

مقاله پژوهشی

همسانه‌سازی، بیان، تخلیص و بررسی فعالیت اندولیزین فاژ KP27 کلبسیلا پنومونیه در سیستم بیانی (+) *pET28a*

زینب زارع، مهدی ایمانی*، صفیه آقازاده

بخش بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

پذیرش: ۱۳ آذر ۱۴۰۳

دریافت: ۲۱ آبان ۱۴۰۳

چکیده

زمینه و هدف: اندولیزین فاژ KP27 پروتئینی با جرم مولکولی ۱۴/۷ کیلو دالتون است که دارای فعالیت اندوپیتیدازی علیه دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد. به دلیل وجود تحقیقات محدود روی اندولیزین KP27 و همچنین برتری آن در برابر شرایط محیطی سخت مثل دما و pH هدف از این مطالعه تولید نوترکیب و بررسی فعالیت ضدباکتریایی آن علیه دو باکتری گرم منفی و مثبت اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس می‌باشد.

روش‌ها: ژن اندولیزین KP27 بین دو آنزیم محدودکننده *XhoI* و *NcoI* در پلاسمید *pET-28a(+)* همسانه‌سازی شد. تولید در باکتری *E. coli BL21* (*DE3*) و تخلیص توسط کروماتوگرافی Ni^{2+} -NTA سفاروز انجام شد. جهت بررسی فعالیت ضدباکتری اندولیزین از تست‌های فعالیت باکتری‌کشی، MIC، MBC و فعالیت آنزیمی از تخریب دیواره سلولی استفاده شد. آنالیز آماری و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار گراف پد پریسم انجام شد.

یافته‌ها: اندولیزین KP27 با موفقیت همسانه‌سازی و با راندمان بالا به مقدار ۲۸/۵ میلی‌گرم/لیتر محیط کشت تولید شد. میزان کشندگی آن علیه باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس در غلظت‌های بالاتر از ۴ ماکروگرم/لیتر بیشتر از ۵۰ درصد بود. میزان MIC و MBC آن به ترتیب ۱۶ و ۶۴ ماکروگرم/لیتر برای اشرشیاکلی و ۸ و ۳۲ ماکروگرم/لیتر برای استافیلوکوک اورئوس به دست آمد. بررسی فعالیت تخریب دیواره سلولی اندولیزین حاکی از کاهش ۲۰ درصد کدورت محلول پس از نیم ساعت مجاورت با اندولیزین بود.

نتیجه‌گیری: باتوجه به مقدار بیان و تولید بالای اندولیزین KP27 و همچنین فعالیت بالای آن در برابر دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت مورد مطالعه، می‌توان آن را گزینه مناسبی برای پژوهش‌های کاربردی و متعاقب آن صنعتی شدن به جای آنتی‌بیوتیک‌ها پیشنهاد داد.

واژه‌های کلیدی: اندولیزین KP27، باکتریوفاژ، پروتئین نوترکیب، دیواره سلولی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

امروزه یکی از تهدیدهای رو به رشد جهانی در حوزه سلامت و امنیت غذایی ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌باشد به‌گونه‌ای که سازمان بهداشت جهانی هشدارهای جدی در زمینه آثار منفی اجتماعی، اقتصادی و سیاسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی صادر کرده است [۱]. به همین خاطر یافتن جایگزین‌های مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. مدت‌ها است از باکتریوفاژها جهت از بین بردن عفونت‌های

باکتریایی در بخش‌های مختلف دنیا از جمله اروپای شرقی استفاده می‌شود. باوجود این به دلایلی نگرانی‌های جدی در استفاده از آن‌ها وجود دارد که از جمله این نگرانی‌های می‌توان به پاسخ‌دهی سیستم ایمنی، انتقال ژن و ظهور و گسترش باکتری‌های مقاوم به فاژ اشاره کرد. علاوه بر این محققان مشاهده کردند که لیزات فاژها نیز قادر به لیز و از بین بردن باکتری‌ها هستند بنابراین در جستجوی عامل لیزکننده به کشف و شناسایی پروتئین‌هایی به نام اندولیزین‌ها دست یافتند که امروزه اندولیزین‌ها یک جایگزین و یک حوزه مطالعاتی مورد

در سال‌های اخیر اندولیزین‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج به دلیل داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد توجهات ویژه‌ای جلب کرده‌اند. از جمله این ویژگی‌ها می‌توان به اختصاصی و انتخابی بودن، مکانیسم اثر، قابلیت دستکاری و مهندسی شدن و نیز عدم ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشاره کرد. اندولیزین‌ها دارای کاربردهایی در زمینه درمان عفونت‌های باکتریایی بیمارستانی، تجزیه بیوفیلم باکتری‌ها، مقابله با عفونت‌هایی با منشا غذایی و حتی در تشخیص باکتری‌های پاتوژن مواد غذایی می‌باشند [۶]. اندولیزین‌های درمانی بیشتر روی باکتری‌های گرم‌مثبت اثربخشی دارند زیرا زمانی که اندولیزین‌ها به صورت آگزوژن به کار گرفته می‌شوند به دلیل عدم وجود غشاء خارجی در این باکتری‌ها برای دسترسی و رسیدن به پپتیدوگلیکان نیاز به پروتئین‌های هولین نمی‌باشد. با وجود این، در باکتری‌های گرم‌منفی به دلیل وجود غشاء خارجی استفاده از اندولیزین‌ها با محدودیت مواجه شده است. به منظور غلبه بر این محدودیت و عبور از غشاء خارجی، محققان استراتژی‌های خلاقانه‌ای به کار می‌برند که از جمله آن‌ها می‌توان به استفاده از نفوذپذیرکننده‌های غشایی مثل EDTA، فشار هیدرواستاتیکی بالا^۴، و مهندسی آن‌ها مثل ساخت اندولیزین‌های کایمر یا افزودن قطعه پپتیدی اشاره کرد [۷].

اندولیزین ویروس KP27 پروتئینی با ۱۳۱ اسیدآمین و جرم مولکولی ۱۴/۷ kDa است که دارای فعالیت آنزیمی اندوپپتیدازی علیه دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد. این آنزیم پیوند پپتیدی بین دو اسیدآمین موجود در عرض دیواره سلولی یعنی L-آلانین و D-گلوتامات را هیدرولیز می‌کند. ژن کدکننده این اندولیزین از فاژ KP27 آلوده‌کننده باکتری کلبسیلا پنومونیه استخراج و در سال ۲۰۱۷ به صورت نو ترکیب پروتئین آن تولید شد. از میان فاژهای آلوده‌کننده باکتری‌های گرم‌منفی، فاژهای KP15 و KP27 پیشرفته‌ترین سیستم لیتیک را دارا می‌باشند. این سیستم از چهار پروتئین با نام‌های هولین، آنتی‌هولین، اسپانین و اندولیزین تشکیل شده است و تشابه بسیار بالای بیش از ۹۹ درصد بین پروتئین‌های دو فاژ وجود دارد. برای مثال در اندولیزین فاژ KP27 اسیدآمین گلوتامین جایگزین گلوتامات در اندولیزین KP15 شده است [۸]. یکی از معیارهای مهم در کاربرد پروتئین‌ها و آنزیم‌های

