

آنالیز، تعیین توالی و بررسی بیوانفورماتیکی فیوژن پروتئین OmpL1-LipL41 لپتوسپیرا به عنوان یک کاندید نوین در تولید واکسن لپتوسپیروزیس

• ملیسا اقبال

گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
• فرشته قندهاری (نویسنده مسئول)

گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
• پژواک خاکی

گروه میکروبیولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات
کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران
• مرتضی تقی‌زاده

گروه واکسن‌های انسانی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان
تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران
• مجید تیبانیان

گروه ایمونولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات
کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۱۰-۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱-۰۱-۰۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰-۱۲-۲۱ تاریخ انتشار: ۱۴۰۲-۰۴-۰۱
Email: fe_gh_2010@yahoo.com



چکیده

در سال‌های اخیر با توجه به پیشرفت‌های انجام شده در حوزه طراحی واکسن، مطالعات بیوانفورماتیک انجام شده بر روی باکتری لپتوسپیرا دستخوش تغییرات و پیشرفت‌های قابل توجهی شده است. هدف از این مطالعه طراحی یک پروتئین فیوژن بر مبنای پروتئین‌های سطحی OmpL1 و LipL41 است که دارای ساختار محافظت شده‌ای در طی زمان بوده‌اند. با توجه به مطالعات میدانی قبلی، پروتئین‌های مورد نظر مورد بررسی قرار گرفته و پروتئین فیوژن OmpL1-LipL41 انتخاب شد. پس از بررسی خصوصیات شیمیایی پروتئین‌های مورد نظر با استفاده از سرورهای مناسب، ساختار اولیه پروتئین فیوژن تعیین شد و در نهایت این پروتئین درون وکتور +PET32a و در بین دو ناحیه آنزیمی HindIII و BamHI قرار داده شد. نتایج حاصله نشان داد که وزن پروتئین مورد نظر ۷۳ کیلودالتون بوده و دارای ۲۰۹۷ جفت باز و ۶۱۰ اسید آمینه می‌باشد. pH ایزوالکتریک پروتئین فوق ۷ و میزان حلالیت آن در سیستم پروکاریوتی ۱۰۰ درصد است. در نهایت و با توجه به داده‌های فوق پیش‌بینی می‌شود که ساختار کانستراکت طراحی شده، دارای خصوصیات ایمونوژنیک قابل قبولی می‌باشد و می‌توان از آن به میزان قابل قبول و موفقیت آمیزی در سیستم‌های پروکاریوتی بیان نمود و جهت مطالعات ایمنی‌زایی باکتری لپتوسپیرا به عنوان یک کاندید نوین در تولید واکسن لپتوسپیروزیس و در طراحی و ساخت کیت‌های تشخیصی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: پروکاریوت، لپتوسپیرا، وکتور، پروتئین سطحی، omp1 lip41

- Veterinary Researches & Biological Products No 139 pp: 128-138

Bioinformatic Analysis and Sequencing of OmpL1-LipL41 Leptospiral Fusion Protein as a New Candidate for Leptospirosis Vaccine

By: Eghbal, M., Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. Ghandehari, F., Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. Khaki, P., (Corresponding Author) Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Taghizadeh, M., Department of Human Vaccine, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Tebianian, M., Department of Immunology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2021-12-30 Accepted: 2022-03-29

Received: 2022-03-12 Accepted: 2023-07-22

Email: fe_gh_2010@yahoo.com

In recent years, due to advances in vaccine design, bioinformatic studies on *Leptospira* have undergone significant changes and advances. The aim of this study was to design a fusion protein based on OmpL1 and LipL41 surface proteins that have a conserved structure over time. Based on the previous field studies, the target proteins were examined and the OmpL1-LipL41 fusion protein was selected. After examining the chemical properties of the target proteins using appropriate servers, the initial structure of the fusion protein was determined and finally this protein was placed in the PET32a+ vector between the two enzymatic regions of HindIII and BamHI. The results revealed that the protein weighs 73 kDa and has 2097 bp and 610 amino acids. The isoelectric pH of the above protein is 7 and its solubility degree in the prokaryotic system is 100%. Finally, according to the above data, it is predicted that the designed construct structure has acceptable immunogenic properties and can be expressed to an acceptable and successful extent in prokaryotic systems and used for immunogenicity studies of *Leptospira* as a new candidate in the production of leptospirosis vaccine and in the design and manufacture of diagnostic kits.

Key words: Prokaryote, Vector, Surface Protein

مقدمه

لپتوسپیروزیس یک بیماری زئونوز است که در سال ۱۸۸۶ توسط آدولف ویل شرح داده شد. جنس لپتوسپیرو متعلق به خانواده لپتوسپیروسه از راسته اسپروکتالهاست و بر پایه روش‌های هیبریداسیون DNA، به ۲۰ گونه مختلف تقسیم شده است، همچنین بر اساس روابط آنتی‌ژنی‌شان به سرووارهای مختلف گروه‌بندی می‌شوند (۲۴). این جنس شامل گونه‌های پاتوژن مثل *Leptospira interrogans* و گونه‌های ساپروفیت مثل *Leptospira biflexa* می‌باشد (۲۲). با توجه به متغیر بودن علائم کلینیکی تشخیص لپتوسپیروزیس مشکل بوده و با استفاده از تست‌های مختلف آزمایشگاهی قابل جداسازی است. برای تشخیص این بیماری روش‌های سرولوژیکی مختلفی از جمله ELISA/MAT به کار می‌رود (۵). تست ELISA با استفاده از انواع مختلفی از آنتی‌ژن‌ها مثل OmpL1، LigA طراحی شده است. این تست، نیاز به کشت نداشته و به صورت اتوماتیک انجام می‌گردد. پروتئین مهم غشای خارجی لپتوسپیرو یعنی OmpL1، به پروتئین‌های خارج سلولی تنظیمی با آهن، وابسته است. که آنتی‌ژن سطحی و اصلی موجود در غشای خارجی لپتوسپیرو می‌باشد و منحصر به گونه‌های

