

## بررسی بیان و تیتراژ آنتی‌بادی پروتئین نوترکیب نوکلئوکپسید به عنوان یک کاندید ایمونوژن علیه ویروس سارس کوو ۲

حسین سمیعی ایبانه<sup>۱</sup> (M.Sc)، شهرام نظریان<sup>۲\*</sup> (Ph.D)، جعفر امانی<sup>۳</sup> (Ph.D)، عماد کردبچه<sup>۱</sup> (M.Sc)، امیر رضایی<sup>۴</sup> (M.Sc)

۱- گروه زیست فناوری و نانو فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشکده سیستم بیولوژی مسمومیت‌ها، بیمارستان بقیه اعظم، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اعظم (عج)، تهران، ایران

۴- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۴۸۶۱۳۳۸ kpnazari@ihu.ac.ir تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۱

### چکیده

هدف: همه‌گیری بیماری کووید-۱۹ نتیجه عفونت ناشی از ویروس سارس کوو ۲ است. آنالیز تکاملی بر اساس هم‌ردیفی توالی اسید نوکلئیک نشان می‌دهد سارس کوو ۲ عضوی از جنس بتاکروناویروس‌ها بوده و ژنوم آن متشکل از یک RNA تک‌رشته‌ای مثبت و کدکننده ۱۶ پروتئین می‌باشد. در بین پروتئین‌های ساختاری نوکلئوکپسید فراوان‌ترین پروتئین در کروناویروس‌ها بوده و توالی آمینواسیدی آن تا حد زیادی حفاظت شده است. با توجه به بروز جهش‌های زیاد در پروتئین اسپایک، هدف از این تحقیق بررسی بیوانفورماتیکی، بیان پروتئین نوکلئوکپسید و ارزیابی ایمونژنیسیته آن به عنوان یک کاندید ایمونوژن بود.

مواد و روش‌ها: بررسی اپی‌توپ‌های سلول B و T پروتئین نوکلئوکپسید در پایگاه داده IEDB انجام شد. پلاسمید pET28a-N به میزبان بیانی *E.coli* BL21 (DE3) ترانسفر و بیان پروتئین نوترکیب با القاگری IPTG انجام شد. تخلیص پروتئین نوترکیب با روش کروماتوگرافی تمایلی ستون Ni-NTA انجام و جهت تأیید آن از روش وسترن بلاتینگ استفاده گردید. در نهایت ایمنی‌زایی موش‌ها با پروتئین نوترکیب طی سه دوز صورت گرفت.

یافته‌ها: ژن بهینه‌سازی شده شاخص سازگاری کدون ۰/۹۷ را دارا شد. درصد کدون‌های با شیوع بالا در ژن به ۸۵ درصد بهبود یافت. بیان پروتئین نوترکیب در میزبان *E.coli* منجر به تولید پروتئین نوترکیب با وزن ۴۵ کیلو دالتون شد. میزان پروتئین خالص شده برای هر لیتر از محیط ۴۳ میلی‌گرم بود. ایمن‌سازی موش‌ها پاسخ آنتی‌بادی سرمی را القا کرد. آنالیزهای آماری نشان داد که میزان تیتراژ آنتی‌بادی در مقایسه با نمونه کنترل به‌طور قابل توجهی تفاوت معنی‌داری دارد و تیتراژ آنتی‌بادی تا رقت ۱/۲۵۶۰۰۰ قابل قبول بود.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این پژوهش، پروتئین نوترکیب نوکلئوکپسید می‌تواند به عنوان یک کاندید ایمونوژن جهت توسعه واکسن‌های علیه ویروس سارس کوو ۲ در تحقیقات بعدی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: کووید-۱۹، سارس کوو ۲، نوکلئوکپسید، ایمونوژن نوترکیب، اپی‌توپ

### مقدمه

همه‌گیری بیماری کووید-۱۹ (COVID-19) نتیجه عفونت ناشی از ویروس سندرم حاد تنفسی شدید کروناویروس ۲ (SARS-CoV2) است که به اندام‌های حیاتی بدن حمله می‌کند و با هدف قرار دادن سطح سلول‌های اپیتلیال آلوئول‌ها در ریه، منجر به دیسترس تنفسی کشنده می‌شود [۱]. بیماری کووید-۱۹ با علائمی از جمله تنگی نفس، تب و درد عضلانی شناخته می‌شود [۲]. طبق آمار رسمی سازمان بهداشت جهانی تعداد مبتلایان، بهبودیافتگان و فوت‌شدگان ثبت شده تا بهمن

ماه سال ۱۴۰۰ به ترتیب ۴۲۶، ۲۸۰، ۳۹۷ و ۰۳۶، ۰۲۹، ۳۱۴ و ۴۴۳، ۷۶۲، ۵ نفر بوده که این آمار در کشور ایران که رتبه نهم را در جهان از نظر تعداد مبتلایان دارد به ترتیب ۰۸۵، ۰۱۹، ۶ و ۵۸۷، ۱۷۱، ۶ و ۹۳۴، ۱۳۲ نفر بود. بنابراین درک بهتر ایمنی‌زایی و پاتوژنز عفونت‌های سارس کوو ۲ در انسان به عنوان پایه‌ای برای توسعه واکسن‌های جدید علیه سارس کوو ۲ ضروری است [۳].

آنالیز تکامل مولکولی بر اساس هم‌ردیفی توالی اسید نوکلئیک نشان می‌دهد که سارس کوو ۲ عضوی از جنس بتاکروناویروس ( $\beta$ -Coronavirus) و زیرجنس Sarbecovirus

پروتئین S است [۲۳]. تمام ادله نام برده احتمال کارایی بالاتر پروتئین N در مقایسه با S به عنوان ایمونوزن در مبتلایان هستند.

با توجه به این که نوکلئوکسپید فراوانترین پروتئین در کروناویروسها است، بسیار ایمنی‌زا است و توالی اسیدآمینیه آن تا حد زیادی همان‌طور که گزارش شده است حفظ شده است [۸]، این پروتئین می‌تواند به عنوان کاندیدی برای توسعه واکسن‌ها علیه سارس‌کوو ۲ بررسی شود. با توجه به بروز جهش‌های زیاد در پروتئین اسپایک، هدف از این تحقیق بررسی بیوانفورماتیکی، بیان پروتئین نوکلئوکسپید و ارزیابی ایمونژنیستیه آن به عنوان یک کاندید ایمونوزن بود.

