



دانشگاه گیلان

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد چهارم، شماره سوم، ۱۳۹۵
<http://ejrr.gau.ac.ir>

تعیین نواحی اپی توپی سلول B و T پروتئین فلاژلین از باکتری کلاستریدیوم شوای، عامل بیماری شاربن علامتی در دام با استفاده از تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی

*سیده زهرا موسوی^۱، نرگس نظیفی^۲، زانا پیرخضریانیان^۲ و کسری احمدیان^۲

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد و ^۲دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی،

دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: شاربن علامتی از جمله بیماری‌های حاد و موثر بر گاو و گوسفندان جوان است که علائم این بیماری ایجاد میوزیت و مسمومیت است که اغلب کشنده می‌باشد. عامل این بیماری باکتری کلاستریدیوم شوای است که یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل و بی‌هوازی است و تولید گاز و اسپور می‌نماید. اسپور این باکتری مقاومت بالایی دارد و می‌تواند در خاک و غذا سال‌ها زنده بماند. ابعاد این باکتری ۸-۱×۳-۰/۵ میکرون است و معمولاً به صورت انفرادی، گاهی دیپلو، بندرت استریتو باسیل مشاهده می‌گردد. مهمترین آنتی‌ژن حفاظتی این باکتری فلاژلین نامیده می‌شود که یک پروتئین سطحی است و در پروتئین فلاژلا قرار دارد. از آنجا که پروتئین فلاژلین یک فاکتور بیماری‌زایی است، بنابراین یک آنتی‌ژن حفاظتی به شمار می‌آید که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است و از آن می‌توان در طراحی واکسن نو ترکیب استفاده کرد. هدف اصلی از مطالعه‌ی حاضر بررسی پروتئین فلاژلین با استفاده از تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی و مشخص کردن نواحی اپی توپی مربوط به سلول B و T است.

مواد و روش‌ها: با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی پیش بینی کننده‌ی اپی توپ‌های سلول B و T و همچنین نرم افزارهای پیش بینی کننده‌ی ساختار دوم و سوم پروتئین، اپی توپ‌های نهایی پروتئین فلاژلین براساس بالاترین امتیاز و بیشترین تکرار در نرم‌افزارها تعیین شدند و در نهایت به منظور بررسی بیشتر خواص

*نویسنده مسئول: zaramousavi@yahoo.com

اپی توپ‌های انتخاب شده، بررسی هضم آنزیمی و توان آنتی ژنی اپی توپ‌های نهایی با نرم‌افزار VaxiJen 2.0 با حد آستانه ۰/۸ نیز به کمک نرم افزارهای تحت وب مربوطه انجام شد.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر سه اپی توپ در دامنه‌ی توالی آمینواسیدی ۹۵-۱۰۷، ۳۱۱-۳۲۰، ۳۹۹-۴۰۶ برای سلول T و ۳ اپی توپ با توالی اسیدآمینه ای ۱۴۶-۱۵۶، ۲۴۶-۲۵۴، ۲۹۱-۲۹۹ برای سلول B مشخص کرد و نشان داد که توالی آمینو اسیدی ۳۲_۴۵ یک اپی توپ مشترک برای سلول‌ها B و T است. در نهایت تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ساختار دوم و سوم نشان داد که توالی اسید آمینه‌ای ۳۲_۴۵ ناحیه‌ی اپی توپی مشترک در دو گروه سلول‌های B و T می باشد که ۶۱ درصد این ناحیه شامل حلقه‌های تصادفی است و در سطح ساختار آنتی ژن فلاژلین قرار دارند.

نتیجه‌گیری: استفاده از توالی اسید آمینه ای اپی توپ‌های حاصله به‌خصوص اپی توپ مشترک در سازه‌های نو ترکیب مورد استفاده در واکسن‌های نسل جدید می‌تواند علاوه بر حذف خطرات ناشی از آثار سوء واکسن‌های زنده و تخفیف حدت یافته، سطح بالایی از پاسخ سیستم ایمنی را در بدن میزبان آلوده به باکتری کلستریدیوم شووای به وجود آورد.

