DOI: 10.22092/VJ.2022.359453.1995
شماره ۱۳۹ تابستان ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مهندسی یک پروتئین کایمریک نوترکیب متشکل از آنتی‌ژن OmpL متصل شده به ادجوانت مولکولی HBHA (HBHA-OMPL) با هدف توسعه واکسن بر علیه سالمونلا تیفی‌موریوم

• **مرضیه بازگیر**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان
• **نعمت شمس(نویسنده مسئول)**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان
• **علی فروهر**
گروه علوم دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان
• **امین جایدری**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان
• **نرگس نظیفی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان

تاریخ دریافت: ۰۲-۰۵-۱۴۰۱ تاریخ پذیرش:۰۸-۰۸-۱۴۰۱
تاریخ بازنگری: ۲۸-۰۶-۱۴۰۱ تاریخ انتشار:۰۱-۰۴-۱۴۰۲
Email: shams.n@lu.ac.ir

چکیده

سالمونلا تیفی موریوم یک باکتری گرم منفی از خانواده آنتروباکتریاسه است که بعنوان عامل ایجاد کننده بیماری در انسان و دام مطرح می‌باشد. یکی از جدیدترین راه های مقابله با این عامل بیماریزا استفاده از واکسن‌های نوترکیب است. در این مطالعه، سازه‌ای متشکل از آنتی‌ژن *OmpL* از باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم و پروتئین *HBHA* به عنوان ادجوانت مولکولی از باکتری مایکوباکتریوم به روش درون رایانه ای (in silico) و با استفاده از یک لینکر پپتیدی طراحی شد. بدین منظور توالی نوکلئوتیدی هریک از این پروتئین‌ها از پایگاه داده‌ها استخراج شدند و سازه نوترکیب HBHA-OmpL با بررسی فریم صحیح خوانش طراحی شد. سپس برای ارزیابی امتیاز ایمنی‌زایی و خواص فیزیکوشیمیایی و همچنین ساختارهای دوم و سوم این سازه از سرورهای معتبر آنلاین استفاده شد. بهترین مدل سه بعدی پالایش شده برای فرایند داکینگ مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. توالی نکلئوتیدی سازه کایمریک نوترکیب برای بیان در اشریشیا کولای بهینه سازی گردید و امکان کلون توالی بهینه شده در وکتور بیانی pET22b(+) بررسی شد. بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، سازه کایمریک HBHA- OmpL با وزن مولکولی ۴۹/۴۵ کیلو دالتون دارای شاخص ناپایداری ۳۲/۷۵ و شاخص آنتی ژنسیتی ۰/۶۸۸ بود و ساختارهای مارپیچ آلفا و سیم پیچ‌های تصادفی بیشترین سهم را در توزیع ساختار دوم این سازه داشتند. بررسی داکینگ پروتئین-پروتئین نشان داد که پروتئین *HBHA* علیرغم کانژوگه شدن با پروتئین *OmpL*، توانست از طریق ۲۳ پیوند هیدروژنی به گیرنده *TLR۴/MD۲* متصل شود. نتایج کلونینگ درون رایانه ای نیز نشان داد سازه کایمریک می‌تواند در وکتور pET22b(+) با موفقیت کلون شود.

کلمات کلیدی: واکسن نوترکیب، سالمونلا تیفی‌موریوم، *HBHA* ، *OmpL*

● Veterinary Researches & Biological Products No 139 pp: 100-111

Engineering a Recombinant Chimeric Protein Consisting of *OmpL* Antigen Conjugated to *HBHA* Molecular Adjuvant (HBHA-OmpL) with the Aim of Developing a Vaccine Against *Salmonella Typhimurium*

By: Bazgir, M., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Iran. Shams, N., (Corresponding Author) Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Iran. Forouharmehr, A., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Iran. Jaydari, A., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Iran. and Nazifi, N., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Iran.

Received:2022-07-24 Accepted: 2022-10-30
Revised:2022-09-19 Published: 2023-07-22

Email: shams.n@lu.ac.ir

Salmonella Typhimurium is a zoonotic gram-negative bacterium of the *Enterobacteriaceae* family. One of the newest ways against the pathogen is the use of recombinant vaccines. In this study, a recombinant construct consisting of *OmpL* antigen from *Salmonella Typhimurium* and *HBHA* protein as a molecular adjuvant from *Mycobacterium* was designed by an in silico method and a peptide linker. For this purpose, sequences of these proteins were extracted from the database and the HBHA-OmpL recombinant construct was designed based on the correct reading frame. Then, reliable online servers were used to evaluate the immunogenicity score and physicochemical properties as well as the secondary and tertiary structures of the designed construct. The best refined 3D model was used for the molecular docking process. A codon optimization was done for expression in *E. coli*, and the possible cloning of the optimized nucleotide sequence in pET22b(+) expression vector was evaluated. Based on the results obtained in this study, the HBHA-OmpL chimeric construct with a molecular weight of 49.45 kDa had an instability index of 32.75 and an antigenicity index of 0.688, and alpha helices and random coil structures had the largest contribution in its secondary structure. The protein-protein docking results showed that despite being conjugated with *OmpL* protein, *HBHA* molecule was able to connect to *TLR4/MD2* receptor by 23 hydrogen bonds. Also, cloning results confirmed that nucleotide sequence of the designed vaccine can be successfully inserted in pET22b(+) vector.

Key words: Recombinant vaccine, *Salmonella typhimurium*, *OmpL*, *HBHA*

مقدمه

سالمونلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک انسان و دام با گستردگی جهانی است که باعث مشکلات فراوانی از لحاظ بهداشتی و اقتصادی در کشورها می‌شود (۳, ۴). اولین گزارش مربوط به شیوع این بیماری توسط گارتنر در سال ۱۳۸۸ در آلمان بود (۳۷). بیماری سالمونلوز سالانه باعث ۲۰۰۰۰۰ مرگ در جهان می‌شود (۲۴). این بیماری در دام سبب تورم معده و روده همراه با اسهال و استفراغ، تورم مفاصل، تورم و بزرگ شدن کبد، سقط جنین، گاسترو آنتریت و ... می‌شود. عامل ایجادکننده این بیماری یک باکتری تاژک‌دار گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری از جنس سالمونلا و خانواده آنتروباکتریاسه است (۲۴). براساس جدیدترین طبقه‌بندی این جنس به دو گونه سالمونلا بونگوری (*Salmonells bongori*) و سالمونلا انتریکا (*Salmonella enterica*) تقسیم می‌شود. سالمونلا بونگوری طیف وسیعی از جانوران خونسرد را آلوده می‌کند (۴) در حالی‌که سالمونلا انتریکا بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و هموژوی DNA به شش زیرگونه (I,II,IIIa,IIIb,IV,V) تقسیم می‌شود که از بین آن‌ها سروتیپ زیر گونه I مسئول غالب عفونت‌های سالمونلا در حیوانات خونگرم می‌باشند (۲۰). در این میان، سرو تیپ‌های سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس باعث ایجاد مسمومیت‌های غذایی می‌شوند و دارای شیوع گسترده‌ای در آسیا (کره، ژاپن، هند، تایلند و ...) می‌باشند. عمده‌ترین راه انتقال بیماری از طریق دستگاه گوارش است. مصرف آب و غذای آلوده، علوفه خشبی یا سایر غذاهایی که توسط مدفوع، ادرار و خون ناقلین آلوده شده‌اند، از راه‌های انتقال این باکتری می‌باشند (۲۶). میزان مرگ و میر بالا و مشکلات بهداشت عمومی مرتبط با سالمونلا تیفی موریوم به حدی افزایش‌یافته که آن را به موضوع مهمی برای جوامع بشری تبدیل کرده است این باکتری در مقابل درمان‌های آنتی‌بیوتیکی رایج به راحتی مقاوم می‌شود و این مسئله مشکلات زیادی را در درمان انسان‌ها و حیوانات در سرتاسر جهان به وجود آورده است (۳۶). ایمنی‌زایی از طریق واکسن‌ها نیز محدودیت‌هایی از قبیل ایمنی