### مواد و روش‌ها

طراحی سازه کدکننده پروتئین نوکلئوکسپید. توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینیه‌ای مرتبط با نوکلئوکسپید جهت ارزیابی‌های بیوانفورماتیک از پایگاه‌های داده NCBI و Uniprot استخراج گردید هم ترازوی توالی پروتئین N در بین هفت کروناویروس که انسان را آلوده می‌کنند با استفاده از پایگاه داده EMBL-EBI سرور Clustal Omega انجام شد. Clustal Omega یک برنامه تحت وب برای هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌ها (multiple sequence alignment) می‌باشد که برای هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های DNA، RNA و پروتئین به کار می‌رود [۲۴]. بهینه‌سازی توالی نوترکیب برای باکتری *E. coli* BL21 (DE3) با استفاده از ابزار OPTIMIZER در پایگاه داده HEG انجام شد. در ادامه ساختار ثانویه mRNA و سایر پارامترهای مختلف سازه نوترکیب توسط RNA Predict Secondary (RNAfold) Structure Server پیش‌بینی و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پروتئین نوترکیب نوکلئوکسپید همانند وزن مولکولی، PH، ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری، نیمه عمر و درصد اسیدآمینیه‌هایی با بار مثبت و منفی با استفاده از ابزار ProtParam ExPasy به دست آمد. برای تسهیل در خالص‌سازی و شناسایی پروتئین، توالی ۶ تایی از اسیدآمینیه هیستیدین به انتهای سازه اضافه گردید. هم‌چنین در انتهای ۵' و ۳' توالی جایگاه برش آنزیم‌های محدودکننده *EcoRI* و *HindIII* قرار داده شده. در نهایت از سرورهای آنلاین ABCpred، BepiPred-2.0 و Antibody Epitope Prediction در پایگاه داده اپیتوپ ایمنی (IEDB) برای پیش‌بینی خطی اپی‌توپ سلول B استفاده شد. IEDB مخزن اطلاعات مرتبط با اپی‌توپ‌ها است که ابزارهای بیوانفورماتیک را همراه با الگوریتم‌ها فراهم می‌کند. اطلاعات مربوط به توالی

است. ژنوم ویروسی متشکل از یک RNA تک‌رشته‌ای مثبت است که شامل ۱۴ قالب خواندن باز (ORF) است که ۱۶ پروتئین را کد می‌کند که کمپلکس رپلیکاز را تشکیل می‌دهند [۴-۶]. ژنوم کروناویروس تعداد نسبتاً کمی از پروتئین‌ها را کد می‌کند که به عنوان ساختاری یا غیر ساختاری طبقه‌بندی می‌شوند. در بین پروتئین‌های ساختاری، گلیکوپروتئین اسپایک (S) و پروتئین نوکلئوکسپید (N) عمده‌ترین آن‌ها هستند، در حالی که پروتئین پوششی (E) و پروتئین غشایی (M) اجزای ساختاری کوچک‌تری هستند [۸،۷]. در میان این چهار پروتئین ساختاری، پروتئین‌های S و N بیش‌ترین میزان ایمنی‌زایی را در مقایسه دیگر پروتئین‌ها نشان داده‌اند [۹].

پروتئین اسپایک بر روی سطح ویروس قرار گرفته است و ظاهر "تاج" که مشخصه کرونا ویروس‌ها است را ایجاد می‌کند [۱۰]. پروتئین اسپایک شامل دو زیر واحد است: S<sub>1</sub> و S<sub>2</sub>. زیر واحد S<sub>1</sub> از یک بخش انتهایی آمینی و یک بخش اتصال‌شونده به گیرنده (RBD) تشکیل شده است [۱۱،۱۰]. بخش اتصال‌شونده به گیرنده با اتصال به گیرنده هدف (ACE2) در سلول میزبان خود، اجازه ورود ویروس را می‌دهد [۱۲،۱۰]. علاوه بر این، پروتئین اسپایک دارای چندین نقطه داغ برای جهش نیز است که بیش‌ترین آن در بخش اتصال‌شونده به گیرنده مشاهده می‌شود [۱۳]. پروتئین N در جنس کرونا ویروس‌ها به شدت حفاظت شده است و یکی از فراوان‌ترین پروتئین‌های ساختاری در سلول‌های آلوده به ویروس است [۱۴]. عملکرد اساسی پروتئین N این است که RNA ژنومی ویروس را در یک کمپلکس ریبونوکلئوکسپیدی ماریچی بلند (RNP) بسته‌بندی می‌کند و از طریق برهمکنش‌های آن با ژنوم ویروس و پروتئین غشایی M در جمع‌آوری اجزای ویریون پس از آلوده‌سازی میزبان، شرکت می‌کند [۱۵]. علاوه بر این، پروتئین N در مکانیسم‌های سلولی میزبان مانند مهار اینترفرون، تداخل RNA و آپوپتوز نقش دارد و نقش تنظیم‌کننده‌ای در چرخه زندگی ویروسی دارد [۱۷،۱۶]. تمام این ویژگی‌ها در حالی است که ژن نوکلئوکسپید پایدارتر است و تا به امروز برخلاف پروتئین اسپایک جهش‌های کم‌تری به دست آورده است [۱۸].

بیش‌تر مطالعات واکسن تاکنون بر پاسخ‌های آنتی‌بادی تولیدشده علیه پروتئین اسپایک متمرکز شده‌اند که در معرض‌ترین پروتئین سارس‌کوو ۲ است [۱۹-۲۱]. با این حال، پاسخ‌های آنتی‌بادی در همه بیماران آلوده، به ویژه آن‌هایی که با شدت کم‌تری کووید-۱۹ داشتند، قابل تشخیص نبود [۲۲]. هم‌چنین در طی فرآیند تشخیص، مشخص شد که میزان تشخیص پروتئین N در بیماران PCR مثبت بیش‌تر از

تائید پروتئین نو ترکیب به وسترن بلا تیگ. پروتئین نو ترکیب از ژل SDS-PAGE با سیستم انتقال آغشته (Bio-Rad) به کاغذ پلی‌وینیلیدین دی فلورید (PVDF) توسط دستگاه Bio-Rad در شرایط شناور در بافر الکتروبلاتینگ منتقل شد. مسدودسازی غشای PVDF با محلول شیر خشک ۵ درصد در بافر PBST حاوی (۸ گرم NaCl، ۲/۹ گرم  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ، ۲/۲ گرم KCl، ۰/۲ گرم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  و ۰/۰۵ درصد Tween20) به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. در مرحله بعد غشای PVDF با بافر PBST سه مرتبه شست‌وشو داده شد هر مرحله به مدت ۱۵ دقیقه درون شیکر با سرعت ۸۰ دور بر دقیقه هم‌زده شد. سپس آنتی‌بادی کانژوگه ضد دنباله هیستدینی با رقت ۱/۱۰۰۰۰ درون بافر PBST به غشا اضافه گردید طوری که غشا به طور کامل درون محلول غوطه‌ور گردد پس از ۱ ساعت هم‌زنی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۸۰ دور بر دقیقه همانند شست‌وشوی قبلی غشا را شست‌وشو داده و بعد محلول DAB را به غشا اضافه کرده و پس ظاهر شدن باند پروتئین نو ترکیب با استفاده از  $\text{ddH}_2\text{O}$  واکنش رنگ‌دهی متوقف گردید.

