



طراحی بیوانفورماتیکی و تأیید بیان کلراتوکسین B-لینکر-انتروتوکسین A-لیگاند در گونه صنوبر (*Populus euramericana* (Dode) Guinier)

هانیه شاه‌قبادی^{۱*}، وحید اعتماد^۲، داود اسماعیلی^۳ و انوشیروان شیروانی^۴

^۱دکتری گروه جنگلداری و اقتصاد جنگل، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۲دانشیار گروه جنگلداری و اقتصاد جنگل، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۳استاد گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۴دانشیار گروه جنگلداری و اقتصاد جنگل، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۰)

چکیده

مقدمه: با توجه به افزایش مقاومت دارویی، نیاز به شناسایی داروهای ضدسرطانی جدید و یافتن راهبردهای درمانی نو برای مقابله با آنها افزایش یافته است. بسیاری از باکتری‌ها پپتیدهایی به نام توکسین تولید می‌کنند که دارای اثرهای ضدتوموری بر برخی رده‌های سلول‌های سرطانی هستند. با وجود پیشرفت‌های فراوان در زمینه درمان سرطان، محدودیت‌های موجود در روش‌ها و ترکیبات ضدسرطانی متداول، توجه محققان را به ترکیبات ضدسرطانی طبیعی، به‌ویژه انتروتوکسین‌ها، معطوف کرده است. هدف این پژوهش طراحی و تأیید بیان پروتئین فیوژن Anticancer-cTxB-linker-enTA-Ligand در گونه صنوبر، یکی از اقتصادی‌ترین درختان جهان است. این گونه به‌دلیل رشد سریع، از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار است و برای سرمایه‌گذاری میان‌مدت و بلندمدت استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها: به‌منظور طراحی پروتئین مدنظر، ابتدا توالی انتروتوکسین A و کلراتوکسین B از پایگاه داده ژنومی NCBI استخراج شد. سپس یک توالی لینکر، برای افزایش انعطاف‌پذیری و نگهداری ساختار بین دو توالی انتروتوکسین قرار گرفت و یک توالی ضدسرطانی برای افزایش خاصیت ضدتوموری به ژن اضافه شد. در نهایت ژن فیوژن نوترکیب سنتز شد و مراحل بیان و تخلیص انجام گرفت. بیان پروتئین نوترکیب مدنظر با SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پروتئین فیوژن طراحی‌شده از ساختار مناسب و پایداری فیزیکی‌شیمیایی مطلوبی برخوردار است و در شرایط شبیه‌سازی‌شده آبی مقاومت زیادی از خود نشان می‌دهد. افزون بر این، موفقیت انتقال وکتور نوترکیب با استفاده از کلنی PCR تأیید شد و مشاهده باند واضح ۲۳۸ جفت‌باز، نشان‌دهنده حضور ژن فیوژن نوترکیب بود. نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات نیز به‌وضوح بیان موفقیت‌آمیز پروتئین نوترکیب با وزن مولکولی ۴۷ کیلودالتون را در برگ‌های صنوبر تأیید کردند.

نتیجه‌گیری: پروتئین فیوژن حاصل از ترکیب انتروتوکسین A و کلراتوکسین B به‌همراه توالی ضدسرطانی، خواص ضدتوموری چشمگیری دارد. از این‌رو، ارزیابی‌های پیش‌بالینی، شامل آزمون‌های حیوانی، به‌منظور ارزیابی امکان استفاده از این ترکیب به‌عنوان راهکار مکمل یا جایگزین در درمان سرطان در حال انجام است.

واژه‌های کلیدی: انتروتوکسین، آگرواینفیلتراسیون، فعالیت ضدسرطانی.

مقدمه

سرطان یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های سلامت عمومی در جهان امروز است و عامل بخش بزرگی از مرگ‌ومیرها محسوب می‌شود (Bray et al., 2018). با وجود پیشرفت‌های چشمگیر علم پزشکی، درمان قطعی و مؤثر بسیاری از انواع سرطان همچنان دور از دسترس است. روش‌های رایج درمانی مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی، در افزایش طول عمر بیماران مؤثرند، اما به دلیل آسیب به سلول‌های سالم، عوارض جانبی متعدد و ظهور مقاومت دارویی در سلول‌های سرطانی، با محدودیت‌های جدی روبه‌رو هستند (Siegel et al., 2020). از این‌رو، تلاش برای توسعه روش‌های درمانی جدید با عوارض کمتر و قابلیت هدفگیری دقیق و اختصاصی سلول‌های سرطانی به یکی از اولویت‌های پژوهشی تبدیل شده است (Hanahan & Weinberg, 2011).

در این زمینه، بیوانفورماتیک در جایگاه یکی از شاخه‌های پیشرو زیست‌فناوری، امکان تحلیل و طراحی مولکول‌ها و پروتئین‌های نو ترکیب با ویژگی‌های خاص درمانی را فراهم ساخته است. بیوانفورماتیک با استفاده از ابزارهای محاسباتی و شبیه‌سازی‌های پیشرفته، به محققان کمک می‌کند تا پیش از ورود به آزمایش‌های عملی، خواص فیزیکوشیمیایی، پایداری و سازوکار عملکرد ترکیبات درمانی را بررسی کنند. این امر تأثیر اساسی در بهینه‌سازی فرایند ساخت داروهای ضدسرطان با هدفگیری دقیق و ایمنی زیاد دارد (Lionta et al., 2014; Reddy & Zhang, 2013; Hajieghrari et al., 2026).

با توجه به پیچیدگی‌های روش‌های درمانی رایج، استفاده از ترکیبات طبیعی به‌عنوان گزینه‌های جدید درمانی در مقابله با سرطان توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. از جمله این ترکیبات، توکسین‌های باکتریایی مانند انتروتوکسین A از استافیلوکوکوس اورئوس و کلراتوکسین B از ویبریو کلرا هستند که پتانسیل‌های چشمگیری در زمینه القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و ایجاد اثرهای ضدتوموری نشان داده‌اند (Michl & Gress, 2004). این

