

## طراحی بیوانفورماتیک و ساخت ایمونوژن RBD علیه اتصال ویروس SARS CoV\_2

امیر رضایی<sup>۱</sup>، شهرام نظریان<sup>۲\*</sup>، سید میرلطیف موسوی گرگری<sup>۳</sup>، حسین سمیعی ابیانه<sup>۴</sup>، عماد کردبچه<sup>۵</sup>  
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، ۳- استاد، دانشگاه شاهد، ۲- دانشیار، ۴ و ۵- کارشناس ارشد، دانشگاه جامع امام حسین (ع)

(دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۱، پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۰)

### چکیده

ویروس مسری SARS CoV\_2 به سرعت در جهان شیوع پیدا کرد. این ویروس بیش از ۵۵۰ میلیون نفر را در سراسر جهان آلوده کرده و منجر به مرگ حدود ۷ میلیون نفر شده است. در سازوکار تهاجم ویروس، زیرواحد متصل شونده به گیرنده (RBD) از پروتئین Spike نقش مهمی در ورود ویروس به سلول میزبان دارد. در این مطالعه، با توجه به رویکردهای بیوانفورماتیک، طراحی کاست، سازگاری کدون و پایداری پروتئین و در نهایت صحت سازه طراحی شده با بررسی بیان پروتئینی سنجیده شد. برای افزایش احتمال بیان کاست RBD، کدون‌های ژنی و پارامترهای مختلف بهینه شده و تجزیه و تحلیل ترمودینامیکی ساختار mRNA برای افزایش ثبات انجام گردید. ساختار پروتئین سوم نیز پیش‌بینی شد و کیفیت ساختارها ارزیابی شدند. اپی‌توپ‌های خطی و فضایی تعیین شدند. پروتئین نوترکیب RBD بالاترین شاخص آنتی‌ژنی را نشان داد. شاخص سازگاری کدون پروتئین نوترکیب به ۰/۹۶ افزایش یافت. ساختار سوم پیش‌بینی شده بر اساس سرور I\_TASSER کیفیت خوبی را نشان داد. تجزیه و تحلیل ترمودینامیکی ساختار mRNA نشان داد که ساختار پیش‌بینی شده پایدار است و اپی‌توپ‌های تطبیقی و خطی در هر سه حوزه پروتئین نوترکیب مشاهده شده است. سپس سازه مورد نظر در میزبان باکتریایی بیان شد. نتایج ایمونوفورماتیک و بیان نشان داد سازه نوترکیب طراحی شده آنتی‌ژنیسیته و پتانسیل تولید بالایی دارد و می‌تواند به‌عنوان یک کاندید ایمونوژن علیه ویروس SARS CoV\_2 در مطالعات بعدی استفاده شود.

**کلیدواژه‌ها:** کاندید واکسن، بیوانفورماتیک، RBD، پروتئین نوترکیب، SARS CoV\_2

## In Silico Design and Construction of an RBD Immunogen Against the Adherence of SARS Cov\_2

A. Rezaiei, S. Nazarian, S. M. L. Mousavi Gargari, H. Samiei Abianeh, E. Kordbacheh

Imam Hossein University

(Received: 01 / 01 / 2022; Accepted: 11 / 08 / 2022)

### Abstract

The contagious SARS virus CoV\_2 spread rapidly around the world. The virus has infected more than 550 million people worldwide and killed about 7 million to date. Regarding the mechanism of infection, the receptor-binding domain (RBD) of the Spike protein plays an important role in the virus entry into the host cell. In this study, with a bioinformatics approach the cassette design, codon compatibility, protein stability and finally the structural accuracy (through examining the protein expression) were investigated. To increase the probability of RBD cassette expression, the gene codons and various parameters were optimized and the thermodynamic analysis of mRNA structure were performed to increase stability. The structure of the third protein was also predicted and the quality of the structures was evaluated. The linear and conformational B-cell epitopes were determined. The recombinant RBD protein showed the highest antigen index. The compatibility index of the recombinant protein codon increased to 0.96. The third predicted structure based on the I\_TASSER server showed good quality. Thermodynamic analysis of the mRNA structure showed that the predicted structure is stable. The conformational and linear B-cell epitopes were observed in all three domains of the recombinant protein. Finally, the recombinant protein was expressed in a bacterial host. Immunoinformatics and expression results showed that the designed recombinant construct has a high antigenicity and production potential and can be considered as an immunogenic candidate against SARS CoV\_2 virus in the future studies.

**Keywords:** Vaccine Candidate, Bioinformatics, RBD, Recombinant Protein, SARS CoV\_2

## ۱. مقدمه

در ۲۹ دسامبر ۲۰۱۹، پزشکان بیمارستانی واقع در شهر ووهان چین متوجه موارد غیر معمولی از بیماران مبتلا به ذات‌الریه (پنومونی) شدند. با این حال، اولین مورد از این بیماری در تاریخ ۹ دسامبر مشاهده گردید [۱]. بررسی‌های بعدی نشان داد که منشأ این بیماری از بازار غذاهای دریایی، طیور و حیوانات زنده واقع در شهر ووهان استان هوبای در مرکز چین بوده است. پس از آن، شیوع غیر معمول موارد ذات‌الریه در تاریخ ۱۰ دسامبر به سازمان بهداشت جهانی گزارش شد. در تاریخ یکم ژانویه بازار مذکور بسته و تحت آلودگی زدایی قرار گرفت. بعد از گمانه زنی‌های گسترده درباره عامل مسبب این بیماری، سرانجام بخش چینی مرکز کنترل و پیشگیری بیماری گزارش منتشر شده توسط وال استریت ژورنال را تأیید و در تاریخ ۹ ژانویه ۲۰۲۰، عامل این بیماری را یک کروناویروس جدید با نام nCoV-2019 اعلام نمود.

اولین توالی ژنومی nCoV-2019 یک روز بعد از تأیید آن توسط ژانگ و دانشمندان دیگر در دانشگاه فودان شانگ‌های به صورت آنلاین قرار گرفت [۲]. متعاقباً در تاریخ ۱۱ ژانویه، پنج توالی ژنومی دیگر از این ویروس توسط انستیتوهای مختلف در سرتاسر چین از جمله انستیتو ویروس شناسی ووهان و آکادمی علوم پزشکی بر روی پایگاه‌های داده قرار داده شد و به محققان در سرتاسر دنیا اجازه داد تا تحقیقات بر روی این کروناویروس جدید را آغاز کنند [۳ و ۴].

