



## Design and Molecular Docking Study of Recombinant Chimera Protein HBHA-Omp28 for Developing an Efficient Vaccine Against *Salmonella typhimurium*

Syedeh Zahra Abolvafaei<sup>1✉</sup>, Nemat Shams<sup>2✉</sup>, Ali Forouharmehr<sup>3✉</sup>, Amin Jaydari<sup>2✉</sup>, Narges Nazifi<sup>4✉</sup>

<sup>1</sup> Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

<sup>2</sup> Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

<sup>3</sup> Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

<sup>4</sup> Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 17 April 2023, Accepted: 22 July 2023



[10.22059/jvr.2023.355694.3329](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.355694.3329)



[20.1001.1.20082525.1402.78.3.7.3](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.3.7.3)

### Abstract

**BACKGROUND:** Salmonellosis is a dangerous disease that can threaten the health of humans and animals. This disease can lead to economic losses annually; therefore, many studies have been conducted to prevent this disease.

**OBJECTIVES:** The current study aims to design a recombinant chimera protein HBHA-Omp28 as a vaccine against *Salmonella typhimurium*.

**METHODS:** The nucleotide and amino acid sequences of Omp28 and HBHA proteins were first extracted from the NCBI database. Then, the recombinant chimera of HBHA-Omp28 was bioinformatically assembled using a rigid linker. Epitope prediction of T and B cells, antigenicity, allergenicity, and physicochemical features assessments of HBHA-Omp28 were done using Immune Epitope Database (IEDB), ABCpred, VaxiJen, AllerTOP and ProtParam online servers, respectively. To assess the secondary and tertiary structures, the Self-Optimized Prediction Method with Alignment (SOPMA) and the Iterative Threading ASSEMBLY Refinement (I-TASSER) server were used, respectively. Molecular docking between recombinant chimera and TLR4/MD2 receptor was assessed by ClusPro server. Finally, after codon optimization of nucleotide sequence of recombinant chimera to express in *Escherichia Coli* k-12 strain, the cloning of recombinant chimera in pET21-a (+) vector was examined.

**RESULTS:** The designed recombinant chimera was classified as an antigenic and non-allergenic protein with molecular weight of 34.19 kDa. According to the results of molecular docking study, the HBHA-Omp28 protein was able to bind to TLR4/MD2 receptor using 9 hydrogen bonds. The results of cloning study demonstrated that HBHA-Omp28 successfully cloned into pET21-a (+).

**CONCLUSIONS:** The designed recombinant chimera can be an appropriate vaccine against salmonella bacteria.

**Keywords:** Bioinformatics, Salmonellosis, Recombinant protein, Infection, Vaccination

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).  
Publisher: University of Tehran

**Corresponding author:** Nemat Shams, Tel/Fax: +9866-33120330/ +9866-33120109



### How to cite this article:

Abolvafaei SZ, Shams N, Forouharmehr A, Jaydari A, Nazifi N. Design and Molecular Docking Study of Recombinant Chimera Protein HBHA-Omp28 for Developing an Efficient Vaccine Against *Salmonella typhimurium*. J Vet Res, 2023; 78(3): 223-233. doi: 10.22059/jvr.2023.355694.3329

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** List of predicted epitopes using IEDB and ABCpred servers and their antigenicity.

**Table 2.** List of effective amino acids involved in hydrogen bonds formation.

**Figure 1.** Final structure of HBHA-Omp28.

**Figure 2.** Secondary structure of HBHA-Omp28 obtained by the SOPMA.

**Figure 3.** Ramachandran plot of HBHA-Omp28 before refinement. In this model, 260 (82%) residues were located in the core area.

**Figure 4.** Ramachandran plot of HBHA-Omp28 after refinement. In this model, 288 (91%) residues were located in the core area.

**Figure 5.** The best refined model of HBHA-Omp28, visualized by PyMol software.

**Figure 6.** Interaction between HBHA-Omp28 protein and TLR4/MD2 receptor.

**Figure 7.** Number and length of hydrogen bonds between HBHA-Omp28 protein and TLR4/MD2 receptor visualized by LigPlot+ software.

**Figure 8.** Cloning the nucleotide sequence of HBHA-Omp28 (green color) into pET21-a (+) vector.

## طراحی و بررسی داکینگ مولکولی کایمر نو ترکیب HBHA-Omp28 با هدف توسعه یک واکسن کارآمد علیه باکتری سالمونلا تیفی موریوم

سیده زهرا ابوالوفایی<sup>۱</sup>، نعمت شمس<sup>۲</sup>، علی فروهر مهر<sup>۳</sup>، امین جایدری<sup>۴</sup>، نرگس نظیفی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

<sup>۲</sup> گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

<sup>۳</sup> گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

<sup>۴</sup> گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۲۸ فروردین ماه ۱۴۰۲، تاریخ پذیرش: ۳۱ خرداد ماه ۱۴۰۲

doi 10.22059/jvr.2023.355694.3329

20.1001.1.20082525.1402.78.3.7.3

### چکیده

**زمینه مطالعه:** سالمونلوزیک بیماری مهم و خطرناک می‌باشد که سلامت انسان و حیوان را مورد تهدید قرار می‌دهد. این بیماری سالیانه سبب زیان‌های اقتصادی بی‌شماری می‌شود، از جمله مهم‌ترین راه‌های مقرون به صرفه برای مهار انواع پاتوژن‌ها و اکسیناسیون ایمن با انواع واکسن‌های زیر واحدی می‌باشد. آنتی‌ژن Omp28 به عنوان یک پروتئین خارج غشایی مهم در باکتری سالمونلا تیفی موریوم توانایی اثبات شده‌ای در تحریک سیستم همورال و سلولار میزبان را دارد. از طرفی جهت بهبود واکنش ایمنی نسبت به آنتی‌ژن‌ها، در طراحی واکسن‌ها معمولاً از ادجوانت‌ها استفاده می‌شود.

