

Original Article

Expression of Soluble c-CfTXB Protein from *Chironex fleckeri* Jellyfish Fused to SUMO Tag in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and Evaluation of Immunogenicity in Syrian Mice

Mehdi Bakhshian¹ , Hossein Honari¹ , Hossein Samiei Abianeh² ,
Seyed Mojtaba Aghaie³ 

¹ Department of Biology, School of Basic Sciences, Imam Hossein comprehensive university, Tehran, Iran.

² Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, School of Medicine, University of Medical Sciences Mashhad, Iran.

³ Department of Biology, School of Basic Sciences, Imam Hossein comprehensive university, Tehran, Iran

✉ Corresponding author:

Vice President of Medicine,
Shahid Sadougi University of
Medical Sciences, Yazd, Iran

Email: hhonari@ihu.ac.ir

Tel: 09123848187

Postal Code: 1698715861

Received: September 09, 2025

Revised: April 27, 2026

Accepted: May 09, 2026

Citation:

Bakhshian M, Honari H, Samiei Abianeh H, Aghaie A.M. Expression of Soluble c-CfTXB Protein from *Chironex fleckeri* Jellyfish Fused to SUMO Tag in *Escherichia coli* BL21(DE3) and Evaluation of Immunogenicity in Syrian Mice. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2026; 34(4): 10163-76.

Introduction: The box jellyfish *Chironex fleckeri* is a toxin-producing species whose cytotoxic and neurotoxic effects have been well demonstrated in living organisms. Due to the presence of various bioactive proteins within its toxin, acute exposure can lead to temporary paralysis or even death under severe conditions. This study aimed to solubilize and evaluate the immunogenicity of the engineered SUMO-tagged recombinant c-CfTXB protein as an antigen, by comparing its immune response to the untagged form in animal model.

Methods: The StXB gene fragment was excised from the pET-28aSUMO-c-CfTXB-StXB vector using enzymatic digestion. Subsequently, the recombinant proteins SUMO-c-CfTXB and c-CfTXB were expressed in competent prokaryotic hosts following IPTG induction, and purified through Ni-NTA affinity chromatography. Protein identity was confirmed by Western blot analysis. Following immunization of mouse groups, antibody titers were measured using indirect ELISA, and protective efficacy was evaluated through a toxin challenge. Data analysis was performed using One-way ANOVA combined with survival analysis.

Results: Successful protein expression and separation were confirmed by SDS-PAGE and Western blot analysis, demonstrating that the SUMO tag enhanced the solubility of the target protein. In the toxin challenge test, only the vaccinated groups survived (100%) due to a significant increase in antibody titers (Pvalue c-CfTXB>0.0001 and Pvalue SUMO-c-CfTXB>0.0003).

Conclusion: Fusion of the SUMO tag to the engineered c-CfTXB protein improved its folding, expression yield, purification efficiency, and solubility. These findings suggest that the successful immunogenicity of the antigen in the mouse model may pave the way for the design of recombinant vaccines to neutralize box jellyfish venom.

Keywords: CfTXB, *Chironex fleckeri*, Jellyfish, Soluble protein, SUMO.

مقاله پژوهشی

تولید پروتئین محلول c-CfTXB عروس دریایی Chironex fleckeri متصل به تگ سامو در اشریشیاکلی (Bl21(DE3) و بررسی ایمنی زایی آن در موش سوری

مهدی بخشیان^۱ ID، حسین هنری^۱ ID، حسین سمیعی ابیانه^۲ ID، سید مجتبی آقایی^۳ ID

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

^۲ گروه زیست‌فناوری و نانوفناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

^۳ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

✉ نویسنده مسئول:

حسین هنری

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم

پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)،

تهران، ایران.

پست الکترونیک:

hhonari@ihu.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۲۳۸۴۸۱۸۷

صندوق پستی: ۱۶۹۸۷۱۵۸۶۱.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۱۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۲/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۱۹

ارجاع:

بخشیان مهدی، هنری حسین،

سمیعی ابیانه حسین، آقایی سید

مجتبی. تأثیر تولید پروتئین محلول

c-CfTXB عروس دریایی

Chironex fleckeri متصل به

تگ سامو در اشریشیاکلی

(Bl21(DE3) و بررسی ایمنی‌زایی

آن در موش سوری. مجله علمی

پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی

شهید صدوقی یزد ۱۴۰۵؛ ۳۴ (۴):

۱۰۱۶۳-۷۶.

مقدمه: عروس دریایی Chironex fleckeri از گونه‌های تولیدکننده توکسین‌های پروتئینی است که اثرات سایتوتوکسیک و نوروتوکسیک آن‌ها بر موجودات زنده به اثبات رسیده است. به علت حضور انواع پروتئین‌های فعال زیستی در توکسین این جاندار، فلج موقت یا حتی مرگ در شرایط حاد مشاهده شده است. هدف از این مطالعه، محلول‌سازی و بررسی ایمنی‌زایی پروتئین مهندسی‌شده c-CfTXB متصل به تگ سامو به‌عنوان یک آنتی‌ژن نوترکیب و مقایسه پاسخ ایمنی آن با فرم بدون تگ در مدل حیوانی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی هضم آنزیمی برای برش قطعه ژنی StXB از وکتور pET-SUMO-c-CfTXB-StXB انجام شد. سپس بیان پروتئین‌های نوترکیب SUMO-c-CfTXB-StXB و c-CfTXB در میزبان پروکاریوتی مستعد با القاء IPTG انجام و پس از آن به کمک ستون کروماتوگرافی Ni-NTA خالص‌سازی گردید. وسترن‌بلاتینگ جهت تایید پروتئین‌ها انجام پذیرفت. پس از ایمن‌سازی گروه‌های موشی، تیتراژ آنتی‌بادی با روش الایزا و قابلیت حفاظتی واکسن با چالش توکسین ارزیابی گردید. داده‌ها از نرم‌افزار SPSS version 16 با و با آزمون ANOVA یک‌طرفه و تحلیل بقا پردازش شدند.

نتایج: طی بیان و جداسازی موفق پروتئین‌ها با SDS-PAGE، مشخص شد که تگ سامو باعث محلول شدن پروتئین هدف گردیده است. در آزمون چالش و مقابله با توکسین، تنها گروه‌های واکسینه‌شده به سبب ایجاد اختلاف معنی‌دار در میزان آنتی‌بادی تولیدشده، بقاء ۱۰۰٪ خود را حفظ کردند.

