

## تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های پیلوژیک

# مطالعه بیوانفورماتیکی پروتئین مولتی اپی توپ طراحی شده بر اساس مناطق بسیار محافظت شده پروتئین هم‌گلوآنتینین سویه‌های H9N2 و H5N8 ویروس آنفلوآنزا

• زهرا بزرگخو

گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

• بهزاد همتی

گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

• مرتضی تقی‌زاده

بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات سرم سازی رازی، سازمان واکنس و

ترویج کشاورزی، کرج، تحقیقات، آموزش و ایران

• مجید تیبانیان

بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات سرم سازی رازی، سازمان واکنس و

ترویج کشاورزی، کرج، تحقیقات، آموزش و ایران

• مصطفی قادری

گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران



تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۰۹-۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱-۱۰-۰۳

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱-۰۹-۳۰ تاریخ انتشار: ۱۴۰۲-۱۰-۰۱

Email: m.tebianian@rvsri.ac.ir

### چکیده

واکسیناسیون علیه آنفلوآنزای پرندگان H9N2/H5N8 به عنوان یک راهکار موثر برای مقابله و کنترل این پاتوژن‌های کشنده مطرح می‌باشد. به همین منظور در این مطالعه یک واکسن کایمریک دوگانه موثر علیه H9/H5 از ناحیه HA2 دوسویه H9N2 و H5N8 طراحی شد و با استفاده از مدل‌های بیوانفورماتیک، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و تجزیه و تحلیل ساختار آنتی ژنیک اپی توپ‌های انتخاب شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای انجام این مطالعه سویه‌های H9N2 (A/chicken/Iran/B308B/2004) و A/Poultry/Iran/clade) H5N8 (2344/2018) انتخاب شدند و اپی توپ‌های محرک لنفوسیت‌های B و T بررسی و مناسب‌ترین آنها انتخاب شدند. سپس یک واکسن کایمریک با ترکیب اپی توپ‌های بسیار ایمنی‌زا طراحی شد. در ادامه با استفاده از نرم افزارهای مرتبط، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ساختار ثانویه واکسن طراحی شده از لحاظ پایداری حرارتی و آبدوستی و pH ایزوالکتریک و میزان آنتی ژنسیستی، آلرژنسیستی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت واکسن پیشنهادی رونویسی معکوس شد و به منظور قرارگیری در وکتور بیانی پروکاریوتی PET 41 a (+) تطبیق داده شد. با توجه به نتایج حاصل، پیش بینی می‌شود که ساختار آنتی ژنیک طراحی شده در این مطالعه می‌تواند با موفقیت و به میزان قابل قبولی در سیستم‌های پروکاریوتی بیان شود و جهت مطالعات ایمنی‌زایی علیه سویه‌های H9N2 و H5N8 ویروس آنفلوآنزا مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ویروس آنفلوآنزا، مولتی اپی توپ، هم‌گلوآنتینین، بیوانفورماتیک

- Veterinary Researches & Biological Products No 141 pp: 3-13

### Bioinformatic Analysis of Multi-epitope Protein Designed Based on Highly Conserved Regions of Hemagglutinin Protein of H9N2 and H5N8 Influenza Virus Strains.

By: Bozorgkhoo, Z., Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. Hemmati, B., Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. Taghizadeh, M., Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Tebianian, M., Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Ghaderi, M., Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Received: 2022-12-21

Accepted: 2022-12-24

Revised: 2022-12-24

Published: 2023-12-22

Email: m.tebianian@rvsri.ac.ir

Vaccination against bird flu H9N2/H5N8 is considered as an effective strategy to deal with and control these deadly pathogens. For this purpose, in this study, an effective dual chimeric vaccine against H9/H5 from the bidirectional HA2 region of H9N2 and H5N8 was designed and analyzed using bioinformatics models, physicochemical characteristics and antigenic structure analysis of selected epitopes. To carry out this study, (A/chicken/Iran/B308B/2004) H9N2 and (A/Poultry/Iran/clade 2344/2018) H5N8 strains were selected and the epitopes stimulating B and T lymphocytes were investigated and the most suitable ones were selected. Then a chimeric vaccine was designed by combining highly immunogenic epitopes. In the following, using related software, the physicochemical characteristics and secondary structure of the designed vaccine were evaluated in terms of thermal stability, hydrophilicity, isoelectric pH, antigenicity and allergenicity. Finally, the proposed vaccine was reverse transcribed and adapted to be placed in the prokaryotic expression vector pET-41 a(+). According to the results, it is predicted that the antigenic structure designed in this study can be expressed successfully in prokaryotic systems and use for immunogenic studies against H5N8 and H9N2 strains of influenza virus.

**Key words:** influenza virus, multi-epitope, hemagglutinin, bioinformatics

محسوب می‌شوند. شیوع اولیه آن‌ها دلیل سازگاری ضعیف ویروسی با میزبانان غیر پرند تا حد زیادی در انسان محدود شده است (۲۶-۱۴). ولی این محدودیت از طریق نوترتیبی مجدد، که به موجب آن دو سویه مختلف می‌تواند یک میزبان را آلوده کند و مواد ژنتیکی را برای ایجاد سویه‌های جدید به اشتراک بگذارد، می‌تواند از بین برود (۲۹-۲۷). بیشتر همه‌گیرهای قبلی در انسان‌ها نتیجه چنین رخدادهایی بوده است (۱۵) شواهد نشان می‌دهد پرندگان آبی به عنوان مخزن طبیعی ویروس آنفلوانزا عمل می‌کنند و نظارت و مداخله در روابط انسان و پرندگان می‌تواند در شناسایی زود هنگام و از بین بردن سویه بالقوه همه گیر بعدی نقش حیاتی داشته باشد (۳۲-۱۵).

سویه‌های بسیار بیماری‌زا (Highly pathogenic avian influenza) H5 (HPAI) در شرق آسیا غالب هستند. این ویروس‌ها به طور فعال با سویه‌های پرندگان در حال گردش در منطقه تعامل دارند و ممکن است از طریق بازآرایی ژنتیکی منجر به ایجاد ویروس‌های جدید شود

### مقدمه

ویروس آنفلوانزا به عنوان عضوی از خانواده ویروسی اورتومیکسوسویریده محسوب می‌شود. این ویروس بر اساس ویژگی‌های آنتی‌ژنتیکی نوکلئوپروتئین و پروتئین ماتریکس به سه زیر گروه A, B, C تقسیم می‌شود. ویروس آنفلوانزای نوع A بسیار شایع می‌باشد و بیماری‌زایی بیشتری نسبت به سایر زیرگروه‌های آنفلوانزا دارد. این ویروس می‌تواند باعث ابتلای گونه‌های مختلف پستانداران و پرندگان و همچنین باعث اپیدمی با شدت‌های مختلف شود. تقریباً همه زیرگونه‌های شناخته شده ویروس آنفلوانزای A در پرندگان یافت شده است. در حالی که بسیاری از حیوانات دیگر نیز میزبان آنفلوانزا هستند، اما از لحاظ تاریخی آنفلوانزای پرندگان بیشترین نگرانی برای سلامتی انسان را به همراه داشته است (۲۴).

از دیرباز تاکنون عفونت‌های انسانی با آنفلوانزای فوق حاد پرندگان و سایر زیرگروه‌ها به عنوان تهدیدی برای بهداشت عمومی جهانی

برای انتخاب سویه‌های  $H^9N^2$  و  $H^5N^8$  ویروس آنفلوآنزای A و تجزیه و تحلیل اطلاعات مرتبط با این سویه‌ها، از اطلاعات موجود در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) استفاده شد.

