مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۴

شاپای چاپی: ۰۶۳۲ – ۲۷۱۷، شاپای الکترونیکی: ۹۸۰۴ - ۲۷۱۶

بررسی سیگنال پپتیدهای پری پلاسمیک جهت بیان پپتید تاناتین در *Escherichia coli*

نوع مقاله: پژوهشی 20.1001.1.27170632.1404.18.1.5.0

عباس تنهاییان[۱]، لیلی سیمایی سلطانی[۲]، سیده زهرا موسوی[۲*]

۱. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده مهندسی کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

۲. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

zaramousavi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۹، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۵

صفحه ۸۳-۷۲

چکیده

بیان پری پلاسمیک پپتیدهای ضدمیکروبی یکی از گزینه‌های مهم در سیستم‌های بیان پروتئین‌ها است. در مطالعه‌ی حاضر به منظور پیش‌بینی بهترین سیگنال پپتید برای بیان تاناتین در میزبان *Escherichia coli* از روش‌های بیوانفورماتیک استفاده شد. به‌طوری که توالی ۲۹ سیگنال پپتید از پایگاه‌های اطلاعاتی سیگنال پپتید تهیه شد. از آنجایی که هدف از این مطالعه معرفی سیگنال پپتیدهای بهینه برای بیان پری پلاسمیک بود، بررسی محیطی که پروتئین در آن فعالیت می‌کند، جایگاه برشی، حلالیت، احتمال سیگنال پپتید ترشحی و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی به ترتیب از طریق نرم افزارهایی همچون Signalp6، Psort، Protein-sol، PRED-TAT و Portparam مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله‌ی اول از ۲۹ سیگنال پپتید، ۲۶ مورد از فیلتر Signalp6 و از Psort تنها ۲ مورد عبور کردند. بررسی حلالیت و ترشحی بودن سیگنال پپتیدها نشان داد که تنها سیگنال پپتیدهای zraP و MalE مناسب بودند. در نهایت بررسی خواص فیزیکی شیمیایی نشان دادند که از بین ۲ پپتید مورد نظر MalE ویژگی‌های مطلوب‌تری را نشان داد. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت کهMalE به عنوان بهترین سیگنال پپتید برای بیان تاناتین می‌باشد. از نتایج به‌دست‌آمده می‌توان برای طراحی سازه‌های بیان پری‌پلاسمیک تاناتین در میزبان *Escherichia coli* استفاده کرد. هر چند بررسی‌های آزمایشگاهی جهت تایید نهایی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پپتید ترشحی، پروتئین، بیوانفورماتیک

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.5.0]

مقدمه

مقاومت روزافزون باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، لزوم معرفی داروهای جدید برای مبارزه با عفونت‌ها را ضروری کرده است. با این حال، بررسی دسته‌های جدید آنتی‌بیوتیکی با مکانیسم‌های عمل متفاوت برای مهار رشد و عفونت باکتریایی از اهمیت بالایی برخوردار است (Mancuso *et al.*, 2021). در میان طیف گسترده‌ای از ترکیبات ضدمیکروبی، پروتئین‌ها و پپتیدهای ضدمیکروبی جایگاه مهمی دارند. بنابراین، بررسی و ارزیابی آن‌ها امری ضروری و بسیار مؤثر است (Mba *et al.*, 2022).

در طول چند دهه گذشته، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش دام و طیور برای پیشگیری و درمان بیماری‌ها و همچنین تقویت رشد مورد توجه قرار گرفته است. فدراسیون بهداشت دام اتحادیه اروپا اعلام کرد که بخش قابل توجهی از تمام آنتی‌بیوتیک‌های تجویز شده در اتحادیه اروپا به حیوانات مزرعه داده می‌شود. در حالی که آنتی‌بیوتیک‌ها مزایایی از نظر سلامت و عملکرد حیوانات دارند، استفاده مداوم آن‌ها منجر به بروز مشکلات متعدد در مورد سلامت حیوانات و انسان می‌شود (Pokharel *et al.*, 2020). در میان این چالش‌ها، انتقال میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جایگاه ویژه‌ای دارد. این موضوع، جدا از زیان اقتصادی، پیچیدگی‌هایی را در حوزه درمان پزشکی ایجاد کرده است. علاوه بر این، می‌تواند به عنوان مخزنی برای ژن‌های مقاومت عمل کند و در درازمدت خطراتی برای سلامت انسان ایجاد کند (Jeihooni Nezhad and Karimi, 2023). در سال‌های اخیر، با افزایش مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی معمولی، محققان متعددی تحقیقاتی را برای ایجاد آنتی‌بیوتیک‌های جدید به منظور مدیریت و کاهش اثرات مضر عوامل بیماری‌زا عفونی آغاز کرده‌اند (Murray *et al.*, 2022).

پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) دسته نسبتاً جدیدی از آنتی بیوتیک‌های با منشا طبیعی هستند. این پپتیدها جزء جدایی ناپذیر سیستم ایمنی موجودات زنده هستند و نقش مهمی در تعاملات میکروبی ایفا می‌کنند و با از بین بردن میکروارگانیسم‌های مهاجم، ایمنی ذاتی موجودات را تقویت می‌کنند. علاوه بر این،AMPs توانایی تحریک سلول‌ها برای تولید کموکین‌ها، تحریک رگ‌زایی، تسریع بهبود زخم و تأثیر بر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در موجودات چند سلولی را دارند (Zhang *et al.*, 2021). در طول ده سال گذشته، پپتیدها به عنوان درمان امیدوارکننده برای مبارزه با طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند سرطان، دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی و بیماری‌های عفونی استفاده شده‌اند (Wang *et al.*, 2022).

اکثر پپتیدهای ضد میکروبی بار مثبت دارند و معمولاً از ۱۲ تا ۵۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند که بار مثبت آن‌ها عمدتاً به دلیل وجود اسیدهای آمینه بازی مانند لیزین و آرژنین است (Clark *et al.*, 2021). تاناتین یک پپتید کاتیونی از خانواده مارپیچ بتا است که با بار مثبت، خاصیت غیر همولیتیک و خواص آمفی پاتیک مشخص می‌شود. این پپتید در ابتدا از حشره *Podisus maculiventris* پس از فعال شدن سیستم ایمنی جدا شد. این پپتید جزء اصلی مکانیسم های دفاعی اولیه حشره است و اثربخشی وسیعی در برابر انواع عوامل بیماری زا، از جمله باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین قارچ‌ها نشان داده است (Tanhaeian *et al.*, 2020).

امروزه، استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک برای سنتز پپتیدهای ضد میکروبی رواج پیدا کرده است. رویکرد خاصی که شامل استفاده از سیستم بیان در *Escherichia coli* برای تولید تاناتین است، ایجاد شده است. برای تولید پپتیدهای ضد میکروبی از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.5.0]

تعیین سیگنال پپتید مناسب برای بیان پری پلاسمی پپتیدها بسیار مهم است. بنابراین، هدف اصلی تحقیق، گسترش کاربرد روش‌های بیوانفورماتیک در شناسایی این سیگنال پپتیدها است.

مواد و روش‌ها

دریافت توالی تاناتین از پایگاه داده ضد میکروبی

در این پژوهش، توالی اسیدآمینه‌ای تاناتین از مطالعه‌ی (Javadmanesh *et al*., 2020) تهیه شد.

جمع آوری سیگنال پپتیدها

برای بدست آوردن توالی‌های سیگنال پپتید، از پایگاه داده سیگنال پپتید (http://www.signalpeptide.de/) استفاده شد. لازم به ذکر است که شاخص‌های انتخاب شده از پایگاه داده، که برای اعتبارسنجی سیگنال پپتید برای بیان در *E. coli* استفاده می شد، از بررسی‌های تجربی به دست آمد. به عبارت ساده‌تر، انتخاب سیگنال پپتید بر اساس منبع آن‌ها (تأیید شده برای *E. coli*) و همچنین سایر پپتیدها تحت شرایط درون تراشه‌ای انجام شد. برای دستیابی به این هدف، یک بررسی کامل از ۱۳۲ توالی پپتید سیگنال، با تمرکز بر ارزیابی ویژگی‌های مولکولی و فیزیکوشیمیایی آن ها از طریق استفاده از ابزارهای آنلاین بهینه‌سازی شده انجام شد.

پیش بینی سیگنال پپتید مناسب

SignalP6

در ابتدا، از سرور SignalP6 برای تجزیه و تحلیل ۱۳۲ سیگنال پپتید انتخاب شده که برای بیان در *Escherichia coli* در نظر گرفته شده بودند، استفاده شد. هدف از این تجزیه و تحلیل تعیین نواحی برشی n، h و c برای سیگنال پپتید بود. در مجموع، این سرور مبتنی بر وب وجود سیگنال پپتید را پیش بینی می کند و محل برش آن‌ها را در باکتری های گرم مثبت، باکتری های گرم منفی، آرکی ها، و یوکاریوت ها مشخص می کند.

