin gene from Gilthead seabream (*Sparus aurata*) in *Escherichia coli*

Najme Berenjkar[1], Mohhamadreza Kalbassi [1*], Saman Hoseinkhani[2]

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

2- Department of Biochemistry, Biology Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

A B S T R A C T

Piscidin has a wide range in killing microorganisms including bacteria, fungi, viruses, parasites and has strong anti-tumor activity and plays a role in increasing innate immunity and also does not provide resistance against bacteria; Therefore, it is of great importance in aquaculture. In this study, piscidin gene of *Sparus aurata* in vector pTZ57R/T was cloned. In this research, ligation product was transferred to component cell of *E. coli* DH5α strain. Plasmid extraction was performed from single colonies observed in ampicillin plate. Confirmation of the accuracy of single colonies grown in this research was performed by direct PCR and sequencing. The amplified cDNA fragment of the gilthead seabream piscidin gene consists of 310 nucleotides and 57 amino acids. The results of this research show that piscidin gene has been successfully cloned in pTZ57R /T vector. Comparison of nucleotide sequence of piscidin gene in this study showed high similarity with piscidin 5 of *Morone chrysops*. The comparison of the amino acid sequence of signal peptide piscidin is quite similar to Dicentracin-like of that species registered in the genebank, and mature peptide piscidin sequence is similar in only three amino acids to Pleorocidin-like of *Poesila farmosa* and Dicentracin-like of *Sphaeramia orbicularis*. This study could be a step towards further studies of piscidin peptide.

KEYWORDS: Piscidin peptide, Gene cloning, Gilthead seabream (*Sparus aurata*), pTZ57R/T vector

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 20 January 2021

Accepted: 5 May 2021

ePublished: 31 May 2021

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.12.4]

* Corresponding Author:
Email address: kalbassi_m@modares.ac.ir
Tel: +98 (21) 82883287
© Published by Tarbiat Modares University
eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513