ایمنی‌زایی در موش‌های آزمایشگاهی. موش‌های ماده BALB/c (۶ تا ۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران) که هیچ دارو یا واکسنی دریافت نکرده بودند و وزن تقریبی آن‌ها ۲۵ گرم بود برای آزمایش‌های ایمن‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند. قبل از هرگونه آزمایشی بر روی حیوان، موش‌ها به مدت یک هفته بدون محدودیت دسترسی به آب و غذا و در شرایط دمایی  $22 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد و چرخه خواب و بیداری مناسب (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد نگهداری شدند و تمامی آزمایشات مطابق پروتکل نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت. برای تجویز زیر جلدی، موش‌ها به دو گروه تقسیم شدند: گروه آزمایش که ۲۰ میکروگرم پروتئین نو ترکیب را در ترکیب با ادجوانت کامل فروند در تزریق اول و ۱۵ و ۱۰ میکروگرم همراه با ادجوانت ناقص فروند به ترتیب در تزریق دوم و سوم دریافت کردند (۱۰ عدد) و گروه کنترل که PBS را در ترکیب با ادجوانت فروند دریافت کردند (۵ عدد). در نهایت به هر موش حجم ۲۰۰ میکرولیتر به صورت زیر جلدی در سه نوبت به فاصله دو هفته در هر نوبت تزریق شد. قبل از تزریق و یک هفته پس از تزریقات خون‌گیری از چشم موش‌ها و جداسازی سرم انجام‌شده و برای مراحل بعدی در ۲۰- نگهداری شد.

بررسی تیتراژ آنتی‌بادی با روش الایزای غیرمستقیم. تیتراژ آنتی‌بادی با روش الایزا (Enzyme linked immunosorbant

آپتوب، آنتیژن مرجع و موجودی که توالی از آن برگرفته شده را ارائه می‌دهد. سروهای پیش‌بینی اپی‌توپ آنتی‌بادی در صفحه ابزار پیش‌بینی سلول‌های B در IEDB قابل دسترسی بودند و آستانه روی ۰/۳۵ (آستانه پیش‌فرض) تنظیم شد [۲۵].

بیان و خالص‌سازی پروتئین نو ترکیب نوکلئوکسپید. پلاسمید نو ترکیب pET28a-N (دریافت شده از شرکت Shinegene) به سلول مستعد شده از سویه بیانی *E. coli* BL21 (DE3) (دریافت شده از آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین) با روش شوک حرارتی ترانسفورم شد. باکتری‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب pET28a-N در محیط مایع لوریا برتانی (LB) حاوی کانامایسین با غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تلقیح و ۱۸ ساعت در انکوباتور با حرکت دورانی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. از این کشت ۱۸ ساعته برای تلقیح محیط مایع جدید LB حاوی کانامایسین استفاده شد. محیط مذکور در انکوباتور با حرکت دورانی قرار گرفت و زمانی که کدورت محیط در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ رسید القای بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از Isopropyl- $\beta$ -d- thiogalactopyranoside (IPTG) با غلظت نهایی یک میلی‌مولار انجام شد. نمونه‌های رسوب زمان صفر الی ۴ ساعت از باکتری‌های القا شده گرفته شد و پس از سونیکاسیون میزان بیان پروتئین نو ترکیب N با روش SDS-PAGE و با رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو R250 در نرم‌افزار GelAnalyser ورژن ۱۹/۲ ارزیابی گردید. برای تخلیص پروتئین نو ترکیب یک کشت ۱۸ ساعته از باکتری *E. coli* BL21 (DE3) به شکلی که شرح داده شد تهیه و از آن برای تلقیح ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط تازه LB استفاده گردید. بعد از این‌که باکتری‌ها به کدورت مناسب رسیدند با IPTG یک میلی‌مولار القاء و به مدت ۴ ساعت بعد از آن در ۳۷ درجه سلسیوس و هم‌زنی ۱۶۰ دور بر دقیقه گرماگذاری شد. پس از طی شدن این زمان، سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور بر دقیقه جمع‌آوری و در بافر فسفات (PBS) یک‌نواخت گردید. دیوار سلولی از طریق سونیکاسیون (قدرت ۷۰ و ۰/۵ سیکل به مدت ۱۰ ثانیه و ۳ مرتبه) شکسته شده و سپس در حداکثر دور به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و محلول رویی جدا شد. در نهایت این پروتئین با خالص‌سازی به روش کروماتوگرافی رزین نیکل به کمک برچسب‌گذاری شده با His از *E. coli* در شرایط دنا توره خالص شد. در نهایت پروتئین علیه بافر تخلیص‌کننده دیالیز گردید.

شامل ۴۱۹ اسید آمینه و جرم مولکولی ۴۵/۶۵ کیلودالتون بود، نقطه ایزوالکتریک آن ۱۰/۰۷ می‌باشد. مجموع اسید آمینه‌های با بار منفی (گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید) ۳۶ عدد و مجموع اسید آمینه‌های با بار مثبت (آرژینین، لیزین) ۶۰ عدد می‌باشد. شاخص آلفاتیکی نیز ۵۲/۵۳ و شاخص ناپایداری پروتئین نیز ۲۱/۲۲ می‌باشد. نوکلئوکپسید سارس‌کوو ۲ هر دو اپی‌توپ سلول B و T، که در کل پروتئین توزیع شده است، را نشان می‌دهد (شکل ۳). توالی‌های متناظر آنتی‌ژن‌بسته پیش‌بینی شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب. فرآیند القا و بیان پروتئین نوترکیب N صورت گرفت و نمونه‌ها پس از آماده‌سازی، بر روی ژل اکریل‌آمید ۱۲ درصد با وزن مولکولی ۴۵ کیلو دالتون در مقایسه با نمونه القا نشده (کنترل) مشاهده شد (شکل ۴). با توجه به تشکیل اجسام انکلوزن بادی در سلول باکتری از بافر اوره ۸ مولار جهت استخراج پروتئین نوترکیب استفاده شد که برای جلوگیری از فولدینگ نامناسب پروتئین در مرحله تخلیص از ترکیب روش دنا توره و غیردنا توره استفاده شد که پس از اضافه کردن بافر E اوره ۸ مولار با PH برابر ۴ از بافر ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار در PH برابر ۸ استفاده شد (شکل ۵).

تأیید پروتئین نوترکیب N به روش وسترن بلاتینگ. پس از تخلیص پروتئین نوترکیب در شرایط غیردنا توره و بر روی ستون نیکل جهت اطمینان از صحت پروتئین‌های نوترکیب تولید شده، از روش وسترن بلاتینگ استفاده شد. برای این منظور پروتئین نوترکیب خالص شده، الکتروفورز گردید و سپس به کاغذ PVDF منتقل شد. با انجام وسترن بلاتینگ مشخص شد که آنتی‌بادی ضد هیستدینی به‌طور اختصاصی با His-Tag پروتئین نوترکیب متصل شده است (شکل ۵).

