Feyz Medical Sciences Journal
2024, Volume 28, Issue 1
Pages: 33-41
Doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.1.33
Original Article

Evaluation of the antibacterial activity of recombinant protein oncorhyncin II against *Acinetobacter baumannii* (ATCC19606) under *in vitro* conditions

Mozhdeh Safari [1], Robab Rafiei Tabatabaei [1], Hamid Abtahi [2 *], Shohreh Fahimirad [2], Abbas Alimoradian [3]

[1] Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran
[2] Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[3] Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

[*]**Corresponding author:** Hamid Abtahi. Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
Email: habtahi2001@yahoo.com

Received: 15 October 2023 **Revised:** 8 January 2024 **Accepted:** 8 January 2024

Abstract

Background and Aim: Multi-drug resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* is a prevalent hospital pathogen. Antimicrobial peptides (AMPs), such as Oncorhyncin II, have been proposed for treating MDR pathogens. This study aimed to assess the antibacterial activity of recombinant protein Oncorhyncin II against *Acinetobacter baumannii* (ATCC19606) under *in vitro* conditions.

Methods: In this experimental study, the gene construct pET32a-oncorhyncin II was transferred to *Escherichia coli BL21 (DE3)* for expressing the recombinant Oncorhyncin II protein. Purification was optimized using nickel affinity chromatography (Ni-NTA), and the peptide's efficacy was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), bactericidal kinetics, and growth kinetics against *Acinetobacter baumannii* (ATCC19606).

Results: The recombinant Oncorhyncin II protein was successfully expressed in *E. coli BL21 (DE3)* and purified with over 70% purity. The MIC assay confirmed effective antibacterial activity of Oncorhyncin II against *Acinetobacter baumannii* at a concentration of 95.87 µg/ml. At 2x MIC, Oncorhyncin II led to a rapid reduction in viable cell count and decreased turbidity of the bacterial inoculum in bactericidal and growth kinetics assessments.

Conclusion: The produced recombinant Oncorhyncin II exhibited potent antibacterial activity against *Acinetobacter baumannii*. These findings can contribute to the development and production of novel antimicrobial drugs for treating infections caused by *Acinetobacter baumannii*.

Keywords: Antimicrobial Peptides, Recombinant Proteins, *Acinetobacter baumannii*

Copyright© 2024. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms. Downloaded from: http://feyz.kaums.ac.ir/

مجله علوم پزشکی فیض
دوره ۲۸، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۳
صفحات: ۴۱-۳۳
Doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.1.33
اصیل پژوهشی

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II بر باکتری *اسینتوباکتر بومانی* (ATCC19606) در شرایط آزمایشگاهی

مژده صفری [۱]، رباب رفیعی طباطبایی [۱]، حمید ابطحی [۲*]، شهره فهیمی راد [۲]، عباس علیمرادیان [۳]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات مولکولی و پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
[۳] گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۷/۲۳ **اصلاح مقاله:** ۱۴۰۲/۱۰/۱۸ **پذیرش مقاله:** ۱۴۰۲/۱۰/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو (MDR) یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی است. پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) مانند پپتید Oncorhyncin II در درمان پاتوژن‌های MDR معرفی شده‌اند. این مطالعه به‌منظور ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II علیه *اسینتوباکتر بومانی* (ATCC19606) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، برای بیان پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II، سازه ژنی pET32a-Oncorhyncin II به میزبان بیان *اشرشیاکلی BL21* (*DE3*) منتقل شد. مراحل خالص‌سازی با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل (Ni-NTA) بهینه‌سازی شد و اثربخشی پپتید با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)، سنتیک باکتری‌کشی و سنتیک رشد علیه *اسینتوباکتر بومانی* (ATCC19606) ارزیابی گردید.

یافته‌ها: پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II با موفقیت در *E. coli BL21* (DE3) بیان شد. پروتئین مذکور با خلوص بیش از ۷۰ درصد خالص‌سازی گردید. سنجش MIC، عملکرد ضد باکتریایی موثر Oncorhyncin II را علیه *اسینتوباکتر بومانی* در غلظت µg/ml ۹۵/۸۷ تایید کرد. Oncorhyncin II در غلظت ۲ × MIC منجر به کاهش سریع تعداد سلول‌های زنده و کاهش کدورت تلقیح باکتریایی در مطالعات سنتیک باکتری کشی و سنتیک رشد شد.

نتیجه‌گیری: Oncorhyncin II نوترکیب تولید شده عملکرد ضد باکتریایی موثری را علیه *اسینتوباکتر بومانی* نشان داد. بنابراین، نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند برای توسعه و تولید داروهای ضد میکروبی جدید در درمان عفونت‌های ناشی از *اسینتوباکتر بومانی* استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: پپتیدهای ضد میکروبی، پروتئین‌های نوترکیب، *اسینتوباکتر بومانی*

*نویسنده مسئول: **حمید ابطحی**. پست الکترونیک: habtahi2001@yahoo.com
آدرس: مرکز تحقیقات مولکولی و پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

