مطالعه بیوانفورماتیکی چندجانبه مولکولی و ساختاری پروتئین غشای خارجی (OmptS) باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* عامل بیماری سپتی‌سمی عفونی در ماهی در جهت اهداف ایمن‌سازی

- **شادی افتخارمعنوی***: گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، صندوق پستی: ۱٤٥- ٦۱۳٥٥
- **رحیم پیغان**: گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، صندوق پستی: ۱٤٥- ٦۱۳٥٥
- **مهدی سلطانی**: گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، صندوق‌پستی: ۱۳۱٤٥-۱۳۱۸
- **مسعود قربانپورنجفی**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، صندوق پستی: ۱٤٥- ٦۱۳٥٥
- **آرش قلیانچی‌لنگرودی**: گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، صندوق پستی: ۱۳۱٤٥-۱۳۱۸

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۳

چکیده

باکتری آئرومونـاس هیدروفیلا یک باکتری گرم منفی و متحرک است که به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب و زئونوز در ماهیان گرمابی مطرح است. وقوع میزان بالای مرگ و میر در ماهیان، خسارات اقتصادی و مقاومت باکتریایی از عوامل اصلی پیدایش روش‌های جدید مانند واکسیناسیون علیه آئرومونـاس هیدروفیلا محسوب می‌شوند. با توجه به مطالعات اخیر پروتئین غشای خارجی OmpTS فاکتور حدت باکتری آئرومونـاس هیدروفیلا بوده و نظر به اهمیت سپتی‌سمی‌های باکتریایی ناشی از آئرومونـاس هیدروفیلا بررسی بیوانفورماتیکی و ساختاری این پروتئین در راستای ایمن‌سازی ماهی ضروری به‌نظر می‌رسد. در این مطالعه باکتری آئرومونـاس هیدروفیلا جدا شده از کلیه تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) بیمار با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی از جمله اکسیداز، کاتالاز، TSI، SIM، آسکولین، نیترات و هیدرولیز قندها، مورد بررسی قرار گرفته و یک جفت پرایمر اختصاصی از OmptS طراحی شده و محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تایید تعیین توالی گردید. به‌منظور دسترسی به اطلاعات بیش‌تر در مورد ساختار و خصوصیات این پروتئین درخت تکاملی و ساختارهای این پروتئین (اول، دوم و سوم) رسم گردیدند. آزمایش‌های بیوشیمیایی و تعیین توالی محصول PCR موید باکتری آئرومونـاس هیدروفیلا جدا شده از کلیه تاس‌ماهی ایرانی بوده و براساس درخت تکاملی OmptS باکتری آئرومونـاس هیدروفیلا بیش‌ترین شباهت را به *A. aquariorum* و کم‌ترین شباهت را به *A. diversa* دارد. بررسی‌های ساختاری OmptS بیان‌گر پایداری این پروتئین در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. به‌علاوه جایگاه‌های فعال این پروتئین بین اسیدآمینه‌های ۳٤۰-۱۰۲ می‌باشد. پیش‌گیری مناسب برای جلوگیری از وقوع عفونت‌ها خصوصاً عفونت‌های باکتریایی گرم منفی در صنعت آبزی پروری ضروری بوده از طرفی مطالعه‌ای در زمینه بیوانفورماتیکی بر روی OmptS صورت نگرفته ولی با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه پروتئین غشای خارجی OmptS کاندید مناسبی برای ایمن‌سازی ماهی علیه آئرومونـاس هیدروفیلا مطرح است.

کلمات کلیدی: تاس‌ماهی ایرانی، *آئرومونـاس هیدروفیلا*، پروتئین غشای خارجی OmptS، مطالعه بیوانفورماتیک

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: shadieftekharmanavi@ymail.com

مقدمه

آئروموناس هیدروفیلا یک پاتوژن فرصت‌طلب بوده، که می‌تواند طیف وسیعی از میزبانان از جمله گونه‌های مختلف ماهیان مانند کپورمعمولی، گربه‌ماهی، تیلاپیا، مارماهی، گلدفیش و انسان را مبتلا کند (Poobalane و همکاران، ۲۰۱۰؛ Zhou و همکاران، ۲۰۱۰؛ Xia و همکاران، ۲۰۰۴). اگرچه این باکتری معمولاً پاتوژن ثانویه است، اما به‌صورت اولیه نیز عامل مرگ و میر زیادی در مزارع پرورش ماهی می‌باشد و به‌عنوان یکی از عوامل مهم بیماری‌زا در ماهیان گرمابی مطرح است (Pridgeon و همکاران، ۲۰۱۱). *آئروموناس هیدروفیلا* عامل بسیاری از عوارض و بیماری‌ها در ماهی از جمله سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده، آب‌آوردگی، زخم، سپتی‌سمی بدون علامت و بیرون‌زدگی چشم می‌باشد. این باکتری در پاره‌ای مواقع خسارات جبران ناپذیری در جمعیت‌های ماهیان پرورشی و وحشی ایجاد می‌نماید و کنترل عفونت به حذف فاکتورهای مستعدکننده عفونت بستگی دارد (Khushiramani و همکاران، ۲۰۰۷). به سپتی‌سمی ناشی از آئروموناس‌های متحرک، سندرم زخمی همه‌گیر نیز گفته می‌شود (Pridgeon و Klesius، ۲۰۱۱؛ Majumdar و همکاران، ۲۰۰۷). *آئروموناس هیدروفیلا* هم‌چنین در ایجاد عفونت‌های روده‌ای و به‌میزان کم‌تر عفونت‌های خارج روده‌ای نقش دارد (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۷).

