دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی و درمانی بوشهر

CrossMarck

doi 10.61186/ismj.27.6.418

مقاله پژوهشی

تحلیل *in silico* اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک در پروتئین VP2 پارو ویروس سگ و بهینه‌سازی کدونی برای طراحی واکسن چند ظرفیتی

حسین سمیعی ابیانه[1و2]، مهدی تات[3]، معصومه بلندیان[3]، سیداکبر آریان‌زاد[4]، جعفر سلیمیان[3*]

[1] گروه زیست فناوری و نانو فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

[2] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

[3] مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

[4] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد سلامی واحد کرج، کرج، ایران

چکیده

زمینه: ویروس پارووویروس سگ یکی از عوامل اصلی گاستروآنتریت ویروسی شدید در سگ‌هاست. با وجود واکسیناسیون، ظهور سروتیپ‌های جدید و جهش در پروتئین VP2 ممکن است باعث کاهش اثربخشی واکسن شود. از این رو، شناسایی نواحی ایمونوژنیک مشترک و خاص هر سروتیپ جهت طراحی واکسن نوترکیب، اهمیت زیادی دارد. هدف از این مطالعه طراحی و بهینه‌سازی یک واکسن نوترکیب از نواحی ایمونوژن محافظت‌شده پروتئین VP2 از سروتیپ‌های مختلف CPV است.

مواد و روش‌ها: توالی آمینواسیدی پروتئین VP2 از چهار سروتیپ مختلف CPV از پایگاه NCBI استخراج و با Clustal Omega هم‌تراز شد. به‌منظور تحلیل ویژگی‌های ساختاری و ایمونولوژیکی، از ابزارهایی نظیر SignalP، TOPOCONS و DIpro استفاده شد. همچنین، حلالیت، ساختارهای دوم و سوم و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی با کمک سرورهای Protein-Sol، I-TASSER و ProtParam بررسی گردید. توالی ژن کدکننده نیز برای بیان در *E. coli* بهینه‌سازی و ساختار دوم mRNA با MFOLD تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج هم‌ترازی پنج اختلاف کلیدی در ناحیه آمینواسیدی ۴۵۰-۲۸۵ نشان داد. تحلیل ساختار سوم حاکی از آن بود که این ناحیه به‌صورت دو زائده سطحی از ساختار اصلی پروتئین بیرون‌زده و دو موقعیت جهش‌یافته ۲۹۷ و ۴۲۶ در رأس این زائده‌ها قرار دارند. حذف ۲۰ آمینواسید ابتدایی موجب بهبود پایداری ساختار و کاهش شاخص ناپایداری به حدود ۲۹ شد. همچنین، بهینه‌سازی کدونی باعث افزایش شاخص CAI به ۰/۷۹ و کاهش انرژی آزاد mRNA به ۵۹۷ کیلوکالری بر مول گردید.

نتیجه‌گیری: طراحی واکسن کایمر نوترکیب ناحیه ۴۵۰-۲۸۵ از پروتئین Vp2 از سروتیپ‌ها، پیشنهاد می‌شود. با وجود نتایج امیدوارکننده‌ی *in silico*، ارزیابی آزمایشگاهی بیان پروتئین و پاسخ ایمنی در مدل‌های حیوانی ضروری است.

پیام کلیدی: با تحلیل بیوانفورماتیکی پروتئین VP2 از سروتیپ‌های مختلف ویروس پارووویروس سگ (CPV)، ناحیه‌ای ایمونوژن و محافظت‌شده بین اسیدهای آمینه ۲۸۵ تا ۴۵۰ شناسایی شد که شامل جهش‌های کلیدی سروتیپ‌ها نیز می‌باشد. طراحی واکسن نوترکیب مبتنی بر این ناحیه و حذف توالی‌های ناپایدار اولیه، منجر به بهبود ویژگی‌های ساختاری، افزایش پایداری و بهینه‌سازی بیان ژن در *E. coli* شد.

واژگان کلیدی
بیوانفورماتیک
پارووویروس
پروتئین نوترکیب
ژن VP2
واکسن

***نویسنده مسئول**
جعفر سلیمیان
Jafar.salimian@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۹
پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۹

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]

Original Article

In Silico Analysis of Immunogenic Epitopes in the VP2 Protein of Canine Parvovirus and Codon Optimization for Multivalent Vaccine Design

10.61186/ismj.27.6.418

Hossein Samiei-Abianeh[1,2], Mahdi Tat[3], Masoumeh Bolandian[3], Seyed Akbar Arianzad[4], Jafar Salimian[3*]

[1] Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences Mashhad, Iran

[2] Department of Biology, School of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

[3] Applied Virology Research Center, Biomedicine Technologies Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[4] Department of Microbiology, School of Scince, Islamic Azad Universty, Karaj Branch, Karaj, Iran

Abstract

Background: Canine parvovirus (CPV) is one of the major agents of severe viral gastroenteritis in dogs. Although vaccines are available, the emergence of new serotypes and mutations in the VP2 protein can compromise vaccine efficacy. Therefore, identifying both conserved and serotype-specific immunogenic regions is crucial for the design of recombinant vaccines. This study aimed to design and optimize a recombinant vaccine based on conserved immunogenic regions of the VP2 protein from different CPV serotypes.

Materials and Methods: Amino acid sequences of the VP2 protein from four CPV serotypes were retrieved from the NCBI database and aligned using Clustal Omega. Structural and immunological features were analyzed using tools such as SignalP, TOPOCONS, and DIpro. Protein solubility, secondary and tertiary structures, and physicochemical properties were evaluated using Protein-Sol, I-TASSER, and ProtParam. The coding sequences were optimized for expression in *E. coli* and the mRNA secondary structure was analyzed using MFOLD.

Results: Multiple sequence alignment identified five key amino acid differences in the 285–450 region of VP2. Tertiary structure analysis showed that this region forms two surface-exposed loops, with the mutated residues at positions 297 and 426 located at the tips. Deletion of the first 20 amino acids improved structural stability, lowering the instability index to 29. Codon optimization increased CAI value to 0.79 and decreased mRNA free energy to −597 kcal/mol.

Conclusion: A chimeric recombinant vaccine targeting the 285–450 region of the VP2 protein across CPV serotypes shows promise as a candidate for broad-spectrum protection. Despite *in silico* results, experimental validation of protein expression and immune response in animal models is essential.

Keywords
Bioinformatics
Parvovirus
Recombinant protein
VP2 gene
Vaccine

***Corresponding author**
Jafar Salimian
jafar.salimian@gmail.com

Received: 2025/04/18
Accepted: 2025/06/30

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]

مقدمه

پارووویروس سگی نوع ۲ (Canine Parvovirus type 2- CPV-2) یکی از اعضای خانواده پارووویروس‌ها است که نخستین بار در دهه ۱۹۷۰ گزارش شد. این ویروس به دلیل قدرت بیماری‌زایی بالا و میزان مرگ‌ومیر قابل توجه، به‌ویژه در سگ‌های جوان، اهمیت زیادی دارد. بررسی‌ها نشان داده است که از زمان بروز اولین علائم بیماری تا مرگ‌ومیر، به‌طور میانگین حدود سه روز طول می‌کشد (۱). اگرچه این ویروس می‌تواند سگ‌ها را در هر سنی آلوده کند، اما بیشترین میزان مرگ‌ومیر در توله سگ‌های ۶ هفته تا ۶ ماه مشاهده شده است (۲). انتقال این بیماری معمولاً از طریق مسیر دهانی- مدفوعی و تماس با مدفوع یا سطوح آلوده صورت می‌گیرد. پس از ورود به بدن، این ویروس عمدتاً بافت‌های دارای تکثیر سریع مانند بافت‌های لنفاوی، پوشش روده و مغز استخوان را هدف قرار می‌دهد. گیرنده طبیعی CPV، رسپتور ترانسفرین (Transferrin receptor- TfR) است که در ورود ویروس به سلول میزبان نقش اساسی دارد. در توله سگ‌های نوزاد، ویروس می‌تواند به قلب نیز حمله کرده و مشکلات جدی ایجاد کند. چندین واکسن (شامل ویروس غیرفعال شده با حرارت و ویروس زنده تغییریافته) برای کنترل این بیماری توسعه یافته‌اند، اما برخی گزارشات حاکی از این است که این واکسن‌ها در پوشش تمام سروتیپ‌های ویروسی ناموفق بوده‌اند (۳). احتمال دارد دلیل شکست در ایمن‌سازی این باشد که آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه یک سروتیپ، قادر به خنثی‌سازی سایر سروتیپ‌های ویروس‌های نباشند.

