IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران
سال ۱۴۰۳، دوره ۸، پیاپی ۱۸، صفحه ۱۴۸-۱۳۷

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

دریافت: ۲۱ آبان ۱۴۰۳ پذیرش: ۱۳ آذر ۱۴۰۳

چکیده

زمینه و هدف: اندولیزین فاژ KP27 پروتئینی با جرم مولکولی ۱۴/۷ کیلو دالتون است که دارای فعالیت اندوپپتیدازی علیه دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد. به‌دلیل 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 *NcoI* و *XhoI* 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: باتوجه‌به 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]. به‌همین‌خاطر 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. باوجوداین 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. علاوه‌براین محققان مشاهده کردند که لیزات فاژها نیز قادر به لیز و ازبین‌بردن 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

* نویسندگان مسئول مکاتبات: m.imani@urmia.ac.ir (ORCID: 0000-0002-9990-4389)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

توجهی در زمینه کنترل باکتری‌ها شده است [۲]. به‌طورکلی اندولیزین‌ها آنزیم‌های هیدرولیز کننده لایه‌ی پپتیدوگلیکان دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها هستند که توسط فاژها در مرحله آخر چرخه لیتیک به‌همراه پروتئین‌هایی به نام هولین‌ها تولید می‌شوند. ازآنجایی‌که اندولیزین‌ها در داخل سلول باکتری‌های آلوده‌شده با فاژ تولید می‌شوند برای فعالیت خود نیاز به خروج از غشا داخلی و دسترسی به لایه پپتیدوگلیکان دارندکه 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 به‌صورت اگزوژن استفاده می‌شود، باعث شده است که اندولیزین‌ها به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های رایج معرفی شوند و به‌دلیل خاصیت آنزیمی به آن‌ها آنزیم‌های لیزکننده یا آنزیبیوتیک[1] 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 داری چهار نوع فعالیت آنزیمی می‌باشند: ۱- N–استیل مورامیداز (شبه لیزوزومی) ۲- N–استیل گلوکوزآمینیداز ۳- N–استیل موراموئیل–آلانین آمیداز و ۴–آلانوئیل–گلوتامات اندوپپتیداز [۴]. از نظر ساختاری اندولیزین‌ها پروتئین‌هایی هستند با وزن مولکولی بزرگتر از ۲۵ کیلودالتون که از دو دُمین فعال آنزیمی[2] (EAD) و دُمین متصل شونده[3] (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

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 اگزوژن به کار گرفته می‌شوند به دلیل عدم وجود غشاء خارجی در این باکتری‌ها برای دسترسی و رسیدن به پپتیدوگلیکان نیاز به پروتئین‌های هولین نمی‌باشد. باوجوداین، در باکتری‌های گرم‌منفی به‌دلیل وجود غشا خارجی استفاده از اندولیزین‌ها با محدودیت مواجه شده است. به‌منظور غلبه بر این محدودیت و عبور از غشا خارجی، محققان استراتژی‌های خلاقانه‌ای به‌کار می‌برند که ازجمله آن‌ها می‌توان به استفاده از نفوذپذیرکننده‌های غشایی مثل EDTA، فشار هیدرواستاتیکی بالا[4]، و مهندسی آن‌ها مثل ساخت اندولیزین‌های کایمر یا افزودن قطعه پپتیدی اشاره کرد [۷].