مقدمه

اسینتوباکتر بومانی (*Acinetobacter baumannii*)، یک پاتوژن بیمارستانی فرصت طلب گرم منفی است که به عنوان یکی از شایع ترین عوامل بیماری زا در مراکز بهداشتی و درمانی از آن نام برده می‌شود [۱]. باکتریمی، پنومونی مرتبط با ونتیلاتور و عفونت‌های گردش خون از جمله عفونت‌هایی هستند که ممکن است توسط اسینتوباکتر بومانی رخ دهد که می‌تواند میزان مرگ‌ومیر را تا ۹۲درصد افزایش دهد [۲،۳]. پلی‌میکسین E (کولیستین) یکی از رایج ترین داروها در درمان عفونت های ایجاد شده به وسیله اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو (Multidrug-resistant) است. در سال‌های اخیر، بروز و گسترش عفونت‌های اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو و کاهش گزینه‌های درمانی موجود، به بزرگترین چالش در درمان این عفونت‌ها تبدیل گردیده است. از این رو، محققان ملزم به طراحی و توسعه ضد میکروبی‌های جدید شده‌اند که یکی از آنها پپتیدهای ضدمیکروبی Antimicrobial Peptides (AMPs) هستند [۴،۵]. AMP ها پلی پپتیدهایی آمفی پاتیک، کاتیونیک، با کمتر از ۱۰۰ اسیدآمینه، بخش مهمی از سیستم ایمنی ذاتی میزبان در پیشگیری و مبارزه با عفونت‌ها هستند. AMPها طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضدمیکروبی را علیه باکتری‌های پاتوژن، قارچ‌ها، انگل‌ها و ویروس نشان می‌دهند [۶،۷]. بدین صورت که در باکتری‌های گرم منفی به لیپوپلی ساکاریدهای (LPS) موجود در غشای خارجی باکتری و در باکتری‌های گرم مثبت به تیکوئیک اسیدهای (Teichoic acids) (TA) موجود در لایه پپتیدوگلیکان متصل می‌گردند. همچنین به فسفولیپیدهای دارای بار منفی که به فراوانی در غشای سیتوپلاسمی باکتری یافت می‌شوند، نیز توانایی اتصال دارند. AMPها پس از تجمع در سطح باکتری به‌صورت موازی در کنار یکدیگر قرار گرفته و در نهایت وارد لایه لیپیدی باکتری شده و باعث ایجاد اختلال و بی‌ثباتی در یکپارچگی غشای سلولی می‌گردند [۸]. همچنین، با هدف قرار دادن فعالیت‌های داخل سلولی مانند مهار سنتز دیواره سلولی، مهار سنتز DNA، مهار سنتز پروتئین و مهار فعالیت‌های آنزیمی از طریق اتصال به اسیدنوکلئیک منجر به لیز و مرگ میکروارگانیسم می‌شوند [۹]. گسترش میکروارگانیسم هایی که در برابر AMP ها مقاوم هستند بسیار دشوار است. با توجه به حداقل پتانسیل آنها برای ایجاد مقاومت، طیف وسیعی از فعالیت، تاثیر سریع و سمیت کمتر، AMPها می‌توانند به عنوان نسل جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌های قوی با عملکردهای ضد میکروبی موثر، به جای آنتی‌بیوتیک‌های رایج در نظر گرفته شوند [۱۰]. یکی از این پپتیدهای ضد میکروبی، پپتید Oncorhyncin II با توالی ژن UniProt: P06350 است که از عصاره اسیدی پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان (Oncorhynchus mykiss) استخراج شده است [۹]. پپتید Oncorhyncin II که از انتهای C (کربوکسیل) پروتئین هیستون H1 مشتق شده است، از نظر ساختاری کاتیونی، آمفی‌پاتیک و آلفا هلیکال با وزن مولکولی ۷/۲ کیلو دالتون و دارای ۶۹ اسید آمینه است. مطالعات نشان داده که پپتیدهای مشتق از هیستون نیز مانند سایر AMPها، از طریق برهم کنش الکترواستاتیک با مولکول‌های با بار منفی روی غشاء می توانند اثر مخربی بر انواع غشاء باکتری های گرم مثبت و گرم منفی داشته باشند [۹،۱۱]. لذا هدف از این مطالعه، ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II علیه اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش‌ها

در این مطالعه تجربی (experimental) از پلی‌میکسین E، آمپی‌سیلین تهیه شده از شرکت آلدریچ (امریکا)، نوترینت آگار (NA)، نوترینت براث (NB)، مولر هینتون آگار (MHA)، مولر هینتون براث (MHB) تهیه شده از شرکت مرک (آلمان)، نمک سدیم رزازورین تهیه شده از شرکت سیگما (امریکا) وکیت خالص‌سازی پروتئین رزین نیکل (Ni-NTA) تهیه شده از شرکت کیاژن (آمریکا) استفاده شد.

سویه باکتریایی

در این مطالعه تجربی فعالیت ضد باکتریایی پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II علیه باکتری گرم منفی *اسینتوباکتر بومانی* (ATCC19606) ارزیابی شد. همچنین از باکتری *اشرشیاکلی (Escherichia coli)* سویه *BL21 (DE3)* به عنوان میزبان برای بیان پروتئین نوترکیب استفاده گردید.

بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II

ابتدا توالی آمینواسیدی پروتئین Oncorhyncin II(UniProt: P06350) از سایت uniprot بررسی شد. سپس از سایت‌های بیوانفورماتیکی برای تبدیل توالی پروتئین به اسید نوکلئیک و اپتیمایز کردن بر اساس تمایل کدونی باکتری *اشرشیاکلی* که میزبان بیان کننده آن است، استفاده گردید. همچنین بر اساس مطالعات تجربی و آزمایشگاهی، جهت بیان ژنی مناسب، وکتور بیانی pET32a برای تولید پروتئین نوترکیب انتخاب شد. طبق سفارش، سازه ژنی pET32a-Oncorhyncin II (UniProt: P06350) از شرکت بیوماتیک (کانادا) تهیه شد. برای انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول میزبان *E. coli BL21 (DE3)* ابتدا سلول‌های مستعد (Competent cell) *E.coli. BL21 (DE3)* به روش کلسیم کلراید جهت پذیرش پلاسمید نوترکیب تهیه شد. سازه ژنی *pET32a-Oncorhyncin II* طبق پروتکل استاندارد در سلولهای مستعد *E.coli BL21(DE3)* قرار داده شد [۱۲]. سوسپانسیون فوق در محیط انتخابی نوترینت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت شد و سلول‌های ترنسفورم شده که حامل توالی ژن هدف Oncorhyncin II بودند، طبق پروتکل استاندارد تولید شد [۱۳، ۱۴]. در ادامه ۲ کلنی نوترکیب حامل سازه pET32a-Oncorhyncin II که روی پلیت به همراه آمپی‌سیلین رشد کرده