طبقه‌بندی جدید، خانواده کروناویروس را به دو زیرخانواده کروناویروس و لتوویروس تقسیم می‌کند. زیرخانواده کروناویروس شامل چهار جنس آلفاکروناویروس، بتا کروناویروس، گاما کرونا ویروس‌ها و دلتا کرونا ویروس‌ها است [۵ و ۶]. با مشخص شدن توالی ژنومی این ویروس، SARS-CoV-2 کروناویروس انسانی جدید نیز در جنس بتا کروناویروس قرار داده شد. این ویروس RNA دار و از سنس می‌باشد که تقریباً ۲۹۷۰۰ نوکلئوتید طول دارد و ۷۹/۵ درصد با ویروس سارس (SARS-CoV-1) مشابهت دارد [۷ و ۸]. در انتهای ۳ ژنوم این ویروس ۴ پروتئین اصلی ساختاری از جمله Spike(S)، Nucleocapsid(N)، Membrane(M) و Envelope(E) وجود دارند [۸ و ۹].

پروتئین اسپایک ویروس کرونا به دو بخش S1 و S2 تقسیم بندی می‌شود که در قسمت S1 که سر N ترمینال دارد بخش زیرواحد متصل شونده به گیرنده (RBD) واقع شده است [۱۰]. به تازگی نتایج نشان داد که کروناویروس جدید از همان گیرنده ورودی سلول (ACE2) مانند کروناویروس سارس استفاده می‌کند [۷ و ۱۱]. این ویروس از طریق گلوتامین ۳۹۴ موجود در RBD، لایزین ۳۱ موجود در ACE2 را تشخیص می‌دهد [۱۲]. از این رو به نظر می‌رسد پروتئین نوترکیب RBD می‌تواند کاندیدی برای واکسن نوترکیب باشد که باید طراحی و بررسی‌های

بیوانفورماتیکی روی آن صورت گیرد.

امروزه در تحقیقات بیولوژیک از ابزارهای بیوانفورماتیک به‌منظور شناسایی ایمونوژن و یافتن اپی‌توپ‌هایی که به‌عنوان آنتی‌ژن قوی عمل می‌کنند، استفاده می‌شوند زیرا که شناسایی آزمایشگاهی کاندیدهای واکسن اغلب فرآیندی طولانی می‌باشد. با این روش آنتی‌ژن‌هایی که می‌توانند کاندیدی برای واکسن باشند به سرعت شناسایی و وارد فاز آزمایشگاهی و مطالعات پیش بالینی خواهند شد. همچنین تجزیه و تحلیل ساختاری و ایمونولوژیکی آنتی‌ژن‌ها می‌تواند منجر به انتخابی دقیق‌تر و عاقلانه از ایمونوژن‌ها برای واکسن‌های زیرواحدی و چند زیرواحدی شود [۱۳].

از این رو بهتر است که ابتدا از طریق مطالعات بیوانفورماتیکی امکان کلون و بیان پروتئین نوترکیب، پایداری و قدرت ایمنی زایی RBD مورد مطالعه قرار گیرد تا در صورت مساعد بودن نتایج، ایمنی زایی این پروتئین در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گیرد.

## ۲. روش تحقیق

## ۲-۱. به‌دست آوردن توالی

توالی ژنوم ویروس SARS-CoV-2 از پایگاه داده NCBI Virus با کد دسترسی NC\_045512 در فرمت FASTA ذخیره شد. در ادامه توالی نوکلئوتیدی ژن S (کدکننده پروتئین Spike glycoprotein) از ژنوم ویروس استخراج گردید. همچنین توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین Spike از پایگاه داده UNIPROT به شماره دسترسی P0DTC2 دریافت و با فرمت FASTA ذخیره شد. با توجه به اتصال ناحیه اختصاصی از پروتئین Spike به گیرنده ACE2 به نام دومین متصل شونده به گیرنده (RBD) توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای مرتبط با آن ذخیره شد. ژن (RBD) انتخاب شده و توالی‌های مرتبط با آن شامل اپی‌توپ‌های اصلی اتصال ویروس به گیرنده اختصاصی آن است. جهت اطمینان از توالی انتخاب شده با ابزار Clustal Omega در پایگاه داده مؤسسه بیوانفورماتیک اروپایی (EBI) و UniProt (منبع پروتئین جهانی) به‌طور مشخص بررسی شدند [۱۴].

## ۲-۲. طراحی سازه و بهینه سازی کدون

جهت تسهیل در تخلیص و شناسایی پروتئین به روش وسترن بلات، توالی ۶ تایی از اسیدآمینه هیستیدین به انتهای سازه اضافه گردیده است. همچنین در انتهای ۵ و ۳ توالی جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده NdeI و BamHI قرار داده شده است (شکل ۱).

جهت بررسی جایگاه‌های برش آنزیم محدود کننده از ابزار RestrictionAnalyze در سرور WebDSV (<https://molbiotools.com/WebDSV/index.html>) استفاده شد.

آنتی‌ژنیسیته استفاده شد [۲۳]. این برنامه با استناد به پاسخ آنتی‌بادی، بخش‌هایی را از درون یک توالی پروتئینی که احتمالاً آنتی‌ژنیک هستند، پیش‌بینی می‌کند. در این نرم‌افزار پپتیدهای آنتی‌ژنی به روش کولاسکار و تونگوانکار تعیین می‌شوند. همچنین برای تخمین میزان آلرژی‌زایی و سمیت پروتئین طراحی شده از سرور AlgPred و ToxinPred استفاده گردید [۲۴ و ۲۵].

#### ۲-۷. پیش‌بینی اپی‌توپ‌ها

برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B، پنج یا شش الگوریتم مختلف در پایگاه‌های اطلاعاتی مختلف مانند پایگاه داده (IEDB) وجود دارد که مطابق با آب دوستی، انعطاف‌پذیری، دسترسی، چرخش‌ها، سطوح در معرض، قطبیت و تمایل آنتی‌ژنی زنجیره‌های پلی‌پپتیدی پیش‌بینی انجام شد.

ABCpred, Ellipro و CBtop به ترتیب برای بررسی اپی‌توپ‌های خطی و ناپیوسته B-Cell سازه RBD استفاده شد [۲۶، ۲۷]. همچنین اپی‌توپ‌های خطی سلول‌های B توسط نرم‌افزار آنلاین Bcepred بر پایه ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی پروتئین پیش‌بینی شد [۲۸].

#### ۲-۸. تهیه و تأیید سازه حاوی ژن RBD

پس از طراحی ژن RBD، پلاسمید pET28a حاوی ژن توسط شرکت Biomatik (Canada) ارسال گردید. سلول‌های مستعد سوش *E. coli* BL21(DE3) تهیه شده و پلاسمید به روش شوک حرارتی به میزبان تلقیح و تکثیر شد. تخلیص پلاسمیدها با روش لیز قلیایی صورت گرفته است. جهت تأیید سازه ژنی از روش PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی T7 استفاده شد و سپس نتایج با الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده گردید.