ویروس CPV یک ویروس کوچک، تک‌رشته‌ای، بدون پوشش و حاوی ژنومی از جنس DNA با حدود ۵۲۰۰ نوکلئوتید دارد. ژنوم این ویروس شامل دو چارچوب خوانش باز (ORF) اصلی است: یکی از آن‌ها پروتئین‌های غیرساختاری NS1 و NS2 را کدگذاری می‌کند، درحالی‌که ORF دیگر مسئول تولید دو پروتئین ساختاری VP1 و VP2 است. در دو انتهای ژنوم، ساختارهای سنجاق‌سری پالیندرومیک با طول تقریبی ۱۵۰ نوکلئوتید قرار دارند که در فرایند همانندسازی DNA ویروسی نقش مهمی ایفا می‌کنند (۴). پس از ظهور CPV-2 در سال ۱۹۷۴، دو سویه جدید به نام‌های CPV-2a و CPV-2b به ترتیب در سال‌های ۱۹۷۹ و ۱۹۸۴ شناسایی شدند (۵). در سال ۲۰۰۰، سویه جدیدتری تحت عنوان CPV-2c در ایتالیا معرفی شد (۶). تفاوت اصلی میان این سویه‌ها به تغییرات اسیدهای آمینه در پروتئین کپسید ویروسی (VP2) مربوط می‌شود که بر ویژگی‌های بیولوژیکی و بیماری‌زایی ویروس تأثیر می‌گذارد.

کپسید ویروس CPV از دو پروتئین ساختاری تشکیل شده است: VP1 با وزن ۸۲ کیلو دالتون و VP2 با وزن ۶۴ کیلو دالتون. پروتئین VP1 شامل تمام توالی‌های پروتئین VP2 است و علاوه بر آن، ۱۴۳ اسیدآمینه اضافی در ابتدای توالی خود دارد. بررسی‌ها نشان داده است که ۹۵ درصد پروتئین‌های کپسید را VP2 و تنها ۵ درصد را VP1 تشکیل می‌دهد. بنابراین، بخش عمده‌ای از ساختار کپسید را پروتئین VP2 تشکیل می‌دهد. پروتئین VP2 مسئول پیوند ویروس به رسپتور TfR و ورود ویروس به سلول میزبان می‌باشد. تغییرات در توالی آمینواسیدی VP2، باعث تمایز سروتیپ‌ها می‌شود. مهم‌ترین این تغییرات در موقعیت ۴۲۶ است و تغییر در این اسیدآمینه موجب ایجاد سروتیپ جدید شده است. اسیدآمینه ۴۲۶ در سویه CPV-2a برابر با آسپاراژین (Asn)، در CPV-2b برابر با آسپارتیک‌اسید (Asp) و در CPV-2c برابر با گلوتامیک‌اسید (Glu) است (۷).

چندین واکسن (ویروس غیرفعال شده با حرارت و ویروس زنده تغییریافته) برای کنترل این بیماری ساخته شده‌اند. اما، برخی گزارشات نشان می‌دهد که حتی با وجود واکنش متقاطع بین این سروتیپ‌ها، به دلیل ناتوانی آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده در مقابله با تمام سروتیپ‌های ویروسی، این واکسن‌ها نتوانسته‌اند به‌طور کامل مؤثر باشند (۸ و ۹). به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای در تایوان طی سال‌های ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۶، از بین ۸۸ نمونه آلوده به CPV، حدود ۵۴/۶ درصد به سروتیپ CPV-2c تعلق داشتند. جالب توجه آنکه از ۲۲ نمونه مبتلا به CPV-2c که قبلاً واکسینه شده بودند، ۴ مورد به‌علت عفونت تلف شدند (۱۰). همچنین، در یک مطالعه مورد شاهدی، یک سگ جوان که با واکسن تجاری ضد CPV-2 واکسینه شده بود، پس از مواجهه با CPV-2c، تنها ۳۰ دقیقه پس از ظهور علائم بالینی تلف شد که شاهدی بر عدم کارایی این واکسن در برابر سروتیپ جدید است (۱۱). علاوه بر این، یک مرور سیستماتیک که ۶ کارآزمایی بالینی را بررسی کرده بود، هیچ شواهد محکمی دال بر اثربخشی واکسن‌های قدیمی علیه CPV-2c ارائه نکرد (۱۲). اگر چه برخی گزارش‌ها حاکی از تأثیر نسبی واکسن‌های سنتی بر سویه CPV-2c هستند (۱۳ و ۱۴)، اما با توجه به قدمت این مطالعات، به‌نظر می‌رسد توسعه واکسن‌های جدید علیه این

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]

سروتیپ ضروری باشد. این مطالعه با بهره‌گیری از رویکردهای پیشرفته بیوانفورماتیکی، به بررسی جامع توالی آمینواسیدی پروتئین VP2 در سروتیپ‌های مختلف CPV پرداخته و با تحلیل ایمونوانفورماتیکی دقیق، اپی‌توپ‌های ایمنوژنیک را شناسایی می‌نماید. نوآوری اصلی این تحقیق در طراحی اولین واکسن چندظرفیتی نوترکیب علیه سه سروتیپ اصلی CPV نهفته است که قادر به القای پاسخ ایمنی در برابر تمامی این سروتیپ‌ها می‌باشد. واکسن پیشنهاد شده در این مطالعه حاوی ناحیه اتصال شونده به گیرنده TfR از پروتئین VP2 در سه سروتیپ می باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج توالی آمینو اسیدی از پروتئین VP2

جهت استخراج توالی آمینو اسیدی VP2 از سروتیپ‌های مختلف جستجو در پایگاه داده NCBI صورت گرفت. توالی‌هایی که مقاله مرتبط داشته و هم چنین از تکنیک‌های NGS برای توالی‌یابی در کشورهای مختلف توالی‌یابی شده بودند انتخاب شدند. سه توالی برای پروتئین VP2 از سروتیپ CPV (VP2d) با اعداد دسترسی AAA47159.1، NP_955539.1 و WPT09947، سه توالی برای پروتئین VP2a با اعداد دسترسی AAA47157.1، UNG30021.1 و AAY99073.1، سه توالی برای VP2b با اعداد دسترسی QHI46376.1، AAA67463.1 و UNG30009.1، سه توالی برای VP2c با اعداد دسترسی ACL27661.1، QOU12615.1 و AAY99063.1 استخراج شد. سپس جهت انتخاب یک توالی از میان توالی‌ها برای VP2 هر سروتیپ هم ترازی چندگانه توالی (MSA) با سرور Clustal Omega انجام شد. پس از آن توالی‌ها بین گونه‌ای هم تراز شدند تا جهش‌های بین گونه‌ای مشخص شود.

پیش‌بینی سیگنال پپتید و ساختارهای غشایی

برای بررسی حضور سیگنال پپتید در طول توالی پروتئینی، از سرور SignalP-5.0 استفاده شد. این سرور یکی از دقیق‌ترین ابزارهای موجود برای پیش‌بینی سیگنال پپتید است که می‌تواند توالی‌های پروتئینی را از نظر داشتن سیگنال پپتیدهای باکتریایی، آرکیایی و یوکاریوتی بررسی کند. SignalP-5.0 بر پایه شبکه‌های عصبی عمیق (Deep Neural Networks - DNN) طراحی شده و مدل‌های خاصی برای پیش‌بینی نوع و موقعیت سیگنال پپتید دارد. این سرور قادر است ناحیه h-region (هیدروفوبیک)، n-region (ناحیه آمینی) و c-region (محل شکستن سیگنال پپتید) را شناسایی کند.

برای پیش‌بینی نواحی غشایی در پروتئین مورد مطالعه، از سرور TOPOCONS استفاده شد. این سرور یک روش اجماعی (consensus-based) است که با ترکیب چندین الگوریتم پیش‌بینی، از جمله OCTOPUS، Phobius، SCAMPI، SPOCTOPUS و TOPCONS ساختارهای غشایی را با دقت بیشتری شناسایی می‌کند. خروجی TOPOCONS شامل تعداد و موقعیت توالی های آلفا هلیکس تراغشایی (TM helices) و جهت‌گیری پروتئین نسبت به غشا است که به درک بهتر ویژگی‌های ساختاری آن کمک می‌کند.

بررسی احتمال گلیکوزیلاسیون و تشکیل پیوند دی‌سولفید

در این پژوهش، برای تحلیل گلیکوزیلاسیون پروتئین نوترکیب، از سرور GlySeq استفاده شد. این ابزار با شناسایی توالی‌های هدف بر اساس الگوی اختصاصی N-X-S/T (X≠P)، که نشان‌دهنده جایگاه‌های بالقوه N-گلیکوزیلاسیون است، امکان بررسی دقیق سایت‌های گلیکوزیله شده را فراهم می‌کند. همچنین، برای پیش‌بینی پیوندهای دی‌سولفیدی در توالی پروتئینی از سرور DIpro که بخشی از مجموعه SCRATCH است، استفاده شد. DIpro یک ابزار پیشرفته مبتنی بر شبکه‌های عصبی بازگشتی دوبعدی (D recurrent neural networks۲)، ماشین بردار پشتیبان (SVM)، تطبیق گراف و الگوریتم‌های رگرسیون است. این سرور قابلیت تشخیص وجود یا عدم وجود پیوندهای دی‌سولفیدی، تخمین تعداد آن‌ها، پیش‌بینی وضعیت اتصال هر سیستئین و تعیین جفت‌های متصل شونده را دارد.