توکسین‌ها، به‌دلیل هدفگیری اختصاصی تر و عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمی‌درمانی متداول، به‌عنوان گزینه‌های درمانی نوین و کارآمد مطرح شده‌اند و می‌توانند به بهبود کیفیت زندگی بیماران کمک کنند (Yin & Thaker, 2023). تولید ایمن و اقتصادی این ترکیبات با استفاده از سیستم‌های زیستی جدید، از اولویت‌های پژوهشی به شمار می‌آید. به‌منظور دستیابی به روش‌های ایمن و مقرون به‌صرفه برای تولید ترکیبات دارویی، زراعت مولکولی نیز به‌منزله یکی از حوزه‌های مهم در علم زیست‌فناوری، با هدف تولید پروتئین‌ها و ترکیبات دارویی در گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک مطرح شده است (Hood et al., 2002). این روش با بهره‌گیری از گیاهان به‌عنوان میزبان‌های تولید پروتئین‌های نو ترکیب، امکان تولید انبوه و ایمن ترکیبات دارویی را با هزینه‌ای به‌مراتب کمتر فراهم می‌کند (Sainsbury & Lomonossoff, 2014). از آنجا که بازده تولید پروتئین در سیستم‌های گیاهی محدود است، پژوهشگران در پی استفاده از سیستم‌های بیان کلروپلاستی و سایر اندامک‌ها برای افزایش بازده و کارایی تولید این ترکیبات در گیاهان هستند (Daniell et al., 2001). این پژوهش با هدف ارزیابی قابلیت استفاده از برگ درخت صنوبر (*Populus euramericana*) به‌عنوان یک سامانه گیاهی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب ضدسرطان انجام گرفته است. گونه صنوبر به‌دلیل رشد سریع، بازده اقتصادی مناسب و توانایی تکثیر آسان از طریق قلمه‌زنی، به گزینه‌ای مطلوب در زراعت چوب و تولیدات زیستی تبدیل شده است (Jansson & Douglas, 2007; Taylor, 2002; Shahghobadi et al., 2025). یک گونه هیبرید است که ویژگی‌های منحصربه‌فردی از والدین خود را به ارث برده که ممکن است به افزایش سطح بیان صفات مدنظر، از جمله تولید پروتئین‌های خاص مانند عوامل ضدسرطان، کمک کند. این تنوع ژنتیکی همچنین می‌تواند مقاومت در برابر تنش و سازگاری با شرایط محیطی مختلف را افزایش دهد (Bonhomme et al., 2009).

هدف اصلی این تحقیق، طراحی و بررسی بیان کلراتوکسین B- لینکر- انتروتوکسین A- لیگاند در برگ صنوبر است؛ ترکیبی که به عنوان روشی نوین در تولید پروتئین‌های ضدسرطان می‌تواند نیاز به زیرساخت‌های آزمایشگاهی پیچیده و پرهزینه را کاهش دهد و از این طریق، رویکردی مقرون به صرفه و کارآمد برای درمان بیماران سرطانی فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

سنتز کانستراکت ژن فیوژن نو ترکیب -Anticancer-cTxB-linker-enTA-Ligand

ابتدا توالی انتروتوکسین A و کلراتوکسین B از پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ایالات متحده^۱ (NCBI) استخراج شد. سپس یک توالی لینکر به منظور افزایش انعطاف‌پذیری و حفظ ساختار، در کنار یکدیگر قرار داده شد و یک توالی ضدسرطان که از سایت AntiCP گرفته شده بود نیز به منظور افزایش خاصیت ضدتوموری به ژن افزوده شد. توالی‌های مذکور به وسیله نرم‌افزار <http://www.generunner.net> و پایگاه‌های داده <https://www.uniprot.org>، <https://www.expasy.org>، <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>، <https://www.ncbi.gov>، <https://webs.iitd.edu.in/raghava/anticp/index.htm>، به صورت دقیق طراحی و بررسی شد.

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین فیوژن

با استفاده از سرور Expasy's ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) ویژگی‌های پروتئین فیوژن طراحی شده شامل وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری، شاخص هیدروپاتی^۲ و شاخص آلفاتیک مشخص شد (Fathizadeh et al., 2020).

پیش‌بینی ساختار دوم و سوم پروتئین فیوژن

پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین فیوژن طراحی شده از نظر وجود و تعداد ساختار مارپیچی^۳، ساختار غیرمنظم^۴

و ساختارهای صفحه‌ای^۵ به وسیله نرم‌افزار GOR4 مشخص شد. سپس فرمت pdb پپتید فیوژن برای بررسی توسط سرور I-TASSER استفاده شد. این سرور با استفاده از روش multiple threading alignments، مدل‌های سه‌بعدی برای پروتئین پیش‌بینی کرده و آنها را با استفاده از C-score یا نمره اطمینان بیان می‌کند. در مرحله بعد برای بررسی مدل‌های سه‌بعدی ارائه‌شده، نمودار رامچاندرا^۶ آن با استفاده از نرم‌افزار RAMPAGE ترسیم شد. همچنین ProSA-web برای ارزیابی کیفی ساختار پروتئین استفاده و نتایج براساس Z-score بیان شد (Babakanrad et al., 2024).

سنتز توالی ژن فیوژن طراحی‌شده

پس از طراحی و پیش‌بینی صحت پروتئین فیوژن نو ترکیب، توالی ژنتیکی پپتید مدنظر متشکل از انتروتوکسین A و کلراتوکسین B برای سنتز به شرکت بیوماتیک کانادا (BIOMATIK, Canada) فرستاده شد. توالی‌های ذکر شده به همراه توالی لینکر و توالی ضدسرطان در بین جایگاه‌های برشی *Bam HI* در قسمت 5' و *Sma I* در قسمت 3' در وکتور pBI121 قرار گرفتند که این وکتور دارای توالی ژنی کدکننده His-tag نیز است. برای پایداری طی زمان طولانی، پلاسمید حاوی ژن فیوژن نو ترکیب به صورت لیوفیلیزه توسط شرکت بیوماتیک تهیه شد.

انتقال پلاسمید نو ترکیب به داخل باکتری اگروباکتریوم

از اگروباکتریوم *تومفاسینس*^۷ برای انتقال موقت سازه به گیاه استفاده شد. انتقال پلاسمید حاوی ژن فیوژن نو ترکیب به درون سلول‌های مستعدشده اگروباکتریوم با شوک اسمزی کلرید کلسیم ۰/۱ مولار و روش انجماد و ذوب مطابق (Wang et al., 2006) انجام گرفت. غربالگری کلنی‌های حاوی پلاسمید

5. β -sheets

6. Ramachandran Plot

7. *Agrobacterium tumefaciens*

1. The National Center for Biotechnology Information

2. Hydropathy index

3. α -helices

4. coil

انجام گرفت (جدول ۲). چرخه دمایی ذکر شده به صورت دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه، دنا تورا سیون ثانویه به مدت یک دقیقه، دمای انیلینگ ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه است. چرخه PCR ۳۵ بار تکرار شد. محصول واکنش روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد.

نو ترکیب نیز روی محیط کشت LB Agar حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین انجام گرفت.

تأیید کلونینگ با واکنش زنجیره ای پلیمرز^۱ (PCR)
به منظور تأیید کلونینگ ژن مدنظر از تک کلنی های رشد کرده روی پلیت لوریا برتانی آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۱۰ µg/ml) به عنوان نمونه استفاده و براساس جدول زیر مواد لازم برای PCR آماده شد. به منظور طراحی پرایمر، ابتدا و انتهای توالی ژن فیوژن طراحی شده به همراه توالی آنزیم محدود کننده انتخاب شد و سنتز آغازگرها در شرکت سیناکلون^۲

جدول ۱- ترکیبات به کاررفته در واکنش PCR

Table 1. Compounds used in the PCR reaction

اجزا Component	حجم (میکرو لیتر) Volume (µL)
مستر میکس Master mix	11.5
پرایمر پیشرو F-primer	1.25
پرایمر پسرو R-primer	1.25
نمونه Template	1
آب دوبار تقطیر DDW	10
حجم کل Final volume	25

جدول ۲- آغازگرهای استفاده شده

Table 2. Used primers

توالی آغازگر Primer Sequence	نام آغازگر Primer Name	ردیف Row
5'TCGATCCATGACCGTTCGTCT3'	GH-F	۱
5'GTCTCCAGCAGCAGGCATGA3'	GH-R	۲