کنترل آنتی‌بیوتیکی بیماری ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا*، ممکن است به‌علت ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، موفقیت‌آمیز نباشد، از این‌رو ساخت و توسعه واکسن ضد آن جهت پیش‌گیری از بیماری‌های ناشی از این عامل، کاهش خسارت اقتصادی در صنعت آبزی‌پروری و کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک در ماهی ضروری به‌نظر می‌رسد (Sahoo و همکاران، ۲۰۱۱؛ Poobalane و همکاران، ۲۰۱۰؛ Khushiramani و همکاران، ۲۰۰۷). تاکنون بیش‌تر مطالعات انجام شده در زمینه ایمن‌سازی ضد *آئروموناس هیدروفیلا* با استفاده از باکتری کشته شده با فرمالین یا حرارت صورت گرفته است (Pridgeon و Klesius، ۲۰۱۱)، البته به‌علت تنوع آنتی‌ژنی جدایه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* تاکنون واکسن تجاری موفق ضد آن به بازار عرضه نشده است. کپسول، لیپوپلی‌ساکارید، پروتئین غشاء خارجی، انتروتوکسین و تاژک این باکتری، با بیماری‌زایی آن در ارتباطند (Yeh و Klesius، ۲۰۱۱). پروتئین‌های غشاء خارجی *آئروموناس هیدروفیلا*، به‌علت دارا بودن سطوح در ارتباط با سلول میزبان و سدهای دفاعی، یکی از عوامل تعیین‌کننده حدت بوده و با توجه به این‌که وجود ژن کدکننده پروتئین غشای خارجی، (OmpTS) *آئروموناس هیدروفیلا* در جدایه‌های مختلف از باکتری آئروموناس با استفاده از آنتی‌بادی ضد این پروتئین به روش وسترن بلات به‌اثبات رسیده و از طرفی قادر به تحریک سیستم ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی ماهی می‌باشد، استفاده از آن به‌عنوان آنتی‌ژن در واکسن می‌تواند محافظت کننده باشد (Khushiramani و همکاران، ۲۰۰۸؛ Khushiramani و همکاران، ۲۰۰۷). از طرفی بررسی‌های ایمنی‌شناسی بر روی پروتئین‌های غشای خارجی آئروموناس‌های متحرک نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها با ایمنی در ارتباط بوده و کاندید مناسبی برای تولید واکسن می‌باشند (Khushiramani و همکاران، ۲۰۰۷).

برنامه‌های محاسبه‌ای و سرورهای آنلاین از ابزارهای رایج در آنالیز و شناسایی توالی پروتئین می‌باشند (Sivakumar، ۲۰۰۵). خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ساختاری پروتئین‌ها به صورت بهتری با استفاده از ابزارهای محاسبه‌ای قابل فهم می‌شوند. تعدادی از ابزارهای محاسبه‌ای جهت شناخت و پیش‌گویی ساختار پروتئین‌ها به‌وجود آمده‌اند. توالی آمینواسیدی پروتئین مورد نظر می‌تواند به‌عنوان ورودی در بسیاری از برنامه‌ها و سرورها به‌کار رفته و اطلاعات بی‌شماری را از پروتئین در اختیار قرار دهد (Tramontano و همکاران، ۲۰۰۱؛ Marti-Renom و همکاران، ۲۰۰۰).

نظر به‌اهمیت سپتی‌سمی‌های باکتریایی ناشی از آئروموناس‌های متحرک به‌خصوص *آئروموناس هیدرفیلا*، در صنعت آبزی‌پروری در کشور و با توجه به این که مطالعه واکنش سیستم ایمنی ماهی نسبت به عفونت‌های باکتریایی در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته (Das و همکاران، ۲۰۱۱)، هم‌چنین گزارشی مبنی بر بررسی بیوانفورماتیکی این پروتئین وجود ندارد در مطالعه حاضر اقدام به آنالیز in silico خصوصیات مولکولی، ساختاری و ایمنی‌شناسی پروتئین غشاء خارجی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (OmpTS) به‌منظور شناخت کارکردهای مختلف این پروتئین و استفاده از آن که در جهت اهداف ایمن سازی شده است، که این امر با به‌کارگیری گستره وسیعی از ابزارها و برنامه‌های پیشرفته بیوانفورماتیکی محقق گردیده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که در سال ۱۳۹۳ انجام گرفت به‌منظور بررسی توالی ژن ompTS باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* از باکتری جدا شده از کلیه تاس‌ماهی بیمار و دارای علایم در

دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران استفاده شد. در ابتدا از باکتری لئوفیلیزه در محیط آبگوشت TSB و آگارخونی کشت داده شد و ۱ شب در انکوباتور ۱±۳۰ درجه گرمخانه‌گذاری گردید و پس از رشد پرگنه‌های تک مبادرت به انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی گردید (ابوالقاسمی و همکاران، ۱۳۸۸). در ادامه جهت تایید مولکولی،DNA باکتری با استفاده از کیت استخراج DNA (MBST، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده از کشت تازه صورت گرفت و پس از طراحی یک جفت پرایمر اختصاصی، توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اقدام به تکثیر ژن مورد نظر گردید و محصول واکنش با روش الکترفورز در ژل آگاروز ۱ درصد و دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین جهت اطمینان از صحت طول قطعه تکثیر شده از مارکر ۱ کیلو جفت باز و ۱۰۰ جفت باز استفاده گردید.

بازیابی توالی‌های پروتئینی و ژنیOmpTS و بررسی حفاظت‌شدگی دومن‌های این پروتئین در *آئروموناس هیدروفیلا*: توالی ژن پروتئین غشای خارجی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* OmpTS به‌همراه سایر توالی‌های این پروتئین مربوط به گونه‌های دیگر باکتری *آئروموناس*، از مرکز اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) گرفته و ذخیره گردید. توالی پروتئینی OmpTS متعلق به *آئروموناس هیدروفیلا* به شماره دسترسی AFD۰۲۱۱۱ و توالی ژن مربوط به آن جهت آنالیزهای مراحل بعدی این مطالعه استفاده شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار BLAST که توسط پایگاه اطلاعاتی NCBI ارائه می‌گردد توالی پروتئینی پروتئین غشای خارجی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با شماره دسترسی AFD۰۲۱۱۱ با داده‌های موجود در بانک جهانی، مقایسه گردید تا صحت ارتباط و تشابه توالی سوش مورد ارزیابی با توالی داده‌های مرتبط مورد ارزیابی قرار گیرد. سپس حفاظت‌شدگی دومن‌های پروتئین گزارش شده برای این پروتئین ثبت گردید.

هم‌ردیفی توالی‌ها، رسم منحنی آنتروپی و درخت تکاملی: توالی ژن OmpTS به‌دست آمده از NCBI با استفاده از نرم‌افزارهای ClustalX (Thampson و همکاران، ۱۹۹۷) و Bioedite۷/۷/۹ مورد ارزیابی قرار گرفته شد. سپس آخر توالی‌های کوتاه و نواحی مبهم حذف شدند و آنتروپی توالی‌ها مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز اخیر جهت بررسی میزان تنوع و حفاظت شدگی موجود در بین اسید آمینه‌های توالی‌های مربوط به گونه‌های مختلف *آئروموناس* انجام گردید.

جهت رسم درخت تکاملی (Phylogenetic tree) از نرم‌افزار MEGA۵/۳، با روش اتصال همسایه (Nieghbour joining) استفاده شد (Salehi Moghadam و همکاران، ۲۰۱۳). امروزه این روش در بین محققین به‌عنوان یک روش متوازن جهت رسم درخت تکاملی شناخته شده است که نسبت به بسیاری از روش‌های دیگر درخت‌های دقیق‌تری ایجاد می‌کند. برای اطمینان از اعتبار و تکرارپذیری درخت‌های رسم شده از Boot Strap، ۱۰۰۰ استفاده و برون گروه مناسب نیز مورد نظر قرار گرفت (Salehi Moghadam و همکاران، ۲۰۱۳).