پاتوژن است. این پروتئین شدیداً ایمونوژنیک است (۱۴). مونومرهای ۲۱-۲۷۲ در OmpL1، از یک هسته Jelly-roll fold ساخته شده‌اند. داده‌های اسپکتروسکوپی ثابت کرده‌اند که OmpL1 ویژگی اتصال به کلسیم دارد. اتصال به کلسیم یک افزایش معنی‌دار در پایداری در برابر گرما در این پروتئین ایجاد می‌کند (۳، ۷). LipL41، سومین پروتئین حفاظت شده و فراوان است که در سطح لپتوسپیرو در سرووارهای بیماری‌زا حفظ شده است اما در گونه‌های ساپروفیت یا غیربیماری‌زا وجود ندارد (۱۰). ثبات ژنتیکی ژن lipL41 و قدرت ایمنی‌زایی بالای OmpL1 به قابلیت استفاده از این ژن برای تهیه واکسن نوترکیب موثر و کارآمد بر علیه لپتوسپیروزیس اشاره می‌کند (۱۰، ۱۱). با توجه به خصوصیات فوق‌الذکر و نیز ایمونوژیک بودن این آنتی‌ژن و حضور انحصاری آن در لپتوسپیروهای بیماری‌زا، لازم است که محصول این ژن جهت استفاده در واکسن نوترکیب و یا به منظور عامل تشخیصی موثر در روش‌های سرولوژیکی مانند ELISA مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به اینکه که تاکنون هیچ مطالعه‌ای مبنی بر بیان ژن OmpL1 در سرووارهای واکسینال و بومی لپتوسپیرو داخلی انجام نشده است (۹). شناسایی، توالی‌یابی، بیان و بررسی ایمنی‌زایی این

فوق باعث بیان مقادیر فراوانی از mRNA ژن مورد نظر و در نتیجه بیان انبوه پروتئین نوترکیب می‌شود. با استفاده از کلونینگ مقادیر کافی از آن ژن خاص به صورت خالص را با استفاده از برش توسط آنزیم محدودکننده تولید می‌کنیم. بررسی توالی omp11 lip141 در بانک ژنی NCBI بر مبنای سرروار هارجو جستجو شد و در ژنوم کامل این سرروار ژن مورد نظر بررسی شد (۱۶). ژن omp11 lip141 یک قطعه ۲۰۹۷ جفت بازی می‌باشد که در تمام سرروارهای پاتوژن باکتری لپتوسپیروا به صورت حفاظت شده وجود دارد. ژن استخراج شده از پایگاه NCBI با ژنهای توالی یابی شده omp11 از سرروارهای مختلف موجود در موسسه سرم و واکنش سازی رازی در سرور NCBI Blast مقایسه شدند و ژن lip141 یک قطعه ۱۱۶۷ جفت بازی می‌باشد که روی کروموزوم با فاصله ۲۸ bp در بالادست یک ژن کوچک بنام lep (۳۳۳ bp) قرار دارد. هر دو ژن منحصر در سویه‌های بیماری‌زای لپتوسپیروا وجود دارند و در سویه‌های غیربیماری‌زا حضور ندارند (۴). omp11 lip141 که یک قطعه ۲۰۹۷ جفت بازی است که دارای وزن مولکولی ۷۳ کیلودالتون می‌باشد و در تشکیل یک زیر مجموعه‌ی کوچکی از آنتی‌ژن‌های پروتئینی بعنوان حفاظت علیه فاز حاد بیماری ایجاد می‌شود (۲۱).

بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی توالی اسید آمینه‌ای

خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین نوترکیب از جمله pH ایزوالکتریک، وزن مولکولی، نیمه عمر آنتی‌ژن و... بررسی شد. بدین منظور از سرور ProtParam استفاده شد (۲۵). توالی اسیدهای آمینه‌ای را در کادر مورد نظر وارد و کلید 'compute parameter's' را انتخاب کرده و نتایج در فایلی متنی نشان داده شد.

بررسی شباهت توالی‌های اسید آمینه‌ای به وسیله ابزار Blastp

بررسی شباهت توالی‌های اسید آمینه‌ای پروتئین مورد نظر با توالی‌ها

آنتی‌ژن‌ها ضرورت دارد. در این مطالعه به آنالیز، تعیین توالی و بررسی بیوانفورماتیکی فیوژن پروتئین omp11 lip141 لپتوسپیروا به عنوان یک کاندید نوین در تولید واکسن لپتوسپیروزیس با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

استفاده از سیستم‌های بیانی مورد استفاده در تولید پروتئین نوترکیب به عوامل متعددی وابسته است که از این دست می‌توان به رشد سلول میزبان، میزان بیان پروتئین نوترکیب، بیان در سطح داخل یا خارج سلولی و تغییرات پس از ترجمه و همچنین به خصوصیات ساختاری پروتئین مورد نظر اشاره کرد. رایج‌ترین سیستم بیانی که امروزه از آن در مقیاس آزمایشگاهی استفاده می‌شود سیستم PET می‌باشد (۲). این سیستم دارای پروموتورهای هیبرید، MCS برای قرار گرفتن چند ژن در کنار هم و دیگر دستکاری‌های ژنتیکی در جهت اهداف مختلف بیان می‌باشد. در این سیستم ژن هدف در پایین دست پروموتور late از باکترِوفاژ T_p قرار می‌گیرد. برای بیان این ژن، این سیستم باید درون میزبانی قرار گیرد که توسط قطعه فازی DE_p لیزوژنه شود. قطعه DE_p باعث کدشدن RNA polymerase T_p و تحت کنترل پروموتور LacUV₅ بوده و به وسیله IPTG القا می‌گردد (۱۳، ۱۹). از طرفی دیگر ژن LacI که یک کپی از آن در ژنوم میزبان و یک کپی از آن در PET وجود دارد، LacI repressor را تولید می‌کند که هم پروموتور LacUV₅ میزبانی و هم پروموتور هیبریدی Lac/T_p پلاسمیدی را سرکوب می‌کند. پس وقتی IPTG به محیط اضافه می‌شود، LacI را از هر دو اپراتور Lac خارج و به خود می‌چسباند، و در نتیجه T_p polymerase RNA بیان شده و RNA پلی‌مراز حاصله ژن موجود در پروموتور هیبریدی را بیان می‌کند (۱۹، ۲۰). مناسب‌ترین میزبان برای سیستم بیانی PET باکتری *E. Coli BL21* می‌باشد که هم قطعه DE_p و هم پروموتور LacUV₅ را در ژنوم دارد. سیستم بیان‌کننده

شکل ۱-۲- بررسی قطعه ژنی با سرور Neb Cutter.

برش نقش اساسی ایفا می‌کنند. بنابراین توالی این جایگاه‌های برشی در طراحی پرایمر اختصاصی با حساسیت بالایی باید انجام گیرد. در ابتدا توالی ژن omp11 lip141 را از نظر جایگاه‌های برشی بررسی شد. برای این مرحله از کار ابزارهای مختلفی وجود دارند. در این مرحله از سرور Neb Cutter استفاده شد. به این صورت که توالی نوکلئوتیدی ژن مورد نظر را در جایگاه تعیین شده مطابق با شکل ۱-۲ وارد و تایید می‌کنیم (۱۱).