**هدف:** مطالعه حاضر به منظور طراحی کایمر نو ترکیب HBHA-Omp28 به عنوان یک واکسن علیه پاتوژن سالمونلا اجرا شد.

**روش کار:** برای این منظور، توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی آنتی‌ژن Omp28 و مولکول HBHA از پایگاه داده‌های NCBI استخراج شد. سپس کایمر نو ترکیب HBHA-Omp28 با استفاده از لینکر پپتیدی غیر منعطف به صورت درون رایانه‌ای طراحی شد. پیش بینی اپی توپ‌های سلول‌های T و B به ترتیب توسط سرورهای IEDB و ABCpred انجام شد و خواص آنتی‌ژن‌سیستی، آلرژن‌سیستی و فیزیکی‌شیمیایی سازه طراحی شده نیز به ترتیب توسط سرورهای VaxiJen، ProtParam و AllerTOP بررسی شد. در ادامه برای ارزیابی ساختار دوم و ساختار سوم سازه، به ترتیب سرورهای SOPMA و I-TASSER به کار گرفته شدند. داکینگ مولکولی بین کایمر نو ترکیب و گیرنده TLR4/MD2 با استفاده از سرور ClusPro بررسی شد. در نهایت پس از بهینه‌سازی کدون‌های توالی نوکلئوتیدی کایمر نو ترکیب در سامانه پروکاریوتی *E. Coli* سویه K-12، امکان کلون کایمر نو ترکیب درون وکتور pET21-a (+) مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** بر اساس نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، کایمر نو ترکیب HBHA-Omp28 یک پروتئین غیر آلرژن و آنتی‌ژنتیک با وزن مولکولی ۳۴/۱۹ کیلو دالتون بود. این سازه با توزیع ۹۱ درصد اسیدهای آمینه در ناحیه هسته (بر اساس آنالیزهای رامانچاندرا) مدل شد. همچنین بر اساس داکینگ مولکولی مشخص شد که پروتئین HBHA توانسته با تشکیل ۹ پیوند هیدروژنی به گیرنده TLR4/MD2 متصل شود. همچنین نتایج کلونینگ اثبات کرد که کایمر نو ترکیب با موفقیت درون وکتور بیانی pET21-a(+) کلون شد.

**نتیجه‌گیری نهایی:** به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که سازه طراحی شده HBHA-Omp28 در مطالعه حاضر می‌تواند کاندید قابل اعتمادی در ساخت واکسن‌های نو ترکیب علیه باکتری سالمونلا باشد.

**کلمات کلیدی:** بیوانفورماتیک، پروتئین نو ترکیب، سالمونلوزیس، عفونت، واکسیناسیون

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است. © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: نعمت شمس، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

## مقدمه

امروزه نقش واکسیناسیون در جهت مقابله با انواع بیماری‌های عفونی ضرورتی انکارناپذیر است. واکسن‌ها سبب کاهش میزان مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی در جهان می‌شوند و نقش مهمی در کنترل و پیشگیری از بیماری‌های عفونی دارند (۱، ۲). واکسن‌هایی که عمدتاً مورد استفاده قرار می‌گیرند، شامل پاتوژن‌های زنده ضعیف شده، پاتوژن‌های کشته شده و واکسن‌های زیرواحدی مانند سموم باکتریایی غیرفعال شده می‌باشند. امروزه نسل‌های جدید از انواع واکسن مانند واکسن‌های نوترکیب به منظور ایجاد پاسخ‌های ایمنی قوی و پایدار مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳، ۴). از مزیت‌های واکسن‌های زیرواحدی، کاهش اثرات و واکنش‌هایی است که می‌تواند در صورت استفاده از واکسن‌های زنده یا کشته شده در بدن ایجاد شود (۵). واکسن‌های زیرواحدی، برخلاف واکسن‌های زنده ضعیف شده به منظور اثرگذاری بهتر، به ادجوانت نیاز دارند. از جمله مزایای ادجوانت‌ها می‌توان به تولید سریع و طولانی مدت آنتی‌بادی، افزایش تیتراژ آنتی‌بادی و کاهش دفعات تزریق واکسن اشاره کرد (۶). مهم‌ترین عامل محدود کننده استفاده و توسعه واکسن‌های نوترکیب به موضوع ایمنی ادجوانت‌ها بر می‌گردد (۷). باکتری سالمونلا جزء خانواده/تتروباکتریاسه می‌باشد و به صورت باسیل‌های گرم منفی دیده می‌شود. این جنس باکتری به صورت هوازی یا بی‌هوازی اختیاری فعالیت دارد. سالمونلوزیس از جمله بیماری‌های زئونوز مهم عفونی می‌باشد، عامل آن باکتری سالمونلا است که از مهم‌ترین عوامل ایجاد آلودگی در مواد غذایی به شمار می‌آید (۸). امروزه برای باکتری سالمونلا بیشتر از ۲۴۰۰ سروتایپ معرفی شده است که شامل دو گروه عمده *سالمونلا/انتریکا* با شش زیر گروه و *سالمونلا/بونگوری* است. سویه‌های بیماریزا انسانی به طور معمول در گروه انتریکا قرار دارند که به منظور بررسی ایمنی‌زایی سروتایپ‌های سالمونلا ابتدا آزمایش‌های بیوشیمیایی و سرولوژی صورت می‌گیرد (۹، ۱۰). یکی از انواع آنتی‌ژن‌های قابل بررسی باکتری سالمونلا جهت تولید واکسن، پروتئین‌های سطحی آن به خصوص پروتئین‌های غشا خارجی می‌باشد، مطالعات نشان داده است که پروتئین غشاء خارجی ۲۸ (Omp28) دارای خاصیت آنتی‌ژنیک می‌باشد، لذا این پروتئین می‌تواند در ساخت واکسن استفاده شود (۱۱). یکی از نکات مهمی که در طول طراحی و ساخت یک واکسن نوترکیب باید به آن توجه شود، اعمال یک ادجوانت مولکولی مناسب می‌باشد. طبق گزارشات انجام شده، یکی از پروتئین‌های سطحی باکتری‌های خانواده مایکوباکتریوم (عامل سل) به نام هم‌گلوتینین چسبنده به هپارین (HBHA) می‌تواند به عنوان ادجوانت مولکولی برای بهبود تأثیرگذاری واکسن در نظر گرفته شود (۱۲). در مطالعه حاضر، یک کایمر نوترکیب بر پایه پروتئین آنتی‌ژنیک Omp28 از باکتری *سالمونلا تیپ‌موریوم* و ادجوانت مولکولی HBHA از باکتری *مایکوباکتریوم بویس* طراحی گردید و به عنوان کاندید واکسن علیه سالمونلوز با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش کار

**جمع‌آوری اطلاعات از پایگاه داده‌ها:** به منظور انجام مطالعه حاضر، توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی مولکول HBHA از باکتری *مایکوباکتریوم بویس* و آنتی‌ژن Omp28 از باکتری *سالمونلا تیپ‌موریوم*، از پایگاه داده (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استخراج شدند. شماره دسترسی پروتئین HBHA و Omp28 به ترتیب NC\_000962/3 و CP104638 بودند. علاوه بر این فایل pdb مربوط به گیرنده TLR4/MD2 با شماره دسترسی ۶۴ Z از پایگاه داده‌های RCSB (<https://www.rcsb.org/>) استخراج شد.