بررسی تیتراژ آنتی‌بادی سرم موش‌های ایمن شده با پروتئین نوترکیب. حساسیت آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده علیه آنتی‌ژن نوترکیب N از طریق ایزا بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۶ دیده می‌شود تجویز زیربوستی پروتئین نوترکیب منجر به تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌سرم شد. تیتراژ آنتی‌بادی علیه پروتئین پس از هر بار تزریق افزایش داشت. نتایج به‌دست آمده از تیتراژ آنتی‌بادی نشان می‌دهد که در حیوان‌های ایمن شده تیتراژ آنتی‌بادی به‌صورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود ( $P < 0.01$ ). هم‌چنین افزایش تیتراژ آنتی‌بادی در تزریق سوم نسبت به تزریق دوم به لحاظ آماری معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ).

assay) تعیین شد. ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب داخل ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ (۰/۲ مولار  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ، ۰/۲ مولار  $\text{NaHCO}_3$ ) درون چاهک‌های الایزا (Caspian) یک نواخت شد. پس از هر مرحله چاهک‌ها با بافر سه مرتبه شست‌وشو گردید. سپس با شیر خشک ۵ درصد بدون چربی در PBST به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مسدود شد. چاهک‌های شسته شده با نمونه‌های سرم از رقت ۱:۲۰۰ تا ۱:۱۲۵۶۰۰ درون PBST رقیق و به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. چاهک‌ها سه بار با PBST شسته شدند و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه (ضد موشی کانژوگه با HRP) با رقت ۱:۲۰۰۰۰ در بافر PBST به هر چاهک اضافه شد. صفحه به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و سپس چهار بار در PBST شست‌وشو شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا حاوی ۳ میلی‌گرم OPD به هر چاهک اضافه گردید. در نهایت پس از رنگ گرفتن، واکنش با  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ۲/۵ مولار متوقف شد و جذب در نانومتر ۴۹۵ بر روی خواننده میکروپلیت خوانده شد.

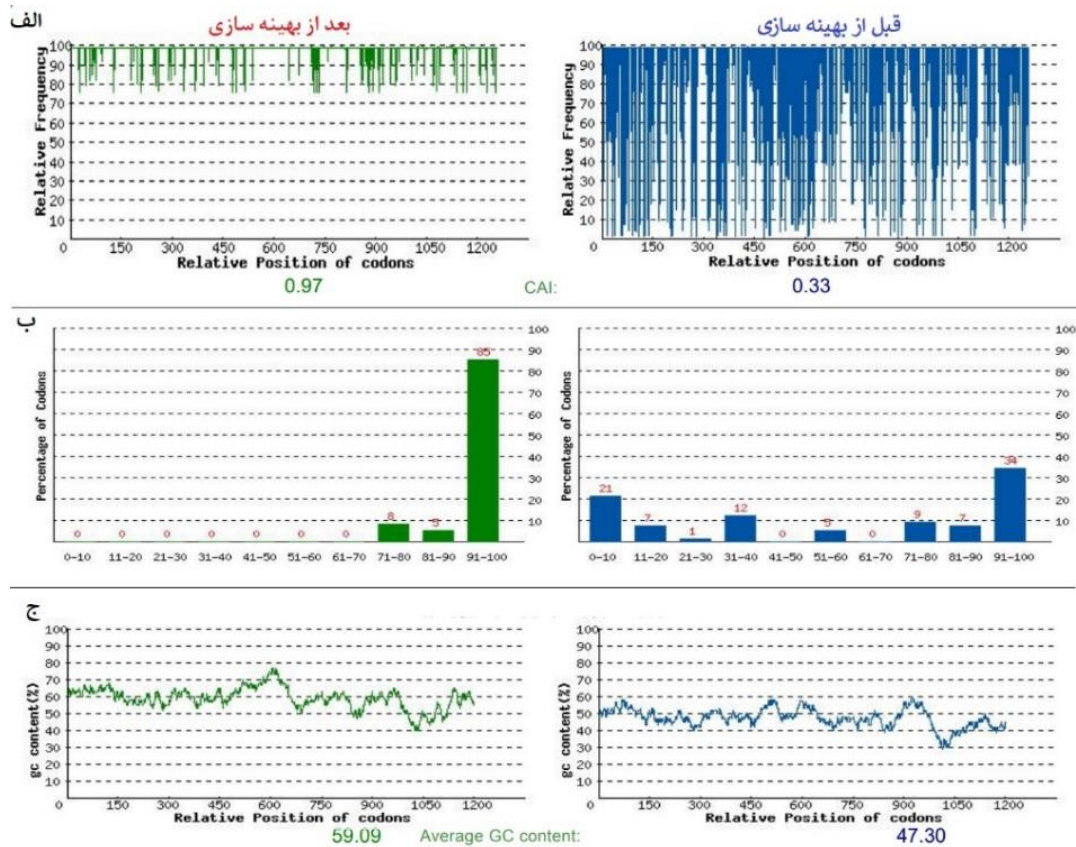
تجزیه و تحلیل آماری. برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از انوای یک طرفه انجام و مقایسه میانگین در سطح تجویز دوم و سوم با استفاده از آزمون t انجام شد. عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

## نتایج

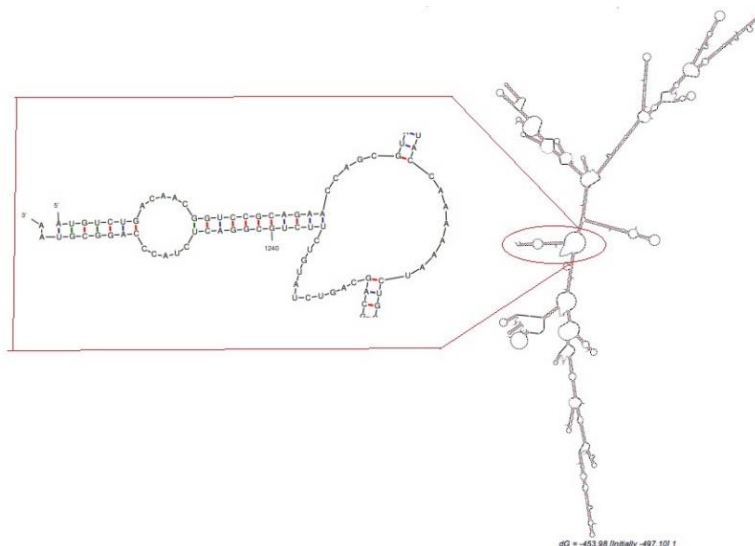
بیوانفورماتیک و ایمونوآفورماتیک پروتئین نوترکیب. توالی ژنوم ویروس سارس‌کوو ۲ و توالی اسید آمینه‌ای پروتئین N سویه وهان به ترتیب با عدد دسترسی NC\_045512.2 و sp-P0DTC9 از پایگاه‌های داده GeneBank و Uniprot استخراج و در فورمت FASTA ذخیره گردید. توالی نوکلئوتیدی پروتئین N برابر ۱۲۶۰ جفت باز بود. پس از بهینه‌سازی توالی نوکلئوتیدی میزان سازگاری کدونی از ۰/۳۳ به ۰/۹۷ افزایش یافت هم‌چنین درصد نوکلئوتید GC ۴۷/۳۰ درصد به ۵۹/۰۹ درصد افزایش یافت که این میزان در بازه درصد ایده‌آل قرار دارد (شکل ۱). ساختار پیش‌بینی شده در نقطه شروع ۵' (آغاز ترجمه) ساختارهای گره ساختگی و یا لوپ‌های بلند را که بر شروع ترجمه تأثیر دارند، دیده نمی‌شود. میزان حداقل انرژی این ساختار ۴۹۷/۱۰- کیلوکالری بر مول بود (شکل ۲). بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین با استفاده از برنامه PROTPARAM نشان داد که وزن مولکولی پروتئین نوکلئوکپسید نوترکیب