اندولیزین ویروس KP27 پروتئینی با ۱۳۱ اسیدآمینه و جرم مولکولی ۱۴/۷ kDa است که دارای فعالیت آنزیمی اندوپپتیدازی علیه دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد. این آنزیم پیوند پپتیدی بین دو اسیدآمینه 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 به‌صورت نوترکیب پروتئین آن تولید شد. از میان فاژهای آلوده کننده 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 اسیدآمینه گلوتامین جایگزین گلوتامات در اندولیزین KP15 شده است [۸]. یکی از معیارهای مهم در کاربرد پروتئین‌ها و آنزیم‌های

[4] High hydrostatic pressure

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

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 اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

آنزیم‌های *NcoI*، *XhoI* و T4 DNA لیگاز از شرکت NEB، نشانگر DNA، آگاروز، کیت استخراج پلاسمید و استخراج از ژل از شرکت سیناکلون، ستون کروماتوگرافی Ni^{2+}-NTA از شرکت نوآوران زیست گستر ارگ تبریز، کیت‌های ژل الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات-پلی آکریل-آمید[5] 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 uniport 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 شد [۱۰]. به طور خلاصه، ابتدا پلاسمید pGEM-B1 که ژن سنتتیک KP27 در آن قرار داشت توسط دو آنزیم محدودکننده *NcoI* و *XhoI* 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 مخلوط‌کردن نسبت ۵ به ۱ ژن KP27 و پلاسمید *pET28a(+)* هضم شده در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد به‌مدت 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/میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین برده شد. به‌منظور تایید همسانه‌سازی 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 همسانه‌سازی به‌منظور بیان و تخلیص اندولیزین KP27، ابتدا ۲ میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری BL21 حاوی پلاسمید حامل ژن KP27 به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک 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 میلی‌مولار 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. به‌منظور دسترسی به محتوی سیتوزولی، باکتری‌های دارای پروتئین اندولیزین در بافر لیز ۵۰ میلی‌لیتر مونو سدیم فسفات، ۳۰۰ میلی‌لیتر سدیم کلراید و ۱۰ میلی‌لیتر 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) جداره‌ی باکتری‌ها

[5] SDS-PAGE

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

شکسته شد. نمونه‌ی سونیکه‌شده، روی یخ، به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ نمونه‌ها، مایع رویی تمام میکروتیوب‌ها برای انتقال روی ستون کروماتوگرافی تمایلی در یک فالکون جمع آوری شد. جهت تخلیص تک مرحله‌ای اندولیزین KP27 از ستون Ni^{2+}-NTA استفاده شد. قبل از بارگذاری نمونه، برای شستشو و به تعادل‌رساندن 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 پروتئین‌هایی که به ستون متصل نشده است، بافر شست‌وشو ۵۰ میلی‌لیتر مونو سدیم فسفات، ۳۰۰ میلی‌لیتر سدیم کلراید و ۲۵ میلی‌لیتر ایمیدازول (pH برابر ۸) از ستون عبور داده شد. در مرحله آخر برای جدا کردن اندولیزین KP27 متصل شده به ستون از بافر ۵۰ میلی‌لیتر مونو سدیم فسفات، ۳۰۰ میلی‌لیتر سدیم کلراید و ۲۵۰ میلی‌لیتر ایمیدازول استفاده شد. اندولیزین خروجی از ستون درون میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری در حجم‌های ۱/۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری شد و قبل از بررسی فعالیت ضدباکتریایی، نمک‌ها و ایمیدازول و سایر مولکول‌های 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 توده‌ای[6] ٪۵ و ژل جداکننده‌ی[7] ۱۵ درصد استفاده شد. در روش برادفورد از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد [۱۲].

