

مقاله پژوهشی

بررسی پتانسیل واکسن بودن پروتئین VceC علیه باکتری بیماری‌زای آبی *Vibrio cholerae* و طراحی واکسن پپتیدی زیرواحدی بر اساس توالی آمینواسیدی این پروتئین با روش‌های تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک

زینب رئوفی^۱، سجاد عبدالهی^{۱*}

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۰

چکیده

Vibrio cholerae یک باکتری بیماری‌زای آبی است که سویه‌های مختلف آن باعث ایجاد بیماری‌هایی چون وبا، اسهال حاد، مننژیت و سپتی‌سمی می‌شوند. با توجه به مقاومت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های گوناگون، تولید واکسن‌های موثر بر تمامی سویه‌های بیماری‌زا می‌تواند یکی از بهترین روش‌های مبارزه باشد. از این رو، در این مطالعه پتانسیل واکسن بودن پروتئین VceC علیه باکتری *V. cholerae* با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت و در کنار تعیین ویژگی‌های آنتی‌ژنی، ویروالانسی و فیزیکوشیمیایی پروتئین نام برده، نقشه‌برداری اپیتوپ‌های B و T به منظور طراحی بهترین واکسن زیرواحدی انجام شد. نتایج نشان داد که این پروتئین دارای ویژگی‌های بهینه از جمله حضور در سطح تمامی سویه‌های مورد مطالعه، پایداری و نیمه عمر بالا، مقاومت به دما و همچنین حلال بودن در هنگام بیش‌بیانی است. همچنین نقاط آنتی‌ژنیک و اپیتوپ‌های خطی و فضایی زیادی در طول توالی و ساختار پروتئین مشاهده شد. با توجه به موقعیت مکانی و ویژگی‌های آنتی‌ژنیک، دو واکسن زیرواحدی خطی و فضایی طراحی شد که می‌توانند علیه بیماری‌زایی سویه‌های مختلف باکتری *V. cholerae* مورد آزمایش و استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: *Vibrio cholerae*، وبا، واکسن، بیوانفورماتیک، نقشه‌برداری اپیتوپ.

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان، بهبهان، ایران.

* نویسنده مسئول: sajadabdollahi@bkatu.ac.ir

مقدمه

رشد است (Drasar and Forrest, 1996). در اکوسیستم‌های آبی، جاندارانی مانند کوپه‌پودها (Colwell and Huq, 2001) و پشه‌های فاقد نیش (Chironomids) (Resende et al., 2016) و همچنین جلبک‌های دریایی (Islam et al., 1988) به عنوان مخازن طبیعی *V. cholerae* شناخته شده‌اند. همچنین اخیراً نشان داده شده است که ماهی‌های سالم نیز می‌توانند حامل این گونه بیماری‌زا باشند. به طوری که حضور گسترده این باکتری در روده ماهیان سالم دریایی و آب شیرین خود گواه این فرضیه است (Halpern and Izhaki, 2017). این باکتری حتی می‌تواند باعث مرگ آبزیان نیز بشود (Rehulka et al., 2015). به طوری که آلودگی با این عوامل بیماری‌زا یا عفونت همزمان با عوامل بیماری‌زای متعدد اغلب منجر به بیماری‌های ماهی می‌شود که می‌تواند منجر به ضررهای اقتصادی جدی بویژه در مزارع کشت با تراکم بالا شود.

از طرفی *V. cholerae* می‌تواند باعث وبا، یک بیماری اسهالی روده‌ای منتقله از آب و عوامل آبی، در انسان شود (Harris, 2012; Yosra et al., 2016). نوشیدن آب آلوده و خوردن آبزیان خام یا نپخته رایج‌ترین راه برای

باکتری‌های جنس *Vibrio* به علت ایجاد بیماری از طریق آب و غذاهای دریایی آلوده، از اهمیت بالایی برای مطالعه برخورد هستند. گونه‌های متعلق به جنس *Vibrio* باسیل‌های خمیده گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، نمک دوست و متحرک هستند که در محیط‌های آبی بویژه نواحی ساحلی یافت می‌شوند. این باکتری‌ها در غلظت‌های ۲ تا ۴ درصد نمک می‌توانند رشد کنند و حتی توانایی تحمل غلظت‌های تا ۸ درصد از نمک را نیز دارند (Deshayes et al., 2015). بقای این باکتری‌ها توسط درجه حرارت و شوری آب تنظیم می‌شود. از این رو، شیوع آنها در آب‌ها و آبزیان در تابستان افزایش می‌یابد (Thompson et al., 2004).

باکتری *Vibrio cholerae* یکی از گونه‌های بیماری‌زای کشنده این جنس است که تقریباً می‌تواند در تمام محیط‌های آبی دریایی و آب شیرین یافت شود و سویه‌های مختلف آن در محیط‌های آبی مانند رودخانه‌ها، حوضچه‌ها، فاضلاب و خورها حضور بسیار گسترده‌ای دارند (Uchiyama, 2000). این باکتری توانایی تحمل گستره بالایی از دما و نمک را دارد و در محدوده دمایی ۴۳-۱۰ درجه سانتی‌گراد قادر به

باعث می‌شوند (Kaper et al., 1995; Thungapathra et al., 2002; Feghali and Adib, 2011; Awasthi et al., 2013; Deshayes et al., 2015). عوامل مختلفی در بیماری‌زایی این سویه‌ها دخیل هستند که می‌توان به پروتئین‌های غشای خارجی اشاره کرد (Elluri et al., 2014). این پروتئین‌ها حدود ۲ تا ۳ درصد از کل محتوای پروتئینی غشای باکتری‌ها را تشکیل می‌دهند و دارای نقش‌های مهمی در ساختمان باکتری و بیماری‌زایی آنها هستند (Schulz, 2002; Wimley, 2002). با توجه به موقعیت قرارگیری آنها در سطح سلول، آنها می‌توانند به عنوان کاندیدای واکسن‌های پروتئینی و پپتیدی نیز در نظر گرفته شوند (Thompson et al., 2002; Hong et al., 2006; Gil et al., 2007).

یکی از رویکردهای مبارزه با *V. cholerae* استفاده از عوامل ضد میکروبی است. اما متاسفانه، ظهور سویه‌های مقاوم چند دارویی (Multi-drug Resistance: MDR) در بین سویه‌های بیماری‌زای این باکتری به عنوان یک مشکل مهم در درمان بیماری مطرح است (Mwansa et al., 2007). در نتیجه باید به دنبال روش‌های موثرتری از جمله آموزش‌های بهداشتی، دسترسی به آب شرب تمیز و

آلوده شدن افراد به این باکتری است (Mookerjee et al., 2015). باکتری‌های *V. cholerae* بر اساس آنتی‌ژن سطحی O به ۲۰۰ گروه سرولوژی تقسیم می‌شوند (Nelson et al., 2009). دو سویه O1 و O139 از این باکتری عامل وبا از طریق تولید سم کلرا یا سم وبا (Cholera Toxin: CT) هستند. این سم نفوذپذیری غشای سلولی اپیتلیال روده را تغییر می‌دهد و منجر به ترشح کنترل نشده آب و الکترولیت به روده کوچک و روده بزرگ می‌شود (Colwell, 2002). سالانه حدود ۱/۳ تا ۴ میلیون نفر به وبا مبتلا می‌شوند که حدود ۲۱۰۰۰ تا ۱۴۳۰۰۰ نفر از مبتلایان در سال در سراسر جهان جان خود را از دست می‌دهند (WHO, 2018). سویه‌های دیگر این باکتری سم کلرا تولید نمی‌کنند و در نتیجه عامل وبا نیستند (Petsaris et al., 2010). اما این سویه‌ها عامل ایجاد بیماری‌های مختلفی بویژه در بیماران دارای نقض ایمنی می‌شوند. در حال حاضر تخمین زده می‌شود که بین ۱ تا ۳/۴ درصد اسهال حاد در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته ناشی از این سویه‌ها است و همچنین بیماری‌هایی مانند گاستروانتریت، سلولیت، مننژیت، اوتیت، عفونت‌های بافت نرم و زخم، سپتی‌سمی و باکتری می را نیز

واکسیناسون رفت. امروزه واکسن‌ها باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان مرگ و میر حاصل از عوامل عفونی شده‌اند.

تا به امروز، سه نوع واکسن خوراکی تجاری بر پایه سلول‌های کامل کشته شده، سلول‌های کامل کشته شده به همراه یکی از زیر واحدهای سم کلرا (CTB) و سلول‌های باکتری ضعیف شده علیه *V. cholerae* در دسترس است (Jertborn et al., 1992, 1993; Richie et al., 2000; Trach et al., 2002; Viret et al., 2004; Elluri et al., 2014). اما تمامی واکسن‌های تجاری شده دارای اشکالاتی مانند ایمنی‌زایی ضعیف، محدودیت تجویز برای نوزادان کمتر از ۶ ماه، اثربخشی پایین در کودکان خردسال و واکنش‌پذیری بالا بویژه در واکسن تزریقی و غیرخوراکی هستند (Levine, 2010). از این رو، با توجه به مشکلات موجود، بررسی و مطالعات لازم به منظور تولید یک واکسن کارا و ایمن باید ادامه یابد. یکی از روش‌های طراحی واکسن، روش واکسن‌شناسی معکوس و طراحی واکسن بر پایه اپیتوپ‌ها است که در آن از پروتئین‌های خارج سلولی ترشحی و یا در معرض واقع در ساختمان میکرواورگانسیم‌های بیماری‌زا استفاده می‌شود (Pastor et al., 2013; Finco and

Rappuoli, 2014). این روش مبتنی بر نرم‌افزارها و روش‌های بیوانفورماتیکی به منظور طراحی واکسن است که بهترین گزینه واکسن را هم از لحاظ اقتصادی و هم ایمنی‌زایی و عدم ایجاد حساسیت و اثرات جانبی، پیش‌بینی می‌کند.

پپتیدها و پروتئین‌ها دارای پتانسیل بالایی برای درمان هستند زیرا بسیار اختصاصی بوده، ماهیتی گزینشی دارند و دارای کمترین عوارض جانبی هستند. بنابراین، استفاده از پروتئین‌ها یا پپتیدهای درمانی به طرز فوق العاده‌ای در مطالعات بالینی در حال افزایش است تا جنبه‌های درمانی بسیاری از مولکول‌های کلیدی که می‌توانند نقش مهمی در تعدیل بیماری‌های کشنده امروزی ایفا کنند، کشف شود (Rauta et al., 2016).