کوتاه مدت و احیای بیماری‌زایی دارد. واکسن‌های حاوی سلول‌های کامل کشته شده به علت سمیت و ایمنی‌زایی کم چندان مناسب نیستند و واکسن‌های زنده ضعیف شده‌ای که تا به حال تولید شده‌اند نیز به دلایل متعدد چندان قابل قبول نمی‌باشند (۲۲, ۲۳). امروزه استفاده از دانش مهندسی ژنتیک برای تهیه واکسن‌های جدید و موثر به راهکار متداولی در مبارزه با بسیاری از عفونت‌های میکروبی تبدیل شده است. واکسن‌های بر پایه پروتئین‌های آنتی‌ژنیک نوترکیب که با روش‌های مهندسی ژنتیک به یک ادجوانت مولکولی متصل شده باشد هم می‌توانند سبب ایجاد پاسخ بهتر سیستم ایمنی شوند و هم از عوارض ناخواسته واکسن‌های کشته شده که حاوی اجزای مختلف پیکره باکتری هستند، پیشگیری می‌کنند (۱۳). از مسائل مهمی که در طراحی واکسن‌های جدید علیه این بیماری باید در نظر داشت یافتن عوامل حدت‌زا و ملکول‌های کاندیدایی است که بتوانند برای مدت طولانی ایمنی ایجاد کنند (۱۸). غشای خارجی یک ساختار پیوسته بر روی سطح باکتری‌های گرم منفی است و اهمیت خاصی به عنوان یکی از اهداف بالقوه برای ایمنی محافظتی دارد. مطالعات اخیر روی پروتئین‌های غشای خارجی (Out Membrane Proteins) در باکتری سالمونلا نشان داده است که این اجزای ایمنی‌زا پتانسیل زیادی برای استفاده در طراحی واکسن دارند (۳۱). این پروتئین‌ها به عنوان یکی از انواع آنتی‌ژن‌های قابل بررسی در توسعه واکسن علیه باکتری سالمونلا، نقش مهمی در فرآیندهای بیماری‌زایی مانند تحرک، چسبندگی و تجمع سلول‌های میزبان، تزریق سموم و پروتئازهای سلولی و همچنین تشکیل کانال‌هایی برای حذف آنتی‌بیوتیک‌ها (مقاومت آنتی‌بیوتیکی) بازی می‌کنند (۳۱). پورین‌ها بخشی از پروتئین‌های غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی هستند که سیستم ایمنی را تحریک می‌کنند (۱۱, ۳۴). پورین L غشای خارجی(*OmpL*)، یک پروتئین غشای خارجی در سالمونلا تیفی موریوم است که به دلیل قرار گرفتن بر سطح باکتری به عنوان آنتی‌ژن انتخابی در ساخت واکسن مورد توجه قرار گرفته است (۱۰). از آنجایی‌که واکسن‌های نوترکیب در مقایسه با واکسن‌های کشته و تضعیف شده قدرت ایمنی‌زایی کمتری دارند، لذا برای جبران این نقیصه امروزه از ادجوانت‌ها مولکولی بصورت کانژوگه شده با واکسن‌ها نوترکیب استفاده می‌شود. در نتیجه ادجوانت‌ها نقش بسیار مهمی در افزایش قدرت ایمنی‌زایی واکسن‌های نوترکیب دامی و انسانی دارند (۳۳). پروتئین *HBHA* (Heparin-Binding Haemagglutinin) یک پروتئین سطح سلولی متیله‌شده مایکوباکتریایی و عامل چسبندگی به سلول‌های اپیتلیال است و در انتشار مایکو باکتریوم توبرکلوزیس از محل عفونت اولیه نقش دارد. این پروتئین اخیراً به عنوان ادجوانت در مطالعات توسعه واکسن بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۷). توسعه پایگاه‌های داده‌های وسیع مبتنی بر داده‌های آزمایشگاهی از یک سو و گسترش نرم‌افزارهای پیش‌بینی کننده دقیق و قابل اعتماد از سوی دیگر سبب شده است که آنالیزهای درون رایانه امروزه جایگاه ویژه‌ای در تمام زمینه‌های علوم زیستی بخصوص طراحی واکسن های نوترکیب پیدا کنند. بطوری‌که انجام این نوع آنالیزها بعنوان یک فاز مطالعاتی سریع، ارزان و دقیق، قبل از اجرا فازهای آزمایشگاهی لازم و ضروری است(). با توجه به مطالب ارائه شده، هدف از مطالعه پیش‌رو طراحی و ارزیابی یک سازه کایمریک نوترکیب متشکل از آنتی‌ژن *OmpL* از باکتری سالمونلا تیفی موریوم و ادجوانت مولکولی *HBHA* با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی است تا بتوان جایگزین مناسبی برای واکسن‌های رایج که در آن‌ها از باکتری زنده و تخفیف حدت‌یافته استفاده می‌کنند معرفی کرد.

روش انجام کار

جمع‌آوری توالی نوکلئوتیدی و پروتیینی از پایگاه داده‌ها

توالی نوکلئوتیدی آنتی‌ژن *OmpL* و پروتئین *HBHA* از پایگاه داده (/https://www.ncbi.nlm.nih.gov NCBI) به ترتیب با شماره دسترسی NC_۰۲۱۸۷۰,۱ و NC_۰۰۰۹۶۲,۳ استخراج شدند، همچنین فایل pdb گیرنده MD۲/TLR۴ با شماره دسترسی ۲Z۶۴ از پایگاه داده RCSB (https://www.rcsb.org/) استخراج شد.

مهندسی سازه کایمریک نوترکیب

در این مطالعه به منظور مهندسی سازه کایمریک نوترکیب توالی پروتئینی *OmpL* با استفاده از یک لینکر پپتیدی مناسب به پروتئین *HBHA* بعنوان ادجوانت مولکولی متصل گردید. شایان ذکر است به ترتیب پروتئین *HBHA* در انتهای N و پروتئین *OmpL* در انتهای C این سازه قرار داده شد.

بررسی خواص فیزیکو شیمیایی، آنتی‌ژنسیتی، پیش بینی ساختار دوم سازه کایمریک نوترکیب

مهمترین خواص فیزیکو شیمیایی توالی اسید آمینه‌ای سازه کایمریک نوترکیب HBHA-OMPL مانند وزن مولکولی، نیمه عمر، GRAVY، aliphatic index، شاخص پایداری و نقطه ایزوالکتریک با استفاده از سرور ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/) ارزیابی شدند. در ادامه به منظور بررسی میزان آنتی‌ژنسیتی سازه کایمریک نوترکیب، سرور VaxiJen (http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html) استفاده شد. همچنین با هدف تعیین ساختار دوم و مشخص کردن درصد مارپیچ‌ها، صفحه‌ها، حلقه‌ها و پیچ‌ها در توالی سازه کایمریک نوترکیب HBHA-OmpL، از سرور SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) استفاده گردید.

پیش‌بینی ساختار سوم سازه کایمریک نوترکیب

در این پژوهش بمنظور پیش‌بینی ساختار سوم سازه کایمریک طراحی شده از سرور I-TASSAR (/https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER) استفاده شد. بهترین مدل پیشنهاد شده توسط سرور I-TASSAR، بر اساس C-score انتخاب گردید، بهترین ساختار سوم انتخاب شده با استفاده از سرور GalaxyRefine (http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE) پالایش شد. و در نهایت به منظور شناسایی بهترین ساختارهای سوم پالایش شده، پلات راماچاندران برای هریک از مدل‌های پالایش شده توسط سرور VADAR (http://vadar.wishartlab.com) ترسیم شد.

بررسی داکینگ مولکولی و پیوندهای هیدروژنی درون کمپلکس

برای بررسی اثرات احتمالی ساختار طراحی شده برروی ساختار سه بعدی مولکول HBHA، برهمکنش سازه کایمریک نوترکیب HBHA-OmpL با گیرنده *TLR4/MD2* از طریق فرآیند داکینگ مولکولی، با استفاده از سرور ClusPro (https://cluspro.org/login.php?redir=/queue.php) انجام شد. در این فرآیند، از فایل‌های pdb گیرنده *TLR4/MD2* و بهترین مدل ریفاین شده سازه کایمر شده HBHA-OmpL استفاده شد. همچنین تعداد پیوند هیدروژنی درون کمپلکس HBHA-OmpL توسط نرم‌افزار LigPlot+ مشخص گردید.