سنجش فعالیت ضدباکتریایی اندولیزین

یک کلونی از سویه‌های استاندارد کشت داده شده باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس از محیط کشت جامد آگار برداشته و به لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع براث اضافه شد و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس باکتری‌های کشت داده شده در محیط کشت مایع به نسبت ۱ به ۳۰ رقیق شدند. جهت انجام تست سنجش فعالیت کشندگی، ابتدا در تمام چاهک‌های تست مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS[8] ریخته شد. برای تهیه‌ی رقت‌های اندولیزین KP27 ابتدا مقدار ۸ میکرومولار/میلی‌لیتر از آن در چاهک اول ریخته شد و برای تهیه سایر رقت‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه شد تا رقت ۴ میکرومولار/میلی‌لیتر از اندولیزین به دست آید و دیگر رقت‌ها نیز به‌همین‌ترتیب تهیه شد. جهت منظور حذف اثر احتمالی بافر اندولیزین، در یک چاهک به جای پروتئین از حداکثر غلظت بافر PBS به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد و یک چاهک نیز دارای فقط محیط کشت و باکتری‌ها به‌عنوان کنترل مثبت تهیه گردید. درنهایت سوسپانسیون میکروبی از کشت دو ساعته‌ی باکتری به نسبت ۱ به ۳۰ رقیق شد، سپس به‌منظور افزایش نفوذپذیری غشای خارجی باکتری گرم‌منفی محلول ۵/. میلی‌مولار EDTA در حجم نهایی در تمامی چاهک‌های تست تلقیح گردید. در نهایت، درب پلیت بسته شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. جهت تشخیص اثر اندولیزین، پس از گذشت ۲۴ ساعت، OD600 چاهک‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر، ثبت شد و توسط فرمول $[(OD_{conrol}-OD_{test})/OD_{control}]x100$ محاسبه و درصد کشندگی بدست آمد [۱۳].

تعیین MIC[9]

برای انجام این تست در میکروپلیت ۹۶خانه‌ی استریل، رقت‌های لازم از باکتری و اندولیزین KP27 در محیط MHB تهیه شد و سپس از هر رقت اندولیزین به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به اضافه‌ی ۹۰ میکرولیتر محیط MHB، و ۱۰ میکرولیتر باکتری در فاز لگاریتمی با غلظت (CFU/ml ۱×۱۰^{۶}) به هر چاهک میکروپلیت اضافه شد و با یکدیگر به‌آرامی ترکیب شد. برای چاهک کنترل، باکتری مورد نظر با محیط MHB ترکیب شد و چاهک بلانک تنها حاوی محیط MHB بود. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور قرار می‌گیرد. برای نفوذپذیرسازی

[6] Stacking Gel
[7] Resolving Gel
[8] Phosphate-buffered saline
[9] Minimal inhibitory concentration

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

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

تعیین MBC[10]

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 پپتیدوگلیکان و ارزیابی فعالیت اندولیزین KP27

پپتیدوگلیکان خالص‌شده به‌عنوان سوبسترا برای ارزیابی فعالیت آنزیمی اندولیزین KP27 استفاده شد. به‌همین‌دلیل برای ارزیابی اثر اندولیزین KP27 بر تخریب دیواره سلولی استافیلوکوکوس اورئوس، کدورت سوسپانسیون باکتریایی اندازه‌گیری شد. سویه استافیلوکوکوس اورئوس در ۵۰۰ میلی‌لیتر (MHB)[11] 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 میلی لیتر 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 میلی لیتر 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].

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 درنظر 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).

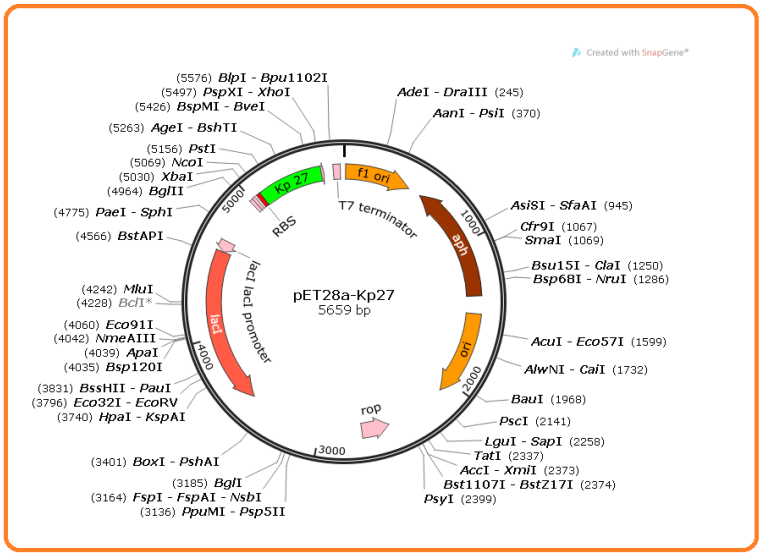
بیان و تخلیص اندولیزین

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.