### بازیابی توالی پروتئین

پروتئین هم‌گلوتینین ویروسی آنفلوآنزای A سویه‌های  $H^9N^2$  و  $H^5N^8$  با استفاده از داده‌های موجود در پایگاه NCBI بازیابی شد و با استفاده از نتایج ژنومی سویه‌های ثبت شده ایران، نتایج توالی‌ها مقایسه و مورد ارزیابی قرار گرفت.

### ارزیابی خصوصیات فیزیکی شیمیایی توالی‌های پروتئین و تجزیه و

#### تحلیل ساختار

میزان حلالیت اپی‌توپ‌های انتخاب شده به وسیله سرورهای [www.biotech.ou.edu](http://www.biotech.ou.edu) و <https://sable.cchmc.org>، میزان pH ایزوالکتریک اپی‌توپ‌ها از طریق سرور (Peptide property calculator) (<https://pepcalc.com>) مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت آن دسته از اپی‌توپ‌های دارای حلالیت مناسب که فاقد خاصیت آلرژیک و دارای pH ایزوالکتریک مناسب بودند برای ادامه کار انتخاب شدند.

### پیش‌گویی اپی‌توپ B-Cell

به منظور ارزیابی و پیش‌بینی اپی‌توپ‌های مربوط به لنفوسیت‌های B از سرورهای مختلفی استفاده شد. این ابزارهای پیش‌بینی شامل Kolaskar برای مقدار آنتی‌ژن‌سیستی، Emini برای پیش‌بینی دسترسی سطح، Karpulas and Schulz برای پیش‌بینی انعطاف پذیری، Bepipred، linear epitope برای آنالیز اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده، Chaou and Fasman برای پیش‌بینی بتا ترن‌ها و Parker برای پیش‌بینی میزان آب دوستی اپی‌توپ‌ها می‌باشد.

### پیش‌بینی اپی‌توپ T-Cell

برای پیش‌بینی اتصال مولکول‌های MHC-I از ابزار IEDB (Immune Epitope Database) استفاده می‌شود. MHC-I محصور شده با CDA + لنفوسیت‌های تی سایتوتوکسیک (CTL) نقش مهمی در کنترل عفونت ویروس دارند. از این رو شناسایی اپی‌توپ‌های فعال‌کننده T سل برای شناسایی مکانیزم فعال‌سازی سلول T و طراحی واکسن مبتنی بر اپی‌توپ حائز اهمیت می‌باشد.

### بررسی نواحی گلیکوزیله

با توجه به این که هدف نهایی در این مطالعه، بیان پروتئین نوترکیب طراحی شده در سیستم پروکاریوتیک می‌باشد، در نتیجه اپی‌توپ‌هایی که محل‌های N-Glycosylated دارند می‌بایست حذف شوند؛ بنابراین اپی‌توپ‌های انتخابی در پایگاه NetNGlyc ۱,۰ مورد بررسی قرار گرفتند.

### اتصال اپی‌توپ‌ها برای ساخت پروتئین نوترکیب

واکسن زیرواحدی حاوی اجزای آنتی‌ژنیک موجود در یک ارگانیزم پاتوژن برای القا واکنش ایمنوژنیک در میزبان است. منظور طراحی

که می‌تواند سلامت انسان‌ها را به مخاطره بیندازند. با اینکه هیچ تهدید قریب‌الوقوعی از سوی ویروس  $H^5N^8$  (HPAI A) برای بیماری نوظهور وجود ندارد ولی اتصال مشاهده شده از این سویه ویروس به گیرنده‌های شبه پستانداران و توانایی آن برای تکثیر در مدل‌های پستانداران نشان می‌دهد که تکامل آن به یک ویروس قابل اهمیت نباید نادیده گرفته شود (۸). ویروس‌های آنفلوآنزای مرغی که در طیور قادر به گردش هستند می‌تواند بطور مستقیم انسان را آلوده کند که خوشبختانه برخی از واکسن‌های موجود می‌تواند در کنترل این بیماری مفید واقع شوند (۱۹-۱۶). با این حال، تمام همه‌گیری‌های قبلی فقط از ویروس‌های HPAI نبوده است. همچنین گزارش شده که سویه  $H^9N^2$  که یک ویروس آنفلوآنزای مرغی با بیماری‌زایی کم Low pathogenic (LPAI) (avian influenza) می‌باشد که در سال ۱۹۹۴ ظهور کرد نیز ممکن است به همان اندازه HPAI کاندید همه‌گیری بعدی باشد (۲۵-۲۳). ویروس‌های  $H^9N^2$  بصورت اندمیک در طیور و در سراسر دامنه جغرافیایی گسترش دارد و باعث ایجاد عفونت در انسان و خوک شده است و در بعضی موارد برای شناسایی و اتصال به گیرنده‌های انسانی نیز تاحدودی سازگاری پیدا کرده است (۶).

پروتئین هم‌گلوتینین (HA) ویروس آنفلوآنزا مسئول اتصال این ویروس به گیرنده‌های اسید سیالیک سطح سلول‌های اپی‌تلیال میزبان است که اجازه ورود ویروس را به درون سلول می‌دهد. ساختار گیرنده‌های اسید سیالیک در میزبان‌های انسانی و مرغی از نظر با یکدیگر تفاوت دارند. به طوری که ویروس‌های آنفلوآنزای مرغی برای آلوده‌سازی سلول‌های انسانی سازگاری ناچیزی دارند (۳۳-۲۰). با این حال، جهش‌های متعدد احتمالی در توالی ژن HA می‌تواند اتصال ویروس‌های آنفلوآنزای مرغی به گیرنده‌های اسید سیالیک انسان را امکان‌پذیر کند (۵-۱۳-۳۱).

قابل پیش‌بینی است که عفونت هم‌زمان  $H^5N^1$  و  $H^9N^2$  می‌تواند یک زیرگونه جدید و ایجاد کند و انسان را با بیماری‌زایی بالایی آلوده کند (۱۰). به همین دلیل شیوع ویروس‌های آنفلوآنزای مرغی در ساب تاپ‌های H5 و H9 و عفونت‌های مشترک انسان و دام نه تنها صنعت طیور بلکه بهداشت عمومی را نیز تهدید می‌کند و از مهم‌ترین تهدیدات پاندمی در لیست WHO محسوب می‌شوند (۳۵-۲۸). بنابراین، برخی از کشورها برای محافظت از صنعت مرغداری و کاهش خطر عفونت انسان از طریق تماس مستقیم با طیور آلوده، از واکسن‌های مختلف مرغی ویروس  $H^5$  HPAI و  $H^9N^2$  LPAI استفاده می‌نمایند (۷).

بنابراین برای مقابله با فشار روزافزون بیماری‌های ویروسی و نیز کنترل آن در طیور از طریق واکسیناسیون که پیامدهایی در تجارت بین‌المللی در برخواهد داشت، طراحی به موقع واکسن جدید بمنظور جلوگیری از شیوع بیماری ویروسی نیازمند چالش‌های علمی است. با در نظر گرفتن مجموع این یافته‌ها هدف ما در این مطالعه طراحی واکسن مولتی اپی‌توپ آنفلوآنزا بر اساس مناطق بسیار محافظت شده پروتئین هم‌گلوتینین سویه‌های  $H^9N^2$  و  $H^5N^8$  است که در طی زمان دچار تغییر و موتاسیون نمی‌شوند.