جدول ۱. آنتیژن های پیش بینی شده برای پروتئین نوکلئوکسپید از ویروس سارس کوو ۲

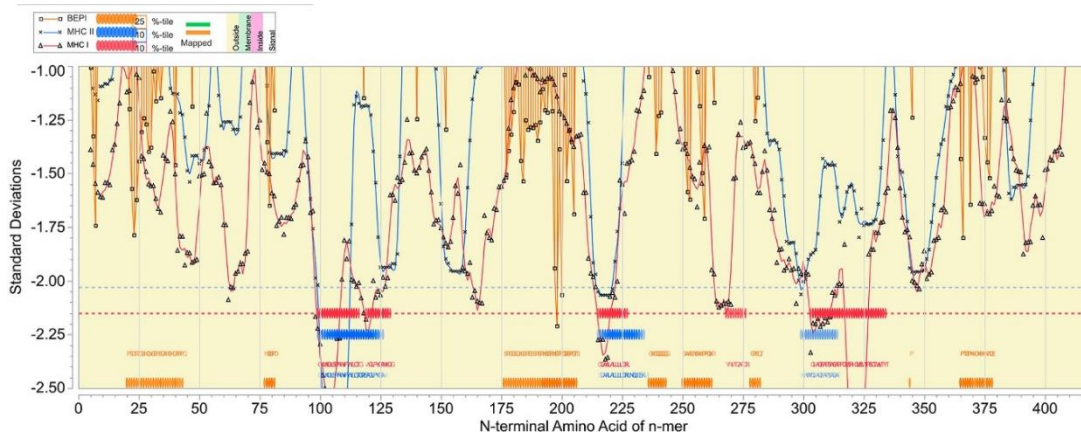
اپیتوپ‌های سلول B		مناطق اتصال به MHC I	
Position	Peptide sequence	Position	Peptide sequence
21–32	SDSTGSNQNGER	209–232	RMAGNGGDAALALLLDRLNQLES
76–82	TNSSPDD	261–279	KRTATKAYNVTQAFGRGPG
176–206	SRGGSQASSRSSSRNSTRNTPGSSRGTS	306–335	QFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTG
235–243	SGKGQQQQG	<b>مناطق اتصال به MHC II</b>	
249–263	KSAAEASKKPRQKRT	97–127	GGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANK
363–379	FPPTPEPKDKKKKADET	213–238	NGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKG
363–379	FPPTPEPKDKKKKADET	293–320	RQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSR



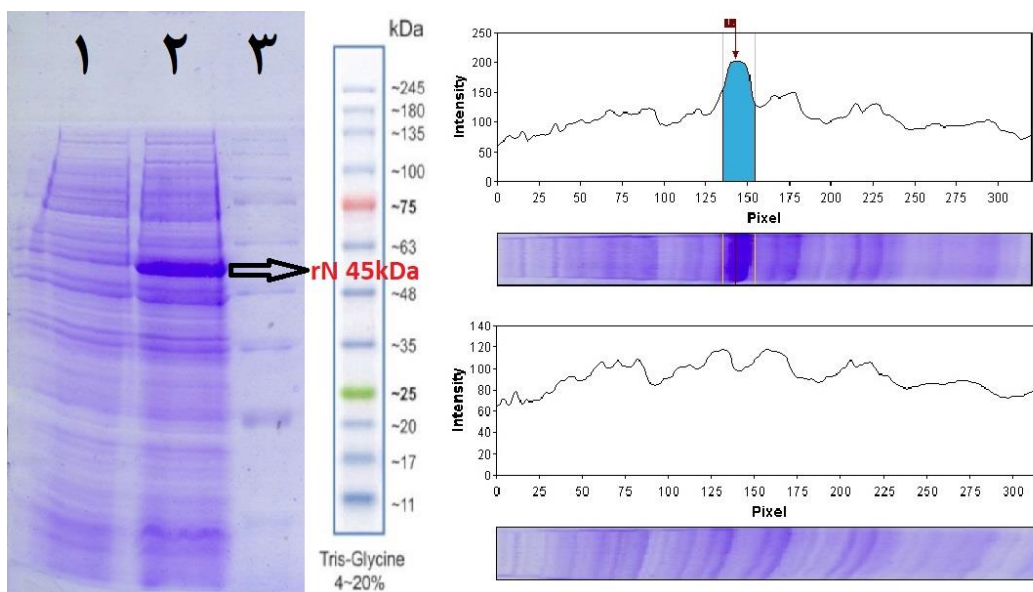
شکل ۱- بررسی بهینه سازی کدونی با سرور GenScript. ضریب سازگاری کدونی و درصد GC برای توالی ژن نو ترکیب بعد از بهینه سازی نسبت به قبل از این فرایند بهبود یافته است و توزیع فراوانی کدونی و تعداد عناصر CIS منفی نیز در وضعیت بعد از بهینه سازی نسبت به قبل از آن کاهش یافته است



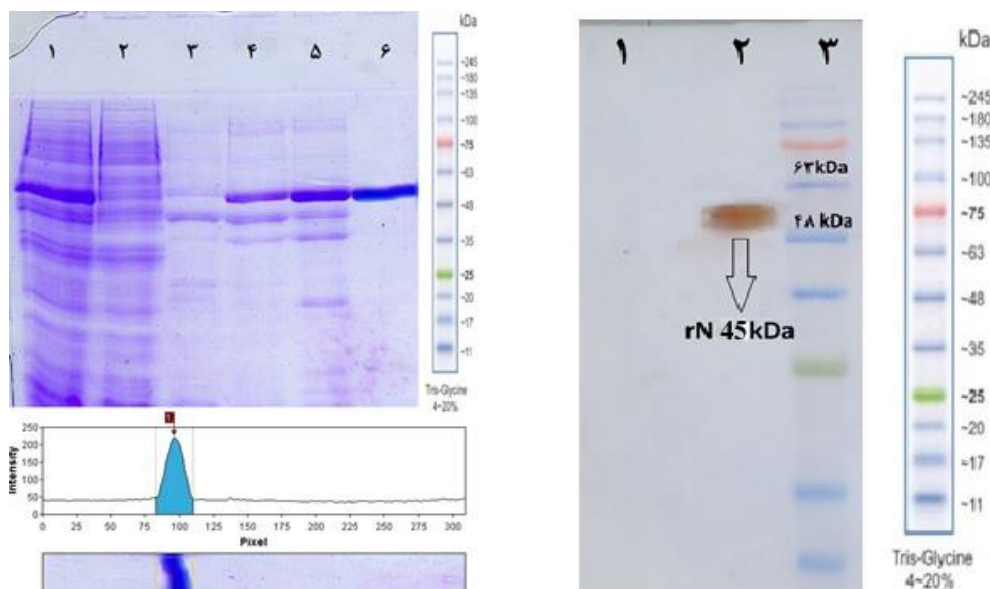
شکل ۲ پیش بینی ساختار mRNA بعد از بهینه سازی. بخش بزرگنمایی شده از شکل نشان دهنده انتهای 5' ساختار mRNA تاخوردن مربوط به نوکلئوکسپید می باشد که کدون آغاز در آن واقع شده است که فاقد گره و لوپ می باشد.