یکی از پروتئین‌های واقع در غشای خارجی *V. cholerae* پروتئین VceC است که در پمپاژ (Efflux) آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد سمی و در نتیجه ایجاد مقاومت دارویی در این باکتری نقش دارد. VceC در واقع یک پروتئین تشکیل دهنده کانال با ساختار سه تایی در غشای خارجی است (Federici et al., 2005). این پروتئین بخشی از پمپ سه جانبه VceABC است که ممکن است *V. cholerae* را در برابر

شد. ساختار سه بعدی پروتئین یاد شده نیز با کد 1YC9 از پایگاه NCBI و قسمت Structure Summary MMDB دریافت شد (Jenuth, 1999).

بررسی میزان یکسانی توالی پروتئین در بین سویه‌ها و گونه‌های مختلف

به منظور تعیین میزان حفاظت بخش بودن پروتئین و درصد یکسانی توالی پروتئین در میان سویه‌ها و گونه‌های مختلف از نرم‌افزار آنالین BLASTp که در پایگاه NCBI موجود است، استفاده شد. در این نرم‌افزار از طریق هم‌ردیف کردن تمامی توالی‌های ثبت شده، میزان ثبت و عدم تغییر یا تغییرپذیری توالی پروتئینی در میان سویه‌ها، گونه‌ها و جنس‌های مختلف تعیین شد. به منظور تعیین میزان یکسانی توالی در میان سویه‌های مختلف، ابتدا در بخش مشخص کردن جاندار، گونه *Vibrio cholerae* (taxid:666) انتخاب شد تا فقط در میان سویه‌های این گونه بررسی صورت پذیرد. سپس توالی پروتئین VceC علیه Non-redundant Protein Sequence (nr) پردازش شد. به منظور بررسی میزان حفاظت توالی پروتئین نام برده در میان گونه‌های مختلف *Vibrio* و یا گونه‌های متعلق به جنس‌های دیگر،

چندین آنتی‌بیوتیک، مواد شوینده و ترکیبات مضر مقاوم کند (Colmer et al., 1998). اهمیت بالای این پروتئین در ساختار باکتری باعث شده است که ساختار سوم و سه بعدی آن در مطالعات گذشته کریستالوگرافی شود (Federici et al., 2005). از این رو، با توجه به موقعیت مکانی این پروتئین و همچنین نقش آن در ویروانس و مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها، در این مطالعه ویژگی‌های آنتی‌ژنی و ایمونوژنی VceC مورد بررسی قرار گرفت و نقاط ایمونوژن در توالی و ساختار آن مشخص شد. همچنین پتانسیل واکسن بودن این پروتئین و اپیتوپ‌های موجود در آن نیز با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و نرم‌افزاری تجزیه و تحلیل شد.

مواد و روش‌ها

دریافت توالی آمینواسیدی و ساختار سوم پروتئین VceC

توالی آمینواسیدی و ژنی مربوط به پروتئین VceC در گونه *Vibrio cholerae* با شماره دستیابی WP_088129296.1 از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (National Centre for Biotechnology Information: NCBI) (Jenuth, 1999) با فرمت FASTA دریافت

و SignalP 5 (Armenteros et al., 2019) که پپتید نشانه و نوع آن را نیز پیش‌بینی می‌کند، برای تشخیص توالی مکانی پپتید نشانه و جایگاه برش آن استفاده شد.

شناسایی دامین‌های عملکردی و حفاظت شده در ساختار و توالی پروتئین

به منظور شناسایی دامین‌های حفاظت شده در توالی پروتئین، نرم‌افزارهای آنلاین NCBI Conserved CDD/SPARCLE (Domain Database) و Pfam 33.1 به کار گرفته شدند. CDD/SPARCLE از طریق اسکن یک سری از دامین‌های از قبل محاسبه شده (Marchler-Bauer et al., 2016; Lu et al., 2020) و Pfam از طرق مختلف از جمله هم‌ردیفی توالی‌های متعدد دامین‌ها (El-Gebali et al., 2019)، پیش‌بینی را انجام داد.

تعیین موقعیت مکانی در سلول

از سرور آنلاین CELLO که از یک سیستم دارای ۱۴۴۴ توالی پروتئینی به عنوان پایگاه داده استاندارد استفاده می‌کند (Yu et al., 2006) و Gneg-mPLOC و یک سرور اختصاصی برای شناسایی موقعیت مکانی پروتئین‌ها در باکتری‌های گرم منفی است (Shen and Chou, 2010)، به منظور

گونه *Vibrio cholerae* (taxid:666) و یا جنس *Vibrio* (taxid:662) حذف شد و پردازش همانند مرحله قبل صورت گرفت. به منظور دریافت توالی‌های بیشتر، در بخش پارامترها، بیشترین توالی هدف ۵۰۰۰ انتخاب شد. حد آستانه مورد انتظار نیز ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

بررسی درصد شباهت پروتئین VceC با محتوای کل پروتئینی بدن انسان و موش

با توجه به این که شباهت یک پروتئین خارجی با پروتئین‌های میزبان می‌تواند مشکلاتی مانند عدم ایجاد ایمنی مناسب یا حتی سبب ایجاد بیماری‌های خود ایمنی در میزبان شود، از این رو میزان شباهت توالی آمینواسیدی پروتئین VceC با پروتئین‌های انسان و یا موش از طریق نرم‌افزار BLASTp مورد بررسی قرار گرفت و در قسمت جاندار انسان *Homo sapiens* (taxid: 9606) یا موش (taxid: 10088) انتخاب شد.

تعیین موقعیت پپتید نشانه و جایگاه برش آن

از سرور LIPOP 1.0 (Juncker et al., 2003) که یک سرور اختصاصی برای پیش‌بینی پپتید نشانه (Signal Peptide) لیپوپروتئین‌ها و دیگر پروتئین‌های باکتری‌های گرم منفی است

مورد مطالعه، ابتدا توالی پپتید نشانه حذف شد و در مرحله بعد آنالیز صورت گرفت.

تخمین میزان سمی و آلرژن بودن پروتئین برای انسان

به منظور پیش‌بینی این که آیا پروتئین مورد مطالعه برای انسان حساسیت‌زا است یا خیر، از نرم‌افزار AlgPred 2.0 استفاده شد (Sharma et al., 2020). بررسی میزان سمی بودن پروتئین برای انسان نیز توسط نرم‌افزار ToxinPred صورت گرفت. در این نرم‌افزار بعد از تبدیل پروتئین به توالی‌های کوتاه پپتیدی، میزان سمیت هر توالی مورد بررسی قرار گرفت (Gupta et al., 2013).

بررسی پتانسیل ویرولانسی و آنتی‌ژن بودن پروتئین و پیش‌بینی نقاط آنتی‌ژن در توالی آن از VirulentPred که یک نرم‌افزار پیش‌بینی کننده میزان حدت و ویرولانسی باکتری‌ها است به منظور تعیین ویرولانسی بودن پروتئین استفاده شد (Garg and Gupta, 2008). همچنین آنتی‌ژن بودن پروتئین و مشخص کردن نقاط آنتی‌ژنیک موجود در توالی آن به ترتیب توسط سرورهای VaxiJen v2.0 و Antigenic Peptide Prediction Tool صورت پذیرفت.

پیش‌بینی موقعیت مکانی پروتئین VceC استفاده شد.

بررسی میزان حلالیت پروتئین بعد از بیش‌بینی در میزبان

با توجه به این که ممکن است پروتئین بعد از بیش‌بینی توسط وکتور بیانی در میزبان به صورت غیرمحلول در سلول میزبان تجمع یابد، لازم است میزان حلالیت پروتئین بیش‌بین شده بررسی شود، از این رو برای بررسی میزان حلالیت پروتئین VceC بعد از بیش‌بینی در میزبان *Escherichia coli*، نرم‌افزار SOLpro به کار گرفته شد (Magnan et al., 2009).

تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین VceC

نرم‌افزار Expasy's ProtParam به منظور تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین VceC مانند وزن مولکولی، تعداد آمینواسیدها، ترکیب آمینواسیدی، شاخص ناپایداری، شاخص آلیفاتیک و نیمه عمر پروتئین در میزبان‌های مخمر و *E. coli*، به کار گرفته شد (Gasteiger et al., 2005). از آنجایی که پپتید نشانه در ساختار پروتئین جایی ندارد و قبل از تشکیل ساختار نهایی از پروتئین جدا می‌شود، به منظور تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین

2008) انجام شد. این نرم‌افزارها نیز از اپیتوپ‌های تعیین شده از طریق روش اشعه ایکس کمک می‌گیرند.

پیش‌بینی اپیتوپ‌های سلول T

با توجه به ارائه آنتی‌ژن توسط مجموعه سازگاری بافتی اصلی کلاس I و II (MHC I, II) به سلول‌های T، اپیتوپ‌های عرضه شونده توسط هر دو کلاس توسط نرم‌افزار MHCpred ورژن ۲ (Hattotuwigama et al., 2004) پیش‌بینی شد. از EpiTOP3 نیز به منظور پیش‌بینی اپیتوپ‌های کلاس II استفاده شد. اپیتوپ‌های متصل شونده به یک سروتیپ از MHC-II با نام HLA-DRB1 در این نرم‌افزار شناسایی شدند.

بررسی اپیتوپ‌های پیش‌بینی شده و معرفی

بهترین زیرواحدهای محرک سیستم ایمنی

به منظور انتخاب بهترین اپیتوپ‌ها، ابتدا تمامی اپیتوپ‌های بالقوه پیش‌بینی شده هم‌تراز شدند و اپیتوپ‌های مشترک در بین نتایج مربوط به اپیتوپ‌های سلول‌های B و T مشخص شد. موقعیت مکانی اپیتوپ‌های انتخاب شده بررسی شد و همچنین حضور این اپیتوپ‌ها در مناطق آنتی‌ژنیک بالقوه نیز چک شد. در انتها،

بررسی توپولوژی و مشخص کردن نقاط واقع شده در خارج از ساختار باکتری

با توجه به این که ساختار سوم پروتئین VceC قبلاً کریستالوگرافی و ثبت شده است، بنابراین از سرور Structure Summary MMDB به منظور بررسی توپولوژی ساختار پروتئین و تعیین نقاط پروتئینی واقع در بخش خارج سلولی استفاده شد (MMDB ID: 32059) (Madej et al., 2014).