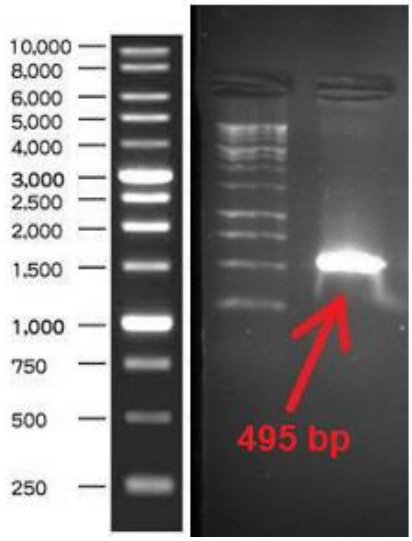
[10] Minimum bactericidal concentration
[11] Mueller Hinton Broth

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

```
        10         20         30         40         50
MFKFSQKSLN NLKGVKPQLV KVVERALQLS PVDFGVREGL RTVEQQRENV
        60         70         80         90        100
RKGVSQTMNS KHITGDAVDL YPSVLPQGWQ TNPKVWLPVL NAVKQAGDEL
       110        120        130
GVKLRFGINW KNDPNLPIET KFIDAPHVEL AHHHHHHHH
```



شکل ۱– توالی اسیدآمینه‌ای و نقشه مولکولی پلاسمید دارای ژن اندولیزین KP27 با نام *pET28a(+)-KP27*. در شکل بالا توالی اسیدآمینه‌ای اندولیزین کلون شده که در آن هشت هیستیدین در موقعیت انتهای کربوکسیل پروتئین به منظور تخلیص تک‌مرحله‌ای با کروماتوگرافی تمایل به ۱۳۱ اسیدآمینه 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 محدودکننده *NcoI* و *XhoI* انجام شده است. نقشه توسط نرم‌افزار SnapGene ایجاد شده است.

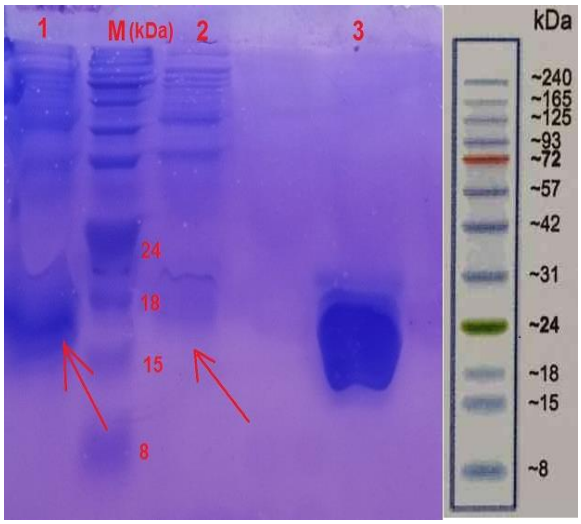


شکل ۲– الکتروفورز ژل آگاروز محصول PCR. به منظور تایید حضور ژن اندولیزین KP27 در پلاسمید *pET28a*(+) از پلاسمید ساخته شده به‌عنوان الگو برای واکنش PCR استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده طوری طراحی شدند که پرایمر رفت از بالا دست محل برش آنزیم *NcoI* و پرایمر برگشت از پایین دست محل برش آنزیم *XhoI* شروع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

ارزیابی فعالیت باکتری‌کشی اندولیزین KP27

پس از تخلیص اندولیزین به‌منظور تایید اینکه اندولیزین تخلیص شده در طی فرایند تخلیص فعالیت خود را حفظ کرده است یا نه فعالیت باکتری‌کشی و تخریب دیواره سلولی آن بررسی شد. جهت بررسی فعالیت باکتری‌کشی 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).