انتخاب توالی آنزیم‌های برشی مناسب

تفاوت در آنزیم‌های برشی باعث شده بر روی جایگاه‌هایی با اندازه‌های متفاوت اثر بگذارند. برش این آنزیم‌ها هم به صورت انتهای صاف و هم انتهای چسبنده می‌باشد. در مراحل کلونینگ استفاده از آنزیم‌های ایجاد کننده انتهای چسبنده در اکثر اوقات باعث نتیجه بهتر در اتصال قطعه به پلازمید می‌شود.

انتخاب جایگاه‌های آنزیم‌های برشی بر اساس ساختار منطقه MCS پلازمید انتخابی و در دسترس بودن آنزیم‌های آن تعیین شد. با توجه به نتایج حاصل از سرور Neb Cutter، جایگاه آنزیم‌های برشی مطابق با شکل ۲-۲ BamHI در ناحیه ۵' و HindIII در ناحیه ۳' به عنوان انتخاب ایده‌آل در نظر گرفته شد (۱۱).

سرورهای بومی (بیشترین فراوانی) با استفاده از ابزار Blastp که زیر مجموعه NCBI می‌باشد انجام شد. این پروتئین به صورت کاملاً حفاظت شده‌ای در سرورهای مختلف وجود دارد. شباهت توالی اسید آمینه‌ای این پروتئین در سرور هاردجو با سرورهای کانیکولا، پومونا، گریپتوفوزا، ایکتره‌موراژیه مقایسه شد (۶).

استفاده از سرور Neb cutter جهت بررسی جایگاه‌های برشی ژن

omp11 lip141

در مراحل کلونینگ و اتصال قطعه مورد نظر به وکتور بیانی جایگاه‌های

BamHI	HindIII
5'... G GATCC...3'	5'... A AGCTT...3'
3'... C CTAGG...5'	3'... T TCGAA...5'

شکل ۲-۲- نحوه برش آنزیم های BamHI و HindIII.

>omp11lip141

```
GGATCCATGCGTAAACTGAGCAGCCTGATTACCGTTCCTGGTTCGCTGATTTATCTGGGCAACTGCGCGGGCACCCTGGA
CGTGGAAATACCCGGTTTTCCCGAAGGACAAAGAGGGTCTGTCGCTGCAGAAGTTCCTGGGCACCATCCGTAACGTGGGGC
TGCGCGTTGAACCGCCGAAGAAAAGCCTGTGGGAGGCGATCTTCGGTGAAGGCAGCAGCTTTATTGACCAAATGCCGAGC
AAGGTGTTGAGGCGTTTGTATAAGGAAAGCTACTATAAACTGACCGACCGAGCAAACGTGCGGACATCCTGAACGAGGC
GACCTGAGCCTGACCGGATTACCAAGAGCCGTGCCGAAAATCGGTAACCTGATTGGCGCGGAAGCGCTCTGTACATTGGT
TATCAGAAAACCGTATAACCGAGTGCAGCACCAGAAACAAGATCGATGCGGTGGCGGGCGGGTCTGAAAAGTGGCGGGTTTTGC
GGCAGCATGGCGACCGGTAAGAGGTGAACACCGGCAACGAACCGGTGAGAAAACCGACCGGTGTTTCGTATGATGCTGAT
CCCGCTGGATGCGACCCGATAAAGGTGAAAACCGGCGAAGTTAAGAAAAGCGGTGGTTAGCAGCCCGGAAAAATCTTCAAC
AGCGTTGGTAACCTGGAGTGCACCGAGCATTCTGGAAGCTTTGGTCAAGGCCCTGGATGAAGCTGCGGCGTACATCAAGGGT
CGTGAGCCCGATCGTGAAGAACCGAGCGTATTAAGGTGTTTCGTTAAAGACGAAGATGAGGAAGTTAAGGAGCTGCTGCAGG
AAGGTTATGAGGAAATTGTGGCGAAACCCCGAGCTTCAAGAAAAGCGAAAGAGGCGTGGGAAAAAGCGACAAGAAAAGCGA
AGGGTCAAAGCTGGGGCGCAAAGCGAACCTGGCACCTACTATTTTCAGCGTGGGTGATTTTGAAGAGCATCAAACCTGT
ACGGGAAGCGATGAAGCTGAAAGACGCGGATAAGAGCTATCTGCGTGAAGCTGTAACCGTGTGGAAGCGACCTTCGCGG
TTGACGAGAGCAACGCGAAGAATTCTCGAGATGATTTCGTAACATGAGCAAAGTTCGTTTCGCGCTGGCGTGGTTTTAG
CAGCGCGAAAAGCTGAGCGCGAAGAGCTACGCGATCTGGGTTTTCGGCCTGCAGCTGGACCTGGGTCAACTGGGTGGCA
CCATTACAAAAGACGGTCTGGATGCGGCGACCTACTATGGCCCGGTGCGTAGCACAAACACCTGCACCGTTAACGCGAACGA
TCCGACCTGCGTGCAGAACCCGGCAAACCGGCGGGCGAGGGCAACTATGTGGGTGTTGGCACCCGCTCGTGCGATTGCGG
CGAAAACCGTCTGATTACCCCTGGACCGTACCACCGGTGCATCATTAACGCGCGTAGCACCAAGGGTGGATGGTGGGTG
GCAACCTATGGTTGGTTACGAGAGCGATTTTGGCAAAATTTCTTTTGGCGTGTGGGCGGAATACACCCAAAAGATCAGC
GGTGGCATTACCAAAGCGGACATCGGGTCTGAACATTGTGGATATGACCTGGGGCTTACGCGCGATCGTGATCCGGCGAC
CGTTGGCATCAAGCTGAACGTGACCGAGGACGCGCGGTTACATGGGTGCGGGCCTGAACTATTTTAAACGGTGGCTGGA
GCCTGAACGATGAACAACATCAAAGGTGGCCACGATATCTGGCGCGGCGGGTGTGCCAGCATTGCGAACCTGCTGGC
GGATGGCACCGATCCGATCACACCCCTGAACACATTCGTTCCGTCGCGACCGGTATCGCGCCGAACTTTCTGATTGGCAC
CCAGGCGCGTGTGACCGATAAGGGTCACGTTTTCTGGAGCTGAAACCATCATGAGCGCGCGTACAGCGTGGGCAAAA
CCAAAGCATGTGGCGCGAGCACCCCTGGCGCGTTTTCCGACCTATCCGATGTGGTGGGCGCCAGATTACCGTTTTGGT
TACAAGTATGAACTGAAGCTT
```

شکل ۱-۳- توالی استخراج شده ژن omp11 lip141 از بانک ژنی NCBI.

