



دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده پزشکی

رساله دکتری

رشته: بیوشیمی بالینی

عنوان:

تهیه پادکن های نو ترکیب پروتئین سطحی ویروس کرونا (سارس کوو-۲) به عنوان عامل  
محرک سیستم ایمنی

نگارنده: فائزه نورآباد قهرودی

استاد راهنما: دکتر محمد جواد رسایی

استاد مشاور: دکتر سعید خلیلی

تابستان ۱۴۰۲

# آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت

## مدرس

**مقدمه:** با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهش‌های علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرح‌های تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

**ماده ۱-** حق نشر و تکثیر پایان‌نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

**ماده ۲-** انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان‌نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

**تبصره:** در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود

**ماده ۳** انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثر هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

**ماده ۴-** ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

**ماده ۵-** این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **فائزه نورآباد قهرودی** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی ۱۳۹۷ مقطع **دکتری**

**تخصصی** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته‌های علمی مستخرج از پایان‌نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق‌الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم.»

## آئین نامه پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

"کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری تخصصی نگارنده در رشته بیوشیمی بالینی است که در سال ۱۴۰۲ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر محمد جواد رسایی، مشاوره دکتر سعید خلیلی از آن دفاع شده است.

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب فائزه نورآباد قهرودی دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی مقطع دکتری تخصصی تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

## تقدیر و تشکر

---

پروردگارا ، امروز با تکیه بر قدرت بیکرانت و با قلمی سرشار از شکرانه الطافت ، وظیفه‌ای خطیر را بر من روا داشتی تا انعکاسی کم سو از فراوان موهبت تو را به قلم کشم و گوشه ای بس ناچیز از بی نهایت رازهای گیتی‌ات را بر کاغذ نهم ، باشد که بدانم بی لطف تو هرگز نتوان سخنی را پیمود.

نیک می دانم تلاشها و زحمات بزرگ زنان و مردان این مملکت را هرگز نمی توان در محدود سپید این رساله جای داد . اما وظیفه خود میدانم که نهایت سپاسگزاری را از تمامی عزیزانی که در این راه به من کمک کرده اند به عمل آورم.

از استاد عالیقدر جناب آقای دکتر محمد جواد رسایی که بی شک انتخاب شایسته ایشان در عنوان پایان نامه برایم راهگشا بوده است، کمال تشکر را دارم . استادی که دلسوزانه به حمایت در اجرای پروژه پرداختند و رفتار متینشان مایه دلگرمی برایم بود . لطف و مهربانی بی شائبه ایشان همیشه در خاطرم خواهد ماند.

از استاد مشاورگرمی جناب آقای دکتر سعید خلیلی که در امر مشاوره مرا راهنمایی فرمودند سپاسگزارم.

از اساتید داور دکتر رسول مدنی ، دکتر فاطمه فتوحی، دکتر حوریه سلیمانجاهی و دکتر عبدالامیر علامه که اینجانب را لایق میزبانی دانسته اند صمیمانه تشکر می نمایم.

تشکر بیکران از مهربانترین همراهان زندگیم ، پدر، مادر و خانواده عزیزم که در سختی ها و دشواری های زندگی همواره یآوری دلسوز و فداکار و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بودند.

در پایان از دوستان عزیزم در گروه بیوشیمی بالینی و بیوتکنولوژی پزشکی که همراهان همیشگی من بوده‌اند و اوقات خوشی را در کنار هم سپری کرده‌ایم، تقدیر و تشکر دارم.

شاله صفتی

زندگی پر صحتی است  
مهم زندگی است

هر کسی نغمه خود خواند و از صحنه رود  
صحنه پویاست به جاست

خوش آن نغمه که بسازد  
ساده مردم سازد

نوشته کاظمی

## چکیده

**مقدمه:** شیوع سارس کوو-۲ سومین بیماری ویروسی از خانواده ویروس کرونا در قرن ۲۱ است. با توجه به تأیید نقش حیاتی پروتئین سنبله (اسپایک) در بیماری‌زایی سارس کوو-۲، بنابراین پروتئین می‌تواند عامل پادکنی (آنتی ژنیک) مهمی در تحریک سیستم ایمنی میزبان و تولید پادتن خنثی ساز محسوب شود. از این رو در این مطالعه هدف ما بر روی طراحی، تولید و ارزیابی ظرفیت استفاده از ۳ پروتئین نوترکیب از پروتئین سنبله به عنوان نامزد واکسن با قابلیت تحریک سیستم ایمنی هومورال (پادتن خنثی کننده) و سلولی (CD4 و CD8) می باشد.

**روش:** طراحی ۳ بخش پروتئین نوترکیب بر مبنای پروتئین سنبله (P1,P2,P3) توسط مطالعات داده زیستی (بیوانفورماتیکی) انجام شد. توانایی این پروتئین‌ها بعد از تولید برای تشخیص پادتن سرم بیماران مبتلا به کووید-۱۹ توسط الایزا سنجش شد. این پروتئین‌ها به موش و خرگوش تزریق و تیتراژ پادتن برای بررسی ویژگی خنثی سازی پادتن ارزیابی شد. سپس تست دوز-پاسخ برای انتخاب بهترین پاسخ در برابر کمترین مقدار تزریقی انجام شد. برای بررسی تحریک ایمنی سلولی سنجش ایمونوهیستوشیمی انجام شد. عوارض احتمالی ناشی از تزریق در بافت‌ها توسط رنگ آمیزی هماتوکسین و ائوزین (H&E) بررسی شد. اتصال پروتئین نوترکیب به گیرنده ACE2 و اثر مهار پادتن بر این اتصال بوسیله مطالعات سلولی انجام و با فلوسایتومتری ارزیابی گردید.

**نتایج:** پادتن موجود در سرم بیماران توسط پروتئین‌های نوترکیب تولید شده شناسایی شدند. نتایج نشان داد پروتئین تزریق شده قادر به تحریک سیستم ایمنی سلولی و هومورال بدون ایجاد هرگونه عارضه‌ای بود. تست خنثی سازی ویروس (VNT) نشان داد که پادتن‌های تولید شده قادر به خنثی سازی ویروس زنده در محیط کشت هستند. همچنین پروتئین نوترکیب قادر به اتصال به گیرنده ACE2 بوده و پادتن تولید شده اثر مهار پادتن بر این اتصال دارد.

**نتیجه گیری:** مجموع مطالعات داده زیستی، آزمایشگاهی و حیوانی نشان داد که تزریق پروتئین نوترکیب بر مبنای پروتئین سنبله می‌تواند باعث تحریک پاسخ پادتن خنثی ساز با ماندگاری طولانی شود. بنابراین واکسن‌های زیرواحدی می‌توانند به عنوان ابزار قدرتمندی برای واکسیناسیون موثر بر علیه کووید-۱۹ استفاده شود.

---

**کلمات کلیدی:** سارس کوو-۲، پروتئین سنبله، واکسن، پاسخ ایمنی، پادتن خنثی ساز

## جدول اختصارات

<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>nCoV-2019</b>	Novel Corona Virus -2019
<b>GISAID</b>	Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data
<b>COVID-19</b>	Corona Virus Disease -2019
<b>ICTV</b>	International Committee on Taxonomy of Viruses
<b>SARS CoV-2</b>	Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus-2
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>MERS</b>	CoV-MERS Corona Viruse
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>nsp</b>	Nonstructural proteins
<b>PHB</b>	Prohibitin
<b>ADRP</b>	Adipocyte differentiation-related protein
<b>ssRNA</b>	Single-stranded RNA
<b>RBD</b>	Receptor Binding Domain
<b>ACE2</b>	Human angiotensin-converting enzyme 2
<b>PD</b>	peptidase domain
<b>TMPRSS2</b>	Serine 2 Transmembrane protease
<b>RTC</b>	Replication/transcription complex
<b>RBD</b>	Receptor-binding domain
<b>NTD</b>	N-Terminal Dmain
<b>RBM</b>	receptor-binding motif
<b>APN</b>	Amino Peptidase N
<b>DPP4</b>	Dipeptidyl peptidase 4
<b>FP</b>	Fusion peptide
<b>HR</b>	Heptad repeat
<b>AT2</b>	Angiotensin2
<b>DIC</b>	Disseminated Intravascular Coagulation
<b>PRRs</b>	Pattern recognition receptors
<b>TLR</b>	Toll-like receptors
<b>NLR</b>	NOD-like receptors
<b>NLRP</b>	NOD-LRR-and pyrin domain-containing protein 3
<b>MDA</b>	Melanoma differentiation-associated protein5
<b>RAG</b>	Retinoic acid-inducible gene1
<b>DAMPs</b>	Damage associated molecular patterns
<b>DC</b>	Dendritic Cells
<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Trancription 1
<b>IRF</b>	Interferon Regulatory Factor 1
<b>ARDS</b>	Acute respiratory distress syndrome
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>PDCs</b>	Plasmacytoid dendritic cells
<b>TFH</b>	T follicular helper cells
<b>NIH</b>	National Institutes of Health
<b>TCR</b>	T Cell receptor
<b>IPC</b>	Infection prevention and control
<b>CNBG</b>	China National Biotec Group
<b>EUL</b>	Emergency Use Listing
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>ADE</b>	Antibody-Dependent Enhancement



## فهرست

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته .....	۱
مقدمه .....	۲
۱-۱. کرونا سارس: اولین شیوع کروناویروس در قرن ۲۱ با بیماریزایی بالا در انسان .....	۳
۲-۱. کرونا مرس: شیوع نگران کننده دیگر از عفونت تنفسی کروناویروس .....	۴
۳-۱. کرونا سارس-۲: یک ویروس جدید با همه گیری جهانی .....	۵
۴-۱. طبقه بندی ویروسهای کرونا .....	۶
۵-۱. زیست شناسی ملکولی ویروس .....	۷
۶-۱. ساز و کار بیماریزایی سارس کوو-۲ .....	۱۲
۷-۱. پروتئین سنبله یا اسپایک: مسئول بیماریزایی .....	۱۳
۸-۱. گیرنده ACE2 .....	۱۷
۹-۱. طوفان سایتوکائینی .....	۲۰
۱۰-۱. ایمونولوژی ویروس .....	۲۱
۱-۱۰-۱. مروری بر سیستم ایمنی ذاتی .....	۲۱
۲-۱۰-۱. مروری بر سیستم ایمنی اکتسابی .....	۲۵
۱-۲-۱۰-۱. ایمنی سلولی .....	۲۶
۱-۱-۲-۱۰-۱. نقش سلولهای CD4+T در عفونت سارس کوو-۲ .....	۲۶
۲-۱-۲-۱۰-۱. نقش سلولهای CD8+T در عفونت سارس کوو-۲ .....	۲۶
۲-۲-۱۰-۱. ایمنی هومورال (سلولهای B) .....	۲۷
۱-۱۱. گونه های مختلف ویروس سارس کوو-۲ .....	۲۸
۱۲-۱. دوره نهفتگی و علائم کووید-۱۹ .....	۳۰
۱۳-۱. همه گیری بیماری در جهان .....	۳۲
۱-۱۳-۱. شیوع کووید-۱۹ در کشور ایران .....	۳۲
۱۴-۱. مسیرهای انتقال بیماری کووید-۱۹ .....	۳۳
۱۵-۱. تشخیص کووید-۱۹ .....	۳۴
۱۶-۱. گزینه های درمانی بالقوه کووید-۱۹ .....	۳۵
۱۷-۱. پیشگیری و کنترل .....	۳۶
۱۸-۱. واکسیناسیون .....	۳۶
۱-۱۸-۱. چشم انداز تولید واکسن .....	۳۷

۳۷	۱-۱۸-۲. واکسنهای تولید شده بر علیه سارس کوو-۲
۴۵	فصل دوم: مواد و روشها
۴۶	۲-۴. مرور مطالعات انجام شده
۴۶	۲-۵. بررسی بیوانفورماتیک
۴۷	۲-۶. انتخاب میزبان پروکاریوتی
۴۸	۲-۷. وکتور مورد استفاده
۴۹	۲-۸. انتخاب قطعه مناسب به وسیله مطالعات بیوانفورماتیک
۴۹	۲-۹. کلون سازی توالی ژنی P1,P2,P3 در وکتور pET-28a(+)
۴۹	۲-۱۰. مستعد نمودن سویه DH5α از باکتری اشریشیا کلاهی به روش شیمیایی
۵۱	۲-۱۱. انتقال (ترانسفورم) پلاسمید نوترکیب حاوی ژن P3,P2,P1 به باکتری مستعد DH5α
۵۳	۲-۱۲. تأیید انتقال پلاسمید نوترکیب P1,P2,P3 توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز (Colony PCR)
۵۵	۲-۱۳. بررسی محصول PCR توسط الکتروفورز افقی روی ژل آگاروز
۵۸	۲-۱۴. انتقال پلاسمید نوترکیب تخلیص شده به باکتری BL21
۵۸	۲-۱۵. بیان پروتئین P1,P2,P3 در باکتری BL21
۵۹	۲-۱۶. الکتروفورز SDS-PAGE
۶۲	۲-۱۶-۱. رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با کوماسی بلو R-250
۶۳	۲-۱۶-۲. رنگبری ژل پلی آکریل آمید به منظور مشاهده باندهای پروتئین
۶۳	۲-۱۷. استخراج پروتئین
۶۴	۲-۱۷-۱. بررسی تأثیر بافرهای لیز متفاوت بر بازدهی استخراج P1,P2,P3
۶۵	۲-۱۸. تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون تمایلی نیکل (IMAC)
۶۷	۲-۱۹. دیالیز پروتئین
۶۸	۲-۲۰. تغلیظ پروتئین به وسیله ستون آمیکون
۶۹	۲-۲۱. سنجش غلظت پروتئین
۷۰	۲-۲۲. تأیید پروتئین P1,P2,P3 به وسیله فناوری وسترن بلات
۷۲	۲-۲۳. الایزا برای تأیید پروتئین نوترکیب تخلیص شده با پادتن ضد برچسب هیسیتیدینی متصل به HRP
۷۴	۲-۲۴. بررسی ساختار دوم پروتئین با استفاده از طیفسنجی CD
۷۴	۲-۲۵. بررسی وجود اندوتوکسین در پروتئین تخلیص شده با استفاده از تست LAL
۷۵	۲-۲۵-۱. سنجش اندوتوکسین به روش ژل کلات
۷۶	۲-۲۶. تأیید پروتئین نوترکیب ساخته شده با پادتن موجود در سرم افراد مبتلا به کووید-۱۹ و افراد واکسینه شده با واکسن آسترانکا.

۲۷-۲. تحریک ایمنی هومورال .....	۷۶
۲۷-۱. انتخاب ادجوانت مناسب .....	۷۶
۲۷-۲. انتخاب حیوان مناسب .....	۷۶
۲۷-۳. تزریق ایمونوژن به حیوانات .....	۷۷
۲۸-۲. انجام تست الیزا جهت بررسی ایمنی‌زایی در حیوانات .....	۸۰
۲۹-۲. تأیید پروتئین P1,P2,P3 با پادتن سرم خرگوش توسط وسترن بلات .....	۸۱
۳۰-۲. بررسی اتصال پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱ (RBD) با سارس کوو-۲ توسط فناوری وسترن بلات .....	۸۳
۳۱-۲. تخلیص پادتن پلی کلونال از سرم خرگوش ایمن شده .....	۸۳
۳۲-۲. بررسی میزان اختصاصیت پادتن پلی کلونال .....	۸۴
۳۳-۲. بررسی اتصال پادتن تولید شده بر علیه پروتئین های نوترکیب P1,P2,P3 در مواجهه با سارس کوو-۲ توسط الیزا .....	۸۵
۳۴-۲. تست خنثی سازی ویروس توسط پادتن .....	۸۵
۳۵-۲. بررسی اتصال P1(RBD) نوترکیب به گیرنده ACE2 در سطح سلول .....	۸۶
۳۵-۱. انتخاب Caco <sub>2</sub> به عنوان سلول مثبت گیرنده ACE2 .....	۸۷
۳۵-۲. انتخاب K562 به عنوان سلول منفی گیرنده ACE2 .....	۸۷
۳۵-۳. بررسی اتصال پروتئین نوترکیب با گیرنده ACE2 .....	۸۹
۳۵-۴. بررسی اثر مهارى پادتن بر اتصال پروتئین نوترکیب به گیرنده سلولی .....	۹۰
۳۶-۲. انتخاب بهترین دوز - پاسخ پروتئین نوترکیب RBD در موش .....	۹۰
۳۷-۲. بررسی آسیب شناسی بافتها .....	۹۱
۳۷-۱. آماده سازی بافت برای تهیه برش های پارافینی .....	۹۱
۳۷-۲. برش بافت پارافینی و تهیه لام .....	۹۲
۳۷-۳. رنگ آمیزی لام ها به روش هماتوکسیلین و اتوزین (H&E) .....	۹۳
۳۸-۲. بررسی ایمنی سلولی توسط ایمونوهیستوشیمی .....	۹۴
۳۹-۲. چالش خوچه هندی با ویروس زنده سارس کوو-۲ .....	۹۶
<b>فصل سوم: نتایج .....</b>	۹۷
۱. مطالعات بیوانفورماتیک .....	۹۸
۳-۱. طراحی و ساخت پلاسمید نوترکیب از پروتئین سطحی سنبله (اسپایک) سارس کوو-۲ .....	۹۸
۲-۳. مدل سازی مولکولی RBD-ACE2 .....	۱۱۲
۳-۳. کلون سازی توالی ژنی P1,P2,P3 در وکتور pET28a(+) .....	۱۱۵
۲. مطالعات مولکولی .....	۱۱۷
۳-۴. سنتز ژن .....	۱۱۷

- ۱۱۷..... ۵-۳. مستعد نمودن سویه‌ی BL21 و DH5 $\alpha$  باکتری اشرشیاکلاهی به روش شیمیایی
- ۱۱۸..... ۳-۶. انتقال(ترانسفورم)پلاسمید نوترکیب حاوی ژن P3,P2,P1 به باکتری مستعد DH5 $\alpha$
- ۱۱۹..... ۳-۷. تخلیص پلاسمید نوترکیب و انتقال آن به باکتری BL21
- ۱۱۹..... ۸-۳. بیان پروتئین P1,P2,P3 در باکتری BL21 و بررسی آن توسط الکتروفورز SDS-PAGE
- ۱۲۰..... ۳-۹. تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون تمایلی نیکل
- ۱۲۲..... ۳-۱۰. سنجش غلظت پروتئین
- ۱۲۲..... ۳-۱۱. تأیید پروتئین P1,P2,P3 به وسیله‌ی فناوری وسترن بلات
- ۱۲۳..... ۳-۱۲. الایزا برای تأیید پروتئین نوترکیب تخلیص شده با پادتن ضد برچسب هیستیدینی متصل به HRP
- ۱۲۴..... ۳-۱۳. بررسی ساختار دوم پروتئین با استفاده از طیف‌سنجی CD
- ۱۲۵..... ۳-۱۴. بررسی وجود اندوتوکسین در پروتئین های تخلیص شده با استفاده از تست LAL
- ۱۲۶..... ۳-۱۵. الایزا جهت بررسی پروتئین نوترکیب با پادتن موجود در سرم بیماران مبتلا به کووید-۱۹
- ۱۲۷..... ۳-۱۶. الایزا جهت بررسی پروتئین نوترکیب با پادتن موجود در سرم افراد واکسینه شده با واکسن آسترانکا
- ۱۲۷..... ۳-۱۷. بررسی تحریک ایمنی هومورال
- ۱۲۸..... ۳-۱۷-۱. ایمن سازی خرگوش
- ۱۲۹..... ۳-۱۷-۲. ایمن سازی موش
- ۱۳۰..... ۳-۱۷-۳. ایمن سازی خوکچه هندی
- ۱۳۱..... ۳-۱۸. تأیید پادتن پلی کلونال تولید شده در سرم خرگوش بر علیه پروتئین P1,P2,P3 توسط فناوری وسترن بلات
- ۱۳۲..... ۳-۱۹. بررسی اتصال پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱ (RBD) با سارس کوو-۲ توسط فناوری وسترن بلات
- ۱۳۲..... ۳-۲۰. تأیید پادتن تولید شده بر علیه پروتئین های نوترکیب در سرم خرگوش با کیت تشخیص سریع IgM, IgG بر علیه سارس کوو-۲ انسانی
- ۱۳۳..... ۳-۲۱. تخلیص پادتن پلی کلونال از سرم خرگوش ایمن شده
- ۱۳۶..... ۳-۲۲. بررسی میزان اختصاصیت پادتن پلی کلونال
- ۱۳۶..... ۳-۲۳. بررسی میزان تحریک سیستم ایمنی هومورال توسط پروتئین های نوترکیب در مقایسه با سارس کوو-۲ توسط الایزا
- ۱۳۷..... ۳-۲۴. تست خنثی سازی سارس کوو-۲ توسط پادتنهای تولید شده
- ۱۳۹..... ۳-۲۵. چالش خوکچه های هندی با سارس کوو-۲
- ۱۴۱..... ۳-۲۶. بررسی ایمنی سلولی
- ۱۴۳..... ۳. مطالعات سلولی
- ۱۴۳..... ۳-۲۷. بررسی اتصال پروتئین ۱ (RBD) به گیرنده ACE2 در سطح سلول
- ۱۴۶..... ۳-۲۸. انتخاب بهترین دوز - پاسخ در موش
- ۱۴۸..... ۴. مطالعات بافت شناسی

۱۴۸	۳-۲۹. بررسی آسیب شناسی بافتها.....
۱۵۳	فصل چهارم : بحث .....
۱۷۱	پیشنهادات .....
۱۷۲	فهرست منابع .....
۱۸۰	Abstract .....

### فهرست تصاویر

۱۰	تصویر ۱-۱. شمای کلی از ساختار سارس کوو-۲.....
۱۰	تصویر ۲-۱. ساختار ژنوم ویروس سارس کوو-۲ .....
۱۳	تصویر ۳-۱. چرخه زندگی سارس کوو-۲ در سلول میزبان. ....
۱۴	تصویر ۴-۱. زیرواحدهای تشکیل دهنده پروتئین سنبله سارس کوو-۲.....
۱۶	تصویر ۵-۱. مدل پیشنهاد شده برای ورود کروناویروسها، پس از اتصال زیرواحد S1 به گیرنده .....
۱۷	تصویر ۶-۱. ساز و کار مولکولی واکنش پروتئین S سارس کوو۲ با گیرنده ACE2 به کمک TMPRSS2 .....
۱۸	تصویر ۷-۱. اتصال دومین RBD پروتئین S ویروس سارس کوو-۲ توسط موتیف RBM .....
۱۹	تصویر ۸-۱. نمایش اندام های بیان کننده ACE2 .....
۲۱	تصویر ۹-۱. تظاهرات بالینی سیستمیک سارس کوو-۲.....
۲۳	تصویر ۱۰-۱. فعال شدن التهاب NLRP3 توسط سارس کوو.....
۲۴	تصویر ۱۱-۱. اثر هم افزایی TNF ، IFNy و رخداد پانوپتوزیس. ....
۲۷	تصویر ۱۲-۱. زمانبندی تولید پادتن IgM و IgG بعد از بروز علائم ابتلا به کوید-۱۹. ....
۳۰	تصویر ۱۴-۱. مقایسه سویه های سارس کوو-۲.....
۳۳	تصویر ۱۵-۱. آمار ابتلا به کووید-۱۹ در تاریخ ششم تیرماه ۱۴۰۲ توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO) .....
۳۸	تصویر ۱۶-۱. مدل های مورد تحقیق برای توسعه واکسن بر علیه سارس کوو-۲. ....
۴۸	تصویر ۱-۲. نمای کلی از وکتور pET-28a .....
۶۶	تصویر ۲-۲. نمایش چگونگی اتصال رزین نیکل به برچسب هیستیدینی موجود در پروتئین های نوترکیب .....
۹۹	تصویر ۱-۳. اطلاعات مربوط به پروتئین سنبله سارس کوو-۲ از پایگاه NCBI .....
۱۰۰	تصویر ۲-۳. توالی کامل FASTA پروتئین سنبله سارس کوو-۲ از پایگاه NCBI .....
۱۰۰	تصویر ۳-۳. نمایش جایگاههای گلیکوزیله پروتئین سنبله سارس کوو-۲ توسط سرور PDB .....
۱۰۱	تصویر ۴-۳. نمایش جایگاههای گلیکوزیله در پروتئین سنبله سارس کوو-۲ توسط مقاله .....

- تصویر ۳-۵. پیش بینی جایگاههای دارای پیوند دی سولفیدی در کل توالی پروتئین سنبله توسط نرم افزار DiANNA ... ۱۰۱
- تصویر ۳-۶. نمایش جایگاههای انتخاب شده برای مطالعه در پروتئین سنبله سارس کوو-۲ ..... ۱۰۲
- تصویر ۳-۷. تعیین جایگاه RBD, Fusion peptide, Cleavage site در توالی کامل پروتئین سنبله سارس کوو-۲ ..... ۱۰۲
- تصویر ۳-۸. نمایش پیش بینی خاصیت پادکنسپته توالی های P1,P2,P3 توسط پایگاه Vaxijen ..... ۱۰۳
- تصویر ۳-۹. نمایش پیش بینی خاصیت آلرژنسیته توالی های P1,P2,P3 توسط پایگاه Aller TOP ..... ۱۰۴
- تصویر ۳-۱۰. نمایش پیش بینی ویژگیهای فیزیکوشیمیایی توالی P1,P2,P3 توسط پایگاه ProtParam ..... ۱۰۵
- تصویر ۳-۱۱. نمایش پیش بینی پیوندهای دی سولفیدی در توالی P1,P2,P3 توسط پایگاه DiANNA ..... ۱۰۶
- تصویر ۳-۱۱۲. نمایش پیش بینی سمیت توالی های انتخاب شده P1,P2,P3 توسط پایگاه ToxinPred ..... ۱۰۷
- تصویر ۳-۱۳. نمایش پیش بینی جایگاههای اپی توپ در توالی P1,P2,P3 توسط پایگاه IEDB ..... ۱۰۸
- تصویر ۳-۱۴. نمایش پیش بینی پیوند گلیکوزیله در توالی P1,P2,P3 توسط پایگاه NetNGLyc-1.0 ..... ۱۰۸
- تصویر ۳-۱۵. نمایش پیشگویی ساختار اول پروتئین های P1,P2,P3 توسط پایگاه pepcalc ..... ۱۰۹
- تصویر ۳-۱۶. نمایش پیشگویی ساختار دوم پروتئین های P1,P2,P3 توسط پایگاه Prabi ..... ۱۱۰
- تصویر ۳-۱۷. نمایش پیشگویی ساختار دوم و نمودار رامچاندرا پروتئین های P1,P2,P3 توسط پایگاه Swiss Model ..... ۱۱۱
- تصویر ۳-۱۸. پیش بینی داکینگ مولکولی بین پروتئین سنبله سارس کوو-۲ و گیرنده ACE2 توسط پایگاه RCSB ..... ۱۱۳
- تصویر ۳-۱۹. نمایش ساختار سه بعدی پروتئین ۱ (RBD) توسط پایگاه PDB ..... ۱۱۳
- تصویر ۳-۲۰. نمایش داکینگ مولکولی بین RBD-ACE2 نوترکیب توسط پایگاه HDOCK ..... ۱۱۴
- تصویر ۳-۲۱. نمایش کلون قطعه مورد نظر P1,P2,P3 در وکتور pET-28a توسط نرم افزار SnapGene ..... ۱۱۶
- تصویر ۳-۲۲. کشت باکتری های مستعد شده بر روی محیط LB آگار ..... ۱۱۷
- تصویر ۳-۲۳. نمایش کلون های رشد کرده حاصل از انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری DH5α در محیط LB آگار ..... ۱۱۸
- تصویر ۳-۲۴. تأیید انتقال پلاسمید نوترکیب حاوی ژن P1,P2,P3 به باکتری DH5α توسط Colony PCR ..... ۱۱۸
- تصویر ۳-۲۵. الف : نمایش پلاسمید نوترکیب تخلیص شده از سویه DH5α و تأیید آن توسط ژل آگارز ..... ۱۱۹
- تصویر ۳-۲۶. بررسی حضور پروتئین در فاز محلول یا نامحلول توسط الکتروفورز SDS-PAGE ..... ۱۲۰
- تصویر ۳-۲۷. بررسی الکتروفورز SDS-PAGE خروجی های ستون حاوی رزین نیکل حاصل از پروتئین ۱ ..... ۱۲۰
- تصویر ۳-۲۸. بررسی الکتروفورز SDS-PAGE. خروجی های ستون حاوی رزین نیکل حاصل از پروتئین ۲ ..... ۱۲۱
- تصویر ۳-۲۹. بررسی الکتروفورز SDS-PAGE خروجی های ستون حاوی رزین نیکل حاصل از پروتئین ۳ ..... ۱۲۱
- تصویر ۳-۳۰. الکتروفورز SDS-PAGE هرسه پروتئین نوترکیب تخلیص شده ..... ۱۲۱
- تصویر ۳-۳۱. تأیید پروتئین های تخلیص شده در فناوری وسترن بلات. ..... ۱۲۳
- تصویر ۳-۳۲. بررسی حضور اندوتوکسین در پروتئین های تخلیص شده توسط تست LAL با کیت Lonza ..... ۱۲۶
- تصویر ۳-۳۳. ایمن سازی حیوانات (موش , خرگوش و خوکچه هندی) ..... ۱۲۸
- تصویر ۳-۳۴. تأیید شناسایی پروتئین های تخلیص شده با پادتن پلی کلونال توسط فناوری وسترن بلات ..... ۱۳۲

- تصویر ۳-۳۵. بررسی اتصال پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱ با سارس کوو-۲ توسط فناوری وسترن بلات . . . . . ۱۳۳
- تصویر ۳-۳۶. ارزیابی پادتن های تولید شده بر علیه پروتئین نوترکیب تزریق شده به خرگوش با کیت تشخیصی (IgM و IgG) سارس کوو-۲ . . . . . ۱۳۴
- تصویر ۳-۳۷. ارزیابی خاصیت خنثی سازی پادتن های تولید شده بر علیه پروتئین نوترکیب تزریق شده به خرگوش با کیت تشخیص پادتن خنثی ساز . . . . . ۱۳۴
- تصویر ۳-۳۸. تائید تخلیص پادتن توسط ستون حاوی رزین پروتئین A به وسیله الکتروفورز SDS-PAGE . . . . . ۱۳۵
- تصویر ۳-۳۹. الکتروفورز پادتن های تغلیظ شده بر علیه هر سه پروتئین . . . . . ۱۳۵
- تصویر ۳-۴۰: تست خنثی سازی ویروس (VNT) , رقت های مختلف ویروس , سرم کنترل و پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱،۲،۳ . . . . . ۱۳۸
- تصویر ۳-۴۱. نتایج سی تی اسکن ریه خوکچه هندی چالش شده با سارس کوو-۲ . . . . . ۱۴۰
- تصویر ۳-۴۲. تصاویر میکروسکوپی از تست ایمونوهیستوشیمی برای مارکر CD4 (IHC, Ob: 20) . . . . . ۱۴۱
- تصویر ۳-۴۳. تصاویر میکروسکوپی از تست ایمونوهیستوشیمی برای مارکر CD8 (IHC, Ob: 20) . . . . . ۱۴۲
- تصویر ۳-۴۴. نمایش سلولهای کشت داده شده برای مطالعات سلول . . . . . ۱۴۳
- تصویر ۳-۴۵. تصاویر میکروسکوپی از ساختار ریه . . . . . ۱۴۹
- تصویر ۳-۴۶. تصاویر میکروسکوپی از ساختار کبد . . . . . ۱۴۹
- تصویر ۳-۴۷. تصاویر میکروسکوپی از ساختار کلیه . . . . . ۱۵۰
- تصویر ۳-۴۸. تصاویر میکروسکوپی از ساختار طحال . . . . . ۱۵۰

## فهرست جداول

- جدول ۱-۱. مقایسه ویژگی کرونا مرس، سارس، سارس-۲ . . . . . ۶
- جدول ۱-۲. ژن های سارس کوو-۲ و پلی پروتئین های رمزگذاری شده . . . . . ۱۱
- جدول ۱-۳. معیارهای شدت بیماری کووید-۱۹ ناشی از ویروس کرونا سارس کوو-۲ . . . . . ۳۱
- جدول ۱-۴. نرخ مرگ و میر و مقدار R0 ویروس های نوظهور شناخته شده . . . . . ۳۴
- جدول ۲-۱. پایگاه های مورد استفاده برای مطالعات بیوانفورماتیکی . . . . . ۴۶
- جدول ۲-۲. مواد مورد استفاده برای تهیه محیط کشت LB Borth . . . . . ۵۰
- جدول ۲-۳. مواد مورد استفاده برای تهیه محیط کشت 2xYT . . . . . ۵۰
- جدول ۲-۴. مواد شیمیایی مورد استفاده برای تهیه محیط کشت SOB . . . . . ۵۲
- جدول ۲-۵. مشخصات پرایمرهای مصرف شده در PCR . . . . . ۵۴
- جدول ۲-۶. شرایط PCR مربوط به تکثیر ناحیه ی پلی کلونینگ وکتور pET-28a حاوی ژن . . . . . ۵۴
- جدول ۲-۷. شرایط PCR مربوط به تکثیر ناحیه ی پلی کلونینگ وکتور pET-28a حاوی ژن . . . . . ۵۴

جدول ۲-۸.	مواد مورد نیاز برای تهیه بافر تانک	۶۱
جدول ۲-۹.	مواد لازم برای تهیه ژل بالا و پائین	۶۲
جدول ۲-۱۰.	ترکیبات بافرهای لیز متفاوتی که برای لیز باکتری مورد استفاده قرار گرفتند.	۶۵
جدول ۲-۱۱.	مواد مورد نیاز برای تهیه بافرهای دیالیز	۶۸
جدول ۲-۱۲.	مواد لازم برای تهیه بافر PBS	۷۱
جدول ۲-۱۳.	دلیل انتخاب حیوانات و مشخصات آن ها	۷۷
جدول ۲-۱۴.	شرایط پادکن تزریق شده به موش	۷۸
جدول ۲-۱۵.	غلظت پادکن تزریق شده به خرگوش	۷۹
جدول ۲-۱۶.	شرایط پادکن تزریق شده به خوکچه ها با ادجوانت فروند	۷۹
جدول ۲-۱۷.	شرایط پادکن تزریق شده به خوکچه ها با آلوم	۷۹
جدول ۲-۱۸.	رقت پادتن های استفاده شده برای الایزا	۸۱
جدول ۲-۱۹.	غلظت و نوع پادکن تزریق شده به موش ها	۸۵
جدول ۲-۲۰.	غلظت و نوع پادکن تزریق شده به موش ها	۹۰
جدول ۳-۱.	مطالعات انجام شده در حوزه سارس ، مرس و سارس کوو-۲	۹۸
جدول ۳-۲.	مشخصات ۱۰مدل پیش بینی شده برتر از نتایج داکینگ مولکولی گیرنده- لیگاند	۱۱۴
جدول ۳-۳.	جدول جذب نوری در غلظت های مختلف BSA برای رسم نمودار استاندارد برادفورد	۱۲۲
جدول ۳-۴.	نتایج حاصل از تست CD برای پروتئین های تخلیص شده P1,P2,P3	۱۲۵
جدول ۳-۵.	نتایج حاصل از تست خنثی سازی ویروس توسط پادتن بر علیه پروتئین های نوترکیب	۱۳۸
جدول ۳-۶.	نتایج تحلیل تصاویر حاصل از ایمونوهیستوشیمی توسط نرم افزار z image	۲۰۳
جدول ۳-۷.	نتایج فلوسایتومتری حاصل از واکنش پروتئین ۱ با سلولهای گیرنده مثبت و منفی	۱۴۵
جدول ۴-۱.	ویژگیهای کل بخش سنبله پروتئین و RBD	۱۵۷

## فهرست نمودار

نمودار ۳-۱.	نتایج الایزا برای پروتئین های نوترکیب تخلیص شده با پادتن ضد برجسب هیستیدین	۱۲۴
نمودار ۳-۲.	بررسی پروتئین های نوترکیب با پادتن سرم بیماران مبتلا به کووید-۱۹ و مقایسه با سرم کنترل	۱۲۶
نمودار ۳-۳.	بررسی پروتئین های نوترکیب با پادتن سرم افراد واکسینه شده توسط واکسن آسترانکا و مقایسه با سرم کنترل	۱۲۷
نمودار ۳-۴.	الایزا جهت بررسی تغییرات تیتر پادتن پلی کلونال بر علیه پروتئین ۱، ۲ و ۳ در سرم خرگوش	۱۲۹
نمودار ۳-۵.	الایزا جهت بررسی تغییرات تیتر پادتن پلی کلونال بر علیه هر سه پروتئین و مخلوط آن ها در سرم موش	۱۳۰
نمودار ۳-۶.	الایزا جهت بررسی تیتر پادتن پلی کلونال در سرم خوکچه هندی	۱۳۱
نمودار ۳-۷.	الایزا جهت بررسی اختصاصیت پادتن تولید شده بر علیه پروتئین های نوترکیب با پادکنهای متفرقه PI	۱۳۶



- نمودار ۳-۸. الایزا جهت بررسی اتصال پادتن تولید شده در حیوانات با سارس کوو-۲ ..... ۱۳۷
- نمودار ۳-۹. نتایج فلوسایتومتری حاصل از واکنش پروتئین ۱ با سلولهای گیرنده مثبت و منفی ACE2 ..... ۱۴۴
- نمودار ۳-۱۰. نتایج فلوسایتومتری حاصل از مهار اتصال ویروس با سلولهای گیرنده مثبت ACE2 توسط پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱ ..... ۱۴۵
- نمودار ۳-۱۱. بررسی بهترین ایمنی زایی در سرم موشهای تزریق شده با غلظتهای مختلف پروتئین ۱ به وسیله الایزا ..... ۱۴۷

## فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

## مقدمه

در ۲۹ دسامبر ۲۰۱۹ پزشکان بیمارستانی واقع در شهر ووهان چین متوجه موارد غیرمعمولی از بیماران مبتلا به ذات‌الریه<sup>۱</sup> شدند [۱]. بررسی‌های بعدی نشان داد که منشأ این بیماری از بازار غذاهای دریایی، طیور و حیوانات زنده در شهر ووهان واقع در استان هوبای در مرکز چین بوده است [۲]. پس از آن، شیوع غیرمعمول موارد ذات‌الریه در تاریخ ۳۱ دسامبر به سازمان بهداشت جهانی گزارش شد. دولت و محققان حوزه بهداشت در چین اقدامات سریع را برای کنترل همه‌گیری آن انجام دادند و تحقیقات علت‌شناسی<sup>۲</sup> را آغاز نمودند [۱]. در تاریخ ۱ ژانویه ۲۰۲۰، بازار مذکور بسته و تحت آلودگی‌زدایی قرار گرفت. متعاقب آن در ۷ ژانویه سال ۲۰۲۰ دانشمندان چینی یک ویروس کرونا جدید را از این بیماران مبتلا به ذات‌الریه (پنومونی) ویروسی جدا کردند [۱]. بعد از گمانه‌زنی‌های گسترده درباره عامل ایجادکننده این بیماری، سرانجام بخش چینی مرکز کنترل و پیشگیری بیماری (CDC)<sup>۳</sup> گزارش منتشر شده توسط وال استریت ژورنال را تأیید و در تاریخ ۹ ژانویه سال ۲۰۲۰، عامل این بیماری را یک کرونا ویروس جدید با نام nCoV-2019<sup>۴</sup> اعلام نمود [۱، ۲].

اولین توالی ژنومی nCoV-2019 یک روز بعد از تأیید آن توسط ژانگ و دانشمندان دیگر در دانشگاه فودان شانگهای به صورت آنلاین گذاشته شد [۱]. متعاقباً در تاریخ ۱۱ ژانویه، پنج توالی ژنومی دیگر از این ویروس توسط انستیتوهای مختلف در سرتاسر چین (CDC چین، انستیتو ویروس‌شناسی ووهان و آکادمی علوم پزشکی چین) بر روی پایگاه داده GSAID<sup>۵</sup> قرار داده شد و به محققان در سرتاسر دنیا اجازه داد تا تحقیقات بر روی این کرونا ویروس جدید را آغاز کنند [۳]. در ادامه، توالی‌های ژنومی تمام کرونا ویروس‌های جداسازی شده در چین و خارج از آن نیز تعیین شد و بر روی پایگاه داده قرار گرفت [۳]. جداسازی و تعیین توالی ژنومی موفقیت‌آمیز کروناویروس nCoV-2019 در فهم منشأ این ویروس و خصوصیات عفونت‌زایی آن کمک‌های فراوانی کرده است.

با این حال هم‌اکنون ابهامات فراوانی باقی مانده و دانشمندان در حال تحقیقات گسترده بر روی این ویروس جدید می‌باشند. پس از افزایش موارد ابتلا و گسترش جهانی این ویروس، سازمان بهداشت جهانی در تاریخ ۳۰ ژانویه ۲۰۲۰ با انتشار بیانیه‌ای، شیوع کرونا ویروس جدید را ششمین عامل وضعیت اضطراری بهداشت عمومی در سرتاسر جهان اعلام نمود که تهدیدی نه فقط برای چین، بلکه برای تمام کشورها به‌شمار می‌رود [۳].

قبل از این کروناویروس جدید، سازمان بهداشت جهانی، وضعیت اضطراری بهداشت عمومی را در ارتباط با موارد شیوع ویروس آنفلوآنزای H1N1 (سال ۲۰۰۹)، ویروس پولیو<sup>۶</sup> یا فلج اطفال (سال ۲۰۱۴)،

<sup>1</sup> Pneumonia

<sup>2</sup> Etiology

<sup>3</sup> Centers for Disease Control and Prevention; CDC

<sup>4</sup> novel Corona Virus -2019; nCoV-2019

<sup>5</sup> Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data; GISAIID

<sup>6</sup> Poliovirus

ویروس ابولا<sup>۱</sup> در غرب آفریقا (سال ۲۰۱۴)، ویروس زیکا<sup>۲</sup> (سال ۲۰۱۶) و ویروس ابولا در جمهوری دموکراتیک کنگو (سال ۲۰۱۹) اعلام کرده بود. سازمان بهداشت جهانی در تاریخ ۱۱ فوریه ۲۰۲۰، نام رسمی را برای بیماری کرونا ویروس جدید تحت عنوان کووید-۱۹<sup>۳</sup> انتخاب نمود و کمیته بین‌المللی طبقه بندی ویروسها<sup>۴</sup> (ICTV) نیز در همین روز، نام ویروس ایجاد کننده این بیماری را از nCoV-2019 به سندروم تنفسی حاد شدید ویروس کرونا (سارس کوو-۲)<sup>۵</sup> تغییر داد [۴]. از زمان ظهور این ویروس در نوامبر ۲۰۱۹، علیرغم تلاش‌های سازمان بهداشت جهانی و دولت‌ها برای مهار آن، عمدتاً به دلیل ماهیت بسیار تهاجمی آن، به سرعت در سراسر جهان گسترش یافته و زندگی میلیون‌ها انسان را به شدت تهدید می‌کند [۵]. با توجه به پاندمی اخیر کووید-۱۹ و روند صعودی تعداد مبتلایان و موارد مرگ‌ومیر ناشی از آن در سراسر جهان، جمع‌آوری و بررسی مطالعات مختلف در خصوص این بیماری می‌تواند راهگشای قدم‌های بعدی برای روند شناخت بهتر ماهیت و پاتوژن آن و همچنین کمک به پیشگیری، تشخیص و درمان مناسب این بیماری باشد.

## ۱-۱. کرونا سارس<sup>۶</sup>: اولین شیوع کرونا ویروس در قرن ۲۱ با بیماریزائی بالا در انسان

در سال ۲۰۰۲ شیوع یک بیماری جدید که عامل آن یک ویروس کرونا تازه کشف شده با نام کرونا سارس بود، معرفی شد. این بیماری با گسترش به ۲۹ کشور در پنج قاره به مرحله همه‌گیری جهانی<sup>۷</sup> رسید. تا زمان سازمان‌یابی اقدامات مداخله‌ای بهداشت عمومی برای مهار این همه‌گیری جهانی، بر اساس شواهد قطعی آزمایشگاهی ۸۰۹۶ مورد ابتلا و ۷۷۴ مورد مرگ تا آگوست ۲۰۰۳ گزارش شد. اولین مورد ابتلا به سارس که توسط ویروس کرونا جدید ایجاد شده بود، مردی ۴۵ ساله در شهر فوشان ایالت گوانگدونگ چین در نوامبر سال ۲۰۰۲ بود [۶، ۷]. تظاهرات بالینی بیماری تنفسی مرموز که در آینده سارس نام گرفت، تب بالا ( $38^{\circ}\text{C}$ )، سرفه خشک و پیشرفت سریع به سمت نارسائی تنفسی بود. در نتیجه یک تصویر بالینی از عفونت غیر طبیعی ریه ذکر شد. با این حال، تشخیص اینکه عامل جدید عفونی از انسان به انسان منتقل می‌شود چند ماه بعد رخ داد. بنابراین در آوریل سال ۲۰۰۳ بود که سازمان جهانی بهداشت (WHO)<sup>۸</sup> اعلام کرد که همه‌گیری سارس با عامل بیماری زای جدید از خانواده کرونا ویروس که قبلاً در انسان نبوده، ایجاد شده است [۸، ۹]. موارد اولیه سارس، تا ۲۱ فوریه ۲۰۰۳ به چین محدود می‌شد، اما بعد از مدتی به کشورهای دیگر نیز گسترش یافت. با این حال سرعت عمل

<sup>1</sup> Ebola Virus

<sup>2</sup> Zika virus

<sup>3</sup> Corona Virus Disease -2019; COVID-19

<sup>4</sup> International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV

<sup>5</sup> Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus-2; SARS CoV-2

<sup>6</sup> SARS CoV

<sup>7</sup> Pandemic

<sup>8</sup> World Health Organization; WHO

جامعه علمی در فهم این بیماری ویروسی جدید بی همتا بود و موفق به مهار سارس شد. با کشف یک ویروس کرونا جدید که مسئول همه گیری سارس بود، پاسخ سوالات جدیدی از جمله اینکه منشأ اولیه این ویروس چه حیوانی بوده است باید روشن می شد. آیا هر حیوانی می توانست به عنوان میزبان ناقل در انتقال ویروس به انسان نقش داشته باشد؟ برای پاسخ به این معما، لازم بود به موارد اولیه ابتلا به سارس برگردیم. با نگاه به گذشته و اولین مورد شناسائی شده سارس در شهر فوشان، معلوم نبود که آن فرد کجا و چگونه بیمار شده، اما مشخص بود که او برای هفته ها به جایی سفر نکرده بود اما با حیوانات مختلف (جوجه، گربه و مار) که برای مصرف خانواده تهیه می کرد در ارتباط بود [۴].

به علاوه، در آغاز همه گیری سارس مشابه با اولین مورد ابتلا بیماری، کارگران رستوران را که از پستانداران وحشی به عنوان غذای نامتعارف استفاده می کردند درگیر کرد. به دنبال آن، کرونا سارس و آنتی بادیهای کرونا سارس در گربه زباد نخلی<sup>۱</sup> و حیواناتی که در یک فروشگاه ارائه می شدند پیدا شد. مطالعات بعدی نشان داد که کرونا ویروس های متعددی در خفاش ها وجود دارند. این یافته ها در نهایت نشان داد که خفاش ها میزبان طبیعی و اصلی تمام انواع کرناویروس ها هستند [۶، ۱۰].

## ۱-۲. کرونا مرس<sup>۲</sup>: شیوع نگران کننده دیگر از عفونت تنفسی

### کرناویروس

کرونا مرس یک کرناویروس انسانی است که بیماری مشابه با سارس را در خاورمیانه ایجاد می کند. اولین مورد گزارش شده یک مرد ۶۰ ساله سعودی بود و هفت روز تب، سرفه، خلط و تنگی نفس را تجربه کرد و در تاریخ ۱۳ ژوئن ۲۰۱۲ در بیمارستان خصوصی جده در عربستان سعودی بستری شد و یازده روز پس از بستری در بیمارستان درگذشت [۱۱]. چند ماه بعد در ۱۲ سپتامبر همان سال، یک مرد ۴۹ ساله از قطر با نارسائی حاد کلیوی و عفونت دو طرفی ریه به بیمارستان منتقل شد. تست های مولکولی نمونه های بیمار در همان ماه انجام شد و ژنگان ویروسی که بسیار مشابه با آنچه که در بیمار عربستان سعودی بود مشخص شد [۱۲]. افرادی که ارتباط نزدیک داشتند. شامل: متخصصین بهداشت، خانواده و دوستان تا ده روز بعد از آخرین تماسشان با بیمار تحت نظر قرار گرفتند تا نحوه سرایت و گسترش ویروسی مشخص شود. بنابراین، ۶۴ نفر تحت نظر قرار گرفتند و شاهدی مبنی بر انتقال شخص به شخص علیرغم نظارت دقیق تماس ها تأیید نشد [۱۲]. مقامات بهداشتی از انتشار یک کرونا ویروس جدید که در نوامبر ۲۰۱۲ به عنوان نوع جدید بتا کرناویروس که بسیار نزدیک به HKU4 و

HKU5 موجود در خفاش ها بود، آگاه شدند [۱۱]. در دسامبر ۲۰۱۲ مرکز کنترل و پیشگیری بیماری در اروپا لیستی از کشورهای در خطر شامل بحرین، ایران، عراق، اسرائیل، اردن، کویت، لبنان، فلسطین، عمان، قطر، عربستان سعودی، سوریه، امارات متحده عربی و یمن منتشر کرد [۱۳] از این رو

<sup>1</sup> Civet

<sup>2</sup> MERS Corona Viruse; MERS-CoV

دستورالعملی برای نظارت تماسهای نزدیک بیمار اتخاذ شد و انتقال انسان به انسان این بیماری را تأیید کرد. موارد ابتلا پیوسته مشخص می‌شدند و در ژوئن ۲۰۱۵، ۵۵ مورد قطعی گزارش شد و نرخ مرگ و میر با مرگ ۳۱ مورد مرگ، ۵۶٪ اعلام شد [۱۴]. عفونت ویروسی موضوع شصت و ششمین مجمع جهانی بهداشت در ژنو سوئیس بود و به علت فقدان اطلاعات در مورد ویروس، این بیانیه که "ویروس جدید، تهدیدی برای کل جهان است"، صادر شد.

در اوایل سال ۲۰۱۴، افزایش ناگهانی آلودگی کرونا مرس در جده عربستان سعودی خاستگاه اولین مورد ابتلا مشاهده شد. مجموع ۲۵۵ مورد ابتلا از اول تا شانزدهم ژانویه با سن متوسط ۴۵ سال، با قابلیت انتقال انسان به انسان، در افرادی که با یک واحد سلامت تماس داشتند، مشاهده شد [۱۵]. بر اساس سازمان جهانی بهداشت، از آوریل ۲۰۱۲ تا ژانویه ۲۰۲۰، ۲۵۱۹ مورد قطعی آزمایشگاهی از آلودگی کرونا مرس گزارش شد، با نرخ مرگ و میر ۳۴٪ با ۸۶۶ مورد مرگ که عمدتاً در عربستان سعودی رخ داده بود (۲۱۲۱ مورد، شامل ۷۸۸ مرگ و نرخ مرگ آوری (۳۷/۱) [۱۶].

### ۱-۳. کرونا سارس-۲: یک ویروس جدید با همه گیری جهانی

در کمال ناباوری، در اواخر دسامبر ۲۰۱۹ شیوع یک عفونت ریه مرموز در شهر ووهان ایالت هوبی چین رخ داد [۱۷]. علت بیماری یک کروناویروس جدید بود که در ابتدا توسط سازمان جهانی بهداشت nCoV-2019 نام گرفت و اکنون توسط کمیته بین المللی طبقه بندی ویروس ها (ICTV) کرونا سارس نامیده می‌شود [۲]. در نتیجه، چین مرکز ظهور بیماری کووید-۱۹ بوده است که سازمان جهانی بهداشت آن را در مارچ ۲۰۲۰ به عنوان همه گیری جهانی اعلام کرد [۱۸]. گاهی اوقات ویروس کرونایی که به طور معمول حیوانات را آلوده می‌کنند می‌توانند تکامل یافته و انسان را بیمار کنند و به یک ویروس کرونا انسانی جدید مبدل شوند و شیوع‌های مرگبار معمولاً در نتیجه‌ی این کروناویروس‌های زونوتیکی<sup>۲</sup> می‌باشد که از سد گونه عبور کرده‌اند و باعث عوارض و مرگ و میر بالا در جمعیت‌های انسانی می‌شوند، مانند سارس، مرس و سارس کوو-۲ [۱۹]. در اولین مبتلایان کووید-۱۹ مشخص شد این افراد قبل از بیماری، در معرض حیوانات وحشی در بازار عمده فروشی غذاهای دریایی هوانان (ووهان چین) بوده‌اند، جایی که پرندگان، خفاش‌ها، مارها و دیگر حیوانات مزرعه داد و ستد می‌شوند. بر اساس این سناریو، منشاء جانوری مبتلایان اولیه پیشنهاد شد. با این حال به زودی انتقال انسان به انسان با ابتلای موارد متعدد کووید-۱۹ در خانواده و افرادی که به بازار هوانان نرفته بودند مشخص شد [۲۰]. در ژانویه ۲۰۲۰، بیماری به سرعت در داخل و خارج ایالت هوبی و حتی در دیگر کشورها گسترش پیدا کرد. چنانچه در ۱۷ آوریل ۲۰۲۰ مجموع ۲,۱۱۴,۲۶۹ مورد کووید-۱۹ در سرتاسر جهان تأیید شد. این نکته حائز اهمیت است که ۶۰٪ موارد (۲,۱۱۴,۲۶۹/۱,۲۶۵,۷۶۵) در اسپانیا، ایتالیا، آمریکا، آلمان و فرانسه بوده

<sup>1</sup> Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus-2: SARS CoV-2

<sup>2</sup> Zoonotic

اند. در سطح بین الملل، موارد ابتلا در ۲۰۳ کشور و در پنج قاره گزارش شده است [۲۱]. در جدول ۱-۱ ویژگی ویروس کرونا های سارس، مرس و سارس ۲ با هم مقایسه شده اند.

جدول ۱-۱. مقایسه ویژگی کرونا مرس، سارس، سارس-۲

کرونا سارس-۲	کرونا مرس	کرونا سارس	
ویروس کرونا	ویروس کرونا	ویروس کرونا	بیماری زاها (پاتوژن ها)
۲۰۱۹	۲۰۱۲	۲۰۰۲-۲۰۰۴	سال همه گیری
بله	بله	بله	ابتلای انسان به انسان
تب، خستگی و سرفه های خشک	تب، سرفه، میالژی، تنگی نفس	تب، سرفه های خشک، تنگی نفس، اسهال، نارسایی اعضای بدن به خصوص در کلیه ها و شوک عفونی	علائم بالینی
۵۶۴۰۰۰۰۰۰	۸۴۳۷	۲۴۹۴	مبتلایان
۶,۳۷۰,۰۰۰	۸۱۳	۸۵۸	مرگ
۱۴-۰ روز	۷-۲ روز	۵ روز	دوره کمون
۳	۳	۰,۶۹	عدد تولید مثل $R_0$ *

\* $R_0$ : reproduction number

#### ۴-۱. طبقه بندی ویروس های کرونا

ویروس کرونا (ویروس تاجدار) متعلق به خانواده کروناویریده زیر خانواده کروناویرینه و راسته نیدوویرالس است که به عنوان بزرگترین گروه ویروس های ریبو نوکلئیک اسید (RNA) تک رشته ای و همچنین بزرگترین ژنوم ویروس های RNA شناخته شده با محتوای گوانین+ سیتوزین از ۳۲ تا ۴۳ درصد است. زیرخانواده کروناویریده شامل چهارجنس آلفا، بتا، گاما و دلتا کرونا ویروس ها است. ویروس کرونای انسانی برای اولین بار در اواسط دهه ۱۹۶۰ شناسایی شدند. ویروس کرونای جزء ویروس های شایع می باشند. به طوری که ۳۰ تا ۶۰ درصد از جمعیت چین پادتن علیه آن را دارند [۴].

ویروس سارس کوو-۲ متعلق به گونه ویروس کرونا مرتبط با سندرم فوق حاد تنفسی، تحت جنس مطالعات تکاملی سارکوویروس، جنس بتا کروناویروس، تحت خانواده ارتوکروناویرینه است [۴]. این ویروس شباهت نزدیکی با کروناویروس های شناسایی شده در خفاش (خفاش نعل بینی) و مورچه خوار پولک دار (پانگولین) دارد [۲۲]. ژنوم کروناویروس جدید در بعضی نواحی، شباهت های قابل توجهی با ژنوم کروناویروس های قبلی دارد. به عنوان مثال: تحلیل و توالی یابی ژنتیکی سارس کوو-۲ نشان می دهد که ۸۵ تا ۹۶٪ از کل ژنوم آن با ویروس کرونای خفاش (bat SARS-like coronavirus) و ۷۹٪ با سارس-کوو و حدود ۵۲٪ با مرس کوو تشابه دارد [۲۳]. مطالعات نشان دادند در سطح نوکلئوتیدی، این ویروس حدود ۷۲ درصد با توالی ژن پروتئین سنبله (اسپایک) ویروس سارس شباهت دارد [۲۲]. ویروس های کرونا شناخته شده در خفاش ها نشان دادند از نظر توالی نوکلئوتیدی ویروس سارس کوو در

خفاش نعل بینی (RaTG13) حدود ۹۶ درصد و در ناحیه دُمین اتصال به گیرنده (RBD) حدود ۸۵ درصد با ویروس بیماری کووید ۱۹ شباهت دارد. ژن S1 در ویروس سارس کوو-۲، ۷۰ درصد شباهت توالی با ویروس بتاکرونا دارد [۲۴].

علی‌رغم این شباهت‌ها از نظر ویژگی‌های کلیدی ژنومی متفاوت است. به عنوان مثال:

- ژن سنبله یا اسپایک (S) ویروس سارس کوو-۲ در محل شکاف حاوی چهار اسید آمینه بازی است که در بیماری‌زایی ویروس نقش مهمی دارد.
- پروتئین a8 در کروناویروس سارس وجود دارد. در حالی که این پروتئین در کرونا ویروس جدید سارس-کوو-۲ وجود ندارد.
- پروتئین b8 در کروناویروس سارس دارای ۸۴ اسید آمینه می‌باشد، در حالی که طول این پروتئین در کروناویروس جدید سارس-کوو-۲ بلندتر و ۱۲۱ اسید آمینه‌ای می‌باشد.
- پروتئین b3 در کروناویروس سارس طولی برابر با ۱۵۴ اسید آمینه دارد، حال آنکه طول این پروتئین در کروناویروس جدید سارس-کوو-۲ کوتاهتر و ۲۲ اسید آمینه‌ای است (تصویر ۱-۲) [۲۵، ۲۲].

## ۵-۱. زیست‌شناسی<sup>۱</sup> ملکولی ویروس

"کرونا" در لاتین به معنای تاج است و این نام به دلیل وجود طرح‌های میخی شکل پوشش ویروس به آن نسبت داده شده است که در زیر میکروسکوپ الکترونی به تصویر تاج نمایان می‌شود. بنابراین میتوان آن را ویروس تاجدار نامید (تصویر ۱-۱ الف). این ویروس‌ها، کروی، بیضی یا پلئومورف هستند که قطر آنها در حدود ۶۰ تا ۱۴۰ نانومتر است ویروس سارس کوو-۲ جزء ویروس‌های پوشش دار با ژنومی از نوع ریبو نوکلئیک اسید و دارای ژنوم تک رشته‌ای با قطبیت مثبت با منشا جانوری متعلق به خانواده کروناویریده و دسته نیدوویروس‌ها می‌باشند [۲۶].

"نیدو" به معنی لانه است و به توانایی ویروس‌ها برای ساخت مجموعه‌ای پیچیده از زیرژنومی‌های<sup>۲</sup> mRNA اشاره دارد [۲۶]. اندازه ژنوم ویروس ۲۹۸۸۱ نوکلئوتید (Gene Bank no. MN908947) است که ۹۸۶۰ اسید آمینه را جای گذاری (کدگذاری) می‌کند. ژنوم این ویروس جزء بزرگترین RNA ویروس‌ها می‌باشند. ژنوم ویروس از دو ناحیه ترجمه نشده<sup>۳</sup> (UTR) در انتهای<sup>۴</sup> ۵، ۳ و یازده چارچوب خواندن باز<sup>۴</sup> (ORF) تشکیل شده است که ۲۷ پروتئین را به رمز در می‌آورند [۲۷]. آرایش ژنوم ویروس سارس کوو-۲ در تصویر ۲-۱ نشان داده شده است.

<sup>1</sup> Biology

<sup>2</sup> subgenomic

<sup>3</sup> untranslated region; UTR

<sup>4</sup> Open Reading Frame; ORF



ژن رپلیکاز<sup>۱</sup> از همپوشانی دو چارچوب خوانش ORF1a و ORF1b تشکیل شده است و دو پلی پروتئین بزرگ pp1ab (۷۰۹۶ نوکلئوتید) و pp1a را کد می کنند. ژن orf1ab (GeneID:43740578) شامل ۲۱۲۹ نوکلئوتید است و دو سوم RNA ویروسی را شامل می شود و در انتهای ۵' ژنوم قرار دارد اندازه ژن طولانی رپلیکاز بیش از ۲۱ Kb است و شانزده پروتئین غیرساختاری<sup>۲</sup> (NSP) را کد می کند. (NSP (16->1 که به صورت پلی پروتئین pp1ab ترجمه می شود. در کنار این ژن، چهارده پروتئین غیرساختاری توسط mRNA های تحت ژنومی (NS 3a->14) نیز کد می شوند [۲۸].

پروتئین nsp1 با اتصال به زیرواحد ۴۰S ریبوزوم در سلول منجر به مهار ترجمه در سلول میزبان می شود. این کمپلکس سبب القای شکاف اندونوکلئولیتیک ناحیه ۵' UTR در mRNA های میزبان و در نهایت موجب تجزیه آن ها می شود. mRNA های ویروسی به دلیل وجود توالی هدایت کننده انتهایی در ناحیه ۵' در برابر این شکاف اندونوکلئولیتیک محافظت می شوند. با سرکوب بیان ژن در سلول میزبان، پروتئین nsp1 بیان ژن های ویروسی در سلول های مبتلا و فرار از پاسخ سیستم ایمنی میزبان را تسهیل می کند. پروتئین nsp2 در تنظیم مسیر انتقال پیام بقای سلول ها با واکنش بین مولکول های PHB<sup>۳</sup> و PHB2 میزبان نقش دارد. این دو پروتئین نقش کلیدی در پایداری عملکرد میتوکندری و حفظ سلول از استرس ها ایفا می کنند. پروتئین nsp3 در شکاف توالی انتهایی N در پلی پروتئین ها نقش دارد. در کنار این پروتئین، PL-PRO دارای فعالیت دیوبیکوئیتین<sup>۴</sup> است که در مهار پاسخ ایمنی نقش دارد و زنجیره های متصل پلی یوبیکوئیتین به لیزین ۶۳ و لیزین ۴۸ در سوبستراهای سلولی را هدف قرار می دهد. این پروتئین به همراه پروتئین nsp4 در تشکیل وزیکول های دوغشایی ضروری برای تکثیر ویروس نیز نقش دارد. پروتئین nsp3 با بلوکه کردن فسفوریلاسیون، دیمریزاسیون و انتقال بین جایگاهی هسته سلول ها، سبب مهار القای اینترفرون تیپ ۱ از ایمنی ذاتی می شود. این پروتئین در مهار انتقال پیام NF-kappa-B نقش دارد. در ناحیه ژن کدکننده nsp3 توالی دُمین SUD وجود دارد که فقط در ویروس های کرونا نوع سارس دیده می شود که با اتصال به mRNA G4 در مهار انتقال پیام مرگ سلولی (آپوپتوز) و بقای سلول ها نقش دارد [۲۹-۳۱].

پروتئین nsp3 در شکاف توالی انتهایی C پلی پروتئین رپلیکاز در یازده ناحیه نقش دارد. سوبستراهای شناخته شده برای این پروتئین حاوی توالی [ILMV]-[SGACN]-[Q] هستند. این پروتئین همچنین به ADRP<sup>۵</sup> نیز متصل می شود. پروتئین nsp6 در القای اولیه اتوفاگوزوم شبکه آندوپلاسمی میزبان و سپس محدود کردن گسترش این فاگوزوم ها و تسهیل در انتقال اجزای ویروسی به لیزوزوم ها نقش دارد. پروتئین nsp7 با پروتئین nsp8 یک همگرا دکامر تشکیل می دهد که به عنوان یک پریماز در تکثیر ویروس نقش دارد. پروتئین nsp9 نیز به عنوان پروتئین اتصالی به ssRNA<sup>۶</sup> در تکثیر ویروس نقش دارد.

<sup>1</sup> replicase

<sup>2</sup> Nonstructural proteins; nsp

<sup>3</sup> prohibitin; PHB

<sup>4</sup> deubiquitinating

<sup>5</sup> Adipocyte differentiation-related protein; ADRP

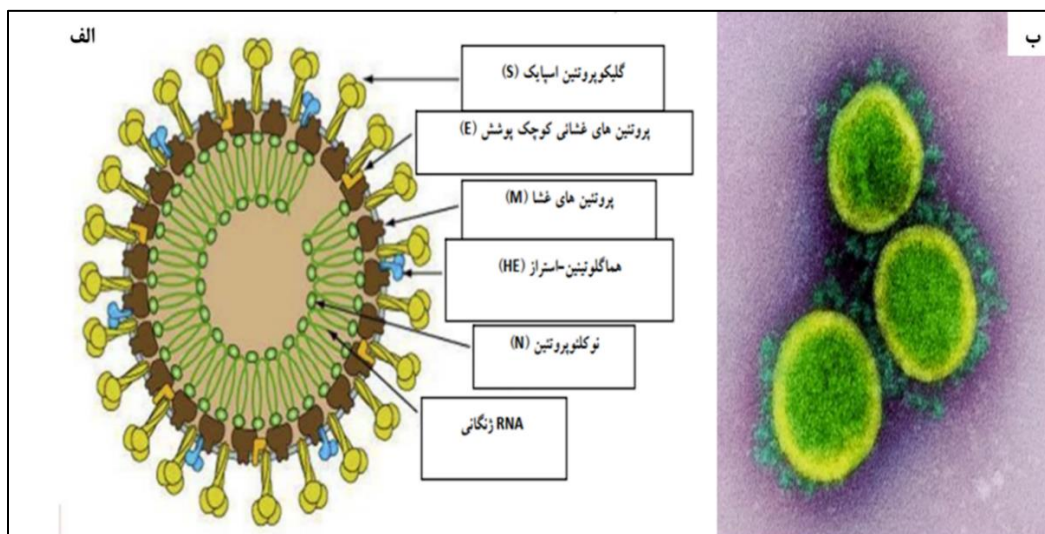
<sup>6</sup> Single-stranded RNA; ssRNA

پروتئین nsp10 با هم‌زمان‌سازی فعالیت‌های ۳'-۵' اگزوریبونوکلئازی پروتئین nsp14 و ۲-O-متیل ترانسفراز پروتئین nsp16 نقش حیاتی در سیستم ترجمه ویروس دارد. این پروتئین در متیلاسیون Cap توالی mRNA های ویروسی نقش دارد. پروتئین RdRp یا nsp12 همراه با کوفاکتورهای nsp7 و nsp8 در تکثیر و ترجمه ژنوم RNA ویروس نقش دارد. پروتئین هلیکاز یک پروتئین چندعملکردی با دُمین اتصالی در ناحیه انتهایی N است. این پروتئین در باز کردن مارپیچ دوگانه RNA و DNA از ناحیه ۵' به ۳' نقش دارد. فعالیت پروتئین هلیکاز وابسته به یون منیزیم است [۲۹-۳۱].

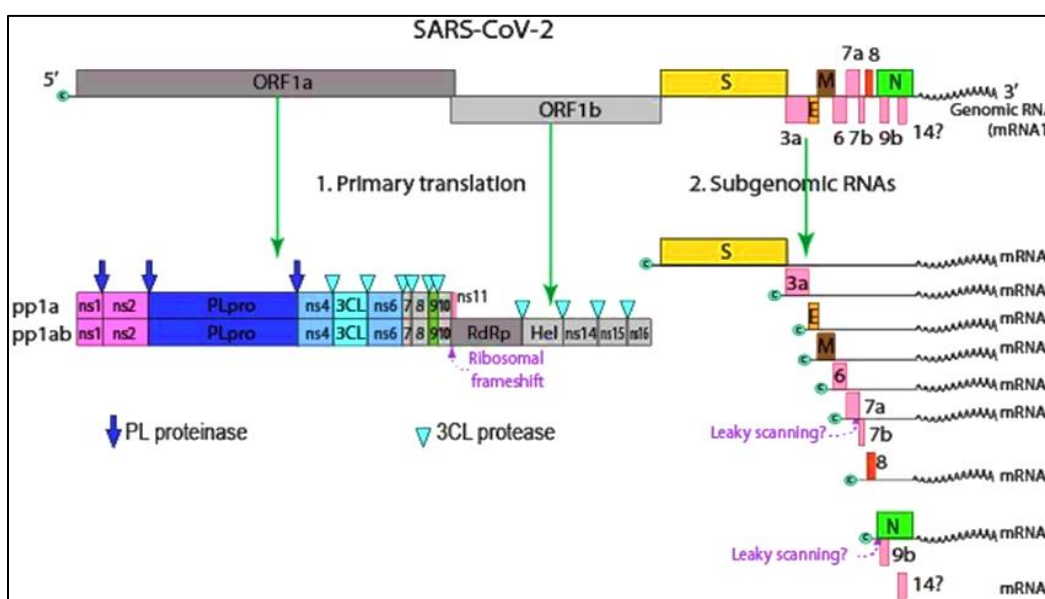
از سوی دیگر در انتهای ۳' ژنوم، یک سوم باقیمانده ژنوم چهار پروتئین ساختمانی شامل پروتئین سطحی اسپایک (S)، پروتئین پوششی (E)، پروتئین غشایی (M)، پروتئین نوکلئوکپسید (N) و هشت پروتئین فرعی شامل orf14، 9b، 8b، 7b، 7a، 6، 3b، 3a کد می‌شود. (الف) گلیکوپروتئین سنبله (S)، که شامل برجستگی‌های بزرگ سطح میشوند و صورت تریمر بوده و نقش پادکنیک اصلی ویروس را داشته و همچنین قابلیت اتصال به گیرنده سطح سلول را به عهده دارد. (ب) فسفوپروتئین نوکلئوکپسیدی (N) که نقش اتصال به RNA، سنتز و ترجمه آن را برعهده دارد. (ج) گلیکوپروتئین غشایی (M) که به صورت سه تایی پوشاننده غشاء ویروس است، در ریخت زایی (مورفوژنز) و کنار هم قرار گرفتن اجزای مختلف و جوانه‌زنی ویروس نقش مهمی ایفا می‌کند. (د) گلیکوپروتئین پوششی کوچک (E) که به صورت پنتامریک به عنوان کانال‌های یونی عمل می‌کند. این پروتئین به عنوان ویروپورین با منافذ پنتامری لیپیدی پروتئینی امکان عبور یون‌ها را فراهم می‌کند. این پروتئین در القای آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلول) نقش دارد (تصویر ۱-۱) [۳۲، ۳۳].

سارس کوو-۲ علاوه بر موارد فوق دارای یک گلیکوپروتئین اضافی با ویژگی‌های آستیل استراز و هم آگلوتیناسیونی<sup>۱</sup> است که از این جهت با دیگر ویروس کروناها متفاوت است. کروناویروسها پوشش خود را با جوانه‌زدن نوکلئوکپسید به داخل غشا قسمت‌های واسطه مانند شبکه آندوپلاسمی و شبکه گلژی به دست می‌آورد [۳۳].

<sup>1</sup> Hemagglutinin esterase



تصویر ۱-۱ الف) شمای کلی از ساختار سارس کوو-۲. گلیکوپروتئین S، نوکلئوپروتئین N، ژنوم RNA، پروتئین غشایی M و پروتئین پوششی E برگرفته از Biowiki، ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی ویروس سارس کوو-۲ نشان دهنده تصویر کروی و تاج های روی آن است.