بهینه‌سازی کدون‌ها و کلونینگ درون رایانه‌ای سازه کایمریک نوترکیب

در این مطالعه به منظور بهینه‌سازی کدون‌های توالی نوکلئوتیدی سازه کایمریک نوترکیب برای بیان در اشرشیا کولای، از نرم‌افزار JCat/ (http://www.jcat.de) استفاده گردید. در این آنالیز درصد GC و شاخص سازگاری کدون‌ها (CAI) بر اساس میزبان بیانی بهینه شد. در نهایت توالی نوکلئوتیدی بهینه‌شده سازه کایمریک نوترکیب به منظور بررسی توانای بیان در سامانه پروکاریوتی، در وکتور بیانی pET22b(+) بین دو آنزیم محدودالاثر NCOI (انتهای ۵) و EcoRI (انتهای ۳) گنجانده شد.

نتایج

طراحی سازه نوترکیب

همانطور که در شکل یک مشاهده می‌شود سازه نوترکیب HBHA-OmpL با موفقیت طراحی شد. در انتهای N این سازه توالی آمینو اسیدی ادجوانت مولکولی HBHA با ۱۹۹ آمینو اسید و در انتهای C آن آنتی‌ژن OmpL با ۲۳۰ آمینو اسید قرار داده شد. همچنین به منظور حفظ فعالیت زیستی سازه، دو دمین، توسط لینکر سخت و غیر قابل انعطاف EAAAK به هم متصل شدند.

ارزیابی خواص فیزیکو شیمیایی و آنتی‌ژنسیتی سازه نوترکیب مهندسی شده

بر اساس نتایج بدست‌آمده از سرور ProtParam مشخص شد که این سازه نوترکیب با وزن ملکولی ۴۹/۴۵ کیلودالتون، نقطه ایزوالکتریک ۶/۴۵ و شاخص آلفاتیک ۷۵/۸۷، دارای شاخص ناپایداری ۳۲/۷۵ است که یک پروتئین پایدار در نظر گرفته می‌شود و نیمه عمر آن در سلول‌های پستاندارن ۳۰ ساعت، در مخمر بیش از ۲۰ ساعت و در باکتری *E.coli* بیش از ۱۰ ساعت است. شاخص آنتی‌ژنسیتی این سازه بر اساس گزارش سرور VaxiJen برابر با ۰/۶۸۸۲ می باشد بنابراین می‌توان آن را یک سازه آنتی‌ژنیک در نظر گرفت.

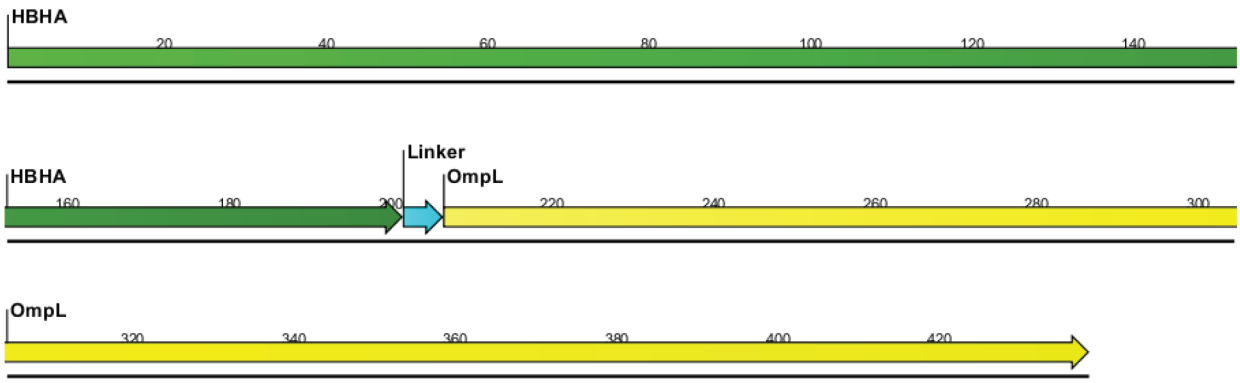
تعیین ساختار دوم و سوم سازه نوترکیب مهندسی شده

در این مطالعه اشکال مختلف فضایی موجود در ساختار کایمریک HBHA- OmpL توسط سرور SOPMA تعیین شد و نتایج نشان داد که توزیع مارپیچ‌های آلفا (Alpha helix)، رشته‌های گسترده (Extended strands)، پیچ‌های بتا (Bet turns) و پیچ‌های تصادفی (Random coil) به ترتیب ۵۱/۶۰، ۱۷/۸۱، ۴/۳۴ و ۲۶/۲۶ درصد بودند (شکل ۲). پیش‌بینی بهترین مدل سه بعدی سازه مورد مطالعه با استفاده از سرور I-TASSAR انجام شد و بهترین فایل pdb با امتیاز ضریب اطمینان (C-score) ۱/۸۳- و شاخص RMSD: ۴/۵ ± ۱۱/۳ A^o انتخاب شد. در این مدل بر اساس آنالیزهای راماچاندران ۵۷ ٪ اسید آمینه‌ها در ناحیه هسته، ۳۳٪ در ناحیه مجاز، ۴٪ درصد در ناحیه قابل قبول (generous) و ۳٪ در ناحیه غیر مجاز قرار داشتند (شکل‌های ۳ و ۴). برای بهبود دقت مدل pdb اولیه، از سرور GalaxyRefine و همچنین پلات و آنالیزهای راماچادران استفاده شد. بر این اساس بهترین مدل سه بعدی پالایش شده را ارائه کردند که در آن ۸۹٪ از اسید آمینه‌ها در ناحیه هسته (Core) و ۱٪ از اسید آمینه‌ها در منطقه مجاز (Allowed)، ۱٪ در ناحیه قابل قبول و تنها ۱٪ در منطقه خارج (Disallowed) قرار داشتند (شکل ۳ و ۴).

ssss

بررسی داکینگ مولکولی و پیوندهای هیدروژنی درون کمپلکس

برهمکنش مولکول *HBHA* متصل به توالی آنتی‌ژن *OmpL* با گیرنده مولکولی *TLR4/MD2* در محیط مجازی توسط سرور ClusPro با موفقیت انجام شد. بررسی‌های بیشتر نشان داد که مولکول *HBHA* کانژوگه شده قادر است به خوبی به گیرنده *TLR4/MD2* خود متصل شود. این



شکل ۱- سازه نهایی ترسیم شده توسط نرم افزار CLC Main Work Bench . رنگ سبز ادجووانت مولکولی *HBHA* ، رنگ زرد آنتی ژن *OmpL* و رنگ آبی لینکر EAAAK می‌باشند.

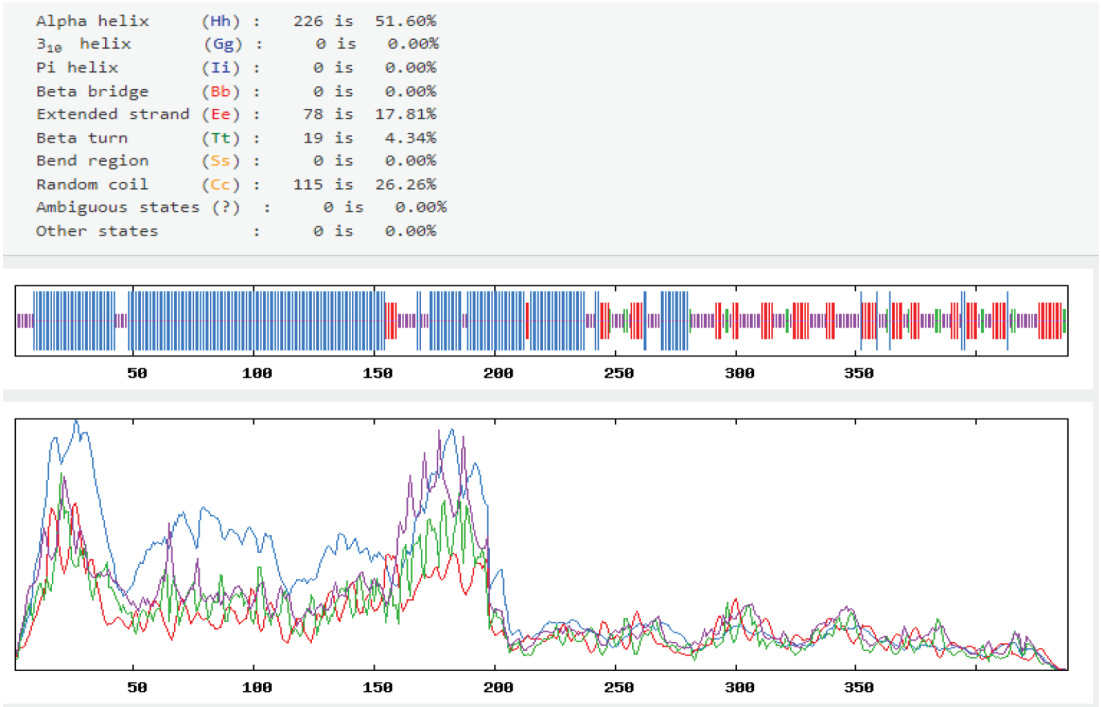
برهمکنش دارای ۷۶ عضو خوشه (Cluster members)، امتیاز مرکز خوشه (Cluster center) ۱۲۰۹/۱- بود. کمترین انرژی (Lowest energy) این اتصال ۱۲۰۹/۱- کیلوکالری بر مول محاسبه شد (شکل ۵). محصول داک شده برای تعیین تعداد و طول پیوندهای هیدوژنی درون کمپلکس، توسط نرم‌افزارهای LigPlot+ و PyMol مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل پنج نشان داده شده است، در کمپلکس *HBHA* با پروتئین گیرنده مولکولی *TLR4/MD2* تعداد ۲۳ پیوند هیدوژنی وجود داشت، که اسید آمینه‌های دخیل در ایجاد این پیوندهای هیدوژنی در جدول یک گزارش شده است (شکل ۵) (جدول ۱).