نتیجه‌گیری: اتصال تگ SUMO به پروتئین مهندسی‌شده c-CfTXB باعث بهبود تاخوردگی پروتئین هدف و نهایتاً بهبود بیان، میزان تخلیص و سهولت آن گردید. این نتایج می‌تواند در طراحی واکسن‌های نوترکیب برای مقابله با زهر عروس‌های دریایی با توجه به ایمنی‌زایی موفق آنتی‌ژن در مدل موشی، مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: تگ سامو، پروتئین محلول، پروتئین c-CfTXB، عروس دریایی، کایرونکس فلکری

مقدمه

کیسه‌تنانی که از پنج انقراض دسته‌جمعی جان سالم به در برده‌اند، نقش مهمی در اکوسیستم‌های دریایی دارند (۱،۲). اکثر گونه‌های کیسه‌تنان برای انسان بی‌ضرر هستند. با این حال، برخی از گونه‌های عروس‌دریایی به دلیل توانایی پیشرفته در شکار طعمه، تولید سموم قدرتمند و اثرات بالقوه کشنده، مستثنا از این قاعده می‌باشند. گرچه برخی از گونه‌های موجود در آب‌های خلیج فارس و دریای عمان نسبت به گونه‌های جهانی سمیت کمتری دارند، اما قادر به ایجاد اثرات مخریبه مانند فلج طولانی‌مدت (تا ۶۰ روز) و حتی مرگ می‌شوند. بیش از ۵۵۰ مورد گزیدگی عروس دریایی در ساحل چابهار در نوروز ۱۴۰۲ توسط اورژانس پیش بیمارستانی و مدیر حوادث دانشگاه علوم پزشکی ایرانشهر گزارش شده است (۳،۴). نماتوسیت‌های عروس‌دریایی حاوی پروتئین‌های سمی متعددی از جمله CftX-1 (۴۳ کیلودالتون)، CftX-2 (۴۵ کیلودالتون)، CftXA (۴۰ کیلودالتون) و CftXB (۴۲ کیلودالتون) هستند (۵) که قابلیت بیان در میزبان‌های پروکاریوتی مانند اشریشیاکلی را دارند (۶). در این میان، CftXA و CftXB از فراوان‌ترین و مهم‌ترین پروتئین‌های سمی موجود در گونه *Chironex fleckeri* محسوب می‌شوند (۷) که می‌توانند لیز گلبول‌های قرمز را تسهیل کنند (۸). ژن *CftX* دارای ۱۴۹۳ جفت‌باز بوده و یک پروتئین ۵۱ کیلودالتون را کد می‌کند (۹،۱۰). با وجود اهمیت زیستی عروس‌های دریایی، مطالعات محدودی بر روی گونه *C. fleckeri* موجود در آب‌های جنوبی ایران انجام شده است. بررسی ایمنی‌زایی نانوانتی‌ژنی c-CftXB در موش سوری توسط صمدپور (۶)، بررسی ایمنی‌زایی آنتی‌ژن N-CftX-2 عروس‌دریایی در موش سوری توسط جلیل‌پور (۱۱)، جداسازی سموم *C. fleckeri* توسط بلک لائوسن (Black Lausen) (۱۲)، بخشی از تحقیقات صورت گرفته در این حوزه می‌باشد. در جنوب ایران، موارد گزش ناشی از این جانوران دریایی به‌ویژه در فصول گرم سال گزارش می‌شود که در برخی موارد، می‌تواند مرگ‌آور باشد. سموم تولیدشده عروس‌های دریایی، به‌سرعت جذب بدن

شده و بر عملکرد سیستم عصبی و قلبی-عروقی تأثیر می‌گذارد (۳،۴). آنزیم‌های موجود در این سموم موجب کاتابولیسم بافت‌های طعمه شده، درحالی‌که پروتئین‌های ایجادکننده منفذ، از طریق القای لیز اسمزی، باعث مرگ سلولی می‌شوند. تحریک سیستم ایمنی توسط ترکیبات سمی عروس‌دریایی، اغلب منجر به پاسخ‌های ایمنی ناکارآمد شده و در بسیاری از موارد، تولید پادزهر به‌عنوان استراتژی اصلی درمان مدنظر قرار می‌گیرد (۳،۴،۱۳). در مطالعه حاضر، محلول‌سازی پروتئین c-CftXB به واسطه اتصال به دنباله تگ سامو در میزبان پروکاریوتی بررسی شد. سامو یک پروتئین شبه یوبی‌کوئیتین است که به‌صورت کووالانسی به پروتئین‌های هدف متصل شده (۱۴) و موجب بهبود تآخوردگی و پایداری آن‌ها می‌شود (۱۵،۱۶). یکی از مشکلات رایج فناوری همجوشی پروتئین، ایجاد باقی‌مانده‌های N ترمینال نامطلوب همراه با تغییر ساختار طبیعی پروتئین هدف است اما زمانی که پروتئین هدف مستقیماً به C ترمینال سامو متصل شود، این مشکل برطرف شده و پروتئین محلول و فعال تولید می‌گردد (۱۷،۱۸). با توجه به ویژگی‌های ایمنی‌زایی c-CftXB، این پروتئین می‌تواند به‌عنوان یک ایمونوژن غالب مطرح گردد و کاندیدای بالقوه‌ای برای توسعه واکسن‌های نو ترکیب باشد. هدف این پژوهش، محلول‌سازی پروتئین مهندسی‌شده c-CftXB به‌واسطه اتصال به تگ سامو و ارزیابی ایمنی‌زایی آن در مدل حیوانی است.

روش بررسی

در این مطالعه، توالی آمینواسیدی پروتئین CftXB از ژنوم زهر *C. fleckeri* به‌منظور بررسی و تحلیل توالی، از پایگاه داده NCBI با شماره دسترسی JN695598.1 در قالب و فرمت FASTA استخراج شد. با توجه به نیاز پروتئین‌های سامو جهت برش در C ترمینال پروتئین هدف (۱۹،۲۰)، بخش C ترمینال از توالی ژنی انتخاب گردید تا با توالی تگ سامو ممزوج شده و در طراحی وکتور بیانی نو ترکیب مورد استفاده قرار گیرد. هم‌چنین دو نوع پلاسمید مورد استفاده قرار گرفت: پلاسمید pET-28a(+) حاوی ژن *c-CftXB* و پلاسمید pET-28aSUMO حاوی ژن *c-CftXB-StXB*. این

پلاسمیدها از مرکز زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) دریافت شدند و به‌عنوان حامل‌های بیان پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار گرفتند. علت حضور قطعه ژنی *StXB* بررسی خاصیت آنتی‌ژنی پروتئین‌های عروس‌دریایی در تحقیقات تکمیلی بعدی می‌باشد.

هضم آنزیمی قطعه ژنی *StXB*: پس از تأیید حضور ژن *c-CfTXB* و *c-CfTXB-StXB* در وکتورهای بیانی، فرآیند هضم آنزیمی برای جداسازی قطعه ژنی *StXB* از وکتور-pET-28aSUMO-c-CfTXB-StXB به کمک آنزیم‌های محدودالثر Sal1- Xho1 انجام شد. واکنش هضم آنزیمی به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد میسر گردید. صحت خطی شدن وکتور روی ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۱).

تهیه سلول مستعد و ترانسفورماسیون: در این مطالعه، سویه اشریشیا کلی BL21 (DE3) به‌عنوان میزبان پروکاریوتی برای بیان پروتئین نوترکیب انتخاب شد (۲۲). جهت تسهیل ورود پلاسمید به درون باکتری، فرآیند مستعدسازی سلول‌های باکتریایی طی دو مرحله تیمار شدن با کلریدکلسیم سرد استریل، انجام گرفت. ترانسفورماسیون با استفاده از روش شوک حرارتی انجام گرفت (۲۳، ۲۴). سلول‌های مستعد با پلاسمیدهای نوترکیب pET-28aSUMO-c-CfTXB (تست) و pET-28a-c-CfTXB (کنترل مثبت) انکوبه شدند و در معرض شوک حرارتی قرار گرفتند تا جذب پلاسمید تسهیل شود. جهت غربالگری، کشت باکتری بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (با غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای انتخاب کلنی‌های نوترکیب انجام شد.