بود، در ۲ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث دارای آمپی‌سیلین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. روز بعد، ۳۰۰ میکرولیتر از تلقیح باکتریایی به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث (X ۱/۵) دارای آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و در ۲۲۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. هنگامی که تراکم سلولی در ۶۰۰ نانومتر به۰/۶ ~ رسید،۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپیل تیوβ-D-گالاکتوزیداز (IPTG) ۱ میلی‌مولار برای القای بیان پروتئین اضافه شد. سلول‌ها پس از ۴ ساعت انکوباسیون توسط سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه جمع‌آوری شدند. انتقال پروتئین حاصل به ژل الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات-پلی آکریل آمید ۱۲درصد (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) نتایج القایی را تایید کرد. پروتئین نوترکیب تولید شده با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی رزین آگارز (Ni-NTA) و شرایط دناتوره اوره ۸ مولار خالص سازی شد [۱۵]. کیفیت پروتئین تخلیص شده با استفاده از الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) و کمیت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر بررسی شد [۱۶].

بهینه‌سازی تاکردن مجدد پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II

از آنجایی که اوره چین‌خوردگی فعال پروتئین‌ها را از بین می‌برد، بنابراین برای از بین بردن آن، روش دیالیز برای بازیابی مجدد پیتید انجام شد. با در نظر گرفتن این موضوع، بافر فسفات سالین (Phosphate buffered saline) همراه با اسیدآمینه‌های آرژنین، ال- پرولین، سیستین، سیستئین و گلایسین هرکدام با غلظت ۰/۱ مولار و دامنه pH های مختلف ۵، ۶/۵، ۷، ۸/۵، ۹ برای فرایند دیالیز استفاده گردید [۱۷]. دیالیز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انجام شد. برای بهبود اثربخشی دیالیز، PBS هر ۳ ساعت یکبار تعویض گردید. در نهایت پروتئین دیالیز شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای آزمایشات بعدی نگهداری شد. غلظت پروتئین نوترکیب تا شده در داخل کیسه دیالیز، توسط یک فیلتر سانتریفیوژ آمیکون با اندازه منافذ ۱۰ کیلودالتون افزایش یافت [۱۸, ۱۹].

سنجش فعالیت ضد باکتریایی پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) (Minimum Inhibitory Concentration) علیه *اسینتوباکتر بومانی* (ATCC19606) به روش میکروبراث دایلوشن بر اساس دستورالعمل‌های مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (Clinical and Laboratory Standards Institute) MO7-A10 (CLSI) اندازه‌گیری شد [۲۰،۲۱]. کلنی‌های *اسینتوباکتر بومانی* (ATCC19606) در محیط مولرهینتون براث کشت شدند و تا زمانی که چگالی نوری کشت در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۱ (۱×۱۰^{۸} سلول در میلی‌لیتر) برسد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس سوسپانسیون باکتری با استفاده از مولر هینتون براث به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شد تا تعداد سلول‌ها به ۱×۱۰^{۶} سلول در میلی لیتر برسد. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث استریل (X ۲) به تمام چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه ای از شماره ۱ تا ۱۰ ریخته شد. سپس۵۰ میکرولیتر از پروتئین نوترکیب تغلیظ شده Oncorhyncin II در چاهک اول ریخته شد و تا چاهک شماره ۱۰ رقیق سازی انجام گرفت و ۵۰ میکرولیتر از چاهک شماره ۱۰ دور ریخته شد. در انتها ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری به چاهک‌های شماره ۱ تا ۱۰ اضافه شد. علاوه بر آن، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث استریل به چاهک شماره ۱۱ به‌عنوان کنترل منفی و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به چاهک شماره ۱۲ به‌عنوان کنترل مثبت اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۲۰ میکرو لیتر رنگ رزازورین ۰/۰۲ درصد (w/v) به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت دیگر انکوبه گردید و غلظت هر گروه تیمار در آخرین چاهک آبی رنگ، به‌عنوان مقدار MIC در نظر گرفته شد [۲۲]. همچنین حداقل غلظت بازدارنده پلی‌میکسین E علیه *اسینتوباکتر بومانی* به روش میکروبراث دایلوشن مطابق با CLSI تعیین شد [۲۰]. برای ارزیابی حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) (Minimum Bactericidal Concentration)، ۱۰۰ میکرولیتر از محتوای چاهک آبی میکروپلیت مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی و چاهک‌هایی با غلظت بالاتر ترکیب ضدمیکروبی، در محیط مولر هینتون آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت شدند. کمترین غلظت ترکیب ضدمیکروبی که ۹۹/۹٪ از یک ارگانیسم خاص را می‌کشد به عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی ثبت شد. فعالیت باکتری‌کشی بر اساس نسبت MBC تقسیم بر MIC تعریف شد (MBC/MIC =۲یا۱ باکتریواستاتیک، MBC/MIC= ۱۶یا۴ باکتری کش) [۲۳،۲۴].

سنتیک باکتری‌کشی پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II

برای تعیین زمان مرگ باکتری *اسینتوباکتر بومانی* توسط Oncorhyncin II، منحنی کشتن در زمان با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریزم نسخه ۹ ترسیم گردید. بدین صورت که تلقیح اولیه از کشت باکتری با چگالی نوری ۰/۱ (۱×۱۰^{۸} سلول در میلی لیتر) تهیه و سپس به نسبت ۱:۱۰۰رقیق شد. به میکروتیوپ‌های جداگانه حاوی باکتری مورد مطالعه، غلظت ۲ برابر MIC از پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II تولید شده اضافه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در ۰، ۰/۵، ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۱ و ۲۰ ساعت روی محیط مولر هینتون آگار کشت شدند و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، کلنی‌های هر پلیت شمارش گردید. همچنین از کشت باکتری بدون هیچگونه افزودنی به عنوان کنترل منفی و کشت باکتری همراه با پلی میکسین E (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید [۲۵]. آزمون ۳ مرتبه تکرار شد. برای اینکه فعالیت ضدباکتریایی در نظر گرفته شود، باید در

مقایسه با تلقیح اصلی، میزان باکتری ۱۰ log ۱ ≤ کاهش یابد.