طول قطعه: ۲۳۸

Fragment length: 238

تومفاسینس منتقل شد و کلنی های تأیید شده حاوی پلاسمید دارای ژن فیوژن نو ترکیب، در محیط کشت LB Broth غنی شده با کانامایسین (۵۰ میلی گرم در لیتر) کشت داده شدند. پس از آماده سازی محلول باکتری و تنظیم تراکم بهینه طبق دستورالعمل (Kapila et al., 1997)، محلول تلقیح به برگ های صنوبر تزریق شد و برگ ها تحت خلأ با فشار ۲۰ تا ۲۵

بیان پروتئین نو ترکیب و تخلیص آن از برگ درخت صنوبر با استفاده از آگروباکتریوم

در این تحقیق، از روش آگرواینفیلتراسیون^۳ برای بیان موقت پروتئین نو ترکیب در برگ های صنوبر استفاده شد. سازه ژنتیکی مدنظر به آگروباکتریوم

1. Polymerase chain reaction
2. Sinaclon
3. Agroinfiltration

ستون نیکل استفاده شد. در انتها برای تأیید بیان پروتئین نوترکیب الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE انجام گرفت (Fathizadeh et al., 2020).

تأیید پروتئین نوترکیب

تأیید پروتئین نوترکیب در برگ درخت صنوبر با استفاده از روش وسترن بلات و آنتی‌بادی‌های اولیه (Anti His Tag) و ثانویه (Anti HRP) انجام گرفت (Fathizadeh et al., 2020).

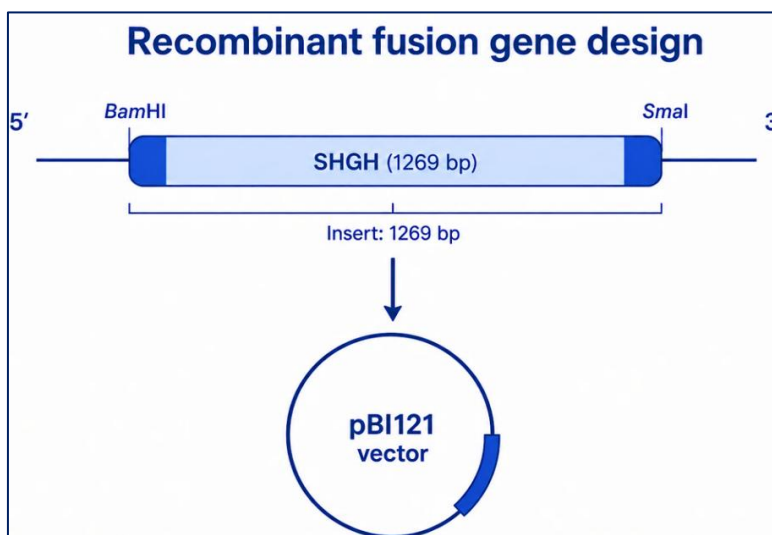
نتایج

طراحی ژن فیلوژن نوترکیب

توالی ژن فیلوژن نوترکیب با طول ۱۲۶۹ جفت‌باز برای بیان در برگ صنوبر بهینه‌سازی شده است. این ژن در وکتور pBI121 قرار گرفته و بین دو جایگاه برشی *BamHI* در انتهای ۵' و *SmaI* در انتهای ۳' کلون شده است (شکل ۱).

میلی‌بار قرار گرفتند. (Voinnet et al., 2003). برگ‌های اینفیلتره‌شده روی کاغذ صافی مرطوب و در تاریکی با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت سه تا شش روز برگ‌ها در ازت مایع فریز و تا زمان استفاده در دمای منفی ۷۰ درجه نگهداری شدند. این روش کارآمد نه تنها امکان بیان سریع پروتئین نوترکیب را فراهم کرد، بلکه شرایط بهینه‌ای را برای حفظ کیفیت و پایداری پروتئین تولیدشده ایجاد نمود.

استخراج پروتئین طبق روش (Guy et al., 1992) انجام گرفت. به‌ازای هر گرم برگ، یک میلی‌لیتر بافر استخراج پروتئین استفاده شد. سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. بخش مایع رویی محلول به تیوب جدید منتقل و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه با همان شرایط سانتریفیوژ تکرار شد. مایع رویی به لوله جدید منتقل و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تخلیص پروتئین نوترکیب از روش کروماتوگرافی



شکل ۱- شماتیک طراحی کانستراکت نوترکیب

Figure 1. Schematic design of the recombinant construct

خاصیت ضدسرطانی مؤثر این توالی است. همچنین ارزیابی فاکتور پیش‌بینی^۲ نرم‌افزار Anti-CP نشان می‌دهد که توالی انتخاب‌شده دارای ویژگی‌های ضدسرطانی چشمگیری است (شکل ۲).

نتایج ارزیابی خاصیت ضدسرطانی در سرور Anti-CP نتایج نشان دادند که مقادیر ضریب اثربخشی خاصیت ضدسرطانی^۱ (SVM) برای توالی طراحی‌شده پروتئین فیلوژن نوترکیب کمتر از یک است که بیانگر

2. predictionfactor

1. Support Vector Machine

Peptides Scanned from Original Protein		
Peptide Sequence	SVM score	Prediction
ENMKVLYDDNHVSAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNK	0.74	Anticp
NMKVLYDDNHVSAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKD	0.74	Anticp
MKVLYDDNHVSAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDL	0.74	Anticp
KVLYDDNHVSAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLA	0.73	Anticp
VLYDDNHVSAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLAD	0.74	Anticp
LYDDNHVSAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADK	0.74	Anticp
YDDNHVSAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKY	0.74	Anticp
DDNHVSAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYK	0.74	Anticp
DNHVSAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKD	0.73	Anticp
NHVSAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDK	0.73	Anticp
HVSAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKY	0.74	Anticp
VSAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYV	0.74	Anticp
SAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVD	0.74	Anticp
AINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDV	0.74	Anticp
INVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDVF	0.74	Anticp
NVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDVFG	0.74	Anticp
VKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDVFGA	0.74	Anticp
KSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDVFGAN	0.74	Anticp
SIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDVFGANY	0.74	Anticp
IDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDVFGANY	0.74	Anticp
DQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDVFGANYYY	0.74	Anticp
QFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDVFGANYYYQ	0.73	Anticp

شکل ۲- داده‌های به‌دست‌آمده از سرور Anti-CP
Figure 2. Data obtained from the Anti-CP server

نشان داد که ساختار تحت بررسی دارای ۳۴.۵۱ درصد آلفاهلیکس (ساختار مارپیچی)، ۴۰.۴۱ درصد رندوم‌کوئل (ساختار غیرمنظم و تصادفی) و ۲۵.۰۸ درصد رشته‌های کشیده (Extended strand) است (شکل ۳).

پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین نو ترکیب
از میان مدل‌های سه‌بعدی ایجادشده توسط سرور I-TASSER، ساختاری با بالاترین میزان اطمینان به‌عنوان مدل نهایی انتخاب شد و برای تحلیل‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. تصویر حاصل از این مدل نهایی در شکل ۴ ارائه شده است.