تأیید ژن نوترکیب در کلونی‌های منتخب به روش PCR: جهت تأیید حضور ژن نوترکیب در کلونی‌های منتخب طی غربالگری آنتی‌بیوتیکی، از PCR استاندارد با بهره‌گیری از تکنیک گرادیانت استفاده شد. محصولات PCR جهت تجزیه و تحلیل الگوی باند، بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شدند. پس از اتمام الکتروفورز، باندهای DNA تحت نور UV مشاهده و مستند شدند (۲۵).

بیان پروتئین: کلونی‌های ترانسفورم شده‌ی منتخب در محیط کشت مایع لوریا-برتانی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. این محیط کشت به دلیل دارا بودن ترکیبات ساده و مغذی، pH مناسب و قابلیت غربالگری به کمک آنتی‌بیوتیک، رشد سریع و موثر باکتری را میسر می‌کند و شرایط را برای تولید و بیان پروتئین نوترکیب مهیا می‌نماید. پس از تلقیح کشت شبانه، القاء بیان ژن‌های نوترکیب و حذف پروتئین‌های سرکوب‌گر موجود در اپران لک با افزودن IPTG با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار انجام گرفت. جهت جمع‌آوری رسوب پروتئینی، سانتریفیوژ انجام گرفت. جهت تیمار سلول‌های باکتریایی، روش دنا توره استفاده گردید. در این روش، سلول‌ها ابتدا با بافر PBS و سپس با بافر لیزکننده B (حاوی اوره ۸ مولار و pH=۸) مخلوط شده و تحت سونیکاسیون قرار گرفتند. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ جهت تحلیل و ارزیابی بیان پروتئین نوترکیب و مقایسه آن‌ها با یکدیگر، با سمپل بافر (غلظت شده به ۵x) محلول گردید و بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲٪ بارگذاری شد. الکتروفورز به مدت ۹۰ دقیقه با جریان ثابت ۲۵ آمپر و ولتاژ ۲۵۰ ولت انجام گرفت. برای مشاهده باندهای پروتئینی نیز از روش رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو استفاده گردید (۲۶).

تخلیص پروتئین: جهت تخلیص پروتئین‌های نوترکیب، پس از بیان تحت شرایط دنا توره، از کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA استفاده گردید. پروتئین‌های نوترکیب پس از شست‌وشو با بافرهای C (pH=۶/۳)، D (pH=۵/۹) و E (pH=۴/۵) حاوی اوره، تحت تغییر شرایط pH قرار گرفتند و با استفاده از محلول‌های ایمیدازول با pH معادل ۸ از ستون کروماتوگرافی (تهیه شده از شرکت زیست گستر ارگ) جدا شدند. برای تحلیل این فرآیند، نمونه‌های حاصل بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲٪ الکتروفورز گردید (۲۷). هم‌چنین میزان پروتئین موجود در هر محلول نیز به روش برادفورد غلظت‌سنجی شد (۲۸).

تایید پروتئین نوترکیب با تکنیک وسترن بلاتینگ: جهت تایید هویت پروتئین و ارزیابی صحت بیان آن، تکنیک وسترن

میزان واکنش شیمیایی و تعیین غلظت آنتی‌بادی‌ها در سرم‌ها بررسی شد (۳۲).

آزمون کارایی حفاظتی در مدل حیوانی توسط توکسین عروس‌دریایی: توکسین *Rhopilema nomadica* به عنوان عامل چالش انتخاب شد؛ چرا که یکی از سموم موثر در سیستم عصبی است که شباهت‌های ساختاری و عملکردی با توکسین *C. fleckeri* دارد (۳۳، ۳۴). ابتدا گروه کنترل منفی، که به‌طور طبیعی در معرض ۵۰ برابر LD₅₀ توکسین عروس‌دریایی قرار گرفته بود، به‌عنوان گروه پایه مورد بررسی قرار گرفت. تمامی گروه‌های واکنش‌دهنده به مدت ۲۱ روز تحت چالش با توکسین عروس‌دریایی روییلما نومادیکا قرار گرفتند (۳۵). همچنین توزیع و شدت علائم بالینی در حین و پس از تزریق توکسین، به‌طور کامل مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت ارزیابی توانایی آنتی‌بادی‌های تولید شده در فرآیند ایمن‌سازی گروه‌های موشی، آنالیز Two-Way ANOVA انجام گرفت. علاوه بر این، جهت بررسی نتایج چالش با توکسین، تست زنده‌مانی Survival Assay انجام گردید. نمودار زنده‌مانی بر اساس درصد بقا در طی مدت زمان چالش ۲۱ روزه تهیه شد. تمام داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری GraphPad Prism 10 تحلیل شدند و مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان معیار معنی‌داری در نظر گرفته شدند.

نتایج

بررسی و تایید صحت ترانسفورماسیون: پس از تکثیر قطعات *SUMO-c-CfTXB* ژنی ناحیه هدف، نتایج نشان داد که ژن نوترکیب نیز در حوالی *c-CfTXB* در حوالی ۱۰۰۰ جفت‌باز و ژن *c-CfTXB* ۷۵۰ جفت‌باز قرار دارند که مطابق با اندازه پیش‌بینی شده برای این قطعات ژنی ترانسفورم شده است (۱).

شکل ۱

بررسی پروتئین بیان شده توسط الکتروفورز آکریل‌آمید: پس از القای بیان توسط IPTG، نتایج الکتروفورز نشان داد که پروتئین

بلاست به‌کار گرفته شد. پروتئین BSA به عنوان کنترل منفی در این آزمایش به کار گرفته شد. عصاره سلولی حاصل از بیان پروتئین به غشاء کاغذ PVDF منتقل گردید. فرآیند انتقال (بلاستینگ) به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد. از آنتی‌بادی بزرگ کانژوگه به HRP ضد دنباله هیستیدین (آنتی‌بادی Anti-Histag) محلول در بافر PBS به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه جهت شناسایی و اتصال به پروتئین نوترکیب استفاده گردید. کاغذ PVDF در محلول دی‌آمینوبنزوتیک اسید (DAB) قرار گرفت تا باند پروتئینی ظاهر شود. برای متوقف‌سازی واکنش، کاغذ با آب مقطر شستشو داده شد (۲۹).

واکسیناسیون حیوانات آزمایشگاهی: به منظور ایجاد پاسخ ایمنی ناشی از پروتئین‌های مدنظر، از سه گروه موش سوری که از انستیتو رازی با وزن متوسط ۲۰ گرم تهیه گردید، استفاده شد که هر گروه شامل پنج موش سوری بود؛ لذا در راستای بررسی اثر آنتی‌ژنیسته، یک گروه برای پروتئین c-CfTXB به همراه ادجوانت و گروهی دیگر برای پروتئین نوترکیب SUMO-c-CfTXB به همراه ادجوانت انتخاب شد. همچنین یک گروه به عنوان کنترل منفی نیز در نظر گرفته شد. فرآیند واکسیناسیون شامل چهار نوبت تزریق زیرجلدی با فاصله زمانی ۱۴ روز بود (۳۰، ۳۱). در طول دوره نیز وضعیت فعالیت بدنی و تغذیه‌ای حیوانات، پاسخ‌های التهابی در ناحیه تزریق و شرایط دمایی (دما اتاق) بررسی شد که خوشبختانه مشکلی در طی فرآیند مشاهده نگردید.

