مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۹
صفحه ۱۲۶-۱۱۶
DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.4.9

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

طراحی بیوانفورماتیکی واکسن علیه بیماری ویبریوکلرا با استفاده از رویکرد معکوس

Bioinformatics design of a vaccine against Vibrio cholerae using the reverse approach

مینا عقبی طلب، محمدجواد دهقان عصمت آبادی*، علیرضا سعیدی نیا، محمدعلی یعقوبی مقدم

Mina Oghbatalab, Mohammad Javad Dehgha Esmatabadi*, Alireza Saeedinia, Mohammad Ali Yaghobi Moghaddam

مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mohammad_dehghan@mut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۶/۷ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۲۶)

چکیده

طراحی واکسن درگذشته تا به امروز براساس روش‌های کلاسیک صورت میگیرد که زمان‌بر، هزینه‌بر و دارای ملاحظاتی هستند، اما با کشف ژنوم و تعیین توالی ژن، روش‌های مدرنی برای طراحی واکسن ابداع شده که از جمله آن می‌توان به روش طراحی واکسن به روش معکوس اشاره کرد. در این پژوهش از سرور NCBI (ORF Finder) به منظور یافتن توالی‌های Coding و برای مکان‌یابی پروتئین از سرور PSORTb استفاده شده و بررسی آلرژنیک بودن پروتئین از سرور Algpred و به منظور پیش‌بینی اپی توپ خطی و فضایی از سرورهای LBtope – ABCpred - IEDB CBTOPE - Disco Tope 2.0 – IEDB (Ellipro) اپی توپ نهایی انتخاب شده و سپس تجزیه و تحلیل سازه پلی توپی را توسط سرور ExPasy (ProtParam) بررسی کردیم و در نهایت با سرور JCat توالی نوکلئوتیدی بهینه شده را بدست آوردیم. با استفاده از این روش ٦٠٧٤ چارچوب خوانش و همچنین ٤٣ پروتیین سطحی و ترشحی شناسایی گردیده که در نهایت، ۱۰ اپی توپ مناسب به عنوان کاندیدای واکسن قادر به ایجاد ایمنی در برابر طیف وسیعی از سویه‌ها می باشند، امید است که راه پیشرفت تولید این واکسن را بسیار آسان کنند.

واژه‌های کلیدی

بیوانفورماتیک،
پروتئین،
سازه پلی توپی،
عامل وبا،
واکسن‌سازی به روش معکوس

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.4.9]

مقدمه

بر اساس شواهد تاریخ، هیچ بیماری هولناک‌تر از وبا نبوده است. در مورد مرگ ناشی از وبا که قدمت آن به دوران بقراط و نوشته-های سانسکریت باز می‌گردد، اشاره شده است. گمان می‌رود که منشأ باستانی این بیماری از هند و دلتاهای رود گنگ است. ضعف شرایط بهداشتی در آنجا و استفاده از استخرهای آلوده‌ای که آب در آنها ساکن بود، باعث شد که از عهد باستان، موارد این بیماری در هند رایج شود. بیماری نخست از طریق راه‌های تجاری خشکی و دریایی در سال ۱۸۱۷ به روسیه رسید. سپس از روسیه به موازات پیشرفت‌های فناوری در این کشور و مبادلات تجاری، به اروپا و سپس آمریکای شمالی رسید.

در فاصله زمانی ۱۵۰ ساله هفت پاندمی اصلی در جهان رخ داده :

– همه‌گیری اول: در قسمت بنگال هند بین سال‌های ۱۸۱۷ تا ۱۸۲٤ رخ داد. بیماری از هند به جنوب شرقی آسیا و سپس به چین، ژاپن، خاورمیانه و جنوب روسیه رسید.

– همه‌گیری دوم: بین سال‌های ۱۸۲۷ تا ۱۸۳۵ رخ داد و عمدتا آمریکا و اروپا را متأثر کرد. دلیل آن هم پیشرفت‌های فناوری و میزان زیاد مبادلات تجاری و مهاجرت‌های گسترده‌ای بود که رخ می‌داد.

– همه‌گیری سوم: بین سال‌های ۱۸۳۹ تا ۱۸۵٦ بود و به آفریقا و جنوب آمریکا رسید به خصوص در برزیل غوغا کرد.

–همه‌گیری چهارم: بین سال‌های ۱۸۳٦ تا ۱۸۷۵ رخ داد و منطقه زیر صحرای بزرگ آفریقا را گرفتار کرد.

– همه‌گیری‌های پنجم و ششم: به ترتیب بین سال‌های ۱۸۸۱ تا ۱۸۹٦ و ۱۸۹۹ تا ۱۹۲۳ رخ دادند. این دو آمار مرگ و میر کمتری داشتند، چون در این زمان باکتری وبا کشف شده بود و راه پیشگیری از آن مشخص شده بود. اما متأسفانه در مصر، ایران، هند و فیلیپین وبا در همین زمان به طرز گسترده‌ای شایع شد و افراد زیادی به خاطر ابتلا به آن درگذشتند.