پیش‌گویی پروفایل‌های فیزیکوشیمیایی موثر در آنتی ژنیسیتی: از الگوریتم Kolaskar و Tongaonkar به‌عنوان یک روش با دقت مناسب جهت نقشه‌یابی نواحی با آنتی ژنیسیته بالا استفاده گردید (Ranjbar و همکاران، ۲۰۱۳). این الگوریتم سه فاکتور هیدروفیلیسیتی، دسترسی و انعطاف‌پذیری را به‌صورت هم‌زمان بررسی کرده و یک جواب واحد را به کاربر می‌دهد.

بررسی ساختار اولیه OmpTS: ساختارهای اولیه OmpTS خصوصیاتی نظیر میزان حلالیت، شاخص پایداری، نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی، تعداد باقیمانده های با بار مثبت و منفی و GRAVY (Grand Average Hydropathicity) با استفاده از ابزارهای سرور Expasy مورد بررسی قرار گرفته و در جدول ۲ مرتب گردید. هم‌چنین تعداد و نحوه فراوانی اسیدهای آمینه مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی تغییرات پس از ترجمه (گلیکوزیلاسیون): به جهت اهمیت تغییر پس از ترجمه (گلیکوزیلاسیون) در میزان آنتی ژنیسیتی و خواص فیزیکوشیمیایی این مورد ارزیابی شده است. N-glycosylation و O-glycosylation توسط ابزارهای NetNGlyc۱/۰ و NetOGlyc۴/۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

بررسی ساختارهای ثانویه OmpTS: ساختارهای ثانویه OmpTS مانند رشته‌ها و پیچش‌های آلفا و بتا با استفاده از برنامه‌های بیوانفورماتیک موجود در سرور استفاده گردید. سپس از روش GOR۴ جهت شناسایی پیچش‌های آلفا، رشته‌های بتا و ساختار کویل استفاده گردید.

پیش‌گویی ساختارهای سوم OmpTS با روش همولوژی مدلینگ و نمایش ساختار سه بعدی (فضایی) پروتئین: BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool) و PSIBLAST در پایگاه مرجع پروتئین (PDB) جهت انتخاب بهترین الگو (توالی همولوگوس) و ساخت ساختار سه بعدی (۳D)

پروتئین OmpTS به‌روش همولوژی مدلینگ استفاده گردید (رنجبر و همکاران، ۱۳۹۲). سعی شد در انتخاب الگو معیارهایی نظیر حد تفکیک پائین‌تر از ۳ آنگستروم مربوط به کریستالوگرافی اشعه ایکس، R-value پائین‌تر از ۰/۳، شباهت بالای ۳۵ درصد الگو با توالی مورد مطالعه و E-value پائین اعمال شود. هم‌چنین به این نکته توجه شد که توالی مورد نظر و الگوی انتخاب شده واجد هم‌ردیفی ساختاری مناسبی با ارزش‌های RMSD (Root-mean-square deviation) پائین باشند. رعایت این نکات سبب افزایش اعتبار و اطمینان‌پذیری مدل می‌شود. بعد از هم‌ردیفی نزدیک‌ترین توالی پیدا شده با توالی مورد آنالیز در این مطالعه مورد هم‌ردیفی قرار گرفت و از برنامه Modeller نسخه ۹v۸ جهت ساخت ساختار سه بعدی و فضایی از روی الگو بر مبنای توالی OmpTS استفاده گردید (فهیمی و همکاران، ۱۳۹۰). جهت نمایش ساختار سه بعدی پروتئین از امکانات برنامه SwissPdbviewer بهره‌گیری شد.

اعتبارسنجی و بهینه‌سازی مدل فضایی ترسیم شده: ارزیابی کیفیت مدل، مرحله‌ای بسیار مهم در همولوژی مدلینگ می‌باشد. جهت اعتبارسنجی برای دستیابی به بهترین نتایج از روش هیبرید (چندگانه) جهت آنالیز استفاده گردید. جهت اعتبارسنجی ساختاری مدل ترسیم شده سه بعدی از طرح راماچاندران، جهت ارزیابی و تخمین کیفیت و دقت stereo chemical (محاسبه زوایای دی هیدرال) پروتئین مدل‌سازی شده از برنامه RAMPAGE و از برنامه ProQ (Protein Quality server) جهت بررسی کیفیت مدل استفاده گردید (Wallner، ۲۰۰۳).

شناسایی جایگاه فعال پروتئین: سرور Q-siteFinder امکاناتی را جهت شناسایی نواحی اتصالی و فعال پروتئین در ساختار فضایی پروتئین به‌دست می‌دهد که از این خصوصیات جهت ارزیابی این نقاط در پروتئین غشای خارجی OmpTS باکتری *آئروموناس* هیدروفیلا استفاده شد (Lauria و Jackson، ۲۰۰۵).

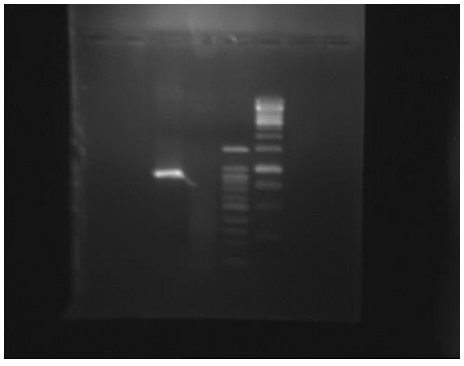
نتایج

آزمایش‌های بیوشیمیایی: نتایج آزمایش‌ها در جدول زیر تاییدکننده گونه *آئروموناس هیدروفیلا* می‌باشد:

جدول ۱: نتایج آزمایش‌ها در تایید گونه *آئروموناس هیدروفیلا*

تست	گرم	اکسیداز	کاتالاز	سولفیدهیدروژن	حرکت	ایندول	اسکولین	ژلاتین	TSI	لیزین	اورنیتین	گالاکتوز	مالتوز	نیترات	اینوزیتول	MR/VP
–	+	+	+	+	+	–	+	+	اسید/اسید	+	–	+	+	+	+	+/–

بررسی مولکولی: مطالعه توالی ژن، پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمر اختصاصی و تعیین توالی ژن حاکی از شباهت ژن جداشده با توالی‌های موجود در بانک ژن می‌باشد.