ارزیابی میزان تولید آنتی‌بادی به کمک تست الایزای غیرمستقیم: جهت ارزیابی میزان آنتی‌بادی‌های موجود در سرم خونی گروه‌های موشی، از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. در این روش، پروتئین c-CfTXB به همراه بافر کوآپینگ در کف چاهک‌های الایزا تثبیت گردید تا از این طریق میزان ایمنی‌زایی ناشی از آنتی‌ژن نوترکیب مقایسه شود. چاهک‌ها با بافر بلاکینگ حاوی شیر خشک ۵ درصد وزنی/حجمی به‌منظور مسدودسازی مکان‌های غیر اختصاصی مسدود شدند. تغییرات در جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر برای اندازه‌گیری

نوترکیب SUMO-c-CfTXB در دو حالت محلول و نامحلول در نمونه‌های بافر لیزکننده B مشاهده گردید. در بافر PBS حاصل از

سونیکاسیون، بیان این پروتئین با شدت کمتری دیده شد. قابل B تنها در بافر لیزکننده c-CfTXB هم‌چنین پروتئین مشاهده نشد (PBS مشاهده بود و در محلول حاصل از تیمار با

SUMO-c-CfTXB شکل ۲). بر اساس نتایج، باند پروتئین نوترکیب در ۲۳ کیلودالتون برای بخش محلول و ۴۰ کیلودالتون c-CfTXB برای بخش نامحلول مشاهده گردید. این مشاهده تایید می‌کند که با موفقیت بیان شده است SUMO-c-CfTXB پروتئین نوترکیب و تگ سامو در فرآیند پس از ترجمه قادر است با افزایش را محلول کند. باند ۴۰ c-CfTXB تاخوردگی پروتئین هدف، نشان‌دهنده آن است که تگ SUMO-c-CfTXB کیلودالتون که به خودش متصل بوده pET-28 سامو توانسته است توالی‌ای از ترمینال N و حاوی پروتئین هدف است را جدا کند و پروتئینی با اما آنچه که بارز است عدم طبیعی و غیر دنا توره تولید می‌شود انحلال کامل پروتئین هدف است که بخشی از آن به صورت اجسام درهم‌تنیده (اینکلوژن‌بادی) در حوالی ۴۰ کیلودالتون مشاهده شده است)

شکل ۲).

تخلیص پروتئین: به علت وجود شش عدد هیستیدین، به‌طور مؤثر پروتئین هدف از سایر پروتئین‌ها و ناخالصی‌های موجود در سلول‌های باکتریایی جدا شدند. نتایج مشاهده شده بر روی ژل آکریل آمید ۱۲٪ علاوه بر اینکه جداسازی موفق پروتئین نوترکیب را از سایر پروتئین‌ها بازگو کرده است، SUMO-c-CfTXB نشان‌دهنده محلولیت بخش قابل توجهی از آن است نه همگی)

شکل ۲).

تایید پروتئین نوترکیب توسط وسترن بلا تی نگ: پس از انجام تست وسترن بلا ت و رنگ‌پذیری کاغذ، با توجه به نشانگر مولکولی پروتئین، نتایج این آزمون تایید کرد که باندهای پروتئینی در محدوده ۲۳، ۲۵ و ۴۰ کیلودالتون قرار دارند که این امر نشان‌دهنده صحت بیان پروتئین‌های هدف است (شکل).

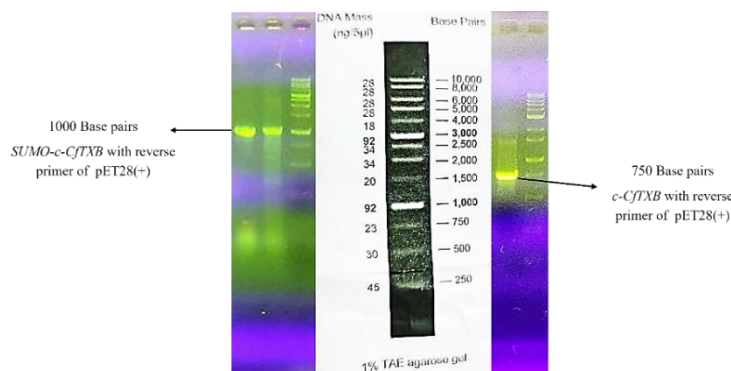
حاصل از IgG ارزیابی واکسیناسیون، پاسخ ایمنی و تیتراژ ایمن‌سازی: طبق ارزیابی‌های نرم‌افزار گرف‌پد که با پارامترهای انجام گرفت، نتایج نشان داد که تیتراژ Dunnett چندگانه آنتی‌بادی در گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن نسبت به گروه کنترل منفی، پس از هر نوبت تزریق، دارای روندی صعودی است. این امر نشان‌دهنده توانایی ایمنی‌زایی این پروتئین‌ها و القای پاسخ ایمنی هومورال در مدل حیوانی مورد مطالعه بود. هیچ‌گونه مشکل یا آسیبی در طول فرآیند تزریق در حیوانات هم‌چنین طبق تحلیل‌های انجام شده توسط مشاهده نشد P value دوطرفه، در صورتی که $ANOVA$ (۰/۱) آزمون آماری باشد، اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار تلقی می‌گردد. طبق نتایج، گروه‌های ایمن‌شده دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل منفی هستند (شکل ۳ و

شکل ۴). طبق تحلیل‌های نرم‌افزار گرف‌پد، گروه بیشترین اختلاف معنی‌دار c-CfTXB دریافت‌کننده آنتی‌ژن (****) را نسبت به گروه کنترل منفی دارد و گروه دارای SUMO-c-CfTXB دریافت‌کننده آنتی‌ژن نوترکیب اختلاف معنی‌دار (****) نسبت به گروه کنترل منفی است. نسبت به c-CfTXB هم‌چنین گروه دریافت‌کننده آنتی‌ژن ، دارای SUMO-c-CfTXB گروه دریافت‌کننده آنتی‌ژن اختلاف معنی‌دار (**) می‌باشد (شکل ۳ و

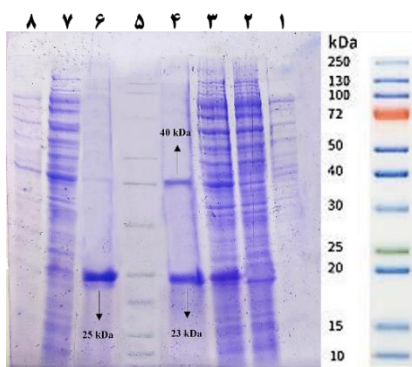
شکل ۴).

چالش با توکسین و ارزیابی زنده‌مانی: در ابتدا نیمی از موش‌های گروه‌های کنترل منفی (۳ عدد موش از ۵ عدد موش) بعد از ۳ روز مُردند و سپس گروه‌های ایمن شده بطور مشابه با توکسین عروس‌دریایی مورد چالش واقع شدند و وضعیت حیاتی آن‌ها به مدت ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفت. این یافته‌ها تأیید می‌کند که پروتئین‌های نوترکیب مذکور توانسته‌اند پاسخ ایمنی محافظتی موثری در برابر توکسین عروس‌دریایی القا کنند. طبق تحلیل‌های انجام شده بین گروه‌های واکسینه‌شده و گروه‌های کنترل منفی بر اساس منحنی زنده‌مانی، اختلاف معنی‌دار مشاهده شد)

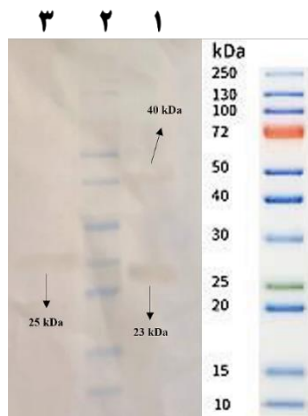
شکل ۱.