توجهی در زمینه کنترل باکتری‌ها شده است [۲]. به‌طور کلی اندولیزین‌ها آنزیم‌های هیدرولیز کننده لایه‌ی پپتیدوگلیکان دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها هستند که توسط فاژها در مرحله آخر چرخه لیتیک به همراه پروتئین‌هایی به نام هولین‌ها تولید می‌شوند. از آنجایی که اندولیزین‌ها در داخل سلول باکتری‌های آلوده‌شده با فاژ تولید می‌شوند برای فعالیت خود نیاز به خروج از غشا داخلی و دسترسی به لایه پپتیدوگلیکان دارند که این کار توسط هولین‌ها انجام می‌شود. تجزیه لایه پپتیدوگلیکان توسط اندولیزین‌ها باعث به هم خوردن تعادل اسمزی و در نتیجه لیز و مرگ باکتری می‌شود. ویژگی هیدرولازی لایه پپتیدوگلیکان و همچنین اثربخشی ضدباکتریایی اندولیزین‌ها در زمانی که به صورت آگزوژن استفاده می‌شود، باعث شده است که اندولیزین‌ها به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های رایج معرفی شوند و به دلیل خاصیت آنزیمی به آن‌ها آنزیم‌های لیزکننده یا آنزیم‌بیوتیک^۱ نیز گفته می‌شود [۳]. دیواره سلولی باکتری‌ها ساختار فوق مولکولی است که باکتری را از تنش‌های اسمزی محیطی محافظت می‌کند. از نظر بیوشیمیایی بخش اصلی و مهم دیواره سلولی پپتیدوگلیکان می‌باشد هتروپلیمری است که از تکرار واحدهای دی‌ساکارید N-استیل گلوکزآمین (NAG) و N-استیل مورامیک اسید (NAM) ساخته شده است. N-استیل مورامیک اسیدهای دو رشته پلیمری روبروی هم توسط پل‌های عرضی پپتیدی مستحکم شده است. براساس محل شکستن و نوع پیوند موجود در ساختار دیواره سلولی، اندولیزین‌ها دارای چهار نوع فعالیت آنزیمی می‌باشند: ۱- N-استیل مورامیداز (شبه لیزوزومی) ۲- N-استیل گلوکزآمینیداز ۳- N-استیل موراموئیل-آلانین آمیداز و ۴- آلانویئیل-گلوتامات اندوپپتیداز [۴]. از نظر ساختاری اندولیزین‌ها پروتئین‌هایی هستند با وزن مولکولی بزرگتر از ۲۵ کیلوالتون که از دو دُمین فعال آنزیمی^۲ (EAD) و دُمین متصل شونده^۳ (CBD) به دیواره سلولی تشکیل شده‌اند. علاوه بر این در اندولیزین‌های مستخرج از فاژهای آلوده‌کننده باکتری‌های گرم مثبت مشاهده شده است که بیشتر از یک CBD دارند [۵].

¹ Enzybiotics

² Enzymatically active domain

³ Cell wall binding domain

⁴ High hydrostatic pressure

شد [۱۰]. به طور خلاصه، ابتدا پلاسمید pGEM-B1 که ژن سنتتیک KP27 در آن قرار داشت توسط دو آنزیم محدودکننده *XhoI* و *NcoI* برش داده شد. سپس به منظور استخراج قطعه KP27 محصول هضم شده روی ژل آگاروز برده شد و استخراج شد. در مرحله بعد، واکنش لیگاسیون با مخلوط کردن نسبت ۵ به ۱ ژن KP27 و پلاسمید *pET28a(+)* هضم شده در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد به مدت دو ساعت انجام شد. سرانجام پلاسمید ساخته شده توسط روش شوک حرارتی به باکتری مستعد *E. coli DH5a* ترانسفورم و روی پلیت LB آگار دارای ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین برده شد. به منظور تایید همسانه سازی ژن KP27 در جایگاه مورد نظر بین دو آنزیم محدودکننده ذکر شده پس از استخراج پلاسمید، ابتدا واکنش PCR توسط پرایمرهای رفت با توالی 5'TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAA GGAGATATACCATGGG3' و پرایمر برگشت با توالی 5'GCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA GAT3' انجام شد و پس از تایید حضور ژن در پلاسمید *pET28a(+)* برای تایید نهایی برای تعیین توالی ارسال شد.

بیان و تخلیص

پس از تایید صحت همسانه سازی به منظور بیان و تخلیص اندولیزین KP27، ابتدا ۲ میلی لیتر از کشت شبانه باکتری BL21 حاوی پلاسمید حامل ژن KP27 به ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل داده شد. بعد از رسیدن OD محیط کشت به کدروت ۰/۶ تا ۰/۸، از لاکتوز با غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار جهت القاء بیان اندولیزین استفاده شد [۱۱] و باکتری‌ها در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه و دمای ۲۲ درجه به صورت شبانه کشت داده شدند. روز بعد محیط کشت حاوی باکتری‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و پلت باکتری‌ها جمع‌آوری شد. به منظور دسترسی به محتوی سیتوزولی، باکتری‌های دارای پروتئین اندولیزین در بافر لیز ۵۰ میلی لیتر مونی سدیم فسفات، ۳۰۰ میلی لیتر سدیم کلراید و ۱۰ میلی لیتر ایمیدازول (pH برابر ۸) حل شدند و توسط سونیکاسیون روی یخ (شامل ۱۰ مرحله ۱۵ ثانیه‌ای با فواصل زمانی ۱۵ ثانیه با شدت ۷۰ درصد) جداری باکتری‌ها

تجاری پایداری آن‌ها طی فرایند تولید، نگهداری و استفاده از آن‌ها می‌باشد که از جمله آن‌ها می‌توان به پایداری دمایی، پایداری در برابر pH و فعالیت کاتالیتیکی اشاره کرد [۹]. با بررسی‌هایی که روی اندولیزین‌های مختلف انجام شد مشخص شد که در مقایسه با سایر اندولیزین‌ها تحقیقات محدودی روی اندولیزین KP27 انجام شده است و به علاوه این اندولیزین در برابر شرایط محیطی مثل دما و pH برتری دارد. بنابراین هدف از این تحقیق تولید نوترکیب و بررسی فعالیت ضدباکتریایی آن علیه دو باکتری گرم منفی و مثبت اثرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

آنزیم‌های *XhoI*، *NcoI* و T4 DNA لیگاز از شرکت NEB، نشانگر DNA، آگاروز، کیت استخراج پلاسمید و استخراج از ژل از شرکت سیناکلون، ستون کروماتوگرافی Ni²⁺-NTA از شرکت نوآوران زیست گستر ارگ تبریز، کیت‌های ژل الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات-پلی آکریل-آمید^۵ و تعیین غلظت پروتئین از شرکت آرسام فرازیست ارومیه و سایر مواد شیمیایی استفاده شده از شرکت مرک تهیه شدند. پلاسمید *pET-28a(+)* و باکتری‌های *E. coli DH5a* و *E. coli BL21 (DE3) pLysS* از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. توالی اسیدآمینه‌ای اندولیزین KP27 با کد دسترسی A0A0K1LQK3 از uniprot و توالی ژن کد کننده آن تحت شماره دسترسی YP_007348788 از NCBI استخراج و سنتز آن سفارش داده شد. باکتری‌های *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* اهدایی از طرف دکتر نیما شیخ بیگلو استاد میکروبیولوژی گروه زیست شناسی دانشگاه ارومیه بودند.

