



Insilico Design and Construction of a Chimeric Gene Comprising the A Subunit of *Vibrio cholera* Pilin and the B Subunit of Cholera Toxin

Milad Amerian, Shahram Nazarian, Hosein Honari, Mohammad Ebrahim Minaie, Emad kordbacheh

Biological Research Center, Faculty and Research Institute for Basic Sciences, Imam Hossein comprehensive University, Tehran, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2017/01/21
Accepted: 2017/03/08
Available online: 2017/08/08

Article Subject:

Molecular Microbiology

IJMM 2017; 11(3): 37-48

Corresponding author:

Dr. Shahram Nazarian

Biological Research Center,
Faculty and Research Institute
for Basic Sciences, Imam
Hossein comprehensive
University, Tehran, Iran

Tel: 0982177104934

Email:

nazarian56@gmail.com

Abstract

Background and Aims: Cholera is a lethal diarrheal disease that cause by *Vibrio cholerae*. Cholera toxin and colonization factor pili (*tcpA*) are the major virulence factor in *V.cholerae* pathogenesis. The B subunit of the enterotoxin (*ctxB*) which is responsible for toxin binding to eukaryotic cells and toxin-coregulated pili A (*tcpA*) that is essential for *V.cholerae* colonization, have immunogenic properties. Chimeric proteins carrying epitopes, linkers or adjuvant sequences could increase immunogenicity for recombinant antigens and can also elicit broad immune responses. The aim of this study was to design an immunogen against adherence and toxicity of *V.cholerae*.

Materials and Methods: *ctxB* and *tcpA* genes were analyzed for rare codons and gene optimization was performed using optimization software. The half-life and protein instability index was determined. Secondary and tertiary structure was predicted and evaluated. Linear and conformational epitopes were predicted. Recombinant pET28a/chimeric gene plasmid was transformed to *E.coli* BL21 DE3 and expression was induced with Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The protein expression was evaluated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Results: Chimeric protein instability index was 24.04 and the codon adaptation index of chimeric constructs increased to 0.9. The tertiary predicted structure of the chimeric proteins confirmed and mRNA was stable. Conformational and linear epitopes were seen in both domains of the chimeric protein. Restriction analysis confirmed cloning of the gene into pET28a vector. Expression of recombinant protein in *E.coli* led to the production of chimeric protein with 35 kDa molecular weight.

Conclusions: According to the results of bioinformatics and recombinant protein expression, the design chimeric protein could be used as an immunogen to evaluate the immunity against cholera.

KeyWords: *Vibrio cholerae*, Virulence factors, Cholera toxin, Bioinformatic design, Chimeric gene

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Amerian M, Nazarian S, Honari H, Minaie ME, kordbacheh E. Insilico Design and Construction of a Chimeric Gene Comprising the A Subunit of *Vibrio cholera* Pilin and the B Subunit of Cholera Toxin. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (3): 37-48



Farname Inc.

طراحی بیوانفورماتیکی و ساخت ژن کایمر در بردارنده زیر واحد B کلراتوکسین و زیر واحد A پیلی ویبریو کلرا

میلاذ عامریان، شهرام نظریان، حسین هنری، محمد ابراهیم مینایی، عماد کردبچه

مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: وبا بیماری خطرناکی است که توسط ویبریو کلرا ایجاد می‌شود. فاکتور کلونیزاسیون پیلی Toxin-coregulated pili A (*tcpA*) و توکسین کلرا مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی ویبریوکلرا می‌باشند. زیر واحد B انتروتوکسین Cholera toxin subunit B (*ctxB*) مسئول اتصال سم به سلول یوکاریوتی است و *tcpA* که برای کلونیزاسیون باکتری ضروری است، ویژگی‌های ایمونوژنیک دارند. پروتئین‌های کایمر در بردارنده اپی توپ و ادجوانت، می‌توانند سبب افزایش خاصیت ایمونوژنسیته پروتئین‌ها شوند و سبب بروز پاسخ‌های ایمنی گردند. هدف از تحقیق طراحی ایمونژن کایمر علیه فاکتورهای اتصال و توکسین ویبریو کلرا بود.

مواد و روش کار: ژن *tcpA* و *ctxB* به لحاظ وجود کدون‌های نادر مورد بررسی قرار گرفتند و بهینه‌سازی ژن‌ها انجام شد. نیمه‌عمر و شاخص ناپایداری پروتئین تعیین گردید. ساختارهای دوم و سوم پروتئین پیش‌بینی و ارزیابی شد. اپی توپ‌های خطی و فضایی نیز تعیین گردید. پلاسمید نوترکیب به سلول‌های مستعد منتقل و بیان پروتئین با استفاده از IPTG القا گردید. بیان پروتئین با روش SDS-PAGE و سترن بلاتینگ ارزیابی شد.

یافته‌ها: شاخص ناپایداری پروتئین کایمر ۲۴/۰۴ بود. شاخص سازگاری کدون سازه کایمر به ۰/۹ افزایش یافت. ساختار سوم پیش‌بینی شده نیز کیفیت مناسبی را داشت و mRNA آن نیز پایدار بود. اپی توپ‌های فضایی و خطی در هر دو دومین پروتئین کایمر دیده شد. آنالیز همسانه سازی، پلاسمید نوترکیب واجد ژن کایمر را تأیید کرد. بیان پروتئین نوترکیب از ژن سنتزی منجر به تولید پروتئینی با وزن ۳۵ کیلو دالتون شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی و بیان پروتئین نوترکیب می‌توان از آن به‌عنوان ایمونوژن جهت بررسی‌های ایمنی علیه وبا استفاده شود.

کلمات کلیدی: ویبریوکلرا، فاکتورهای ویروانس، کلرا توکسین، طراحی بیوانفورماتیکی، ژن کایمر

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۲

پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۵/۱۷

موضوع:

میکروبی‌شناسی مولکولی

IJMM 1396; 11(3): 37-48

نویسنده مسئول:

دکتر شهرام نظریان

مرکز تحقیقات زیست‌شناسی،
دانشکده و پژوهشکده علوم پایه،
دانشگاه جامع امام حسین (ع)،
تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۱۷۷۱۰۴۹۳۴

پست الکترونیک:

nazarian56@gmail.com

مقدمه

بیماری‌زایی متعددی از جمله آنزیم‌ها و سموم مختلف می‌باشد که مهم‌ترین آن‌ها کلرا توکسین است که یک انتروتوکسین بوده و عامل اصلی بیماری وبا می‌باشد (۵،۷). در نتیجه عملکرد توکسین، آب و الکترولیت‌ها از بدن خارج شده و باعث کاهش شدید حجم پلاسماي خون و در نهایت مرگ در عرض چند ساعت خواهد شد. ویبریو از راه دستگاه گوارش با خوردن غذا و یا آشامیدن آب آلوده وارد بدن می‌شود و پس از عبور از سد اسیدی شیره معده در محیط قلیایی روده کوچک در بین پرزهای لایه مخاطی چسبیده و شروع به تکثیر می‌نماید (۸). با توجه به خواص آنتی‌ژنیک قابل توجه کلراتوکسین، مطالعات زیادی جهت استفاده

بیماری‌های عفونی سالانه حدود ۱۱ میلیون نفر از کودکان زیر ۵ سال را به کام مرگ می‌کشند. این در حالی است که از این آمار بیماری‌های اسهالی ۳/۱ میلیون مرگ‌ومیر را به خود اختصاص می‌دهند که یکی از عوامل ایجادکننده اسهال ویبریوکلرا می‌باشد (۱،۲). ویبریوکلرا عامل بیماری مهلک وبا است که اغلب کشورهای جهان سوم را درگیر می‌نماید و با مرگ‌ومیر بالایی نیز همراه است (۳،۴). عملکرد توکسین مترشحه از باکتری، منجر به از دست دادن سریع آب و الکترولیت‌ها و در نتیجه کاهش شدید حجم پلاسماي خون و در موارد حاد منجر به مرگ خواهد شد (۵،۶). ویبریوکلرا دارای فاکتورهای

از این توکسین برای ایجاد مصونیت در برابر این بیماری صورت گرفته است (۹،۱۰).