#### ۲-۹. بیان پروتئین RBD

از کلنی‌های همسانه سازی شده دارای پلاسمید نوترکیب pET28a+ کشت شبانه صورت گرفت به این صورت که، یک کلنی از باکتری به ۱ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین اضافه گردید و به مدت یک شب در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و rpm ۱۸۰ کشت داده شده. در روز بعد به محیط کشت انبوه ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح گردیده و بر روی شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و rpm ۱۷۰ انکوبه شده تا به OD ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر رسید. سپس غلظت ۱ میلی مولار IPTG به محیط کشت اضافه گردیده و به مدت ۵ ساعت با همان شرایط انکوبه‌گذاری شد. باکتری‌های حاصل رسوب داده شده و با بافر لیز کننده حاوی اوره شکسته شدند. برای تأیید بیان پروتئین نوترکیب RBD از ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد استفاده شد

بهینه سازی توالی نوترکیب برای باکتری *E. coli* BL21(DE3) با استفاده از ابزار OPTIMIZER در پایگاه داده HEG (http://genomes.uv.cat/HEG-DB) انجام شد [۱۷-۱۵].

#### ۲-۳. پیش‌بینی ساختار ثانویه RNA

ساختار ثانویه mRNA و سایر پارامترهای مختلف سازه نوترکیب توسط RNA Predict Secondary Structure Server (RNAfold) پیش‌بینی شد. برنامه RNAfold برای آنالیز الگوهای تغییر همگام، از انطباق چندگانه توالی به عنوان ورودی بهره می‌برد. سپس ساختار ثانویه RNA قبل و بعد از بهینه سازی ژن مقایسه شد [۱۸].

#### ۲-۴. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پروتئین همانند وزن مولکولی، PH، ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری، نیمه عمر و درصد اسید آمینه‌هایی با بار مثبت و منفی با استفاده از ابزار ProtParam ExPasy به دست آمد [۱۹]. حلالیت پروتئین نوترکیب و احتمال تشکیل اجسام نامحلول توسط سرور Protein-sol به عنوان یکی از پارامترهای امتیاز مورد ارزیابی قرار گرفت [۲۰]. تشکیل پیوند دی سولفید توسط سرور DISULFIND مورد بررسی قرار گرفت [۲۱].

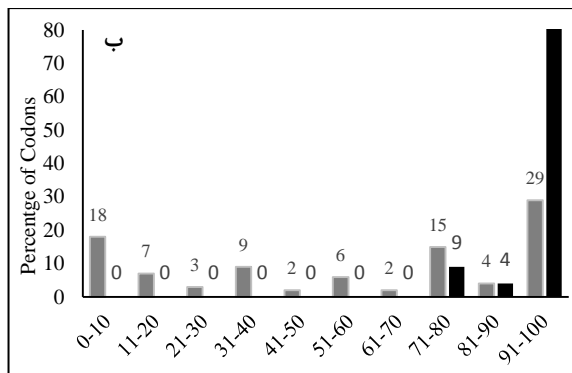
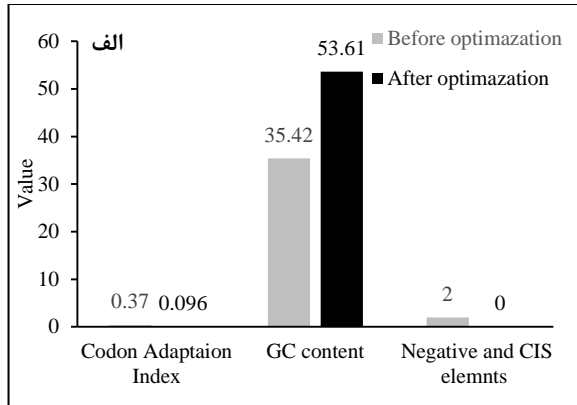
#### ۲-۵. پیش‌بینی و اعتبارسنجی ساختارهای دوم و سوم پروتئین

جهت پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین از الگوریتم PHD و GOR استفاده شد [۲۲]. همچنین میزان حلالیت، ساختار ثانویه، گذرنده آلفا بتا، دومین‌ها و پیوندهای دی سولفیدی برخی از داده‌هایی بودند که از سرور پیش‌بینی کننده پروتئین Scratch به دست آمدند [۲۳]. از نرم‌افزار PSIPRED برای ترسیم حاشیه نویسی‌های شماتیک ساختار ثانویه استفاده شد [۲۴]. به منظور پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین از سرور I-TASSER استفاده شد [۲۵]. این سرور با استفاده از بانک اطلاعاتی شبیه‌سازی خود، پایدارترین ساختار پروتئینی را با توجه به اطلاعات ذخیره شده در خود پیشنهاد می‌دهد. کیفیت مدل‌های سه‌بعدی با سرور ModFOLD ارزیابی و برای مشاهده از نرم‌افزار Accelrys Discovery Studio ۱،۷۷. استفاده شد [۲۶]. در ادامه کیفیت ساختار پیش‌بینی شده با نرم‌افزار PROSA بررسی شد [۲۷].

#### ۲-۶. بررسی میزان آنتی‌ژنیسیته

میزان آنتی‌ژنیسیته سازه RBD با نرم‌افزارهای vaxigen و ANTIGENpro سنجیده شد [۲۲]. سرور Vaxijen به گونه‌ای توسعه یافته است که امکان امتیاز دهی آنتی‌ژن را بر اساس ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی سازه فراهم می‌کند. از سرور "Predicted antigenic peptides" نیز جهت بررسی میزان

۰/۹۶ تغییر یافت. همچنین، شیوع کدون با توزیع فرکانسی ۱۰۰-۹۱ از ۲۹ درصد به ۸۷ درصد افزایش یافت (شکل ۳).



شکل ۳. تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای پارامترهای مختلف مورد استفاده برای بهینه‌سازی کدون

### ۳-۲. پیش‌بینی ساختار و پایداری mRNA

ساختار دوم mRNA پس از بهینه‌سازی کدون‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و از لحاظ میزان حداقل انرژی (نشانه پایداری ساختار) و عدم داشتن ساختارهای نامناسب ارزیابی شد. ساختار پیش‌بینی شده در نقطه شروع ۵' (آغاز ترجمه) ساختارهای گره ساختگی و یا لوپ‌های بلند را که بر شروع ترجمه تأثیر دارند، دیده نمی‌شود. میزان حداقل انرژی این ساختار ۲۱۴/۷- کیلوکالری بر مول بود.