ایجاد می‌کنند بنابراین بررسی قالب خوانش دارای اهمیت فراوان است. با استفاده از سرور ExPASy توالی مورد نظر از نظر ORF بررسی شد (شکل ۲-۳). توالی ۶۲۰ اسید آمینه‌ای ترجمه شده قطعه نوکلئوتیدی ژن omp11 lip141 مشخص شد. بدین صورت Frame‌های قابل ترجمه در توالی با رنگ قرمز مشخص می‌شوند. بر اساس این توالی ترجمه شده کل قطعه ژنتیکی مورد نظر قابلیت تبدیل به پروتئین نوترکیب را دارد (۱۸).

بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی آنتی‌ژن به صورت In Silico
در اکثر مطالعات، قبل از انجام مراحل آزمایشگاهی در فضای In Silico

نتایج

استخراج توالی ژن omp11 از بانک ژنی NCBI

توالی نوکلئوتیدی ژن omp11 مطابق با شکل ۱-۳ که دارای ۲۰۹۷ جفت باز با کدون ابتدایی ATG و کدون پایانی TAA از بانک ژنی NCBI استخراج شد. از این توالی در مرحله بعدی از جمله طراحی پرایمر اختصاصی استفاده می‌شود.

نحوه قرارگیری ORF در ژن omp11 lip141

از آنجایی که قالب‌های خواندن متفاوت محصولات پروتئینی متفاوت

```
GSMRKLSSLITVLLIYLGNCAATVDVEYYPVFPKDKTEGRALQKFLGTIRNVGLAVEPPKSLWEAIFGEGSSFIDQMPSKVFEAFDKES
YYKLTDLKSRADILNEATLSLTGITKSRKIGNLIGAEAILYIGYQKPYTECSTENKIDAVAAGLKVAGFAASMATGKEVNTGNPEVSKP
TGVRMMLIPLDATLIKVETGEVKKAVVSSPAKIFNSVGNLECP SILDSFGQLDEAAAYIKGRLSPIVKTERIKVFVKDEDEEVKELLQEG
YEEIVGETPSFKKAKEAWEKADKKAKGQSWGAKANLATYFVSGDFEKSILKYEEAMKLDADKSYLRELKRKVEATFAVDESNAKE
FLEMIRNMSKVLFFALAVVFSSAESLSAKSYAIVGFGLQLDLGQLGGTITKDGLDAATYYPVRSNTNCTVNANDPTCVQNPSKPAGEGN
YVGVGTRRAIAAENRLITLDRRTGGIINARSTKGMVGGNLMVGYESDFGKYFFWRVAAEYTKISGGITKADIAGLNIVDMTWGFSAI
VIPATVGIKLNVIEDAAVYMGAGLNYFNNGWSLNGMNNIKGGHDILAAAGVTSIANLLADGTDPIITREHIRFRATGIAPNFLIGTQAR
VTDKGHVFFLEETIMSAAYSVGKTSIGGASTLAPFPTYPIVGGQIYRFGYKYELKL
```

شکل ۲-۳- توالی اسید آمینه‌ای در قالب ORF.

Number of amino acids: 2049

Molecular weight: 164232.67

Theoretical pI: 4.91

Formula: C₅₈₉₅H₉₇₄₃N₂₀₄₉O₂₄₅₆S₄₈₇

Total number of atoms: 20630

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is G (Gly).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 40.81

This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 24.30

Grand average of hydropathicity (GRAVY): 0.765

شکل ۳-۳- سرور ProtParam.

NCBI با سروار هارگو بومی تعیین توالی شده ۱۰۰٪ می‌باشد.

بررسی سیگنال پپتید و پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین

با توجه به توالی اسید آمینه‌ای وارد شده احتمال وجود سیگنال پپتید استاندارد در ۲۳ اسید آمینه ابتدایی وجود دارد و جایگاه برشی بین اسید آمینه ۲۳ و ۲۴ تعیین شده است (شکل ۳-۵). با استفاده از سرور Swissmodel و ابزار CLC Workbench ساختار سه بعدی پروتئین پیش‌بینی شد (شکل ۳-۶).

میزان آنتی‌ژنیک و آلرژن بودن پروتئین در محیط In silico

بر اساس نتایج به دست آمده از دو سرور AllerTOP و vaxigen محصول نهایی آنتی‌ژنیک بوده و خاصیت تحریک سیستم ایمنی را دارد و همچنین

بررسی‌های ابتدایی انجام می‌شود. در این مرحله خواص شیمیایی و فیزیکی آنتی‌ژن omp11 lip141 در سرور ProtParam بررسی شد و نتایج آن به صورت زیر در شکل ۳-۳ می‌باشد (۱۵). وزن مولکولی قطعه مورد نظر حدود ۷۳ kd، Ph ایزوالکتریک حدود ۸/۹ و نیمه عمر تخمین زده شده در سیستم پروکاریوتی حدود ۱۰ ساعت می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده پروتئین stable می‌باشد.

نتیجه بررسی شباهت توالی‌های اسید آمینه‌ای به وسیله ابزار Blastp

بررسی توالی اسید آمینه‌ای پروتئین omp11 استخراج شده از پایگاه NCBI در سروار هارگو با دیگر سروارهای بومی که بیشترین فراوانی را دارند، شکل ۳-۴ نشان دهنده شباهت بالای ۹۰٪ این پروتئین در این سروارها می‌باشد. این شباهت در بین سروار هارگو استخراج شده از

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

		Alignments	Download	GenPept	Graphics	Distance tree of results	Multiple alignment
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	OmpL1 (Leptospira interrogans serovar Hardjo)	628	628	97%	0.0	100%	AFV26098.1
<input type="checkbox"/>	OmpL1 (Leptospira interrogans serovar Canicola)	625	625	96%	0.0	100%	AFV26091.1
<input type="checkbox"/>	OmpL1 (Leptospira interrogans serovar Pomona)	625	625	96%	0.0	100%	AFV26097.1
<input type="checkbox"/>	OmpL1 (Leptospira interrogans serovar Hardjo)	625	625	96%	0.0	100%	AFV26093.1
<input type="checkbox"/>	OmpL1 (Leptospira interrogans serovar Icterohaemorrhagiae)	572	572	97%	0.0	94%	AFV26096.1
<input type="checkbox"/>	OmpL1 (Leptospira interrogans serovar Grippotyphosa)	565	565	96%	0.0	92%	AFV26092.1

شکل ۳-۴- مقایسه omp11 در سروارهای بومی با بیشترین فراوانی.