تصویر ۱-۲. ساختار ژنوم ویروس سارس کوو-۲ و موقعیت قرار گیری هر کدام از چهارچوب های خوانش بر روی آن

جدول ۱-۲. ژن های سارس کوو-۲ و پلی پروتئین های رمزگذاری شده

ژن	طول ژن (نوکلئوتید)	پروتئین	طول پروتئین (اسید آمینه)	عملکرد
5' UTR	۲۶۵	بدون ترجمه	-----	-----
<b>Orf1ab</b>	۲۱۲۹۰	Pp1a/pp1ab	۴۴۰۵/۷۰۹۶	کدگذاری شانزده پروتئین غیرساختاری
<b>S</b>	۳۸۲۲	S	۱۲۷۳	کدگذاری پروتئین ساختاری گلیکوپروتئین S
<b>Orf3a</b>	۸۲۸	Orf3a	۲۷۵	یک پروتئین جانبی ویروس را رمزگذاری می کند.
<b>E</b>	۲۲۸	E	۷۵	کدگذاری کپسول پروتئین
<b>M</b>	۶۶۹	M	۲۲۲	کدگذاری پروتئین ماتریکس
<b>Orf6</b>	۱۸۶	Orf6	۶۱	یک پروتئین جانبی ویروس را رمزگذاری می کند.
<b>Orf7a</b>	۳۶۶	Orf7a	۱۲۱	یک پروتئین جانبی ویروس را رمزگذاری می کند.
<b>Orf7b</b>	۱۳۲	Orf7b	۴۳	یک پروتئین جانبی ویروس را رمزگذاری می کند.
<b>Orf8</b>	۳۶۶	Orf8	۱۲۱	یک پروتئین جانبی ویروس را رمزگذاری می کند.
<b>N</b>	۱۲۶۰	N	۴۱۹	کدگذاری پروتئین نوکلئوکپسید
<b>Orf10</b>	۱۱۷	Orf10	۳۸	یک پروتئین جانبی ویروس را رمزگذاری می کند.
3' UTR	۲۲۹	بدون ترجمه	-----	-----

## ۱-۶. ساز و کار بیماری‌زایی سارس کوو-۲

ناحیه S ژنوم ویروس، گلیکوپروتئین سنبله را کد می‌کند که در سطح ویروس قرار دارد و نقش مهمی در اتصال ویروس به میزبان و بیماری‌زایی ویروس بازی می‌کند. گلیکوپروتئین سنبله دارای دو زیرواحد S1 برای اتصال به گیرنده و پروتئین S2 برای هم‌جوشی<sup>۱</sup> پوشش ویروس با غشای سلول میزبان است. گلیکوپروتئین S در محل شکاف فورین دارای چند اسیدآمینو بازی (PRRA) در محل اتصال زیرواحد S1 و S2 است که عفونت‌زایی ویروس را افزایش می‌دهد. پروتئین S1 دارای دُمین اتصال به گیرنده<sup>۲</sup> (RBD) است که در اتصال به گیرنده hACE2<sup>۳</sup> و ورود ویروس به سلول میزبان نقش دارد و اجازه می‌دهد سارس کوو-۲ مستقیماً به قسمت پپتیداز<sup>۴</sup> (PD) از ACE2 متصل شود و سبب القای تغییرات ساختاری گلیکوپروتئین S می‌شود

این پروتئین در ریه انسان با استفاده از پروتئاز بین‌غشایی سرین<sup>۲</sup> (TMPRSS2)<sup>۵</sup> سبب ورود ویروس به سلول‌های ریه می‌شود. پروتئولیز گلیکوپروتئین S توسط کاتپسین CatB/L سبب فعالیت پپتید فیوژن S2 و فعال شدن ادغام غشایی ویروس درون اندوزوم‌ها می‌شود [۲۴، ۳۴-۳۶].. پس از هم‌جوشی غشایی، RNA ژنوم ویروسی در سیتوپلاسم سلول میزبان آزاد می‌شود و RNA بدون پوشش، دو پلی‌پروتئین pp1a و pp1ab را ترجمه می‌کند [۳۷]. دو پلی‌پروتئین pp1a و pp1ab، پروتئین‌های غیرساختاری را رمزگذاری کرده و کمپلکس همانندسازی-رونویسی<sup>۶</sup> (RTC) را درون یک وزیکول دو غشایی تشکیل می‌دهند. در ادامه RTC مجموعه‌ای از RNA‌های پیچیده را که پروتئین‌های جانبی و پروتئین‌های ساختاری را رمزگذاری کرده، تکثیر و رونویسی می‌کند. به واسطه‌ی شبکه‌ی آندوپلاسمیک رتیкулوم و جسم گلژی؛ RNA‌های تازه تشکیل شده، پروتئین‌های نوکلئوکپسید و گلیکوپروتئین‌های پوشش ویروس جمع‌آوری شده و جوانه‌های ذره ویروسی را تشکیل می‌دهند. سرانجام، وزیکول‌های حاوی ویروس با غشای پلاسمایی ترکیب می‌شوند تا ویروس آزاد شود (تصویر ۱-۳). از آنجایی که کروناویروس‌ها به صورت بالقوه می‌توانند دچار جهش شوند از این رو بیماران باید به شدت از این جهت پایش شوند تا جهش‌های احتمالی مهم در جهت افزایش تمایل اتصال RBD به ACE2 شناسایی شوند [۳۸-۴۱].

<sup>1</sup> Fusion

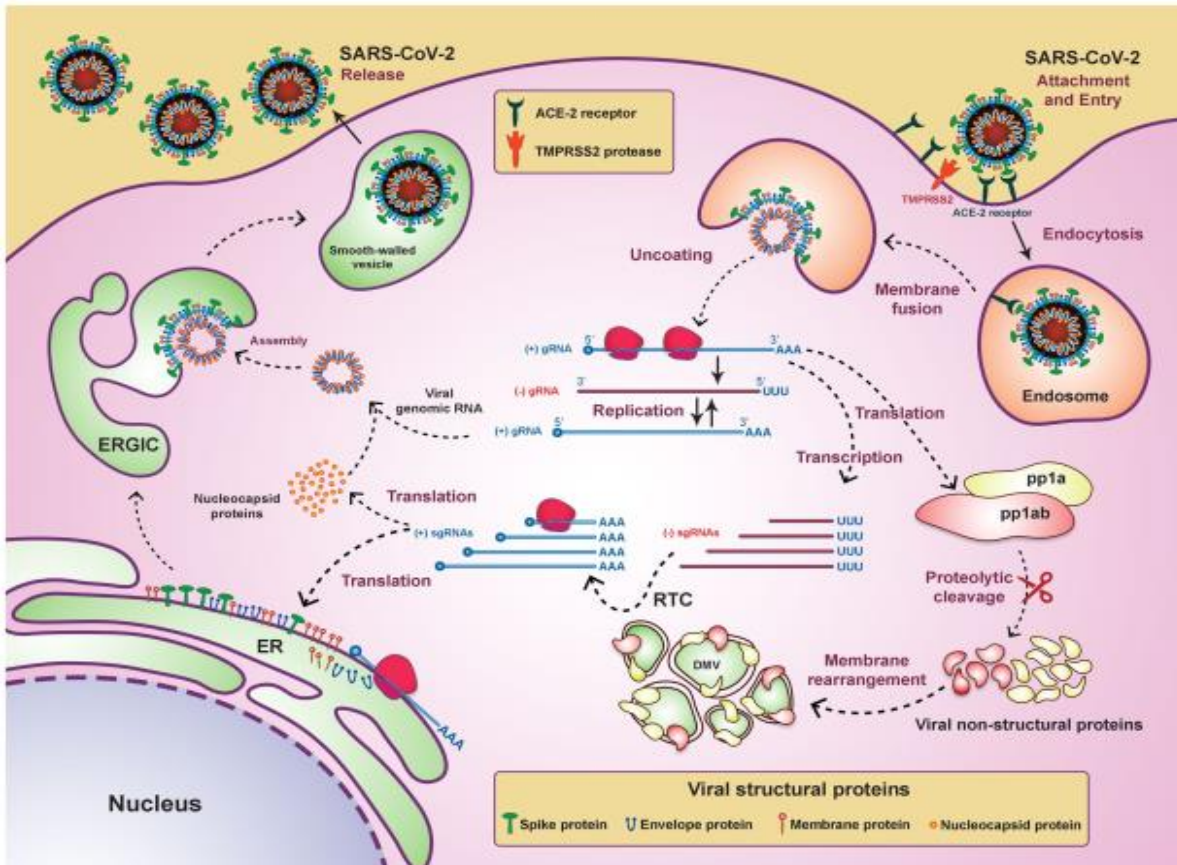
<sup>2</sup> Receptor Binding Domain; **RBD**

<sup>3</sup> Human angiotensin-converting enzyme 2; **ACE2**

<sup>4</sup> peptidase domain; **PD**

<sup>5</sup> Transmembrane protease serine 2; **TMPRSS2**

<sup>6</sup> replication/transcription complex; **RTC**



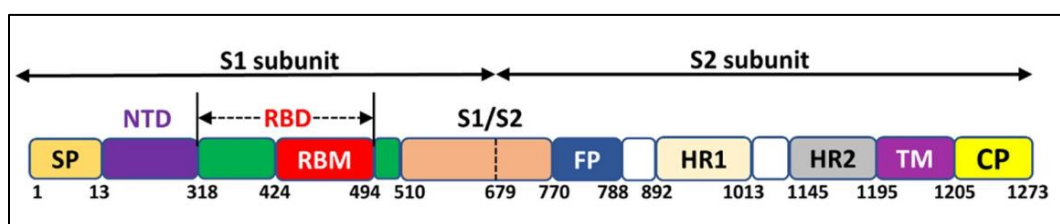
تصویر ۱-۳. چرخه زندگی سارس کوو-۲ در سلول میزبان. پس از همجوشی غشایی سارس کوو-۲، RNA ژنوم ویروسی در سیتوپلاسم سلول میزبان آزاد می‌شود و RNA بدون پوششش، دو پلی پروتئین pp1a و pp1ab را ترجمه می‌کند که، پروتئین‌های غیرساختاری را رمزگذاری کرده و کمپلکس همانندسازی-رونویسی ۱ را تشکیل می‌دهند. در ادامه RTC مجموعه‌ای از RNA های پیچیده را که پروتئین‌های جانبی و پروتئین‌های ساختاری را رمزگذاری کرده، تکثیر و رونویسی می‌کند. به واسطه شبکه‌ی آندوپلاسمیک رتیкулوم و جسم گلژی، RNA های تازه تشکیل شده، پروتئین‌های نوکلئوکپسید و گلیکوپروتئین‌های پوشش ویروس جمع‌آوری شده و جوانه‌های ذره ویروسی را تشکیل می‌دهند. سرانجام، وزیکول‌های حاوی ویروس با غشای پلاسمایی ترکیب می‌شوند تا ویروس آزاد شود.

## ۷-۱. پروتئین سنبله یا اسپایک: مسئول بیماری‌زایی

پروتئین سنبله (S) نقش مهمی را در قدرت بیماری‌زایی ویروس ایفا می‌کند. پروتئین سنبله ویروس کرونا ها، یک تریمر بزرگ و میخک شکل است پروتئین S به کلاس ۱ گلیکوپروتئین‌های ویروسی تعلق دارد که شامل ویروس آنفلوانزا، ویروس نقص ایمنی انسان HIV 160، ویروس ابولا و پارامیکسو ویروس نیز هست و با اتصال به گیرنده میزبان و تغییرات کانفورماسیونی الحاق غشای ویروس با سلول را هنگام ورود تقویت می‌کند [۴۲]. پروتئین S نقش مهمی را در قدرت بیماری‌زایی ویروس سارس کوو-۲ ایفا

<sup>1</sup> replication/transcription complex; RTC

می‌کند. این گلیکوپروتئین یک جزء مهم ویروس در بیماری‌زایی، فرار از سیستم ایمنی و اختصاصی گونه است. سایز پروتئین S ۱۸۰-۲۰۰ کیلو دالتون است که از یک ترکیب پیش ساز گلیکو پروتئینی (۱۲۷۳ اسید آمینه) ساخته شده است. انتهای آمین و همچنین بیشتر پروتئین‌های آن در سطح خارجی سلول و یا ویروس می‌باشند. پروتئین سنبله از یک سیگنال پپتید (اسید آمینه ۱-۱۲) در بخش N ترمینال پروتئین، زیرواحد S1 (۶۸۵-۱۴) و زیرواحد S2 (۶۸۶-۱۲۷۳) تشکیل شده است. زیر واحد S1 شامل یک دومین N ترمینال (۱۴-۳۰۵)، RBD (۳۱۹-۵۴۱) می‌باشد و همچنین FP (۷۸۸-۸۰۶)، HR1 (۹۱۲-۹۸۴)، HR2 (۱۱۶۳-۱۲۳۷)، دومین قطعه گذر غشایی (۱۲۱۳-۱۲۳۷) و دومین قطعه گذر غشایی سیتوپلاسمی (۱۲۳۷-۱۲۷۳) زیرواحد S2 را تشکیل می‌دهند (تصویر ۱-۴) [۴۳-۴۵].



تصویر ۱-۴. زیرواحدهای تشکیل دهنده پروتئین سنبله سارس کوو-۲

گلیکو پروتئین سنبله، نقش مهمی در اتصال ویروسی، همجوشی (فیوژن) و ورود به سلول میزبان را بازی می‌کند. شبیه به دیگر کروناویروس‌ها، پروتئین سنبله سارس کو می‌تواند بوسیله پروتئین‌هایی مثل تریپسین، کاتپسین L و فاکتور Xa به دو زیرواحد مشخص S1 و S2 تقسیم شود [۹۶]. زیر واحد S1 (۷۵۶-۱۷) دارای دو حوزه عملکردی است: دومین N ترمینال<sup>۱</sup> (NTD) و دومین اتصال گیرنده (RBD) که دارای موتیف اتصال گیرنده<sup>۲</sup> (RBM) است و در میان اکثر سویه‌های ویروس کرونا حفاظت شده است [۴۶]. NTD در زیرواحد S1 مسئول متصل شدن به قند و گیرنده‌های قندی است، که تنها استثنای شناخته شده آن NTD بتاکرونا ویروس MHV5 است که گیرنده پروتئینی CEACAM1 را شناسایی می‌کند. بخش دیگر در این ناحیه RBD (۳۱۸-۵۱۰) است که دارای موتیف اتصال به گیرنده بوده و به طور مستقیم به گیرنده میزبان متصل شده و زمینه ساز ورود ویروس به درون سلول میزبان می‌شود [۴۷]. زیرواحد S2 (۷۵۷-۱۲۲۵) شامل دو ناحیه تکراری (HR) که باعث تسهیل اتصال ویروس به گیرنده می‌شود و دومین ناقل غشایی که مابین اسیدآمینه‌های ۱۱۸۹ و ۱۲۲۷ که مثل لنگر روی پوشش ویروس قرار می‌گیرد. پروتئین S دارای دو ساختار فضایی (کانفورماسیون) به نامهای پیش‌الحاق<sup>۳</sup> و پس‌الحاق<sup>۴</sup> است. زیر واحد S1 با ساختار خود ساختار فضایی پیش‌الحاق پروتئین S را حفظ می‌کند و اجازه نمی‌دهد که ماشین الحاق غشایی که در زیرواحد S2 قرار دارد فعال شود. پپتید الحاق در پروتئین‌های S کروناویروس در پایین دست انتهای N از جایگاه برش S2 قرار دارد و به عنوان یک

<sup>1</sup> N -Terminal Domain; NTD

<sup>2</sup> Receptor-Binding Motif; RBM

<sup>3</sup> Prefusion conformation

<sup>4</sup> Postfusion conformation

پپتید الحاق داخلی به حساب می‌آید. این پپتید الحاق یک مارپیچ کوتاه و یک حلقه را تشکیل داده، که اکثر باقیمانده‌های آن آبگریز بوده که در داخل ساختار پیش الحاق پنهان می‌شوند [۴۸]. برش توسط پروتئازهای میزبان در جایگاه برش S1/S2 پروتئین S و برش در جایگاه S2 آغازگر فعال شدن ماشین الحاق S2 و گذر ساختار فضایی از وهله پیش الحاق به پس الحاق می‌شود و این گذر ساختار فضایی الحاق غشای ویروس و میزبان را باعث می‌شود. RBD مسئول تشخیص گیرنده‌های پروتئین<sup>۱</sup> APN، ACE2 و DPP4<sup>۲</sup> است. مطالعات مختلف نشان داده است که گیرنده انسانی برای سارس کوو-۲ می‌تواند آنزیم مبدل آنژیوتانسین-۲ (ACE2) باشد. دیگر ویروس کرونا هم‌چون عامل بیماری سارس نیز از طریق گیرنده ACE2، وارد سلول میزبان می‌شود. در مورد تشخیص گیرنده‌های پروتئینی، NTD ممکن است با شناخت مولکول‌های قندی خاص، اتصال اولیه ویروس به سطح سلول را تسهیل کند. بنابراین میانکنش گیرنده S1 یک عامل کلیدی تعیین کننده گرایش بافت و طیف میزبان CoV ها است [۴۹-۵۱]. برش در محل S1/S2 توسط پروتئاز فورین در هنگام خروج ویروسی در مسیر آگزوسیتوز باعث ایجاد ویروس با پروتئین S برش خورده می‌شود، این نوع ویروس با پروتئین S برش خورده بعد از اتصال به گیرنده ACE2 سریعتر کانفورماسیون‌شان تغییر می‌کند. در نتیجه جایگاه S2 در معرض پروتئازهای میزبان (مانند TMPRSS2 که در روی غشا یا نزدیکی آن است) قرار می‌گیرد. به دنبال آن تغییرات کانفورماسیونی اتفاق می‌افتد که منجر به الحاق پوشش ویروس و غشای سیتوپلاسمی می‌شوند و ژنگان ویروس به طور مستقیم در سیتوپلاسم آزاد می‌شود (ورود پیش‌رس)<sup>۳</sup>. اینکه چگونه این فرایندهای برشی امکان الحاق غشایی را فراهم می‌کند به این صورت است که پس از اتصال زیرواحد S1 به گیرنده مربوطه و بریده شدن جایگاه های برشی پروتئین، زیر واحد S1 جدا می‌شود. در نتیجه محدودیت های تحمیل شده بر روی زیرواحد S2 به عنوان ماشین الحاق غشایی، برداشته و ساختاری باز ایجاد می‌شود. زیرواحد S2 در این حالت یک ساختار دمبلی شکل<sup>۴</sup> می‌گیرد که ساختاری میله‌ای شکل<sup>۵</sup> در وسط و کروی شکل<sup>۶</sup> در هر دو انتها دیده می‌شود و ایجاد این ساختار باعث الحاق غشایی می‌شود. ساختار میله‌ای شکل ساختاری از دسته مارپیچ شش تایی<sup>۷</sup> دارد که توسط بخش‌های HR1 و HR2 تشکیل شده است، در حالی که ساختار کروی شکل تشکیل شده در هر دو انتها مربوط به ناحیه انتهای N تا HR1 پپتید الحاق در این ناحیه است و ناحیه بین بخش‌های HR1 و HR2 زیرواحد S2 است. سه تا پپتید الحاق که از انتهای N تا HR1 قرار دارند و قبلاً در کانفورماسیون پیش الحاق پروتئین S مدفون بودند به خاطر برش در جایگاه S2 در کانفورماسیون پس الحاق پروتئین S در معرض قرار گرفته و به هم متصل می‌شوند و در غشا جای می‌گیرند (تصویر ۱-۵) [۴۹-۵۱].

<sup>1</sup> Amino Peptidase N; APN

<sup>2</sup> dipeptidyl peptidase 4; DPP4

<sup>3</sup> Early entry

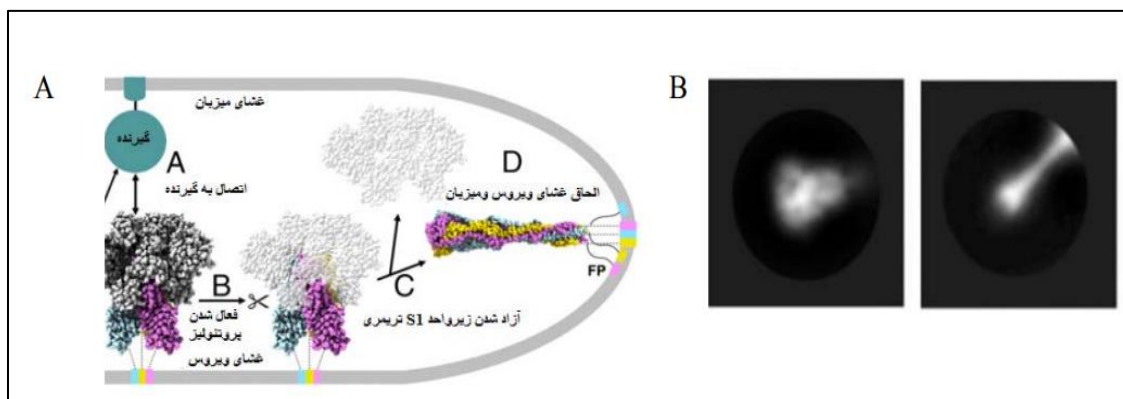
<sup>4</sup> Structure dumbbell-shaped

<sup>5</sup> Rod-like structure

<sup>6</sup> Globular structure

<sup>7</sup> Six helix -bundle



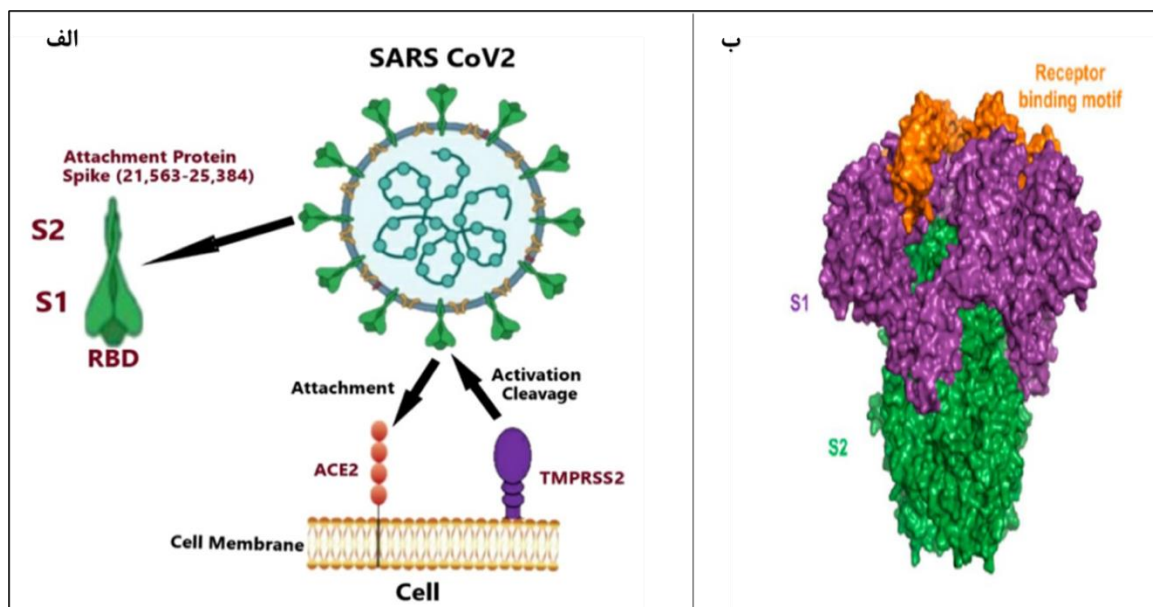


تصویر ۱-۵. الف) مدل پیشنهاد شده برای ورود کروناویروس‌ها، پس از اتصال زیر واحد S1 به گیرنده مربوطه و بریده شدن جایگاههای برشی پروتئین، زیر واحد S1 جدا می‌شود و این فرایند باعث تغییر ساختار زیر واحد S2 می‌گردد که این تغییر عامل کلیدی الحاق غشایی است. ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی از حالت پیش‌الحاق و پس‌الحاق از سارس کوو

به طور کلی RBD با ACE2 ایجاد یک کمپلکس می‌نماید. در فرایند میانکنش RBD با گیرنده، RBD به انتهای آمینی پروتئیناز ACE2 متصل شده و باعث اتصال حلقه اصلی RBD به ACE2 می‌شود و بدین ترتیب اتصال کامل ایجاد می‌گردد. به این ناحیه RBM (اسید آمینه ۴۹۶-۴۲۴) گفته می‌شود [۵۲]. ناحیه RBM غنی از تیروزین است. از بین ۱۴ رزیدو از RBM که در تماس مستقیم با ACE2 هستند، ۶ اسید آمینه تیروزین است که دارای گروه هیدروکسیل و حلقه هیدروفوبی است. ناحیه RBD دارای چند رزیدوی سیستئینی است که توسط پیوندهای دی سولفیدی بهم متصل شده‌اند. دو رزیدوی ویژه در جایگاه ۴۷۹ و ۴۸۷ پیشرفت بیماری سارس کوو را تعیین می‌کند. تغییر حتی یک رزیدو در RBD که مسئول اتصال به دومین پپتیداز ACE2 است باعث افزایش تمایل اتصال ACE2 انسانی سارس کوو ها از حیوانات شامل خفاش، موش، رت و تسهیل در انتقال آن می‌شود. در حالی که زیر واحد S2 که بخش غشایی پروتئین S است، ماشین الحاق غشایی S2 برای الحاق غشا ویروس با غشای میزبان را تشکیل می‌دهد و شامل چند بخش از جمله: پروتئین همجوشی<sup>۱</sup> (FP)، تکرار هپتاد<sup>۲</sup> ۱ و ۲ (HR) می‌باشد (تصویر ۱-۶). اتصال RBD به گیرنده ACE2 تغییرات ساختاری S2 را تحریک می‌کند. که نقشی اساسی در مونتاژ و ورود (درهم آمیختگی بین پوشش لیپیدی ویروسی و غشای سلول میزبان) ویروس دارد [۵۳، ۵۴]. مطالعات درباره جهش در توالی RBD نشان داده اسپارژین ۵۰۱ جهش ندارد و با اتصال به تیروزین ۴۱ توسط پیوند هیدروژنی سبب پایداری اتصال RBD به گیرنده hACE2 می‌شود و این ناحیه به دلیل حالت‌های چندگانه اتصال از عملکرد پیچیده‌ای برخوردار است. در کنار این‌ها، مطالعات نشان دادند جهش‌های اسپارژین ۴۷۹، ترئونین ۴۸۷، لوسین ۴۵۵ آلانین، فنیل آلانین ۴۵۶ آلانین، گلوتامین ۴۹۳ آلانین، سبب اتصال ضعیف به گیرنده hACE2 خواهند شد [۵۵، ۵۶].

<sup>1</sup> Fusion Peptide; **FP**

<sup>2</sup> Heptad Repeat; **HR**



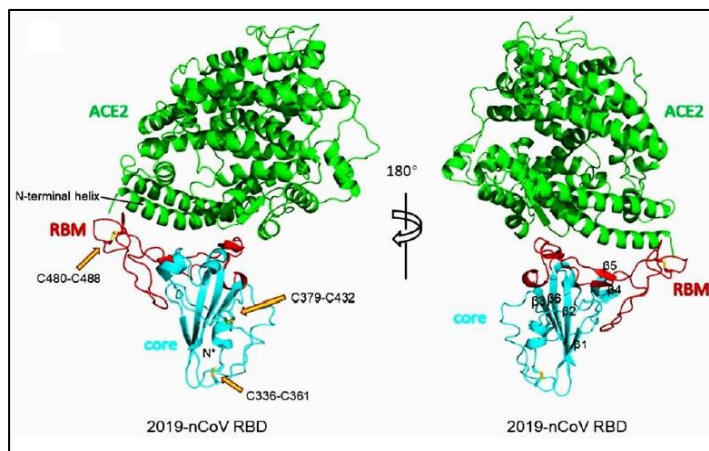
تصویر ۱-۶. الف) ساز و کار مولکولی واکنش پروتئین S سارس کوو ۲ با گیرنده ACE2 به کمک TMPRSS2 (ب) تصویری شماتیک از دو زیر واحد ساختاری پروتئین سطحی سنبله در ویروس کرونا عامل بیماری سارس و سارس-کوو ۲ که به رنگ سبز و بنفش نمایش داده شده است. موتیف اتصالی به گیرنده به صورت زرد رنگ نشان داده شده است.

## ۸-۱. گیرنده ACE2

ACE2 یک متالوپروتئاز روی است که در سیستم آنژیوتانسین نقش دارد. در بدن ابتدا پیش ساز هورمون یعنی آنژیوتانسینوژن توسط کبد ساخته و در خون آزاد می‌شود. پروتئین آنژیوتانسینوژن توسط هورمون رنین به آنژیوتانسین یک، تبدیل می‌شود و آنژیوتانسین ۱، توسط آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) در ریه به آنژیوتانسین ۲ تبدیل می‌شود که هم یک عامل قوی انقباض عروقی است و هم از راهکارهای مختلف موجب احتباس آب و سدیم می‌شود. بنابراین عملکرد نهایی هورمون آنژیوتانسین ۲ افزایش فشار خون است. آنزیم ACE2 که به سطح بیرونی (غشاء خارجی) سلولهای ریه‌ها، رگهای خونی، قلب، کلیه‌ها و روده متصل می‌شود از طریق تجزیه و تبدیل آنژیوتانسین ۲ به آنژیوتانسین ۱-۷ موجب کاهش فشار خون میگردد. نوع انسانی این آنزیم را به اختصار hACE2 می‌نامند [۵۷]. آنزیم ACE2 یک پروتئین تک گذر غشایی با فعالیت کربوکسی پپتیداز است، دومین فعال آن در سطح سلولهای ریه و سایر بافتها آشکار است. دومین خارج سلولی ACE2، می‌تواند توسط آنزیم دیگری به نام شداز<sup>۱</sup> که نوعی آنزیم تجزیه کننده است از دومین تراغشایی آن تجزیه و جدا شده و پروتئین حاصل که محلول در آب است، به خون می‌ریزد و از طریق ادرار دفع می‌شود [۵۸]. همانطور که قبلا اشاره شد دومین خارجی آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۲، نقطه ورود برخی از انواع ویروس کروناها نظیر سارس کوو-۲، سارس کوو و HCoV-NL63 به سلولهای بدن است، تصویر ۱-۷ چگونگی اتصال دومین خارجی ACE2 با

<sup>۱</sup> Sheddase

دومین RBD پروتئین S را نشان می‌دهد. گمان می‌رود که کاهش سطح آنزیم ACE2 در سلول، در نبرد با عفونت ویروسی کمک کننده باشد. اما از طرفی دیگر، وجود آنزیم ACE2 با افزایش دادن سطح ماده گشادکننده، سلولهای ریوی را از آسیب ناشی از این ویروس، محافظت می‌کند. علاوه بر اینها، بر اساس مطالعات انجام شده بر روی موش‌ها، تعامل خارهای روی ویروس با آنزیم ACE2 سبب می‌شود که سطح این آنزیم در سلول افت کند و آسیب وارده به ریه‌ها بیشتر شود [۵۹]. مطالعه بر روی بیماران مبتلا به بیماری کووید-۱۹ یافته‌های جالبی را در ارتباط با آنزیم ACE2 نشان داده است. برای مثال این مطالعات نشان داده است که بیان گیرنده ACE2 در سلولهای ریه با افزایش سن زیاد می‌شود که این امر می‌تواند توجیهی بر عدم ابتلای جدی کودکان به بیماری کرونا و ابتلای شدید افراد مسن به این بیماری باشد. مطالعات مولکولی نشان داده است که دومین RBD پروتئین S این ویروس‌ها در گونه‌های مختلف با اسیدهای آمینه مختلفی به گیرنده ACE2 متصل می‌شوند. برای مثال ویروس سارس کوو-۲ در ناحیه RBD به کمک اسیدهای آمینه لوسین ۴۵۵، فنیل آلانین ۴۸۶، گلوتامین ۴۹۳، سرین ۴۹۴، اسپارژین ۵۰۱، تیروزین ۵۰۵ به گیرنده ACE2 سلول انسانی متصل می‌شود و در این اتصال اسید آمینه لیزین ۳۱ در گیرنده ACE2 انسان نقش مهمی داشته و به گلوتامین ۴۹۳ پروتئین S متصل می‌شود [۵۹].



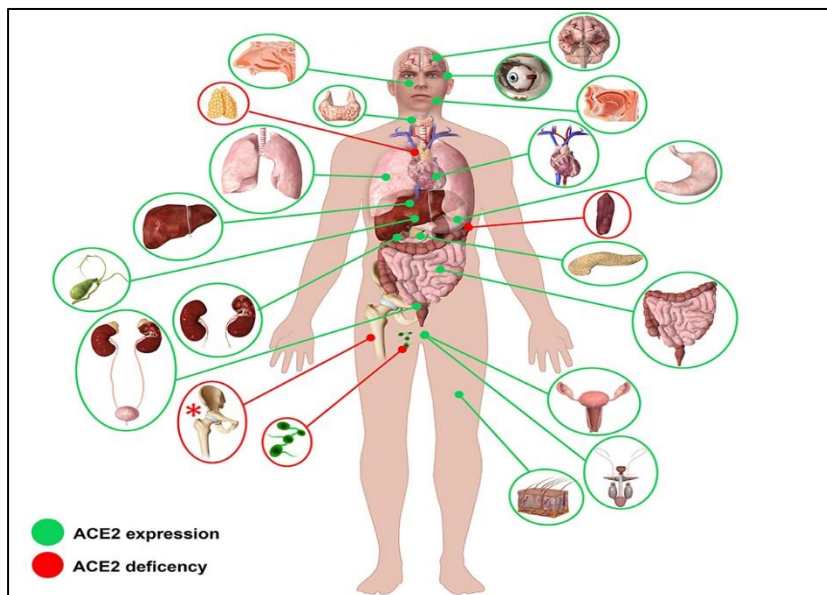
تصویر ۱-۷. اتصال دومین RBD پروتئین S ویروس سارس کوو-۲ توسط موتیف RBM (قرمز) به دومین خارج سلولی آنزیم ACE2

گیرنده‌های سلولی برای برخی از HCoVها از آنزیم‌های سطح سلولی از جمله آمینوپپتیداز (APN)N برای کروناویروس HCoV 229E، آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۲ (ACE2) برای کروناویروسهای HCoV-NL63 و سارس کوو و آنزیم دی پپتیدیل پپتیداز ۴ (DPP4) برای کروناویروس مرس است. ویروس سارس کوو-۲ هم مشابه ویروس سارس کوو برای ورود به سلول میزبان از ACE2 به عنوان گیرنده سلولی استفاده می‌کند [۵۹].

ACE2 یک مولکول سطحی است که بیانگر یک مسیر بالقوه در سیستم گوارش و سیستم تنفسی برای ویروس سارس کوو-۲ است. ACE2 که در دستگاه تنفسی تحتانی انسان یافت می‌شود، به عنوان گیرنده سلولی برای سارس کوو-۲ شناخته می‌شود و تنظیم انتقال گونه های متقابل و انسان به انسان را برعهده دارد [۶۰].

ACE2 در سلول های اپی تلیال ریه و قلب به مقدار زیاد و در کلیه، رگ های خونی و روده نیز بیان می‌گردد. نشان داده شده است که ۸۳٪ از بیان پروتئین ACE2 در سلول های آلوئولار اپی تلیال تیپ ۲ است که پیشنهاد می‌کند این سلول ها به عنوان میزبان برای تهاجم ویروسی هستند که گیرنده هایی با تمایل بالا بوده و هم انتقال دهنده برای ورود ویروس ها به ریه می باشد. ریه ها از ارگان های اصلی هستند که به وسیله کووید-۱۹ تحت تاثیر قرار می گیرند. اما اندامهای دیگری چون سیستم عصبی مرکزی، کلیه، کبد، روده، معده و قلب هم می‌توانند تحت تاثیر قرار بگیرند. گزارش شده که گیرنده های مغز، ACE2 را بیان می‌کنند که بر روی سلولهای گلیال و نورون‌ها شناسایی شده اند که آنها را هدف بالقوه ای برای کووید-۱۹ می‌کند [۶۰].

مطالعات گذشته توانایی سارس کوو را برای ایجاد مرگ در نورون های موش ها نشان داده اند. علاوه بر این سارس کوو-۲ با صدمات قلبی نیز در ارتباط است بیماری عروق مغزی، انسداد مزمن ریوی، بیماری قلبی عروقی، فشارخون بالا، دیابت قندی، بدخیمی از ریسک فاکتورهای مهم کووید-۱۹ هستند و یافته ها به نقش اساسی این چند ابتلایی (کوموربیدیتی ها)<sup>۱</sup> در بیماری کووید-۱۹ تاکید می‌کنند [۶۱]. در تصویر ۱-۸ اندام های بیان کننده ACE2 نشان داده شده است.



تصویر ۱-۸. نمایش اندام های بیان کننده ACE2

<sup>1</sup> Comorbidity

## ۹-۱. طوفان سایتوکایینی<sup>۱</sup>

وقتی ویروس به گیرنده ACE2 متصل می‌شود باعث کاهش بیان ACE2 و افزایش تولید AT2<sup>۲</sup> می‌شود. این گیرنده روی طیف گسترده‌ای از سلول‌های بدن به خصوص پنوموسیت‌های ریه و سلول‌های اپی‌تلیال مجاری هوایی بیان می‌شوند [۵۳]. AT2 باعث افزایش نفوذپذیری عروق ریه شده و متعاقب این نفوذپذیری، ریه دچار تورم<sup>۳</sup> و آسیب می‌شود [۵۳].

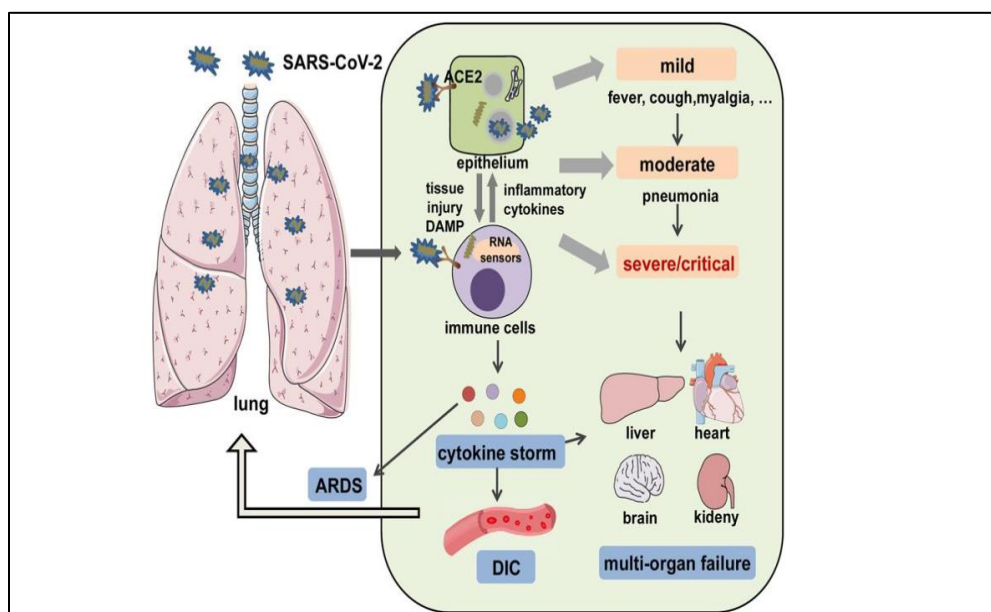
با ورود ویروس به سلول میزبان و تکثیر آن‌ها، پنوموسیت‌ها و آلوئول‌ها، آسیب دیده و متعاقب این آسیب تولید سورفاکتانت و تبادل گاز در ریه با مشکل مواجه می‌شود. علاوه بر این، ویروس با آلوده کردن سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن و سلول‌های دندریتیک میزبان باعث فعال شدن ماکروفاژها و دیگر سلول‌های سیستم ایمنی شده و یک واکنش شدید ایمنی در بدن ایجاد می‌شود. در نتیجه آن سایتوکاین‌های پیش التهابی (IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-8, IL-33, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) و کموکاین (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10) در حجم وسیع ترشح می‌شوند و سبب طوفان سایتوکایینی می‌گردد [۶۲]. این واسطه‌های التهابی باعث فراخوانی سلول‌های سیستم ایمنی به خصوص نوتروفیل به بافت ریه می‌شوند. ماکروفاژهای ریوی، اپی‌تلیوم مجاری هوایی و سلول‌های دندریتیک عناصر سلولی و کلیدی دفاع ذاتی میزبان در برابر عفونت‌های تنفسی هستند. در حالی که ماکروفاژهای ریوی در سطح اپیتلیال مجرا قرار دارند، سلول‌های دندریتیک به وفور در زیر اپی‌تلیوم قرار دارند. این مکان‌های استراتژیک سلول‌ها در مجاری هوایی، نقش این سلول‌ها را در بیماری‌زایی ویروس، مشخص می‌سازد [۶۲].

به محض فراخوانی سلول‌هایی مثل نوتروفیل و ماکروفاژ به محل آسیب، این سلول‌ها شروع به تولید آنزیم و مواد ترشحی کرده، که سبب آسیب لایه‌های زیرین سلول‌های اپی‌تلیال و سلول‌های اندوتلیال می‌شود. با آسیب اندوتلیال سیستم‌های انعقادی و پلاکت فعال شده و با مصرف فاکتورهای انعقادی و پلاکت‌ها، واکنش انعقاد منتشره درون عروقی رخ داده و خون‌رسانی به بافت‌های دورتر مثل کلیه و کبد کاهش می‌یابد. به همین دلیل در فرم‌های شدید بیماری شاهد نقص چند ارگانی مثل اختلال در کلیه، کبد و... هستیم [۱۲۹-۱۳۱].

<sup>1</sup> cytokine storm

<sup>2</sup> Angiotensin2; AT2

<sup>3</sup> Edem



تصویر ۱-۹. تظاهرات بالینی سیستمیک سارس کوو-۲. ویروس سلولهای اپیتلیال مجاری هوایی یا سلولهای ایمنی را از طریق اتصال به گیرنده‌های ACE2 آلوده می‌کند و باعث آسیب بافتی و آزاد شدن الگوهای مولکولی مرتب با آسیب (DAMPs) و همچنین تولید سایتوکین‌های التهابی توسط سلولهای اپیتلیال و سلولهای ایمنی می‌شود. آسیب وارد شده به سلولهای اپیتلیال و سلولهای ایمنی منجر به طیف گسترده‌ای از تظاهرات بالینی، از اشکال خفیف (مانند تب، سرفه و میالژی) تا اشکال متوسط که نیاز به بستری شدن در بیمارستان دارند (پنومونی و التهاب موضعی) منجر می‌شود؛ در فرمهای شدید بیماری به صورت ذات‌الریه، DIC<sup>۱</sup>، ARDS و نارسایی چند عضوی ظاهر می‌شود.

## ۱-۱۰. ایمونولوژی ویروس

### ۱-۱۰-۱. مروری بر سیستم ایمنی ذاتی

ورود ویروس به سلول‌هایی مانند اپیتلیوم مجاری هوایی، پنوموسیت‌ها و انتروسیت‌های روده منجر به تکثیر ویروسی، تخریب سلول‌های آلوده و تحریک پاسخ‌های ایمنی ذاتی می‌شود. این فرآیندها در اوایل دوره نهفتگی سارس کوو-۲ تقریباً ۵ روز طول می‌کشد.

<sup>1</sup> Disseminated Intravascular Coagulation; DIC

ژنوم سارس کوو-۲ در ابتدا توسط سلول‌های میزبان از طریق گیرنده‌های شناساگر الگو (PRRs) مثل TLRهای (۳،۷،۸،۹)، NLR<sup>۳</sup> ها به خصوص NLRP3<sup>۴</sup>، MDA5<sup>۵</sup> و RIG1<sup>۶</sup> شناسایی می‌شود. گیرنده‌های Toll مانند TLR 7 و TLR 8 و RNA، تک رشته‌ای را شناسایی می‌کنند و TLR3.RNA دو رشته‌ای را شناسایی می‌کند. TLRها باعث افزایش رونویسی ژن‌های IRF<sup>۷</sup> و NF-κB<sup>۸</sup> و تولید اینترفرون‌های ضد ویروسی می‌شوند. پیام‌رسانی TLRها از طرف دیگر باعث افزایش بیشتر بیان ژن خانواده NLRها به خصوص NLRP3 می‌شود. NLRP3 در نوعی مرگ سلولی که پایروپتوزیس<sup>۹</sup> نام دارد؛ دخالت دارد [۶۳].

NLRP3 به همراه کلسیم داخل سلولی، گونه‌های فعال اکسیژن و سایر پروتئین‌ها، کمپلکس اینفلامازوم<sup>۱۰</sup> تشکیل داده و کاسپاز ۱<sup>۱۱</sup> را فعال می‌کنند. کاسپاز ۱ با اثر بر سایتوکاین‌های پیش‌التهابی pro IL-18 و pro IL-1β باعث فعال شدن آن‌ها و تبدیلیشان به IL-18 و IL-1β می‌شود. این مدیاتورها در نهایت به واسطه منفذ گاسدرمین D به بیرون نشت پیدا می‌کنند (تصویر ۱-۱۰) [۶۳].

---

<sup>1</sup> Pattern recognition receptors; **PRRs**

<sup>2</sup> Toll-like receptors; **TLR**

<sup>3</sup> NOD-like receptors; **NLR**

<sup>4</sup> NACHT, LRR, and PYD domains containing protein 3; **NLRP3**

<sup>5</sup> Melanoma differentiation-associated protein5; **MDA**

<sup>6</sup> Retinoic acid- inducible gene 1; **RIG1**

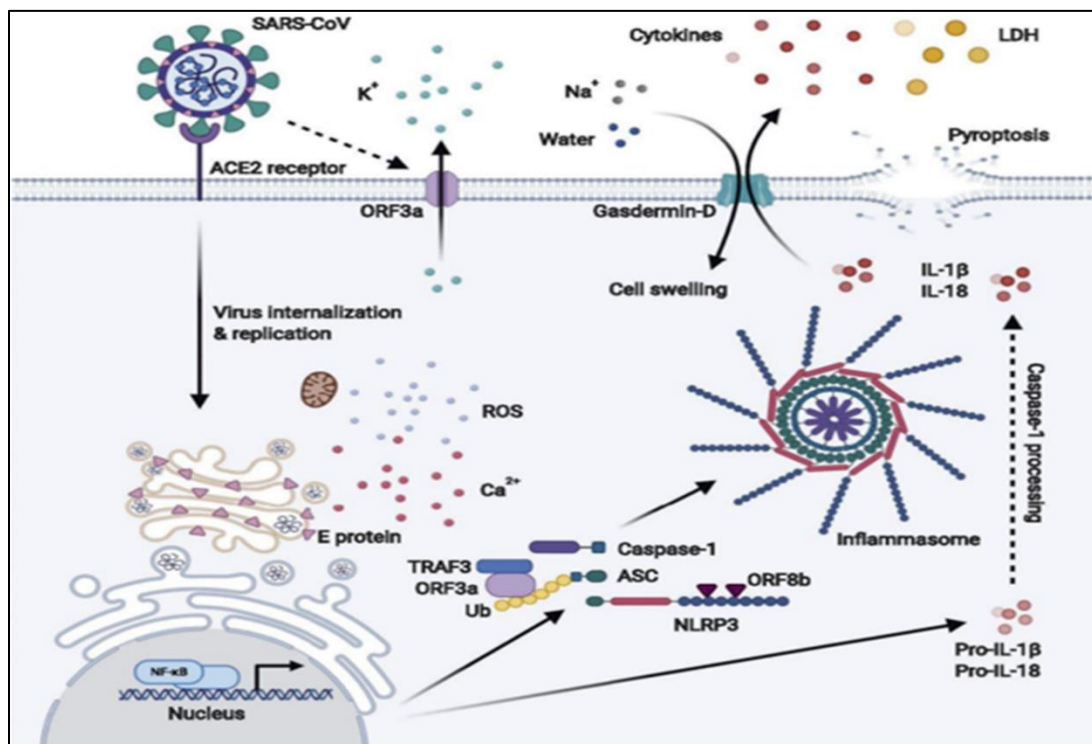
<sup>7</sup> Interferon-regulatory factors; **IRF**

<sup>8</sup> Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; **NF-κB**

<sup>9</sup> Pyroptosis

<sup>10</sup> Inflammasome

<sup>11</sup> Caspase-1



تصویر ۱-۱۰. فعال شدن التهاب NLRP3 توسط سارس کوو. پروتئین SARS-CoV E باعث نشت یون کلسیم ذخیره شده در گلژی به سیتوزول می‌شود؛ در حالی که ORF3a جریان یون پتاسیم را از غشای پلاسمایی به فضاهای خارج سلولی القا می‌کند. این عدم تعادل در غلظت یونی درون سلولها و ROS حاصله که توسط میتوکندریهای آسیب دیده ایجاد می‌شود، باعث فعالسازی التهاب NLRP3 می‌شود. علاوه بر القای جریان یون پتاسیم، ORF3a باعث سرهمبندی و یوبی کوییتینه شدن ASC به واسطه TRAF3 میشود. ORF8b به طور مستقیم برای تحریک و فعال شدن مستقل NLRP3 از کانال یونی عمل می‌کند. فعال شدن این التهاب باعث ایجاد منافذ گاسدرمین D بر روی غشای سلولی می‌شود و باعث ترشح IL-1 $\beta$  و IL-18 و هجوم مولکولهای آب شده که منجر به تورم و پارگی سلول و در نهایت پایروپتوز می‌شود.

پایروپتوزیس التهاب گسترده‌ای در بدن ایجاد می‌کند و حتی می‌تواند مسیرهای منتهی به DIC و کوآگولوپاتی را تسهیل کند. مسیرهای پیام آور MyD88 و NF- $\kappa$ B، که منجر به تولید IFN های نوع I و سایتوکین‌های پیش‌التهابی می‌شوند (IL-6، TNF- $\alpha$  و IL-1 $\beta$ ) نیز فعال شده و با افزایش سطوح این سایتوکاین‌ها، سلول‌های میزبان آسیب می‌بینند. طی این آسیب‌ها، الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب<sup>۱</sup> (DAMPs) مانند ATP، DNA، محتویات سلول، سیتوپلاسم و فسفولیپیدهای اکسید شده که برای سیستم ایمنی ناشناخته‌اند، آزاد می‌شوند. این مواد به نوبه خود لوپ التهاب را تقویت می‌کنند [۶۴]. سلول‌های ایمنی ذاتی از جمله مونوسیت‌ها و DC<sup>۲</sup> های فعال شده به واسطه آنتی‌ژن‌های ویروس، در نهایت به عدد لنفاوی مهاجرت می‌کنند. با عرضه آنتی‌ژن به سلول‌های ایمنی اکتسابی و واکنش‌های مراکز زایگر<sup>۳</sup>، سلول‌های T و B را برای درگیری با ویروس آماده می‌کنند [۶۴].

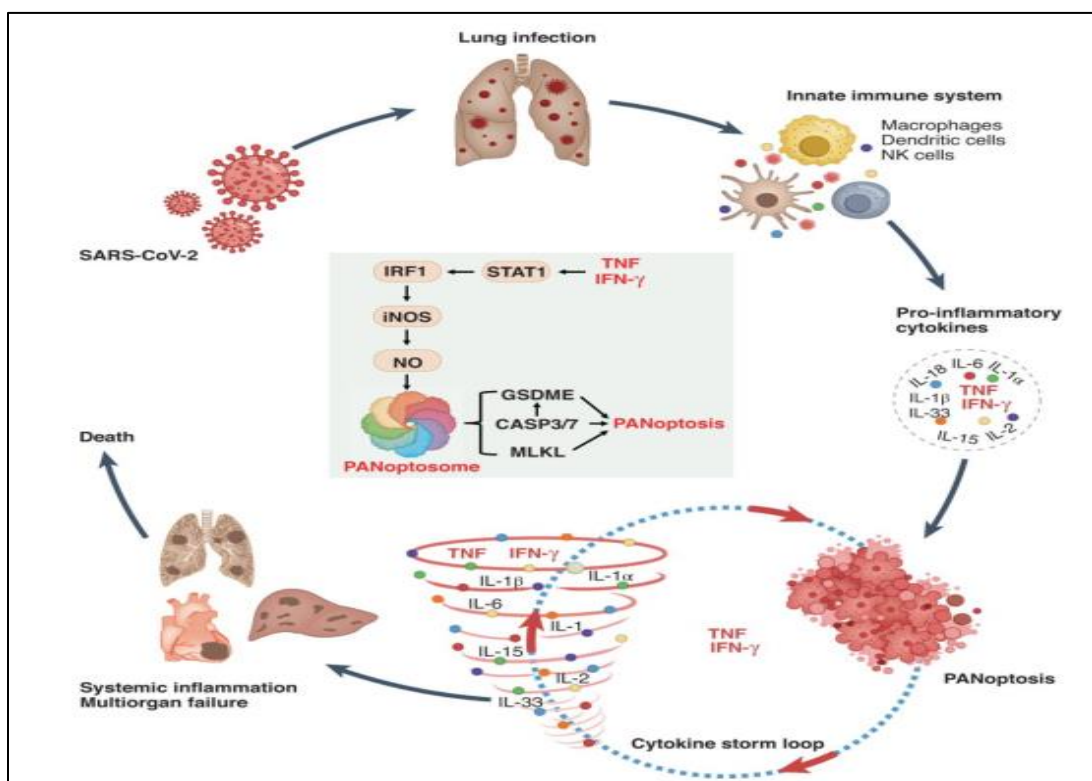
<sup>1</sup> Damage – associated molecular patterns; DAMPs

<sup>2</sup> Dendritic Cells; DC

<sup>3</sup> Germinal center



نوع دیگری از مرگ سلولی که در عفونت سارس کوو-۲ دخالت دارد پانوپتوزیس می‌باشد. همان طور که گفته شد پیام‌ها و پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی در پاسخ به سارس کوو-۲ باعث تولید فراوان سایتوکاین‌های پیش‌التهابی می‌شود. به واسطه اثر هم افزایی  $TNF-\alpha$  و  $IFN-\gamma$  و متعاقب آن فعال شدن پیام‌رسانی  $STAT1$ <sup>۱</sup> و  $IRF1$ <sup>۲</sup>، کاسپاز ۸ فعال شده و باعث القای نوعی مرگ سلولی وابسته به التهاب به نام پانوپتوزیس می‌شوند که این نوع مرگ سلولی به واسطه کمپلکس پروتئینی پانوپتوزوم ایجاد می‌شود. به واسطه این نوع مرگ سلولی لوپ التهاب و تولید سایتوکاین‌های مخرب و اضافی به شدت تقویت شده و در نهایت منجر به التهاب سیستمیک، نقص چند ارگانی و مرگ می‌شود (تصویر ۱-۱۱). [۶۴].



تصویر ۱-۱۱. اثر هم افزایی  $TNF$ ،  $IFN\gamma$  و  $IFN\gamma$  و  $TNF-\alpha$  اثر هم افزایی  $IFN-\gamma$  و  $TNF-\alpha$  و متعاقب آن فعال شدن پیام‌رسانی  $STAT1$ <sup>۳</sup> و  $IRF1$ <sup>۴</sup>، کاسپاز ۸ فعال شده و باعث القای پانوپتوزیس می‌شوند. به واسطه این نوع مرگ سلولی لوپ التهاب و تولید سایتوکاین‌های مخرب و اضافی به شدت تقویت شده و در نهایت منجر به التهاب سیستمیک، نقص چند ارگانی و مرگ می‌شود.

<sup>۱</sup> Signal Transducer and Activator of Transcription 1; **STAT**

<sup>۲</sup> Interferon Regulatory Factor 1; **IRF**

<sup>۳</sup> Signal Transducer and Activator of Transcription 1; **STAT**

<sup>۴</sup> Interferon Regulatory Factor 1; **IRF**

اتفاقی که در کووید می‌افتد این است که اینترفرون‌های تیپ ۱ که ضد ویروس هستند دیر ترشح می‌شوند و یا این که تولیدشان دچار اختلال می‌شود. این موضوع سبب ایجاد فرصت تکثیر و گسترش ویروس و تشدید بیماری می‌گردد [۶۵].

## ۱-۱-۱-۱. اختلال در تنظیم سیستم ایمنی مرتبط با عفونت سارس کوو-۲ شدید (ایمنی

### ذاتی

پس از دوره نهفتگی ویروس، در بیشتر موارد، یک فرد جوان سالم با این پاسخ‌های ایمنی هماهنگ، ویروس را پاکسازی می‌کند. با این حال، علائم بیمار می‌تواند بسیار متفاوت باشد، از بدون علامت تا شدید، که فرم‌های شدید در بزرگسالان مسن شایع‌تر است. بیماران مبتلا به فرم‌های شدید سطوح بالاتری از سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها را در گردش خون دارند و این واسطه‌ها سبب کاهش پیش‌آگهی بیماری می‌شوند؛ که به صورت عارضه‌های پنومونی، طوفان سیتوکاینی،<sup>۱</sup> ARDS، سپسیس<sup>۲</sup> و کواگولوپاتی<sup>۳</sup> خود را نشان می‌دهد. ARDS یک عارضه شدید و اغلب کشنده بیماری است. در بررسی‌های بالینی بیماری، نارسایی حاد تنفسی، هیپوکسمی، ارتشاح دو طرفه ریه در تصویربرداری قفسه سینه مشاهده می‌شود. بسیاری از بیماران مبتلا به فرم شدید نیز به پنومونی باکتریایی، که یک عفونت باکتریایی ثانویه ریه است، مبتلا می‌شوند. این عفونت‌های باکتریایی پاسخ‌های پیش‌التهابی را تقویت می‌کنند که طوفان سایتوکاین، التهاب سیستمیک و ARDS را تشدید می‌کند [۶۶]. یکی از دلایل تشدید بیماری در بعضی از افراد نقص تولید اینترفرون‌های ضد ویروسی به خصوص اینترفرون‌های-تیپ I می‌باشد. کاهش پاسخ‌های اینترفرون نوع I در انسان تا حدی با کاهش تعداد دندریتیک‌های پلاسماسیتوئیدی<sup>۴</sup> (pDCs) که یک سلول تولیدکننده قوی اینترفرون آلفا است، مرتبط بوده و در موارد شدید بیماری نیز گزارش شده است [۶۵].

## ۱-۱-۲. مروری بر سیستم ایمنی اکتسابی

نقش ایمنی اکتسابی در کنترل عفونت سارس کوو-۲ یکی از موضوعات بسیار مهم می‌باشد؛ زیرا ایجاد یک حافظه ایمنی قوی هدف اصلی تولید واکنش‌های فعلی است. ایمنی اکتسابی توسط سه جمعیت وسیع از لنفوسیت ایجاد می‌شود: سلول‌های B، سلول‌های CD4<sup>+</sup> T و سلول‌های CD8<sup>+</sup> T.

سلول‌های B مسئول تولید پادتن‌های ضد ویروسی هستند. سلول‌های CD4<sup>+</sup> T به عنوان سلول‌های کمکی عمل می‌کنند و سایتوکاین‌هایی را برای تقویت پاسخ ایمنی ضد ویروسی تولید می‌کنند و به سلول‌های B در تولید پادتن‌های خنثی‌کننده کمک می‌کنند. سلول‌های CD8<sup>+</sup> T مستقیماً سلول‌های

<sup>1</sup> Acute Respiratory Distress Syndrome; ARDS

<sup>2</sup> Sepsis

<sup>3</sup> Coagulopathy

<sup>4</sup> Plasmacytoid Dendritic Cells; pDCs

آلوده به ویروس را می‌کشند و در عین حال سایتوکاین‌های ضد ویروسی نیز تولید می‌کنند. در مجموع، این سه بازوی ایمنی اکتسابی، در کنترل عفونت‌های ویروسی، از جمله سارس کوو-۲، بسیار حیاتی هستند. با افزایش سن، ایمنی اکتسابی کاهش می‌یابد و سبب فرار سارس کوو-۲ از سیستم ایمنی می‌شود. به همین دلیل افراد مسن بیشتر به فرم‌های شدید بیماری مبتلا می‌شوند [۶۷].

### ۱-۱۰-۲-۱. ایمنی سلولی

#### ۱-۱۰-۲-۱. نقش سلول‌های $CD4^+T$ در عفونت سارس کوو-۲

سلول‌های  $CD4^+T$  توانایی تمایز به انواع مختلفی از سلول‌های کمکی را دارند. سلول‌های  $CD4^+T$  اختصاصی ویروس، معمولاً به سلول‌های  $Th1$  و سلول‌های  $T$  کمکی فولیکولی<sup>۱</sup> (TFH) تمایز پیدا می‌کنند. سلول‌های  $Th1$  از طریق تولید  $IFN-\gamma$  و سایتوکاین‌های مرتبط فعالیت ضد ویروسی دارند. سلول‌های TFH سلول کمکی و عرضه‌کننده تخصصی به سلول‌های B هستند و برای توسعه بیشتر پاسخ‌های پادتن خنثی‌کننده و هم‌چنین تولید سلول‌های B خاطره و ایمنی هومورال طولانی مدت حیاتی هستند سلول‌های TFH<sup>۲</sup> در گردش مخصوص سارس کوو-۲ در طول عفونت حاد تولید می‌شوند [۶۸]. سلول‌های CTFH خاطره علیه سارس کوو-۲ نیز تولید می‌شوند اگر چه تیتراژ پادتن خنثی‌کننده با کاهش شدت بیماری ارتباطی ندارد؛ ولی فراوانی سلول‌های سارس کوو-۲  $cTFH$  با کاهش شدت بیماری مرتبط است. شایان ذکر است، بخش قابل توجهی از CTFH سارس کوو-۲،  $CCR6^+$  هست که در لانه‌گزینی این سلول‌ها در مجاری هوایی و مخاطی دخیل است [۶۹]. سلول‌های  $CD4^+T$  علاوه بر کمک به تولید پاسخ‌های پادتن، به فعال شدن سلول‌های  $CD8^+T$  نیز کمک می‌کنند. اگر چه ساز و کار دقیق ارتباط این سلول با  $CD8^+$  مشخص نیست ولی  $IL-21$ ، سایتوکاین مترشح از سلول TFH، می‌تواند مدیاتور مهم دخیل در تعامل بین سلول‌های  $CD4^+T$  و سلول‌های  $CD8^+$  باشد [۷۰].

#### ۱-۱۰-۲-۲. نقش سلول‌های $CD8^+T$ در عفونت سارس کوو-۲

سلول‌های  $CD8^+T$  برای مقابله با بسیاری از عفونت‌های ویروسی، به دلیل توانایی آن‌ها در کشتن سلول‌های آلوده، حیاتی هستند. در عفونت‌های سارس کوو-۲، وجود سلول‌های  $CD8^+T$  اختصاصی ویروس با تشخیص بهتر بیماری مرتبط است [۶۹، ۷۱].

به طور کلی، سلول‌های  $CD8^+T$  اختصاصی سارس کوو-۲ در گردش نسبت به سلول‌های  $CD4^+T$  کمتر مشاهده می‌شوند. شواهد فعلی به شدت نشان می‌دهد که پاسخ  $Th1$  یک مرحله کلیدی برای کنترل

<sup>1</sup> T follicular helper cells ;TFH

<sup>2</sup> Circulating Tfh Cells

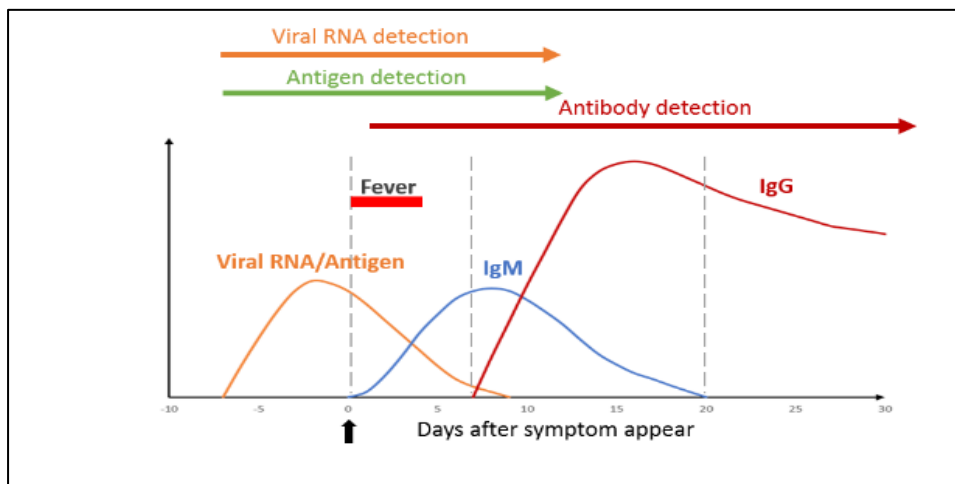
<sup>3</sup> C-C Motif Chemokine Receptor 6; CCR6

موفقیت آمیز سارس کوو و مرس کوو بوده است. احتمالاً این موضوع برای سارس کوو-۲ نیز صادق است. نکته مهم این است که پاسخ سلول CD8+ T با اینکه بسیار مهم می‌باشد، باید به خوبی کنترل شود تا باعث آسیب به ریه نشود. از آنجا که بیشتر اپی توپهای شناسایی شده برای هر دو ویروس بر روی پروتئین‌های ساختاری ویروس متمرکز می‌باشند، نقشه برداری از اپی توپهای سارس کوو با مرس کوو و سارس کوو-۲ مشخص شده در طراحی واکسن احتمالی مفید خواهد بود [۶۹، ۷۱].

### ۱-۱۰-۲-۲. ایمنی هومورال (سلولهای B)

#### ۱-۱۰-۲-۲-۱. نقش سلولهای B و پادتن‌ها در عفونت سارس کوو-۲

پادتن‌های خنثی کننده به سرعت در اکثر افراد مبتلا به سارس کوو-۲، در همان بازه زمانی تبدیل سرمی<sup>۱</sup> ایجاد می‌شوند. پاسخ ایمنی هومورال، به ویژه تولید پادتن خنثی کننده، با محدود کردن عفونت در مرحله بعدی نقش محافظتی را ایفا می‌کند و از بروز عفونت مجدد در آینده جلوگیری می‌نماید. عفونت سارس کوو باعث تغییرات سرمی IgM، حدود ۷-۹ روز پس از شروع بیماری به اوج خود می‌رسد و در بیشتر بیماران به مدت حدوداً ۱۴ روز مشاهده می‌شود. IgG اختصاصی تقریباً از روز ۷ شروع به تولید می‌شود و در روز ۱۴ به بالاترین سطح می‌رسد، اما ماندگاری این نوع پادتن با خاصیت خنثی کننده تا ۲ سال پس از عفونت نیز گزارش شده است (تصویر ۱-۱۲) [۷۲].



تصویر ۱-۱۲. زمانبندی تولید پادتن IgM و IgG بعد از بروز علائم ابتلا به کوید-۱۹. همانطور که مشاهده می‌شود از روز صفر که اولین روز بروز علائم بیماری است IgM شروع به تولید می‌کند و تا روز هفتم به اوج خود می‌رسد و حدوداً تا روز بیستم کاهش پیدا می‌کند. IgG حدوداً در روز هفتم شروع به تولید می‌کند و در روز چهارده به اوج خود می‌رسد اما تیتراژ این نوع پادتن به زودی پایین نمی‌آید و ماندگاری بالاتری دارد.

<sup>۱</sup> Seroconversion

جزئیات سرولوژی محدودی در ارتباط با سارس کوو-۲ ثبت شده است. جالب توجه است که در سرم ۵ بیمار مبتلا به سارس کوو-۲ تا حدودی واکنش متقابل با سارس کوو دیده شده است و این افراد ویروس کرونا دیگری نداشته اند. علاوه بر این، مشاهده شده است که سرم همه بیماران قادر به خنثی کردن سارس کوو-۲ در روش پلاک<sup>۱</sup> در محیط آزمایشگاهی هستند و این اتفاق شروع موفقیت آمیز احتمالی پاسخ هومورال را نشان می‌دهد [۷۲].

## ۲-۲-۱۰-۱. اختلال در تنظیم سیستم ایمنی مرتبط با عفونت سارس کوو-۲ شدید: ایمنی اکتسابی

شدت بیماری سارس کوو-۲ با لنفوپنی مرتبط است و بسیاری از مطالعه‌های ارتباط بین پیامد ضعیف بیماری و کاهش تعداد سلول‌های T در خون را نشان داده‌اند. حتی پیشنهاد شده که درصد لنفوسیت‌های خون بیمار می‌تواند از نظر بالینی به عنوان یک معیار پیش‌آگهی مستقل برای شناسایی فرم‌های خفیف یا شدید بیماری استفاده شود تا پروتکل‌های درمانی اولیه را مشخص کند. عموماً این لنفوپنی برای افراد مسن خطرناک‌تر از جوانان می‌باشد. بسیاری از مطالعه‌ها ارتباط بین تیتراژ پادتن IgG بالا و بیماری شدید را گزارش کرده‌اند؛ اما برخی دیگر هیچ ارتباطی بین تولید پادتن و شدت بیماری نشان نداده‌اند. این نتایج به ظاهر متناقض را احتمالاً می‌توان با نقش دوگانه پادتن‌ها در طول عفونت‌های ویروسی توضیح داد که اگرچه پادتن‌های خنثی‌کننده عموماً برای پاکسازی ویروسی مفید هستند، تولید اولیه یا وجود پادتن‌های غیر خنثی‌کننده از قبل در گردش خون می‌تواند منجر به افزایش ورود و ایجاد یک پاسخ التهابی شدیدی ویروسی با واسطه پادتن شود. این حالت افزایش بیماری وابسته به پادتن نامیده می‌شود. با این حال، در حال حاضر هیچ مدرکی وجود ندارد که از نقش افزایش وابسته به پادتن در طول عفونت سارس کوو-۲ حمایت کند [۷۲].

## ۱۱-۱. گونه‌های مختلف ویروس سارس کوو-۲

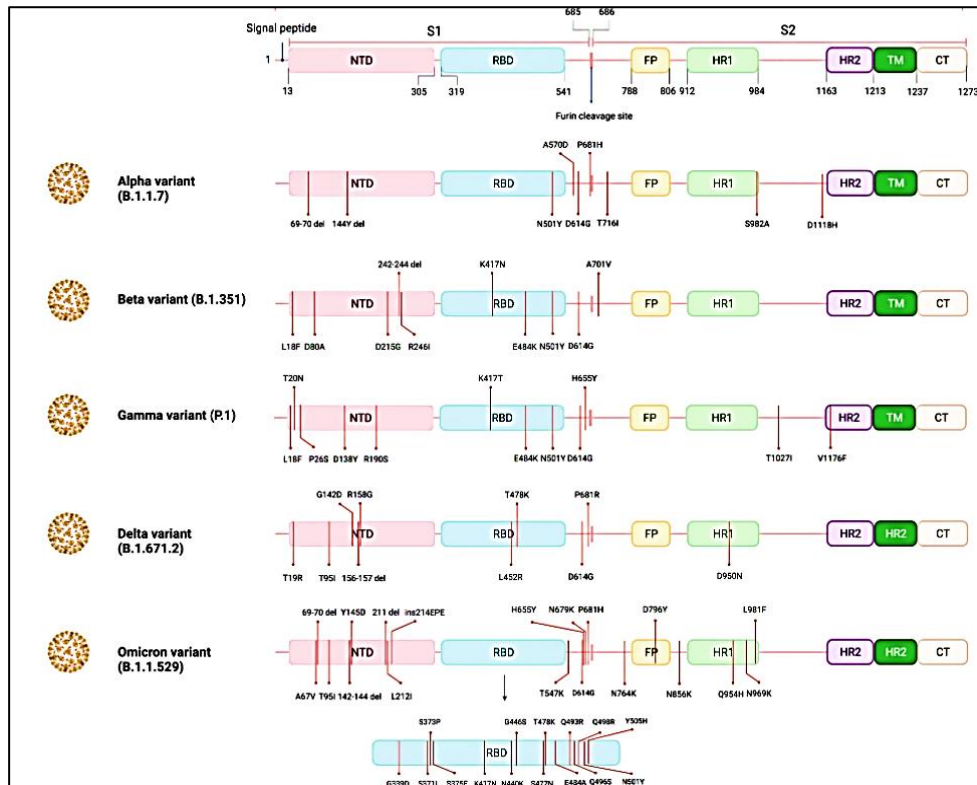
گونه یا واریانت‌های سارس کوو-۲ بر اساس رده و جهش‌های رخ داده، طبقه‌بندی می‌شوند. در نتیجه، ویروس‌های متعلق به جد یکسان، اما حاوی جهش‌های مختلف، می‌توانند در دسته‌های گوناگون طبقه‌بندی شوند. واریانت‌ها سبب افزایش انتقال، شدت بیماری و توانایی فرار از ایمنی هومورال می‌شوند. افزایش قابلیت انتقال با توانایی یک واریانت برای پیشی گرفتن از واریانت‌های دیگر و با افزایش عفونت مجدد در مقایسه با سایر واریانت‌ها نشان داده می‌شود. طی ماه‌های گذشته شاهد ظهور چهار گونه نگران‌کننده سارس کوو-۲ (آلفا، بتا، گاما و دلتا و اخیراً میکرون) بوده‌ایم که با افزایش انتقال، افزایش خطر عفونت مجدد و یا کاهش کارایی واکسن‌ها مرتبط بودند [۷۳، ۷۴].

<sup>1</sup> Plaque assay

- **آلفا [Alpha (B.1.1.7)]**: اولین گونه‌ای که در اواخر دسامبر ۲۰۲۰ در انگلستان (بریتانیا) یافت شد، گونه آلفا بود. گونه آلفا متحمل ۲۳ موتاسیون مختلف، از جمله ۱۴ جهش غیر مترادف<sup>۱</sup>، ۳ حذف و ۶ جهش مترادف می‌شود. به واسطه جهش‌های رخ داده در سنبله سرایت و بیماری‌زایی ویروس نسبت به گونه عادی افزایش پیدا می‌کند [۷۵].
- **بتا Beta (B.1.351.2)**: گونه بتا برای اولین بار در دسامبر ۲۰۲۰ در آفریقای جنوبی گزارش شد. گونه بتا حاوی ۳ جهش در پروتئین سنبله می‌باشد که شامل N501Y, E484K, K417N هستند. این موتاسیون‌ها باعث می‌شوند که ویروس راحت‌تر به سلول میزبان اتصال پیدا کند در نتیجه راحت‌تر سلول را آلوده کند. موتاسیون‌های E484K, N501Y در RBD ویروس رخ می‌دهند. در کنار این موارد گونه بتا متحمل ۵ موتاسیون دیگر از جمله A701, R246I, D215G, D80A, L18F شده که نسبت به موتاسیون‌های قبلی اهمیت کمتری دارند [۷۶-۷۸].
- **گاما [(P.1.2, P.1.1, P.1)] یا (B.1.1.28.1)**: گونه دیگری که باعث بیماری می‌شود، در ژاپن در ژانویه ۲۰۲۱ شناسایی شد. این گونه دارای ۱۷ جایگزینی اسید آمینه است که ۱۰ مورد آن در پروتئین سنبله می‌باشد. سه جهش پروتئین سنبله شامل N501Y, E484K و K417T. P.1، بسیار نگران‌کننده هستند. هم‌چنین این گونه دارای ۲ زیرگونه مختلف AM-1 و AM-2 است، که هر دو دارای جهش‌های K417, N501Y, E484K می‌باشند [۷۷, ۷۹].
- **دلتا [(B.1.617.2)]**: گونه دلتا یا هندی اولین بار در اواخر سال ۲۰۲۰ در هند شناسایی و در ژوئن ۲۰۲۱ به عنوان "گونه نگران‌کننده" اعلام شد. علت آن رخداد موج دوم هند و موج سوم در بریتانیا و آفریقای جنوبی بود. تا جولای ۲۰۲۱ تعداد موارد ابتلا در آسیا، ایالات متحده و استرالیا هم به شدت افزایش یافت. ژنوم B.1.617.2 دارای ۱۳ جهش است که چهار مورد از آن‌ها (P681R, L452R, T478K, D614G) در پروتئین سنبله بوده و نگران‌کننده می‌باشد. جهش D614G ویروس را بسیار مسری کرده و قابلیت انتقال را افزایش داده است [۸۰].
- **امیکرون: Omicron [(B.1.1.529)]**: محققان در آفریقای جنوبی گونه جدیدی را ردیابی کردند که باعث عفونت سارس کوو-۲ می‌شود. این گونه دارای تعداد زیادی از جهش‌های موجود در گونه‌های دیگر از جمله دلتا است که به سرعت در سراسر آفریقای جنوبی و متعاقب آن در جهان گسترش یافت. بررسی‌ها نشان می‌دهند موتاسیون‌هایی که در ORF S و پروتئین سنبله رخ می‌دهند، ویروس را برای ورود به سلول‌های موش به واسطه گیرنده ACE2 بر خلاف سایر گونه‌ها توانا می‌سازند و حتی ویروس می‌تواند از موش دوباره به انسان

<sup>1</sup> Nonsynonymous mutation

منتقل شود. بررسی‌های ژنومیک نشان می‌دهند که موتاسیون‌های رخ داده در موش با موتاسیون‌های رخ داده در انسان هم پوشانی دارند(تصویر ۱-۱۴) [۸۱، ۸۲].