Psort

از آنجایی که هدف از این تحقیق شناسایی سیگنال پپتیدهای مناسب برای بیان تاناتین در پری پلاسم بود، مرحله بعدی شامل بررسی محل فعال پروتئین است. الگوریتم‌های متعددی برای پیش‌بینی محل‌های فعال پروتئین‌ها طراحی شده است، از جمله ابزارهایی مانند سرورهای PSORT، CELLO، Gneg-PLoc و ProtComp (Yu *et al*., 2012). از PSORT با دقت قابل قبولی استفاده شد. بنابراین، از این سرور در تحقیق فعلی استفاده شد. در مورد پروتئین‌های موجود در سیستم باکتریایی گرم مثبت، سه مسیر اصلی مشخص شده است که شامل محفظه‌های سیتوپلاسمی، غشایی و خارج سلولی می‌باشد. در مقابل، برای پروتئین‌های موجود در باکتری‌های گرم منفی، پنج ناحیه مجزا وجود دارد که شامل محفظه‌های سیتوپلاسمی، غشایی (خارجی و داخلی)، پری پلاسمی و خارج سلولی (ترشح شده) می‌باشد. بنابراین، از این سرور در تحقیق فعلی استفاده شد. در مورد پروتئین‌های موجود در سیستم باکتریایی گرم مثبت، سه مسیر اصلی محلی‌سازی مشخص شده است، از جمله محفظه‌های سیتوپلاسمی، غشایی و خارج سلولی. در مقابل، برای پروتئین‌های موجود در باکتری‌های گرم منفی، پنج ناحیه مجزا وجود دارد، از جمله محفظه‌های سیتوپلاسمی، غشایی (هم خارجی و هم داخلی)، پری پلاسمی و خارج سلولی (ترشح شده).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.5.0]

Protein-sol

در مرحله بعد، حلالیت سیگنال پپتیدها با استفاده از نرم افزار آنلاین Protein-sol مورد ارزیابی قرار گرفت (http://protein-sol.manchester.ac.uk).

Protein-sol یک سرور تحت وب با دسترسی آزاد است که حلالیت پیش بینی شده را در مقیاسی از ۰ تا ۱ ارائه می دهد و تفسیر نتایج را ساده می‌کند (Hebditch *et al*., 2017). در مرحله بعد، پروتئین‌های ناپایدار و نامحلول حذف شدند.

PRED-TAT

در مرحله بعد، از سرور (http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/submit) PRED-TAT برای طبقه بندی پپتیدهای سیگنال بر اساس ویژگی های ترشح آن ها استفاده شد.

Portparam

از (https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam) Portparam برای پیش‌بینی خواص فیزیکی و شیمیایی مرتبط با ترکیب اسید آمینه، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک (PI)، شاخص ناپایداری، شاخص آلیفاتیک، اسیدهای آمینه باردار مثبت و منفی و میانگین مقدار آب‌دوستی (GRAVY) سیگنال پپتیدها استفاده شد (Ali *et al*., 2018).

نتایج و بحث

همانطور که نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است، از ۲۹ سیگنال پپتید مورد استفاده در سرور SignalP6، ۲۶ سیگنال پپتید با احتمال بالای ۹۰ درصد در ناحیه ی مطلوب برش داده شدند و وارد مرحله ی بعدی شدند. مطالعه‌ای در ارتباط با بررسی بهترین سیگنال پپتید جهت بیان پپتید ضد میکروبی بوفورین I در باکتری *E. coli* انجام شد. این محققین در بررسی با سرور SignalP4 نشان دادند که از سیگنال پپتیدهای مورد انتخاب فقط torA با D-score= 0.177 امتیاز مورد قبول را کسب نکرد و بقیه موارد مورد بررسی در این مرحله به عنوان سیگنال پپتید در نظر گرفته شدند (MalE، ptrA وzraP). همچنین، این محققین اظهار داشتند که همه سیگنال پپتیدها دارای مناطق h،n و c واضح بودند به جزtorA و با توجه به محل برش پیش‌بینی‌شده توالی ycdO، ptrA، rbsB و efeO در ناحیه نامطلوب بودند (Roshanak *et al*., 2020). موافق با نتایج مطالعه‌ی حاضر MalE، ptrA و zraP امتیاز مورد نیاز از این سرور را برای مرحله‌ی بعدی کسب کردند.

جدول ۱. بررسی سیگنال پپتید با استفاده از سرور SignalP6

Number	Protein name	Signal peptide	source	sequence	Cleavage site between pos	probability
1	Protein sufI	sufI	*E. coli*	MSLSRRQFIQASGIALCAG AVPLKASA	54 and 55	0.809059
2	Zinc resistance-associated protein	zraP	*E. coli*	MKRNTKIALVMMALSAM AMGSTSAFA	26 and 27	0.969466
3	Protease 3	ptrA	*E. coli*	MPRSTWFKALLLLVALW APLSQA	23 and 24	0.977334
4	Maltose-binding periplasmic protein	malE	*E. coli*	MKIKTGARILALSALTTM MFSASALA	26 and 27	0.968867
5	Heat-labile enterotoxin B chain	EltB	*E. coli*	MNKVKFYVLFTALLSPLC AHG	21 and 22	0.686577
6	Maltoporin	LamB	*E. coli*	MMITLRKLPLAVAVAAG VMSAQAMA	25 and 26	0.938707