شکل ۳-۵- نتیجه سیگنال پپتید و پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین.

آلرژن نمی باشد (شکل ۳-۷).

در شکل ۳-۸ جایگاه‌های برشی مربوط به ژن ما مشخص شده است. این به این معنی می‌باشد که آنزیم‌های موجود در این تصویر در صورت استفاده در مراحل کلونینگ باعث برش در قطعه ژنتیکی ما و ایجاد اشکال در بیان ژن و رسیدن به پروتئین نوترکیب می‌شود. در هنگام انتخاب جایگاه برشی و تعبیه آن‌ها در پرایمرها به این نکته توجه شد.

آشکارسازی محصول PCR در ژل آگارز

واکنش در سه دمای مختلف انجام گرفت و بهترین دما ۵۳ درجه سانتی‌گراد بود و طبق انتظار (شکل ۳-۹) در ۲۰۹۷ bp باند مشاهده شد.

نتایج طراحی کانستراکت با استفاده از نرم‌افزار Snap gen

در شکل ۳-۱۰ نمایی از جایگاه ورود سازه ژنی omp11 lip141 به وکتور PET⁺(a)

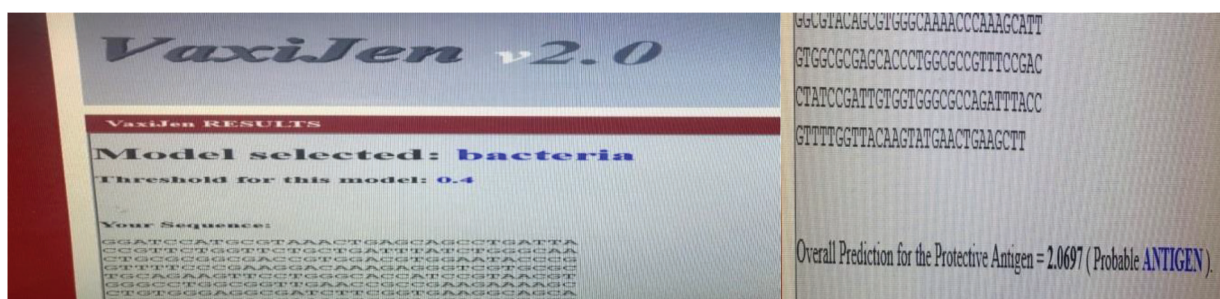
بحث و نتیجه‌گیری

باکتری لپتوسپیرا توانایی زنده ماندن طولانی در آب و خاک با رطوبت



شکل ۳-۶- ساختار سه بعدی بر اساس نرم‌افزار.

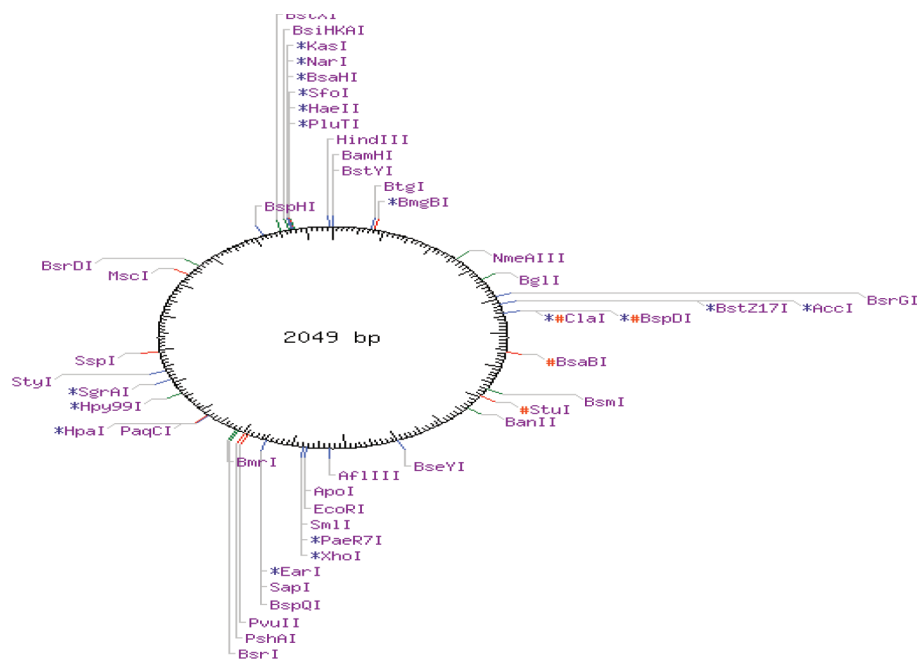
بالا را دارد. تشخیص این باکتری بدون انجام تست‌های آزمایشگاهی برای پزشکان ما مشکل است (۱). در سویه‌های مختلف، سرووارهای مشابه در کنار هم قرار گرفته‌اند. به همین ترتیب، تفاوت‌های زیادی در مناطق حفاظت شده ژن‌های ompL در *L. interrogans* دیده می‌شود که می‌تواند تغییرات ژنتیکی را در طول فرآیند تکاملی به همراه داشته باشد. پروتئین‌های پورین باکتریایی به شدت محافظت می‌شوند و امکان حرکت انتخابی املاح آبدوست را از طریق غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی فراهم می‌کنند (۲۳). ابزار BLAST مسلماً قدرتمندترین و مفیدترین ابزار در بیوانفورماتیک است و برای بررسی عملکردی میلیون‌ها ژن استفاده شده است و بینش قابل توجهی در مورد سیستم‌های بیولوژیکی ارائه می‌دهد. علیرغم واکنش‌های بر علیه لپتوسپیروزیس در برخی نقاط کشور همچنان بیماری وجود دارد. واکنش‌های موجود در حال حاضر، بر اساس باکتری‌های غیرفعال شده کامل ساخته می‌شود که این گونه واکنش‌ها، به علت LPS موجود در آن، برای انسان عوارض جانبی غیرقابل قبولی به همراه داشته و ایمنی ناکامل و کوتاه مدتی را ایجاد می‌کنند که نیاز به ایمن‌سازی تقویت‌کننده سالانه دارند و ایمنی متقاطع در برابر سرووارهای مختلف ایجاد نمی‌کنند (۲۴). با توجه به ناکارآمدی این واکنش‌ها در کنترل لپتوسپیروزیس، استفاده از روش‌های مولکولی مانند PCR و تعیین توالی جهت ساخت یک واکنش نوترکیب موثر و کارآمد جهت کنترل سلامت عمومی جامعه و شناسایی دقیق سرووارهای غالب در هر منطقه حائز اهمیت می‌باشد و تشخیص سریع، دقیق و جداسازی گونه‌های بیماری‌زا از غیر بیماری‌زا بنابراین طراحی کیت‌های تشخیصی بر اساس پروتئین‌های سطحی این باکتری امری ضروری می‌باشد. چندین واکنش پروتئینی نوترکیب لپتوسپیرایی با شیوه‌های بیوتکنولوژیکی مدرن ساخته شده‌اند، که از میان آنها، OMP، لپوپروتئین‌ها، فاکتورهای ویرولانسی، آنتی‌ژن‌های بین گونه‌ای و آنتی‌ژن‌های محافظت شده از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. از این رو شناخت آنتی‌ژن‌های اختصاصی گونه‌های لپتوسپیرا و ارتباط بین لپتوسپیراها و سیستم ایمنی میزبان ضروری به نظر می‌رسد. طبق مطالعه هاکه و همکاران در سال ۱۹۹۹، برای طراحی کنستراکت پروتئین omp11 lip141 از باکتری اشرشیاکلی *DH5α* به عنوان سویه میزبان برای تبدیل DNA نوترکیب استفاده شده بود ولی در این مطالعه به این نتیجه رسیدیم که بهتر است از *E. coli BLR(DE3 pLysS)* برای میزبان پلاسمید بودن استفاده شود.