مواد و روش‌ها

ساخت و تایید وکتور بیانی

برای ساخت وکتور بیانی *pET28a(+)-KP27* همانند مراحل و دستورالعمل‌های ذکر شده در پژوهش‌های قبلی عمل

⁵ SDS-PAGE

۳۷ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری شد. سپس باکتری های کشت داده شده در محیط کشت مایع به نسبت ۱ به ۳۰ رقیق شدند. جهت انجام تست سنجش فعالیت کشندگی، ابتدا در تمام چاهک های تست مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS^۸ ریخته شد. برای تهیه رقت های اندولیزین KP27 ابتدا مقدار ۸ میکرومولار/ میلی لیتر از آن در چاهک اول ریخته شد و برای تهیه سایر رقت ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه شد تا رقت ۴ میکرومولار/ میلی لیتر از اندولیزین به دست آید و دیگر رقت ها نیز به همین ترتیب تهیه شد. جهت منظور حذف اثر احتمالی بافر اندولیزین، در یک چاهک به جای پروتئین از حداکثر غلظت بافر PBS به عنوان کنترل منفی استفاده شد و یک چاهک نیز دارای فقط محیط کشت و باکتری ها به عنوان کنترل مثبت تهیه گردید. در نهایت سوسپانسیون میکروبی از کشت دو ساعته باکتری به نسبت ۱ به ۳۰ رقیق شد، سپس به منظور افزایش نفوذپذیری غشای خارجی باکتری گرم منفی محلول ۰/۵ میلی مولار EDTA در حجم نهایی در تمامی چاهک های تست تلقیح گردید. در نهایت، درب پلیت بسته شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. جهت تشخیص اثر اندولیزین، پس از گذشت ۲۴ ساعت، OD600 چاهک ها توسط دستگاه الیزا ریدر، ثبت شد و توسط فرمول $[(OD_{control}-OD_{test})/OD_{control}] \times 100$ محاسبه و درصد کشندگی بدست آمد [۱۳].

تعیین MIC^۹

برای انجام این تست در میکروپلیت ۹۶ خانه ای استریل، رقت های لازم از باکتری و اندولیزین KP27 در محیط MHB تهیه شد و سپس از هر رقت اندولیزین به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به اضافه ی ۹۰ میکرولیتر محیط MHB و ۱۰ میکرولیتر باکتری در فاز لگاریتمی با غلظت (CFU/ml) $10^6 \times 1$ به هر چاهک میکروپلیت اضافه شد و با یکدیگر به آرامی ترکیب شد. برای چاهک کنترل، باکتری مورد نظر با محیط MHB ترکیب شد و چاهک بلانک تنها حاوی محیط MHB بود. میکروپلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور قرار می گیرد. برای نفوذپذیرسازی

شکسته شد. نمونه ی سونیکه شده، روی یخ، به میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ نمونه ها، مایع رویی تمام میکروتیوب ها برای انتقال روی ستون کروماتوگرافی تمایلی در یک فالكون جمع آوری شد. جهت تخلیص تک مرحله ای اندولیزین KP27 از ستون Ni²⁺-NTA استفاده شد. قبل از بارگذاری نمونه، برای شستشو و به تعادل رساندن ستون آن با ۵ برابر حجم ستون توسط آب مقطر و بافر لیز شسته شد. سپس سوپ پروتئینی روی ستون بارگذاری شد. در مرحله بعد جهت شستن و حذف مواد و پروتئین هایی که به ستون متصل نشده است، بافر شست و شو ۵۰ میلی لیتر مونو سدیم فسفات، ۳۰۰ میلی لیتر سدیم کلراید و ۲۵ میلی لیتر ایمیدازول (pH برابر ۸) از ستون عبور داده شد. در مرحله آخر برای جدا کردن اندولیزین KP27 متصل شده به ستون از بافر ۵۰ میلی لیتر مونو سدیم فسفات، ۳۰۰ میلی لیتر سدیم کلراید و ۲۵۰ میلی لیتر ایمیدازول استفاده شد. اندولیزین خروجی از ستون درون میکروتیوب های ۲ میلی لیتری در حجم های ۱/۵ میلی لیتری جمع آوری شد و قبل از بررسی فعالیت ضدباکتریایی، نمک ها و ایمیدازول و سایر مولکول های کوچک با کیسه دیالیز دارای منافذ ۱۲۰۰Da (سیگما -D2272) حذف شدند.

تعیین غلظت اندولیزین و الکتروفورز

برای تعیین غلظت اندولیزین KP27 و بررسی خلوص آن به ترتیب از روش برادفورد و SDS-PAGE با درصد ژل توده ای ۵٪ و ژل جداکننده ی ۱۵٪ درصد استفاده شد. در روش برادفورد از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد [۱۲].

سنجش فعالیت ضدباکتریایی اندولیزین

یک کلونی از سویه های استاندارد کشت داده شده باکتری های اثرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس از محیط کشت جامد آگار برداشته و به لوله های حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت مایع برات اضافه شد و به مدت یک شب در دمای

⁸ Phosphate-buffered saline

⁹ Minimal inhibitory concentration

⁶ Stacking Gel

⁷ Resolving Gel

آنالیز آماری

آنالیز آماری و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism 9 انجام شد. جهت مقایسه داده‌ها از آزمون آماری t-test و آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شد. ارزش p کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

استخراج توالی اسیدآمینه‌ای اندولیزین KP27 و همسانه‌سازی

توالی اسیدآمینه‌ای و ژنی اندولیزین KP27 از بانک اطلاعاتی پروتئین به نام Uniprot و بانک ژن استخراج شد و توالی ژنی آن به صورت تجاری سنتز گردید. توالی و مکان همسانه‌سازی اندولیزین در شکل ۱ نمایش داده شده است. قبل از ارسال نمونه‌ها به تعیین توالی، ورود ژن اندولیزین به پلاسمید $pET28a(+)$ با استفاده از PCR تایید شد (شکل ۲) و سپس تایید نهایی همسانه‌سازی توسط تعیین توالی انجام شد (داده نشان داده نشده است).

بیان و تخلیص اندولیزین

پس از القا و بیان اندولیزین توسط لاکتوز، جهت تخلیص از کروماتوگرافی تمایلی نیکل سفاروز استفاده شد. پس از جمع‌آوری و تخلیص فراکشن‌های پروتئینی، غلظت آن‌ها توسط روش برادفورد تعیین شد و نتایج حاکی از این بود غلظت پروتئینی فراکشن‌های ۲، ۳ و ۴ به ترتیب ۱/۵، ۲/۴۸ و ۱/۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. به‌منظور تایید اینکه فراکشن‌های فوق دارای اندولیزین هستند از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد که در آن باند پروتئینی مربوط به فراکشن ۳ نمایش داده شده است (شکل ۳). همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، تحرک الکتروفورتیکی اندولیزین تخلیص شده در حدود ۱۵ کیلودالتون می‌باشد. از آنجایی که حجم محیط کشت مورد استفاده برای القا و تولید اندولیزین ۲۰۰ ml بود مقدار پروتئین تولید شده در این سیستم در مجموع حدود ۵/۷ میلی‌گرم در ۲۰۰ میلی‌لیتر یا ۲۸/۵ میلی‌گرم بر لیتر بود.

غشای باکتری گرم منفی *E. coli* از EDTA با غلظت ۰/۵ میلی مولار استفاده شد.