نقشه‌برداری از اپیتوپ‌های سلول B

از نرم‌افزارهای Bepipred-1.0 (Larsen) BepiPred-2.0 (et al., 2006) و SVMTriP (Yao et al., 2017) به منظور تعیین اپیتوپ‌های خطی از روی توالی پروتئین استفاده شد. در این مطالعه حد آستانه تعیین شده توسط سرور BepiPred-2.0 به کار گرفته شد و همچنین طول اپیتوپ ۱۲ آمینواسید در سرور SVMTriP انتخاب شد.

پیش‌بینی اپیتوپ‌های خطی و همچنین غیرپیوسته و فضایی از روی ساختار سوم پروتئین VceC توسط نرم‌افزار آنلاین DiscoTope 2.0 (Kringelum et al., 2012) و Ellipro (Ponomarenko et al.,)

میزان شباهت واکسن‌های طراحی شده دوباره با پروتئین‌های انسانی مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین میزان حلالیت آن بعد از بیش‌ببانی در میزبان نیز بررسی شد.

بررسی کلونینگ پروتئین VceC و واکسن‌های زیرواحدی طراحی شده در وکتور pET-28a(+)

به منظور تولید پپتید مورد نظر، هر یک از واکسن‌های زیرواحدی و همچنین پروتئین VceC در وکتور بیانی (+) pET-28a کلون شوند که توسط آنزیم‌های برشی اندونوکلئازی صورت گرفت. تعیین آنزیم‌های برشی که توالی آنها باید به ابتدای ۵' و انتهای ۳' قطعه ژنی مورد نظر اضافه شد، بر اساس جایگاه کلونینگ چندگانه (Multiple Cloning Site: MCS) وکتور و با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier 5 انجام شد. بررسی این که آیا کلونینگ پروتئین نامبرده و واکسن‌های زیرواحدی در وکتور (+) pET-28a با موفقیت همراه بود و همچنین آیا وکتور حاوی قطعه مورد نظر در میزبان باکتریایی *E. coli* BL21-DE3 به درستی بیان شد، از نرم‌افزار SnapGene 5.3.2 استفاده شد.

اپیتوپ‌های آنتی‌ژنیک مشترک که در خارج از سلول حضور دارند، به عنوان اپیتوپ‌های اصلح انتخاب شدند و میزان آنتی‌ژن‌سیته و شباهت آنها با پروتئین‌های انسانی بررسی شد تا بهترین اپیتوپ معرفی شود.

طراحی واکسن زیرواحدی

برای طراحی یک واکسن زیرواحدی کارا و موثر متشکل از اپیتوپ‌های خطی، اپیتوپ‌های انتخاب شده شماره یک و سه از طریق لینکر GGGGS به هم متصل شدند. از این لینکر برای جلوگیری از بهم ریختن فولدینگ و تاخوردگی صحیح پپتیدهای زیرواحدی استفاده شد که همزمان و به طور پیوسته بیان می‌شدند. یک واکسن زیرواحدی بر پایه اپیتوپ‌های پیش‌بینی شده غیرپیوسته نیز طراحی شد. کدون‌های توالی آمینواسیدی واکسن غیرپیوسته بر اساس میزبان بیانی مورد استفاده که در این مطالعه بر مبنای *Escherichia coli* (Grote et al., 2005) بود، توسط نرم‌افزار JCat (Grote et al., 2005) به صورت بهینه به توالی ژنی برگردانده شد. سپس میزان آنتی‌ژن‌سیته، ویرولاسی و

نتایج

میزان حفاظت توالی پروتئین در بین سویه‌ها و

گونه‌های مختلف

بررسی نتایج به دست آمده از هم ردیفی نشان داد که دو سویه بیماری‌زای عامل وبا (O1 و O139) در کنار بیش از ۱۰۰۰ سویه مورد بررسی حاوی ژن مربوط به توالی پروتئینی VceC بودند و توالی این پروتئین نیز در میان سویه‌های مورد مطالعه به شدت حفاظت شده بود و درصد یکسانی بسیار بالایی داشت. نتایج همچنین حاکی از حفاظت توالی پروتئین در دیگر گونه‌های مربوط به جنس *Vibrio* بود، به طوری که گونه‌های *V. metoecus*، *V. furnissii*، *V. fluvialis*، *V. diazotrophicus*، *V. cincinnatiensis* و *V. ziniensis* و *V. plantisponsor* میزان یکسانی توالی بالای ۷۰ درصد با پوشش بالای ۹۵ درصد را نشان دادند. میزان شباهت تقریباً بالایی در دیگر گونه‌های مربوط به این جنس نیز مشاهده شد. اما شباهتی در میان گونه‌های مربوط به جنس‌های دیگر مشاهده نشد.

میزان شباهت توالی پروتئین مورد مطالعه با

پروتئین‌های بدن انسان و موش

نتایج به دست آمده از هم ردیفی حاکی از عدم وجود کوچکترین شباهتی بین پروتئین VceC و محتوای پروتئینی انسان و موش بود.

پیتید نشانه و جایگاه برش آن

هر دو نرم‌افزار به کار گرفته شده در این مطالعه نشان دادند که آمینواسیدهای شماره ۱ تا ۳۰ پیتید نشانه بودند و جایگاه برش آن نیز بین آمینواسیدهای ۳۰ و ۳۱ واقع شده بود. همچنین نشان داده شد که این پیتید نشانه متعلق به یک لیپوپروتئین بود که با سیگنال پیتیداز نوع II برش داده شد.

دامین‌های حفاظت شده و عملکردی

بررسی نتایج نشان از وجود دامین مربوط به انتشار به خارج موجود در پروتئین‌های غشای خارجی (Outer Membrane Efflux Protein) و فاکتور غشای خارجی (Outer Membrane Factor: OMF) لیپوپروتئین که در انتقال مواد از غشای باکتری‌های گرم منفی نقش دارد، در ساختار پروتئین VceC داشت.

۹۰/۷۰ تعیین شد. همچنین نیمه عمر این پروتئین در میزبان‌های مخمری و *E. coli* به ترتیب بالای ۲۰ و ۱۰ ساعت تخمین زده شد.

میزان آلرژن و سمی بودن پروتئین برای انسان نتایج به دست آمده نشان داد که پروتئین VceC برای انسان سمی و حتی آلرژن و حساسیت‌زا نیست.

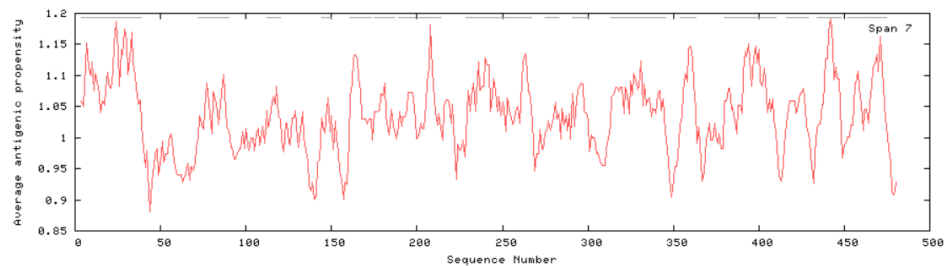
ویرولان‌س و آنتی‌ژن بودن VceC و معرفی نقاط آنتی‌ژنیک آن

با بررسی صورت گرفته مشخص شد که پروتئین مورد مطالعه یکی از عوامل ویرولانسی و موثر در بیماری‌زایی باکتری *V. cholerae* به شمار می‌رود که دارای خاصیت آنتی‌ژنیک با میانگین بالای ۱ (۱,۰۰۳۳) بود (شکل ۱) و ۱۷ نقطه آنتی‌ژنیک نیز در توالی این پروتئین مشاهده شد (جدول ۱).

مکان قرارگیری پروتئین VceC در سلول *Vibrio cholerae* با توجه به نتایج به دست آمده از نرم‌افزار CELLO، پروتئین VceC در غشای خارجی واقع شده بود.

حلالیت پروتئین VceC بعد از بیش‌بیانی نرم‌افزار SOLpro نشان داد که پروتئین هدف بعد از کلون و بیش‌بیانی در میزبان *E. coli* با درصد پیش‌بینی بالا به صورت محلول بود.

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین VceC ساختار پروتئین VceC از ۴۵۴ آمینواسید تشکیل شده بود و وزن مولکولی آن ۴۸/۹۷ کیلودالتون بود. شاخص ناپایداری پروتئین ۳۹/۵۴ محاسبه شد که نشان از پایدار بودن پروتئین دارد. همچنین شاخص آلیفاتیک آن



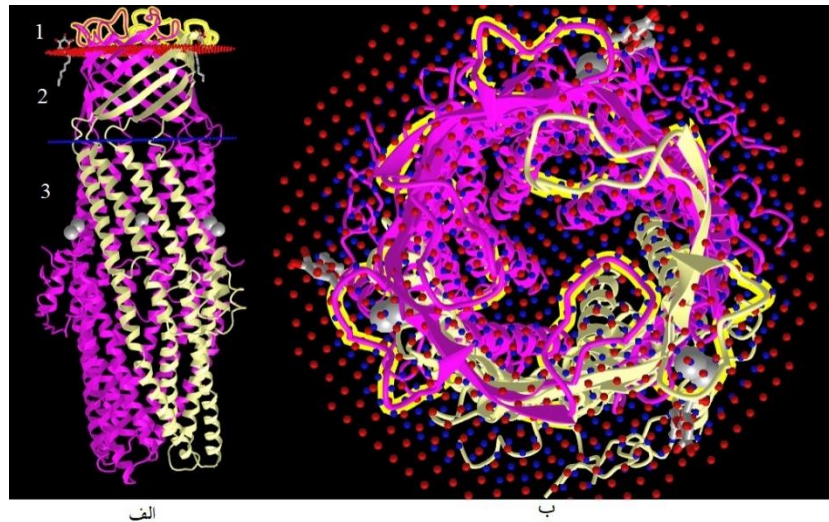
شکل ۱: نمودار آنتی‌ژنیک توالی پروتئین VceC. عدد بزرگ‌تر نشان دهنده قدرت آنتی‌ژنیک بالاتر است.