شکل ۳- نقشه برداری اپی توپ پروتئین نوکلئوکسپید سارس کوو ۲. محور X موقعیت اسید آمینه‌ها در توالی پروتئین نوکلئوکسپید را نشان می‌دهد و محور Y نشان‌دهنده میل اتصالی اپیتوپ پیش‌بینی شده در واحدهای انحراف استاندارد برای پروتئین است.



شکل ۴- بررسی بیان پروتئین نو ترکیب نوکلئوکسپید با نرم افزار GelAnalyse. ستون ۱ نمونه القا نشده (کنترل منفی)، ستون ۲ نمونه القا شده با القاگر IPTG ۱ میلی مولار، ستون شماره ۳ مارکر پروتئینی سیناکلون، نتایج بررسی با نرم افزار GelAnalyse نشان از تغییر در باند های پروتئینی در موقعیت ۴۵ کیلو دالتونی داشت



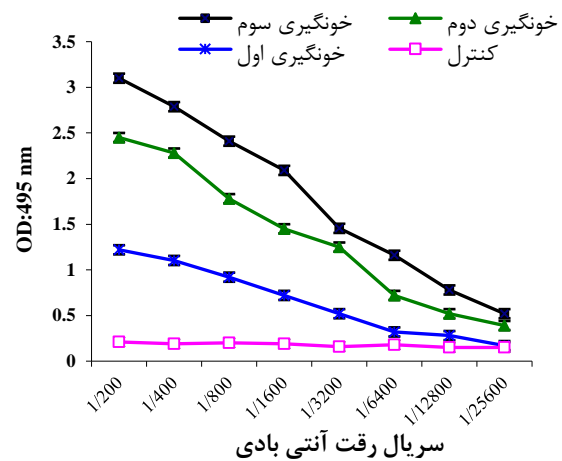
شکل ۵- بررسی فرآیند خالص سازی و نائید پروتئین نو ترکیب. سمت چپ تخلیص پروتئین نو ترکیب به صورت غیر دنا توره، ستون ۱ نمونه قبل از خالص سازی، ستون ۲ نمونه عبوری از ستون کروماتوگرافی تمایلی، ستون ۳ بافر اوره ۸ مولار PH=۶/۳، ستون ۴ بافر اوره ۸ مولار PH=۵/۴، ستون ۵ بافر اوره ۸ مولار PH=۴/۲، ستون ۶ بافر ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار، نتایج آنالیز با نرم افزار GelAnalyser خالص سازی ۹۵ درصدی در بافر ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار را نشان می‌داد. سمت راست نتیجه تائید پروتئین نو ترکیب با استفاده از آنتی بادی ضد دنباله هیستدین، ستون ۱ پروتئین BSA به عنوان کنترل منفی، ستون ۲ نمونه تخلیص شده در بافر ایمیدازول ۲۵۰، ستون ۳ مارکر پروتئینی سیناکلون

سارس کوو ۲ مبتلا می‌شوند [۲۸،۲۷]. این داده‌ها نشان می‌دهند که در حالی که آنتی‌بادی‌های پروتئین ضد S ممکن است برای کنترل تیتراهای ویروسی در طول یک عفونت مداوم کلیدی باشند، سایر واسطه‌های ایمنی ممکن است مسئول ایجاد مصونیت طولانی‌مدت به سارس کوو ۲ باشند. بر این اساس در مطالعه حاضر بررسی تیترا آنتی‌بادی پروتئین N، مورد مطالعه قرار گرفت.

در این پژوهش در ابتدا از ابزارهای بیوانفورماتیک جهت طراحی یک ایمونوژن مناسب استفاده شد این ابزارها علاوه بر سرعت و ایمنی زیستی، مزیت بی‌طرفی در طراحی پروتئین ایمونوژن را نیز دارند. در این‌جا، از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک برای تعیین پتانسیل آنتی‌ژنی پروتئین نوکلئوکسپید ویروس سارس کوو ۲ سویه وهان استفاده شد.

پس از طراحی توالی ژن نو ترکیب، بهینه‌سازی کدون‌ها انجام گرفت. افزایش CAI و رسیدن آن به ۰/۹۷، مشخص‌کننده این مطلب است که ژن مورد نظر با بیان خوبی همراه خواهد بود. یکی از فاکتورهای مهم در طراحی ژن و بهینه‌سازی کدونی توجه به پایداری ساختار mRNA می‌باشد. به منظور بررسی پایداری ساختار RNA، میزان  $\Delta G$  و نیز وجود ساختارهایی از قبیل لوپ‌های کاذب ارزیابی شد. یکی از ویژگی‌های ساختار mRNA مربوط به سازه ژنی نوکلئوکسپید، عدم وجود ساختارهای گره ساختگی و یا لوپ‌های بلند در نقطه شروع ۵' (آغاز ترجمه) بود. این ساختارها بر شروع ترجمه تأثیر دارند. میزان حداقل انرژی این ساختار ۴۹۷/۱۰- کیلوکالری بر مول محاسبه شد که نشان می‌دهد mRNA دارای پایداری کافی برای بیان در سیستم میزبان است. شاخص ناپایداری پروتئین نو ترکیب نوکلئوکسپید با سرور ProtParam ۲۱/۲۲ پیش‌بینی شد. شاخص ناپایداری بیان‌گر میزان پایداری پروتئین نو ترکیب بوده به گونه‌ای که پروتئین‌هایی با شاخص کم‌تر از ۴۰ جزو پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شوند. نتایج بررسی اپی‌توپ‌ها نشان داد که در نواحی آمینواسیدهای ۲۰۶-۱۷۶ و ۲۱۳-۲۳۸ اپی‌توپ‌های قوی برای سلول‌های B و T وجود دارند که در پژوهش‌های دیگر نیز این مسئله ثابت شده است [۲۹].

پس از طراحی‌های بیوانفورماتیک سازه درون پلاسمید بیان pET28a(+) سفارش داده شد. در پژوهش‌های متعددی از سیستم بیانی pET جهت بیان پروتئین نو ترکیب استفاده شده است به عنوان مثال در پژوهشی آقای رابرت و همکاران این سیستم را به عنوان یکی از قوی‌ترین سیستم‌های بیانی معرفی کردند که می‌تواند تا ۵۰ درصد از پروتئین‌سازی سلول باکتری



شکل ۶. بررسی تیترا آنتی‌بادی سرم موش‌های ایمن شده با پروتئین نوکلئوکسپید، تیترا آنتی‌بادی سرم حاصل از خونگیری سوم در رقت ۱/۲۵۶۰۰۰ معنی‌دار بود. سرم موش ایمن نشده به‌عنوان کنترل استفاده شد ( $P < 0/01$ ).