**طراحی کایمر نوترکیب:** برای طراحی کایمر نوترکیب متشکل از توالی آمینواسیدی پروتئین‌های Omp28 و HBHA از نرم‌افزار CLC Main WorkBench استفاده شد. بدین منظور ابتدا توالی پروتئین این دو مولکول توسط نرم‌افزار CLC Main WorkBench ورژن ۵/۵ به دست آمد سپس در کایمر نوترکیب، توالی آمینواسیدی پروتئین HBHA در بالادست (انتهای N) و توالی آمینو اسیدی آنتی‌ژن Omp28 در پایین دست (انتهای C) کایمر گنجانده شد. با هدف حفظ فاصله بین دو دومین پروتئینی از یکدیگر و به دنبال آن عملکرد صحیح آن‌ها، از لینکر غیرمنعطف EAAAK استفاده شد.

**بررسی آنتی‌ژنیسیته و آلرژن‌زایی کایمر نوترکیب:** برای سنجش میزان آنتی‌ژنیسیته و آلرژن‌زایی کایمر نوترکیب HBHA-Omp28، به ترتیب سرورهای VaxiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen>) ورژن ۲، و AllerTOP (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) ورژن ۱ به کار گرفته شدند. برای استفاده از این سرورها توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین نوترکیب مذکور با فرمت FASTA به کار گرفته شد.

پیش بینی اپی توپ‌های سلول‌های T و B کایمر نو ترکیب: با هدف تعیین اپی توپ‌های اختصاصی سلول‌های B و T موجود در کایمر نو ترکیب طراحی شده در مطالعه حاضر، از سرورهای معتبر IEDB (<http://tools.iedb.org/>) و ABCpred (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred/index.html>) به ترتیب برای پیش بینی اپی توپ‌های سلول‌های T (MHCI و MHCII) و سلول‌های B استفاده شد. لازم به ذکر است که برای استفاده از سرورهای مذکور از توالی اسید آمینه‌ای پروتئین کایمر نو ترکیب طراحی شده با فرمت FASTA استفاده شد. در ادامه برای ارزیابی بیشتر آنتی ژنسیتی اپی توپ‌های به دست آمده، سرور معتبر VaxiJen ([http://pharmfac.net/vaxijen/scripts/VaxiJen\\_scripts/](http://pharmfac.net/vaxijen/scripts/VaxiJen_scripts/)) با حد آستانه ۰/۴ مورد استفاده قرار گرفت.

**بررسی خواص فیزیکی‌شیمیایی و ساختار دوم کایمر نو ترکیب:** در مطالعه حاضر برای بررسی خواص فیزیکی‌شیمیایی کایمر نو ترکیب، از سرور ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) استفاده شد. شایان ذکر است این سرور توانایی آنالیز خواص فیزیکی‌شیمیایی مهم از قبیل وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شاخص آلفاتیک، شاخص ناپایداری و GRAVY را دارا می‌باشد. همچنین به منظور بررسی ساختار دوم و پیش‌بینی حالت‌های مختلف فضایی (آلفا هلیکس، پیچ‌های تصادفی، صفحات گسترده و پیچ‌های بتا) کایمر نو ترکیب HBHA-Omp28 طراحی شده از سرور SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html)) استفاده شد.

**بررسی ساختار سوم کایمر نو ترکیب:** در مطالعه حاضر به منظور مدل کردن ساختار سوم کایمر نو ترکیب طراحی شده از سرور I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) استفاده شد. سپس ساختار سوم مدل شده برای استفاده در مراحل بعد توسط سرور GalaxyRefine (<https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>) ریفاین گردید و بهترین مدل ریفاین شده از طریق آنالیز پلات رامچاندرا ارائه شده توسط سرور VADAR (<http://vadar.wishartlab.com>) انتخاب شد. در نهایت بهترین مدل ریفاین شده کایمر HBHA-Omp28 با استفاده از نرم‌افزار PyMol (<https://pymol.org>) ورژن ۲/۵/۴ رویت‌سازی شد.

جدول ۱. لیست اپی توپ‌های پیش بینی شده توسط سرورهای ABCpred و IEDB و ارزیابی آنتی ژنسیتی آن‌ها.

نوع اپی توپ	توالی پپتیدی اپی توپ‌ها	امتیاز VaxiJen	نام سرور	آدرس سرور
سلول B	TDTRSVEESRRLTK	۱/۲۷۷۸	ABCpred	<a href="https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred/index.html">https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred/index.html</a>
سلول B	DFKGGDYVDFQETETT	۰/۹۵۹۷	ABCpred	<a href="https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred/index.html">https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred/index.html</a>
سلول T (MHCI)	YLEAATSRV	۰/۵۷۹۷	IEDB	<a href="http://tools.iedb.org/mhci/">http://tools.iedb.org/mhci/</a>
سلول T (MHCI)	FVDLNPQTM	۱/۱۸۸۵	IEDB	<a href="http://tools.iedb.org/mhci/">http://tools.iedb.org/mhci/</a>
سلول T (MHCII)	SCQEFVDLNPQTMAP	۰/۷۴۹۵	IEDB	<a href="http://tools.iedb.org/mhcii/">http://tools.iedb.org/mhcii/</a>
سلول T (MHCII)	APLLAALGAADLALA	۰/۴۶۳۱	IEDB	<a href="http://tools.iedb.org/mhcii/">http://tools.iedb.org/mhcii/</a>

جدول ۲. اسیدهای آمینه مؤثر در ایجاد پیوند هیدروژنی و طول پیوندها.

طول پیوند هیدروژنی (Å)	اسید آمینه‌های پروتئین HBHA	اسید آمینه‌های گیرنده TLR4/MD2
۲/۵۱	گلوتامین ۲۹۲	لیزین ۱۲۸
۲/۶۳	پرولین ۲۸۸	لیزین ۱۲۸
۲/۸۵	آسپاراژین ۲۷۰	آرژنین ۹۰
۳/۲۲	گلیسین ۲۷۳	آرژنین ۹۰
۲/۷۳		
۲/۵۷	آسپاراژین ۲۷۵	لیزین ۸۹
۲/۵۴		
۲/۹۸	آسپاراژین ۲۷۵	لیزین ۹۱
۲/۸۹	آسپاراژین ۲۷۵	آرژنین ۹۰

**بررسی داکینگ مولکولی:** بررسی برهمکنش پروتئین-پروتئین بین کایمر HBHA-Omp28 و گیرنده TLR4/MD2، توسط سرور ClusPro (<https://cluspro.org/login.php/redis=/queue.php>) ورژن ۲ انجام شد. به این منظور از فرمت pdb پروتئین TLR4/MD2 به عنوان گیرنده و فایل pdb بهترین مدل ریفاین شده کایمر HBHA-Omp28 که از مراحل قبل به دست آمده بود به عنوان لیگاند، استفاده شد. بهترین مدل داک شده بر اساس بزرگ‌ترین سایز کلاستر و کمترین انرژی انتخاب شد. رویت‌سازی و بررسی طول و تعداد پیوندهای هیدروژنی بین دو دمین مورد مطالعه توسط نرم‌افزارهای PyMol ورژن ۲/۵/۴ و LigPlot<sup>+</sup> ورژن ۲/۲/۸ انجام شد.