واژه‌های کلیدی: کلستریدیوم شووای، فلاژلین، پیش بینی اپی توپ، بیوانفورماتیک

مقدمه

شاربن علامتی یکی از بیماری‌های حادی است که به طور عمده در گاو و گوسفند جوان مشاهده می‌شود. از جمله علائم این بیماری ایجاد میوزیت و مسمومیت است که اغلب کشنده می‌باشند. عامل این بیماری باکتری کلسترییدیوم شووای است که یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل، بی‌هوازی است که تولید گاز و اسپور می‌نماید. اسپور این باکتری مقاومت بالایی داشته و می‌تواند در خاک و غذا سال‌ها زنده بماند (۷)، بنابراین رایج‌ترین مسیر ورود این باکتری به بدن از طریق دستگاه گوارش است. هرچند که ممکن است از طریق ضایعات پوستی نیز منتقل شود (۱۲). ابعاد این باکتری ۸-۱۳×۰/۵ میکرون است و معمولاً به صورت انفرادی، گاهی دیپلو، بندرت استرپتو باسیل مشاهده می‌گردد (۱۳). امروزه مشخص شده است که ترشح *toxin*, *hyaluronidase*, *neuraminidase*, *DNAse*, *flagella* در بیماری‌زایی توسط این باکتری نقش به‌سزایی دارند (۶). آنتی‌ژن حفاظتی عمده‌ی این باکتری فلاژلین نامیده می‌شود که (۱۰) یک پروتئین سطحی است و در پروتئین فلاژلا قرار دارد (۱۵). از آن جایی که پروتئین فلاژلین یک فاکتور بیماری‌زا و هم‌چنین یک آنتی‌ژن حفاظتی به‌شمار می‌آید، در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۱۰). سیستم ایمنی بدن مسئول تنظیم آنتی‌بادی‌هایی است که ناحیه‌ی اپی‌توپ آنتی‌ژن را شناسایی می‌کنند (۵). اپی‌توپ‌ها پپتیدهای کوتاهی هستند که بر اساس نوع گیرنده‌ی آن‌ها در سیستم ایمنی به دو دسته‌ی کلی سلول B (خطی پیوسته و فضایی غیر پیوسته) سلول T (*MHC I* و *MHC II*) تقسیم‌بندی می‌شوند (۵). اپی‌توپ‌های سلول T در کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (*MHC*) که رشته پپتیدی آنتی‌ژنیک هستند قرار دارند و به وسیله‌ی گیرنده‌های سلول T شناسایی می‌شوند. مولکول *MHC I* در آنتی‌ژن‌های اندوژنوس و مولکول *MHC II* در آنتی‌ژن‌های اگزوژنوس حضور دارند. مولکول *MHC I* به پپتیدی با طول تقریباً ۹ اسیدآمینو در داخل یک شیار بسته باند می‌شود. ولی به‌دلیل این که آنتی‌ژن‌هایی که به شیار متصل هستند در هر دو انتها باز هستند، مولکول *MHC II* می‌تواند در پپتیدهای بلندتر حضور داشته باشد. اپی‌توپ‌های سلول B به وسیله آنتی‌بادی‌ها یا سلول B شناسایی می‌شوند که شامل اپی‌توپ‌های خطی پیوسته و اپی‌توپ‌های فضایی ناپیوسته می‌باشد. اپی‌توپ‌های فضایی که شامل اپی‌توپ‌های سلول B بزرگ هستند با ویژگی‌های سطحی سه بعدی مورد توجه قرار گرفته و در مولکول آنتی‌ژنیک شرکت می‌کنند (۴). با وجود این که منابع کمی در رابطه با تولید واکسن شاربن علامتی وجود دارد واکسیناسیون تنها راه مؤثر

1. Major Histocompatibility complex

برای کنترل بیماری شاربن علامتی می‌باشد (۱۳). حیوانات اهلی می‌توانند منابع مسمومیت غذایی انسان باشند، لذا برای کاهش یا حذف این خطر باید استراتژی‌هایی برای جلوگیری از ورود عفونت‌های حیوانی به زنجیره غذایی انسان توسعه پیدا کنند (۱). واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)^۱ به‌عنوان یکی از مدرن‌ترین تکنولوژی‌ها در تشخیص بیماری‌های عفونی، در مقایسه با تکنیک‌های سنتی است و همچنین ثابت شده است که این روش می‌تواند با سرعت و قابلیت اعتماد بیشتری، نتایج را در طی چند ساعت نشان دهد. PCR می‌تواند تشخیص سریع‌تر و مستقیم عفونت‌های باکتریایی را به‌طور مستقیم از نمونه‌های کلینیکی فراهم آورد (۲). همچنین ابداع روش‌های مهندسی ژنتیک سبب پیدایش حوزه‌ی نوینی در تولید مواد بیولوژیک از جمله واکسن‌های نو ترکیب شده است. پیش بینی اپی توپ‌های سلول B و T با قدرت ایمنی‌زایی بالا می‌تواند ابزاری توانمند برای تولید واکسن نو ترکیب بر اساس اپی توپ برای تحریک سیستم ایمنی بدن باشد (۵). پیش بینی اپی توپ‌های پیوسته سلول B بسیار مشابه به پیش بینی اپی توپ سلول T است، اما پیش‌بینی اپی توپ‌های ناپیوسته و فضای نیاز به شناخت بیشتر از ساختار سه بعدی کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی و سایر مسائل نیز دارد (۱۶). همچنین با پیشرفت علم ژنتیک، ژن عامل اصلی در برنامه‌ریزی عملکرد سلول و به دنبال آن کنترل ویژگی‌های موجود زنده شناخته شد. به این ترتیب تمایل برای شناخت هرچه بیشتر ژن‌ها به منظور توجیه پدیده‌های زیستی افزایش یافت تا حدی که در چند دهه اخیر، تجهیزات مورد نیاز در تحقیقات مولکولی به‌طور گسترده‌ای افزایش یافته است و امروزه تحقیقات مولکولی جزو مطالعات رایج آزمایشگاه‌های زیستی است. اطلاعات به‌دست آمده از تحلیل داده‌های زیستی به وسیله علم بیوانفورماتیک، در به خط کردن توالی‌ها در بانک‌های اطلاعاتی برای یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنی، پیش‌گویی ساختار و عملکرد محصولات ژن‌ها و یافتن ارتباط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و توالی‌های پروتئینی کمک می‌کند (۹۸).