پروتئین *TcpA* (Toxin coregulated pillus) به عنوان زیر

واحد بزرگ پیلای باکتری محسوب می شود. با توجه به محل قرارگیری *tcpA* در سطح باکتری، این پروتئین در دسترس سیستم ایمنی بوده و باعث شده تا کاندید مناسبی به منظور توسعه ایمنی ضد کلونیزاسیون باکتری و با باشد. پروتئین *TcpA* با وزن حدود ۲۲ کیلو دالتون توسط ژنی دارای ۵۹۸ جفت باز کد می شود (۱۱). پروتئین کلرا توکسین، متشکل از زیر واحدهای هتروداایمر Cholera enterotoxin subunit A (*CtxA*) با وزن مولکولی ۲۷۴۰۰ دالتون و زیر واحدهای هوموپنتامر Cholera toxin subunit B (*CtxB*) با وزن مولکولی حدود ۵۸۰۰۰ دالتون می باشد. زیر واحد A به صورت پروتئولیتیکی برش خورده و دوزنجیره پلی پپتیدی به نام های A_1 و A_2 ایجاد می نماید. به نظر می رسد مسئول کلیه فعل و انفعالات بیولوژیکی، زیر واحد A_1 کلرا توکسین باشد (۱۵-۱۲). بخش اتصال شامل ۵ قسمت ۱۰۳ اسید آمینه ای است که آرایش حلقه مانند داشته و دارای محل اتصال به گانگلوژید GM_1 سلول های اپی تلیال ژنوم هستند. زیر واحد B مسئول اتصال سم به گیرنده های موجود در غشاء سیتوپلاسمی سلول میزبان بوده و فاقد خاصیت سمی می باشد. امروزه *CtxB* به عنوان ایمونو ادجوانت قوی در ایمونیزاسیون وابسته به مخاط می دانند، زیرا این پروتئین یک انتقال دهنده بسیار مؤثر برای ترشح آنتی بادی سیستمیک و مخاطی برای آنتی بادی ژن های کونژوکه شده می باشد (۱۶). از طرفی یکی از راه های تقویت اثر واکسن ها استفاده از ادجوانت ها است که می توان با فیوژن کردن آنتی ژن های کاندیدای واکسن با ادجوانت هایی مثل *ctxB* سبب تقویت پاسخ های ایمنی شد. در بین سازوکارهای واکسیناسیون به ایمونوژن ها و واکسن های زیر واحدی نو ترکیب توجه زیادی شده است. ساخت واکسن نوع نو ترکیب باعث صرفه جویی در هزینه، تولید و القا سطح بالا و طولانی مدتی از محافظت بعد از دوز اولیه می شود (۱۷،۱۸). واکسن های زیر واحدی به طور قابل توجهی ایمن تر و اختصاصی تر بوده و واکنش های غیر اختصاصی کمتری را در سیستم ایمنی به راه انداخته و به همین جهت توانایی هدف قرار دادن عامل بیگانه را داشته است. علی رغم خواص ایمونولوژیکی کلرا توکسین که بسیار مورد توجه محققان می باشد، ولی سمیت آن موجب محدود شدن استفاده برای واکسیناسیون انسانی شده است. در عوض به علت عدم خاصیت سمی زیر واحد B، استفاده از *CtxB* به عنوان

ایمونوژن مخاطی در انسان مورد بررسی قرار گرفته است. استفاده از ایمونوژن های کایمیری و واکسن های چند زیر واحدی به جای تک زیر واحدی ها به دلیل پاسخ کامل و ایمن تر مورد توجه قرار می گیرد (۱۹). Kundu و همکاران ایمونیزاسیون پروتئین های نو ترکیب *TcpA* و *CtxB* را به صورت جداگانه و مخلوط باهم علیه ویبریو کلرا O_1 را مورد مطالعه قرار دادند. استفاده از آنتی ژن *ctxB* به عنوان ایمونوژن مصونیت بخشی ۷۰/۴۵ درصد و آنتی ژن *tcpA* مصونیت بخشی ۴۱/۱ درصد را نشان داد. این در حالی بود که استفاده هم زمان هر دو آنتی ژن سبب مصونیت ۱۰۰ درصدی در مدل حیوان شد (۱۴).

یکی از جنبه های مهم در بیوانفورماتیک شامل مطالعه ساختارهای پروتئین های جدید و نیز و طراحی الگوریتم هایی برای نمایش اپی توپ های سلول های B و T می باشد که از این طریق زمان و هزینه مورد نیاز برای بررسی های آزمایشگاهی را کاهش می دهد. با استفاده از این روش ها، ایمون شناسان می توانند جایگاه های میان کنش سیستم ایمنی با آنتی ژن ها را شناسایی کنند که به نوبه خود می تواند منتهی به ساخت واکسن های جدید شود.

پروتئین های کایمر در بردارنده زیر واحدهای پروتئینی، لینکرها و توالی هایی با خاصیت ادجوانتی، می توانند سبب افزایش خاصیت ایمونوژنیسیته پروتئین های نو ترکیب شوند (۱۹). با توجه به مزایای استفاده از پروتئین های کایمر و با در نظر گرفتن تحقیقاتی قبلی انجام شده که مؤید کارایی پروتئین های نو ترکیب *TcpA* و *CtxB* علیه بیماری زایی ویبریو کلرا بود، هدف از این تحقیق طراحی ایمونوژن کایمر نو ترکیب علیه فاکتورهای اتصال و توکسین باکتری ویبریو کلرا می باشد.

مواد و روش ها

به دست آوردن توالی و طراحی سازه

برای طراحی سازه ژنی نو ترکیب توالی ژن های کد کننده کاست ژنی از بخش سکانس های مرجع از سایت NCBI با کد دسترسی NC_015209.1 برای ژن *ctxB* و کد دسترسی NZ_CP013311.1 برای ژن *tcpA* دریافت شد. همچنین توالی های آمینو اسیدی نیز از پایگاه داده Uni Prot با کدهای دسترسی P01556 و P23024 به ترتیب برای پروتئین *CtxB* و *TcpA* دانلود و با فرمت FASTA ذخیره شد.