شکل ۱. الگوی الکتروفورز افقی حاصل از PCR کلونی‌های ترانسفورم شده در میزبان پروکاریوتی

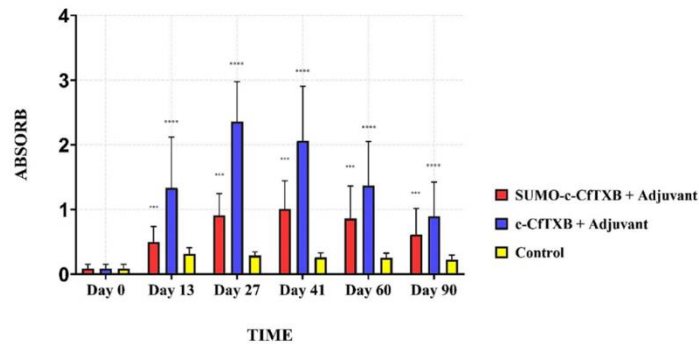


شکل ۲. الگوی الکتروفورز بیان و تخلیص آنتی‌ژن کایمر SUMO-c-CfTXB و آنتی‌ژن c-CfTXB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار از IPTG؛ (۱) شاهد SUMO-c-CfTXB در بافر B، (۲) بیان در SUMO-c-CfTXB در PBS، (۳) بیان SUMO-c-CfTXB در بافر B، (۴) تخلیص SUMO-c-CfTXB در بافر B با ایمیدازول ۲۰۰، (۵) نشانگر پروتئینی، (۶) تخلیص c-CfTXB در بافر B با ایمیدازول ۲۵۰، (۷) بیان c-CfTXB در بافر B، (۸) شاهد c-CfTXB در بافر B

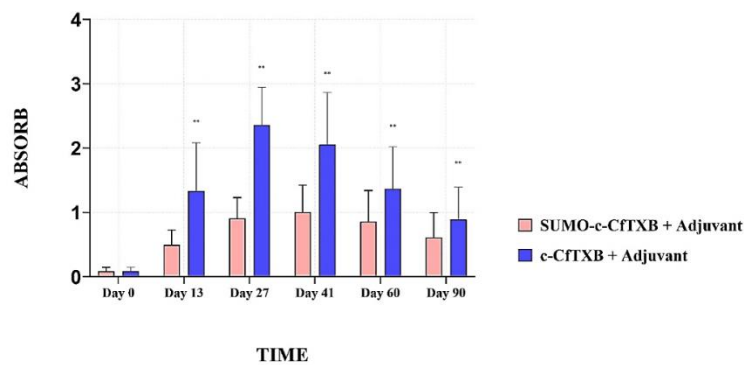


شکل ۳: تایید پروتئین نو ترکیب بیان شده به وسیله وسترن بلات با استفاده از کانژوگه موشی؛

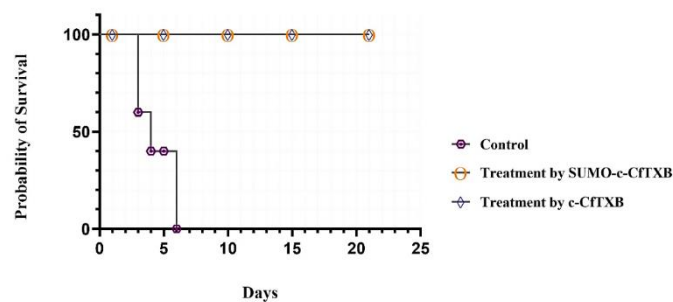
(۱) بیان پروتئین SUMO-c-CfTXB در بافر B، (۲) نشانگر پروتئینی، (۳) بیان پروتئین c-CfTXB در بافر B



شکل ۳: نمودار آنالیز آماری مربوط به تولید آنتی‌بادی در گروه‌های واکسینه‌شده نسبت به کنترل منفی در طول موج ۴۹۰ نانومتر



شکل ۴: نمودار آنالیز آماری جهت قیاس میزان تولید آنتی‌بادی در گروه‌های واکسینه‌شده نسبت به یکدیگر در طول موج ۴۹۰ نانومتر



شکل ۶: نمودار آنالیز زنده‌مانی (بقاء) گروه‌های چالش شده با توکسین عروس دریایی

بحث

محسوب می‌شوند و در فصل‌های خاص افزایش جمعیت (بلوم) دارند (۳۶). حدود ۲۰۰۰ گونه عروس دریایی شناسایی شده که نزدیک به ۱۰۰ گونه‌ی آن برای انسان خطرناک است. زهر

عروس‌های دریایی به‌ویژه گونه‌های جعبه‌ای، یکی از چالش‌های زیست‌محیطی و بهداشت عمومی در مناطق ساحلی

گونه‌های جعبه‌ای به دلیل پیچیدگی ساختاری و سرعت بالای اثرگذاری (۳۷،۳۸) چالشی بزرگ در پزشکی و سم‌شناسی است. این سموم به سرعت اثرات مخربی بر سیستم‌های قلبی و عصبی می‌گذارند (۳۹،۴۰). پژوهش‌ها در این زمینه به دنبال راهکارهایی هستند که بتوانند اثرات این سموم را مهار کرده یا کاهش دهند. نematوسیت‌های عروس‌دریایی (ابزار دفاعی و شکار این موجودات) سمومی ترشح می‌کنند که باعث درد شدید، سوزش دردناک، مشکلات تنفسی، کاهش فشار خون، مشکلات قلبی عروقی و حتی مرگ می‌شود (۴۱). با وجود موارد متعدد گزش در سواحل خلیج فارس، مطالعات علمی مطلوبی در این زمینه انجام نشده است و این جاندار به عنوان یکی از عوامل بالقوه آسیب‌رسان و ناتوان‌کننده در مناطق جنوبی کشور شناخته می‌شود. تهیه پادزهر یکی از راه‌های درمانی می‌باشد اما هنوز دارای مشکلاتی است. دلایل زیادی برای عدم تاثیر مناسب پادزهر وجود دارد که یکی از مهم‌ترین آن‌ها، تاثیر سریع زهر و Andreosso (کاردیوتوکسیک بودن آن می‌باشد (۴۲)، اندروئوسو) و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که به‌طور معمول توکسین، از طریق عروق به بافت هدف می‌رسد و در عرض *C. fleckeri* ۵ الی ۱۰ دقیقه توانایی فلج کردن و در برخی موارد توانایی کشندگی را دارد. همچنین برای خنثی کردن زهر، پادزهر زیادی کشد تا اثر آن را خنثی کند باید تزریق شود و ۶۰ دقیقه طول می‌کشد (۴۳). زهر عروس‌دریایی حاوی ترکیبات پروتئینی است که می‌تواند به سرعت وارد گردش خون شده و تاثیرات جدی بر روی سیستم قلبی-عروقی و عصبی بگذارد. ترکیبات موجود در زهر عروس‌دریایی، سیستم ایمنی سلولی و هومورال را تحریک بر روی موش *C. fleckeri* می‌کند (۱۱). علائم گزش اثرات زهر مشابه علائم نیش حیوان در انسان است (۱۰). در این میان، از *C. fleckeri* در زهر *CfTXB* و *CfTXA* پروتئین‌های عوامل اصلی نارسایی قلبی و مرگ هستند. به دلیل همسانی بالای این پروتئین‌ها، جداسازی آن‌ها دشوار است (۴۴). تحلیل نشان *CfTXB* و *CfTXA* میزان همولوژی توالی آمینواسیدی داد که این دو پروتئین دارای بیش از ۹۶٪ همولوژی در برخی نواحی هستند (۳۸). بنابراین، با انتخاب قطعه ژنی ۵۷۰