تصویر ۱-۱۴. مقایسه سویه‌های سارس کوو-۲

## ۱۲-۱. دوره نهفتگی و علائم کووید-۱۹

به حداقل زمانی بین مواجهه فرد با ویروس تا ظهور علائم بالینی، دوره کمون یا نهفتگی ویروس گفته میشود. سازمانهای بهداشتی مختلف در دنیا، دوره کمونهای مختلفی را برای بیماری کووید-۱۹ بیان کرده‌اند [۸۳]. به طوری که سازمان بهداشت جهانی عددی بین ۲-۱۰ روز، کمیسیون سلامت ملی چین عددی بین ۱۴-۱۰ روز و مرکز کنترل و پیشگیری بیماری آمریکا عددی بین ۱۴-۲ روز را برای این دوره مشخص کرده‌اند [۸۴]. با این حال نتایج متفاوت دیگری نیز در ارتباط با طول دوره کمون این بیماری گزارش شده است. همچنین در تاریخ ۲۲ فوریه ۲۰۲۰، بیماری با طولانی‌ترین دوره کمون (۲۷ روز) در استان هوبای چین شناسایی شده است [۸۵]. بر این اساس، مدت زمان دوره کمون یا نهفتگی بیماری کووید-۱۹ در بیماران، بسیار متغیر و میانگین آن بیشتر از بیماری سارس است [۸۶]. سارس کوو-۲ به طور کارآمدی در دستگاه تنفسی فوقانی تکثیر می‌کند. افراد آلوده در طول یک دوره مقدماتی، مقادیر زیادی از ویروس را در دستگاه تنفسی فوقانی خود تولید می‌کنند که این امر منجر به انتشار بیشتر این ویروس به سایر افراد می‌شود [۸۷]. عفونت با کروناویروس جدید سارس کوو-۲ در مرحله

مقدماتی با علائم غیراختصاصی و کلی نظیر احساس کسالت، خستگی و بدن درد، تب و سرفه خشک همراه است. به طور کلی شدت بیماری را می‌توان به چهار گروه تقسیم کرد که در جدول (۱-۳) به آن اشاره شده است [۸۸]. مطالعه‌ای که توسط هوآنگ و همکاران روی ۴۱ مورد تأیید شده از عفونت با کروناویروس جدید سارس کوو-۲ بستری در بیمارستان ووهان به انجام رسید، مشخص نمود که تب (۹۸ درصد)، سرفه (۷۶ درصد)، تنگی نفس (۵۵ درصد) و درد عضله و خستگی (۴۴ درصد) به ترتیب شایعترین علائم بالینی این عفونت بودند. به دلیل شباهت‌های بین کروناویروس سارس و سارس کوو-۲ گمانه زنی‌ها در مورد ویرمی (حضور ویروس در خون) و آلودگی بافت‌هایی به غیر از دستگاه تنفسی وجود دارد. همانند عفونت با کروناویروس، نتایج حاصل از اشعه ایکس قفسه سینه و توموگرافی، درگیری دو طرفه ریه را در ۱۱۴ بیمار (۸۱ درصد) از ۱۴۰ بیمار مبتلا به عفونت کروناویروس سارس کوو-۲ نشان داده است. در بین این ۱۴۰ مورد، ۶۱ بیمار (۴۴ درصد) دارای لنفوپنی (کاهش تعداد لنفوسیت‌های خون) بوده و ۵۸ بیمار (۴۱ درصد) دارای افزایش سطح آنزیم‌های آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) یا آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) بالاتر از محدوده مجاز بودند. در بین بیماران که مرتبط با عفونت، سطوح پرو کلسی‌تونین در اکثر افراد طبیعی بوده است. با این حال، سطوح فریتین سرمی و پروتئین واکنشی C انسانی (CRP) به ترتیب در ۶۳ درصد و ۸۶ درصد از بیماران مبتلا به کروناویروس جدید افزایش یافته است. همانند یافته‌های به دست آمده در مورد عفونت کروناویروس سارس سطوح سایتوکاین‌های پیش التهابی پلاسمایی در بیماران مبتلا به کروناویروس سارس کوو-۲ افزایش یافته و این افزایش با شدت بیماری در ارتباط بوده است [۴۳، ۸۹-۹۱].

### جدول ۱-۳. معیارهای شدت بیماری کووید-۱۹ ناشی از ویروس کرونا سارس کوو-۲

مشخصات	شدت بیماری
علائم بالینی خفیف (تب بالای ۳۸ درجه سانتی گراد، همراه با سرفه یا بدون سرفه، نبود تنگی نفس، نفس نزدن، نبود بیماری زمینه ای)، نبود یافته‌های تصویری از ذات الریه	خفیف
تب، علائم تنفسی، یافته‌های تصویری از ذات الریه	متوسط
اگر هر کدام از علائم زیر مشاهده شود: ۱- دیسترس زجر تنفسی نرخ تنفس (RR) بیش از ۳۰ بار در دقیقه ۲- سطح اشباع اکسیژن خون (SPO2) کمتر از ۹۳ درصد در حالت استراحت ۳- نسبت فشار اکسیژن شریانی به درصد اکسیژن دمی (PaO2/Fio2) کمتر از ۳۰۰ میلی متر جیوه	شدید
اگر هر کدام از علائم زیر مشاهده شود: ۱- نارسایی تنفسی نیاز به تهویه مکانیکی یا تنفس مصنوعی ۲- شوک سپتیک ۳- نارسایی ارگانی خارج از ریوی، انتقال به بخش مراقبت جیوه	وخیم

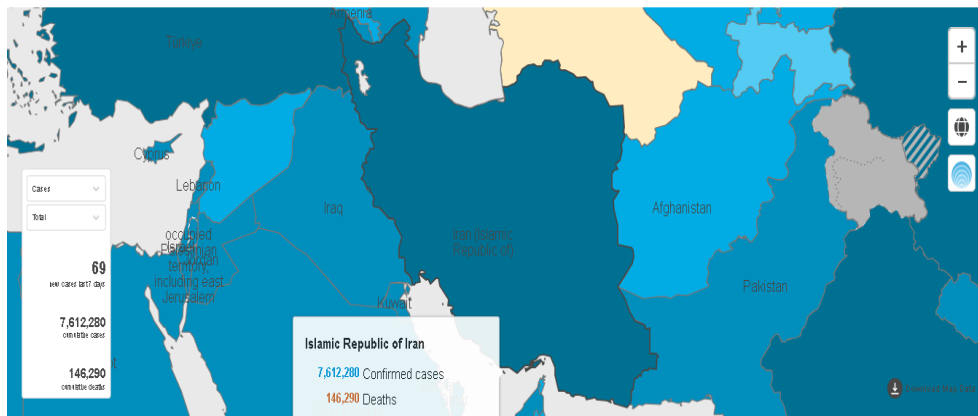


## ۱-۱۳. همه گیری بیماری در جهان

میزان شیوع کووید-۱۹ در جهان به قدری بالا بوده که سازمان بهداشت جهانی آن را یک پاندمی اعلام کرده است و تا تاریخ ششم تیرماه سال ۱۴۰۲ تعداد ۲۰۵ کشور جهان را در بر گرفته است و تا این زمان تعداد ۷۶۸,۱۸۷,۰۹۶ مورد آلودگی قطعی به ویروس و تعداد ۶,۹۴۵,۷۱۴ مورد فوت در اثر ابتلا به این ویروس ثبت شده است [۹۲]. بیشترین تعداد ابتلا مربوط به اروپا با ۲۷۴,۵۶۷,۱۳۶ مورد و کمترین مربوط به آفریقا با ۹,۵۱۴,۹۴۸ مورد ابتلا می باشد. انتقال ویروس ها می توانند تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله شرایط آب و هوایی (مانند دما و رطوبت) تراکم جمعیت و کیفیت مراقبت های بهداشتی قرار گیرند. بنابراین درک رابطه بین آب و هوا و انتقال کووید-۱۹ جهت پیش بینی شدت همه گیری و زمان پایان آن بسیار حائز اهمیت است [۹۳, ۹۴]. مطالعات وسیع در مورد شیوع کووید-۱۹ در خارج از چین صورت گرفته است. در اوایل شیوع بیماری، کشورهای که دمای هوای کمتر و رطوبت نازلتری دارند (مانند کره، ژاپن و ایران) نسبت به کشورهای گرمتر با میزان رطوبت بالاتر (مانند سنگاپور، مالزی و تایلند) شیوع بالاتری داشتند [۹۳]. فاکتورهای اقلیمی مانند دما، رطوبت و سرعت باد می تواند بر پایداری قطرات در محیط و شیوع ویروس تاثیر گذار باشد [۹۵].

### ۱-۱۳-۱. شیوع کووید-۱۹ در کشور ایران

تعداد ابتلای ایرانیان به سارس کوو-۲ بر اساس اعلام سازمان بهداشت جهانی در تاریخ ششم تیر ماه ۱۴۰۲، ۷,۶۱۲,۲۸۰ نفر اعلام شده است که از این تعداد متأسفانه ۱۴۶,۲۹۰ نفر فوت شدند (تصویر ۱-۱۵). الگوی شیوع کووید-۱۹ در کشور ایران به گونه ای است که در تمامی شهرهای کشور پخش شده ولی در شهرهای جنوبی شاهد شیوع کمتر آن در موج اول بوده ایم که این امر به سبب بالا بودن رطوبت هوا به عنوان یک فاکتور محدودکننده شیوع ویروس قابل توجه است که البته با وجود بالا بودن رطوبت در شهرهای شمالی شاهد شیوع بالای این ویروس بودیم.



تصویر ۱-۱۵. آمار ابتلا به کووید-۱۹ در تاریخ ششم تیرماه ۱۴۰۲ توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO)

## ۱-۱۴. مسیرهای انتقال بیماری کووید-۱۹

در دسامبر سال ۲۰۱۹، اولین علایم بالینی از بیماری که به کروناویروس جدید سارس کوو-۲ مبتلا شده بودند تظاهر پیدا کرد. در ابتدا تعداد موارد ابتلا پایین بود، اما در اواسط ژانویه به حداکثر میزان خود تا به آن زمان رسید. در طول نیمه دوم این ماه و به دلیل مسافرت و حرکت جمعیتی قبل از سال جدید چینی (۲۵ ژانویه ۲۰۲۰) افزایش قابل توجهی در تعداد بیماران آلوده در شهرهایی خارج از استان هوبای چین مشاهده گردید [۲۳۰]. به دنبال یک رشد لگاریتمی تا ۲۳ ژانویه ۲۰۲۰ این بیماری به سایر کشورها منتشر شد که در نتیجه توجه گسترده‌ای را در سرتاسر جهان به خود جلب کرد. با مشاهده آلودگی با این ویروس در اعضای خانواده‌ها و همچنین کارکنان بهداشتی و پزشکی، انتقال انسان به انسان این کروناویروس از طریق قطرات تنفسی و اشیای آلوده به تائید رسید [۲۳۱]. تاکنون هیچ شاهد محکمی مبنی بر انتقال داخل رحمی این عفونت وجود ندارد [۲۳۲]. بر طبق نتایج تحقیقات اخیر، مسیر اصلی انتقال این ویروس از طریق استنشاق قطرات تنفسی آلوده، تماس نزدیک (کمتر از ۶ قدم یا کمتر از ۲ متر) با فرد مبتلا یا تماس با ترشحات فرد بیمار می‌باشد. تاکنون انتقال هوابرد<sup>۱</sup> این ویروس به اثبات نرسیده است. قطرات تنفسی آلوده از طریق عطسه یا سرفه فرد مبتلا در محیط منتشر شده و در دهان یا بینی افرادی که در نزدیکی فرد بیمار قرار دارند فرود آمده و سپس به داخل ریه آنها منتقل می‌شود [۲۳۳]. یک مؤلفه بسیار مهم در ارتباط با سرایت ویروس، عدد نرخ تولید مثل (R0) می‌باشد. عدد نرخ تولید مثل برابر با تعداد میانگین افرادی است که از طریق شخص آلوده در معرض خطر ابتلا به بیماری قرار دارند. با این فرض که هیچکدام در برابر ویروس ایمن سازی نشده‌اند. بسته به

<sup>1</sup> Airborne

مقدار  $R_0$  سه احتمال برای شیوع یا کاهش بیماری وجود دارد: الف) وقتی مقدار  $R_0$  کمتر از یک باشد بدان معنی است که عفونت کمتر از یک عفونت مولد را ایجاد می‌کند. در این مواقع این مؤلفه بیانگر این است که بیماری در حال کاهش است. ب) وقتی  $R_0$  مساوی با یک باشد، بدان معنی است که بیماری به ثبات نسبی رسیده است و پ) وقتی این عدد بزرگتر از یک باشد، یعنی بیماری در حال گسترش می‌باشد (جدول ۱-۴) [۲۳۶].

جدول ۱-۴. نرخ مرگ و میر و مقدار  $R_0$  ویروس های نوظهور شناخته شده

مقدار $R_0$	نرخ مرگ و میر (درصد)	ویروس
۱/۴ تا ۶/۴۹	۳/۴	سارس کوو-۲
۲ تا ۵	۹/۶	سارس
کمتر از یک	۳۵/۲	مرس
۲/۳	۷۰	ابولا
۱/۲ تا ۱/۶	۰/۰۳	آنفلوآنزای H1N1 (۲۰۰۹)
کمتر از یک	۴۰	آنفلوآنزای پرنندگان H7N9
۱۸ تا ۱۲	۰/۳	سرخک
۷ تا ۵	۱۷	آبله
۳/۴	۸۰	HIV

## ۱-۱۵. تشخیص کووید-۱۹

از آنجا که قبلاً کروناویروس نوین - ۲۰۱۹ در انسان یافت نشده بود، بنابراین در ابتدا واکسن یا درمان خاصی برای آن ارائه نشده بود. در آن شرایط اضطراری، تعداد موارد به سرعت در حال افزایش بود. بنابراین، تشخیص همه موارد مشکوک در اسرع وقت و جدا کردن سریع آنها، برای قطع منبع عفونت مسئله بسیار مهمی است. تشخیص بیماری کووید-۱۹ متکی به یافته‌های رادیولوژیکی و آزمایشگاهی می‌باشد. مشخصه برجسته تصاویر رادیولوژیکی در بیمارانی که به پنومونی شدید کرونا ویروسی مبتلا شده اند. شامل نمای شیشه مات<sup>۱</sup> و تراکم ریه<sup>۲</sup> است که میتواند هر دو ریه را درگیر می‌نماید. نمونه‌های مورد استفاده جهت انجام تست آزمایشگاهی شامل نمونه‌های سواب از انتهای حفره بینی و حلق (نازوفارنژیال)، خلط یا اسپیره دستگاه تنفسی تحتانی است [۹۶]. تست استاندارد تأییدی تشخیصی معمولاً RT-PCR است که ژنوم ریبونوکلوئیک اسید ویروس را مورد شناسایی قرار می‌دهد. معمولاً ناحیه مورد شناسایی توسط این تکنیک شامل ناحیه ژنومی (RdRp پلیمرز ویروس) به همراه نواحی دیگر نظیر نواحی ژنومی E یا N می‌باشد. تشخیص موارد ابتلا به بیماری کووید-۱۹ از طریق مثبت شدن نتیجه آزمایش تشخیص مولکولی بر روی یکی از نمونه‌های تنفسی اصلی در یکی از آزمایشگاههای

<sup>1</sup> ground glass opacity

<sup>2</sup> consolidation

مرجع کشور است [۹۶]. همچنین بیماری کووید-۱۹ را می‌توان با اندازه‌گیری سطوح پادتن IgM و IgG به طور غیرمستقیم در خون بررسی نمود. پادتن IgG و IgM حدوداً دو هفته بعد از ابتلا فرد، به بالاترین سطح خود در خون می‌رسد. کیت‌های های پادتن IgM و IgG مبتنی بر الایزا بیش از ۹۵ درصد ویژگی را برای تشخیص بیماری کووید-۱۹ دارند [۹۷].

## ۱-۱۶. گزینه های درمانی بالقوه کووید-۱۹

در ابتدای شیوع بیماری هیچ درمان ضد ویروسی یا واکسنی برای عفونت‌های سارس کوو-۲ وجود نداشت. تولید واکسن‌های ایمن و پایدار یک چالش بزرگ بود، زیرا واکسن‌ها به طور ایده آل طیف گسترده‌ای خواهند بود، از طرفی تحقیقات و تولید داروهای جدید یک فرایند بسیار طولانی بود. در چنین بیماری همه گیر ناگهانی، دانشمندان نتوانستند با رعایت اصول سنتی، تولید داروهای جدید را انجام دهند. بنابراین گزینه دیگری پیش رو بود. یک غربالگری منظم و گسترده در مورد داروهای موجود برای دانستن اینکه آیا آنها تاثیری در مقابل ویروس کرونا نوین - ۲۰۱۹ دارند یا خیر.

برخی از داروهایی که برای درمان ویروس کرونا به کار می‌روند را می‌توان به ترتیب زیر تقسیم‌بندی نمود:

۱- **فاوپیرواویر<sup>۱</sup>**: در سال ۲۰۱۴ وزارت بهداشت ژاپن استفاده از این دارو در بهبود علائم و درمان آنفولانزا H1N1 را تأیید کرد. در سال ۲۰۲۰ با شیوع کووید-۱۹ دولت چین اعلام کرد که در کارآزمایی بالینی، تاثیر این دارو در بهبود علائم بیماران کووید-۱۹ را تأیید کرده است [۹۸].

۲- **درمان با داروهای اختصاصی ضد ویروس کرونا**: از آنجایی که ویروس کرونای جدید صرفاً از طریق اتصال S-پروتئین با ACE2 برای ورود به سلول میزبان استفاده می‌کند. لذا مهار این اتصال می‌تواند بر درمان آن موثر باشد، از جمله ترکیباتی که با این عملکرد ویروس تداخل دارد کلروکین<sup>۲</sup> است. کلروکین از طریق اتصال به پروتئین غشایی ACE2 دارای اثرات درمانی در بیماری سارس می‌باشد. همچنین رمدسیویر<sup>۳</sup> به عنوان یک داروی ضد ویروسی امیدوارکننده در برابر ویروس های RNA چندگانه (کروناویروس سارس و مرس) در سلول های کشت شده، و در مدل های موشی و غیرانسانی معرفی شد [۹۸].

۳- **پلاسما درمانی**: نسخه پنجم راهنمایی های پیشگیری و کنترل عفونت<sup>۴</sup> (IPC) اعلام کرد که بیماران مبتلا به بیماری شدید و بحرانی می‌توانند با پلاسما درمانی مداوم<sup>۵</sup> شوند از این روش میتوان به عنوان استراتژی درمانی دیگر نام برد. در این روش، پلاسماهای افرادی که از بیماری کووید-۱۹ بهبود

<sup>1</sup> Favipiravir

<sup>2</sup> Chloroquine

<sup>3</sup> Remdesivir

<sup>4</sup> Infection prevention and control; IPC

<sup>5</sup> Recovery plasma

یافته‌اند استخراج شده و جهت ایمن سازی غیرفعال استفاده می‌گردد. نتایج مطالعات متعدد نشان می‌دهد که پادتن‌های ضدویروسی IgE, IgM, IgA, IgG و IgD موجود در پلاسمای بیماران بهبود یافته دارای تأثیرات موثری در عفونت‌های ویروسی و بیماری‌های عفونی از قبیل آنفلوآنزای A (H1N1 و H5N1) سارس، مرس می‌باشد [۹۸].

## ۱-۱۷. پیشگیری و کنترل

در صورت عدم وجود درمان‌های مؤثر، بهترین راه مقابله با بیماری همه‌گیر کووید-۱۹ کنترل منابع عفونت است. راهبردهای موثر شامل تشخیص زودرس، ایزوله، قرنطینه و درمان‌های حمایتی است. انتشار به موقع اطلاعات همه‌گیریک و حفظ نظم اجتماعی نیز بسیار موثر و مفید است. برای افراد اقدامات محافظتی از جمله ارتقا بهداشت شخصی، زدن ماسک‌های پزشکی، استراحت کافی و تهویه مناسب اتاق‌ها می‌تواند به طور مؤثر از بروز عفونت کروناویروس نوین-۲۰۱۹ جلوگیری کند [۸۴]. در ابتدا با توجه به نبود درمان استاندارد و واکسن مؤثر برای کروناویروس جدید، بهترین راه اجتناب از آلودگی و جلوگیری از انتشار آن بود مطالعات گذشته و همچنین نتایج مطالعات اخیر نشان می‌دهند که کروناویروس کووید-۱۹ ممکن است برای چند ساعت یا حتی چند روز بر روی سطوح زنده بماند و به انسان منتقل شود. مدت زمان زنده ماندن این ویروس بر روی سطوح متغیر بوده و به عوامل مختلفی نظیر نوع سطح، دما یا رطوبت محیط بستگی دارد [۸۴].

## ۱-۱۸. واکسیناسیون

برای پیشگیری از کووید-۱۹ به عنوان بیماری نو ظهور قرن و سخت‌ترین چالش بهداشتی کشف واکسن موثر ضروری است. میزان عفونت بالا، دوره انکوباسیون طولانی، در کنار علائم حاد تا خفیف که به وسیله افراد مختلف تجربه شده است، کووید-۱۹ را به عنوان یک بیماری تهدید کننده سلامت جامعه معرفی کرده است. در این رابطه طراحی و تولید یک واکسن کارآمد، با توجه به وجود ناقلین بدون علامت بیماران، کووید-۱۹ ضروری و حیاتی است و تنها عاملی است که منجر به برداشت کامل محدودیت‌ها می‌شود [۹۹]. اما در این راه چالش‌هایی وجود دارد که باید مد نظر قرار گرفته شود که در وهله اول شامل طراحی واکسن، ساخت سریع واکسن و توزیع جهانی آن است. تجربه حاصل از استراتژی‌های توسعه واکسن سارس و مرس نشان داد وجود پروتئین سنبله در سطح کروناویروس سارس کوو-۲ یکی از مهمترین ویژگی‌های ساختمانی این ویروس است. بنابراین پروتئین سنبله می‌تواند یک هدف مناسب برای تهیه انواع واکسن علیه بیماری کووید-۱۹ باشد که مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است [۹۹].

## ۱-۱۸-۱. چشم‌انداز تولید واکسن

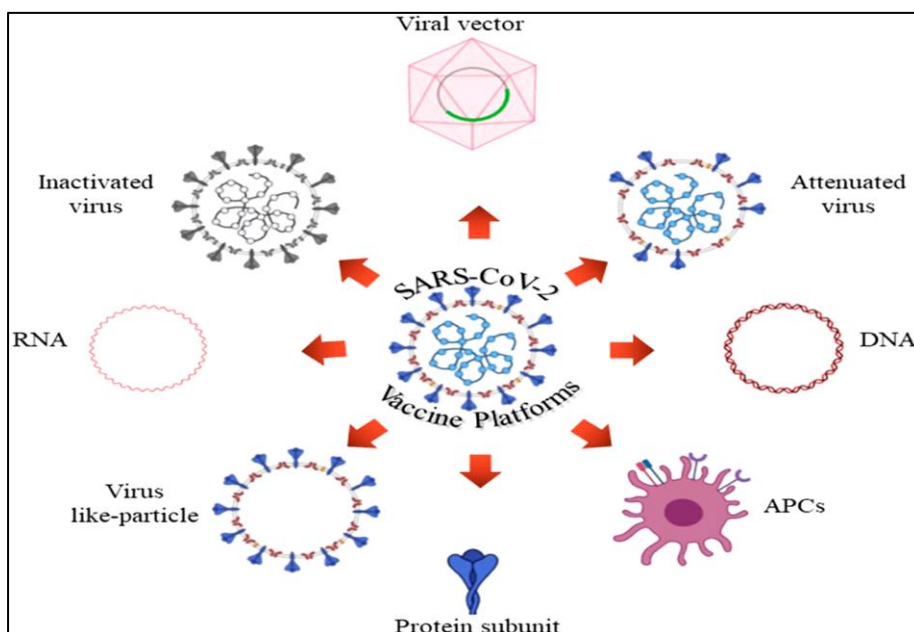
ادوارد جنر<sup>۱</sup> پزشک انگلیسی و کاشف واکسن آبله، اولین دانشمندی بود که کاربری واقعی واکسیناسیون را کشف کرد. بعدها واکسنهای مختلف برای بیماری‌های مختلف کشف شدند. امروزه عمده واکسن‌ها بر پایه عامل عفونی ضعیف شده و یا mRNA ساخته می‌شوند که می‌توانند سیستم ایمنی سلولی و همورال را وادار به ساخت پادتن نمایند تا در صورت مواجهه با عامل عفونی احتمال مرگ و میر و و عوارض شدید، کاهش یابد [۹۹]. در هنگام طراحی یک واکسن، در ابتدا باید اطلاعات کامل در رابطه با خصوصیات پادکن، ادجوانت، سیستم ساخت و تحویل واکسن را داشته باشیم. به دلیل در دسترس بودن بسیار سریع اطلاعات ژنومی و ساختاری ویروس سارس کوو-۲ برای محققین، تولید سریع واکسن‌های مختلف برای این ویروس امکانپذیر است. چندین نوع واکسن مانند واکسن‌های کشته و غیرفعال، ویروس‌های تضعیف شده زنده، واکسن‌های زیرواحد، پروتئین‌های نوترکیب و واکسن‌های DNA برای کروناویروس‌ها تعریف شده‌اند. در کنار واکسن‌های غیرفعال، ظهور واکسن‌های مبتنی بر نانو تکنولوژی، از قبیل واکسن‌های مبتنی بر mRNA که به وسیله نانوذره حمل می‌شوند و واکسن‌های ساخته شده از وکتورهای ویروسی قبلاً "به فاز ۲ و ۳ آزمایشات بالینی رسیده‌اند"، ابزار بسیار خوبی را در تولید واکسن‌های جدید و کارآمد ارائه کرده است [۸۴].

## ۱-۱۸-۲. واکسن‌های تولید شده بر علیه سارس کوو-۲

روش‌های مختلفی در سراسر دنیا برای تولید واکسن بر علیه سارس کوو-۲ مورد تحقیق قرار گرفته است. در تصویر ۱-۱۶ برخی از مدل‌های تولید واکسن نشان داده شده است.

---

<sup>۱</sup> Edward Jenner



تصویر ۱-۱۶. مدل های مورد تحقیق برای توسعه واکسن بر علیه سارس کوو-۲. این مدل ها شامل انواع DNA, RNA، ویروس ضعیف شده یا کشته شده، نوترکیب، وکتور ویروسی، ذره های شبه ویروسی و... می باشد.

### ۱- واکسنهای زنده ضعیف شده<sup>۱</sup> (LAVs)

ویروس زنده تکثیر شونده غیر بیماری زا هستند. هدف از طراحی LAVs، ایمنی زایی با یک دوز تزریق بدون ایجاد بیماری است. در این زمینه شرکت Codagenix واکسن زنده ضعیف شده ای به نام CDX-500 را سنتز کرده است. با این حال، LAVs معایبی همچون انتقال ویروس، تبدیل شدن به شکل بیماری زا، فعالیت مجدد در افراد با سیستم ایمنی تضعیف شده و همچنین نوترکیبی با ویروس های مرتبطی که در حال چرخش در جامعه هستند به خصوص عفونت های جدیدی که هنوز بیماری زایی آنها شناخته نشده است، را دارد [۱۰۰، ۱۰۱].

### ۲- واکسن های غیرفعال شده<sup>۲</sup> (IVs)

ویروس های غیرفعال شده از طریق گرما، مواد شیمیایی و یا ترکیبی از هر دو هستند. این واکسن ها قادر به تکثیر نبوده و ایمن تر از LAVs هست اما باید توجه داشت که عمل غیرفعال سازی، سبب کاهش ایمنوژنسیته واکسن شده و در نهایت نیازمند به دوزهای تکراری جهت افزایش ایمنی زایی واکسن در طولانی مدت هستند. با اینکه IVs پایداری بیشتری در مقایسه با LAVs دارند، آنها نیازمند زنجیره

<sup>1</sup> Live-attenuated vaccines

<sup>2</sup> Inactivated vaccines

انتقال سرد هستند. چندین واکسن IVs علیه کووید-۱۹ در حال تولید هستند که واکسن شرکت سینوواک<sup>۱</sup> اولین مرحله آزمایشات بالینی آن تأیید شده است [۱۰۰].

❖ **واکسن سینوفارم<sup>۲</sup>** توسط شرکت دارویی گروه ملی بیوتک چین (CNBG)<sup>۳</sup> واقع در پکن تولید می شود. واکسن سینوفارم ترکیب هیدروکسی آلومینیوم حاوی کروناویروس سارس کوو-۲ غیرفعال شده است که سبب تحریک سیستم ایمنی بدن برای تولید پادتن های متصل شونده به پروتئین سنبله سطحی ویروس می شود. هیدروکسی آلومینیوم، با ترشح سطوح بالای مشتقات اینترلوکین یک بتا و اینترلوکین ۱۸ سازوکار های پیش التهابی سیستم ایمنی را فعال می کند. در حال حاضر WHO استفاده از سینوفارم را توصیه می کند حتی اگر انواع مختلف این ویروس در یک کشور وجود داشته باشد [۱۰۲].

❖ **سینوواک<sup>۴</sup>** یک واکسن کووید-۱۹ است که توسط سینوواک بیوتک یک شرکت دارویی مستقر در چین تولید شده است. این شرکت به طور خاص بر توسعه و ساخت واکسن برای بیماری های عفونی انسان تمرکز دارد. سینوواک یک واکسن غیرفعال است و از نسخه مرده ویروس سارس کوو-۲ استفاده می کند به طوری که نمی تواند تکثیر شود. اما پروتئین سنبله سطحی را دست نخورده نگه میدارد که سیستم ایمنی بدن را تحریک کند تا پادتن برای محافظت در برابر ویروس زنده تولید نماید. واکسن سینوواک در فهرست استفاده اضطراری<sup>۵</sup> (EUL) توسط WHO تأیید شده و اکنون در ۲۲ کشور جهان استفاده می شود [۱۰۲].

### ۳- وکتورهای ویروسی

تعدادی از ویروس های پستانداران به گونه های مهندسی شده اند که برای تولید واکسن های مختلف مورد استفاده قرار گرفته اند. برای کووید-۱۹ چندین نامزد واکسن در حال تولید است که در آن از وکتورهای آدنوویروسی استفاده شده است. وکتورهای آدنوویروسی پیشرو در ساخت واکسن علیه سارس کوو-۲، آدنوویروس تیپ ۵ (Ad-nCoV) و وکتور آدنوویروس شامپانزه (ChAdOx1) به وسیله دانشگاه آکسفورد ۲۰۲۰ مارس ۱۶ از CanSino Biological از ۳۱ مارس ۲۰۲۰ مورد استفاده قرار گرفته اند. استفاده از وکتورهای آدنوویروسی مزایایی از قبیل گرایش بافتی وسیع و گسترده، خصوصیت ذاتی ادجوانتی و مقیاس پذیری آن است. واکسن آکسفورد-آسترانکا جهت تزریق مورد تأیید قرار گرفته است [۱۰۳-۱۰۵].

❖ **واکسن آکسفورد-آسترانکا** که با عناوین واکسن Covishield یا Vaxzevira نیز شناخته می شود، یکی از سه واکسنی (بعد از فایزر و مدرنا) است که برای پیشگیری از کووید-۱۹ در انگلستان (تا مارس ۲۰۲۱) به طور مشروط تأیید شده است. واکسن آکسفورد-آسترانکا در

<sup>1</sup> Sinovac

<sup>2</sup> Sinopharm

<sup>3</sup> China National Biotech Group; CNBG

<sup>4</sup> CoronaVac

<sup>5</sup> Emergency Use Listing; EUL



اواخر مارس ۲۰۲۱ در بیش از ۱۰۰ کشور تأییدیه نظارتی دریافت کرده است و تقریباً ۵۰ میلیون دوز در سراسر انگلستان، اتحادیه اروپا و هند تزریق شده است [۱۰۵].  
واکسن آکسفورد-آسترازنکا از فناوری جدیدی استفاده می‌کند که بر ناقل آدنووایروس شامپانزه متکی است تا تولید پروتئین سنبله مربوط به سارس کوو-۲ را که باعث ایجاد پاسخ ایمنی می‌شود رمزگذاری کند و برای این مهم در هر دوز تزریقی واکسن،  $10^{10} * 50$  ذره ویروسی وجود دارد [۱۰۶].

❖ **واکسن جانسون - جانسون** یک واکسن علیه کووید-۱۹ است که توسط شرکت یانسن در هلند و شرکت بلژیکی جانسون که زیرمجموعه شرکت جانسون-جانسون آمریکا است ساخته شده است [۱۰۷]. این واکسن از آدنووایروس استفاده می‌کند که علت شایع عفونت‌های تنفسی است. در این آدنووایروس، DNA به نحوی اصلاح شده که بخش مهمی از ذرات ویروسی سارس کوو-۲ را تولید می‌کند که بدن به آن پاسخ ایمنی می‌دهد. آدنووایروس که ژنهای مربوط به سارس کوو-۲ را منتقل می‌کند، نمی‌تواند تکثیر شود. بنابراین باعث عفونت نمی‌شود. از آنجا که این سیستم بر پایه مولکولهای DNA پایدار است، نیازی به ذخیره سازی فوق سرد ندارد و توزیع آن آسان است [۱۰۷].

❖ **اسپوتنیک وی:** این واکسن توسط مرکز تحقیقاتی گامالیا در روسیه تولید و توسعه یافته است. این واکسن که با نام Gam-COVID-Vac نیز شناخته می‌شود، از رویکرد هترولوگ نوترکیب آدنووایروس با استفاده از آدنووایروس ۲۶ و ۵ به عنوان حامل پروتئین سنبله مسئول ایجاد سندرم حاد تنفسی شدید استفاده می‌کند. شایان ذکر است آدنووایروس که در واکسن استفاده می‌شود نمی‌تواند تکثیر گردد، اما در دو دوز به اندازه کافی DNA پروتئین سنبله را برای ایجاد پاسخ ایمنی ارائه می‌دهد [۱۰۸].

#### ۴- واکسن‌های نسل بعد بر پایه پیشرفت‌های فناوری نانو

ویروس‌ها اجرامی با مقیاس نانو هستند. بنابراین می‌توانند به عنوان نانومواد طبیعی در نظر گرفته شوند. ذرات نانو چه طبیعی و چه ساختگی، ویژگی‌های ساختاری ویروس‌ها را تقلید می‌کنند که این عمل باعث می‌شود در زیست فناوری و نانوشیمی امکان توسعه فناوری‌های تولید واکسن‌های نسل بعدی را فراهم کند [۱۰۳].

#### ۵- طراحی واکسن بر پایه اسیدنوکلئیک

استفاده از کدهای ژنتیکی برای تولید مستقیم پروتئین‌های ویروسی یک روش جایگزین امیدوار کننده برای طراحی و تولید واکسن به صورت سنتی است. هر دو ساختار اسیدنوکلئیک DNA و mRNA در تولید واکسن علیه همه گیری کووید-۱۹ استفاده شده‌اند [۱۰۳]. استفاده از این زیرساخت تولید واکسن،

سبب شده است که سرعت تولید واکسن، پایداری آن و همچنین ایمنی ایجاد شده توسط این واکسن‌ها مورد توجه قرار گیرد. برای ساخت DNA واکسن علیه کووید-۱۹ شرکت پیشرو Inovio است که آزمایشات بالینی فاز ۱ را در ۶ آوریل ۲۰۲۰ انجام داده است. واکسن‌های مبتنی بر mRNA از طریق ساز و کار رونویسی در آزمایشگاه تولید می‌شوند. در این حالت نیاز به سلول و همچنین مواعی که در هنگام رونویس در سلول رخ خواهد داد، برطرف می‌شود. شرکت آلمانی بیون-تک- فایزر فاز ۱ و ۲ آزمایشات بالینی چهار واکسن بر مبنای mRNA را پشت سر گذاشته است [۱۰۹].

## ۶- واکسن‌های پپتیدی

بسیاری از واکسن‌ها به گونه‌های طراحی شده‌اند که کل ساختار پروتئین مورد نظر، در ساخت واکسن به کار گرفته شده است. به عنوان مثال استفاده از طول کامل پروتئین سنبله (S) حاوی اپی‌توپ‌های مختلف در ساختار خود است که منجر به تولید طیف وسیعی از پاسخ‌های ایمنی سلولی و آنتی‌بادی در فرد دریافت کننده واکسن می‌شود. با این حال مطالعات اخیر بر روی نامزدهای پروتئینی واکسن سارس و مرس اشاره به خطرات ناشی از عفونت ADE<sup>۱</sup> پدیده داشته‌اند [۱۰۹]. حضور آنتی‌بادی‌های غیرخنثی کننده می‌توانند در افزایش عفونت‌زایی شرکت کنند و منجر به التهاب آلرژیک و تهدید زندگی فرد مبتلا شوند. با این حال تاکنون شواهدی در دسترس نیست، اما اطلاعات ایمونولوژیکی از بیماران مبتلا به سارس کوو-۲ شواهدی از پدیده ADE در این دسته از بیماران را داشته و امکان دارد که تیترا بالای IgG علیه ویروس با عواقب بدتری همراه باشد. با این حال، هدف قرار دادن پروتئین S ویروس سارس کوو با تنوعی از اپی‌توپ‌های متنوع و مختلف که سبب افزایش تحریک سیستم ایمنی می‌شوند، می‌تواند بسیار کمک کننده باشد [۱۰۹].

❖ OncoGen و دانشگاه DIOSynVax در ساخت واکسن از توالی‌های پپتیدی پروتئین S استفاده کرده‌اند و جهت افزایش تحریک سلولهای B و T برخی مناطق تحریک کننده سیستم ایمنی در آنها پیش بینی شده است [۱۰۲، ۱۰۹].

## ۱-۱۸-۲-۱. هفت واکسن پیشرو ایرانی

✓ **کوواایران برکت:** نخستین طرح و فعالیت ساخت واکسن کرونا در ایران که توسط شرکت داروسازی شفا (Shifa Pharmmed) کلید خورد و «کوواایران برکت» نامگذاری شده است. واکسن مورد آزمایش داروسازی شفا با استفاده از روش ویروس غیرفعال شده تولید شده است. روش ساخت این واکسن شبیه به دو واکسن چینی سینوواک و سینوفارم است.

✓ **فخرا:** گروه دارویی میلاد نیز بر اساس مدل ویروس غیرفعال شده کار خود را آغاز و نام واکسن تولید شده فخرا گذاشته شد.

<sup>۱</sup> antibody-dependent enhancement; ADE

- ✓ **کوووپارس:** واکسن کرونا ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی با نام کوووپارس نامگذاری شد. این واکسن طبق گفته مسئولان موسسه رازی بر اساس پروتئین نوترکیب سنبله و ویروس کرونا ساخته و از دو بخش آنتی ژن و ادجوانت تشکیل شده و واکسیناسیون آن در سه دوز که شامل دو دوز تزریقی و دوز سوم استنشاقی است، انجام می‌شود. مسئولان حوزه بهداشت ایران فناوری تولید این واکسن را شبیه واکسن کوبایی عنوان کرده‌اند.
- ✓ **اسپایکوژن:** واکسن تولیدی شرکت سیناژن با همکاری شرکت Vaxine استرالیا حاوی قسمتی از ویروس کرونا (پروتئین سنبله) است که باعث ایجاد ایمنی در برابر این ویروس می‌شود و در ساخت آن از خود ویروس زنده و یا کشته شده استفاده نشده است. این واکسن از نوع پروتئین نوترکیب است. ادجوانت‌ها در بیشتر واکسن‌ها از نوع نمک‌های آلومینیومی هستند، اما در واکسن استرالیایی-ایرانی اسپایکوژن از ادجوانت‌های غیرآلومینیومی استفاده شده است؛ این واکسن در دو دوز است و فاصله هر دوز ۲۱ روز خواهد بود.
- ✓ **پاستوکوک:** یک واکسن کرونا است که با مشارکت موسسه فینلای کوبا و انستیتو پاستور ایران ساخته شده است. این واکسن شامل دو دز و یک دز یادآور یا بوستر با نام پاستوکوک پلاس<sup>۱</sup> است. این واکسن‌ها در کوبا با نام‌های سوبرانا ۰۲ و سوبرانا پلاس تولید می‌شوند. واکسن‌های پاستوکوک و پاستوکوک پلاس، واکسن‌های با زیرساخت پروتئین نوترکیب هستند. واکسن پاستوکوک کونزوگه با توکسوئید کزار است.
- ✓ **نورا:** یک واکسن نوترکیب پروتئینی می‌باشد که بر اساس بخشی از پروتئین سنبله می‌باشد و با ادجوانت فرموله شده است. این واکسن همانند واکسن‌های نوترکیب به راحتی می‌توان در سطح صنعتی تولید کرد و زیر ساخت تولید صنعتی این واکسن‌ها در ایران موجود است و قابل دسترس می‌باشد.
- ✓ **رناب:** نخستین واکسن mRNA ایرانی است که با موافقت سازمان غذا و دارو به مرحله کارآزمایی بالینی رسید. این واکسن‌ها حاوی mRNA ساخته شده در آزمایشگاه هستند و بعد از وارد شدن به بدن باعث تولید پروتئینی می‌شوند که پاسخ ایمنی ایجاد می‌کند مهم‌ترین مزیت واکسن‌های mRNA نسبت به سایر واکسن‌ها، توانایی القای همزمان پاسخ ایمنی خونی و ایمنی سلولی بدون کمک گرفتن از مواد اضافی (ادجوانت) در فرمولاسیون واکسن است.
- ❖ هدف ما در این پژوهش بیان پروتئین سطحی (اسپایک) نوترکیب تقطیع شده ویروس کرونا (سارس کوو-۲) و ایمن سازی حیوانات مدل بر علیه این پروتئین و در نتیجه بررسی واکنش‌های ایمنی بر علیه ویروس کرونا می‌باشد.

<sup>1</sup> PastoCovac Plus

۱. آیا پروتئین نوترکیب (برگرفته از برخی از اپی توپ های پروتئین S) با استفاده از وکتور pET-28a به خوبی بیان می شود؟
۲. آیا پروتئین نوترکیب بیان شده دارای ساختار سه بعدی مناسب است (با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیکی)؟
۳. آیا پروتئین نوترکیب بیان شده قادر به واکنش با پادتن های پلی کلونال علیه آن (تولید شده با استفاده از تزریق پروتئین خالص به خرگوش) است؟
۴. آیا پروتئین نوترکیب بیان شده قادر به تحریک ایمنی سلولی و هومورال در حیوان آزمایشگاهی است؟
۵. آیا پروتئین نوترکیب بیان شده قادر به اتصال به گیرنده ACE2 بیان شده در رده سلولی Caco2 است؟
۶. آیا پادتن تولید شده علیه پروتئین نوترکیب بیان شده قادر به خنثی سازی موثر ویروس است؟

## اهداف

---

۱. تهیه و تولید اپی توپ های انتخاب شده از پروتئین S ویروس کووید-۱۹ به صورت نوترکیب ، قادر به تحریک سیستم ایمنی برای تولید پادتن های خنثی کننده ویروس باشد.
۲. بررسی پتانسیل ایمنی زایی پروتئین نوترکیب بیان شده در حیوان آزمایشگاهی
۳. بررسی امکان واکنش پروتئین نوترکیب بیان شده با پادتن های پلی کلونال علیه آن
۴. بررسی امکان اتصال پروتئین نوترکیب بیان شده با گیرنده ACE2 رده سلولی Caco2
۵. بررسی قدرت خنثی سازی موثر ویروس کرونا توسط پادتن های تولید شده ناشی از تزریق پروتئین نوترکیب به حیوان

## فرضیات:

۱. بر اساس مطالعات *in silico*، بیان مناسب پروتئین نوترکیب با ساختار سه بعدی صحیح است.
۲. پروتئین نوترکیب قادر به تحریک سیستم ایمنی سلولی و هومورال به صورت مؤثر در حیوان آزمایشگاهی (موش Balb-c و خرگوش نیوزیلندی) است.
۳. پادتن تهیه شده بر علیه پروتئین نوترکیب بریده شده با پروتئین S کامل واکنش خواهد داد.
۴. پروتئین نوترکیب قادر به اتصال به گیرنده ACE2 در رده سلولی Caco<sub>2</sub> است.
۵. پادتن تهیه شده مانع از اتصال پروتئین نوترکیب به گیرنده ACE2 در رده سلولی Caco<sub>2</sub> می‌گردد.
۶. پادتن تولید شده بر علیه پروتئین نوترکیب قادر است ویروس کرونا زنده کشت داده شده را به طور مؤثر خنثی کند .

## ضرورت انجام طرح

یافتن کاندیدای واکسن احتمالی علیه ویروس کووید-۱۹ برای ایجاد ایمنی در جمعیت، در شرایط فعلی کشور به دلایل زیر حیاتی است:

۱. پاندمی عفونت ویروس سارس کوو-۲، نرخ سرایت و مرگ و میر بالا
۲. هزینه های سنگین تحمیل شده بر سیستم بهداشت و درمان
۳. پیامدهای منفی اجتماعی، اقتصادی و فرهنگی ناشی از فراگیری این بیماری در جهان
۴. احتمال تحریم اقلام دارویی و عدم امکان واردات آن به دلایل سیاسی
۵. امکان استفاده از پادکن تهیه شده به عنوان کنترل مثبت در کیت‌های تشخیص طبی
۶. امکان استفاده از پادکن در طراحی سنجش برای تعیین پادتن خنثی ساز

# فصل دوم

## مواد و روشها

## ۲-۱. مرور مطالعات انجام شده

ابتدا مقاله های مورد نظر در حوزه ویروس کرونا ها و مخصوصا سارس کوو-۲ مطالعه شد. واکسن هایی که در حوزه سارس و مرس استفاده شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. مطالعاتی که به بررسی واکسنهای مبتنی بر ویروس و نوترکیب در حوزه سارس و مرس بود ارزیابی شد و با توجه به عملکرد ویروس سارس کوو-۲ و چگونگی ورود به سلول میزبان پروتئین هدف به عنوان کاندید واکسن برای تحریک سیستم ایمنی انتخاب شد. با توجه به نتایج مطالعات که کل پروتئین سنبله را به دلیل وجود عوارض گزینه مناسبی برای تولید واکسن نمی دانستند. بنابراین مبنا بر طراحی پروتئین های زیرواحدی کوچکتر گذاشته شد. برای انتخاب بخش های کوچکتر از این پروتئین لازم بود مطالعات بیوانفورماتیکی به دقت انجام شود تا بهترین نواحی انتخاب شوند.

## ۲-۲. بررسی بیوانفورماتیک

توالی مربوط به پروتئین سنبله از پایگاه داده ای <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> دریافت شد. سپس بخش های مورد نظر که در مقالات بیشترین حفاظت در توالی و ایمنی زایی را در بین ویروس کروناها داشتند انتخاب شدند. این بخش ها شامل RBD,FP,CS بودند که برای انتخاب نواحی دارای ویژگی شاخص در ایمنی زایی توسط مطالعات بیوانفورماتیکی ارزیابی شدند. نرم افزارهایی که برای انتخاب نواحی شاخص در پروتئین سنبله استفاده شدند در جدول ۲-۳ آورده شده است.

جدول ۲-۳. پایگاه های مورد استفاده برای مطالعات بیوانفورماتیکی

وبژگی	نرم افزار	سایت
وبژگی های آنتی ژنسیته	Vaxijen-2.0	<a href="http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html">http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html</a>
وبژگی های فیزیکوشیمیایی	ProtParam	<a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a>
وجود سیگنال پپتید	SignalP-5.0	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP">https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP</a>
سمیت	ToxinPred	<a href="https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/protein.php">https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/protein.php</a>
قندی شدن	NetNGlyc-1.0	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0">https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0</a>
وبژگی های آلرژنسیته	Aller TOP	<a href="https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/method.html">https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/method.html</a>
اپی توپی پادتن	IEDB	<a href="http://tools.immuneepitope.org/bcell/result/">http://tools.immuneepitope.org/bcell/result/</a>
پیوند دی سولفیدی	DiANNA 1.1	<a href="http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/">http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/</a>
ساختار اول	Pepcalc	<a href="https://pepcalc.com/">https://pepcalc.com/</a>
ساختار دوم	Predict Protein	<a href="https://predictprotein.org/">https://predictprotein.org/</a>
ساختار سوم	model Swiss	<a href="https://swissmodel.expasy.org/">https://swissmodel.expasy.org/</a>
ساختار سه بعدی	Robetta	<a href="http://robeta.bakerlab.org/">http://robeta.bakerlab.org/</a>
داکینگ مولکولی	HDOCK	<a href="http://hdock.phys.hust.edu.cn/">http://hdock.phys.hust.edu.cn/</a>

براساس نتایج مطالعات بیوانفورماتیکی انجام شده، سه بخش به منظور کاندید تولید پروتئین نوترکیب به عنوان واکسن انتخاب شد.

## ۲-۳. انتخاب میزبان پروکاریوتی

در سال ۱۸۸۵ باکتری اشریشیاکلی<sup>۱</sup> توسط تئودور اشریش باکتری‌شناس آلمانی کشف شد. این باکتری میله‌ای گرم منفی به صورت بی‌هوازی اختیاری و در بازه دمایی ۸°C تا ۴۸°C رشد می‌کند. علی‌رغم محدودیت‌های اشریشیاکلی برای تولید برخی از پروتئین‌های بزرگ، میزبان‌های بیان باکتریایی انتخاب ارجح هستند. زیرا باکتریها مقرون به صرفه‌اند، ژنتیک آن‌ها شناخته شده و میزبان‌های بسیار مختلفی از باکتری‌های بیانی در دسترس است. اولین داروی نوترکیبی که برای درمان دیابت تأیید شده است، انسولین انسانی نوترکیب در میزبان بیانی اشریشیاکلی است. FDA و آژانس دارویی اروپا ۱۵۱ داروی نوترکیب مبتنی بر پروتئین را تأیید کرده‌اند که ۴۵ مورد از آن‌ها با استفاده از محصولات مشتق شده از اشریشیاکلی تولید می‌شود. همچنین در سال ۲۰۱۱، اولین واکسن نوترکیب مبتنی بر VLP بر علیه ویروس هپاتیت E در میزبان بیانی اشریشیاکلی با نام هکولین<sup>۲</sup> مجوز لازم برای تزریق انسانی را از FDA چین گرفت. تاکنون عوارضی از تزریق این واکسن در افراد گزارش نشده است و دارای اثربخشی بالا (۹۹٫۵٪) در طی ۱۹ ماه است. در همین راستا در مقاله‌ای در سال ۲۰۰۵ ذکر شده است که پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در سیستم پروکاریوتی می‌توانند به عنوان پادکن برای واکسن‌های مبتنی بر پروتئین سنبله باعث تولید پادتن‌های ویژه شوند. علی‌رغم مزایای ذکر شده برای انتخاب باکتری به عنوان میزبان، یکی از محدودیت‌ها برای انتخاب میزبان پروکاریوتی فقدان تغییرات پس از ترجمه<sup>۳</sup> (PTMs) در آن‌ها می‌باشد. بنابراین با انتخاب باکتری اشریشیاکلی به عنوان میزبان از مزیت‌های تولید در این سیستم استفاده و سعی شد تا حد امکان عوامل محدود کننده را حذف کنیم.

در این پژوهش از باکتری اشریشیاکلی، سوش‌های DH5- $\alpha$  و BL21 استفاده گردید.

- ✓ سویه DH5- $\alpha$  برای تکثیر و ذخیره پلاسمید استفاده شد. این سویه به دلیل عدم حضور آنزیم اندونوکلاز توانایی نگهداری پلاسمید را درون خود به مدت طولانی‌تر دارد.
- ✓ BL21 (DE3) یکی از بهترین میزبان‌های اختصاصی برای بیان ژن‌های نوترکیب ناهم ساخت (هترولوگ) در باکتری اشریشیاکلی محسوب می‌شود، زیرا در بیان پروتئین‌ها نقص داشته و پروتئین‌های بیان شده بیشتر محفوظ می‌مانند.

<sup>1</sup> Escherichia.coli

<sup>2</sup> Hecolin

<sup>3</sup> Post Translation Modifications; PTMs





## ۵-۲. انتخاب قطعه مناسب به وسیله مطالعات بیوانفورماتیک

ابتدا مطالعات بر روی سارس کوو-۲ انجام شد. سپس بعد از انتخاب پروتئین سطحی سنبله سارس کوو-۲، توالی آن از پایگاه داده NCBI<sup>۱</sup> بدست آمد. از لحاظ ساز و کار عمل در ورود به داخل ویروس، نواحی قندی نشده، پیوندهای دی سولفیدی و توالی های اپی توپی از پیش تعیین شده بررسی شد. همچنین بخش های انتخاب شده با استفاده از نرم افزارهای مربوطه برای ویژگی های پادکنسپته، آلرژنیسیته، سیگنال پپتید، قندی شدن، سمیت و... مورد بررسی قرار گرفت.

## ۶-۲. کلون سازی توالی ژنی P1,P2,P3 در وکتور pET-28a(+)

توالی سه بخش متفاوت از ژن سنبله سارس کوو-۲ (سویه ووهان) شامل بخشهایی از RBD, Fusion Peptide, Cleavage Site انسانی انتخاب و در وکتور pET-28a(+) برای بیان در میزبان پروکاریوتی کلون گردید و برای ساخت به شرکت Generay ارسال شد.

## ۷-۲. مستعد نمودن سویه DH5α از باکتری اشریشیاکلای به روش

### شیمیایی

قبل از انتقال پلاسمیدهای نو ترکیب به باکتری ها لازم است ابتدا باکتری ها مستعد شوند تا امکان جذب DNA خارجی را داشته باشند. به همین منظور سویه DH5α از باکتری اشریشیاکلای با روش شیمیایی مستعد گردید (Frederick Griffith, 1928).

### مواد لازم

- ✓ سویه DH5α از باکتری اشریشیاکلای
- ✓ کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار (سرد)
- **کاربرد:** کلرید کلسیم برداشت DNA از محیط اطراف توسط سلوهای باکتریایی را تسهیل میکند. سطح باکتری و DNA بار منفی وجود دارد نیروی دافعه ایجاد میکند. نقش کلسیم به عنوان پل کاتیونی بین بار منفی لیپیدهای فسفریله شده A در لیپوپلی ساکارید باکتری و اسکلت فسفات در ساختمان DNA است. بنابراین نیروی دافعه بین آن ها از بین میرود و DNA نزدیک به باکتری میشود و با شوک حرارتی باعث ورود به باکتری از طریق منافذ آن می شود.
- **آماده سازی:** ۱،۴۷ گرم کلرید کلسیم را وزن کرده در یک ارلن ۲۵۰ میلی ریزیم. سپس ۱۰۰ میلی لیتر آب یون زدایی شده به آن اضافه کرده و در آن را با پنبه و فویل بسته و سپس اتوکلاو می کنیم.
- ✓ محیط کشت LB Borth

<sup>1</sup> National Center for Biotechnology Information; NCBI

- **کاربرد:** یک محیط غنی از مواد غذایی برای رشد، نگه داری و کشت سویه های جدید و نو ترکیب اشربشیاکلی که به علت نداشتن مواد ضد میکروبی تقریبا تمام باکتری ها می توانند در آن رشد کنند. پپتون موجود در این محیط نیتروژن و کربن را تامین می کند. ویتامین ها از جمله ویتامین B و برخی عناصر کمیاب توسط عصاره مخمر تامین می شود. کلرید سدیم هم تعادل اسمزی محیط را ایجاد می کند.
- **آماده سازی LB:** برای تهیه این محیط، مواد ذکر شده در جدول ۲-۴ در ۱۰۰ میلی لیتر آب یون زدایی شده حل و پس از بستن در ظرف با فویل و پنبه توسط اتوکلاو ضد عفونی و استریل گردید.

جدول ۲-۵. مواد مورد استفاده برای تهیه محیط کشت LB Borth

نام مواد	نام علمی	مقدار (گرم)
پپتون	Pepton	۱
عصاره مخمر	yeast extract	۰,۵
سدیم کلراید	NaCl	۱

#### ✓ محیط کشت 2xYT

- **آماده سازی:** تمام مواد ذکر شده در جدول ۲-۵ در ۹۰ میلی لیتر آب یون زدایی شده حل کرده سپس حجم نهایی را به ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم و اتوکلاو می کنیم.

جدول ۲-۶. مواد مورد استفاده برای تهیه محیط کشت 2xYT

نام مواد	نام علمی	مقدار (گرم)
تریپتون	Tryptone	۱,۶
مخمر	Yeast Extract	۱
کلرید سدیم	NaCl	۰,۵

#### ✓ پلیت LB Agr

- **آماده سازی:** همانند محیط LB مایع عمل کرده و به آن ۱,۵ گرم آگار اضافه کرده و سپس اتوکلاو گردید. سپس بعد از کاهش نسبی دمای محیط، LB-Agar در کنار شعله در پلیت های استریل ریخته شد و از آنجا که نیاز به محیط انتخابی دارای آنتی بیوتیک بوده، به ازای هر میلی لیتر از محیط یک میکرولیتر از آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت ۵۰ mg/ml تا رسیدن به غلظت نهایی ۵۰ µg/µl به محیط پلیت های کشت اضافه گردید.

#### ✓ گلیسرول ۳۰ درصد (اتوکلاو شده)

- **آماده سازی:** از استوک ۱۰۰ درصد گلیسرول، ۳ میلی لیتر گلیسرول با ۷ میلی لیتر آب یون زدایی شده را با هم مخلوط کرده در یک ظرف ریخته در آن را بسته و اتوکلاو می کنیم.

- ۱) مقدار ۱۰ میکرولیتر از باکتری DH5 $\alpha$  خالی در پلیت آگار فاقد آنتی‌بیوتیک کشت چمنی داده و به مدت یک شبانه روز (۱۴-۱۲ ساعت) در انکوباتور ۳۷ $^{\circ}$ C ساکن قرار داده شد.
- ۲) روز بعد یک کلون در ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع فاقد آنتی‌بیوتیک تلقیح و به صورت شبانه در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ $^{\circ}$ C گرماگذاری (انکوبه) گردید.
- ۳) روز بعد ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت 2xYT فاقد آنتی‌بیوتیک تلقیح و در انکوباتور شیکردار قرار داده شد تا به جذب نوری ۰,۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر برسد.
- ۴) سپس باکتری به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ g در دمای ۴ $^{\circ}$ C سانتریفیوژ گردید و در شرایط استریل، مایع رویی توسط پیپت پاستور دور ریخته شد.
- ۵) جهت تهیه‌ی باکتری مستعد شیمیایی، میزان ۱۰ میلی‌لیتر از محلول کلرید کلسیم سرد، در شرایط استریل و کنار شعله توسط پیپت پاستور به رسوب باکتری اضافه کرده و ورتکس شد تا رسوب باکتری کاملاً حل شود، سپس باکتری به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ گرماگذاری گردید.
- ۶) باکتری به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ g در دمای ۴ $^{\circ}$ C سانتریفیوژ گردید و مایع رویی دور ریخته شد.
- ۷) دو مرتبه‌ی دیگر مراحل ۵ و ۶ تکرار گردید.
- ۸) سپس رسوب در ۵ میلی‌لیتر کلرید کلسیم حل گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ گرماگذاری شد و مانند مراحل قبل سانتریفیوژ انجام گردید.
- ۹) مایع رویی دور ریخته شده و ۳۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم به آن اضافه گردید. پس از پیتاژ کردن رسوب در کلرید کلسیم و به دست آوردن محلول یکنواخت، الیکوت‌های ۱۰۰ میکرولیتری درون میکروتیوب‌های استریل ۱,۵ ریخته شد.
- ۱۰) به منظور ذخیره باکتری مستعد در ۷۰ $^{\circ}$ C-، به میزان ۳۰-۱۵ درصد از حجم باکتری مستعد از استوک استریل گلیسرول ۳۰٪ اضافه گردید.
- ۱۱) به منظور بررسی عدم آلودگی، ۱۰ میکرولیتر از باکتری مستعد شده بر روی پلیت آگار آنتی‌بیوتیک‌دار کانامایسین و آمپی‌سیلین کشت داده و به مدت یک شبانه‌روز در انکوباتور ۳۷ $^{\circ}$ C گرماگذاری شد.

## ۸-۲. انتقال (ترانسفورم) پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن P3,P2,P1 به

### باکتری مستعد DH5 $\alpha$

#### مواد لازم

✓ باکتری مستعد DH5 $\alpha$

## ✓ پلاسمید نو ترکیب

- آماده سازی: استوک پلاسمید (۴ میکروگرم) از شرکت به صورت لیوفیلیزه ارسال می شود. ۱۰۰ میکرولیتر از آب تزریقی در شرایط کاملا استریل به میکروتیوب اضافه و با ضربات دست پودر را در آب حل کردیم.

## ✓ محیط کشت SOB مایع

- آماده سازی: مواد ذکر شده در جدول زیر را در ۱ لیتر آب یون زدایی شده حل کرده و پس از بستن در ظرف با فویل و پنبه توسط اتوکلاو ضد عفونی و استریل گردید.

جدول ۲-۷. مواد شیمیایی مورد استفاده برای تهیه محیط کشت SOB

نام	نام علمی	مقدار
پپتون	peptone	۲ درصد حجمی وزنی
عصاره مخمر	Yeast extract	۰,۵ درصد حجمی وزنی
کلرید سدیم	NaCl	۱۰ میلی مولار
کلرید پتاسیم	KCl	۲,۵ میلی مولار
کلرید منیزیم	MgCl <sub>2</sub>	۱۰ میلی مولار
منیزیم سولفات	MgSO <sub>4</sub>	۱۰ میلی مولار

## ✓ محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین

- آماده سازی: محیط LB مایع تهیه شده و به آن ۱,۵ گرم آگار اضافه و سپس اتوکلاو گردید. بعد از کاهش نسبی دمای محیط LB آگار, در کنار شعله در پلیت های استریل ریخته شد و از آنجا که نیاز به محیط انتخابی دارای آنتی بیوتیک بوده, به ازای هر میلی لیتر از محیط یک میکرولیتر از آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت ۵۰ mg/ml تا رسیدن به غلظت نهایی ۵۰ μg/μl به محیط پلیت های کشت اضافه گردید.

## روش کار

- (۱) باکتری مستعد شده را روی یخ قرار داده تا یخ آن ذوب شود.
- (۲) ۷ الی ۱۰ میکرولیتر از پلاسمید نو ترکیب (۴۰۰ نانوگرم) به ۱۰۰ میکرولیتر باکتری مستعد شیمیایی اضافه و به آرامی به میکروتیوب ضربه زده تا مخلوط شود و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ گرماگذاری گردید.
- (۳) سپس به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲°C گرماگذاری شده و به مدت ۵ دقیقه روی یخ گرماگذاری گردید.
- (۴) ۴۰۰ میکرولیتر محیط SOB اتوکلاو شده به میکروتیوب اضافه گردید و به مدت ۱,۵ الی ۲ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷°C گرماگذاری گردید.
- (۵) محصول انتقال به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و مایع رویی دور ریخته می شود.

۶) رسوب در باقی مانده‌ی محیط حل شد و روی پلیت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین مرتبط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی پلاسمید مورد نظر برای بدست آوردن تک کلونی کشت داده شد و سپس پلیت به مدت ۱۴-۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد (Griffith, 1928).

۷) برای تأیید کلون‌های رشد کرده در پلیت، PCR انجام گردید.

## ۲-۹. تأیید انتقال پلاسمید نو ترکیب P1,P2,P3 توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز<sup>۱</sup> (Colony PCR)

PCR روشی مبتنی بر تکثیر قطعه‌ی مشخصی از DNA است. یکی از مزیت‌های این روش عدم محدودیت در انتخاب قطعه‌ی هدف است و قطعه هدف می‌تواند همه یا بخشی از ژن‌های رمز کننده پروتئین، RNA یا قسمتی از یک بیومارکر یا نشانگر زیستی باشد. بر همین اساس هدف از فرایند PCR دستیابی به تعداد انبوه کپی از ناحیه‌ی هدف می‌باشد (Kary Mullis, 1983).

### مواد لازم

✓ مستر میکس  
شامل:

○ آنزیم Taq پلیمراز (Taq DNA polymerase)

• کاربرد: این آنزیم از باکتری ترموس آکوآتیکوس استخراج می‌شود. این آنزیم با توجه به شرایط زندگی باکتری ترموس آکوآتیکوس که در دریچه‌های عمیق اقیانوس‌ها می‌باشد، مقاومت بالایی نسبت به گرما دارند و پایدار هستند. فعالیت این آنزیم تا دمای ۷۰°C پایدار است. این آنزیم دارای سه ویژگی است: (۱) پایداری گرمایی (۲) قدرت پردازش (حفظ پیوند به سوبسترا تا پایان واکنش (۳) عملکرد صحیح

○ بافر PCR

○ نوکلئوتیدها (dNTP)

• کاربرد: dNTP به عنوان بلوک‌های ساختمانی رشته DNA عمل می‌کند و از کاتیون‌های دو ظرفیتی مانند: منیزیم در واکنش‌هایی که باید پیوند کووالان صورت پذیرد استفاده می‌شود.

○ MgCl<sub>2</sub>

• کاربرد: یک ماده شیمیایی مهم در فرایند PCR است که به عنوان کوفاکتور فعالیت آنزیمی DNA پلیمراز را افزایش می‌دهد و بنابراین باعث افزایش تکثیر DNA می‌شود.

✓ پرایمر عمومی T7

<sup>1</sup> Polymerase Chain Reaction; PCR

- کاربرد: آنزیم Taq پلی مرز فقط با وجود پرایمر توانایی ساخت رشته جدید را دارد. پرایمرها با ایجاد سر آزاد OH در مجاورت آنزیم باعث ایجاد یک نقطه شروع برای آن می‌شوند. به طور کلی در هر واکنش PCR دو پرایمر برای اتصال به دو رشته ی DNA لازم است.

جدول ۲-۸. مشخصات پرایمرهای مصرف شده در PCR

پرایمر	نام	توالی	طول پرایمر
Forward	T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	۲۰
Reverse	T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	۱۹

✓ آب یون زدایی شده (دیونیزه)

✓ نمونه

## روش کار

۱) کلون ها را از روی پلیت برداشته و برای تائید کلون حاوی پلاسمید مورد نظر PCR انجام شد.  
 ۲) واکنش PCR، برای تکثیر ناحیه ی پلی کلونینگ وکتور pET-28a حاوی ژن در کلون های رشد کرده طبق شرایط ذیل صورت گرفت:

جدول ۲-۹. شرایط PCR مربوط به تکثیر ناحیه ی پلی کلونینگ وکتور pET-28a حاوی ژن

مواد مورد استفاده	مقادیر (میکرولیتر)
پرایمر T7 promotor	۰,۳
پرایمر T7 terminator	۰,۳
مسترمیکس	۳,۵
آب دیونیزه	۵,۴
کلون حاوی پلاسمید	۰,۵
حجم نهایی	۱۰

جدول ۲-۱۰. شرایط PCR مربوط به تکثیر ناحیه ی پلی کلونینگ وکتور pET-28a حاوی ژن

مراحل واکنش	ویژگی	دما	زمان
مرحله ی اول <sup>۱</sup>	دناتوراسیون اولیه	۹۵°C	۵ دقیقه
مرحله ی دوم <sup>۲</sup> (۳۰ سیکل)	دناتوراسیون اولیه	۹۵°C	۳۰ ثانیه
	اتصال پرایمر	۵۰°C	۴۰ ثانیه
	طویل شدن	۷۲°C	۴۵ ثانیه

<sup>۱</sup> Denaturation

<sup>۲</sup> Annealing

مرحله‌ی سوم <sup>۱</sup>	طولیل شدن نهایی	۷۲°C	۱۰ دقیقه
--------------------------	-----------------	------	----------

## ۲-۱۰. بررسی محصول PCR توسط الکتروفورز افقی روی ژل آگاروز

الکتروفورز بر روی ژل، فناوری ساده و بسیار کارآمد برای جداسازی ملکول‌ها است که در آن بر مبنای اختلاف در سرعت حرکت ملکول‌ها در یک بستر نیمه جامد در داخل میدان الکتریکی از یکدیگر تفکیک می‌شوند. این روش امکان جدا سازی قطعات DNA از ۰/۵ تا ۲۵ کیلو باز را فراهم می‌سازد. مولکول‌های DNA دارای بار منفی هستند و در میدان الکتریکی از قطب منفی به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. حرکت مولکول‌ها در ژل آگاروز در یک میدان الکتریکی به اندازه، بار مولکول‌ها و همچنین قطر منافذ ژل بستگی دارد. (Arne Tiselius.1930)

### مواد لازم

- ✓ نمونه (کلون حاوی پلاسمید نو ترکیب)
- ✓ پودر آگارز
- ✓ بافر بارگذاری نمونه (Loading buffer 6X)
- کاربرد: متراکم کردن نمونه در چاهک‌ها، این بافر دارای رنگ نیز می‌باشد که نمونه را رنگ می‌کند.
- آماده سازی: ۰,۰۰۳ گرم از برم فنل بلو وزن کرده و به آن ۴۵۰ میکرولیتر گلیسرول استریل اضافه کرده و با 0.5 X TBE حجم آن را به ۱,۵ میلی لیتر می‌رسانیم. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ را در یک میکروتیوب ریخته و به آن ۲۰۰ میکرولیتر 0.5X TBE اضافه میکنیم تا قابل استفاده شود.
- ✓ رنگ Green Viewer
- کاربرد: با اتصال به DNA دو رشته ای رنگ فلورسانس سبز از خود ساطع می‌کند و با اتصال به DNA تک رشته یا RNA فلورسانس قرمز از خود ساطع می‌کند. به کار بردن رنگ در ژل آگاروز به منظور آشکارسازی محصولات با نور UV است.
- ✓ بافر TAE 1X
- کاربرد : به طور کلی بافرها در الکتروفورز به عنوان برقرارکننده جریان و حفظ کننده pH در یک مقدار ثابت هستند و از آن جا که قدرت تفکیک پذیری بافر TAE برای DNA در حالت ابر مارپیچ بهتر از TBE است، برای بررسی پلاسمیدهای نو ترکیب استخراج شده از TAE استفاده گردید.
- ✓ دستگاه ژل داک

<sup>۱</sup> Elongation



- (۱) ژل آگاروز ۱٪ را آماده کردیم.
- **آماده سازی:** حل کردن ۰/۲ گرم پودر آگاروز در ۲۰ میلی لیتر، بافر TAE و قرار دادن آن بر روی شعله تا حدی که محلول شفافی حاصل شود. بعد از برداشتن از روی شعله و رسیدن دمای محلول به ۵۰-۴۰ C مقدار ۲ میکرولیتر رنگ Green Viewer را به محلول اضافه می کنیم.
- (۲) شانه الکتروفورز را جهت ایجاد چاهک در سینی ژل قرار داده و ژل را به سینی اضافه می کنیم.
- (۳) پس از بستن کامل ژل، آن را به مخزن الکتروفورز انتقال می دهیم.
- (۴) ۲ میکرولیتر از مارکر وزن ملکولی DNA را در اولین چاهک می ریزیم.
- (۵) نمونه های حاصل از PCR به چاهک ها ریخته می شود.
- (۶) انجام الکتروفورز به مدت ۴۵-۵۵ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز انجام می شود.
- (۷) عکس گرفتن از ژل توسط دستگاه ژل داک می شود.
- (۸) پس از اطمینان از کمیت و کیفیت پلاسمیدها، کلون منتخب برای تخلیص پلاسمید و انتقال به باکتری BL21 استفاده می شود.

## ۱۱-۲. تخلیص پلاسمید نوترکیب

### مواد لازم

- ✓ کیت استخراج پلاسمید (DNA Biotech) شامل:
  - بافر معلق سازی (سوسپانسیون)
  - **کاربرد:** این بافر اغلب بر اساس بافر تریس و <sup>۱</sup>EDTA است که به دناچوره شدن DNA کمک می کند. نقش EDTA در این بافر به کاتیون های دو ظرفیتی که عامل ناپایداری غشا و مهارکننده DNase است متصل می شود.
  - RNase A
  - **کاربرد:** برای تخریب RNA های آزاد شده در لیز سلولی به بافر معلق سازی اضافه می گردد.
  - **آماده سازی:** ۱ میلی لیتر از بافر تعلیق کننده را به میکروتیوب حاوی RNase A لیوفیلیزه اضافه کرده، بعد از حل شدن پودر لیوفیلیزه، آن را به ظرف بافر معلق کننده اضافه می کنیم. این بافر به مدت ۶ ماه در یخچال می تواند نگهداری شود.
  - بافر لیزکننده
  - **کاربرد:** این بافر حاوی SDS و NaOH است که برای پاره کردن غشای سلولها در شرایط بازی به منظور آزاد کردن محتویات سلولی از جمله DNA کروموزومی و پلاسمید استفاده می شود.
  - بافر اتصال

<sup>۱</sup> Ethylen Diamine Tetra Acetic acid; EDTA

- **کاربرد:** این بافر اتصال و بازیابی موثر DNA را از واکنش های آنزیمی و ناخالصی ها تسهیل می کند.
- بافر شستشو ۱ (WB<sub>1</sub>)
  - **کاربرد:** این بافر برای شستشوی DNA و حذف مواد باقیمانده از بافرهای استفاده شده مانند نمک ها می باشد. اضافه کردن الکل به منظور افزایش حلالیت نمک ها و کاهش دادن حلالیت DNA و رسوب آن می باشد.
  - **آماده سازی:** ۶ میلی لیتر از اتانول مطلق به ۴ میلی لیتر از بافر شستشو ۱ اضافه می شود. این بافر در دمای ۲۵-۱۵ درجه نگهداری می شود.
  - بافر شستشو ۲ (WB<sub>2</sub>)
    - **کاربرد:** این بافر برای شستشوی DNA و حذف مواد باقیمانده از بافرهای استفاده شده مانند نمک ها می باشد. اضافه کردن الکل به منظور افزایش حلالیت نمک ها و کاهش دادن حلالیت DNA و رسوب آن می باشد.
    - **آماده سازی:** ۱۶ میلی لیتر از اتانول مطلق به ۴ میلی لیتر از بافر شستشو ۲ اضافه می شود. این بافر در دمای ۲۵-۱۵ درجه نگهداری می شود.
    - بافر تخلیص
      - **کاربرد:** حاوی تریس ۱۰ میلی مولار با pH = ۸,۵ (برای حفاظت از DNA در زمان نگهداری) و EDTA ۰,۱ میلی مولار (برای مهار کردن نوکلئازها) است. DNA در محلولهایی با قدرت یونی کم مانند بافر تریس یا آب بدون نوکلئاز، محلول است. زمانی که چنین بافری به غشای سیلیکایی افزوده می شود DNA از غشا آزاد و مایع خروجی شامل DNA جمع آوری می شود.
      - **آماده سازی:** قبل از مصرف باید به مدت ۱ دقیقه در دمای ۶۵°C گرم شود.