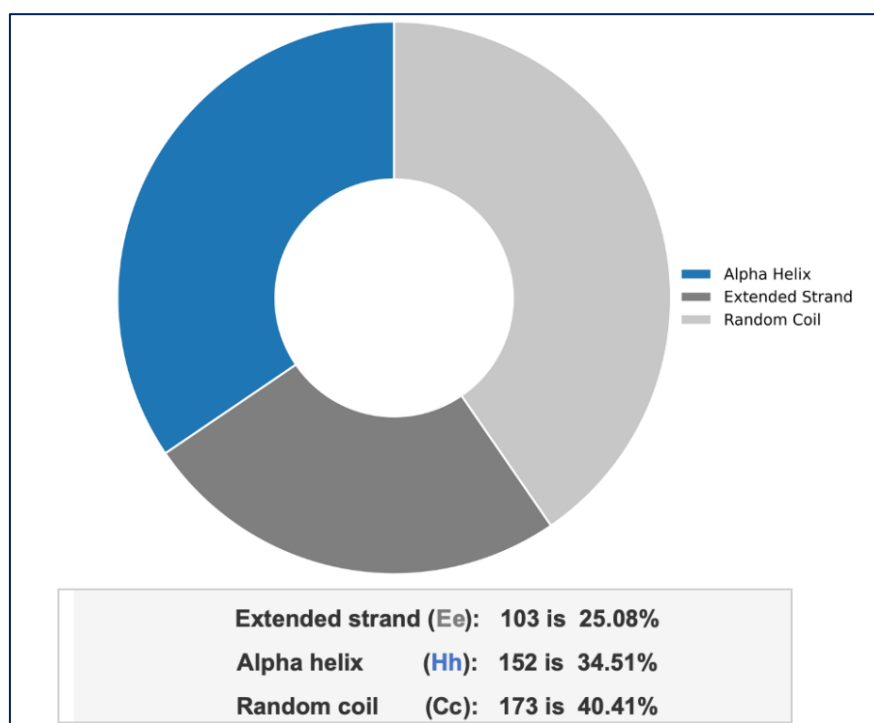
خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین طراحی‌شده
خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین نو ترکیب، شامل وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک و بقیه پارامترها، با استفاده از سرور ExPASy's ProtParam تعیین و در جدول سه ارائه شده است. تحلیل فیزیکوشیمیایی نشان داد که وزن مولکولی این پروتئین ۴۷۸۵۳.۰۳ دالتون، نقطه ایزوالکتریک آن ۸.۶۶ (pI) و شاخص ناپایداری ۳۵.۶۶ است. شاخص آلفاتیک ۷۶.۷۲ و میانگین کلی هیدروپاتیسیت^۱ (GRAVY) منفی ۰.۴۴۹ به دست آمد.

پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین نو ترکیب
تحلیل ساختار ثانویه با استفاده از سرور GOR4

جدول ۳- پارامترهای فیزیکوشیمیایی پروتئینیوژن با استفاده از سرور Expsy's ProtParam

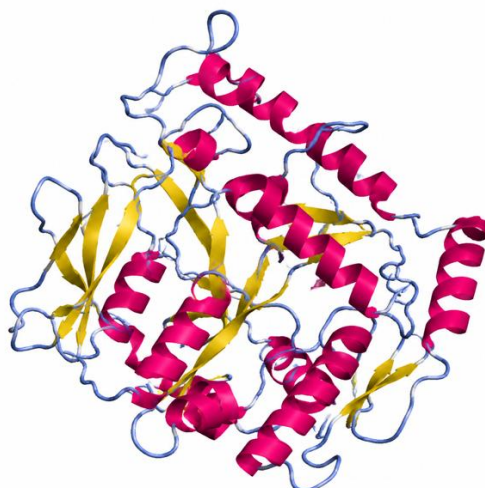
Table 3. Physicochemical parameters of fusion protein using Expsy's ProtParam server

پارامترهای فیزیکوشیمیایی Physiochemical parameters	مقدار Value
تعداد اسیدهای آمینه Number of amino acids	423
وزن مولکولی Molecular weight	47853/03
نقطه ایزوالکتریک تئوری (pI) Theoretical isoelectric point (pI)	8/66
نیمه عمر تخمینی Estimated half-life	30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro) 20> hours (yeast, in vivo) 10> hours (Escherichia coli, in vivo)
شاخص ناپایداری (II) Instability index (II)	۳۵.۶۶ (پایدار) 35/66 (Stable)
شاخص آلیفاتیک Aliphatic index	76/72
میانگین کلی هیدروپاتیسیته Grand Average of Hydropathicity (GRAVY)	-0/449



شکل ۳- نتایج پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین نو ترکیب با نرم‌افزار GOR4

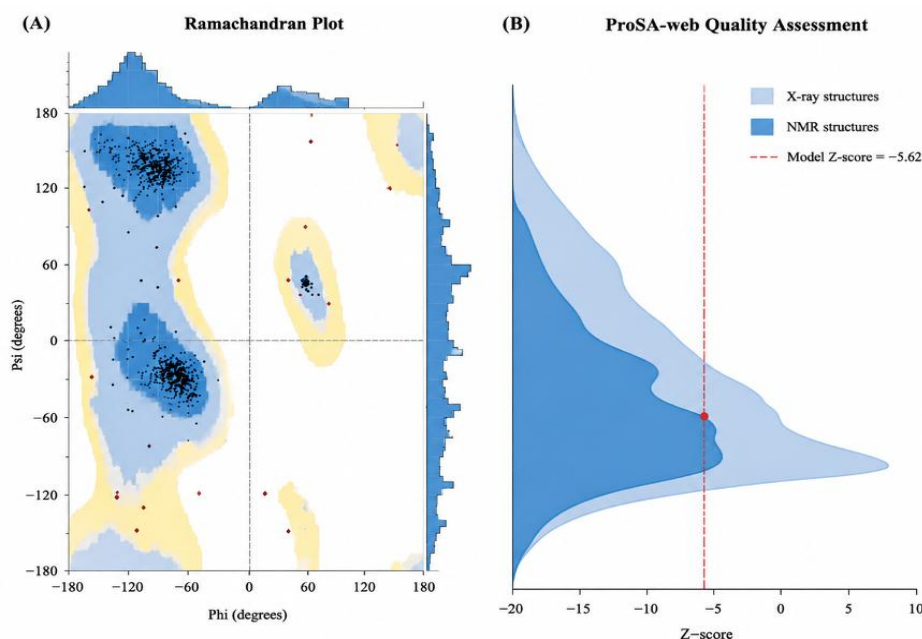
Figure 3. Prediction results of the secondary structure of the recombinant protein with GOR4 software



شکل ۴- شمای کلی ساختار سوم پروتئین توسط سرور I-TASSER
Figure 4. Protein tertiary structure modeled by the I-TASSER server.

برای پروتئین‌های طبیعی با اندازه مشابه نشان داد. مقایسه این مقدار با داده‌های پایگاه PDB شامل ساختارهای تعیین‌شده به روش‌های X-ray و NMR نشان می‌دهد که مدل از نظر انرژی ساختاری در محدوده استاندارد قرار دارد. نتایج نشان داد که Z-score پروتئین مدنظر در محدوده طبیعی بین صفر تا ۱۰- قرار دارد که بیانگر کیفیت و پایداری ساختار سه‌بعدی آن است.