تعیین MBC^{۱۰}

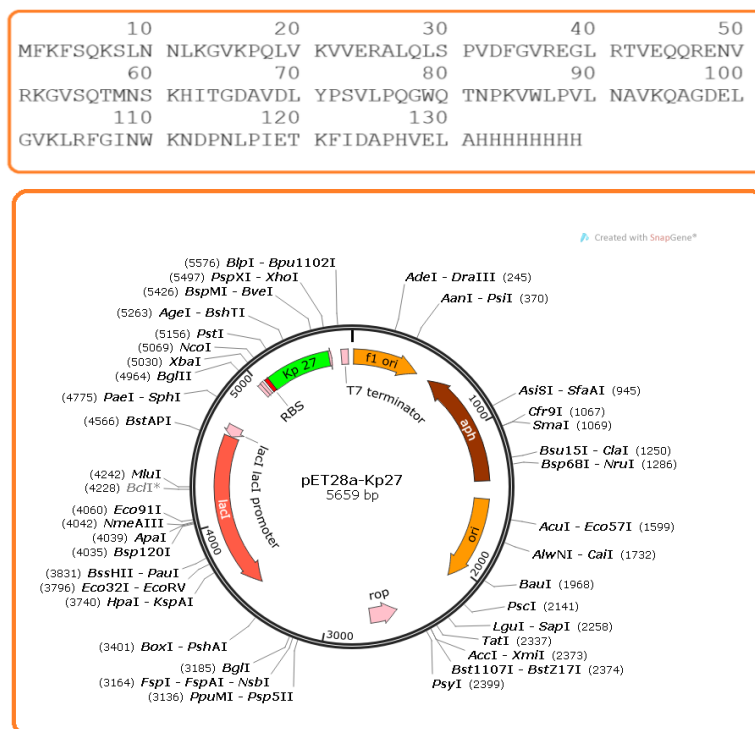
MBC کمترین غلظت عامل ضدباکتریایی است که برای از بین بردن تمام جمعیت باکتریایی نسبت به گروه کنترل عمل می‌کند. برای تعیین MBC، ابتدا حداقل غلظت مهاری (MIC) به‌صورت بصری تعیین شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از مخلوط هر چاهک در غلظت‌های بالاتر از MIC بر روی صفحات آگار کشت شدند. MBC به‌عنوان کمترین غلظتی از اندولیزین که در آن هیچ کلونی باکتری مشاهده نشد تعیین گردید.

تخلیص دیواره‌ی پتیدوگلیکان و ارزیابی فعالیت اندولیزین KP27

پتیدوگلیکان خالص‌شده به‌عنوان سوبسترا برای ارزیابی فعالیت آنزیمی اندولیزین KP27 استفاده شد. به‌همین دلیل برای ارزیابی اثر اندولیزین KP27 بر تخریب دیواره سلولی استافیلوکوکوس اورئوس، کدورت سوسپانسیون باکتریایی اندازه‌گیری شد. سویه استافیلوکوکوس اورئوس در ۵۰۰ میلی‌لیتر (MHB)^{۱۱} در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد تا به میانه‌ی فاز لگاریتمی برسد، و سپس سه بار با PBS شسته شد. پلت باکتری با ۱۴ میلی‌لیتر SDS ۴ درصد ترکیب و به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده شد. دیواره سلولی با سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ فورس جی به مدت ۱۵ دقیقه جدا شد، چهار بار با آب مقطر شسته و در ۱۰ میلی‌لیتر بافر تریس-HCl ۰/۱ مولار با pH برابر ۶/۸ دارای ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنزیم تریپسین و کلرید کلسیم ۲۰ میلی‌مولار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد. نمونه سرانجام پس از چهار بار شستشو با آب مقطر در ۲ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد حل شده و به مدت ۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، و در نهایت دیواره‌ی سلولی پس از چهار بار شستشوی دیگر با آب مقطر در PBS حل شد و با اندولیزین KP27 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد [۱۴].

¹⁰ Minimum bactericidal concentration

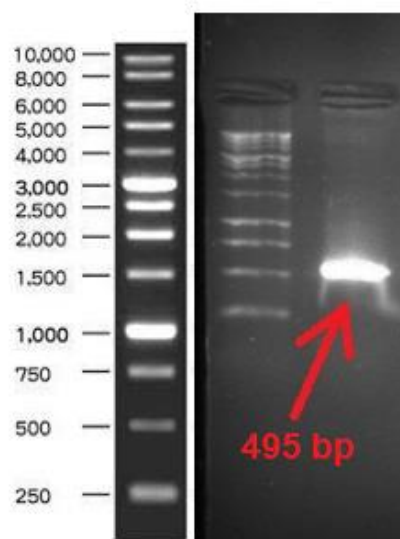
¹¹ Mueller Hinton Broth



شکل ۱ - توالی اسید آمینه‌های و نقشه مولکولی پلاسمید دارای ژن اندولیزین KP27 با نام *pET28a(+)-KP27*. در شکل بالا توالی اسید آمینه‌های اندولیزین کلون شده که در آن هشت هیستیدین در موقعیت انتهایی کربوکسیل پروتئین به منظور تخلیص تک مرحله‌ای با کروماتوگرافی تمایل به ۱۳۱ اسید آمینه آن افزوده شده است، نمایش داده شده است. در شکل پایین موقعیت ژن KP27 با رنگ سبز مشخص شده است. همسانه‌سازی ژن KP27 بین دو آنزیم محدود کننده *NcoI* و *XhoI* انجام شده است. نقشه توسط نرم‌افزار SnapGene ایجاد شده است.

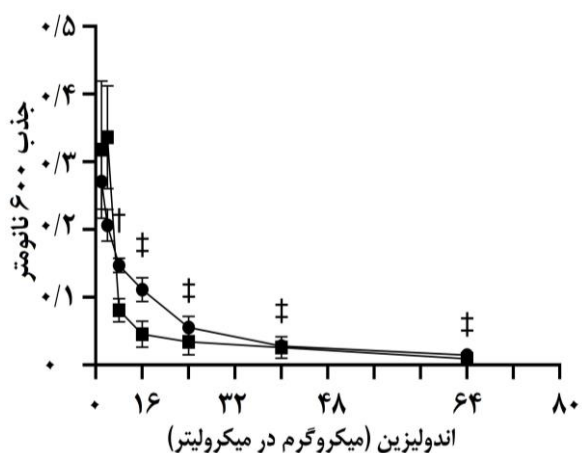
ارزیابی فعالیت باکتری کشی اندولیزین KP27

پس از تخلیص اندولیزین به منظور تایید اینکه اندولیزین تخلیص شده در طی فرایند تخلیص فعالیت خود را حفظ کرده است یا نه فعالیت باکتری کشی و تخریب دیواره سلولی آن بررسی شد. جهت بررسی فعالیت باکتری کشی از دو باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس استفاده شد. بدین منظور غلظت‌های ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، و ۰/۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. نتایج توسط برنامه‌ی GraphPad Prism آنالیز و رسم شد. نتایج نشان می‌دهد که بالاترین غلظت اندولیزین (۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) روی دو باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس بیشترین اثر کشندگی یعنی به ترتیب ۹۲ و ۱۰۰ درصد را داشته است. اما در غلظت‌های پایین تر از ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر بیشترین تاثیر کشندگی روی باکتری اشرشیاکلی بوده است به طوری که در غلظت ۱ میکروگرم/میلی‌لیتر بیشتر از ۵۰ درصد کشندگی روی اشرشیاکلی داشته در حالی که روی استافیلوکوک اورئوس ۲۵ درصد موثر بوده است (نمودار ۱).