پیشنهادی نرم‌افزارهای تعیین ساختار سه‌بعدی پروتئین توسط برنامه PROSA (Austria) تعیین گردید (۲۸).

پیش‌بینی اپی توپ‌های خطی و فضایی سلول B

برای پیش‌بینی اپی توپ‌های خطی از سرور ABCpred (India) استفاده گردید. سرور ABCpred با استفاده از یک شبکه عصبی مصنوعی، مناطق اپی توپ خیز خطی در یک توالی آنتی‌ژن را پیش‌بینی می‌نماید. پیش‌بینی اپی توپ‌های فضایی با نرم‌افزار Cbtope (India) انجام شد (۱۹،۲۹).

تهیه سازه ژنی نو ترکیب

به منظور بررسی تأثیرات بهینه‌سازی کدونی بر بیان پروتئین نو ترکیب کایمر، توالی بهینه‌سازی شده جهت سنتز به شرکت Biomatik کانادا ارسال گردید. همچنین با طراحی پرایمر، ژن‌های تشکیل‌دهنده کایمر از روی ژنوم باکتری ویبریوکلا نیز تکثیر و در وکتور بیانی pET28a همسانه سازی شدند.

پس از دریافت ژن از شرکت Biomatik (Canada)، با استفاده از سلول‌های مستعد *E. coli* BL21DE3 و روش شوک حرارتی، تراریخت صورت گرفت. از میان کلون‌های به دست آمده در محیط LB آگار حاوی ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر کانامایسین، چند کلنی انتخاب و به طور جداگانه در محیط LB مایع حاوی کانامایسین به مدت یک شب در شیکر انکوباتور (Germany GFL3031) با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و سرعت ۱۵۰ rpm کشت داده شدند. پس از جمع‌آوری سلول‌ها، با روش لیز قلیایی، پلاسمید استخراج گردید. با استفاده از آنزیم‌های محدودالتر *HindIII* و *EcoRI* بر روی پلاسمیدهای استخراج شده هضم آنزیمی صورت گرفت و وجود ژن کایمر در کنار نشانگر مولکولی توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد. برای ساخت ژن کایمر به روش همسانه سازی، واکنش PCR برای ژن *ctxB* در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با غلظت ۳ میلی‌مولار *MgCl₂* و در دمای اتصال ۵۸ درجه سلسیوس انجام شد. ژن کد کننده *tcpA* با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی واجد توالی لینکر نیز با غلظت ۳ میلی‌مولار *MgCl₂* و در دمای اتصال ۵۸ درجه سلسیوس تکثیر شد.

جهت همسانه سازی، محصول PCR ژن *ctxB* و پلاسمید تخلیص شده pET28a با دو آنزیم محدودالتر *HindIII* و *EcoRI* برش زده شد. پس از تخلیص از ژل، الحاق قطعات با استفاده از آنزیم *T₄ DNA ligase* و در شرایط دمایی ۱۴ درجه سلسیوس و

برای حفظ انسجام ساختاری پروتئین کایمر وعدم تداخل دومین‌ها از یک تکرار لینکر (EAAAK) شامل اسیدآمینه‌های گلوتامیک، آلانین و لیزین استفاده گردید (۱۹). این لینکر به دلیل دارا بودن پل نمکی مربوط به اسیدگلوتامیک و لیزین می‌تواند با ایجاد ساختار هلیکس پایدار، مانع از به هم نزدیک شدن دومین‌های پروتئین گردد.

نرم‌افزار Optimizer (Spain) برای بهینه‌سازی توالی کد کننده و در نتیجه بهبود بیان پروتئین نو ترکیب کایمر استفاده گردید (۲۰). بررسی آنتی‌ژنیسیته پروتئین کایمر با استفاده از سرور آنلاین VaxiJen (Bulgaria Sofia) انجام گرفت (۱۹-۲۲).

ویژگی فیزیکی و شیمیایی

ویژگی‌هایی نظیر وزن مولکولی، ترکیب اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده پروتئین، تکرار آن‌ها، تعداد اسیدهای آمینه باردار مثبت و منفی، خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین، نیمه عمر، شاخص ناپایداری، انعطاف‌پذیری پروتئین، نقطه ایزو الکتریک و ساختار دوم پروتئین با استفاده از برنامه ProtParam (India) و ProtScale (India) پیش‌بینی گردید (۲۳،۲۴).

پیش‌بینی ساختار دوم RNA

ساختار ثانویه mRNA پس از بهینه‌سازی کدون ها مورد ارزیابی قرار گرفت. به همین جهت از برنامه Mfold.RNA Fold (England) استفاده شد (۲۵). همچنین از الگوریتم ژنتیکی RNAG که بر اساس حداقل انرژی آزاد می‌باشد برای تعیین ساختار دوم مولکول mRNA استفاده گردید. برنامه RNAFold برای آنالیز الگوهای تغییر همگام، از انطباق چندگانه توالی به‌عنوان ورودی بهره می‌برد.

پیش‌بینی ساختار دوم و سوم پروتئین

پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین با استفاده از نرم‌افزارهای GORIV و PSI Pred (USA) که این نرم‌افزارها آنالیز ساختار دوم پروتئین را بر اساس موقعیت مکانی UCL ها انجام داده صورت گرفت (۲۶).

ساختار سوم پروتئین‌ها با استفاده از سرور I-TASSER (USA) انجام گرفت (۲۷). این سرور با استفاده از بانک اطلاعاتی شبیه‌سازی خود، پایدارترین ساختار پروتئینی را با توجه به اطلاعات ذخیره‌شده در خود پیشنهاد می‌دهد. کیفیت مدل‌های

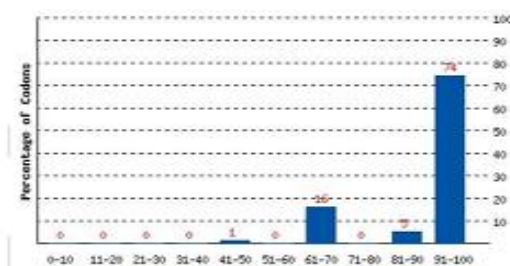
یافته‌ها

بهینه‌سازی در چهار بخش قابل‌بررسی بود که دربردارنده انعطاف‌پذیری ساختار پروتئین، تنظیم ترجیحی کدون‌ها، حلالیت و افزایش درصد فراوانی بازهای آلی نیترژن دار سیتوزین و گوانین می‌شد. افزایش شاخص Codon Adaptive Index (CAI) (شاخص انطباق‌پذیری کدونی) به ۱۰۰٪ نشان‌دهنده میزان انعطاف‌پذیری و افزایش کدون‌های مورد استفاده برای بیان ژن در باکتری *اشریشیاکلی* می‌باشد. مزیت نسبی در بهینه‌سازی سازه ژنی الگوی کدونی مناسب برای افزایش کارایی الگوی انتخابی در متابولیسم باکتری *اشریشیاکلی* می‌باشد. شاخص انطباق‌پذیری کدونی از ۰/۶۶ به ۰/۹۰ تغییر کرد (نمودار ۳). انتخاب و تغییر کدون مناسب به نحوی بود که محتوای سیتوزین و گوانین از ۴۱ درصد به ۴۴/۶ درصد افزایش یافت (نمودار ۲). تعداد کدون‌هایی که از کیفیت مناسبی برای افزایش بیان پروتئین برخوردار هستند از ۴۴ درصد به ۷۴ درصد تغییر پیدا کرد (نمودار ۱). نتایج حاصل از آنالیز توالی کایمر با نرم‌افزار Blast-x تأیید نمود که اعمال تغییرات روی ژن و بهینه‌سازی توالی آن بدون هیچ‌گونه تغییری بر روی ردیف اسیدهای آمینه در پروتئین هدف بوده است. با استفاده از نرم‌افزار *Vaxijen* آنتی‌ژن بودن پروتئین کایمر ۰/۴۸۵ تعیین شد.