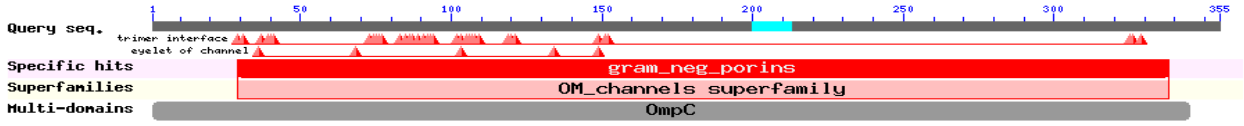


شکل ۱ : تصویر محصول واکنش PCR در ژل آگارز

از راست به چپ شکل: مارکر ۱ کیلو باز، مارکر ۱۰۰ جفت باز، ژن OmpTS

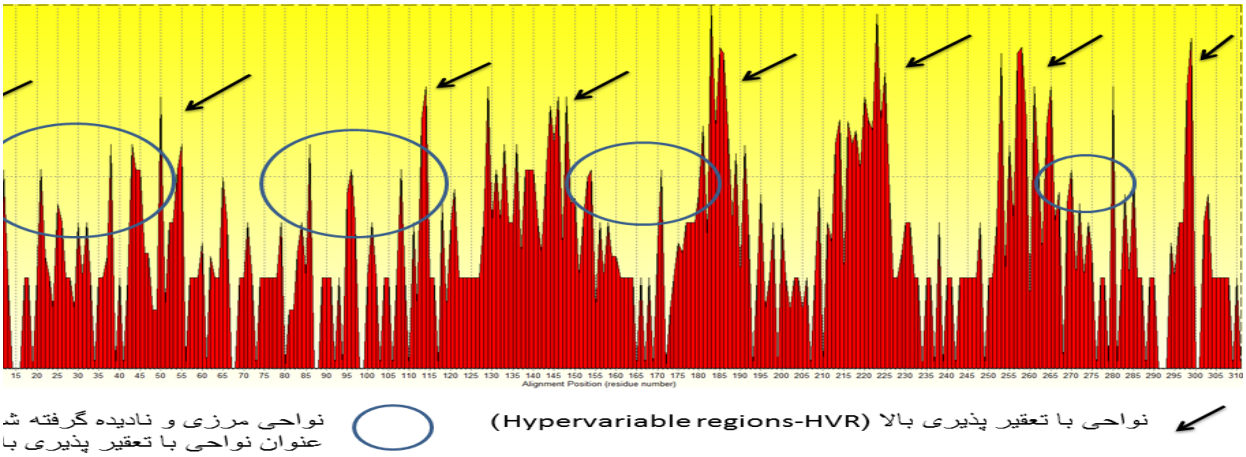
ارزیابی دومن‌های حفاظت شده پروتئین: Specific hits در شکل ۲ حاکی از این است که این توالی شباهت بسیار زیادی به پورین‌های شکل‌دهنده کانال آبی در باکتری گرم منفی دارد که کانالی جهت انتشار مولکول‌های هیدروفیلیک کوچک از طریق غشای خارجی شکل می‌دهند.

Superfamiliy بیان‌گر تعلق دومن‌های این پروتئین به ابرخانواده پورین است. Multi domains نیز نمایان‌گر شباهت به پروتئین‌های خارج غشایی می‌باشد.



شکل۲: شناسایی دومن‌های حفاظت شده پروتئین غشای خارجی (OmpTS) باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*

رسم منحنی آنتروپی و درخت تکاملی: پلات (نقشه) آنتروپی جهت ارزیابی نواحی حفاظت شدگی و تنوع در طول توالی پروتئینی OmpTS در جنس آئروموناس در شکل ۳قابل مشاهده است. هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی OmpTS در *آئروموناس هیدروفیلا* و هم‌ردیفی این پروتئین در جنس *آئروموناس* نشان‌دهنده حفاظت تقریباً صد درصدی این پروتئین در میان *آئروموناس هیدروفیلاها* بوده و از سوی دیگر در میان جنس *آئروموناس* تنوع قابل ملاحظه‌ای در توالی پروتئینی وجود دارد که در منحنی آنتروپی قابل ملاحظه است. براساس منحنی حدود هشت ناحیه با میزان تنوع زیاد در میان توالی قابل مشاهده است که مشخص شده‌اند. نواحی نیز که در حد آستانه یا با فاصله ناچیز بالاتر از آن قرار دارند نادیده شمرده شده‌اند. توجه به این نکته نیز ضروری است که به سبب طول‌های مختلف توالی‌ها سعی شد ابتدا توالی‌ها هم طول شوند و سپس نقشه آنتروپی رسم شود.

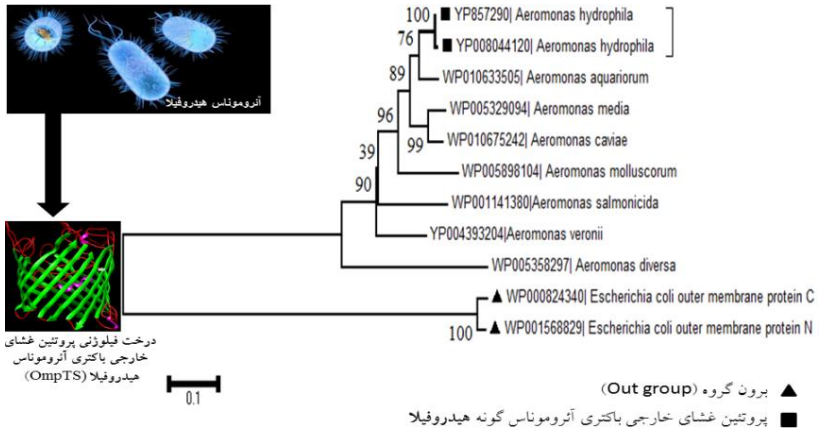


شکل ۳: تنوع اسیدآمینه‌ای در توالی ژن پروتئین غشای خارجی OmpTS باکتری جنس *آئروموناس* با رسم نقشه آنتروپی

نواحی بالای آستانه ۱ به‌عنوان نواحی با تغییرپذیری بالا در نظر گرفته می‌شوند.

در شکل ۴ درخت تکاملی براساس توالی پروتئینی غشای خارجی باکتری‌های جنس *آئروموناس* رسم گردیده است. دو توالی مربوط به باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در یک شاخه درخت قرار گرفته‌اند و حالت عمودی و عدم کشیدگی (یا کشیدگی ناچیز) آن‌ها از گره (node) مشترک مربوط به آن‌ها حاکی از شباهت و ارتباط نزدیک آن‌ها می‌باشد. به‌نظر می‌رسد براساس درخت تکاملی نزدیک‌ترین گونه *آئروموناس* به گونه *هیدروفیلا* از نظر پروتئین OmpTS توالی مربوط به *Aeromonas aquariorum* است که در نزدیک‌ترین شاخه قرار گرفته و حالت خواهری با *هیدروفیلا* دارد. از نزدیک‌ترین گونه‌های دیگر می‌توان از *Aeromonas media* و *Aeromonas cavia* نام برد. دورترین گونه *آئروموناس* به گونه *هیدروفیلا* *Aeromonasdiversa* می‌باشد که در یک شاخه مجزا قرار گرفته است. به‌نظر *Aeromonas veroni* در میان سایر گونه‌های *آئروموناس* از نظر پروتئین OmpTS قدیمی‌تر می‌باشد.