– آخرین همه‌گیری: در سال ۱۹٦۱ در اندونزی گزارش شد و به خاطر ظهور گونه جدید El Tor بود که این گونه هنوز هم در کشورهای در حال توسعه شیوع می‌یابد. از قرن نوزدهم به بعد، بیماری وبا باعث مرگ ده‌ها میلیون نفر شده است. در روسیه به تنهایی بین سال‌های ۱۸٤۷ تا ۱۸۵۱، بیش از یک میلیون نفر به خاطر ابتلا به آن درگذشتند و در طی همه‌گیری دوم ۱۵۰ هزار آمریکایی و ۸ میلیون هندی جان باختند (Dehghannejad & Kasiri, 2011). در سطح جهانی، تعداد واقعی وبا بسیار بیشتر از موارد گزارش شده به WHO، تخمین زده می شود. در سطح جهان، ۱/۳ میلیارد نفر در کشورهای بومی مبتلا به وبا در معرض خطر هستند. در سال ۲۰۱۰ ، بزرگترین شیوع وبا در جهان در نیم قرن گذشته رخ داد که بیش از ٦۰۰۰۰۰ فرد را آلوده کرد و حدود ۸۰۰۰ نفر را به قتل رساند (Nair & Takeda, 2014). شیوع بیماری وبا در یمن از اکتبر سال ۲۰۱٦ آغاز شد، از ژانویه سال ۲۰۱۷، ۲۷۵/۹۸۷ مورد، مشکوک به وبا و ۱٦۳٤ مرگ ناشی از وبا ثبت شده است. سازمان بهداشت جهانی و صندوق کودکان سازمان ملل متحد در بیانیه مشترکی اعلام کردند که نوع بیماری وبا رایج در یمن از بدخیم‌ترین نوع آن است و در نتیجه این بیماری تاکنون بیش از ۱۳۰۰ نفر جان خود را از دست داده‌اند و آمار تلفات رو به افزایش است. با آنکه بیماری وبا کاملا شناخته شده است و در صورت استفاده به موقع از روشهای مناسب، درمانی ساده و موثر دارد ولی همچنان بی‌وقفه به صورت همه‌گیر گسترش می یابد و این در حالیست که حتی رعایت حداقل اصول بهداشتی نیز از بروز آن پیشگیری می نماید (Razmjoo, 2018).

اگرچه تا سال‌ها استفاده از روش‌های سنتی در تولید واکسن مرسوم بود، اما با پیدایش علومی مانند مهندسی ژنتیک و بیوانفورماتیک، فرصتی برای توسعه واکسن های جدید و بهبود یافته فراهم شده است. در این روش، ژنوم کامل یک پاتوژن به کمک تجزیه و تحلیل‌های کامپیوتری بررسی میشود تا آنتی‌ژنهایی که بیش‌ترین احتمال ایمنی‌زایی را دارند، شناسایی شوند (Shaikh et al, 2020). بیوانفورماتیک دانش استفاده از علوم کامپیوتر، آمار و احتمال در شاخه زیست‌شناسی مولکولی است. در چند دهه گذشته، پیشرفت در زیست‌شناسی مولکولی و تجهیزات مورد نیاز تحقیق در این زمینه باعث افزایش سریع تعیین توالی ژنوم بسیاری از گونه‌های موجودات شد، تا جایی که پروژه‌های تعیین توالی ژنوم‌ها از پروژه‌های بسیار رایج به حساب می‌آیند. گسترش

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.4.9]

روزافزون حجم عظیمی از داده‌های ژنومی وهمچنین نیاز به ذخیره، بازیابی و تحلیل مناسب این داده‌ها، موجب پیدایش علم بیوانفورماتیک شد (Del Tordello, et al, 2017). با وجود پیشرفت هایی که در درمان بیماری‌های عفونی صورت گرفته، میکروارگانیسم های پاتوژن هنوز مهم‌ترین عامل تهدیدکننده‌ی سلامت عمومی‌اند و هرچند واکسن‌های مرسوم، در درمان یا ریشه کنی برخی عوامل بیماری زا نقش اساسی داشته اند اما با پیدایش بیماری های نوظهور نیازمند روش‌های جدیدی در زمینه-ی طراحی واکسن می باشد. روش‌های مرسوم در تولید واکسن که در گذشته به کار گرفته می‌شد نیازمند کشت میکروارگانیسم پاتوژن و شناسایی اجزا ایمنی‌زایی آن بود که روشی زمان‌بر بوده و تنها قادر به شناسایی آن دسته از آنتی‌ژن‌هایی است که به میزان زیادی تولید شده و قابلیت تخلیص بالایی دارند، در حالی که فراوانی پروتئین همواره به معنای ایمنی زایی نبوده و یا گاهی آنتی‌ژن‌هایی که در شرایط سلول زنده در طی بیماری‌زایی تولید می شوند، در شرایط آزمایشگاهی تولید نخواهند شد. از طرف دیگر چنین روش‌هایی در مورد میکروارگانیسم های غیرقابل کشت کارایی نخواهد داشت. امروزه پیشرفت در زمینه‌ی تعیین توالی ژنوم و پیدایش فناوری های زیستی وابسته به کامپیوتر روش‌های جدیدی هستند که به منظور بررسی آنتی‌ژن‌های محافظ، از جمله طراحی واکسن به روش معکوس را پیش رو قرارداده است (Nandy & Basak, 2019).