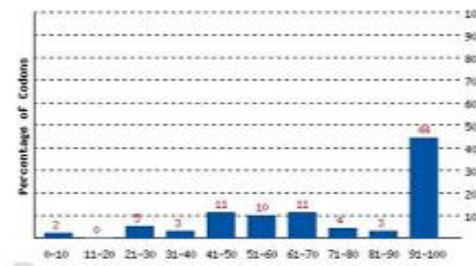
به مدت ۱۰ ساعت انجام شد. پلاسمید نو ترکیب به درون سلول‌های مستعد *E.coli* DH5 α ترانسفرم و غربال‌گیری کلنی‌ها بر روی محیط کشت LB agar واحد ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک کانامایسین انجام گرفت. در مرحله بعد پلاسمید نو ترکیب واحد ژن *ctxB* و محصول PCR ژن *tcpA* با دو آنزیم محدودالتر *XhoI* و *HindIII* برش زده شد. قطعات تخلیص شده با استفاده از آنزیم T₄ DNA ligase و در شرایط دمایی ۱۴ درجه سلسیوس و به مدت ۱۰ ساعت به هم الحاق شدند. پلاسمید نو ترکیب به درون سلول‌های مستعد *E.coli* DH5 α ترانسفرم شد.

بررسی بیان پروتئین کایمر

جهت بیان پروتئین نو ترکیب، کلنی‌های تأیید شده در محیط LB مایع حاوی ۸۰ $\mu\text{g/mL}$ کانامایسین تلقیح و به مدت یک‌شب در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و سرعت ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از کشت مجدد، زمانی که جذب نوری در طول موج ۶۰۰ nm به ۰/۶ رسید، با افزودن ماده القاء کننده IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار در شرایط استریل، القاء صورت گرفت. محیط‌های فوق در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و سرعت ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از گذشت ۵ ساعت، سلول‌های محیط با سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شدند. سلول‌ها با بافر لیزکننده شکسته و به همراه نشانگر پروتئینی، روی ژل ۱۲ درصد sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) polyacrylamide gel electrophoresis الکتروفورز گردیدند.

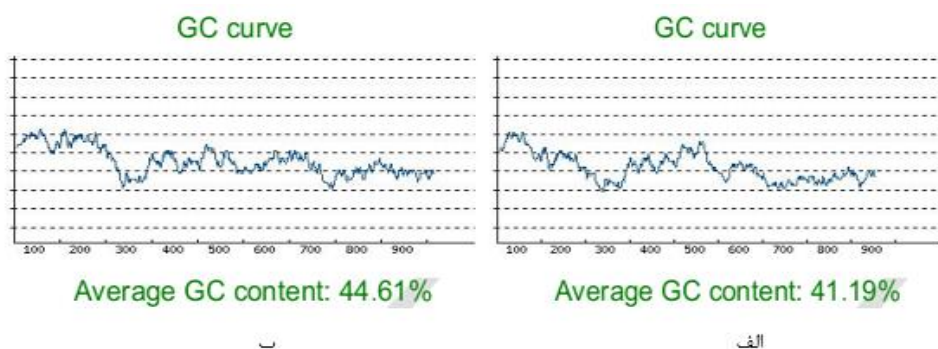


ب

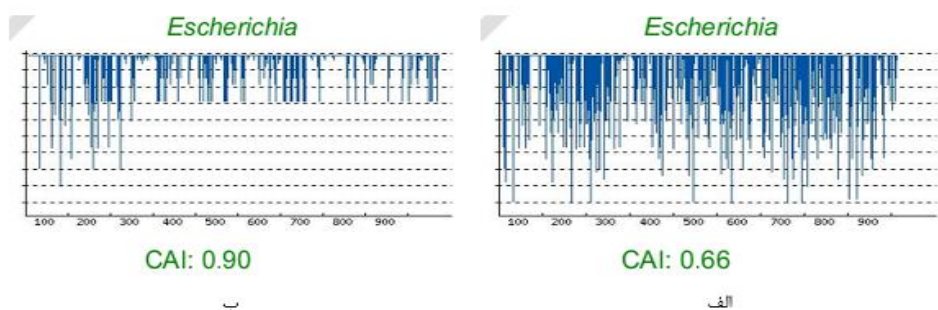


الف

نمودار ۱: درصد توزیع کدون‌ها مربوط به کایمر طبیعی *tcpA-ctxB* (الف) و کایمر بهینه‌سازی شده *tcpA-ctxB* (ب). به کدون‌هایی که بالاترین فراوانی را دارند ارزش ۱۰۰ داده شده است. پس از بهینه‌سازی درصد کدون‌های با شانس بیان بالا، افزایش یافت.



نمودار ۲: متوسط درصد بازهای GC مربوط به کایمر طبیعی *tcpA-ctxB* (الف) و کایمر بهینه‌سازی شده *tcpA-ctxB* (ب). تغییر کدونی منجر به افزایش میزان بازهای گوانین و سیتوزین گردید



نمودار ۳: شاخص سازگاری کدون (CAI) مربوط به کایمر طبیعی *tcpA-ctxB* (الف) و کایمر بهینه‌سازی شده *tcpA-ctxB* (ب). به همراه بهینه‌سازی کدونی، شاخص سازگاری کدون نیز حدود ۲۷ درصد ارتقاء یافت

نو ترکیب طراحی شده با احتمال ۱۰۰ درصدی در این میزان به صورت محلول بیان می‌شود.