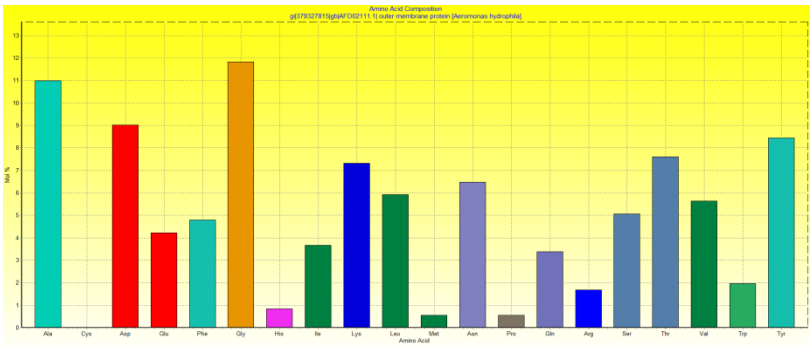
این نتایج تا اندازه‌ای این نکته را قوت می‌دهد که ایمن سازی با پروتئین OmpTS *آئروموناس هیدروفیلا* شاید سبب ایمن‌سازی علیه *Aeromonas aquariorum* با احتمال زیاد و سپس علیه *Aeromonas media* و *Aeromonas cavia* شود (منظور واکنش متقاطع است). هم‌چنین تخمین میانگین واگرایی تکاملی مابین توالی‌های پروتئینی آئروموناس ۰/۲۶۰ (با احتمال خطای ۰/۰۲۰) به‌دست آمد که حاکی از واگرایی تقریباً کم این پروتئین است.



شکل ۴: درخت تکاملی پروتئین غشای خارجی (OmpTS) باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* جزئیات در شکل مشخص شده‌اند

پروتئین غشای خارجی *اشرشیا کلی* (*Escherchia coli*) به‌عنوان برون گروه انتخاب شده است.

پیش‌گویی ساختار اول پروتئین OmpTS: خلاصه‌ای از نتایج آنالیز در جدول ۲ ارائه گردیده است. نتایج نشان می‌دهد که نقطه ایزوالکتریک این پروتئین در دامنه اسیدی (پائین‌تر از ۷) است و خاصیت اسیدی دارد. دانستن نقطه ایزوالکتریک در ارزیابی حلالیت و نحوه حرکت پروتئین در میدان الکتریکی صفر مفید است. هم‌چنین محاسبه عدد بالا برای شاخص آلفاتیک این پروتئین حاکی از پایداری این پروتئین در محدوده مناسبی از دماها می‌باشد. شاخص ناپایداری پروتئین غشای خارجی (OmpTS) باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* بیان‌گر پایداری این پروتئین و قابلیت تحمل شرایط آزمایشگاهی جهت بررسی روی آن می‌باشد. هم‌چنین هیدروفیل بودن پروتئین، بیان‌گر قابلیت مناسب پروتئین در ارتباط با محیط آبی پیرامون آن می‌باشد. در نهایت فراوان‌ترین اسید آمینه‌ها به‌ترتیب گلایسین و آلانین می‌باشند (جدول ۲، شکل ۵).



شکل ۵: دیاگرام فراوانی اسیدآمینه‌ها در پروتئین غشای خارجی (OmpTS) باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*

این الگوریتم‌ها قطعاتی را که درون توالی پروتئین با احتمال زیاد آنتی‌ژنیک هستند، با در نظر گرفتن واعمال هم‌زمان سه فاکتورهیدروفیلیسیتی، دسترسی و انعطاف‌پذیری و براساس جدولی از پیش تعریف شده، شناسایی می‌کنند. در شکل ۶ منحنی پیش‌گویی آنتی‌ژنیسیتی پروتئین نشان داده شده است. محور x تعداد آمینواسیدهای توالی را نشان می‌دهد و محور y میانگین تمایل ذاتی آنتی‌ژن بودن را نمایش می‌دهد. ۱۶ شاخص آنتی‌ژنیک قابل ذکر با تمایل ذاتی متفاوت آنتی‌ژنیکی در توالی دیده می‌شود. بالاترین قله در محدوده اسیدآمینه شماره ۳۱۵ تا ۳۳۵ و سپس ۴ تا ۲۵ و ۱۷۶ تا ۱۸۵ است. جزئیات نواحی گلیکوزیله که حاصل از تغییرات پس از ترجمه است در جدول ۳ نشان داده شده است.

نتایج آنالیز آنتی‌ژنیسیتی پروتئین با الگوریتم Kolaskar-Tongaonkar: بالاترین قله‌های توالی نشان‌دهنده محل‌های با احتمال بالای اتصال آنتی بادی بوده و محل‌های پراهمیت از نظر ایمنی‌شناسان می‌باشند. به‌نظر می‌رسد جهت ایمن‌سازی پنج منطقه از اسیدآمینه شماره ۱ تا ۴۰، ۱۰۲ تا ۱۳۵، ۱۷۰ تا ۲۰۵، ۲۴۰ تا ۲۵۵ و ۲۷۰ تا ۳۴۰ مناسب می‌باشند. هم‌چنین می‌توان با در نظر گرفتن قطعه بزرگ ۱۰۲ تا ۳۴۰ به اهداف مورد نظر در ایمن‌سازی دست یافت.

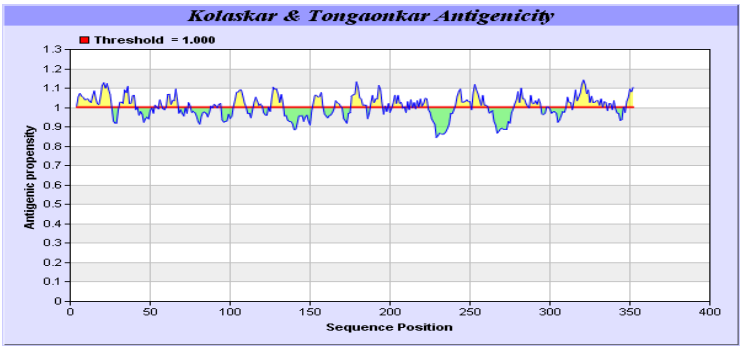
جدول ۲: پارامترهای محاسبه شده با ابزار Expasy's ProtParam برای پروتئین غشای خارجی (OmpTS) باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*