(۲۵ کیلودالتون)، تلاش *CfTXB* ترمینال از جفت‌بازی ناحیه شد تا با همجوشی آن به تگ سامو، محلولیت آن میسر گردد. سپس با انتخاب این ناحیه، بهینه‌سازی، همسانه‌سازی و بیان آنتی‌ژن در میزبان پروکاریوتی، میزان تولید آنتی‌بادی در موش سوری در دو حالت متصل به تگ سامو و بدون تگ، مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه پادزهرها پاسخ فوری مطلوبی ارائه نمی‌دهند، طراحی واکسن‌های نو ترکیب اهمیت زیادی دارد. بیان نو ترکیب می‌تواند به تولید پروتئین‌های طبیعی موجود در زهر و توسعه روش‌های درمانی مؤثر کمک کند که این رویکرد نه تنها برای مطالعه سم‌شناسی بلکه برای توسعه روش‌های درمانی مؤثر و ایمن نیز بسیار ارزشمند است. بدین منظور از فناوری همجوشی پروتئین با تگ سامو به دلیل بهبود حلالیت و افزایش بازده تولید پروتئین‌های نو ترکیب (۱۷) استفاده شد. در این مطالعه، پروتئین‌های سامو به عنوان پیش‌سازهایی بیان می‌شوند ترمینال دارند. حذف پروتئولیتیک چندین *C* که نیاز به برش اسید آمینه توسط ساموایزوپپتیدازها منجر به قرار گرفتن موتیف ترمینال می‌شود (۱۹،۲۰). سامو علاوه *C* گلاسیسین-گلاسیسین در بر افزایش حلالیت پروتئین‌های بیان شده، به عنوان چارونین و آغازگر تاخوردگی عمل می‌کند (۱۷) و بالاترین سطوح پروتئین محلول را در اشریشیاکلی تولید می‌کند (۴۵). لذا بیان پروتئین *E. SUMO-c-CfTXB* نو ترکیب و قابلیت تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی *Coli BL21 (DE3)* در موش سوری بررسی گردید. نتایج نشان داد این آنتی‌ژن‌ها واکنش‌های ایمنی مناسبی در برابر دوزهای کشنده توکسین *c-c-PET-28a(+)* ایجاد می‌کنند. پس از تهیه وکتورهای *pET-28a(+)* *SUMO-c-CfTXB-StXB* و *CfTXB* ، ژن به‌طور موفقیت‌آمیز در اشریشیاکلی *SUMO-c-CfTXB* ، بیان گردید. تخلیص پروتئین با IPTG ترنسفورم و با القا به واسطه حضور تگ سامو، Ni-NTA استفاده از کروماتوگرافی *c-CfTXB* تسهیل شد. پروتئین نو ترکیب در قیاس با پروتئین و وسترن بلات به‌طور کامل SDS-PAGE با استفاده از روش‌های شناسایی و تأیید شد. این فرآیندها مشابه مطالعات پیشین است که در آن از تکنیک‌های مشابه این پژوهش (مانند ممزوج‌سازی

Pواکسینه شده نسبت به گروه کنترل (۱۰۰٪ در مقابل ۰٪؛ نشان دهنده توانایی پروتئین نو ترکیب در $\text{value} < 0.0052$ ایجاد پاسخ ایمنی محافظتی در برابر توکسین است. لذا واکسیناسیون گروه های موشی، ایمنی قابل قبولی را در طی دوران ایمن سازی ایجاد کرده است و تنها گروه های واکسینه شده *Rhopilema eros* دریایی توانستند در برابر توکسین *nomadica* زنده بمانند

شکل). یافته های این مطالعه با مطالعات و تحقیقات پیشین مشابهت دارد؛ کیفیت بالای تولید پروتئین های نو ترکیب سموم جانوری در اشریشیاکلی (۵۱، ۵۰، ۱۵)، ایمنی زایی موش های سوری در مواجهه با دریافت آنتی ژن های *C. fleckeri* (۴، ۶، ۱۱)، سهولت و افزایش سرعت تخلیص پروتئین هدف (۵۰، ۵۲، ۵۳)، عدم دستیابی به محلول سازی کامل پروتئین هدف (۱۵)، بهره ربری از تگ سامو در زمینه های آرایشی، بهداشتی و درمانی (۵۴)، همجوشی پپتیدهای ضد میکروبی با تگ سامو در جهت افزایش بازده تولید در صنعت درمانی (۵۵) و بیان پروتئین های SARS-CoV با استفاده از فناوری همجوشی سامو (۴۹)، تحقیقات انجام گرفته هستند و روند نتایج این مطالعه نیز مشابه با آن ها می باشد. متقابلاً با افزایش و بهبودی شرایط کاربردی تگ سامو، افزایش حلالیت و افزایش میزان ایمنی زایی در دسترس است.

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که قابلیت محلول شدن پروتئین نو ترکیب SUMO-c-CfTXB توسط تگ سامو امکان پذیر بوده است؛ لذا در صورت استفاده از امکانات پیشرفته تر و بهینه سازی شرایط، می تواند ایمنی موش ها را در برابر زهر عروس دریایی نسبت به پروتئین c-CfTXB (بدون تگ سامو)، بیش از پیش فراهم کند و در مقابل دوزهای کشنده سم، واکنش های ایمنی مناسب تر ایجاد نماید که نشان دهنده پتانسیل بالا برای استفاده در طراحی واکسن های ضد زهر است. آنتی بادی های ایجاد شده با القای ایمنی محافظتی و خنثی سازی اثرات سمی آنتی ژن در مواجهه با آن، مانع از تاثیر توکسین بر میزبان شده است؛ این امر اهمیت ویژه ای دارد. با توجه به اینکه واکنش های ایمنی پیچیده ای در

تگ، بیان و تخلیص پروتئین) برای تولید و شناسایی پروتئین های نو ترکیب سموم جانوری و غیر جانوری استفاده شده است (۴۶-۴۹). به عنوان مثال رویکردی برای تولید پپتیدهای زنبورهای عسل، در اشریشیاکلی با *abaecin* ضد میکروبی (Da Sol Kim) استفاده از تگ سامو توسط دا سول کیم (پیشنهاد شد که نهایتاً اکثر پروتئین های ممزوج شده در بخش محلول بیان شدند و میزان دقیق محاسبه نگردید (۱۵). همچنین، سطح بیان و تسهیل خالص سازی *Xun Zuo* ژان زوو (را در اشریشیاکلی با استفاده از SARS-CoV پروتئین های تکنیک همجوشی با تگ سامو، افزایش داد که باعث تولید آنتی بادی های پلی کلونال بسیار اختصاصی در مقیاس بزرگ گردید (۴۹). آنچه قابل استنتاج است این است که تگ سامو توانسته است که بخشی از پروتئین مدنظر را محلول کند که اختلالی در روند و تفسیر نتایج نداشته است؛ بلکه با انحلال کامل پروتئین هدف با توجه به پیشینه تحقیقات ذکر شده، میزان بهره برداری افزایش خواهد یافت. قابل ذکر است که با بهینه سازی شرایط استفاده از تگ سامو، تغییر در میزان دمای کشت باکتری، و همچنین استفاده از ستون نیکل و رزین IPTG افزایش میزان مناسب، میزان انحلال پذیری و تخلیص افزایش خواهد یافت. آنالیزهای آماری دوره ایمن سازی موش ها نشان داد تولید پروتئین های نو ترکیب یوکاریوتی با سیستم های پروکاریوتی روشی مؤثر برای توسعه درمان های ایمنی زا و پیشگیری از گزش عروس دریایی است؛ زیرا با توجه به شکل ۳ و