شکل ۲ - الکتروفورز ژل آگاروز محصول PCR. به منظور تایید حضور ژن اندولیزین KP27 در پلاسمید *pET28a(+)* از پلاسمید ساخته شده به عنوان الگو برای واکنش PCR استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده طوری طراحی شدند که پرایمر رفت از بالا دست محل برش آنزیم *NcoI* و پرایمر برگشت از پایین دست محل برش آنزیم *XhoI* شروع به تکثیر ژن کنند. لکه مشخص شده تکثیر ژن اندولیزین به طول ۴۹۵ bp را نشان می‌دهد.

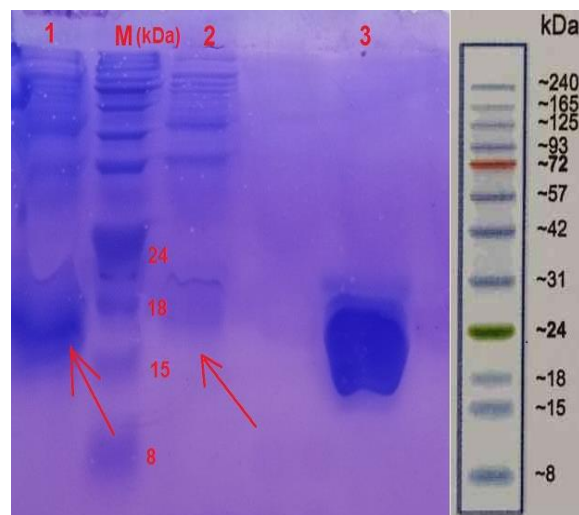
قابل مشاهده برای باکتری اشرشیاکلی ۱۶ میکروگرم/میلی لیتر و برای استافیلوکوک اورئوس ۸ میکروگرم/میلی لیتر بود. پس از مشخص شدن غلظت مهاری اندولیزین KP27 در مدت زمان یک شب انکوباسیون، از کمترین غلظت مهارکنندگی تا بیشترین غلظت و کشت آن‌ها روی صفحات پلیت آگار MBC تعیین شد. نتایج بدست آمده نشان داد که MBC برای باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس به ترتیب ۶۴ و ۳۲ میکروگرم/میلی لیتر بود.



نمودار ۲- جذب طول موج ۶۰۰ نانومتر دو باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس در غلظت‌های مختلف اندولیزین KP27. نمودار، مهار رشد دو باکتری را در غلظت‌های بالا نشان می‌دهد. تعیین MIC بر اساس روش کار گفته شده در روش کار به صورت بصری و مشاهده‌ای انجام شد. دایره‌ها و مربع‌های توپر به ترتیب نمودار مهار رشد باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس را نشان می‌دهد. †: اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0/01$ و ‡: اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0/001$ را با گروه کنترل نشان می‌دهد.

ارزیابی فعالیت تخریب دیواره سلولی^{۱۲} اندولیزین KP27

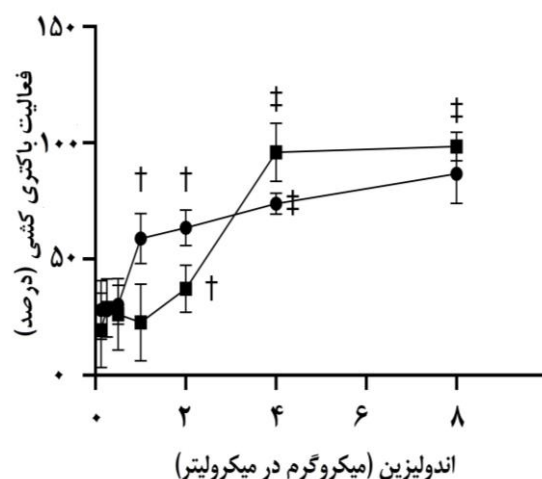
از آنجایی که فعالیت باکتری‌کشی اندولیزین‌ها بواسطه فعالیت آنزیمی آن‌ها روی لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد اثر آنزیمی اندولیزین تخلیص شده نیز مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پس از استخراج دیواره سلولی باکتری، محلول دیواره سلولی در معرض اندولیزین قرار گرفت و تغییرات کدورت آن را ارزیابی شد. نتایج بدست آمده نشان داد که در حضور اندولیزین KP27 کاهش معنی‌دار در حدود



شکل ۳- الکتروفورز اندولیزین. مسیر ۱، لیژات پروتئینی باکتری بعد از القا توسط لاکتوز، مسیر M: مارکر پروتئینی، مسیر ۲، لیژات پروتئینی باکتری قبل از القا توسط لاکتوز، مسیر ۳، اندولیزین خالص شده‌ی KP27 با وزن مولکولی حدود ۱۵ کیلوالتون.

MIC و MBC اندولیزین KP27

MIC، به کمترین عامل ضدباکتری که از رشد قابل مشاهده‌ی میکروارگانیسم‌ها بعد از کشت شبانه جلوگیری می‌کند، گفته می‌شود. تعیین MIC اندولیزین KP27 برای دو باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس به صورت نمودار ۲ نمایش داده شده است. بیشترین اثر مهاری



نمودار ۱- نمودار سنجش فعالیت باکتری‌کشی اندولیزین KP27. دایره و مربع توپر به ترتیب نمودار فعالیت باکتری‌کشی روی دو باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس را نشان می‌دهد. †: اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0/01$ و ‡: اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0/001$ را با گروه کنترل نشان می‌دهد.

¹² Cell wall degradation assay

اندولیزین KP27 و KP15 به ترتیب با منشا دو فاز VB_KpnM_KP15 و VB_KpnM_KP27 مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده است که این اندولیزین‌ها علاوه بر اینکه از پایداری بالایی برخوردار هستند دارای خاصیت هیدرولازی بالا روی سویه‌های گرم‌منفی، و عدم سمیت روی سلول‌های انسانی نیز هستند. در مطالعه فوق ژن کدکننده‌ی آن در وکتور بیانی pEXP-5-CT/TOPO® TA همسانه‌سازی و بیان شد [۸].