پارامتر	پروتئین ompTs
تعداد اسیدهای آمینه	۳۵۵
وزن مولکولی	۳۸۹۳۳/۵
نقطه ایزوالکتریک	۴/۶۶
شاخص ناپایداری	۷/۷۷
مجموع شارژهای مثبت و منفی	۴۷/۳۲
شاخص آلفاتیک	۶۴/۶۸
فراوان‌ترین اسیدآمینه	گلایسین (۱۱/۸٪)

جدول۳: پیشگویی نواحی گلیکوزیلاسیون پروتئین OmpTS باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*

نوع تغییرات پس از ترجمه	نواحی تغییرات	نام پروتئین
NetNGlyc ۱/۰ Server	۷۸ (NNTW) و ۲۶۵ (NTTG)	پروتئین OmpTS/
NetOGlyc ۴/۰ Server	خیر	"

پیش‌گویی ساختار دوم پروتئین OmpTS: ساختارهای ثانویه پروتئین معمولاً ساختارهای تکرارشونده محلی (موضعی) می‌باشند که به‌وسیله پیوندهای هیدروژنی پایدار می‌شوند. نتایج



شکل۶: منحنی پیش‌گویی آنتی ژنیسیتی پروتئین غشای خارجی (OmpTS) باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با الگوریتم Kolaskar-Tongaonkar

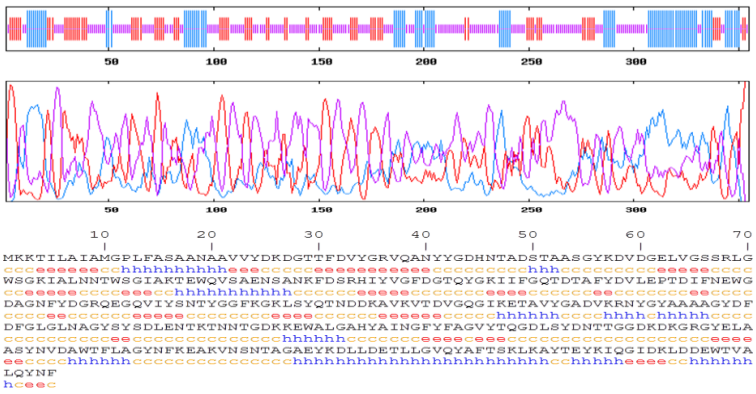
نقاط با تمایل ذاتی بالای ۱، را می‌توان مناطق آنتی‌ژنیک در نظر گرفت. حداکثر و حداقل آنتی ژنیسیتی ۱/۱۴۲و۰/۸۴۷است. پنجره انتخابی ۷ بوده است.

پیش‌گویی ساختار دوم این پروتئین بیان‌گر ۱۱ ناحیه آلفا هلیکس، ۲۰ ناحیه صفحه بتا و ۳۰ ناحیه کویل می‌باشد. جزئیات نحوه ارزیابی در شکل ۷ به‌صورت منحنی و توالی نشان داده شده است.

پیش‌گویی ساختار سوم با روش همولوژی مدلینگ و نمایش سه بعدی (3D، فضایی) پروتئین: پس از انجام فرآیند همولوژی مدلینگ ساختار سه بعدی پروتئین غشای خارجی (OmpTS) باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*، با استفاده از امکانات برنامه SwissPdbviewer به نمایش در آمد و در این ساختار پیش‌گویی شده نواحی آلفاهلیکس، صفحات بتا و کویل‌ها با رنگ‌های مختلف به‌طور متمایز مشخص گردید (شکل ۸). سپس مدل پروتئینی پیش‌گویی شده از نماهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. ساختار رشته‌های موازی ناهمسو بتا که به حالت بشکه‌ای (استوانه توخالی) قرار گرفته‌اند سبب ایجاد یک منفذ مرکزی شده‌اند. این نحوه کنفورماسیون فضایی به عبور مواد به داخل غشاء کمک می‌کند.

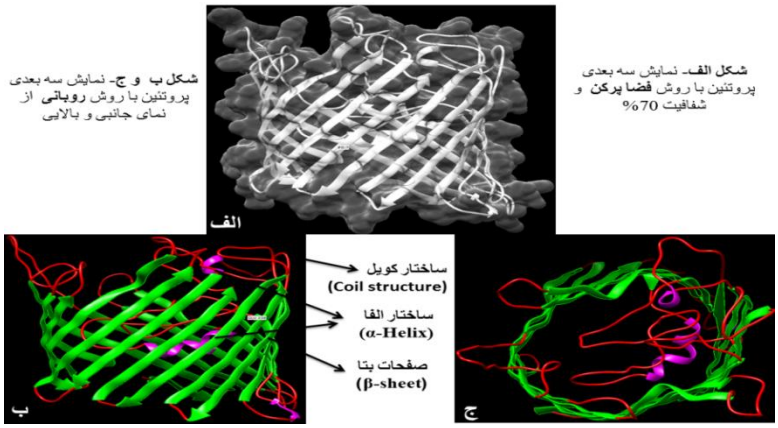
اعتبارسنجی و ارزیابی مدل پیش‌گویی شده: ارزیابی کیفیت مدل ارائه شده اقدام ضروری در همولوژی مدلینگ می‌باشد لذا کیفیت stereochemical و دقت مدل پیش‌گویی شده به‌وسیله نقشه راماچاندران مورد ارزیابی قرار گرفت.

پلات‌های دوبعدی جفتی φ و ψ محاسبه شده برای همه باقی‌مانده‌ها و به‌ویژه پرولین و گلایسین به ارزیابی مدل پیش‌گویی شده کمک می‌کند. ستون فقرات ساختار فضایی ساختار مدل سازی شده با آنالیز زاویای پیچشی فی ((φ) phi) و سای (psi (ψ)) با استفاده از سرور Rampage مورد ارزیابی قرار گرفته است. Rampage پلات‌های Phi/Psi برای گلایسین (Gly)، پرولین (Pro)، Pre-Pro و سایر باقی‌مانده‌ها را نمایش می‌دهد. پلات به سه بخش ناحیه مورد قبول، مجاز و مطرود تقسیم می‌شود. نقشه آنالیز راماچاندران نشان داد که درصد باقی‌مانده‌ها در ناحیه مورد قبول، مجاز و مطرود به ترتیب ۸۸/۵ (۲۹۳ باقی‌مانده)، ۸/۸ (۲۹ باقی‌مانده) و ۲/۷ (۹ باقی‌مانده) است. با جمع ناحیه مورد قبول و مجاز ۹۷/۳ می‌شود. بنابراین مدل ارائه شده برای پروتئین OmpTS باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در این مطالعه قابل قبول است.