در این روش پروتیین های سطحی و ترشحی احتمالی با یک روش معکوس که به جای میکروارگانیسم از ژنوم شروع می شود و با استفاده از روش های محاسباتی و تشخیص الگو، شناسایی خواهند شد. بنابراین، ازدیگر مزیت‌های این روش، علاوه بر شناسایی تمامی آنتی‌ژن‌هایی که با روش‌های مرسوم قابل بررسی-اند، قادر به شناسایی آنتی‌ژن‌های جدید نیز می‌باشد که نقش مهمی در ایمنی‌زایی واکسن‌های نسل جدید دارند (Del Tordello, et al, 2017).

ما در این پروژه مناسب‌ترین اپیتوپ‌های باکتری ویبریوکلرا از نظر ایمنی‌زایی توسط نرم افزارهای مختلف بیوانفورماتیک شناسایی کرده و در نهایت به چند آنتی‌ژن (پلی توپ) دست یافتیم که قادر است بیشترین ایمنی‌زایی را برای بدن ایجاد کند.

روش‌ها و نتایج

شناسایی توالی های چارچوب خوانش باز (ORF): در ابتدای توالی کامل باکتری ویبریوکلرا از سایت NCBI استخراج شده (NC_002505.1) و توسط پایگاه داده ORFfinder توالی‌های چارچوب خوانش باز یک میلیون انتهایی ژنوم باکتری ویبریو کلرا مورد خوانش قرار گرفته، نمونه‌ای تعداد چارچوب‌ها و شماره نوکلئوتید خوانده شده که در جدول ۱ نشان داده شده است.

مکان‌یابی توالی چارچوب خوانش باز: یکی از لازمه‌های اپی توپ مناسب دسترسی بالا و سطحی بودن آن است. هدف ما در این بخش از طراحی واکسن، پیدا کردن پروتئین‌هایی است که سطحی و ترشحی می‌باشند. بدین منظور برای مکان‌یابی از نرم افزار PSORTb استفاده کردیم که در این پروژه ۴۳ کاندید پروتئینی در غشای بیرونی و خارج سلولی قرار داشتند که به عنوان پروتئین‌های کاندید مناسب اپی توپ انتخاب کردیم.

حذف سیگنال پپتید: با توجه به اینکه سیگنال پپتید قسمتی از توالی پروتئین می‌باشد که بعد از ترشح شناسایی و حذف می‌شود، اپی توپ‌هایی که در این ناحیه از پروتئین هستند را به عنوان کاندید اپی توپ در نظر نمی‌گیریم. به همین جهت باید قبل از بررسی‌های بعدی طراحی واکسن نسبت به حذف توالی ذکر شده اقدام کنیم. باید توجه داشت که ممکن است بعضی از پروتئین‌ها فاقد سیگنال پپتید باشند. بدین منظور سیگنال پپتید پروتئین های کاندید توسط سرور SignalP شناسایی و سپس حذف شده‌اند.

بررسی حساسیت زایی برای انسان: در ادامه با استفاده از سرور ALgpred پروتئین‌ها از لحاظ آلرژن بودن یا نبودن بررسی شدند که در نهایت پروتئین non allergen را انتخاب کردیم.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.4.9]

جدول ۱- شماره خوانش‌ها و تعداد خوانش یافت شده در یک میلیون انتهایی کروموزوم ویبریوکلرا
Table1. Number of readings and number of readings found in one million ends of Vibrio cholerae chromosome

شماره خوانش	شماره نوکلئوتید خوانده شده	تعداد خوانش
۱	۲۰٤۹۰۰۰-۱۹۹۹۰۰۰	۲۹۹
۲	۲۰۹۹۰۰۱-۲۰٤۹۰۰۱	۲۹۹
۳	۲۱٤۹۰۰۲-۲۰۹۹۰۰۲	۳۳۱
٤	۲۱٤۹۰۰۳-۲۱۹۹۰۰۳	۳٦۱
٥	۲۱۹۹۰۰٤-۲۲٤۹۰۰٤	۳٥۳
٦	۲۲٤۹۰۰٥-۲۲۹۹۰۰٥	۳٥۳
۷	۲۲۹۹۰۰٦-۲۳٤۹۰۰٦	۳۳۰
۸	۲۳٤۹۰۰۷-۲۳۹۹۰۰۷	۳۲٦
۹	۲۳۹۹۰۰۸-۲٤٤۹۰۰۸	۲۹۸
۱۰	۲٤٤۹۰۰۹-۲٤۹۹۰۰۹	۳٤۲
۱۱	۲٤۹۹۰۱۰-۲٥٤۹۰۱۰	۲۹۸
۱۲	۲٥٤۹۰۱۱-۲٥۹۹۰۱۱	۳۰٤
۱۳	۲٥۹۹۰۱۲-۲٦٤۹۰۱۲	۲۹۹
۱٤	۲٦٤۹۰۱۳-۲٦۹۹۰۱۳	۳۱۸
۱٥	۲٦۹۹۰۱٤-۲۷٤۹۰۱٤	۳٤۰
۱٦	۲۷٤۹۰۱٥-۲۷۹۹۹۰۱٥	۳۱۸
۱۷	۲۷۹۹۰۱٦-۲۸٤۹۰۱٦	۳٤٤
۱۸	۲۸٤۹۰۱۷-۲۸۹۹۰۱۷	۳۲٥
۱۹	۲۸۹۹۰۱۸-۲۹٤۹۰۱۸	۳۰۰
۲۰	۲۹٤۹۰۱۹-۲۹٦۰۰۰۰	۷٤

در حقیقت این سرور به ما این امکان را می‌دهد که پروتئین‌هایی که برای موجود زنده (انسان یا جانور آزمایشگاهی) تولید حساسیت می‌کند را حذف کنیم. به عبارت دیگر پروتئین‌هایی که برای طراحی واکسن انتخاب می‌شوند نباید آلرژن یا توانایی بالقوه تولید حساسیت را داشته باشند. درطی این بررسی ۳۲ پروتئین از پروتئین‌ها کاندید آلرژن و ۱۱ پروتئین غیرآلرژن بوده است.