ارزیابی نمودار رامچاندرا با استفاده از سرور RAMPAGE نشان داد که بخش عمده‌ای از باقی‌مانده‌های اسیدآمین در نواحی مطلوب و مجاز قرار دارند و تنها درصد کمی در نواحی غیرمجاز مشاهده می‌شود. این توزیع بیانگر کیفیت مناسب مدل سه‌بعدی پیش‌بینی‌شده است (شکل ۵ الف).
شکل ۵ ب به تحلیل کیفیت ساختار با استفاده از مقدار ProSA-web Z-score را در محدوده قابل قبول



شکل ۵- نمودار رامچاندرا به وسیله سرور RAMPAGE (A) و آنالیز Z-score با استفاده از ProSA-web (B)
Figure 5. Ramachandran diagram by RAMPAGE server (A) and Z-score analysis using ProSA-web (B)

ترانسفورماسیون وکتور نو ترکیب و تأیید آن به وسیله کلنی PCR

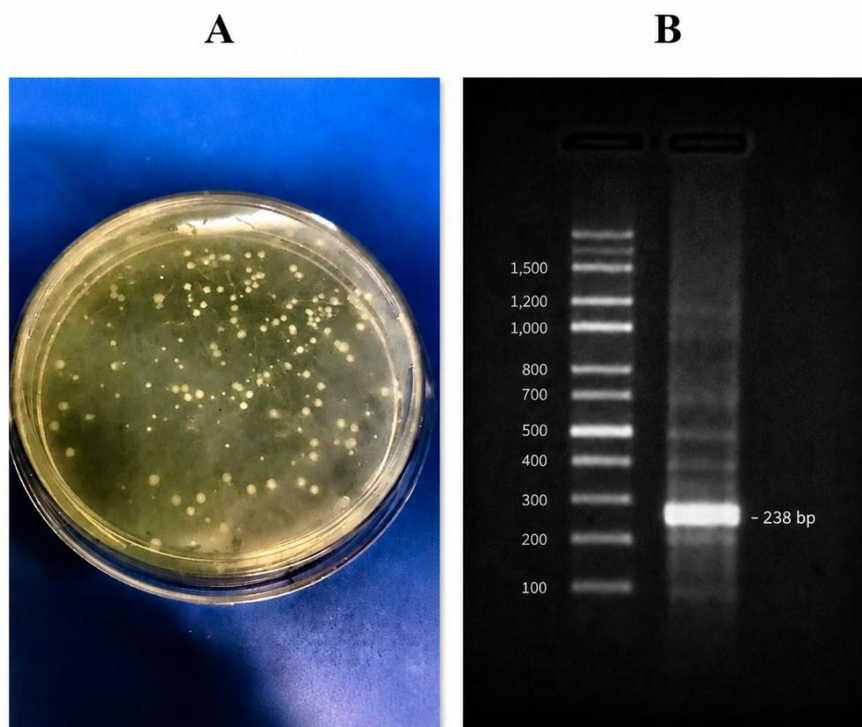
رشد کلنی‌ها در محیط حاوی کانامایسین نشان‌دهنده موفقیت ترانسفورماسیون و انتقال ژن‌های مقاومت به باکتری است که به خوبی در شکل ۶ الف نشان داده شده است. همچنین نتایج کلنی PCR و الکتروفورز حضور قطعی ژن فیوژن نو ترکیب را در باکتری‌های ترانسفورم شده نشان می‌دهد. باند واضح و مشخص ۲۳۸ جفت باز با اندازه مورد انتظار محصول PCR حاصل از پرایمرهای اختصاصی مطابقت دارد و بیانگر موفق بودن ترانسفورماسیون است. این نتایج موفق بودن فرایند کلونینگ و تثبیت ژن هدف در میزبان را تأیید می‌کنند (شکل ۶ ب).

تأیید بیان پروتئین فیوژن نو ترکیب

نتایج SDS-PAGE نشان داد که lane اول (سمت چپ) شامل مجموعه‌ای از باندهای پروتئینی مختلف است که بیانگر ماهیت پیچیده و غیرخالص نمونه

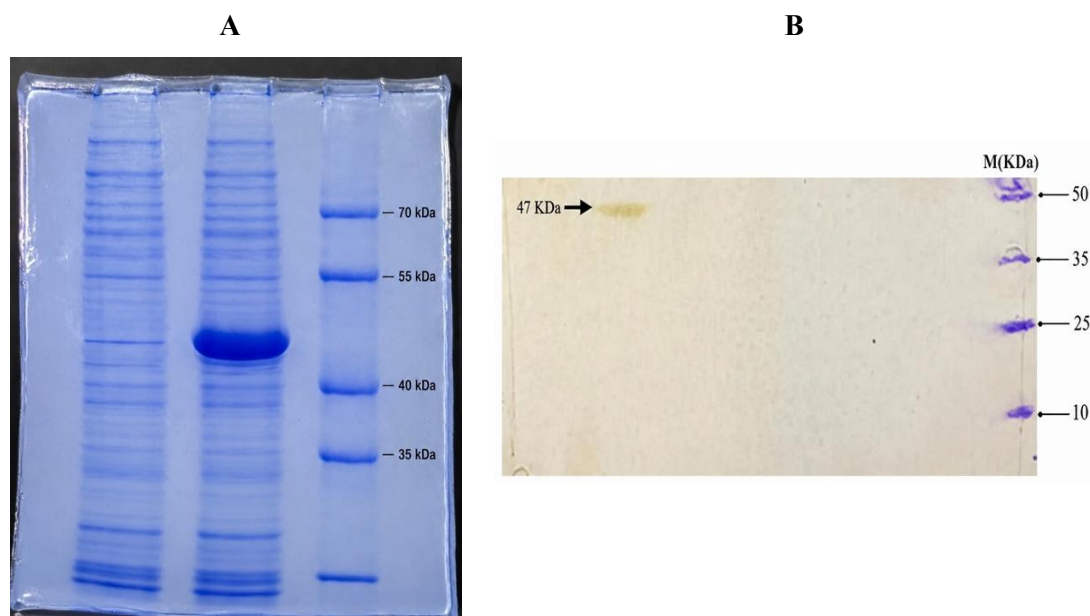
می‌باشد. در lane میانی نیز الگوی مشابهی از چندین باند پروتئینی مشاهده می‌شود، با این تفاوت که یک باند مشخص و برجسته در حدود ۴۷ کیلودالتون قابل مشاهده است. در lane سوم (سمت راست)، باندهای مارکر وزن مولکولی قرار دارند. باند مشاهده شده در حدود ۴۷ کیلودالتون به عنوان پروتئین هدف در نظر گرفته شده و حضور آن در نمونه بیانگر موفقیت در بیان پروتئین نو ترکیب است (شکل ۷ الف).

در شکل ۷ ب، وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی جهت بررسی حضور پروتئین نو ترکیب انجام شد. نتایج نشان داد که تنها در نمونه‌های مربوط به بیان پروتئین هدف، یک سیگنال مشخص در وزن مولکولی مورد انتظار مشاهده می‌شود، در حالی که در نمونه‌های کنترل هیچ باند اختصاصی قابل مشاهده نیست. این نتایج بیانگر بیان اختصاصی و تأیید هویت پروتئین نو ترکیب است.