سنتیک رشد پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II

برای تعیین اثر پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II تولید شده بر روی الگوی رشدی باکتری *اسینتوباکتربومانی*، از روش مقایسه منحنی رشد این ماده علیه باکتری مذکور در مقایسه با سلول‌های باکتریایی تیمار نشده با هیچ عامل ضدمیکروبی، استفاده شد. بدین صورت که کشت باکتری با کدورت ۰/۶ در ۶۰۰ نانومتر تهیه و با محیط مولر هینتون براث رقیق گردید تا غلظت سلولی به ۰/۱ در ۶۰۰ نانومتر (۱×۱۰^{۸} سلول در میلی‌لیتر) برسد. سوسپانسیون تهیه شده در لوله های جداگانه ریخته و به هر لوله غلظت ۲ برابر MIC از پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II اضافه گردید. در فواصل زمانی ۰، ۱، ۳،۵، ۷، ۱۱ و ۲۰ ساعت، کدورت کشت باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد و بر اساس آن منحنی رشد با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریزم نسخه۹ ترسیم گردید. همچنین از پلی میکسین E (۱ گرم در میلی لیتر) به‌عنوان کنترل مثبت و باکتری تیمار نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد [۱۳]. این آزمون نیز ۳ مرتبه تکرار گردید.

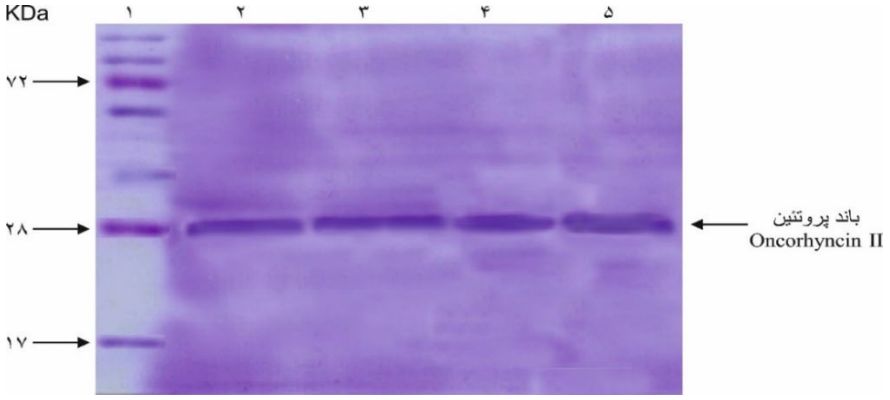
محاسبات آماری

داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) مقایسه شدند. نتایج با P-value کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. تجزیه‌وتحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریزم نسخه ۹ انجام شد.

نتایج

بیان، خالص‌سازی و بهینه‌سازی تا کردن مجدد پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II در اشرشیاکلی

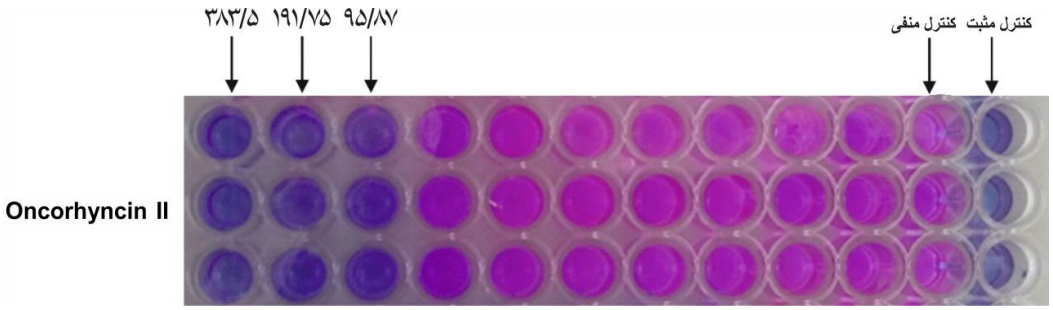
با توجه به یافته های دیالیز در PBS، ترکیب آمینواسیدهای آرژنین و ال-پرولین هرکدام با غلظت ۰/۱ مولارو pH برابر ۸/۵ حداکثر کارایی پروتئین را داشت. پروتئین حاصل پس از تغلیظ با استفاده فیلتر سانتریفیوژ آمیکون با اندازه منافذ ۱۰ کیلودالتون، غلظت ۷۶۷ µg/ml داشت. حضور باندهای خاص در ژل SDS-PAGE نشان داد که پروتئین هدف Oncorhyncin II (۲۸ کیلو دالتون) به طور موثر بیان شده است (شکل ۱).



شکل ۱. نتایج حاصل از تخلیص، دیالیز و تغلیظ پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II بر روی ژل SDS
چاهک ۱: مارکر پروتئینی رنگی۱۰ تا ۲۵۰ کیلودالتون، چاهک ۲ و ۳: تخلیص پروتئین نوترکیب در فازهای C1 و D1
چاهک ۴: دیالیز پروتئین نوترکیب، چاهک ۵: تغلیظ پروتئین نوترکیب

سنجش فعالیت ضدباکتریایی پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II

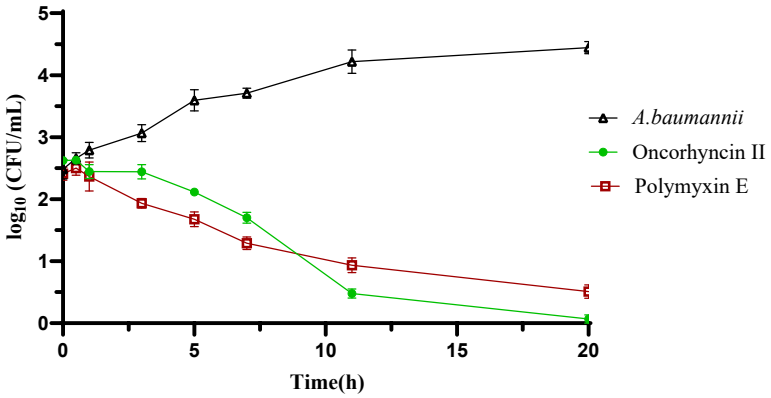
همان‌طور که در شکل ۲ آمده است، مقدار MIC و MBC برای پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II علیه اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) به ترتیب ۹۵/۸۷µg/ml و ۳۸۳/۵ µg/ml بدست آمد. همچنین مقدار MIC پلی میکسین E نیز µg/ml ۰/۵ بود. بر اساس نتایج MBC و نسبت MBC/MIC >۴ مشخص شد که Oncorhyncin II اثر باکتری‌کشی دارد.