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.5.0]

7	Protein prsK	prsK	*E. coli*	MIKSTGALLLFAALSAGQ AMA	21 and 22	0.964913
8	Taurine-binding periplasmic protein	tauA	*E. coli*	MAISSRNTLLAALAFIAFQ AQA	22 and 23	0.975807
9	Maltoporin	LamB	*E. coli*	MMITLRKLPLAVAVAAG VMSAQAMA	25 and 26	0.938707
10	Flagellar P-ring protein	flgI	*E. coli*	MVIKFLSALILLLVTTAAQ A	20 and 21	0.971069
11	Iron(III) dicitrate-binding periplasmic protein	fecB	*E. coli*	MLAFIRFLFAGLLLVISHA FA	21 and 22	0.973554
12	Periplasmic protein torT	torT	*E. coli*	MRVLLFLLLSLFMLPAFS	18 and 19	0.972544
13	Uncharacterized protein yncJ	yncJ	*E. coli*	MFTKALSVVLLTCALFSG QLMA	22 and 23	0.971087
14	Periplasmic appA protein	appA	*E. coli*	MKAILIPFLSLLIPLTPQSA FA	22 and 23	0.968169
15	Cytochrome c-type biogenesis protein	ccmH	*E. coli*	MRFLLGVLMLMISGSALA	18 and 19	0.972203
16	Outer membrane protein assembly factor yaeT	YAET	*E. coli*	MAMKKLLIASLLFSSATV YG	20 and 21	0.972526
17	Outer membrane protein N	OMPN	*E. coli*	MKSKVLALLIPALLAAGA AHA	21 and 22	0.969340
18	Outer membrane protein X	OMPX	*E. coli*	MKKIACLSALAAVLAFTA GTSVA	23 and 24	0.973324
19	Outer membrane protease ompP	OMPP	*E. coli*	MQTKLLAIMLAAPVVFSS QEASA	23 and 24	0.969444
20	Outer-membrane lipoprotein carrier protein	LOLA	*E. coli*	MKKIAITCALLSSLVASSV WA	23 and 24	0.969444
21	Glucose-1-phosphatase	Agp	*E. coli*	MNKTLIAAAVAGIVLLAS NAQA	22 and 23	0.975870
22	Endonuclease-1	EndA	*E. coli*	MYRYLSIAAVVLSAAFSG PALA	22 and 23	0.969725
23	Cyclic di-GMP-binding protein	BcsB	*E. coli*	MKRKLFWICAVAMGMSA FPSFMTQA	25 and 26	0.896832
24	Sigma-E factor regulatory protein RseB	RseB	*E. coli*	MKQLWFAMSLVTGSLLF SANASA	23 and 24	0.951564
25	Protein GltF	GltF	*E. coli*	MFFKKNLTTAAICAALSV AAFSAMA	25 and 26	0.970569
26	Threonine-rich inner membrane protein GfcA	GfcA	*E. coli*	MKHKLSAILMAFMLTTPA AFA		
27	Glucose-1-phosphatase	Agp	*E. coli*	MNKTLIAAAVAGIVLLAS NAQA	22 and 23	0.975870
28	Uncharacterized protein YpeC	YpeC	*E. coli*	MFRSLFLAAALMAFTPLA ANA	21 and 22	0.972541
29	Uncharacterized fimbrial-like protein YraK	YraK	*E. coli*	MKRAPLITGLLLISTSCAY A	16 and 17	0.937013

موراد هایلایت قرمز، امتیاز مورد نیاز در این سرور را کسب نکردند و در ادامه حذف شدند.

با گسترش تکنولوژی و ایجاد تکنیک‌های دی‌ان‌ای نوترکیب، حلالیت پروتئین‌های هترولوگ اهمیت پیدا کرد. چرا که تجمع پروتئین‌های نامحلول بیان شده و فولدینگ نادرست می‌توانند منجر به

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.5.0]

تشکیل اجسام انکلوژن شوند و از طرفی بازده پروتئین‌های به درستی فولد شده را نیز کاهش می دهند (Khatami *et al*., 2020). جهت حل این مسئله، بیان پروتئین های هترولوگ در فضای پری پلاسمی *E. coli* پیشنهاد می‌شود. انتقال پروتئین به فضای پری پلاسمی منجر به سهولت خالص‌سازی می‌شود چرا که در این فضا پروتئین کمتری وجود دارد. دیگر مزایا استفاده از سیستم بیانی پری پلاسمی شامل جلوگیری از حمله پروتئاز و گسترش N-Terminal Met و همچنین داشتن پروتئین فولد شده مناسب‌تر است (Khatami *et al*., 2020).