بررسی همولوژی پروتئین های کاندید: لازم است همولوژی پروتئین‌های کاندید، با انسان وموش بررسی شود، ضرورت انجام این مرحله به علت این است که اگر با انسان و موش همولوژی داشته باشند سیستم ایمنی آن‌ها را به عنوان پروتئین‌های خودی در نظر گرفته و سیستم ایمنی فعال نمی‌شود که پس از بررسی تمام پروتئین‌های کاندید اپی توپ، هیچ‌گونه همولوژی با انسان و موش یافت نشد.

بررسی دقیق تر جایگاه پروتئین های کاندید: به منظور مکان یابی دقیق توالی های آمینو اسیدی در سلول از پایگاه داده TMHMM استفاده شد که در واقع توسط این سرور قسمت‌های ترانس ممبرین را شناسایی و حذف کردیم زیرا قسمت‌های ترانس ممبرین به علت دردسترس نبودن اپی توپ های مناسبی نمی-باشند. TMHMM در آدرس الکترونیکی http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0 یک روش پیشرفته است که از مدل‌های ریاضی پیچیده مدل‌های مخفی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.4.9]

مارکوف (HMM) برای پیش بینی نواحی هلیکس درون غشایی (ترانس ممبرین) استفاده می‌شود.

بررسی پروتئین های کاندید در نمودار راماچاندران: نمودار راماچاندران وضعیت مجاز هر زاویه را برای ساختارهای پروتئین نشان می دهد. Procheck برای ساختار ورودی نمودار راماچاندران استفاده می‌شود. این نرم افزار در بررسی ایده‌آل بودن طول پیوندها، زاویه‌ی پیوندها و مقادیر φ وψ کاربردی منطقی دارد. درنتیجه با پایگاه داده PROCHECK در ناحیه مجاز بررسی کرده و به عنوان گزینه مناسبی برای طراحی واکسن انتخاب کردیم.

جداسازی و انتخاب اپی توپ های نهایی برای طراحی سازه پلی توپی: برای بدست آوردن اپی توپ های کاندید نهایی به صورت خطی از پایگاه داده های ABCpred، LBtope، BCPRED و IEDB و اپی توپ های کاندید نهایی به صورت ساختار فضایی از پایگاه داده های CBTOPE، Disco Tope و Elli Pro استفاده شده است. سپس اپی توپ های بدست آمده از پایگاه داده‌های مختلف را به صورت تک آمینواسیدی با هم مورد مقایسه قرارداده و توالی‌هایی به عنوان اپی توپ مناسب انتخاب می‌شوند که دارای دو شاخص اصلی باشند: ۱- توالی هدف بین تمامی سرورهای پیشگویی اپی توپ B مشترک باشند ۲- اپی توپ‌های انتخابی Score بالاتری داشته باشند. در نهایت اپی توپ های مشترک را انتخاب و درصد score آن‌ها را محاسبه کردیم و توالی‌ها با score بالا به عنوان اپی توپ نهایی مناسب انتخاب شدند که در این پروژه به ۱۰ اپی توپ های مناسب دست یافتیم. اپیتوپ های بدست آمده در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- توالی اپی توپ های خطی و موقعیت اپی توپ های کاندید

Table 2. The sequence of linear epitopes and the position of candidate epitopes

بخشی از توالی اپی توپ	Score	شماره چارچوب	شماره خوانش
TLTQDDLTQDEQ	۰/۵۹	ORF۲۲۹	۲۰۹۹۰۰۲-۲۱٤۹۰۰۲
LYGTTAPSEQGKVGDY	۰/۵۲۹	ORF۲۳۲	
IQVDDYDPEEEEYLDE	۰/٤۷	ORF۲۱۵	۲۲٤۹۰۰٤-۲۱۹۹۰۰٤
SSAKMPSNTSRSCSSTELKRLG	۰/٦۲۸	ORF۱۸۰	۲۲۹۹۰۰۵-۲۲٤۹۰۰۵
VQQQSAGQQQRYTGQE	۰/٦۲۳	ORF۲٦۱	
MINIQTAKRMNDNE	۰/۵۸	ORF۱۷٤	۲۳٤۹۰۰٦-۲۲۹۹۰۰٦
PKMGFTIEERNQSQGT	۰/۵۵	ORF۳۲۲	
PIYWLLKNSFQRRRPQ	۰/۵۱	ORF۱۹۲	۲٦۹۹۰۱۳-۲٦٤۹۰۱۳
LKADEKPKPKSVL	۰/۵٤	ORF۲۸۹	۲۸٤۹۰۱٦-۲۷۹۹۰۱٦
EQGQLNKNGEQV	۰/۵۸	ORF۲۰٤	۲۸۹۹۰۱۷-۲۸٤۹۰۱۷