### ۳-۳. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پروتئین

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین کایمر با استفاده از برنامه PROTPARAM نشان داد که وزن مولکولی کایمر ۲۶۳۱۳/۷۲ دالتون بود، نقطه ایزوالکتریک آن ۸/۵ می‌باشد. مجموع اسیدآمین‌های با بار منفی (گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید) ۱۶ عدد و مجموع اسیدآمین‌های با بار مثبت (آرژنین و لیزین) ۲۳ عدد می‌باشد. شاخص آلیفاتیک کایمر نیز ۶۸/۸۴ و شاخص ناپایداری پروتئین کایمر نیز ۲۱/۲۲ می‌باشد. شاخص ناپایداری بیانگر میزان پایداری پروتئین نوترکیب بوده به‌گونه‌ای که پروتئین‌هایی با شاخص کمتر از ۴۰ جزو پروتئین‌های پایدار تقسیم بندی می‌شوند. بر اساس پیش‌بینی احتمال بیان پروتئین نوترکیب به حالت محلول در سامانه بیانی اشرشیاکلی در سرور

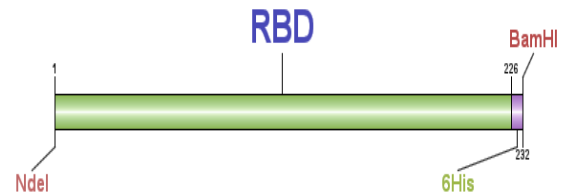
### ۳-۱۰. تخلیص و تأیید پروتئین نوترکیب

برای جداسازی پروتئین مورد نظر که دارای دنباله His-tag است از ستون کروماتوگرافی نیکل (Ni-NTA) اسفاده شد. در این مرحله از شیب غلظت ایمیدازول (به ترتیب از غلظت‌های ۵۰-۱۰۰-۲۵۰ میلی‌مولار) در PH=7 برای خالص‌سازی پروتئین RBD استفاده گردید. در ادامه پروتئین خالص شده با روش وسترن بلات با آنتی‌بادی ضد هیستیدین مورد ارزیابی قرار گرفت.

### ۳. نتایج و بحث

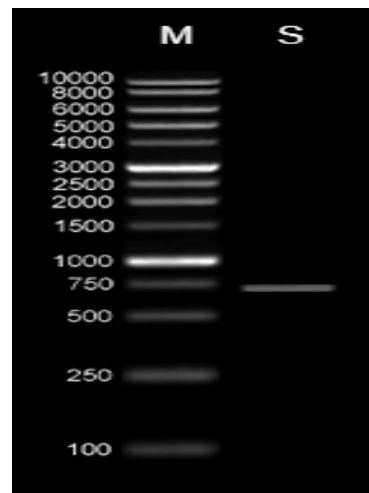
#### ۳-۱. طراحی سازه و بهینه‌سازی کدون

توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمین‌های مرتبط با RBD از سرور Genbank و Uniprot شامل ۶۷۲ نوکلئوتید و ۲۲۶ اسیدآمین بود. شش آمینواسید هیستیدین برای تسهیل خالص‌سازی و تشخیص به روش وسترن بلات به C-ترمینال سازه اضافه شد (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر شماتیک از سازه RBD

بررسی جایگاه برش آنزیم محدود کننده نشان داد هیچ جایگاه برش برای دو آنزیم محدود کننده BamHI و NdeI وجود ندارد (شکل ۲).



شکل ۲. بررسی جایگاه برش دو آنزیم محدود کننده BamHI و NdeI در سازه ژنی با استفاده از سرور WebDSV. ستون M مارکر DNA و ستون S سازه RBD ارزیابی شده

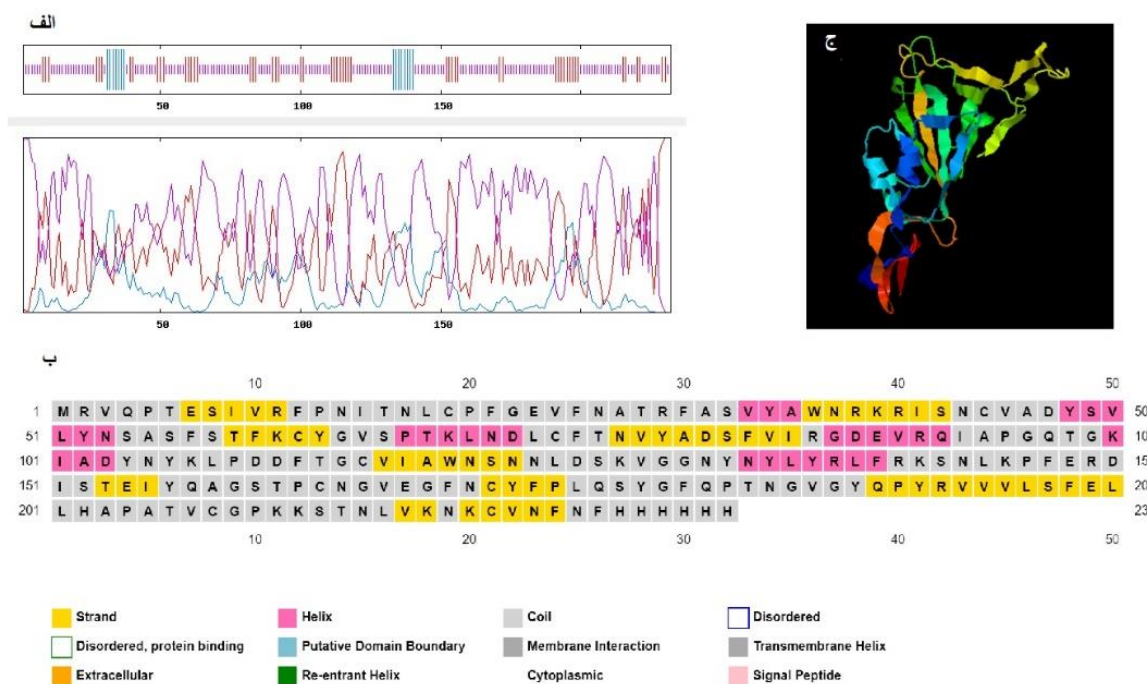
توالی‌های اصلی و بهینه شده از نظر محتوای پایه GC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و درصد GC از ۳۵/۴۲٪ تا ۵۳/۶۱٪ افزایش یافت. شاخص تطبیق کدون توالی پس از بهینه‌سازی از ۰/۳۷ به

(شکل ۴\_ج). در ادامه کیفیت ساختار پیش‌بینی شده نرم‌افزار PROSA بررسی شد. بر این اساس کیفیت ساختار پروتئین در محدوده پروتئین‌های کریستالوگرافی شده و یا تعیین ساختار شده به روش NMR بود (شکل ۴\_الف). بررسی نمودار رامچاندرا در مدل پیش‌بینی شده با سرور ITASSER، نشان داد بیش از ۹۴/۵ درصد از اسیدآمینوهای درون مناطق مطلوب و ۴/۹ درصد درون منطقه مجاز و ۰/۴ درصد از اسیدآمینوها در ناحیه غیر مطلوب قرار دارند (شکل ۴\_ب).