بررسی حلالیت پروتئین در میزبان *E. coli*

از الگوریتم Protein-Sol برای پیش‌بینی حلالیت پروتئین‌های به‌دست آمده استفاده شد. این الگوریتم بر اساس توالی اسیدهای آمینه طراحی شده است و ۳۵ ویژگی توالی را محاسبه می‌کند که شامل ترکیب ۲۰ اسید آمینه استاندارد، طول توالی (len) و همچنین ۱۴ ویژگی محاسبه‌شده بر اساس یک پنجره‌ی متحرک ۲۱ اسید آمینه‌ای است. ویژگی‌های محاسبه شده شامل نمرات ترکیبی اسیدهای آمینه، تمایل به تاخوردگی، بی‌نظمی ساختاری،

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]

آب‌گریزی، آنتروپی توالی، نقطه ایزوالکتریک و بار الکتریکی مطلق در pH=7 هستند. سپس، این داده‌ها برای آموزش مدل یادگیری ماشین استفاده می‌شوند که میزان حلالیت مقیاس‌شده (QuerySol) را پیش‌بینی کرده و با میانگین جمعیتی حلالیت تجربی (PopAvrSol=۰/۴۵) مقایسه می‌کند. پروتئین‌هایی که مقدار QuerySol آن‌ها بیشتر از ۰/۴۵ باشد، محلول‌تر از میانگین پروتئین‌های محلول در باکتری *E. coli* در نظر گرفته می‌شوند و مقادیر کمتر نشان‌دهنده کاهش حلالیت پیش‌بینی‌شده است.

بررسی ساختار دوم و ویژگی‌های فیزیک و شیمیایی پروتئین

در این مطالعه، از سرور JPRED برای بررسی در معرض حلال قرار گرفتن بقایای آمینواسیدی در پروتئین استفاده شد. این ابزار با استفاده از الگوریتم‌های یادگیری ماشین و پایگاه‌های داده تجربی، احتمال در معرض بودن هر باقی‌مانده را پیش‌بینی می‌کند. همچنین، برای پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین، از سرور GOR بهره گرفته شد. روش GOR یکی از مدل‌های مبتنی بر اطلاعات آماری است که با تحلیل توالی‌های آمینواسیدی و بررسی الگوهای تکرارشونده، احتمال تشکیل ساختارهای دوم مانند مارپیچ آلفا، صفحه بتا و کویل را تخمین می‌زند. این دو ابزار مکمل یکدیگر بوده و به درک بهتر ویژگی‌های ساختاری و پایداری پروتئین کمک می‌کنند. از سرور I-TASSER جهت پیش‌بینی ساختار سوم و سرور Protparam برای بررسی ویژگی‌های فیزیک و شیمیایی پروتئین استفاده شد. برای پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین از سرور I-TASSER (Iterative Threading Assembly Refinement) استفاده شد. این سرور یکی از روش‌های پیشرفته مدل‌سازی ساختاری است که با ترکیب روش‌های threading، مونتاژ قطعه‌ای و بهینه‌سازی انرژی، ساختار سه بعدی پروتئین را با دقت بالایی پیش‌بینی می‌کند. همچنین، برای بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین از سرور ProtParam استفاده شد. این ابزار، بر اساس توالی اسیدهای آمینه، پارامترهایی مانند وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک (pI)، ترکیب اسیدهای آمینه، تعداد باقی‌مانده‌های باردار، ضریب جذب نوری و شاخص ناپایداری را محاسبه می‌کند که اطلاعات مهمی در مورد خواص زیستی و پایداری پروتئین ارائه می‌دهد.

بررسی تعامل گیرنده TfR با پروتئین VP2c

جهت بررسی برهم‌کنش مولکولی بین گیرنده TfR و پروتئین VP2c، فرآیند داکینگ مولکولی با استفاده از نرم‌افزار آنلاین HADDOCK (High Ambiguity Driven protein–protein DOCKing) ویرایش ۳ انجام شد. این نرم‌افزار بر پایه اطلاعات بیولوژیکی شناخته شده (نواحی فعال، داده‌های تجربی یا زیستی) اقدام به شبیه‌سازی دقیق تعاملات میان مولکولی می‌کند و مدل‌هایی با کمترین انرژی و بیشترین احتمال برهم‌کنش ارائه می‌دهد. برای این منظور، ساختار سه‌بعدی گیرنده TfR با کد PDB: 1CX8 از پایگاه داده Protein Data Bank (PDB) استخراج گردید. این ساختار با روش X-ray diffraction و با وضوح (Resolution) برابر با ۳٫۲۰ آنگستروم تعیین شده است. پس از انجام فرآیند داکینگ، نتایج حاصل با استفاده از سرور PDBsum مورد تحلیل قرار گرفت. این سرور ابزارهای تحلیلی گرافیکی و عددی برای ارزیابی کمپلکس‌های پروتئینی ارائه می‌دهد که شامل بررسی تعداد پیوندهای هیدروژنی، نواحی تماس، و نقشه‌های برهم‌کنش میان دو مولکول است.

بررسی توزیع اپی‌توپ‌های T-Cell

جهت شناسایی اپی‌توپ‌های احتمالی ارائه شده توسط مولکول‌های DLA کلاس ا، از سرور NetMHCpan v4.1b استفاده شد. این سرور با بهره‌گیری از الگوریتم‌های یادگیری ماشین و بانک‌های اطلاعاتی تجربی، توان اتصال پپتیدها به انواع DLA را پیش‌بینی می‌کند. در این مطالعه، اپی‌توپ‌های طراحی شده بر اساس آلل‌های DLA ارزیابی شدند پپتیدهای حاصل بر اساس مقدار Rank درصد طبقه‌بندی شدند؛ به‌طوری‌که پپتیدهای با مقدار %Rank≤۰/۵ به‌عنوان اتصال‌دهنده قوی (Strong binders) و پپتیدهای با ۰/۵<%Rank≤۲ به‌عنوان اتصال‌دهنده ضعیف (Weak binders) در نظر گرفته شدند.

جهت پیش‌بینی آنتی‌ژنیسیته، از سرور VaxiJen v2.0 استفاده شد. این سرور به‌صورت مستقل از هم‌ترازی (alignment-independent) عمل کرده و بر پایه ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئین، توانایی آن در القای پاسخ ایمنی را تخمین می‌زند.

در این تحلیل، تمامی پروتئین‌های VP2 به‌همراه نسخه ترانکیت شده (قطعه کوتاه شده) مورد ارزیابی قرار گرفتند. آستانه تشخیص برای مدل ویروسی برابر ۰/۴ در نظر گرفته شد؛ مقادیر بالاتر از این عدد به‌عنوان ایمونوژن (آنتی‌ژنیک) تلقی می‌شوند.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]

بهینه‌سازی کدونی جهت بیان در میزبان پروکاریوتی

برای بهینه‌سازی توالی CDS پروتئین‌ها جهت بیان در میزبان باکتریایی، از ابزار Codon Optimization Tool (ExpOptimizer) که در پایگاه Novapro ارائه شده است، استفاده شد. این ابزار با تنظیم کدون‌ها بر اساس فراوانی در میزبان هدف، حذف توالی‌های مضر احتمالی (مانند توالی‌های حاوی سایت‌های خاتمه زودهنگام یا توالی‌های غنی از بازهای تکراری که ممکن است پایداری mRNA را کاهش دهند) و بهینه‌سازی شاخص تطابق کدونی (CAI)، کارایی ترجمه و تولید پروتئین را افزایش می‌دهد. در این مطالعه، جهت تسهیل برش آنزیمی و کلونینگ، دو جایگاه *BamHI* و *HindIII* به ترتیب در ابتدا و انتهای توالی طراحی شدند. همچنین، برای خالص‌سازی ساده‌تر پروتئین، توالی کدکننده تگ ۶xHis به انتهای C- ترمینال پروتئین اضافه شد. پس از طراحی و بهینه‌سازی، سازه نهایی از نظر حضور نواحی برشی آنزیم‌های محدودکننده و احتمال برش ناخواسته، توسط سرور Nebcutter مورد ارزیابی قرار گرفت تا از درستی طراحی و امکان‌پذیری مراحل برش و کلونینگ اطمینان حاصل شود.