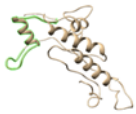
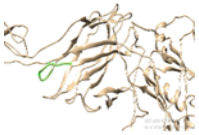
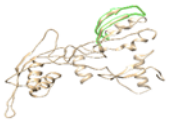
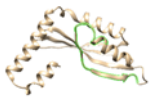
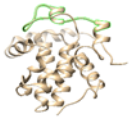
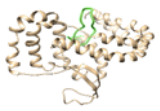
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.4.9]

موقعیت اپی توپ‌های کاندید بر روی پروتئین: موقعیت اپی توپ‌های کاندید توسط نرم افزار Chimera شناسایی و در جدول ۳ با رنگ سبز نمایش داده شده‌اند. البته این نکته حائز اهمیت است که اپی توپ‌های کاندید، تمام ویژگی‌های اپی توپ مناسب از جمله: انعطاف‌پذیری (flexibility)، در دسترس بودن سطحی (Surface accessibility)، آب‌دوستی (hydrophilicity)، پیچ‌های بتا (Beta-turns)، آنتی‌ژنیسیتی (Antigenicity) را شامل می شوند.

ساخت سازه پلی توپی: بعد از تعیین اپی توپ‌های کاندید باتوجه به خواص مختلف، اپی توپ‌ها را در کنار یکدیگر قرار داده و سازه پلی توپی طراحی میشود. برای طراحی سازه پلی توپی مناسب، اپی توپ‌های مناسب را از نظر امتیاز از درصد بالا به پایین کنار هم قرارداده و بین آنها لینکر مناسب قرارداده می-شود. در این مطالعه از لینکر معروف GGSGG به دلیل خاصیت هیدروفیلی و انعطاف‌پذیری بالا لوپ تشکیل نمی‌دهند وطول مناسبی را در سازه‌ی پلی توپی ایجاد می‌کنند مورد استفاده قرار گرفته است.

جدول۳- موقعیت اپی توپهای کاندید بر روی پروتئین

Table3. Position of candidate epitopes on protein.

کانفورماسیون فضایی	شماره خوانش	کانفرماسیون فضایی	شماره خوانش
	ORF 229 (154-165)		ORF 232 (114-129)
	ORF 180 (130-156)		ORF 174 (617-621)
	ORF 261(622-636)		ORF 322(254-275)
	ORF 204 (21-225)		ORF 289 (128-146)
	ORF 192 (81-101)		ORF 215 (231-252)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.4.9]

جدول ٤- توالی سازه پلی توپی طراحی شده در این مطالعه

Table 4. Sequence of polytopic structures designed in this study

توالی سازه پلی توپی
SSAKMPSNTSRSCSSTELKRLGGGSGGSSAKMPSNTSRSCSSTELKRLGGGSGGSSAKMPSNTSRSCSSTELKRL GGGSGGVQQQSAGQQQRYTGQEGGSGGTLTQDDLTQDEQGGSGGEQGQLNKNGEQVGGSGGMINIQTAKR MNDNEGGSGGPKMGFTIEERNQSQGTGGSGGLKADEKPKPKSVLGGSGGLYGTTAPSEQGKVGDYGGSGGPI YWLLKNSFQRRRPQ GGSGG IQVDDYDPEEEEYLDE

جدول ٥- آنالیز سازه پلی توپی

Table 5. Analysis of polytopic structures

The part of Construct seq	Number Of amino acid	Molecular weight	PI	Asp+Glu	Arg+lys	Half-life in vitro	Half-life in vivo (yeast)	Half-life in vivo (E.coli)	Aliphatic index	GRAVY	Instability index
SSAKMPSNTSRSCSSTELKR LGLVLVLVLVLVGGSGGSS AKMPSNTSRSCSSTELKRLG LVLVLVGGGSGGSSAKMPS NTSRSCSSTELKRLGLVLVL VLVLVGGGSGG VQQQSAG QQQRYTGQELVLVLVLVGG SGG TLTQDDLTQDEQGGSG	312	31852/09	6/39	27	27	1.9h	20h	10h	59.48	-1.038	42/55

تجزیه و تحلیل سازه پلی توپی

تجزیه و تحلیل توسط پایگاه داده ProtParam صورت گرفته و پارامترهای محاسبه توسط پایگاه داده شامل: وزن مولکولی، ترکیب آمینواسیدی، ترکیب اتمی، ضریب خاموشی و ... است. نتایج این تجزیه و تحلیل منجر به رسیدن چندین پلی توپ نهایی می‌شود. توالی مورد نظر شامل ۳۱۲ اسید آمینه است که وزن مولکولی آن ۳۱۸۵۲/۰۹ دالتون و pH ایزوالکتریک آن ٦/۳۹ می باشد. فرمول مولکولی این پروتئین C1048H1694N334O395S9 و مجموع اتم‌های آن ۳٤۸۰ است که به این ترتیب شاخص ناپایداری (II) آن برابر با ٤۲/۵۵ است بنابراین پروتئین مورد نظر جزء پروتئین های پایدار دسته بندی می‌شود.