شکل ۳-۷- نتیجه بررسی جایگاه‌های برشی در توالی ژن omp11.

شبیه‌سازی شد. در مطالعه خاکی و همکاران مشخص شد که در ایران همسانی پروتئین lip141 بین واکسن و سرووارهای بالینی *Canicola* ۱۰۰٪ بود. همچنین تشابه بیش از ۹۵/۹٪ با سایر سرووارهای بیماری‌زا در بانک اطلاعاتی Genbank را نشان داد که نشان‌دهنده حفظ ژنتیکی این ژن است. به دلیل حفظ ژن lip141 در بین سویه‌های مختلف لپتوسپیرا و حضور انحصاری آن در لپتوسپیرا، مشخص شد که ژن شبیه‌سازی شده می‌تواند به عنوان کاندیدای مناسبی برای توسعه روش‌های تشخیصی مانند الایزا و به عنوان کنترل مثبت در PCR تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد و در نتیجه بهتر است حضور این پروتئین را با سایر پروتئین‌های موجود در باکتری لپتوسپیرا مورد مطالعه قرار گیرد تا نتایج مطلوب‌تری در ساخت واکسن و کیت‌های تشخیصی حاصل شود. (۱۲) در طی مطالعه گلاب و همکاران در سال ۲۰۲۰، بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب lip141 در سویه‌های ایرانی را در وکتور pET³⁺ کلون کردند و در اثر شیاکلی *BL21DE3* قرار دادند که در مطالعه ما نیز از وکتور pET³⁺ استفاده شد ولی به عنوان میزبان با توجه به فیوژن بودن پروتئین ما با

(۱۰) در سال ۲۰۲۱ تاکاشی و همکاران، سرووار Copenhagen سویه M۲۰ ژنومی DNA به عنوان الگویی برای تقویت ژن‌های lip141 و lip121 استفاده شد. مکان‌های محدود EcoRI و XhoI به الیگونوکلوئوتیدها اضافه شدند تا توالی‌ها را در وکتور pET³⁺-SUMO (اصلاح‌کننده کوچک یوبیکوئیتین مانند) شبیه‌سازی کنند ولی طبق مطالعه انجام شده با توجه به نتایج حاصل از سرور Neb Cutter و با توجه متفاوت بودن پروتئین ما با مطالعه‌ای که تاکاشی و همکاران انجام دادند، جایگاه آنزیم‌های برشی BamH^۱ در ناحیه ۵' و HindIII در ناحیه ۳' به عنوان انتخاب ایده آل در نظر گرفته شد و توالی‌ها را در وکتور PET +۳۲ شبیه‌سازی کردیم، همچنین تاکاشی و همکارانش از سویه E. coli BL۲۱ DE۳ به عنوان میزبان برای بیان پروتئین استفاده شد که ما از سویه *E. coli (BLRDE3pLysS)* استفاده کردیم. (۱۷) طی مطالعه خاکی و همکاران در سال ۲۰۱۵ پس از استخراج DNA از سرووار، پروتئین lip141 تکثیر و در وکتور pTZ⁵⁷R/T کلون شد که در مطالعه ما با توجه به فیوژن بودن پروتئین lip141 omp11 توالی‌ها را در وکتور PET +۳۲



Main options	Availability	Display	List
New DNA	All commercial	2 cutters	0 cutters
Custom digest	All	3 cutters	1 cutters
View sequence		Linear	All sites
ORF summary			Save all sites
Save project	Minimum ORF length to display: <input type="text" value="100"/> aa.		
Print			