### مواد و روش‌ها

#### انتخاب سویه ویروس

سیستم‌ها برای کلونینگ و بیان پروتئین نو ترکیب است. سکانس پروتئین نو ترکیب در محل برش‌های آنزیم‌های محدودکننده BamHI/HindIII وارد شد. توالی آنزیم BamHI در انتهای آمینی سکانس و توالی آنزیم HindIII در انتهای کربوکسیل سکانس قرار می‌گیرند.

### نتایج

#### انتخاب سویه ویروسی

کل پروتئوم ویروسی سویه‌های آنفلوانزای مرغ A (H5N8, H9N2) از پایگاه داده NCBI استخراج شد. همه سکانس‌ها مربوط به ایران بود. از میان آنها، دو سویه ساختاری برای تجزیه و تحلیل بیشتر انتخاب شد که شناسه دستیابی آنها در جدول ۱ آمده است.

#### بازیابی توالی پروتئین

بازیابی توالی‌های پروتئوم دو سویه فوق با استفاده از پایگاه داده NCBI انجام شد و نتیجه در جدول ۲ آورده شده است.

#### ارزیابی خصوصیات فیزیوشیمیایی توالی‌های پروتئین و تجزیه و

##### تحلیل ساختار

توالی‌های بازیابی شده توسط سرور VaxiJen ارزیابی شدند تا قوی‌ترین ناحیه آنتی‌ژنیک مشخص شود. امتیاز پیش‌بینی برای پروتئین هم‌گلوپتینین H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> توسط سرور VaxiJen ۰/۴۳۳۳ و برای پروتئین هم‌گلوپتینین H<sub>5</sub>N<sub>8</sub> ۰/۵۲۰۲ محاسبه شد که بالاتر از مقدار آستانه (۰/۴) بود، از این رو این سرور پروتئین‌های منتخب ما را تأیید می‌کند. خواص فیزیوشیمیایی مختلف پروتئین‌ها توسط ابزار ProtParam تجزیه و تحلیل شد و نتایج آن در جدول ۳ آمده است.

#### پیش‌گویی اپی‌توپ B-Cell

در این مطالعه، با استفاده از شش الگوریتم مختلف پیش‌بینی، توالی پپتیدها برای دوسویه H<sub>5</sub>N<sub>8</sub> و H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> مشخص شد که نتایج آن به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ آمده است.

#### تعیین اپی‌توپ‌های منتخب

پس از ارزیابی امتیاز اپی‌توپ‌ها و همچنین ارزیابی خصوصیات شیمیایی آن‌ها به صورت تکی و در توالی، بهترین نتایج انتخاب و برای ساخت پروتئین نو ترکیب استفاده شدند.

#### پیش‌بینی اپی‌توپ T-Cell

اپی‌توپ‌های انتخاب شده در این مطالعه بر مبنای لنفوسیت B بوده است اما با توجه به اینکه میزان تاثیرگذاری این اپی‌توپ‌ها بر روی پاسخ‌های سلولهای T نیز قابل توجه بود، تمام اپی‌توپ‌ها از لحاظ تحریک لنفوسیت‌های T با استفاده از ابزار پیش‌بینی اتصال MHC-I از IEDB مورد آنالیز قرار گرفت که نتایج امتیاز اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک از پروتئین هم‌گلوپتینین در جدول ۶ آورده شده است. همانطور که در جدول زیر قابل مشاهده است برخی از این اپی‌توپ‌ها که امتیاز بالاتری دارند قابلیت تحریک لنفوسیت T را داشته و برخی از آن‌ها که امتیاز

پروتئین نو ترکیب در این مطالعه اپی‌توپ‌هایی که قدرت تحریک سلول‌های B و هم‌زمان CTL را دارا هستند انتخاب شده و در کنار یکدیگر قرار گرفتند تا یک ساختار پروتئین نو ترکیب ایجاد شود. به همین منظور ساختار طراحی شده در این مطالعه که شامل اپی‌توپ‌های مختلف در کنار یکدیگر می‌باشند با استفاده از سرورهای مختلف مجدداً مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

#### پیش‌بینی آلرژی و آنتی‌ژنی سازه واکسن

برای پیش‌بینی رفتار غیر آلرژیک سازه‌های واکسن از AllerTOP v ۲,۰ server و همچنین از سرور VaxiJen v ۲,۰ برای تعیین احتمال آنتی‌ژنی بودن آن استفاده شد.

#### خصوصیات فیزیوشیمیایی و تجزیه و تحلیل ساختار ثانویه پروتئین واکسن

خواص فیزیوشیمیایی مختلف پروتئین واکسن شامل وزن مولکولی، pH، ایزوالکتریک، شاخص آلیفاتیک، هیدروپاتوتیک، شاخص بی‌ثباتی و نیمه عمر تخمینی می‌باشد که در مورد سازه نهایی انتخابی که شامل اپی‌توپ‌های منتخب می‌باشد با استفاده از سرورهای مناسب آنالیز شد. ProtParam ابزاری است که توسط سرور Expasy (<http://expasy.org/cgi-bin/protpraram>) ارائه شده که برای ویژگی عملکرد واکسن‌های ساخته شده است. برنامه v ۳/۳ PSIPRED و NetTurnP ۱,۰ برای پیش‌بینی آلفاهلیکس، ورقه بتا و ساختار کوئل پروتئین واکسن مورد استفاده قرار گرفت.

#### پیش‌بینی ساختار سوم واکسن

سرور <https://swissmodel.expasy.org> ساختار ۳D سازه طراحی شده را بر اساس میزان شباهت بین پروتکل هدف و ساختار قالب موجود از PDB (Protein Data Bank) پیش‌بینی خواهد کرد. به همین دلیل در این مطالعه برای ترسیم ساختار سوم پروتئین نو ترکیب از سرور مذکور استفاده شد.

#### ترجمه‌ی معکوس ساختار اولیه و سازگاری کدون‌ها

پس از انتخاب مناسب‌ترین اپی‌توپ‌ها بر اساس آنالیزهای بیوانفورماتیک توالی مربوط به آن‌ها به صورت یک ساختار اولیه خطی نوشته شد. در ادامه با استفاده از پایگاه GenScript ترجمه‌ی معکوس بر روی این ساختار انجام شد و توالی نوکلئوتیدی اپی‌توپ‌ها بدست آمد. معمولاً برای انطباق کدون با ارگانسیم‌های پروکاریوتی مناسب، برای سرعت بخشیدن به میزان بیان در آنها از ابزار انطباق کدون استفاده می‌شود. با توجه به عدم هماهنگی بین مصرف کدون از سویه انسانی و E.coli، این روش با هدف دستیابی به میزان بیان بالاتر پروتئین میزبان انتخابی اتخاذ شد.

#### انتخاب وکتور و طراحی سازه نهایی

مرحله‌ی نهایی در این مطالعه، انتخاب وکتور برای بیان ژن مورد نظر و ساختار پروتئین مولتی‌اپی‌توپ انتخابی است. بدین منظور وکتور +PET۲۱a استفاده شد. سیستم بیانی PET یکی از پرکاربردترین

پایین تری دارند فاقد این قابلیت هستند.

### اتصال اپی توپها برای ساخت پروتئین نو ترکیب یا سازه واکسن

اپی توپهای منتخب از E1 الی E8 که سه عدد از آنها از سویه H9N2 و پنج عدد دیگر از سویه H5N8 هستند که در جدول نشان داده شد. به منظور اتصال اپی توپها به یکدیگر و ایجاد یک ساختار خطی اولیه در بین اپی توپهای انتخابی دو عدد گلیسین قرار داده شد که در شکل ۳ نشان داده شده است.