برخی از پژوهشگران ایرانی با بررسی بیوانفورماتیکی پیش‌بینی اپی توپ‌های سلول B و T نشان دادند که این اپی توپ‌ها می‌توانند به‌عنوان نواحی مناسب برای ساخت واکسن‌های نو ترکیب در نظر گرفته شوند (۵ و ۱۷). هدف از مطالعه حاضر بررسی پروتئین فلاژلین با استفاده از تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی و مشخص کردن نواحی اپی توپی سلول B و T باکتری کلستری‌دیوم شووای

1. Polymerase chain reaction

است که در نهایت می توان این اپی توپ ها را به منظور تولید واکسن نو ترکیب در عوض استفاده از کل آنتی ژن مورد استفاده قرار داد.

مواد و روش ها

توالی اسید آمینه پروتئین فلاژلین: توالی اسید آمینه پروتئین فلاژلین آنتی ژن حفاظتی باکتری کلستری دیوم شووای که از ۴۱۳ اسید آمینه تشکیل شده است با شماره دسترسی BAB13814 از بانک جهانی (<http://www.ncbi.nih.gov/genbank>) استخراج شد (شکل ۱).

نرم افزارهای مورد استفاده برای پیش بینی اپی توپ ها: به منظور پیش بینی اپی توپ های سلول B و T پروتئین فلاژلین، نرم افزارهای لیست شده در جدول ۱ مورد استفاده قرار گرفتند. الگوریتم این نرم افزارها بر مبنای پیش بینی اختصاصی اپی توپ های سلول B و T طراحی شده است. در این نرم افزارها از توالی خطی اسید آمینه برای تعیین مناطقی با میزان بالای خواص آنتی ژنی که به عنوان ناحیه ی اپی توپ شناخته می شوند، استفاده شد. این نواحی با اسکورهای (رتبه های) مختلفی گزارش می شوند. انتخاب آلل های مورد استفاده در رابطه با سلوهای T مبنی بر شیوع بیشتر آلل ها در کشور می باشد (۳).

جدول ۱- نرم افزارهای تحت وب مورد استفاده برای پیش بینی توپ های سلول B و T

Table 1. web used to prediction of B and T cells

سرورها	لینک
Servers	Links
پیش بینی اپی توپ های سلول T	
Prediction of T cell epitopes	
IEDB	http://tools.immuneepitope.org/mhci/
SYFPEITH	http://www.syfpeithi.de/
PropredI	http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/
Propred	http://www.imtech.res.in/raghava/propred/
پیش بینی اپی توپ های سلول B	
Prediction of B cell epitopes	
Bcepred	http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/
ABCpred	http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/
BepiPred	http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred
BCPred	http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/
SVMTrip	http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/
LEPS	http://leps.cs.ntou.edu.tw/
IEDB	http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input

پیش‌بینی ساختار دوم و سوم آنتی‌ژن فلاژلین: شکل‌های مختلف فضایی (مارپیچ‌ها، صفحه‌ها، حلقه‌ها و چرخش‌ها) آنتی‌ژن فلاژلین باکتری کلستری‌دیوم شووای برای پیش‌بینی ساختار دوم آنالیز شد. برای این منظور از نرم‌افزار I_tasseer (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) استفاده گردید. در ادامه پیش‌بینی ساختار سوم آنتی‌ژن فلاژلین با استفاده از نرم‌افزار I_tasseer و هم‌چنین نرم‌افزار pymol انجام شد.

تعیین ویژگی‌های آنتی‌ژنی و هضم آنزیمی اپی‌توپ‌ها: انتخاب نهایی اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده سلول B و T با استفاده از سرور VaxiJen 2.0 انجام شد (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). این نرم‌افزار تحت وب اپی‌توپ‌ها را با توجه به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی طبقه‌بندی می‌کند. در پایان برای بررسی هضم آنزیمی توپ‌های پیش‌بینی شده پروتئین فلاژلین نرم‌افزار تحت وب هضم پروتئینی مورد استفاده قرار گرفت (<http://db.systemsbio.net:8080/proteomicsToolkit/proteinDigest.html>). علاوه بر شناسایی آنزیم‌هایی که اپی‌توپ‌های نهایی را هضم می‌کنند، جرم و نقطه ایزوالکتریک اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده نیز به وسیله این نرم‌افزار مشخص گردید.

ORIGIN

```
1 miinhnmnal nahrnmngni atagksmekl ssglrinrag ddaaglaise kmrgqirgld
61 qasrnaqdgi sliqtaegal aethsilqrm relsvqsand tnvavdrtai qdeinsltee
121 inrisgdtef ntqkllldggf kgefqiigans nqtvkldign msaaslgltt tnsleskalt
181 kdsnladgty ksigknlvdt ngnsvgtfda askkitvngk dtvfdkaala enavltvksg
241 taeikntmtg aatklssgny eikgtnvikd gklagtfdaa kkkltidvgv dvseaelgfg
301 tskmldkvsf tingsdvstr elasgsikti nsaieqvstq rsklgavqnr lehtinnlnt
361 ssenltaaes rvrdvdmake mmafsknnil sqaaqamlgq anqqpqqvlg llr
```

شکل ۱. توالی اسید آمینه‌ای پروتئین فلاژلین

Figure 1- Amino acid sequence of Flagellin protein

نتایج و بحث

تایید روش‌های تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک: به منظور بررسی صحت عملکرد نرم‌افزارهای مورد استفاده در این مطالعه، چهار آنتی‌ژن (GroEL, Dnak, Omp31 و SOD) که عملکرد اپی‌توپ‌های آن‌ها به صورت تجربی تایید شده‌اند، انتخاب شدند و اپی‌توپ‌های آن‌ها به وسیله ابزارهای بیوانفورماتیکی مورد استفاده در این مطالعه، پیش‌بینی شدند. سپس نتایج مقایسه اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده در برابر

اپی توپ‌های حاصله از آزمایشات تجربی نشان داد که اپی توپ پیش‌بینی شده بیوانفورماتیکی، با یافته‌های تجربی در همه آنتی‌ژن‌های انتخاب شده مشابه است (۵).