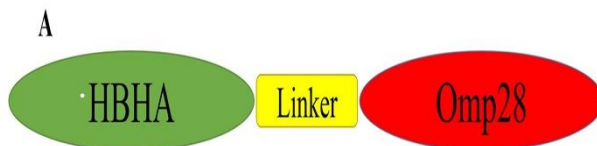
**بهینه سازی کدون‌های بیانی توالی نوکلئوتیدی کایمر نو ترکیب:** در مطالعه حاضر به منظور بهینه سازی کدون‌های بیانی توالی نوکلئوتیدی کایمر نو ترکیب در سیستم بیانی پروکاریوتی *E. Coli* سویه K-12- از سرور JCat (<http://www.jcat.de>) استفاده گردید. برای این منظور توالی اولیه در سرور بارگزاری شد و علاوه بر بهینه‌سازی کدون‌ها، حذف جایگاه‌های برشی آنزیم‌های محدودالایر اضافی و جایگاه‌های اتصال ریبوزم پروکاریوتی نیز در دستور کار قرار گرفت.

**کلونینگ توالی نوکلئوتیدی کایمر نو ترکیب:** در مطالعه حاضر امکان کلون شدن توالی نوکلئوتیدی کایمر نو ترکیب بین جایگاه برشی دو آنزیم محدودالایر *BamHI* و *HindII* (به ترتیب در انتهای ۵' و ۳') در وکتور بیانی pET21-a(+) با نرم‌افزار Snap Gene ورژن ۱/۵/۳ مورد بررسی قرار گرفت.

## نتایج

**طراحی سازه ایمونوزنیک نو ترکیب:** همان‌طور که در **تصویر ۱** مشاهده می‌شود، در سازه کایمر نو ترکیب از N انتهای به سمت C انتهای به ترتیب، توالی پروتئینی ادجوانت مولکولی HBHA از باکتری مایکوباکتریوم، لینکر سخت و غیرمنعطف EAAAK و توالی آمینواسیدی آنتی‌ژن ۲۸ کیلودالتونی غشاء خارجی باکتری *سالمونلا تیفی موربیوم* (Omp28) قرار گرفته است. این سازه نو ترکیب دارای ۳۱۳ آمینواسید باقی مانده در ساختار اول خود بود (**تصویر ۱**).

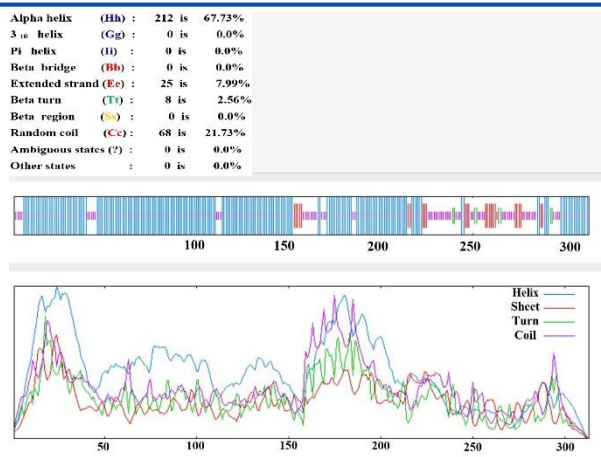
**ارزیابی آنتی‌ژن‌سنجی، آلرژن‌زایی و خواص فیزیکوشیمیایی کایمر نو ترکیب:** در مطالعه حاضر، نتایج حاصل از سرور معتبر ProtParam نشان داد، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شاخص آلفاتیک، شاخص ناپایداری و GRAVY سازه نو ترکیب طراحی شده HBHA-Omp28 به ترتیب ۳۴/۱۹، ۶/۰۱، ۸۳/۱۳، ۴۱/۱۲ و ۰/۴۵۳- بودند. علاوه بر این مشخص شد که نیمه عمر واکسن طراحی شده در پستانداران، مخمرها و باکتری *اشریشیا کلی* به ترتیب، ۳۰ ساعت، بیشتر از ۲۰ ساعت و بیشتر از ۱۰ ساعت می‌باشد. اطلاعات به دست آمده از سرورهای AllerTOP و VaxiJen نشان داد که سازه مهندسی شده مورد مطالعه (با توجه به امتیاز آنتی‌ژنی ۰/۶۳ و سطح آستانه ۰/۴) می‌تواند به عنوان یک آنتی‌ژن سبب تحریک سیستم ایمنی شود ولی در عین حال هیچ‌گونه واکنش آلرژنی در بدن ایجاد نمی‌کند.



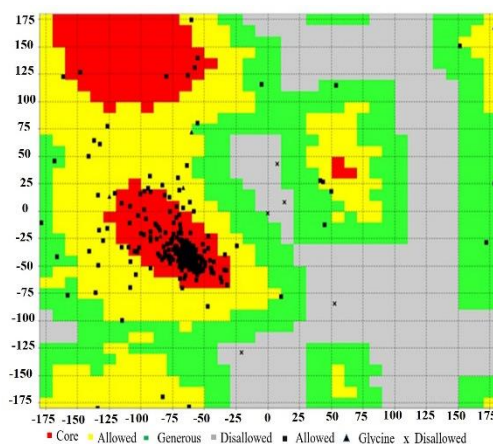
B

```
MAENSNIDDIKAPLLAALGAADLALATVNELITNLRERAETRTDTRSVEES
RARLTKLQEDLPEQLTELREKFTAELRKAEGYLEAATSRYNELVERGEAAL
ERLRSQQSFEEVSARAEGYVDQAVELTQEQALGTVASQTRAVGERAAKLVGIE
LPKKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAPAKKA
FSLATAGIIVAALVTSVSNAAATDTTKTNVTPKGMSCQEFVDLNPQTMAPVAF
WVLNEDEDFKGGDYVDFQETETAAPLAVELCKKNPQSELSKIKDEIKKELSK
```

**تصویر ۱. (A)**، سازه نهایی کایمر نو ترکیب: در این سازه به ترتیب رنگ سبز، زرد و قرمز نشان دهنده پروتئین HBHA به عنوان ادجوانت مولکولی، لینکر و پروتئین غشاء خارجی باکتری *سالمونلا تیفی موربیوم* (Omp28) می‌باشد (B)، توالی آمینواسیدی کایمر نو ترکیب طراحی شده.