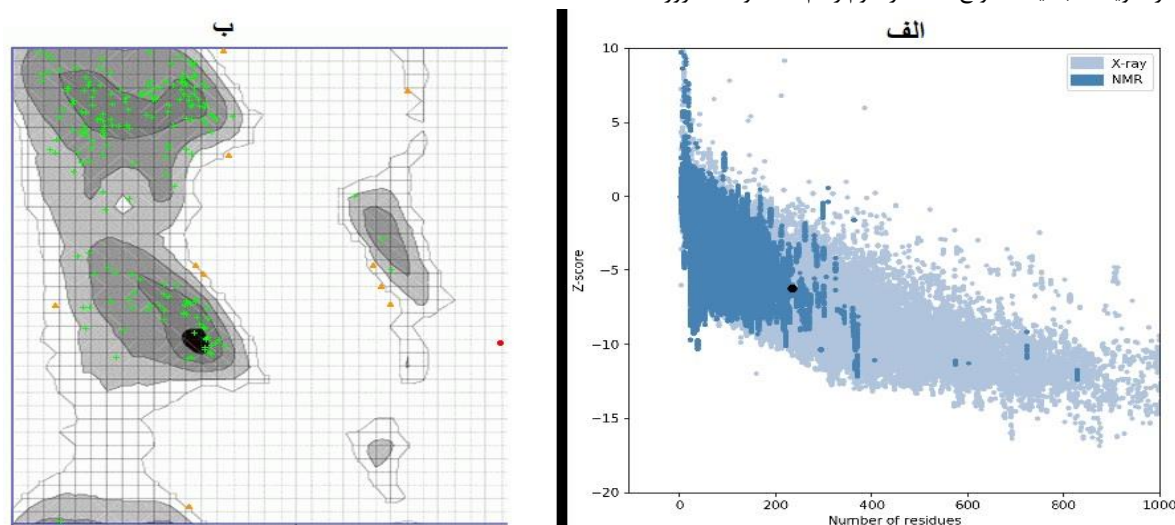
Protein sol، پروتئین با امتیاز ۰/۴۵۹ در آستانه ۰/۴۵ به‌عنوان محلول طبقه‌بندی شد. ابزار DISULFIND پیش‌بینی کرد که اصلاً پیوند دی‌سولفیدی تشکیل نمی‌شود.

### ۴-۳. ساختار دوم و سوم سازه RBD

نتایج بررسی ساختار دوم نشان داد که ساختار شامل که ۶/۷۴ آلفا هلیکس، ۲۳/۲۸ رشته توسعه یافته و ۷۰/۲۶ رندوم کویل است (شکل ۴\_الف و ب). ساختار سوم سازه نو ترکیب توسط سرور I-TASSER پیش‌بینی شد و فرمت PDB آن ذخیره گردید



شکل ۴. نمایش‌های گرافیکی و ارزیابی ساختار ثانویه: الف) ارزیابی ساختار ثانویه توسط سرور GOR4 نشان داد ساختار شامل که ۶/۷۴ درصد آلفا هلیکس، ۲۳/۲۸ رشته توسعه یافته و ۷۰/۲۶ رندوم کویل است، ب) پیش‌بینی ساختار ثانویه توسط PSIPRED نشان داده است که نه رشته آلفا مارپیچ و نه رشته بتا در ساختار ثانویه غالب نیستند و ج) ساختار سوم رسم شده توسط سرور I-tasser



شکل ۵. بررسی کیفیت ساختار سوم پیش‌بینی شده: الف) نتایج نمودار PROSA نشان داد که ساختار پیش‌بینی شده در محدوده پروتئین‌های تعیین ساختار شده به روش NMR و X-ray می‌باشد و ب) بررسی نمودار رامچاندرا نشان داد که ۹۴/۵۸۱ درصد از اسیدآمینوها در منطقه مطلوب قرار دارند.

## ۳-۵. آنالیز ایمونوآنفورماتیک

هومورال دارند، بنابراین سرورهای ABCpred، BCePred، Discotope و CBTOPE به کار گرفته شدند. در مورد اپی‌توپ‌های خطی، برای اطمینان هر دو نتایج ABCpred و BCePred مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). اپی‌توپ‌های فضایی سلول B مهم‌تر هستند، و با این نظر، Discotope و CBTOPE توزیع مناسبی از اپی‌توپ‌های فضایی را در طول توالی نشان دادند (جدول ۲ و شکل ۶).

میزان آنتی‌ژنیسیته از سرور Predicted antigenic peptides نشان داد که ۱۲ توالی از سازه خاصیت آنتی‌ژنیسیته دارند که درون توالی پخش است. همچنین نتایج حاصل از سرورهای Vaxigen و ANTIGENpro امتیاز بالایی برای آنتی‌ژنیسیته توالی پیشنهاد دادند. اپی‌توپ‌های سلول B نقش کلیدی در ایمنی

جدول ۱. بررسی اپی‌توپ‌های خطی پروتئین RBD: الف) اپی‌توپ‌های خطی سازه پروتئینی دریافت شده از سرور ABCPred و ب) اپی‌توپ‌های خطی سازه پروتئینی دریافت شده از سرور BCPred

امتیاز	موقعیت	اپی‌توپ	الف
0.91	158	GSTPCNGVEGFNCYFP	
0.90	174	LQSYGFQPTNGVGYQP	
0.89	207	CGPKKSTNLVKNKCVN	
0.86	146	FERDISTEIQAGSTP	
0.85	88	EVRQIAPGQTGKIADY	
0.85	73	CFTNVYADSFVIRGDE	
0.84	97	TGKIADYNYKLPDDFT	
0.82	11	FPNITNLCPFGEVFNA	
امتیاز	موقعیت	اپی‌توپ	ب
0.88	91	RQIAPGQTGKIADYNYKLPD	
0.871	176	QSYGFQPTNGVGYQPYRVVV	
0.836	1	MRVQPTESIVRFPNITNLCP	
0.743	155	IYQAGSTPCNGVEGFNCYFP	
0.738	202	HAPATVCGPKKSTNLVKNKC	

جدول ۲. نتایج بررسی اپی‌توپ‌های فضایی با سرور Ellipro، ۱۰ توالی دارای امتیاز بالای اپی‌توپ‌های فضایی در توالی RBD پیشنهاد شد که توزیع مناسبی در توالی دارد