نرم‌افزارهای استفاده شده برای پیش‌بینی اپی توپ‌ها

سلول B: پس از وارد کردن توالی اسید آمینه‌ای پروتئین فلاژلین در نرم‌افزارهای پیش‌بینی اپی توپ‌های سلول B، اپی توپ‌هایی که بالاترین امتیاز را داشتند انتخاب شدند. بین اپی توپ‌های انتخاب شده مقایسه انجام شد و اپی توپ‌ها با بالاترین امتیاز و بیشترین تکرار در سرورها وارد مرحله بعدی آنالیز شدند (جدول ۲).

جدول ۲- اپی توپ‌های پیش‌بینی شده به وسیله نرم‌افزارهای پیش‌بینی کننده اپی توپ‌های سلول B

Table 2. Predicted epitopes by software's of B cell epitopes prediction

نرم افزارها	شروع	توالی	انتها
Software	Start	Sequence	Stop
BCPREDSFBCPRED	32	SGLRINRAGDDAAG	45
BCPREDSAAP	56	IRGLDQASRNAQDG	69
BCPREDSFBCPRED	95	VQSANDTNVAVDRT	108
BCPREDSAAP	107	RTAIQDEINSLTEE	120
SVMTRIP	115	NSLTEEINRISGDT	128
BCPREDSAAP	136	LDGGFKGEFQIGAN	149
BCPREDSAAP	169	TTTNSLESKALTKD	182
SVMTRIP	175	ESKALTKDSNLADG	188
BCPREDSFBCPRED	193	SGKNLVDNNGNSVG	206
BCPREDSAAP	205	VGTFDAASKKITVN	218
BCPREDSFBCPRED	220	KDTVFDKAALAENA	233
ABCPRED	228	ALAENAVLTVKSGT	241
BCPREDSAAP	241	TAEIKNTMTGAATK	254
BCPREDSAAP	272	KLAGTFDAAKKLT	385
BCPREDSFBCPRED	309	SFTINGSDVSTREL	322
BCPREDSAAP	328	KTINSAIEQVSTQR	341
BCPREDSFBCPRED	352	EHTINNLNTSSEN	365
BCPREDSFBCPRED	368	AESRVRDVMKEM	381
IEDB	399	GQANQQPQ	406

سلول T: برای شناسایی اپی توپ‌های سلول T از نوع MHC I به کمک نرم‌افزارهای پیش‌بینی کننده نوع MHC I از آلل‌های A-0101, A0201 و B-2705 و نوع MHC II از آلل‌های DRB1-0101 و DRB1-040 استفاده شد. اپی توپ‌هایی که بالاترین امتیاز را در هر نوع MHC I و MHC II داشتند به‌عنوان مناسب‌ترین اپی توپ‌ها انتخاب شدند و در نهایت اپی توپ‌های مشترک بین MHC I و

MHC II با بالاترین امتیاز و بیشترین تکرار، انتخاب و وارد مرحله پیش‌بینی اپی‌توپ بعدی شدند (جدول ۳).

جدول ۳- اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده به وسیله نرم‌افزارهای پیش‌بینی کننده اپی‌توپ‌های سلول T

Table 3. Predicted epitopes by software of T cell epitopes prediction

نرم افزار - آلل Software - Alleles	شروع Stat	توالی Sequence	انتهای Stop
PROPREDR-B-10401	1	MIINHNMNA	9
MHCI IEDB-A-0101	8	EKLSSGLRINRAGD	41
MHCI IEDBA-0101	20	IATAGKSMEKLSSG	33
MHCI IEDB-A-0101	32	SGLRINRAGDDAAG	45
MHCI IEDB-A-0101	45	GLAISEKMRGQIRG	58
MHCI IEDB-A-0201	55	QIRGLDQASRNAQD	68
MHCI IEDB-A-0201	83	THSILQRMRELSVQ	96
MHCI IEDB-A-0101	87	LQRMRELSVQSAND	100
MHCI IEDB-A-0201	100	DTNVAVDRTAIQDE	113
Propred-A-0201	116	SLTEEINRI	124
MHCI IEDB-A-0201	120	EINRISGDTEFNTQ	133
MHCI IEDB-B-2705	125	SGDTEFNTQKLLDG	138
MHCI IEDB-A-0201	139	GFKGEFQIGANSNQ	152
MHCI IEDB-A-0101	146	IGANSNQTVKLDIG	156
Propred-A01	173	SLESKALTK	181
SYFPEIT-A-0101	180	TKDSNLADGTY	190
MHCI IEDB-A-0101	189	TYKISGKNLVDNNG	202
SYFPEITHI-A-0201	193	NLADGTYKI	201
MHCI IEDB-B-2705	209	DAASKKITVNGKDT	222
MHCI IEDB-A-0101	227	AALAENAVLTVKSG	240
MHC II IEDBDR-B1-0401	237	VKSGTAEIKNTMTGA	251
MHCI IEDB-A-0201	243	EIKNTMTGAATKLS	256
MHCI IEDB-A-0101	253	TKLSSGNYEIKGTN	266
MHCI IEDB-A-0101	258	GNYEIKGTNVIKDG	271
MHCI IEDB-A-0201	270	DGKLAGTFDAAKKK	283
MHCI IEDB-A-0201	287	DGVGDVSEALGFQ	300
MHCI IEDB-A-0201	294	EAELGFQTSKMLDK	307
MHCI IEDB-A-0101	312	INGSDVSTRELASG	325
MHCI IEDB-A-0101	363	ENLTAAESRVRDVD	376
MHCI IEDB-A-0201	374	DVDMAKEMMAFSKN	387