شکل ۶- پلیت حاوی کلنی‌های ترانسفورم شده (A) و تأیید ترانسفورماسیون و سازه به روش کلنی PCR (B)

Figure 6. Plate containing transformed colonies (A) and confirmation of transformation and construct using colony PCR (B).



شکل ۷- بیان پروتئین نو ترکیب و تأیید آن با استفاده از روش SDS-PAGE (A) و وسترن بلات (B).
Figure 7. Recombinant protein expression and confirmation using SDS-PAGE (A) and Western blot (B).

همچنین، از آنزیم‌های SmaI و BamHI استفاده شد؛ انتخابی که با پژوهش‌های پیشین متفاوت بوده و به‌طور اختصاصی برای فرایند طراحی این پروتئین فیوژن بهینه‌سازی شد. نتایج تحلیل‌های نرم‌افزاری Anti-CP نشان داد که توالی طراحی‌شده دارای ویژگی‌های ضدسرطانی قابل توجهی است. مقایسه این نتایج با پژوهش (Babakanrad et al., 2024) نیز نشان‌دهنده همسویی خواص ضدسرطانی پروتئین فیوژن طراحی‌شده با یافته‌های آن مطالعه است. بر اساس داده‌های پیش‌بینی‌شده، ضریب اثربخشی خاصیت ضدسرطانی (SVM) کمتر از یک گزارش شده است که این نتایج تطابق نزدیکی با داده‌های کمی و کیفی ارائه‌شده در آن پژوهش دارد. این نتایج می‌تواند پایه‌گذار ایجاد درمان‌های نوین در حوزه سرطان باشد و مسیر جدیدی را برای کاربرد پروتئین‌های فیوژن در درمان این بیماری هموار کند (Saw Song, 2019; Thundimadathil, 2012).

تحلیل GOR4 نشان داد که پروتئین فیوژن نو ترکیب این پژوهش، مشابه پژوهش (Fathizadeh et al., 2020)، دارای مقادیر قابل توجهی از ساختارهای نامنظم مانند

بحث

با توجه به اهمیت بیماری سرطان و تلاش‌های گسترده برای یافتن درمان‌های مؤثر، بررسی اثر ضدسرطان توکسین‌های باکتریایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Patyar et al., 2010). تحلیل‌های بیوانفورماتیکی پیش از آزمایش‌های تجربی، امکان درک بهتری از پایداری و سازوکار عملکرد این ترکیبات فراهم می‌کند و مسیر را برای دستیابی به درمان‌های ایمن و مؤثر هموار می‌سازد (Lionta et al., 2014). در این زمینه، ترکیب انتروتوکسین A از استافیلوکوکوس اورئوس و کلراتوکسین B از ویبریو کلرا می‌تواند به‌عنوان راهکاری نوین در ارزیابی اثرهای درمانی ضدسرطانی مدنظر قرار گیرد.

در این پژوهش، نوعی پروتئین فیوژن نو ترکیب Anticancer-cTxB-linker-enTA-Ligand طراحی و خاصیت ضدسرطانی مؤثر آن ارزیابی شد. برخلاف پژوهش‌های (Babakanrad et al., 2024; Fathizadeh et al., 2020) که از وکتورهای متفاوتی استفاده کردند، در این پژوهش، وکتور pBI121 به‌منظور بیان ژن در سیستم گیاهی به‌کار گرفته شد.

(Ikai, 1980). همچنین، مقدار منفی شاخص هیدروپاتی (GRAVY) برابر با منفی ۰.۴۴۹ نشان‌دهنده آبدوست بودن و انحلال‌پذیری زیاد این ترکیب است که ویژگی‌های مطلوبی برای کاربردهای زیستی به شمار می‌آیند (Kyte & Doolittle, 1982). در این تحقیق، مشابه پژوهش (Hesari et al., 2020)، از سرور پیشرفته I-TASSER به منظور مدل‌سازی و ارزیابی ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های فیوژن نو ترکیب استفاده شد. I-TASSER با قابلیت مدل‌سازی خودکار پروتئین‌هایی با کمتر از ۱۵۰۰ اسید آمینه از طریق روش Threading، اطلاعاتی مهم در خصوص ساختار ثانویه و جایگاه‌های فعال احتمالی پروتئین‌ها ارائه داد (Yang & Zhang, 2015). در هر دو تحقیق، C-score به عنوان یکی از شاخص‌های اصلی ارزیابی و انتخاب مدل‌های ساختاری مورد استفاده قرار گرفت و نتایج نشان داد که مدل‌های انتخاب‌شده از کیفیت ساختاری قابل قبولی برخوردارند (Hesari et al., 2020).

افزون بر این، تحلیل Z-score به وسیله ProSA-web کیفیت ساختاری مدل‌ها را تأیید کرد و مقادیر مثبت Z-score، بیانگر صحت طراحی و قرار گرفتن این پروتئین‌های نو ترکیب در محدوده طبیعی پروتئین‌های مشابه بود. تطابق این شاخص‌ها در هر دو تحقیق، بر توانمندی I-TASSER در پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی دقیق و پایدار برای پروتئین‌های نو ترکیب دلالت دارد (Wiederstein & Sippl, 2007). بیان موقت روشی سریع، منعطف و تکرارپذیر برای بیان سطح بالایی از پروتئین نو ترکیب در گیاه است (Choi et al., 2008; Voinnet et al., 2003) که سطح بالایی از بیان را در مقایسه با بیان دائم ایجاد می‌کند (Chen et al., 2014). نتایج حاصل از SDS-PAGE و وسترن بلات در این پژوهش بیانگر آن است که پروتئین نو ترکیب با وزن مولکولی ۴۷ کیلودالتون با موفقیت در برگ‌های صنوبر بیان شده است. حضور باندهای واضح در نمونه‌های تیمار شده و نبود باند در

Random coil است. این ویژگی به دلیل حضور اسیدهای آمینه‌ای نظیر گلیسین و سیستئین است؛ گلیسین با انعطاف‌پذیری بالای خود به شکل‌گیری ساختارهای نامنظم کمک می‌کند، درحالی‌که سیستئین با ایجاد پل‌های دی‌سولفیدی پایداری بیشتری به ساختار پروتئین می‌بخشد (Betz, 1993; Finkelstein & Ptitsyn, 2016). نتایج تحلیل GOR4 نشان داد که پروتئین فیوژن این پژوهش نسبت به نمونه گزارش‌شده در پژوهش (Fathizadeh et al., 2020) خاصیت آنتی‌ژنی قوی‌تری دارد. این تفاوت با میزان Extended Strand مرتبط است که در این تحقیق بین ۲۰ تا ۵۰ درصد گزارش شد و به بهبود خاصیت آنتی‌ژنی و افزایش کارایی پروتئین فیوژن کمک کرده است (Eswar et al., 2003).