جدول ۱: توالی نقاط آنتی‌ژنیک بالقوه در پروتئین VceC

| شماره | نقطه آغاز | توالی | نقطه پایان |
|-------|-----------|---|------------|
| ۱ | ۴ | SVQTVGLLHKAAPYFTASLLSAFVLTGCSVLDHYPD | ۳۹ |
| ۲ | ۷۲ | YQDAQLNHLIEEALQHSPS | ۹۰ |
| ۳ | ۱۱۲ | RSFDLGLAA | ۱۲۰ |
| ۴ | ۱۴۴ | GTLTLNF | ۱۵۰ |
| ۵ | ۱۶۱ | RAAVVAATSELAA | ۱۷۳ |
| ۶ | ۱۷۵ | EAESVAARLMIST | ۱۸۷ |
| ۷ | ۱۸۹ | IANAYAELARL | ۱۹۹ |
| ۸ | ۲۰۱ | ANQETVHAALQVRN | ۲۱۴ |
| ۹ | ۲۲۹ | ETLGSVSQAKAVAASVEAELLGIQESIQLQKNALAALVG | ۲۶۷ |
| ۱۰ | ۲۷۵ | SIEEPHITL | ۲۸۳ |
| ۱۱ | ۲۹۱ | SEAGVGLLGH | ۳۰۰ |
| ۱۲ | ۳۱۳ | AAAQQVGIAQAQFYPDVTLSAFEYQAFGLDHL | ۳۴۵ |
| ۱۳ | ۳۵۴ | AIGPAIYLPL | ۳۶۳ |
| ۱۴ | ۳۸۰ | YQEAVAQYNGTLVQALHEVADVVTSSQALQA | ۴۱۰ |
| ۱۵ | ۴۱۶ | EQAVQQAQALHIA | ۴۲۹ |
| ۱۶ | ۴۳۴ | QGGLATYLDVLAEE | ۴۴۸ |
| ۱۷ | ۴۵۲ | NNQRALVNLQSRFSLDLALIHAI | ۴۷۵ |

توپولوژی پروتئین و مناطق واقع شده در خارج سلول و لوله ماندی را در غشا ایجاد می‌کنند. در هر نسخه از پروتئین دو لوپ خارج سلولی با طول ۱۷ و ۱۴ آمینواسید وجود دارد که با توجه به ساختار سه تایی، در مجموع شش لوپ خارج غشایی را در ساختار باکتری می‌توان داشت (شکل ۲).

بررسی توپولوژی پروتئین نشان داد که پروتئین نام برده به صورت تریمریک یا سه تایی بیان می‌شود. یعنی در واقع سه نسخه از پروتئین به صورت همزمان و در کنار هم در ساختار غشایی پروتئین بیان می‌شود که ساختار بشکه



شکل ۲: نمایش توپولوژی پروتئین VceC در ساختار باکتری با بیان سه تایی. الف) نمایش عمودی پروتئین در ساختار باکتری که توالی‌های واقع شده در خارج سلول در ناحیه ۱ با رنگ زرد به نمایش درآمده است، ۱: فضای خارج سلولی؛ ۲: فضای پریپلاسمی؛ ۳: فضای داخل سلولی. ب: تصویر بزرگ شده و از بالای پروتئین که نشان دهنده ایجاد حفره در غشای باکتری از طریق بیان سه تایی پروتئین است.

همچنین این ناحیه به عنوان یک منطقه بالقوه اپیتوپی در نظر گرفته می‌شود (شکل ۴). نتایج به دست آمده از Ellipro نشان از وجود ۷ اپیتوپ پیوسته و خطی در ساختار پروتئین دارد (جدول ۴). همچنین بررسی ساختار توسط این نرم‌افزار تعداد ۷ اپیتوپ غیرپیوسته و فضایی را مشخص کرد که بهترین اپیتوپ با بیشترین امتیاز (۰/۷۷) در شکل ۵ نمایش داده شده است.

اپیتوپ‌های پیش‌بینی شده سلول B

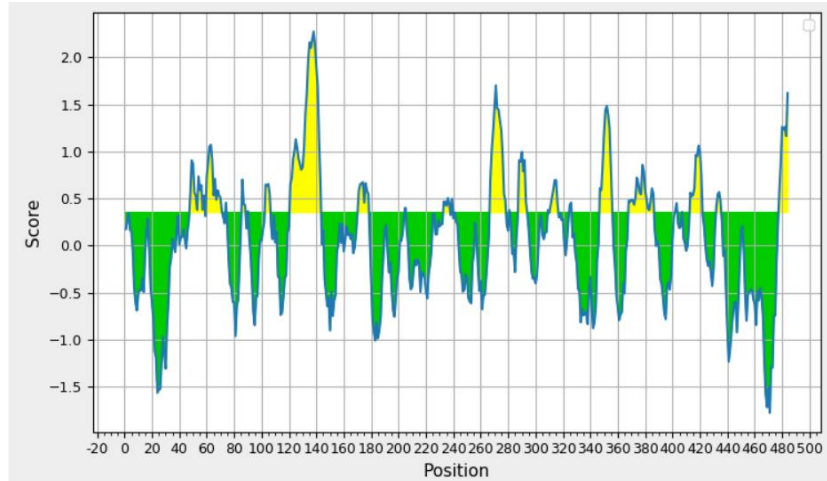
SVMTriP تعداد ۱۰ اپیتوپ را در توالی VceC پیش‌بینی کرد (جدول ۲). ۱۳ اپیتوپ بالقوه با طول بیش از ۴ آمینواسید نیز توسط Bepipred-1.0 در توالی پروتئین شناسایی شد (جدول ۳) که امتیاز و درجه قدرت هر یک از اپیتوپ‌ها در شکل ۳ نمایش داده شده است. بررسی ساختاری پروتئین مورد مطالعه با DiscoTope نشان دهنده وجود یک اپیتوپ بسیار قوی در منطقه خارج غشایی است.

جدول ۲: اپیتوپ‌های خطی سلول B، پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار SVMTriP. نتایج بر اساس قوی‌تر بودن اپیتوپ ردیف شده است.

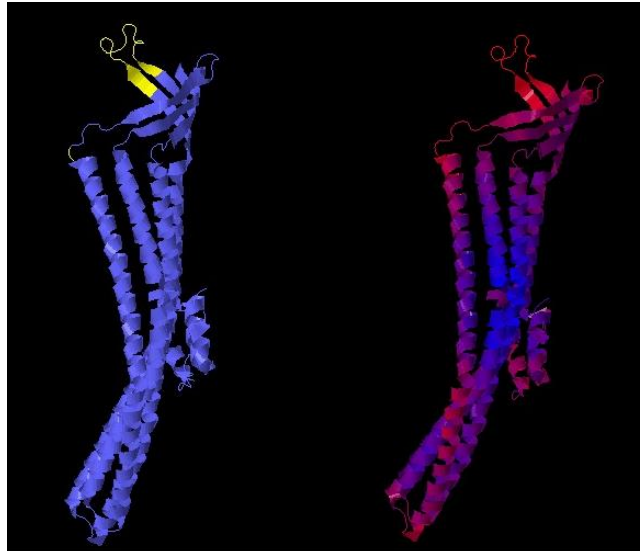
| ترتیب | موقعیت شروع | اپیتوپ |
|-------|-------------|--------------|
| ۱ | ۴۶۴ | AFSLDLALIHAI |
| ۲ | ۲۲۵ | AFVLTGCSVLDH |
| ۳ | ۱۸۰ | AARLMISTSIAN |
| ۴ | ۲۱۲ | VRNKTVELLEKR |
| ۵ | ۳۳۹ | AFGLDHLFDSGN |
| ۶ | ۱۰۹ | GAIRSFDLGLAA |
| ۷ | ۲۹۵ | VGLLGHRADITA |
| ۸ | ۲۴۰ | VAASVEAELGI |
| ۹ | ۷۴ | DAQLNHLIEEAL |
| ۱۰ | ۳ | NSVQTVGLLHKA |

جدول ۳: اپیتوپ‌های پیش‌بینی شده توسط سرور Bepipred-1.0. نتایج بر اساس موقعیت قرارگیری اپیتوپ ردیف شده است و اپیتوپ‌های با طول کمتر از ۴ آمینواسید گزارش نشده است.

| شماره | آغاز | پایان | پپتید | طول |
|-------|------|-------|-------------------------|-----|
| ۱ | ۴۸ | ۵۸ | ELSSNTTFSHQ | ۱۱ |
| ۲ | ۶۰ | ۷۱ | EMDWPSANWWQR | ۱۲ |
| ۳ | ۱۰۳ | ۱۰۶ | GFAR | ۴ |
| ۴ | ۱۲۱ | ۱۴۳ | SATESKVSERYQSATPPDGWNDY | ۲۳ |
| ۵ | ۱۷۱ | ۱۷۸ | LAAAEAES | ۸ |
| ۶ | ۲۳۳ | ۲۳۷ | SVSQA | ۵ |
| ۷ | ۲۶۷ | ۲۷۸ | GQGPDRASIEE | ۱۲ |
| ۸ | ۲۸۸ | ۲۹۳ | GLPSEA | ۶ |
| ۹ | ۳۱۱ | ۳۱۶ | AEAAAQ | ۶ |
| ۱۰ | ۳۴۷ | ۳۵۶ | DSGNDAGAIG | ۱۰ |
| ۱۱ | ۳۶۸ | ۳۸۶ | RLEGQLTSAEARYQEAVAQ | ۱۹ |
| ۱۲ | ۴۱۳ | ۴۲۱ | NKTEQAVQQ | ۹ |
| ۱۳ | ۴۳۲ | ۴۳۴ | RYQG | ۴ |



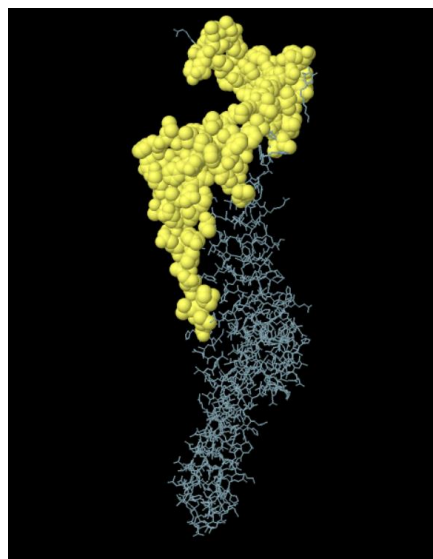
شکل ۳: امتیاز تعلق گرفته به توالی پروتئین VceC از لحاظ پتانسیل اپیتوپ بودن. هرچه امتیاز تعلق گرفته مثبت تر باشد، نشان از قوی تر بودن اپیتوپ دارد.