### پیش بینی آلرژنسیتی و آنتی ژنیسیتی سازه واکسن

با استفاده از دو سرور VaxiJen v2.0 و server 2.0.AllerTOP v ترتیب آلرژنسیتی و آنتی ژنیسیتی پروتئین نو ترکیب سنجیده شد. نتایج نشان داد پروتئین نو ترکیب غیر آلرژن می باشد. قدرت آنتی ژنیک آن نیز به میزان 0.4-threshold- و میزان score 0.4828- گزارش شد.

### خصوصیات فیزیکوشیمیایی و تجزیه و تحلیل ساختار ثانویه

#### پروتئین نو ترکیب

همان گونه که در جدول مشاهده می شود، این پروتئین دارای ۲۹۶ اسید آمینه است و PH ایزوالکتریک آن تقریباً در محدوده ی خنثی ۷ (۷/۱۹) می باشد. وزن ملکولی آن ۳۲/۴۶ کیلو دالتون برآورد شد که نشان دهنده پتانسیل آنتی ژنی خوب آن است.

پیش بینی می شود نیمه عمر سازه طراحی شده ۱ ساعت در رتیکولوسایت پستانداران در شرایط آزمایشگاهی و بیش از ۱۰ ساعت در E. coli در شرایط in vivo باشد. ترمو استبیلیتی و ماهیت آب دوست پروتئین با شاخص آلفاتیکی و مقدار (Grand average of GRAVY) (hydropathicity) به ترتیب ۷۱،۴۵ و -۰/۵۶۸- نشان داده شد. شاخص ناپایداری ۱۷/۹۳ محاسبه شد که پروتئین را به عنوان یک پروتئین پایدار طبقه بندی می کند و نشان داد که این سازه از ویژگی های خوبی برای شروع واکنش ایمنی زایی برخوردار است. با استفاده از نرم افزار PSIPRED ۳،۳ برای پیش بینی ساختار های آلفاهلیکس، ورقه های بتا و ساختار کوپل پروتئین نو ترکیب مورد استفاده شد که شکل ۴ نتایج را نشان می دهد.

### سازگاری کدون ها و کلونینگ در In silico

سازگاری کدون با در نظر گرفتن سیستم بیان میزبان (Ecoli) BL21 با استفاده از سرور GenScript انجام شد. میزان CIA (شاخص کدون) برای توالی طراحی شده ۰/۹۶ محاسبه شد که نشان می دهد شانس زیادی در بیان ژن دارد. همچنین محتوای GC بهینه شده (۵۵/۹۸) برای این توالی معنی دار بود.

در نهایت ORF حاوی کدون های بهینه، در درون وکتور (+) pET41a و بین دو آنزیم محدود الاثر BamHI در انتهای آمینی و HindIII در انتهای کربوکسیل قرار گرفت.

### بحث و نتیجه گیری

از میان گونه های متعدد ویروس آنفلوانزا، ویروس های H9N2 در

چندین گونه پرندگان در اوراسیا در گردش بوده اند که منجر به خسارات اقتصادی زیادی به صنعت طیور به دلیل کاهش تولید تخم مرغ و میزان تلفات متوسط تا بالا شده است (۲). علاوه بر این، ویروس های آنفلوانزای H9N2 در دهه گذشته در اوراسیا تبدیل به پانزوتیک شده اند و از طیور خشکی در سراسر جهان جدا شده اند. علاوه بر ویروس های H9N2، ویروس های H5 HPAI گسترده شده اند و باعث عفونت پرندگان آبی وحشی و طیور اهلی در آسیای مرکزی و جنوبی، خاورمیانه، اروپا و آفریقا شده اند (۳۴-۴).

با در نظر گرفتن بارهای دامپزشکی و بهداشت عمومی ناشی از ویروس های H9N2 و H5 HPAI، هدف اصلی این مطالعه طراحی یک واکسن گسترده، محافظ متقاطع، دوگانه H5 و H9 با استفاده از روش های بیوانفورماتیک بود. برای این منظور، یک بخش کایمیریک جدید HA H5/H9 طراحی شد که شامل ناحیه HA2 هر دو سویه بود. این درحالیست که Hai و همکاران برای تولید ویروس های آنفلوانزای HA کایمیریک از طریق جایگزینی دامنه سر کروی از زیرگروه های مختلف عمل کرده بودند. این رویکرد منجر به یک ویروس کایمیریک می شود که دامنه سر کروی خارجی و بخشی از مناطق صلی HA1 و HA2 را بیان می کند (۸). در مطالعه دیگری wang و همکاران نیز یک ویروس کایمیریک تولید کردند که حاوی HA1 از ویروس H1N1 California/2009/V/A/ و HA2 از ویروس فصلی ویروس H1N1 A/South Dakota/07/03. kim و همکاران نیز واکسن نو ترکیب کایمیریک H5/H9 را ساختند که کل ناحیه HA1 زیرگروه H9N2 و ناحیه HA2 زیرگروه H5N8 HPAIV را بیان می کند (۱۷).

در این مطالعه به منظور طراحی واکسن مولتی اپی توپ آنفلوانزا، کل پروتئوم ویروسی آنفلوانزای مرغی A سویه های H9N2 و H5N8 را با استفاده از پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) بازایی شد. خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین های ویروسی این مطالعه از طریق سرور ProtParam مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با استفاده از سرور VaxiJen تمام توالی های پروتئین بازایی شده مورد ارزیابی قرار گرفت تا قوی ترین پروتئین های آنتی ژنیک انتخاب شود.

از آنجایی که ژنوم ویروس آنفلوانزا قطعه قطعه بوده و از هشت قسمت تشکیل شده است، احتمال نو ترکیبی در روند تکثیر ویروس بسیار زیاد است و ممکن است آنتی ژن های پروتئین های نورامینیداز (N) یا همگلوپتینین (H) و یا هر دوی آنها با هم دستخوش تغییرات شوند که در این میان تغییرات پروتئین همگلوپتینین شایعتر از پروتئین نورامینیداز است (۲۶). در میان هشت پروتئین ویروسی، پروتئین همگلوپتینین دو سویه آنفلوانزا (شناسه دسترسی ABO09915 و MK920168) به عنوان بهترین کاندیدهای پروتئینی آنتی ژنیک بر اساس توانایی آنها در اعطای مصونیت و امکان تجزیه و تحلیل بیشتر انتخاب شد.

اکثر آنتی ژن ها و واکسن ها نه تنها پاسخ سلول B بلکه واکنش سلول T را نیز تحریک می کنند. واکسن باعث تولید آنتی بادی هایی می شود که توسط سلول های B سنتز می شوند تا عملکردهای موثر با عامل بیماری زا را کنترل کند (۳). با این حال، پاسخ هومورال از حافظه سلول های B می تواند به راحتی بر افزایش آنتی ژن ها در طول زمان غلبه کند در حالی که ایمنی با واسطه سلول اغلب ایمنی طولانی مدت ایجاد

می‌کند (۱۱-۱).

برای پیش‌بینی اپی‌توپ سلول B، از شش الگوریتم از سرور IEDB استفاده شد. روش پیش‌بینی Bipipred دنباله پپتیدی در مناطق ۱۳۰-۱۰۰ و ۲۸۰-۳۰۰ برای پروتئین هم‌گلوپتین H۹N۲ و دنباله پپتیدی در مناطق ۱۴۰-۱۲۰ و ۳۸۰-۳۵۰ برای پروتئین هم‌گلوپتین H۵N۸ با توانایی ایجاد پاسخ‌های ایمنی پیش‌بینی کرد.