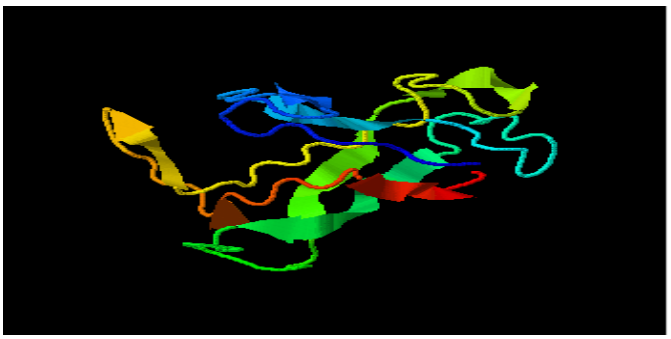
برای ساخت سازه پلی توپی نیاز به توالی نوکلئوتیدی می‌باشد که توسط پایگاه داده Backtranseq صورت می‌گیرد.

بهینه سازی توالی نوکلئوتیدی

به منظور عملکرد بهتر سازه در تست‌های آزمایشگاهی توالی نوکلئوتیدی سازه، توسط پایگاه داده JCat بهینه‌سازی شده است

مدل سازی سازه پلی توپی

هدف از این مرحله، آگاهی و شناخت پروتئین ساخته شده می-باشد که می‌توان باتوجه به ویژگی‌های آن با کارآمدی بیشتری از آن استفاده کنیم. در نهایت مدل سازه ی پلی توپی را با نرم افزار I tasserبدست آوردیم که در شکل ۱ قابل مشاهده است.



شکل ۱ - نمایی شماتیک پلی توپ طراحی شده با سرور I TASSER

Fig1. Schematic view of a poly ball designed with I TASSER server

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.4.9]

خلاصه ای از نرم افزار و پایگاه داده های مورد استفاده

جدول ٦- نرم افزار، سرور و پایگاه دادههای مورد استفاده

Table 6. Software, server and database used in this study

کاربرد	آدرس	نرم افزار/ سرور/ پایگاه داده
استخراج ژنوم	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/	NCBI
یافتن توالی هایی از ژنوم که پروتئین را کد میکند	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/	NCBI (ORF Finder)
مکان یابی پروتئین	https://www.psort.org/psortb/	PSORTb
حذف سیگنال پپتید	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	SignalP-5.0
بررسی آلرژنیک بودن پروتئین	http://crdd.osdd.net/raghava/algpred/	Algpred
بررسی همولوژی	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	NCBI (BLAST)
مکان یابی دقیق آمینواسیدها	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ - https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html	TMHMM – ExPASy(TMpred)
مدل سازی	https://swissmodel.expasy.org/	SWISS-MODEL
پیش بینی اپی توپ خطی	- http://crdd.osdd.net/raghava/lbtope/ - http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/ - http://tools.iedb.org/bcell/	LBtope - ABCpred IEDB (Bepipred, Kolaskar and Tongaonkar, Emini, Parker, Chou and Fasman, Karplus)
پیش بینی اپی توپ فضایی	http://crdd.osdd.net/raghava/cbtope/ - http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/ - http://tools.iedb.org/ellipro/	CBTOPE - Disco Tope 2.0 – IEDB (Ellipro)
بررسی نمودار راماچاندران پروتئین	https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/	PROCHECK
ایجاد تغییرات روی مدل پروتئین	Software	Chimera 1.8.1
تجزیه و تحلیل سازه پلی توپی	https://web.expasy.org/protparam/	ExPasy (ProtParam)
ترجمه توالی آمینواسیدی به نوکلئوتیدی	https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/	Backtranseq
بهینه سازی توالی نوکلئوتیدی	http://www.jcat.de/	JCat

بحث

بررسی نمونه های کار شده روی ویبریوکلرا

در سال ۲۰۱٤ وقارگانی تنتاری و همکارانش در دانشگاه SRM ،که با هدف طراحی و توسعه یک کاندید واکسن علیه ویبریوکلرا تحقیق کردهاند. در این پژوهش از سویه ویبریوکلرا ۰۳۹۵ استفاده شده است که این سویه دارای ۱۲۸٦۵ توالی پروتئینی بیماریزا است که وی از ۵ توالی به صورت انتخابی استفاده کرده است. این محقق توالی پروتئینهای ویبریو را به وسیله پایگاه داده TIGER و SDSC Biology Bench Work بررسی کرده و سپس از پایگاه دادههای ProPred، HLAPred و PORTER به ترتیب برای غربالگری و ساخت ساختار دوم پروتئینهای شناسایی شده، استفاده کرد. در نهایت آنتیژن پنجم طراحی شده توسط وی با توالی LLAL به عنوان آنتیژن برتر انتخاب شد (Qureshi, et al, 2018).

در سال ۲۰۱٦ پژوهشها نیات نورین و همکارانش از OMP ها و پروتئینهای فلاژله در سویه O۱ به عنوان پروتئینهای کلیدی در طراحی واکسن استفاده شد. در این تحقیق ۳۸ سویه ویبریوکلرا به دو زیرگروه PSC1 و PSC2 تقسیم شدند سپس این ۳۸ سویه از لحاظ ژنومیکی، تکاملی و ساختاری به وسیله پایگاه دادههای NCBI، CLC Sequence Viewer و EMBOSS بررسی شدند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.4.9]

در مرحله بعد توالی‌ها به وسیله پایگاه داده‌های ABCPred، Ellipro، Bepipred و ProPred برای شناسایی اپی توپ های B cell و T cell بررسی شدند. در مورد B cell، ٤ اپی توپ فضایی برتر انتخاب شدند و به وسیله مدل‌سازی سه بعدی مورد بررسی قراگرفته‌اند (Noureen, et al, 2016).