## روش کار

- (۱) بعد از انتخاب کلون مناسب حاصل از نتایج PCR, کلون مورد نظر در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت LB همراه با آنتی بیوتیک کانامایسین به صورت شبانه (۱۴-۱۲ ساعت) در انکوباتور ۳۷°C شیکردار کشت داده شد.
- (۲) سپس روز بعد ۵ میلی لیتر از محیط کشت داده شده را برای تخلیص پلاسمید برداشته و از باقی مانده ی آن استوک گرفته می شود.
- (۳) ۵ میلی لیتر از کشت شبانه در مرحله ی قبل، در دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ g سانتریفیوژ گشت و مایع رویی دور ریخته شد.
- (۴) رسوب به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه گذاشته شد.
- (۵) رسوب در ۲۵۰ میکرولیتر از بافر معلق کننده حل گردید و ورتکس شد.
- (۶) ۲۵۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده به میکروتیوب اضافه شد و ۱۰-۵ مرتبه سر و ته گشت و به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد تا سلول ها لیز گردند.
- (۷) ۳۵۰ میکرولیتر از بافر اتصال دهنده، به میکروتیوب اضافه گشت و ۱۰-۵ مرتبه سر و ته گردید.

- ۸) محتوای درون میکروتیوب در دمای ۴°C در دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی، به ستون منتقل گردید.
- ۹) سپس مجدداً با دور ۱۱۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گشت و مایع زیری دور ریخته شد.
- ۱۰) میکرولیتر از بافر شست و شو دهنده‌ی اول (WB<sub>1</sub>) به ستون اضافه شد و با دور ۱۱۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گشت؛ نهایتاً مایع زیری دور ریخته شد.
- ۱۱) ۷۰۰ میکرولیتر از بافر شست و شو دهنده‌ی دوم (WB<sub>2</sub>)، به ستون اضافه گردید و با دور ۱۱۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع زیری مجدداً دور ریخته شد.
- ۱۲) ستون خالی جهت حذف الکل، با دور بالا به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد.
- ۱۳) ستون در میکروتیوب جدید قرار گرفت و ۱۰۰ میکرولیتر از بافر تخلیص که قبلاً در دمای ۶۵°C گرم شده بود، به آن اضافه شد.
- ۱۴) ستون با دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گشت و مایع زیری درون میکروتیوب، حاوی پلاسمید مورد نظر می‌باشد.
- ۱۵) انتقال ۵ میکرولیتر از پلاسمید تخلیص شده برای بررسی و تأیید توسط الکتروفورز با ژل آگارز انجام شد.

## ۱۲-۲. انتقال پلاسمید نو ترکیب تخلیص شده به باکتری BL21

پلاسمید تخلیص شده پس از تهیه‌ی باکتری مستعد شیمیایی BL21 (مطابق بخش ۲-۸) برای بیان پروتئین نو ترکیب مطابق پروتکل ذکر شده در بخش ۲-۹ به باکتری BL21 منتقل شد.

## ۱۳-۲. بیان پروتئین P1,P2,P3 در باکتری BL21

### مواد لازم

- ✓ محیط LB Broth
- ✓ آنتی بیوتیک کانامایسین A
- آماده سازی: محصول به صورت پودر است. ۵۰ میلی گرم از پودر را به ۱ میلی لیتر آب تزریقی درون یک فالکون استریل ریخته و ورتکس می‌کنیم. برای استریل کردن محلول از فیلتر سرسرنگی ۰,۲۲ میکرومتر استفاده شد و سپس در میکروتیوب تقسیم شد و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.
- ✓ ایزوپروپیل بتا-دی-۱- تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG)
- کاربرد: Isopropyl B-D-1- thiogalactopyranoside یا IPTG یک آنالوگ شیمیایی لاکتوز است که اپرون Lac را القا میکند و منجر به بیان پروتئینی میشود که ژن آن تحت کنترل اپراتور Lac است.

- آماده سازی: محصول به صورت پودر است. ۰,۲۴ گرم از پودر را به ۱۰ میلی لیتر آب تزریقی درون یک فالكون استریل ریخته و ورتکس میکنیم. برای استریل کردن محلول از فیلتر سرسرنگی ۰,۲۲ میکرومتر استفاده شد و سپس در میکروتیوب تقسیم شد و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

## روش کار

- (۱) ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری BL21 حاوی پلاسمید منتخب به ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت مایع LB Broth حاوی کانامایسین منتقل شد.
- (۲) در فالكون کاملاً بسته شد و یک شبانه روز در ۳۷°C گرماگذاری و شیک گردید.
- (۳) روز بعد به منظور بهینه سازی بیان پروتئین از لحاظ زمان، دما و غلظت IPTG بررسی گردید.
- (۴) بدین منظور ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت حاوی کانامایسین توسط ۵ میلی لیتر از باکتری که شب قبل کشت داده شده بود، تلقیح شد و در انکوباتور ۳۷°C برای رسیدن به جذب ۰,۵ در ۶۰۰ نانومتر گرماگذاری گردید.
- (۵) سپس ۵ میلی لیتر از این محیط تلقیح شده را به منظور بررسی زمان، دما و غلظت مناسب تهیه کرده و گرماگذاری می کنیم.
  - غلظت IPTG: ۰,۳,۰,۵,۰,۸,۱ میلی مولار
  - دما: ۱۸,۲۵,۳۷ درجه سانتی گراد
  - زمان: ۳,۴,۵,۶ ساعت (برای ۳۷ درجه) و ۱۲,۱۴,۱۶ ساعت (برای ۲۵ و ۱۸ درجه سانتی گراد)
- (۶) سپس تمام نمونه ها پس از اتمام گرماگذاری در دور ۵۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محیط رویی و رسوب به صورت جداگانه جمع آوری شد.
- (۷) بهترین شرایط برای بهینه سازی بیان پروتئین توسط الکتروفورز SDS-PAGE انجام می شود.

## ۱۴-۲. الکتروفورز<sup>۱</sup> SDS-PAGE

از این روش برای جداسازی مخلوط پروتئین های حاصل از تجزیه ی یک سلول می توان استفاده نمود. در این روش در حضور سدیم دو دسیل سولفات (SDS)، به عنوان نوعی دترجنت، پروتئین ها دناتوره می شوند. بعد از اضافه کردن SDS و احاطه شدن پروتئین ها توسط آن، پروتئین ها بار نسبتاً همسان پیدا کرده و به صورت خطی در می آیند؛ بدین ترتیب جداسازی فقط بر اساس اندازه صورت می پذیرد. در SDS-PAGE از دو ژل مجزا استفاده می گردد؛ ژل متراکم کننده<sup>۲</sup> و ژل جدا کننده<sup>۳</sup>. ژل متراکم کننده بر روی ژل جدا کننده قرار می گیرد و چاهک های لازم برای نمونه ها در این بخش ایجاد می شوند.

<sup>۱</sup> Sodium Dodecyl-Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis: **SDS-PAGE**

<sup>۲</sup> Stacking gel

<sup>۳</sup> Resolving gel

پس از رسیدن و جمع شدن نمونه‌ها در حد فاصل دو ژل، پروتئین‌ها وارد ژل جدا کننده شده و بر مبنای تفاوت در اندازه از هم جدا می‌گردند (Ulrich K. Laemmli, 1970).

## مواد لازم

### ✓ استوک اکریل آمید

- **کاربرد:** پلی اکریل آمید نقش بسیار تعیین کننده برای تفکیک و جداسازی پروتئین‌ها از یکدیگر دارد. دامنه وزنی قابل تفکیک با توجه به قطر منافذ موجود در این ژل مشخص می‌شود که قطر این منافذ بستگی به غلظت دو جز سازنده آن (آکریل آمید و بیس آکریل آمید) دارد.

- **آماده سازی:** ۳۰ گرم آکریل آمید و ۰,۸ گرم بیس آکریل آمید در ۱۰۰ میلی لیتر آب حل شد و با کاغذ واتمن صاف گشت. این استوک در ظرف تیره‌ی پوشیده با فویل در یخچال نگهداری شد.

### ✓ بافر ژل پایین (ژل جداکننده)

- **کاربرد:** نقش این بافر جداکردن پروتئین‌ها براساس اندازه ملکولی است.

- **آماده سازی:** ۱۸,۲ گرم تریس باز در ۷۰ میلی لیتر آب حل شد و پس از تنظیم pH محلول به وسیله HCl روی ۸,۸، مقدار ۰,۴ گرم SDS به آن اضافه گردید و به حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و در یخچال نگهداری شد.

### ✓ بافر ژل بالا (ژل متراکم کننده)

- **کاربرد:** نقش این بافر خطی کردن همه پروتئین‌های نمونه در چاهک‌ها است تا همه نمونه در یک زمان وارد ژل پایین بشوند.

- **آماده سازی:** ۶,۱ گرم تریس بازی در ۷۰ میلی لیتر آب حل شد و پس از تنظیم pH روی ۶,۸، مقدار ۰,۴ گرم SDS به آن اضافه گردید و به حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و در یخچال نگهداری شد.

### ✓ بافر نمونه پروتئین 5X

- **کاربرد:** برای آماده سازی نمونه در SDS-PAGE بافر نمونه را با نسبت خاصی به نمونه می‌افزایند. SDS یک دترجنت آنیونی می‌باشد که با اتصال به نواحی هیدروفوب پروتئین‌ها آن‌ها را دلتانوره می‌کند. در واقع مولکول SDS با اتصال به پروتئین‌ها بار طبیعی آن‌ها را می‌پوشاند و توزیع یکنواختی از بارهای منفی بر روی آن ایجاد می‌نماید. در نتیجه این اتفاق، جداسازی پروتئین‌ها تنها بر اساس وزن مولکولی‌شان صورت می‌گیرد.

- **آماده سازی:** ۱۰ میلی لیتر از بافر ژل متراکم کننده، ۵ میلی لیتر گلیسرول، ۱ گرم SDS، ۲۰۰ میکرولیتر محلول بروموفنول بلو (۰,۵ درصد در متانول) و ۱ میلی لیتر ۲-مرکاپتواتانول مخلوط گردید و سپس به حجم ۲۰ میلی لیتر رسانده و در یخچال نگهداری شد.

### ✓ محلول آمونیوم پرسولفات<sup>۱</sup> (APS):

- **کاربرد:** پلیمریزاسیون شیمیایی آکریل آمید را تسهیل و با حل شدن پرسولفات آمونیوم، رادیکال‌های آزاد شده پرسولفات، مونومر آکریل آمید را فعال می‌کند. مونومرهای آکریل آمید فعال شده می‌توانند با مونومرهای غیرفعال واکنش داده و یک زنجیره ی پلیمری بلند تولید کنند. زنجیره‌های پلیمری بلند آکریل آمید به طور

<sup>۱</sup> Ammonium Persulfate: APS

تصادفی با پله‌ای عرضی بیس آکریل آمید بهم متصل می‌شوند تا شبکه‌ای از زنجیره‌های پلی آکریل آمید را تشکیل دهد.

- **آماده سازی:** ۰,۱ گرم پودر آمونیوم پرسولفات در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و در یخچال نگهداری گردید (بهتر است این محلول تازه تهیه گردد).

✓ تمد ۱۰٪

- **کاربرد:** پلیمریزاسیون شیمیایی آکریل آمید را تسهیل می‌کند. به عنوان کاتالیزور برای تسریع واکنش پلیمریزاسیون به دلیل توانایی آن در حمل الکترون اضافه می‌شود.

- **آماده سازی:** ۱۰۰ میکرولیتر از تمد را به ۹۰۰ میکرولیتر آب یون زدایی شده در میکروتیوب ۱,۵ میلی لیتر اضافه کرده و سپس ورتکس می‌کنند.

✓ بافر تانک SDS-PAGE

- **کاربرد:** برای حرکت پروتئین در بستر ژل نقش ضروری دارد.
- **آماده سازی:** برای تهیه‌ی این بافر مواد ذکر شده در جدول زیر در ۱ لیتر آب حل شد (نیازی به تنظیم pH نمی‌باشد).

جدول ۲-۱۱. مواد مورد نیاز برای تهیه بافر تانک

نام	نام علمی	مقدار (گرم)
تریس - باز	Tris- base	۳
گلیسین	Glycin	۱۴,۴
سدیم دو دسیل سولفات	SDS	۱

## روش کار

- (۱) صفحات شیشه‌ای (spacer)، گیره‌ها و شانه مورد استفاده برای ایجاد چاهک را شسته و با اتانول مطلق تمیز کردیم.
- (۲) دو صفحه‌ی شیشه‌ای ما بین گیره‌ها قرار گرفته و بر روی دستگاه نگهدارنده ثابت شدند.
- (۳) منافذ اطراف کاست را با آگارز غلیظ بسته شد تا از نشت مواد به بیرون جلوگیری گردد.
- (۴) درون کاست با آب پر شد و پس از عدم نشتی آب، با کاغذ صافی خشک گردید.
- (۵) بعد از تهیه‌ی ژل پایین، آن را درون کاست ریخته و برای از بین بردن حباب روی ژل، به آن ۵۰۰ میکرولیتر الکل ایزوپروپانول اضافه گردید.
- (۶) بعد از بستن ژل پایین، الکل را خالی نموده و با آب مقطر شستشو و با کاغذ صافی خشک کردیم.
- (۷) ژل بالا را داخل کاست ریخته و شانه‌ها را داخل آن قرار داده شد.
- (۸) پس از پلیمریزه شدن ژل متراکم کننده شانه از فضای بین دو شیشه خارج گردید و شیشه‌های جداکننده در دستگاه الکتروفورز عمودی قرار داده شد.

۹) تانک الکتروفورز با بافر تانک پر گردید.

۱۰) حباب‌های پائین کاست توسط سرنگ خارج گردید.

۱۱) مقدار ۳۲ میکرولیتر از نمونه مورد نظر با ۸ میکرولیتر از بافر نمونه در میکروتیوب مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوشانده شدند و در نهایت در چاهک‌های ژل ریخته شدند. در کنار نمونه‌ها مقدار ۲ میکرولیتر از مارکر پروتئین نیز در داخل یکی از چاهک‌ها ریخته شد.

۱۲) ولتاژ لازم جهت حرکت پروتئین در ژل بالا، یعنی فاز Stacking، ۱۴۰ میلی‌ولت و در ژل پایین یعنی فاز Resolving، ۱۲۰ میلی‌ولت می‌باشد.

۱۳) الکتروفورز تا زمان رسیدن خط نشانه‌ی آبی رنگ به انتهای ژل ادامه یافت و سپس دستگاه خاموش گردید (حدود ۹۰ دقیقه).

۱۴) ژل به آرامی از فضای بین دو شیشه خارج شد.

۱۵) به منظور از بین بردن SDS، ژل یک بار به مدت ۳۰ ثانیه جوشیده و سپس رنگ‌آمیزی شد.

جدول ۲-۱۲. مواد لازم برای تهیه ژل بالا و پائین

مواد مورد نیاز	ژل بالا ۴٪ (میکرولیتر)	ژل پایین ۱۵٪ (میکرولیتر)
بافر ژل بالا	۶۲۵	-
بافر ژل پایین	-	۱۵۰۰
استوک آکریل آمید	۴۰۵	۲۴۵۰
آب مقطر	۱۴۵۰	۲۰۵۰
آمونیم پر سولفات	۶۰	۱۰۰
تمد	۲۰	۳۰
حجم نهایی	۲۵۶۰	۶۱۳۰

## ۲-۱۴-۱. رنگ‌آمیزی ژل پلی آکریل آمید با کوماسی بلو R-250

رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها در ژل پلی آکریل آمید با روش‌های متنوعی امکان‌پذیر است. کوماسی بلو (انواع R و G) و نقره از پر استفاده‌ترین مواد برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها هستند. در اینجا رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو که بسیار متداول می‌باشد، توضیح داده می‌شود.

### مواد لازم

✓ رنگ کوماسی بلو R-250

- کاربرد: کوماسی بلو R-250 معمولترین رنگ برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها است. حساسیت این روش ۰.۵-۰.۲ میکروگرم پروتئین در هر باند می‌باشد.

- آماده سازی: مقدار ۸۰ میلی گرم از پودر کوماسی بریلیانت بلو G250 به مدت ۳ ساعت در ۱ لیتر آب یون زدایی شده با کیفیت بالا مخلوط شد و سپس ۳ میلی لیتر HCL خالص به آن اضافه گردید. محلول به مدت چند دقیقه روی استریل مخلوط گردید و سپس در جای تاریک قرار گرفت.

## روش کار

- (۱) ژل جداکننده در داخل ظرف استریلی که با اتانول مطلق شسته شده بود، قرار داده شد. برای شفاف شدن ژل یک بار آن را در آب جوش به مدت ۳۰ ثانیه جوشانده سپس آب را خالی کرده و محلول آماده‌ی کوماسی بلو روی ژل ریخته شد.
- (۲) ظرف حاوی ژل به مدت ۲ ساعت برای رنگ شدن روی شیکر قرار داده شد.

## ۲-۱۴-۲. رنگبری ژل پلی آکریل آمید به منظور مشاهده‌ی باندهای پروتئین

### مواد لازم

- ✓ محلول رنگبر
- کاربرد: جهت از بین بردن رنگ بستر ژل و نمایش واضح باندهای پروتئینی استفاده می‌شود.
- آماده سازی: ۲۰۰ میلی لیتر متانول، ۱۰۰ میلی لیتر استیک اسید به همراه آب مقطر باهم ترکیب می‌کنیم.

## روش کار

- (۱) رنگ کوماسی بلو از داخل ظرف خارج شد و ۲۰۰ میلی لیتر از محلول رنگبری بر روی ژل ریخته و ظرف حاوی ژل روی شیکر قرار داده شد.
- (۲) در ابتدا که محلول رنگبری سریع آبی می‌شود باید در فواصل زمانی کوتاه محلول را با ۲۰۰ میلی لیتر محلول تازه تعویض کرد.
- (۳) رنگبری ژل تا کمرنگ شدن رنگ آبی زمینه‌ی ژل و ظاهر شدن باندهای پروتئینی باید ادامه دارد.

## ۲-۱۵. استخراج پروتئین

جهت بررسی صحت و کمیت بیان ژن، در ابتدا می‌بایست غشای باکتری لیز شده و پروتئین‌های آن استخراج شوند تا به کمک ژل الکتروفورز SDS-PAGE و در ادامه وسترن بلات بتوان بیان ژن مورد نظر را به طور اختصاصی مورد بررسی قرار داد. به همین منظور لازم بود تا مراحل استخراج پروتئین نو ترکیب بهینه سازی گردد تا بتوان با حداکثر لیز سلول باکتری به بیشترین مقدار پروتئین مورد نظر



نیز دست پیدا کرد. در همین راستا ابتدا بافرهای لیز متفاوتی برای تجزیه‌ی غشای باکتری بررسی شدند، که این بافرهای لیز در نوع و مقدار دترجنت متفاوت بودند. پس از انتخاب مناسب‌ترین بافر، زمان و شدت سونیکاسیون و ورتکس نیز بهینه‌سازی گردید (Itakura K. et al. 1977).

## مواد لازم

- ✓ محیط کشت LB
- ✓ استوک باکتری منتقل شده
- ✓ آنتی بیوتیک کانامایسین
- ✓ IPTG

## روش کار

- (۱) ۵۰ میکرولیتر از استوک باکتری BL21 حاوی پلاسمید ، به ۵ میلی‌لیتر محیط LB حاوی ۵ میکرولیتر کانامایسین (با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) تلقیح گشت و به صورت شبانه در انکوباتور شیکردار قرار داده شد.
- (۲) کشت شبانه به ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین اضافه گشت تا به جذب نوری ۰,۵ در ۶۰۰ نانومتر رسد.
- (۳) ۵ میلی‌لیتر IPTG با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار (غلظت ۰,۷ میلی‌مولار در هر میلی‌لیتر) به مجموعه‌ی قبلی اضافه گشت و سپس به مدت ۴ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷C ، قرار گرفت.
- (۴) هر ۳۵ میلی‌لیتر از کشت درون یک فالكون ۵۰ ریخته شد و با دور ۴۰۰۰ g به مدت زمان ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گشت.
- (۵) مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله برای ادامه کار نگهداری شد.
- (۶) در هر فالكون در حدود ۲,۵ میلی‌لیتر از بافر لیز کننده اضافه شد (۷۵۰ میکرولیتر از بافر لیز به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر از کشت) و ۲ ساعت روی یخ گرماگذاری شد. در این مدت، مرتباً ورتکس انجام گشت.
- (۷) سانتریفیوژ با دور ۹۰۰۰ g به مدت ۲۵ دقیقه انجام گردید. محیط رویی که حاوی پروتئین نوترکیب و سایر پروتئین‌های محلول بود، جدا گردید و جهت تخلیص نگهداری شد.

## ۱۵-۱-۲. بررسی تأثیر بافرهای لیز متفاوت بر بازدهی استخراج P1,P2,P3

### روش کار

- (۱) ۳ بافر لیز مختلف مورد بررسی قرار گرفتند که محتویات هر کدام و به ترتیب استفاده در جدول ۱۲-۲ ذکر شده است.

جدول ۲-۱۳. ترکیبات بافرهای لیز متفاوتی که برای لیز باکتری مورد استفاده قرار گرفتند.

انواع روش تخلیص پروتئین	مواد تشکیل دهنده بافر شتسو
طبیعی <sup>۱</sup>	۲۰۰ NaCl میلی مولار، NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O ۱۰۰ میلی مولار، ایمیدازول (۱۰ تا ۵۰۰ میلی مولار)
هیبرید	۲۰۰ NaCl میلی مولار، تریس باز ۱۰ میلی مولار، NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O ۱۰۰ میلی مولار، ایمیدازول (۱۰ تا ۵۰۰ میلی مولار)
دناچوره (بافر اوره با شیب pH)	۲۰۰ NaCl میلی مولار، تریس باز ۱۰ میلی مولار، NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O ۱۰۰ میلی مولار، اوره ۸ مولار (pH مختلف)

۲) مقدار کافی از رسوب باکتری به دست آمده که در ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شده بود، از فریزر خارج شد و پس از ذوب شدن در ۱ میلی لیتر از بافرهای لیز مختلف به صورت سوسپانسیون در آمد.

۳) محتویات ویالها بر روی یخ به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شدند.

۴) در ادامه، سوسپانسیون سلولهای باکتری در بافرهای لیز متفاوت بر روی یخ سونیکه شدند. برنامه‌ی سونیکاسیون شامل ۳ مرحله سونیکاسیون بود، که در هر مرحله ۳۰ ثانیه سونیکاسیون و ۳۰ ثانیه استراحت اجرا گردید (کل مدت زمان سونیکاسیون ۹۰ ثانیه بود).

۵) البته یک سری از همه نمونه‌ها هم بدون سونیکاسیون بود و فقط در بازه زمانی ۹۰ دقیقه که روی یخ گرماگذاری بودند، ورتکس شدند.

۶) محلول حاوی سلولهای تجزیه شده که به صورت سوسپانسیون در آمده بودند، به مدت ۲۵ دقیقه و با شتاب ۹۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتیگراد، سانتریفیوژ شدند؛ مایع رویی جمع‌آوری شد و برای انتخاب بهترین بافر لیز کننده، شرایط سونیکاسیون و ورتکس، الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد.

۷) پس از انتخاب مناسب ترین بافر لیز کننده که بیشترین بازده را در استخراج کارآمد پروتئین نوترکیب نشان داده بود، نمونه برای تخلیص پروتئین نوترکیب بر روی ستون تمایلی نیکل برده شد.

## ۲-۱۶. تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون تمایلی

### نیکل<sup>۲</sup> (IMAC)

پروتئین‌های بیان شده در این مطالعه دارای ۲ قطعه His-tag در هر دو انتهای C-terminal و N-terminal خود می‌باشد و وجود این پپتیدهای نشانه امکان اتصال پروتئین نوترکیب را به ستون دارای

<sup>1</sup> Native

<sup>2</sup> Immobilized Metal Affinity Chromatography: IMAC

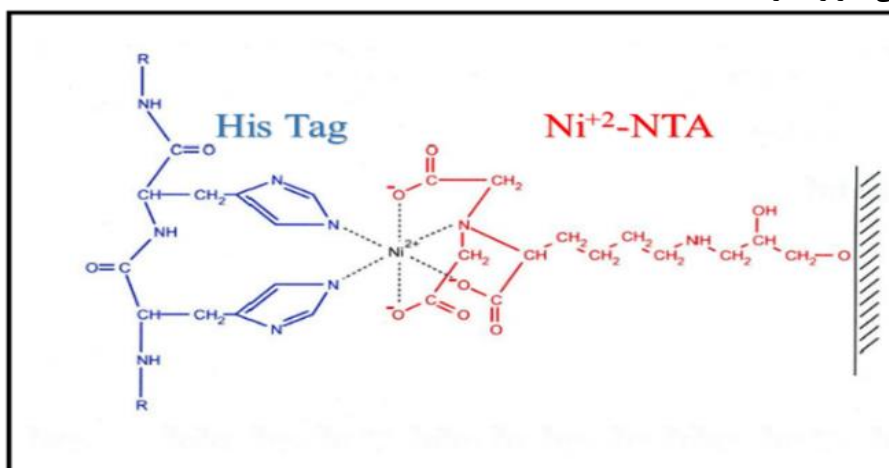
کاتیون‌های نیکل فراهم می‌سازد. پیش از اتصال، پروتئین را می‌توان با استفاده از بافرهایی با pH پایین و یا بافرهایی که دارای ایمیدازول هستند و در اتصال به پروتئین با کاتیون‌های ستون رقابت می‌کنند، از ستون استخراج نمود. برای جداسازی از روش کروماتوگرافی تمایلی استفاده شده. این ستون شامل رزین باردار شده با کاتیون‌های نیکل است (Porath & Olin, 1983).

## مواد لازم

✓ ستون کروماتوگرافی

✓ رزین نیکل (Ni-NTA Agarose)

- کاربرد: این رزین‌ها برای خالص‌سازی پروتئین‌های دارای دنباله هیستیدینی با راندمان بالا در کروماتوگرافی تمایلی کاربرد دارند.



تصویر ۲-۲. نمایش چگونگی اتصال رزین نیکل به برجسب هیستیدینی موجود در پروتئین‌های نوترکیب

- آماده‌سازی: حدود ۲ میلی لیتر از رزین نیکل داخل ستون کروماتوگرافی ریخته شد و ۳ مرتبه با اتانول ۵۰٪ شستشو داده شد (این ستون می‌تواند در الکل ۲۰٪ و دمای ۴°C نگهداری میشود).

✓ بافر متعادل سازی

- آماده‌سازی: مواد ذکر شده را در یک لیتر آب یون زدایی شده حل کرده و با pH آن را تنظیم می‌کنیم.

- NaCl ۲۰۰ میلی مولار
- تریس باز ۱۰ میلی مولار
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ۱۰۰ میلی مولار
- اوره ۸ مولار

✓ اتانول ۵۰٪

- ۱) ابتدا ستون با پنج برابر حجم ظرفیت ستون (ظرفیت ستون، به مقدار رزین موجود در ستون اطلاق می‌گردد.) با آب شستشو داده شد.
- ۲) مرحله‌ی متعادل سازی: ۵ میلی لیتر از بافر لیزات استفاده شده در مراحل قبل، به ستون اضافه گردید و ستون به مدت ۳۰ دقیقه بسته شد تا به تعادل رسد. سپس ستون باز گردید و بافر متعادل کننده از ستون عبور نمود.
- ۳) مرحله‌ی بارگذاری: ۳ تا ۵ مرتبه، فاز محلول پروتئینی (که در مرحله‌ی ۲-۱۶-۱ جمع‌آوری گشته بود) را از ستون عبور داده و مایع خروجی جمع‌آوری گردید.
- ۴) مرحله‌ی شستشو و استخراج پروتئین: به منظور حذف پروتئین‌هایی که احیاناً به صورت غیر اختصاصی به سطح رزین متصل شده‌اند از بافر اوره با pH (۶,۳ و ۵,۹) استفاده شد و ستون با آن شستشو داده شد.
- ۵) به منظور خروج پروتئین نو ترکیب متصل شده به سطح رزین، از ۵ میلی لیتر بافر اوره با pH=۵,۲ استفاده شد.
- ۶) در مرحله بعد به منظور شستشوی ستون از pH=۴,۵ استفاده شد.
- ۷) همه خروجی‌های ستون جمع‌آوری و در ۴°C نگهداری شدند.
- ۸) در انتها، ستون با ۱۰-۵ میلی لیتر آب مقطر شسته شد و در الکل ۲۰٪ نگهداری گردید.

## ۱۷-۲ دیالیز پروتئین

جهت تعویض بافر پایه نمونه مورد نظر (از لحاظ غلظت و pH) دیالیز انجام می‌شود. به دلیل حل شدن پروتئین در بافر حاوی اوره‌ی ۸ مولار با pH اسیدی، پروتئین ساختار دوم و سوم خود را از دست داده و به فرم ساختار اول درمی‌آید؛ بنابراین، برای به دست آوردن ساختمان سه بعدی پروتئین احتیاج به دیالیز برای ایجاد شرایط فیزیولوژیک می‌باشد.

### مواد لازم

- ✓ کیسه دیالیز
- ✓ بافرهای دیالیز پروتئین
- آماده سازی: برای تهیه‌ی این بافر، مواد زیر در ۲۰۰ میلی لیتر آب یون زدایی شده حل شد و پس از تنظیم pH مورد نظر، به حجم نهایی ۲۵۰ میلی لیتر رسانده شد.

جدول ۲-۱۴. مواد مورد نیاز برای تهیه بافرهای دیالیز

نام مواد	نام علمی	مقدار
سدیم فسفات مونوبازیک. دوآبه	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	۱۰۰ میلی مولار برابر با ۳,۹ گرم
تریس - باز	Tris-base	۱۰ میلی مولار برابر با ۰,۳ گرم
کلرید سدیم	NaCl	۲۰۰ میلی مولار برابر با ۲,۹۲ گرم
اورره	Urea	۶ مولار برابر با ۹۰,۰۹ گرم در $\text{pH}=6$ ۴ مولار برابر با ۶۰,۰۶ گرم در $\text{pH}=7,2$

## روش کار

- پروتئین درون کیسه دیالیز، در بافر دیالیز شامل ۶ مولار اوره با  $\text{pH}=6$  قرار گرفت و درون یخچال بر روی استریلر به مدت ۷-۱۲ ساعت، در دمای  $4^\circ\text{C}$  بهم خورد.
- پروتئین درون کیسه دیالیز، در بافر دیالیز شامل ۴ مولار اوره با  $\text{pH}=7,4-7,2$  قرار گرفت و درون یخچال بر روی استریلر به مدت ۷-۱۲ ساعت، بهم خورد.

## ۱۸-۲. تغلیظ پروتئین به وسیله ستون آمیکون

به منظور تغلیظ پروتئین و کاهش حجم پروتئین بدست آمده از فیلتر آمیکون ۳ کیلو دالتونی استفاده شد.

### مواد لازم

- ✓ ستون آمیکون
- کاربرد: ستونهای اولترافیلتراسیون آمیکون یک روش سریع و قابل اعتماد برای تغلیظ پروتئین-ها و سایر مولکول های زیستی می باشد.
- ✓ بافر PBS

## روش کار

- ۵ میلی لیتر بافر PBS درون فیلتر ریخته شد و با دور  $4000\text{g}$  به مدت ۲۰ دقیقه، سانتریفیوژ گردید.
- پروتئین داخل بخش بالایی ستون آمیکون ریخته شد و با دور  $4000\text{g}$  به مدت ۲۰ دقیقه، سانتریفیوژ گردید.
- پروتئین تغلیظ شده پس از تعیین غلظت با روش برادفورد، در میکروتیوب ۱,۵ تقسیم گشت و در فریزر  $-80$  نگهداری شد.

۴) در انتها، دو مرتبه فالكون با PBS شسته شد و درون فالكون را با الكل ۲۰٪ پر گردید و نگهداری شد.

۵) در نهایت فراکشن هایی خروجی از ستون برای تخلیص پروتئین نو ترکیب به صورت خالص توسط الکتروفورز SDS-PAGE تأیید شدند.

## ۱۹-۲. سنجش غلظت پروتئین

یکی از راه های تعیین غلظت پروتئین، روش برادفورد می باشد که بر پایه ی تشکیل کمپلکس بین رنگ آبی کوماسی G250 و پروتئین های موجود در محلول، می باشد (Marion Bradford, 1976).

### مواد لازم

✓ محلول برادفورد

• کاربرد: معرف رنگی کوماسی بلو با اسید آمینه های بازی و آروماتیک از قبیل آرژنین، لیزین، تریپتوفان، تیروزین، هیستیدین و فنیل آلانین موجود در پروتئین ها واکنش می دهد.

• آماده سازی: ۱۰۰ میلی گرم از رنگ کوماسی بلو G250، ۵۰ میلی لیتر از الكل ۹۶ درصد، به صورت شبانه بر روی استیرر باهم مخلوط گشت و روز بعد ۱۰۰ میلی لیتر از فسفریک اسید را به آن ها اضافه کرده و سپس به حجم نهایی ۱ لیتر رسانده شد. در نهایت از کاغذ صافی عبور داده و در ظرف تاریک نگهداری شد.

✓ پروتئین BSA با غلظت های مختلف ۰,۲۵,۰,۵,۱,۲ میلی گرم

• آماده سازی: ۲ میلی گرم از BSA را وزن کرده در ۱ میلی لیتر آب یون زدایی شده حل می کنیم. سپس از استوک بدست آمده رقت های ۰,۵,۰,۲۵ و ۱ را تهیه می کنیم.

### روش کار

۱) پس از تهیه محلول برادفورد برای بدست آوردن معادله استاندارد، با پروتئین BSA نمودار استاندارد کشیده شد و فرمول لازم جهت تعیین غلظت، با نرم افزار اکسل به دست آمد (بدین صورت که ۱۰۰ میکرولیتر از برادفورد در ۸ چاهک الیزا ریخته و ۱۰ میکرولیتر از پروتئین BSA با غلظت های مختلف به صورت دوتکرار به این چاهک ها اضافه گردید و جذب نوری آن ها در ۴۰۵ به ۶۰۰ نانومتر خوانده شد).

## ۲۰-۲. تأیید پروتئین P1,P2,P3 به وسیلهی فناوری وسترن بلات

وسترن بلات فناوری است که در آن یک پروتئین خاص که در مجموعه‌ای از پروتئین‌های جدا شده از سلول‌ها می‌باشد، قابل تمایز می‌گردد. این فناوری شامل سه مرحله‌ی اصلی می‌باشد: مرحله‌ی اول که در آن پروتئین‌ها بر اساس اندازه خود جدا می‌گردند، مرحله‌ی دوم شامل انتقال پروتئین‌ها به کاغذ و مرحله‌ی آخر استفاده‌ی مناسب از پادتن‌های اولیه و ثانویه مناسب برای پدیدار شدن پروتئین می‌باشد (Jaime Renart, 1979).

### مواد لازم

#### ✓ کاغذ(غشا) نیتروسولوز

- **کاربرد:** این کاغذ دارای قدرت اتصال و حساسیت بالا است. اندازه منافذ این نوع کاغذ ۰,۴۵-۰,۵ میکرون متغیر است. هرچه اندازه منافذ یک غشا کوچک‌تر باشد سطح مخصوص و ظرفیت اتصال آن بیشتر خواهد بود.
- **آماده سازی:** کاغذ نیترو سلولز را قبل از استفاده در بافر انتقال خیس می‌کنیم.

#### ✓ بافر انتقال

- **کاربرد:** بافر وسترن بلات دو خاصیت اصلی دارد: ۱. افزایش شستشوی پروتئین‌ها از ماتریکس ژل ۲. تسهیل نمودن اتصال کارآمد همه پروتئین‌های نمونه به غشاء
- **آماده سازی:** برای تهیه‌ی این بافر، مواد زیر در آب مقطر حل و به حجم نهایی به ۱ لیتر رسانده شد. برای پروتئین‌های بزرگتر از ۸۰ کیلودالتون، ۰,۱ درصد SDS به محلول‌ها اضافه می‌گردد.

○ تریس - باز: ۳,۰۲ گرم

- **کاربرد:** بافر تریس انتخاب خوبی برای اکثر سیستم‌های بیولوژیکی است زیرا دارای pKa تقریباً ۸,۱ در دمای ۲۵C است. این محدوده pH برای اکثر فرآیندهای بیولوژیکی مناسب است.

○ گلیسین: ۱۴,۴ گرم

- **کاربرد:** گلیسین کمک می‌کند تا SDS را از پروتئین‌ها خارج کنند زیرا ترک SDS از ژل باعث میشود تا ژل بتواند بهتر به غشای بچسبند.

○ متانول: ۲۰۰ میلی لیتر

- **کاربرد:** متانول موجود در بافر انتقال به جلوگیری از تورم ژل کمک می‌کند و کارایی اتصال پروتئین به غشاها (به ویژه نیتروسولوز) را بهبود می‌بخشد. با این حال، همچنین می‌تواند باعث کاهش اندازه منافذ ژل، تغییرات بار پروتئین و رسوب پروتئین شود.

#### ✓ شیر خشک بدون چربی ۵٪

- **آماده سازی:** ۰,۵ گرم از شیرخشک را در ۱۰ میلی لیتر بافر PBS حل کرده و می‌گذاریم روی شیکر بهم بخورد.

#### ✓ پادتن ضد برچسب هیستیدینی متصل به HRP<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> Horseradish peroxidase

- **آماده سازی:** ۱ میکرولیتر از پادتن ضد برجسب هیستیدینی متصل به HRP به ۵ میلی لیتر PBS اضافه کرده و به آرامی بهم میزنیم و در یک ظرف تیره در یخچال نگهداری می شود.
- ✓ **ECL<sup>۱</sup>**
- **کاربرد:** این سوبسترا حساسیت بالای دارد و میتواند مقدار پیکوگرم از پادکن را تشخیص دهد و با استفاده از روش عکسبرداری یا دیگر روش ها قابلیت نشان دادن حضور HRP را دارد.
- **آماده سازی:** این محلول به صورت دو سوبسترا وجود دارد که در زمان استفاده باید به نسبت برابر با هم ترکیب شود و استفاده گردد. این محلول حساس به نور است و باید در ظرف تیره نگهداری شود.
- ✓ **بافر PBS**
- **آماده سازی:** برای تهیه این بافر تمام مواد ذکر شده در جدول زیر را در یک لیتر آب یون زدایی شده ریخته و می گذاریم روی استیر تا کاملا حل شود. (pH این بافر باید ۷٫۲-۷٫۴ باشد).

جدول ۲-۱۵. مواد لازم برای تهیه بافر PBS

نام ماده	نام علمی	غلظت نهایی (میلی مولار)	مقدار (گرم)
کلرید سدیم	NaCl	۱۳۷	۹-۸
سدیم فسفات مونوبازیک	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	۱۰	۱٫۴۴
کلرید پتاسیم	KCl	۲٫۷	۰٫۲۴
پتاسیم فسفات	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	۱٫۸	۰٫۲۴

- ✓ **بافر PBST**
- **آماده سازی:** به بافر PBS, توئین ۲۰ به نسبت ۰٫۰۵٪ اضافه می شود. به دلیل چگالی بالای توئین، اجازه می دهیم روی استیر با مگنت بهم بخورد تا توئین کاملا در PBS حل شود.

## روش کار

- (۱) بعد از انجام الکتروفورز SDS-PAGE ژل از کاست جدا گردید و به مدت ۱۰ دقیقه درون آب مقطر و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در بافر انتقال قرار داده شد. همچنین، پدهای ابری به مدت ۲۰ دقیقه در بافر انتقال قرار داده شد.
- (۲) ژل SDS، کاغذ صافی و غشا نیتروسولوز را در اندازه های مورد نظر بریده (اندازه ی ژل و غشای نیتروسولوز برابر هم و اندازه ی کاغذ صافی معمولا کمتر از آن دو می باشد). و سپس کاغذ صافی و غشای نیتروسولوز، به مدت ۱۰ دقیقه درون بافر انتقال خیس گردید (در مرحله ی چیدن ساندویچ وسترن، رعایت این نکته که دو فرآیند خیس کردن و حباب گیری همزمان و به صورت مداوم انجام گیرد، حائز اهمیت می باشد).

<sup>۱</sup> Electro Chemi Luminescence: ECL



- ۳) برای چیدن ساندویچ، ابتدا سه عدد کاغذ صافی نازک روی پد اسفنجی قرار گرفت و حباب‌گیری انجام شد. سپس ژل روی آن قرار داده شد و بر روی آن غشا نیتروسولولز را قرار گرفت. سه کاغذ صافی نازک دوم را روی کاغذ قرار داده و پد اسفنجی که کاملاً خیس است روی آن گذاشته و کاست را با چندین کش محکم بسته شد.
- ۴) ساندویچ فوق را طوری درون تانک قرار گرفت که غشا نیتروسولولزی به سمت قطب مثبت (قرمز رنگ) و ژل به سمت قطب منفی (مشکی رنگ) قرار گیرند. درون تانک از بافر انتقال پر گشته و ساندویچ در ظرف حاوی یخ (جهت اعمال دمای ۴°C) قرار گرفت. قطب مثبت تانک به قطب مثبت پاور و قطب منفی تانک را به قطب منفی پاور متصل گردید. میلی آمپر پاور روی ۳۰۰ به مدت ۹۰ دقیقه تنظیم شد (یا ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۹۰ دقیقه).
- ۵) بعد از گذشت این زمان، غشا درون شیر خشک بدون چربی ۰.۵٪ به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق غوطه‌ور شد تا مسدود سازی اتفاق افتد.
- ۶) غشا دو مرتبه با PBST و یک مرتبه با PBS مورد شست و شو قرار گرفت.
- ۷) غشا درون پادتن ضد برچسب هیستیدینی متصل به HRP (حساس به نور)، با رقت ۱/۵۰۰۰ قرار گرفت و به مدت ۱ ساعت روی شیکر قرار گرفت.
- ۸) غشا دو مرتبه با PBST و یک مرتبه با PBS مورد شست و شو قرار گرفت.
- ۹) از ECL که دارای دو معرف A و B می‌باشد به نسبت مساوی با یکدیگر مخلوط کرده و در تاریکی روی کاغذ نیتروسولولز ریخته و سپس عکس برداری انجام شد.

## ۲۱-۲. الایزا برای تأیید پروتئین نو ترکیب تخلیص شده با پادتن ضد برچسب هیستیدینی متصل به HRP

جهت تأیید پروتئین های تخلیص شده علاوه بر وسترن , الایزا نیز انجام شد.  
(Eva Engvall and Peter Perlm, 1971).

### مواد لازم

- ✓ پلیت الایزا
- ✓ شیرخشک بدون چربی ۰.۵٪
- ✓ بافر PBS
- ✓ بافر PBST
- ✓ پادتن ضد برچسب هیستیدینی متصل به HRP

## ✓ TMB<sup>۱</sup>

- کاربرد: ۳،۳،۵،۵، تترامتیل بنزیدین (TMB) سوبسترای کروموزنیک برای آنزیم پراکسیداز ترب کوهی (HRP) است. TMB میتواند به عنوان احیا پراکسید هیدروژن به آب توسط آنزیم HRP عمل کند.
  - آماده سازی: این محلول به صورت دو سوبسترا وجود دارد که در زمان استفاده باید به نسبت برابر ترکیب شود و استفاده گردد. این محلول حساس به نور است و باید در ظرف تیره نگهداری شود.
- ✓ اسید ۲ نرمال H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- آماده سازی: ۲ میلی لیتر از اسید ۱۲ نرمال را به ۱۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه و با هم مخلوط می کنیم.

## روش کار

- (۱) پروتئین P1,P2,P3 با غلظت ۱ میکروگرم در ۵۰ میکرولیتر بافر PBS حل شد و در کف چاهک های پلیت الایزا، پوشش دهی گردید و به صورت شبانه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. برای کنترل در دو چاهک فقط PBS پوشش دهی شد.
- (۲) روز بعد، چاهک ها دو مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBST و یک مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBS شسته شده و باقی مانده ی آن ها با ضربه زدن روی دستمال خشک گردید.
- (۳) درون هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر از بافر بلاک کننده حاوی شیرخشک بدون چربی ۰.۵٪ که در PBS حل شده، ریخته شد و به مدت ۹۰ دقیقه درون انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت.
- (۴) چاهک ها، دو مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBST و یک مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBS شسته شده و باقی مانده ی آن ها با زدن روی دستمال خشک گردید.
- (۵) ۵۰ میکرولیتر از پادتن ضد برچسب هیستیدینی متصل به HRP با رقت ۱ به ۵۰۰۰ (رقت با PBS) به صورت دوگانه از هر رقت درون چاهک ها ریخته شد و به مدت ۹۰ دقیقه درون انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت.
- (۶) چاهک ها، دو مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBST و یک مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBS شسته شده و باقی مانده ی آن ها با ضربه زدن روی دستمال خشک گردید.
- (۷) ۵۰ میکرولیتر از TMB به چاهک ها اضافه گشت. روی پلیت با فویل کاملا پوشانده و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت.
- (۸) واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از بافر متوقف کننده به چاهک ها، پایان گرفت.
- (۹) میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گرفته شد.

<sup>۱</sup> Tetra Methyl Benzidine: TMB

## ۲۲-۲. بررسی ساختار دوم پروتئین با استفاده از طیف‌سنجی<sup>۱</sup>CD

اساس این روش بر مبنای میزان زاویه چرخش در زوایای پیوند پپتیدی است. مطالعه دو رنگ نمایی نوری در محدوده فرابنفش دور، در محدوده طول موج ۱۹۰-۲۶۰ نانومتر (Far-UV-CD) که مطابق با جذب پیوندهای پپتیدی است با اسپکتروپلاریمتر Jasco's J-810 انجام شد. هر ساختار دوم با توجه به زاویه چرخش پیوند پپتیدی خود، نوعی منحنی خاص را ایجاد می‌کند.

(Jean-Baptiste Biot, Augustin Fresnel, Aimé Cotton, 1996)

### مواد لازم

- ✓ پروتئین نو ترکیب
- ✓ بافر PBS
- ✓ بافر پایه با غلظت‌های مختلف اوره

### روش کار

- ۱) جهت انجام این تحلیل، ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از هر پروتئین در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار و مولاریته‌های مختلف اوره حل شد.
- ۲) سپس در دستگاه طیف‌سنجی اسپکتروپلاریمتر قرار گرفت.
- ۳) طیف‌های بدست آمده در برابر بافر PBS و بافرهای پایه اوره با مولاریته مختلف (۰, ۱, ۲, ۴, ۶, ۸) به عنوان شاهد، با نرم افزار مخصوص کاهش نویز، اصلاح گردید و بیضی‌واری مولی بدست آمد.
- ۴) داده‌های مربوط برای محاسبه درصد ساختارهای دوم با ساختار پیش بینی شده در پایگاه‌ها، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

## ۲۳-۲. بررسی وجود اندوتوکسین در پروتئین تخلیص شده با استفاده

### از تست<sup>۲</sup> LAL

تست اندوتوکسین یا Bacterial Endotoxin Test که به آن BET نیز گفته میشود روشی آزمایشگاهی است که در آن میزان اندوتوکسین در نمونه بیولوژیک یا در سطوح مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. تست LAL یکی از معروف ترین تست ها برای اندازه گیری مقدار اندوتوکسین باکتریایی در نمونه های

<sup>۱</sup> Circular Dichroism Techniques: CD

<sup>۲</sup> Limulus' Poly Phemus' Amebocyte Lysate: LAL

مختلف در فرایندهای تحقیقاتی و تولیدی است. اصول تست LAL بر مبنای کواگولاسیون آن است که در مایع خارج سلولی یا همولنف خرچنگ نعل اسبی در حضور لیپوپلی ساکارید اتفاق می افتد (Frederick Bang and Jack Levin, 1970). همانطور که گفته شد روش LAL سنتی، روشی کیفی بوده و به جهت کمی سازی تست، تغییراتی در تست اصلی داده شده تا بتوانیم نتایجی دقیق از میزان اندوتوکسین موجود در نمونه به دست بیاوریم. سه روش اصلی سنجش اندوتوکسین که بر مبنای روش LAL توسعه یافته اند عبارتند از:

- روش ژل کلات<sup>۱</sup>
- روش کروموزنیک<sup>۲</sup>
- روش کدورت سنجی<sup>۳</sup>.

## ۲-۲۳-۱. سنجش اندوتوکسین به روش ژل کلات

روش ژل کلات به نظر حساس ترین و دقیق ترین نوع تست LAL بوده و کمترین میزان مثبت کاذب نسبت به سایر روش ها در این روش مشاهده شده است. همچنین این روش در فارماکوپه آمریکا، اروپا و ژاپن به عنوان روش استاندارد برای تعیین وجود اندوتوکسین در نمونه دارویی معرفی گردیده است. با این وجود این روش زمان بر بوده و قابلیت انجام اتوماتیک ندارد به همین دلیل در حجم های بالای نمونه و امکان ایجاد خطای انسانی این روش توصیه نمی شود.

### مواد لازم

✓ کیت (Cat.No:E50-643L) Lonza

#### شامل:

○ معرف پیروژن (LAL)

- کاربرد: این تست به صورت کیفی و حضور لخته در صورت وجود اندوتوکسین انجام میشود. این تست بسته به نوع کیت تا رقت های  $10^{-4}$  حساسیت دارد. دوز مجاز اندوتوکسین برای استفاده در انسان ۵ EU می باشد. کیت مورد استفاده در این تحقیق کیت Lonza بود که حساسیت آن تا ۰,۱۲۵ EU/ml یا ۰,۰۲۵ng/kg می باشد.
- استاندارد اندوتوکسین

✓ نمونه پروتئین

<sup>1</sup> Chromogenic method

<sup>2</sup> Chromogenic method

<sup>3</sup> Turbidimetric method

- (۱) نمونه پروتئینی را به ویال حاوی معرف LAL اضافه می‌کنیم.
- (۲) ویال را در هات پلیت ۳۷C به مدت ۶۰ دقیقه گرماگذاری می‌کنیم.
- (۳) بعد از ۶۰ دقیقه، ویال‌ها را به آرامی برداشته و ۱۸۰ درجه برمی‌گردانیم.
- (۴) در صورت تشکیل لخته نمونه حاوی اندوتوکسین و در صورت عدم تشکیل لخته فاقد آن می‌باشد.

### ۲-۲۴. تأیید پروتئین نو ترکیب ساخته شده با پادتن موجود در سرم افراد مبتلا به کووید-۱۹ و افراد واکسینه شده با واکسن آسترانکا

برای ارزیابی پروتئین نو ترکیب، سرم ۵۰ بیمار مبتلا به کووید-۱۹ و ۷۰ فرد واکسینه شده با واکسن آسترانکا تهیه شد و با هر سه پروتئین الایزا انجام شد. روش کلی تست مانند بخش ۲-۲۷ انجام شد. اما سرم افراد با نسب ۱ به ۲۵ رقیق شد و از پادتن ثانویه انسانی کونژوگه با HRP استفاده شد.

### ۲-۲۵. تحریک ایمنی هومورال

#### ۲-۲۵-۱. انتخاب ادجوانت مناسب

واژه ادجوانت از کلمه لاتین "adjuvare" به معنی کمک یا افزایش مشتق شده است. ادجوانت‌ها ترکیباتی هستند که واکنش ایمنی علیه پادکن‌های تلقیح شده با آن را افزایش می‌دهند. ادجوانت‌ها باید مطابق معیارهای مختلفی انتخاب شوند که از جمله آن‌ها گونه‌های هدف، نوع پادکن، نوع و مدت پاسخ ایمنی مورد نیاز برای حفاظت می‌باشد. تحقیقی که در سال ۱۹۲۵ انجام شد نشان داد که افزایش سطح آنتی توکسین کزاز و دیفتری توسط افزایش موادی همچون آگار، نمک‌های فلزی، لیسیتین یا ساپونین امکان پذیر است. ادجوانت‌های مختلف، به منظور افزایش واکنش ایمنی علیه پادکن‌های خاص استفاده شده‌اند. از جمله شناخته شده‌ترین ادجوانت‌ها، فروند و آلوم می‌باشد. نمک‌های آلوم بیشتر به شکل فسفات آلومینیوم یا هیدروکسید آلومینیوم به شکل گسترده‌ای به عنوان ادجوانت‌های انسانی استفاده شده‌اند. ادجوانت فروند یک امولسیون آب در روغن است که پادکن را در فاز مایع به کمک یک ماده ی امولسیون ساز وارد روغن پارافین سبک وزن می‌کند. به هنگام تزریق، این ماده تولید مداوم آنتی‌بادی‌های قوی را تحریک می‌کند. این نوع ادجوانت، فروند ناقص نامیده می‌شود. اضافه کردن مایکوباکتریوم‌های مرده و خشک شده به فاز روغنی، ایمنی سلولی و هومورال را بر می‌انگیزد.

#### ۲-۲۵-۲. انتخاب حیوان مناسب

جدول ۲-۱۶. دلیل انتخاب حیوانات و مشخصات آن ها

سن و وزن تقریبی	دلیل انتخاب	نوع حیوان
۶-۸ هفته ۱۵-۲۰ گرم	متعلق به رده <i>Euarchontoglires</i> هستند که انسان نیز از این رده است و دارای شباهت های ژنتیکی زیادی است این شباهت ۹۸ درصدی به ژنوم انسانی ، سهولت نگهداری و کار با آن ها و میزان تولیدمثل بالا، موش ها را مدل های مناسبی برای تحقیقات مربوط به انسان قرار می دهد. موش های ماده نسبت به نر بوی کمتری دارند و نزاع کمتری بین آن ها دیده می شود.	موش ماده BALB/c
۴۵ روز ۱٫۵ کیلوگرم	به دلیل شباهت های فیلوژنیک بین دو گونه پستاندار خرگوش و انسان ، سهولت در نگهداری و مهار آسان ، کوچک و مطیع بودن ، قیمت مناسب بهترین گزینه در دسترس برای مطالعه در حوزه واکسن هست.	خرگوش نیوزیلندی سفید ماده
۶۰ روز ۴۰۰-۵۰۰ گرم	خوکچه هندی به دلیل شباهت بیولوژیکی به انسان گزینه مناسبی برای مطالعات می باشد.	خوکچه هندی ماده

## ۲-۲۵-۳. تزریق ایمونوژن به حیوانات

### مواد لازم

- ✓ ادجوانت فروند کامل و ناقص
- ✓ بافر PBS
- ✓ پنبه
- ✓ الکل
- ✓ سرنگ ۲ سی سی
- ✓ امولسیفایر

• کاربرد: به منظور مخلوط کردن بهتر پادکن و ادجوانت استفاده می شود.

موش BALB/c ماده:

- ۱) جهت تولید پادتن پلی کلونال، ۲۵ عدد موش BALB/c ماده‌ی از موسسه‌ی پاستور خریداری گشت و به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط، در حیوان‌خانه‌ی دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شد.
- ۲) برای تمایز موش‌ها از یکدیگر، قسمت‌های مختلف بدن آن‌ها به وسیله‌ی رنگ پیکریک اسید، رنگ گردید.
- ۳) قبل از تزریق، از دم تمامی موش‌ها برای کنترل خون‌گیری شد.
- ۴) موش‌ها به ۵ گروه ۲ تایی تقسیم شدند. سپس آنتی‌ژن ۱،۲،۳ با غلظت ۵۰ میکروگرم با PBS به حجم مساوی از ادجوانت فروند کامل ترکیب گشت (حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر) و به صورت درون صفاقی به موش‌ها تزریق گردید. در یک گروه هم پادکن به صورت مخلوط و در مجموع غلظت ۵۰ میکروگرم تزریق شد.
- ۵) در گروه کنترل، هر دو تزریق PBS با ادجوانت تزریق شد.
- ۶) پس از تزریق‌ها، خونگیری به فاصله دو هفته بعد تزریق برای جمع‌آوری سرم صورت گرفته و میزان تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی در آن‌ها از طریق آزمون الایزای غیر مستقیم سنجیده شد.

جدول ۲-۱۷. شرایط پادکن تزریق شده به موش

تعداد	گروه ۴	گروه ۱
تزریق	۲ مرتبه	۲ مرتبه
ایمونوژن	۵۰ میکروگرم پادکن نو ترکیب	PBS
نوع ادجوانت	ادجوانت فروند	ادجوانت فروند

خرگوش نیوزیلندی:

- ۱) برای تهیه این آنتی‌بادی‌ها از خرگوش‌های ماده سفید نیوزیلندی استفاده شد. در تزریق اول آنتی‌ژن‌ها از ادجوانت کامل فروند و در تزریق‌های بعدی از ادجوانت ناقص فروند استفاده شده است.
- ۲) فواصل بین تزریق‌های متعدد دو هفته بوده است. به هر یک از خرگوش‌ها ۵ بار تزریق آنتی‌ژن‌ها انجام گرفت تا موجب ایجاد پاسخ قوی آنتی‌بادی گردد.
- ۳) پس از تزریق‌ها خونگیری‌های متعدد از خرگوش‌ها برای جمع‌آوری سرم صورت گرفته و میزان تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی در آن‌ها از طریق آزمون الایزای غیر مستقیم سنجیده شد.

جدول ۲-۱۸. غلظت پادکن تزریق شده به خرگوش

توزیع	۱	۲	۳	۴	۵
ایمونوزن (میکروگرم)	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰
نوع ادجوانت	کامل	ناقص	ناقص	ناقص	ناقص

### خوکچه هندی:

- (۱) به منظور چالش با ویروس، به خوکچه ها پادکن نو ترکیب تزریق شد. این گروه بعد از افزایش تیترا پادتن در سرم ، با سارس کوو-۲ چالش می شوند.
- (۲) آنتی ژن ها با غلظت ۵۰ میکروگرم در PBS با حجم نهایی ۵۰۰ میکرولیتر و حجم مساوی از ادجوانت فروند کامل (نوبت اول) و ناقص (نوبت دوم) و همچنین ادجوانت آلوم (هر دو نوبت) ترکیب گشت و به صورت عضلانی تزریق گردید.
- (۳) فواصل زمانی بین تزریق ها ۱۴ روز بوده و به هر یک از خوکچه ها ۲ بار تزریق آنتی ژن ها انجام شد؛ که این امر موجب ایجاد پاسخ قوی آنتی بادی می گردد.
- (۴) پس از تزریق ، خونگیری از خوکچه ها برای جمع آوری سرم صورت گرفت و میزان تیترا آنتی بادی اختصاصی در آن ها از طریق آزمون الایزای غیر مستقیم سنجیده شد.

جدول ۲-۱۹. شرایط پادکن تزریق شده به خوکچه ها با ادجوانت فروند

تعداد	۴ سر (گروه تزریقی)	۲ سر (گروه کنترل)
تزریق	۲ مرتبه	۲ مرتبه
ایمونوزن	۵۰ میکروگرم پادکن نو ترکیب	PBS
نوع ادجوانت	ادجوانت فروند	ادجوانت فروند

جدول ۲-۲۰. شرایط پادکن تزریق شده به خوکچه ها با آلوم

تعداد	۲ سر (گروه تزریقی)	۲ سر (گروه کنترل)
تزریق	۲ مرتبه	۲ مرتبه
ایمونوزن	۵۰ میکروگرم پادکن نو ترکیب	PBS
نوع ادجوانت	آلوم	آلوم



## ۲-۲۶. انجام تست الایزا جهت بررسی ایمنی زایی در حیوانات

### مواد لازم

- ✓ پلیت الایزا
- ✓ شیرخشک بدون چربی ۵٪
- ✓ بافر PBS
- ✓ بافر PBST
- ✓ پادتن ضد برچسب هیستیدینی متصل به HRP
- ✓ TMB
- ✓ اسید ۲ نرمال H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### روش کار

- (۱) جهت بررسی فرآیند ایمنی زایی در موش‌ها، یک هفته پس از هر تزریق، خون‌گیری از حیوانات انجام گرفت، پس از گذشت ۲۰ دقیقه، خون با دور ۳۵۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد؛ سپس از مایع رویی (سرم) برای انجام تست الایزا استفاده گردید.
- (۲) پروتئین P1, P2, P3 با غلظت ۱ میکروگرم در ۵۰ میکرولیتر بافر PBS در کف چاهک پلیت الایزا، پوشش دهی گردید و به صورت شبانه در انکوباتور ۳۷°C، قرار داده شد.
- (۳) روز بعد، چاهک‌ها دو مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBST و یک مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBS شسته شده و باقی‌مانده‌ی آن‌ها با ضربه زدن روی دستمال خشک گردید.
- (۴) درون هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر از بافر بلاک‌کننده حاوی شیرخشک بدون چربی ۵٪ که در PBS حل شده بود، ریخته شد و به مدت ۹۰ دقیقه درون انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت.
- (۵) چاهک‌ها، دو مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBST و یک مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBS شسته شده و باقی‌مانده‌ی آن‌ها با ضربه زدن روی دستمال خشک گردید.
- (۶) ۵۰ میکرولیتر از سرم (موش، خرگوش و خوکچه هندی) با رقت‌های ۱/۵۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ۱/۲۰۰۰، ۱/۴۰۰۰، به صورت دوگانه از هر رقت درون چاهک‌ها ریخته شد و به مدت ۹۰ دقیقه درون انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت.
- (۷) چاهک‌ها، دو مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBST و یک مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBS شسته شده و باقی‌مانده‌ی آن‌ها با ضربه زدن روی دستمال خشک گردید.
- (۸) ۵۰ میکرولیتر از پادتن ثانویه‌ی متصل به HRP (IgG)، با PBS رقیق و درون چاهک‌ها ریخته شد، روی آن فویل پیچیده شد و به مدت یک ۹۰ دقیقه درون انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت.

جدول ۲-۲۱. رقت پادتن های استفاده شده برای الایزا

رقت با PBS	پادتن ثانویه کونژوگه با HRP
۱/۱۵۰۰۰	موش
۱/۳۰۰۰۰	خرگوش
۱/۸۰۰۰	خوکچه هندی

- ۹) چاهک‌ها، دو مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBST و یک مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBS شسته شده و باقی‌مانده‌ی آن‌ها با ضربه زدن روی دستمال خشک گردید.
- ۱۰) ۵۰ میکرولیتر از TMB به چاهک‌ها اضافه گشت، سپس پلیت با فویل پوشانده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت.
- ۱۱) واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از بافر متوقف کننده به چاهک‌ها، پایان گرفت.
- ۱۲) میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر به ۶۰۰ نانومتر اندازه گرفته شد.

## ۲-۲۷. تأیید پروتئین P1,P2,P3 با پادتن سرم خرگوش توسط وسترن بلات

### مواد لازم

- ✓ کاغذ(غشا) نیتروسولوز
- ✓ بافر انتقال(ترانسفر)
- ✓ شیر خشک بدون چربی ۵٪
- ✓ پادتن ضد برچسب هیستیدینی متصل به HRP
- ✓ ECL
- ✓ بافر PBS
- ✓ بافر PBST

### روش کار

- ۱) ژل الکتروفورز شده از کاست جدا گردید و به مدت ۱۰ دقیقه درون آب مقطر و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در بافر انتقال قرار داده شد. همچنین، پدهای ابری به مدت ۲۰ دقیقه در بافر انتقال قرار داده شد.

- ۲) ژل SDS، کاغذ صافی و غشا نیتروسولولز را در اندازه های مورد نظر بریده (اندازه ی ژل و غشای نیتروسولولز برابر هم و اندازه ی کاغذ صافی معمولاً کمتر از آن دو می باشد) و سپس کاغذ صافی و غشای نیتروسولولز، به مدت ۱۰ دقیقه درون بافر انتقال خیس گردید (در مرحله ی چیدن ساندویچ وسترن، رعایت این نکته که دو فرآیند خیس کردن و حباب گیری همزمان و به صورت مداوم انجام گیرد، حائز اهمیت می باشد).
- ۳) برای چیدن ساندویچ، ابتدا سه عدد کاغذ صافی نازک روی پد اسفنجی قرار گرفت و حباب گیری انجام شد؛ سپس ژل روی آن قرار داده شد و بر روی آن غشا نیتروسولولز را قرار گرفت؛ سپس سه کاغذ صافی نازک دوم را روی کاغذ قرار داده و پد اسفنجی که کاملاً خیس است روی آن گذاشته شد و کاست را با چندین کش محکم نموده شد.
- ۴) ساندویچ فوق را طوری درون تانک قرار گرفت که غشا نیتروسولولزی به سمت قطب مثبت (قرمز رنگ) و ژل به سمت قطب منفی (مشکی رنگ)، قرار گیرند. درون تانک را کاملاً از بافر انتقال پر و ساندویچ در ظرف حاوی یخ (جهت اعمال دمای ۴°C) قرار گرفت. قطب مثبت تانک به قطب مثبت پاور و قطب منفی تانک را به قطب منفی پاور متصل گردید. پاور را روی ۳۰۰ میلی آمپر به مدت ۹۰ دقیقه قرار گرفت.
- ۵) بعد از گذشت این زمان، غشا درون شیر خشک بدون چربی ۵٪ به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق غوطه ور شد تا مسدود سازی اتفاق افتد.
- ۶) غشا دو مرتبه با PBST و یک مرتبه با PBS مورد شست و شو قرار گرفت.
- ۷) غشا درون پادتن اولیه (سرم خرگوشی با رقت ۱/۱۰۰ در PBS رقیق شد) قرار گرفت و به مدت یک شبانه روز روی شیکر در دمای ۴°C یخچال قرار گرفت.
- ۸) غشا دو مرتبه با PBST و یک مرتبه با PBS مورد شست و شو قرار گرفت.
- ۹) غشا درون پادتن ثانویه برعلیه پادتن خرگوشی با HRP با رقت ۱/۵۰۰۰ به مدت ۲ ساعت روی شیکر قرار گرفت.
- ۱۰) غشا دو مرتبه با PBST و یک مرتبه با PBS مورد شست و شو قرار گرفت.
- ۱۱) از ECL که دارای دو معرف A و B می باشد به نسبت مساوی با یکدیگر مخلوط کرده و در تاریکی روی کاغذ نیتروسولولز ریخته و سپس عکسبرداری انجام شد.
- ۱۲) برای بررسی بیشتر و تعیین هویت دقیق تر پادتن های تولید شده بر ضد پروتئین نوترکیب، پادتن ها تخلیص شدند.

## ۲۸-۲. بررسی اتصال پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱ (RBD) با سارس کوو-۲ توسط فناوری وسترن بلات

به منظور بررسی واکنش پادتن پلی کلونال با سارس کوو-۲، ویروس روی ژل برده شد و با پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱ (RBD) مانند بخش ۲-۲۸ وسترن انجام شد. در انتها برای تشخیص باند از DAB استفاده شد.

## ۲۹-۲. تخلیص پادتن پلی کلونال از سرم خرگوش ایمن شده

### مواد لازم

- ✓ آمونیوم سولفات ۷۰٪
- **کاربرد:** رسوبگیری با آمونیوم سولفات براساس Salting Out پروتئین از فاز محلول هستند. این نمک از تشکیل پیوند هیدروژنی بین پروتئین ها با آب جلوگیری می کند و باعث تسهیل این فرایند می شود. در نهایت رسوب پروتئینی تشکیل می شود
- **آماده سازی:** برای تهیه این نمک اشباع مقدار ۷۶۱ گرم آمونیوم سولفات را در یک لیتر آب حل کرده و میگذاریم روی استیرر هیتردار تا چند ساعت با مگنت بهم بخورد. بعد از اینکه مطمئن شدیم نمک بیشتر از این مقدار در آب حل نمی شود، از روی استیرر برداشته و یک شبانه روز در دمای اتاق به صورت ساکن میگذاریم. این محلول به صورت معمولی PH بین ۵-۶ دارد.
- ✓ بافر PBS
- ✓ کیسه دیالیز
- ✓ Glycine-HCl
- ✓ Tric-HCl
- ✓ رزین پروتئین A
- **کاربرد:** پروتئین A از سویه استافیلوکوکوس اورئوس بدست می آید و در کروماتوگرافی تمایلی برای تخلیص پادتن پلی کلونال IgG از سرم خرگوش، خوکچه، سگ و گربه توصیه می شود. این پروتئین به ناحیه ثابت زنجیره سنگین (FC) پادتن (ناحیه CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) متصل می شود و باعث جداسازی پادتن از سایر پروتئین ها می شود.
- **آماده سازی:** ۲ میلی لیتر از رزین پروتئین A را در ستون ریخته سپس با ۵ میلی لیتر آب یون زدایی شده شستشو می دهیم.

### روش کار

(۱) خونگیری از خرگوش انجام شد و سرم آن ها بعد از ۲۰ دقیقه گرماگذاری در دمای محیط، توسط سانتریفیوژ در دور ۳۵۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه جدا شد.

- ۲) سرم را داخل بشر کوچک ریخته و روی دستگاه همزن قرار دادیم ، اطراف بشر می‌بایست خرده های یخ احاطه شود.
- ۳) در حالیکه سرم با مگنت بهم می‌خورد به آرامی آمونیوم سولفات اشباع با حجم برابر سرم به آن اضافه می‌شود (آمونیوم سولفات ۳۵٪ در حجم نهایی محلول ایجاد می‌شود).
- ۴) بشر بر روی استیرر به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۴°C گرماگذاری شد.
- ۵) در مرحله بعد محلول در ۹۰۰۰ g دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.
- ۶) در مرحله بعد دوباره رسوب را با ۱/۲ حجم سولفات آمونیوم مجدداً شسته و سانتریفیوژ کردیم.
- ۷) رسوب حاصله را در حداقل حجم بافر PBS با pH= ۷,۳ حل کرده (رنگ شیری) و در کیسه دیالیز به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C با سه مرتبه تعویض بافر ، عمل دیالیز انجام شد.
- ۸) سپس محلول درون کیسه دیالیز روی ستون کروماتوگرافی A (که قبلاً با ۵ میلی لیتر آب شسته و توسط ۱۵ میلی لیتر بافر PBS به تعادل رسیده است) ریخته شد .
- ۹) سپس نمونه را ۵ بار از ستون عبور دادیم.
- ۱۰) در ادامه ستون را با ۱۰ میلی لیتر PBS شستشو دادیم.
- ۱۱) بعد با ۵ میلی لیتر بافر الوشن (glycine-HCL) با pH= ۲,۵ شستشو می‌دهیم و فراکشن های خروجی از ستون را جمع آوری کردیم.
- ۱۲) به منظور تأیید فراکشن حاوی پادتن خالص ،الکتروفورز SDS-PAGE مشخص شده و غلظت آن توسط روش برادفورد تعیین گردید.
- ۱۳) در ضمن برای تأیید پادتن تخلیص شده یک الایزا با این پادتن تخلیص شده (براساس روش ذکر شده با سرم خرگوش) انجام شد.

## ۲-۳۰. بررسی میزان اختصاصیت پادتن پلی کلونال

جهت بررسی اختصاصیت پادتن پلی کلونال به آنتی ژن ها، تست الایزا با آنتی ژن های متفرقه انجام شد. در این تست از ۳ آنتی ژن متفاوت استفاده گردید که با شماره ۱-۳ مشخص شده‌اند. الایزا مانند روش های ذکر شده در بخش ۲-۲۶ انجام گردید.

## ۳۱-۲. بررسی اتصال پادتن تولید شده بر علیه پروتئین های نو ترکیب P1,P2,P3 در مواجهه با سارس کوو-۲ توسط الایزا

به منظور ارزیابی و مقایسه پادتن تولیدی بر علیه سارس کوو-۲، ۶ گروه موش انتخاب شدند و مطابق غلظت واکسن تزریق شده فخر و برکت (۵ میکروگرم دوز ویروس) از پروتئین های نو ترکیب به موش ها تزریق شد. سپس اتصال پادتن تولید شده بر علیه پروتئین نو ترکیب در مواجهه با سارس کوو-۲ در مقایسه با پادتن تولید شده بر علیه سارس کوو-۲ توسط الایزا ارزیابی می شود. به این منظور ابتدا غلظت ۱ میکروگرم از سارس کوو-۲ را در پلیت های الایزا پوشش دهی کرده و سپس مانند روش ذکر شده در بخش ۲-۲۷ الایزا انجام شد.

جدول ۲-۲۲. غلظت و نوع پادکن تزریق شده به موش ها

گروه	مقدار تزریق	تعداد موش
۱	۵ میکروگرم پادکن P1 + آلوم	۵ موش
۲	۵ میکروگرم پادکن P2 + آلوم	"
۳	۵ میکروگرم پادکن P3 + آلوم	"
۴	۵ میکروگرم مخلوط سه پروتئین (۱،۲،۳) + آلوم	"
۵	۲،۵ میکروگرم ویروس + ۲،۵ میکروگرم پادکن P1 + آلوم	"
۶	۵ میکروگرم ویروس + آلوم	"

## ۳۲-۲. تست خنثی سازی ویروس توسط پادتن

به علت رعایت مسائل ایمنی، این تست در آزمایشگاه سطح ۳ مجموعه واکسن سازی فخر انجام شد.

### مواد لازم

✓ رده سلولی Vero

- کاربرد: سلول های Vero که رده های سلولی مشتق شده از بافت کلیه میمون سبز هستند نیز برای کشت برخی ویروس های انسانی استفاده می شوند. سلول های Vero ظرفیت کاهش یافته ای برای ساختن اینترفرون دارند و بنابراین سلول ها برای کشت ویروس هایی که حساسیت بالایی به اینترفرون نشان می دهند مناسب هستند و از طرف دیگر مطالعات نشان داده سارس کوو-۲ به سرعت در این رده سلولی رشد می کند.

✓ نمونه پروتئین نو ترکیب

✓ محیط کشت DMEM<sup>1</sup> (High Glucose)

✓ سرم جنین گاوی<sup>2</sup> (FBS)

✓ آنتی بیوتیک پن استرپ

- کاربرد: ترکیب پنی سیلین و دی هیدرواسترپتومایسین جهت جلوگیری از رشد باکتری های گرم منفی و گرم مثبت در محیط کشت سلول استفاده میشود.