پیش‌بینی ساختار دوم mRNA

برای پیش‌بینی ساختار دوم mRNA حاصل از توالی بهینه‌سازی‌شده، از نرم‌افزار MFOLD ویرایش ۲/۳ استفاده شد. این نرم‌افزار با استفاده از الگوریتم‌های پیشرفته، ساختارهای ثانویه احتمالی mRNA را بر اساس توالی نوکلئوتیدی پیش‌بینی می‌کند. ساختار دوم mRNA نقش مهمی در کارایی ترجمه و پایداری mRNA دارد، زیرا ساختارهای محکم و پیچیده مانند سنجاق‌سرها (hairpin loops) می‌توانند از دسترسی ریبوزوم به توالی‌های شروع ترجمه جلوگیری کنند.

یافته‌ها

بررسی صحت توالی آمینو اسیدی استخراج شده

نتایج هم‌ترازی توالی‌های VP2 درون سروتیپ‌های مختلف ویروسی در جدول ۱ نشان داده شده است. با توجه به اشتراکات برای VP2d توالی با کد دسترسی NP_955539.1 برای VP2a توالی با کد دسترسی AAY99073.1 و برای VP2b با کد دسترسی AAA67463.1 و برای VP2c با کد دسترسی ACL27661.1 به عنوان توالی هدف انتخاب شدند.

جدول ۱. بررسی اختلافات بین توالی‌های VP2 درون هر سروتیپ

VP2a			
ناحیه	**AAA47157.1**	**UNG30021.1**	**AAY99073.1**
۲۹۷	S	A	S
۴۴۰	T	S	T
۵۵۵	I	V	V
VP2d			
ناحیه	**WPT09947**	**NP_955539.1**	**AAA47159.1**
۳۶۷	Y	Y	D
۳۷۵	D	D	N
۴۶۶	Y	F	F
VP2b			
ناحیه	**QHI46376.1**	**AAA67463.1**	**UNG30009.1**
۲۵۷	I	T	T
۲۶۷	Y	F	F
۳۲۴	I	Y	Y
۴۴۰	A	T	S
VP2c			
ناحیه	**ACL27661.1**	**QOU12615.1**	**AAY99063.1**
۲۶۷	F	Y	F
۳۲۴	Y	I	Y
۳۷۰	Q	R	Q
۴۴۷	I	M	I

در ادامه هم‌ترازی توالی‌های پروتئین VP2 بین سروتیپ‌های مختلف b،a،d و c انجام شد. نتایج نشان دهنده ۲ اختلاف بین VP2c و VP2b یک اختلاف بین VP2a و VP2b و ۵ اختلاف بین VP2b و VP2d بود (جدول ۲). طبق نتایج هم‌ترازی ناحیه حفاظت شده در VP2 بین آمینواسیدهای ۴۲۷ الی ۵۸۴ به‌دست آمد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]

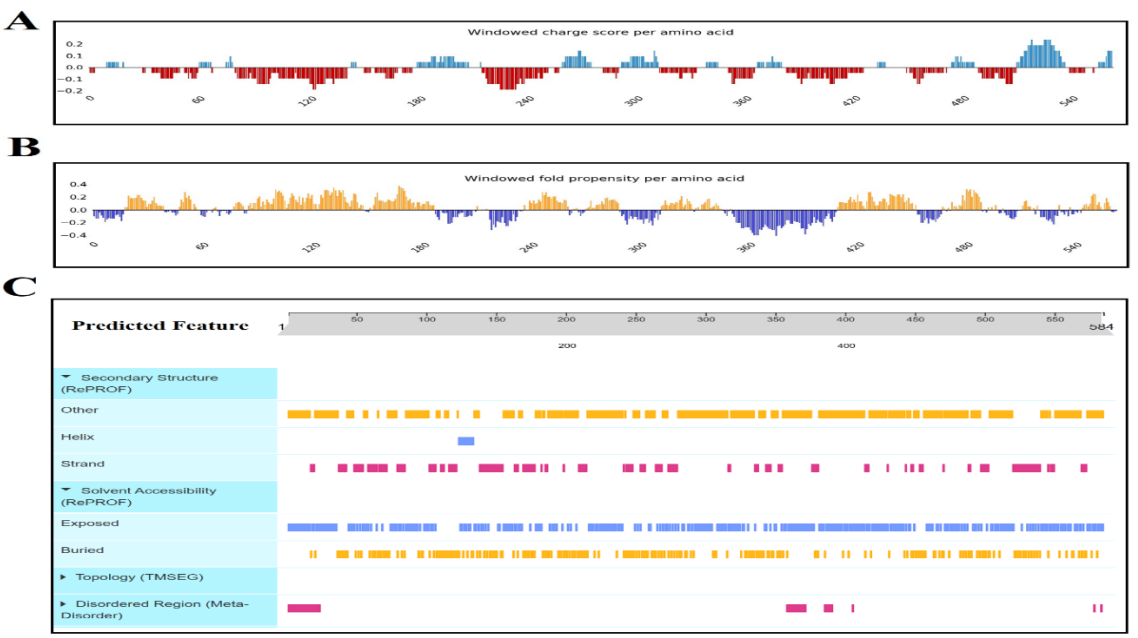
جدول ۲. بررسی اختلافات بین توالی‌های VP2 میان هر سروتیپ

سروتیپ ناحیه	VP2d	VP2a	VP2b	VP2c
ناحیه ۸۷	M	L	L	L
ناحیه ۲۹۷	S	S	S	A
ناحیه ۳۰۰	A	G	G	G
ناحیه ۳۰۵	D	Y	Y	Y
ناحیه ۳۶۷	Y	D	D	D
ناحیه ۴۲۶	N	N	D	E

بررسی ویژگی‌های بیانی پروتئین‌های VP2

هیچ سیگنال پپتید یوکاریوتی و پروکاریوتی یا توالی مورد توافق هلیکس غشایی در توالی آمینو اسیدی پروتئین VP2 دیده نشد. ۵ ناحیه از پروتئین دارای امتیاز احتمال گلیکوزیلاسیون بالایی بودند که عبارتند از: آمینواسیدهای آرژنین‌های شماره ۶۴، ۱۸۰، ۴۴۳، ۵۰۵ و ۵۱۷.

۴ توالی سیستئین در پروتئین مشاهده شد که احتمال بسیار ضعیف ایجاد دو پیوند دی‌سولفید بین آمینواسیدهای ۲۷۳-۲۷۰ و ۴۹۴-۴۹۰ وجود دارد. امتیاز حلالیت محاسبه شده و pI پروتئینی توسط سرور Protein-Sol برای پروتئین VP2a به‌ترتیب برابر ۰/۲۹۸ و ۵/۶۵ و برای دو پروتئین VP2b و VP2c به ترتیب برابر ۰/۳۰۵ و ۵/۵۳ بود. بررسی احتمال فولدینگ و بار توالی پروتئین VP2 نشان داد که در صورت حذف ۲۰ آمینواسید ابتدایی و ۵ آمینواسید انتهایی پروتئین فولد بهتری خواهد داشت و امتیاز آن به ۰/۳۲۰ می‌رسد (شکل ۱). طبق پیش‌بینی سرور predictprotein سه ناحیه ۲۳-۱، ۳۷۱-۳۵۸ و ۳۹۰-۳۸۵ و سه آمینواسید ۴۰۵، ۵۷۸ و ۵۸۳ در منطقه آشفته قرار دارند و برای پایداری پروتئین مطلوب نیستند (شکل ۱-C).



شکل ۱. بررسی توزیع بار (A) و احتمال فولد (B) پروتئین VP2 در طول توالی. برخی ویژگی های دیگر پروتئین (C) پیش بینی شده توسط سرور predictprotein