شکل ۲. نتایج حاصل از آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برای پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II بر روی باکتری A. baumannii (ATCC19606) (اعداد ذکر شده برحسب µg/ml)

سنتیک باکتری‌کشی پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II

یافته‌های سنتیک باکتری‌کشی علیه اسینتوباکتر بومانی در غلظت ۲ برابر MIC از Oncorhyncin II از نظر تغییرات در log ۱۰CFU/mL سلول‌های زنده در نمودار ۱ ارائه شده است. Oncorhyncin II باعث بیش از ۵ کاهش در log ۱۰ CFU/mL طی ۱۱ ساعت و مرگ سلولی طی ۲۰ ساعت شد. همچنین پلی‌میکسین E در غلظت ۲ برابر از MIC خود، پس از ۱۱ ساعت log ۱۰CFU/mL را کاهش داد و در طول زمان تغییر قابل‌توجهی در تعداد کلنی‌ها ایجاد نکرد. تجزیه‌وتحلیل آماری و مقایسه میانگین بین پلی‌میکسین E و Oncorhyncin II تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱).



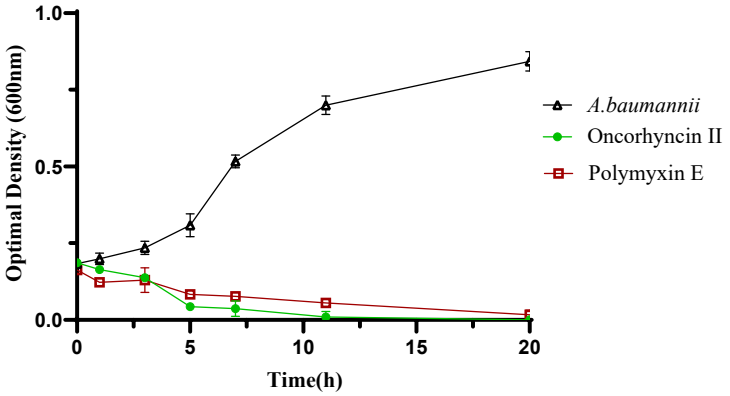
نمودار ۱. نتایج سنتیک باکتری‌کشی علیه باکتری A. baumannii (ATCC19606) در غلظت ۲ برابر MIC از پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II. مثلث‌های باز نشان‌دهنده کنترل، مربع‌های باز نشان‌دهنده پلی‌میکسین E (۱ µg/ml)، دایره‌های پر نشان‌دهنده Oncorhyncin II (۱۹۱/۷۴µg/ml)

جدول ۱. نتایج واریانس یکطرفه برای مقایسه میانگین تغییرات درlog ۱۰ CFU/mL گروه ها

متغیر	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	مقدار P
log ۱۰ تعداد سلول	۱۳/۹۳	۲	۶/۹۶۵	۹/۹۹۸	۰/۰۰۰۹

سنتیک رشد پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II

همانطور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، Oncorhyncin II کدورت کشت سلولی اسینتوباکتر بومانی را تا ۹۵درصد پس از ۵ ساعت کاهش داد. علاوه بر این، پلی میکسین E در غلظت ۲ برابر از MIC خود باعث کاهش کدورت سلولی پس از ۱۱ ساعت گردید. نتایج تحلیل واریانس یکطرفه نشان داد که بین تمام گروه‌های مورد آزمایش از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵) (جدول ۲).



نمودار ۲. نتایج سنتیک رشد علیه باکتری *A. baumannii* (ATCC19606) در غلظت ۲ برابر MIC از پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II

مثلث‌های باز نشان‌دهنده کنترل، مربع‌های باز نشان‌دهنده پلی‌میکسین E (۱ µg/ml)، دایره‌های پر نشان‌دهنده Oncorhyncin II (۱۹۱/۷۴µg/ml)

جدول ۲. نتایج واریانس یک‌طرفه برای مقایسه میانگین تغییرات در کدورت سلولی گروه‌ها

متغیر	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	مقدار P
کدورت سلولی	۰/۵۳۶۷	۲	۰/۲۶۸۴	۱۰/۳۰	۰/۰۰۱