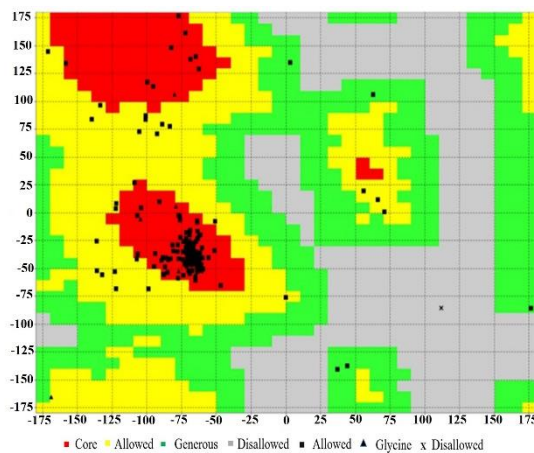
**تصویر ۲.** ساختار دوم سازه نو ترکیب به دست آمده توسط سرور SOPMA. رنگ آبی، سبز، نارنجی و قرمز به ترتیب مربوط به بخش آلفا هلیکس، پیچ بتا، پیچ‌های تصادفی و صفحات گسترده می‌باشد.



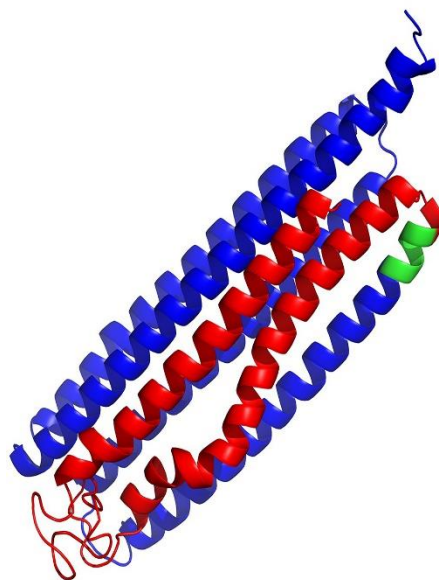
**تصویر ۳.** پلات رامچاندرا ن به دست آمده توسط سرور VADAR: پلات مربوط به ساختار سوم سازه طراحی شده قبل از ریفاین کردن است که در این مدل ۲۶۰ اسید آمینه (۸۲ درصد) در ناحیه هسته قرار داشت.

**نتایج پیش بینی اپی توپ‌های سلول‌های B و T:** محتمل‌ترین و قوی‌ترین اپی توپ‌های سلول‌های گروه T و B که بالاترین امتیاز ارائه شده را به ترتیب توسط سرورهای آنلاین IEDB و ABCpred داشتند انتخاب شدند. در ادامه آنتی ژنسیتی هر یک از اپی توپ‌های انتخاب شده از مرحله قبل مجدد توسط سرور VaxiJen با موفقیت ارزیابی شد و در نهایت از هر گروه دو اپی توپ برتر معرفی گردید (جدول ۱).

**پیش بینی ساختار دوم و سوم سازه کایمر نو ترکیب طراحی شده:** همان‌طور که در **تصویر ۲** نشان داده شده است، نتایج به دست آمده از بررسی پیش‌بینی ساختار دوم به کمک سرور SOPMA مشخص کرد که میزان حضور هر یک از ساختارهای آلفا هلیکس، پیچ‌های تصادفی، صفحات گسترده و پیچ‌های بتا به ترتیب ۶۷/۷۳، ۲۱/۷۳، ۷/۹۹ و ۲/۵۶ درصد در سازه نهایی می‌باشد. با توجه به داده‌های **تصویر ۲**، ساختار مارپیچ‌های آلفا بیشترین مقدار را در بین ساختارهای پروتئین نو ترکیب به خود اختصاص دادند. در ادامه، ساختار سه بعدی سازه نو ترکیب مورد مطالعه توسط سرور I-TASSER مدل شد و بهترین فایل pdb با ضریب اطمینان (C-Scor) ۲/۷۳- و شاخص RMSD:  $4/2A^{\circ} \pm 12/8$  انتخاب گردید. بر اساس آنالیزهای رامچاندرا ن در این مدل، ۸۲ درصد از اسیدهای آمینه در ناحیه هسته، ۱۳ درصد از آن‌ها در منطقه مجاز و ۱ درصد در منطقه خارج قرار داشتند (**تصویر ۳**). پس از ریفاین کردن این مدل توسط سرور GalaxyRefine و پس از ارزیابی توسط پلات و آنالیزهای رامچاندرا ن، مشخص شد که در مدل سه‌بعدی ریفاین شده نهایی، ۹۱ درصد اسیدهای آمینه در ناحیه هسته، ۶ درصد اسیدهای آمینه در منطقه مجاز و ۰ درصد از آن‌ها در منطقه خارج قرار داشتند (**تصویر ۴**). در نهایت بهترین مدل ریفاین شده سازه نو ترکیب HBHA-Omp28، توسط نرم‌افزار PyMol رویت‌سازی شد (**تصویر ۵**).



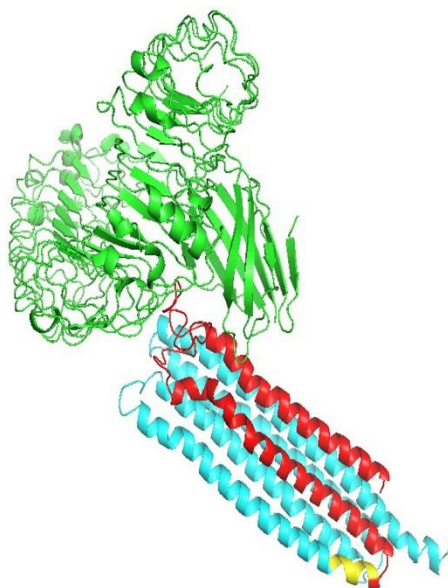
**تصویر ۴.** پلات رامچاندرا ن به دست آمده توسط سرور VADAR: پلات مربوط به ساختار سوم سازه طراحی شده بعد از ریفراین کردن است که در این مدل ۲۸۸ اسید آمینه (۹۱ درصد) در ناحیه هسته مشاهده می‌شوند.



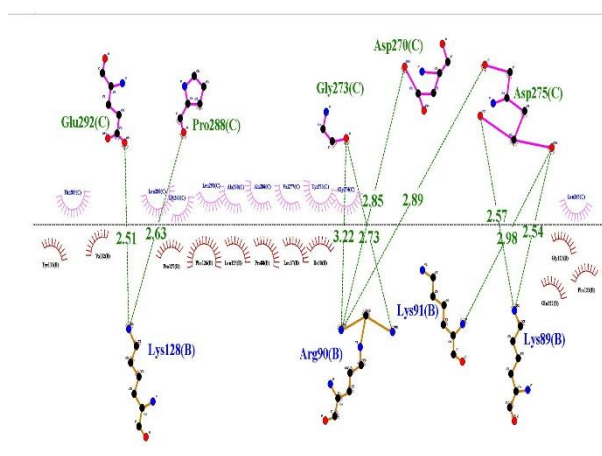
**تصویر ۵.** بهترین مدل ریفراین شده سازه نو ترکیب HBHA- Omp28 که توسط نرم افزار PyMol روی تری سازی شد. رنگ آبی نشان دهنده ساختار ادجوانت مولکولی (HBHA)، رنگ سبز معرف لینکر EAAAK بین دو دومین است و رنگ قرمز مربوط به ساختار آنتی ژن Omp28 می‌باشد.