روش‌های پیش‌بینی سطح دسترسی Emini، پیش‌بینی بتاترن Chou و Fasman و انعطاف‌پذیری Schulz & Karplus و آنتی‌ژن‌سیتی Kolaskar and Tongaonkar و هیدروفیلیسیتی Parker به ترتیب به منظور شناسایی سطح دسترسی، قوی‌ترین نواحی بتاترن، قابل انعطاف‌ترین، آنتی‌ژنیک و هیدروفیلیک‌ترین مناطق استفاده شد. از بین موارد فوق، قوی‌ترین اپی‌توپ‌های سلول B به عنوان نامزد واکنش علیه آنفلوآنزای مرغی (H۹N۲/H۵N۸/A) انتخاب شد.

در مطالعه انجام شده توسط Kim و همکارانش در سال ۲۰۱۶، پروتئین کایمریک هم‌گلوپتین h۹/h۵ طراحی گردید که تفاوت آن‌ها با این مطالعه در این بود که آنها از ناحیه H۱ از سویه H۹ و ناحیه HA۲ از سویه H۵ استفاده کردند (۱۶) ولی در این مطالعه با توجه به رخداد جهش‌های نقطه‌ای گسترده در زیر واحد HA۱ و عدم وجود این تغییرات و همچنین وجود جایگاه‌های متعدد حافظت شده در زیر واحد HA۲ انتخاب اپی‌توپ‌ها فقط از ناحیه H۲ هر دو سویه انجام شد. توالی‌های پپتیدی منتخب از طریق پیونددهنده گلیاسینی به هم متصل شدند و سازه مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

آلرژن‌سیتی، یک عامل مهم در توسعه واکنش است که به عنوان واکنش آلرژیک در فرایند تحریک سیستم ایمنی مشاهده می‌شود. طبق فرمول پیش‌بینی آلرژن‌سیتی توسط WHO یا FAO، اگر در یک قاب ۸۰ اسید آمینه‌ای، حداقل شش آمینو مجاور، مشابه با آلرژن‌های شناخته شده باشد بطور بالقوه می‌توان آن توالی را آلرژن در نظر گرفت (۲۱). در این مطالعه، از سرورهای PA۲P، AllerTOP و AllerMatch برای ارزیابی حساسیت‌زایی سازه استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که سازه طراحی شده غیرآلرژن می‌باشد و به لحاظ پتانسیل ایمنولوژیک در سرور vaxigen از امتیاز خوبی برخوردار بود. عدم آلرژن‌سیتی این سازه به عنوان یک شرط اساسی در استفاده آن در مطالعات بالینی مورد توجه می‌باشد. به طوری که تقریباً در تمام مطالعات مشابه انجام شده نیز سازه‌های به کار رفته دارای خاصیت عدم آلرژن‌سیتی بودند (۲۲-۹). یکی دیگر از شروط مهم در سازه طراحی شده، بررسی و تعیین خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی پروتئین‌ها می‌باشد که این امر می‌تواند برای شناخت بهتر پروتئین‌ها و شناسایی آنها بسیار سودمند باشد، به همین منظور خواص فیزیکی‌شیمیایی و ساختار ثانویه این سازه نیز قبل از پیش‌بینی ساختار سوم و اصلاح مدل سه بعدی تجزیه و تحلیل شد. ارزیابی پروتئین نوترکیب در سرور ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) نشان داد که وزن ملکولی آن ۳۲۴۶/۰۹ g/m با ۲۹۶۶ اسید آمینه است. همچنین سایت ProtParam شاخص ناپایداری را حدوداً عدد ۱۸ تخمین زد. شاخص ناپایداری (Instability index) عبارتست از میزان پایداری پروتئین در داخل لوله آزمایش که برای پروتئین‌های پایدار شاخص ناپایداری کمتر از ۴۰ است و زمانی که این شاخص از ۴۰

بیشتر باشد به معنای آن است که پروتئین ناپایدار می‌باشد (۱۸). شاخص دیگری که در این بررسی مورد ارزیابی قرار گرفت شاخص آلیفاتیک (index Aliphatic) بود. این شاخص نشان‌دهنده حجم نسبی پروتئین که با زنجیره‌های جانبی آلیفاتیک (آلانین، والین، ایزولوسین و لوسین) اشغال شده است که اثر مثبتی بر افزایش مقاومت پروتئین در برابر حرارت دارد (۱۲). در این مطالعه شاخص آلیفاتیکی با استفاده از سایت ProtParam در حدود ۷۱ پیش‌بینی گردید، که این مقدار شاخص آلیفاتیک یک فاکتور مثبت افزایش پایداری پروتئین در برابر حرارت محسوب می‌گردد.

حلالیت ضعیف پروتئین‌ها مشکلی رایج در مطالعات ساختاری و سازه‌های پروتئینی می‌باشد. حلالیت پروتئین با میزان آبگریزی (درجه میانگین هیدروپاتیسیتی) آن رابطه‌ای نزدیک دارد. مقدار درجه میانگین هیدروپاتیسیتی (GRAVY) برای یک پپتید یا پروتئین به صورت مجموع میزان هیدروپاتی تمام اسیدهای آمینه محاسبه شده و بر اساس تعداد باقی مانده‌های موجود در توالی تقسیم می‌شود (۳۵). در این مطالعه شاخص هیدروپاتی حدوداً ۰/۵۷- پیش‌بینی شد که نشان می‌دهد سازه دارای کمترین میزان آبگریزی و در نتیجه جزو پروتئین‌های محلول می‌باشد. این خاصیت به عنوان یکی از مزایای پروتئین نوترکیب می‌تواند مدنظر قرار گیرد. میزان pH ایزوالکتریک توالی به میزان ۷/۱۹ محاسبه شد که خنثی بودن سازه را نشان می‌دهد بنابراین تأثیر خوبی بر میزان حلالیت و فولدینگ پروتئین می‌گذارد. میزان خلوص پروتئین نوترکیب با توجه به عدد ضریب خاموشی این سازه که ۶۴۰۸۰ بود، قابل قبول ارزیابی شد.

در نهایت، سازه واکنش طراحی شده، به طور معکوس رونویسی شد و قبل از جایگذاری در وکتور بیانی + PET41a جهت بیان بهینه در سیستم پروکاریوت (*E. coli BL21*) سازگار گردید. بهینه‌سازی کدون‌ها نشان داد که CIA ۰/۹۶ است که برای بیان در سیستم پروکاریوتی در باکتری *E. coli BL21* بسیار مناسب است.

بر اساس ساختار سازه طراحی شده انتظار می‌رود که این پروتئین بتواند در مقابل سویه‌های H۵N۸ و H۹N۲ به میزان قابل قبولی ایمنی‌زایی داشته باشد.

#### منابع مورد استفاده

1. Bacchetta R, Gregori S, Roncarolo MG. CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun Rev.* 2005;4(8):491-6.
2. Choi YK, Ozaki H, Webby RJ, Webster RG, Peiris JS, Poon L, et al. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in South-eastern China. *J Virol.* 2004; 78(16):8609-14.
3. Cooper NR, Nemerow GR. The role of antibody and complement in the control of viral infections. *J Invest Dermatol.* 1984; 83(1 Suppl):121s-127s.
4. Eagles D, Siregar ES, Dung DH, Weaver J, Wong F, Daniels P. H5N1 highly pathogenic avian influenza in Southeast Asia. *Rev Sci Tech.* 2009;28(1):341-8.