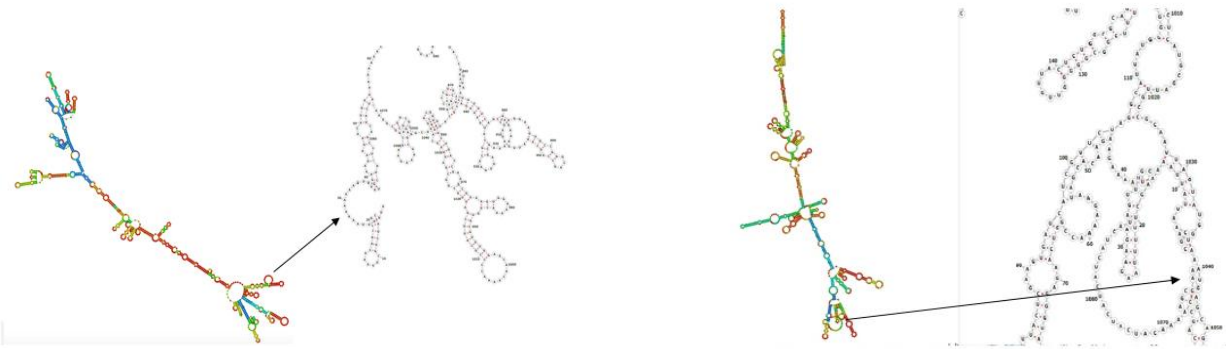
پیش‌بینی ساختار RNA

پیش‌بینی ساختار RNA یکی از حوزه‌های مهم بیوانفورماتیک می‌باشد و روش‌های مختلفی برای آسان‌تر کردن تعیین ساختار RNA ارائه شده است. برای پیش‌بینی ساختار دوم از الگوریتم SetPSO که یک الگوریتم بهینه‌سازی بر پایه کار با مجموعه‌هاست و از رویکرد مینیمم سازی سطح انرژی بهره می‌برد استفاده می‌نماییم. ساختار پیش‌بینی شده ناحیه شروع mRNA ۵' پس از بهینه‌سازی کدون های ژن کایمر در شکل ۱ قابل مشاهده بوده و میزان حداقل انرژی برای ساختار قبل از بهینه‌سازی ۲۶۹/۳۰- کیلوکالری و بعد از بهینه‌سازی به ۳۶۷/۸۰- رسید.

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پروتئین

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین کایمر با استفاده از برنامه Prot param نشان داد که وزن مولکولی کایمر ۳۲۴۲۵/۲۴ دالتون بود، نقطه ایزوالکتریک آن ۸/۲۴ می‌باشد. مجموع اسید آمینه‌های با بار منفی (گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید): ۲۵ و مجموع اسید آمینه‌های با بار مثبت (آرژنین، لیزین): ۲۷ می‌باشد. شاخص آلیفاتیک کایمر نیز ۹۴/۸۵ و شاخص ناپایداری پروتئین کایمر نیز ۲۴/۰۴ بود. شاخص ناپایداری بیان‌گر میزان پایداری پروتئین نو ترکیب بوده به گونه‌ای که پروتئین‌هایی با شاخص کمتر از ۴۰ جز پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شوند. بر این اساس پروتئین کایمر که پروتئین TcpA در قسمت انتهایی آمینی و پروتئین CtxB در انتهای کربوکسیل آن قرار دارد، مورد استفاده قرار گرفت.

بر اساس پیش‌بینی احتمال بیان پروتئین نو ترکیب به حالت محلول در سیستم بیانی /شیریشیالی، پروتئین کایمر

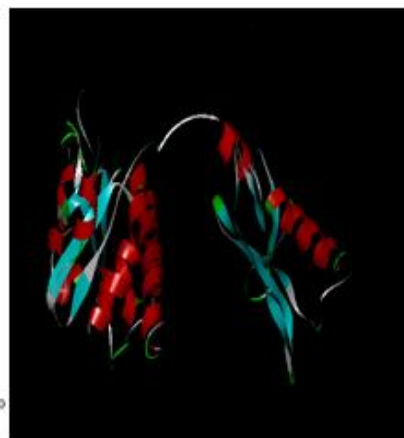
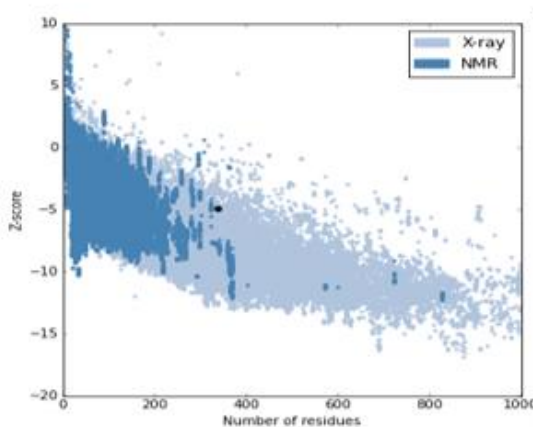


شکل ۱: الف) ساختار RNA قبل از بهینه‌سازی بیوانفورماتیکی (حداقل انرژی آزاد ۲۶۹,۳۰-) فلش‌ها نواحی ابتدایی mRNA ۵' می‌باشد. ب) ساختار دوم RNA بعد از بهینه‌سازی بیوانفورماتیکی (حداقل انرژی آزاد ۳۶۷,۸۰-). ناحیه mRNA ۵' فاقد لوپ یا گره‌های بلند می‌باشد.

پیش‌بینی ساختار دوم و سوم پروتئین کایمر

بررسی ساختار دوم پروتئین با استفاده از برنامه GORIV و PsiPred نشان داد که پروتئین حاصل از کایمر موردنظر ۱۸۶ مارپیچ آلفا (۴۹/۶۰٪)، ۵۰ رشته گسترده (۱۳/۳۳٪)، فاقد چرخش β و ۱۳۹ پیچ تصادفی (۳۷/۰۷٪) می‌باشد. ساختار سه‌بعدی پروتئین کایمر پیش‌بینی‌شده به‌وسیله برنامه I-TASSER در شکل ۲ نشان داده شده است. در بررسی‌ها حالت‌های ممکن بررسی و پایدارترین حالت (c-score -2/34) انتخاب شد. کیفیت ساختار پیش‌بینی‌شده توسط نرم‌افزار PROSA بررسی شد. بر این اساس کیفیت ساختار پروتئین در محدوده پروتئین‌های کریستالوگرافی شده و یا تعیین ساختار شده به روش NMR بود (شکل ۲).

پیش‌بینی اپی توپ خطی و فضایی سلول B



ب

الف

شکل ۲. پیش‌بینی ساختار پروتئین کایمر (الف) و بررسی کیفیت ساختار (ب). ساختار پروتئین کایمر نشان می‌دهد که لینکر توانسته دو پروتئین را از هم جدا نگه دارد. کیفیت ساختار پروتئین در محدوده پروتئین‌های کریستالوگرافی شده و یا تعیین ساختار شده به روش NMR بود.

جدول ۱: نتایج پیش‌بینی اپی توپ‌های خطی. توالی‌هایی با امتیاز بیش از ۰/۴ به‌عنوان اپی توپ مطرح می‌باشند