## روش کار

- 1) قبل از انجام تست، کشت سلول vero در پلیت تا زمانیکه به کانفلوئنسی<sup>3</sup> ۷۰-۸۰ برسد انجام شد.
- 2) از نمونه های حاوی پادتن P1,P2,P3 رقت های (۱/۱۰۰ ، ۱/۱۰۰۰ ، ۱/۱۰۰۰۰) تهیه شد.
- 3) از استوک ویروسی سارس کوو-۲ با ct:12 (10<sup>6</sup> TCID 50/ml) هم، رقت هایی به همین شکل تهیه کردیم.
- 4) سپس ۲۵۰ میکرولیتر از هر رقت ویروسی را با رقت های متفاوت سرم های P1,P2,P3 و همچنین ۲۵۰ میکرولیتر از رقت های ویروسی با ۲۵۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم به عنوان کنترل تکثیر ویروس مخلوط کردیم.
- 5) نمونه های فوق را در دمای ۳۷°C برای مدت ۲ ساعت به منظور خنثی سازی سارس کوو-۲ گرماگذاری شد.
- 6) سپس مخلوط سرم - ویروس را روی سلولهای vero در پلیت اضافه کرده و پلیت کشت سلول را برای ۲ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری کردیم.
- 7) اضافه نمودن محیط کشت DMEM با FBS ۲٪ به هر چاهک و گرماگذاری نمودن پلیت کشت سلول در دمای ۳۷°C درجه تا زمان مشاهده اثرات بیماری زایی در سلول<sup>4</sup> (CPE) ادامه یافت (Atanasiu, 1973).

## ۳-۲. بررسی اتصال P1(RBD) نوترکیب به گیرنده ACE2 در سطح

### سلول

با توجه به نقش مهم اتصال بخش RBD از سارس کوو-۲ به گیرنده سطح سلولی و شروع فرایند عفونت زایی، در این مرحله هدف ما بررسی شناسایی پروتئین نوترکیب توسط گیرنده سطح سلولی ACE2

<sup>1</sup> Dulbeccos Modified Eagle Medium; DMEM

<sup>2</sup> Fetal Bovin Serum; FBS

<sup>3</sup> Confluency

<sup>4</sup> Cytopathic effect or Cytopathogenic effect; CPE

و اتصال به آن است. همچنین بررسی اثر مهاری پادتن تولیدشده بر این اتصال نیز مورد بررسی قرار گرفت .

## ۱-۳۳-۲. انتخاب Caco<sub>2</sub> به عنوان سلول مثبت گیرنده ACE2

ابتدا مطالعات برای انتخاب سلول مناسب از لحاظ داشتن گیرنده ACE2 به عنوان کنترل مثبت انجام شد. در نهایت سلول Caco<sub>2</sub> به عنوان رده سلولی دارای ACE2 انتخاب گردید.

Caco<sub>2</sub> یک رده سلولی جاودانه از سلولهای آدنوکارسینوم روده بزرگ انسان است و در محیط کشت، سلولهای Caco<sub>2</sub> خود به خود به یک مخلوط ناهمگن از سلولهای اپیتلیال روده متمایز می شوند. در مقاله ای با بررسی ۳۰ رده سلولی نشان داده شد که تکثیر عفونت حاد تنفسی پس از تلقیح فقط در ۶ رده سلولی شامل Caco<sub>2</sub>, PK, 1Lu, Mv, Vero, Vero E6, MA104 دیده می شود. مطالعات نشان داد از بین رده های سلولی مطالعه شده، رده سلولی Caco<sub>2</sub> بعد از شش هفته همچنان از همانندسازی ویروس پشتیبانی می کند، بنابراین انتخاب مناسبی برای مطالعه ما می باشد. رده سلولی Caco<sub>2</sub> نسبت به رده های سلولی دیگر اولاً از جمله موارد خوب از نظر داشتن گیرنده ACE2 و کمک گیرنده TMPRSS2 بوده و ثانیاً از نظر تکثیر ویروس در مقدار بالاتری از ورود ویروس قرار می گیرد. باتوجه به موارد ذکر شده سلول Caco<sub>2</sub> به عنوان سلولی مناسب برای در برداشتن گیرنده ACE2 می باشد و این رده سلولی برای ادامه کار انتخاب شد.

## ۲-۳۳-۲. انتخاب K562 به عنوان سلول منفی گیرنده ACE2

مطالعات برای یافتن رده سلولی مناسب برای کمترین یا عدم بیان ACE2 انجام شد و نتایج نشان داد رده سلولی k562 بیان گیرنده ACE2 ندارد. به دلیل این مزیت گزینه مناسبی برای کنترل منفی گیرنده ACE2 بود. این سلولها از لنفوبلاست مغزاستخوان مرد ۵۳ ساله مبتلا به لوسمی میلوژنیک مزمن منشا گرفته است .

الف) آماده سازی سلول Caco<sub>2</sub> :

### مواد لازم

- ✓ محیط کشت DMEM
- ✓ FBS
- ✓ آنتی بیوتیک پن استرپ



## روش کار

- ۱) سلول Caco<sub>2</sub> (چسبنده) در محیط DMEM با FBS ۱۰٪ کشت داده شد.
- ۲) سلولها بعد از رسیدن به کانفلوئنسی ۷۰ پاساژ داده شدند .
- ۳) بعد از رسیدن تعداد سلول به مقدار مورد نیاز برای شروع آزمایش سلولها را تریپسینه و سپس سانتریفیوژ کرده و رسوب در کمترین میزان محیط کشت حل گردید و شمارش انجام شد.
- ۴) به هر میکروتیوب تعداد ۱۰<sup>۵</sup>\*۳ سلول ریخته و با PBS دو بار شستشو می شود .
- ۵) بعد از این مرحله برای جلوگیری از داخل رفتن گیرنده به درون سلول, تا آخرین مرحله کار سلولها روی یخ نگهداری می شوند.

## ب) آماده سازی سلول K562 :

### مواد لازم

- ✓ محیط کشت RPMI<sup>۱</sup>
- ✓ FBS
- ✓ آنتی بیوتیک پن استرپ

## روش کار

- ۱) سلول K562 (شناور) در محیط RPMI با FBS ۱۰٪ کشت داده شد .
- ۲) سلولها بعد از رسیدن به کانفلوئنسی ۷۰-۸۰ پاساژ داده شد .
- ۳) بعد از رسیدن تعداد سلول به مقدار مورد نیاز برای شروع آزمایش محیط کشت حاوی سلول را در یک فالكون استریل ریخته و با دور ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می کنیم .
- ۴) رسوب حاصله در کمترین میزان محیط کشت حل شده و شمارش انجام شد.
- ۵) به هر میکروتیوب تعداد ۱۰<sup>۵</sup>\*۳ سلول ریخته و با PBS دو بار شستشو می شود .
- ۶) بعد از این مرحله برای جلوگیری از داخل رفتن<sup>۲</sup> گیرنده به درون سلول , تا آخرین مرحله کار سلولها روی یخ نگهداری می شوند.

<sup>1</sup> Roswell Park Memorial Institute: RPMI

<sup>2</sup> Internalize

## ۳-۳۴-۲. بررسی اتصال پروتئین نو ترکیب با گیرنده ACE2

### مواد لازم

- ✓ PBS
- ✓ پروتئین RBD(P1)
- ✓ سرم موش تزریق شده با پروتئین P1
- ✓ پادتن ثانویه موشی متصل به FITC
- ✓ بافر EIA
- کاربرد: به منظور پایداری بهتر پادتن از BSA استفاده میشود.
- آماده سازی: به ازای هر ۱۰ میلی لیتر از PBS، ۰.۱ گرم از BSA به آن اضافه می کنیم.

### روش کار

- (۱) در این مرحله سلولهای کنترل مثبت و منفی با هم شمارش شده و برای یکسان بودن شرایط به صورت همزمان آزمایش می شود.
- (۲) بنابراین به هریک از میکروتیوبهای حاوی سلول پروتئین نو ترکیب RBD با غلظتهای مختلف ۱، ۳، ۵ میکروگرم در PBS حل شده و در حجم نهایی ۳۰۰ میکرولیتر به میکروتیوب اضافه می شود
- (۳) به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر و روی یخ به آرامی گرماگذاری می شود.
- (۴) بعد از این مرحله دو مرتبه شستشو با PBS توسط سانتریفیوژ با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه برای حذف پروتئین های متصل نشده انجام می شود.
- (۵) در مرحله بعد سرم موش انتخاب شده با جذب نوری بالا برای رقت ۱ به ۲۰۰ به حجم ۳۰۰ میکرولیتر به میکروتیوب اضافه می شود و مانند مرحله قبلی به مدت ۳۰ دقیقه با همان شرایط گرماگذاری می شود.
- (۶) بعد از این مرحله دو مرتبه شستشو با PBS توسط سانتریفیوژ با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه برای حذف پادتن های متصل نشده انجام می شود.
- (۷) در مرحله نهایی ۰،۳ پادتن ثانویه موشی متصل به FITC<sup>۱</sup> ( ۱ میکرولیتر به ازای هر ۱۰<sup>۶</sup> \* ۱ ) در ۳۰۰ میکرولیتر بافر EIA<sup>۲</sup> رقیق شد و برای شناسایی پادتن های متصل شده به پروتئین نو ترکیب به گیرنده ACE2 سطح سلولی اضافه شده و مانند مراحل قبلی گرماگذاری می شود.
- (۸) بعد از این مرحله دو مرتبه شستشو با PBS توسط سانتریفیوژ با دور g ۹۰۰ به مدت ۷ دقیقه برای حذف پادتن های ثانویه متصل نشده انجام و توسط فلوسایتومتری خوانش FITC انجام میشود.

<sup>۱</sup> Fluorescein Iso Thio Cyanate: FITC

<sup>۲</sup> Enzyme immunoassay: EIA

## ۴-۳۴-۲. بررسی اثر مهارى پادتن بر اتصال پروتئين نوترکيب به گيرنده سلولى

### روش کار

- (۱) در این مرحله برای بررسی اثر مهارى پادتن تولید شده بر اتصال پروتئين نوترکيب به گيرنده ، پروتئين نوترکيب و پادتن در یک میکروتیوب به مدت ۳۰ دقیقه گرماگذارى شدند.
- (۲) سپس مخلوط حاصل به میکروتیوب حاوی سلول اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه گرماگذارى شد.
- (۳) بعد از این مرحله دو مرتبه شستشو با PBS توسط سانتریفیوژ با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام می‌شود.
- (۴) در مرحله نهایی پادتن ثانویه متصل به FITC برای شناسایی پادتن های متصل شده به پروتئين نوترکيب به گيرنده ACE2 سطح سلولى اضافه شده و مانند مراحل قبلى گرماگذارى می‌شود.
- (۵) بعد از این مرحله دو مرتبه شستشو با PBS توسط سانتریفیوژ با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه برای حذف پادتن های ثانویه متصل نشده انجام می‌شود و توسط فلوسایتومتری خوانش FITC انجام می‌شود.

## ۳۵-۲. انتخاب بهترین دوز - پاسخ پروتئين نوترکيب RBD در موش

به منظور به دست آوردن بهترین غلظت پادکن تزریقى و بهترین پاسخ ، غلظت‌های مختلف از پروتئين P1(RBD) با ادجوانت آلوم (ادجوانت مورد استفاده برای واكسن های انسانی) به موش ها به تعداد ۲ مرتبه در بازه زمانى ۱۴ روز تزریق شد. سپس به منظور یافتن بهترین غلظت با کمترین عارضه این تست انجام شد. توسط روشهای ذکر شده برای سرم موش در بخش ۲-۲۷ از موش هایی که با غلظت های مختلف تزریق شده بودند، خونگیری و ایزا انجام شد.

جدول ۲-۲۳. غلظت و نوع پادکن تزریق شده به موش ها

گروه	مقدار تزریق	تعداد موش
۱	PBS + آلوم	۵ موش
۲	۵ میکروگرم پادکن P1 + آلوم	"
۳	۱۰ میکروگرم پادکن P1 + آلوم	"
۴	۲۵ میکروگرم پادکن P1 + آلوم	"
۵	۵۰ میکروگرم پادکن P1 + آلوم	"
۶	۷۵ میکروگرم پادکن P1 + آلوم	"
۷	۱۰۰ میکروگرم پادکن P1 + آلوم	"

## ۳۶-۲. بررسی آسیب شناسی بافت‌ها

بعد از انتخاب بهترین گروه موش‌ها بر مبنای دوز تزریقی با بالاترین تیترا پادتن، به منظور بررسی عوارض جانبی حاصل از تزریق پروتئین‌های نو ترکیب بعد از ۲ مرتبه تزریق به موش‌ها، بافت بدن این گروه از موش‌ها (شامل کبد، کلیه، طحال و ریه) خارج شد و بعد از تهیه لام و رنگ آمیزی توسط پاتولوژی با میکروسکوپ Olympus و بزرگ‌نمایی‌های مختلف دیده شد.

### ۳۶-۲-۱. آماده سازی بافت برای تهیه برش‌های پارافینی

به مرحله‌ای که در طی آن بافت گرفته شده از انسان یا جانور تثبیت شده و به طور کامل در یک موم بافت شناسی مناسب غوطه ور می‌شود به صورتی که آماده برش زدن توسط دستگاه میکروتوم شود، آماده سازی بافت گویند.

#### مواد لازم

- ✓ فرمالدهید ۱۰٪
  - کاربرد: این ماده با غیر فعال کردن آنزیم‌های لیزوزومی از اتولیز جلوگیری می‌کند.
- ✓ الکل
  - کاربرد: الکل از معروف‌ترین مواد جاذب آب است که اب را از هر چیزی که در تماس با آن قرار گیرد، جذب می‌کند.
- ✓ زایلن
  - کاربرد: یک حلال حدواسط است که هم با الکل و هم با پارافین قابل اختلاط است. این حلال جایگزین اتانول می‌شود و سپس در مرحله بعد خود توسط پارافین ذوب شده جایگزین می‌گردد و باعث شفاف سازی بافت می‌گردد.
- ✓ پارافین
  - کاربرد: یک موم مناسب بافت شناسی که در بافت نفوذ می‌کند. موم‌های بافت شناسی بر پایه پارافین متداول تر هستند.

#### روش کار

آماده سازی بافت شامل چهار مرحله است: تثبیت، آبگیری، شفاف سازی و آغشته سازی به موم (پارافین)

**(۱) تثبیت کردن:** معمولاً فرمالدهید با غلظت ۴٪ یا فرمالین با غلظت ۱۰٪ برای تثبیت کردن به کار می‌رود. عمل تثبیت کردن در دمای اتاق انجام می‌گیرد. بسته به اندازه نمونه ۶ تا ۲۴ ساعت زمان برای تثبیت کردن لازم است. نمونه‌ها در سبد‌های ویژه یا ظروف مناسب با ذکر مشخصات قرار می‌گیرند. پس از مرحله فیکس شدن، بافت‌ها به

اندازه کافی محکم و منسجم نیستند تا بتوان بخش های نازک را برش زد به همین دلیل باید مرحله پروسس انجام شود. قبل از پروسس ، بافت ها را درون کاست های مورد نظر قرار می دهند و کاست ها را شماره گذاری می کنند.

**۲) مرحله آبیگری بافت ها:** در این مرحله آب موجود و ماده ثابت کننده (فیکساتیو) از بافت خارج می گردد. به دلیل اینکه پارافین هیدروفوبیک (غیر قابل حل در آب) است ، قبل از آنکه نمونه در پارافین قرار گیرد، باید آب موجود در بافتها به طور کامل حذف شود.

- **مراحل انجام آبیگری:** اتانول ۷۰٪ (برای یک ساعت) ، اتانول ۷۰٪ (برای یک ساعت) ، اتانول ۹۵٪ (برای یک ساعت) ، اتانول ۱۰۰٪ (برای یک ساعت)

**۳) شفاف سازی:** معمول ترین ماده شفاف کننده گزلیل است و چندین مرحله عبور دادن از گزلیل لازم است تا کاملاً جایگزین اتانول شود.

- **مراحل شفاف سازی:** گزلیل ۱ (برای یک ساعت) ، گزلیل ۲ (برای یک ساعت)

**۴) آغشته سازی با موم:** در این مرحله یک موم مناسب بافت شناسی در بافت نفوذ داده می شود. اگرچه برای سال ها مواد مختلف برای این منظور مورد استفاده قرار گرفته اند، موم های بافت شناسی بر پایه پارافین متداول تر هستند.

- **مراحل آغشته سازی:** پارافین ۱ (برای ۲ ساعت) ، پارافین ۲ (برای ۳ ساعت)

**۵) قالب گیری پارافینی:** هنگامی که نمونه کاملاً با موم آغشته شد باید قالب گیری شود تا بتوان آن را به دستگاه میکروتوم متصل نمود و برش گیری کرد.

- **مراحل قالب گیری**

- ۱) کمی پارافین را در قالب های بافت ریخته و اجازه داده می شود تا پارافین در لایه زیرین قالب ها تشکیل شود.
- ۲) بافت ها با پنس بر روی مرکز قالب قرار داده می شوند.
- ۳) کاست های پلاستیکی را بر روی قالب قرار داده و در صورت لزوم پارافین بیشتری به قالب اضافه می شود.
- ۴) سپس قالب ها به منظور خنک سازی سریع، به صفحه سرد منتقل می شود.

## ۲-۳۶-۲. برش بافت پارافینی و تهیه لام

۱. از دستگاه میکروتوم برای برش مقاطع استفاده می شود. ابتدا ضخامت برش دستگاه میکروتوم را تنظیم می کنیم (۰,۳۶ میکرون) و سپس بلوک را برش می دهیم.

۲. عمل برش را تا جایی ادامه می‌دهیم که به بافت برسیم سپس ضخامت برش دستگاه را روی ۰,۰۵ میکرون تنظیم می‌کنیم و نمونه را برش می‌دهیم.
۳. صفحه بسیار نازکی به قطر ۰,۰۵ میکرون بدست می‌آید که آن را بوسیله پنس بر روی لامی که بر سطح آن الکل ۲۰٪ ( برای باز کردن چین و چروک) ریخته ایم ، منتقل می‌کنیم.
۴. لام تهیه شده را در دستگاه Tissue floating که حاوی آب ۳۴°C می باشد ، به طور کامل فرو برده و چند ثانیه صبر میکنیم تا چین و چروک صفحه برش داده می شود تا کاملاً باز شود.
۵. سپس لام را طوری بالا می آوریم که صفحه برش داده شده ، قسمت اعظم لام را بدون ایجاد چین و چروک بپوشاند.

### ۳-۳۶-۲. رنگ آمیزی لام ها به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E)

تشخیص بین سلولهای مختلف بافت هنگام مشاهده یک نمونه بافت در زیر میکروسکوپ نوری اغلب دشوار است ، زیرا این سلول ها تقریباً بی رنگ هستند. بنابراین برای ایجاد تمایز در رنگ ها، مشاهده و تجزیه و تحلیل واضح تر سلول ها از رنگ آمیزی بافت نمونه استفاده می شود . در روش رنگ آمیزی H&E که نام دیگر آن هماتوکسیلین- ائوزین است ، هسته و سیتوپلاسم با دو رنگ متفاوت از یکدیگر متمایز شده و نشان داده می شود. هسته سلول رنگ بنفش و سیتوپلاسم رنگ صورتی به خود می گیرد. (Bohmer and Mayer. 1865)

#### مواد لازم

- ✓ زایلین
  - کاربرد: پرکاربرد ترین عامل پاکسازی است. قبل از رنگ آمیزی ، زایلین برای حذف پارافین از لام های خشک شده استفاده می شود.
- ✓ کربنات لیتیم
  - کاربرد: برای فیکس شدن رنگ هسته به کار می رود.
  - آماده سازی: برای تهیه این محلول به ازای هر ۱۰۰ سی سی آب مقطر ، یک گرم پودر کربنات لیتیم اضافه می شود.
- ✓ اتانول
  - کاربرد: به منظور آگیری از نمونه ها از الکل اتانول استفاده می شود.
- ✓ هماتوکسیلین
  - کاربرد: این رنگ هسته سلول را به رنگ بنفش می کند.
- ✓ ائوزین
  - کاربرد: این رنگ ماتریکس برون یاخته ای و سیتوپلاسم سلول را به رنگ صورتی در می آورد.
- ✓ اسید الکل

- **کاربرد:** بعد از رنگ آمیزی سلول با هماتوکسیلین ، به منظور حذف این رنگ از سیتوپلاسم استفاده می‌شود.
- **آماده سازی :** برای تهیه این محلول الکل ۹۶٪ را تهیه و به ازای هر ۱۰۰ سی سی الکل، ۲ سی سی اسید کلریدریک غلیظ می‌ریزیم.

## روش کار

رنگ آمیزی لام ها به ترتیب به شرح زیر می باشد:

زایلن خالص (۲ دقیقه)، زایلن خالص (۲ دقیقه)، زایلن خالص (۲ دقیقه)، اتانول ۹۶٪ (۳ دقیقه)، اتانول ۸۰٪ (۳ دقیقه)، اتانول ۷۰٪ (۳ دقیقه)، شستشو با آب مقطر با دمای حدود ۳۶°C، رنگ هماتوکسیلین (۱۰ دقیقه)، شستشو با آب مقطر با دمای حدود ۳۶°C، غوطه وری در اسید الکل ۱٪ (۲ بار)، غوطه وری در کربنات لیتیم ۱٪ (۲ بار)، رنگ اتوزین (۲ الی ۵ دقیقه)، شستشو با آب مقطر با دمای حدود ۳۶°C، غوطه وری در اتانول ۷۰٪ (۱۰ ثانیه)، غوطه وری در اتانول ۷۵٪ (۱۰ ثانیه)، غوطه وری در اتانول ۹۶٪ (۱۰ ثانیه)، مخلوط الکل و زایلن (۲ الی ۳ دقیقه)، زایلن خالص (۲ دقیقه)، زایلن خالص (۲ دقیقه)

## ۳۷-۲. بررسی ایمنی سلولی توسط ایمونوهیستوشیمی<sup>۱</sup>

با توجه به مطالعه مقالات مربوط به واکسن های مرتبط با سارس کوو-۲ و بررسی ایمنی سلولی در آن ها به این نتیجه رسیدیم دو مارکر CD4 و CD8 به عنوان یکی از شاخص های تحریک سیستم ایمنی سلولی شناخته می شوند . بنابراین برای بررسی تحریک سلولی واکسن نو ترکیب، مارکرها CD4 و CD8 توسط تست ایمونوهیستوشیمی (IHC) بر روی بافت ریه به عنوان یکی از آسیب پذیرترین بافتها در مواجهه با سارس کوو-۲ ارزیابی گردید (Albert Coons, 1941).

## مواد لازم

- ✓ زایلن
- ✓ الکل مطلق
- ✓ بافر رتریوال
- **کاربرد:** بافر رتریوال برای از بین بردن اثر فرمالین استفاده می‌شود این بافر باعث می‌شود که پایگاه‌های پادکنیک که در فرایند فیکس با فرمالین پوشیده شده اند در معرض قرار بگیرند تا با پادتن واکنش دهند .
- **آماده سازی:** بافر سیترات شامل (۱۰ میلی مولار سدیم سیترات، توئین ۰,۰۵٪ با دمای ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه با pH=۶)
- ✓ محلول پراکسید هیدروژن
- **کاربرد:** بهترین ماده بلاک کننده است تا آنزیم های درونی موجود در بافت غیر فعال شوند.

<sup>1</sup> IHC; Immunohistochemistry

✓ پادتن اولیه

- rabbit anti –human CD4 monoclonal antibody:CD4
- rabbit anti –human CD8 monoclonal antibody :CD8

✓ پادتن ثانویه

- Master prooxidase

✓ دی آمینوبنزیدین<sup>۱</sup> (DAB)

- کاربرد: ۳،۳-دی آمینوبنزیدین تتراهیدروکلراید هیدرات یا پودر سوبسترا DAB ماده ای توکسیک بوده که به عنوان یکی از رنگ های مورد استفاده در ایمونوهیستوشیمی شهرت دارد. این ماده شیمیایی به عنوان تتراهیدرو کلراید محلول در آب، در رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی اسیدهای نوکلئیک و پروتئین ها مورد استفاده قرار می گیرد.

## روش کار

- (۱) برش های بافتی ۱-۲ میکرونی را بر روی لام گذاشته و تا خشک شدن لام ها در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه صبر می کنیم.
- (۲) لام ها به مدت ۴۰ دقیقه داخل فور  $58^{\circ}\text{C}$  قرار می گیرند.
- (۳) لام ها داخل گزبلول ۳ بار تغییر هرکدام ۵ دقیقه قرار می گیرد.
- (۴) با استفاده از الکل های اتانول مطلق (دوبار تغییر)، ۹۶، (دو بار تغییر) و ۷۰ (یک بار تغییر) و هرکدام سه دقیقه عمل آبدهی صورت می گیرد و لام ها به مدت ۲-۳ دقیقه با آب شسته می شوند.
- (۵) لام ها به مدت ۱۰ دقیقه داخل محلول پراکسید هیدروژن ۱۰٪ قرار می گیرد.
- (۶) لام ها به مدت ۵ دقیقه زیر آب شسته می شوند.
- (۷) لام ها پس از قرارگرفتن در داخل آب مقطر ۲ بار تغییر با استفاده از بافر رتریوال و سیستم مایکروویو عمل پادکن رتریوال صورت می گیرد.
- (۸) لام ها داخل بافر به مدت ۲۰ دقیقه باقی می مانند تا سرد شوند.
- (۹) لام ها پس از شستشو با آب مقطر دو بار تغییر داخل بافر شستشوی PBS دو بار تغییر هرکدام ۵ دقیقه قرار می گیرند.
- (۱۰) لام ها داخل جار IHC به مدت ۵۰ دقیقه با پادتن اولیه بر علیه CD4 و CD8 در دمای اتاق گرماگذاری می شوند.
- (۱۱) لام ها در بافر شستشوی دوبار تغییر هرکدام به مدت ۵ دقیقه شسته شدند.
- (۱۲) لام ها به مدت ۴۰ دقیقه با استفاده از پادتن ثانویه در دمای اتاق و در جار IHC گرماگذاری می شوند.
- (۱۳) لام ها در بافر شستشوی دوبار تغییر هرکدام به مدت ۵ دقیقه شسته می شوند.
- (۱۴) لام ها به مدت ۱۰ دقیقه داخل کروموژن DAB در دمای اتاق و داخل جار IHC گرماگذاری می شوند.
- (۱۵) لام ها با آب شسته می شوند.

<sup>1</sup> Diaminobenzidine 3,3; DAB



۱۶) لام‌ها آبدگیری شده و داخل گزلیل قرار می‌گیرند تا مونته شوند.

▪ **نکته:** برای دیدن لام زیر میکروسکوپ باید آن را مونت<sup>۱</sup> کنیم. "مونته کردن" به معنای محکم کردن و محافظت کردن بافت می‌باشد. برای این کار باید از چسب مخصوص مونت استفاده کنیم. سپس روی آن لامل گذاشته و زیر میکروسکوپ بررسی می‌شود. در این حالت عکس دارای کنتراست بیشتری است.

۱۷) لام‌های تهیه شده توسط پاتولوژیست و نرم افزار image j تفسیر می‌شوند.

## ۲-۳۸. چالش خوکچه هندی با ویروس زنده سارس کوو-۲

خوکچه‌های هندی ایمن شده به منظور چالش با ویروس و بررسی عکس‌العمل آنها در مواجهه با ویروس به مرکز واکسن سازی فخر ارسال شد تا در شرایط محافظت شده خوکچه‌ها با ویروس سارس کوو-۲ چالش شوند.

### روش کار

۱- ویروس کشت داده شده به صورت زنده (حداکثر تعداد ویروس  $10^8$  در لیتر است) با PBS مخلوط می‌شود. (ویروس ترکیبی از ویروس استخراج شده از ۴۰ نمونه انسانی است که تکثیر شده است).

۲- خوکچه را در محفظه‌ای مقید کرده طوری که پوزه حیوان بیرون باشد و نتواند حرکت کند. سپس ماسکی جلوی پوزه حیوان قرار می‌گیرد.

۳- سپس مخلوط ویروس با PBS را در دستگاه نوبولایزر ریخته و چالش انجام می‌شود.

▪ **نکته:** با استفاده از این دستگاه مخلوط ویروس مثل بخور از شلنگ عبور می‌کند و تعداد مشخصی از ویروس به صورت ذرات آبروسل در مدت زمان حدوداً ۲ دقیقه به مجرای تنفسی خوکچه از طریق ماسکی که روی پوزه حیوان قرار دارد، می‌رسد. این دستگاه با توجه به تعداد تنفس حیوان در دقیقه طوری رسانش می‌کند که حیوان حداکثر جذب را داشته باشد (این مرحله بسیار مهم است چون حیوان به محض خطر پره‌های بینی خود را می‌بندد). کل این سیستم شامل حیوان و دستگاه نوبولایزر در یک محفظه قرار دارد تا اپراتور در معرض ویروس قرار نگیرد. این مرحله یکبار انجام می‌شود چون در صورت تکرار مجدد این کار با توجه به چالش قبلی حیوان ایمن می‌شود.

<sup>1</sup> Mounting

# فصل سوم

## نتایج

## ۱. مطالعات بیوانفورماتیک

### ۳-۱. طراحی و ساخت پلاسمید نو ترکیب از پروتئین سطحی سنبله (اسپایک) سارس کوو-۲

مطالعات برای انتخاب بخش مورد نظر از سارس کوو-۲ که بیشترین اثرگذاری را بر تحریک سیستم ایمنی و تولید پادتن خنثی کننده دارد، انجام گردید. نتایج مطالعات نشان داد پروتئین سنبله سارس کوو-۲، مهم ترین پروتئین در اتصال ویروس به گیرنده سطح سلول و ورود ژنوم ویروس به داخل سلول میزبان می باشد.

جدول ۳-۱. مطالعات انجام شده در حوزه سارس ، مرس و سارس کوو-۲

رفرنس	نتیجه مطالعه
۵۱	از مطالعات قبلی در مورد سارس کوو ، مرس کوو و اخیر در مورد سارس کوو-۲ ، به خوبی مشخص شده است که پروتئین سنبله نقش مهمی در تعامل ویروس و ورود آن به سلولهای انسانی دارد.
۶۱	قطعات پروتئین سنبله ، مانند پروتئین S1 و S2 بویژه RBD ، پتانسیل زیادی برای تولید پادتن خنثی کننده برای مهار کردن اتصال ویروس به گیرنده ACE2 دارد و ایمنی حفاظتی در برابر سارس کوو-۲ ایجاد می کند.
۶۴-۶۶	تزیق پلی پروتئین سنبله نو ترکیب سارس کوو باعث ایجاد افزایش تیتراژ پادتن در موش ها و محافظت از حیوانات در برابر عفونت دستگاه تنفسی فوقانی و تحتانی با سارس کوو شد.
۵۲	واکسیناسیون میمون های سبز آفریقایی با ویروس ضعیف شده پارا آنفلانزا که به طور کامل پروتئین سنبله را کد می کنند، سبب تولید پادتن های اختصاصی ای شدند که از میمون های واکسینه در مقابل کووید محافظت کردند.
۶۱	با توجه به نقش عملکردی اصلی RBD در پروتئین سنبله که حاوی اپی توپ خنثی کننده است از یک پروتئین فیوژن نو ترکیب (RBD-Fc) به عنوان ایمونوژن برای ایمن سازی خرگوش استفاده کردند و متوجه شدند که باعث پاسخ های قوی پادتن در خرگوش های ایمن شده است و می تواند به طور کامل در سرم رقیق شده از عفونت سارس کوو جلوگیری کند.
۵۳-۵۶	واکسن هایی که دارای توالی کامل پروتئین سنبله هستند ، ممکن است بتوانند باعث پاسخ های ایمنی ناخواسته شوند که می تواند باعث آسیب التهابی و کبدی یا افزایش عفونت پس از در معرض قرار دادن با سارس کوو در مدل های حیوانی شود.

۵۷-۶۰

استفاده از توالی کامل S پروتئین گزینه مناسبی به عنوان واکسن نیست و انتخاب RBD به تنهایی توانسته تیتراژ پادتن بالاتری را نسبت به توالی کامل S پروتئین ایجاد کند.

هدف از انجام این تحقیق، تولید پروتئین های نو ترکیب به عنوان نامزد واکسن برای تحریک سیستم ایمنی بود. به منظور تحقق این هدف، توالی کامل پروتئین سنبله و ویژگی های آن به خوبی شناسایی گردید. توالی بخش پروتئین سنبله سارس کوو-۲ از پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) بدست آمد. سپس تمام توالی برای تحلیل و بررسی بیشتر، به فرمت FASTA ذخیره شدند.

GenPept ▾ Send to ▾

**surface glycoprotein [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2]**

NCBI Reference Sequence: YP\_009724390.1  
[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

---

[Go to](#) ☒

LOCUS	YP_009724390	1273 aa	linear	VRL 18-JUL-2020
DEFINITION	surface glycoprotein [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2].			
ACCESSION	YP_009724390			
VERSION	YP_009724390.1			
DBLINK	BioProject: <a href="#">PRJNA485481</a>			
DBSOURCE	REFSEQ: accession <a href="#">NC_045512.2</a>			
KEYWORDS	RefSeq.			
SOURCE	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)			
ORGANISM	<a href="#">Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</a> Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes; Nidovirales; Coronidovirineae; Coronaviridae; Orthocoronavirinae; Betacoronavirus; Sarbecovirus.			
REFERENCE	1 (residues 1 to 1273)			
AUTHORS	Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.M., Wang, W., Song, Z.G., Hu, Y., Tao, Z.W., Tian, J.H., Pei, Y.Y., Yuan, M.L., Zhang, Y.L., Dai, F.H., Liu, Y., Wang, Q.M., Zheng, J.J., Xu, L., Holmes, E.C. and Zhang, Y.Z.			
TITLE	A new coronavirus associated with human respiratory disease in China			
JOURNAL	Nature 579 (7798), 265-269 (2020)			

**Change region shown**

---

**Customize view**

---

**Analyze this sequence**

Run BLAST

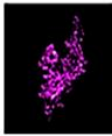
Identify Conserved Domains

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

---

**Protein 3D Structure**



Cryo-EM structure of S protein trimer of SARS-CoV2  
PDB: 7FG7  
Source: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2  
Method: Electron Microscopy  
Resolution: 6.9 Å

[See all 102 structures](#)

تصویر ۳-۱. اطلاعات مربوط به پروتئین سنبله سارس کوو-۲ از پایگاه NCBI

```

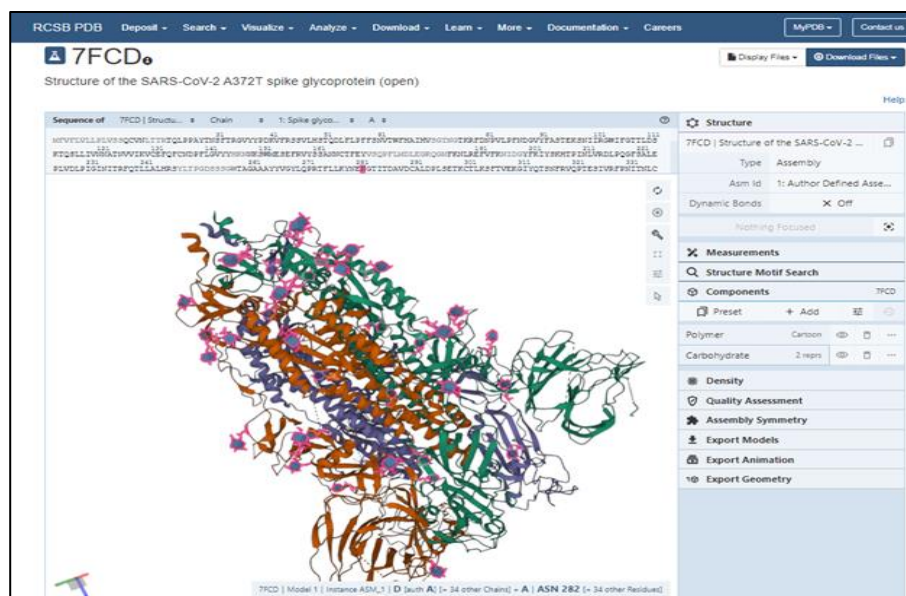
FASTA
Send to: v

surface glycoprotein [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2]
NCBI Reference Sequence: YP_009724390.1
GenPept Identical Proteins Graphics
>YP_009724390.1 surface glycoprotein [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2]
MFVFLVLLPLVSSQCIVLITRRTQLPPAYTNSFTRGVVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSIVTWFAIHV
SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTKSNIRGWIFGTLDLSTQSLIVNIATNIVVIVKVFCEFCNDPF
LGVVYHKHNSMSESEFRVYSSANICTFEYVSQPFMDLEGKQGNFKILREFVFNKIDGYFKIYSKHTPI
NLVRDLPGQFSALEPLVLPIGINITRFQTLALHRSYLPDGSSSGWTAGAAAAYVGYLQPRFTLLKYN
ENGTITDAVDCALDPLSETKTLKSFVTEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASV
YAWNRKRISIKCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPDKLNDLCFTIIVYADSFVIRGDEVRQIAPGQGTGIAD
YIYKLPDDFTGCVIAWHSNLDLSDKVGNNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNIGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKIKCVNFINFNGLTGTGVLTESNKKFL
PFQQFGRDIADTDAVRDPQTLLEILDITPCSFSGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNICTEVPVAIHADQLT
PTWRVYSGSNVQTRAGCLIGAHEVHNSYECIPIGAGICASYQTQINSRPRARSVASQSIAYTHSLG
AENSVAYSNHSIATPHTFTISVTTEILPVSMHTKTSVDCIMYICGDSTECSNLLQYGSFCTQLNRALTGI
AVEQDKNTQEVFAQVQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGD
LGDIAARDLCAQKFNGLTVLPPLLTDEHIAQYTSALLAGTITSGHTFGAGAALQIPFAMQHMAYRFNGIG
VTQINLVYENQKLIANQFNSAIGKIQSLSSTASALGKLDQVWVWQAQALNTLVKQLSSNFGAISVSLNDI
LSRLDKVEAEVQIDRLITGRQLSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKHSCEVLGQSKRVDFCGKGYHLM
SEFQSAPIHGTVFHVTVYPAQEKNFITAPAIKCHDGAHFREGVFSVINGTHWFVQRNFYEPQIITDNT
FVSGNCDVVIGIVHITVYDPLQPELDSFKEELDKYFKIHITSPOVDLGDISGINASVWIIQKEIDRLNEVA
KHLNLSLDLGLKGYEQYIKWPKWYIWLGIAGLIAIWMVTIMLCMTSCCSLKGCCSCGSGCKFDEDD
SEPVKGVKHLHYT

```

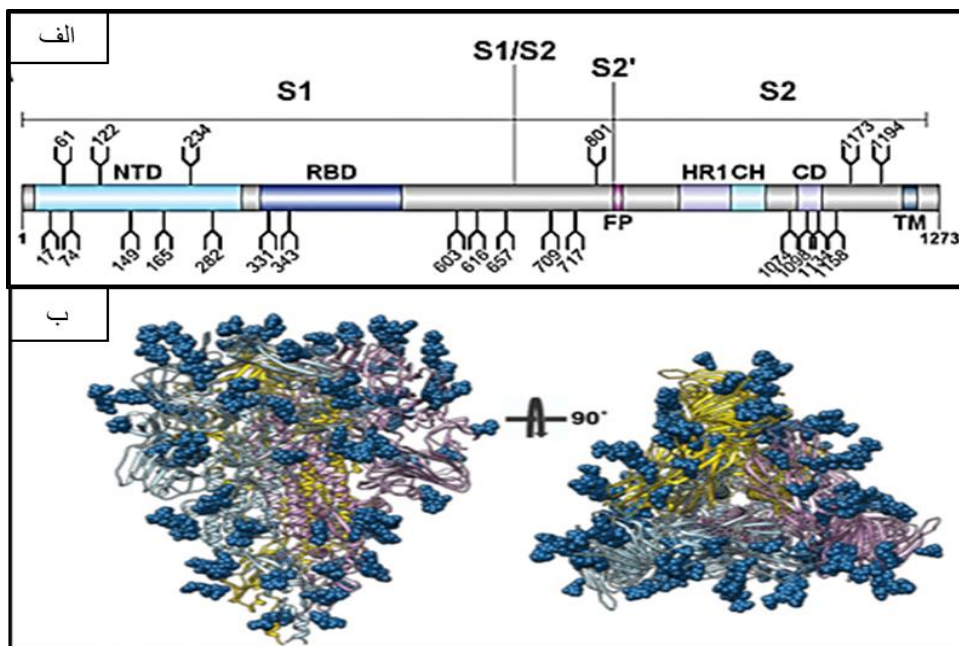
تصویر ۳-۲. توالی کامل FASTA پروتئین سنبله سارس کوو-۲ از پایگاه NCBI

ابتدا جایگاه‌های گلیکوزیله و دارای پیوند دی سولفیدی در کل پروتئین سنبله بدست آمد.



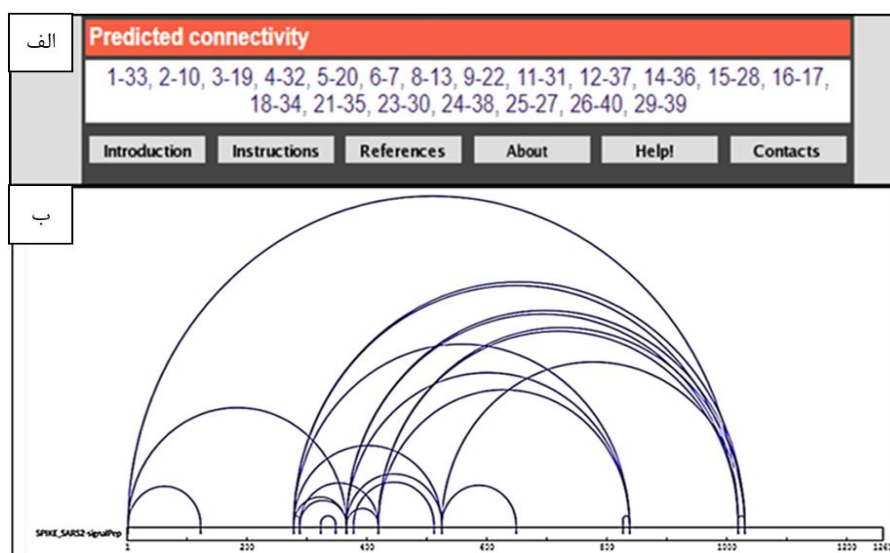
تصویر ۳-۳. نمایش جایگاه‌های گلیکوزیله پروتئین سنبله سارس کوو-۲ توسط

سرور PDB به صورت سه بعدی



تصویر ۳-۴. الف) نمایش جایگاههای گلیکوزیله در پروتئین سنبله سارس کوو-۲ توسط مقاله [۲۵۰]. همانطور که مشخص است ۲۲ جایگاه گلیکوزیله در پروتئین سنبله وجود دارد. ب) نمایش نواحی قندی شده و پرهیز از انتخاب این نواحی برای بخش های مورد نظر

بعد از شناسایی جایگاه های دارای پیوند دی سولفیدی و پیوند گلیکوزیله با توجه به بیان این پروتئین ها در میزبان پروکاریوت و محدودیت های این میزبان در ایجاد تغییرات پس از ترجمه ، عدم انتخاب این جایگاههای دارای پیوند در توالی نهایی در نظر گرفته شد.

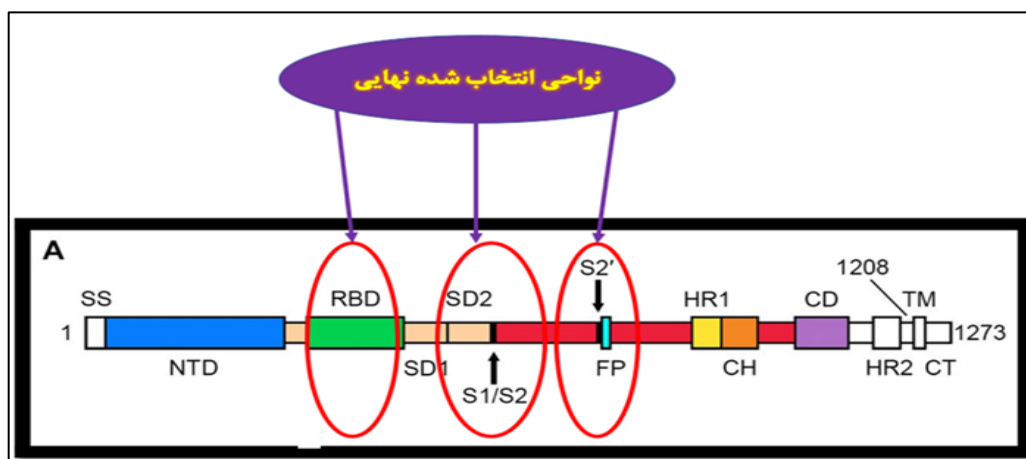


تصویر ۳-۵. الف) پیش بینی جایگاههای دارای پیوند دی سولفیدی در کل توالی پروتئین سنبله توسط نرم افزار DiANNA 1.1 web server (ب) پیش بینی پیوندهای دی سولفیدی در کل توالی پروتئین سنبله (۲۰ پیوند دی سولفیدی) در matrixscience

براساس نتایج مقالات و مطالعات بیوانفورماتیک مهمترین بخش های پروتئین سنبله که باعث تحریک و پاسخ سیستم ایمنی می شود ، انتخاب شدند. این نواحی شامل بخش های Fusion peptide, RBD , Cleavage site از پروتئین سنبله سارس کوو-۲ بود.

الف	<pre> /site_type="other" /notes="trimer interface [polypeptide binding]" /db_xref="CDD:394958" 319..541 Region /region_name="SARS-CoV-2_Spike_S1_RBD" /notes="receptor-binding domain of the S1 subunit of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 Spike (S) protein; cd21480" /db_xref="CDD:394822" order(355,374..377,381..384,386,390,396,405..406,408,414..415,417,424,427,514,516..517,519) Site /site_type="other" /notes="trimer interface [polypeptide binding]" /db_xref="CDD:394822" </pre>	→ RBD
ب	<pre> /site_type="other" /notes="S1/S2 cleavage region" /db_xref="CDD:411965" 798..806 Site /site_type="other" /notes="fusion peptide" /db_xref="CDD:411965" 816..833 Site /site_type="other" /notes="internal fusion peptide" /db_xref="CDD:411965" </pre>	→ Fusion peptide
ج	<pre> /site_type="other" /notes="receptor binding motif" /db_xref="CDD:394827" 543..1208 Region /region_name="SARS-CoV-like_Spike_SD1-2_S1-S2_S2'" /notes="SD-1 and SD-2 subdomains, the S1/S2 cleavage region, and the S2 fusion subunit of the spike (S) glycoprotein from SARS-CoV-2 (COVID-19) and related betacoronaviruses in the B lineage; cd22378" /db_xref="CDD:411965" order(672,694..699,709) Site /site_type="other" /notes="S1/S2 cleavage region" /db_xref="CDD:411965" </pre>	→ S1/S2 Cleavage site

تصویر ۳-۶. نمایش جایگاههای انتخاب شده برای مطالعه در پروتئین سنبله سارس کوو-۲



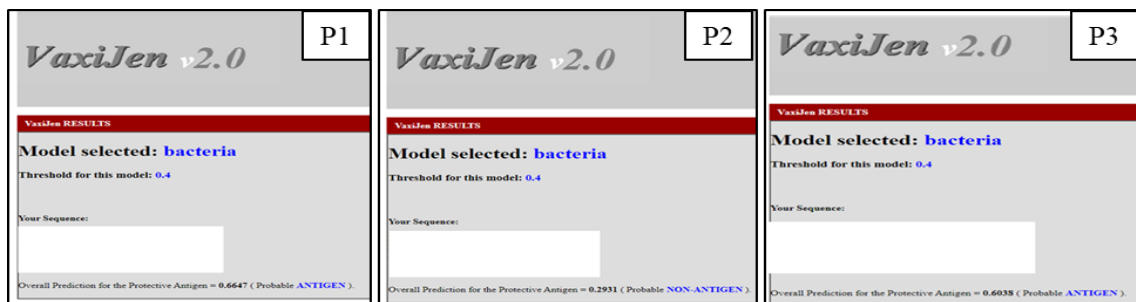
تصویر ۳-۷. تعیین جایگاه RBD, Fusion peptide, Cleavage site در توالی کامل پروتئین سنبله سارس کوو-۲

با توجه به انتخاب میزبان پروکاریوتی برای بیان پروتئین نوترکیب توالی های انتخاب شده RBD , Fusion peptide , Cleavage site توسط مطالعات بیوانفورماتیکی ارزیابی شدند . در انتخاب

توالی های انتخاب شده شاخص های استاندارد یک واکسن در ایمونوژنسیته و محدودیت های سیستم بیانی در آن لحاظ شد. در ادامه برای اختصار در نام پروتئین های تولید شده از Fusion peptide (P2) و RBD (P1) Cleavage site استفاده می شود.

### الف. تعیین پادکنسیتته

جهت ارزیابی پادکنسیتته زیرواحدهای اپی توپی واکسن برای تعیین بهترین توالی پروتئینی، از پایگاه Vaxijenev2.0 استفاده شد. در این پایگاه، از پارامترهای پیش فرض برای تعیین آنتی ژنسیته پروتئین استفاده گردید.



تصویر ۳-۸. نمایش پیش بینی خاصیت پادکنسیتته توالی های P1,P2,P3 توسط پایگاه Vaxijen. همانگونه که نتایج نشان می دهد دو توالی انتخاب شده دارای خاصیت پادکنسیتی می باشند. توالی P2 دارای خاصیت پادکنسیتی نمی باشد ، می توان کوچک بودن اندازه پروتئین را یکی از دلایل احتمالی دانست.

### ب: حساسیت زایی (آلرژنسیته)

از پایگاه AllerTOP برای پیش بینی حساسیت اپی توپ های پیشنهادی برای تولید سازه ایمنی زا استفاده شد. این پایگاه حساسیت های آلرژیکی را از طریق پیش بینی های ترکیبی ارزیابی کرده و آلرژن ها و غیر آلرژن ها را با ویژگی بالا پیش بینی می کند. این امر باعث می شود که این پایگاه برنامه بسیار مفیدی برای پیش بینی واکنش متقابل حساسیت زا (آلرژن) باشد. با توجه به نتایج بدست آمده پروتئین ۱ آلرژن نمی باشد ولی دو پروتئین دیگر پتانسیل آلرژن شدن را دارند. از بین بخش های انتخاب شده ، توالی هایی که احتمال آلرژن زایی کمتری داشتند انتخاب شدند .



P1	P2	P3
<p><b>AllerTOP v. 2.0</b></p> <p>Bioinformatics tool for allergenicity prediction</p> <p>Your sequence is:</p> <p>PROBABLE NON-ALLERGEN</p> <p>The nearest protein is:</p>	<p><b>AllerTOP v. 2.0</b></p> <p>Bioinformatics tool for allergenicity prediction</p> <p>Your sequence is:</p> <p>PROBABLE ALLERGEN</p> <p>The nearest protein is:</p>	<p><b>AllerTOP v. 2.0</b></p> <p>Bioinformatics tool for allergenicity prediction</p> <p>Your sequence is:</p> <p>PROBABLE ALLERGEN</p> <p>The nearest protein is:</p>

تصویر ۳-۹ نمایش پیش بینی خاصیت آلرژنسیته توالی های P1,P2,P3 توسط پایگاه **Aller TOP**. همانگونه که نتایج نشان می دهد پروتئین ۱ غیر آلرژن ولی پروتئین ۲ و ۳ پتانسیل آلرژن شدن را دارند.

#### پ: تعیین ویژگی فیزیکوشیمیایی

با استفاده از پایگاه ProtParam برخی خواص بیوفیزیکی پروتئین شامل درصد و بار اسید آمینه، تعداد اسید آمینه ، وزن مولکولی، pH ایزوالکتریک، قطبیت، نیمه عمر، شاخص ناپایداری، حلالیت در آب، شاخص آلیفاتیک و..... شناسایی شدند.

۱. **نیمه عمر:** عبارت است از مدت زمانی که طول می کشد تا نصف مقدار پروتئین بعد از ساختن در داخل سلول ناپدید شود. نتایج نشان داد نیمه عمر هر سه پروتئین در میزبان پروکاریوتی بیشتر از ۱۰ ساعت است که بسیار خوب است.

۲. **شاخص ناپایداری:** عبارت است از میزان پایداری پروتئین در داخل لوله آزمایش . برای پروتئین های پایدار شاخص ناپایداری کمتر از ۴۰ است و زمانیکه این شاخص بالاتر از ۴۰ باشد به معنای آن است که پروتئین ناپایدار است. بر اساس نتایج بدست آمده هر سه پروتئین پایدار هستند.

۳. **شاخص های آلیفاتیکی:** یک پروتئین عبارت است از به عنوان حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره های جانبی آلیفاتیک تعیین می شود. این شاخص بیان کننده میزان پایداری پروتئین از دنا توره شدن در برابر حرارت است . در میزان شاخص آلیفاتیکی یک پروتئین، چهار اسید آمینه آلانین ، والین ، ایزولوسین و لوسین بیشترین نقش را دارند. نتایج نشان داد هر سه پروتئین در برابر حرارت پایدار هستند.

۴. **شاخص آگریزی (GRAVY)** بر مبنای مجموع اسید آمینه های هیدروفوب تقسیم بر طول پروتئین محاسبه می شود. شاخص پایین تر از صفر برای یک پروتئین به عنوان یک پروتئین گلبولار آبدوست در نظر گرفته می شود . نتایج برای پروتئین ۱ و ۳ منفی گزارش شده که نشان دهنده آبدوست بودن ساختار پروتئین است اما نتیجه پروتئین ۲ مثبت می باشد که نشان دهنده این مطلب است که در ساختار این پروتئین بیشتر اسید آمینه های آگریز وجود دارند .

<p><b>Estimated half-life:</b></p> <p>The N-terminal of the sequence considered is T (Thr).</p> <p>The estimated half-life is: 7.2 hours (mammalian reticulocytes, in vitro). &gt;20 hours (yeast, in vivo). &gt;10 hours (Escherichia coli, in vivo).</p> <p><b>Instability index:</b></p> <p>The instability index (II) is computed to be 12.42 This classifies the protein as stable.</p> <p><b>Aliphatic index:</b> 65.54</p> <p><b>Grand average of hydropathicity (GRAVY):</b> -0.442</p>	P1
<p><b>Estimated half-life:</b></p> <p>The N-terminal of the sequence considered is K (Lys).</p> <p>The estimated half-life is: 1.3 hours (mammalian reticulocytes, in vitro). 3 min (yeast, in vivo). 3 min (Escherichia coli, in vivo).</p> <p><b>Instability index:</b></p> <p>The instability index (II) is computed to be 38.53 This classifies the protein as stable.</p> <p><b>Aliphatic index:</b> 98.62</p> <p><b>Grand average of hydropathicity (GRAVY):</b> 0.147</p>	P2
<p>The N-terminal of the sequence considered is V (Val).</p> <p>The estimated half-life is: 100 hours (mammalian reticulocytes, in vitro). &gt;20 hours (yeast, in vivo). &gt;10 hours (Escherichia coli, in vivo).</p> <p><b>Instability index:</b></p> <p>The instability index (II) is computed to be 27.00 This classifies the protein as stable.</p> <p><b>Aliphatic index:</b> 76.41</p> <p><b>Grand average of hydropathicity (GRAVY):</b> -0.218</p>	P3

تصویر ۳-۱۰. نمایش پیش بینی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی P1,P2,P3 توسط پایگاه ProtParam

### ت: تعیین پیوند دی سولفیدی


پیوندهای دی سولفیدی در توالی‌های انتخاب شده توسط پایگاه DIANNA پیشگویی شد.

در این پیشگویی برای پروتئین ۱، یک پیوند دی سولفیدی و برای پروتئین ۳، سه پیوند دی سولفیدی پیش بینی شده و پروتئین ۲ فاقد پیوند دی سولفیدی است. چند نکته در اینجا لازم به ذکر است: در پیشگویی‌ها کل توالی پروتئین سنبله دارای حدوداً ۲۰ پیوند دی سولفیدی است که در انتخاب توالی مد نظر ما قرار داشت. بنابراین با توجه به این نکته تا جاییکه امکان داشت و به خاصیت ایمنی زایی پروتئین مورد نظر خللی وارد نمی‌کرد اسید آمینه‌های دارای پیوند دی سولفیدی حذف شدند. اما پیوند

دی سولفیدی در ساختار پروتئین ۱ و ۳ قابل حذف نبود و به ساختار کلی پروتئین آسیب میزد و ناگزیر به حضور این اسیدآمینها بودیم.

<b>Step 5: Weighted matching</b>		P1
<b>Predicted bonds</b>		
66 - 74		
<b>Predicted connectivity</b>		
2-3		

 Software <a href="#">Web Supplements</a> <a href="#">Home Page</a> Clote Lab	<b>DiANNA 1.1 web serve</b>		P2
	No disulfide bonds are possible for this sequence, the prediction will not be attempted		
	<a href="#">Web Supplements</a> <a href="#">Home Page</a> Clote Lab		
	<a href="#">Clote Lab</a> <a href="#">Clote Lab</a>		

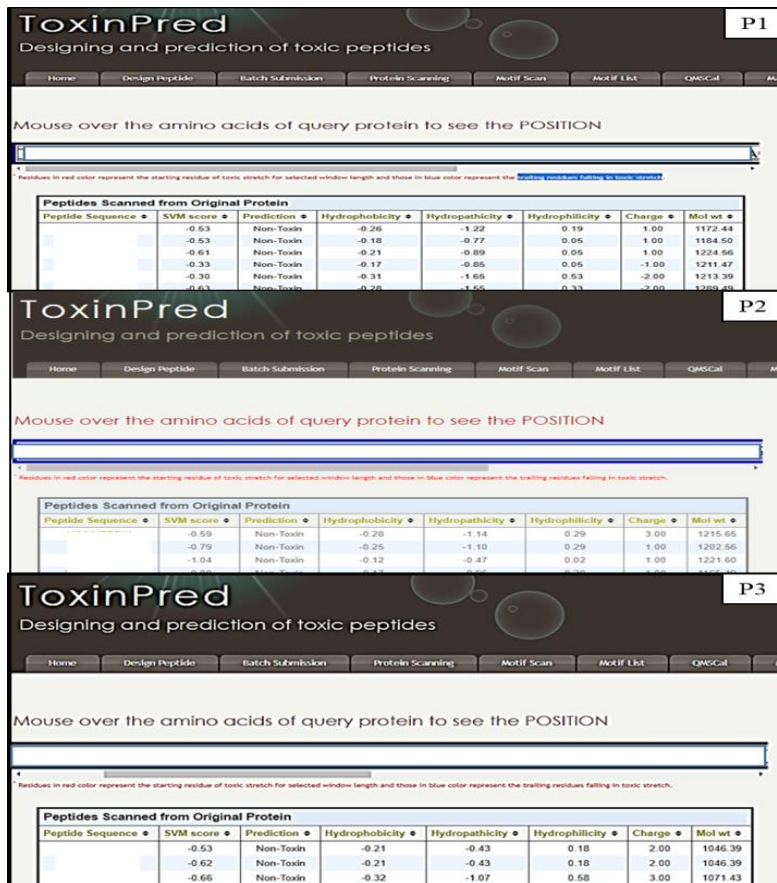
<b>Step 5: Weighted matching</b>		P3
<b>Predicted bonds</b>		
2 - 148		
67 - 139		
94 - 126		
<b>Predicted connectivity</b>		
1-7, 3-6, 4-5		

تصویر ۳-۱۱. نمایش پیش بینی پیوندهای دی سولفیدی در توالی P1, P2, P3 توسط پایگاه DiANNA. پروتئین ۲ فاقد پیوند دی سولفیدی اما پروتئین ۱ و ۳ دارای پیوند دی سولفیدی است.

### ث: پیشگویی سمیت<sup>۱</sup>

اپی توپ های انتخاب شده باید از لحاظ سمیت زایی بررسی شوند. به این منظور از نرم افزار Toxinpred استفاده شد. در این پایگاه توالی های دارای سمیت در میزبان باکتریایی بررسی می شود. برای طراحی این پایگاه، داده مربوط به ۱۵۰ سم باکتریایی شامل ۷۷ سم آگزوتوکسین و ۷۳ سم اندوتوکسین جمع آوری و توالی های بارگذاری شده با این بانک داده مقایسه می شود. در صورت شباهت به توالی موجود در پایگاه، به عنوان وجود سمیت پیشگویی می شود. در اینجا، پایگاه تعداد اسید آمینه های محدودی را به عنوان توکسین گزارش داد. تا جائیکه به ساختار اصلی پروتئین و خاصیت آن آسیب نمی رساند، آنها را حذف کردیم.

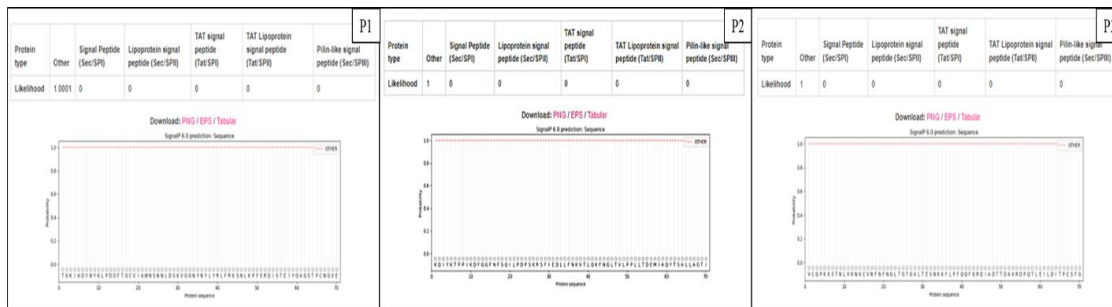
<sup>1</sup> Toxicity



تصویر ۳-۱۳. نمایش پیش بینی سمیت توالی های انتخاب شده P1,P2,P3 توسط پایگاه ToxinPred. نتایج نشان داد برخی از آمینو های دارای خاصیت سمیت هستند.

### ج: پیشگویی سیگنال پپتید

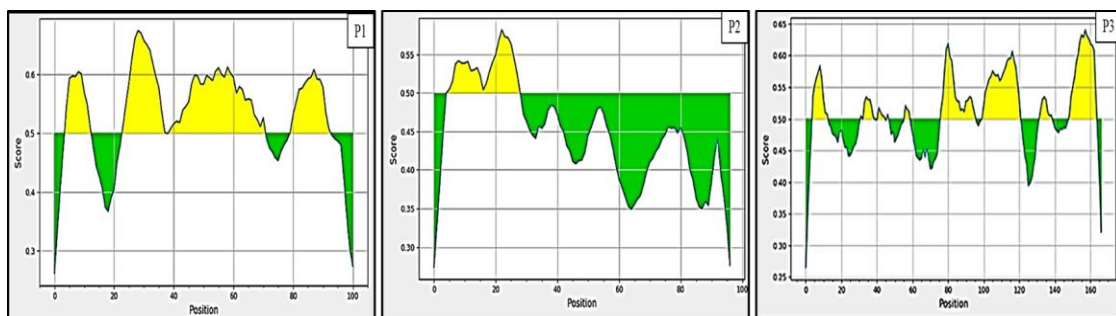
توالی سیگنال پپتید پروتئین باعث هدایت پروتئین به غشا پری پلاسمی سلول می گردد. برای کنترل پروتئین بیان شده و به منظور نگهداشتن پروتئین در رسوب , سیگنال پپتید حذف شد تا پروتئین به بخش پری پلاسم ترشح نشود. بنابراین سیگنال پپتید هر سه پروتئین حذف شد.



تصویر ۳-۱۳. نمایش پیش بینی سیگنال پپتید توالی های انتخاب شده P1,P2,P3 توسط پایگاه SignalP. هر سه توالی فاقد سیگنال پپتید هستند.

### ج: پیشگویی شاخص اپی توپیک

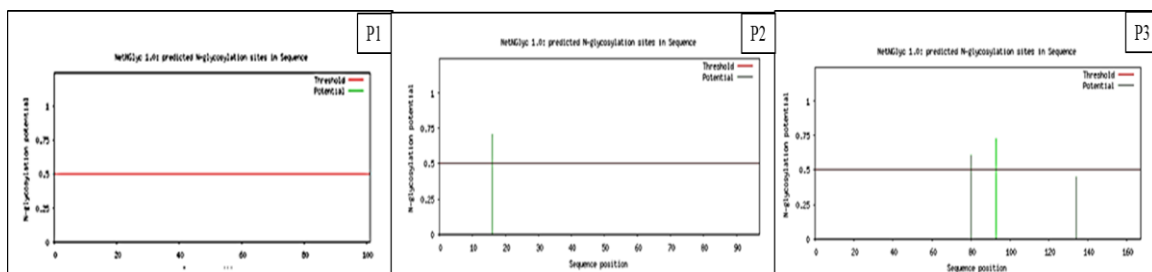
یک اپی توپ قسمتی از یک پادکن است که توسط سیستم دفاعی به ویژه پادتن ها ، سلولهای B و T تشخیص داده می شود. برای انجام فرایند طراحی واکسن بر مبنای اپی توپ، از پایگاه داده IEDB برای پیش بینی نواحی اپی توپیک استفاده کردیم. در این پایگاه با تعیین عناصر مربوطه و انتخاب پروتئین موردنظر و بارگذاری آن، به بخش های اپی توپیک در توالی انتخاب شده دسترسی پیدا کردیم. نواحی زرد رنگ گویای مناطق دارای بخش های اپی توپیک هست. نتایج نشان داد که پروتئین ۱ و ۳ بخش های اپی توپیک بیشتری نسبت به پروتئین ۲ داشتند .



تصویر ۳-۱۴. نمایش پیش بینی جایگاههای اپی توپ در توالی P1,P2,P3 توسط پایگاه IEDB. نواحی زرد رنگ نشانگر شاخص اپی توپیک هستند. هر سه توالی پروتئینی دارای شاخص اپی توپیک هستند اما پروتئین ۱ و ۳ دارای بخش های اپی توپیک بیشتری هستند.

### ح: پیشگویی پیوندهای قندی شده

عدم حضور اسید آمینه های دارای پیوند گلیکوزیله با توجه به میزبان پروکاریوتی بسیار مهم است . نتایج نشان داد پروتئین ۱ فاقد پیوند قندی است اما پروتئین ۲ و ۳ پتانسیل تشکیل یک پیوند قندی را دارند . در اینجا ما اطلاعات پیشگویی شده از توالی های انتخاب شده را با هم مقایسه کردیم و در نهایت پروتئین ۲ و ۳ با احتمال یک جایگاه قندی انتخاب شدند.

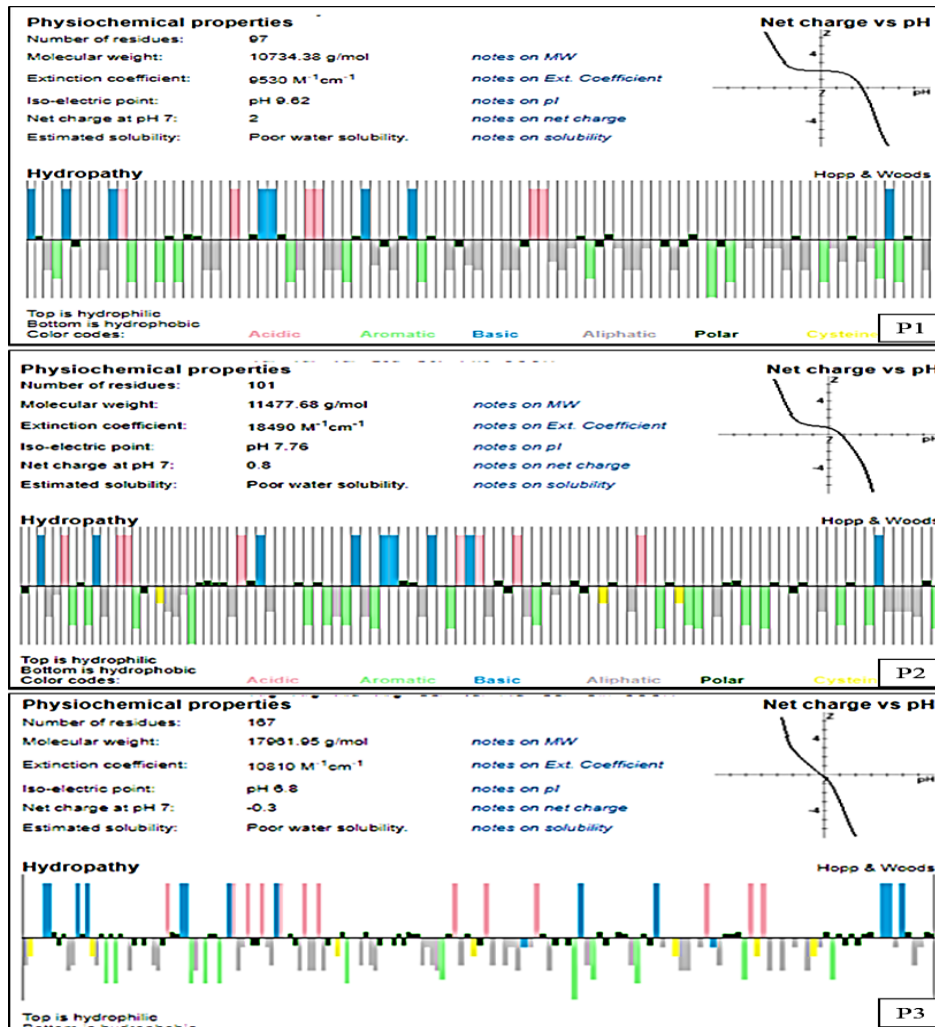


تصویر ۳-۱۵. نمایش پیش بینی پیوند گلیکوزیله در توالی P1,P2,P3 توسط پایگاه NetNGlyc-1.0

نتایج نشان می دهد پروتئین ۱ فاقد پیوند قندی می باشد و پروتئین ۲ و ۳ امکان قندی شدن را دارند.

## خ: پیشگویی ساختار اولیه

پایگاه Pepcalc ساختار اولیه پروتئین که به صورت خطی است را تجزیه و تحلیل می کند. همچنین این پایگاه شاخص هیدروپاتی را نیز نشان می دهد. این شاخص معیاری از قطبیت زنجیر جانبی اسید آمینه ها است. هرچه زنجیر جانبی هیدروفوب تر باشد شاخص هیدروپاتی مثبت تر است و بالعکس. در اینجا نمودار هیدروپاتی به نمایش در آمده است و ویژگی تمام اسید آمینه ها ذکر شده است. نتایج نشان داد هر سه پروتئین دارای حلالیت کمی در آب هستند.



تصویر ۳-۱۶. نمایش پیشگویی ساختار اول پروتئین های P1,P2,P3 توسط پایگاه pepcalc. این پایگاه تعداد اسید آمینه، وزن ملکولی، PI پروتئین، شاخص هیدروپاتی و ..... را نشان می دهد.

## د: پیشگویی ساختار دوم پروتئین

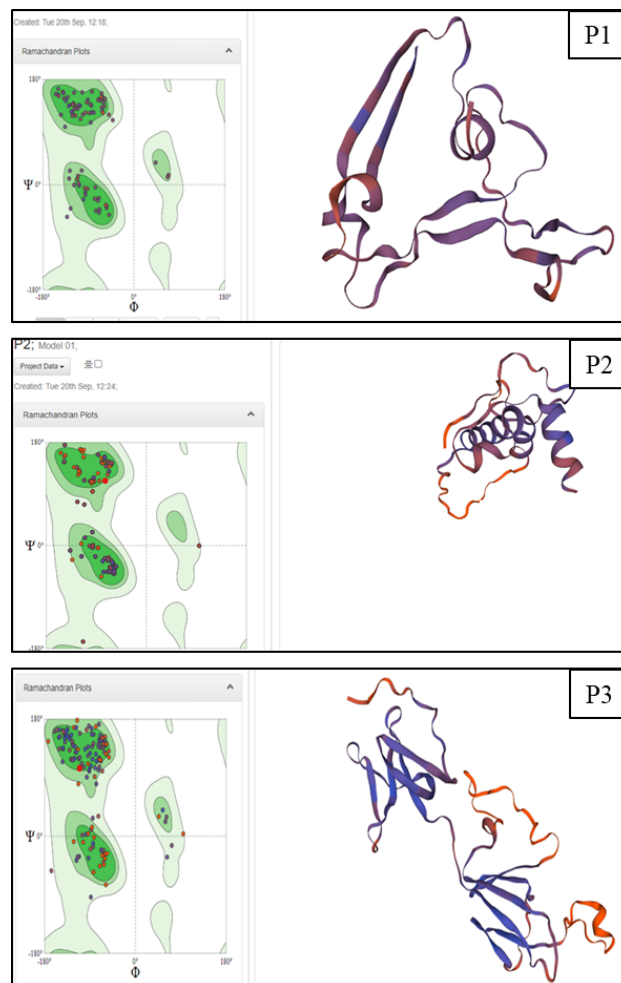
پیش بینی ساختار دوم پروتئین ها از روی توالی آمینواسیدها یک امر مهم و اساسی در دانش پروتئین ها و زیست محاسباتی است که نقش مهمی در تعیین ساختار سه بعدی و در نتیجه عملکرد پروتئین ها دارد. به همین دلیل در چند دهه ی اخیر، تلاش های فراوانی در این زمینه صورت گرفته و روش های زیادی برای پیش بینی ساختار دوم پروتئین ها ارائه شده است. در اینجا از پایگاه Prabi برای پیشگویی ساختار دوم پروتئین ها استفاده شد. از پیشگویی بدست آمده در این پایگاه برای مقایسه با نتایج تست CD استفاده می شود.