5. El-Shesheny R, Kandeil A, Bagato O, Maatouq AM, Moatasim Y, Rubrum A, et al. Molecular characterization of avian influenza H5N1 virus in Egypt and the emergence of a novel endemic sub-clade. *J Gen Virol*. 2014;95(Pt 7):1444-1463.
6. Gao R, Bai T, Li X, Xiong Y, Huang Y, Pan M, et al. The comparison of pathology in ferrets infected by H9N2 avian influenza viruses with different genomic features. *Virology*. 2016 ;488:149-55.
7. Guo YJ, Krauss S, Senne DA, Mo IP, Lo KS, Xiong XP, et al. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology*. 2000; 267(2):279-88.
8. Hai R, Krammer F, Tan GS, Pica N, Eggink D, Maamary J, et al. Influenza viruses expressing chimeric hemagglutinins: globular head and stalk domains derived from different subtypes. *J Virol*. 2012; 86(10):5774-81.
9. Hasan M, Ghosh PP, Azim KF, Mukta S, Abir RA, Nahar J, et al. Reverse vaccinology approach to design a novel multi-epitope subunit vaccine against avian influenza A (H7N9) virus. *Microb Pathog*. 2019;130:19-37.
10. Hayden F, Croisier A. Transmission of avian influenza viruses to and between humans. *J Infect Dis*. 2005 ;192(8):1311-4.
11. Igietseme JU, Eko FO, He Q, Black CM. Antibody regulation of Tcell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Rev Vaccines*. 2004;3(1):23-34.
12. Ikai A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Biochem*. 1980;88(6):1895-8.
13. Kandeil A, El-Shesheny R, Maatouq AM, Moatasim Y, Shehata MM, Bagato O, et al. Genetic and antigenic evolution of H9N2 avian influenza viruses circulating in Egypt between 2011 and 2013. *Arch Virol*. 2014 Nov;159(11):2861-76. doi: 10.1007/s00705-014-2118-z. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24990416; PMCID: PMC4206084.
14. Kandeil A, Hicks JT, Young SG, et al. Active surveillance and genetic evolution of avian influenza viruses in Egypt, 2016-2018. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1):1370-1382.
15. Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(1):9-14.
16. Kim SM, Kim YI, Park SJ, Kim EH, Kwon HI, Si YJ, et al. Vaccine Efficacy of Inactivated, Chimeric Hemagglutinin H9/H5N2 Avian Influenza Virus and Its Suitability for the Marker Vaccine Strategy. *J Virol*. 2017 Feb 28;91(6):e01693-16.
17. Kim YI, Pascua PNQ, Kwon H-I, Lim G-J, Kim E-H, Yoon S-W, et al. Pathobiological features of a novel, highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus. *Emerg Microbes Infect*. 2014;3(10):e75.
18. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol*. 1982; 157(1):105-32.
19. Loeb J. Avian flu: is vaccination the answer?. *Vet Rec*. 2022;191(4):142-143.
20. Matrosovich MN, Gambaryan AS, Teneberg S, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, et al. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology*. 1997;233(1):224-34. doi: 10.1006/viro.1997.8580. PMID: 9201232.
21. McKeever TM, Lewis SA, Smith C, Hubbard R. Vaccination and allergic disease: a birth cohort study. *Am J Public Health*. 2004;94(6):985-9.
22. Moghaddam F, Taghizadeh M, Mansouri R, Dabaghian M. Designing of A Multi-epitope Recombinant Protein, Consisting of Several Conserved Epitopes from Hemagglutinin Protein of the H1N1 and H5N1 Strains of Influenza Virus by Immunoinformatics Approaches. *aunj* 2020; 9 (4) :395-404
23. Neumann G, Kawaoka Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(6):881-6.
24. Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(2):243-67.
25. Pu J, Wang S, Yin Y, Zhang G, Carter RA, Wang J, et al. Evolution of the H9N2 influenza genotype that facilitated the genesis of the novel H7N9 virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 ;112(2):548-53.
26. Skeik N, Jabr FI. Influenza viruses and the evolution of avian influenza virus H5N1. *Int J Infect Dis*. 2008;12(3):233-8.
27. Smith G, Naipospos T, Nguyen T, et al. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology*. 2006;350(2):258-268..
28. Tang Y, Wu P, Peng D, Wang X, Wan H, Zhang P, et al. Characterization of duck H5N1 influenza viruses with differing pathogenicity in mallard (*Anas platyrhynchos*) ducks. *Avian Pathol*. 2009;38(6):457-67.
29. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(1):15-22
30. Wang W, Suguitan AL Jr, Zengel J, Chen Z, Jin H. Generation of recombinant pandemic H1N1 influenza virus with the HA cleavable by bromelain and identification of the residues influencing HA bromelain cleavage. *Vaccine*. 2012;30(5):872-8.
31. Watanabe Y, Arai Y, Daidoji T, Kawashita N, Ibrahim MS, El-Gendy Eel-D, et al. Characterization of H5N1 influenza virus

variants with hemagglutinin mutations isolated from patients. *mBio*. 2015 ;6(2):e00081-15.

32. Webster, Robert G., and Elizabeth Jane Walker. Influenza: The World Is Teetering on the Edge of a Pandemic That Could Kill a Large Fraction of the Human Population. *American Scientist*, 2003; 91(2) : 122-9

33. Yang ZY, Wei CJ, Kong WP, Wu L, Xu L, Smith DF, et al. Immunization by avian H5 influenza hemagglutinin mutants with altered receptor binding specificity. *Science*. 2007;317(5839):825-

8.

34. Yassine HM, Lee CW, Gourapura R, Saif YM. Interspecies and intraspecies transmission of influenza A viruses: viral, host and environmental factors. *Anim Health Res Rev*. 2010; 11(1):53-72.

35. Zhao K, Gu M, Zhong L, Duan Z, Zhang Y, Zhu Y, et al. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China. *Vet Microbiol*. 2013;163(3-4):351-7. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.12.025. Epub 2013 Jan 17. PMID: 23375651.

جدول ۱- شناسه دستیابی سویه‌های منتخب.

سویه	Accession number
Hemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/Iran/B308B/2004(H9N2))]	ABO۰۹۹۱۵
Hemagglutinin [Influenza A virus (A/Poultry/Iran/clade 2344/2018(H5N8))]	MK۹۲۰۱۶۸

جدول ۲- بازیابی توالی‌های پروتئوم دوسویه H5N۸/H۹N۲ با استفاده از پایگاه داده NCBI.