**داکینگ مولکولی:** برای بررسی اتصال مولکولی بین پروتئین نو ترکیب و گیرنده اختصاصی TLR4/MD2، از سرور آنلاین ClusPro استفاده شد. نتایج داکینگ نشان داد که HBHA با کمترین انرژی به گیرنده خود متصل شد (تصویر ۶). این برهمکنش با ۶۰ عضو خوشه دارای امتیاز مرکز خوشه ۶۸۳/۸- بود. کمترین انرژی این اتصال ۸۶۷/۳- کیلوکالری بر مول محاسبه شد. نرم افزارهای PyMol و LigPlot+ جهت ارزیابی بیشتر محصول داک شده و برآورد تعداد و طول پیوندهای هیدروژنی مورد استفاده قرار گرفت. طبق مشاهدات ارائه شده در تصویر ۷، در طی برهمکنش مولکول HBHA با پروتئین گیرنده مولکولی TLR4/MD2، تعداد ۹ پیوند هیدروژنی ایجاد شد. اسیدهای آمینه مؤثر در ایجاد پیوندهای هیدروژنی در جدول ۲ ارائه شده است.

**بهینه سازی کدون های بیانی توالی نوکلئوتیدی کایمر نو ترکیب:** نتایج بهینه سازی کدون های بیانی توالی نوکلئوتیدی کایمر نو ترکیب در سیستم بیانی پروکاریوتی نشان داد درصد GC که توالی اولیه ۵۸/۸ درصد بود به ۵۰/۵ درصد در توالی بهینه شده تغییر یافت. همچنین شاخص بهینه سازی کدون ها (CAI) از ۰/۳۱ در توالی اولیه به ۰/۹۴ در توالی بهینه شده ارتقاء یافت.



تصویر ۶. برهمکنش بین کایمر HBHA-Omp28 و گیرنده TLR4/MD2. رنگ سبز نشان دهنده مولکول گیرنده TLR4/MD2، رنگ آبی ادجوانت مولکولی HBHA، رنگ زرد لینکر EAAAK و رنگ قرمز آنتیژن Omp28 را نشان می دهد.



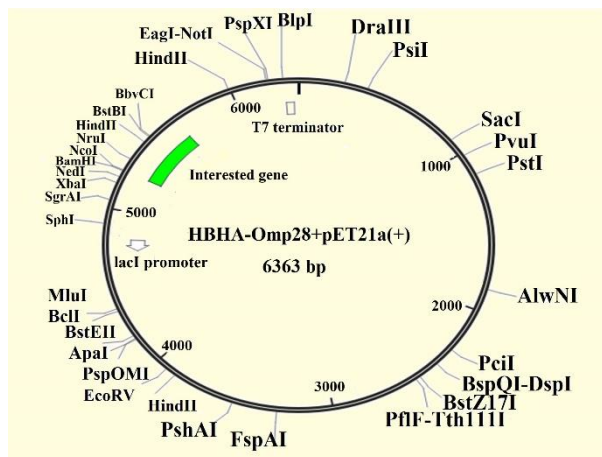
تصویر ۷. تعداد و طول پیوندهای هیدروژنی بین مولکول HBHA و گیرنده TLR4/MD2 که توسط نرم افزار LigPlot<sup>+</sup> ظاهر سازی شده است. پیوندهای هیدروژنی توسط خط چین سبز نشان داده شده است.

**کلونینگ توالی نوکلئوتیدی کایمر نو ترکیب:** نتایج کلونینگ توالی نوکلئوتیدی کایمر نو ترکیب نشان داد این توالی می تواند در pET21-a(+) به عنوان یک وکتور بیانی در سیستم پروکاریوتی کلون شود (تصویر ۸). همان طور که در تصویر ۸ نمایش داده شده است به جز انتهای ۵' و ۳'، هیچ گونه جایگاه برشی برای دو آنزیم *BamHI* و *HindIII* در طول توالی کلون شده وجود ندارد.

## بحث

*سالمونلا انتریتیدیس* و *تیفی موریوم* شایع ترین سروتیپ های سالمونلا می باشند که باعث بیماری در انسان و حیوانات می شوند. شواهد اپیدمیولوژی و باکتریولوژی نشان داد که پرندگان وحشی ممکن است عفونت را به انسان و مرغ انتقال دهند (۱۳). در مناطق شرقی آسیا میزان شیوع گونه های سالمونلا در لاشه مرغ معادل ۸/۳ درصد بیان شد (۱۲). در سال های اخیر با توجه به محدودیت واکسن های غیرفعال، ایده استفاده از واکسن های نسل جدید جهت کنترل بیماری های عفونی قوت بیشتری گرفته است. اما نقطه چالش برانگیز واکسن های نو ترکیب، تولید اندک آنتیژن نو ترکیب در میزبان پروکاریوتی می باشد. استفاده از ادجوانت مناسب با هدف تحریک





تصویر ۸. کلونینگ توالی نوکلئوتیدی کایمر HBHA-Omp28. (رنگ سبز) درون وکتور pET21+ (a)