بحث

پپتیدهای ضد میکروبی یک کلاس جدید امیدوارکننده از عوامل درمانی مشتق شده طبیعی با فعالیت‌های ضد باکتریایی گسترده هستند که می‌توانند به عنوان جایگزین‌های احتمالی برای آنتی‌بیوتیک‌های تجاری مورد توجه قرار گیرند. AMPs پلی‌پپتیدهایی کاتیونی با کمتر از ۱۰۰ اسید آمینه هستند [۲۶]. AMP های کاتیونی با لیپوپلی ساکارید در غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی برهم کنش می‌کنند تا تأثیر مستقیمی بر غشای باکتری داشته باشند. بی ثباتی ساختار غشای باکتری ناشی از اتصال AMP ها امکان جذب درون سلولی آنتی بیوتیک‌ها را فراهم می‌کند [۲۷]. Oncorhyncin II یکی از AMPهای قوی با دامنه فعالیت های ضد میکروبی متنوع است [۹]. در این مطالعه برای اولین بار فعالیت ضدمیکروبی پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II علیه اسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت تا چشم اندازی جهت کشف درمان های جایگزین علیه اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو باشد. در مطالعه حاضر، پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II به طور موثر در باکتری E. coli DE3 زیرگونه BL21 به عنوان میزبان بیان تولید شد. پروتئین نوترکیب سنتز شده در این سویه تجزیه نمی‌شود زیرا این سویه فاقد پروتئازهای متصل به غشاء است [۲۸]. در ادامه مراحل خالص‌سازی، پروتئین نوترکیب با خلوص بیش از ۷۰ درصد از طریق کروماتوگرافی تمایلی نیکل به دست آمد [۲۹]. لازم به ذکر است که استفاده از فناوری نوترکیب برای تولید این پروتئین‌ها دارای اشکالاتی مانند کاهش فعالیت آنها به دلیل از بین رفتن ساختار طبیعی پروتئین در طول فرآیندهای تولید و خالص سازی است. برای حل این مشکل، ساختار پروتئین باید پس از مرحله خالص سازی با استفاده از فرآیند دیالیز و حذف عواملی مانند اوره، مجدد تا شود تا عملکرد پروتئین افزایش یابد. در مطالعه حاضر، آزمایش‌ها بر روی فعالیت ضد باکتریایی پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II نشان داد که تا شدن مجدد در بافر فسفات سالین با pH برابر ۸/۵ و همچنین افزودن اسیدآمینه های آرژنین و ال- پرولین (هر کدام با غلظت ۰/۱ مولار)، منجر به تولید پروتئین‌های مثبت و فعال‌تر شد که در مطالعات قبلی نیز تایید شده است [۱۳،۱۶]. ال-پرولین با اتصال به سطح آبگریز پروتئین باعث پایداری و جلوگیری از تداخل و در نهایت تسهیل تا زدن مجدد پروتئین‌ها می‌گردد. آرژنین از طریق برهمکنش با سطح آبدوست پپتید به حفظ شکل محلول پروتئینی و جلوگیری از رسوب و تجمع پروتئین ها کمک می‌کند. نکته مهم این است که تا کردن مجدد پپتیدهای ضد میکروبی با نقطه ایزوالکتریک آن همبستگی مستقیم دارد. بنابراین، وجود اسیدهای آمینه آرژنین و ال- پرولین به پروتئین اجازه می‌دهد تا با دقت در pH بهینه خود تا شود [۳۰].

برای تأیید نتایج MIC، بررسی سنتیک باکتری‌کشی و سنتیک رشد، با اعمال غلظت ۲ برابر MIC از پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II علیه باکتری اسینتوباکتربومانی (ATCC19606) صورت گرفت که نتایج حاصل از هر ۳ تست با یکدیگر هم‌خوانی داشت. پروتئین مذکور، دارای اثر ضد باکتریایی بالقوه موثری علیه اسینتوباکتر بومانی بود و در مقایسه با پلی‌میکسین E به عنوان آنتی‌بیوتیک کنترل در برابر باکتری مورد مطالعه ما، پتانسیل باکتری‌کشی قابل‌توجه‌تری را در زمان کوتاه‌تر نشان داد. تحقیقات متعدد ثابت کرده که پروتئین‌ها و پپتیدهای مشتق از هیستون در برابر طیف گسترده‌ای از باکتری‌های پاتوژن مهم ماهی، از جمله گونه‌های خاصی از جنس ویبریو و آئروموناس (مانند ویبریو آنگیلاروم، ویبریو آلژینولیتیکوس، آئروموناس هیدروفیلا، آئروموناس سالمونیسیدا) مؤثر هستند [۱۱،۳۱،۳۲].

Robinette و همکاران ۳ پروتئین ضدباکتریایی به نام‌های HLP-1،HLP-2 وHLP-3 را که فراوان‌ترین پروتئین مرتبط با هیستون بودند، از عصاره‌های اسیدی گربه‌ماهی جداسازی کردند، طی مطالعه آنها HLP-1 و HLP-2 به ترتیب شباهت زیادی به هیستون‌های H2B و H1 جدا شده از قزل‌آلای رنگین‌کمان داشت. این پروتئین‌ها طیف گسترده‌ای از فعالیت را در برابر باکتری‌های بیماری‌زای ماهی (ویبریو و آئروموناس)، کپک‌های آبی (ساپرولگنیا) و انگل‌ها (آمیلواودینوم) در غلظت‌های بافتی نشان دادند [۱۱]. Fernandes و همکاران نیز نشان دادند که Oncorhyncin II مشتق از هیستون H1، به دست آمده از ترشح پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان، در برابر باکتری‌های گرم منفی (مانند اشرشیاکلی و ویبریو آنگیلاروم) با MIC μM ۰/۴– ۰/۸ فعال است [۹]. در مطالعه‌ای که توسط Jacobsen و همکاران بر روی باکتری های جداشده از زخم های سوختگی انجام شد، هیستون H1.2 دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر سویه مرجع سودوموناس آئروژینوزا بود. همچنین در بررسی فعالیت همولیتیک، هیستون H1.2 کمترین آسیب را به گلبول‌های قرمز انسانی نشان داد (متوسط ۲درصد). آنها تایید کردند که اختلال در دیواره سلولی باکتری ناشی از هیستون H1.2 وابسته به غلظت پپتید می باشد. طی نتایج آنها هیستون H1.2 می‌تواند در درمان عفونت زخم به عنوان جایگزین یا مکمل آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده استفاده گردد [۳۳]. در مطالعه Noga و همکاران، هویت دو پروتئین شبه هیستون به نام‌های H2B و H1 از ماهی شناسایی شد. پروتئین شبه H2B بیشترین اثر بازدارنده را بر آئروموناس هیدروفیلا و ساپرولگنیا که پاتوژن باکتریایی و قارچی مهم ماهی بودند، داشت [۳۴]. در بررسی دیگری مشخص گردید که هیستون