Sequence length : 101	P1	Sequence length : 97	P2	Sequence length : 167	P3
SOPMA :		SOPMA :		SOPMA :	
Alpha helix (Hh) :	6 is 5.94%	Alpha helix (Hh) :	37 is 38.14%	Alpha helix (Hh) :	24 is 14.37%
3 <sub>10</sub> helix (Gg) :	0 is 0.00%	3 <sub>10</sub> helix (Gg) :	0 is 0.00%	3 <sub>10</sub> helix (Gg) :	0 is 0.00%
Pi helix (Ii) :	0 is 0.00%	Pi helix (Ii) :	0 is 0.00%	Pi helix (Ii) :	0 is 0.00%
Beta bridge (Bb) :	0 is 0.00%	Beta bridge (Bb) :	0 is 0.00%	Beta bridge (Bb) :	0 is 0.00%
Extended strand (Ee) :	27 is 26.73%	Extended strand (Ee) :	12 is 12.37%	Extended strand (Ee) :	44 is 26.35%
Beta turn (Tt) :	6 is 5.94%	Beta turn (Tt) :	5 is 5.15%	Beta turn (Tt) :	15 is 8.98%
Bend region (Ss) :	0 is 0.00%	Bend region (Ss) :	0 is 0.00%	Bend region (Ss) :	0 is 0.00%
Random coil (Cc) :	62 is 61.39%	Random coil (Cc) :	43 is 44.33%	Random coil (Cc) :	84 is 50.30%
Ambiguous states (?) :	0 is 0.00%	Ambiguous states (?) :	0 is 0.00%	Ambiguous states (?) :	0 is 0.00%
Other states :	0 is 0.00%	Other states :	0 is 0.00%	Other states :	0 is 0.00%

تصویر ۳-۱۷. نمایش پیشگویی ساختار دوم پروتئین های P1,P2,P3 توسط پایگاه Prabi

## ذ: پیشگویی ساختار سوم پروتئین

ساختار سوم پروتئین توسط پایگاه Swiss Model پیشگویی شد. معمولا بعد از پیشگویی ساختار سوم یک پروتئین به منظور ارزیابی کیفیت پارامترهای ساختاری مدل ساخته شده نمودار رامچاندرا برای الگو و پروتئین هدف ترسیم می شود. نمودار رامچاندرا وضعیت مجاز هر زاویه را برای ساختارهای پروتئین را نشان می دهد و با نامهای Ramachandran plot یا  $[\phi \text{ و } \psi]$  شناخته می شود. نتایج نشان میدهد هر سه پروتئین در محدوده مجاز نمودار رامچاندرا قرار دارند.



تصویر ۳-۱۸. نمایش پیشگویی ساختار دوم و نمودار راماچاندران پروتئین های P1,P2,P3

توسط پایگاه Swiss Model

در مجموع نتایج به دست آمده نشان دهنده ویژگی های مطلوب سه ناحیه انتخاب شده P1,P2,P3 برای استفاده به عنوان کاندید واکسن بود.



## ۲-۳. مدل سازی مولکولی<sup>۱</sup> RBD-ACE2

اتصال سارس کوو-۲ به گیرنده سطح سلول ACE2 از طریق بخش RBD می‌باشد و سپس با ورود ژنوم ویروس به داخل سلول عفونت آغاز می‌شود. بنابراین لازم بود اتصال پروتئین نوترکیب RBD به گیرنده ACE2 توسط داکینگ بررسی شود. به منظور بررسی احتمال اتصال پروتئین نوترکیب و گیرنده ابتدا به وسیله پایگاه Robetta ساختار سه بعدی پروتئین نوترکیب RBD در قالب PDB بدست آمد. سپس ساختمان سه بعدی ACE2 نیز توسط پایگاه RCSB بدست آمد. داکینگ مولکولی توسط پایگاه HDock انجام شد. پایگاه HDock برای پیش‌بینی کمپلکس‌های اتصال بین دو مولکول مانند پروتئین‌ها با استفاده از یک ساز و کار اتصال هیبریدی است. دو شاخص مهم برای بررسی قدرت اتصال در نتایج داکینگ این پایگاه ارائه می‌شود که شامل:

**شاخص اتصال<sup>۲</sup>:** یک نتیجه حاصل از انرژی آزاد اتصال و اتصال تمایلی لیگاند - گیرنده است و منفی تر بودن آن نشان از اتصال قویتر و پایدارتر لیگاند به گیرنده هست. هر چند این یک پیشگویی هست و با مدل‌های تجربی مقایسه نمی‌شود. شاخص اتصال برای مدل داکینگ پروتئین - گیرنده ، ۲۷،۳۲۷- بود که نشان‌دهنده اتصال مناسبی می‌باشد.

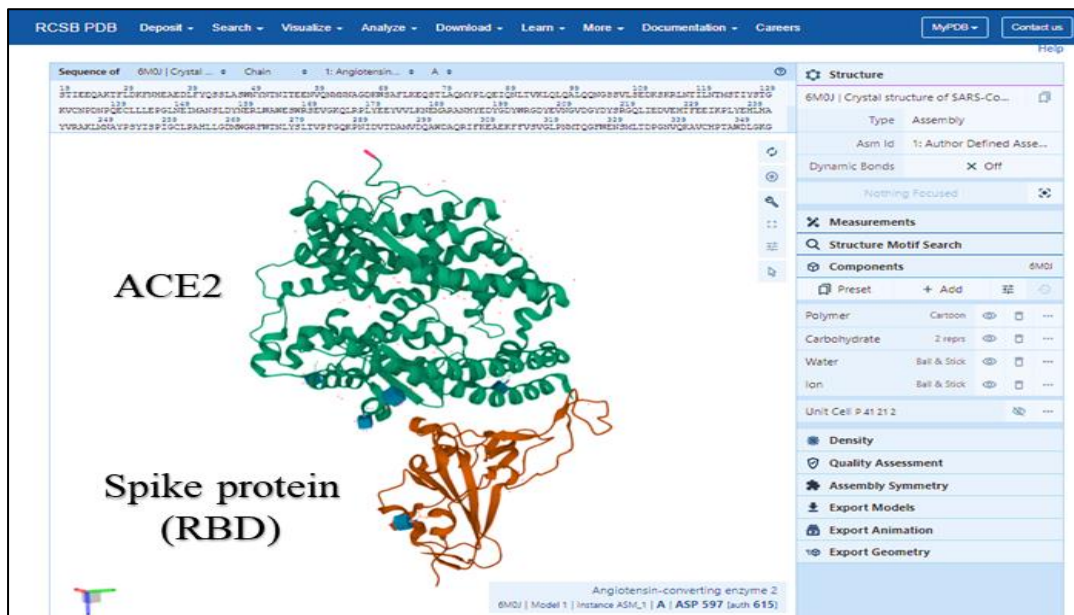
**شاخص اطمینان<sup>۳</sup>:** با توجه به اینکه کمپلکس‌های پروتئین-پروتئین/RNA/DNA در PDB معمولاً دارای نمره اتصال حدود ۲۰۰- یا بهتر هستند، در اینجا به طور تجربی یک شاخص اطمینان وابسته به نمره اتصال را برای نشان دادن احتمال اتصال دو مولکول تعریف کرده است. تقریباً وقتی شاخص اطمینان بالای ۰،۷ باشد، احتمال اتصال دو مولکول بسیار زیاد است. هنگامی که امتیاز اطمینان بین ۰،۵ و ۰،۷ باشد، اتصال دو مولکول امکان پذیر است. هنگامی که امتیاز اطمینان زیر ۰،۵ باشد، بعید است که دو مولکول به یکدیگر متصل شوند. با این وجود، امتیاز اطمینان در اینجا به دلیل ماهیت تجربی آن باید با دقت مورد استفاده قرار گیرد. نتایج ما نشان دهنده شاخص اطمینان بالاتر از ۰،۸ بودند که نشان‌دهنده احتمال زیاد اتصال بین گیرنده و پروتئین نوترکیب است.

در جدول ۲-۳ ، مشخصات ۱۰ مدل برتر را که احتمال اتصال بیشتری دارند ، نشان داده شده است .

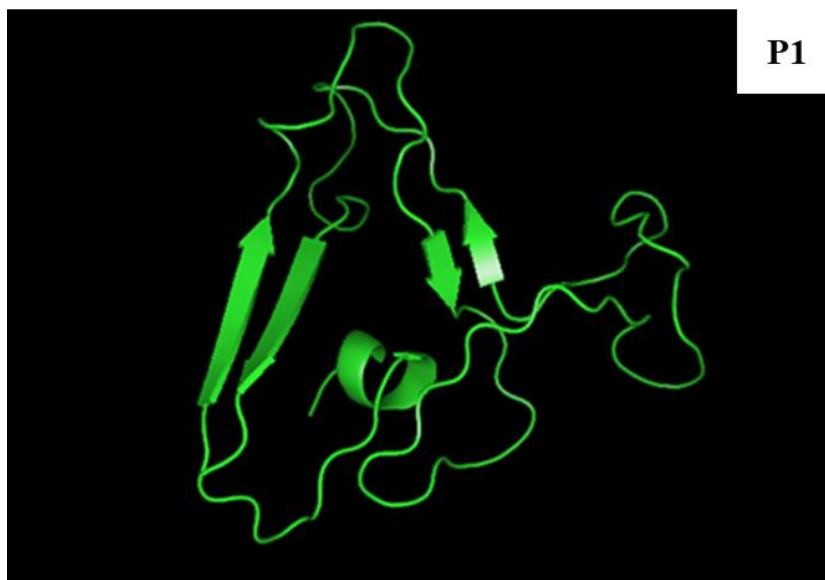
<sup>1</sup> Molecular Docking

<sup>2</sup> Docking score

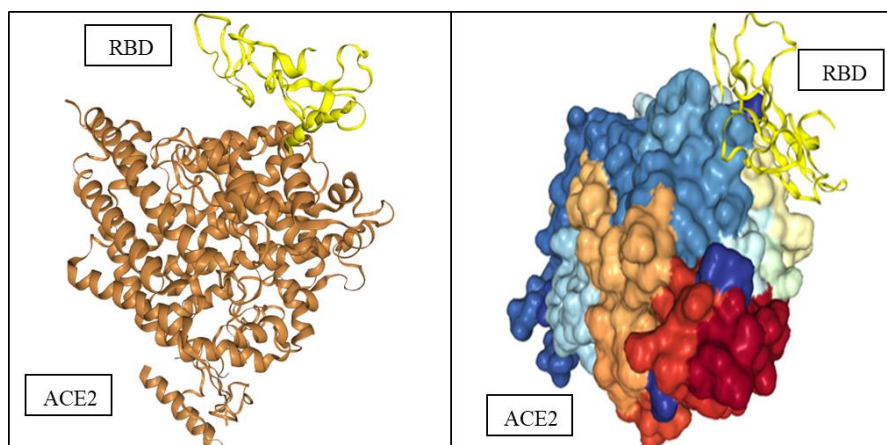
<sup>3</sup> Confidence Score



تصویر ۳-۱۹. پیش بینی داکینگ مولکولی بین پروتئین سنبله سارس کوو-۲ و گیرنده ACE2 توسط پایگاه RCSB



تصویر ۳-۲۰. نمایش ساختار سه بعدی پروتئین ۱ (RBD) توسط پایگاه PDB



تصویر ۳-۲۱. نمایش داکینگ مولکولی بین RBD-ACE2 نو ترکیب توسط پایگاه HDOCK

جدول ۳-۲. مشخصات ۱۰ مدل پیش بینی شده برتر از نتایج داکینگ مولکولی گیرنده-لیگاند

Molecule	PDB ID	Chain ID	Align_length	Coverage	Seq_ID (%)
Receptor	<a href="#">7EKH</a>	A	597	0.784	100.0
Ligand	<a href="#">7EKH</a>	B	101	1.000	99.0

Note: The built model of "Model 0" based on the above PDB complex template has a *high* confidence.

#### Summary of the Top 10 Models

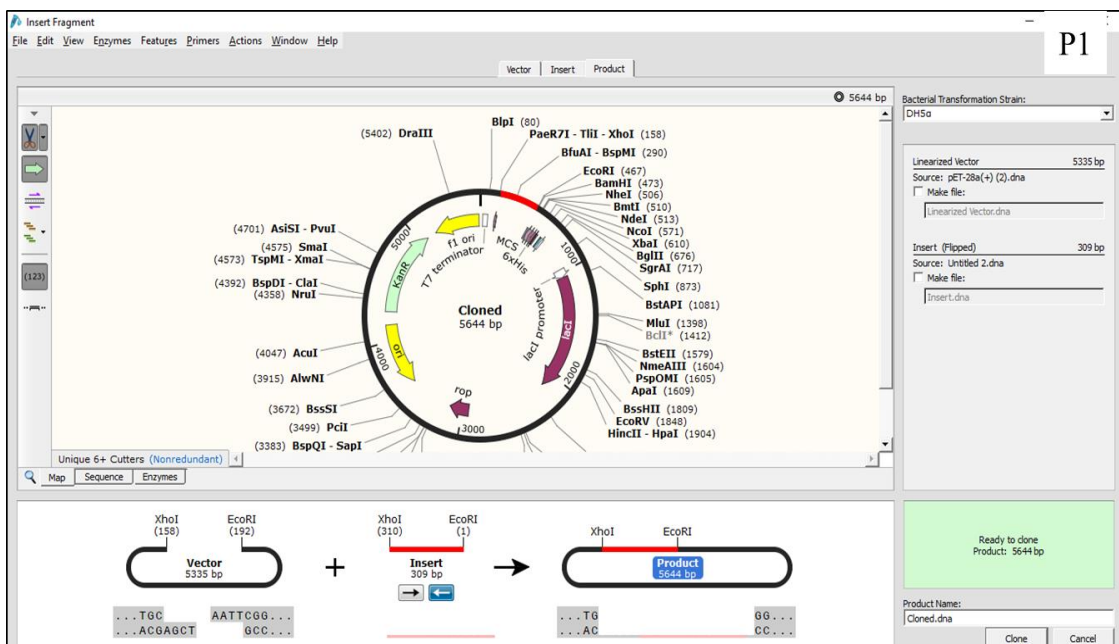
Rank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Docking Score	-327.27	-260.17	-252.49	-247.80	-246.20	-241.20	-236.99	-236.95	-236.60	-233.10
Confidence Score	0.9720	0.9006	0.8859	0.8761	0.8726	0.8610	0.8507	0.8506	0.8497	0.8405
Ligand rmsd (Å)	0.57	83.59	54.62	86.54	42.59	45.67	74.97	79.55	56.56	39.91
Interface residues	<a href="#">model 1</a>	<a href="#">model 2</a>	<a href="#">model 3</a>	<a href="#">model 4</a>	<a href="#">model 5</a>	<a href="#">model 6</a>	<a href="#">model 7</a>	<a href="#">model 8</a>	<a href="#">model 9</a>	<a href="#">model 10</a>

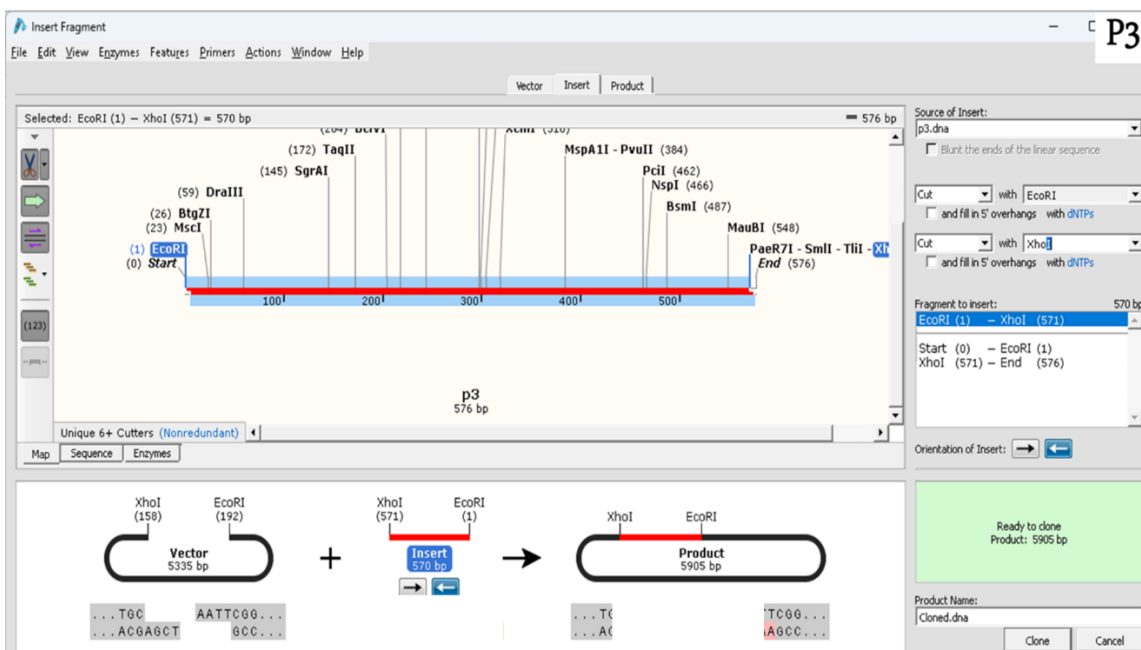
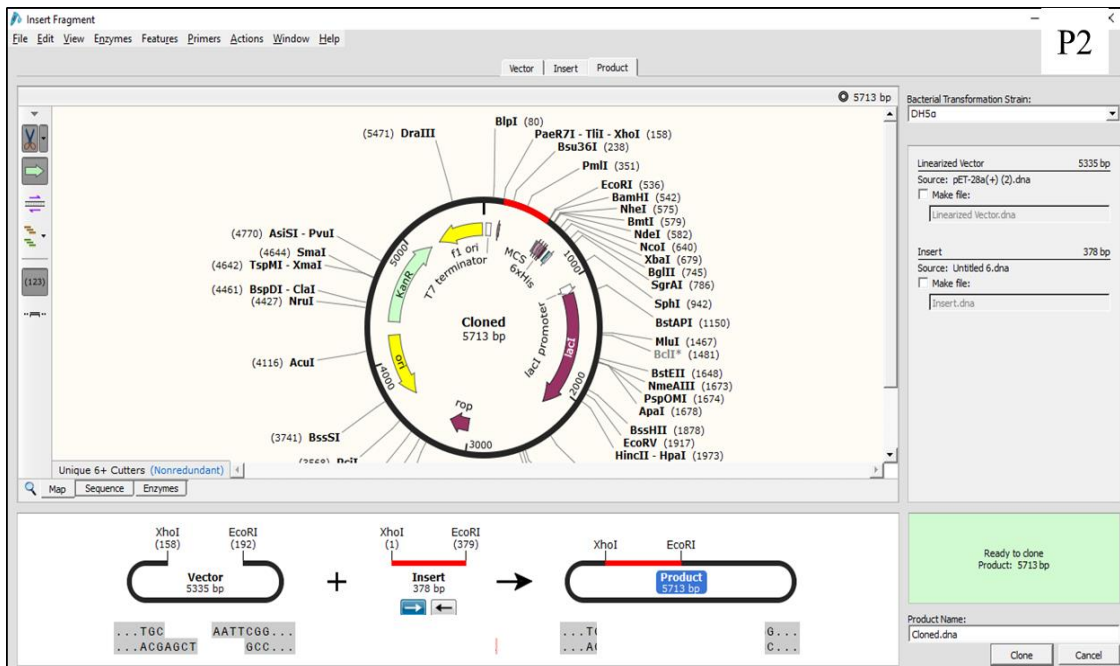
Note: The models are ranked according to the docking scores. Please click [help](#) for the explanations of evaluation metrics

شاخص داکینگ برای ۱۰ مدل اول حاکی از اتصال قوی و پایدار بین پروتئین نو ترکیب-گیرنده هست. همانطور که مشاهده می شود شاخص داکینگ ۱۰ مدل اول بالاتر از ۲۰۰- است. همچنین شاخص اطمینان نیز بیشتر از ۰.۷ است. در این پایگاه شاخص RMSD را به صورت معیار مهم و اصلی برای اتصال در نظر نمی گیرد اما به طور کلی گفته شده است شاخص RMSD کمتر از ۲ نشان دهنده نزدیک بودن ساختار پروتئین به ساختار واقعی و مرجع آن است. در اینجا مدل ۱ دارای شاخص ۰.۵ می باشد. بنابراین میتواند احتمال اتصال مناسب بین گیرنده ACE2 و RBD را قوت بخشد.

### ۳-۳. کلون سازی توالی ژنی P1,P2,P3 در وکتور pET28a(+)

توالی سه بخش متفاوت از ژن سنبله سارس کوو-۲ (سویه ووهان) شامل بخشهایی از RBD(P1), FP(P2) و CS(P3) انسانی انتخاب و توسط نرم افزار Snap gene در وکتور pET-28a(+) برای بیان در میزبان پروکاریوتی کلون شد. جایگاه برش برای هر سه ژن بین جایگاه های XhoI و EcoRI به همراه برچسب هیستیدینی در N-terminal و C-terminal طراحی شد. تولید پروتئین به صورت ادغام با برچسب هیستیدینی، امکان تشخیص پروتئین نو ترکیب را در وسترن بلات با پادتن اختصاصی بر علیه برچسب هیستیدینی در یک مرحله و تخلیص پروتئین نو ترکیب بیان شده، با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل امکان پذیر خواهد نمود.





تصویر ۳-۲۲. نمایش کلون قطعه مورد نظر P1,P2,P3 در وکتور pET-28a توسط نرم افزار SnapGene

## ۲. مطالعات مولکولی

### ۳-۴. سنتز ژن

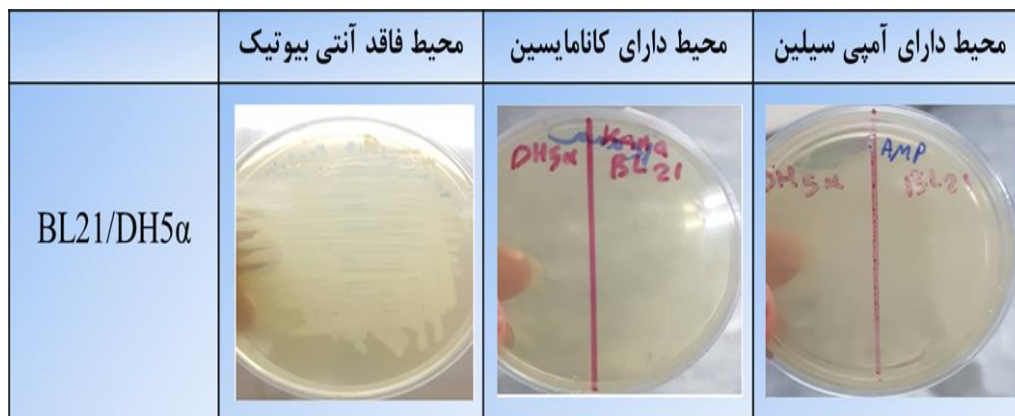
توالی طراحی شده داخل وکتور جهت سنتز به شرکت Genevay سفارش داده شد. ویژگی‌ها و پیش-بینی‌های لازم برای قرار گرفتن ژن مورد نظر در داخل وکتورهای هدف در نظر گرفته شد. برای انجام این رساله سه ژن برای سنتز سفارش داده شدند. ژن‌ها به ترتیب مربوط به بخش RBD,FP,CS بوده که در وکتور pET-28a کلونینگ شده است.

### ۳-۵. مستعد نمودن سویه‌ی BL21 و DH5 $\alpha$ باکتری اشرشیاکلاهی به

#### روش شیمیایی

ابتدا باید سویه باکتریایی مورد نظر را مستعد دریافت پلاسمید نو ترکیب می کردیم. بعد از مستعد سازی هر دو سویه BL21 و DH5 $\alpha$ ، برای اطمینان از عدم آلودگی باکتری‌ها در روند کار، چک آلودگی انجام شد و بعد از تأیید عدم آلودگی در باکتری‌های مستعد شده، انتقال پلاسمید‌های نو ترکیب به روش شیمیایی انجام شد. سپس رسوب بدست آمده از محصول انتقال، بر روی پلیت جامد حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شد و به مدت ۱۲-۱۴ ساعت در دمای ۳۷ $^{\circ}$ C گرماگذاری شد.

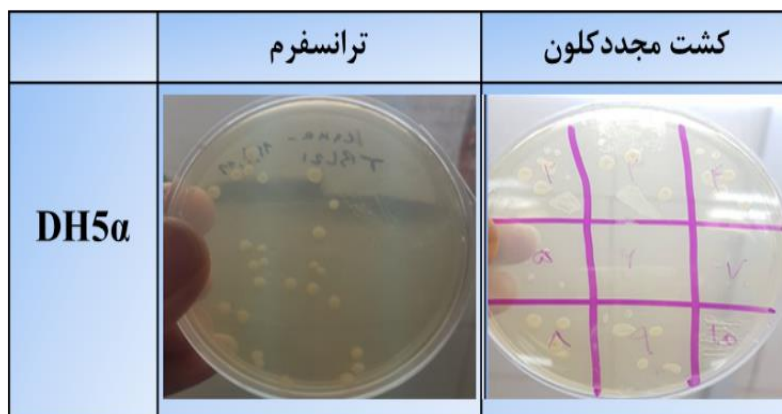
روز بعد برای تأیید انتقال، بر روی کلون‌های رشد کرده، Colony-PCR انجام شد. در اینجا از پرایمرهای مخصوص به pET-28a (T7 promoter و T7 Terminator) استفاده شد. نمونه‌ها بعد از Colony-PCR توسط بستر ژل آگارز بررسی شدند. کلون‌های رشد کرده با این پرایمرها در colony-PCR جواب دادند و این نتیجه نشان می‌دهد که کلون‌های رشد کرده حاوی پلاسمیدهای دارای مقاومت به کانامایسین بوده و انتقال پلاسمید به داخل باکتری با موفقیت انجام شده است.



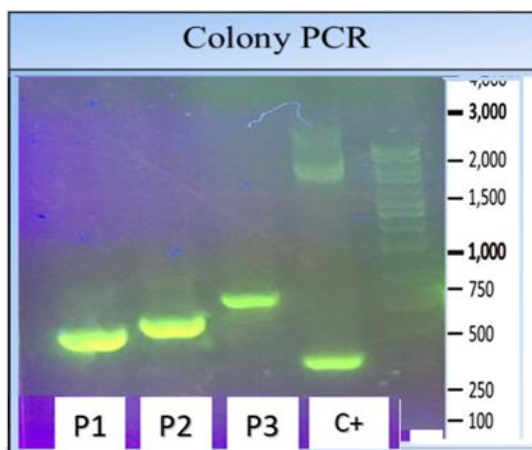
تصویر ۳-۲۳. کشت باکتری‌های مستعد شده بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین، آمپی سیلین و بدون آنتی بیوتیک برای چک آلودگی. هیچ آلودگی در پلیت‌ها مشاهده نشد.

## ۳-۶. انتقال (ترانسفورم) پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن P3,P2,P1 به باکتری مستعد DH5α

پلاسمید نو ترکیب به باکتری مستعد منتقل شد و بعد از کشت باکتری روی پلیت آگار به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد. روز بعد به منظور تأیید انتقال پلاسمید به باکتری، colony PCR انجام شد.



تصویر ۳-۲۴. نمایش کلون های رشد کرده حاصل از انتقال پلاسمید نو ترکیب به باکتری DH5α در محیط LB آگار حاوی کانامایسین

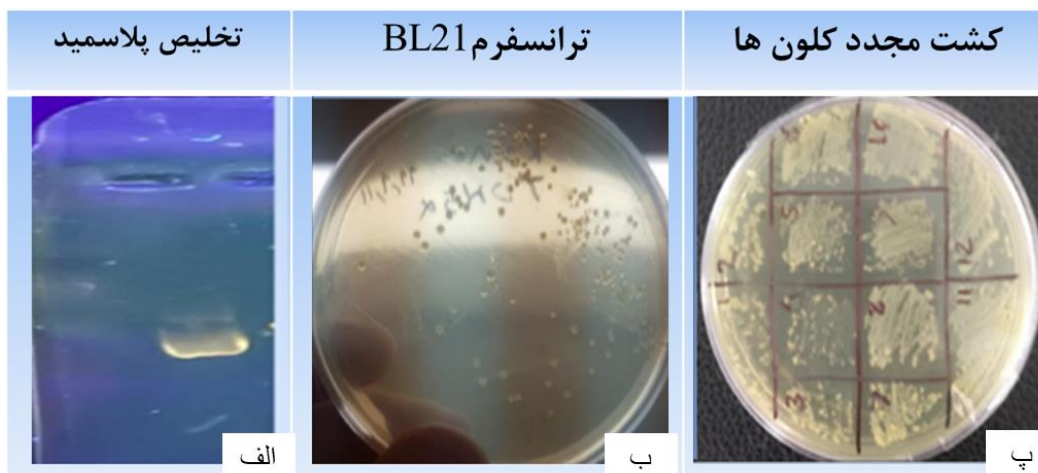


تصویر ۳-۲۵. تأیید انتقال پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن P1,P2,P3 به باکتری DH5α توسط Colony PCR بر روی ژل آگاروز. C+ به عنوان کنترل مثبت است (pET-28a خالی) و سه نمونه دیگر pET-28a حاوی ژن مورد نظر) با احتساب بخشهایی از وکتور که توسط پرایمر ساخته شده به ترتیب حدوداً در ۶۰۰، ۶۱۰ و ۸۰۰ برای هر سه پروتئین دیده می شود.

بعد از انتخاب کلون مناسب، کشت آن در حجم ۵ میلی لیتر انجام شد و تخلیص پلاسمید نوترکیب به منظور انتقال آن به سویه بیانی BL21 انجام شد.

### ۳-۷. تخلیص پلاسمید نوترکیب و انتقال آن به باکتری BL21

پلاسمید نوترکیب توسط کیت تخلیص شده و سپس بر روی ژل آگاروز بررسی و غلظت آن توسط نانودراپ سنجش شد. بعد از تخلیص پلاسمید نوترکیب به منظور بیان پروتئین نوترکیب از سویه بیانی BL21 استفاده و به آن سویه نیز منتقل شد.



تصویر ۳-۲۶. الف: نمایش پلاسمید نوترکیب تخلیص شده از سویه DH5a و تأیید آن توسط ژل آگاروز، ب: نمایش کلون های رشد کرده حاصل از انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری BL21 در محیط LB-آگار حاوی کانامایسین، پ: کشت مجدد کلون های رشد کرده

### ۳-۸. بیان پروتئین P1, P2, P3 در باکتری BL21 و بررسی آن توسط

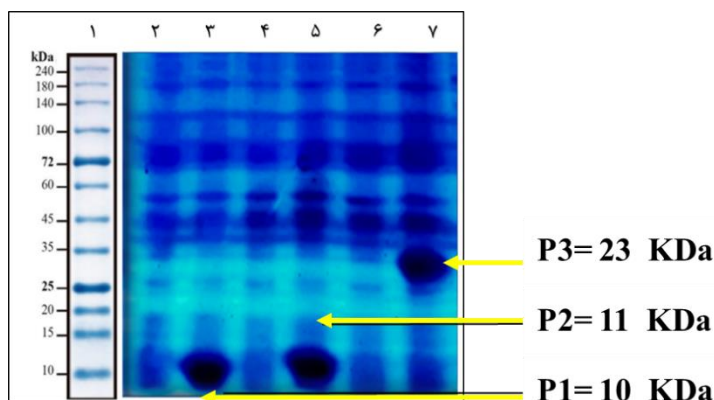
#### الکتروفورز SDS-PAGE

برای تأیید بیان پروتئین و حضور پروتئین در فاز محلول (محیط رویی) و یا نامحلول (رسوب) از الکتروفورز استفاده شد. در این بخش بعد از بهینه سازی بیان پروتئین و تأیید بهترین شرایط برای ادامه کار، رسوب بدست آمده از تلقیح را با بافر لیزهای متفاوت ارزیابی کردیم. نتایج نشان داد هیچ کدام از پروتئین ها در فاز محلول<sup>۱</sup> نیستند و هر سه در فاز نامحلول<sup>۲</sup> قرار دارند.

<sup>۱</sup> soluble

<sup>۲</sup> Inclusion body

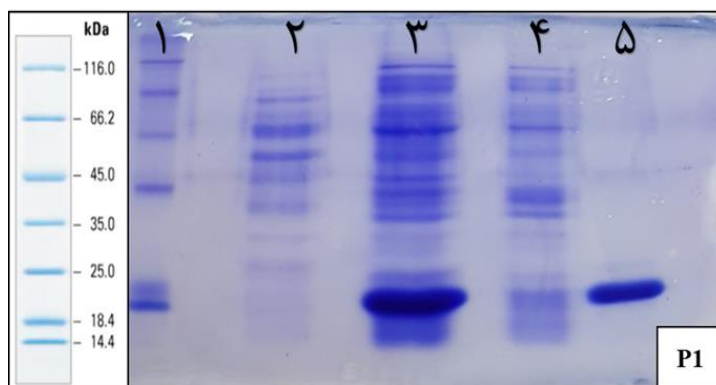




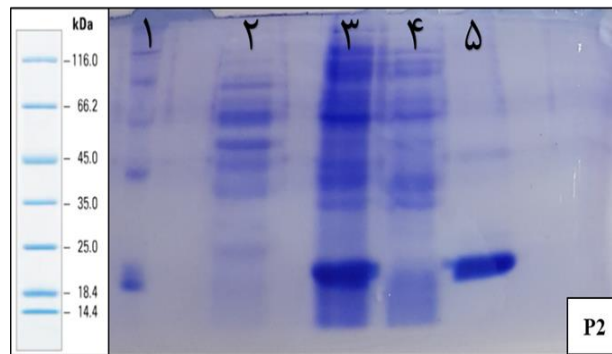
تصویر ۳-۲۷. بررسی پروتئین در فاز محلول یا نامحلول توسط الکتروفورز SDS-PAGE. در این الکتروفورز مشخص شد هر سه پروتئین در فاز نامحلول قرار دارند. ستون ۱: مارکر وزن ملکولی پروتئین ، ستون ۲: محلول رویی P1 ، ستون ۳: رسوب P1 ، ستون ۴: محلول رویی P2 ، ستون ۵: رسوب P2 ، ستون ۶: محلول رویی P3 ، ستون ۷: رسوب P3

### ۳-۹. تخلیص پروتئین نو ترکیب با استفاده از ستون تمایلی نیکل

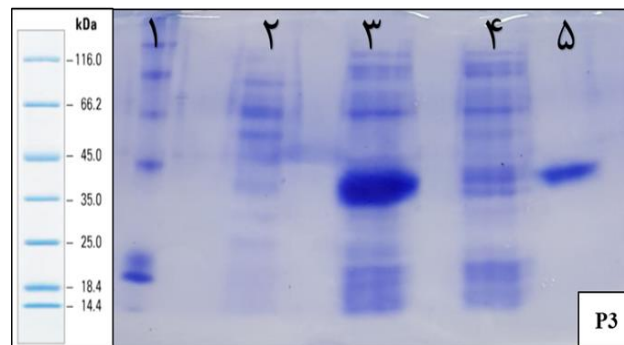
تخلیص پروتئین ها توسط ستون نیکل انجام شد. به دلیل عدم تخلیص پروتئین ها با بافرهای طبیعی و هیبرید، در نهایت از بافر اوره استفاده شد و با ایجاد شیب pH در بافر ، پروتئین ها به صورت کاملا خالص (تک باند) تخلیص شدند. سپس با الکتروفورز تائید و برای تعویض بافر و کاهش مولاریته اوره در پروتئین های تخلیص شده دیالیز انجام شد و در نهایت توسط ستون آمیکون تغلیظ شد.



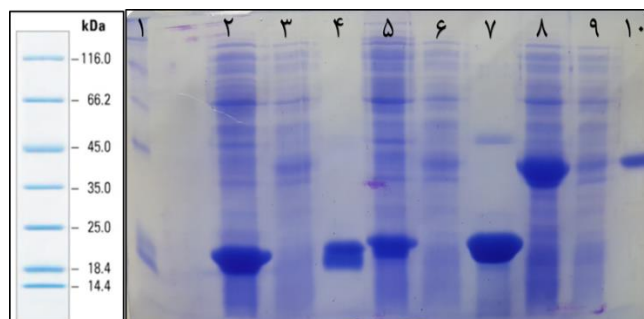
تصویر ۳-۲۸. بررسی الکتروفورز SDS-PAGE خروجی های ستون حاوی رزین نیکل حاصل از پروتئین ۱. ستون ۱: مارکر پروتئین. ستون ۲: لیزات باکتری القا شده BL21 فاقد پلاسمید به عنوان کنترل منفی ، ستون ۳: لیزات باکتری القا شده قبل از عبور از ستون حاوی رزین نیکل ، ستون ۴: لیزات باکتری بعد از عبور از ستون نیکل ، ستون ۵: پروتئین تخلیص شده از ستون نیکل



تصویر ۳-۲۹. بررسی الکتروفورز SDS-PAGE خروجی های ستون حاوی رزین نیکل حاصل از پروتئین ۲. ستون ۱: مارکر پروتئین. ستون ۲: لیزات باکتری القا شده BL21 فاقد پلاسمید به عنوان کنترل منفی ، ستون ۳: لیزات باکتری القا شده قبل از عبور از ستون حاوی رزین نیکل ، ستون ۴: لیزات باکتری بعد از عبور از ستون نیکل ، ستون ۵: پروتئین تخلیص شده از ستون نیکل



تصویر ۳-۳۰. بررسی الکتروفورز SDS-PAGE خروجی های ستون حاوی رزین نیکل حاصل از پروتئین ۳. ستون ۱: مارکر پروتئین. ستون ۲: لیزات باکتری القا شده BL21 فاقد پلاسمید به عنوان کنترل منفی ، ستون ۳: لیزات باکتری القا شده قبل از عبور از ستون حاوی رزین نیکل ، ستون ۴: لیزات باکتری بعد از عبور از ستون نیکل ، ستون ۵: پروتئین تخلیص شده از ستون نیکل



تصویر ۳-۳۱. الکتروفورز SDS-PAGE هر سه پروتئین نوترکیب تخلیص شده . ستون ۱: مارکر وزن ملکولی پروتئین، ستون ۲: لیزات باکتری پروتئین ۱ قبل از ستون نیکل ، ستون ۳ : لیزات باکتری پروتئین ۱ بعد از عبور از ستون نیکل ، ستون ۴: پروتئین ۱ تخلیص شده، ستون ۵: لیزات باکتری پروتئین ۲ قبل از ستون نیکل، ستون ۶: لیزات

باکتری پروتئین ۲ بعد از عبور از ستون نیکل، ستون ۷ : پروتئین ۲ تخلیص شده، ستون ۸: لیزات باکتری پروتئین ۳ قبل از ستون نیکل، ستون ۹: لیزات باکتری پروتئین ۳ بعد از عبور از ستون نیکل، ستون ۱۰: پروتئین ۳ تخلیص شده

### ۱۰-۳. سنجش غلظت پروتئین

پس از تخلیص، دیالیز و تغلیظ پروتئین، غلظت آن‌ها توسط محلول برادفورد سنجش شد. در این مرحله با استفاده از استانداردهای BSA، معادله بدست آمد و سپس عدد جذب نوری (OD) بدست آمده حاصل از سنجش پروتئین‌ها در فرمول گذاشته و غلظت نهایی مشخص گردید.

جدول ۳-۳. جدول جذب نوری در غلظت‌های مختلف BSA برای رسم نمودار استاندارد برادفورد

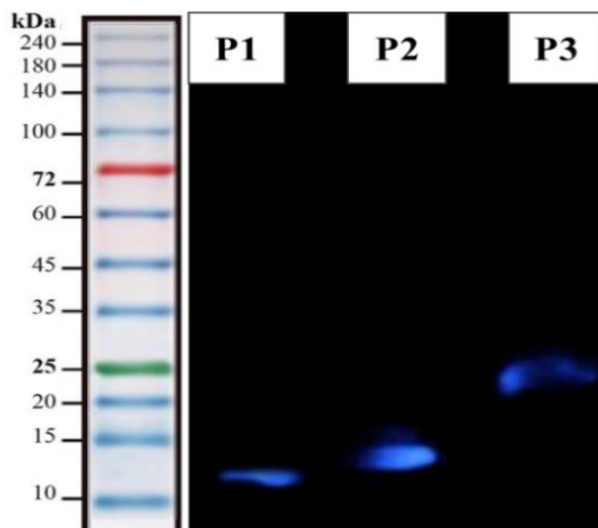
غلظت BSA (برحسب میلی‌گرم)	جذب ۴۰۵/۶۰۰	جذب ۴۰۵/۶۰۰ (تکرار)
۲	۰,۷۸۹	۰,۸۰۰
۱	۰,۶۸۷	۰,۷۵۸
۰,۵	۰,۴۷۷	۰,۴۶۷
۰,۲۵	۰,۳۲۱	۰,۳۱۹

X برابر با نور جذب شده برای پروتئین با غلظت مجهول و Y برابر با غلظت پروتئین مورد نظر می‌باشد.

$$Y = 0,5811 X + 0,1681$$

### ۱۱-۳. تأیید پروتئین P1, P2, P3 به وسیله فناوری وسترن بلات

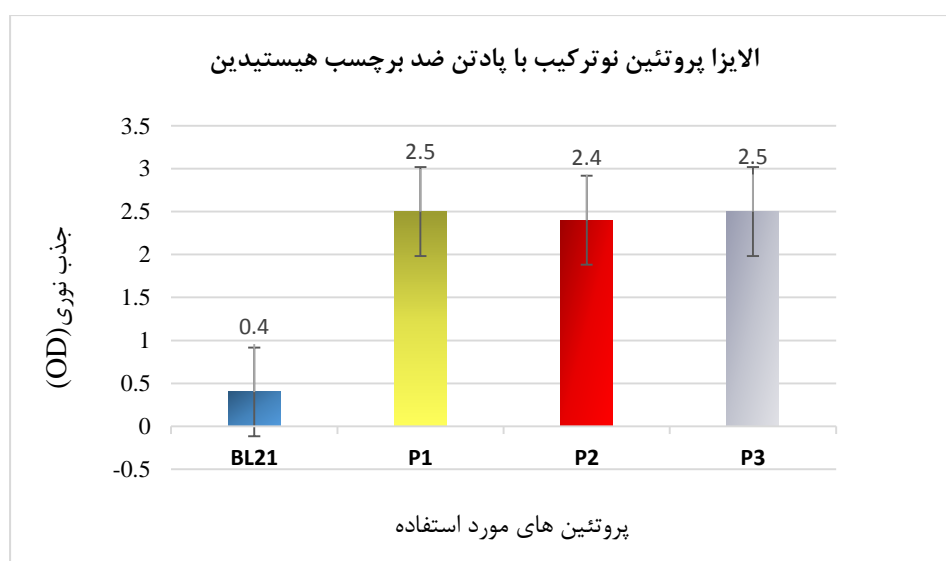
وسترن بلات انجام شده به خوبی نشان داد که پادتن اولیه ضد برچسب هیستیدینی با هیستیدین موجود در ساختار پروتئین واکنش داده و تأییدی بر تخلیص صحیح آن‌ها بود.



تصویر ۳-۳۲. تأیید پروتئین های تخلیص شده در فناوری وسترن بلات. باندها برای P3,P2,P1 به ترتیب وزن ملکولی ۱۰،۱۱،۲۳ کیلودالتونی توسط پادتن ضد برچسب هیستیدینی متصل به HRP شناسایی گردیدند.

### ۱۲-۳. الایزا برای تأیید پروتئین نو ترکیب تخلیص شده با پادتن ضد برچسب هیستیدینی متصل به HRP

پروتئین های تخلیص شده با پادتن ضد برچسب هیستیدینی توسط الایزا نیز ارزیابی شدند. که نتایج این تست همراستا با نتایج وسترن بلات بود و آن را تأیید کرد ( البته بعد از تأیید پروتئین ها توسط وسترن بلات، این تست ضرورتی ندارد).



نمودار ۳-۱. نتایج الیزا برای پروتئین های نو ترکیب تخلیص شده با پادتن ضد برجسب هیستیدین .  
ستون ۱: لیزات باکتری BL21 القا شده فاقد پلاسمید، ستون ۲: پروتئین ۱، ستون ۳: پروتئین ۲، ستون ۴:  
پروتئین ۳ . هر سه پروتئین در واکنش با پادتن ضد برجسب هیستیدین اتصال معناداری نسبت به لیزات  
باکتری فاقد پلاسمید دارد.

### ۱۳-۳. بررسی ساختار دوم پروتئین با استفاده از طیفسنجی CD

اساس این روش بر مبنای میزان زاویه چرخش در زوایای پیوند پپتیدی است. مطالعه دو رنگ نمایی  
نوری در محدوده فرابنفش دور، در محدوده طول موج ۱۹۰-۲۶۰ نانومتر (Far-UV-CD) که مطابق با  
جذب پیوندهای پپتیدی است با اسپکتروپلاریمتر Jasco's J-810 انجام شد. هر ساختار دوم با توجه به  
زاویه چرخش پیوند پپتیدی خود، نوعی منحنی خاص را ایجاد می کند.

تاخوردگی<sup>۱</sup> پروتئین به ساختار طبیعی برای طراحی پروتئین های نو ترکیب به دلیل تحریک پاسخ ایمنی  
مناسب، مهم و ضروری است. چون تخلیص پروتئین ها به وسیله بافرهای حاوی اوره انجام گردیده است.  
بنابراین ساختار دوم پروتئین می تواند تغییر کرده باشد. اوره توانایی دناتورده کردن پروتئین به روش های  
مستقیم و غیرمستقیم دارد. سازو کار مستقیم که در آن اوره می تواند مستقیما به زنجیره های قطبی و  
یا باردار از طریق پیوندهای هیدروژنی و یا میانکنش های الکترواستاتیک متصل گردد، و یا اوره می  
تواند مستقیما به آمینواسیدها از طریق نیروی واندروالسی متصل گردد. همچنین می تواند از طریق دو  
روش نیز به زنجیره های جانبی متصل گردد. پخش قویتر اوره در پروتئین نسبت به آب از میانکنش  
مستقیم حمایت می نماید. در سازو کار غیرمستقیم، اوره منجر به انحلال آسانتر گروه های هیدروفوبیک  
پروتئین از طریق اختلال در ساختار آبی می باشد. گزارش شده است همراه با افزایش غلظت اوره از ۶  
به ۱۰ مولار صفحات بتا شیت از بین خواهند رفت. در حالیکه آلفا هلیکس ها پایدار باقی مانده و یا  
حتی افزایش می یابند . همچنین ساختارهای رندوم کوپل نیز دست نخورده باقی می ماندند. نتایج CD  
به دست آمده برای پروتئین های انتخابی واکسن P1,P2,P3 این تغییرات ساختاری در طول حذف اوره  
را تأیید می نماید. پروتئین ها می توانند با حذف اوره به حالت ساختاری خود بازگردند.

<sup>1</sup> Folding

جدول ۳-۴. نتایج حاصل از تست CD برای پروتئین های تخلیص شده P1,P2,P3

	Secondary structure	PBS	0M Urea	1M Urea	2M Urea	4M Urea	6M Urea	8M Urea	Prediction (%) <sup>1</sup>	Prediction (%) <sup>2</sup>
P1	$\alpha$ -helix	۱۲,۱۰	۱۰۰	۳۵,۸۰	۴۸,۰۰	۲۳,۳۰	۰,۰۰	۳۲,۳۰	۵,۹۴	۸,۹۱
	$\beta$ -sheet	۶۱,۶۰	۰,۰۰	۰,۰۰	۰,۰۰	۳۸,۵۰	۶۰,۰۰	۰,۰۰	۲۶,۷۳	۱۹,۸
	$\beta$ -turn	۲۶,۳۰	۰,۰۰	۶۴,۲۰	۵۲,۰۰	۲۸,۷۰	۰,۰۰	۴۱,۹۰	۵,۹۴	
	Random coil	۰,۰۰	۰,۰۰	۰,۰۰	۰,۰۰	۹,۵۰	۴۰,۰۰	۲۵,۸۰	۶۱,۳۹	۷۱,۲۹
P2	$\alpha$ -helix	۳۶,۰۰	۳۳,۹۰	۴۹,۷۰	۱۲,۸۰	۱۳,۳۰	۸۵,۵۰	۵۶,۴۰	۳۸,۱۴	۴۰,۲
	$\beta$ -sheet	۰,۰۰	۶۶,۱۰	۰,۰۰	۵۴,۷۰	۳۴,۶۰	۰,۰۰	۰,۰۰	۱۲,۳۷	۹,۲۹
	$\beta$ -turn	۶۴,۰۰	۰,۰۰	۵۰,۳۰	۷,۵۰	۳۱,۵۰	۰,۰۰	۴۳,۶۰	۵,۱۵	
	Random coil	۰,۰۰	۰,۰۰	۰,۰۰	۲۵,۰۰	۲۰,۶۰	۱۴,۵۰	۰,۰۰	۴۴,۳۳	۵۰,۵۱
P3	$\alpha$ -helix	۷,۷۰	۷۴,۷۰	۳۸,۰۰	۷۵,۱۰	۱۹,۸۰	۱۰۰,۰	۵۹,۲۰	۱۴,۳۷	۰,۰۰
	$\beta$ -sheet	۳۳,۵۰	۰,۰۰	۰,۰۰	۰,۰۰	۵۲,۲۰	۰,۰۰	۰,۰۰	۲۶,۳۵	۴۰,۰۰
	$\beta$ -turn	۳۶,۷۰	۰,۰۰	۶۲,۰۰	۰,۰۰	۲۱,۹۰	۰,۰۰	۴۰,۸۰	۸,۹۸	
	Random coil	۲۲,۰۰	۲۵,۳۰	۰,۰۰	۲۴,۹۰	۶,۱۰	۰,۰۰	۰,۰۰	۵۰,۳۰	۶۰,۰۰

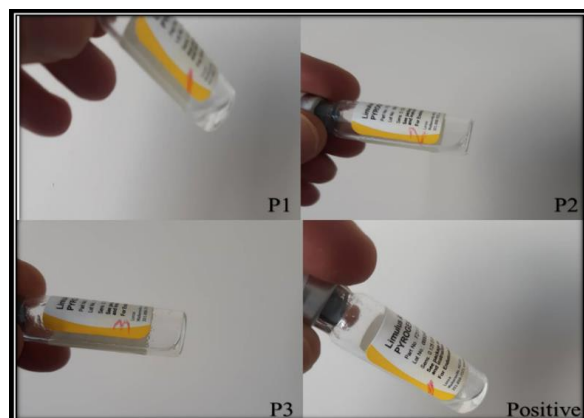
1: <https://npsa-prabi.ibcp.fr>

2: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>

### ۱۴-۳. بررسی وجود اندوتوکسین در پروتئین های تخلیص شده با

#### استفاده از تست LAL

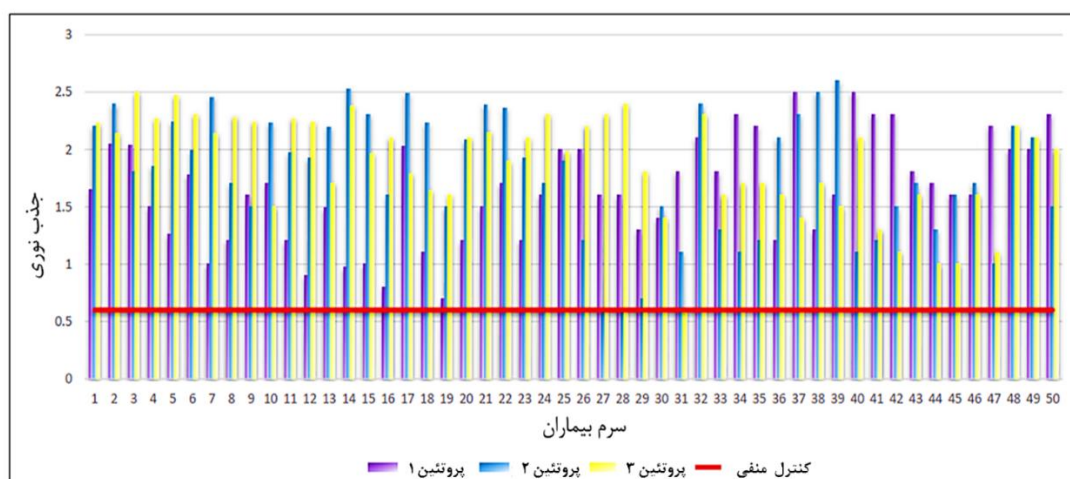
این تست برای ارزیابی حضور اندوتوکسین در نمونه های زیستی به کار می رود. در صورت حضور لیپو پلی ساکارید با افزودن معرف LAL به رقت های نمونه، لخته تشکیل می شود. این تست بسته به نوع کیت تا رقت ها  $10^{-4}$  حساسیت دارد. دوز مجاز اندوتوکسین برای استفاده در انسان ۵ EU می باشد. کیت مورد استفاده در این تحقیق کیت Lonza بود که حساسیت آن تا ۰,۱۲۵ EU/ml یا ۰,۰۲۵ ng/kg می باشد. با استفاده از کیت Lonza مشاهده کردیم هر سه نمونه پروتئین فاقد لیپوپلی ساکارید بودند زیرا هیچ گونه لخته ای تشکیل نشد.



تصویر ۳-۳۳. بررسی حضور اندوتوکسین در پروتئین های تخلیص شده توسط تست LAL با کیت Lonza. هر سه پروتئین تخلیص شده فاقد اندوتوکسین بودند و هیچ لخته ای در نمونه تشکیل نشد. در حالی که در نمونه کنترل مثبت، لخته دیده شد.

### ۱۵-۳. الایزا جهت بررسی پروتئین نو ترکیب با پادتن موجود در سرم بیماران مبتلا به کووید-۱۹

به منظور تأیید پروتئین های نو ترکیب، تست الایزا با نمونه سرم بیماران مبتلا به کووید-۱۹ انجام شد. به مقدار ۱ میکروگرم پروتئین نو ترکیب به مدت ۱۲-۱۴ ساعت در چاهک ها پوشش دهی شده و سپس توسط ۵۰ سرم بیمار مبتلا به کووید-۱۹ ارزیابی گردید. نتایج این تست نشان داد پادتن تولید شده در سرم بیماران مبتلا به سارس کوو-۲ با پروتئین های پوشش دهی شده در کف چاهک اتصال برقرار کرده و قابل تشخیص است. بنابراین تغییرات معناداری در میزان جذب نوری نمونه ها دیده شد.

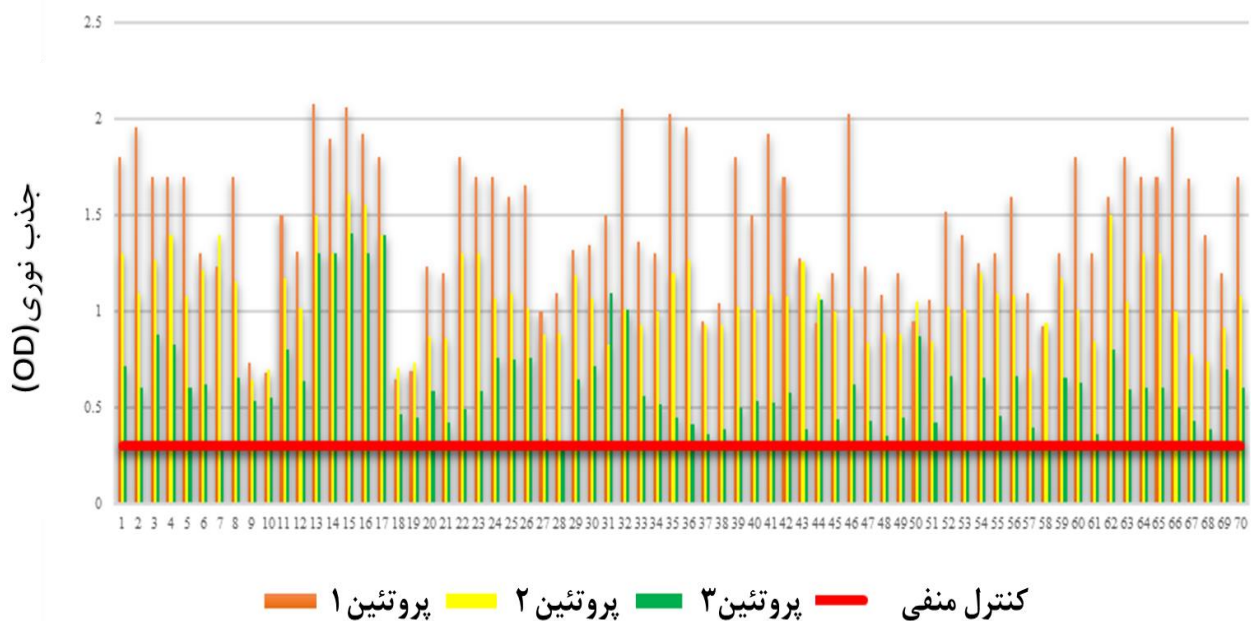


نمودار ۳-۲. بررسی پروتئین های نو ترکیب با پادتن سرم بیماران مبتلا به کووید-۱۹ و مقایسه با سرم کنترل. همانگونه که ملاحظه می شود از میان ۵۰ نمونه مثبت تایید شده به روش الایزا با میانگین گروه کنترل با شدت جذب ۰,۶ همه نمونه ها برای هر سه پروتئین به صورت ۱۰۰ درصد مثبت تلقی می شوند.

## ۱۶-۳. الیزا جهت بررسی پروتئین نو ترکیب با پادتن موجود در سرم افراد واکسینه شده با واکسن آسترانکا

به منظور بررسی اتصال پروتئین نو ترکیب با پادتن های ناشی از تزریق واکسن آسترانکا ، الیزا انجام شد . تعداد ۷۰ نمونه از سرم افراد واکسینه شده با واکسن آسترانکا جمع آوری و سپس با هر سه پروتئین الیزا انجام شد .

نتایج نشان داد جذب نوری همه نمونه ها توسط پروتئین ۱ ، ۲ ، و همچنین ۶۸ نمونه توسط پروتئین ۳ بالاتر از سرم کنترل منفی بود. بنابراین پادتن های تولید شده بعد از واکسیناسیون توسط پروتئین های نو ترکیب قابل شناسایی بودند.



نمودار ۳-۳. بررسی پروتئین های نو ترکیب با پادتن سرم افراد واکسینه شده توسط واکسن آسترانکا و مقایسه با سرم کنترل. همانگونه که ملاحظه می شود از میان ۷۰ نمونه افراد واکسینه شده به روش الیزا با میانگین گروه کنترل با شدت جذب ۰.۰۳، برای پروتئین ۱ و ۲، ۱۰۰ درصد مثبت و برای پروتئین ۳، ۹۷ درصد نمونه ها را مثبت نشان داده است.

## ۱۷-۳. بررسی تحریک ایمنی هومورال



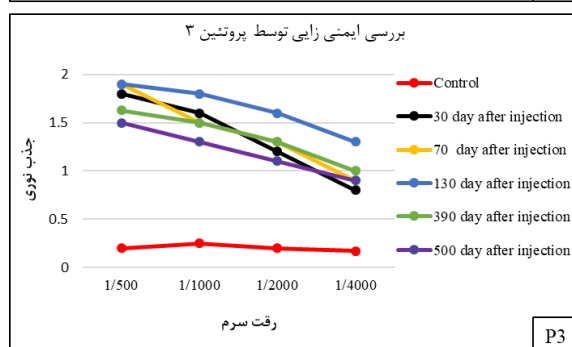
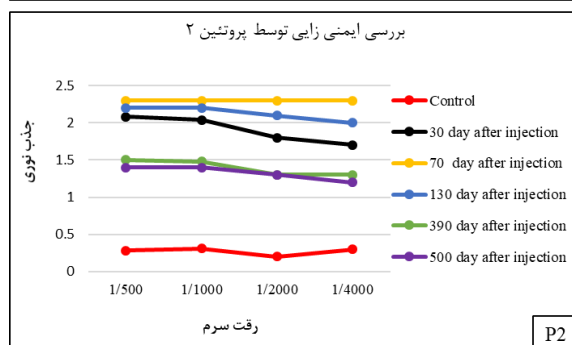
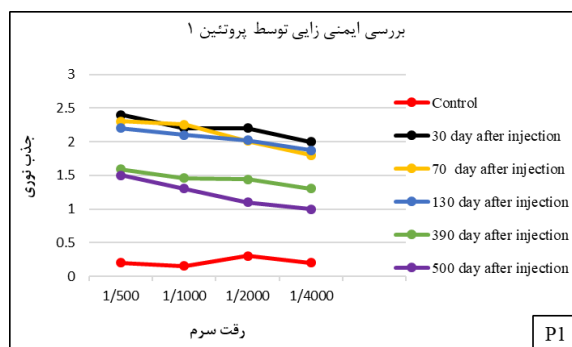
به منظور بررسی تحریک سیستم ایمنی هومورال به سه گروه از حیوانات تزریق شد.



تصویر ۳-۳۴. ایمن سازی حیوانات (موش ، خرگوش و خوکچه هندی)

### ۳-۱۷-۱. ایمن سازی خرگوش

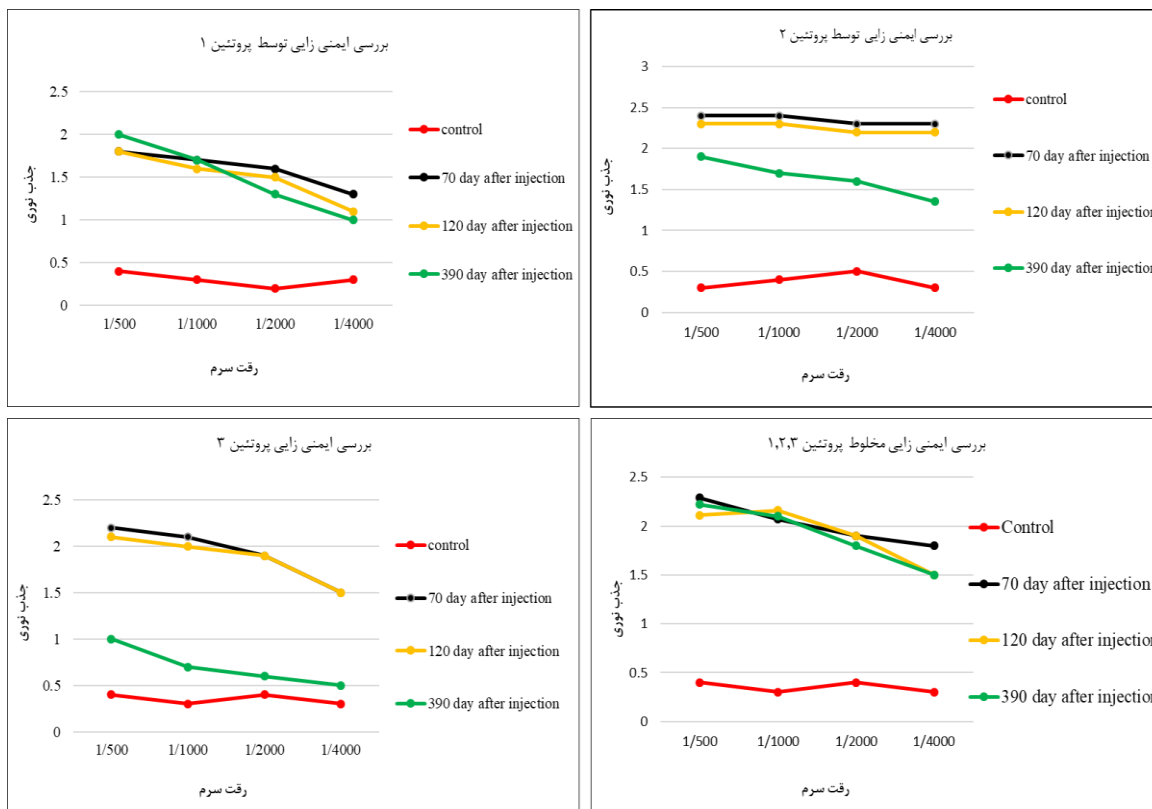
برای ایمن سازی خرگوش ها به هر یک از ۳ گروه (هرگروه یک خرگوش) ۵ مرتبه تزریق آنتی ژن مورد نظر صورت گرفت تا موجب ایجاد پاسخ قوی سیستم ایمنی هومورال گردد. فواصل بین تزریق های متعدد ۱۴ روز بود. سپس در فاصله زمانی ۳۰، ۷۰ و ۱۳۰ و ۳۹۰ و ۵۰۰ روز بعد از تزریق خونگیری از خرگوش ها برای جمع آوری سرم صورت گرفت و میزان تیتر آنتی بادی پلی کلونال در آن ها از طریق آزمون الیزای غیرمستقیم سنجیده شد. نتایج نشان داد بعد از ۳۰ روز تیتر پادتن برای هر سه پروتئین به خوبی افزایش یافته است و مدت زمان ماندگاری پادتن ها تا ۵۰۰ روز بعد از تزریق همچنان بالاتر از گروه کنترل است.



نمودار ۳-۴. الایزا جهت بررسی تغییرات تیتر پادتن پلی کلونال بر علیه پروتئین ۱، ۲، ۳ در سرم خرگوش با ۴ رقت (۱/۵۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۲۰۰۰، ۱/۴۰۰۰) در روزهای مختلف بعد از تزریق و مقایسه آن با سرم گروه کنترل. همانگونه که ملاحظه می شود تیتر پادتن بر علیه هر سه پروتئین نو ترکیب بعد از ۵۰۰ روز از تزریق به خرگوش همچنان بالاتر از گروه کنترل است. همچنین تیتر پروتئین ۱ بعد از ۳۰ روز نسبت به دو پروتئین دیگر افزایش بیشتری داشته است. ولی ۵۰۰ روز بعد از تزریق تیتر پادتن بر علیه هر سه پروتئین در رقت ۱/۵۰۰ حدوداً یکسان هستند.

## ۳-۱۷-۲. ایمن سازی موش

برای ایمن سازی، موش ها را به ۵ گروه ۵ تایی (P1, P2, P3, مخلوط هر سه پروتئین و کنترل) تقسیم نموده و تزریق در دو نوبت به فاصله ۱۴ روز انجام شد. در فاصله زمانی ۷۰ و ۱۲۰ و ۳۹۰ روز بعد از تزریق از موش ها خونگیری و سرم جدا شد. سپس الایزا برای بررسی تیتر پادتن پلی کلونال انجام شد. نتایج نشان داد در همه گروه ها تیتر پادتن تا ۳۹۰ روز بعد از تزریق سه پروتئین بالاتر از گروه کنترل بود. بهترین نتیجه بعد از ۳۹۰ روز مربوط به مخلوط پروتئین ها و بعد پروتئین ۱ بود. اگرچه روند رو به کاهشی در نتایج تست، نسبت به روزهای ابتدایی دیده می شود.

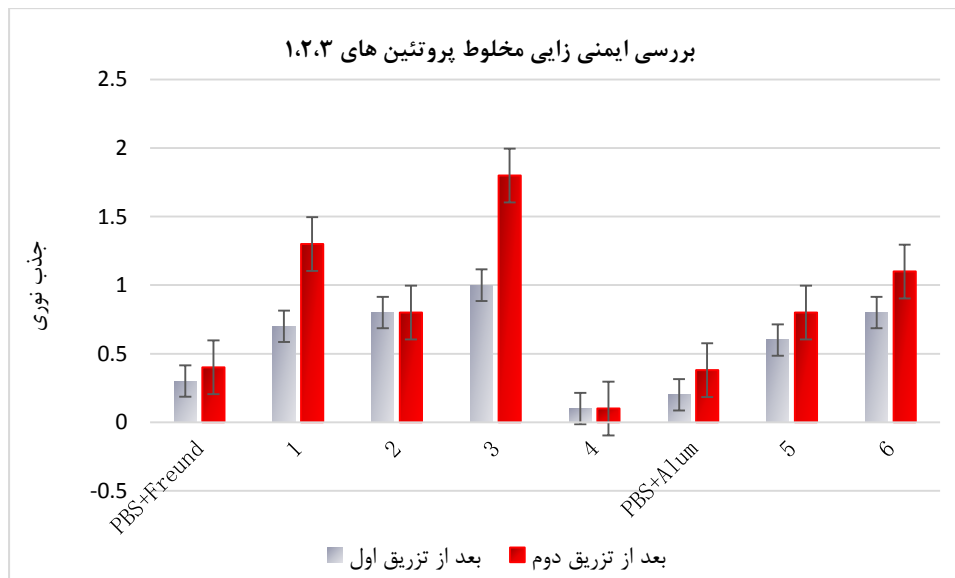


نمودار ۳-۵. الیذا جهت بررسی تغییرات تیتر پادتن پلی کلونال بر علیه هر سه پروتئین و مخلوط آن ها در سرم موش با ۴ رقت (1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000) در روزهای مختلف بعد از تزریق و مقایسه آن با سرم کنترل. همانگونه که ملاحظه می شود تیتر پادتن بر علیه هر سه پروتئین نو ترکیب بعد از ۳۹۰ روز از تزریق همچنان در ۴ گروه تزریق شده بالاتر از گروه کنترل است. همچنین نتایج نشان می دهد بعد از ۳۹۰ روز گروه پروتئین ۳ کاهش تیتر پادتن بیشتری نسبت به ۳ گروه دیگر دارد. بهترین نتیجه مربوط به مخلوط پروتئین و پس از آن پروتئین ۱ می باشد.

### ۳-۱۷-۳. ایمن سازی خوکچه هندی

۱۰ سر خوکچه هندی ماده با وزن تقریبی ۴۰۰-۵۰۰ گرم برای ایمن سازی انتخاب شد. سپس به سه گروه شامل ( ۴ سر با ادجوانت فروند, ۲ سر با آلوم و ۴ عدد به عنوان کنترل) تقسیم شدند. به هر دو گروه مقدار ۱۵۰ میکروگرم پروتئین شامل مخلوط هر سه پروتئین در دو دوز تزریقی در روزهای ۰ و ۲۱ تزریق شد. در گروه ۱ پادکن به نسبت برابر با ادجوانت کامل و در نوبت دوم با ادجوانت ناقص تزریق شد. در گروه ۲ مخلوط پروتئینی به همراه آلوم (به نسبت ۲۶۰ μg/kg) تزریق شد. یک هفته بعد از تزریق دوم از خوکچه ها خونگیری شد. سرم ها جدا شدند و میزان تیتر آنتی بادی پلی کلونال سرم ها از طریق آزمون الیضای غیرمستقیم سنجیده شد. نتایج این تست نشان داد در تمامی خوکچه ها به جز یک سر در گروه ۴ ( تزریق با ادجوانت فروند) تیتر پادتن به صورت معناداری در مقایسه با گروه کنترل

افزایش داشته است. لازم به ذکر است این گروه از حیوانات بعد از افزایش تیتراژ پادتن توسط سارس کوو-۲ چالش شده و برای بررسی ماندگاری تیتراژ پادتن ارزیابی نشدند.

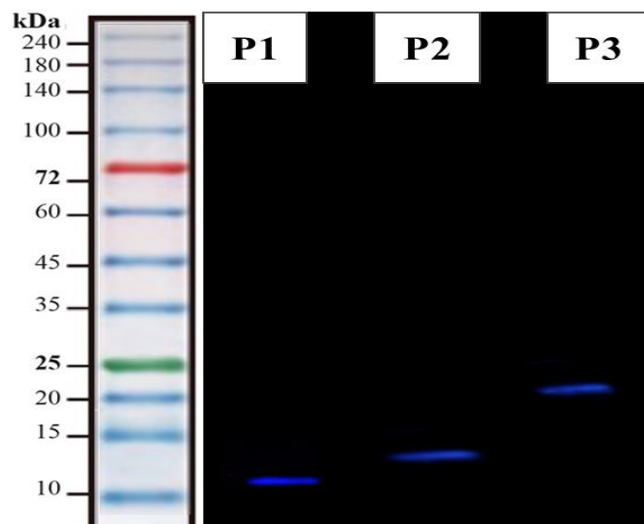


نمودار ۳-۶. الیزا جهت بررسی تیتراژ پادتن پلی کلونال در سرم خوکچه هندی بعد از تزریق در روز ۰ و ۲۱ و مقایسه آن با سرم گروه کنترل. ستون PBS+ Ferund: سرم گروه تزریق شده با ادجوانت فروند به عنوان کنترل, ستون شماره ۱،۲،۳،۴: نمونه سرم های تزریق شده با مخلوط پروتئین + ادجوانت فروند, ستون PBS+ Alum: سرم گروه تزریق شده با ادجوانت آلوم به عنوان کنترل, ستون شماره ۵،۶: نمونه سرم های تزریق شده با مخلوط پروتئین + آلوم. همانگونه که ملاحظه می شود شدت جذب در گروه های تزریق شده (به جز یک مورد از حیوانات) بالاتر از گروه کنترل است.

### ۱۸-۳. تأیید پادتن پلی کلونال تولید شده در سرم خرگوش بر علیه

#### پروتئین P1,P2,P3 توسط فناوری وسترن بلات

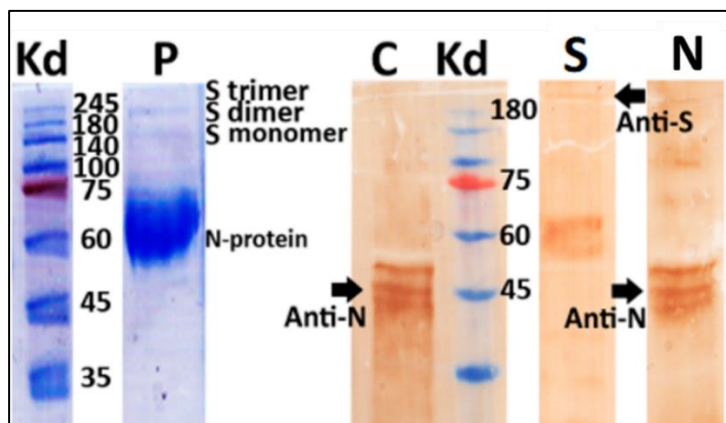
وسترن بلاتینگ روشی قدرتمند جهت تایید حضور و صحت خصوصیات آنتی ژنیک پروتئین می باشد که بر اساس اتصال پادگن (آنتی ژن) و پادتن (آنتی بادی) عمل می نماید. در وسترن بلات اتصال پادتن های پلی کلونال تولید شده در سرم خرگوش با پروتئین های نو ترکیب تأیید شد و با پیشگویی های انجام شده برای وزن مولکولی و نیز بررسی صورت گرفته برای بیان با روش SDS-PAGE مطابقت داشت.



تصویر ۳-۳۵. تأیید شناسایی پروتئین های تخلیص شده با پادتن پلی کلونال توسط فناوری وسترن بلات . ستون ۱: مارکر وزن مولکولی، ستون ۲،۳،۴: مربوط به پروتئین نو ترکیب ۱،۲،۳. همانطور که مشاهده می شود باندهای مربوط به هر سه پروتئین در جایگاه مورد انتظار قرار دارند.

### ۱۹-۳. بررسی اتصال پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱ (RBD) با سارس کوو-۲ توسط فناوری وسترن بلات

این تست توسط مجموعه واکسن سازی فخر انجام شد. در این تست بوسیله سارس کوو-۲ غیرفعال شده، وسترن بلات انجام شد. پادتن استفاده شده در این تست، پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱ نو ترکیب (RBD) بود. نتایج نشان داد پادتن تولید شده، پروتئین سنبله سارس کوو-۲ را شناسایی و به آن متصل گردیده است [۲۵۱].