استفاده از اندولیزین‌ها رویکرد نوینی برای کنترل باکتری‌ها و پاتوژن‌های غذایی، تجزیه بیوفیلم‌ها و عفونت‌های باکتریایی بیمارستانی از جمله سویه‌های مقاوم به چند دارو است. این آنزیم‌ها به علت اختصاصیت بالا، سمیت انتخابی باکتریایی، عملکرد لیتیک سریع، استحکام در محیط‌های سخت، تولید ارزان و مهم‌تر از همه احتمال ایجاد مقاومت پایین، نامزدهای امیدوارکننده‌ای برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها و تعدیل‌کننده باکتری‌های خاص هستند به طوری که اندولیزین‌هایی مثل SAL200، CF-301، استافکت^{۱۴} SA.100 و مدولیزین که وارد فازهای آزمون‌های بالینی و حتی صنعتی شده‌اند [۱۸، ۱۷]. پس از تخلیص به منظور بررسی اینکه آیا اندولیزین KP27 در طی فرایند بیان و سپس تخلیص فعالیت خود را حفظ کرده است یا نه از سنجش‌های باکتری‌کشی و فعالیت تخریب دیواره سلولی علیه دو باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس استفاده شد. بدین منظور غلظت‌های مختلف اندولیزین به صورت رقت‌سازی سریالی از ۸ میکروگرم/میلی‌لیتر تا ۰/۱۲ میکروگرم/میلی‌لیتر تهیه و بررسی شد نتایج آزمون باکتری‌کشی نشان داد که اندولیزین به صورت وابسته به غلظت باعث از بین بردن باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس می‌شود به طوری که در غلظت ۸ میکروگرم/میلی‌لیتر حداکثر فعالیت را نشان داد. وجود فعالیت لیتیک در اندولیزین نشان‌دهنده حفظ فعالیت اندولیزین در طی فرایند تخلیص می‌باشد. علاوه بر این، همانگونه که در نمودار ۱ نشان داده شده است اثربخشی اندولیزین در غلظت‌های کمتر از ۴ میکروگرم روی باکتری اشرشیاکلی بیشتر از استافیلوکوک اورئوس می‌باشد که دلیل این موضوع می‌تواند احتمالاً دیواره سلولی ضخیم آن در مقایسه با دیواره سلولی اشرشیاکلی باشد. لازم به

۲۰ درصد در کدورت محلول در طی نیم ساعت اولیه رخ می‌دهد و پس از آن تجزیه دیواره سلولی کند می‌شود به طوری که بعد از گذشت ۲ ساعت جذب اولیه از ۱/۲ به ۰/۸ یعنی ۳۵ درصد کاهش می‌یابد (نمودار ۳).

بحث

در سال‌های اخیر، آنزیم‌هایی زیادی با خاصیت ضدباکتریایی تحت عنوان اندولیزین‌ها از باکتریوفاژها جداسازی و پس از تولید به صورت نوترکیب در *in vivo* و *in vitro* مورد بررسی و پژوهش قرار گرفته‌اند. از آنجایی که اندولیزین KP27 در مقایسه با بسیاری از اندولیزین‌ها ویژگی‌های ساختاری و عملکردی بهتری از خود نشان داده است [۱۵] بنابراین تولید و بررسی‌های بیشتر در زمینه فعالیت و ساختار آن از اهمیت زیادی برخوردار است. بررسی اولیه حاکی از پایداری دمایی^{۱۳} بالای آن می‌باشد به طوری که بعد از مجاورت در برابر دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت و حتی دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه فعالیت خود را از دست نمی‌دهد. در پژوهش حاضر ژن کدکننده اندولیزین KP27 بین دو آنزیم محدودکننده *XhoI* و *NcoI* در وکتور بیانی *pET-28a* همسانه‌سازی شد. این وکتور دارای پروموتور قوی T7 بوده و از کارایی مناسب و بالایی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در میزبان باکتری اشرشیاکلی برخوردار است [۱۶]. در این مطالعه با استفاده از همسانه‌سازی ژن کدکننده اندولیزین KP27 در پلاسمید بیانی *pET28a(+)* پروتئین KP27 با کارایی بالا با غلظت ۲۸/۵ میکروگرم/لیتر با موفقیت تولید و تایید شد.

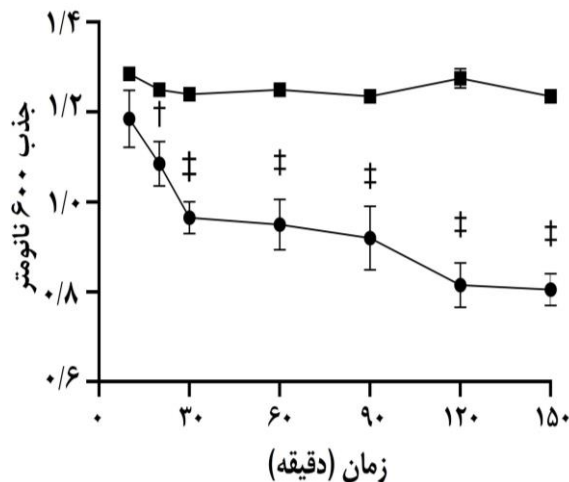
اندولیزین KP27 از فاز VB_KpnM_KP27 نمونه‌ای از این آنزیم‌های هیدرولاز می‌باشد که علاوه بر تخریب دیواره پپتیدوگلیکان باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، از پایداری بالا و عدم سمیت در سلول‌های اپیتلیال انسانی برخوردار می‌باشد [۸] که می‌تواند آن را به عنوان یک جزء ضدباکتریایی در فناوری‌های نگهداری مواد غذایی، ضدعفونی سازی‌های بیمارستانی، دامپزشکی و همچنین در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم‌ها مطرح کند. این اندولیزین برای اولین بار در لهستان توسط تیم Drulis-Kawa و همکاران در سال ۲۰۱۷ شناسایی و معرفی شد. ویژگی‌های آنتی‌باکتریایی و بیوشیمیایی دو

¹⁴ Staphefekt SA.100

¹³ Thermostability

گرم منفی اشرشیاکلی از ۰/۵ میلی مولار EDTA استفاده گردید.

کاربرد وسیع اندولیزین‌ها در امنیت غذایی، فعالیت لیتیک آن‌ها علیه باکتری‌های پاتوژن با منشا غذایی و عفونی و همچنین باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و به‌علاوه غلظت موثر آن‌ها در مطالعات متعددی ارائه شده است [۲۰]. باوجود این، در مطالعه دیگری در سال ۲۰۲۰، اثر باکتری‌کشی اندولیزین‌های نو ترکیب دیگر مثل LysSAP26 بر باکتری‌های گرم منفی و مثبت بررسی شد، و نتایج نمایانگر فعالیت ضدباکتریایی بالای آن در سویه‌های گرم منفی و مثبت بود. در این مطالعه اثر اندولیزین LysSAP26 فاژ SAP-26 روی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کارباپنم مثل آسینتوباکتر بومانی، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکلی بررسی شد و غلظت موثر اندولیزین ۸۰-۵ میکرومولار/میلی لیتر برآورد شد. در مطالعه دیگر اندولیزین فاژ STG2 به نام LysSTG2 را به‌صورت نو ترکیب تولید و روی باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس پوتیدا در نمونه‌های آب معدنی، شیر ماهی سالمون و همچنین بیوفیلیم‌های ساخته شده در سطوح رزین پلی‌استیرن و استیل ضدزنگ بررسی و مشاهده شد که اندولیزین نو ترکیب LysSTG2 در غلظت ۱۰۰ میکرومولار/میلی لیتر به‌طور موثر و معنی‌داری باعث کاهش رشد در نمونه‌های مواد غذایی شد و در غلظت ۱ میلی گرم میلی لیتر به‌طور معنی‌داری باعث تجزیه بیوفیلیم تشکیل شده در سطوح پلی‌استیرن و استیل ضدزنگ شد [۲۱]. در مطالعه حاضر، در مقایسه با اندولیزین‌های LysSAP26 و LysSTG2 اندولیزین KP27 در غلظت‌های کمتر از ۱ میکرومولار/میلی لیتر نیز علیه دو باکتری گرم منفی و مثبت اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس موثر عمل کرد. MIC سنجشی است که حداقل غلظت مورد نیاز یک ماده ضد میکروب برای مهار رشد قابل مشاهده باکتری در *in vitro* را تعیین می‌کند [۲۲]. در پژوهش حاضر میزان MIC و MBC اندولیزین تولیدی بر علیه دو باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس برآورد شد و مقادیر آن‌ها به ترتیب برای اشرشیاکلی ۱۶ و ۶۴ میکرومولار/میلی لیتر برای استافیلوکوک اورئوس ۸ و ۳۲ میکرومولار/میلی لیتر بدست آمد.