شکل ۷: پیش‌گویی ساختار ثانویه با روش GOR IV

شکل‌های گرافیکی نمایان‌گر ساختارها می‌باشند. رنگ آبی: آلفا هلیکس ها، قرمز: رشته گسترش یافته (صفحات بتا) و بنفش: کویل‌ها (پیچ‌ها)

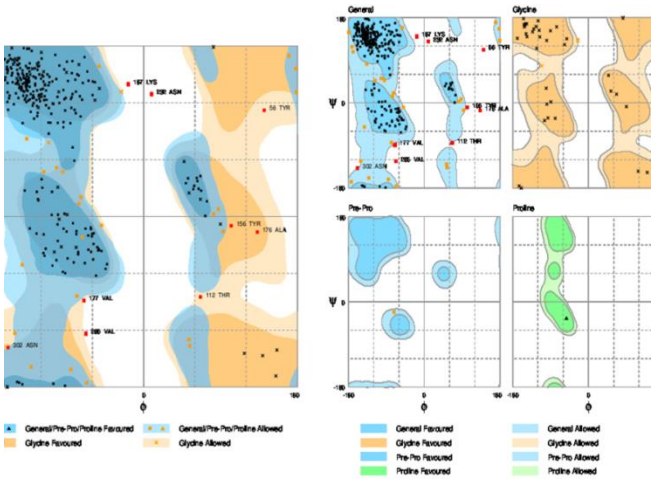


شکل ۸: نمایش سه بعدی پروتئینOmpTS باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* توسط هومولوژی مدلینگ و به تصویر کشیدن آن با نرم‌افزار SwissPdbviewer

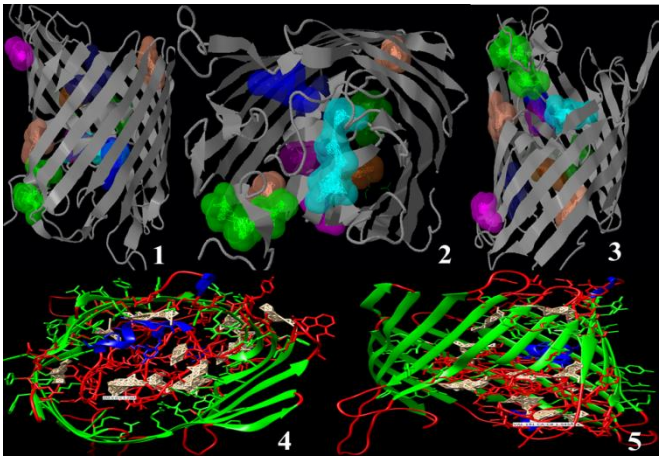
رنگ بنفش= آلفا هلیکس، رنگ سبز= صفحات بتا، قرمز=ساختار کویل

هم‌چنین از نرم‌افزار ProQ (Protein Quality Predictor) جهت ارزیابی کیفیت مدل فضایی (سه بعدی) پیش‌گویی شده استفاده گردید. این نرم‌افزار از یک الگوریتم شبکه عصبی بر مبنای یک سری از ویژگی‌های ساختاری جهت پیش‌گویی کیفیت مدل فضایی پروتئین استفاده می‌کند. دو معیار کیفیت خروجی این نرم‌افزار به‌صورت LGscore و MaxSub می‌باشد. LGscore منفی لگاریتم P-value و MaxSub محدوده‌ای از ۰ تا ۱ است که صفر بی‌معنی و ۱ بسیار بامعنی تفسیر می‌شود. ارزیابی نشان داد که LGscore و MaxSub برای مدل معرفی شده در این مطالعه به‌ترتیب ۰/۵۲۴ و ۰/۰۷۳می‌باشد که با توجه به جدول مقادیر محدوده کیفیت مدل‌ها در نرم‌افزار، می‌توان نتیجه گرفت که مدل این مطالعه نسبتاً خوب به‌حساب می‌آید.

شناسایی جایگاه فعال (اتصالی) پروتئین: شناخت جایگاه‌های فعال پروتئین‌های پاتوژن می‌تواند کمک شایانی را در رابطه با ساخت داروهای موثر و تهیه آنتی‌بادی‌های خنثی کننده و متصل شونده به این جایگاه‌ها داشته باشد. سرور Q-site finder براساس اتصال پروب‌های هیدروفوبیک (CH_3) به پروتئین مورد نظر عمل می‌کند و خوشه‌هایی از پروب‌ها با انرژی‌های اتصالی بسیار مطلوب را شناسایی و امتیازدهی می‌کند. در مطالعه حاضر ۱۰ ناحیه اتصالی در ساختار مدل سازی شده یافت شد. که از میان آن‌ها بزرگ‌ترین ناحیه که واجد مقدار ۴۳۴ مکعب انگستروم بود به‌عنوان جایگاه فعال پروتئین در نظر گرفته شده است. باقی‌مانده‌های مهمی که در جایگاه فعال مشاهده شده‌اند عبارتند از TYR ۴۲، GLN ۹۰، ASP ۱۰۱، SER ۱۰۲، ARG ۱۰۳، GLN ۱۲۱، GLU ۱۳۸، TRP ۱۳۹، GLY ۱۴۰، ASP ۱۴۱،ALA ۱۴۲، PHE ۱۴۵، TYR ۱۴۶، ASP ۱۴۷، GLN ۱۵۳، VAL ۱۵۴، ILE ۱۵۵، TYR ۱۵۶، TYR ۱۶۰، GLY ۱۶۱، GLY ۱۶۲، PHE ۱۶۳ و LYS ۱۶۴.



شکل ۸: نقشه راماچانداران برای مدل پیش‌گویی شده پروتئین غشای خارجی (OmpTS) باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*



شکل ۷: پیش‌گویی نواحی متصل شونده به لیگاند و نمایش سه بعدی آن‌ها

در شکل ۱، ۲ و ۳ نواحی پیش‌گویی شده اتصالی انتخاب شده براساس میزان احتمال ناحیه اتصال با رنگ‌های مختلف کد گذاری شده‌اند. رنگ سبز محتمل‌ترین ناحیه که به‌دنبال آن آبی، ارغوانی و نارنجی/قهوه‌ای قرار دارند. در شکل ۴ و ۵ همه نواحی اتصالی به رنگ سفید نمایش داده شده‌اند.