بهینه‌سازی کدون‌ها و کلونینگ درون رایانه‌ای سازه کایمریک نوترکیب

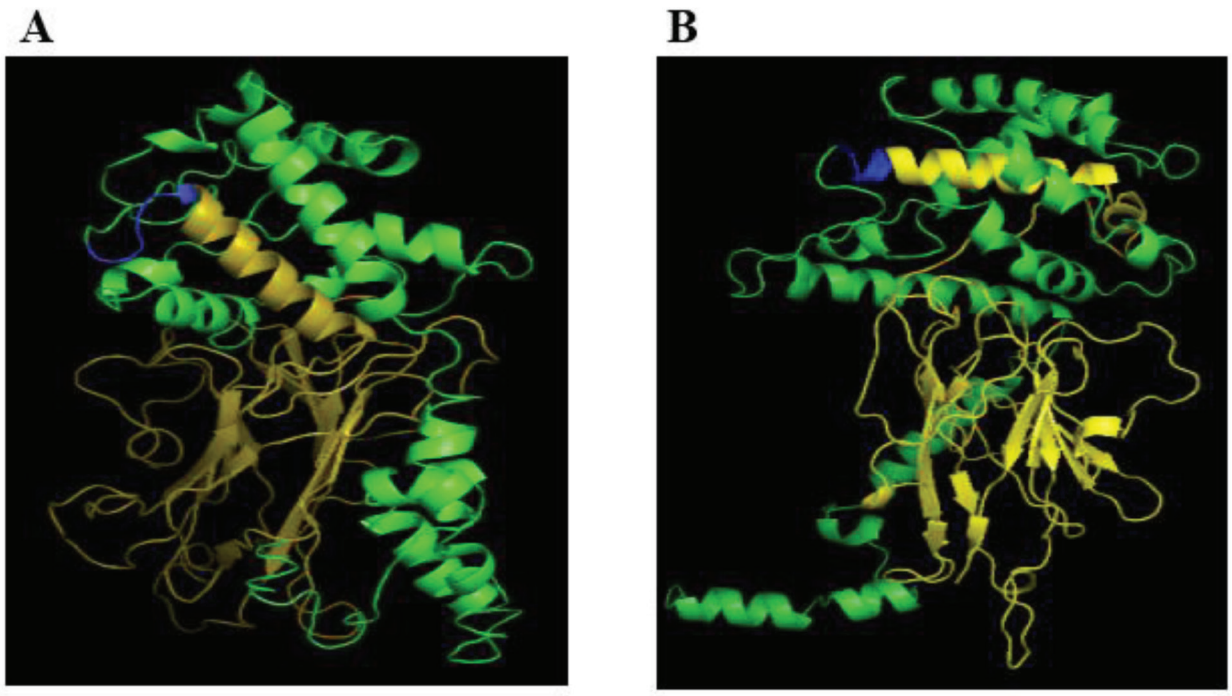
نتایج بهینه‌سازی توالی نوکلئوتیدی سازه کایمریک نوترکیب نشان داد، درصد GC توالی از ۵۱/۹۹ (قبل از بهینه‌سازی) به ۵۰/۰۶ بهینه‌سازی تغییر یافت. همچنین مقدار CAI توالی از ۰/۲۷ (قبل از بهینه‌سازی) به ۰/۹۷ افزایش یافت(شکل ۶). به علاوه نتایج کلونیگ درون رایانه ثابت کرد توالی نکلئوتیدی سازه کایمریک نوترکیب به طول ۱۳۱۸ جفت باز می‌تواند بصورت موفقیت‌آمیز بین جایگاه برشی دو آنزیم محدالاثر NcoI و EcoRI در وکتور بیانی pET22b(+) کلون گردد(شکل ۷).

بحث

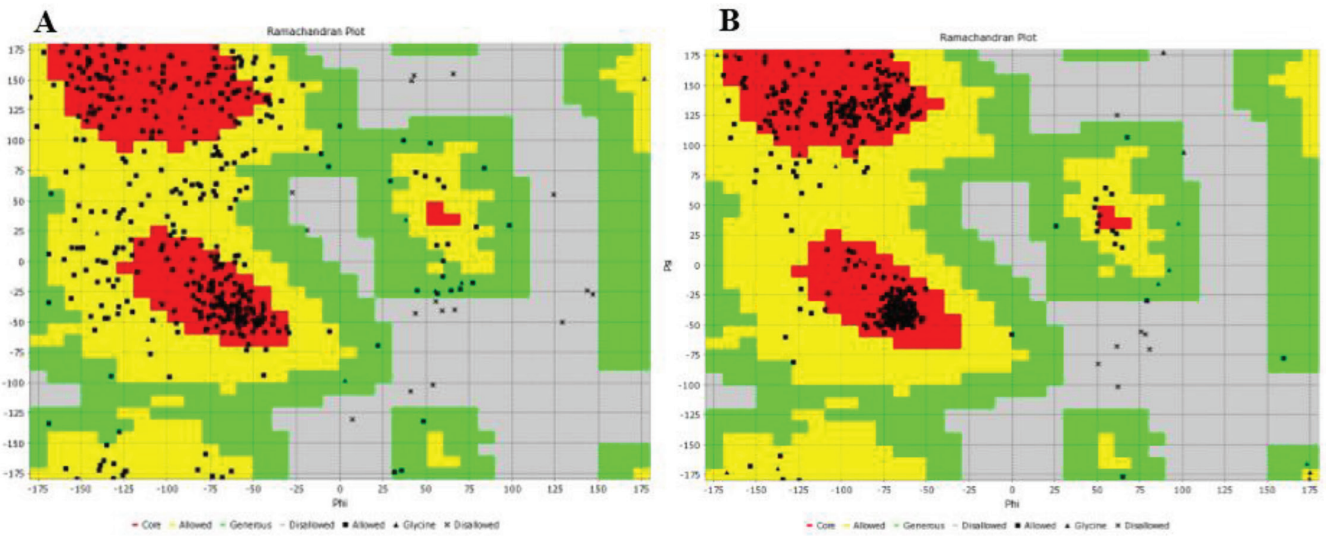
باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم عامل بروز عفونت‌های روده‌ای یا خارج روده‌ای با شیوع بالا، در انسان، دام و پرندگان می‌شود. در مطالعات متعدد، میزان شیوع آن از ۲/۷۴ ٪ درآمریکا تا ۳/۸ ٪ در ایران گزارش شده است (۳, ۱۵). میزان مرگ و میر بالا و مشکلات بهداشت عمومی مرتبط با سالمونلا تیفی موریوم به حدی افزایش یافته است که آن را به موضوع مهمی برای جوامع بشری تبدیل کرده است. این باکتری در برابر درمان‌های آنتی‌بیوتیکی رایج به راحتی مقاوم می‌شود و این مسئله مشکلات زیادی را در درمان انسان‌ها و حیوانات در سرتاسر جهان به وجود آورده است (۶). بنابراین نیاز به یک واکسن کارامد با قابلیت مناسب در تحریک سیستم ایمنی و با کمترین عوارض جانبی به شدت احساس می‌شود. توسعه روزافزون داده‌ها در حوزه بیولوژی که سبب افزایش نیاز به ذخیره‌سازی مناسب شده است و همچنین نیاز بازیابی و تجزیه و تحلیل این داده‌ها با دقت بالا و هزینه بسیار کمتر نسبت به مطالعه آزمایشگاهی منجر به ظهور دانش بیوانفورماتیک شده است. بیوانفورماتیک علمی است که از روش‌ها و نرم‌افزارهایی برای شناسایی و آنالیز اطلاعات بیولوژیکی با استفاده از تکنیک‌های ریاضی و آماری و همچنین علوم پیشرفته کامپیوتر استفاده می‌کند (۲). امروزه



شکل ۲- ساختار دوم سازه نوترکیب HBHA- OmpL. در این شکل بخش‌های مختلف سازه مورد مطالعه که شامل آلفا هلیکس -پیچ بتا- پیچ‌های تصادفی و رشته‌های گسترده است به ترتیب با رنگ‌های آبی، سبز، نارنجی و قرمز مشخص شده‌اند.