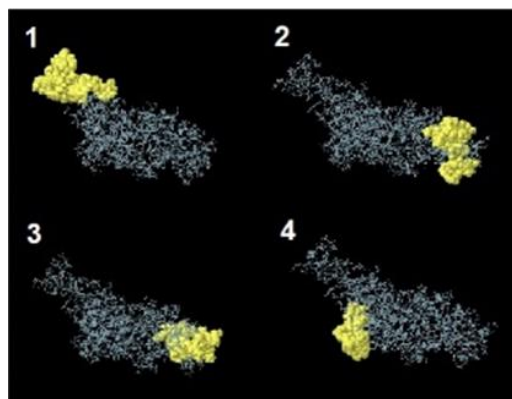
امتیاز	موقعیت	اپی‌توپ
0.816	1-19	MRVQPTESIVRFPNITNLCP
0.737	150-174	DISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
0.731	234-211	KKSTNLVKNKCVNFNHFFFFFFHGS
0.714	99-95	PGQTG
0.701	134-120	NSNNLDSKVGGNVNY
0.567	146-138	LFRKSNLKP
0.561	205-201	LHAPA
0.539	58-50	VLYNSASFS
0.519	189-178	YGFQPTNGVGYQ

## ۳-۶. تأیید سازه حاوی RBD

پس از تخلیص پلاسמיד از کشت شبانه سلول‌های حاوی تراریخت شده، واکنش PCR برای دو نمونه پلاسמיד حاوی ژن RBD و پلاسמיד فاقد ژن RBD به‌عنوان کنترل جهت تأیید سازه نو ترکیب انجام شد. نتایج بر روی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده شد و صحت سازه طراحی شده مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۷).

## ۳-۷. بیان پروتئین RBD

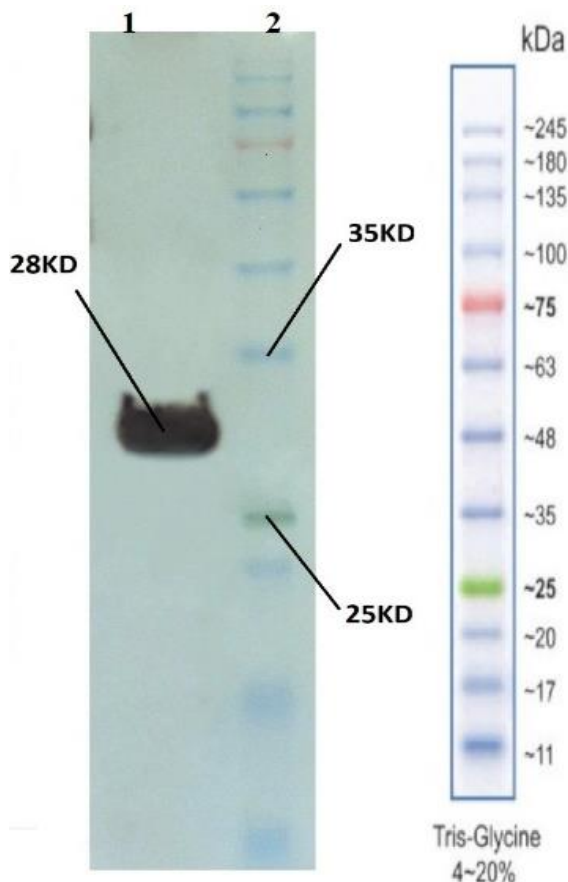
با القای بیان پروتئین تحت کنترل اپرون lac در شرایط انکوباسیون استاندارد، سلول‌های القاء شده و القاء نشده جمع‌آوری و شکسته شدند و بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. نتایج نشان داد در نمونه‌های القاء شده واجد



شکل ۶. تصویر ساختار سوم ۴ توالی که اپی‌توپ فضایی که امتیازی بالایی دارند مشخص شده است

### ۳-۸. تخلیص و تأیید پروتئین نوترکیب

تخلیص پروتئین نوترکیب در شرایط دناتورده و بر روی ستون نیکل انجام شد. برای اطمینان از صحت پروتئین‌های نوترکیب تولید شده، از روش وسترن بلات استفاده شد. برای انجام وسترن بلات پروتئین نوترکیب خالص شده، الکتروفورز گردید و سپس به کاغذ نیترو سلولز منتقل شد. با انجام وسترن بلات مشخص شد که آنتی His-Tag به‌طور اختصاصی با His-Tag پروتئین نوترکیب واکنش می‌دهد (شکل ۹).

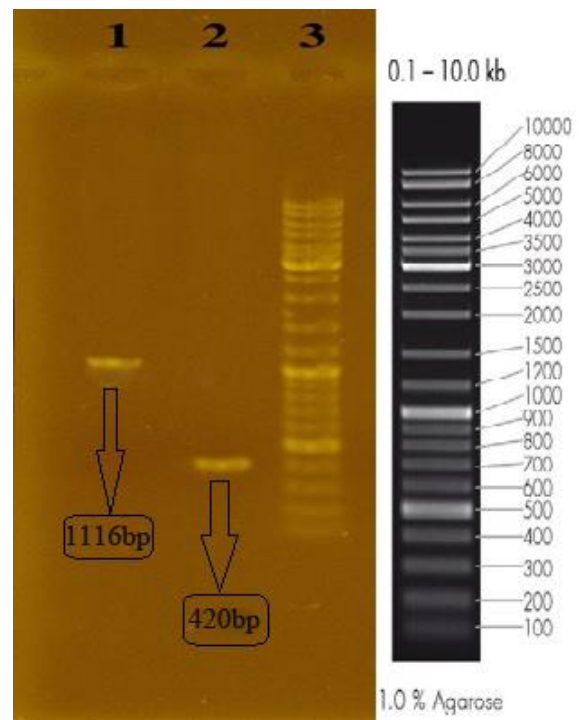


شکل ۹. تأیید پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلات: ردیف ۱- پروتئین نوترکیب RBD تخلیص شده و ردیف ۲- مارکر پروتئینی سینا کلون

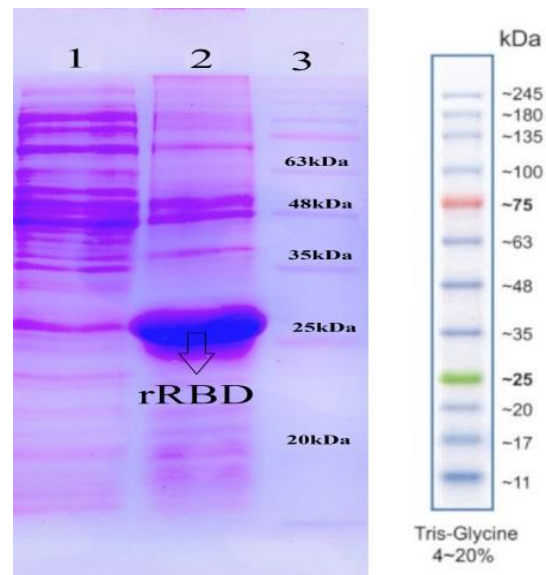
### ۴. نتیجه‌گیری

بیماری همه‌گیر کرونا (COVID19) یک تهدید جهانی است که توسط سندروم حاد تنفسی SARS-COV-2 ایجاد می‌شود. به‌منظور کاهش میزان تلفات ناشی از این ویروس واکنش‌ها نقش به‌سزایی ایفاء می‌کنند. بیوانفورماتیک یک علم بین رشته‌ای است که از روش‌های شبیه‌سازی محاسباتی برای تجزیه و تحلیل داده‌های بیولوژیکی و پیش‌بینی شبکه‌های تنظیم ژن استفاده می‌کند. از این علم با موفقیت برای تحقیقات واکنش، از جمله

پلاسمید نوترکیب دربردارنده ژن سنتزی، تولید پروتئین نوترکیب با وزن مولکولی حدود ۲۸ کیلو دالتون مشاهده و در مقایسه با نمونه القاء نشده بسیار مناسب بوده است (شکل ۸).