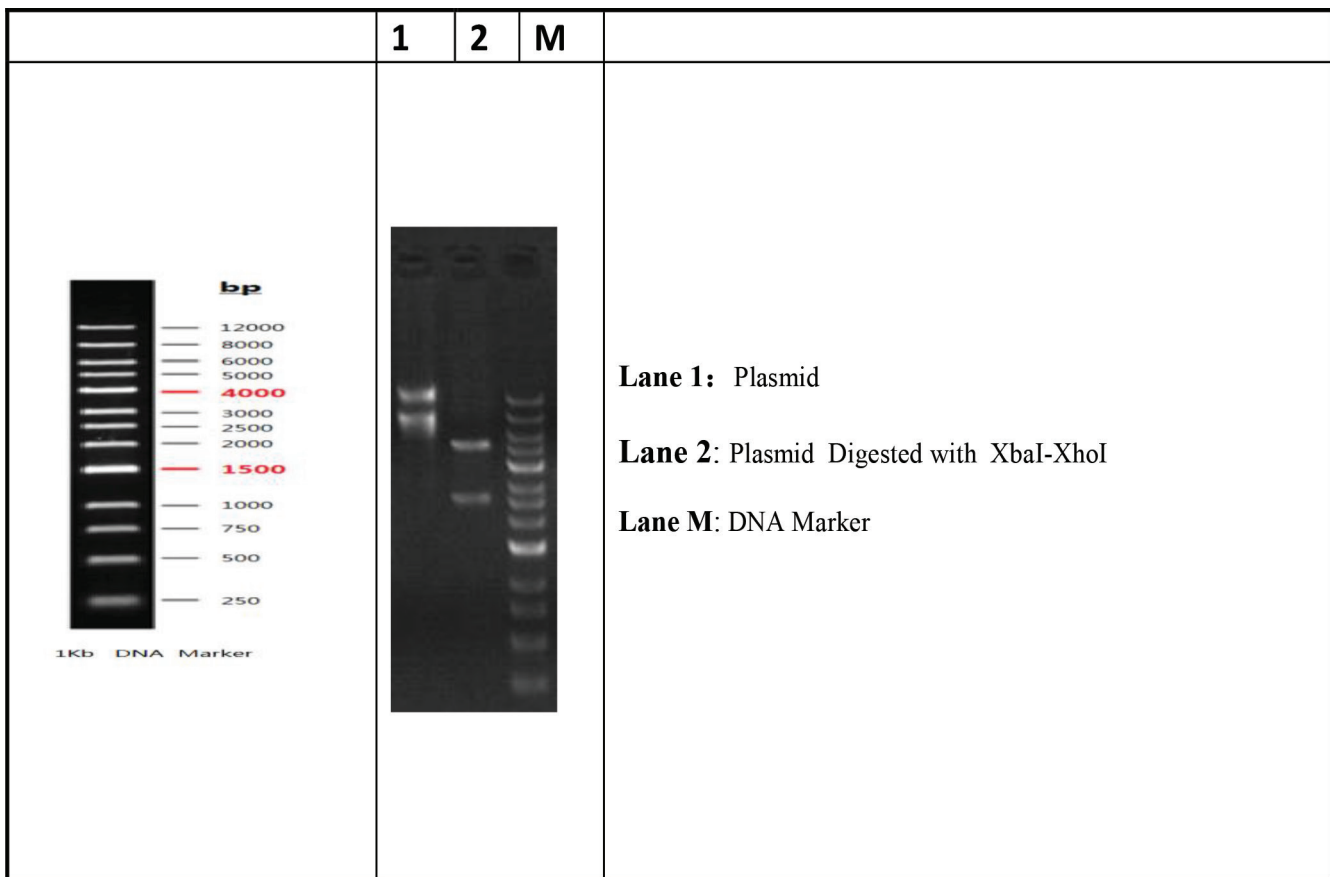
شکل ۳-۸- جایگاه‌های برشی آنزیم‌های BamH^۱ و HindIII.

مناسب‌ترین کاندیدای واکسن هستند زیرا نسبت به شناسایی آنتی‌بادی حساس‌تر هستند و بنابراین می‌توانند پاسخ‌های ایمنی محافظتی را ایجاد کنند. بسیاری از برنامه‌های کامپیوتری پیچیده برای پیش‌بینی مکان‌های درون سلولی پروتئین‌های احتمالی در کل ژنوم توسعه یافته‌اند.

منابع مورد استفاده

- 1- Bierque, E., R. Thibeaux, D. Girault, M.-E. Soupé-Gilbert and C. Goarant. 2020. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS One* 15: e0227055.
- 2- Boey, K., K. Shiokawa and S. Rajeev. 2019. *Leptospira* infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. *PLoS neglected tropical diseases* 13: 0007499.
- 3- Bourhy, P., L. Collet, S. Brisse and M. Picardeau. 2014. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Lepto-*

omp11 متوجه شدیم که بهتر است از سویه *E. coli* BLR(DE3pLysS) برای بیان استفاده کنیم (۸). در دسترس بودن اطلاعات کامل توالی ژنوم برای بسیاری از پاتوژن‌ها و توسعه برنامه‌های کامپیوتری پیچیده منجر به ایجاد الگوی جدیدی در توسعه واکسن شده است. اکنون می‌توان ژن‌های کاندید واکسن بالقوه را به روشی معکوس و با شروع از ژنوم غربالگری کرد این واکسن شناسی معکوس ابتدا برای *MenB* اعمال شد و اکنون به طور معمول در ساخت واکسن استفاده می‌شود، مانند جست و جوی واکسن علیه استافیلوکوکوس پنومونیه، استرپتوکوک آگالاکتیه، استافیلوکوکوس اورثوس، پورفیرومونا *ژنژیوالیس*، کلامیدیا پنومونیه و سایر میکروارگانیسم‌ها. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک اولین استراتژی مهم واکسینولوژی معکوس است. باکتری‌های گرم منفی دارای پنج مکان درون سلولی هستند: سیتوپلاسم، غشای داخلی، غشای خارجی، پری پلاسم و فضای خارج سلولی. پروتئین‌هایی که در معرض سطح قرار دارند، یعنی آن‌هایی که در مکان‌هایی غیر از سیتوپلاسم قرار دارند،



شکل ۳-۹- PCR کانستراکت طراحی شده *omp11 lip141* با باند ۲۰۹۷ جفت باز در حضور مارکر، (M: مارکر)، (Lane ۱ پلاسمید)، (Lane ۲: پلاسمید طراحی شده با XbaI-XhoI).

anian. 2020. Expression and purification of the LipL41, a surface-exposed lipoprotein antigen of pathogenic *Leptospira* spp. *Veterinarski arhiv* 90: 297-305.

9- Haake, D., C. Champion, C. Martinich, E. Shang, D. Blanco, J. Miller and M. Lovett. 1993. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *Journal of bacteriology* 175: 4225-4234.

10- Haake, D. A., M. K. Mazel, A. M. McCoy, F. Milward, G. Chao, J. Matsunaga and E. A. Wagar. 1999. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infection and immunity* 67: 6572-6582.

11- Kamaruzaman, I. N. A. 2019. Delineating host-pathogen interaction of pathogenic *Leptospira* spp. The University of Liverpool (United Kingdom).

12- Khaki, P., S. Moradi Bidhendi, Y.-F. Chang, M. S. Soltani and K. Tadaion. 2016. Amplification and cloning of a gene encoding a 41 kDa outer membrane protein (LipL41) of *Leptospira interrogans*

spira isolated from humans. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 64: 4061.