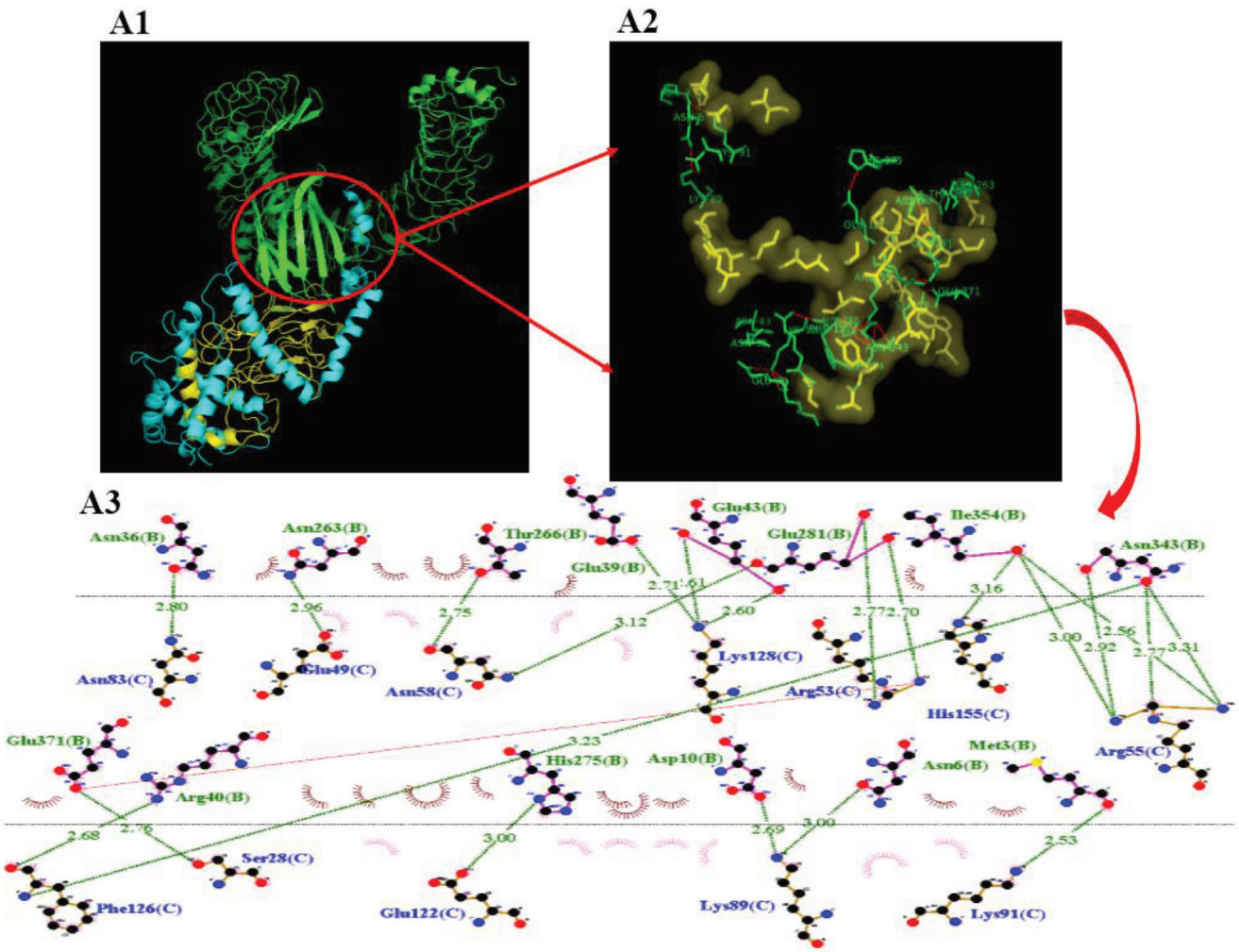
شکل ۳- A: ساختار سوم پیش بینی شده سازه نوترکیب HBHA- OmpL. توسط سرور I-TASSER: B ساختار سوم پالایش شده توسط سرور GalaxyRefine. رنگ سبز نشانگر ساختار پروتئین *HBHA* است، رنگ آبی معرف لینکر بین دو دمین و رنگ زرد مربوط به ساختار آنتی ژن *OmpL* می‌باشد.



شکل ۴- A: پلات آنالیزهای راماچاندران بدست آمده از سرور VADAR که مربوط به مدل ارائه شده توسط سرور I-TASSER می باشد. در این مدل ۵۷٪ اسید آمینه‌ها در ناحیه هسته، ۳۳ ٪ در ناحیه مجاز، ۴ ٪درصد در ناحیه قابل قبول و ۳٪ در ناحیه غیر مجاز قرار داشتند. B: پلات آنالیزهای راماچاندران بدست آمده از سرور VADAR که مربوط به بهترین مدل پالایش شده است. در این مدل ۸۹ ٪ اسید آمینه‌ها در ناحیه هسته، ۸ ٪ در ناحیه مجاز، ۱٪ درصد در ناحیه قابل قبول و ۱٪ در ناحیه غیر مجاز قرار داشتند.

بکارگیری علم بیوانفورماتیک و مهندسی ژنتیک در زمینه طراحی دارو و واکسن بسیار افزایش یافته است. علاقه به توسعه استراتژی‌های جدید واکسیناسیون در برابر تهدید بیماری‌های عفونی منجر به توسعه نسل جدیدی از واکسن‌های ایمن شده است که فقط از اجزای ایمنی‌زای پاتوژن‌ها استفاده می‌کنند (۱۶, ۱۷, ۲۷). بکارگیری تکنیک‌های مبتنی بر DNA نوترکیب، منجر به تولید نسل سوم واکسن‌هایی شدند که در امتداد نسل دوم (شامل اجزای مؤثر ایمونوژنیک میکروارگانیسم‌ها) (۵)، به نسل اول واکسن‌های ضعیف و غیرفعال اضافه شدند (۳۲). امروزه، فناوری پروتئین نوترکیب اجازه تولید آنتی‌ژن‌های پروتئینی را به جای واکسن‌های باکتریایی و ویروسی زنده ضعیف شده یا غیرفعال داده است.