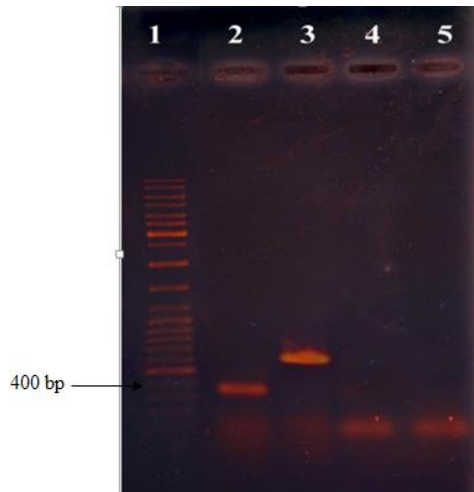
امتیاز	موقعیت شروع	توالی	امتیاز	موقعیت شروع	توالی
۰/۷۶	۸۷	PFIGTNMNFSPRNA	۰/۹۳	۵۲	RGLGNYPATADATAAS
۰/۷۶	۳۰۵	MANGAAGCAGCAGCAA	۰/۹۰	۲۶۸	AIERMKDTLRIAYLTE
۰/۷۶	۲۰۵	TPQNITDLCAEYHNTQ	۰/۸۹	۲۳۷	GKREMAITFKNGAIF
۰/۷۵	۲۵۹	SQHIDSQKKAIERMKD	۰/۸۸	۴۶	ALTQTYRGLGNYPATA
۰/۷۴	۲۸۸	KLCVWNNKTPHAIAAI	۰/۸۸	۲۱۱	DLCAEYHNTQIYTLND
۰/۷۴	۱۹۹	SEAAAKTPQNITDLCA	۰/۸۶	۲۹۶	TPHAIAAISMANGAAG
۰/۷۳	۲۵	QRAIDSQNMTKAAQSL	۰/۸۴	۷۲	GLVSLGKISSDEAKNP
۰/۷۱	۲۵۳	QVEVPGSQHIDSQKKA	۰/۸۳	۲۳۱	YTESLAGKREMAITF
۰/۷۱	۱۹	GVVTLAQRIDSQNMT	۰/۸۲	۲۲۵	NDKIFSYPESLAGKRE
۰/۷۱	۱۰۷	AFAISVDGLTQAQCKT	۰/۸۲	۱۶۰	GVGVIKSIAPASKNLD
۰/۷۰	۲۷۴	DTLRIAYLTEAKVEKL	۰/۸۲	۱۳۰	MFPYIAIKAGGAVALA
۰/۶۶	۶۰	TADATAASKLTSGLVS	۰/۸۱	۱۳۹	GGAVALADLGDFENSA
۰/۶۶	۲۸۲	TEAKVEKLCVWNNKTP	۰/۷۹	۷۸	KISSDEAKNPFIGNM
۰/۵۸	۳۴	TKAAQSLNSIQVALTQ	۰/۷۹	۱۸۷	KGTAPFGVAFGNSEAA
۰/۵۸	۶۶	ASKLTSGLVSLGKISS	۰/۷۸	۸	IVLGIMGVVSAGVVTL
۰/۵۶	۲۱۸	NTQIYTLNDKIFSYTE	۰/۷۸	۱۷۲	KNLDTNITHVEKLCK
۰/۵۶	۱۴۵	ADLGDFENSAAAAETG	۰/۷۸	۱۲۱	KTLITVSGDMFPYIAI
۰/۵۶	۹۹	PRNAAANKAFAISVDG	۰/۷۷	۱۵۴	AAAAETGVGVIKSIAP

جدول ۲: نتایج پیش‌بینی اپی توپ‌های ساختاری. توالی‌هایی با امتیاز ۴ و بیش از آن به‌عنوان اپی توپ مطرح می‌باشند

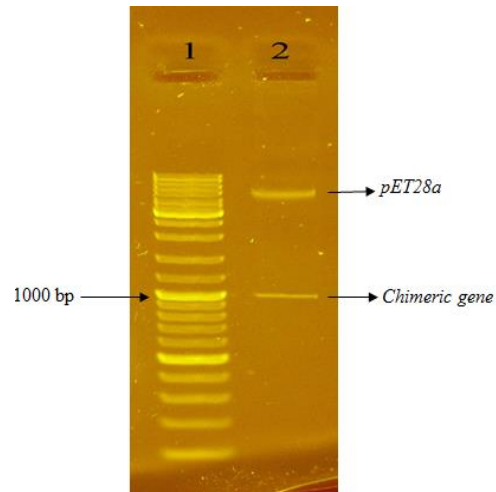
امتیاز	موقعیت	آمینواسید	امتیاز	موقعیت	آمینواسید
۴	۱۲۱	K	۴	۶۰	T
۴	۱۲۴، ۱۲۵	IT	۴	۷۷، ۷۸	GK
۴	۱۵۱، ۱۵۲	EN	۵	۷۹، ۸۰	IS
۴	۱۷۷	T	۴	۸۱	S
۴	۱۹۱	P	۵	۸۲، ۸۳	DE
۴	۲۰۱-۲۰۳	AAA	۴	۸۵، ۸۶	KN
۷	۲۶۲	I	۴	۹۹، ۱۰۰	PR
۸	۲۶۳	D	۵	۲۵۰-۲۵۵	AIFQVE
۶	۲۶۴	S	۷	۲۵۷، ۲۵۶	VP
۵	۲۶۵	Q	۸	۲۵۸	G
۴	۲۸۸-۲۹۰	KLC	۷	۲۵۹، ۲۶۰	SQ
۴	۲۹۱	V	۸	۲۶۱	H

ساخت کاست ژنی

برشی آنزیمی پلاسمید نوترکیب واجد ژن کایمر سنتزی صورت گرفت و قطعه ۹۶۵ جفت بازی مشاهده‌شده بر روی ژل آگارز صحت همسانه سازی ژن سنتزی را نشان داد (شکل ۳ الف). نتایج تعیین توالی نیز تأیید کرد که توالی در حین سنتز دچار تغییرات نشده است.



شکل ۳: ب. تأیید ساخت کاست ژنی با روش PCR داخلی و پرایمرهای اختصاصی ژن‌ها. ردیف ۱: نشانگر اندازه DNA ladder mix. ردیف ۲: الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نوترکیب با جفت پرایمرهای اختصاصی *ctxB*. ردیف ۳: الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نوترکیب با جفت پرایمرهای اختصاصی *tcpA*. ردیف ۴: PCR پلاسمید pET28a با جفت پرایمرهای اختصاصی *ctxB*. ردیف ۵: PCR پلاسمید pET28a با جفت پرایمرهای اختصاصی *tcpA*

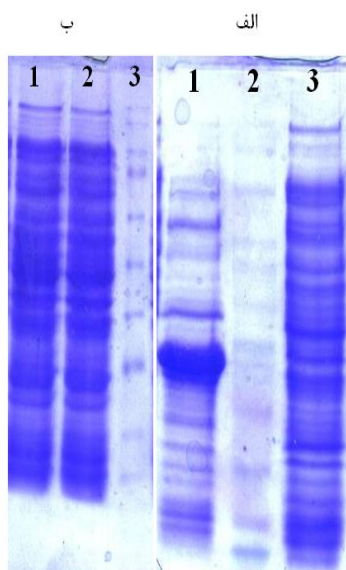


شکل ۳: الف. تأیید کاست ژنی سنتز شده با روش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدود گر *EcoRI* و *HindIII*. ردیف ۱: نشانگر اندازه DNA ladder mix. ردیف ۲: پلاسمید نوترکیب برش خورده با آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI*

به منظور ساخت کاست ژنی از طریق همسانه سازی ابتدا قطعه *ctxB* در وکتور همسانه سازی شد و در ادامه محصول PCR مربوط به ژن *tcpA* که واجد توالی لینکری EAAAK بود، در فرودست ژن *ctxB* وارد وکتور شد. جهت تأیید همسانه سازی ژن‌ها و ساخت کاست ژنی از جفت پرایمرهای اختصاصی هر ژن استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۳ ب دیده می‌شود، واکنش PCR مربوط به پلاسمید نوترکیب با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *ctxB* منجر به تکثیر قطعه ۳۲۰ جفت بازی شد. همچنین واکنش تکثیری با استفاده از پلاسمید نوترکیب و پرایمرهای *tcpA* نیز، وجود قطعه ۶۰۰ جفت بازی مربوط به ژن *tcpA* را تأیید کرد.