استخراج شده از بیضه نابالغ ماهی قزل‌آلای اقیانوس اطلس فعالیت مهاری قابل‌توجهی را علیه سودوموناس پوتیدا و استافیلوکوکوس اورئوس داشت و با افزایش غلظت هیستون، مهار بهبود یافت. همچنین در مطالعات سینتیکی مقدار چگالی نوری سوسپانسیون باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با هیستون استخراج شده در مقایسه با سوسپانسیون باکتری بدون هیستون بسیار کندتر افزایش یافت [۳۵]. بررسی اثر Oncorhyncin II نوترکیب در درمان عفونت‌های پوستی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) توسط جعفری و همکاران، نشان داد که Oncorhyncin II، بهبود چشمگیری در زخم موش‌های آلوده به عفونت موضعی توسط MRSA ایجاد کرد [۱۲]. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر با مطالعات قبلی منطبق بود. به نظر می‌رسد با عنایت به نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه، و انجام تحقیقات بیشتر بتوان از Oncorhyncin II نوترکیب به عنوان آنتی بیوتیک جدید، به تنهایی یا به‌عنوان مکمل آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده برای کنترل و درمان عفونت‌های مقاوم به دارو ناشی از اسینتوباکتر بومانی مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از آزمون‌های حداقل غلظت مهارکنندگی، سنتیک باکتری کشی و سنتیک رشد، در این پژوهش نشان داد که پروتئین نوترکیب Oncorhyncin II به طور بالقوه دارای اثر ضد باکتریایی قوی و سریع بر روی باکتری *اسینتوباکتر بومانی* (ATCC19606)، در مقایسه با آنتی بیوتیک پلی میکسین E، است.

تشکر و قدردانی: این مطالعه برگرفته از رساله دکتری تخصصی نویسنده اول در گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال (کد پایان نامه۱۶۲۴۹۱۸۹۹) است. نویسندگان از همکاری دانشگاه علوم پزشکی اراک و پرسنل محترم آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی در انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

نقش نویسندگان: همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می کنند که هیچ گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Breslow JM, Meissler Jr JJ, Hartzell RR, Spence PB, Truant A, Gaughan J, et al. Innate immune responses to systemic Acinetobacter baumannii infection in mice: neutrophils, but not interleukin-17, mediate host resistance. Infect Immun. 2011; 79(8): 3317-27. doi:10.1128/IAI.00069-11 PMid:21576323 PMCid:PMC3147579
2. Zordan S, Prenger-Berninghoff E, Weiss R, van der Reijden T, van den Broek P, Baljer G, et al. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in veterinary clinics, Germany. Emerg infect Dis. 2011; 17(9):1751. doi:10.3201/eid1709.101931 PMid:21888812 PMCid:PMC3322069
3. Safari M, Shojapour M, Akbari M, Pourbabaee A, Abtahi H. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamase among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Markazi province, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2013;6(8). doi:10.5812/jjm.7182
4. López-Rojas R, Jiménez-Mejías ME, Lepe JA, Pachón J. Acinetobacter baumannii resistant to colistin alters its antibiotic resistance profile: a case report from Spain. J Infect Dis. 2011; 204(7):1147-8. doi:10.1093/infdis/jir476 PMid:21881133
5. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, et al. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of Acinetobacter baumannii mediated by the pmrAB two-component regulatory system. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55 (7):3370-9. doi:10.1128/AAC.00079-11 PMid:21576434 PMCid:PMC3122444
6. Spencer JJ, Pitts RE, Pearson RA, King LB. The effects of antimicrobial peptides WAM-1 and LL-37 on multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Pathog Dis. 2018;76(2): fty007. doi:10.1093/femspd/fty007 PMid:29370365
7. Albatineh A, Sohrabi R, Baghi V, Ghanei Gheshlagh R. Effect of vitamin D on Helicobacter pylori infection and eradication: An updated systematic review and meta-analysis. Novel Clin Med, 2023; 2(3): 155-162. doi: 10.22034/ncm.2023.385278.1074
8. Ding B, Soblosky L, Nguyen K, Geng J, Yu X, Ramamoorthy A, et al. Physiologically-relevant modes of membrane interactions by the human antimicrobial peptide, LL-37, revealed by SFG experiments. Sci Rep. 2013;3(1):1854. doi:10.1038/srep01854 PMid:23676762 PMCid:PMC3655398
9. Fernandes JM, Molle G, Kemp GD, Smith VJ. Isolation and characterisation of oncorhyncin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Dev Comp Immunol. 2004;28(2):127-38 doi:10.1016/S0145-305X(03)00120-4 PMid:12969798
10. Waghu FH, Joseph S, Ghawali S, Martis EA, Madan T, Venkatesh KV, et al. Designing antibacterial peptides with enhanced killing kinetics. Front Microbiol. 2018;9:325 doi:10.3389/fmicb.2018.00325 PMid:29527201 PMCid:PMC5829097
11. Robinette D, Wada S, Arroll T, Levy M, Miller W, Noga E. Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish Ictalurus punctatus: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. Cell Mol Life Sci CMLS. 1998; 54:467-75. doi:10.1007/s000180050175 PMid:9645227
12. Mahmoudi S, Abtahi H, Bahador A, Mosayebi G, Salmanian A. Production of recombinant streptokinase in E. coli and reactivity with immunized mice. Pak J Biol Sci. 2010; 13(8): 380-4. doi:10.3923/pjbs.2010.380.384 PMid:20836298
13. Jafari SF, Ghaznavi-Rad E, Fahimirad S, Abtahi H. Recombinant oncorhyncin II effect on the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infection. Jundishapur J Microbiol. 2020; 13(4). doi:10.5812/jjm.95948

14. Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using Escherichia coli. Protein Sci. 2009;18(5):936-48. doi:10.1002/pro.102 PMid:19384993 PMCid:PMC2771296
15. Farjadi V, Abtahi H, Zolfaghari M, Soufian S, Hasanzadeh L. Expression, purification and evaluation of antigenicity of CagA antigenic fragment of. Helicobacter Pylori. 2013:1-6. doi:10.5812/jjm.7367
16. Fahimirad S, Ghaznavi-Rad E, Abtahi H, Sarlak N. Antimicrobial activity, stability and wound healing performances of chitosan nanoparticles loaded recombinant LL37 antimicrobial peptide. Int J Peptide Res Ther. 2021; 27(4):2505-15. doi:10.1007/s10989-021-10268-y
17. Yamaguchi H, Miyazaki M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. Biomolecules. 2014;4(1):235-51. doi:10.3390/biom4010235 PMid:24970214 PMCid:PMC4030991
18. Satei P, Ghaznavi-Rad E, Fahimirad S, Abtahi H. Recombinant production of Trx-Ib-AMP4 and Trx-E50-52 antimicrobial peptides and antimicrobial synergistic assessment on the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus under in vitro and in vivo situations. Protein Expr Purif. 2021; 105949. doi:10.1016/j.pep.2021.105949 PMid:34324967
19. Abtahi H, Salmanian AH, Rafati S, Behzadian Nejad G, Mohammad Hassan Z. High level expression of recombinant ribosomal protein (L7/L12) from Brucella abortus and its reaction with infected human sera. Iran Biomedical J. 2004; 8(1): 8-13.
20. Clinical, Institute LS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA; 2012.
21. Abtahi H, Ghazavi A, Karimi M, Mollaghasemi S, Mosayebi G. Antimicrobial activities of water and methanol extracts of bitter apricot seeds. J Med Sci. 2008;8(4):433-6. doi:10.3923/jms.2008.433.436
22. Dangel A, Ackermann N, Abdel-Hadi O, Maier R, Önder K, Francois P, et al. A de novo-designed antimicrobial peptide with activity against multiresistant Staphylococcus aureus acting on RsbW kinase. FASEB J. 2013;27(11):4476-88. doi:10.1096/fj.13-234575 PMid:23901070
23. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. Biotechnol Lett. 2016;38:1015-9. doi:10.1007/s10529-016-2079-2 PMid:26969604 PMCid:PMC4853446
24. Fahimirad S, Razavi SH, Abtahi H, Alizadeh H, Ghorbanpour M. Recombinant production and antimicrobial assessment of beta casein-IbAMP 4 as a novel antimicrobial polymeric protein and its synergistic effects with thymol. Int J Peptide Res Ther. 2018;24:213-22. doi:10.1007/s10989-017-9605-5
25. Gopal R, Kim YG, Lee JH, Lee SK, Chae JD, Son BK, et al. Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric peptides against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strains. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(3):1622-9. doi:10.1128/AAC.02473-13 PMid:24366740 PMCid:PMC3957903
26. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol. 2003;3(9):710-20. doi:10.1038/nri1180 PMid:12949495
27. Guo Y, Wang L, Lei J, Xu J, Han L. Antimicrobial and antibiofilm activity of human cationic antibacterial peptide (Ll-37) and its analogs against Pan-Drug-resistant Acinetobacter baumannii. Jundishapur J Microbiol. 2017;10(3). doi:10.5812/jjm.35857
28. Ranjbaran M, Zolfaghari M, Japoni-Nejad A, Amouzandeh-Nobaveh A, Abtahi H, Nejad M, et al. Molecular investigation of integrons in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from urinary tract infections. J Mazandaran Univ Med Sci. 2013; 23(105):7-10.
29. Miragaia M. Factors contributing to the evolution of mecA-mediated β-lactam resistance in staphylococci: update and new insights from whole genome sequencing (WGS). Front Microbiol. 2018;9:2723. doi:10.3389/fmicb.2018.02723 PMid:30483235 PMCid:PMC6243372
30. Sadeghi S, Bakhshandeh H, Ahangari Cohan R, Peirovi A, Ehsani P, Norouzian D. Synergistic anti-staphylococcal activity of niosomal recombinant lysostaphin-LL-37. Int J Nanomedicine. 2019:9777-92. doi:10.2147/IJN.S230269 PMid:31849468 PMCid:PMC6911324
31. Birkemo GA, Lüders T, Andersen Ø, Nes IF, Nissen-Meyer J. Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus L.). Biochim Biophys Acta. 2003;1646(1-2):207-15. doi:10.1016/S1570-9639(03)00018-9
32. Lüders T, Birkemo GA, Nissen-Meyer J, Andersen Ø, Nes IF. Proline conformation-dependent antimicrobial activity of a proline-rich histone h1 N-terminal Peptide fragment isolated from the skin mucus of Atlantic salmon. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(6):2399-406. doi:10.1128/AAC.49.6.2399-2406.2005 PMid:15917539 PMCid:PMC1140541
33. Jacobsen F, Baraniskin A, Mertens J, Mittler D, Mohammadi-Tabrisi A, Schubert S, et al. Activity of histone H1. 2 in infected burn wounds. J Antimicrob Chemother. 2005;55(5):735-41. doi:10.1093/jac/dki067 PMid:15772144
34. Noga EJ, Borron PJ, Hinshaw J, Gordon WC, Gordon LJ, Seo J-K. Identification of histones as endogenous antibiotics in fish and quantification in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) skin and gill. Fish Physiol Biochem. 2011;37:135-52 doi:10.1007/s10695-010-9422-7 PMid:20711849
35. Fu B, Lin H, Ramesh Pavase T, Mi N, Sui J. Extraction, identification, modification, and antibacterial activity of histone from immature testis of Atlantic salmon. Mar Drugs. 2020; 18(3): 133. doi:10.3390/md18030133 PMid:32111010 PMCid:PMC7142871

How to Cite this Article:
safari M, Rafiei Tabatabaei R, abtahi H, Fahimirad S, Alimoradian A. Evaluation of the antibacterial activity of recombinant protein oncorhyncin II against Acinetobacter baumannii (ATCC19606) under in vitro conditions. Feyz Med Sci J. 2024; 28(1):33-41. doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.1.33