علاوه بر این، تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس بزرگ با هزینه کمتر یکی از مزایای عمده این فناوری است (۱). با این حال، این پروتئین‌های کوچک در تحریک سیستم ایمنی ضعیف‌تر از کل ویروس یا باکتری هستند که در واکسن‌های معمولی یافت می‌شوند. علاوه بر این، به دلیل وزن مولکولی کم، نیمه‌عمر کوتاه تری دارند و به سرعت از سیستم فیلتراسیون کلیوی حذف می‌شوند. بنابراین، برای تحریک موثرتر سیستم ایمنی و داشتن نیمه عمر طولانی‌تر واکسن‌های مبتنی بر پروتئین، این پروتئین‌ها باید با مولکول‌های سنگین‌تر، که به عنوان ادجوانت شناخته می‌شوند، کانژوگه شوند (۱۷, ۳۵). در مطالعه حاضر یک واکسن کایمریک متشکل از *OmpL* بعنوان آنتی‌ژن اختصاصی علیه باکتری سالمونلا تیفی



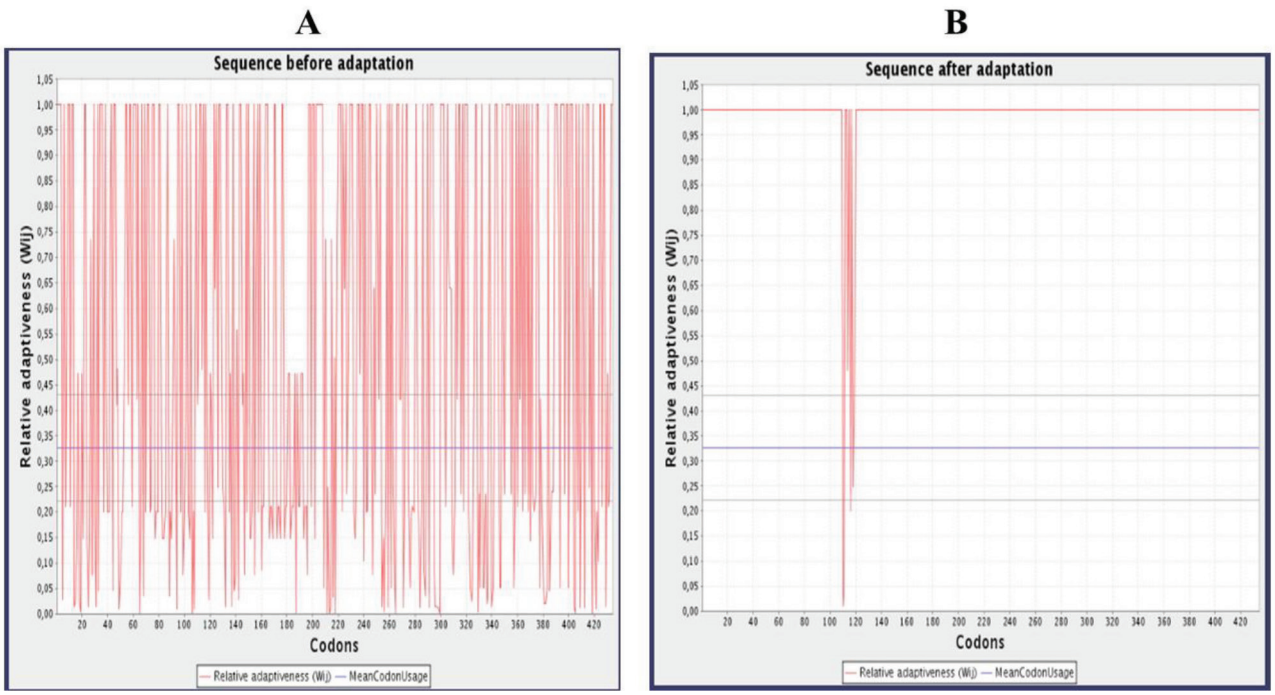
شکل ۵- A۱: برهمکنش بین سازه کایمریک HBHA- OmpL و گیرنده مولکولی *TLR4/MD2* که توسط نرم افزار PyMol ظاهر سازی شده است. رنگ سبز مولکول MD۲/TLR۴، رنگ آبی مولکول *HBHA* و رنگ زرد آنتی ژن A۲ .*OmpL* : ناحیه برهمکنش بین مولکول *HBHA* و گیرنده *TLR4/MD2*، رنگ قرمز نشان دهنده پیوندهای هیدورژنی بین اسید آمینه‌های مولکول *HBHA* و گیرنده *TLR4/MD2* . A۳ نمایش تعداد و طول پیوندهای هیدوژنی بین مولکول *HBHA* و گیرنده *TLR4/MD2* به تفکیک اسید آمینه‌های مولکول C *(HBHA)*، و مولکول A(*TLR4/MD*) که توسط نرم افزار LigPlot+ روئیت سازی شده است. خط چین سبز نشان دهنده پیوندهای هیدروژنی و خط چین قرمز نشان دهنده پل‌های نمکی بین دو دومین مورد مطالعه می باشد.

موریم که با استفاده از لینکر EAAAK به پروتئین *HBHA* بعنوان ادجوانت مولکولی کانژوگه شده بود طراحی گردید. پروتئین *HBHA* مولکولی است که در ابتدا به عنوان یک فاکتور شبه لکتین در عصاره سلولی مایکوباکتریوم سل شناخته شده بود که قادر به آگلوتینه کردن گلبول‌های قرمز بود (۲۵)، اما اخیراً گزارش شده است که این مولکول که یک آگونیست برای گیرنده *TLR4/MD2* بشمار می‌رود، می‌تواند به عنوان یک ادجوانت مولکولی نیز بکار گرفته شود زیرا این مجموعه قادر است تولید اولیه سایتوکین‌های ضد التهابی و تولید کموکاین‌ها را آغاز کند (۱۸). در مطالعات اخیر استفاده از این ادجوانت مولکولی در واکسن‌های زیر واحدی بسیار مورد توجه گرفته است به عنوان مثال در برخی از مطالعات استفاده از این مولکول در طراحی واکسن‌های نوترکیب علیه باکتری‌های کوکسیلا بورنتی، سالمونلا و یا ویروس *SARS-CoV-2* مورد استفاده قرار گرفته است (۱۹, ۲۸-۳۰). در این راستا، شناسایی برهمکنش بین مولکول‌ها و گیرنده-های آنها در علوم زیستی برای درک بهتر عملکرد سلولی بسیار حائز اهمیت است (۲۱). لینکرها توالی های آمینو اسیدی کوتاهی هستند که نقش بسیار مهمی در تاخوردگی و خفظ

جدول ۱- لیست اسید آمینه‌های درگیر در ایجاد پیوند هیدوژنی و طول پیوندها.

طول پیوند هیدورژنی (A°)	اسید آمینه‌های مولکول *HBHA*	اسید آمینه‌های گیرنده *TLR4/MD2*
۲/۸۰	آسپارژین ۸۳	آسپارژین ۳۶
۲/۹۶	گلوتامین ۴۹	آسپارژین ۲۶۳
۲/۷۵	آسپارژین ۵۸	تیروزین ۲۶۶
۲/۷۱	لیزین ۱۲۸	گلوتامین ۳۹
۲/۶۱	لیزین ۱۲۸	گلوتامین ۴۳
۲/۶۰		
۳/۱۲	آسپارژین ۵۸	گلوتامین ۲۸۱
۲/۷۷	آسپارژین ۵۳	گلوتامین ۲۸۱
۲/۷۰		
۳/۱۶	هیستیدین ۱۵۵	ایزولوسین ۳۵۴
۳/۰۱	تیروزین ۱۱۲	ایزولوسین ۳۵۴
۳	آرژنین ۵۵	ایزولوسین ۳۵۴
۲/۵۶		
۲/۹۲	آرژنین ۵۵	آسپارژین ۳۴۳
۲/۷۷		
۳/۳۱		
۳/۲۳	فنیل آلانین ۱۲۶	آسپارژین ۳۴۳
۲/۶۸	فنیل آلانین ۱۲۶	آرژنین ۴۰
۲/۶۸	سرین ۲۸	گلوتامین ۳۷۱
۳	گلوتامین ۱۲۲	هیستیدین ۲۷۵
۲/۶۹	لیزین ۸۹	آسپارژین ۱۰
۳	لیزین ۸۶	آسپارژین ۶
۲/۵۳	لیزین ۹۱	متیونین ۳