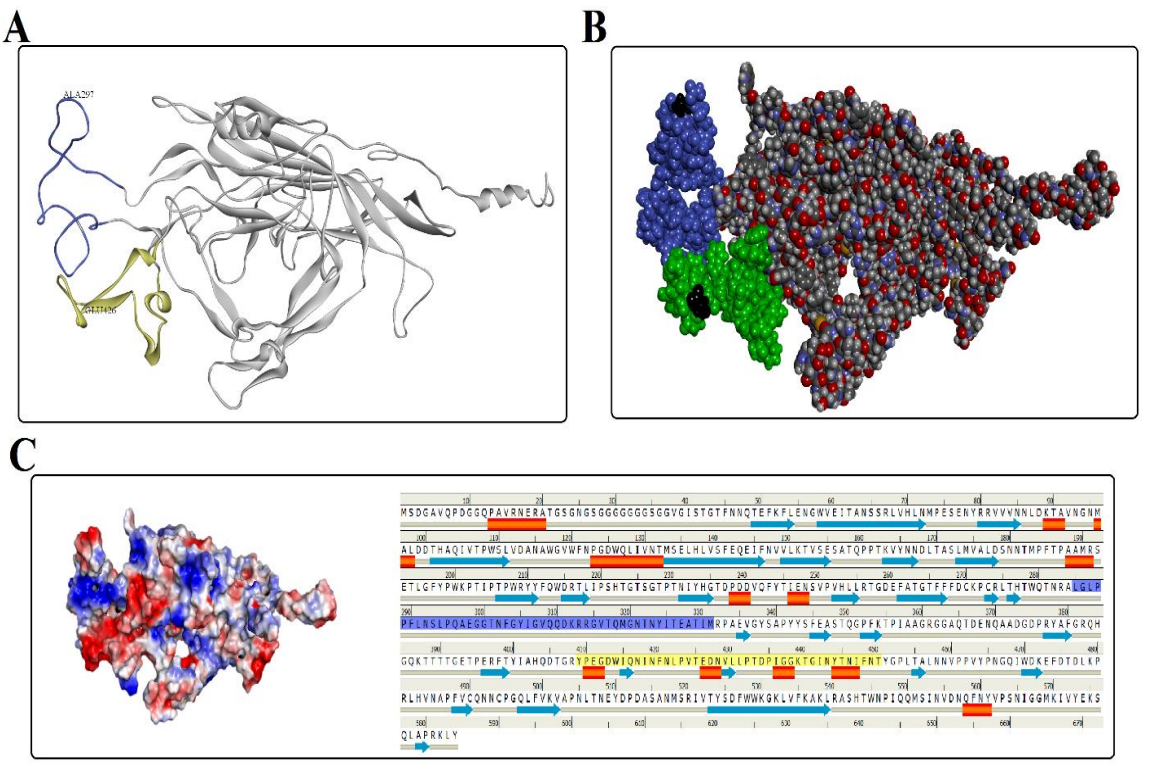
Fig 1. Examination of the charge distribution (A) and folding probability (B) of the VP2 protein along the sequence. Some other protein features (C) predicted by the predictprotein server

نتایج بررسی در معرض حلال قرار گرفتن پروتئین با الگوریتم Jnet_25 نشان داد که ناحیه ۳۶۰ الی ۴۵۰ باندترین ناحیه پروتئین است که با احتمال بیش از ۷۵ درصد در معرض قرار می‌گیرد و هیچ آمینواسیدی در این ناحیه با احتمال ۱۰۰ درصدی درون پروتئین قرار ندارد. بررسی ساختار دوم نیز نشان داد که در ناحیه ۲۶۰ الی ۴۶۰

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]

بیشترین ساختار به صورت کویل می‌باشد (شکل ۲-C). ساختار سوم هر سه پروتئین، به دلیل شباهت بالای آن‌ها، یکسان بود. تجزیه و تحلیل ساختاری نشان داد که دو آمینواسید کلیدی که در سویه‌های مختلف دچار جهش شده بودند، به‌طور کامل در معرض محیط قرار داشته و از نظر فضایی، در سطح پروتئین واقع شده‌اند. بررسی ساختار دوم در این ناحیه نشان داد که این بخش فاقد عناصر منظم ثانویه بوده و به‌صورت رندم کویل مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲. بررسی ساختار سوم پروتئین VP2c. (A) نمایش خطی ساختار سوم پروتئین، (B) نمایش حجمی ساختار، که در آن دو ناحیه جهش‌یافته و در معرض، با رنگ‌های آبی (۲۸۵-۳۳۱) و زرد (۴۰۹-۴۵۰) مشخص شده‌اند. آمینواسیدهای دارای جهش با رنگ مشکی نشان داده شده‌اند. (C) بررسی توزیع بار الکتریکی و ساختار دوم همراه با توالی پروتئینی.

Fig 2. Investigation of the tertiary structure of the VP2c protein. (a) Linear representation of the tertiary structure of the protein, (b) volumetric representation of the structure, in which the two mutated and exposed regions are marked in blue (285-331) and yellow (409-450). Mutated amino acids are shown in black. (c) Investigation of the electrical charge distribution and secondary structure along with the protein sequence.

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پیش‌بینی‌شده توسط سرور ProtParam برای سه پروتئین، تفاوت جزئی در شاخص ناپایداری نشان داد که به‌ترتیب برای VP2a، VP2b و VP2c برابر با ۲۴/۲۹، ۲۹/۵ و ۲۹ بود. همچنین، شاخص هیدروپاتی در پروتئین‌های VP2a و VP2b به‌ترتیب ۰/۵۰۷ و در VP2c برابر با ۰/۴۹۹ محاسبه شد. در شاخص‌های دیگر نیز تفاوت چندانی دیده نشد (جدول ۳).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]

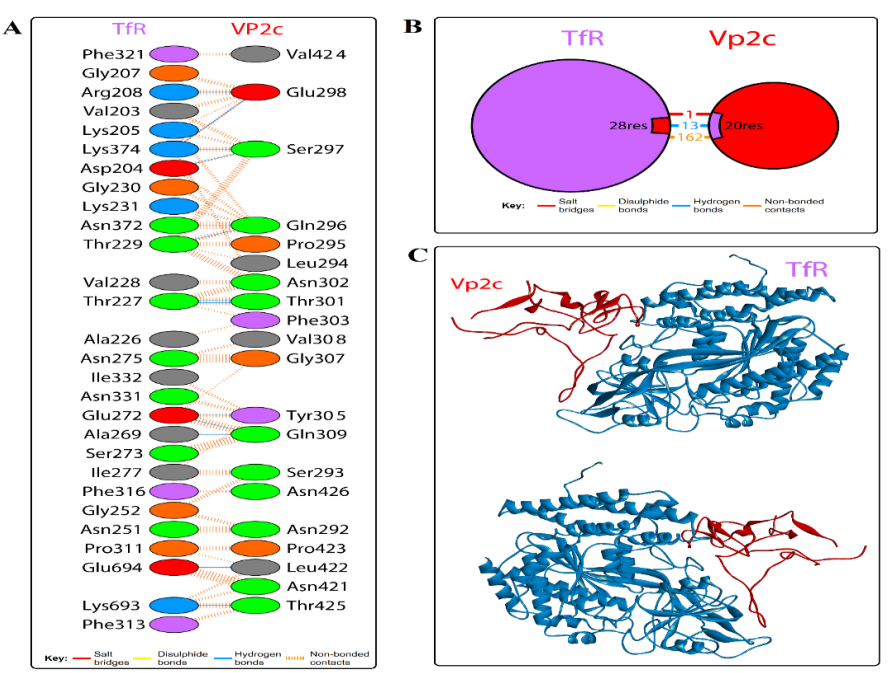
جدول ۳. بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین‌های کایمر

پارامتر	VP2a	VP2b	VP2c
نقطه ایزوالکتریک (pI)	۵/۴۴	۵/۴۴	۵/۴۴
ضریب خاموشی	۱۱۱۵۲۰	۱۱۱۵۲۰	۱۱۱۵۲۰
شاخص ناپایداری	۲۹/۲۴	۲۹/۵۰	۲۹
میانگین کل هیدروپاتیک (GRAVY)	-۰/۵۰۷	-۰/۵۰۷	-۰/۴۹۹
وزن مولکولی	۶۴	۶۴	۶۴
تعداد آمینواسید	۵۸۴	۵۸۴	۵۸۴
شاخص آلیفاتیک	۶۴/۹۳	۶۴/۹۳	۶۴/۹۹
نیمه عمر در پستانداران	۳۰ ساعت	۳۰ ساعت	۳۰ ساعت
نیمه عمر در مخمر	۳۰> ساعت	۳۰ > ساعت	۳۰> ساعت
نیمه عمر در E.coli	۱۰> ساعت	۱۰> ساعت	۱۰> ساعت

بررسی برهمکنش میان TfR و VP2c

برای بررسی تعامل میان پروتئین VP2c و گیرندهTfR ، داکینگ مولکولی با استفاده از نرم‌افزار HADDOCK ویرایش ۳ انجام شد. بهترین کمپلکس به‌دست آمده دارای HADDOCK score برابر با ۳۲/۲-، انرژی الکترواستاتیک ۲۴۹/۳- و سطح دفن‌شده ۲۲۸۲/۶Å² بود.

آنالیز ساختاری با سرور PDBsum نشان داد که در این کمپلکس، ۲۸ آمینواسید از TfR با ۲۰ آمینواسید از VP2c درگیر تعامل هستند، که از این میان ۱۳ پیوند هیدروژنی، ۱ پل نمکی و ۱۶۲ تماس غیرکوالانسی ایجاد شده است (شکل ۳).



شکل ۳. بررسی برهم‌کنش پروتئین VP2c با گیرنده TfR با استفاده از داکینگ مولکولی.
A) باقی‌مانده‌های آمینواسیدی درگیر در تعامل بین VP2c و TfR، به تفکیک نوع پیوند. B) شماتیک تعداد و نوع برهم‌کنش‌ها شامل پیوندهای هیدروژنی، پل‌های نمکی و تماس‌های غیرکوالانسی. C) نمای سه‌بعدی کمپلکس ناحیه اتصالی پروتئین VP2c (قرمز) و تاج گیرنده TfR (آبی) در محل اتصال؛ نمای بالا و پایین ساختار اتصال نشان داده شده است.