گسترده سیستم ایمنی می تواند این مشکل را برطرف کند (۱۴، ۱۵). مطالعات مختلفی در طی سال های گذشته برای تولید واکسن های نوین مانند انواع واکسن های تحت واحدی، نو ترکیب، DNA واکسن ها و یا استفاده از ادجوانت های مختلف در ساختار واکسن انجام شد (۱۶-۱۸). امروزه طراحی و ساخت واکسن های نو ترکیب که در تهیه آن ها فقط از اجزای ایمن آنتی ژنی استفاده می شود، بسیار توسعه یافته است. این دستاورد مهم توسط علم بیوانفورماتیک و مهندسی ژنتیک امکان پذیر شده است (۱۱، ۱۹، ۲۰). دسترسی به این فناوری از یک سو اجازه تولید واکسن های نو ترکیب تشکیل شده از آنتی ژن های پروتئینی را به جای واکسن های باکتریایی و ویروسی ضعیف شده و یا غیر فعال را می دهد و از سوی دیگر تولید پروتئین نو ترکیب را در مقیاس عظیم با کمترین هزینه مقدر ساخته است (۲۱). امروزه مطالعات بیوانفورماتیکی فراوانی در زمینه طراحی و ساخت واکسن های نو ترکیب صورت گرفته است. اخیراً Shams و همکاران در سال ۲۰۱۹، با استفاده از سه پروتئین ایمنی زا یک واکسن چند اپی توپی علیه عفونت سالمونلایی طراحی کردند (۲۲). همچنین Forouharmehr و همکاران در سال ۲۰۲۲، با استفاده از علم بیوانفورماتیک، واکسن نو ترکیب مبتنی بر اپی توپ به همراه ادجوانت مولکولی طراحی کردند که می تواند کاندید مناسبی برای جلوگیری از عفونت بازبوز گاوی محسوب شود (۲۳). بر اساس مطالعه Pandey و همکاران در سال ۲۰۱۸، پروتئین های غشاء خارجی ۲۸ باکتری سالمونلا تیفی موریوم (Omp28) پتانسیل امیدوار کننده ای را به عنوان کاندیدای واکسن ارائه کرده است. این پروتئین با داشتن ۱۰۸ اسید آمینه و همچنین دارا بودن خاصیت اسیدی، قادر به تحریک هر دو نوع ایمنی همورال و سلولی با شاخص آنتی ژنی بالا می باشد. در نتیجه پروتئین Omp28 یک پروتئین آنتی ژنیک محسوب می شود (۲۴). طبق گزارشات موجود دامنه آنتی ژنیسیتهی باید بین ۰/۵۵ تا ۰/۹۲ باشد تا بتواند سیستم ایمنی را تحریک کند (۲۵، ۲۶). بر اساس نتایج سرور VaxiJen، مشخص شد که سازه مهندسی شده در مطالعه حاضر با امتیاز آنتی ژنی ۰/۶۷ خاصیت ایمنی زایی دارد و سبب تحریک سیستم ایمنی می شود. علاوه بر این، بر اساس پارامتر GRAVY می توان آبدوست یا آبریز بودن یک پروتئین را تعیین کرد. به طور کلی یک پروتئین با GRAVY منفی، به عنوان یک پروتئین آبدوست شناخته می شود (۲۷). بنابراین پروتئین نو ترکیب طراحی شده در این مطالعه با GRAVY ۰/۴۵۳ - آبدوست می باشد. از جمله مشاهدات مطالعه حاضر که می تواند به عنوان یک دستاورد مهم قلمداد شود، وزن مولکولی سازه طراحی شده است. به طور کلی چنانچه وزن مولکولی پروتئینی کمتر از ۱۰ KDa باشد، به دلیل دفع سریع از مجاری کلیوی، ماندگاری کمتری در بدن میزبان موجود زنده دارد. این موضوع می تواند به عنوان نقطه ضعف در طراحی سازه های مناسب برای ساخت واکسن در نظر گرفته شود (۲۸). نتایج بیوانفورماتیک در مطالعه حاضر نشان داد که وزن مولکولی سازه طراحی شده ۳۴/۱۹ KDa بود، لذا می توان نتیجه گیری کرد که چنین سازه ای با وزن مولکولی مذکور در بدن موجود زنده پایداری بیشتری دارد. سرورهای I-TASSER و VADAR جهت مدل سازی و ریفاین ساختار سوم سازه استفاده شدند. نتایج حاصل از ریفاین ساختار سوم نشان داد که بخش عمده اسیدهای آمینه (۹۱ درصد) در منطقه هسته قرار گرفته اند. لذا می توان بیان کرد که واکسن مهندسی شده به خوبی مدل شده است. با توجه به گزارشات موجود، کارکرد واکسن های نو ترکیب و چند اپی توپی با استفاده از لینکرهای مناسب تضمین می شود. همچنین گزارش شده است که لینکرها نقش مهمی در حفظ فضای مناسب بین اجزاء تشکیل دهنده یک واکسن را ایفا می کنند و نه تنها به ارائه صحیح واکسن به سیستم ایمنی کمک می کنند، بلکه از تشکیل ناخواسته ساختارهای حساسیت زا و آلرژیک علیه واکسن

جلوگیری می کنند (۲۹). طبق نتایج حاصل از نرم افزار CLC Main WorkBench، توالی پروتئینی آنتی ژن ۲۸ کیلو دالتونی غشاء خارجی باکتری سالمونلا تیفی موریوم (Omp28) در انتهای C و همچنین توالی پروتئینی ادجوانت مولکولی HBHA از باکتری مایکوباکتریوم در انتهای N، از طریق لینکر سخت و غیرمنعطف EAAAK به یکدیگر متصل شدند. همان طور که در قسمت نتایج نشان داده شد شاخص بهینه سازی کدون ها (CAI) سازه طراحی شده از ۰/۳۱ در توالی اولیه به ۰/۹۴ در توالی بهینه شده ارتقاء یافت که نزدیک شدن این شاخص به عدد ۱ نشان دهنده این مهم است که اکثر کدون های این سازه نو ترکیب برای بیان در سیستم پروکاریوتی بهینه شده اند. سیستم بیانی پروکاریوتی، سیستمی ارزان قیمت، ایمن و کاربر پسند می باشد که به طور گسترده ای برای تولید پروتئین های نو ترکیب ساده که نیاز به تغییرات پس از ترجمه ندارند استفاده می شود (۳۰) نتایج کلونینگ نشان داد، توالی نوکلئوتیدی کایمر نو ترکیب در وکتور بیانی pET21-a(+) که مربوط به سیستم بیانی پروکاریوتی است قابل کلون و در نتیجه تحت پروموتور T7 وکتور ذکر شده قابل بیان است.

برهمکنش ادجوانت مولکولی کایمر شده با گیرنده آن می تواند تأثیر منفی بر روی واکنش داشته باشد. در نتیجه تعامل بین ادجوانت واکنش و گیرنده آن باید به صورت دقیق ارزیابی شود (۱۷، ۲۷). نتایج داکینگ مولکولی انجام شده با استفاده از سرور ClusPro بیان می کند که پروتئین HBHA-Omp28 توانایی اتصال به گیرنده TLR4/MD2 را با حداقل اتلاف انرژی دارد. لذا بر اساس نتایج حاصل، HBHA می تواند به عنوان یک ادجوانت مولکولی مناسب در تهیه واکنش های نو ترکیب استفاده شود.

نتیجه گیری نهایی: به طور کلی می توان نتیجه گیری کرد که پروتئین نو ترکیب طراحی شده HBHA-Omp28 با وزن مولکولی KDa ۳۴/۱۹ و برهمکنش مناسب با گیرنده اختصاصی خود، کاندید مناسبی به عنوان یک واکنش کارآمد، مؤثر و محرک سیستم ایمنی علیه بیماری سالمونلوز می باشد.