نمودار ۳- سنجش فعالیت تخریب دیواره سلولی توسط اندولیزین. دیواره سلولی در مجاورت اندولیزین KP27 قرار گرفت و در بازه‌های زمانی مختلف جذب آن در ۶۰۰nm سنجیده شد. در نمونه کنترل (مربع‌های توپر) از PBS به جای اندولیزین استفاده شد. †: اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.01$; ‡: اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.001$ را با گروه کنترل نشان می‌دهد.

ذکر است از آنجایی که پروتئین‌ها قادر به نفوذ از غشا خارجی باکتری‌های گرم منفی نیستند برای نفوذپذیر کردن غشا خارجی باکتری اشرشیاکلی از ۰/۵ میلی مولار استفاده شد. با وجود این، در کنار تمامی آزمون‌ها از EDTA و نیز اندولیزین به‌تنهایی نیز استفاده شد. نتایج بدست آمده حاکی از این بود که EDTA و اندولیزین به‌تنهایی اثر منفی در رشد باکتری اشرشیاکلی نداشته است (داده‌ها نشان داده نشدند). مطالعات کمتری روی اندولیزین KP27 انجام شده است در یکی از این مطالعات نانوذرات دندرونی نقره به‌عنوان افزایش‌دهنده‌ی نفوذپذیری غشای باکتری سودوموناس آئروژینوزا به‌همراه لیزوزوم و اندولیزین KP27 مورد بررسی قرار گرفتند، و نتایج حاکی از افزایش خاصیت آنتی‌باکتریایی اندولیزین KP27 بود [۱۹]. در این مطالعه ژن کدکننده‌ی اندولیزین KP27، به صورت تجاری در وکتور بیانی TA pEXP-5-CT/TOPO® همسانه‌سازی و بیان شده بود. نانوذرات نقره دندرونی شده با افزایش نفوذ پذیری غشای خارجی باکتری، دسترسی اندولیزین به لایه پپتیدوگلیکان باکتری را افزایش داد و باعث افزایش قدرت ضدباکتریایی اندولیزین KP27 در غلظت ۵ میکرومولار شد. در مطالعه‌ی حاضر، برای نفوذپذیر کردن غشای خارجی باکتری

گزینه مناسبی برای پژوهش‌های کاربردی و متعاقب آن صنعتی شدن به جای آنتی‌بیوتیک‌های موجود پیشنهاد داد.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه خانم زینب زارع در مقطع کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی با شماره ثبت ۱۹۴۹۳ می‌باشد.

ملاحظات مالی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه انجام شد.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ز.ز.: انجام مطالعه؛ ص.آ.ا.: آنالیز داده‌ها و نظارت بر حسن اجرای مطالعه؛ م.ا.: ایده، طراحی و نگارش مقاله.

فهرست منابع

- Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C, The advantages and challenges of using endolysins in a clinical setting. *Viruses* 13 (2021) 680.
- Fischetti VA, Development of phage lysins as novel therapeutics: a historical perspective. *Viruses* 10 (2018) 310.
- Dams D, Briens Y, Enzybiotics: Enzyme-Based Antibacterials as Therapeutics. In: Labrou N, editor, *Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications*. Singapore: Springer Singapore, 2019: 233-253.
- Fenton M, McAuliffe O, O'Mahony J, Coffey A, Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioengineered Bugs* 1 (2010) 9-16.
- Cernooka E, Rumnicks J, Zrelavs N, Tars K, Kazaks A, Diversity of the lysozyme fold: structure of the catalytic domain from an unusual endolysin encoded by phage Enc34. *Sci Rep* 12 (2022) 5005.
- Schmelcher M, Loessner MJ, Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage* 4 (2014) e28137.
- Briens Y, Walmagh M, Van Puyenbroeck V, Cornelissen A, Cenens W, Aertsen A, Oliveira H, Azeredo J, Verween G, Pirnay J-P, Engineered endolysin-based "Artilyns" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. *MBio* 5 (2014) e01379-14.

در مطالعه‌ی مربوط به اثر اندولیزین HY-133 روی استافیلوکوک اورئوس MIC و MBC هر دو برابر ۱۲ میکرومولار/میلی‌لیتر بود نشان‌دهنده میزان مهارکنندگی و باکتری‌کشی بود [۲۳] درحالی‌که این میزان برای اندولیزین KP27 در برابر باکتری استافیلوکوک اورئوس میزان برابر ۸ میکرومولار/میلی‌لیتر و MBC برابر ۳۲ میکرومولار/میلی‌لیتر بود که میزان MIC آن کمتر از مطالعه‌ی کناک^{۱۵} و همکارانش است. به علاوه در تحقیقاتی که به وسیله‌ی ویپرا^{۱۶} و همکارانش از پروتئین کایمریک مشتق از باکتریوفازی به نام p128 گزارش شده است میزان MIC و MBC برای سویه‌های مختلف استافیلوکوک اورئوس به ترتیب ۸ و ۱۶ میلی‌گرم/لیتر می‌باشد [۲۴]، و همین مورد برای اندولیزین CF-301 میزان ۳۲-۸ میلی‌گرم/لیتر گزارش شده است که برابر با MIC اندولیزین KP27 مورد مطالعه است [۲۵].

علاوه بر فعالیت ضد باکتریایی اندولیزین KP27، فعالیت تخریب دیواره سلولی آن نیز بررسی شد. بدین‌منظور پس از مجاورت دیواره سلولی با اندولیزین، تغییرات کدورت آن دنبال شد. نتایج به دست آمده حاکی از کاهش معنی‌دار کدورت محلول در حدود ۲۰ درصد طی نیم ساعت اولیه پس از مجاورت با اندولیزین KP27 می‌باشد. در تحقیقی که در سال ۲۰۲۳ انجام گرفت، سوسپانسیون پیتیدوگلیکان خالص شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در حضور ۴ میکروگرم مولار از LL-37، ۱/۶ میکرومولار از Ply2660 و ترکیبی از هر دو قرار گرفت که با توجه به نتایج بدست آمده بیشترین درصد کاهش را ترکیب Ply2660 + LL-37 و در مرتبه‌ی بعد Ply2660 داشتند [۱۴].