Fig 3. Investigation of the interaction of VP2c protein with the TfR receptor using molecular docking.
A) Amino acid residues involved in the interaction between VP2c and TfR, broken down by bond type. B) Schematic of the number and type of interactions including hydrogen bonds, salt bridges, and non-covalent contacts. C) 3D view of the complex of the VP2c protein binding region (red) and the TfR receptor crown (blue) at the binding site; top and bottom views of the binding structure are shown.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]

بررسی توزیع اپی‌توپیک و آنتی‌ژنیسیته پروتئین‌های VP2

نتایج حاصل از بررسی اپی‌توپ‌های شناسایی شده برای سلول‌های $T\ CD8^+$ (کلاس I) در جدول ۴ ارائه شده‌اند. در این جدول، قوی‌ترین اپی‌توپ‌ها بر اساس قدرت اتصال به آلل‌هایDLA نمایش داده شده‌اند. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، ناحیه آمینواسیدی ۲۸۵ تا ۴۵۰ از پروتئین VP2 دارای تراکم بالایی از اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده است.

مقادیر آنتی‌ژنیسیته محاسبه شده برای زیر واحدهای مختلف پروتئین VP2 شامل VP2a، VP2b و VP2c به‌ترتیب برابر ۰/۵۱۵۵، ۰/۵۱۵۲ و ۰/۵۱۱۰ بود. این نتایج نشان‌دهنده‌ی ماهیت آنتی‌ژنیک این پروتئین‌ها هستند. پس از انتخاب ناحیه‌ی آمینواسیدی ۲۸۰ تا ۴۵۰ به‌عنوان بخش منتخب دارای توزیع اپی‌توپی بالا، مقادیر آنتی‌ژنیسیته به‌ترتیب به ۰/۵۲۸۴ (VP2a)، ۰/۵۲۷۴ (VP2b) و ۰/۵۱۵۹ (VP2c) افزایش یافت.

جدول ۴. بررسی توزیع قوی‌ترین اپی‌توپ‌های T-cell در پروتئین VP2c

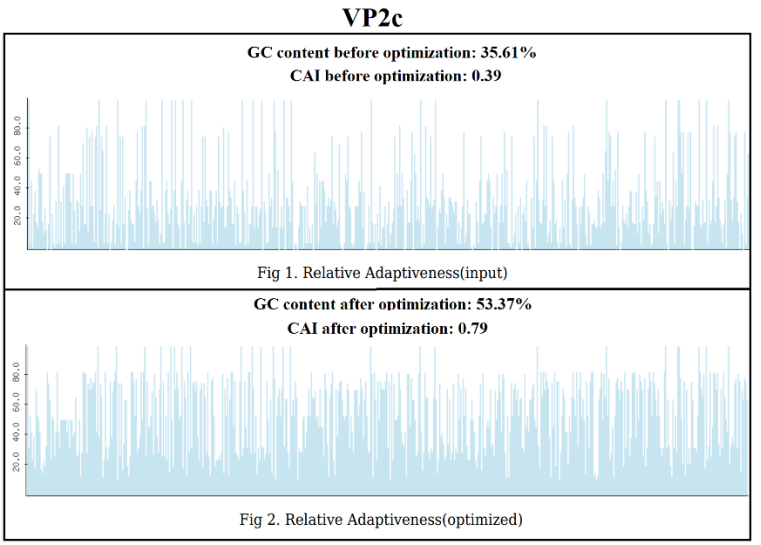
توالی پپتیدی	ناحیه	امتیاز	الل
ALDDTHAQIV	۹۸-۱۰۷	۰/۲۷۸	DLA-8850101
SLVDANAWGV	۱۱۱-۱۲۰	۰/۳۳۴	
YTIENSVPV	۲۴۵-۲۵۳	۰/۲۲۷	
GLPPFLNSL	۲۸۷-۲۹۵	۰/۰۶۱	
ESATQPPTKVY	۱۵۶-۱۶۶	۰/۳۴۹	DLA-8850801
HGTDPDDVQFY	۲۳۵-۲۴۵	۰/۱۲۸	
TTGETPERFTY	۳۹۱-۴۰۱	۰/۲۱۷	
QAEGGTNFGY	۲۹۷-۳۰۶	۰/۱۲۰	
PTIPTPWRY	۲۱۱-۲۰۳	۰/۱۵۷	
VTQMGNTNY	۳۱۷-۳۲۵	۰/۰۹۳	
NVDNQFNY	۵۵۵-۵۶۲	۰/۳۰۰	
RPAEVGYSAPY	۳۳۳-۳۴۳	۰/۱۲۸	DLA-8803401
YPNGQIWDKEF	۴۶۴-۴۷۴	۰/۱۴۸	
MPFTPAAM	۱۸۳-۱۹۰	۰/۱۰۹	
LPVTEDNVL	۴۲۳-۴۳۱	۰/۱۴۱	
QAADGDPRY	۳۷۱-۳۷۹	۰/۰۶۹	
IPTPWRYYF	۲۰۶-۲۱۳	۰/۰۶۹	
LPQAEGGTNF	۲۹۵-۳۰۴	۰/۱۴۲	
EYDPDASANM	۵۱۰-۵۱۹	۰/۱۶۰	DLA -C885010
ALDDTHAQI	۹۸-۱۰۶	۰/۰۶۵	
GLPPFLNSL	۲۸۷-۲۹۵	۰/۴۷۳	
FFDCKPCRL	۲۶۸-۲۷۶	۰/۰۱۸	
NVDNQFNYV	۵۵۵-۵۶۳	۰/۲۱۵	
IWDKEFDTDL	۴۷۰-۴۷۹	۰/۲۹۰	

بهینه‌سازی کدنی و ساختار mRNA

توالی های CDS کدکننده سه پروتئین VP2a، VP2b و VP2c با سرور Novapro بهینه‌سازی شدند (شکل ۴). در ساختار هر سه پروتئین توالی rbs داخل ژن (AGGAGGT) مشاهده شده است که پس از بهینه‌سازی حذف شد. آنالیز حضور نواحی برشی آنزیم محدود کننده در طول توالی‌های بهینه شده نشان داد که هیچ ناحیه برشی برای *BamHI* و *HindIII* وجود ندارد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

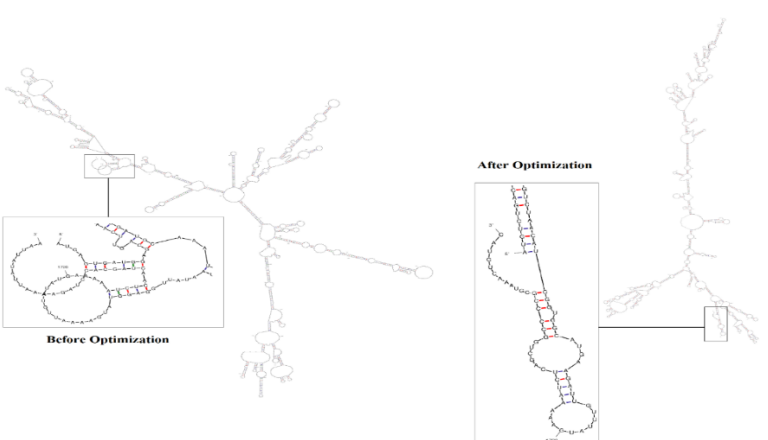
[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]



شکل ۴. بررسی شاخص CAI و درصد GC قبل و بعد از بهینه‌سازی برای پروتئین VP2c

Fig 4. CAI index and GC percentage before and after optimization for VP2c protein

ساختار ثانویه mRNA مربوط به توالی کدکننده پروتئین VP2c قبل و بعد از بهینه‌سازی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پس از بهینه‌سازی، انرژی آزاد (ΔG) ساختار mRNA از ۴۲۰- به ۵۹۷- کیلوکالری بر مول بهبود یافت که نشان‌دهنده افزایش پایداری ساختار mRNA است. همچنین، ساختار mRNA پس از بهینه‌سازی دارای پیچ‌های کمتری بود که این امر دسترسی ریبوزوم به ناحیه شروع ترجمه (RBS) و کارایی بیان پروتئین را افزایش می‌دهد (شکل ۵).