شکل ۴: اپیتوپ‌های ساختاری پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار DiscoTope. مناطق بالقوه اپیتوپ در تصویر راست با رنگ قرمز مشخص شده است و اپیتوپ‌های پیوسته در سمت چپ با رنگ زرد نمایش داده شده است.

جدول ۴: اپیتوپ‌های پیوسته و خطی بیش‌بینی شده توسط Ellipro

| امتیاز | اپیتوپ | پایان | آغاز | شماره |
|--------|--|-------|------|-------|
| ۰/۸۷۷ | LGLAASATESKVSERYQSATPPDGWNDYGTLTLN | ۱۴۹ | ۱۱۶ | ۱ |
| ۰/۷۸۶ | LQVRNKTVELLEKRYANGLETLGVSQAKAVAASVEA | ۲۴۶ | ۲۱۰ | ۲ |
| ۰/۷۴ | VGIAQAQFYDPVTLSAFIGYQAFGLDHLFDSGNDAGAIG PAIYLPLFTGGRLEGQLTSAEARYQ | ۳۸۱ | ۳۱۸ | ۳ |
| ۰/۶۹۲ | QALHIATNRYQGGLATYLDVLAEE | ۴۴۸ | ۴۲۴ | ۴ |
| ۰/۶۳۰ | LTSRYVGL | ۲۹۷ | ۲۸۳ | ۵ |
| ۰/۶۰۸ | FDFWG | ۱۵۸ | ۱۵۴ | ۶ |
| ۰/۵۷۳ | QGPDRAASIEE | ۲۷۸ | ۲۶۸ | ۷ |



شکل ۵: بهترین اپیتوپ فضایی غیر پیوسته بیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار Ellipro

اپیتوپ‌های بیش‌بینی شده سلول T
 با توجه به وجود ال‌های متعدد برای MHC
 کلاس یک و دو، تعداد بالایی از اپیتوپ عرضه
 شونده توسط هر یک از دو کلاس، توسط
 نرم‌افزارهای مورد استفاده برای پروتئین VceC
 بیش‌بینی شد که در بخش بعدی مطالعه مورد
 استفاده قرار گرفتند.

اپیتوپ‌های خطی و همچنین بر مبنای اپیتوپ‌های غیر پیوسته در جدول ۵ نمایش داده شده است. توالی ژنی واکسن غیرپیوسته بر مبنای میزبان *E. coli* توسط JCat بهینه‌سازی شد.

بررسی کلونینگ پروتئین VceC و واکسن‌های زیرواحدی طراحی شده در وکتور (+) pET-28a با استفاده از نرم‌افزار 5 Primer Premier با توجه به عدم برش قطعات، آنزیم‌های برشی *BamH1* و *Sac1* برای ابتدا و انتهای قطعات ژنی انتخاب شدند. نتایج به دست آمده از SnapGene نشان می‌دهد که کلونینگ قطعات در وکتور (+) pET-28a و بیان آنها در میزبان *E. coli* BL21-DE3 می‌تواند به درستی صورت گیرد (شکل ۶).

بحث

باکتری *Vibrio cholerae*، یک باسیل کاما شکل و بومی محیط‌های آبی است که از طریق آب یا غذای آلوده به انسان منتقل می‌شود، که سویه‌های مختلف آن باعث ایجاد بیماری‌های گوناگون و حتی مرگ‌آور از جمله وبا در انسان و دیگر جانوران و آبزیان می‌شود.

اپیتوپ‌های برتر و بهترین اپیتوپ محرک سیستم ایمنی

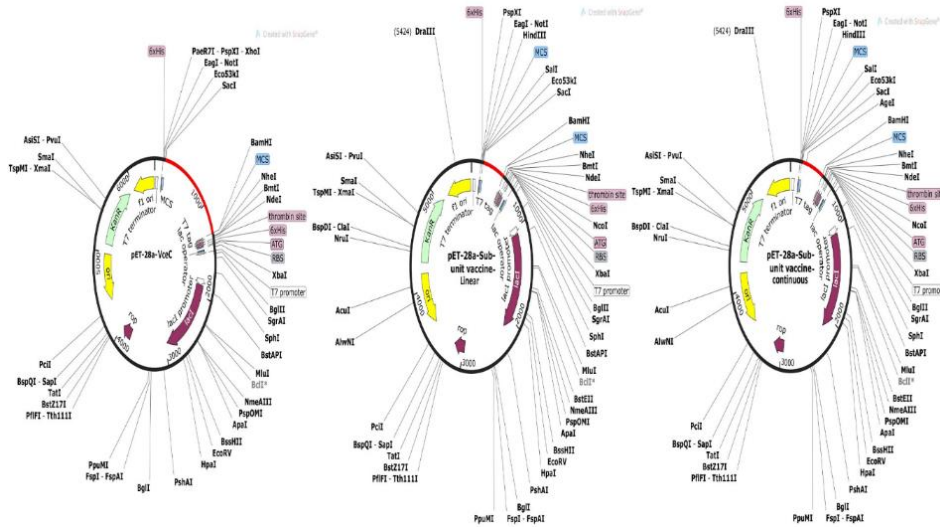
پس از بررسی تمام اپیتوپ‌های پیش‌بینی شده، توالی‌های 5'-GAIRSFDLGLA-109 ASATESKVSERYQSATPPDGWN 230-5' TLGSV .DYGTLTLNF3'-150 SQAKAVAASVEAELLIQESIQL QKNALAALVGQGPDRASIEEPH 313-5' AAAQQVGIAQAQF و 3'-280 YPDVTLSAFIGYQAFGLDHLFDS GNDAGAIG3'356 به عنوان زیرواحدهای بالقوه تحریک کننده سیستم ایمنی (سلول‌های B و T) انتخاب شدند که با توجه به موقعیت قرارگیری در سطح سلول، اپیتوپ اول و سوم اپیتوپ‌های برتر بودند و پس از بررسی‌های صورت گرفته از لحاظ آنتی‌ژنسیته و قدرت تحریک سیستم ایمنی، توالی اول به عنوان بهترین زیر واحد معرفی شد و توالی ESKVSERYQSATPPDGWND نیز به عنوان بهترین اپیتوپ خطی کوتاه معرفی شد.

واکسن‌های زیر واحدی طراحی شده

توالی آمینواسیدی و ژنی واکسن‌های زیرواحدی طراحی شده در این مطالعه بر مبنای

جدول ۵: توالی آمینواسیدی و ژنی واکسن‌های طراحی شده. توالی لینکر به صورت زیر خط‌دار نشان داده شده است و توالی آنزیم‌های برشی نیز با رنگ زرد به نمایش در آمده است

| نام واکسن | توالی آمینواسیدی | توالی بازی |
|---|--|--|
| واکسن زیرواحدی بر مبنای اپیتوپ‌های خطی | GAIRSFDLGLAASATESKVSERYQSATP PDGWNDYGTLLNFGGGGSAQAQVVG IAQAQFYPDVTLSAFIGYQAFGLDHLFD SGNDAGAIG | GGATCC GGCGCAATTCGATCATTG ATCTCGGGTTAGCGGCATCCGCCAC GGAAAGTAAAGTCAGTGAACGTTA TCAATCTGCTACGCCTCCCGATGGT TGGAATGACTATGGCACTCTAACCT TGAATTT GGTGGTGGTGGTTCTG CCGCAGCACAGCAAGTCGGTATTG CGCAAGCACAAATCTATCCAGATGT CACTTGTGTCAGCGTTATTGGTTAT CAGGCATTTGGTCTGGATCATTGT TTGATAGTGGTAATGACGCAGGTG CAATTGGG GAGCTC |
| واکسن زیرواحدی بر مبنای اپیتوپ‌های غیر پیوسته | L116, G117, L118, A119, A120, S121, A122, T123, E124, S125, K126, V127, S128, E129, Y131, Q132, S133, A134, T135, P136, P137, D138, G139, W140, N141, D142, Y143, G144, T145, L146, T147, L148, N149, F154, D155, F156, W157, G158, R161, A315, V318, G319, A321, Q322, A323, Q324, F325, Y326, P327, D328, V329, L331, A333, F334, I335, G336, Y337, Q338, A339, F340, G341, L342, D343, H344, L345, F346, D347, S348, G349, N350, D351, A352, G353, A354, I355, G356, P357, A358, I359, Y360, L361, P362, L363, F364, T365, G366, G367, R368, L369, E370, G371, Q372, L373, T374, S375, A376, E377, A378, Y380, Q381, V384, A385, N388, L391, V392, | GGATCC CTGGGTCTGGCTGCTTCTG CTACCGAATCTAAAGTTTCTGAATA CCAGTCTGCTACCCCGCCGGACGGT TGGAACGACTACGGTACCCTGACC CTGAACTTCGACTTCTGGGGTCGTG CTGTTGGTGCTCAGGCTCAGTTCTA CCCGGACGTTCTGGCTTTCATCGGT TACCAGGCTTTCGGTCTGGACCACC TGTTTCGACTCTGGTAACGACGCTGG TGCTATCGGTCCGGCTATCTACCTG CCGCTGTTACCGGTGGTCTGCTGG AAGGTCAGCTGACCTCTGCTGAAG CTTACCAGGTTGCTAACCTGGTT GA GCTC |



شکل ۶: نمایش کلونینگ صحیح پروتئین VceC و واکسن‌های زیرواحدی پیوسته و غیر پیوسته در وکتور pET-28a (+)