سویه	توالی بازیابی شده
Hemagglutinin [Influenza A virus(A/chicken/Iran/B308B/2004(H9N2)]	MKTISLITILLVVTTSNADKICIGHQSTNSTETVDTLTETNVPVTHAKELLHTEHNGMLCATNLGHPLILDCTIEGLIYGNPSCDLLLGGREWSYIVERPSAVNGTCYPGNVENLEELRTLFSSSSSYQRIQIFPDTIWNVTYTGTSKSCSDSFYRNMRWLTQKNGLYPVQDAQYTNNRGKDILFLWGIHHPPTDTAQTNL YTRDTTTSVTTENLDRTFKPLIGRPLVNGLIGRINYYSVLKPGQTLRVR SNGNLIAPWYGHVLSGESHGRILKTDLNSGNCVVQCQTEKGGLNSTLPFHNISKYAFGTCPKYIGVKSLLKLAIGLRNVPA
hemagglutinin [Influenza A virus (A/Poultry/Iran/clade 2344/2018(H5N8))]	MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLNGVKPLILKDCSVAGWLLGNPMCDFIRVPEWSYIVERANPANDLCYPGSLNDYEELKHLISRINHFELIIPKSSWPNHETSLGVSAACPYQGTSPFFRN VWLIKKNDAYPTIKISYNNNTNREDLLILWGIHHSNNAKEQTNL YKNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSQVNGQRGRMDFFWTILKPNDAIHFESNGNFIAP EYAYKIVKKRDSTIMKSGVEYGH CNTKCQTPVGA INSSMPFHNIHPLTIGEC PKYVKS NKLVLATGLRNSPLRETRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSI IDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVK NLYDKVRLQLRDN AKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNGLSLQCRICI



جدول ۳ - اِپی‌توپ‌های منتخب که در ساختار نهایی پروتئین نو ترکیب استفاده شد.

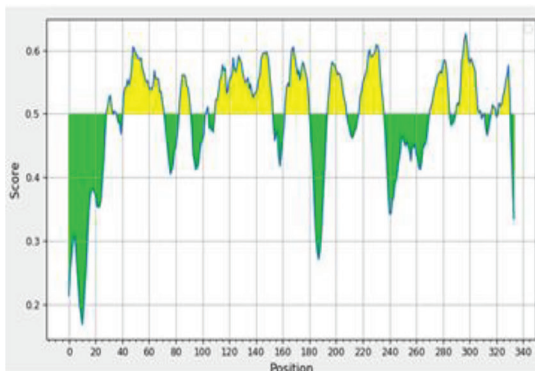
سویه	اِپی‌توپ‌های منتخب
H9N2	DTIWNVTTYTGTSKSCSDSFYNMWLTQKNGLYPVQDAQYTN LWGIHHPPTDTAQTNL YTRTDTTTSVTENLDRTFKPLIGRPLVNLIGRINYYSVLKP NGNLIAPWYGHVLSGE
H5N8	YIVERANPAN SLNDYEELKHLS TSLGVSAACPYQGTPSFFRN VVWLIKNDAYPTIKISYNN TNREDLLILWGIHHSNNA- KEQTNL YKNPTTYSVGTSTLNQRLVPKIATRSQVNGQR ESNGNGFIAPEYAYKIVKKRDSTIMKSGVEYGH CNTKCQTPVGA

جدول ۴ - نتایج امتیاز اِپی‌توپ‌های ایمونوژنیک از پروتئین هم‌گلو تینین.

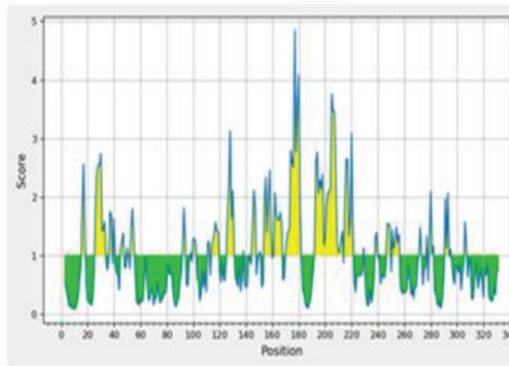
پپتید	اندازه	امتیاز
DTIWNVTTYTGTSKSCSDSFYNMWLTQKNGLYPVQDAQYTN	۴۰	- ۰,۶۹۰۳۹
LWGIHHPPTDTAQTNL YTRTDTTTSVTENLDRTFKPLIGRPLVNLIGRINYYSVLKP	۶۱	۱,۰۳۸۱۲
NGNLIAPWYGHVLSGE	۱۶	- ۰,۳۳۰۱۸
YIVERANPAN	۱۰	- ۰,۲۱۰۰۶
SLNDYEELKHLS	۱۲	- ۰,۰۱۸۶۴
TSLGVSAACPYQGTPSFFRN VVWLIKNDAYPTIKISYNN TNREDLLILWGIHHSNNAKEQTNL YKNPTTYSVGTSTLNQRLVPKIATRSQVNGQR	۹۷	- ۰,۱۷۶۳۷
ESNGNGFIAPE	۱۱	- ۰,۳۳۴۵۲
AYKIVKKRDSTIMKSGVEYGH CNTKCQTPVGA	۳۲	- ۰,۸۶۲۳۸

جدول ۵ - خصوصیات فیزیکی شیمیایی پروتئین نو ترکیب طراحی شده.

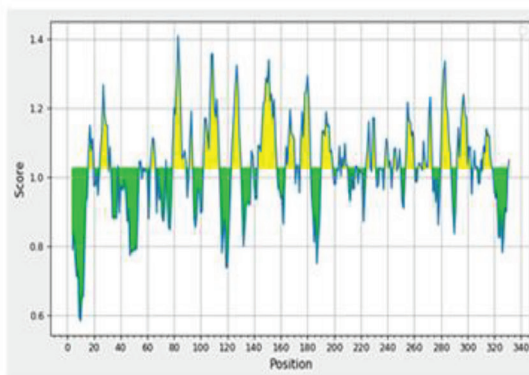
وزن مولکولی (کیلودالتون)	شاخص پایداری	شاخص آلفاتیک	pH ایزوالکتریک	تعداد اسیدهای آمینه	ضریب خاموشی	Gravy
۳۲۴۶۵,۰۹	۱۷,۹۳	۷۱,۴۵	۷,۱۹	۲۹۶	۶۴۰۸۰	- ۰,۵۶۸



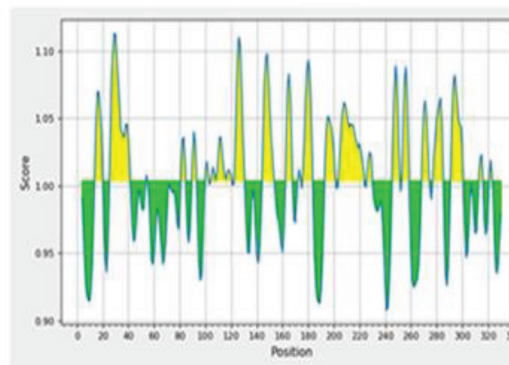
الف



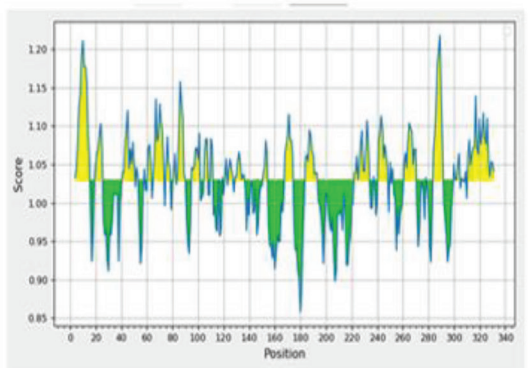
ب



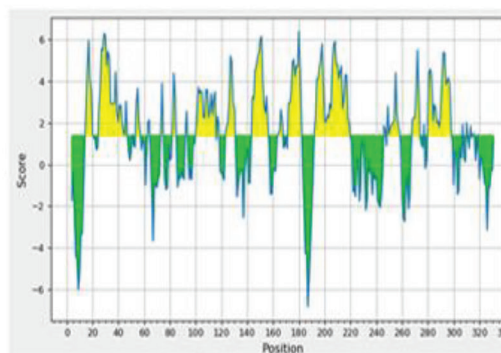
ج



د



ه



و

شکل ۱ - پیش بینی اپی توپ سلول از پروتئین هم‌گلوکوتینین سویه H9N2 که قوی ترین مناطق را به رنگ زرد نشان می دهد. (رنگ زرد ، بالاتر از مقدار آستانه).