در مرحله بعد، از سرور ProtParam برای پیش‌بینی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین نو ترکیب استفاده شد. به طور کلی نقطه ایزوالکتریک (pI) برابر با هفت، نشان‌دهنده ماهیت طبیعی پپتیدهاست. اما نقطه ایزوالکتریک (pI) برای این پروتئین حدود ۸.۶ به دست آمد که نشان‌دهنده ماهیت قلیایی آن است. در مقایسه (pI) پپتید در پژوهش (Fathizadeh et al., 2020) برابر با ۸.۹ بود که قلیایی بیشتری را نشان می‌دهد (Gasteiger, 2005). همچنین شاخص ناپایداری که معیاری برای ارزیابی ثبات پروتئین‌ها در شرایط آزمایشگاهی است، برای این پروتئین فیوژن نو ترکیب ۳۵.۶۶ بود؛ عدد کمتر از ۴۰، نشان‌دهنده پایداری مناسب آن است. مقدار ۲۵.۱۱ برای شاخص ناپایداری در پژوهش (Fathizadeh et al., 2020) نیز بیانگر قرار داشتن هر دو پروتئین در محدوده پایداری است (Guruprasad et al., 1990).

شاخص آلفاتیک که عاملی مهم در مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت محسوب می‌شود، برای این پروتئین فیوژن ۷۶.۷۲ به دست آمد که شاخص مثبتی برای پایداری حرارتی پروتئین به شمار می‌رود

نوترکیب متشکل از دو انتروتوکسین A و کلراتوکسین B انجام گرفت نشان می‌دهد که به‌کارگیری روش‌های بیوانفورماتیک در طراحی، ساخت و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی این ترکیبات، می‌تواند در بهبود کارایی و دقت بیان پروتئین‌های پیچیده مؤثر باشد. بررسی‌های تکمیلی در شرایط فیزیولوژیک مختلف نیز نشان داد که این ترکیب از پایداری مناسبی برخوردار است و قابلیت استفاده در کاربردهای صنعتی و دارویی را دارد.

این یافته‌ها افزون بر تأیید پتانسیل صنوبر به‌عنوان میزبان بیانی، فرصت‌هایی را برای توسعه ابزارهای نوین در تولید پروتئین‌های پیچیده فیوژن در گیاهان جنگلی فراهم می‌کند که می‌تواند برای اهداف درمانی و کاربردهای صنعتی ارزشمند باشد.

نتیجه‌گیری

این پژوهش افزون بر تأیید قابلیت صنوبر به‌عنوان یک سامانه کارآمد برای بیان پروتئین‌های نوترکیب، بر نقش کلیدی تحلیل‌های بیوانفورماتیکی در طراحی هدفمند و بهینه‌سازی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ترکیبات پروتئینی پیچیده تأکید می‌کند. نتایج به‌دست‌آمده بستر مناسبی برای توسعه سامانه‌های نوین تولید پروتئین‌های درمانی و واکسن‌های گیاهی، به‌ویژه در گیاهان جنگلی، فراهم می‌سازد با این حال، برای تأیید کارایی زیستی و درمانی این پروتئین، انجام آزمون‌های عملکردی، سلولی و پیش‌بالینی ضروری است.

نمونه‌های کنترل، تأییدکننده بیان اختصاصی پروتئین در شرایط تیمار شده است.

پژوهش‌های مشابه در گیاهانی مانند توتون و کاهو نیز قابلیت مطلوب گیاهان را به‌عنوان میزبان‌های بیانی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، به‌ویژه برای کاربردهای دارویی نشان داده‌اند. برای مثال، کاهو به‌دلیل ساختار ساده و قابلیت تولید انبوه، به‌طور گسترده‌ای در بیان پروتئین‌های دارویی مختلف، نظیر پروتئین B مربوط به سم وبا (Kim et al., 2004; Ruhlman et al., 2007) و آنتی‌ژن ویروس هپاتیت B (Kapusta et al., 1999) استفاده شده است.

افزون بر این، تحقیقات متعدد دیگری برای تولید پروتئین‌های درمانی و واکسن‌های خوراکی در کاهو انجام گرفته است. برای مثال (Ruhlman et al., 2007) با وارد کردن توالی ژنی مربوط به پیوند پروانسولین و ادجوانت CTB به ژنوم کلروپلاست کاهو موفق به تولید پروتئین امتزاجی (فیوژن) به مقدار ۲.۵ درصد از کل پروتئین محلول شدند. با این حال، تاکنون هیچ کاهوی تراریخته‌ای به‌صورت تجاری عرضه نشده و تنها نمونه کاهوی بیان‌کننده آنتی‌ژن علیه هپاتیت B در مرحله اول آزمون‌های بالینی قرار دارد (Streatfield, 2007).

با وجود گزارش‌های متعدد درباره بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان زراعی، گزارش‌های مربوط به استفاده از گیاهان درختی مانند صنوبر برای بیان پروتئین‌های نوترکیب با اهداف درمانی بسیار محدود است. نتایج این پژوهش که در پروتئین فیوژن

References

- Babakanrad, E., Mohammadian, T., Esmaeili, D., & Behzadi, P. (2024). Designing and cloning of fusion protein CpsA-CpsC-L-ACAN. *Medical Journal Armed Forces India*, 80(6), 642-650. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2022.12.012>
- Betz, S.F. (1993). Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Science*, 2(10), 1551-1558. <https://doi.org/10.1002/pro.5560021002>
- Bonhomme, L., Monclus, R., Vincent, D., Carpin, S., Lomenech, A.M., Plomion, C., Brignolas, F., & Morabito, D. (2009). Leaf proteome analysis of eight *Populus × euramericana* genotypes: Genetic variation in drought response and in water-use efficiency involves photosynthesis-related proteins. *Proteomics*, 9(17), 4121-4142. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900047>

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., & emal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Chen, L., Schiffer, J.M., Dalton, S., Sabourin, C.L., Niemuth, N.A., Plikaytis, B.D., & Quinn, C.P. (2014). Comprehensive analysis and selection of anthrax vaccine adsorbed immune correlates of protection in rhesus macaques. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(11), 1512-1520. <https://doi.org/10.1128/CVI.00469-14>
- Choi, M.S., Yoon, I.S., Rhee, Y., Choi, S.K., Lim, S.H., Won, S.Y., Lee, Y.H., Choi, H.S., Lee, S.C., Kim, K.H., Lomonossoff, G., & Sohn, S. H. (2008). The effect of Cucumber mosaic virus 2b protein to transient expression and transgene silencing mediated by agro-infiltration. *The Plant Pathology Journal*, 24(3), 296-304. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2008.24.3.296>
- Daniell, H., Streatfield, S.J., & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6(5), 219-226. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01922-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01922-7)
- Eswar, N., Ramakrishnan, C., & Srinivasan, N. (2003). Stranded in isolation: Structural role of isolated extended strands in proteins. *Protein Engineering*, 16(5), 331-339. <https://doi.org/10.1093/protein/gzg046>
- Fathizadeh, H., Saffari, M., Esmaceli, D., Moniri, R., & Salimian, M. (2020). Evaluation of antibacterial activity of enterocin A-colicin E1 fusion peptide. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(11), 1471-1479. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.47826.11004>. (In Persian)
- Finkelstein, A.V., & Ptitsyn, O.B. (2016). *Protein physics: A course of lectures (2nd ed.)*. Academic Press.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In J. M. Walker (Ed.), *The proteomics protocols handbook*, Humana Press, 571-607p. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Guruprasad, K., Reddy, B.V.B., & Pandit, M.W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering*, 4(2), 155-161. <https://doi.org/10.1093/protein/4.2.155>
- Guy, C., Haskell, D., Neven, L., Klein, P., & Smelser, C. (1992). Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. *Planta*, 188(2), 265-270. <https://doi.org/10.1007/BF00216823>
- Hajieghrari, B., Hamrahi, S., Hemmati-Asl, S., & Shahghobadi, H. (2026). CRISPR/Cas9 gene editing technology: Advancing sustainable agriculture and crop improvement. *Ecological Genetics and Genomics*, 39, 100483. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2026.100483>
- Hanahan, D., & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hesari, N.G., Esmaceli, D., Mohammadian, T., Shahhosseini, M.H., & Ferdosi, A. (2020). Cloning and expression of a lipase-subtilisin protein fusion. *Gene Reports*, 20, 100727. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100727>
- Hood, E.E., Woodard, S.L., & Horn, M.E. (2002). Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants: Myths and realities. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(6), 630-635. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00351-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00351-8)
- Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *The Journal of Biochemistry*, 88(6), 1895-1898. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133168>
- Jansson, S., & Douglas, C.J. (2007). Populus: A model system for plant biology. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 435-458. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103956>

- Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., & Angenon, G. (1997). An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, 122(1), 101-108. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(96\)04541-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(96)04541-4)
- Kapusta, J., Modelska, A., Figlerowicz, M., Pniewski, T., Letellier, M., Lisowa, O., Yusibov, V., Koprowski, H., Plucienniczak, A., & Legocki, A.B. (1999). A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *The FASEB Journal*, 13(13), 1796-1799. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.13.1796>
- Kim, T.G., Ruprecht, R.M., & Langridge, W.H.R. (2004). Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit SHIV 89.6p Tat fusion protein in transgenic potato. *Protein Expression and Purification*, 35(2), 313-319. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.02.007>
- Kyte, J., & Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Lionta, E., Spyrou, G., Vassilatis, D.K., & Cournia, Z. (2014). Structure-based virtual screening for drug discovery: Principles, applications and recent advances. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(16), 1923-1938. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140929124445>
- Michl, P., & Gress, T.M. (2004). Bacteria and bacterial toxins as therapeutic agents for solid tumors. *Current Cancer Drug Targets*, 4(8), 689-702. <https://doi.org/10.2174/1568009043332727>
- Patyar, S., Joshi, R., Prasad Byrav, D.S., Prakash, A., Medhi, B., & Das, B. K. (2010). Bacteria in cancer therapy: A novel experimental strategy. *Journal of Biomedical Science*, 17(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-21>
- Reddy, A.S., & Zhang, S. (2013). Polypharmacology: Drug discovery for the future. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 6(1), 41-47. <https://doi.org/10.1586/ecp.12.74>
- Ruhlman, T., Ahangari, R., Devine, A., Samsam, M., & Daniell, H. (2007). Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts: Oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnology Journal*, 5(4), 495-510. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00259.x>
- Sainsbury, F., & Lomonossoff, G.P. (2014). Transient expressions of synthetic biology in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 19, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.02.003>
- Saw, P.E., & Song, E.W. (2019). Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy. *Protein & Cell*, 10(11), 787-807. <https://doi.org/10.1007/s13238-019-0639-7>
- Shahghobadi, H., Sharifi Tabesh, S., Etemad, V., Javanmiri Pour, M., Shirvany, A., & Matinizadeh, M. (2025). The effect of biological and organic fertilizers on the survival and growth of Eucalyptus and Mofid hybrid poplar seedlings in an arid region. *Journal of Drought and Climate Change Research*, 3(1), 1-16. <https://doi.org/10.22077/jdcr.2024.7756.1070>. (In persian).
- Siegel, R.L., Miller, K.D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Streatfield, S.J. (2007). Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 5(1), 2-15. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00216.x>
- Taylor, G. (2002). Populus: Arabidopsis for forestry. Do we need a model tree?. *Annals of Botany*, 90(6), 681-689. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf255>
- Thundimadathil, J. (2012). Cancer treatment using peptides: Current therapies and future prospects. *Journal of Amino Acids*, 2012, 967347. <https://doi.org/10.1155/2012/967347>
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., & Baulcombe, D. (2003). Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal*, 33(5), 949-956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01676.x>

Wang, B., Yang, X., Shi, Q., Li, M., Chen, C., Cao, K., & Li, H. (2006). Expression and immunogenicity analysis of a recombinant fusion protein of V. cholerae ctB and H. pylori ureI. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 22(3), 276-279.

Wiederstein, M., & Sippl, M.J. (2007). ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), W407-W410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>

Yang, J., & Zhang, Y. (2015). Protein structure and function prediction using I-TASSER. *Current Protocols in Bioinformatics*, 52(1), 581-5815. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0508s52>

Yin, L., & Thaker, H. (2023). Cancer drug delivery systems using bacterial toxin translocation mechanisms. *Bioengineering*, 10(7), 813. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10070813>



Bioinformatic design and expression validation of cholera toxin B-linker-enterotoxin A-ligand Produced by *Populus euramericana* (Dode) Guinier

H. Shahghobadi^{1*}, V. Etemad², D. Esmaili³ and A. Shirvani⁴

¹PhD. Dept. of Forestry and Forest Economics, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

²Associate Prof., Dept. of Forestry and Forest Economics, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

³Prof., Dept. of Medical Bacteriology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

⁴Associate Prof., Dept. of Forestry and Forest Economics, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: 23 November 2024; Accepted: 30 December 2024)

Abstract

Introduction: Due to the increasing drug resistance, there is a critical need to identify novel anticancer agents and develop innovative therapeutic strategies. Many bacteria produce peptides known as toxins, which exhibit antitumor effects on various cancer cell lines. Despite significant advancements in cancer therapy, the limitations associated with conventional anticancer agents have directed research toward natural compounds, particularly enterotoxins. The objective of this study was to design and verify the expression of the Anticancer-cTxB-linker-enTA-Ligand fusion protein in *Populus euramericana*, one of the most economically significant tree species. This species is highly valued for its rapid growth, making it a viable candidate for medium- to long-term investment.

Materials and Methods: To design the target protein, the sequences of enterotoxin A and cholera toxin B were retrieved from the NCBI genomic database. A linker sequence was inserted between the two enterotoxin sequences to enhance flexibility and maintain structural integrity, and an anticancer sequence was added to the gene to boost antitumor activity. Finally, the recombinant fusion gene was synthesized, and expression and purification processes were conducted. The expression of the target recombinant protein was verified using SDS-PAGE and Western blot.

Results: The results demonstrated that the designed fusion protein possesses a suitable structure and favorable physicochemical stability, showing high resistance under simulated aqueous conditions. Furthermore, the successful transfer of the recombinant vector was confirmed using colony PCR, and the observation of a distinct 238 bp band indicated the presence of the recombinant fusion gene. SDS-PAGE and Western blot results clearly confirmed the successful expression of the recombinant protein, with a molecular weight of 47 kDa, in poplar leaves.

Conclusion: The fusion protein, derived from the combination of enterotoxin A, cholera toxin B, and the anticancer sequence, exhibits significant antitumor properties. Therefore, preclinical evaluations, including animal studies, are currently underway to assess the potential of this compound as a complementary or alternative strategy in cancer therapy.

Keywords: Agroinfiltration, Anticancer activity, Enterotoxin.