بررسی بیان پروتئین کایمر نوترکیب

پس از القاء بیان پروتئین مورد نظر و جمع‌آوری و شکستن سلول‌ها، کل محتوای پروتئینی روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه‌های القاء شده واجد پلاسمید نوترکیب دربردارنده ژن کایمر سنتزی، تولید پروتئین نوترکیب با وزن مولکولی حدود ۳۷ کیلو دالتون مشاهده شد (شکل ۴ الف) ولی بیان چنین پروتئینی در نمونه‌های القاء نشده وجود نداشت (شکل ۴ ب). همچنین در نمونه‌های القاء شده واجد پلاسمید نوترکیب دربردارنده ژن کایمر ساخته‌شده به روش همسانه سازی، تولید پروتئین نوترکیب مشاهده شد.



شکل ۴: بررسی بیان پروتئین کایمر (CtxB) - (TcpA) از کاست ژنی طبیعی و کاست ژنی بهینه‌سازی شده کدون (ب) بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد با رنگ‌آمیزی کوماسی بلو. الف: ستون ۱، نمونه القاشده با IPTG، ستون ۲، نشانگر اندازه پروتئین (Vivantis) ستون ۳، نمونه القا نشده، ب: ستون ۱، نمونه القاشده با IPTG، ستون ۲، نمونه القا نشده، ستون ۳ نشانگر اندازه پروتئین (Vivantis)

بحث

پروتئین TcpA به‌عنوان زیر واحد بزرگ پیلی با توجه به محل قرارگیری آن در سطح باکتری دارای نقش مهمی در تشکیل گیرنده برای باکتریوفاژ می‌باشد و از طرف دیگر با توجه به نحوه قرارگیری این پروتئین در معرض آنتی‌بادی‌ها باعث شده تا کاندیدای مناسبی به‌منظور توسعه ایمنی ضد کلونیزاسیون علیه بیماری وبا باشد. از سوی دیگر پروتئین CtxB دارای ساختاری هموپنتامریک و غیرسمی بوده که بر روی کروموزوم بزرگ باکتری ویبریولکرا قرار گرفته است. پروتئین CtxB علاوه بر اینکه سبب تولید آنتی‌بادی و ایجاد محافظت علیه توکسین کلرا می‌شود، خود به‌عنوان یک ادجوان زیستی مهم مطرح است که می‌تواند سبب برانگیختن پاسخ‌های ایمنی از جمله ایمنی مخاطی شود.

در این تحقیق، به دلیل خاصیت ایمنی‌زایی پروتئین TcpA و خاصیت آنتی‌ژنی و ادجوانتی پروتئین، طراحی پروتئین کایمر دربردارنده هر دو زیر واحد مدنظر قرار گرفت. بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که این پروتئین کایمر توانایی تحریک سیستم ایمنی را خواهد داشت.

Kundu نشان داد که استفاده از پروتئین‌های نوترکیب هرکدام از دو پروتئین TcpA و CtxB به‌تنهایی و هم‌زمان باهم می‌تواند سبب ایجاد ایمنی علیه بیماری شود، اما زمانی که به‌صورت مخلوط باشند خاصیت ایمنی‌زایی به‌مراتب بالاتری دارند (۱۴). به همین دلیل ژن *ctxB* را با ژن *tcpA* فیوژ کرده تا با تولید پروتئین کایمریک حاصل از این ممزوج قدرت ایمنی‌زایی افزایش یابد. در طراحی کاندیدهای واکسن امروزه توجه خاصی به پروتئین‌های کایمر می‌شود. پروتئین‌های کایمر دربردارنده زیر واحدهای پروتئینی، لینکرها و توالی‌هایی با ویژگی ادجوانتی، می‌توانند سبب افزایش خاصیت ایمنونویسیستی پروتئین‌های نوترکیب شوند. استفاده از لینکر مناسب این امکان را فراهم می‌آورد که سیستم ایمنی بتواند علیه اپی‌توپ‌های خطی و به‌ویژه اپی‌توپ‌های ساختاری هر زیر واحد تشکیل‌دهنده پروتئین، آنتی‌بادی تولید کند. در این مطالعه از لینکری سخت شامل اسیدآمینوهای EAAAK (اسیدآمینو گلوتامیک، آلانین و لیزین) استفاده شد. این ترادف به علت داشتن پل نمکی مربوط به اسید گلوتامیک و لیزین می‌تواند با ایجاد ساختار هلیکس پایدار، مانع از به هم نزدیک شدن دمین‌های پروتئینی شود (۲۲). در مطالعات انجام‌شده، تعداد تکرار لینکر بین ۱ تا ۵ تکرار متفاوت

بوده است. نتایج تحقیقات نشان داده که ۴ و یا ۵ تکرار از توالی لینکر EAAAK به‌خوبی می‌تواند سبب پروتئین‌های کایمریک فولدینگ مناسب داشته باشند (۲۹، ۲۷، ۱۹). در تحقیقی که توسط Nazarian و همکاران انجام شد جهت ایجاد فاصله بین زیر واحدهای پروتئین کایمر از تکرار ۴ تایی لینکر استفاده شد (۱۹). در تحقیقی که توسط Amani و همکاران انجام گردید، به‌کارگیری لینکر ۴ (EAAAK) در پروتئین کایمر سبب شد که پروتئین‌های EspA، اینتیمین و Tir (Translocated intimin receptor) ساختار جداگانه داشته باشند (۳۰). در تحقیق حاضر، استفاده از ۱ تکرار لینکر هم توانست سبب جدا ماندن هر دو جزء پروتئینی کایمر از هم شود. این حالت می‌تواند به ماهیت خود پروتئین‌های مورد استفاده نیز ارتباط داشته باشد. از آنجاکه توالی ژن‌های *tcpA* و *ctxB* دارای کدون نادر هست، تمامی توالی‌های نوکلئوتیدی تولیدکننده پروتئین کایمر با نرم‌افزار آنلاین جهت بیان بالا در میزبان *E. coli* بهینه‌سازی گردید. Codon Adaptive (CAI) Index کایمر *ctxB tcpA* قبل از بهینه‌سازی ۰/۶۶ و بعد از بهینه‌سازی به ۰/۹۰ افزایش یافت که این نشانگر انتخاب کدون‌هایی هست که tRNA بیشتری برای آن وجود داشته که باعث افزایش بیان در میزبان *E. coli* می‌شود. عدم بیان پروتئین نوترکیب کایمر از ژن‌های طبیعی فیوژ شده به هم و از طرفی بیان نسبتاً بالای پروتئین نوترکیب از ژن سنتزی تأیید کننده موارد بالا می‌باشد. یکی از فاکتورهای مهم در طراحی ژن‌های کایمر توجه به پایداری ساختار mRNA می‌باشد. به‌منظور بررسی پایداری ساختار RNA میزان ΔG ، وجود ساختارهایی از قبیل لوپ‌های کاذب ارزیابی شد. حداقل انرژی آزاد (ΔG) که نشان‌دهنده پیشرفت خود به خودی واکنش بوده که قبل از بهینه‌سازی ۲۶۹/۳۰- و بعد از بهینه‌سازی به ۳۶۷/۸۰- بود. این تغییر نشان می‌دهد ساختار کایمر انتخاب‌شده پایدار بوده است. با توجه به نتایج حاصل از نرم‌افزارهای مختلف و همچنین تحقیقاتی که پیش‌از این بر روی این پروتئین‌ها و ترکیب آن‌ها برای افزایش پاسخ ایمنونولوژیک صورت گرفته، بهترین حالت برای ساخت واکسن ترتیب این سازه نوترکیب به‌صورت Linker-toxin-coregulated pili A - Cholera toxin subunit B (*ctxB*) در نظر گرفته شد. ترتیب ذکر شده طبق نتایج حاصل از نرم‌افزار ProtParam بیشترین پایداری و طول عمر را خواهد داشت.