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حمایت های معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان برای انجام مطالعه حاضر تشکر و قدرانی می نمایند.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

- Anwar E, Goldberg E, Fraser A, Acosta CJ, Paul M, Leibovici L. Vaccines for preventing typhoid fever. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(1):1-75. doi: 10.1002/14651858.CD001261.pub3 PMID: 24385413
- Plotkin S. History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(34):12283-7. doi: 10.1073/pnas.1400472111 PMID: 25136134
- Roth JA. Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health. *Procedia Vaccinol*. 2011;(5):127-36. doi: 10.1016/j.provac.2011.10.009 PMID: 32288915
- Singh M, T O'Hagan D. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol*. 2003;33(5-6):469-78. doi: 10.1016/s0020-7519(03)00053-5 PMID: 12782048
- Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects. *Vaccine*. 1995;13(14):1263-76. doi: 10.1016/0264-410x(95)00011-o PMID: 8585280
- Meeusen EN, Walker J, Peters A, Pastoret P-P, Jungersen G. Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):489-510. doi: 10.1128/CMR.00005-07 PMID: 17630337
- Dertzbaugh MT. Genetically engineered vaccines: an overview. *Plasmid*. 1998;39(2):100-13. doi: 10.1006/plas.1997.1329 PMID: 9514708
- Su L, Chiu C. Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J*. 2007;30(3):210. doi: 10.1006/plas.1997.1329 PMID: 17760271

9. Bender JB, Hedberg CW, Boxrud DJ, Besser JM, Wicklund JH, Smith KE, et al. Use of molecular subtyping in surveillance for *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium*. N Engl J. 2001;344(3):189-95. doi: [10.1056/NEJM200101183440305](https://doi.org/10.1056/NEJM200101183440305) PMID: [11172141](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11172141/)
10. Zahraei Salehi T. Experimental evaluation of *Salmonella Typhimurium* killed vaccines. J Vet Res. 2001;56(2):87-89. (In Persian).
11. Lin J, Ficht TA. Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. Infect Immun. 1995;63(4):1409-14. doi: [10.1128/iai.63.4.1409-1414.1995](https://doi.org/10.1128/iai.63.4.1409-1414.1995) PMID: [7890403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7890403/)
12. Shanmugasamy M, Velayutham T, Rajeswar J. Inv A gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. Vet World. 2011;4(12):562-564. doi: [10.5455/vetworld.2011.562-564](https://doi.org/10.5455/vetworld.2011.562-564)
13. Kapperud G, Stenwig H, Lassen J. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* O: 4–12 infection in Norway: evidence of transmission from an avian wildlife reservoir. Am J Epidemiol. 1998;147(8):774-82. doi: [10.1093/oxfordjournals.aje.a009522](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009522) PMID: [9554419](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9554419/)
14. Edelman R. Vaccine adjuvants. Rev Infect Dis. 1980;2(3):370-83. doi: [10.1093/clinids/2.3.370](https://doi.org/10.1093/clinids/2.3.370) PMID: [6997966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6997966/)
15. Qadir M, Azimi S, Harzandi N. Cloning and expression of VP1 gene of foot-and-mouth disease virus and fic gene of *Salmonella* in *Escherichia Coli*. J Vet Microbiol. 2017;13(1):89-98. (In Persian).
16. Nagarajan G, Kumar CA, Dechamma H, Reddy G, Ganesh K, Suryanarayana V. Cloning and expression of FMDV-VP1 immunoreactive peptide in trivalent form and its application as immunogen. Indian J Biotechnol. 2008;7(4):472-477.
17. Rodriguez LL, Grubman MJ. Foot and mouth disease virus vaccines. Vaccine. 2009;27(1):D90-D94. doi: [10.1016/j.vaccine.2009.08.039](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.039) PMID: [19837296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19837296/)
18. Ghorbanpour R, Nikbakht Gh, Jalali A H. Immuno-Bioinformatics Study of Autotransporter Protein, Antigen 43, in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated From Calves. J Vet Res. 2019;47(1):127-141. doi: [10.22059/jvr.2018.211721.2504](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.211721.2504) (In Persian)
19. Rashidian E, Forouharmehr A, Nazifi N, Jaydari A, Shams N. Computer-aided design of a novel poly-epitope protein in fusion with an adjuvant as a vaccine candidate against leptospirosis. Curr Proteomics. 2021;18(2):113-23. doi: [10.2174/1570164617666200319144331](https://doi.org/10.2174/1570164617666200319144331)
20. Nikbakht Borojeni Gh, Abasabadi F, Abiri R. Designing B and T cell multi-epitope vaccine for cross protection against *Haemophilus* strains: An immunoinformatics approach. J Vet Res. 2021;76(1):133-145. doi: [10.22059/jvr.2019.271610.2882](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.271610.2882) (In Persian)
21. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. Curr Opin Biotechnol. 2002;13(2):117-23. doi: [10.1016/s0958-1669\(02\)00300-2](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00300-2) PMID: [11950561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11950561/)
22. Shams N, Shakarami Gandabeh Z, Nazifi N, Forouharmehr A, Jaydari A, Rashidian E. Computational design of different epitope-based vaccines against *Salmonella typhi*. Int J Pept Res Ther. 2020;26(3):1527-39. doi: [10.1007/s10989-019-09959-4](https://doi.org/10.1007/s10989-019-09959-4)
23. Forouharmehr A, Nazifi N, Mousavi SM, Jaydari A. Designing an efficient epitope-based vaccine conjugated with a molecular adjuvant against Bovine Babesiosis: A computational study. Process Biochem. 2022;121:170-7. doi: [10.1007/978-3-030-96376-7-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-96376-7-1)
24. Pandey M, Saxena M. Cloning and immunopotential analysis of Omp 28 of *Salmonella Typhimurium* for the development of subunit vaccine for poultry salmonellosis. Indian J Poult Sci. 2015;50(2):138-42.
25. Forouharmehr A. Engineering an efficient poly-epitope vaccine against *Toxoplasma gondii* infection: a computational vaccinology study. Microb Pathog. 2021;152:104646. doi: [10.1016/j.micpath.2020.104646](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104646) PMID: [33242641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33242641/)
26. Vakili B, Eslami M, Hatam GR, Zare B, Erfani N, Nezafat N, et al. Immunoinformatics-aided design of a potential multi-epitope peptide vaccine against *Leishmania infantum*. Int J Biol Macromol. 2018;120:1127-39. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2018.08.125](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.125) PMID: [30172806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30172806/)
27. Chang KY, Yang J-R. Analysis and prediction of highly effective antiviral peptides based on random forests. PloS one. 2013;8(8):e70166. doi: [10.1371/journal.pone.0070166](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070166) PMID: [23940542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23940542/)
28. Jaydari A, Nazifi N, Forouharmehr A. Computational design of a novel multi-epitope vaccine against *Coxiella burnetii*. Hum Immunol. 2020;(81)10-11:596-605. doi: [10.1016/j.humimm.2020.05.010](https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.05.010) PMID: [32718721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32718721/)
29. Chen X, L. Zaro J, Shen WC. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. Adv Drug Deliv Rev. 2013;65(10):1357-69. doi: [10.1016/j.addr.2012.09.039](https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039) PMID: [23026637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23026637/)
30. Pope B, Kent HM. High efficiency 5min transformation of *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 1996;24(3):536-7. PMID: [8602370](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8602370/)