### بحث و نتیجه‌گیری

ظهور ناگهانی سارس کوو ۲ ظاهراً از خفاش‌ها نشانگر این است که بتاکرونا ویروس‌های مشابهی ممکن است در آینده ظاهر شوند. بنابراین، تعیین این‌که آیا آنتی‌ژن‌های بالقوه‌ای وجود دارند که حفاظت شده باشند و می‌توانند در برابر کروناویروس‌های مشترک بین انسان و دام در آینده محافظت کنند، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. هم‌چنین با توجه به اثبات جهش‌پذیری بالای پروتئین اسپایک در کرونا ویروس‌ها [۱۳] و گزارش‌های کم‌تری از جهش در پروتئین نوکلئوکسپید در عین ایمنی‌زایی بالا [۱۸]، استفاده از این پروتئین به عنوان ایمونوژن احتمالاً مقاومت در برابر سویه‌های دیگر را نیز در بر داشته باشد. در تئوری، پروتئین اسپایک باید برای توسعه واکسن در نظر گرفته شود. اما چالش‌هایی برای این پیشنهاد ایده‌آل ایجاد شده است از جمله گلیکوزیلاسیون زیاد و جهش‌های پروتئین S که تولید این پروتئین در مقیاس صنعتی و هم‌چنین ایجاد حفاظت علیه ویروس را مشکل کرده است. وانگ و همکاران گزارش کرده‌اند داوطلبانی که با تزریق واکسن مدرنا (mRNA-1273) یا فایزر (BNT162b2)، واکسن‌های mRNA پروتئین S علیه سارس کوو ۲ که بهترین واکسن‌های علیه RBD بودند، تیترا بالایی از آنتی‌بادی‌های IgM و IgG را علیه پروتئین S و RBD نشان دادند [۲۶]. هم‌چنین گزارش شده است که فعالیت خنثی‌کننده پلازما و تعداد نسبی سلول‌های B حافظه اختصاصی RBD در افراد واکسینه شده مشابه بیمارانی است که از عفونت طبیعی بهبود یافته‌اند. با این حال وجود آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه پروتئین S و RBD، محافظت کاملی در برابر عفونت سارس کوو ۲ در افراد واکسینه شده ایجاد نمی‌کند، حتی در زیرمجموعه‌ای از افرادی که اخیراً واکسینه شده‌اند، هنوز به

بررسی‌های بیشتر در خصوص ایمنی‌زایی این پروتئین علیه ویروس سارس‌کوو ۲ باشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از دانشگاه جامع امام حسین(ع)، جهت پشتیبانی و همکاری در طول دوره انجام طرح اعلام می‌دارند.

### مشارکت و نقش نویسندگان

نقش هر یک از نویسندگان این مقاله به شرح زیر است: نویسندگان شهرام نظریان و جعفر امانی: ایده و طراحی مطالعه، حسین سمیعی ایبانه: جمع‌آوری داده‌ها، عماد کردبچه: آنالیز و تفسیر نتایج، امیر رضایی: نگارش نسخه اول مقاله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

### منابع

- [1] Shimizu K. 2019-nCoV, fake news, and racism. *Lancet* 2020; 395: 685-686. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30357-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30357-3)
- [2] Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395: 497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- [3] Dahlke C, Heidepriem J, Kobbe R, Santer R, Koch T, Fathi A, et al. Distinct early IgA profile may determine severity of COVID-19 symptoms: an immunological case series. *Med Rxiv* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20059733>
- [5] Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends Immunol* 2020; 41: 1100-1115. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
- [4] Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020; 579: 265-269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- [6] Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020; 395: 565-574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- [7] Cheng Y, Feng Y, Luo P, Gu J, Yu S, Zhang WJ, et al. Fusion expression and immunogenicity of EHEC EspA-Stx2AI protein: implications for the vaccine development. *J Microbiol* 2009; 47: 498-505. <https://doi.org/10.1007/s12275-009-0116-8>
- [8] Tilocca B, Soggiu A, Musella V, Britti D, Sanguinetti M, Urbani A, et al. Molecular basis of COVID-19 relationships in different species: a one health perspective. *Microbes Infect* 2020; 22: 218-220. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.03.002>
- [9] Meyer B, Drosten C, Müller MA. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls. *Virus Res* 2014; 194: 175-183. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.018>
- [10] Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LF. The trinity of 467 COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* 2020; 20: 363-374. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
- [11] Mercurio I, Tragni V, Busto F, De Grassi A, Pierri CL. Protein structure analysis of the interactions between SARS-CoV-2 spike protein and the human ACE2 receptor: from conformational changes to novel neutralizing

را به خود اختصاص دهد [۳۰]. جوکیچ و همکاران نیز در مطالعه‌ای جهت تخلص پروتئین نوکلئوکسپید هم‌زمان از دو روش متوالی کروماتوگرافی سائز و کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA استفاده کردند. این در حالی است که در تحقیق حاضر با طراحی انجام شده و قرار دادن توالی شش هیستیدین در انتهای کربوکسیل پروتئین فقط با استفاده از یک مرحله روش کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA، پروتئین نوکلئوکسپید با خلوص بالاتری در مقایسه با پژوهش جوکیچ به دست آمد [۳۱].

پس از بیان با القاگری IPTG و خالص‌سازی با روش کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA، تزریق زیر جلدی موش‌های آزمایشگاهی در سه نوبت با غلظت‌های ۲۰، ۱۵ و ۱۰ میکروگرم از پروتئین نوکلئوکسپید انجام شد. در این روش تجویز آنتی‌ژن شیب ایمونوژن از ۲۰ تا ۱۰ میکروگرم لحاظ شد. بر اساس تجربیات قبلی و برخی مستندات استفاده از این روش سبب تکثیر بیش‌تر لئوسیت‌های سلول B با تمایل بالا نسبت به اپی‌توپ‌های پروتئین می‌گردد [۳۲].

پژوهش تیلوکا بر روی اپی‌توپ‌های پروتئین N از سارس‌کوو ۱ نشان داد که قادر به تولید انبوه آنتی‌بادی در افراد آلوده گزارش کردند [۸]. به طور مشابه در مرس (MERS)، نوکلئوکسپید به عنوان یک واکنش بالقوه مورد بررسی قرار گرفته است [۳۳، ۳۴]. برت و همکاران هم‌چنین نشان دادند که بیماران سابق سارس‌کوو دارای سلول‌های T حافظه طولانی‌مدت هستند که بیش از ۱۷ سال پس از اپیدمی سارس در سال ۲۰۰۳ به پروتئین N واکنش نشان می‌دهند این سلول‌های حافظه T نیز واکنش متقاطع زیادی به پروتئین N سارس‌کوو ۲ داشتند که نشان می‌دهد این افراد ممکن است کم‌تر مستعد ابتلا به عفونت سارس‌کوو ۲ و سایر کروناویروس‌های مشابه باشند [۳۵]. بنابراین این پروتئین جهت ارزیابی به عنوان یک ایمونوژن در سارس‌کوو ۲ نیز می‌تواند مناسب باشد.