پیش‌بینی ساختار دوم و سوم آنتی‌ژن فلاژلین: همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، نتایج بدست آمده از بررسی پیش‌بینی ساختار دوم آنتی‌ژن فلاژلین به کمک سرور I_tasseer مشخص کرد که حلقه‌های تصادفی و رشته‌های توسعه یافته با بالاترین نسبت در پروتئین مورد مطالعه حضور دارند. نواحی حاوی حلقه‌های تصادفی و رشته‌های توسعه یافته در ساختار یک پروتئین موجب افزایش

۱۲۰-۱۳۳، ۱۲۵-۱۳۸، ۱۹۳-۲۰۱، ۲۷۰-۲۸۳، ۳۷۴-۳۸۷ برای سلول T فاقد خواص آنتی ژنیسیته بودند. در نهایت اپی توپ‌ها با امتیاز بالاتر از ۰/۸ انتخاب و وارد مرحله‌ی بعدی شدند. شناسایی خواص اپی توپ‌ها: اپی توپ‌های نهایی سلول T و B با ساختار سه بعدی با استفاده از نرم‌افزار pymol مشخص شدند. اپی توپ‌های پیش‌بینی شده برای سلول T به رنگ سبز و سلول B به رنگ آبی در شکل ۳ مشخص شده است. هم‌چنین اپی توپ مشترک بین سلول T و B نیز در شکل ۳ با رنگ قرمز مشخص شد. آنالیز ساختار سه بعدی پروتئین فلاژلین نشان داد که تمام اپی توپ‌های پیش‌بینی شده سلول T و B در خارج از ساختار پروتئینی آنتی ژن فلاژلین واقع شده است. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل هضم آنزیمی مبنی بر انتخاب اپی توپ‌هایی بود که کمتر تحت تأثیر هضم آنزیمی قرار گرفته‌اند، نقطه‌ی ایزوالکتریک و جرم پپتید مورد نظر در (جدول ۴) نشان داده شده است.

جدول ۴: تجزیه تحلیل هضم آنزیمی برای اپی توپ‌های نهایی سلول T و B

Table 4. Enzyme digestion analysis of final T and B cell epitopes

سلول T (T cell)				
توالی Sequences	امتیاز Vaxjen Vaxjen score	جرم (کیلو دالتون) Mass(KD)	نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	آنزیم‌های هضم نشده Undigested enzymes
32SGLRINRAGDDAAG₄₅	1.8567	1372.42	5.68	Chymotrypsin, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_K
56IRGLDQASRNAQDG₆₉	0.9885	1500.59	5.69	Chymotrypsin, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_K
95VQSANDTNVAVDR₁₀₇	0.9897	1388.46	4.21	Trypsin, Chymotrypsin, Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_K, Trypsin_R, Chymotrypsin(modified)

137	DGGFKGEFQIGAN ₁₅₀	0.9882	1339.43	4.37	Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Trypsin_R, AspN
193	SGKNLVDTNNGNSVG ₂₀₆	1.1096	1361.43	5.55	Chymotrypsin, Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_R
241	TAEIKNTMTGAATK ₂₅₄	1.0530	1436.64	8.26	Chymotrypsin, Clostripain, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Trypsin_R, AspN, Chymotrypsin(modified)
169	TTNSLESKALTK ₁₈₁	0.9690	1393.56	8.26	Chymotrypsin, Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Trypsin_R, AspN
311	TINGSDVSTR ₃₂₀	2.5397	1049.11	5.50	Trypsin, Chymotrypsin, Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_K, Trypsin_R, Chymotrypsin(modified)
370	SRVRDVMMAK ₃₇₉	1.1533	1176/36	8.46	Chymotrypsin, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_K, Chymotrypsin(modified)
399	GQANQQPQ ₄₀₆	0.9646	869.89	5.52	Trypsin, Chymotrypsin, Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Staph_Protease, Trypsin_K, Trypsin_R, AspN, Chymotrypsin(modified)

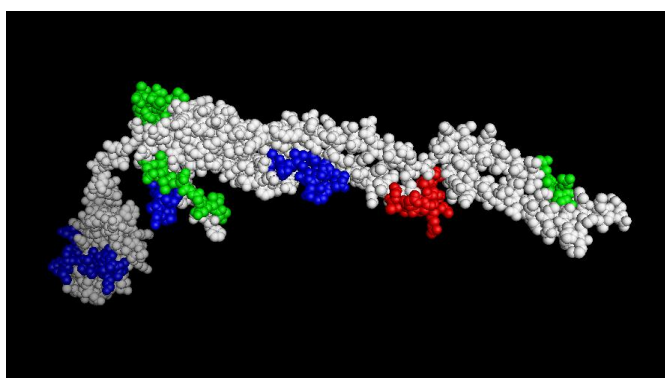
نشریه پژوهش در نشخوار کنندگان (۴)، شماره (۳) ۱۳۹۵