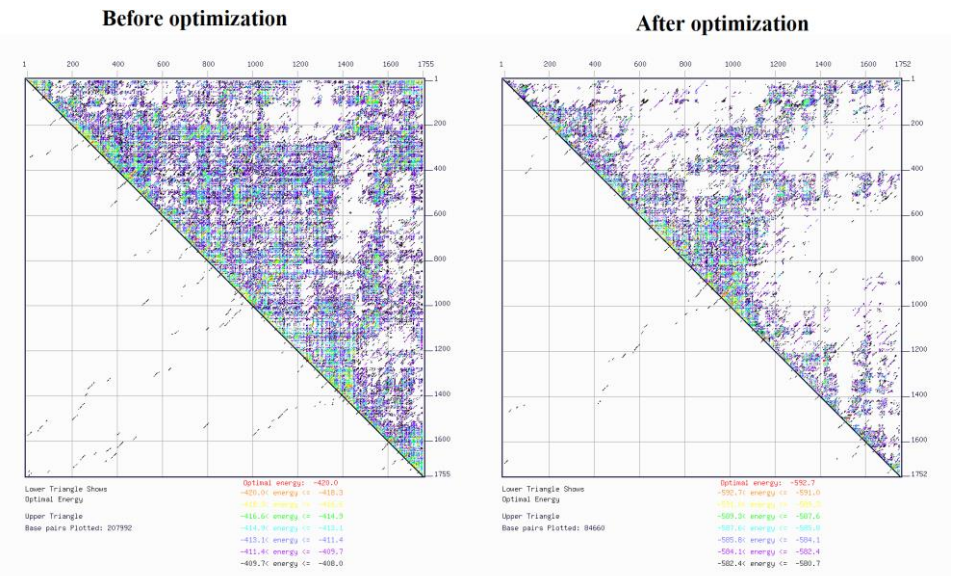
شکل ۵. بررسی ساختار دوم mRNA قبل و بعد از بهینه سازی کدنی برای VP2c

Fig 5. Examination of mRNA secondary structure before and after coding optimization for VP2c

همچنین، نمودار انرژی نقطه‌ای (Dot Plot) که توسط نرم‌افزار MFold ویرایش ۳/۲ تولید شد، نشان داد که پس از بهینه‌سازی، تعداد جفت‌های بازی که در تشکیل ساختارهای ثانویه پیچیده شرکت می‌کنند، کاهش یافته است. این کاهش تعاملات دوربرد و ساده‌تر شدن ساختار mRNA، به بهبود کارایی ترجمه و بیان پروتئین کمک می‌کند (شکل ۶).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]



شکل ۶. نمودار نقطه انرژی قبل و بعد از بهینه‌سازی کدنی برای VP2c
Fig 6. Energy point diagram before and after code optimization for VP2c

بحث

همچون برخی از بیماری‌های ویروسی، هیچ داروی اختصاصی وجود ندارد که بتواند ویروس CPV-2 را در سگ‌های آلوده از بین ببرد و تنها روش درمان، درمان حمایتی شامل تلاش‌ها ومراقبت‌های ویژه برای مبارزه با کم‌آبی بدن با جایگزینی الکترولیت، پروتئین و مایعات و کنترل استفراغ، اسهال، التهاب و درد و جلوگیری از عفونت‌های ثانویه است. این درمان‌ها برای کمک به سیستم بدن سگ است تا زمانی که سیستم ایمنی سگ بتواند عفونت ویروسی را شکست دهد. عموماً در درمان، یکی از داروهایی که توصیه می‌شود استفاده از کاپرومورلین (Capromorelin) با نام‌های تجاری انتیس (Entyce) و الورا (Elura) است. متوکلوپرامید یک داروی محرک معده است که می‌تواند با تحریک تخلیه معده و مهار ناحیه محرک گیرنده شیمیایی، استفراغ را کاهش دهد.

بهترین راه برای کنترل ویروس CPV در حیوانات اهلی، واکسیناسیون است. پس از شیوع بیماری، واکسن‌های مبتنی بر ویروس زنده ضعیف شده به سرعت توسعه یافتند. این واکسن‌ها ایمن بوده و با ایجاد ایمنی محافظتی، نقش مهمی در کنترل بیماری داشته‌اند. با این حال، ویروس همچنان به‌طور گسترده در طبیعت گردش می‌کند. علاوه بر این، تکامل ویروس و وقوع جهش‌های نقطه‌ای در پروتئین کپسید آن، موجب کاهش اثربخشی برخی از واکسن‌های پیشین در برابر سویه‌های جدید شده است. با این حال گزارشی وجود دارد که واکسن تجاری تخفیف حدت یافته علیه (Nobivac Intervet) VP2b می‌تواند حفاظت‌شدگی علیه VP2c در برابر چالش داشته باشد (۱۴).

اینکه واکسن بر پایه CPV قدیمی بتواند واریانت‌های CPV جدید را پوشش دهد از بحث‌های جدی بین متخصصان ویروس‌شناسی در زمینه پارووویروس است. این دغدغه وجود دارد که به دلیل تفاوت‌های آنتی‌ژنی بین سویه‌های در گردش با سویه واکسن، واکسیناسیون با سویه واکسن مبتنی بر سویه قدیمی نتواند در برابر سویه‌های جدید محافظت ایجاد نماید. سگ‌هایی که با واکسن سویه‌های قدیم واکسینه شده‌اند تیتر پایینی از آنتی‌بادی خنثی کننده برای سویه‌های جدید 2c و CPV-2a، 2b در مقایسه با سویه اصلی واکسن دارند. در یک مطالعه که در کره انجام شد، دریافتند که در سگ‌های واکسینه شده با ویروس قدیمی، چه با تست خنثی‌سازی ویروس و چه با تست هماگلوتیناسیون،

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]
[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]

آنتی‌بادی نوترالیزان علیه سویه‌های جدید وجود نداشت (۸). برهمین منوال، گزارشات متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد بیماری گاستروانتریت ناشی از CPV-2c در بین سگ‌هایی وجود دارد که با واکسن بر پایه سویه قدیمی CPV واکسینه شده بودند. در مقابل، گزارشاتی وجود دارد که واکسن می‌تواند علیه ویروس‌های 2c، 2b، CPV-2a، یک محافظت خوب ایجاد نماید. برخی مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد واکسن CPV-2 عموماً برای ایجاد محافظت و کاهش علایم و دفع ویروس در هنگام مواجهه با ویروس وحشی پس از واکسیناسیون مفید است. ازاین رو، درک تغییرات ژنتیکی ویروس برای بهبود راهبردهای واکسیناسیون و طراحی واکسن‌های مؤثر علیه هر سروتیپ، امری ضروری محسوب می‌شود (۸ و ۹).

پروتئین VP2 در مطالعات متعددی با توجه به خاصیت ایمنی‌زایی بالا جهت طراحی واکسن به کار گرفته شده است به‌عنوان مثال در مقاله‌ای داهیا (Dahiya) و همکاران از این پروتئین برای توسعه DNA واکسن علیه CPV استفاده کردند که توانستند هم ایمنی هومورال و سلولی را علیه ویروس در سگ‌ها تحریک کنند (۱۵). همچنین، کسل (Casal) و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که میزان ۱۰ میکروگرم از پروتئین نوترکیب بیان شده در باکلوویروس می‌تواند در سگ‌ها، ایجاد پاسخ ایمنی قوی نماید و سگ‌ها را در برابر ویروس محافظت نماید (۱۶). در مطالعه‌ای توسط اینتونگ (Inthong) و همکاران، بیان قطعه ۳۵ کیلو دالتونی از پروتئین VP2 ویروس پاروو سگ و نیز پروتئین کامل VP2 در سیستم بیانی پروکاریوتی با موفقیت انجام شد. نتایج نشان داد که هر دو پروتئین نوترکیب (قطعه‌ای و کامل) قادر به واکنش اختصاصی با آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد CPV هستند (۱۷). این مجموعه مطالعات، مزایای واکسن‌های نوترکیب در مقایسه با واکسن‌های کشته شده را برجسته می‌سازد؛ هرچند چالش اصلی همچنان عدم پوشش کامل تمام سروتیپ‌ها و سویه‌های ویروس باقی‌مانده است.

بر اساس گزارشات، در ساختار پروتئین VP2، هشت رشته بتا وجود دارد که چهار ناحیه لوپ منعطف بین آن‌ها دیده می‌شود که به شکل نواحی برآمده اسپایک مانند در سطح کپسید قرار می‌گیرند. لوپ‌های ۳ و ۴ به عنوان لوپ بلند GH شناخته می‌شود. ساختار فضایی این لوپ‌ها، آنتی‌ژنیسیته ویروس را مشخص می‌سازد. محل نوترالیزاسیون ویروس که به نام اپی‌توپ A نامیده می‌شود در لوپ ۱ و ۲ از یک مولکول با لوپ ۴ از پروتئین دیگر VP2 قرار دارد که شامل اسیدامینه‌های گلیسین ۲۲۴، هیستیدین ۲۲۲ و آسپاراژین ۲۹۳ می‌شود همچنین، یک اپی‌توپ کم اهمیت‌تر به نام اپی‌توپ B شامل اسیدامینه‌های آلانین ۳۰۰، آسپاراژین ۳۰۲ و گلیسین ۲۹۹ می‌شود (۷ و ۱۸).