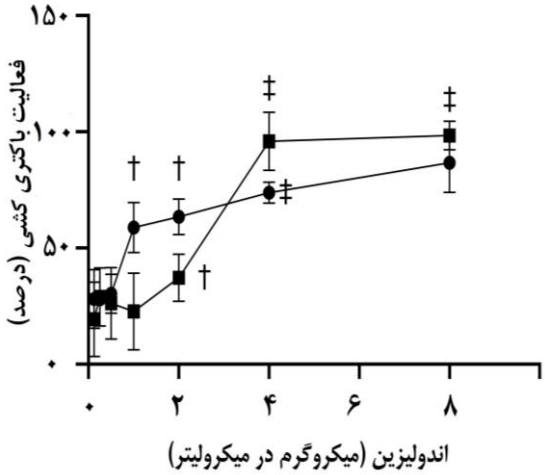
[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]



شکل۳– الکتروفورز اندولیزین. مسیر ۱، لیزات پروتئینی باکتری بعد از القا توسط لاکتوز، مسیر M: مارکر پروتئینی، مسیر۲، لیزات پروتئینی باکتری قبل از القا توسط لاکتوز، مسیر ۳، اندولیزین خالص شده‌ی KP27 با وزن مولکولی حدود ۱۵ کیلودالتون.

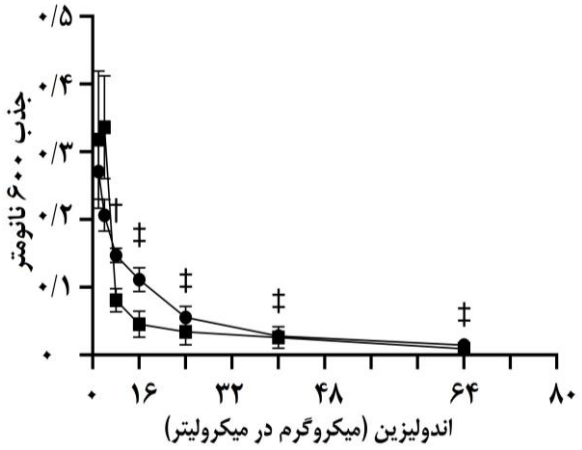
MIC و MBC اندولیزین KP27

MIC، به کمترین عامل ضدباکتری که از رشد قابل مشاهده‌ی میکروارگانیسم‌ها بعد از کشت شبانه جلوگیری می‌کند، گفته می‌شود. تعیین MIC اندولیزینKP27 برای دو باکتری دو باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس به‌صورت نمودار ۲ نمایش داده شده است. بیشترین اثر مهاری



نمودار ۱– نمودار سنجش فعالیت باکتری‌کشی اندولیزینKP27 . دایره و مربع توپر به‌ترتیب نمودار فعالیت باکتری‌کشی روی دو باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس را نشان می‌دهد. †: اختلاف معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۱$ و ‡: اختلاف معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۰۱$ را با گروه کنترل نشان می‌دهد.

قابل مشاهده برای باکتری اشرشیاکلی ۱۶ میکروگرم/میلی‌لیتر و برای استافیلوکوک اورئوس ۸ میکروگرم/میلی‌لیتر 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/میلی‌لیتر 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 $p < ۰/۰۱$ و ‡: اختلاف معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۰۱$ را با گروه کنترل نشان می‌دهد.