دارویی در سویه‌های این باکتری و نیاز به رویکردهای جدید مبارزه، پتانسیل واکسن بودن و ویژگی‌های ایمونژنیک پروتئین نام برده در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است. بررسی دامین‌ها حاکی از وجود فاکتور غشای خارجی لیپوپروتئین موثر در انتشار مواد، در ساختار پروتئین است. حدود ۱ تا ۳ درصد از ژنوم باکتری‌ها را ژن‌های مربوط به لیپوپروتئین‌ها تشکیل می‌دهند. (Zhao et al., 2017). لیپوپروتئین‌ها دارای نقش‌های متعددی در بیماری‌زایی باکتری‌ها هستند و در انتقال و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش دارند (Lim,

بیان پروتئین‌های غشای خارجی عموماً توسط عوامل محیطی تنظیم شده و نقش قابل توجهی در بیماری‌زایی چنین باکتری‌هایی و سازگاری آنها با محیط‌های مختلف دارد (McClelland et al., 2001; Cao and Klebba, 2002). متأسفانه استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف سبب ایجاد مقاومت چند دارویی در سویه‌های مختلف این باکتری شده است که مبارزه با آن را هر روز سخت‌تر می‌کند و باعث شکست در مبارزه با آنها می‌شود. یکی از پروتئین‌های موثر در ایجاد مقاومت دارویی در *V. cholerae* پروتئین غشای خارجی VceC است. با توجه به ایجاد مقاومت

پروتئین‌های مهم و ضروری باکتری‌ها به شمار می‌روند و نقش مهمی را در بقا و بیماری‌زایی باکتری ایفا می‌کنند (Barh et al., 2011; Naz et al., 2015) که نشان از اهمیت پروتئین VceC در *V. cholerae* دارد.

پروتئین VceC کوچک‌ترین شباهتی به پروتئین‌های انسانی ندارد که خود یک مزیت بسیار عالی برای کاندیداهای واکسن به شمار می‌رود. سلول کامل باکتریایی ممکن است دارای آنتی‌ژن‌هایی باشد که شباهت بالایی به پروتئین‌ها و اجزای سلولی انسان یا میزبان‌های دیگر داشته باشد. این امر منجر به تحریک سیستم ایمنی علیه سلول‌ها و اجزای بدن شده، می‌تواند سبب ایجاد بیماری‌های خود ایمنی شود. همچنین از دیگر مزیت‌های این پروتئین، عدم ایجاد حساسیت و سمیت در بدن میزبان است.

نتایج نشان داد که پروتئین مورد مطالعه دارای خواص آنتی‌ژنیک و ویرولانسی است. آنتی‌ژن‌ها غالباً به بیرون از سلول گسترش یافته‌اند و در غشای خارجی قرار دارند (Gourlay et al., 2013). پس در نتیجه می‌توانند به راحتی توسط سیستم ایمنی شناسایی شوند و گزینه مناسبی به عنوان واکسن‌های نو ترکیب و یا زیر واحدی باشند.

2015). در مورد VceC هم نشان داده شده که در مقاومت دارویی باکتری نقش بسزایی دارد. نتایج هم‌ترازی VceC نشان داد که این پروتئین در تمام سویه‌های گزارش شده *V. cholerae* وجود دارد و به شدت نیز حفاظت شده است. همچنین در بسیاری از دیگر گونه‌های مربوط به جنس *Vibrio* نیز درصد حفاظت بالایی را از خود نشان داد. در کنار دو سویه ایجاد کننده وبا و با توجه به بیماری‌زا بودن دیگر سویه‌های *V. cholerae*، باید به دنبال طراحی واکسنی بود که بتواند در برابر تمامی سویه‌ها ایجاد ایمنی کند. CT (سم وبا) تنها توسط دو سویه ایجاد کننده وبا از این باکتری تولید می‌شود، بنابراین استفاده از آن و به تنهایی نمی‌تواند روش موثری در ساخت واکسن‌های زیرواحدی علیه همه سویه‌های بیماری‌زای *V. cholerae* باشد. استفاده از یک پروتئین به شدت حفاظت شده و موجود در تمام سویه‌ها به نظر روش موثری در تولید واکسن‌های پروتئینی علیه این گونه بیماری‌زا باشد. نشان داده شده است که بسیاری از واکسن‌ها به دلیل عدم حضور و یا تغییرپذیری در سویه‌های مختلف، توانایی کسب مجوزهای لازم به منظور تجاری‌سازی را ندارند (Chiang et al., 2015). از طرفی، پروتئین‌های حفاظت شده عموماً از

با توجه به نتایج، VceC یک پروتئین پایدار با نیمه عمر و شاخص آلیفاتیک بالا است که شاخص آلیفاتیک بالا می‌تواند نشان دهنده مقاوم بودن آن در برابر حرارت باشد (Ikai, 1980). عوامل یاد شده به تخلیص و نگه داری پروتئین با فرم طبیعی و عدم دناتوره شدن در هنگام تولید واکسن و یا دارو کمک شایانی می‌کند.

از آنجایی که در هنگام تجویز و ذخیره‌سازی پروتئین‌ها ممکن است پروتئولیز و تغییرات شیمیایی و حتی تغییر فرم رخ دهد، در نتیجه واکسن‌های زیرواحدی مبتنی بر پپتید به دلیل خواص مطلوب‌تر، اهمیت بیشتری پیدا کرده‌اند (Rauta et al., 2016). سیستم‌های درمانی مولکولی به واسطه پپتید می‌تواند جایگزین موثری برای رفع مشکلات فعلی واکسن باشد. تعدادی از داروهای مبتنی بر پپتیدها به دلیل سمیت بسیار پایین، خاصیت زیاد، تنوع شیمیایی فراوان و دسترسی به منابع طبیعی، به طور کامل توسط FDA تایید شده است و بسیاری از آنها نیز هنوز مراحل مختلف توسعه دارو را سپری می‌کنند (Sharma et al., 2014). سادگی نسبی تولید، ثبات زیستی و طبیعت غیرعفونی، پپتیدها را به عنوان کاندیداهای جذاب واکسن تبدیل کرده است

با توجه به نتایج، VceC یک پروتئین پایدار با نیمه عمر و شاخص آلیفاتیک بالا است که شاخص آلیفاتیک بالا می‌تواند نشان دهنده مقاوم بودن آن در برابر حرارت باشد (Ikai, 1980). عوامل یاد شده به تخلیص و نگه داری پروتئین با فرم طبیعی و عدم دناتوره شدن در هنگام تولید واکسن و یا دارو کمک شایانی می‌کند.

از آنجایی که در هنگام تجویز و ذخیره‌سازی پروتئین‌ها ممکن است پروتئولیز و تغییرات شیمیایی و حتی تغییر فرم رخ دهد، در نتیجه واکسن‌های زیرواحدی مبتنی بر پپتید به دلیل خواص مطلوب‌تر، اهمیت بیشتری پیدا کرده‌اند (Rauta et al., 2016). سیستم‌های درمانی مولکولی به واسطه پپتید می‌تواند جایگزین موثری برای رفع مشکلات فعلی واکسن باشد. تعدادی از داروهای مبتنی بر پپتیدها به دلیل سمیت بسیار پایین، خاصیت زیاد، تنوع شیمیایی فراوان و دسترسی به منابع طبیعی، به طور کامل توسط FDA تایید شده است و بسیاری از آنها نیز هنوز مراحل مختلف توسعه دارو را سپری می‌کنند (Sharma et al., 2014). سادگی نسبی تولید، ثبات زیستی و طبیعت غیرعفونی، پپتیدها را به عنوان کاندیداهای جذاب واکسن تبدیل کرده است

با توجه به نتایج، VceC یک پروتئین پایدار با نیمه عمر و شاخص آلیفاتیک بالا است که شاخص آلیفاتیک بالا می‌تواند نشان دهنده مقاوم بودن آن در برابر حرارت باشد (Ikai, 1980). عوامل یاد شده به تخلیص و نگه داری پروتئین با فرم طبیعی و عدم دناتوره شدن در هنگام تولید واکسن و یا دارو کمک شایانی می‌کند.

از آنجایی که در هنگام تجویز و ذخیره‌سازی پروتئین‌ها ممکن است پروتئولیز و تغییرات شیمیایی و حتی تغییر فرم رخ دهد، در نتیجه واکسن‌های زیرواحدی مبتنی بر پپتید به دلیل خواص مطلوب‌تر، اهمیت بیشتری پیدا کرده‌اند (Rauta et al., 2016). سیستم‌های درمانی مولکولی به واسطه پپتید می‌تواند جایگزین موثری برای رفع مشکلات فعلی واکسن باشد. تعدادی از داروهای مبتنی بر پپتیدها به دلیل سمیت بسیار پایین، خاصیت زیاد، تنوع شیمیایی فراوان و دسترسی به منابع طبیعی، به طور کامل توسط FDA تایید شده است و بسیاری از آنها نیز هنوز مراحل مختلف توسعه دارو را سپری می‌کنند (Sharma et al., 2014). سادگی نسبی تولید، ثبات زیستی و طبیعت غیرعفونی، پپتیدها را به عنوان کاندیداهای جذاب واکسن تبدیل کرده است

سپس برای تشخیص توسط لئوسیت‌های سیتوتوکسیک T (CD8) به سطح سلول منتقل می‌شوند (Lehner and Cresswell, 1996).

با این حال، تحریک سلول‌های T کمکی CD4+ (پاسخ MHC II) برای ایجاد پاسخ ایمنی سازگار در طول عفونت‌های بیماری‌زا بسیار مهم است (Reise and Waller, 2009). از این رو پپتیدهای فعال کننده سلول T به هدف اصلی برای توسعه واکسن و ایمونوتراپی تبدیل شده‌اند (Umamaheswari et al., 2012). به همین دلیل اپیتوپ‌های سلول‌های T و B در مطالعه شناسایی و معرفی شد.

افزایش دانش تشخیص آنتی‌ژن و نحوه عمل در سطح مولکولی در بهبود واکسن‌های پپتیدی طراحی شده دخیل است. در نتیجه، مطالعات در زمینه واکسن به سمت کشف آنتی‌ژن‌های در معرض و واقع در سطح سلول باکتریایی که مستعد تشخیص توسط آنتی‌بادی‌ها همچنین القای سلول T هستند، از طریق واکسیناسیون معکوس تغییر مسیر پیدا کرده است (Patronov and Doytchinova, 2013). با توجه به توضیحات داده شده، نقاط آنتی‌ژن و در معرض پروتئین VceC شناسایی شد و در طراحی واکسن زیرواحدی خطی تنها از اپیتوپ‌های واقع در این مناطق استفاده شد.