در تحقیق پلاوی و همکارانش در سال ۲۰۱۷ به وسیله واکسن شناسی معکوس، کاندیدهای واکسن مناسب علیه پاتوژن و یبریو انتخاب کردند. این پژوهشگران به وسیله استراتژی ریورس واکسن، OMP های ویبریو را که می‌توانستند کاندید مناسب واکسن باشند را بررسی کردند. در این بررسی ۲۳ آنتی‌ژن بررسی شد که از این تعداد دو عدد به عنوان لیپوپروتئین غشای خارجی شناسایی شدند. همچنین اپی توپ‌های B و T برای OMP های جدید به کار برده شده در این تحقیق پیش بینی شدند که می‌تواند در طراحی واکسن مبتنی بر اپی توپ مناسب به کار رود. لازم به ذکر است توالی نوکلئوتیدی سویه O1 ویبریو به وسیله پایگاه داده NCBI بازیابی شد. سپس با PSORTb، VaxiJen و EMBOSS مورد بررسی قرار دادند. سپس BLAST انجام شده است و در نهایت اپی توپ های خطی B cell بوسیله BCPred، AAP و FBCPred بررسی شدند. نتایج براساس طول و عدم هم پوشانی انتخاب و با یک B cell پایدار(consensus) ترکیب شدند. از این رو از اپی توپ های به دست آمده در جهت تهیه واکسن براساس پپتید استفاده کردند (Baliga, et al, 2018).

در پژوهش‌ها Rehman و همکارانش در سال ۲۰۱۹ با هدف یافتن آنتی‌ژن های جدید برای توسعه واکسن ویبریو کلرا، که در این مطالعه لیپوپروتئین NlpD، پروتئین غشای خارجی OmpU، فاکتور استعمار جانبی AcfA، Porin، پروتئین غشایی و غشایی بیرونی OmpW که این اپی توپ های پیش بینی شده را به عنوان کاندید واجد شرایط یک واکسن پپتیدی قابل اعتماد گزارش کردند (Rashid, et al, 2019).

Saadia Andleeb و همکارانش در سال ۲۰۱۹ از طراحی واکسن به روش معکوس برای انتخاب کاندیداهای جدید واکسن از پروتئوم cholorea Vibrio استفاده کردند نتایج نشان داده شد که ۱۰ پروتئین به عنوان کاندیدای احتمالی واکسن از ۹۹۸ ژن هسته از مجموعه ۱۰۰ توالی ژنومcholorea Vibrio انتخاب شده اند که می تواند به عنوان عوامل درمانی موفق مورد استفاده قرار داد (Zed, et al, 2019).

مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر: در تحقیق وقار و همکارانش نقطه ضعف آن را می‌توان مربوط به طول کم اپی توپ نهایی دانست که برای فولد و در نهایت عمکرد بهینه متاسب نیست. در نتایج مربوط به این پروژه می توان طول های متفاوت و متنوعی مشاهده کرد که در نهایت به عملکرد و ساخت پلی توپ با کارایی بالا میتوان استفاده کرد.

در پژوهش مربوط به پرادیپتا و همکارانش پیش بینی یک اپی توپ با طول مناسب و همچنین توالی ایمنی زا مشترک بین B cell و T cell می توان به عنوان نقطه قوت یاد کرد اما استفاده نکردن از همه ابزارهای موجود برای یافتن جامع‌ترین نتیجه از نقاط ضعف آن‌هاست. در این پروژه نگاه جامع تری نسبت به ابزارهای در دسترس دارد.

در یافته‌های نورین و همکارانش به صورت جامع تر نسبت به پرادیپا و همکارانش، پژوهش‌ها انجام داده‌اند اما تفکیک بین اپی توپ های خطی و فضایی از نقاط ضعف آن می‌باشد در صورتی که در این پروژه اپی توپی که کاندید شده است دارای تاییدیه پیش‌بینی خطی و فضایی است.

پلاوی و همکارانش شاید یکی از کامل‌ترین روش‌ها را امتحان کرده‌اند و استراتژی ترکیبی آن نقطه قوت و قابل اتکا آن‌ها می‌باشند.

نتیجه گیری کلی: به منظور شناسایی دقیق شاخص‌های آنتی‌ژنیک نیاز به بدست آوردن پروتئین مورد نظر از ارگانیسم و شناخت مناسب قطعات پپتیدی بدست آمده از آن و آزمایش بر روی آن‌ها جهت شناسایی فعالیت ایمنی‌زایی می‌باشد. این چنین مطالعاتی طاقت فرسا، زمان‌بر و پرهزینه بوده، بنابراین تلاش و توجه پژوهشگران به سمت توسعه روش‌های سریع‌تر نظیر پیشگویی، مبتنی بر توالی آمینو اسید پروتئین مورد بررسی، می‌باشد. پیچیدگی ذاتی شناسایی آنتی ژن، پیشگویی اپی توپ را مشکل می کند از این رو الگوریتم‌های متنوعی جهت پیشگویی اپی توپ

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.4.9]

ها طراحی شده‌اند. در خصوص این که سبب تسهیل توسعه واکسن‌های نوین مبتنی بر داده‌های ژنومیک و پرتئومیک شده است. این چنین واکسن‌هایی، به خصوص آن‌هایی که بر علیه بیماری‌هایی عفونی هستند (بیماریهای که سبب ابتلا و مرگ گروه زیادی در تمام جهان می شوند) حائز اهمیت استراتژیک از نظر سلامتی جهانی می‌باشند.