عملکرد واکسن‌های کانژوگه شده بازی می‌کنند. توالی EAAAK یکی از معروف‌ترین لینکرها آمینو اسیدی که در ساخت واکسن‌های نوترکیب برای اتصال دو دمین استفاده می‌شود، این لینکر دارای سه اسید آمینه آلانین است که در شکل‌گیری ساختار آلفا هیلکس نقش دارند در حالی‌که دو اسید آمینه گلوتامیک اسید و لیزین این لینکر در حفظ پایداری آن نقش بازی می‌کنند(۸). در ادامه پژوهش حاضر، مهم‌ترین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی سازه کایمریک مهندسی شده موردی بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که وزن مولکولی این سازه نوترکیب طراحی شده ۴۹/۴۵ kDa بود. به طور کلی، پروتئینی که وزن مولکولی آن کمتر از ۱۰ kDa است از طریق سیستم کلیوی به راحتی دفع می‌شود (۱۷). در نتیجه، این سازه واکسنی مهندسی شده با وزن مولکولی ۴۹/۴۵ kDa می‌تواند از سیستم فیلتراسیون کلیوی فرار کند و این امر می‌تواند سبب افزایش نیمه عمر و در نهایت کارآمدی واکسن طراحی شده گردد. علاوه بر این، سازه مهندسی شده در این مطالعه به عنوان یک پروتئین پایدار شناخته شد، زیرا شاخص بی‌ثباتی آن کمتر از ۴۰ می‌باشد (۱۲, ۱۴). همانطور که در نتایج نشان داده شده است، شاخص بی‌ثباتی سازه واکسنی مهندسی شده ۳۲/۷۵ می‌باشد. آنتی‌ژنسیتی یک فاکتور بسیار مهم در ارزیابی میزان قدر یک واکسن در ایجاد پاسخ ایمنی به شمار می‌رود، بطور کلی اگر یک واکسن نوترکیب غیر آنتی‌ژنیک باشد توانایی ایجاد پاسخ ایمنی را نخواهد داشت. همان طور که نتایج پژوهش حاضر نشان داد، سازه کامیریک مهندسی شده با شاخص آنتی‌ژنسیتی ۰/۶۸۸۲ توانایی لازم در ایجاد پاسخ ایمنی دارد(۹). در این مطالعه ساختار سوم سازه کایمریک با استفاده از سرورهای قابل اعتماد مدل‌سازی و پالایش شد. نتایج حاصل از پالایش ساختار سوم نشان داد که سهم بالایی از اسید آمینه‌ها (۸۹ ٪) سازه در منطقه مطلوب هسته واقع شده‌اند، از این رو می‌توان نتیجه گرفت که واکسن مهندسی شده دارای ساختار سوم متاسب برای آنالیزهای بعدی بود. نتایج داکینگ مولکولی نیز نشان داد که دمین *HBHA* سازه کایمریک توانسته است در حالت کانژوکه با *OmpL* بصورت موفقیت‌آمیز و از طریق پیوند هیدورژنی زیادی با افینتی بالا به گیرنده *TLR4/MD2* متصل شود. بنابراین، می‌توان ادعا کرد که دمین *HBHA* می‌تواند با موفقیت نقش خود را به عنوان یک ادجوانت مولکولی ایفا کند. در نهایت کدون‌های توالی نوکلئوتیدی واکسن کایمریک به منظور بیان در باکتری اشرشیا کولای بهینه‌سازی گردید. تحقیقات نشان می‌دهد سیستم بیانی پروکاریوتی مانند اشرشیا کولای می‌تواند با هزینه کم و حجم تولید مناسب پروتئین‌های ساده که فاقد تغییرات پس از ترجمه هستند را تولید نمایید. بر اساس نتایج بهینه‌سازی کدون‌ها مقدار CAI بعنوان مهم‌ترین شاخص بهینه‌سازی ۰/۹۷ بود. از آنجای که هر چه این عدد به سمت یک میل کند نشان‌دهنده موفقیت در بهینه‌سازی است، لذا می‌توان نتیجه گرفت واکسن کایمریک می‌تواند به شکل مناسبی در سیستم پروکارتوی بیان گردد(۱۷).



شکل ۶- بهینه‌سازی توالی نوکلئوتیدی سازه کایمریک نوترکیب. A: پلات توالی مورد نظر قبل از انجام بهینه‌سازی، B: پلات توالی بعد از انجام بهینه‌سازی به منظور بیان در اشریشا کولای، مقدار CAI قبل و بعد از بهینه سازی به ترتیب ۰/۲۷ و ۰/۹۷ بود.

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر به منظور مقابله با باکتری سالمونلا سازه نوترکیبی متشکل از پروتئین‌های آنتی‌ژن *OmpL* از باکتری سالمونلا تیفی و ادجوانت مولکولی (*HBHA-OmpL*) *HBHA* به روش بیوانفورماتیکی طراحی و ارزیابی شد. بر اساس نتایج بدست آمده سازه معرفی شده از خواص فیزیکوشیمایی و پایداری مطلوبی برخوردار بود و همچنین حاوی درصد بالایی از ساختارهای در معرض مارپیچ آلفا و پیچ‌های تصادفی بود. همچنین بررسی‌های بیشتر در زمینه داکینگ پروتئین- پروتئین نشان داد که دمین *HBHA* از سازه مذکور توانست به صورت مستحکمی (با تشکیل ۲۳ پیوند هیدوژنی) به گیرنده *TLR4/MD2* خود متصل شود. در نهایت مشخص شد این سازه نوترکیب می‌تواند در سیستم پروکاریوتی بیان گردد. بنابراین امید است که در آینده از سازه *HBHA-OmpL* به عنوان یک واکسن نوترکیب زیرواحدی استفاده شود.

منابع مورد استفاده

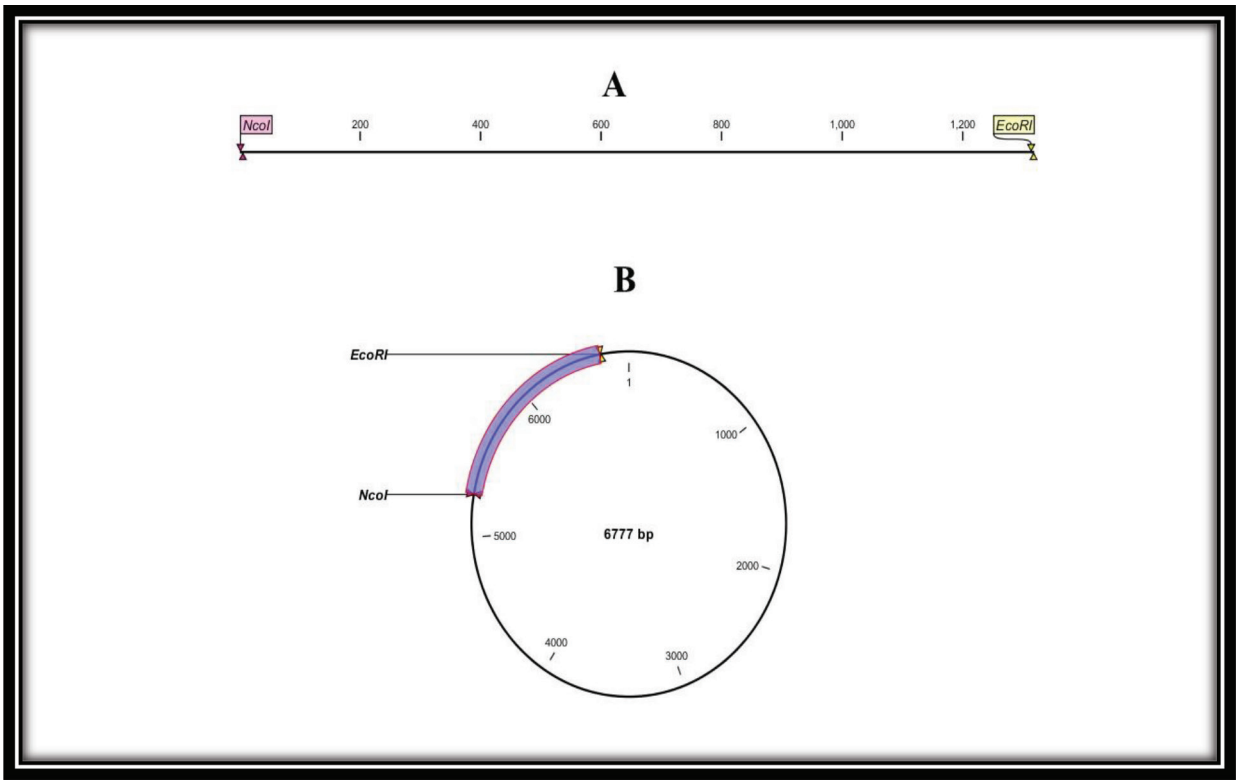
1- Andersen, D. C. and L. Krummen. 2002. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current opinion in biotechnology* 13: 117-123.

2- Attwood, T. K., A. Gisel, N.-E. Eriksson and E. Bongcam-Rudloff. 2011. Concepts, historical milestones and the central place of bioinformatics in modern biology: a European perspective. *Bioinformatics-trends and methodologies* 1.