نتایج شناسایی جایگاه Subcellular سیگنال پپتیدها در جدول ۲ ارائه شده است. در میان چندین الگوریتمی که برای پیش‌بینی جایگاه Subcellular پروتئین‌ها وجود دارند مانند سرورهای PSORTb، CELLO، Gneg-PLoc و ProtComp (Yu *et al*., 2012)، گزارش شده است که سرور PSORTb بالاترین دقت را داشته است. به طوریکه، براساس مطالعه‌ای که آخرین بار در سال ۲۰۱۰ انجام شد، PSORTb v3.0.2 دقیق ترین ابزار پیش بینی محل فعالیت پروتئین در باکتری بوده است. PSORTb نسخه ۳.۰.۲ نسبت به PSORTb نسخه ۲.۰.۴ پیشرفت های زیادی داشته است. PSORTb v3.0.3 که در فوریه ۲۰۲۰ منتشر شد، آخرین نسخه این نرم افزار است و باگ موجود در نسخه ۳.۰.۲ را ندارد و در مطالعه ی حاضر نیز از این سرور استفاده شد. همانطور که در جدول ۲ مشاهده شده است از ۲۶ سیگنال پپتید وارد شده به سرور PSORTb، تنها ۲ مورد آن (zraP و malE) دارای ویژگی مطلوب جهت بیان در ناحیه پری پلاسمی بودند. در مطالعه‌ای که توسط (Roshanak *et al*., 2020) انجام گرفت، سیگنال پپتیدهای MdoD, YcdO, torA, MalE, ptrA, ugpB, zraP, sfmC, rbsB, papK، hofQ، efeO, pbpG در ناحیه‌ی پری پلاسمی واقع شدند که zraP و MalE با مطالعه‌ی حاضر نتایج مشابهی را نشان داد.

جدول ۲. بررسی سیگنال پپتید با استفاده از سرور Psort

No	Protein name	Signal peptide	Accession number	source	Amino acid sequence	Cytoplasmic Membrane	Outer Membrane	Extracellular	Periplasmic
2	Zinc resistance-associated protein	zraP	WP_042082503	*E. coli*	MKRNTKIALVMMALSAMAMGSTSAFA	0.06	0.06	0.11	9.76
3	Protease 3	ptrA	EIL66839	*E. coli*	MPRSTWFKALLLLVALWAPLSQA	9.86	0.01	0.01	0.12
4	Maltose-binding periplasmic protein	malE	P0AEX9	*E. coli*	MKIKTGARILALSALTTMMFSASALA	0.06	0.11	0.11	9.76
6	Maltoporin	LamB	P02943	*E. coli*	MMITLRKLPLAVAVAAGVMSAQAMA	0.01	9.93	0.03	0.03
7	Protein prsK	prsK	EQN57820	*E. coli*	MIKSTGALLLFAALSAGQAMA	2.50	2.50	2.50	2.50

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.5.0]

8	Taurine-binding periplasmic protein	tauA	WP_032218149	*E. coli*	MAISSRNTLLAALAFIAFQAQA	2.50	2.50	2.50	2.50
9	Flagellar P-ring protein	flgI	EFJ97486	*E. coli*	MVIKFLSALILLLVTTAAQA	9.86	0.01	0.01	0.12
10	Iron(III) dicitrate-binding periplasmic protein	fecB	KDW96130	*E. coli*	MLAFIRFLFAGLLLVISHAFA	9.86	0.01	0.01	0.12
11	Periplasmic protein torT	torT	WP_029487908	*E. coli*	MRVLLFLLLSLFMLPAFS	9.86	0.01	0.01	0.12
12	Uncharacterized protein yncJ	yncJ	EYB53638	*E. coli*	MFTKALSVVLLTCALFSGQLMA	2.50	2.50	2.50	2.50
13	Periplasmic appA protein	appA	P07102	*E. coli*	MKAILIPFLSLLIPLTPQSAFA	2.50	2.50	2.50	2.50
14	Cytochrome c-type biogenesis protein	ccmH	P0ABM9	*E. coli*	MRFLLGVLMLMISGSALA	2.50	2.50	2.50	2.50
15	Outer membrane protein assembly factor yaeT	YAET	P0A941	*E. coli*	MAMKKLLIASLLFSSATVYG	2.50	2.50	2.50	2.50
16	Outer membrane protein N	OMPN	P77747	*E. coli*	MKSKVLALLIPALLAAGAAHA	2.50	2.50	2.50	2.50
17	Outer membrane protein X	OMPX	P0A919	*E. coli*	MKKIACLSALAAVLAFTAGTSVA	2.50	2.50	2.50	2.50
18	Outer membrane protease ompP	OMPP	P34210	*E. coli*	MQTKLLAIMLAAPVVFSSQEASA	2.50	2.50	2.50	2.50
19	Outer-membrane lipoprotein carrier protein	LOLA	P61316	*E. coli*	MKKIAITCALLSSLVASSVWA	2.50	2.50	2.50	2.50
20	Glucose-1-phosphatase	Agp	P19926	*E. coli*	MNKTLIAAAVAGIVLLASNAQA	2.50	2.50	2.50	2.50
21	Endonuclease-1	EndA	P25736	*E. coli*	MYRYLSIAAVVLSAAFSGPALA	2.50	2.50	2.50	2.50
22	Cyclic di-GMP-binding protein	BcsB	P37652	*E. coli*	MKRKLFWICAVAMGMSAFPSFMTQA	9.97	0.01	0.01	0.01
24	Protein GltF	GltF	P28721	*E. coli*	MFFKKNLTTAAICAALSVAAFSAMA	2.50	2.50	2.50	2.50
25	Threonine-rich inner membrane	GfcA	P75885	*E. coli*	MKHKLSAILMAFMLTTPAAFA	2.50	2.50	2.50	2.50