در این مطالعه با توجه به بررسی توالی آمینواسید سروتیپ‌های متعدد VP2 مشاهده شد که جهش‌های نقطه‌ای در بین ناحیه ۲۹۷ تا ۴۲۶ می‌باشد که به نظر می‌رسد این ناحیه در اتصال پروتئین به گیرنده نقش دارد زیرا کاملاً در معرض سطح قرار می‌گیرد و توزیع بار در آن ناحیه بالا می‌باشد (شکل ۲). پس از بررسی ساختار سوم مشاهده شد که دو ناحیه ۳۳۱-۲۸۵ و ۴۵۰-۴۰۹ که به‌صورت شاخ از پروتئین جدا شده‌اند دارای دو جهش مهم هستند که هر دو جهش در رأس شاخ واقع شده است. آمینواسیدهای ۴۲۶ و ۲۹۷ می‌توان از این دو آمینواسید در طراحی روش‌های تشخیصی سروتیپ‌های متعدد در مطالعات بعدی استفاده کرد. علاوه بر این، تحلیل برهم‌کنش میان VP2c و گیرنده TfR نشان داد که باقی‌مانده‌های آمینواسیدی ۲۹۶، ۲۹۷، ۲۹۸، ۳۰۱، ۳۰۵، ۳۰۹، ۴۲۲ و ۴۲۵ با تشکیل پیوندهای هیدروژنی، نقش کلیدی در اتصال به گیرنده دارند (شکل ۳). بررسی‌های ایمونولوژیک نشان داد که از میان ۲۴ اپی‌توپ پیش‌بینی شده سلول T، ۷ اپی‌توپ قوی در ناحیه ۲۸۰ تا ۴۵۰ قرار دارند (جدول ۲). برش این ناحیه از پروتئین VP2 و استفاده از آن در طراحی واکسن برای هر سه سروتیپ، منجر به افزایش شاخص آنتی‌ژنیسیته بر اساس تحلیل‌های VaxiJen شده است. این موضوع بر پتانسیل بالای این ناحیه برای طراحی واکسن‌های چندظرفیتی و هدفمند علیه CPV تأکید دارد.

در این مطالعه هدف طراحی یک واکسن نوترکیب در باکتری *E. coli* بوده است. و برای این منظور آنالیزهای بیانی برای این پروتئین VP2 در هر سروتیپ انجام شد. با آنالیز ساختار پروتئین در سرور Protein-Sol مشاهده گردید که برخی نواحی فولد مناسب ندارند و بهتر از ساختار پروتئین حذف شوند از جمله ۲۰ آمینواسیدی ابتدایی که به نظر در عملکرد پروتئین نیز نقش ندارند و بهتر است که حذف شوند. نتایج بررسی ویژگی‌های فیزیک

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]

و شیمیایی نشان داد که پروتئین VP2c به علت شاخص ناپایداری کمتر در سیستم بیانی پایدارتر خواهد بود و همچنین میزان آب دوستی آن از دیگر پروتئین‌ها کمتر است. در ادامه پس از بهینه‌سازی بیان در *E. coli*، با استفاده از نتایج حاصل از MFOLD، اطمینان حاصل شد که توالی بهینه‌سازی شده فاقد ساختارهای ثانویه نامطلوب است که ممکن است بیان پروتئین را مختل کنند. این تحلیل به بهبود کارایی بیان پروتئین در میزبان باکتریایی کمک کرد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، سه سازه ژنی بهینه‌شده برای هر یک از سروتیپ‌های ویروس CPV به‌منظور بیان واکسن نوترکیب در باکتری *E. coli* طراحی و ارزیابی شد. نتایج حاصل نشان داد که ناحیه ایمونوژن اسید آمینه ۴۲۶-۲۹۷، و به‌ویژه ناحیه ۴۲۶-۲۲۲ شامل اپی‌توپ محافظت‌شده A، می‌توانند به‌عنوان بخش‌های کلیدی در طراحی واکسن‌های نوترکیب چندظرفیتی مورد استفاده قرار گیرند. برخلاف واکسن‌های موجود که مبتنی بر ویروس کشته‌شده یا زنده تضعیف‌شده هستند، این پژوهش نخستین گام به‌سوی توسعه واکسن نوترکیب مبتنی بر اپی‌توپ‌های محافظت شده VP2 محسوب می‌شود. این سازه‌های طراحی‌شده نه‌تنها پتانسیل استفاده در تولید واکسن‌های نوین علیه هر سه سروتیپ CPV را دارند، بلکه می‌توانند به‌عنوان اجزای آنتی‌ژنی در کیت‌های تشخیص و سروتیپ‌سنجی نیز کاربرد داشته باشند. گام‌های بعدی این پژوهش شامل بیان آزمایشگاهی سازه‌ها، ارزیابی ایمنی‌زایی آن‌ها در مدل‌های حیوانی، و مقایسه اثربخشی آن‌ها با واکسن‌های تجاری موجود خواهد بود. این تحلیل‌ها می‌توانند پایه‌ای برای تولید واکسن‌های مؤثر، ایمن و چندظرفیتی علیه ویروس CPV فراهم سازند.

حمایت مالی

این مطالعه تحت حمایت مالی هیچ سازمان یا مؤسسه‌ای نبوده است.

سپاس و قدردانی

از همکاران مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی کاربردی در اجرای پروژه قدردانی می‌شود.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Parrish CR. Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. Baillieres Clin Haematol 1995; 8(1): 57-71. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7663051/

2.Houston DM, Ribble CS, Head LL. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs : 283 cases (1982-1991). J Am Vet Med Assoc 1996; 208(4): 542-46. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8603904/

3.Truyen U. Evolution of canine parvovirus--a need for new vaccines?. Vet Microbiol 2006; 117(1): 9-13. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16765539/

4.Gallo Calderón M, Wilda M, Boado L, et al. Study of canine parvovirus evolution: comparative analysis of full-length VP2 gene sequences from Argentina and international field strains. Virus Genes 2012; 44(1): 32-9. 10.1007/s11262-011-0659-8

5.Parrish CR, Have P, Foreyt WJ, et al. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. J Gen Virol 1988; 69 (Pt 5):1111-16. 10.1099/0022-1317-69-5-1111

6.Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. J Gen Virol 2001; 82(Pt 12): 3021-25. 10.1099/0022-1317-82-12-3021

7.Miranda C, Thompson G. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. J Gen Virol 2016; 97(9): 2043-57. 10.1099/jgv.0.000540

8.Decaro N, Buonavoglia C, Barrs VR. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication?. Vet Microbiol 2020; 247: 108760. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32768213/

9.Hoang M, Lin WH, Le VP, et al. Molecular epidemiology of canine parvovirus type 2 in Vietnam from November 2016 to February 2018. Virol J 2019; 16(1): 52. 10.1186/s12985-019-1159-z

10.Chiang SY, Wu HY, Chiou MT, et al. Identification of a novel canine parvovirus type 2c in Taiwan. Virol J 2016; 13(1): 160. 10.1186/s12985-016-0620-5 .

11.Woolford L, Crocker P, Bobrowski H, et al. Detection of the Canine Parvovirus 2c Subtype in Australian

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]

Dogs. Viral Immunol 2017; 30(5): 371-6. 10.1089/vim.2017.0019

12.Hernández-Blanco B, Catala-López F. Are licensed canine parvovirus (CPV2 and CPV2b) vaccines able to elicit protection against CPV2c subtype in puppies?: A systematic review of controlled clinical trials. Vet Microbiol 2015; 180(1-2): 1-9. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26249827/

13.Larson LJ, Schultz RD. Do two current canine parvovirus type 2 and 2b vaccines provide protection against the new type 2c variant?. Vet Ther 2008; 9(2): 94-101. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18597247/

14.Spibey N, Greenwood NM, Sutton D, et al. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. Vet Microbiol 2008; 128(1-2): 48-55. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18006253/

15.Dahiya SS, Saini M, Kumar P, et al. Immunogenicity of a DNA-launched replicon-based canine parvovirus DNA vaccine expressing VP2 antigen in dogs. Res Vet Sci 2012; 93(2): 1089-97. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7111809/

16.López de Turiso JA, Cortés E, Martínez C, et al. Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. J Virol 1992; 66(5): 2748-53. https://doi.org/10.1128/jvi.66.5.2748-2753.1992

17.Inthong N, Kaewmongkol S, Meekhanon N, et al. Expression of recombinant 35 kDa fragment of VP2 protein of canine parvovirus using Escherichia coli expression system. Vet World 2021; 14(6): 1682-1688. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34316219/

18.Wikoff WR, Wang G, Parrish CR, et al. The structure of a neutralized virus: canine parvovirus complexed with neutralizing antibody fragment. Structure 1994; 2(7): 595-607. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7522904/

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.61882/ismj.27.6.418]