با در دست داشتن دانسته‌های کافی، دسترسی به تکنولوژی‌های جدید و الگوریتم‌های طبقه بندی شده ابزارهای محاسبه‌ای که مناطق با آنتی ژنسیتی بالا را در پروتئین پیش‌بینی می‌کنند تقریبا می توان با احتمال بالائی نواحی ایمونوژنیک را در پروتئین شناسایی کرد. براساس همولوژی به وسیله سرور SWISS MODEL، آنتی‌ژن‌ها غربال‌گری شدند. اپی توپ نهایی انتخاب شده در این پژوهش با معرفی ۱۰ پروتئین جدید به عنوان کاندیدای واکسن، راه پیشرفت واکسن را بسیار آسان می‌کند. داده‌های حاصل از مطالعه می‌توانند در تعیین راهکارهای درمانی دقیق به منظور کاهش آمار مبتلایان به وبا بسیار مفید باشند.

منابع

Baliga, P., Shekar, M., & Venugopal, M. N. (2018). Potential outer membrane protein candidates for vaccine development against the pathogen Vibrio anguillarum: a reverse vaccinology based identification. *Current microbiology*, *75*(3), 368-377.

Dehghannejad, M., Kasiri, M. (2011). The problem of Quarantines in Iran during Naseroldin Shah's era (1847-1986), Pajoohesh-haye Tarikhi, *2*(4), 1-14. (In Farsi with English abstract).

Del Tordello, E., Rappuoli, R., & Delany, I. (2017). Reverse vaccinology: exploiting genomes for vaccine design. In *Human vaccines* (pp. 65-86). Academic Press.

Nair, G. B., & Takeda, Y. (Eds.). (2014). Cholera outbreaks (Vol. 379). Springer.

Nandy, A., & Basak, S. C. (2019). Bioinformatics in Design of Antiviral Vaccines. *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, 280.

Noureen, N., Tariq, M., Farooq, A., Arif, A., & Bokhari, H. (2016). In silico identification of receptor specific epitopes as potential vaccine candidates from Vibrio cholerae strains. *Gene Reports*, *4*, 222-232.

Qureshi, A., Tantray, V. G., Kirmani, A. R., & Ahangar, A. G. (2018). A review on current status of antiviral siRNA. *Reviews in medical virology*, *28*(4), e1976. (In Farsi with English abstract).

Rashid, M. I., Rehman, S., Ali, A., & Andleeb, S. (2019). Fishing for vaccines against Vibrio cholerae using in silico pan-proteomic reverse vaccinology approach. *PeerJ*, *7*, e6223. (In Farsi with English abstract).

Razmjoo, A., Razmjoo, M. (2018). Legal review of the use of cholera bacteria in Yemen by Saudi, Bi-Quarterly Journal of Politics and International Relations, 2(4), 53-68. (In Farsi with English abstract).

Shaikh, H., Lynch, J., Kim, J., & Excler, J. L. (2020). Current and future cholera vaccines. *Vaccine*, *38*, A118-A126.

Zeb, S., Ali, A., Gulfam, S. M., & Bokhari, H. (2019). Preliminary work towards finding proteins as potential vaccine candidates for Vibrio cholerae Pakistani isolates through reverse vaccinology. *Medicina*, *55*(5), 195. (In Farsi with English abstract).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.4.9]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

Bioinformatics design of a vaccine against Vibrio cholerae using the reverse approach

Mina Oghbatalab, Mohammad Javad Dehgha Esmatabadi*, Alireza Saeedinia, Mohammad Ali Yaghobi Moghaddam

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

*Corresponding Author, Email: mohammad_dehghan@mut.ac.ir

Abstract

Vaccine design from the past to the present is based on classical methods, which are time consuming, costly and have some risks, but with the discovery of the genome and gene sequencing, the modern methods for vaccine design have been developed, including Referred to the reverse method of vaccine design (vaccine polytop). In this study we used NCBI (ORF Finder) to find the coding sequences, PSORTb server to locate the protein, Algpred server to check the allergenicity of the protein and LBtope - ABCpred - IEDB CBTOPE servers - Disco Tope 2.0 - IEDB (Ellipro) to predict the linear and spatial epitopes. The final epitope was selected and then we analyzed the polypepe structure by ExPasy server (ProtParam) and finally obtained the optimized nucleotide sequence with JCat server. Using this method, 6074 reading frameworks as well as 43 surface and secretory proteins were identified, from which, finally, 10 suitable epitopes that are able to provide immunity against a wide range of strains were selected as a vaccine candidate. It is hoped that this will facilitate the development of this vaccine.

Keywords: Bioinformatics, Cause of Cholera, Polytopic structure, Protein, Reverse vaccination

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.4.9]