(B cell) سلول B				
توالی Sequences	امتیاز Vaxjen Vaxjen score	جرم (کیلو دالتون) Mass(KD)	نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	آنزیم‌های هضم نشده Undigested enzymes
20 IATAGKSMEKLSSG 33	1.2329	1379.59	8.59	Chymotrypsin, Clostripain, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Trypsin_R, AspN
30 LSSGLRINRAG 40	1.2597	1143.31	12.00	Chymotrypsin, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_K, AspN
32 SGLRINRAGDDAAG 45	1.8568	1372.41	5.68	Chymotrypsin, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_K
139 GFKGEFQIGANSNQ 152	1.1314	1496.60	6.00	Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Trypsin_R, AspN
146 IGANSNQTVKL 156	1.5680	1144.29	8.75	Chymotrypsin, Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_R, AspN, Chymotrypsin(modified)
173 SLESKALTK 181	0.8479	976.14	8.31	Chymotrypsin, Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Trypsin_R, AspN
180 TKDSNLADGTY 190	0.8842	1184.22	4.21	Chymotrypsin, Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_R
191 KISGKNLVDTNG 202	0.8947	1245.40	8.59	Chymotrypsin, Clostripain,

					Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_K, Trypsin_R
209	DAASKKITVNGKDT ₂₂₂	1.0706	1447.61	8.50	Chymotrypsin, Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_R, Chymotrypsin(modified)
237	VKSGTAEIKNTM ₂₄₈	1.2018	1231.39	8.56	Chymotrypsin, Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Trypsin_R, AspN, Chymotrypsin(modified)
246	NTMTGAATK ₂₅₄	1.1177	894.01	8.75	Trypsin, Chymotrypsin, Clostripain, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_k, Trypsin_R, AspN, Chymotrypsin(modified)
253	TKLSSGNYEIKGTN ₂₆₆	1.7733	1511.65	8.17	Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Trypsin_R, AspN
258	GNYEIKGTNVIKDG ₂₇₁	1.0961	1507.66	6.07	Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate Proline_Endopept, Trypsin_R
291	DVSEAEELGF ₂₉₉	0.9233	966.01	3.57	Trypsin, Chymotrypsin, Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Trypsin_K, Trypsin_R, AspN
321	INGSDVSTRELASG ₃₂₅	1.7068	1405.48	4.35	Chymotrypsin, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Trypsin_K
363	ENLTAAESRVR ₃₇₃	1.3970	1245.36	6.24	Chymotrypsin, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Trypsin_K, AspN

رنگ آبی مربوط به اپی توپ‌های سلول B، رنگ سبز اپی توپ‌های سلول T، رنگ قرمز اپی توپ مشترک بین سلول B و T می‌باشد.

B cell epitopes are in blue colour, T cell epitopes are in green colour, common epitopes of T and B cell are in red colour



شکل ۳- ساختار سوم به دست آمد آنتی ژن فلاژلین با استفاده از نرم افزار I_TASSEER و نرم افزار pymol

رنگ آبی= اپی توپ‌های سلول B، رنگ سبز اپی توپ‌های سلول T، رنگ قرمز اپی توپ مشترک بین سلول B و T

Figure 3. results of prediction of the tertiary structure of Flagellin antigen using I_TASSEER and pymol softwars. Blue= B cell epitopes, green= T cell epitopes, red= common epitopes of T and B cells

با وجود اینکه واکسن تنها راه کنترل موثر بیماری شاربن علامتی است ولی منابع محدودی در رابطه با واکسن شاربن علامتی در کشور وجود دارد. موسسه سرم سازی رازی در سال ۱۳۹۱ در ایران موفق به تولید انبوه واکسن علیه شاربن علامتی شد (۱۳) و پروتئین فلاژلین باکتری کلسترییدیوم شووای برای اولین بار توسط کوچیما و همکاران در سال ۲۰۰۰ کلون شد (۱۰). به دلیل نیاز به هزینه، زمان و تجهیزات زیاد، استفاده از روش‌های تجربی در توسعه واکسن‌های اپی توپی محدود است بنابراین استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی بیشتر مورد توجه قرار گرفت (۴). در مطالعه‌ی حاضر تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک آنتی‌ژن فلاژلین در باکتری کلسترییدیوم شووای با استفاده از نرم‌افزارهای تحت وب پیش‌بینی‌کننده سلول B و T، هم‌چنین نرم‌افزارهای پیش‌بینی ساختار دوم و سوم انجام شد. هضم آنزیمی نیز به منظور پیش‌بینی جایگاه‌های تخریب آنزیمی برای اپی‌توپ سلول‌های B و T صورت گرفت (جدول ۶). اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده نهایی در این مطالعه برای سلول B و T به ترتیب به رنگ آبی و سبز نشان داده شده است (شکل ۳). نتایج به دست آمده نشان