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.5.0]

	protein GfcA								
26	Glucose-1-phosphatase	Agp	P19926	*E. coli*	MNKTLIAA AVAGIVLL ASNAQA	2.50	2.50	2.50	2.50
27	Uncharacterized protein YpeC	YpeC	P64542	*E. coli*	MFRSLFLA AALMAFTP LAANA	2.50	2.50	2.50	2.50
28	Uncharacterized fimbrial-like protein YraK	YraK	P43319	*E. coli*	MKRAPLIT GLLLISTSC AYA	2	2	2	2

نتیجه پیش‌بینی حلالیت سیگنال پپتیدهای انتخاب شده سرور قبلی در جدول ۳ گزارش شده است. وب سرورهای مختلف برای پیش‌بینی حلالیت پروتئین‌ها در *E. coli* ارائه شده‌اند (Hebditch *et al*., 2017). سرور Protein sol یکی از دقیق‌ترین سرورها پیش بینی حلالیت در بین سرورهای پیش بینی حلالیت است (Yarabbi *et al*., 2019). مقدار عددی گزارش شده در سرور Protein sol بین ۰ و ۱ است (Hebditch *et al*., 2017). همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود؛ مقدار حلالیت برای هر دو سیگنال پپتید بیشتر از ۰/۴۵ پیش‌بینی شد که قابل قبول است. در نتیجه، نتایج نشان می‌دهد که هر دو سیگنال پپتید متصل شده به تاناتین می‌توانند یک پروتئین محلول با امتیاز اطمینان بالاتر از ۰/۹۸ ایجاد کنند. در مطالعه‌ای که توسط (Roshanak *et al*., 2020) انجام شد، سیگنال پپتیدهای MalE,hofQ,papK, zraP, sfmC, دارای حلالیت قابل قبولی بودند که zraP و MalE با مطالعه‌ی حاضر مشترک بود.

جدول ۳. بررسی سیگنال پپتید با استفاده از سرور Protein sol

No	Protein name	Signal peptide	Accession number	source	Amino acid sequence	Solubility
2	Zinc resistance-associated protein	zraP	WP_042082503	*E. coli*	MKRNTKIALVMMALSAMAMGS TSAFA	0.770
4	Maltose-binding periplasmic protein	malE	P0AEX9	*E. coli*	MKIKTGARILALSALTTMMFSAS ALA	0.710

نتایج پیش‌بینی ترشح سیگنال پپتیدها نشان داد که هر دو پپتید به نوع سیستم ترشح پروتئین نوع II و مسیر Sec تعلق دارند (جدول ۴). در میان انواع سیستم ترشح پروتئین (نوع I، نوع II و نوع III)، نوع II بیشترین استفاده را دارا است. سیستم نوع II از سه مسیر ترشحی وابسته به(Sec) SecB، ذرات تشخیص سیگنال (SRP) و مسیرهای انتقال دوگانه آرژینین (TAT) تشکیل شده است و به طور گسترده در بین باکتری‌های گرم منفی منتشر شده است (Choi and Lee, 2004). در مطالعه‌ی حاضر از ۲ سیگنال پپتید وارد شده به PRED-TAT ، هر دو مورد به صورت ترشحی با صحت بالایی بودند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.5.0]

جدول ۴. بررسی سیگنال پپتید با استفاده از سرور PRED-TAT

No	Protein name	Signal peptide	source	Accession number	Amino acid sequence	Reliability score	Most likely cleavage site
2	Zinc resistance-associated protein	zraP	*E. coli*	WP_042082503	MKRNTKIALV MMALSAMAM GSTSAFA	1.000	1 - 26 [AFA-AG]
4	Maltose-binding periplasmic protein	malE	*E. coli*	P0AEX9	MKIKTGARILA LSALTTMMFS ASALA	0.999	1 - 26 [ALA-AG]