شکل ۷. تأیید همسانه سازی ژن در پلاسمید pET28a به روش PCR. ستون ۱) محصول PCR پلاسمیدهای تخلیص شده واجد ژن، ستون ۲) محصول PCR پلاسمیدهای تخلیص شده فاقد ژن و ستون ۳) نشانگر اندازه DNA (DNA Ladder Mix)



شکل ۸. بررسی بیان کاست ژنی pET28a(+)-RBD روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد: ردیف ۱\_ نمونه القاء نشده با IPTG استخراج شده در بافر لیز کننده حاوی اوره ۸ مولار، ردیف ۲\_ نمونه القاء شده با IPTG استخراج شده در بافر لیز کننده حاوی اوره ۸ مولار، ردیف ۳\_ نشانگر مولکولی پروتئین

- مراحل پیش‌بالینی، بالینی و پس از واکسن استفاده شده است.
- در تحقیق یانگ و همکاران، نظر به اینکه پروتئین RBD می‌تواند ایمنی‌زایی مؤثر ایجاد کند، تمام توالی RBD را که ۳۳ کیلودالتون هست را بیان و تخلیص کردند [۲۹]. در تحقیق حاضر با توجه به مطالعات بیوانفورماتیک بخشی از پروتئین RBD که دارای قدرت آنتی‌ژنیک کمتری بود در طراحی حذف گردید. در تحقیقی دیگر جوکیچ و همکاران به بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب نوکلئوکسپید (N) به‌عنوان یک کاندید ایمونوژن پرداختند. نتایج القای بیان در پژوهش جوکیچ ضعیف‌تر از پژوهش حاضر بود [۳۰]. مطالعات انجام شده نشان داد که سازه RBD سمی و آلرژی‌زا نیست و همچنین قدرت آنتی‌ژنیسیته بالایی دارد همچنین سازه مورد نظر دارای اپی‌توپ‌های خطی و فضایی سلول‌های B می‌باشد که می‌تواند پاسخ ایمنی مناسبی در سلول میزبان القاء کند. بر اساس پژوهش‌های آزمایشگاهی صحت طراحی سازه تأیید شده و میزبان باکتریایی قادر به بیان پروتئین نوترکیب می‌باشد و به نظر می‌رسد این پروتئین می‌تواند به‌عنوان یک کاندید واکسن در تحقیقات بعدی مورد ارزیابی قرار گیرد.
- ### ۵. مراجع
- [1] Zhang, J.; Zeng, H.; Gu, J.; Li, H.; Zheng, L.; Zou, Q. "Progress and Prospects on Vaccine Development Against SARS-CoV-2"; *Vaccines (Basel)* 2020, 8, 153.
  - [2] Hussain, A.; Kaler, J.; Tabrez, E.; Tabrez, S.; Tabrez, S. M. "Novel COVID-19: A Comprehensive Review of Transmission, Manifestation, and Pathogenesis"; *Cureus*, 2020, 12.5.
  - [3] Shereen, M. A.; Khan, S.; Kazmi, A.; Bashir, N.; Siddique, R. "COVID-19 Infection: Origin, Transmission, and Characteristics of Human Coronaviruses"; *J. Adv. Res.* 2020, 24, 91.
  - [4] Weiss, S. R.; Navas-Martin, S. "Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus"; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005, 69, 635-664.
  - [5] Farnoosh, G.; Alishiri, G.; Hosseini Zijoud, S. R.; Dorostkar, R.; Jalali Farahani, A. "Understanding the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Coronavirus Disease (COVID-19) Based on Available Evidence - A Narrative Review"; *J. Military Medicine* 2020, 22, 1-11.
  - [6] Shereen, M. A.; Khan, S.; Kazmi, A.; Bashir, N.; Siddique, R. "COVID-19 Infection: Origin, Transmission, and Characteristics of Human Coronaviruses"; *J. Adv. Res.* 2020, 24, 91.
  - [7] Nazarian, S.; Gargari, S. L. M.; Rasooli, I.; Amani, J.; Bagheri, S.; Alerasool, M. J. J. O. M. M. "An in Silico Chimeric Multi Subunit Vaccine Targeting Virulence Factors of Enterotoxigenic Escherichia Coli (ETEC) with Its Bacterial Inbuilt Adjuvant"; *J. Microbiol. Methods* 2012, 90, 36-45.
  - [8] Daugelaite, J.; O'Driscoll, A.; Sleator, R. D. J. I. S. R. N. "An Overview of Multiple Sequence Alignments and Cloud Computing in Bioinformatics"; *Int. Scholarly Res. Not.* 2013.
  - [9] Manikyam, H. K.; Joshi, S. K. J. J. O. P. "Whole Genome Analysis and Targeted Drug Discovery Using Computational Methods and High Throughput Screening Tools for Emerged Novel Coronavirus (2019-nCoV)"; *J. Pharm. Drug Res.* 2020, 3, 341.
  - [10] Puigbo, P.; Romeu, A.; Garcia-Vallve, S. J. N. A. R. "HEG-DB: a Database of Predicted Highly Expressed Genes in Prokaryotic Complete Genomes under Translational Selection"; *Nucleic Acids Res.* 2007, 36, D524-D527.
  - [11] Srivastava, S.; Verma, S.; Kamthania, M.; Kaur, R.; Badyal, R. K.; Saxena, A. K.; Shin, H. J.; Kolbe, M.; Pandey, K. C. J. B. "Structural Basis to Design Multi-Epitope Vaccines Against Novel Coronavirus 19 (COVID19) Infection, the Ongoing Pandemic Emergency: an In Silico Approach"; *BioRxiv*, 2020.
  - [12] Madhugiri, R.; Karl, N.; Petersen, D.; Lamkiewicz, K.; Fricke, M.; Wend, U.; Scheuer, R.; Marz, M.; Ziebuhr, J. J. V. "Structural and Functional Conservation of Cis-Acting RNA Elements in Coronavirus 5'-terminal Genome Regions"; *Virology* 2018, 517, 44-55.
  - [13] Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. J. T. P. P. H. "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server"; *The Proteomics Protocols Handbook*, 2005, 571-607.
  - [14] Hebditch, M.; Carballo-Amador, M. A.; Charonis, S.; Curtis, R.; Warwicker, J. J. B. "Protein-Sol: A Web Tool for Predicting Protein Solubility from Sequence"; *Bioinformatics* 2017, 33, 3098-3100.
  - [15] Ceroni, A.; Passerini, A.; Vullo, A.; Frascioni, P. J. N. A. R. "DISULFIND: A Disulfide Bonding State and Cysteine Connectivity Prediction Server"; *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, W177-W181.
  - [16] Smith, T. R. F.; Patel, A.; Ramos, S.; Elwood, D.; Zhu, X.; Yan, J.; Gary, E. N.; Walker, S. N.; Schultheis, K.; Purwar, M.; Xu, Z.; Walters, J.; Bhojnagarwala, P.; Yang, M.; Chokkalingam, N.; Pezzoli, P.; Parzych, E.; Reuschel, E. L.; Doan, A.; Tursi, N.; Vasquez, M.; Choi, J.; Tello-Ruiz, E.; Maricic, I.; Bah, M. A.; Wu, Y.; Amante, D.; Park, D. H.; Dia, Y.; Ali, A. R.; Zaidi, F. I.; Generotti, A.; Kim, K. Y.; Herring, T. A.; Reeder, S.; Andrade, V. M.; Buttigieg, K.; Zhao, G.; Wu, J. M.; Li, D.; Bao, L.; Liu, J.; Deng, W.; Qin, C.; Brown, A. S.; Khoshnejad, M.; Wang, N.; Chu, J.; Wrapp, D.; McLellan, J. S.; Muthumani, K.; Wang, B.; Carroll, M. W.; Kim, J. J.; Boyer, J.; Kulp, D. W.; Humeau, L.; Weiner, D. B.; Broderick, K. E. "Immunogenicity of a DNA Vaccine Candidate for COVID-19"; *Nat. Commun.* 2020, 11.1, 1-13
  - [17] Tavakoli, A.; Vahdat, K.; Keshavarz, M. "Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): An Emerging Infectious Disease in the 21st Century"; *ISMJ*, 2020, 22.6, 432-450.
  - [18] Coutard, B.; Valle, C.; de Lamballerie, X.; Canard, B.; Seidah, N. G.; Decroly, E. "The Spike Glycoprotein of the New Coronavirus 2019-nCoV Contains a Furin-Like Cleavage Site Absent in CoV of the Same Clade"; *Antiviral Res.* 2020, 176, 104742.
  - [19] Thanh Le, T.; Andreadakis, Z.; Kumar, A.; Gómez Román, R.; Tollefsen, S.; Saville, M.; Mayhew, S. "The COVID-19 Vaccine Development Landscape"; *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020, 19.5, 305-306.
  - [20] Wertheim, J. O.; Chu, D. K. W.; Peiris, J. S. M.; Kosakovsky Pond, S. L.; Poon, L. L. M. "A Case for the Ancient Origin of Coronaviruses"; *J. Virol.* 2013, 87.12, 7039-7045.
  - [21] Giandhari, J.; Pillay, S.; Wilkinson, E.; Tegally, H.; Sinayskiy, I.; Schuld, M.; Lourenco, J.; Chimukangara, B.; Lessells, R.; Moosa, Y.; Gazy, I.; Fish, M.; Singh, L.; Khanyile, K.S.; Fonseca, V.; Giovanetti, M.; Alcantara, L.C.; Petruccione, F.; de Oliveira, T. "Early Transmission of SARS-CoV-2 in South Africa: An Epidemiological and Phylogenetic Report"; *Int. J. Infect. Dis.* 2020, 103, 234-241.