ارزیابی فعالیت تخریب دیواره سلولی[12] اندولیزین KP27

ازآنجایی‌که فعالیت باکتری‌کشی اندولیزین‌ها بواسطه فعالیت آنزیمی آن‌ها روی لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد اثر آنزیمی اندولیزین تخلیص شده نیز مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌منظور 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

[12] Cell wall degradation assay

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

۲۰ درصد در کدورت محلول در طی نیم ساعت اولیه رخ می‌دهد و پس از آن تجزیه دیواره سلولی کند می‌شود به‌طوری‌که 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 به‌صورت نوترکیب در *in vivo* و *in vitro* مورد بررسی و پژوهش قرارگرفته‌اند. ازآنجایی‌که 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 به‌مدت ۱ ساعت و حتی دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به‌مدت ۱۵ دقیقه فعالیت خود را از دست نمی‌دهد. در پژوهش حاضر ژن کدکننده اندولیزین KP27 بین دو آنزیم محدودکننده *NcoI* و XhoI 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 اشریشیاکلی 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 فاژ VB_KpnM_KP27 نمونه‌ای از این آنزیم‌های هیدرولاز می‌باشد که علاوه‌بر 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 به‌عنوان یک جزء ضدباکتریایی در فناوری‌های نگهداری مواد غذایی، ضدعفونی سازی‌های بیمارستانی، دامپزشکی و همچنین در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم ها 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 اندولیزین KP27 و KP15 به ترتیب با منشا دو فاژ VB_KpnM_KP27 و VB_KpnM_KP15 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].

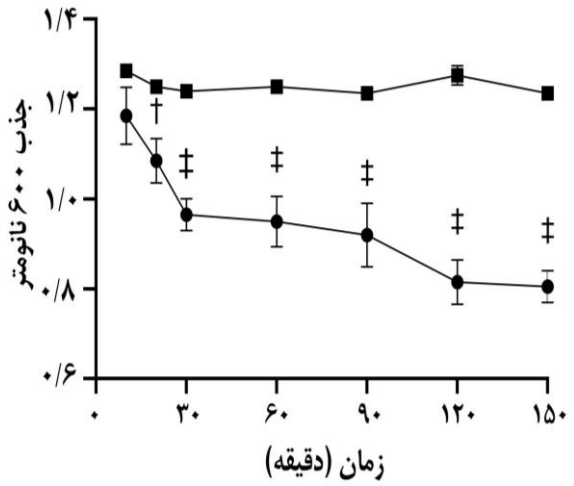
استفاده از اندولیزین‌ها رویکرد نوینی برای کنترل باکتری‌ها و پاتوژن‌های غذایی، تجزیه بیوفیلم‌ها و عفونت‌های باکتریایی بیمارستانی از جمله سویه‌های مقاوم به چند دارو است. این آنزیم‌ها به‌علت اختصاصیت بالا، سمیت انتخابی باکتریایی، عملکرد لیتیک سریع، استحکام در محیط‌های سخت، تولید ارزان و مهم‌تر از همه احتمال ایجاد مقاومت پایین، نامزدهای امیدوارکننده‌ای برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها و تعدیل‌کننده باکتری‌های خاص هستند به‌طوری‌که 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 به‌منظور 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. بدین‌منظور غلظت‌های مختلف اندولیزین به‌صورت رقت‌سازی سریالی از ۸ میکروگرم/میلی‌لیتر تا ۰/۱۲ میکروگرم/میلی‌لیتر تهیه و بررسی شد نتایج آزمون باکتری‌کشی نشان داد که اندولیزین به‌صورت وابسته به غلظت باعث ازبین‌بردن 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. علاوه‌براین، 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

[13] Thermostability

[14] Staphefekt SA.100

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]



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 $p < ۰/۰۱$ و ‡: اختلاف معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۰۱$ را با گروه کنترل نشان می‌دهد.