داد که توالی آمینواسیدی ۳۲ تا ۴۵ می‌تواند ایمنی هومورال و ایمنی سلولی را به‌طور مشترک تحریک کند. بررسی نتایج ساختار دوم و سوم نیز نشان داد اپی توپ مشترک برای سلول B و T شامل ۶۱ درصد نواحی حلقه‌های تصادفی می‌باشد که در سطح ساختار آنتی‌ژن فلاژلین قرار دارند. بررسی‌ها نشان داده است که در نواحی که شامل حلقه‌های تصادفی هستند، به دلیل اینکه بیشتر در سطح پروتئین قرار می‌گیرند، احتمال حضور اپی توپ بیشتری را نیز دارند (۱۶). به منظور جلوگیری از تخریب و تجزیه پپتید در طول فرایند پردازش آنتی‌ژن، اپی توپ باید فاقد جایگاه‌های برشی آنزیم‌های پروتئازوم باشد (۱۴). بر این اساس اپی توپ‌های پیش‌بینی سلول B و T از نظر دارا بودن جایگاه‌های تخریب آنزیمی نیز مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج نشان داد که هیچ جایگاه برشی برای آنزیم‌هایی مانند Trypsin, Clostripain, Cyanogen_Bromide, IodosoBenzoate, Proline_Endopept, Staph_Protease, Trypsin_K, Trypsin_R, AspN که آنزیم‌های مرکزی مسئول تجزیه پروتئین هستند، وجود ندارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که از این اپی توپ‌ها علاوه بر استفاده در واکسن‌های تزریقی در واکسن‌های خوراکی هم با اطمینان بیشتری می‌توان استفاده نمود چرا که نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد که این اپی توپ‌ها با در امان ماندن از تخریب پروتئازومی در دستگاه گوارش با مدت ماندگاری بالاتر، مدت اثر بیشتری را از خود نشان می‌دهند. همچنین با بررسی امتیاز Vaxjen، توالی‌های که در نهایت انتخاب شدند از امتیاز بالایی برخوردار بودند (جدول ۴). بنابراین می‌توان ناحیه‌ی آمینواسیدی ۳۲ تا ۴۵ را به‌عنوان ناحیه اپی توپی مناسب برای بیماری شاربن علامتی گزارش کرد. هرچند که سنتز و آنالیزهای تجربی در آزمایشگاه از اپی توپ‌های پیش‌بینی شده برای ایجاد یک واکسن مؤثر امری ضروری می‌باشد. از آنجا که مطالعه و بررسی‌های بیوانفورماتیکی قبل از شروع آزمایشات در مقایسه با آزمایشات تجربی در زمان و هزینه صرفه جویی می‌کند، پیشنهاد می‌شود که قبل از هر گونه انجام آزمایش تجربی مربوط به ایمنی زایی واکسن‌های مبتنی بر اپی توپ، از اپی توپ‌های حاصله از آنالیزهای بیوانفورماتیک نیز استفاده شود. تا کنون مطالعه‌ای در مورد بررسی اپی توپ‌های موجود در پروتئین فلاژلین باکتری کلاستریدیوم شوای عامل بیماری شاربن علامتی در گاو و گوسفند صورت نگرفته است. امید است که نتایج گزارش شده در این پژوهش، در مطالعات مربوط به واکسن‌های اپی توپی در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Ahsani, MR., Bafti, MS., Esmailzadeh, AK., and Mohammadabadi, MR. 2011. Genotyping of isolates of *Clostridium perfringens* from vaccinated and unvaccinated sheep. *Small Ruminant Research*. 95:1. 65-69.
2. Ahsani, MR., Mohammadabadi, MR., and Shamsaddini, MB. 2010. *Clostridium perfringens* isolate typing by multiplex PCR. *Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases J*. 16:4. 573-578.
3. Cassataro, J., Estein, SM., Pasquevich, KA., Velikovskiy, CA., Barrera, S.D., Bowden, R., Fossati, CA., and Giambartolomei, GH. 2005. Vaccination with the Recombinant *Brucella* Outer Membrane Protein 31 or a Derived 27-Amino-Acid Synthetic Peptide Elicits a CD4 Juliana Cassataro, T Helper 1 Response That Protects against *Brucella melitensis* Infection. *Infection and immunity J*. 73:12.8079-8088.
4. Chen, P., Rayner, S., and Hu, KH. 2011. Advances of Bioinformatics Tools Applied in Virus Epitopes Prediction. *Virologica Sinica, J*. 26:1.1-7.
5. Forouharmehr, A., and Nassiry, MR. 2015. B and T-Cell Epitopes Prediction of the P40 Antigen for Developing *Mycoplasma Agalactiae* Vaccine Using Bioinformatic Tools. *Genetics in the 3 rd Millennium J*. 13:1. 3954-3961.
6. Frey, J., and Falquet, L. 2015. Patho-genetics of *Clostridium chauvoei*. *Microbiology J*. 166:4. 384-392.
7. Gacem, F., Madadi, M.A., Nawel, K.H., and Bakour, R. 2015. Study of Vaccinal Properties of *Clostridium chauvoei* Strains Isolated During a Blackleg Outbreak in Cattle in Algeria. *KafkasUniv Vet FakDerg J*. 21: 6. 825-829.
8. Hadizadeh, M., Mohammadabadi, MR., Niazi, A., Esmailzadeh Koshkoiyeh, AK., Mehdizadeh Gazooei, Y., and Molaei, S. 2013. Use of bioinformatics tools to study exon 2 of GDF9 gene in Tali and Beetal goats. *J. of Modern Genetics J*. 3 :34. 283-288. (In Persian).
9. Hadizadeh, M., Niazi, A., Mohammad Abadi, M., Esmailzadeh, A., and Mehdizadeh Gazooei, Y. 2014. Bioinformatics analysis of the BMP15 exon 2 in Tali and Beetal goats. *Modern Genetics J*. 9(1): 117-120. (In Persian).
10. Kojima, A., Uchida, I., Sekizaki, T., Sasaki, Y., Ogikubo, Y., Kijima, M., and Tamura, Y. 2000. Cloning and expression of a gene encoding the flagellin of *Clostridium chauvoei*. *Veterinary Microbiology J*. 76(4): 359-372.
11. Li, Y., Liu, X., and Zhu, Y. 2013. Bioinformatic prediction of epitopes in the Emy162 antigen of *Echinococcus multilocularis*. *Experimental and Therapeutic Medicine J*. 6(2): 335-340.
12. Ontiveros Corpus Mde, L., Hernández Andrade, L., López Mendez, J., and Tenorio Gutierrez, V. 2008. Prevention of Blackleg by an Immunogen of *Clostridium chauvoei*. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases J*. 1149: 303-305.