نو ترکیب با منشأ کایمر سنتزی به دلیل حذف کدون های نادر و عناصر منفی مؤثر بر بیان، بالا بود.

پروتئین نو ترکیب بیان شده واجد فاکتورهای اتصالی و توکسین باکتری ویبریوکلرا، می تواند به عنوان یک ایمونوژن دوگانه علیه بیماری زایی باکتری ویبریوکلرا مورد مطالعه قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از مدیریت محترم مرکز علم و فناوری زیستی دانشگاه جامع امام حسین (ع) جهت همکاری در اجرای این پژوهش تقدیر و تشکر می شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

برای پیش بینی ساختار سوم پروتئین از روش های همولوژی مدلینگ و پیش گوئی از آغاز (*ab initio*) استفاده می شود. به دلیل اینکه برای پروتئین کایمر مورد نظر دارای ساختار جدید است، پیش بینی بر اساس روش های *ab initio* انجام گرفت. نتایج نرم افزار I-TASSER نشان داد که ساختار سوم پیش بینی شده پروتئین، ساختاری صحیح است. چراکه ضریب اطمینان (C-score) ساختار تعیین شده در محدوده مجاز قرار گرفته است. C-score که از نظر عددی بین ۵- تا ۲ است، یک نمره اطمینان برای تعیین کیفیت ساختارهای پیش بینی شده توسط این نرم افزار می باشد که بر پایه اهمیت ساختار الگوهای هم تراز و همگرایی پارامترهای ساختار شبیه سازی شده محاسبه می گردد.

در این تحقیق به طور مقایسه ای نیز بیان دو سازه طبیعی و سنتزی مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که کاست ژنی طبیعی به دلیل دارا بودن کدون های نادر قابلیت بیانی که با روش SDS-PAGE بررسی شود را ندارد. با این حال بیان پروتئین

References

- Sanchez J, Holmgren J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. Cellular and Molecular Life Sciences 2008;65(9):1347-60.
- Mousavi SL, Nazarian S, Amani J, Karimi Rahgerdi A. Rapid screening of toxigenic *vibrio cholerae* O1 strains from south Iran by PCR-ELISA. Iranian biomedical journal 2008;12(1):15-21.
- Mandal S, Mandal MD, Pal NK. Cholera: a great global concern. Asian Pacific journal of tropical medicine 2011;4(7):573-80.
- Nazarian S, Arefpour M, Bagheripour M, Olad G. Bioinformatical Study and Evaluation of Expression of Cholera Toxin Subunit B Optimized Gene as a Vaccine Candidate. J Isfahan Med Sch 2014;32(279):378-87.
- Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, toxigenic *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhimurium* by multiplex PCR. Archives of Clinical Infectious Diseases 2009;4(2):97-103.
- Sánchez J, Holmgren J. Cholera toxin-a foe & a friend. Indian Journal of Medical Research 2011;133(2):153.
- Bharati K, Ganguly NK. Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. Indian Journal of Medical Research 2011;133(2):179.
- Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiology and molecular biology reviews 1998;62(4):1301-14.
- Banerjee R, Das B, Nair GB, Basak S. Dynamics in genome evolution of *Vibrio cholerae*. Infection, Genetics and Evolution 2014;23:32-41.
- Baldauf KJ, Royal JM, Hamorsky KT, Matoba N. Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications. Toxins 2015;7(3):974-96.
- Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. Proceedings of the National Academy of Sciences 1987;84(9):2833-7.
- Viel T, Dransart E, Nemati F, Henry E, Thézé B, Decaudin D, et al. In vivo tumor targeting by the B-subunit of shiga toxin. Molecular imaging 2008;7(6):7290.2008. 00022.
- Johansson E-L, Bergquist C, Edebo A, Johansson C, Svennerholm A-M. Comparison of different routes of vaccination for eliciting antibody responses in the human stomach. Vaccine 2004;22(8):984-90.

14. Kundu J, Mazumder R, Srivastava R, Srivastava BS. Intranasal immunization with recombinant toxin-coregulated pilus and cholera toxin B subunit protects rabbits against *Vibrio cholerae* O₁ challenge. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2009;56(2):179-84.
15. Childers BM, Klose KE. Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*: the ToxR regulon. *Future Microbiology* 2007; 2(3):335-44.
16. Odumosu O, Nicholas D, Yano H, Langridge W. AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable. *Toxins* 2010;2(7):1612-45.
17. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor α in patients with sepsis syndrome: a randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *Jama* 1995;273(12):934-41.
18. Shen My, Sali A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein science* 2006;15(11):2507-24.
19. Nazarian S, Gargari SLM, Rasooli I, Amani J, Bagheri S, Alerasool M. An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. *Journal of microbiological methods* 2012;90(1):36-45.
20. Puigbo P, Guzman E, Romeu A, Garcia-Vallve S. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic acids research* 2007;35(suppl 2):W126-W31.
21. Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC bioinformatics* 2007;8(1):4.
22. Patwary NIA, Islam MS, Sohel M, Ara I, Sikder MOF, Shahik SM. In silico structure analysis and epitope prediction of E3 CR1-beta protein of Human Adenovirus E for vaccine design. *Biomedical Journal* 2016;39(6):382-90.
23. Garg VK, Avashthi H, Tiwari A, Pramod PAJ. MFPPI-Multi FASTA ProtParam Interface. *Bioinformatics* 2016;12(2):74-7.
24. Chakraborty C, Agrawal A. Computational analysis of C-reactive protein for assessment of molecular dynamics and interaction properties. *Cell biochemistry and biophysics* 2013;67(2):645-56.
25. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* 2003;31(13):3406-15.
26. Barrick JE, Roberts RW. Sequence analysis of an artificial family of RNA-binding peptides. *Protein Science* 2002;11(11):2688-96.
27. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods* 2015;12(1):7-8.
28. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research* 2007;35(suppl 2):W407-W10.
29. Ansari HR, Raghava GP. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome research* 2010;6(1):6.
30. Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of *Escherichia coli* O157: H7. *Vaccine* 2010;28(42):6923-9.