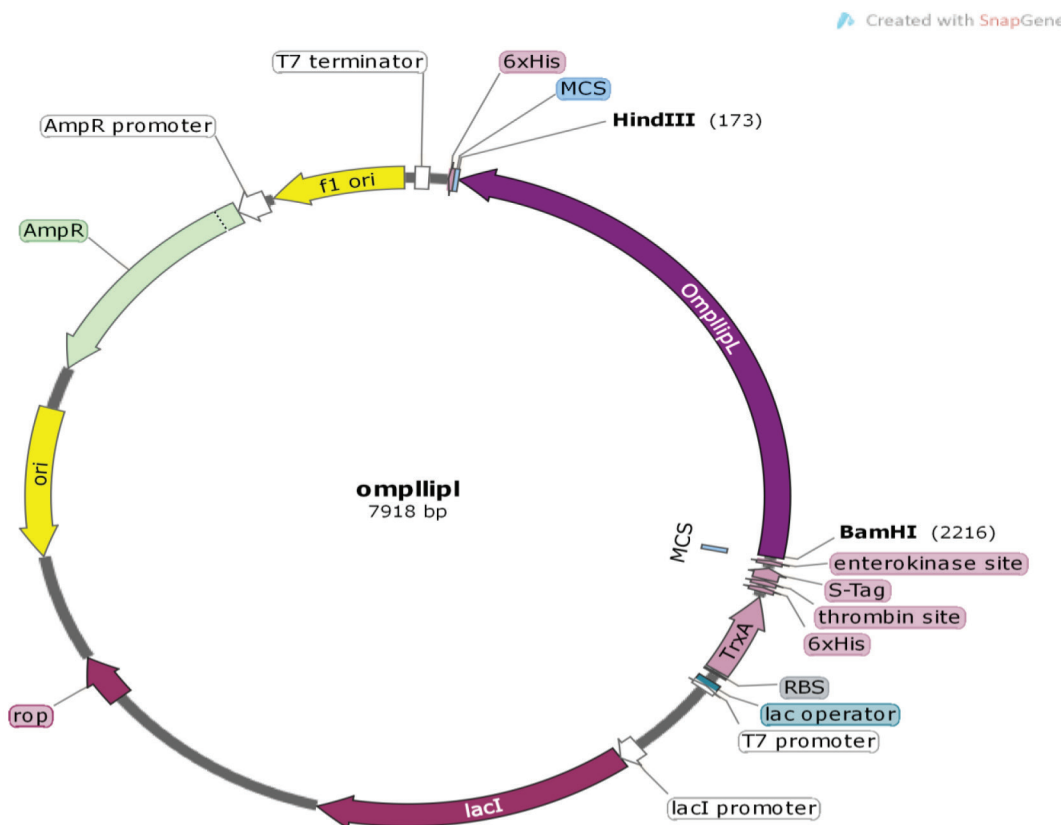
4- Christopher, W., B. Adler and S. Faine. 1982. Immunogenicity of leptospiral vaccines grown in protein-free medium. *Journal of medical microbiology* 15: 493-501.

5- Chu, K. M., R. Rathinam, P. Namperumalsamy and D. Dean. 1998. Identification of *Leptospira* species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in south India. *The Journal of infectious diseases* 177: 1314-1321.

6- Dezhbord, M., M. Esmaelizad, P. Khaki, F. Fotohi and A. Z. Moghaddam. 2014. Molecular identification of the ompL1 gene within *Leptospira interrogans* standard serovars. *The Journal of Infection in Developing Countries* 8: 688-693.

7- Dong, H., Y. Hu, F. Xue, D. Sun, D. M. Ojcius, Y. Mao and J. Yan. 2008. Characterization of the ompL1 gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. *BMC microbiology* 8: 1-12.

8- Golab, N., P. Khaki, N. Harzandi, M. Esmaelizad and M. Tebi-



شکل ۳-۱۰- نمایش از جایگاه ورود سازه ژنی ompL1 lipL41 به وکتور (+)PET32a.

- serovar Canicola. *Infection Epidemiology and Microbiology* 2: 5-7.
- 13- Larentis, A. L., J. F. M. Q. Nicolau, G. dos Santos Esteves, D. T. Vareschini, F. V. R. de Almeida, M. G. dos Reis, R. Galler and M. A. Medeiros. 2014. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbio-reactor. *BMC research notes* 7: 1-13.
- 14- Lehmann, J. S., M. A. Matthias, J. M. Vinetz and D. E. Fouts. 2014. Leptospiral pathogenomics. *Pathogens* 3: 280-308.
- 15- Lin, X. a., A. Sun, P. Ruan, Z. Zhang and J. Yan. 2011. Characterization of Conserved Combined T and B Cell Epitopes in Leptospira interrogans Major Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41. *BMC microbiology* 11: 1-9.
- 16- Mason, M. R., C. Encina, S. Sreevatsan and C. Muñoz-Zanzi. 2016. Distribution and diversity of pathogenic Leptospira species in peri-domestic surface waters from south central Chile. *PLoS neglected tropical diseases* 10: e0004895.
- 17- Mb, T., T. Af and N. Alto. 2021. The leptospiral LipL21 and LipL41 proteins exhibit a broad spectrum of interactions with host cell components. *Virulence* 12: 2798-2813.
- 18- Nally, J. E., J. P. Whitelegge, S. Bassilian, D. R. Blanco and M. A. Lovett. 2007. Characterization of the outer membrane proteome of Leptospira interrogans expressed during acute lethal infection. *Infection and immunity* 75: 766-773.
- 19- Slamti, L., M. A. de Pedro, E. Guichet and M. Picardeau. 2011. Deciphering morphological determinants of the helix-shaped Leptospira. *Journal of bacteriology* 193: 6266-6275.
- 20- Sørensen, H. P. and K. K. Mortensen. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology* 115: 113-128.
- 21- Vedhagiri, K., K. Natarajaseenivasan, P. Chellapandi, S. Prabhakaran, J. Selvin, S. Sharma and P. Vijayachari. 2009. Evolutionary implication of outer membrane lipoprotein-encoding genes ompL1, lipL32 and lipL41 of pathogenic Leptospira species. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 7: 96-106.
- 22- Vincent, A. T., O. Schiettekatte, C. Goarant, V. K. Neela, E. Bernet, R. Thibeaux, N. Ismail, M. K. N. Mohd Khalid, F. Amran and T. Masuzawa. 2019. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus Leptospira through the prism of genomics. *PLoS neglected tropical diseases* 13: e0007270.
- 23- Wang, Z., L. Jin and A. Węgrzyn. 2007. Leptospirosis vaccines. *Microbial cell factories* 6: 1-10.
- 24- Yang, H.-L., Y.-Z. Zhu, J.-H. Qin, P. He, X.-C. Jiang, G.-P. Zhao and X.-K. Guo. 2006. In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against Leptospira interrogans. *BMC genomics* 7: 1-12.
- 25- ZHANG, X. Y., Y. Yu, P. He, Y. X. ZHANG, B. Y. HU, Y. Yang, Y. X. NIE, X. G. JIANG, G. P. ZHAO and X. K. GUO. 2005. Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospire. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 37: 649-656.