شکل ۴ و براساس آزمون آماری مقایسه های چندگانه نسبت به c-CfTXB، گروه دریافت کننده آنتی ژن Dunnett و گروه دریافت کننده P value گروه کنترل دارای $0.0001 <$ نسبت به گروه کنترل SUMO-c-CfTXB آنتی ژن نو ترکیب است. همچنین طبق نمودار P value $0.0003 =$ دارای زنده مانعی)

انجام شده در (Log-rank (Mantel-Cox شکل) و آزمون نرم افزار گرفد، اختلاف معنی دار بین گروه های واکسینه شده و کنترل دیده می شود و درصد بالای زنده مانعی در گروه های

مقاله حاضر بخشی از نتایج حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد گرایش سلولی مولکولی در دانشکده علوم پایه دانشگاه جامع امام حسین^(ع) تهران است. پروپوزال این مطالعه، توسط کمیته اخلاق دانشگاه جامع امام حسین (ع) طی کد اخلاق به شماره: IR. IHU. REC. ۲۶-۰۸-۱۴۰۱ مورخ ۱۴۰۱/۰۸/۲۶ توسط دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، مورد تایید قرار گرفته است.

مشارکت نویسندگان

حسین هنری در ارائه ایده، حسین هنری در طراحی مطالعه، مهدی بخشیان و حسین سمیعی ابیانه در جمع‌آوری داده‌ها، سید مجتبی آقایی و مهدی بخشیان در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

برابر سموم مختلف ممکن است رخ دهد، بهتر است تحقیقات آینده بر بهینه‌سازی فرآیندهای تولید پروتئین‌های نو ترکیب و بررسی واکنش‌های ایمنی در مدل‌های آزمایشگاهی و حیوانی تمرکز داشته باشند.

سپاس‌گزاری

نویسندگان از معاونت پژوهش دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهران تشکر می‌کنند. این مقاله ماحصل از پایان‌نامه جناب آقای مهدی بخشیان است.

حامی مالی

دانشگاه جامع امام حسین^(ع) تهران

تعارض در منافع

وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

References:

1. Bhattacharya D, Agrawal S, Aranda M, Baumgarten S, Belcaid M, Drake JL, et al. *Comparative Genomics Explains the Evolutionary Success of Reef-Forming Corals*. Elife 2016; 5: e13288.
2. Cartwright P, Halgedahl SL, Hendricks JR, Jarrard RD, Marques AC, Collins AG, et al. *Exceptionally Preserved Jellyfishes from the Middle Cambrian*. PloS one 2007; 2(10): e1121.
3. Jouiaei M, Casewell NR, Yanagihara AA, Nouwens A, Cribb BW, Whitehead D, et al. *Firing the Sting: Chemically Induced Discharge of Cnidaria Reveals Novel Proteins and Peptides from Box Jellyfish (Chironex Fleckeri) Venom*. Toxins 2015; 7(3): 936-50.
4. Honari H, Aghaie SM, Hosseinzade M. *Subcloning and Expression of the Chimeric Antigen C-CFTX1-STxB of the Jellyfish Venom and its Antigenicity Assessment in Syrian Mice*. Journal of Ilam University of Medical Sciences 2019; 27(5): 24-36. [Persian]
5. D'Ambra I, Lauritano C. *A Review of Toxins from Cnidaria*. Marine Drugs 2020; 18(10): 507.
6. Honari H, Aghaie S, Hajinormohamadi A, Samadpour Shahrak M. *Investigating the Immunogenicity of C-CFTXB Antigen Obtained from the Jellyfish (Chironex fleckeri) in Syrian Rats*. Qom Univ Med Sci J 2024; 18: E136. [Persian]
7. Brinkman D, Burnell J. *Identification, Cloning and Sequencing of Two Major Venom Proteins from The Box Jellyfish, Chironex Fleckeri*. Toxicon 2007; 50(6): 850-60.
8. Yanagihara AA, Shohet RV. *Cubozoan Venom-Induced Cardiovascular Collapse Is Caused by*

- Hyperkalemia and Prevented by Zinc Gluconate in Mice*. PloS one 2012; 7(12): e51368.
9. *Chironex Fleckeri Toxin B Precursor (TX-B) Mrna, Complete Cds*. 2014. NIH. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/JN695598.1>. Accessed Jun 24, 2026.
10. Brinkman DL, Konstantakopoulos N, McInerney BV, Mulvenna J, Seymour JE, Isbister GK, et al. *Chironex Fleckeri (Box Jellyfish) Venom Proteins: Expansion of a Cnidarian Toxin Family that Elicits Variable Cytolytic and Cardiovascular Effects*. Biol Chem 2014; 289(8): 4798-812.
11. Honari H, Aghaie SM, Jalilpour H. *Immunogenicity of N-CfTX-2 Antigen of Chironex fleckeri Jellyfish in Mice*. Qom University of Medical Sciences Journal 2018; 12(9): 47-57. [Persian]
12. Lausen B, Ahang A, Cummins S, Wang T. *Investigation of Best Practices for Venom Toxin Purification in Jellyfish towards Functional Characterisation*. Toxins 2023; 15(3): 170.
13. Jouiaei M, Yanagihara AA, Madio B, Nevalainen TJ, Alewood PF, Fry BG. *Ancient Venom Systems: A Review on Overview, Cnidaria Toxins*. Toxins 2015; 7(6): 2251-71.
14. Guerrero F, Ciragan A, Iwaï H. *Tandem SUMO Fusion Vectors for Improving Soluble Protein Expression and Purification*. Protein Expr Purif 2015; 116: 42-9.
15. Kim DS, Kim SW, Song JM, Kim SY, Kwon K-C. *A New Prokaryotic Expression Vector for the Expression of Antimicrobial Peptide Abaecin Using SUMO Fusion Tag*. BMC Biotechnology 2019; 19: 1-12.
16. Mignon K, Galle M, Van der Eecken R, Haesaerts S, Demulder M, De Greve H, et al. *Purification and Characterization of the Intrinsically Disordered Arabidopsis Thaliana Protein SOG1*. Protein Expr Purif 2025; 229: 106678.
17. Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, Mattern MR. *SUMO Fusion Technology for Difficult to Express Proteins*. Protein Expr Purif 2005; 43(1): 1-9.
18. Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, Drinker M, Weeks SD, Butt TR. *SUMO Fusions and SUMO-Specific Protease for Efficient Expression and Purification of Proteins*. J Struct Funct Genomics 2004; 5(1-2): 75-86
19. Alfaro AJ, Dittner C, Becker J, Loft A, Mhamane A, Maida A, et al. *Fasting-Sensitive SUMO-Switch on Prox1 Controls Hepatic Cholesterol Metabolism*. EMBO Rep 2023; 24(10): e55981.
20. Aung LHH, Jumbo JCC, Wang Y, Li P. *Therapeutic Potential and Recent Advances on Targeting Mitochondrial Dynamics in Cardiac Hypertrophy: A Concise Review*. Mol ther Nucleic Acids 2021; 25: 416-43.
21. Riviere LR, Tempst P. *Enzymatic Digestion of Proteins in Solution*. Curr Protoc Protein Sci 2001; 11: 11-1
22. Creager AN. *Recipes For Recombining DNA: A History of Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. BJHS Themes 2020; 5: 225-43.
23. Mikić A, Alomari A, Gowers DM. *Classical Recombinant DNA Cloning*. DNA Manipulation and Analysis: Springer 2023; 2633: 1-24.

24. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989: 1546.
25. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*: Academic press; 2012.
26. Francis DM, Page R. *Strategies to Optimize Protein Expression in E. Coli*. Curr Protoc Protein Sci 2010; Chapter 5(1): 5.24.1-5.24.29.
27. Labrou NE. *Protein Purification: An Overview*. Methods Mol Biol 2014; 1129: 3-10.
28. He F. *Bradford Protein Assay*. 2011. Bio-protocol. Available at: <https://bio-protocol.org/pdf/Bio-protocol45.pdf>. Accessed June 6, 2026.
29. *Western Blotting. 2024. HycultBiotech*. Available at: <https://www.hycultbiotech.com/western-blotting/>. Accessed May 21, 2026.
30. Vessey SH. *Effects of Grouping on Levels of Circulating Antibodies in Mice*. Proc Soc Exp Biol Med 1964; 115: 252-5.
31. Greenfield EA. *Sampling And Preparation of Mouse and Rat Serum*. Cold Spring Harbor Protoc 2017; 2017(11): pdb.
32. *ELISA Protocol. 2025. Cusabio*. Available at: <https://www.cusabio.com/m-264.html>. Accessed May 20, 2026.
33. Brinkman DL, Burnell JN. *Biochemical and Molecular Characterisation of Cubozoan Protein Toxins*. Toxicon 2009; 54(8): 1162-73.
34. Dong Z, Liu D, Keesing JK. *Jellyfish Blooms in China: Dominant Species, Causes And Consequences*. Mar pollut bull 2010; 60(7): 954-63.
35. Jafari H, Honari H, Zargan J, S TJ. *Extraction the Venom of Rhopilema Nomadica from the Persian Gulf Coast and the Investigation of Its Hemolytical Activity*. Yafte 2019, 21(3): 86-95. [Persian]
36. Jiang H, Cheng H-Q, Xu H-G, Arreguín-Sánchez F, Zetina-Rejón MJ, Luna PDM, et al. *Trophic Controls of Jellyfish Blooms and Links with Fisheries in the East China Sea*. Ecological Modelling 2008; 212(3-4): 492-503.
37. Bosch-Belmar M, Milisenda G, Basso L, Doyle TK, Leone A, Piraino S. *Jellyfish Impacts on Marine Aquaculture and Fisheries*. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture 2020; 29(2): 242-59.
38. Alam MJ, Ashraf KUM. *Prediction of an Epitope-Based Computational Vaccine Strategy for Gaining Concurrent Immunization Against the Venom Proteins of Australian Box Jellyfish*. Toxicol Int 2013; 20(3): 235-53.
39. Imamichi Y, Yokoyama Y. *Purification, Characterization and Cdna Cloning of a Novel Lectin from the Jellyfish Nemopilema Nomurai*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 2010; 156(1): 12-8.
40. Wang Q, Xiao L, He Q, Liu S, Zhang J, Li Y, et al. *Comparison of Haemolytic Activity of Tentacle-Only Extract from Jellyfish Cyanea Capillata in Diluted Whole Blood and Erythrocyte Suspension: Diluted Whole Blood Is a Valid Test System for Haemolysis Study*. Experimental and toxicologic pathology 2012; 64(7-8): 831-35.
41. Guo Q, Whipps CM, Zhai Y, Li D, Gu Z. *Quantitative Insights Into the Contribution of Nematocysts to the*

- Adaptive Success of Cnidarians Based on Proteomic Analysis*. Biology 2022; 11(1): 91.
42. Isbister GK. *Antivenom Efficacy or Effectiveness : the Australian Experience*. Toxicology 2010; 268(3): 148-54.
 43. Andreosso A, Smout MJ, Seymour JE. *Dose and Time Dependence of Box Jellyfish Antivenom*. Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 2014; 20: 34.
 44. Brinkman D, Burnell J. *Partial Purification of Cytolytic Venom Proteins from the Box Jellyfish, Chironex Fleckeri*. Toxicon 2008; 51(5): 853-63.
 45. Yang Y, He Y, Wang X, Liang Z, He G, Zhang P, et al. *Protein Sumoylation Modification and Its Associations with Disease*. Open Biol 2017; 7(10): 170167.
 46. Gao X, Chen W, Guo C, Qian C, Liu G, Ge F, et al. *Soluble Cytoplasmic Expression, Rapid Purification, and Characterization of Cyanovirin-N as a His-SUMO Fusion*. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 85(4): 1051-60.
 47. Li J, Han Q, Zhang T, Du J, Sun Q, Pang Y. *Expression of Soluble Native Protein in Escherichia Coli Using A Cold-Shock SUMO Tag-Fused Expression Vector*. Biotechnol Rep 2018; 19: e00261.
 48. Marblestone JG, Edavettal SC, Lim Y, Lim P, Zuo X, Butt TR. *Comparison of SUMO Fusion Technology with Traditional Gene Fusion Systems: Enhanced Expression and Solubility with SUMO*. Protein Sci 2006; 15(1): 182-9.
 49. Zuo X, Mattern MR, Tan R, Li S, Hall J, Sterner DE, et al. *Expression and Purification of SARS Coronavirus Proteins Using SUMO-Fusions*. Protein expr purif 2005; 42(1): 100-10.
 50. Ge WS, Fan JG, Chen YW, Xu LM. *Expression and Purification of Functional HMGB1 a Box by Fusion with SUMO*. Mol Med Rep 2015; 12(5): 6527-32.
 51. Yanagihara AA, Giglio ML, Hurwitz K, Kadler R, Espino SS, Raghuraman S, et al. *Elucidation of Medusozoan (Jellyfish) Venom Constituent Activities Using Constellation Pharmacology*. Toxins 2024; 16(10): 447.
 52. Zhou XF, Zhang CL, Gao XP, Wang WL, He ZF, Jiang FY, et al. *A Simple and Rapid Protein Purification Method Based on Cell-Surface Display of SUMO-Fused Recombinant Protein and Ulp1 Protease*. AMB Express 2020; 10: 65.
 53. Liu L, Spurrier J, Butt TR, Strickler JE. *Enhanced Protein Expression in the Baculovirus/Insect Cell System Using Engineered SUMO Fusions*. Protein Expr Purif 2008; 62(1): 21-8.
 54. Mohanraj U, Kinnunen O, Kaya ME, Aranko AS, Viskari H, Linder M. *SUMO-Based Expression and Purification of Dermcidin-Derived DCD-1L, A Human Antimicrobial Peptide, in Escherichia Coli*. bioRxiv 2018: 343418.
 55. Nazir A, Shad M, Rehman HM, Azim N, Sajjad M. *Application of SUMO Fusion Technology for the Enhancement of Stability and Activity of Lysophospholipase from Pyrococcus Abyssii*. World J Microbiol Biotechnol 2024; 40(6): 183.