- [27] Chen, H. Z.; Tang, L. L.; Yu, X. L.; Zhou, J.; Chang, Y. F.; Wu, X. J. I. D. O. P. "Bioinformatics Analysis of Epitope-Based Vaccine Design Against the Novel SARS-CoV-2"; *Infect. Dis. Poverty* 2020, 9, 1-10.
- [28] Can, H.; Köseoğlu, A. E.; Alak, S. E.; Güvendi, M.; Döşkaya, M.; Karakavuk, M.; Gürüz, A. Y.; Ün, C. J. S. R. "In Silico Discovery of Antigenic Proteins and Epitopes of SARS-CoV-2 for the Development of a Vaccine or a Diagnostic Approach for COVID-19"; *Sci. Rep.* 2020, 10, 1-16.
- [29] Yang, J.; Wang, W.; Chen, Z.; Lu, S.; Yang, F.; Bi, Z.; Wei, X. "A Vaccine Targeting the RBD of the S Protein of SARS-CoV-2 Induces Protective Immunity"; *Nature* 2020, 586, 572-577.
- [30] Djukic, T.; Mladenovic, M.; Stanic-Vucinic, D.; Radosavljevic, J.; Smiljanic, K.; Sabljic, L.; Velickovic, T. C. "Expression, Purification and Immunological Characterization of Recombinant Nucleocapsid Protein Fragment from SARS-CoV-2"; *Virology* 2021, 557, 15-22.
- [22] Magnan, C. N.; Zeller, M.; Kayala, M. A.; Vigil, A.; Randall, A.; Felgner, P. L.; Baldi, P. J. B. "High-Throughput Prediction of Protein Antigenicity Using Protein Microarray Data"; *Bioinformatics* 2010, 26, 2936-2943.
- [23] Chukwudozie, O. S.; Duru, V. C.; Ndiribe, C. C.; Aborode, A. T.; Oyebanji, V. O.; Emikpe, B. O. J. B.; Insights, B. "The Relevance of Bioinformatics Applications in the Discovery of Vaccine Candidates and Potential Drugs for COVID-19 Treatment"; *Bioinf. Biol. Insights* 2021, 15, 11779322211002168.
- [24] Sadat, S. M.; Aghadadeghi, M. R.; Yousefi, M.; Khodaei, A.; Larijani, M. S.; Bahramali, G. J. M. B. "Bioinformatics Analysis of SARS-CoV-2 to Approach an Effective Vaccine Candidate Against COVID-19"; *Mol. Biotech.* 2021, 63, 389-409.
- [25] Dangi, M.; Kumari, R.; Singh, B.; Chhillar, A. K. "Advanced in Silico Tools for Designing of Antigenic Epitope as Potential Vaccine Candidates Against Coronavirus"; *Bioinformatics* 2018, 329-357.
- [26] Yazdani, Z.; Rafiei, A.; Yazdani, M.; Valadan, R. J. I.; Resistance, D. "Design an Efficient Multi-Epitope Peptide Vaccine Candidate Against SARS-CoV-2: An in Silico Analysis"; *Infect. Drug Resist.* 2020, 13, 3007.