جدول ۵ نتایج بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی در ترکیب اسیدهای آمینه، وزن مولکولی، PI، شاخص ناپایداری، شاخص آلیفاتیک، باقیمانده‌های باردار مثبت و منفی و میانگین کل هیدروپاتیک (GRAVY) سیگنال پپتیدها توسط سرور Portparam را نشان می دهد. ProtParam، به عنوان بخشی از ExPASy و موسسه بیوانفورماتیک اروپایی (EIB) است که برای اندازه گیری ویژگی های فیزیکی و شیمیایی پروتئین‌ها با قابلیت اطمینان بالا مورد استفاده قرار می گیرد (Gasteiger *et al*., 2005).

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بیشترین و کمترین میزان وزن مولکولی (MW) به ترتیب مربوط به zraP (5282.50)و malE (5247.47) بود. همچنین، نتایج نشان داد که PI برای هر دو مورد ۱۱.۱۱ بود. میانگین کل هیدروپاتیسیتی (GRAVY) برای مقایسه هیدروپاتی سیگنال پپتیدها استفاده می‌شود (Zamani *et al*., 2015).

نتایج نشان داد که کمترین GRAVY مربوط zraP (0.050) و بیشترین متعلق به malE (0.194) است. شاخص آلیفاتیک به عنوان حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره جانبی آلیفاتیک در یک توالی اسید آمینه ممکن است به عنوان یک عامل مثبت برای افزایش پایداری حرارتی پروتئین های کروی در نظر گرفته شود. تغییرات این شاخص برای سیگنال پپتیدهای مورد مطالعه zraP وmalE به ترتیب ۶۵/۲۱ و ۸۳/۵۴ بود. به طور کلی وقتی بی ثباتی بیش از ۴۰ باشد، پروتئین ها ناپایدار در نظر گرفته می شوند که هر دو پپتید مورد نظر پایدار گزارش شدند (Zamani *et al*., 2015) .از آنجاییکه تمام ویژگی ها بین این دو سیگنال پپتید تقریبا مشابه است، اما میزان حلالیت، GRAVY و شاخص آلیفاتیک درmalE مقادیر مطلوب‌تری را نشان داد.

جدول ۵. بررسی سیگنال پپتید با استفاده از سرور Portparam

No	Protein name	Signal peptide	*M.W	*PI	Gravity	*AI	Stability	*H
2	Zinc resistance-associated protein	zraP	5282.50	11.11	0.050	65.21	stable	>10h
4	Maltose-binding periplasmic protein	malE	5247.47	11.11	0.194	83.54	stable	>10h

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.5.0]

مطالعه‌ی حاضر با هدف معرفی و پیش‌بینی سیگنال پپتیدهای مناسب برای بیان پپتید تاناتین با بیان پری پلاسمیک در *E. coli* بود و از بهترین نرم‌افزارها جهت ارزیابی ویژگی‌های سیگنال پپتیدها استفاده شد. در نهایت نتیجه گیری شد که سیگنال پپتید Maltose-binding periplasmic protein (malE) به عنوان بهترین سیگنال پپتید جهت بیان پری پلاسمی تاناتین در باکتری *E. coli* گزارش شد.

سپاسگزاری

از آزمایشگاه چند تخصصی رسپیناژن پارس جهت همکاری در این پژوهش نهایت قدردانی را داریم.

منابع

Choi JH, Lee S. (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. ***Applied Microbiology and Biotechnology***. *64*: 625-635. https://doi.org/10.1007/s00253-004-1559-9.

Clark S, Jowitt TA, Harris LK, Knight CG, Dobson CB. (2021) The lexicon of antimicrobial peptides: A complete set of arginine and tryptophan sequences. ***Communications Biology***. *4*: 605. https://doi.org/10.1038/s42003-021-021137-7.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud SE, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. ***Methods in Molecular Biology***. *112*: 571-607. https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571.

Hebditch M, Carballo-Amador MA, Charonis S, Curtis R, Warwicker J. (2017) Protein–Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. ***Bioinformatics***. *33*: 3098-3100. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx345.

Javadmanesh A, Mousavi Z, Tanhaeian A, Azghandi M. (2020) Comparison of antimicrobial activity of thanatin peptide with cinnamon and oregano essential oils on some pathogenic bacteria. ***Veterinary Research & Biological Products***. *33*: 47-53.