پرهزینه و زمان بر است، ابزارهای بیوانفورماتیکی و نرم‌افزارهای اختصاصی در این مطالعه برای شناسایی اپیتوپ‌ها به کار گرفته شدند.

واکسن‌ها با ایجاد تغییرات عمیق در اجزای سلولی ایمنی تطبیقی که شامل واکنش‌های ایمنی با واسطه سلول‌های B و T در بدن است، عمل می‌کنند. ایده واکسن‌های پپتیدی بر اساس شناسایی اپیتوپ‌های سلول‌های B و T و سنتز شیمیایی آنها به وجود آمده است که می‌تواند پاسخ‌های ایمنی خاص و بهینه را ایجاد کند (Patronov and Doytchinova, 2013). سلول‌های B ایمنی هومورال را به واسطه تولید و ترشح آنتی‌بادی‌ها میانجی‌گری می‌کنند (Murphy and Weaver, 2016). در کنار آنها، سلول‌های T یک نقش اساسی را در ایمنی سلولی بازی می‌کنند (Alberts et al., 2002). اپیتوپ‌های آنها بر روی سطح سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن نمایان می‌شوند (Sigal et al., 1999) و سلول‌های T نمی‌توانند به طور مستقیم آنتی‌ژن‌های آزاد شناور را تشخیص دهند (Ahmad et al., 2016). سلول‌های T به مولکول‌های MHC که می‌توانند اپیتوپ‌ها را به سلول‌های T عرضه کنند، متصل می‌شوند. پپتیدها با مولکول‌های MHC کلاس I در شبکه آندوپلاسمی کمپلکس تشکیل می‌دهند و

آنتی‌ژنیک واقع در غشای خارجی با درجه یکسانی بسیار بالا در سویه‌های مختلف سلول باکتری *V. cholerae* است که توانایی تحریک سیستم ایمنی انسان را دارد. شناسایی اپیتوپ‌های مختلف در ساختار و توالی این پروتئین و حضور بعضی از آنها در خارج از غشا و سلول، منجر به طراحی دو واکسن زیرواحدی پپتیدی پیوسته و یا خطی شد که پتانسیل ایجاد ایمنی در میزبان را دارد.

نتایج بیوانفورماتیکی به دست آمده از تجزیه و تحلیل واکسن‌های طراحی شده توسط این مطالعه نشان داد که واکسن‌های زیرواحدی از قدرت آنتی‌ژنی بالاتری نسبت به کل پروتئین برخوردار هستند. در نتیجه این قطعات پپتیدی می‌توانند به عنوان یک واکسن موثر در ایجاد ایمنی علیه باکتری بیماری‌زای *V. cholerae* مورد آزمایش قرار گیرند که نیاز به مطالعات آزمایشگاهی و بالینی در پژوهش‌های بعدی است.

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین VceC یک فاکتور ویرولانسی و

منابع

- Ahmad T.A., Eweida A.E. and El-Sayed L.H. 2016.** T-cell epitope mapping for the design of powerful vaccines. *Vaccine Reports*, 6: 13–22.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. 2002.** *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, USA. 1464P.
- Armenteros J.J.A., Tsirigos K.D., Sønderby C.K., Petersen T.N., Winther O., Brunak S., Von Heijne G. and Nielsen H. 2019.** SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4): 420–423.
- Awasthi S.P., Asakura M., Chowdhury N., Neogi S.B., Hinenoya A., Golbar H.M., Yamate J., Arakawa E., Tada T. and Ramamurthy T. 2013.** Novel cholera toxin variants, ADP-ribosylating toxins in *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains, and their pathogenicity. *Infection and Immunity*, 81(2): 531–541.
- Barh D., Tiwari S., Jain N., Ali A., Santos A.R., Misra A.N., Azevedo V. and Kumar A. 2011.** In silico subtractive genomics for target identification in human bacterial pathogens. *Drug Development Research*, 72(2): 162–177.
- Cao Z. and Klebba P.E. 2002.** Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins. *Biochimie*, 84(5): 399–412.
- Chiang M.H., Sung W.C., Lien S.P., Chen Y.Z., Lo A.F.Y., Huang J.H., Kuo S.C. and Chong P. 2015.** Identification of novel vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii* using reverse vaccinology. *Human vaccines and Immunotherapeutics*, 11(4): 1065–1073.
- Colmer J.A., Fralick J.A. and Hamood A.N. 1998.** Isolation and characterization of a putative multidrug resistance pump from *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 27(1): 63–72.
- Colwell R. and Huq A. 2001.** Marine ecosystems and cholera. P: 141–145. In: Porter J.W. (Ed.). *The Ecology and Etiology of Newly Emerging Marine Diseases*. Springer, Netherlands.
- Colwell R.R. 2002.** A voyage of discovery: Cholera, climate and complexity. *Environmental Microbiology*, 4(2): 67–69.
- Deshayes S., Daurel C., Cattoir V., Parienti J.J., Quilici M.L. and De La Blanchardiere A. 2015.** Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia: Case report and literature review. *Springerplus*, 4(1): 1–9.

- Drasar B.S. and Forrest B.D. 1996.** Cholera and the Ecology of *Vibrio cholerae*. Springer, Netherlands 376P.
- El-Gebali S., Mistry J., Bateman A., Eddy S.R., Luciani A., Potter S.C., Qureshi M., Richardson L.J., Salazar G.A. and Smart A. 2019.** The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47: 427–432.
- Elluri S., Enow C., Vdovikova S., Rompikuntal P.K., Dongre M., Carlsson S., Pal A., Uhlin B.E. and Wai S.N. 2014.** Outer membrane vesicles mediate transport of biologically active *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) from *V. cholerae* strains. *PLOS One*, 9(9): 1–13 (e106731).
- Federici L., Du D., Walas F., Matsumura H., Fernandez-Recio J., McKeegan K.S., Borges-Walmsley M.I., Luisi B.F. and Walmsley A.R. 2005.** The crystal structure of the outer membrane protein VceC from the bacterial pathogen *Vibrio cholerae* at 1.8 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15): 15307–15314.
- Feghali R. and Adib S. 2011.** Two cases of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 septicaemia with favourable outcome in Lebanon. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 17(8): 722–724.
- Finco O. and Rappuoli R. 2014.** Designing vaccines for the twenty-first century society. *Frontiers in Immunology*, 5(12): 1–6.
- Garg A. and Gupta D. 2008.** VirulentPred: A SVM based prediction method for virulent proteins in bacterial pathogens. *BMC Bioinformatics*, 9(1): 1–12.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S.E., Wilkins M.R., Appel R.D. and Bairoch A. 2005.** Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. P: 571–607. In: Walker J.M. (Ed.). *The Proteomics Protocols Handbook*. Springer, Germany.
- Gershoni J.M., Roitburd-Berman A., Siman-Tov D.D., Freund N.T. and Weiss Y. 2007.** Epitope mapping. *BioDrugs*, 21(3): 145–156.
- Gil F., Ipinza F., Fuentes J., Fumeron R., Villarreal J.M., Aspee A., Mora G.C., Vasquez C.C. and Saavedra C. 2007.** The ompW (porin) gene mediates methyl viologen (paraquat) efflux in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Research in Microbiology*, 158(6): 529–536.
- Gourlay L.J., Peri C., Ferrer-Navarro M., Conchillo-Sole O., Gor A., Rinchai D., Thomas R.J., Champion O.L., Michell S.L. and Kewcharoenwong C. 2013.** Exploiting the *Burkholderia pseudomallei* acute phase antigen BPSL2765 for structure-based epitope discovery/design in

- structural vaccinology. *Chemistry and Biology*, 20(9): 1147–1156.
- Grote A., Hiller K., Scheer M., Munch R., Nortemann B., Hempel D.C. and Jahn D. 2005.** JCat: A novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Research*, 33: 526–531.
- Gupta S., Kapoor P., Chaudhary K., Gautam A., Kumar R., Raghava G.P. and Consortium O.S.D.D. 2013.** In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLOS One*, 8(9): 1–10 (e73957).
- Hailemichael Y. and Overwijk W.W. 2013.** Peptide-based anticancer vaccines: The making and unmaking of a T-cell graveyard. *Oncoimmunology*, 2(7): 1–4 (e24743).
- Halpern M. and Izhaki I. 2017.** Fish as hosts of *Vibrio cholerae*. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1–7 (282).
- Harris J.F. Ryan E.T. and Calderwood S.B. 2012.** Cholera. *Lancet*, 379: 2466–2476.
- Hattotuwigama C.K., Guan P., Doytchinova I.A., Zygouri C. and Flower D.R. 2004.** Quantitative online prediction of peptide binding to the major histocompatibility complex. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 22(3): 195–207.
- Hong H., Patel D.R., Tamm L.K. and Van Den Berg B. 2006.** The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded β -barrel with a hydrophobic channel. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11): 7568–7577.
- Ikai A. 1980.** Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *The Journal of Biochemistry*, 88(6): 1895–1898.
- Islam M., Drasar B. and Bradley D. 1988.** Survival and attachment of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in association with four marine algae. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 5(2): 41–48.
- Jenuth J.P. 1999.** The NCBI: Publicly available tools and resources on the web. *Bioinformatics Methods and Protocols*, 132: 301–312.
- Jertborn M., Svennerholm A.M. and Holmgren J. 1992.** Safety and immunogenicity of an oral recombinant cholera B subunit-whole cell vaccine in Swedish volunteers. *Vaccine*, 10(2): 130–132.
- Jertborn M., Svennerholm A.M. and Holmgren J. 1993.** Evaluation of different immunization schedules for oral cholera B subunit-whole cell vaccine in Swedish volunteers. *Vaccine*, 11(10): 1007–1012.
- Jespersen M.C., Peters B., Nielsen M. and Marcatili P. 2017.** BepiPred-2.0: Improving sequence-