3- Brenner, F., R. Villar, F. Angulo, R. Tauxe and B. Swaminathan. 2000. Salmonella nomenclature. *Journal of clinical microbiology* 38: 2465-2467.

4- de Freitas, C. G., Â. P. Santana, P. H. C. da Silva, V. S. P. Gonçalves, M. d. A. F. Barros, F. A. G. Torres, L. S. Murata and S. Perecmanis. 2010. PCR multiplex for detection of Salmonella Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. International journal of food microbiology 139: 15-22.

5- Delany, I., R. Rappuoli and K. L. Seib. 2013. Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 3: a012476.



شکل ۷- کلونیگ درون رایانه ای توالی نوکلئوتیدی سازه کایمریک نوترکیب. A: توالی سازه بین دو جایگاه برشی آنزیم‌های NcoI و EcoRI. B: توالی نکلئوتیدی کلون شده در وکتور بیانی pET22b(+)، بجز جایگاه های برشی در دو انتهای توالی، هیچ جایگاه برشی دیگری برای NcoI و EcoRI بر روی توالی مشاهده نمی‌شود.

6- Eng, S.-K., P. Pusparajah, N.-S. Ab Mutalib, H.-L. Ser, K.-G. Chan and L.-H. Lee. 2015. Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science* 8: 284-293.

7- Esposito, C., D. Marasco, G. Delogu, E. Pedone and R. Berisio. 2011. Heparin-binding hemagglutinin HBHA from Mycobacterium tuberculosis affects actin polymerisation. *Biochemical and biophysical research communications* 410: 339-344.

8- Forouharmehr, A. 2021. Engineering an efficient poly-epitope vaccine against Toxoplasma gondii infection: a computational vaccinology study. *Microbial Pathogenesis* 152: 104646.

9- Forouharmehr, A., N. Nazifi, S. M. Mousavi and A. Jaydari. 2022. Designing an efficient epitope-based vaccine conjugated with a molecular adjuvant against Bovine Babesiosis: A computational study. *Process Biochemistry* 121: 170-177.

10- Freeman Jr, T. C., S. J. Landry and W. C. Wimley. 2011. The prediction and characterization of YshA, an unknown outer-membrane protein from Salmonella typhimurium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1808: 287-297.

11- Fulop, M., R. Manchee and R. Titball. 1995. Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from Francisella tularensis in the induction of immunity against tularemia. *Vaccine* 13: 1220-1225.

12- Gamage, D. G., A. Gunaratne, G. R. Periyannan and T. G. Russell. 2019. Applicability of instability index for in vitro protein stability prediction. *Protein and peptide letters* 26: 339-347.

13- Gheibihayat, S. M., A, Sadeghinia. sh, Nazarian. Z, Adeli. 2015. Mechanisms and Performances of Adjuvants in Vaccine Immunogenicity. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2 (3) 257-264.

14- Guruprasad, K., B. B. Reddy and M. W. Pandit. 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection* 4: 155-161.

15-Jamshidi, A. E., M. Basami and N. S. Afshari. 2009. Identification of Salmonella spp. and Salmonella typhimurium by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad-Iran. *International Journal of Veterinary Research.* 3 (1) 43-48.

16- Jaydari, A., A. Forouharmehr and N. Nazifi. 2019. Determination of immunodominant scaffolds of Com1 and OmpH antigens of Coxiella burnetii. *Microbial pathogenesis* 126: 298-309.

17- Jaydari, A., N. Nazifi and A. Forouharmehr. 2020. Computational design of a novel multi-epitope vaccine against Coxiella burnetii. Human Immunology 81: 596-605.

18- Kanzler, H., F. J. Barrat, E. M. Hessel and R. L. Coffman. 2007. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature medicine* 13: 552-559.

19- Kardani, K., A. Bolhassani and A. Namvar. 2020. An overview of in silico vaccine design against different pathogens and cancer. *Expert Review of Vaccines* 19: 699-726.

20- Kisiela, D. I., S. Chattopadhyay, S. J. Libby, J. E. Karlinsey, F. C. Fang, V. Tchesnokova, J. J. Kramer, V. Beskhlebnaya, M. Samadpour and K. Grzymajlo. 2012. Evolution of Salmonella enterica virulence via point mutations in the fimbrial adhesin. *PLoS pathogens* 8: e1002733.

21- Kundrotas, P. J., Z. Zhu and I. A. Vakser. 2010. GWIDD: genome-wide protein docking database. *Nucleic acids research* 38: D513-D517.

22- Mitov, I., V. Denchev and K. Linde. 1992. Humoral and cell-mediated immunity in mice after immunization with live oral vaccines of Salmonella typhimurium: auxotrophic mutants with two attenuating markers. *Vaccine* 10: 61-66.

23- Mukkur, T., G. McDowell, B. Stocker and A. Lascelles. 1987. Protection against experimental salmonellosis in mice and sheep by immunisation with aromatic-dependent Salmonella typhimurium. *Journal of medical microbiology* 24: 11-19.

24- Ngan, G. J. Y., L. M. Ng, R. T. Lin and J. W. Teo. 2010. Development of a novel multiplex PCR for the detection and differentiation of Salmonella enterica serovars Typhi and Paratyphi A. *Research in Microbiology* 161: 243-248.

25- Parra, M., T. Pickett, G. Delogu, V. Dheenadhayalan, A.-S. Debrie, C. Locht and M. J. Brennan. 2004. The mycobacterial heparin-binding hemagglutinin is a protective antigen in the mouse aerosol challenge model of tuberculosis. *Infection and Immunity* 72: 6799-6805.

26- Porwollik, S., E. Boyd, C. Choy, P. Cheng, L. Florea, E. Proctor and M. McClelland. 2004. Characterization of Salmonella enterica subspecies I genovars by use of microarrays. *Journal of bacteriology* 186: 5883-5898.

27- Rashidian, E., A. Forouharmehr, N. Nazifi, A. Jaydari and N. Shams. 2021. Computer-aided design of a novel poly-epitope protein in fusion with an adjuvant as a vaccine candidate against leptospirosis. *Current Proteomics* 18: 113-123.

28- Rashidian, E., Z. S. Gandabeh, A. Forouharmehr, N. Nazifi, N. Shams and A. Jaydari. 2020. Immunoinformatics approach to engineer a potent poly-epitope fusion protein vaccine against Coxiella burnetii. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 26: 2191-2201.

29- Shams, N. and A. Forouharmehr. 2021. Assembling the Most

Antigenic Peptides of COVID-19 Immunogenic Proteins Along with a Molecular Adjuvant to Develop a Novel Polyepitope Vaccine: a Bioinformatics Investigation. *Vaccine Research* 8: 36-46.

30- Shams, N., Z. Shakarami Gandabeh, N. Nazifi, A. Forouharmehr, A. Jaydari and E. Rashidian. 2020. Computational design of different epitope-based vaccines against Salmonella typhi. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 26: 1527-1539.

31- Singh, Y., A. Saxena, R. Kumar, P. Bhatt and M. Saxena. 2017. Immunogenic Outer membrane Proteins (Omps) of Salmonella: Potential Candidate for sub-unit vaccine. *Virology & Immunology* 1: 1-6.

32- Tahamtan, A., J. Charostad, S. J. H. Shokouh and M. Barati. 2017. An overview of history, evolution, and manufacturing of various generations of vaccines. *Journal of Archives in Military Medicine* 5(3):e12315.

33- Tritto, E., F. Mosca and E. De Gregorio. 2009. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine* 27: 3331-3334.

34- Verma, S. K., V. Gautam, K. Balakrishna and S. Kumar. 2009. Overexpression, purification, and immunogenicity of recombinant porin proteins of Salmonella enterica Serovar Typhi (S. Typhi). *Journal of microbiology and biotechnology* 19: 1034-1040.

35- Werle, M. and A. Bernkop-Schnürch. 2006. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino acids* 30: 351-367.

36- Azizpour A. 2018. A Survey on Prevalence of Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium Serotypes in Broiler Flocks of Ardabil Province and Determination of Their Antibiotics Resistance to Five Antibacterial Agents Widely Used in the Iranian Medical Field .*J health* 9 (2) :143-151.

37- Shapouri, R., M, Rahnama. Sh, Iqbalzadeh. 2018. Investigating the prevalence of Salmonella serotypes in chicken meat and eggs and determining their antibiotic sensitivity in Zanjan city. *Physiology and animal development (biological sciences).* 2018; 2(3) 63-71