تصویر ۳-۳۶. بررسی اتصال پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱ با سارس کوو-۲ توسط فناوری وسترن بلات. P: الکتروفورز ویروس تخلیص شده، C: وسترن بلات توسط پادتن سرم افراد بهبود یافته، S: وسترن بلات توسط پادتن بر علیه پروتئین ۱، N: وسترن بلات توسط پادتن بر علیه نوکلئوکپسید نو ترکیب

۲۰-۳. تأیید پادتن تولید شده بر علیه پروتئین های نو ترکیب در سرم

خرگوش با کیت تشخیص سریع IgM, IgG بر علیه سارس کوو-۲

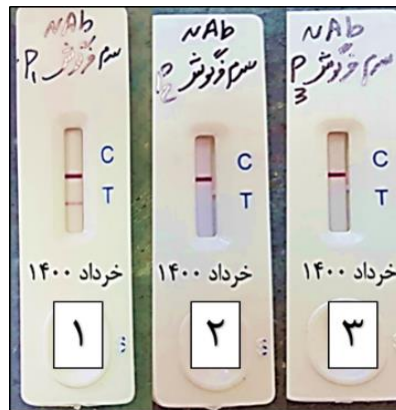
انسانی

سرم خرگوش های ایمن شده با کیت های تشخیص سریع روزان آزما (IgM, IgG) بر علیه سارس کوو-۲ انسانی) نیز چک شدند. باید توجه داشت هر چند پادتنی که در گونه خرگوش بوده با گونه انسان متفاوت است اما به دلیل شباهت های فیلوژنیک بین دو گونه پستانداران و درجه حفاظت شده بودن این پروتئین ها در موجودات، واکنش در صورت تولید پادتن، مشاهده خواهد شد. نتایج بدست آمده موید این مطلب بود که اتصال بین پادتن های تولید شده و آنتی ژن های پوشش دهی شده بر روی کیت تشخیصی برقرار شده و در هر سه نمونه باند مربوط به وجود IgG رویت شد.



تصویر ۳-۳۷. ارزیابی پادتن های تولید شده بر علیه پروتئین نوترکیب تزریق شده به خرگوش با کیت تشخیصی (IgM و IgG) سارس کوو-۲. همانطور که ملاحظه می شود همه نمونه های سرم خرگوشی در ۱۶ تیر (نمونه ۲، ۳، ۴) و ۹ اسفند (۵، ۶، ۷) سال ۱۳۹۹ در مقایسه با سرم گروه کنترل (نمونه ۱) دارای پادتن از نوع IgG می باشند .

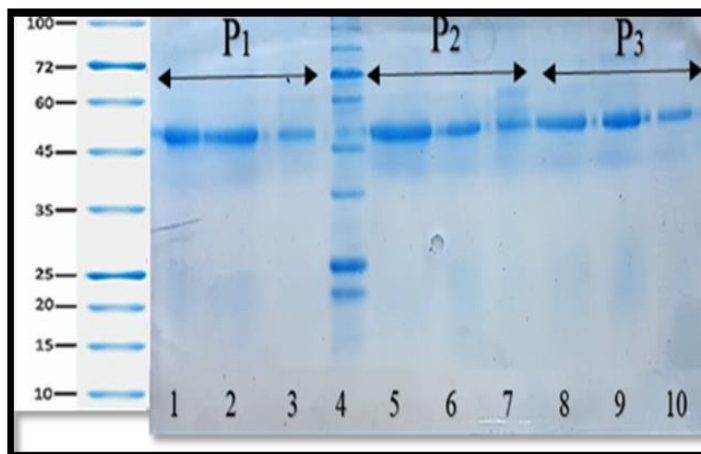
همچنین این پادتن های تولید شده در خرگوش از لحاظ خاصیت خنثی سازی ویروس نیز توسط تست تشخیص خنثی سازی ویروس (VNT) ارزیابی شدند که نتایج نشان داد که از بین ۳ پروتئین نوترکیب، پادتن تولید شده بر علیه پروتئین P1 که مربوط به بخش RBD است، خاصیت خنثی سازی ویروس را دارد.



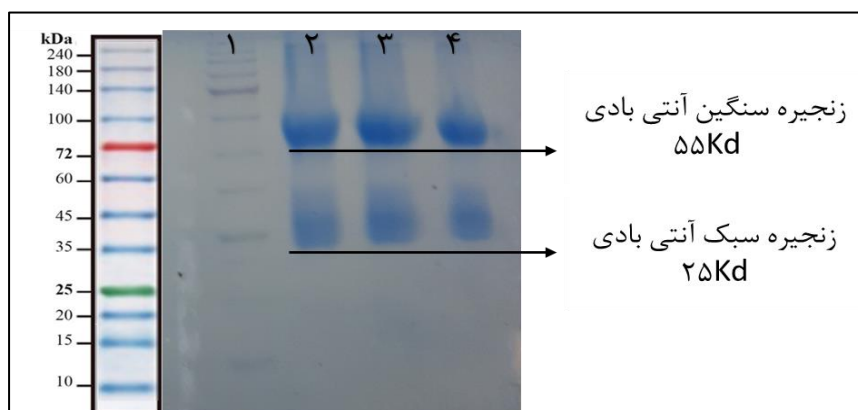
تصویر ۳-۳۸. ارزیابی خاصیت خنثی سازی پادتن های تولید شده بر علیه پروتئین نوترکیب تزریق شده به خرگوش با کیت تشخیص پادتن خنثی ساز. همانگونه که ملاحظه می شود فقط پادتن بر علیه P1 دارای دو باند می باشد که نشان دهنده حضور پادتن علیه پروتئین RBD و خاصیت خنثی سازی است.

## ۲۱-۳. تخلیص پادتن پلی کلونال از سرم خرگوش ایمن شده

پادتن توسط ستون پروتئین A از سرم خرگوش ایمن شده تخلیص و توسط الکتروفورز SDS-PAGE تائید شد.



تصویر ۳-۳۹: تائید تخلیص پادتن توسط ستون حاوی رزین پروتئین A به وسیله الکتروفورز SDS-PAGE ستون ۱، ۲، ۳: تخلیص سه فراکشن پروتئین ۱، ستون ۴: مارکر وزن مولکولی پروتئین، ستون ۵، ۶، ۷: تخلیص سه فراکشن پروتئین ۲، ستون ۸، ۹، ۱۰: تخلیص سه فراکشن پروتئین ۳. پادتن دارای دو زنجیره سبک (۲۵ کیلودالتون) و سنگین (۵۵ کیلودالتون) است که در الکتروفورز این دو زنجیره از هم جدا می شود و دو باند در تصویر مشخص است.

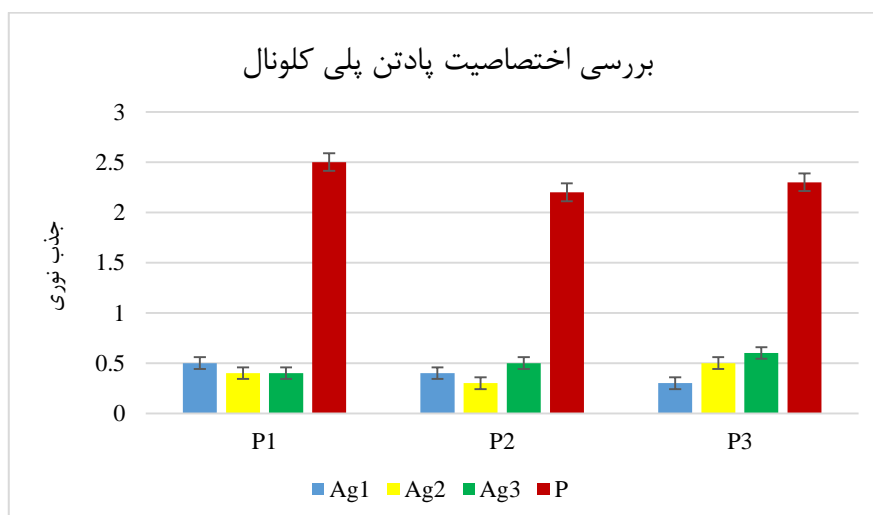


تصویر ۳-۴۰: الکتروفورز پادتن های تغلیظ شده بر علیه هر سه پروتئین. ستون ۱: مارکر وزن ملکولی پروتئین، ستون ۲: پادتن بر علیه پروتئین ۱، ستون ۳: آنتی پروتئین بر علیه ۲، ستون ۴: پادتن بر علیه پروتئین ۳. زنجیره سبک در جایگاه ۵۵ کیلودالتونی و زنجیره سبک در جایگاه ۲۵ کیلودالتونی مشاهده می شود. نمونه های الکتروفورز شده بهترین فراکشن خروجی از ستون برای هر سه پروتئین هستند که تغلیظ شدند.



## ۲۲-۳. بررسی میزان اختصاصیت پادتن پلی کلونال

در این تست به منظور بررسی اختصاصیت پادتن تولید شده بر علیه پروتئین نو ترکیب ، اتصال آنتی ژن های متفرقه با پادتن های تولید شده ارزیابی شدند. نتایج نشان داد پادتن ها با پروتئین های متفرقه واکنش معناداری ندارند و اختصاصیت پادتن ها به پادکن خودشان مشخص گردید.



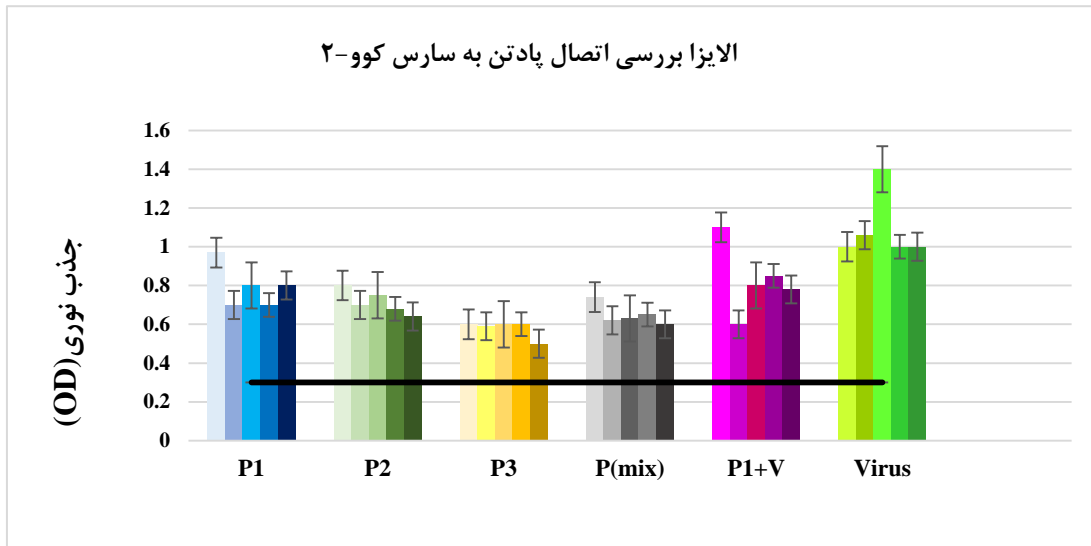
نمودار ۲-۷. الیزا جهت بررسی اختصاصیت پادتن تولید شده بر علیه پروتئین های نو ترکیب با پادکن های متفرقه. P1: پادتن بر علیه پروتئین ۱ در واکنش با سه پروتئین متفرقه و پروتئین ۱، P2: پادتن بر علیه پروتئین ۲ در واکنش با سه پروتئین متفرقه و پروتئین ۲، P3: پادتن بر علیه پروتئین ۳ در واکنش با سه پروتئین متفرقه و پروتئین ۳

## ۲۳-۳. بررسی میزان تحریک سیستم ایمنی هومورال توسط پروتئین

### های نو ترکیب در مقایسه با سارس کوو-۲ توسط الیزا

به منظور مقایسه میزان تحریک سیستم ایمنی هومورال توسط پروتئین های نو ترکیب با سارس کوو - ۲ غیر فعال، ۶ گروه ( هر گروه ۵ موش) آماده شد. به تمام گروه ها ۵ میکروگرم پادکن به همراه ادجوانت آلوم تزریق شد. (دوز تزریقی سارس کوو-۲ در واکنش ها ۵ میکروگرم است). بعد از دو مرتبه تزریق از موش ها خونگیری و سرم جدا گردید. برای بررسی تیتر پادتن، الیزا گذاشته شد. در این بخش چون هدف تعیین مقدار و کارایی پادتن پلی کلونال در مقابل سارس کوو-۲ بود. بنابراین در کف چاهک های الیزا ویروس پوشش دهی شد و اتصال پادتن های تولید شده در تمام گروه ها با سارس کوو-۲ ارزیابی شد. نتایج الیزا نشان داد که در همه گروه ها اتصال پادتن با ویروس برقرار شده است. بالاترین تا پایین ترین جذب نوری خوانش شده به ترتیب مربوط به گروه ویروس، پروتئین ۱ + ویروس، پروتئین ۱، پروتئین

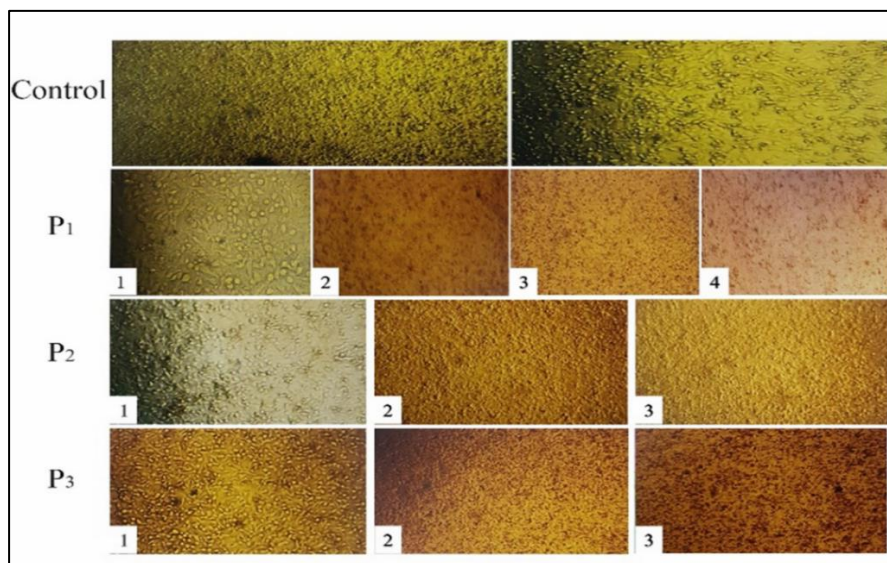
۲ و در نهایت پروتئین ۳ است. نتایج نشان داد بهترین جواب مربوط به گروه تزریق شده با ویروس می باشد. انتظار براین بود با مخلوط کردن ویروس به همراه پروتئین ۱ ایمنی زایی قویتر باشد، که نتایج این فرض را تأیید نکرد. البته لازم به ذکر است مقدار ویروس تزریق شده در این گروه  $1/2$  ماده تزریق شده ویروس بود و  $1/2$  مابقی مربوط به پروتئین ۱ بود. به جز دو گروه ذکر شده در بین گروه پروتئین ها گروه پروتئین ۱ بهترین نتیجه را نسبت به بقیه گروهها در اتصال پادتن با سارس کوو-۲ دارد.



نمودار ۳-۸. الایزا جهت بررسی اتصال پادتن تولید شده در حیوانات با سارس کوو-۲. همانگونه که ملاحظه می شود بهترین اتصال پادتن به سارس کوو-۲ مربوط به گروه تزریق ویروس می باشد و در بین گروه پروتئین ها پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱ اتصال بیشتری با ویروس دارد.

### ۲۴-۳. تست خنثی سازی سارس کوو-۲ توسط پادتن های تولید شده

نتایج این تست نشان داد رقت  $1/10$  سرم P1, P2, P3 توانسته بود هر سه رقت  $1/10$ ,  $1/100$ ,  $1/1000$  از استوک سارس کوو-۲ را ( $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml) خنثی کند. همچنین رقت  $1/100$  سرم P1 توانسته بود رقت  $1/1000$  از نمونه سارس کوو-۲ ( $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml) را خنثی کند.



تصویر ۳-۴: تست خنثی سازی ویروس (VNT) ، رقت های مختلف ویروس ، سرم کنترل و پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱،۲،۳. (تصویر ۱: رقت ۱/۱۰ سرم و رقت ۱/۱۰ ویروس ، تصویر ۲: رقت ۱/۱۰ سرم و رقت ۱/۱۰۰۰ ویروس ، تصویر ۳: رقت ۱/۱۰ سرم و رقت ۱/۱۰۰۰ ویروس ، تصویر ۴: رقت ۱/۱۰۰۰ سرم و رقت ۱/۱۰۰۰ ویروس). در این بخش تصویر رقت هایی از سرم که توانسته اند رقت های ویروسی را خنثی کنند به نمایش در آمده است.

جدول ۳-۵. نتایج حاصل از تست خنثی سازی ویروس توسط پادتن های تولید شده بر علیه پروتئین نو ترکیب. همانطور که مشاهده می شود رقت های دیگر سرم نتوانستند رقت های ویروس را خنثی کنند.

رقت سرم	۱/۱۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰۰۰
رقت ویروس			
۱/۱۰	خنثی شدن ویروس (P1,P2,P3)	تکثیر ویروس	تکثیر ویروس
۱/۱۰۰	خنثی شدن ویروس (P1,P2,P3)	تکثیر ویروس	تکثیر ویروس
۱/۱۰۰۰	خنثی شدن ویروس (P1,P2,P3)	خنثی شدن ویروس (P1)	تکثیر ویروس

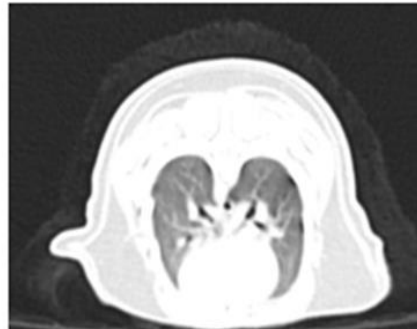
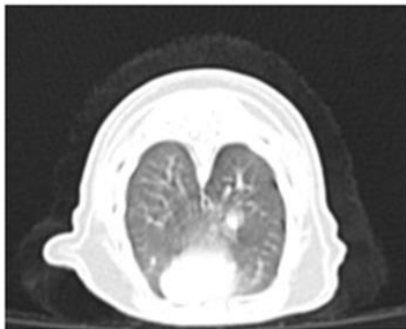
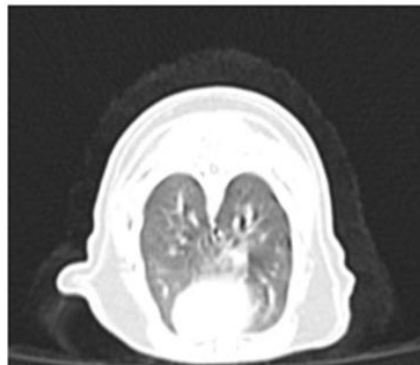
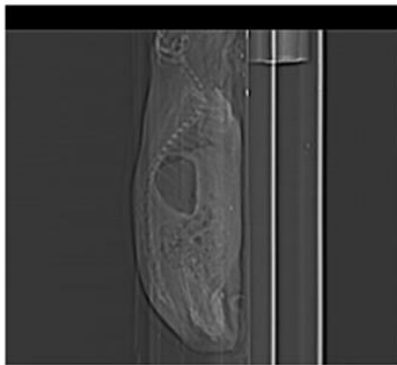
## ۲-۲۵. چالش خوکچه های هندی با سارس کوو-۲

به منظور ارزیابی پادتن تولید شده در خوکچه ها بعد از دو مرتبه تزریق ، تست الایزا انجام شد و بعد از افزایش تیتر پادتن ، به منظور انجام چالش ، آن ها را در مواجهه با سارس کوو-۲ فعال قرار دادیم . تمامی حیوانات بعد از ۱۰ روز سازگاری با محیط (حیوانخانه سطح ۳) در معرض ۱ دوز ویروس با غلظت  $10^6$ \*۱ میلی لیتر به صورت استنشاقی قرار گرفتند. در زمان ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از چالش تب سنجی شدند. میزان غذا ، وزن ، تظاهرات بالینی قبل و بعد از چالش ارزیابی شد. خونگیری پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت و تصویر برداری ریه ( سی تی اسکن) نیز بعد از ۴۸ ساعت انجام شد. نتایج نشان داد هیچ کدام از گروهها واکنشی در مواجهه با سارس کوو-۲ نداشتند. هیچ گونه علائم کم تحرکی ، بی حالی ، بی اشتها و تلفات در آن ها دیده نشد. در نتایج اسکن ریه آن ها هیچ علائمی از درگیری ریه وجود نداشت. بنابراین باتوجه به اینکه گروه کنترل هم هیچ تلفاتی در مواجهه با ویروس نداشتند، می توان نتیجه گرفت این گونه خوکچه هندی توسط ویروس کرونا آلوده نمی شود و میزبان این ویروس نیست. در تصویر ۳-۴۳ گزارش سی تی اسکن یکی از خوکچه ها آورده شده است . به دلیل یکسان بودن گزارش اسکن تمام خوکچه ها ، یک گزارش آورده شد.

## بیمارستان تخصصی دام های کوچک دانشگاه تهران

	1400/12/23	تاریخ گزارش کاربر:	<b>بخش رادیولوژی</b>
صاحب حیوان:	نوع و گونه:	تاریخ تولد:	حوکچه 1
نام حیوان:	تاریخ تولد:	حلق حیوان:	567104
شماره پرونده:	کارشناس نت کننده نتایج:	تاریخ نت:	1400/12/22
تاریخ نت نتایج:	حوکچه هندی	نا مشخص	رادیولوژیست 8

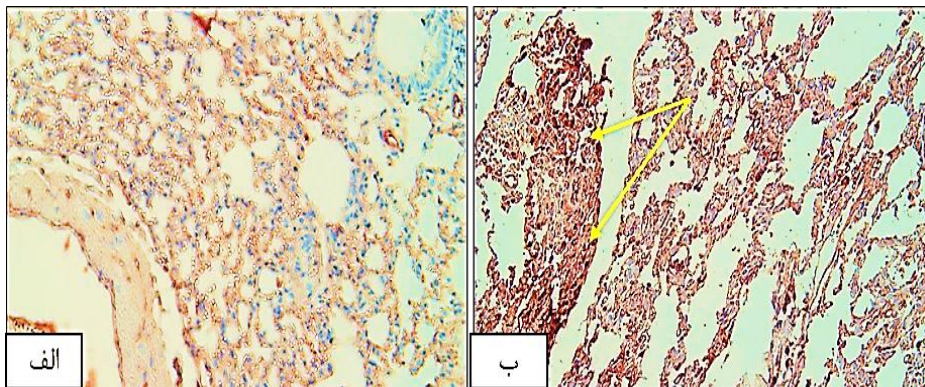
Radiology	
[Technique]	- Plain CT scan examination of thorax
[Finding]	- Patient body condition is good. - Attenuation of skeletal structures is normal and no abnormality is seen in thoracic vertebrae, ribs and sternum. - Diaphragm is intact. - Thoracic trachea is normal in diameter and direction. - Intrathoracic esophagus and other mediastinal structures are normal. - Cardiovascular structures are within normal limits. - Overall attenuation of lung fields is normal.
[Diagnostic]	- NSAD



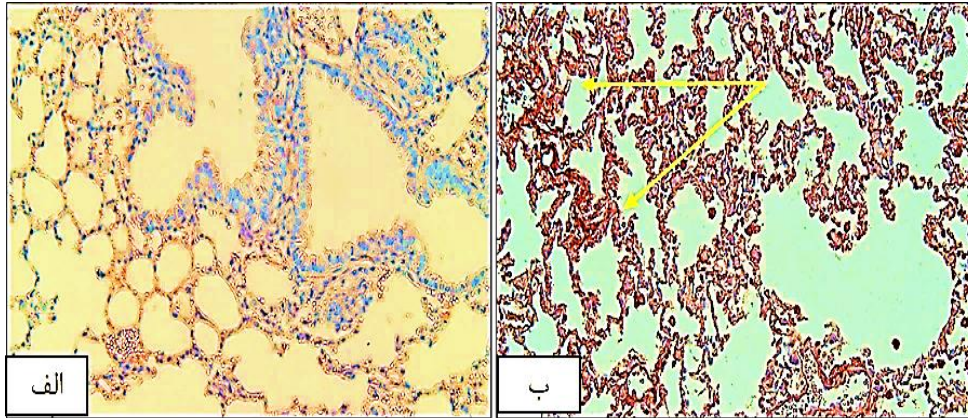
تصویر ۳-۴۲. نتایج سی تی اسکن ریه خوکیچه هندی چالش شده با سارس کوو-۲. نتایج نشان داد هیچ عارضه ای در ریه خوکیچه ها مشاهده نشد و ریه آن ها کاملا سالم است.

## ۲۶-۳. بررسی ایمنی سلولی

نتایج مطالعات نشان می‌دهد برای تأیید کارایی یک واکسن علاوه بر تحریک ایمنی هومورال، ایمنی سلولی نیز باید تحریک شود با توجه به مطالعات انجام شده در حوزه واکسن‌های پیشرو در زمینه مبارزه با ویروس کرونا، بررسی تحریک ایمنی سلولی در موش‌های تزریق شده با پروتئین نوترکیب ۱ با تعیین میزان بیان مارکرهای CD4 و CD8 در بافت ریه توسط فناوری ایمونوهیستوشیمی (IHC) انجام شد. پروتئین ۱ به دلیل ایجاد پادتن با کارایی بهتر در تست خنثی‌سازی ویروس برای این مرحله انتخاب شد. در این تست نتایج بر مبنای شدت رنگ DAB (رنگ قهوه‌ای) تفسیر می‌شود. نتایج تست توسط پاتولوژیست و نرم افزار image j ارزیابی و تفسیر نتایج مؤید بر تحریک سیستم ایمنی سلولی و بیان مارکرهای CD4 و CD8 در سلولهای بافت ریه گروه تزریق شده در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.



تصویر ۳-۴۳. تصاویر میکروسکوپی از تست ایمونوهیستوشیمی برای مارکر CD4 (IHC, Ob: 20). الف) بافت ریه موش در گروه کنترل. ب) بافت ریه موش در گروه تزریق شده. در شکل ب پیکان‌ها نشان دهنده تشکیل کمپلکس CD4 و پادتن می‌باشد. همانگونه که مشاهده می‌شود تغییر رنگ در گروه تزریق شده نسبت به گروه کنترل به صورت معناداری اختلاف دارد و این نشان‌دهنده بیان CD4 در سطح بافت ریه است.



تصویر ۳-۴۴. تصاویر میکروسکوپی از تست ایمونوهیستوشیمی برای مارکر CD8 (IHC, Ob: 20). الف) بافت ریه موش در گروه کنترل. ب) بافت ریه موش در گروه تزریق شده. در شکل ب پیکان ها نشان دهنده تشکیل کمپلکس CD8 و پادتن می باشد. همانگونه که مشاهده می شود تغییر رنگ در گروه تزریق شده نسبت به گروه کنترل به صورت معناداری اختلاف دارد و این نشان دهنده بیان CD8 در سطح بافت ریه است.

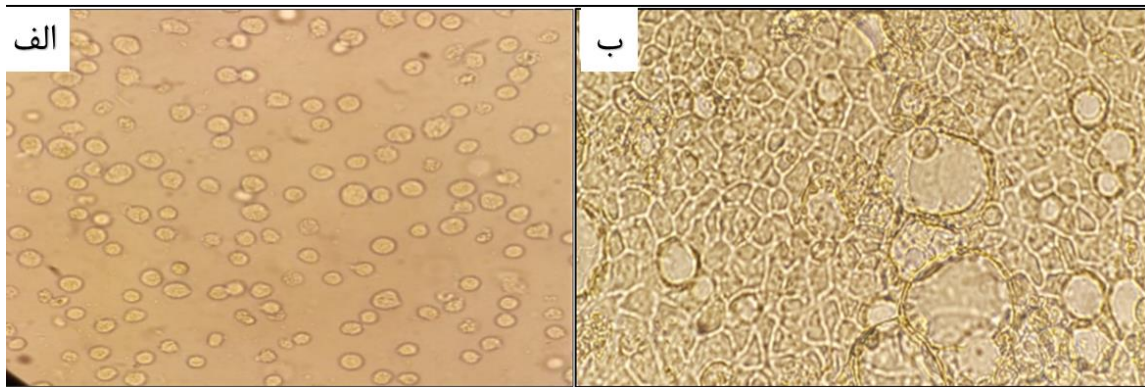
جدول ۳-۶. نتایج تحلیل تصاویر حاصل از ایمونوهیستوشیمی توسط نرم افزار j image. همانطور که مشاهده می شود اختلاف معناداری بین نتایج گروه کنترل و تزریق شده وجود دارد.

مارکر سلولهای T	گروه کنترل	تزریق با ۵۰ میکروگرم پروتئین ۱*۲ مرتبه
%CD4 <sup>+</sup> cells	٪۴,۵	۲۸,۴٪
% CD8 <sup>+</sup> cells	٪۳,۶	۳۵,۵٪

### ۳. مطالعات سلولی

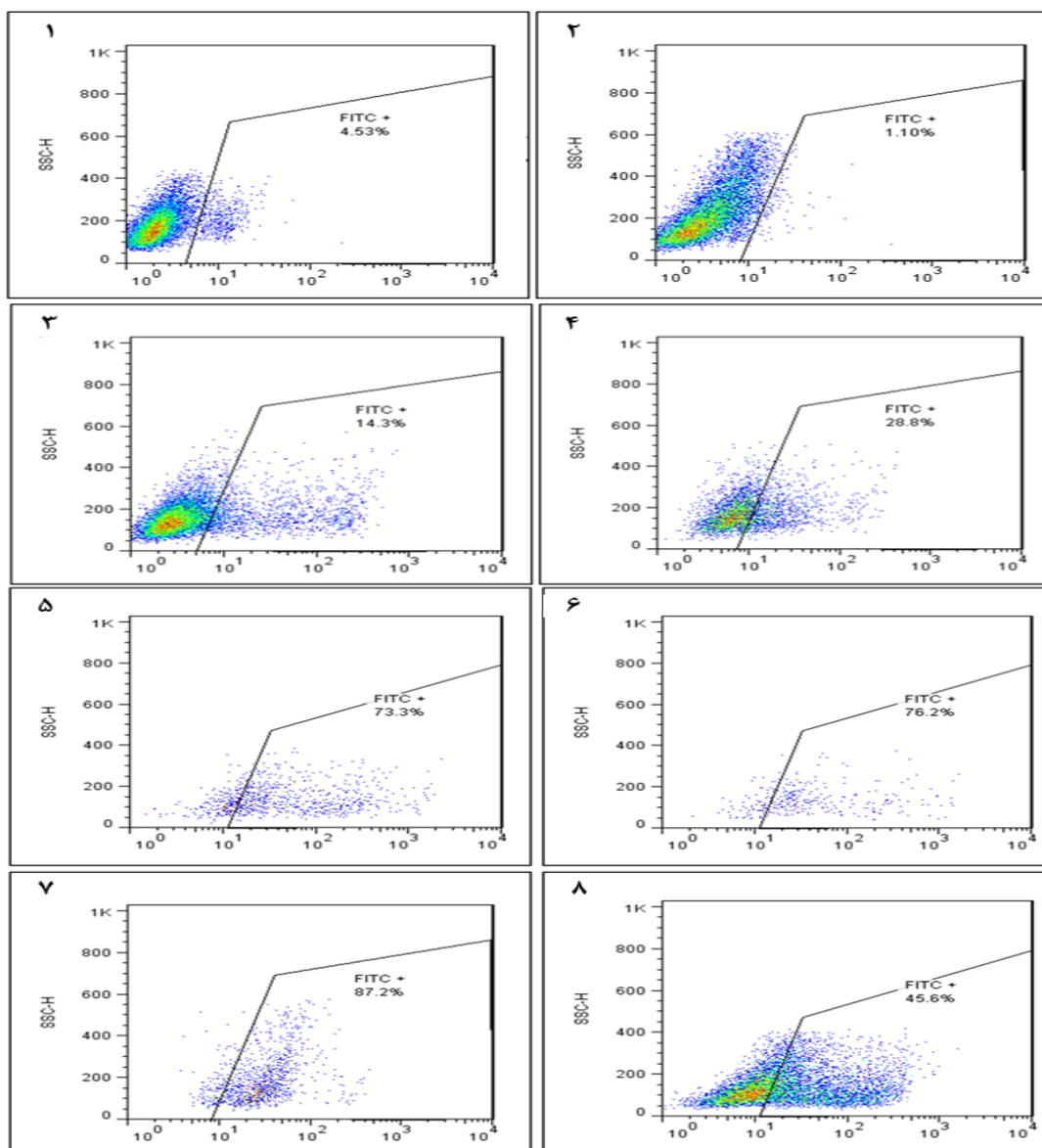
## ۲۷-۳. بررسی اتصال پروتئین ۱ (RBD) به گیرنده ACE2 در سطح سلول

برای این تست دو گروه سلول به عنوان گیرنده مثبت و گیرنده منفی ACE2 استفاده شد. نتایج فلوسایتومتری نشان داد پروتئین ۱ به صورت معناداری با گیرنده ACE2 در سطح سلول Caco2 اتصال پیدا می‌کند که نسبت به گروه کنترل (گیرنده منفی) معنادار بود. همچنین این مطلب تأیید کننده مطالعات بیوانفورماتیک نیز بود. بنابراین به صورت کلی نتایج موید این مطلب است که اولاً پروتئین نوترکیب توسط گیرنده ACE2 شناسایی و به آن متصل می‌شود. ثانیاً پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱ توانایی مهار اتصال ویروس به گیرنده سطح سلول ACE2 را دارد.

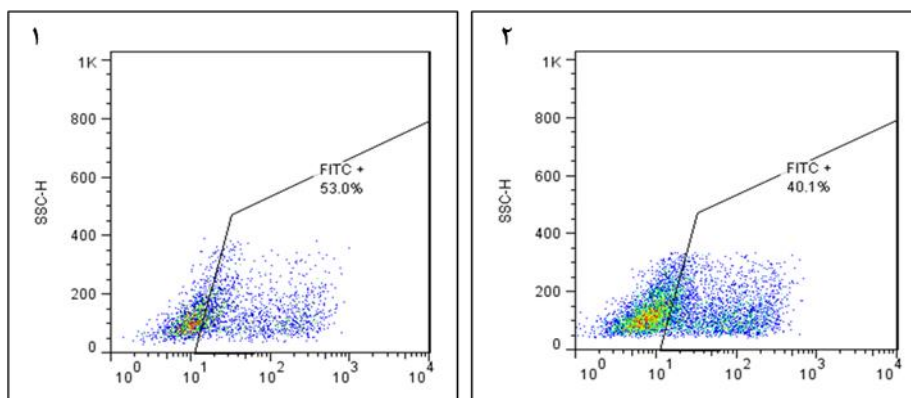


تصویر ۳-۴۵. نمایش سلول‌های کشت داده شده برای مطالعات سلول . الف) سلول K562 که جزو سلول- های معلق است. ب) سلول Caco2 که جزو سلول‌های چسبنده است.





نمودار ۳-۹. نتایج فلوسایتومتری حاصل از واکنش پروتئین ۱ با سلولهای گیرنده مثبت و منفی ACE2. (۱) گروه شاهد (گیرنده منفی), (۲) گروه شاهد (گیرنده مثبت), (۳) گروه گیرنده منفی در مواجهه با یک میکروگرم از پروتئین ۱, (۴) گروه گیرنده منفی در مواجهه با ۵ میکروگرم از پروتئین ۱, (۵) گروه گیرنده مثبت در مواجهه با یک میکروگرم از پروتئین ۱, (۶) گروه گیرنده مثبت در مواجهه با سه میکروگرم از پروتئین ۱, (۷) گروه گیرنده مثبت در مواجهه با پنج میکروگرم از پروتئین ۱, (۸) گروه گیرنده مثبت در مواجهه با گرماگذاری پروتئین ۱+ پادتن



نمودار ۳-۱۰. نتایج فلوسایتومتری حاصل از مهار اتصال ویروس با سلول‌های گیرنده مثبت ACE2 توسط پادتن تولید شده بر علیه پروتئین ۱.۱) گروه گیرنده مثبت در مواجهه با پنج میکروگرم از سارس کوو-۲ و تشخیص توسط پادتن علیه پروتئین ۱، ۲) گروه گیرنده مثبت در مواجهه با گرماگذاری سارس کوو-۲ + پادتن بر علیه پروتئین ۱. همانطور که مشاهده می‌شود گرماگذاری پادتن با سارس کوو-۲ توانست ۱۳٪ اتصال سارس کوو-۲ را نسبت به گروهی که مستقیماً با سارس کوو-۲ در تماس بودند کاهش دهد.

جدول ۳-۷. نتایج فلوسایتومتری حاصل از واکنش پروتئین ۱ با سلول‌های گیرنده مثبت و منفی ACE2

رده سلولی	غلظت پروتئین	%
K562	Control-	4.53
Caco2	Control +	1.10
k562	1 µg RBD	14.3
k562	5 µg RBD	28.8
Caco2	1 µg RBD	73.3
Caco2	3 µg RBD	76.2
Caco2	5 µg RBD	87.2
Caco2	5µg RBD+ Anti RBD (incubation)	45.6
Caco2	5µg virus	53.0
Caco2	5µg virus+ Anti RBD (incubation)	40.1

نتایج نشان می‌دهد:

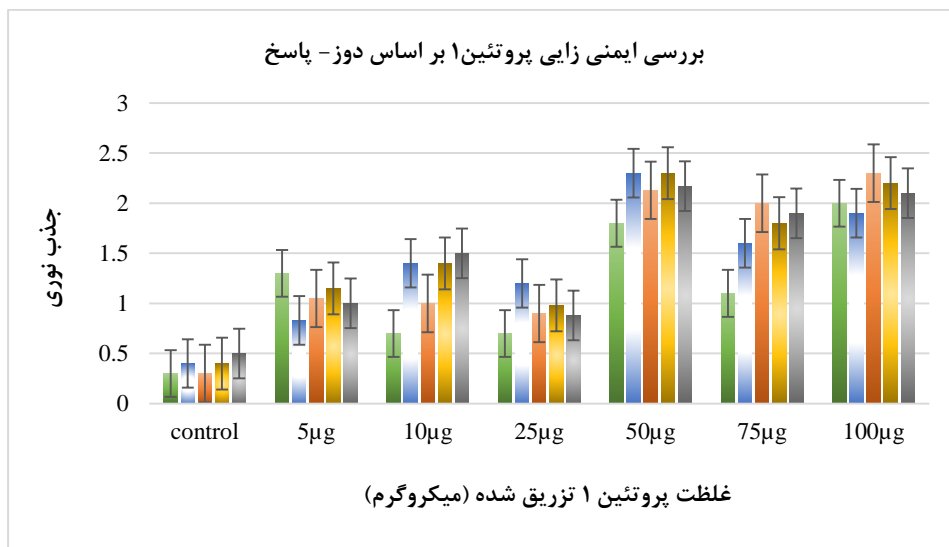
- ❖ در غلظت ۱ میکروگرم پروتئین P1 در گروه هدف (۰.۷۳،۳) نسبت به گروه کنترل منفی (۰.۱۴،۳) تفاوت معناداری در اتصال پادکن - گیرنده دارد.
- ❖ در غلظت ۳ و ۵ میکروگرم پروتئین P1 برای گروه هدف ۰.۷۶،۲ و ۰.۸۷،۲ نسبت به گروه کنترل منفی در غلظت ۵ میکروگرم ۰.۲۸،۸ اختلاف اتصال پادکن - گیرنده کاملاً محسوس است.
- ❖ در زمان گرماگذاری پادتن تولید شده بر علیه P1 با ۵ میکروگرم پروتئین P1، پروتئین‌ها توسط پادتن‌ها مهار شده و اتصال به گیرنده کاهش یافته است (۰.۴۵،۶) که در مقایسه با زمانیکه ۵ میکروگرم پروتئین P1 مستقیماً به سلول اضافه شد (۰.۸۷،۲) پادتن‌ها باعث کاهش معنادار (۰.۴۱،۶) اتصال پروتئین P1 به گیرنده ACE2 می‌شود.
- ❖ گرماگذاری پادتن تولید شده بر علیه P1 با ۵ میکروگرم سارس کوو-۲ (۰.۴۰،۱) نسبت به زمانیکه ۵ میکروگرم ویروس مستقیماً به سلول اضافه می‌شود (۰.۵۳،۰) باعث مهار اتصال ویروس به گیرنده می‌شود (۰.۱۳).

## ۲۸-۳. انتخاب بهترین دوز - پاسخ<sup>۱</sup> در موش

به منظور تعیین بهترین غلظت تزریق پروتئین ۱ برای ایجاد بهترین پاسخ، ۶ گروه با غلظت‌های مختلف ۵،۱۰،۲۵،۵۰،۷۵،۱۰۰ میکروگرم و ۱ گروه به عنوان کنترل با PBS، دو مرتبه تزریق شدند. برای انتخاب بهترین غلظت و پاسخ، الیزا انجام شد. نتایج نشان داد تزریق غلظت ۵۰،۷۵،۱۰۰ میکروگرم از پروتئین ۱ میانگین تقریبی جذب نوری برابر با ۲ داشته است. بنابراین با توجه به نتایج این سه غلظت، بهتر بود کمترین مقدار پادکن با پاسخ برابر با ۱۰۰ میکروگرم به عنوان مناسب‌ترین غلظت تزریقی انتخاب شود. غلظت ۵۰ میکروگرم پاسخ برابر با بالاترین غلظت تزریقی را داشت و به دلیل عدم وجود عارضه به عنوان بهترین غلظت برای بررسی‌های تکمیلی شامل عوارض جانبی در بافت‌ها انتخاب شدند.

---

<sup>1</sup> Dose - Response



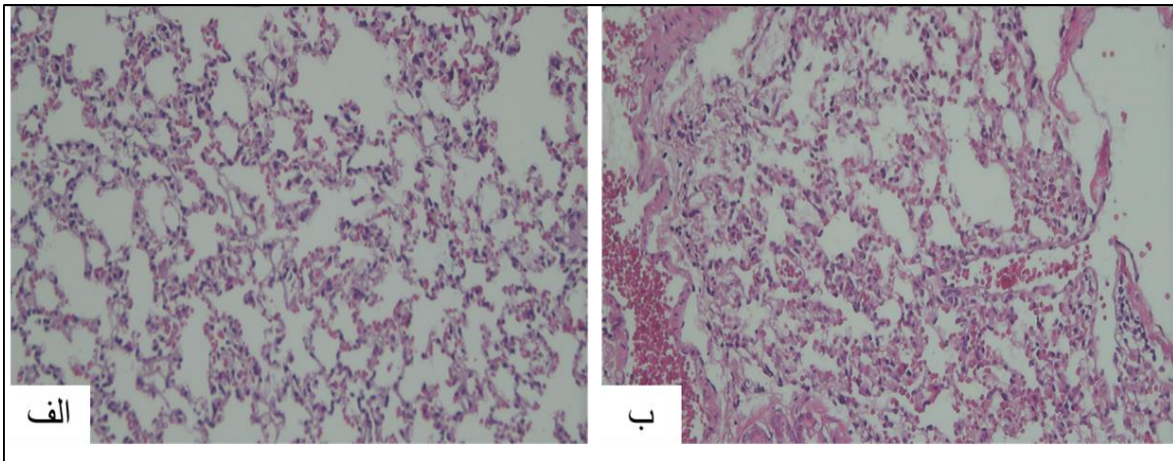
نمودار ۳-۱۱. بررسی بهترین ایمنی زایی در سرم موش‌های تزریق شده با غلظت‌های مختلف پروتئین ۱ به وسیله الیزا. ۶ غلظت مختلف به موش‌ها تزریق شد. بهترین پاسخ با کمترین مقدار پادکن در غلظت تزریقی ۵۰ میکروگرم دیده شد.

### ۲۹-۳. بررسی آسیب شناسی بافت‌ها

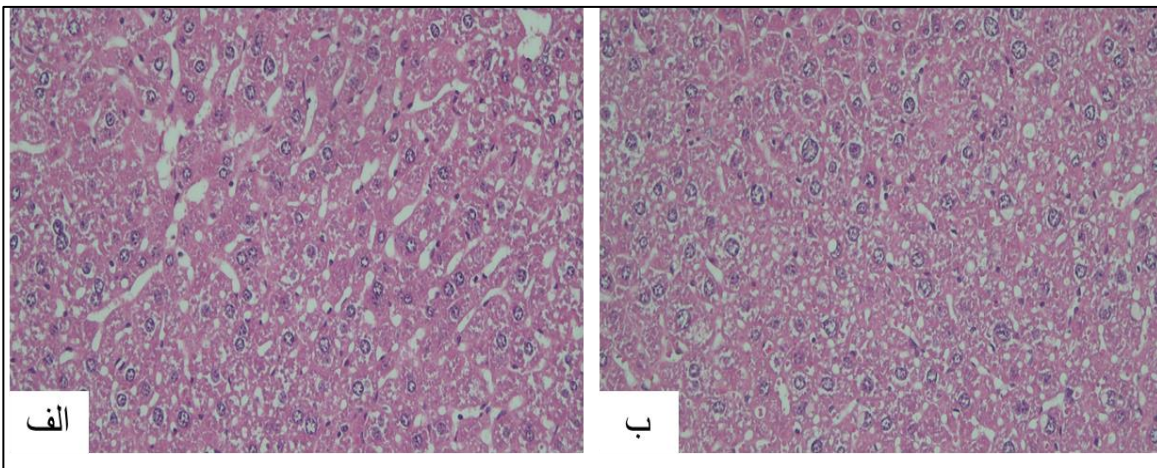
بعد از تأیید غلظت ۵۰ میکروگرم تزریق شده به موش‌ها توسط الیزا، لازم بود تا بافتهای بدن موش‌ها از لحاظ عوارض جانبی ناشی از تزریق نیز بررسی شود. برای بررسی عوارض جانبی تزریق بر روی موش‌ها باید به شرایط آن‌ها در زمان تزریق، بعد از تزریق و کالبدشکافی و تفسیر بافت آن‌ها توسط پاتولوژیست استناد شود و تمامی این عوامل در کنار هم می‌تواند موید این مطلب باشد که واکنش تزریق شده عوارضی داشته است یا خیر. بنابراین با توجه به امکانات موجود تا حد امکان شرایط موش‌ها ثبت و تحلیل شد. شرایط موش‌ها به شرح ذیل بود:

- **قبل تزریق:** موشهای ماده ۶-۸ هفته‌ای بودند. وزن مناسب ۱۵-۲۰ گرم داشتند. از لحاظ وزن، تحرک و مصرف غذا نرمال بودند. به مدت یک هفته در محیط حیوانخانه برای سازگاری با محیط نگه داشته شدند.
- **زمان تزریق:** در این زمان خونریزی و ادم دیده نشد. کمی بی حالی تا یک روز بعد از تزریق در بعضی از موش‌ها دیده شد. البته روز بعد کاملاً برطرف شد.
- **بعد از تزریق:** گروههای تزریق شده هیچ تلفاتی نداشتند. کم اشتها، کاهش وزن، کم تحرکی و... در آن‌ها دیده نشد.
- **زمان کالبدشکافی:** در زمان برداشتن بافتها بعد از کالبدشکافی هیچ گونه عارضه‌ای به صورت ظاهری دیده نشد.
- **تفسیر بافت:** بعد از فیکس کردن بافتها بر روی لام، تفسیر پاتولوژیست از بافت‌های موش در مقایسه با گروه کنترل به شرح ذیل می‌باشد:
  - ✓ **ریه:** نسبت به گروه کنترل ریه‌ها کاملاً سالم است. آلوئول‌ها ساختار مناسب خود را حفظ کرده‌اند. نکروز و تخریب سلولی دیده نشد.
  - ✓ **کبد:** در مقایسه با گروه کنترل، کبد موش‌های تزریق شده طبیعی هستند و هیچ عارضه‌ای دیده نشد. هسته و سیتوپلاسم سالم است و مشکلی ندارند. هیپاتوسیت‌ها منظم در کنار هم هستند و ساختار طبیعی خود را حفظ کرده‌اند. سینوزوئیدها متسع نیستند و هیچگونه تخریب بافتی دیده نمی‌شود.
  - ✓ **طحال:** این بافت از دوبرخش پالپ سفید و پالپ قرمز تشکیل شده است. همانطور که در تصاویر مشخص است بافت کاملاً نرمال است. پالپ سفید و قرمز به صورت مجزا قابل تشخیص است. هیچگونه عارضه‌ای در طحال دیده نمی‌شود.

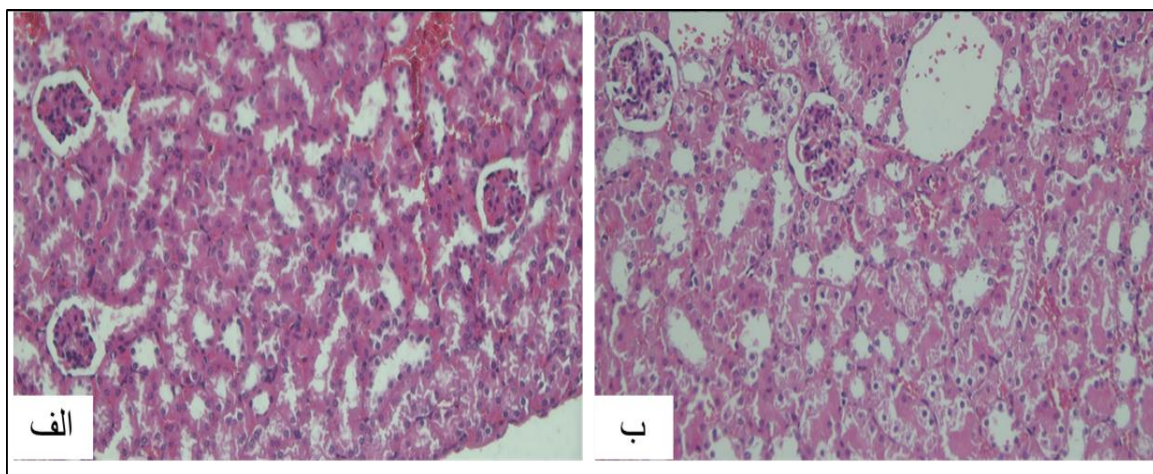
✓ **کلیه:** گلومرول ها شکل صحیحی داشتند. در صورتی که عارضه ای وجود داشته باشد فضای بومن بزرگتر می شود و گلومرول ها تحلیل رفته و جمع می شوند. همانطور که در تصاویر مشخص است کلیه ها کاملا سالم هستند .  
 بنابراین در مجموع از اطلاعات بدست آمده می توان اینگونه ادعا کرد که واکسن تزریق شده هیچگونه عارضه ای بر روی بافت موش ها نداشته است.



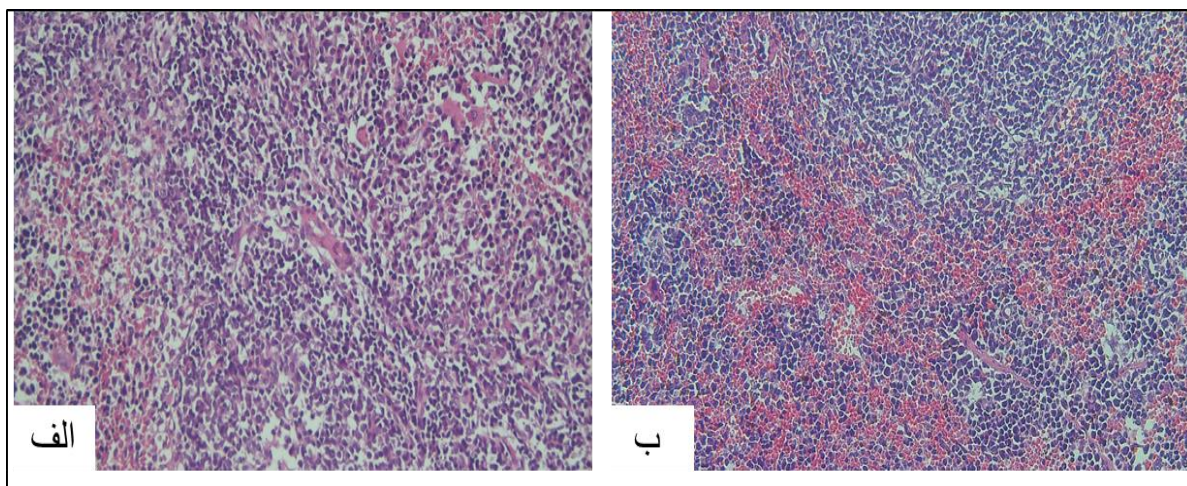
تصویر ۳-۴۶. تصاویر میکروسکوپی از ساختار ریه (H&E, Ob: 20). الف) گروه کنترل (ب) گروه تزریق شده. هیچگونه عارضه ای در آلوئول موش های تزریق شده نسبت به موش کنترل مشاهده نشد.



تصویر ۳-۴۷. تصاویر میکروسکوپی از ساختار کبد (H&E, Ob:20). الف) گروه کنترل. ب) گروه تزریق شده. الف) گروه کنترل (ب) گروه تزریق شده. هیچگونه عارضه ای در سلولهای هپاتوسیت موش های تزریق شده نسبت به موش کنترل مشاهده نشد.



تصویر ۳-۴۸. تصاویر میکروسکوپی از ساختار کلیه (الف) (H&E, Ob: 20) گروه کنترل ب) گروه تزریق شده. هیچگونه عارضه ای در گلومرول های موش های تزریق شده نسبت به موش کنترل مشاهده نشد.



تصویر ۳-۴۹. تصاویر میکروسکوپی از ساختار طحال (الف) (H&E, Ob:20) . گروه کنترل ب) گروه تزریق شده . هیچگونه عارضه ای در پالپ موش های تزریق شده نسبت به موش کنترل مشاهده نشد.

جمع بندی نتایج بدست آمده از هر سه پروتئین نو ترکیب تولید شده در این مطالعه

V	P1+ V	مخلو ط	پروتئین ۳	پروتئین ۲	پروتئین ۱	
			+	-	+	پادکنسپته
			+	+	-	آلرژنسیته
			۲۷	۳۸,۵۳	۱۲,۴۲	شاخص پایداری
			۷۶,۴۱	۹۰,۶۲	۶۵,۵۴	شاخص آلیفاتیک
			۳	---	۱	پیوند دی سولفیدی
			آبدوست	آبگریز	آبدوست	شاخص هیدروفوبیسیته
			+	+	+	سمیت
			-	-	-	سیگنال پپتید
			++	+	+++	شاخص اپی توپیک
			۳	۱	----	پیوند گلیکوزیله
			۶,۸	۷,۷۶	۹,۶۲	PI
			۱۶۷	۹۷	۱۰۱	تعداد اسید آمینه
			کم در آب	کم در آب	کم در آب	حلالیت
			مجاز	مجاز	مجاز	راما چاندران
			-----	-----	-----	اندوتوکسین
			۲,۰۹	۲,۰۵	۱,۴	میانگین الایزا خوانش شده بیمار
			۰,۶۲	۱,۰۸	۱,۴۶	میانگین الایزا خوانش شده واکسن
			۱,۸	۲,۱	۲,۴	تیترا پادتن در خرگوش ۳۰ روز
			۱,۵	۱,۴	۱,۵	تیترا پادتن در خرگوش ۵۰۰ روز
		۲,۳	۲,۲	۲,۴	۱,۸	تیترا پادتن در موش در روز ۷۰
		۲,۲	۱	۱,۹	۲	تیترا پادتن در روز ۳۹۰
۱,۰۹۲	۰,۸۲۶	۰,۶۴۸	۰,۵۷۸	۰,۷۱۶	۰,۷۹۴	الایزا با سرم موش و پلیت سارس کوو ۲
			۱/۱۰	۱/۱۰	۱/۱۰ ۱/۱۰۰	رقت پادتن برای خنثی سازی ویروس
					+++	اتصال به گیرنده ACE2 در سطح سلول
					+++	اثر مهارتی پادتن بر اتصال ویروس به گیرنده
					+++	شناسایی پادتن سرم (تزریق شده با RBD) توسط بخش سنبله ویروس سارس کوو-۲ در وسترن بلات
					+++	تحریک سیستم ایمنی سلولی
					-----	عوارض در بافت



جدول مقدار بازده تقریبی تخلیص هر سه پروتئین نو ترکیب			
P3	P2	P1	غلظت تقریبی پروتئین در شرایط متفاوت (میلی گرم / لیتر)
۳۴۰	۳۴۰	۳۵۰	محلول (سوپرناتانت) پروتئین بیان شده قبل از ستون نیکل
۲۵۰	۲۶۰	۲۸۰	محلول (سوپرناتانت) بعد از ستون نیکل
۷۰	۶۵	۶۰	پروتئین تخلیص شده از ستون نیکل
۴۰	۳۰	۴۰	پروتئین بعد از ستون آمیکون
۴۴,۴٪	۳۷,۵٪	۵۷٪	بازده تخلیص (٪)

در مجموع نتایج بدست آمده از سه پروتئین نو ترکیب تولید شده نشان می دهد با توجه به اینکه هر سه پروتئین نتایج خوبی را در ارزیابی ها داشته اند اما به صورت کلی در تولید پادتن و خنثی سازی ویروس، پروتئین ۱ (RBD) می تواند کارایی بهتری در حوزه واکسن های نو ترکیب داشته باشد.

# فصل چہارم

## بحث

بیش از یک دهه قبل، محققین ظهور یک همه‌گیری ناشی از ویروس‌های کرونا را پیش بینی کرده بودند [۶۱]. در هر دهه از ۳۰ سال گذشته، یک ویروس کرونا جدید سیستم بهداشت عمومی را تحت تاثیر قرار داده است؛ البته عفونت‌های ناشی از آن ویروس‌ها، خود محدود شونده بودند. پس از شیوع ویروس سارس کوو-۲ در آخرین روزهای سال ۲۰۱۹ این ویروس به عنوان عامل بروز بیماری جدید کرونا، توسط سازمان بهداشت جهانی به عنوان یک معضل بهداشتی در جهان مطرح شد و به سرعت تبدیل به پاندمی گردید. تعداد مبتلایان این بیماری هر روزه در حال افزایش است. بر اساس آمار ارائه شده توسط سازمان بهداشت جهانی تا ۱ تیرماه ۱۴۰۲ (۲۲ ژوئن ۲۰۲۳) تمامی کشورهای دنیا درگیر این بیماری شده، بیش از ۷۶۲ میلیون نفر به این ویروس آلوده و نزدیک به ۷ میلیون نفر در اثر این بیماری فوت کرده‌اند که بالاترین آمار مرگ و میر را تاکنون در بین مبتلایان به ویروس کروناها از خود نشان داده است [۱۱۰]. در زمان شیوع بیماری، تنها عاملی که منجر به برداشت کامل محدودیت‌ها می‌گردید، واکسیناسیون افراد بود. بنابراین طراحی و تولید یک واکسن کارآمد، با توجه به وجود ناقلین بدون علامت، ضروری و حیاتی گردید [۱۱۱]. اما بزرگترین چالش در این راه، طراحی، ساخت سریع و توزیع جهانی واکسن بود. کنترل یک بیماری ویروسی نیازمند راه‌های سریع درمان و تولید واکسن‌های موثر بود. در سراسر جهان، میلیاردها دوز واکسن مورد نیاز بود که علاوه بر دارا بودن استانداردهای لازم، می‌بایست در زمان سریع و در مقادیر بالا تولید می‌شدند [۶۱، ۱۱۱]. توانایی تولید سریع داروها، واکسن‌ها و اطمینان از عرضه آن‌ها در مقیاس بزرگ، تبدیل به یک رویکرد مشترک بین شرکت‌های دارویی، دولت‌ها و سازمان‌های بین‌المللی شد. همواره روش‌های متفاوت تولید واکسن، از جمله استفاده از ویروس غیرفعال یا زنده ضعیف شده، وکتور ویروسی، DNA، mRNA و واکسن نوترکیب مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است [۱۱۲]. با توجه به تجربه گذشته از شیوع ویروس‌های سارس و مرس، انواع مختلفی از واکسن‌ها در فاز تحقیقاتی مطرح گردیدند. اما نکته تعجب آور این است که هیچ یک از فناوری‌های نوین تولید واکسن در فاز صنعتی مورد استفاده قرار نگرفت و واکسن‌ها به روش سنتی، از ویروس غیرفعال یا ضعیف شده تولید گردیدند. شاید بتوان سرایت کم ویروس و جوابگو بودن روش سنتی در کنترل و مهار ویروس را یکی از دلایل استقبال از تولید واکسن‌های سنتی در آن زمان دانست [۱۱۳]. این نوع واکسن‌ها به صورت آسانتری تولید شده و سالیان طولانی به عنوان راهکار تولید واکسن مورد نظر بوده‌اند. متأسفانه به علت انتقال سریع انسان به انسان ویروس سارس کوو-۲ و ایجاد پاندمی، نیاز به اقدامات سریعتر، با بازده بالا در حوزه تولید واکسن احساس گردید. محدودیت‌هایی مانند کشت ویروس، بازده پائین، زمان طولانی تولید، چک کردن هر سری تولید واکسن از لحاظ غیرفعال شدن ویروس‌ها، هزینه بالا، احتمال انتشار آلودگی و نیاز به آزمایشگاه‌های سطح ۳، روش‌های نوین تولید واکسن را مورد توجه قرار داد [۱۱۳]. با توجه به همولوژی سارس کوو-۲ به دو ویروس سارس و مرس، از مطالعات قبلی انجام شده بر روی این دو ویروس، برای طراحی و تولید واکسن استفاده گردید. در این تحقیقات نشان داده شد که واکسن‌های مبتنی بر ویروس غیرفعال و نوترکیب بیشترین کارایی را در خنثی کردن ویروس دارند. البته گزارش‌هایی مبنی بر ایجاد عوارض ADE در افرادی که با واکسن‌های ویروس ضعیف یا کشته شده ایمن شده بودند نیز وجود داشت که برای واکسن‌های نوترکیب گزارش

نشده بود [۱۱۴]. با توجه به محدودیت‌های ذکر شده برای تولید واکسن‌های مبتنی بر ویروس، واکسن‌های نو ترکیب به عنوان یکی از راهکارهای کارآمد مورد توجه قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۵۳٪ از مطالعات در حوزه واکسن‌های سارس و مرس بر روی مدل نو ترکیب انجام شده است [۱۱۵]. مطالعات اخیر در حوزه واکسن‌های موجود در حوزه کووید-۱۹ نیز نشان داد که واکسن‌های نو ترکیب نسبت به واکسن‌های دیگر دارای عوارض جانبی کمتری هستند. یکی دیگر از مزیت‌های این واکسن‌ها کنترل دوز تزریقی است. نتایج نشان داده‌اند که بر اثر تزریق دوز بالای واکسن و در پی آن تولید IgG و اتصال به گیرنده FC گاما موجود در برخی سلول‌های ایمنی مانند ماکروفاژ، نوتروفیل، ائوزینوفیل، بازوفیل و.... بروز آنفیلاکسی ممکن می‌باشد که این مساله در واکسن‌های نو ترکیب با کنترل دوز تزریقی برطرف می‌شود [۱۱۶، ۱۱۷]. بنابراین، با توجه به نتایج تحقیقات انجام شده مبنی بر مشکلات موجود در تولید واکسن‌های مبتنی بر ویروس، مزیت استفاده از واکسن‌های نو ترکیب بیشتر مشهود می‌گردد و می‌توان این نوع از واکسن را، ایمن با تولید سریع، مقرون به صرفه و بازده بالا در نظر گرفت. بنابراین با توجه به موارد ذکر شده مطالعات ما در زمینه تولید پروتئین‌های نو ترکیب به عنوان کاندید واکسن بر علیه سارس کوو-۲ آغاز شد. نکته‌ای که باید مد نظر قرار داده می‌شد این بود که در زمان شیوع ویروس در ایران به دلیل عدم وجود آزمایشگاه‌های سطح ۳ در کشور و زیرساخت‌های لازم برای تولید و کشت ویروس در سطح تولید برای میلیون دوز واکسن کار تولید واکسن را با مشکل مواجه می‌کرد. از طرف دیگر با توجه به تحریم‌های جهانی و همچنین در انحصار بودن تولید واکسن برای چند کشور، امکان ورود سریع واکسن‌ها به کشور فراهم نبود. بنابراین با توجه به امکانات موجود در کشور و عدم تجهیزات لازم، یکی از راهکارهای ممکن تولید واکسن در مبتنی بر پروتئین نو ترکیب بود.

### • انتخاب بخش ایمنی زا از سارس کوو-۲ برای تولید واکسن

مهم‌ترین بخش مطالعه ما، انتخاب قسمت ایمنی زا از ویروس کرونا بود. به طوری که بتواند با وزن ملکولی قابل قبول و ساختار مناسب در میزبان پروکاریوتی بیان گردیده و بیشترین ایمنی زایی را نیز ایجاد نماید. بیشتر کرونا ویروس‌ها یک پروتئین سطحی بزرگ بنام سنبله را کد می‌کنند. این پروتئین مسئول اتصال ویروس به گیرنده در سطح سلول میزبان است. در مورد سارس و سارس کوو-۲ پروتئین سنبله به گیرنده ACE2 بر روی سلول میزبان متصل و سپس هم جوشی (فیوژن) غشایی اتفاق می‌افتد و ژنوم ویروس وارد سیتوپلاسم سلول میزبان می‌شود. در تحقیقات مختلف، نشان داده شده است که پادتن‌هایی که بتوانند به پروتئین سنبله به ویژه بخش RBD متصل گردند، می‌توانند از اتصال ویروس به سلول میزبان جلوگیری کرده و در نهایت آن را خنثی نمایند [۱۱۸، ۱۱۹]. بر اساس یافته‌ها و اطلاعات بدست آمده از مطالعات پیش بالینی در مورد سارس و مرس، سنبله پروتئین به عنوان یک پادکن (آنتی‌ژن) هدف برای توسعه واکسن بر علیه سارس کوو-۲ معرفی گردید. بنابراین در اکثر تحقیقات مبنای طراحی برای واکسن نو ترکیب بر اساس بخش سنبله پروتئین ویروس سارس کوو-۲ قرار گرفته است. با توجه به موارد ذکر شده هدف ما برای طراحی واکسن، انتخاب بخش‌های ایمنی زا از ناحیه پروتئین سنبله سارس کوو-۲ بود.

## • انتخاب پادکن (آنتی ژن) مناسب از پروتئین سنبله

بر اساس مطالعات انجام شده در حوزه سارس و مرس، مدل تولید واکسن‌های نوترکیب برای سارس کو-۲ به دو دسته مبتنی بر کل سنبله و اپی توپی تقسیم می‌شوند. برخی از مقالات، کل پروتئین سنبله را به عنوان نامزد مناسب واکسن در نظر گرفته‌اند. یافته‌ها در حوزه سارس و مرس نشان داده‌اند که بیان کل پروتئین سنبله نسبتاً دشوار بوده و بر روی بازده و مقدار دوز تزریقی تأثیر گذار است. علاوه بر این، کل پروتئین سنبله دارای اپی توپ‌هایی می‌باشد که باعث تولید پادتن‌های غیر خنثی‌ساز و در نتیجه ADE می‌گردند [۱۱۹، ۱۲۰]. بنابراین انتخاب ناحیه کامل این پروتئین گزینه مناسبی برای تولید نبوده و به همین دلیل انتخاب بخش‌های کوچکتر و ایمن‌ساز ایمونوژن توجه اکثر گروه‌های مطالعاتی را به منظور آنتی ژن هدف برای تولید واکسن به خود جلب کرده است. در این بخش ما بر اساس نتایج مطالعات داده‌شناسی زیستی (بیوانفورماتیک)، سه بخش از پروتئین سنبله را با توجه به نقش و اهمیت آن‌ها انتخاب کردیم.

### انتخاب RBD(P<sub>1</sub>):

بخش S<sub>1</sub> از پروتئین سنبله، حاوی بخشی بنام RBD است که نقش کلیدی در اتصال ویروس به گیرنده ACE2 در سطح سلول میزبان دارد. مقالات مختلف، به این ویژگی RBD در اتصال به گیرنده اشاره داشته و این بخش را هدف مهمی برای تولید واکسن در نظر گرفته‌اند. انتخاب بخش RBD دارای مزیت‌های فراوانی از جمله بیان آسان‌تر و مستعد بودن به تغییرات پادکنی (پادکنی) نسبت به کل پروتئین سنبله می‌باشد. همچنین پادتن‌های تولید شده بر علیه RBD نسبت به کل پروتئین سنبله دارای خاصیت خنثی‌سازی بیشتری هستند زیرا نتایج نشان می‌دهد بخش‌هایی از پروتئین سنبله قادر به تولید پادتن‌هایی هستند که بر پادتن‌های خنثی‌ساز اثر گذاشته و کارایی آن‌ها را کاهش می‌دهد [۱۲۱].

بخش‌های S<sub>1</sub>، S<sub>2</sub> و RBD اولین کاندیدای واکسن نوترکیب بوده‌اند؛ که از بین آن‌ها RBD با توجه به تولید بالای پادتن خنثی‌ساز و تحریک سیستم ایمنی، به عنوان مهم‌ترین کاندید واکسن در نظر گرفته شده است. نکته قابل توجه این بود که RBD به صورت موثری باعث افزایش پاسخ سیستم ایمنی بر علیه گونه‌های نوپدید می‌گردد. RBD در بیشتر مطالعات به عنوان بخش به شدت ایمن‌زا در نظر گرفته شده است. بخش S<sub>1</sub> پادتن خنثی‌ساز کمتری نسبت به RBD دارد و از این رو RBD نامزد بهتری از بخش S<sub>1</sub> سارس کوو-۲ برای طراحی واکسن می‌باشد [۱۲۱].

موضوع مهمی که در تحقیقات به آن اشاره شده است، سمیت به شدت کم این بخش است. همچنین پروتئین نوترکیب تزریق شده براساس RBD اثری بر وزن، اشتها، خلق و خو ندارد. نتایج آسیب‌شناسی وجود هرگونه عارضه‌ای در مغز، کبد، کلیه و قلب را رد کرده و حتی کاهش در تعداد سلول‌های خونی هم نشان داده نشده است. به هر حال نتایج نشان داده‌اند که RBD از چندین اپی توپ ساختاری تشکیل شده است و می‌تواند باعث تحریک سیستم ایمنی ناشی از سلول B و تولید پادتن خنثی‌ساز با ماندگاری

بالا شود. بنابراین انتخاب بخش RBD نسبت به کل پروتئین سنبله علاوه بر افزایش ایمن زایی، باعث کاهش خطر ایجاد ADE می‌گردد [۱۲۱]. البته نکته قابل توجه این است که با توجه به کوچک بودن اندازه این آنتی‌ژن نسبت به کل پروتئین سنبله، عدم شناسایی آسان توسط سلول‌های ایمنی و مستعد بودن به تخریب این واکسن‌ها، اغلب این پروتئین‌ها با ادجوانت (هم‌یار) و یا دیگر تحریک‌کننده‌های سیستم ایمنی ترکیب گشته تا موجب ایمنی با ماندگاری بالا گردد [۱۲۲]. در جدول ۴-۱ ویژگی‌های کل بخش سنبله پروتئین و RBD به عنوان هدف برای تولید واکسن با هم مقایسه شده‌اند [۱۱۹]. بنابراین یکی از گزینه‌های ما برای طراحی و تولید بخش RBD قرار گرفت. ما نیز همراه با پروتئین نوترکیب از ادجوانت فروند و آلوم استفاده کردیم. هرچند نتایج ما نشان داد ادجوانت فروند نسبت به آلوم باعث تحریک پذیری بیشتر سیستم ایمنی می‌گردد؛ اما استفاده از این نوع ادجوانت برای تولید واکسن‌های انسانی مجاز نمی‌باشد. همچنین در راستای مطالعات قبلی، نتایج ما هم حاکی از عدم عوارض در بافت‌ها و ایجاد سمیت بود.

در جدول ۴-۱. ویژگی‌های کل بخش سنبله پروتئین و RBD به عنوان هدف برای تولید واکسن با هم مقایسه شده‌اند.

ویژگی	S-Protein	RBD	نکته
تیتراژ پادتن خنثی ساز	بالا	زیاد	بیش از ۹۰ درصد برای RBD هدف اما در پروتئین کامل بر علیه S2 و NTD نیز پادتن ساخته می‌شود.
اپی‌توپ‌های RBD	بله	بله	
اپی‌توپ‌های NTD	بله	خیر	NTD دارای تغییر در اسید نوکلئیک به صورت حذفی، جانشینی و اضافه شدن دیده شده است.
پادتن خنثی ساز/پادتن متصل شونده	متوسط	بالا	تعیین مقدار پادتن خنثی ساز دارای کارایی نسبت به کل مقدار پادتن سنجیده می‌شود.
اپی‌توپ‌های CD4	بالا	متوسط	ایمنی ویژه RBD می‌تواند به وسیله نمایش مولتی‌مری و ادجوانت افزایش پیدا کند.
اپی‌توپ‌های CD8	کم	کم	به نظر می‌رسد واکسن‌های ساب‌یونیتی بر مبنای RBD و S پروتئین باعث پاسخ سلول CD8 <sup>+</sup> T نشود. اما S پروتئین بهتر می‌تواند باعث تحریک ایمنی سلولی وابسته به سلول شود.
سلول‌های B خاطره	بالا	بالا	
ماندگاری پادتن	بله	بله	
کارایی بالینی	بله	بله	۱۵ واکسن مبتنی بر S پروتئین گزارش شده با بیش از ۵۰ درصد کارایی، وابسته به واریانت مورد استفاده برای تولید هستند. واکسن کوپایی مبتنی بر RBD با بیش از ۹۰ درصد کارایی گزارش شده است.
حجم تولیدی	متوسط	بالا	کواکس مذاکرات خود را برای تهیه واکسن‌های مبتنی بر RBD انجام داده است.
هزینه	متوسط	پایین	

## انتخاب FP (P<sub>2</sub>):

پپتید جوش خورده<sup>۱</sup> (FP) یکی از بخش‌های بسیار حفاظت شده در خانواده ویروس کرونا می‌باشد. پپتید جوش خورده ویروس کروناها شامل ۱۵ تا ۲۵ اسید آمینه غیر قطبی می‌باشد. در سارس کوو، مرس و سارس کوو-۲ یک توالی ۱۸ اسید آمینه‌ای (SFIEDLLFNKVTLDAGF) با مشابهت بسیار بالایی در میان کرونا ویروس‌ها دیده شده که بسیار حفاظت شده هستند و به عنوان بخش پپتید جوش خورده شناخته می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد بخش فیوژن پپتید، به دلیل تغییرات بسیار کم در میان خانواده کرونا ویریده‌ها (با آمار ۹۳٪) شباهت در بین ۳۹ اسید آمینه حفاظت شده در میان بتا ویروس کروناها و ۳۹ اسید آمینه کاملاً حفاظت شده بین توالی سارس کوو-۲، کاندید واکسن جذابی بر علیه سارس کوو-۲ می‌باشد [۱۲۳]. به همین دلیل این بخش پروتئین نیز به عنوان یکی دیگر از کاندیدای واکسن انتخاب شد.