نتیجه‌گیری

با وجود مطالعات کمتری که در زمینه اندولیزین KP27 انجام شده است با توجه به مقدار بیان و تولید بالای آن و همچنین فعالیت بالای آن در مقایسه با اندولیزین‌هایی مثل HY-133، P128 و CF-301 بر علیه دو باکتری گرم‌منفی و گرم مثبت اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس، می‌توان آن را

¹⁵ Knaack

¹⁶ Vipra

8. Maciejewska B, Roszniowski B, Espaillat A, Keşik-Szeloch A, Majkowska-Skrobek G, Kropinski AM, Briers Y, Cava F, Lavigne R, Drulis-Kawa Z, Klebsiella phages representing a novel clade of viruses with an unknown DNA modification and biotechnologically interesting enzymes. *Applied Microbiol Biotechnol* 101 (2017) 673-684.
9. Camacho-González CE, Cardona-Félix CS, Zamora-Gasga V, Pérez-Larios A, Sánchez-Burgos JA, Biofunctionalization of endolysins with oligosaccharides: Formulation of therapeutic agents to combat multi-resistant bacteria and potential strategies for their application. *Polysaccharides* 3 (2022) 306-325.
10. Imani M, Shahmohamadnejad S, Recombinant production of *Aspergillus Flavus* uricase and investigation of its thermal stability in the presence of raffinose and lactose. *3 Biotech* 7 (2017) 201.
11. Ma X, Su E, Zhu Y, Deng S, Wei D, High-level expression of glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase from *Pseudomonas diminuta* NK703 in *Escherichia coli* by combined optimization strategies. *J Biotechnol* 168 (2013) 607-615.
12. Abdoli V, Sarkhosh-Inanlou R, Delirezh N, Aghazadeh S, ShaykhBaygloo N, Imani M, Cytotoxic effect of sea anemone pore-forming toxin on K562 chronic myeloid leukemia cells. *Vet Res Forum* 12 (2021) 481-485.
13. Antonova NP, Vasina DV, Rubalsky EO, Fursov MV, Savinova AS, Grigoriev IV, Usachev EV, Shevlyagina NV, Zhukhovitsky VG, Balabanyan VU, Potapov VD, Aleshkin AV, Makarov VV, Yudin SM, Gintsburg AL, Tkachuk AP, Gushchin VA, Modulation of endolysin LysECD7 bactericidal activity by different peptide tag fusion. *Biomolecules* 10 (2020) 440.
14. Zhang H, Zhang X, Liang S, Wang J, Zhu Y, Zhang W, Liu S, Schwarz S, Xie F, Bactericidal synergism between phage endolysin Ply2660 and cathelicidin LL-37 against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes* 9 (2023) 16.
15. Heselpoth RD, Owens JM, Nelson DC, Quantitative analysis of the thermal stability of the gamma phage endolysin PlyG: A biophysical and kinetic approach to assaying therapeutic potential. *Virology* 477 (2015) 125-132.
16. Gontijo MTP, Jorge GP, Brocchi M, Current status of endolysin-based treatments against gram-negative bacteria. *Antibiotics* 10 (2021) 1143.
17. Kim N-H, Park WB, Cho JE, Choi YJ, Choi SJ, Jun SY, Kang CK, Song K-H, Choe PG, Bang J-H, Effects of phage endolysin SAL 200 combined with antibiotics on *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 62 (2018) e731-e718.
18. Liu H, Hu Z, Li M, Yang Y, Lu S, Rao X, Therapeutic potential of bacteriophage endolysins for infections caused by Gram-positive bacteria. *J Biomed Sci* 30 (2023) 29.
19. Ciepluch K, Skrzyniarz K, Barrios-Gumiel A, Quintana S, Sánchez-Nieves J, de la Mata FJ, Maciejewska B, Drulis-Kawa Z, Arabski M, Dendronized silver nanoparticles as bacterial membrane permeabilizers and their interactions With *P. aeruginosa* lipopo-lysaccharides, lysozymes, and phage-derived endolysins. *Front Microbiol* 10 (2019) 2771.
20. Khan FM, Chen J-H, Zhang R, Liu B, A comprehensive review of the applications of bacteriophage-derived endolysins for foodborne bacterial pathogens and food safety: recent advances, challenges, and future perspective. *Front Microbiol* 14 (2023) 1259210.
21. [۲۱] Zhang Y, Huang H-H, Duc HM, Masuda Y, Honjoh K-i, Miyamoto T, Application of endolysin LysSTG2 as a potential biocontrol agent against planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas* on various food and food contact surfaces. *Food Control* 131 (2022) 108460.
22. Kadeřábková N, Mahmood AJS, Mavridou DAI, Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration (MIC) assays. *NPJ Antimicrob Resist* 37 (2024) 51-56.
23. Knaack D, Idelevich EA, Schleimer N, Molinaro S, Kriegeskorte A, Peters G, Becker K, Bactericidal activity of bacteriophage endolysin HY-133 against *Staphylococcus aureus* in comparison to other antibiotics as determined by minimum bactericidal concentrations and time-kill analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 93 (2019) 362-368.
24. Vipra AA, Desai SN, Roy P, Patil R, Raj JM, Narasimhaswamy N, Paul VD, Chikkamadaiah R, Sriram B, Antistaphylococcal activity of bacteriophage derived chimeric protein P128. *BMC Microbiol* 12 (2012) 41.
25. Schuch R, Lee HM, Schneider BC, Sauve KL, Law C, Khan BK, Rotolo JA, Horiuchi Y, Couto DE, Raz A, Fischetti VA, Huang DB, Nowinski RC, Wittekind M, Combination therapy with lysin CF-301 and antibiotic is superior to antibiotic alone for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced murine bacteremia. *J Infect Dis* 209 (2014) 1469-1478.

Research paper

Cloning, expression, purification and investigation of activity of *Klebsiella pneumoniae* phage KP27 endolysin

Zeynab Zare, Mehdi Imani*, Safiyeh Aghazadeh

Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 11 November 2024

Accepted: 3 December 2024

Abstract

Background and Aim: Endolysin of phage KP27 is a protein with a molecular mass of 14.7 kDa, which has endopeptidase activity against bacterial cell walls. Due to limited research on endolysin KP27 and its superiority against harsh environmental conditions such as temperature and pH, the aim of this study is recombinant production and investigation of its antibacterial activity against two gram-negative and positive bacteria

Methods: KP27 endolysin gene was cloned between two restriction enzymes *NcoI* and *XhoI* in plasmid *pET-28a(+)*. *E. coli BL21 (DE3)* was used for expression and production and Purification was performed by Ni²⁺-NTA sepharose chromatography. Bactericidal activity tests, MIC and MBC against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria and cell wall degradation were used to investigate the antibacterial and enzymatic activities of endolysin, respectively. Statistical analysis and generation of graphs were achieved by Graphpad Prism software.

Results: Endolysin KP27 was successfully cloned and produced with high efficiency in the amount of 28.5 mg/L of culture medium. Bactericidal activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria was over 50% at the concentrations of 4 µg/ml. For *Escherichia coli*, MIC and MBC were calculated 16 and 64 µg/ml while for *Staphylococcus aureus* they were 8 and 32 µg/ml, respectively. Evaluating the cell wall degradation activity of endolysin indicated a 20% decrease in the turbidity of the solution after half an hour incubation with endolysin.

Conclusion: Considering the high expression and production as well as its high activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, endolysin KP27 can be suggested as a convenient candidate for further applied research and subsequent industrialization instead of antibiotics.

Keywords: Endolysin KP27, Bacteriophage, Recombinant protein, Cell wall, Antibiotic resistance,

Please cite this article as follows:

Zare Z, Imani M, Aghazadeh S, Cloning, expression, purification and investigation of activity of *Klebsiella pneumoniae* phage KP27 endolysin. *Iran J Physiol Pharmacol* 8 (2024) 137-148.

*Corresponding authors: m.imani@urmia.ac.ir (ORCID: 0000-0002-9990-4389)