Jeihooni Nezhad Z, Karimi J. (2023) The effects of azithromycin, tetracycline and erythromycin antibiotics on some microalgae. ***Journal of Biosafety***. *16*(1): 1-14. [In Persian]

Khatami SH, Taheri-Anganeh M, Arianfar F, Savardashtaki A, Sarkari B, Ghasemi Y, Mostafavi-Pour Z. (2020) Analyzing signal peptides for secretory production of recombinant diagnostic antigen B8/1 from *Echinococcus granulosus*: An *in silico* approach. ***Molecular Biology Research Communications.*** *9*(1). https://doi.org/10.22099/mbrc.2019.35429.1457.

Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. (2021) Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. ***Pathogens***. *10*: 1310. https://doi.org/10.3390/pathogens10101310.

Mba IE, Nweze EI. (2022) Focus: Antimicrobial resistance: Antimicrobial peptides therapy: An emerging alternative for treating drug-resistant bacteria. ***The Yale Journal of Biology and Medicine***. *95*(4): 445-463.

Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E, Johnson SC. (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. ***The Lancet***. *399*: 629-55. https://doi.org/101016/S0140-6736(21)02724-0.

Pokharel S, Shrestha P, Adhikari B. (2020) Antimicrobial use in food animals and human health: time to implement 'One Health'approach. ***Antimicrobial Resistance & Infection Control***. *9*: 181. https://doi.org/10.1186/s13756-020-00847-x.

Roshanak S, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Javadmanesh A, Movaffagh J. (2020) Comparison of different signal sequences to use for periplasmic over-expression of buforin I in *Escherichia coli*: An *in silico* study. ***International Journal of Peptide Research and Therapeutics***. *26*: 2495-2504. https://doi.org/10.1007/s10989-020-10042-6.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.5.0]

Tanhaeian A, Azghandi M, Mousavi Z, Javadmanesh A. (2020) Expression of thanatin in HEK293 cells and investigation of its antibacterial effects on some human pathogens. ***Protein and Peptide Letters***. *21*(1): 41-47. https://doi.org/10.2174/0929866526666190822162140.

Wang L, Wang N, Zhang W, Cheng X, Yan Z, Shao G, Wang X, Wang R, Fu C. (2022) Therapeutic peptides: Current applications and future directions. ***Signal Transduction and Targeted Therapy***. *7*: 48. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4.

Yarabbi H, Mortazavi SA, Yavarmanesh M, Javadmanesh A. (2020) *In silico* study of different signal peptides to express recombinant glutamate decarboxylase in the outer membrane of *Escherichia coli*. ***International Journal of Peptide Research and Therapeutics***. *26*: 1879-1891. https://doi.org/10.1007/s10989-019-09986-1.

Yu K, Lin L, Hu S, Huang J, Mei L. (2012) C-terminal truncation of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 extends its activity toward near-neutral pH. ***Enzyme and Microbial Technology***. *50*(4-5): 263-269. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.01.010.

Zamani M, Nezafat N, Negahdaripour M, Dabbagh F, Ghasemi Y. (2015) *In silico* evaluation of different signal peptides for the secretory production of human growth hormone in *E. coli*. ***International Journal of Peptide Research and Therapeutics***. *21*: 261-268. https://doi.org/10.1007/s10989-015-9454-z.

Zhang QY, Yan ZB, Meng YM, Hong XY, Shao G, Ma JJ, Cheng XR, Liu J, Kang J, Fu CY. (2021) Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. ***Military Medical Research***. *8*: 1-25. https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.5.0]

Investigation of Periplasmic Signal Peptides for the Expression of Thanatin Peptide in *Escherichia coli*

Abbas Tanhaeian[1], Leili Simaei Soltani[2], Seyedeh Zahra Mousavi[2*],

1. Department of Crop Production and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Engineering, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
2. Animal Science Department, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

zaramousavi@yahoo.com

Abstract

Periplasmic expression of antimicrobial peptides is one of the important options in protein expression systems. In the present study, bioinformatics methods were used to predict the best signal peptide for the expression of thanatin in the host *Escherichia coli*. So that, the sequences of 29 signal peptides were prepared from signal peptide databases. Since the aim of this study was to introduce optimal signal peptides for periplasmic expression, the environment in which the protein functions, cleavage site, solubility, probability of secretory signal peptide and physical and chemical properties were investigated through software such as Signalp6, Psort, Protein-sol, PRED-TAT and Portparam, respectively. In the first stage, out of 29 signal peptides, 26 passed the Signalp6 filter and only 2 passed the Psort filter. The solubility and secretory properties of the signal peptides showed that only the zraP and MalE signal peptides were suitable. Finally, the physical and chemical properties of the two peptides showed that MalE showed more favorable properties. Finally, it can be concluded that MalE is the best signal peptide for the expression of thanatin. The results obtained can be used to design periplasmic expression constructs of thanatin in the *Escherichia coli* host. However, laboratory studies are recommended for final confirmation.

Keywords: Secretory peptide, Protein, Bioinformatics

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.5.0]