## انتخاب CS (P<sub>3</sub>):

در مطالعه‌ای به اهمیت نقش اپی توپ C<sub>662</sub>-C<sub>671</sub> از توالی سنبله پروتئین پرداختند. نتایج تجزیه و تحلیل این مطالعه نشان داد که اپی توپ C<sub>662</sub>-C<sub>671</sub> یک موتیف ممتاز برای توسعه واکسن و شاید حتی یک ظرفیت بالقوه برای پادتن درمانی دارد. این ناحیه بین گونه‌های مختلف ویروس سارس کوو-۲ بسیار حفاظت شده بوده و ممکن است یک فرصت منحصر به فرد برای توسعه واکسنی باشد که محافظت قوی و با دوام در برابر سارس کوو-۲ ایجاد می‌نماید. با توجه به ویژگی ناحیه CS و حفاظت بسیار بالای ساختار ژنومی آن، این بخش یکی دیگر از گزینه‌های انتخاب شده ما به عنوان نامزد واکسن بود [۱۲۴]. بنابراین سه بخش FP, CS, RBD به عنوان اپی توپ‌های انتخاب شده برای کلون در وکتور (+) pET-28a در نظر گرفته شدند. مطالعات بیوانفورماتیکی نشان دهنده شاخص پادکنی (آنتی‌ژن‌سیتی) برای پروتئین‌های ۱ و ۳، شاخص آلرژن مثبت برای دو پروتئین ۲ و ۳ و پایداری برای هر سه آنتی‌ژن انتخاب شده، بود. نتایج آزمایشگاهی ما نشان داد که هر سه پروتئین دارای شاخص پادکنی (پادکنسیتی) بوده، هیچ یک عوارض و آلرژی به صورت ظاهری یا در اندام‌ها ایجاد نکرده و در مدت زمان طولانی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد پایدار می‌باشند. وجود پیوندهای دی سولفیدی برای هر سه آنتی‌ژن پیش بینی شده است. اختلاف نظرهایی برای تشکیل پیوند دی سولفیدی در باکتری وجود دارد. برخی از محققین معتقدند که باکتری‌ها فاقد توانایی تشکیل پیوند دی سولفیدی می‌باشند؛ در حالی که گروهی دیگر اعتقاد دارند با مهندسی محیط سیتوپلاسمی باکتری و ایجاد شرایط غیر احیایی می‌توان باعث تشکیل پیوند دی سولفیدی شد. نتایج الکتروفورز نشان داد، زمانی که از بافر رنگ احیا کننده یا غیر احیا استفاده می‌نمائیم، اختلاف نظر در باندهای موجود بر روی ژل وجود داشته و بنابراین باند دی سولفیدی تشکیل می‌گردد. ما فکر می‌کنیم علت عدم تشکیل پیوند دی سولفیدی، شرایط احیایی در داخل سیتوپلاسم می‌باشد. هنگام تخریب باکتری، پروتئین‌ها از شرایط احیایی خارج و به شرایط اکسیدی وارد شده و در

<sup>1</sup> Fusion peptide

نتیجه امکان تشکیل پیوند فراهم می‌شود. به هر حال، تفاوت‌هایی در بین داده‌های زیستی (بیوانفورماتیک) و آزمایشگاهی وجود دارد. داده‌های زیستی مبتنی بر پیش‌گویی بوده و کاملاً صحیح نمی‌باشد و برای تأیید آن نیاز به مشاهدات آزمایشگاهی می‌باشد. نتایج ما در آزمایشگاه، هر سه آنتی‌ژن را از لحاظ بیان پادکنسیتی، آلرژی‌زایی و... قابل قبول دانست.

## • انتخاب میزبان پروکاریوتی برای بیان پروتئین نو ترکیب

پروتئین‌های نو ترکیب می‌توانند در سیستم‌های مختلف مانند سلول‌های حشرات، پستانداران، پروکاریوت-ها، مخمرها و گیاهان بیان می‌گردند. نتایج مطالعات گذشته نشان می‌دهند، واکسن‌های نو ترکیب بر پایه پروتئین سنبله می‌توانند در باکتری اشرشیاکلاهی بیان شوند [۱۲۴]. تولید داروهای زیستی در اکلاهی یک مدل قوی و تثبیت شده را ارائه می‌دهد که می‌تواند به راحتی از یک آزمایشگاه دانشگاهی به یک مرکز تولیدی منتقل شود. به وسیله این میزبان، می‌توان بیان را به راحتی افزایش داد و هم‌چنین، جنبه‌های نظارتی تولید برای مدت طولانی وجود خواهند داشت [۱۲۵].

تولید واکسن‌های نو ترکیب دارای مزایای بی‌شماری بوده که در ذیل به برخی از آن‌ها اشاره خواهیم نمود:

۱. عدم وجود ارگانیزم بیماری‌زا (ویروسی یا باکتریایی) در تولید
۲. مشخص بودن ترکیب دقیق واکسن‌ها برای هر دسته مشخص
۳. تولید در سیستم عامل و فرآیندهای تخمیر مختلف
۴. تولید در مقیاس بزرگ، ساده و مقرون به صرفه
۵. اصلاح سیستم بیانی توسط مهندسی ژنتیک

در مطالعه‌ای مقادیر بیان پروتئین نو ترکیب در دو میزبان پروکاریوتی و یوکاریوتی مقایسه شد. نتایج نشان داد که میزان بیان پروتئین نو ترکیب RBD (حاصل از وجود پلاسمید نو ترکیب RBD) در میزبان باکتریایی تقریباً ۴۰ میلی‌گرم در لیتر و در میزبان‌های یوکاریوتی ۴۵ میلی‌گرم در لیتر بوده است. با وجود قندی سازی (گلیکوزیلاسیون) در سلول‌های یوکاریوتی و فرآیند حذف قند در باکتری، باز هم بیان این پروتئین‌ها در میزبان باکتری مناسب به نظر می‌رسد. علاوه بر این، پروتئین‌های تولید شده در باکتری پایداری خود را در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد حفظ می‌کنند و می‌توانند برای مدت طولانی ذخیره شوند [۱۱۵]. نتایج مطالعات ما نیز نشان داد توسط میزبان باکتریایی می‌توان پروتئین‌ها را با بیان بالا و پایدار تولید کرد. البته بازده، نوع و میزان تغییرات پس از ترجمه، بسته به سیستم بیان متفاوت است.

در مقابل، در برخی از تحقیقات نشان داده شده است که تولید پروتئین‌های مفید ویروس سارس و زیر دامنه‌های آن‌ها، چالشی برای سیستم‌های تولید بر مبنای سلول غیر حیوانی بوده است. نتایج تحقیقی



برای تولید بخش RBD ویروس سارس در سال ۲۰۰۳ با استفاده از یک میزبان مبتنی بر اکلاهی، تاخوردگی و تجمع پروتئین ضعیفی را به صورت اجسام اینکلوزن نشان داد. پروتئین به دست آمده بسیار کمتر از همان نوع پروتئین تولید شده در سلول‌های پستانداران یا حشرات ایمنی‌زا بود [۱۲۶]. هم‌چنین تولید پروتئین‌های RBD کروناویروس در سیستم‌های قارچی مانند پیشیا پاستوریس<sup>۱</sup> هم پتانسیل ایمنی‌زایی را نشان داده است، اما بهره‌وری به مراتب کمتر از آن چیزی است که سیستم‌های مخمری برای سایر پروتئین‌های نو ترکیب قادر به انجام آن هستند [۱۲۷].

با توجه به بیان موفقیت آمیز پروتئین‌های نو ترکیب در سیستم پروکاریوتی در مطالعات قبلی و همچنین امکانات موجود، بنابراین استفاده از این میزبان مبنای کار ما برای تولید پروتئین نو ترکیب قرار گرفت. نتایج ما نشان داد هر سه پروتئین در میزبان باکتریایی به خوبی بیان می‌شوند. میانگین بیان هر سه پروتئین تقریباً حدود ۳۵-۴۰ میلی گرم در لیتر بود که نتایج تحقیقات قبلی را تأیید می‌نماید. هم‌چنین نتایج ما نشان می‌دهد که هر سه پروتئین نو ترکیب انتخاب شده از پروتئین سنبله بویژه RBD دارای کارایی از جمله: خاصیت ایمنی‌زایی، خاصیت خنثی سازی ویروس و..... است. هم‌چنین این پروتئین‌ها قابلیت استفاده در تشخیص پادتن سرم بیماران مبتلا به کووید-۱۹ را در تست های تشخیصی دارا هستند. اگرچه ساختار مناسبی که توسط سیستم یوکاریوتی ایجاد می‌گردد، بدون شک دارای کارایی بالاتری به منظور استفاده در تشخیص و تولید واکسن هست؛ اما اعتقاد ما بر این است که با توجه به تمام موارد ذکر شده از جمله هزینه، زمان، مشکلات تولید و در مجموع با توجه به نتایج بدست آمده، می‌توان گفت سیستم پروکاریوتی انتخاب مناسبی برای تولید با حجم بالا در زمان کوتاه و مقرون به صرفه می‌باشد.

## • عدم تغییرات پس از ترجمه در باکتری

### - پیوند گلیکوزیدی

یکی از معیارهای محدود کننده انتخاب میزبان پروکاریوتی، عدم تغییرات پس از ترجمه مانند گلیکوزیلاسیون، تشکیل پیوند دی سولفیدی و .... در این میزبان می‌باشد. مطالعات نشان داده که در بخش RBD، اسید آمینه‌های سرین (۳۶۶، ۵۱۴، ۴۴۳، ۴۳۸، ۳۷۶، ۳۷۵، ۳۷۲، ۳۷۱) و سرین (۵۲۳، ۳۷۶، ۳۳۳) دارای پیوند O-گلیکوزیدی و اسید آمینه آسپارژین (۳۳۱، ۳۳۴، ۳۴۳) دارای پیوند N-گلیکوزیدی می‌باشد [۱۲۸]. بنابراین در انتخاب توالی مورد نظر تا جایی که ممکن بود و به ساختار اصلی پروتئین آسیب وارد نشود، از انتخاب اسید آمینه‌های دارای پیوند گلیکوزیله صرف نظر شد. به عنوان مثال، در بخش انتخاب شده از RBD پیوند N گلیکوزیدی وجود ندارد و تا جای ممکن از انتخاب نواحی دارای پیوند O-گلیکوزیدی صرف نظر گردید. هرچند نمی‌توان گفت این چشم پوشی از نواحی گلیکوزیله یا حتی انتخاب این نواحی در میزبان باکتریایی، اثری بر ایمنی زایی نداشته است اما نتایج یک مطالعه به وسیله یک روش اتصال

<sup>1</sup> Pichia pastoris

تداخل سنجی نشان داد، اگرچه مکان‌های قندی شدن آسپارژین (۱۶۵،۲۳۴،۳۴۳) نزدیک به مکان‌های اتصال گیرنده در پروتئین S سارس کوو-۲ قابل مشاهده است، اما ACE2 به اکتودومین‌های قندی شده (گلیکوزیله) و قندی نشده (غیرگلیکوزیله) S با میل ترکیبی تقریباً یکسان (۱،۷ و ۱،۵ Nm) متصل می‌گردد. این مشاهدات اثبات می‌کند که میل اتصال بالا بین پروتئین S سارس کوو-۲ و ACE2 به قندی شدن پروتئین S بستگی ندارد. در همین راستا در مطالعه دیگری با استفاده از مطالعات پویا (دینامیک) مولکولی نشان داده شد دو اسید آمینه قندی شده در بخش RBD (۳۴۳/۳۳۱) در اتصال به ACE2 نقش مهمی ندارند که تأیید کننده مطالعه قبل بود [۱۲۹].

در مطالعه دیگر نشان داده شد با توجه به اتصال ویروس به میزبان، قندهای (گلیکان‌های) سطح پروتئین‌های ویروس می‌تواند نقش دوگانه متضادی (متناقض) ایجاد نمایند. از یک طرف شناسایی پادتن را تسهیل می‌کند و شبیه اپی توپ‌ها عمل می‌نماید. از طرف دیگر ممکن است نواحی اپی توپیک را بر روی پروتئین‌های ویروس بپوشانند و بنابراین مانع تولید پادتن دارای کارایی گردند [۱۳۰-۱۳۲]. با توجه به این موضوع، بنابراین فقدان قندی شدن در پروتئین‌های بیان شده در باکتری اشرشیا اکلای می‌تواند به عنوان یک اشکال برای این سیستم در تولید پروتئین نوترکیب در نظر گرفته شود. اما در مطالعه دیگری با در نظر گرفتن اشکال ذکر شده، بازهم تولید پادتن بر اثر تزریق RBD و N را در سطح کافی و رضایت بخش گزارش داده است بنابراین با توجه به نتایج این مطالعات، سیستم پروکاریوتی انتخاب و تا حد ممکن از انتخاب مناطق قندی شده صرف نظر شد. نتایج ما نشان داد پروتئین RBD، به خوبی به گیرنده ACE2 متصل می‌شود. بنابراین می‌توان نتایج مطالعات قبلی مبنی بر تأثیر کم جایگاه‌های قندی شده بر اتصال RBD-ACE2 را تأیید نمود [۱۲۲].

## • پیوند دی سولفیدی

پیوند دی سولفیدی به طور طبیعی در سیتوپلاسم باکتری تشکیل نمی‌شود. پیوندهای دی سولفیدی که به صورت لحظه‌ای در سیتوپلاسم باکتری شکل می‌گیرند، توسط حداقل ۵ پروتئین تیوردوکسین ۱ و ۲، گلو تاردوکسین ۳، ۲، ۱ احیا می‌گردند. با نقص در این پروتئین‌ها می‌توان شرایط احیایی سیتوپلاسم را تغییر داده و باعث اکسیداسیون تیول‌ها و جفت شدن سیستم‌ها به هم گردید. مطالعات نشان داده است حضور ملازم‌ها (چاپرون‌ها) و DSbA/B در پروکاریوت‌ها باعث تشکیل پیوند دی سولفیدی می‌شود [۱۳۳]. در مطالعه ما نشان داده شد، زمانی که پروتئین توسط بافر رنگ احیایی و غیر احیایی مخلوط و الکتروفورز می‌گردد، الگوی متفاوتی بر روی ژل SDS-PAGE دیده می‌شود. به عنوان مثال، پروتئین ۱ در حضور بافر رنگ احیا، باندی معادل حدود ۱۰ کیلودالتون در الگوی الکتروفورز داشت در حالیکه در زمان استفاده از بافر رنگ غیر احیا، چندین باند به صورت اسمیر بر روی ژل نمایان می‌گشت که هر کدام با اختلاف ۱۰، ۲۰ و ۳۰... کیلو دالتون دیده می‌شد. تفسیر ما این بود که در شرایط اکسید، سیستم‌های آزاد یک پروتئین به سیستم‌های آزاد پروتئین دیگر متصل شده و پیوندهای دی سولفیدی

تشکیل شده است. در صورتیکه در زمان تولید پروتئین در سیتوپلاسم شرایط احیایی وجود دارد و از تشکیل پیوندهای دی سولفیدی جلوگیری می‌کند.

## • اتصال ACE2- RBD

روند تحقیقات در مورد اتصال ویروس به گیرنده در دو بعد داده های زیستی (بیوانفورماتیک) و آزمایشگاهی انجام شده است. مطالعات مبتنی بر داده های زیستی بر اساس پویایی مولکولی نشان داد که اسید آمینه های گلوتامین ۴۹۳، تیروزین ۴۹۵، فنیل آلانین ۴۸۶، تیروزین ۴۴۹، اسپارژین ۵۰۱، گلوتامین ۴۹۸، اسپارژین ۴۸۷، تیروزین ۵۰۵، لیزین ۴۱۷، تیروزین ۴۸۹، فنیل آلانین ۴۵۶ و لوسین ۴۵۵ نقاط مهم<sup>۱</sup> در بخش RBD سارس کوو-۲ هستند که با اسید آمینه های هیستیدین ۳۴، اسپارتیک اسید ۳۵۵، اسپارتیک اسید ۳۰، لیزین ۳۱، لیزین ۳۵۳، اسپارتیک اسید ۳۸، گلوتامین ۲۴، گلوتامیک اسید ۳۵، تیروزین ۴۱، تیروزین ۸۳، ترئونین ۲۷ در بخش ACE2 در ارتباط هستند. واکنش های آبدوستی (هیدروفوب) و الکترواستاتیک مهم ترین نیروهای حرکتی در اتصال اسید آمینه ها به یکدیگر می باشند. در این مطالعات تاکید شده که فنیل آلانین ۴۵۶، گلوتامین ۴۹۸، اسپارژین ۵۰۱، گلوتامین ۴۹۳، فنیل آلانین ۴۸۶، لیزین ۴۱۷ در بخش RBD رزیدوهای کلیدی مسئول در اتصال محکم سارس کوو-۲ به ACE2 در مقایسه با سارس کوو است. این بخش از توالی سنبله نیز در بخش RBD ما انتخاب شده است [۶۰]. نتایج مطالعات DFT<sup>۲</sup> نشان می دهد در گلايسين ۵۰۲، گلايسين ۴۴۶، گلايسين ۴۹۶، ترئونین ۵۰۰، تیروزین ۴۴۹، گلوتامین ۴۹۳، اسپارژین ۴۸۷ در بخش RBD از طریق اسید آمینه های اسپارتیک اسید ۳۸، لیزین ۳۵۳، گلوتامین ۴۲، تیروزین ۴۱، هیستیدین ۳۴، گلوتامین ۲۴ و گلوتامیک اسید ۳۵ در بخش ACE2 با پیوند هیدروژنی بهم متصل می شوند [۶۰].

مطالعه دیگری نشان داد که ۴ رزیدو در بخش RBM از سارس کوو-۲ (اسید آمینه ۴۸۲-۴۸۵: G-V-E) اتصال مناسبی با بخش N ترمینال هلیکس ACE2 دارند. داده های بیوشیمیایی بر این موضوع تاکید دارند که ویژگی های ساختاری و اسید آمینه های تغییر کرده تمایل اتصال ویروس سارس کوو-۲ به گیرنده را نسبت به سارس کوو قوی تر نموده است [۱۳۴، ۱۳۵].

در مطالعات آزمایشگاهی ساختار پروتئین RBD تولید شده در باکتری، با RBD بیان شده در سلول HEK2 مقایسه شده است. نتایج نشان دهنده این مطلب بود که ساختار دوم و سوم پروتئین های پروکاریوتی بسیار محافظت شده بوده و در نتیجه می توانند با ACE2، اتصالی قوی برقرار کنند. یافته های آزمایشگاهی تاکید می کنند که عدم توانایی قندی سازی در پروتئین در باکتری ها به صورت جزیی بر اتصال به ACE2 اثر گذار است [۱۳۶]. در مطالعه دیگر و موازی، RBD توسط سه سیستم بیانی با HEK، مخمر و اشیریشیا اکلای تولید شد. نتایج به توانایی سیستم بیانی باکتریایی در تولید پروتئین هایی با ویژگی بالا و قابلیت تشخیص پادتن اشاره داشت [۱۳۶]. مطالعات ما نیز این تحقیقات را تأیید می نماید؛

<sup>1</sup> hot spot

<sup>2</sup> Density functional theory; DFT

زیرا نتایج ما در دو بخش لنگر اندازی (داکینگ) مولکولی و فلوسایتومتری موید این اتصال بود. در بخش مولکولی نتایج حاکی از اتصال قوی بین RBD نوترکیب به گیرنده ACE2 بود. همچنین نتایج آزمایشگاهی ما در بخش فلوسایتومتری همراستا با نتایج داکینگ مولکولی نشان داد که پروتئین نوترکیب از بخش RBD، به صورت معنادار و چشمگیری به گیرنده ACE2 در سطح سلول  $\text{CaCO}_2$  (به عنوان گیرنده مثبت) در مقایسه با سلول K562 (به عنوان گیرنده منفی) متصل شده است. البته شاید یک مطالعه مقایسه‌ای توسط پروتئین‌های بیان شده در دو سیستم یوکاریوتی و پروکاریوتی بتواند اتصال پروتئین‌های تولید شده در هر دو میزبان و اتصال آن‌ها به گیرنده ACE2 چه بر سطح سلول یا به صورت نوترکیب را بهتر بررسی کند.

### • تحریک سیستم ایمنی سلولی و هومورال

در سال‌های اخیر به اثبات رسیده است که استفاده از واکسن‌های نوترکیب بر مبنای پروتئین S، به ویژه RBD، توانایی تحریک پاسخ ایمنی هومورال (تولید تیترا بالای پادتن خنثی ساز) و همچنین تحریک ایمنی سلولی (اپی توپ‌های سلول  $\text{CD4}^+ \text{T}$ ,  $\text{CD8}^+ \text{T}$ ) را در مدل‌های چالش شده و مطالعات بالینی دارا است. البته اختلاف نظرهایی در جزئیات وجود دارد؛ اما به صورت کلی این موضوع پذیرفته شده است [۱۳۷]. در مطالعه امیر قائمی و همکاران نشان داده شد که تزریق مخلوط RBD + N نوترکیب به همراه ادجوانت ساپونین به موش‌ها، باعث ایجاد تیترا بالای IgG می‌گردد. این افزایش تیترا پادتن در ۱۴ روز بعد از تزریق اول دیده شد که نتایج ما نیز موید درستی مطلب هست. البته ما این افزایش تیترا پادتن را به صورت انحصاری با تزریق پروتئین RBD و همیار آلوم و فروند دیدیم. در آن مطالعه، ۹ هفته بعد نیز تیترا پادتن اندازه‌گیری و هم‌چنان بالا اعلام گردید [۱۲۲]. در تحقیق ما، ۸۰ هفته بعد از تزریق به موش‌ها، هم‌چنان تیترا پادتن به صورت معناداری بالاتر از گروه کنترل بود. نتایج تحقیق ما موید این مطلب می‌باشد که پادتن، ماندگاری بالایی دارد. بر اساس تست VNT، پادتن‌های موجود در سرم حیواناتی که به وسیله‌ی هر سه گروه پروتئینی ایمن گردیده‌اند دارای خاصیت خنثی‌سازی ویروس می‌باشند. هم‌چنین، در رقت‌های بالاتر از سرم که به آن پروتئین RBD تزریق شده بود (۱/۱۰۰)، هم‌چنان خاصیت خنثی‌سازی مشاهده گردید. نکته قابل توجه در مطالعه ذکر شده این است که نقش RBD در تحریک سیستم ایمنی با ماندگاری بالا، کمتر از N پروتئین گزارش شده است. این در حالی است که نتایج ما نشان داد RBD به تنهایی توانسته بود سیستم ایمنی را به مدت طولانی با ویژگی خنثی ساز تحریک کند [۱۲۲].

هم‌چنین در مطالعه قائمی مشخص گردید که علی‌رغم اطلاعات به دست آمده در مورد توانایی بالاتر پروتئین N (نسبت به RBD) در تحریک سیستم ایمنی با ماندگاری بالا، تزریق پروتئین N به تنهایی نمی‌تواند در تولید پادتن خنثی ساز نقشی داشته باشد. راهکار این گروه برای ایجاد هر دو ویژگی (تحریک سیستم ایمنی هومورال و سلولی) در واکسن، ترکیب RBD + N بود و در نهایت توانستند با ترکیب دو بخش پاسخ ایمنی را ایجاد کنند [۱۲۲]. البته سوالی که پیش می‌آید اینست که با توجه به

نتایج بدست آمده به چه دلیلی نقش N پروتئین را نسبت به RBD در تولید پادتن خنثی ساز بیشتر می‌دانند؟

در مطالعه دیگر همراستا با نتایج مطالعات قبل، به نقش RBD در تولید ۴۸٫۷٪ پادتن خنثی ساز در سرم موش تزریق شده، اشاره دارد. همچنین مطالعات فراوانی به نقش مهم واکنش‌های نوترکیب مبتنی بر RBD در تولید موفق پادتن خنثی ساز در جوندگان بدون ایجاد ADE اشاره کرده‌اند [۱۱۵].

جیا و همکاران در سال ۲۰۲۲ در مقاله ای در حوزه واکنش، پادتن‌های تولید شده بر علیه سارس کوو-۲ را به دو گروه پادتن اتصال دهنده<sup>۱</sup> و پادتن خنثی ساز<sup>۲</sup> تقسیم نمودند. در این مقاله ذکر گردید که سطح هر دو پادتن، مرتبط با کارایی واکنش بر علیه ویروس سارس کوو-۲ می‌باشد. این ارتباط قوی میان دو پادتن در سویه اومیکرون نیز مشاهده شده است. بنابراین اگر پادتن تولید شود که خاصیت اتصال به ویروس را داشته باشد، درصد تولید پادتن خنثی‌ساز نیز بالا می‌رود. این نکته دقیقاً به مطالعه قبل اشاره دارد که پروتئین N ممکن است نقش بیشتری در تولید پادتن داشته باشد [۱۲۰]؛ اما می‌توان گفت بیشتر پادتن تولید شده از نوع اتصال دهنده می‌باشد و خاصیت خنثی سازی کمتری دارند. به اثبات رسیده است واکنشی دارای کارایی است که باعث تولید پادتن خنثی ساز بر علیه ویروس باشد. در برخی افراد ممکن است پادتن با تیترا بالایی تولید گردد اما این پادتن خاصیت خنثی سازی ویروس را نداشته باشد. شایان ذکر است که پروتئین سنبله نقش مهمی در تولید پادتن خنثی ساز دارد اما انتخاب جایگاه آن، به ویژه RBD بسیار مهم است.

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱، گری بایسا و همکاران به بررسی تحریک سیستم ایمنی توسط واکنش نوترکیب بر پایه پروتئین سنبله پرداختند. در این مطالعه ابتدا دو پروتئین بر پایه NTD (۳۰۹-۱۶) و CTD (۳۱۹-۵۴۱) از ناحیه سنبله به صورت متصل با بخش FC از IgG1 جداگانه بیان شده و تزریق شدند. نتایج نشان داد که در هر دو گروه پادتن به خوبی القا و حتی یک دوز هم ممکن است کافی باشد. در این تحقیق به ۳ گروه موش تزریق شد (NTD, CTD, NTD/CTD) و به این نتیجه رسیدند که گروه NTD دارای تیترا پادتن ۱\*۱۰<sup>۴</sup> و کمتر بود در حالیکه در دو گروه دیگر عیار (تیترا) پادتن بالاتر و ۱\*۱۰<sup>۵</sup> می‌باشد. در نهایت اثبات گردید که بخش RBD توانسته بود پادتن خنثی ساز قوی‌تر با ماندگاری طولانی تا ۲۰ هفته بعد از تزریق اول ایجاد کند. نتایج ما نیز همراستا با این مطالعه نشان داد که بخش P<sub>1</sub> (RBD) می‌تواند سیستم ایمنی هومورال را با تولید پادتن خنثی ساز بیشتر و سریعتری نسبت به بخش‌های دیگر P<sub>3</sub>(CS) و P<sub>2</sub>(FP) بدون وجود عارضه ای در بافت‌های بدن موش، خرگوش و خوکچه هندی تزریق شده تحریک کند [۱۱۸].

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۲، ویژگی‌های یک نوع واکنش mRNA بر علیه سویه دلتا سارس کوو-۲ را با واکنش پروتئین نوترکیب مقایسه نمودند. اگرچه هر دو نوع واکنش، می‌توانند افراد را از ابتلا به ویروس

<sup>1</sup> Binding Antibody

<sup>2</sup> Neutralizing Antibody

محافظت کنند اما در میزان تحریک سیستم ایمنی هومورال و سلولی با یکدیگر تفاوت هایی داشته که هنوز هم دلیل آن به وضوح مشخص نشده است. در این مطالعه نشان داده شد که تزریق دو دوز واکسن mRNA باعث القای تیتر بالای پادتن خنثی ساز و همچنین تحریک قوی پاسخ ایمنی سلول های T می گردد. اگرچه در این مطالعه به برتری واکسن mRNA در مقابل واکسن های نو ترکیب اشاره شده است؛ اما نمی توان از ناپایداری این نوع واکسن ها نیز چشم پوشی کرد. از جمله شرایط نگهداری واکسن -های mRNA، ذخیره سازی در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد است که حمل و نقل واکسن را مشکل می سازد [۱۳۸]. در برخی از مطالعات، تست پایداری برای این نوع واکسن ها انجام و نتایج نشان داده که تا سه هفته بعد از تولید و نگهداری در دمای ۴ درجه، واکسن ها دارای کارایی می باشند. مقایسه این دو نوع مدل واکسن نشان داد که هر دو نوع، قادر به القای تولید IgG اختصاصی بر علیه سارس کوو-۲ و ایجاد پادتن خنثی کننده بعد از تزریق اول می باشند. همچنین پس از تزریق دوم، تیتر پادتن به مقدار بالا در هر دو گروه افزایش می یابد که این مطلب در مطالعه ما و گذشته تائید شده است. در این مطالعه نشان داده شد که ۲۱ روز بعد از تزریق واکسن پروتئین نو ترکیب تیتر پادتن به اوج خود می رسد در حالیکه در گروه mRNA این افزایش تیتر ۳۵ روز بعد از تزریق اول است. YixinWu و همکاران به این نتیجه رسیدند که واکسن های بر مبنای پروتئین نو ترکیب می توانند پاسخ سیستم ایمنی هومورال را سریع تر از واکسن های mRNA تحریک کنند [۱۳۸].

در مطالعه ای که در سال ۲۰۲۱ توسط GRAY و همکاران انجام شد به بررسی اثر مهاری پادتن تولید شده در اتصال RBD به ACE2 پرداخته شده است. در این مطالعه از ACE2 نو ترکیب و همچنین یک پادتن تک دودمانی (مونوکلونال) بر علیه RBD به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است. همانطور که انتظار می رفت نتایج نشان داد که پادتن تولید شده بر اتصال RBD به ACE2، اثر مهاری داشته و اتصال را به صورت چشمگیری کاهش داده است [۱۱۸]. در کار مشابه دیگر نیز پادتن های تولید شده بر اثر تزریق واکسن RBD، از اتصال پروتئین به گیرنده به میزان ۲۰ تا ۴۰ درصد جلوگیری کرده بود [۱۱۵].

نتایج گزارش فلوسایتومتری ما این توانایی مهار اتصال RBD به ACE2 توسط پادتن های تولید شده در سلول های Caco<sub>2</sub> (به عنوان گیرنده مثبت) و K562 (به عنوان گیرنده منفی) را اثبات نمود. در مطالعات ما، آزمایش های دیگری نیز انجام شد که از جمله آن ها می توان به بررسی اتصال ویروس به گیرنده، اثر مهاری پادتن تولید شده بر علیه RBD نو ترکیب اشاره نمود. نتایج ما نشان داد، ویروس سارس کوو-۲ به تنهایی حدوداً ۵۰٪ توانایی اتصال به گیرنده دارد؛ اما در زمان انکوباسیون با پادتن خنثی ساز می تواند ۱۳٪ اتصال ویروس به گیرنده را کاهش دهد. بنابراین به اثبات رسید که پادتن های تولید شده توانایی مهار اتصال سارس کوو-۲ به گیرنده ACE2 را دارند.

علاوه بر سیستم ایمنی هومورال، تحریک ایمنی سلولی نیز از اهمیت ویژه ای برخوردار هست. اکثر مطالعات برای تائید یک واکسن با کارایی بالا، تحریک هر دو سیستم ایمنی را مد نظر قرار داده و آن را به عنوان معیار رد یا قبول واکسن در نظر می گیرند. آن ها معتقدند پاسخ ایمنی سلولی نسبت به پاسخ

ایمنی هومورال ماندگاری طولانی تری در افراد بهبود یافته دارد [۱۳۹]. در بررسی واکسن‌ها نشان داده شد که واکسن‌های mRNA در تحریک سیستم ایمنی سلولی موفق‌تر عمل می‌نمایند. در حالی که واکسن‌های پروتئینی در تحریک سیستم ایمنی هومورال نسبت به ایمنی سلولی موفق‌تر هستند. شاید بتوان دلیل این اختلاف در تحریک سیستم ایمنی را اینگونه تفسیر کرد که در واکسن‌های پروتئینی، پروتئین‌های آنتی‌ژن در وزیکول‌های اندوسیتومی محصور هستند و توسط ملکول‌های MHC-II به سلول‌های CD4 Th ارائه می‌شود؛ اما در گروه واکسن mRNA، پس از آلوده سازی (ترانسفکت شدن) سلول‌های بیان کننده آنتی‌ژن از طریق اندوسیتوز، پروتئین‌ها در سیتوزول سلولی ترجمه و پردازش می‌شوند و به این ترتیب علاوه بر مسیر MHC-II، می‌توانند مسیر MHC-I را نیز فعال کنند که این امر منجر به پاسخ‌های قوی سلول‌های CD4<sup>+</sup> T و CD8<sup>+</sup> T می‌شوند. در تحقیقات به این موضوع اذعان شده است که هر دو نوع واکسن به شدت ایمنی‌زا می‌باشند؛ اما در مجموع علی‌رغم افزایش تیتراژ سریع‌تر پادتن در گروه پروتئین نو ترکیب، واکسن mRNA را به دلیل تحریک همزمان پاسخ هر دو ایمنی مناسب‌تر دانسته اند. به نظر می‌رسد مقایسه این نوع پادتن در هر دو گروه در چالش با ویروس بتواند نتایج را بهتر نمایان کند [۱۳۸، ۱۴۰، ۱۴۱]. تحقیق دیگری نشان داده است که پروتئین سنبله، یک هدف مهم سلول‌های CD4 است؛ در حالیکه CD8 کمتر از CD4 توسط عفونت سارس کوو-۲ القا تحریک می‌شود [۱۱۳].

برخلاف این مطالعات، نتایج تست ایمنووهیستوشیمی ما نشان داد که تزریق پروتئین نو ترکیب توانسته (در مطالعات بر روی موش‌هایی که برای دوز- پاسخ انتخاب شده بودند) سیستم ایمنی سلولی را نیز به خوبی تحریک کند. همچنین، بر اساس تفسیر آسیب شناس (پاتولوژیست) و نرم افزار Image J از بافت ریه، بیان معناداری در سطح سلول‌های CD4 (۲۸،۴٪) و CD8 (۳۵،۵٪) نسبت به گروه کنترل وجود دارد. علت انتخاب بافت ریه، به این دلیل می‌باشد که بیشترین آسیب در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ در این بافت بوده و باعث افزایش آمار مرگ و میر می‌شود. بنابراین ما تحریک ایمنی سلولی در بافت ریه را به عنوان یکی از اهداف مهم ویروس کرونا مورد مطالعه قرار دادیم.

البته گروه دیگری از محققان تحریک سیستم ایمنی سلولی را به عنوان شاخص اصلی کارایی واکسن در نظر نمی‌گیرند و معتقدند که سلول‌های T می‌توانند به ایمنی وابسته به واکسن بر علیه کووید-۱۹ مرتبط باشند، اگرچه این موضوع به اثبات نرسیده است [۱۴۲]. در سال ۲۰۲۱ فلور و همکارانش به نقش حمایتی سلول‌های T اشاره کرده‌اند. با توجه به کاهش سریع IgM بعد از ابتلا به کووید-۱۹، IgG به عنوان عامل محافظت کننده در برابر ابتلای مجدد می‌تواند تا ۶ ماه پایدار باشد. این محققان به این نتیجه رسیدند که تحریک پاسخ ایمنی سلولی (سلول T) می‌تواند نقش مهمی در پایداری پادتن و کنترل ابتلای مجدد به سارس کوو-۲ ایفا کند [۱۴۲].

در تحقیقی به نقش سلول‌های CD4<sup>+</sup>T در پاسخ قوی پادتن خنثی کننده اشاره کرده و آن را یک سازوکار احتمالی از حفاظت ایجاد شده بوسیله واکسن دانست. همچنین نشان دادند که پاسخ‌های سلول‌های CD4<sup>+</sup>T و CD8<sup>+</sup>T نقش بیشتری در تعدیل شدت بیماری نسبت به پیشگیری از عفونت‌های بدون علامت یا خفیف دارند. نقش سلول‌های T ممکن است در غیاب پادتن خنثی ساز کافی برجسته‌تر

شود، مانند زمانی که عیار (تیتراژ) کلی پادتن پایین است و یا زمانی که با انواعی از جهش در اپی توپ‌های پادتن خنثی ساز مواجه می‌شویم [۱۱۹]. برای مثال، زمانی که پادتن‌های خنثی ساز در آزمایش مدرنا کمتر از سطح تشخیص بود، ۸،۵۰٪ کارایی واکسن مشاهده شد. به همین ترتیب، واکسن اسپوتنیک وی در یک کارآزمایی بالینی در آفریقای جنوبی ۵۲٪ محافظت کننده بود.

در مقابل، نتایج مطالعات دیگر حاکی از آن است که کاهش سلول‌های CD8<sup>+</sup> T در پستانداران در حال نقاهت قبل از مبارزه مجدد با سارس کوو-۲ تنها تا حدی حفاظت را لغو کرده و در انسان، نوواوکس اثر بالینی ۸۶،۳٪ در برابر آلفا (B.1.1.7) و ۵۰٪ در برابر بتا را گزارش کرده است.

سینوواک، سینوفارم و بهارات نیز اثربخشی بالینی را بدون برانگیختن پاسخ‌های قابل توجه CD8<sup>+</sup> T گزارش کرده‌اند. نوواوکس اثربخشی بالینی ۸۶،۳٪ را در برابر سویه آلفا (B.1.1.7) و ۵۰٪ در برابر سویه بتا (B.1.351) در غیاب هر گونه پاسخ برجسته CD8<sup>+</sup>T را نشان داده است [۱۱۹]. بنابراین، پاسخ سلول CD8<sup>+</sup>T ممکن است مفید باشد، اما برای محافظت مطلقاً مورد نیاز نیست!

RBD حاوی اپی توپ‌های ایمنی زای غالب (ایمونودومینانت) سلول T با ایمنی غالب کمتری نسبت به پروتئین S با طول کامل است. علیرغم این واقعیت، شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد تعداد کافی اپی توپ سلول T توسط RBD، پاسخ‌های CD4 مناسب با سطوح بالا از عملکرد پادتن خنثی ساز را ارائه می‌کند. البته در مطالعات ما تحریک نسبتاً یکسانی در CD4 و CD8 مشاهده شد. شناسایی چندین اپی توپ سلول T مشترک CD4 در RBD به طور مستقل با استفاده از روش‌های مختلف نقشه برداری اپی توپ سلول T تأیید شده است. مطالعات بالینی با آنتی‌ژن‌های RBD این ادعا را تأیید می‌کند که سلول‌های T پس از ایمن سازی به حفاظت کمک می‌نمایند [۱۱۹].

ایمن سازی با یک نامزد واکسن mRNA که RBD را کدگذاری می‌کند، القای عیار (تیتراژ) پادتن خنثی ساز را از ۰،۷ برابر (دوز ۱ میکروگرم) تا ۴،۶ برابر (دوز ۳۰ میکروگرم) بالاتر از گروه کنترل نشان داد. شایان ذکر است القای عیارهای (تیتراژهای) قوی پادتن خنثی ساز توسط RBD، تنها مختص مدل‌های mRNA نبود، بلکه یک واکسن دایمر RBD زیرواحد پروتئینی که با آلوم تجویز شده نیز به طور مشابه قادر به ایجاد پاسخ پادتن خنثی ساز در انسان بود.

به طور خلاصه، داده‌های مربوط به پاسخ‌های ایمنی ناشی از عفونت و واکسیناسیون با پروتئین S یا آنتی‌ژن RBD شواهدی را ارائه می‌نمایند که نشان می‌دهد واکسن قوی براساس RBD از سلول‌های T کمک دریافت می‌کند [۱۱۹].

در مقاله‌ای به بررسی اثر ۴ نوع واکسن در تحریک سیستم ایمنی پرداخته شده است. در این مطالعه فاکتورهای IgG, nAb, CD4, CD8, cTfh, MBCS را در تمامی گروه‌ها به مدت ۶ ماه ارزیابی نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که اگرچه تمامی واکسن‌ها توانسته بودند پاسخ سلول‌های CD4 را تحریک نمایند، اما واکسن مدرنا و نوواوکس (پروتئین نو ترکیب) اثر بیشتری در تحریک سلول‌های T و مارکرهای cTfh و CD4 نشان داده بودند. واکسن مدرنا و اسپوتنیک وی (آدنوویروس) به صورت یکسانی توانسته بودند



سلول‌های CD8 را القا کنند. اگرچه در ۶۰ تا ۷۰ درصد افراد در ۶ ماه قابل مقایسه بود، اما واکسن مدرنا کاهش قابل توجهی در پادتن را نشان داد [۱۴۳]. در این مطالعه نشان داده شد واکسن نوواکس در ۱۰۰ درصد از افراد ایمن شده باعث القا CD4 شده و همچنین در این افراد سلول‌های cTfh نیز به خوبی تحریک شده بودند. پاسخ سلول‌های CD4T حافظه قابل مقایسه با واکسن مدرنا بود. ۶ ماه بعد نیز این فاکتورها پایدار بودند. سلول‌های حافظه CD4 ویژه سنبله در ۶ ماه بعد از واکسن مدرنا و نوواکس به صورت چشم‌گیری بالاتر از افراد بهبود یافته بودند. در حالیکه در گروه واکسن فایزر و اسپوتنیک وی از افراد مبتلا تفاوت چشم‌گیری نداشت. فراوانی سلول‌های حافظه cTfh بین ۴ گروه با افراد مبتلا یکسان بود. در این مقایسه نشان داده شد که واکسن نوواکس توانسته بود نتایج قابل قبولی در تحریک سیستم ایمنی بدست آورد. در مورد سلول‌های CD8 غیر از واکسن نوواکس هر سه واکسن دیگر، نتایج یکسان و قابل قبولی داشتند اما واکسن نوواکس توانسته بود در حدود ۱۰ تا ۵۰ درصد افراد، پاسخ سلول‌های CD8 را هرچند به مقدار کم اما به صورت قابل تشخیص برانگیخته نماید. در نهایت این مطالعه نشان داد با توجه به تمام ارزیابی‌ها، واکسن مدرنا ایمن‌ترین واکسن با سطح بالاتر یا برابر با اسپوتنیک وی و نوواکس می‌باشد [۱۴۳].

در این مطالعه بعد از ۶ ماه عیار پادتن خنثی ساز به ترتیب زیر گزارش شد:

مدرنا، فایزر، نوواکس < اسپوتنیک وی

در اینجا نشان داده شد عیار پادتن خنثی کننده برای واکسن اسپوتنیک وی کمی پایین‌تر از سه واکسن دیگر می‌باشد میزان تحریک سلول‌های CD4 نیز به ترتیب زیر بود:

مدرنا < فایزر، نوواکس < اسپوتنیک وی

به دلیل تنوع زیاد در روش سنجش سلول T و داده‌های حاصل، مقایسه مطالعات متقابل پاسخ‌های سلول T اگر نگوئیم غیرممکن اما دشوار است. درک کامل اثر مدل‌های واکسن و آنتی‌ژن بر پاسخ سلول‌های CD4<sup>+</sup>T و CD8<sup>+</sup>T به جمع‌آوری و سنجش سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی استاندارد شده نیاز دارد، همانطور که در شبکه پیشگیری کوید-۱۹ و کارآزمایی COVE ایجاد شد، مقایسه قابل تفسیر ایمنی سلولی ناشی از تزریق واکسن در طول سال انتظار می‌رود [۱۴۳].

در یک مقاله به نقش سلول‌های CD8<sup>+</sup>T در پاکسازی عفونت‌های ویروسی اشاره شد و پیش بینی شد که ایمنی سلولی به طور قابل توجهی به محافظت واکسن در برابر بیماری شدید سارس کوو-۲ کمک کند. این ممکن است به ویژه برای سویه امیکرون مرتبط باشد، که به طور چشمگیری از پاسخ‌های پادتن خنثی کننده طفره می‌رود [۷۰]. مطالعات اخیر نشان داده است که اسپوتنیک وی و فایزر به ترتیب ۸۵٪ و ۷۰٪ در برابر بستری شدن در بیمارستان به دلیل نوع امیکرون در آفریقای جنوبی محافظت می‌کنند. بنابراین نتیجه گرفتند این داده‌ها زمینه ایمنولوژیک را برای مشاهده این موضوع فراهم می‌نماید که واکسن‌های فعلی با وجود کاهش قابل ملاحظه پاسخ‌های پادتن خنثی کننده در زمان

طولانی، هم‌چنان محافظت قوی در برابر بیماری‌های شدید ناشی از نوع سارس کوو-۲ سویه امیکرون ارائه می‌کنند. در مطالعه ما این تحریک سلول‌های  $CD4^+T$  و  $CD8^+T$  به صورت معناداری نسبت به گروه کنترل دیده شد؛ هرچند این افزایش تحریک به خودی خود قابل قبول بود، اما با مطالعات تکمیلی انواع مدل‌های واکسن می‌توان اعتبار این نتایج را، راستی آزمایی کرد [۱۴۴].

با این حال، توسعه بالینی واکسن به شدت بر پاسخ پادتن متمرکز بوده و تا حد زیادی پاسخ سلولی نادیده گرفته می‌شود. در حالی که این تمرکز محدودتر ممکن است گسترش واکسن‌ها را تسریع کرده باشد. اما شکاف‌های قابل توجهی در درک ما از چگونگی توسعه حفاظت قوی و طولانی مدت ایجاد کرده است. قطعاً با گذشت زمان و تحقیقات بیشتر در آینده میتوان قضاوت عادلانه تری برای مقایسه کارایی واکسن‌های سنتی و جدید داشت. در نتیجه ما در این مطالعه به نتایج زیر دست یافتیم :

- ۱- تولید سه پروتئین نوترکیب در زمان کوتاه ، با هزینه کم و حجم بالا
  - ۲- عاری از اندوتوکسین
  - ۳- دارای حساسیت و اختصاصیت
  - ۴- تحریک کننده سیستم ایمنی هومورال
  - ۵- تولید پادتن خنثی ساز
  - ۶- تحریک کننده سیستم ایمنی سلولی
  - ۷- دارای عدم هرگونه عوارض جانبی
  - ۸- قابلیت اتصال پادکن نوترکیب به گیرنده ACE2 و اثر مهاری براتصال ویروس به گیرنده ACE2
  - ۹- استفاده از پادکن نوترکیب در کیت تشخیصی
-

## ❖ در پایان لازم میدانم چند نکته را بیان کنم:

با شیوع سارس کوو-۲ در بهمن ماه سال ۱۳۹۸ در ایران و با توجه به قدرت سرایت ویروس و آمار بالای مرگ و میر، موجی از اضطراب و نگرانی جامعه را فراگرفت. نامشخص بودن رفتار ویروس و از آن مهم‌تر درمان‌گریز بودن آن موجب گردید، تصمیم‌گیری‌ها و سیاست‌گذاری‌ها به سوی پیشگیری از ابتلا سوق داده شود.

در آن زمان مهم‌ترین راهکار در کنترل سرایت ویروس، واکسیناسیون افراد بود. تحریم‌های حوزه دارویی و تجهیزات پزشکی باعث شد امکان تهیه اقلام مورد نیاز برای کنترل و پیشگیری از ابتلا به ویروس سخت شود. از طرف دیگر، در این شرایط خواسته هر کشور خروج از بحران بود و در نتیجه احتمال ارسال دارو و واکسن از طرف آنها دور از انتظار بود؛ بنابراین باید نیاز جامعه در داخل کشور برطرف می‌شد. با توجه به عدم زیر ساخت‌های آزمایشگاهی لازم برای تولید واکسن به صورت سنتی، تمام تلاش خود را برای توسعه یک واکسن با کارایی بالا، مطابق با تکنولوژی روز و هم‌چنین مقرون به صرفه برحسب شرایط اقتصادی کشور انجام داده و زیربنای طراحی یک واکسن براساس مدل نو ترکیب گذاشته شد و در نهایت این واکسن در شهریور ماه سال ۱۳۹۹ توانست فاز آزمایشگاهی را با موفقیت طی کند. اگر چه به دلیل عدم حمایت سازمان‌های مربوطه، واکسن ما وارد فاز بالینی نگردید؛ اما خوشبین هستیم که توانستیم تکنولوژی تولید واکسن نو ترکیب را بر علیه این ویروس بکار برده و واکسنی موفق را با کمترین امکانات و بودجه در سریع‌ترین زمان ممکن تولید نمائیم. تولید این واکسن می‌تواند دستاوردی ارزشمند برای کشور بوده تا در صورت مواجهه مجدد با بیماری‌هایی این چنین به خود متکی بوده و آمادگی‌های لازم را برای مقابله و پیشگیری داشته باشیم. هر چند امیدواریم جهان هرگز چنین پاندمی-هایی را تجربه نکند و این فناوری در راه برطرف کردن نیازهای کشور در دیگر حوزه‌ها استفاده گردد.

به پایان آمد این دفتر

حکایت همچنان باقیست.....

## پیشنهادات

- ۱- تولید پروتئین های نو ترکیب در سویه های بیانی مختلف و مقایسه عملکرد آنها در تحریک سیستم ایمنی
- ۲- تزریق نامزدهای واکسن به پریمات ها ( میمون رزوس ماکاک)
- ۳- بررسی تست های مربوط به اتصال پروتئین نو ترکیب با ACE2 نو ترکیب
- ۴- بررسی تست های تکمیلی مربوط به تحریک سیستم ایمنی سلولی مانند اینترلوکین ها، فاکتور تومور نکروزیس ، اینترفرون و.....

## فهرست منابع

1. Kahn, N., *New virus discovered by Chinese scientists investigating pneumonia outbreak*. Wall Street Journal, 2020. **8**.
2. Gralinski, L.E. and V.D. Menachery, *Return of the Coronavirus: 2019-nCoV*. Viruses, 2020. **12**(2): p. 135.
3. Lai, C.-C., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges*. International journal of antimicrobial agents, 2020. 55(3): p. 105924.
4. Gorbalenya, A.E., et al., *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses—a statement of the Coronavirus Study Group*. BioRxiv, 2020.
5. Khalaj-Hedayati, A., *Protective immunity against SARS subunit vaccine candidates based on spike protein: lessons for coronavirus vaccine development*. Journal of immunology research, 2020. **2020**.
6. Peiris, J.S., Y. Guan, and K. Yuen, *Severe acute respiratory syndrome*. Nature medicine, 2004. **10**(Suppl 12): p. S88-S97.
7. Xu, R.-H., et al., *Epidemiologic clues to SARS origin in China*. Emerging infectious diseases, 2004. **10**(6): p. 1030.
8. Booth, C.M., et al., *Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area*. Jama, 2003. **289**(21): p. 2801-2809.
9. Lee, N., et al., *A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong*. New England Journal of Medicine, 2003. **348**(20): p. 1986-1994.
10. Jian-Feng, H., et al., *Molecular Evolution of the SARS Coronavirus During the Course of the SARS Epidemic in China*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1666.
11. Zaki, A.M., et al., *Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia*. New England Journal of Medicine, 2012. **367**(19): p. 1814-1820.
12. Pebody, R., et al., *The United Kingdom public health response to an imported laboratory confirmed case of a novel coronavirus in September 2012*. Eurosurveillance, 2012. **17**(40): p. 20292.
13. RISK, R., *Update: Severe respiratory disease associated with a novel coronavirus*. 2012.
14. Organization, W.H., *Novel coronavirus infection—update (Middle East respiratory syndrome—coronavirus)*. 2013.
15. Oboho, I.K., et al., *2014 MERS-CoV outbreak in Jeddah—a link to health care facilities*. New England Journal of Medicine, 2015. **372**(9): p. 846-854.
16. Memish, Z.A., et al., *Middle East respiratory syndrome*. The Lancet, 2020. **395**(10229): p. 1063-1077.
17. Zhu, N., et al., *A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019*. New England journal of medicine, 2020. **382**(8): p. 727-733.
18. Velavan, T. and C. Meyer, *The COVID-19 epidemic*. Tropical medicine & international health, 2020. **25**.
19. Yang, Y., et al., *The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China*. Journal of autoimmunity, 2020. **109**: p. 102434.
20. Li, Q., et al., *Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia*. New England journal of medicine, 2020. **382**(13): p. 1199-1207.

21. Deruelle, T. and I. Engeli, *The COVID-19 crisis and the rise of the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)*. West European Politics, 2021. **44**(5-6): p. 1376-1400.
22. Zhang, J., B. Xie, and K. Hashimoto, *Current status of potential therapeutic candidates for the COVID-19 crisis*. Brain, behavior, and immunity, 2020. **87**: p. 59-73.
23. Guan, Y., et al., *Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China*. Science, 2003. **302**(5643): p. 276-278.
24. Wrapp, D., et al., *Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation*. Science, 2020. **367**(6483): p. 1260-1263.
25. Coutard, B., et al., *The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade*. Antiviral research, 2020. **176**: p. 104742.
26. Helmy, Y.A., et al., *The COVID-19 pandemic: a comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control*. Journal of clinical medicine, 2020. **9**(4): p. 1225.
27. Guo, Y.-R., et al., *The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status*. Military medical research, 2020. **7**: p. 1-10.
28. Heath, L., et al., *Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses*. Journal of virology, 2006. **80**(2): p. 11827-11832.
29. Frieman, M., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin-like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF3 and NF- $\kappa$ B signaling*. Journal of virology, 2009. **83**(13): p. 6689-6705.
30. Lindner, H.A., et al., *Selectivity in ISG15 and ubiquitin recognition by the SARS coronavirus papain-like protease*. Archives of biochemistry and biophysics, 2007. **466**(1): p. 8-14.
31. Saikatendu, K.S., et al., *Structural basis of severe acute respiratory syndrome coronavirus ADP-ribose-1''-phosphate dephosphorylation by a conserved domain of nsP3*. Structure, 2005. **13**(11): p. 1665-1675.
32. Adedeji, A.O., et al., *Mechanism of nucleic acid unwinding by SARS-CoV helicase*. PloS one, 2012. **7**(5): p. e36521.
33. Bianchi, M., et al., *Sars-CoV-2 Envelope and Membrane proteins: differences from closely related proteins linked to cross-species transmission*. BioMed Research International, 2020. **4389089**.
34. Hoffmann, M., et al., *SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE 2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor*. cell, 2020. **181**(2): p. 271-280. e8.
35. Walls, A.C., et al., *Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein*. Cell, 2020. **181**(2): p. 281-292. e6.
36. Zou, X ,et al., *Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection*. Frontiers of medicine, 2020. **14**: p. 185-192.
37. Tripp, R.A. and S.M. Tompkins, *Roles of host gene and non-coding RNA expression in virus infection*. Vol. 419. 2018: Springer.
38. Bleibtreu, A., et al., *Focus on Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)*. Medecine et maladies infectieuses, 2020. **50**(3): p. 243-251.

39. Hussain, S., et al., *Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus*. Journal of virology, 2005. **79**(9): p. 5288-5295.
40. Perrier, A., et al., *The C-terminal domain of the MERS coronavirus M protein contains a trans-Golgi network localization signal*. Journal of Biological Chemistry, 2019. **294**(39): p. 14406-14421.
41. Sawicki, S. and D. Sawicki, *Coronavirus transcription: a perspective*. Coronavirus replication and reverse genetics, 2005: p. 31-55.
42. Rothan, H.A. and S.N. Byrareddy, *The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak*. Journal of autoimmunity, 2020. **109**: p. 102433.
43. Huang, C., et al., *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China*. The lancet, 2020. **395**(10223): p. 497-506.
44. Retamozo, S., et al., *Haemophagocytic syndrome and COVID-19*. Clinical rheumatology, 2021. **40**(4): p. 1233-1244.
45. Vabret, N., et al., *Immunology of COVID-19: current state of the science*. Immunity, 2020. **52**(6): p. 910-941.
46. Khanmohammadi, S. and N. Rezaei, *Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19*. Journal of medical virology, 2021. **93**(5): p. 2735-2739.
47. Onofrio, L., et al., *Toll-like receptors and COVID-19: a two-faced story with an exciting ending*. 2020, Future Science. p. FSO605.
48. Merad, M. and J.C. Martin, *Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages*. Nature reviews immunology, 2020. **20**(6): p. 355-362.
49. Brodin, P., *Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity*. Nature medicine, 2021. **27**(1): p. 28-33.
50. Chowdhury, M.A., et al., *Immune response in COVID-19: A review*. Journal of infection and public health, 2020. **13**(11): p. 1616-1619.
51. McKenzie, B.A., V.M. Dixit, and C. Power, *Fiery cell death: pyroptosis in the central nervous system*. Trends in neurosciences, 2020. **43**(1): p. 55-73.
52. Bartleson, J.M., et al., *SARS-CoV-2, COVID-19 and the aging immune system*. Nature aging, 2021. **1**: p. 769-782.
53. Gao, Y.M., et al., *Cytokine storm syndrome in coronavirus disease 2019: A narrative review*. Journal of internal medicine, 2021. **289**(2): p. 147-161.
54. Gustine, J.N. and D. Jones, *Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19*. The American journal of pathology, 2021. **191**(1): p. 4-17.
55. Vaillancourt, M. and P. Jorth, *The unrecognized threat of secondary bacterial infections with COVID-19*. MBio, 2020. **11**(4): p. e01806-20.
56. Xu, Z., et al., *Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome*. The Lancet respiratory medicine, 2020. **8**(4): p. 420-422.
57. Wang, A., et al., *Specific sequences of infectious challenge lead to secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis-like disease in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019. **116**(6): p. 2200-2209.
58. Zhou, R., et al., *Acute SARS-CoV-2 infection impairs dendritic cell and T cell responses*. Immunity, 2020. **53**(4): p. 864-877. e5.

59. Zhang, Y., et al., *A molecular docking model of SARS-CoV S1 protein in complex with its receptor, human ACE2*. Computational biology and Chemistry, 2005. **29**(3): p. 254-257.
60. Jawad, B., et al., *Key interacting residues between RBD of SARS-CoV-2 and ACE2 receptor: combination of molecular dynamics simulation and density functional calculation*. Journal of chemical information and modeling, 2021. **61**(9): p. 4425-4441.
61. Bertoglio, F., et al., *SARS-CoV-2 neutralizing human recombinant antibodies selected from pre-pandemic healthy donors binding at RBD-ACE2 interface*. Nature communications, 2021. **12**(1): p. 1577.
62. Malireddi, R., et al., *Inflammatory cell death, PANoptosis, mediated by cytokines in diverse cancer lineages inhibits tumor growth*. Immunohorizons, 2021. **5**(7): p. 568-580.
63. Shin, H.-S., et al., *Immune responses to Middle East respiratory syndrome coronavirus during the acute and convalescent phases of human infection*. Clinical Infectious Diseases, 2019. **68**(6): p. 984-992.
64. Liu, W., et al., *Two-year prospective study of the humoral immune response of patients with severe acute respiratory syndrome*. The Journal of infectious diseases, 2006. **193**(6): p. 792-795.
65. Kim, Y.-M. and E.-C. Shin, *Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection*. Experimental & molecular medicine : (°)°³ . ۲۰۲۱ ,p. 750-760.
66. Papazian, L., et al., *Diagnostic workup for ARDS patients*. Intensive care medicine, 2016. **42**: p. 674-685.
67. Yuan, S., et al., *Coronavirus Nsp1: immune response suppression and protein expression inhibition*. Frontiers in microbiology, 2021. **12**: p. 752214.
68. Zhao, J., et al., *Airway memory CD4+ T cells mediate protective immunity against emerging respiratory coronaviruses*. Immunity, 2016. **44**(6): p. 1379-1391.
69. Peng, Y., et al., *Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19*. Nature immunology, 2020. **21**(11): p. 1336-1345.
70. Mortezaee, K. and J. Majidpoor, *CD8+ T cells in SARS-CoV-2 induced disease and cancer—clinical perspectives*. Frontiers in immunology, 2022. **13**: p. 864298.
71. Zander, R., et al., *CD4+ T cell help is required for the formation of a cytolytic CD8+ T cell subset that protects against chronic infection and cancer*. Immunity, 2019. **51**(6): p. 1028-1042. e4.
72. Juno, J.A., et al., *Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19*. Nature medicine, 2020. **26**(9): p. 1428-1434.
73. Chen, X., et al., *Neutralizing Antibodies Against SARS-CoV-2 Variants Induced by Natural Infection or Vaccination: A Systematic Review and Individual Data Meta-Analysis*. 2021.
74. Korber, B., et al., *Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus*. Cell, 2020. **182**(4): p. 812-827. e19.
75. Davies, N.G., et al., *Estimated transmissibility and severity of novel SARS-CoV-2 Variant of Concern 202012/01 in England*. MedRxiv, 2020: p. 2020.12.24.20248822.
76. Gálvez, J.M., et al., *Mutation profile of SARS-CoV-2 genome in a sample from the first year of the pandemic in Colombia*. Infection, Genetics and Evolution, 2022. **97**: p. 105192.



77. Peacock, S.J., *SARS-CoV-2 variants: past, present and future*. Socio-Life Science and the COVID-19 Outbreak: Public Health and Public Policy, 2022: p. 3-23.
78. Zhou, W. and W. Wang, *Fast-spreading SARS-CoV-2 variants: challenges to and new design strategies of COVID-19 vaccines*. Signal transduction and targeted therapy, 2021. **6**(1): p. 226.
79. Duong, D., *Alpha, Beta, Delta, Gamma: What's important to know about SARS-CoV-2 variants of concern*, *Can Med Assoc*.
80. Vlasova, A.N., et al., *Deltacoronavirus evolution and transmission: Current scenario and evolutionary perspectives*. Frontiers in Veterinary Science, 2021. **7**: p. 626785.
81. Callaway, E., *Heavily mutated Omicron variant puts scientists on alert*. Nature, 2021. **600**(7887): p. 21.
82. Liu, L., et al., *Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2*. Nature, 2022. **602**(7898): p. 676-681.
83. Organization, W.H., *World Health Organization Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report-3*. World Health Organization, 2020.
84. Tavakoli, A., K. Vahdat, and M. Keshavarz, *Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19): an emerging infectious disease in the 21st century*. ISMJ, 2020. **22**(6): p. 432-450.
85. Shen, S. and R. Woo, *Coronavirus incubation could be as long as 27 days, Chinese provincial government says*. Reuters [Internet], 2020.
86. Yang, Y., et al., *Epidemiological and clinical features of the 2019 novel coronavirus outbreak in China*. medrxiv, 2020: p. 2020.02. 10.1101/2020.02.11.20025791.
87. Heymann, D.L. and N. Shindo, *COVID-19: what is next for public health?* The lancet, 2020. **395**(10224): p. 542-545.
88. Zu, Z.Y., et al., *Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a perspective from China*. Radiology, 2020. **296**(2): p. E15-E25.
89. Chen, N., et al., *Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study*. The lancet, 2020. **395**(10223): p. 507-513.
90. Neumann, C., A. Scheffold, and S. Rutz. *Functions and regulation of T cell-derived interleukin-10*. in *Seminars in immunology*. 2019. Elsevier.
91. Wong, C., et al., *Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome*. Clinical & Experimental Immunology, 2004. **136**(1): p. 95-103.
92. Organization, W.H., *Surveillance case definitions for human infection with novel coronavirus (nCoV), interim guidance, 15 January 2020*, in *Surveillance case definitions for human infection with novel coronavirus (nCoV), interim guidance, 15 January 2020*. 2020.
93. Chen, B., et al., *Roles of meteorological conditions in COVID-19 transmission on a worldwide scale*. MedRxiv, 2020: p. 2020.03. 16.20037168.
94. Wilder-Smith, A. and D.O. Freedman, *Isolation, quarantine, social distancing and community containment: pivotal role for old-style public health measures in the novel coronavirus (2019-nCoV) outbreak*. Journal of travel medicine, 2020. **27**(2): p. taaa020.
95. Wang, M., et al., *Temperature significantly change COVID-19 transmission in 429 cities*. medrxiv, 2020 :p. 2020.02. 22.20025791.

96. Wu, Y., C. Chen, and Y. Chan, *Overview of the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV): the pathogen of severe specific contagious pneumonia (SSCP)*. J Chin Med Assoc, 2020. **83**(3): p. 217-220.
97. Hou, H., et al., *Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019*. Clinical & translational immunology, 2020. **9**(5): p. e1136.
98. Jahanpeyma, P., et al., *Knowledge of the Covid-19 Virus, From Diagnosis to Prevention and Treatment: A Narrative Review*. Military Caring Sciences Journal, 2020. **7**(3): p. 289-300.
99. Esparza, J., *Early vaccine advocacy: Medals honoring Edward Jenner issued during the 19th century*. Vaccine, 2020. **38**(6): p. 1450-1456.
100. Shin, M.D., et al., *COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward*. Nature nanotechnology, 2020. **15**(8): p. 646-655.
101. Si, L., et al., *Generation of influenza A viruses as live but replication-incompetent virus vaccines*. Science, 2016. **354**(6316): p. 1170-1173.
102. Farahani, A.J., et al., *Available effective vaccines in preventing COVID-19: a narrative review*. J Marine Med, 2021. **3**: p. 153-62.
103. Fausther-Bovendo, H. and G.P. Kobinger, *Pre-existing immunity against Ad vectors: humoral, cellular, and innate response, what's important?* Human vaccines & immunotherapeutics, 2014. **10**(10): p. 2875-2884.
104. Knoll, M.D. and C. Wonodi, *Oxford–AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy*. The Lancet, 2021. **397**(10269): p. 72-74.
105. Voysey, M., et al., *Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK*. The Lancet, 2021. **397**(10269): p. 99-111.
106. Wise, J., *Covid-19: European countries suspend use of Oxford-AstraZeneca vaccine after reports of blood clots*. 2021, British Medical Journal Publishing Group.
107. Livingston, E.H., P.N. Malani, and C.B. Creech, *The Johnson & Johnson Vaccine for COVID-19*. Jama, 2021. **325**(15): p. 1575-1575.
108. De Matos, A., G.P. Cardoso, and M. Neto, *Sputnik v: is the Russian vaccine safe*. Journal of Clinical Epidemiology and Toxicology. SRC/JCET-128. doi10, 2021. **47363**.
109. Siadat, S.D. and A. Fateh, *Strategies of vaccine production against COVID-19: when will an effective vaccine be produced?* Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch, 2021. **31**(1): p. 29-38.
110. <https://www.who.int/news>.
111. Abramo, G., C.A. D'Angelo, and I. Mele, *Gendered impact of COVID-19 pandemic on research production: a cross-country analysis*. arXiv preprint arXiv:2102.05360, 2021.
112. Kaur, S.P. and V. Gupta, *COVID-19 Vaccine: A comprehensive status report*. Virus research, 2020. **288**: p. 198114.
113. Krammer, F., *SARS-CoV-2 vaccines in development*. Nature [Internet]. 2020 Oct 22; 586 (7830): 5.24-16
114. Sridhar, P., et al., *Vaccine-induced antibody dependent enhancement in COVID-19*. Chest, 2022. **162**(4): p. A646-A647.
115. Rezaei, A., et al., *Antibodies Produced Toward Recombinant RBD and Nucleocapsid Neutralize SARS-COV-2*. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 2022. **14**(4): p. 270.

116. Bellomo, R., et al., *Anaphylaxis is a rare reaction in COVID-19 vaccination*. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 2021. **35**(3): p. 839-842.
117. Mamedov, T., et al., *Production and characterization of nucleocapsid and RBD cocktail antigens of SARS-CoV-2 in Nicotiana benthamiana plant as a vaccine candidate against COVID-19*. Vaccines, 2021. **9**(11): p. 1337.
118. Baisa, G., et al., *A recombinant protein SARS-CoV-2 candidate vaccine elicits high-titer neutralizing antibodies in macaques*. bioRxiv, 2021.
119. Kleanthous, H., et al., *Scientific rationale for developing potent RBD-based vaccines targeting COVID-19*. npj Vaccines, 2021. **6**(1): p. 128.
120. Fu, J., et al., *Correlation of Binding and Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Omicron Variant in Infection-Naïve and Convalescent BNT162b2 Recipients*. Vaccines, 2022. **10**(11): p. 1904.
121. Krammer, F., *SARS-CoV-2 vaccines in development*. Nature, 2020. **586**(7830): p. 516-527.
122. Ghaemi, A., et al., *Recombinant COVID-19 vaccine based on recombinant RBD/Nucleoprotein and saponin adjuvant induces long-lasting neutralizing antibodies and cellular immunity*. Frontiers in immunology, 2022. **13**: p. 5127.
123. Alsaadi, E.A., B.W. Neuman, and I.M. Jones, *A fusion peptide in the spike protein of MERS coronavirus*. Viruses, 2019. **11**(9): p. 825.
124. Markosian, C., et al., *Apropos of Universal Epitope Discovery for COVID-19 Vaccines: A Framework for Targeted Phage Display-Based Delivery and Integration of New Evaluation Tools*. Biorxiv, 2021.
125. Ghaderi, H., et al., *Expression and Purification of Functional SARS-CoV-2 RBD in E. coli for Therapeutic and Diagnostic Purposes*. 2023.
126. Berndt, A.J., et al., *Recombinant production of a functional SARS-CoV-2 spike receptor binding domain in the green algae Chlamydomonas reinhardtii*. PloS one, 2021. **16**(11): p. e0257089.
127. Chen, W.-H., et al., *Optimization of the production process and characterization of the yeast-expressed SARS-CoV recombinant receptor-binding domain (RBD219-N1), a SARS vaccine candidate*. Journal of pharmaceutical sciences, 2017. **106**(8): p. 1961-1970.
128. Yang, J., et al., *A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity*. Nature, 2020. **586**(7830): p. 0577-0577.
129. Duan, L., et al., *The SARS-CoV-2 spike glycoprotein biosynthesis, structure, function, and antigenicity: implications for the design of spike-based vaccine immunogens*. Frontiers in immunology, 2020. **11**: p. 576622.
130. Casalino, L., et al., *Beyond shielding: the roles of glycans in the SARS-CoV-2 spike protein*. ACS central science, 2020. **6**(10): p. 1722-1734.
131. Lemmin, T., et al., *Structures and dynamics of the novel S1/S2 protease cleavage site loop of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein*. Journal of structural biology: X, 2020. **4**: p. 100038.
132. Zhao, X., H. Chen, and H. Wang, *Glycans of SARS-CoV-2 spike protein in virus infection and antibody production*. Frontiers in Molecular Biosciences, 2021. **8**: p. 629873.
133. Denoncin, K. and J.-F. Collet, *Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead*. Antioxidants & redox signaling, 2013. **19**(1): p. 63-71.

134. Shang, J., et al., *Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2*. Nature, 2020. **581** :p. 221-224.
135. Shereen, M.A., et al., *COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses*. Journal of advanced research, 2020. **24**: p. 91-98.
136. He, Y., et al., *Purification and characterization of the receptor- binding domain of SARS- CoV- 2 spike protein from Escherichia coli*. Engineering in Life Sciences, 2021. **21**(6): p. 453-460.
137. Homma, T., et al., *Immune response and protective efficacy of the SARS-CoV-2 recombinant spike protein vaccine S-268019-b in mice*. Scientific Reports, 2022. **12**(1): p. 20861.
138. Wu, Y., et al., *Comparison of immune responses elicited by SARS-CoV-2 mRNA and recombinant protein vaccine candidates*. Frontiers in immunology, 2022. **13**: p. 906457.
139. Chen, Z., et al., *Humoral and Cellular Immune Responses of COVID-19 vaccines against SARS-Cov-2 Omicron variant: A systemic review*. International Journal of Biological Sciences, 2022. **18**(12): p. 4629.
140. Stern, L.J. and L. Santambrogio, *The melting pot of the MHC II peptidome*. Current opinion in immunology, 2016. **40**: p. 70-77.
141. Wadhwa, A., et al., *mRNA 疫苗——传统疫苗的救星* | MDPI Pharmaceuticals.
142. Martinez-Flores, D., et al., *SARS-CoV-2 vaccines based on the spike glycoprotein and implications of new viral variants*. Frontiers in immunology, 2021. **12**: p. 701501.
143. Zhang, Z., et al., *Humoral and cellular immune memory to four COVID-19 vaccines*. Cell, 2022. **185**(14): p. 2434-2451. e17.
144. Firouzabadi, N., et al., *Update on the effectiveness of COVID-19 vaccines on different variants of SARS-CoV-2*. International Immunopharmacology, 2023: p. 109968.

## Abstract

**Introduction:**The outbreak of the new coronavirus (SARS-CoV-2) is considered as the third viral disease of the coronavirus family in the 21st century. The pivotal role of the S protein in the pathogenesis of the SARS-CoV-2 confirms that it can be the principal antigenic agent for stimulation of the host immune system and production of neutralizing antibodies. Hence, we have designed, produced, and evaluated the potential use of three truncated recombinant proteins derived from spike protein as vaccine candidates capable of stimulation both of the host immune humoral (neutralizing antibody ) and cellular (CD4 & CD8).

**Method:**In silico tools were used to design spike-based subunit recombinant proteins (RBD (P<sub>1</sub>), fusion peptide (P<sub>2</sub>), and S1/S2 cleavage site (P<sub>3</sub>)). These proteins were checked for their ability to be identified by the anti-SARS-CoV-2 antibodies by exposing them to COVID-19 serum samples. The proteins were also injected into mice and rabbit, the antibody titers were measured for assess their neutralization efficiency. Then the dose-response test was performed to select the best response against the lowest injected dose. An immunohistochemically test was performed to check the stimulation of cellular immunity. Possible side effects caused by injection in the tissues were checked by H&E staining. Binding of recombinant protein to ACE2 receptor and inhibitory effect of antibody on this binding was done by cell studies and evaluated by flow cytometry.

**Result:**The antibodies that existed in the serum of COVID-19 patients were identified by designed proteins. The results showed that the injected protein was able to stimulate the cellular and humoral immune system without causing any complications .The VNT results revealed that the produced antibodies could neutralize the cultured live virus. Also, the recombinant protein is able to bind to the ACE2 receptor and the produced antibody has an inhibitory effect on this binding.

**Conclusion:**Totally of in silico, in vitro, and in vivo experiments, it was shown that the injection of recombinant protein based on spike protein could stimulate long-lasting and neutralizing antibody responses. Therefore subunit vaccines could also be considered as robust tools for effective vaccination against COVID-19. Therefore, subunit vaccines can be used as a powerful tool for effective vaccination against Covid-19.

---

**Key word:** SARS-CoV-2, Spike protein, Vaccine, immune response, neutralizing antibody



*Title:*

***Preparation of recombinant coronavirus surface protein antigens (SARS-CoV-2) as  
an immune system stimulant***

***A Thesis Presented for the Degree of Doctor of Philosophy (Ph.D)  
In Medical Biochemistry***

***By: Faezeh. Noorabad Ghahroodi***

***Supervisor: Dr. Mohammad Javad. Rasaei***

***Advisor: Dr. Saeed .Khalili***

***Tarbiat Modares University  
Faculty of Medical Sciences***

**Summer.2023**