ب: پیش بینی Emini با مقدار آستانه ۱,۰۰۰.

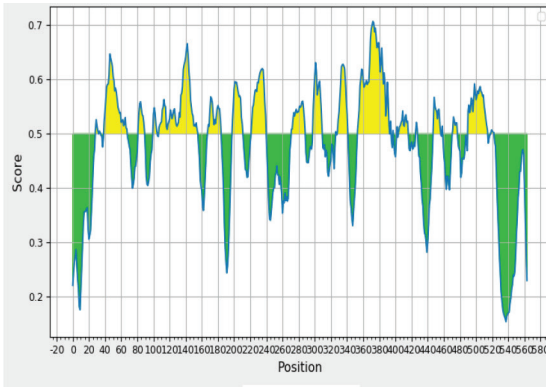
د: پیش بینی Karplus & schulz با مقدار آستانه ۱,۰

و: پیش بینی Parker با مقدار آستانه ۱/۳۸۳

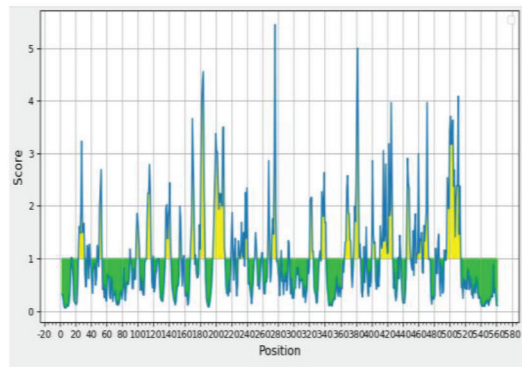
الف: پیش بینی اپی توپ خطی Bepired از سلول B با مقدار آستانه ۰,۰۰.

ج: پیش بینی Chou & fasman با مقدار آستانه ۰,۹.

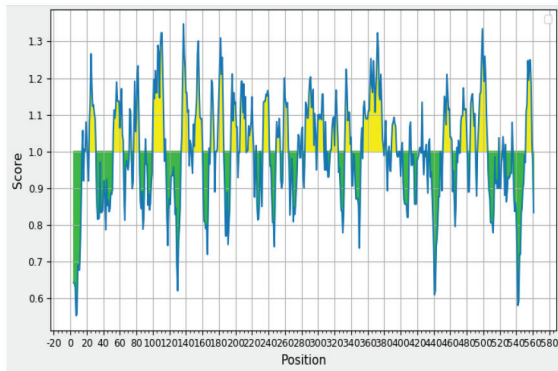
ه: پیش بینی Kolaskar and Tongaonkar با مقدار آستانه ۱/۰۵



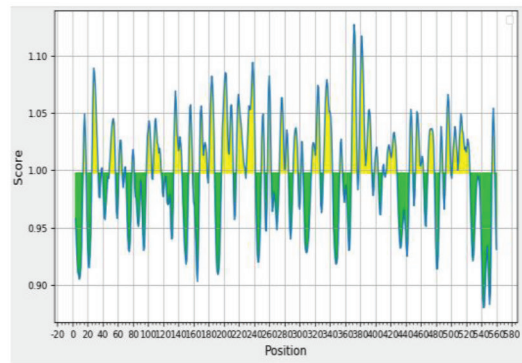
الف



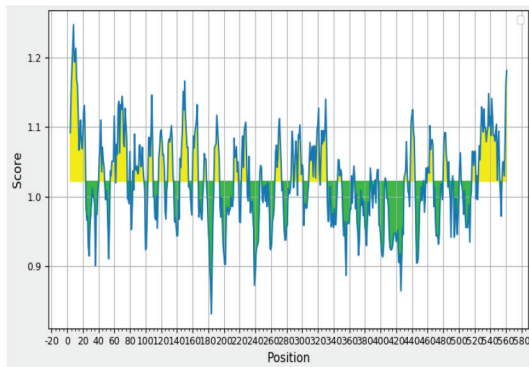
ب



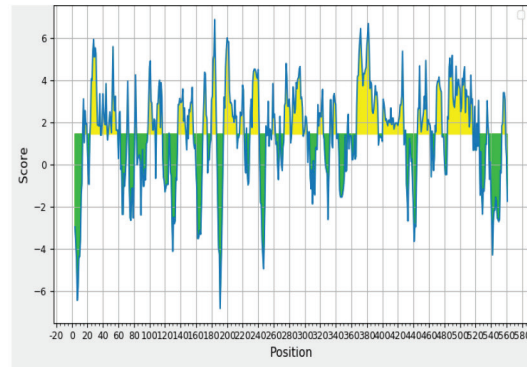
ج



د



ه



و

شکل ۲ - پیش بینی اپی توپ سلول از پروتئین همگلوتینین سویه H5N1 که قوی ترین مناطق را به رنگ زرد نشان می دهد. (رنگ زرد ، بالاتر از مقدار آستانه).

الف: پیش بینی اپی توپ خطی Bepipred از سلول B با مقدار آستانه ۰,۰۰۰.

ب: پیش بینی Emini با مقدار آستانه ۰,۰۰۰.

ج: پیش بینی Chou & fasman با مقدار آستانه ۰,۹.

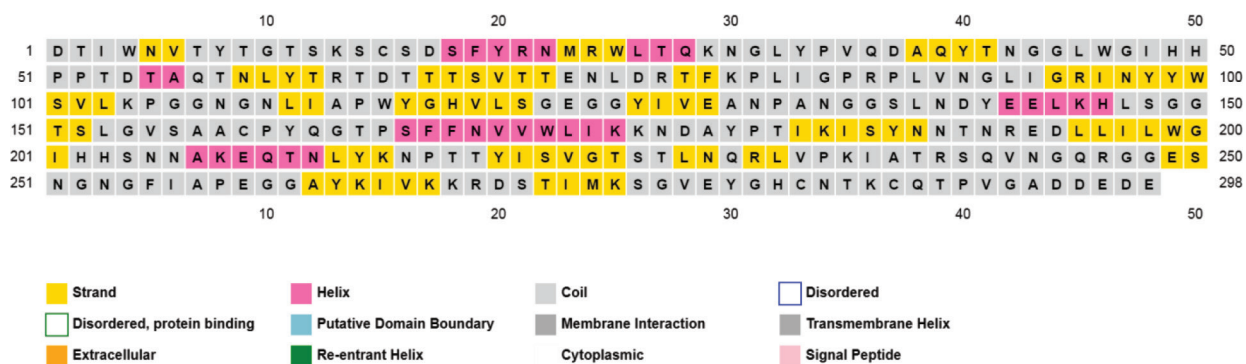
د: پیش بینی Karplus & schulz با مقدار آستانه ۱,۰.

ه: پیش بینی Parker با مقدار آستانه ۰,۰۰.

و: پیش بینی Kolaskar and Tongaonkar با مقدار آستانه ۱/۰۵.



شکل ۳- ساختار اولیه پروتئین نوترکیب بر اساس اپی‌توپ‌های انتخاب شد.



شکل ۴- پیش‌بینی ساختارهای پروتئینی سازه طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار PSIPRED.