از آن‌جا که مشخص شده جهش زیادی در پروتئین اسپایک ویروس رخ داده و این تغییرات می‌تواند کارایی واکنش‌ها و ایمونوژن‌های طراحی شده مبتنی بر این پروتئین را تحت تاثیر قرار دهد، به نظر می‌رسد شواهد موجود از جمله حفاظت‌شدگی توالی در سویه‌های مختلف ویروس به همراه نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر در خصوص وجود شاخصه‌های اپی‌توبی سلول‌های B و T در ساختار پروتئین نوکلئوکسپید، و افزایش بالای تیتراژ آنتی‌بادی در حیوان آزمایشگاهی علیه پروتئین نوکلئوکسپید، می‌تواند زمینه‌ساز



- [24] Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* 2019; 47: W636-W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- [25] Saha S, Raghava GP. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins* 2006; 65: 40-48. <https://doi.org/10.1002/prot.21078>
- [26] Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, Barnes CO, Finkin S, et al. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature* 2021; 592: 616-622. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03324-6>
- [27] Dagan N, Barda N, Kepten E, Miron O, Perchik S, Katz MA, et al. BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine in a nationwide mass vaccination setting. *N Engl J Med* 2021; 384: 1412-1423. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101765>
- [28] Keehner J, Horton LE, Pfeffer MA, Longhurst CA, Schooley RT, Currier JS, et al. SARS-CoV-2 infection after vaccination in health care workers in California. *N Engl J Med* 2021; 384: 1774-1775. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2101927>
- [29] Oliveira SC, de Magalhães MT, Homan EJ. Immunoinformatic analysis of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and identification of COVID-19 vaccine targets. *Front Immunol* 2020; 2758. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.587615>
- [30] Mierendorf RC, Morris BB, Hammer B, Novy RE. Expression and purification of recombinant proteins using the pET system. *Methods Mol Med* 1998; 13: 257-292. <https://doi.org/10.1385/0-89603-485-2:257>
- [31] Djukic T, Mladenovic M, Stanic-Vucinic D, Radosavljevic J, Smiljanic K, Sabljic L, et al. Expression, purification and immunological characterization of recombinant nucleocapsid protein fragment from SARS-CoV-2. *Virology* 2021; 557: 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.01.004>
- [32] Leenaars M, Hendriksen CF. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J* 2005; 46: 269-279. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.269>
- [33] Shi J, Zhang J, Li S, Sun J, Teng Y, Wu M, et al. Epitope-based vaccine target screening against highly pathogenic MERS-CoV: an in silico approach applied to emerging infectious diseases. *PLoS One* 2015; 10: e0144475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144475>
- [34] Veit S, Jany S, Fux R, Sutter G, Volz A. CD8+ T cells responding to the Middle East respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein delivered by vaccinia virus MVA in mice. *Viruses* 2018; 10: 718. <https://doi.org/10.3390/v10120718>
- [35] Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CY, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* 2020; 584: 457. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
- antibodies. *Cell Mol Life Sci* 2021; 78: 1501-1522. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03580-1>
- [12] Zhang J, Xie B, Hashimoto K. Current status of potential therapeutic candidates for the COVID-19 crisis. *Brain Behav Immun* 2020; 87: 59-73. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.04.046>
- [13] Cuesta-Herranz J, de las Heras M, Fernández M, Lluch M, Figueredo E, Umpierrez A, et al. Allergic reaction caused by local anesthetic agents belonging to the amide group. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 427-428. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70064-2](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70064-2)
- [14] He Y, Zhou Y, Wu H, Kou Z, Liu S, Jiang S. Mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5309-5314. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5309-5314.2004>
- [15] Masters PS, Sturman LS. Background paper functions of the coronavirus nucleocapsid protein. *Adv Exp Med Biol* 1990; 276: 235-238. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5823-7\\_32](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5823-7_32)
- [16] Kopecky-Bromberg SA, Martínez-Sobrido L, Frieman M, Baric RA, Palese P. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J Virol* 2007; 81: 548-557. <https://doi.org/10.1128/JVI.01782-06>
- [17] Surjit M, Liu B, Chow VT, Lal SK. The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome-coronavirus inhibits the activity of cyclin-cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 10669-10681. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509233200>
- [18] Zhu Y, Liu M, Zhao W, Zhang J, Zhang X, Wang K, et al. Isolation of virus from a SARS patient and genome-wide analysis of genetic mutations related to pathogenesis and epidemiology from 47 SARS-CoV isolates. *Virus Genes* 2005; 30: 93-102. <https://doi.org/10.1007/s11262-004-4586-9>
- [19] Hotez PJ, Corry DB, Strych U, Bottazzi ME. COVID-19 vaccines: neutralizing antibodies and the alum advantage. *Nat Rev Immunol* 2020; 20: 399-400. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0358-6>
- [20] Wang H, Zhang Q, Shishido T, Takehira KJ. Heteroscedasticity and non-monotonic efficiency effects of a stochastic frontier model. *J Produc Anal* 2002; 18: 241-253. <https://doi.org/10.1023/A:1020638827640>
- [21] Wang C, Li W, Drabek D, Okba N, van Haperen R, Osterhaus AD, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* 2020; 11: 1-6. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16256-y>
- [22] Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med* 2020; 26: 1200-1204. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0965-6>
- [23] Okba NM, Müller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease patients. *Emerging Infect Dis* 2020; 26: 1478. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200841>

# Evaluation of expression and titration of recombinant nucleocapsid protein as an immunogenic candidate against SARS-CoV<sub>2</sub>

Hossein Samiei Abianeh (M.Sc)<sup>1,2</sup>, Shahram Nazarian (Ph.D)<sup>\*2</sup>, Jafar Amani (Ph.D)<sup>3</sup>, Emad Kordbache (M.Sc)<sup>1</sup>, Amir Rezaie (M.Sc)<sup>4</sup>

1- Dept. of Medical Biotechnology and Nanotechnology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences Mashhad, Mashhad, Iran

2 – Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

3 - Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Dept. of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

\* Corresponding author. + 98 9124861338 kpnazari@ihu.ac.ir

Received: 9 Feb 2022; Accepted: 22 Jun 2022

**Introduction:** Covid-19 epidemic results from an infection caused by SARS-CoV2. Evolution-based analyses on the nucleotide sequences show that SARS-CoV2 is a member of the genus Beta-coronaviruses and its genome consists of a single-stranded RNA, encoding 16 proteins. Among the structural proteins, the nucleocapsid is the most abundant protein in virus structure, highly immunogenic, with sequence conservatory. Due to a large number of mutations in the spike protein, the aim of this study was to investigate bioinformatics, expression of nucleocapsid protein and evaluate its immunogenicity as an immunogenic candidate

**Materials and Methods:** B and T cell epitopes of nucleocapsid protein were examined in the IEDB database. The PET28a-N plasmid was transferred to E. coli BL21(DE3) expression host, and IPTG induced recombinant protein expression. The protein was purified using Ni-NTA column affinity chromatography, and the Western blotting method was utilized to confirm it. Finally, mice were immunized with three routes of purified protein. Statistical analysis of the control group injection and test results was carried out by t-test from SPSS software.

**Results:** The optimized gene had a Codon adaptation index (CAI) of 0/97 Percentage of codons having high-frequency distribution was improved to 85%. Expression of recombinant protein in E.coli led to the production of BoNT/B-HCC with a molecular weight of 45 kDa. The total yield of purified protein was 43 mg/L. Immunization of mice induced serum antibody response. Statistical analysis showed that the antibody titer ratio was significantly different compared to the control sample and the antibody titer was acceptable up to a dilution of 1.256000

**Conclusion:** According to the present study results, the protein can be used as an immunogenic candidate for developing vaccines against SARS-CoV2 in future research.

**Keywords:** Covid-19, SARS-CoV2, Nucleocapsid, Recombinant Immunogenic, Epitope