13. Pilehchian Langroudi, R., Jabbari, A.R., and Moosawi Shoshtari, M. 2012. Large scale production of Blackleg vaccine by fermenter and enriched culture medium in Iran. Razi Institute. 67(1): 43-49.
14. Toes, R.E., Nussbaum, A.K., Degermann, S., Schirle, M., Emmerich, N.P., Kraft, M., Laplace, C., Zwinderman, A., Dick, T.P., Müller, J., Schönfisch, B., Schmid, C., Fehling, H.J., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., and Schild, H. 2001. Discrete cleavage motifs of constitutive and immune proteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *Experimental Medicine J.* 194(1):1-12.
15. Usharani, J., Nagaleekar, V.K., Thomas, P., Gupta, S.K., Bhure, S.K. Dandapat, P., Agarwal, R.K., and Singh, V.P. 2015. Development of a recombinant flagellin based ELISA for the detection of *Clostridium chauvoei*. *Anaerobe J.* 33: 48-54.
16. Yanhua, L., Xianfel, L., Yuejie, Z., Xiaotao, Z., Chunbao, C., Xiaoan, H., Haimei, M., Hao, W., Xiumin, M., and Jian-Bing, D. 2013. Bioinformatic prediction of epitopes in the Emy162 antigen of *Echinococcus multilocularis*. *Experimental and Therapeutic Medicine J.* 6(2): 335-340.
17. Yousefi, S., Tahmoorespur, M., and Sekhavati, M.H. 2015. B and T-Cell Epitope Prediction of the OMP25 Antigen for Developing *Brucella melitensis* Vaccines for Sheep. *International Journal of Applied Sciences.* 5:3.629-638.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Ruminant Research, Vol. 4(3), 2016
<http://ejrr.gau.ac.ir>

In silico prediction of B and T cell epitopes of Flagellin antigen of bacterium *Clostridium Chauvoei*

***S.Z. Mousavi¹, N. Nazifi², Z. Pirkhezranian² and K. ahmadian²**

¹M.Sc. student and ²Ph.D Student of Animal Genetics and Breeding, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Received: 04/16/2016; Accepted: 11/15/2016

Abstract

Introduction: Blackleg including a Severe and fatal disease affecting young cattle and sheeps. Symptoms of this disease is poisoning myositis and often fatal. A clostridium chauvoei bacterium which is the agent of this disease is a Gram-positive, rod shape, anaerobic bacteria and produce gase and spore. Spores of the bacteria are highly resistant and can survive in the soil and feed. Size of these bacteria is 0.5-1 × 3-8 microns and seems usually single, diplo and rarely streptobasil. Flagella are the major protective antigen that is in the bacteria surface. Since flagellin protein is a virulence factor and a protective antigen, takes lots attentions in recent years and it can be used as recombinant vaccine design. The aim of present study is detection of B and T cell epitope of Flagellin protein using bioinformatics analysis tools.

Materials and Methods: Using bioinformatics prediction of B and T cell epitopes as well as software to predict the secondary and tertiary structure of proteins, the epitopes of protein Flagellin based on the highest score and most frequent were determined. Finally, to further investigate aimed to exploit properties of selected epitopes, test of antigenicity ability and enzyme digestion has been done using VaxiJen 2.0 software with 8.0 threshold value and protein digest software respectively corresponding related server.

Results: 3 epitopes in the range of 95-107, 311-320, 399-406 for T cell epitope and 3 amino acid 146-156, 246-254, 291-299 residue for B cells resulted. The amino acid sequence 32_45 residue were in common for both B and T cells reported respectively.

*Corresponding author; zaramousavi@yahoo.com

Conclusion: Using the amino acid sequence specially the shared epitopes between both B and T cells in subunit recombinant construct in new generation of vaccines, not only can eliminating the risks of adverse effects of attenuated live vaccines but also a high level of immune response on the host body infected with clostridium chauvoei bacterium could be created.

Keywords: Clostridium Chauvoei, Flagellin, Epitope prediction, Bioinformatics