- based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*, 45: 24–29.
- Juncker A.S., Willenbrock H., Von Heijne G., Brunak S., Nielsen H. and Krogh A. 2003.** Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Science*, 12(8): 1652–1662.
- Kaper J.B., Morris J.G. and Levine M.M. 1995.** Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(1): 48–86.
- Kringelum J.V., Lundegaard C., Lund O. and Nielsen M. 2012.** Reliable B cell epitope predictions: Impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Computational Biology*, 8(12): 1–10 (e1002829).
- Larsen J.E., Lund O. and Nielsen M. 2006.** Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Research*, 2(1): 1–7.
- Lehner P.J. and Cresswell P. 1996.** Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Current Opinion in Immunology*, 8(1): 59–67.
- Levine M.M. 2010.** Immunogenicity and efficacy of oral vaccines in developing countries: Lessons from a live cholera vaccine. *BMC Biology*, 8(1): 1–10.
- Lim J. 2015.** The characterization of the lipoprotein VacJ in *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. Ph.D. Thesis, London School of Hygiene and Tropical Medicine, UK. 190P.
- Lu S., Wang J., Chitsaz F., Derbyshire M.K., Geer R.C., Gonzales N.R., Gwadz M., Hurwitz D.I., Marchler G.H. and Song J.S. 2020.** CDD/Sparcle: The conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*, 48: 265–268.
- Madej T., Lanczycki C.J., Zhang D., Thiessen P.A., Geer R.C., Marchler-Bauer A. and Bryant S.H. 2014.** MMDB and VAST+: Tracking structural similarities between macromolecular complexes. *Nucleic Acids Research*, 42: 297–303.
- Magnan C.N., Randall A. and Baldi P. 2009.** SOLpro: Accurate sequence-based prediction of protein solubility. *Bioinformatics*, 25(17): 2200–2207.
- Marchler-Bauer A., Bo Y., Han L., He J., Lanczycki C.J., Lu S., Chitsaz F., Derbyshire M.K., Geer R.C. and Gonzales N.R. 2016.** CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research*, 45: 200–203.
- McClelland M., Sanderson K.E., Spieth J. and Clifton S.W. 2001.** Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar

- typhimurium* LT2. Nature, 413(6858): 852–856.
- Mookerjee S., Batabyal P., Sarkar M.H. and Palit A. 2015.** Seasonal prevalence of enteropathogenic *Vibrio* and their phages in the riverine estuarine ecosystem of South Bengal. PLOS One, 10(9): 1–13 (e0137338).
- Murphy K. and Weaver C. 2016.** Janeway's Immunobiology. Garland Science, USA. 904P.
- Mwansa J., Mwaba J., Lukwesa C., Bhuiyan N., Ansaruzzaman M., Ramamurthy T., Alam M. and Nair G.B. 2007.** Multiply antibiotic-resistant *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains emerge during cholera outbreaks in Zambia. Epidemiology and Infection, 135(5): 847–853.
- Naz A., Awan F.M., Obaid A., Muhammad S.A., Paracha R.Z., Ahmad J. and Ali A. 2015.** Identification of putative vaccine candidates against *Helicobacter pylori* exploiting exoproteome and secretome: A reverse vaccinology based approach. Infection, Genetics and Evolution, 32: 280–291.
- Naz R.K. and Dabir P. 2007.** Peptide vaccines against cancer, infectious diseases, and conception. Frontiers Bioscience, 12(12): 1833–1844.
- Nelson E.J., Harris J.B., Morris J.G., Calderwood S.B. and Camilli A. 2009.** Cholera transmission: The host, pathogen and bacteriophage dynamic. Nature Reviews Microbiology, 7(10): 693–702.
- Pastor M., Pedraz J. and Esquisabel A. 2013.** The state-of-the-art of approved and under-development cholera vaccines. Vaccine, 31(38): 4069–4078.
- Patronov A. and Doytchinova I. 2013.** T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. Open Biology, 3(1): 1–13 (120139).
- Petsaris O., Nousbaum J., Quilici M., Le Coadou G., Payan C. and Abalain M. 2010.** Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia in a cirrhotic patient. Journal of Medical Microbiology, 59(10): 1260–1262.
- Ponomarenko J., Bui H.H., Li W., Fussedder N., Bourne P.E., Sette A. and Peters B. 2008.** ElliPro: A new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. BMC Bioinformatics, 9(1): 1–8.
- Rauta P.R., Ashe S., Nayak D. and Nayak B. 2016.** In silico identification of outer membrane protein (Omp) and subunit vaccine design against pathogenic *Vibrio cholerae*. Computational Biology and Chemistry, 65: 61–68.
- Rehulka J., Petras P., Marejkova M. and Aldova E. 2015.** *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 infection in fish in the Czech

- Republic. Veterinarni Medicina, 60(1): 16–22.
- Reise S.P. and Waller N.G. 2009.** Item response theory and clinical measurement. Annual Review of Clinical Psychology, 5: 27–48.
- Resende J.A., Godon J.J., Bonnafous A., Arcuri P.B., Silva V.L., Otenio M.H. and Diniz C.G. 2016.** Seasonal variation on microbial community and methane production during anaerobic digestion of cattle manure in Brazil. Microbial Ecology, 71(3): 735–746.
- Richie E., Punjabi N.H., Sidharta Y., Peetosutan K., Sukandar M., Wasserman S.S., Lesmana M., Wangsasaputra F., Pandam S. and Levine M.M. 2000.** Efficacy trial of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. Vaccine, 18(22): 2399–2410.
- Schulz G.E. 2002.** The structure of bacterial outer membrane proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1565(2): 308–317.
- Sharma A., Singla D., Rashid M. and Raghava G.P.S. 2014.** Designing of peptides with desired half-life in intestine-like environment. BMC Bioinformatics, 15(282): 1–8.
- Sharma N., Patiyal S., Dhall A., Pande A., Arora C. and Raghava G.P. 2020.** AlgPred 2.0: An improved method for predicting allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. Briefings in Bioinformatics, 22(4): 1–12.
- Shen H.B. and Chou K.C. 2010.** Gneg-mPLoc: A top-down strategy to enhance the quality of predicting subcellular localization of Gram-negative bacterial proteins. Journal of Theoretical Biology, 264(2): 326–333.
- Sigal L.J., Crotty S., Andino R. and Rock K.L. 1999.** Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. Nature, 398(6722): 25–29.
- Thompson D.K., Beliaev A.S., Giometti C.S., Tollaksen S.L., Khare T., Lies D.P., Nealson K.H., Lim H., Yates J. and Brandt C.C. 2002.** Transcriptional and proteomic analysis of a ferric uptake regulator (fur) mutant of *Shewanella oneidensis*: Possible involvement of fur in energy metabolism, transcriptional regulation, and oxidative stress. Applied and Environmental Microbiology, 68(2): 881–892.
- Thompson F.L., Iida T. and Swings J. 2004.** Biodiversity of vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68(3): 403–431.
- Thungapathra M., Sinha K.K., Chaudhuri S.R., Garg P., Ramamurthy T., Nair G.B. and**

- Ghosh A. 2002.** Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes aac (6')-Ib, dfrA5, dfrA12, and ereA2 in class I integrons in non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9): 2948–2955.
- Trach D.D., Cam P., Ke N., Rao M., Dinh D., Hang P., Hung N., Canh D., Thiem V. and Naficy A. 2002.** Investigations into the safety and immunogenicity of a killed oral cholera vaccine developed in Viet Nam. *Bulletin of the World Health Organization*, 80: 2–8.
- Uchiyama H. 2000.** Distribution of *Vibrio* species isolated from aquatic environments with TCBS agar. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 4(4): 199–204.
- Umamaheswari A., Pradhan D. and Hemanthkumar M. 2012.** Computer aided subunit vaccine design against pathogenic *Leptospira* serovars. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 4(1): 38–45.
- Viret J.F., Dietrich G. and Favre D. 2004.** Biosafety aspects of the recombinant live oral *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD 103-HgR. *Vaccine*, 22(19): 2457–2469.
- WHO. 2018.** World Health Organization. Fourth annual Meeting of the Global Task Force on Cholera Control, South Africa. 30P.
- Wimley W.C. 2002.** Toward genomic identification of β -barrel membrane proteins: Composition and architecture of known structures. *Protein Science*, 11(2): 301–312.
- Yao B., Zhang L., Liang S. and Zhang C. 2012.** SVMTriP: A method to predict antigenic epitopes using support vector machine to integrate tri-peptide similarity and propensity. *PLOS One*, 7(9): 1–5 (e45152).
- Yosra M., Mahmoud M., Ebtsam S., Sabah I. and Elkamel A. 2016.** Subclinical vibriosis in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(3): 119–123.
- Yu C.S., Chen Y.C., Lu C.H. and Hwang J.K. 2006.** Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64(3): 643–651.
- Zhao L., Gao X., Liu C., Lv X., Jiang N. and Zheng S. 2017.** Deletion of the vacJ gene affects the biology and virulence in *Haemophilus parasuis* serovar 5. *Gene*, 603: 42–53.



Research Paper

Evaluation of VceC protein as a vaccine against the aquatic pathogenic bacterium *Vibrio cholerae* and design a subunit peptide vaccine based on VceC amino acid sequence

Zeinab Raoufi¹, Sajad Abdollahi^{1*}

Received: November 2021

Accepted: December 2021

Abstract

Vibrio cholerae is an aquatic pathogenic bacterium whose various strains cause diseases such as cholera, acute diarrhea, meningitis and sepsis. Due to the resistance of the strains to different antibiotics, the production of low-risk vaccines that affect all pathogenic strains can be the best method of control. Therefore, in this study, the vaccine potential of VceC outer membrane protein against *V. cholerae* was evaluated using bioinformatics methods. In addition to determining antigenicity, virulence, and physicochemical properties, B and T cell epitope mapping was performed to design the best peptide subunit vaccine. The results showed that the protein has optimal properties such as presence in all the studied strains, stability and long half-life, good temperature resistance, and solubility during overexpression. Numerous antigenic regions and linear and spatial epitopes were also observed along the protein sequence and structure. According to the location and antigenic properties, two linear and conformational subunit vaccines were designed that can be tested and used against the pathogenicity of different strains of *V. cholerae*.

Key words: *Vibrio cholerae*, Cholera, Vaccine, Bioinformatics, Epitope Mapping.

1- Assistant Professor in Biology Department, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran.

*Corresponding Author: sajadabdollahi@bkatu.ac.ir