ذکر است ازآنجایی‌که پروتئین‌ها قادر به نفوذ از غشا خارجی باکتری‌های گرم‌منفی نیستند برای نفوذپذیرکردن غشا خارجی باکتری اشرشیاکلی از ۰/۵ میلی‌مولار استفاده شد. با وجود این، در کنار تمامی آزمون‌ها از EDTA و نیز اندولیزین به‌تنهایی نیز استفاده شد. نتایج بدست‌آمده حاکی از این بود که EDTA و اندولیزین به‌تنهایی اثر منفی در رشد باکتری اشرسیاکلی 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 اندولیزینKP27 ، به صورت تجاری در وکتور بیانی pEXP-5-CT/TOPO® TA 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 نفوذپذیرکردن غشای خارجی باکتری گرم منفی اشرشیاکلی از ۰/۵ میلی‌مولار 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]. باوجوداین، در مطالعه دیگری در سال ۲۰۲۰، اثر باکتری‌کشی اندولیزین‌های نوترکیب دیگر مثل LysSAP26 بر باکتری‌های گرم‌منفی و مثبت بررسی شد، و نتایج نمایانگر فعالیت ضدباکتریایی بالای آن در سویه های 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/میلی‌لیتر برآورد شد. در مطالعه دیگر اندولیزین فاژ STG2 به نام LysSTG2 را به‌صورت نوترکیب تولید و روی باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس پوتیدا در نمونه‌های آب معدنی، شیر ماهی سالمون و همچنین بیوفیلم‌های ساخته شده در سطوح رزین پلی‌استیرن و استیل ضدزنگ بررسی و مشاهده شد که اندولیزین نوترکیب LysSTG2 در غلظت ۱۰۰ میکرومولار/میلی‌لیتر به‌طور موثر و معنی‌داری باعث کاهش رشد در نمونه‌های مواد غذایی شد و در غلظت ۱ میلی‌گرم میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری باعث تجزیه بیوفیلم 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/ میلی‌لیتر نیز علیه دو باکتری گرم‌منفی و مثبت اشرسیاکلی و استافیلوکوک اورئوس موثر عمل کرد. MIC سنجشی است که حداقل غلظت مورد نیاز یک ماده ضدمیکروب 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 به‌ترتیب برای اشرشیاکلی ۱۶ و ۶۴ میکرومولار/میلی‌لیتر برای استافیلوکوک اورئوس ۸ و ۳۲ میکرومولار/میلی‌لیتر بدست آمد.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

در مطالعه‌ی مربوط به اثر اندولیزین HY-133 روی استافیلوکوک اورئوس MIC و MBC هر دو برابر ۱۲ میکرومولار/میلی‌لیتر بود نشان‌دهنده میزان یکسان 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 باکتریوفاژی 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 پپتیدوگلیکان 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 باتوجه‌به 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 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

1. Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C, The advantages and challenges of using endolysins in a clinical setting. ***Viruses*** 13 (2021) 680.
2. Fischetti VA, Development of phage lysins as novel therapeutics: a historical perspective. ***Viruses*** 10 (2018) 310.
3. Dams D, Briers Y, Enzybiotics: Enzyme-Based Antibacterials as Therapeutics. In: Labrou *N, editor, Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications*. Singapore: Springer Singapore, 2019: 233-253.
4. Fenton M, McAuliffe O, O'Mahony J, Coffey A , Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. ***Bioengineered Bugs*** 1 (2010) 9-16.
5. Cernooka E, Rumnieks J, Zrelovs 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.
6. Schmelcher M, Loessner MJ, Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. ***Bacteriophage*** 4 (2014) e28137.
7. Briers Y, Walmagh M, Van Puyenbroeck V, Cornelissen A, Cenens W, Aertsen A, Oliveira H, Azeredo J, Verween G, Pirnay J-P, Engineered endolysin-based "Artilysins" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. ***MBio*** 5 (2014) e01379-14.

[15] Knaack
[16] Vipra

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

8. Maciejewska B, Roszniowski B, Espaillat A, Kęsik-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 oligosacharides: 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.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

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 Ni^{2+}-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)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]