بحث

در دهه‌های اخیر صنعت آبزی‌پروری در تمام دنیا و خصوصاً ایران دارای رشد قابل توجهی بوده از طرفی طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا از جمله عوامل باکتریایی منجر به بروز بیماری در ماهی و مرگ و میر در پرورش متراکم ماهیان می‌شوند در این بین باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* عامل بیماری آب‌آوردگی عفونی، از مهم‌ترین عوامل بیماریزا در ماهیان پرورشی و زینتی است. این باکتری با آلوده کردن میزبانان مختلف مسئول پیدایش مشکلات اقتصادی فراوانی می‌باشد (Ye و همکاران، ۲۰۱۳؛ Uma و همکاران، ۲۰۱۰؛ Nayak و همکاران، ۱۹۹۹). *آئروموناس هیدروفیلا* به‌طور گسترده در همه محیط‌ها یافت می‌شود و با ایجاد علایمی چون زخم‌های جلدی قرمز، بیرون زدگی چشم، ادم، سپتی‌سمی خونریزی دهنده و بیرون زدگی فلس‌ها در فرم حاد با ایجاد سپتی‌سمی سبب مرگ می‌شود (Citarasu و همکاران، ۲۰۱۱). این باکتری تا دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد را تحمل می‌کند. هم‌چنین عفونت ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا* در انسان با منشا مواد غذایی سبب گاستروانتریت، عفونت زخم، پنومونی و مننژیت می‌شود (Aberoum و Jooyandeh، ۲۰۱۰). با توجه به این‌که رشد صنعت آبزی‌پروری از سایر فرآورده‌های دامی سریع‌تر است، عفونت‌های باکتریایی خصوصاً باکتری‌های گرم منفی در ماهی مشکل عمده‌ای محسوب می‌شوند، برای پیشبرد این صنعت اقدامات پیشگیری‌کننده مانند واکسیناسیون در کاهش وقوع بیماری‌های عفونی و محافظت ماهی مفید می‌باشند. واکسیناسیون در ماهی همانند موجودات خونگرم، یک روش موثر اقتصادی در کنترل بیماری‌های تهدیدکننده است زیرا واکسن‌ها از مواد بیولوژی طبیعی بوده و در محیط و محصول باقی‌مانده برجای نمی‌گذارند و موجب پیدایش سویه‌های مقاوم نمی‌شوند. ایمن‌سازی ماهیان بر ضد باکتری‌های گرم منفی یکی از مشکلات مهم در پرورش ماهی

محسوب می‌شود. در این مطالعه خصوصیات مولکولی، ساختاری و آنتی ژنیسیتی پروتئین غشای خارجی (OmpTS) باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*، به‌روش بیوانفورماتیک برای اولین‌بار مورد بررسی قرار گرفت و منجر به آگاهی از عمکرد و نقش نواحی مختلف توالی پروتئین و کارکردهای آن در جهت اهداف ایمن سازی گردید، که با مطالعه Khushiramani و همکاران (۲۰۰۸) در زمینه ایمنی‌زایی این پروتئین در ماهی که آن را کاندید مناسبی برای واکسن معرفی کرده بودند هماهنگی داشته و با نشان دادن نواحی با آنتی‌ژنیسیتی بالاتر امکان مطالعه بر روی نواحی خاصی از پروتئین را که موجب صرفه‌جویی در وقت و هزینه می‌شود، فراهم می‌نماید. علم بیوانفورماتیک و شبیه‌سازی و مطالعه ساختارهای مولکول‌های زیستی کمک شایانی را به غلبه بر مشکلات پیش روی دانشمندان در جهت شناخت ذات و طبیعت پروتئین‌های مورد بررسی می‌کند و سبب کاهش چشمگیر زمان و هزینه در مقایسه با بررسی آزمایشگاهی آن می شود.

منابع

۱. **ابوالقاسمی، ج.؛ سلطانی، م.؛ پورکاظمی، م.؛ شریف‌پور، ع.؛ جلالی‌جعفری، ب. و شناورماسوله، ع.، ۱۳۸۸.** شناسایی و جداسازی و باکتری‌های موجود در ضایعات خارجی ماهی شیپ در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی، مجله علمی پژوهشی شیلات. سال ۳، شماره ۴، صفحات ۸۹ تا ۹۹.

۲. **رنجبر، م.؛ موسوی‌نسب، د.؛ قلیان‌چی، آ.؛ نازکتبار، ا.؛ احمدی، ن.؛ خوشنویسان، ر.؛ اسفندیاری، س.؛ وفائی منش، ج. و اکبری، ا.، ۱۳۹۲.** ایمونوانفورماتیک و روش‌های پیش‌گویی اپی‌توپ، دانشی پویا با دستاوردهای امیدبخش. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام. دوره ۲۱، شماره ۶، صفحات ۳۰۰ تا ۳۰۹.

۳. **فهیمی، ح.؛ صادقی‌زاده، م.؛ حیدری، س. و محمدی‌پور، م. ۱۳۹۰.** بیان دومین III پروتئین پوششی ویروس تب دانگ (سروتیپ ۱) به‌صورت نوترکیب. طب انتظامی. سال ۱، شماره ۱، صفحات ۵۳ تا ۶۱.

٤. **Aberoum, A. and Jooyandeh, H., ۲۰۱۰.** A Review on Occurrence and Characterization of the *Aeromonas* Species from Marine Fishes. World Journal of Fish and Marine Sciences. Vol. ۲, No. ٦, pp: ٥١٩-٥٢٣.

٥. **Agarwal, S.H.; Gopal, K.; Upadhyaya, T. and Dixit, A. ۲۰۰۷.** Biochemical and functional characterization of UDP-galactose ٤-epimerase from *Aeromonas hydrophila*. Biochimica et Biophysica Acta. ۱۷۷٤, pp: ۸۲۸-۸۳۷.

٦. **Citarasu, T.; Alfred Dhas, K.; Velmurugan, S.; Thanga Viji, V.; Kumaran, T.; Michael Babu, M. and Selvaraj, T. ۲۰۱۱.** Isolation of *Aeromonas hydrophila* frominfected ornamental fish hatchery during massive disease outbreak. Inte. J. Curr. Res. Vol. ۲, pp: ۰۳۷-۰٤۱.

۷. **Cristobal, S.; Zemla, A.; Fischer, D.; Rychlewski, L. and Elofsson, A. ۲۰۰۱.** A study of quality measures for protein threading models. BMC Bioinformatics. pp: ۲-٥.

۸. **Das, A.; Sahoo, P.K.; Mohanty, B.R. and Jena, J.K., ۲۰۱۱.** Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in *Puntius sarana*: Early changes in blood and aspects of the innateimmune-related gene expression in survivors. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. ۱٤۲, pp: ۲۰۷-۲۱۸.

۹. **Khushiramani, R.; Girisha, S.K.; Bhowmick, P.P.; Karunasagar, I. and Karunasagar, I. ۲۰۰۸.** Prevalence of different outer membrane proteins in isolates of *Aeromonas* species. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. ۲٤, No. ۱۰, pp: ۲۲٦۳-۲۲٦۸.

۱۰. **Khushiramani, R.; Girisha, S.K.; Karunasagar, I. and Karunasagar, I., ۲۰۰۷.** Cloning and expression of an outer membrane protein ompTS of *Aeromonas hydrophila*and study of immunogenicity in fish. Protein Expression and Purification. Vol. ٥۱, pp: ۳۰۳-۳۰۷.

۱۱. **Lauria, A.T.R. and Jackson, R.M., ۲۰۰٥.** Q-sitefinder, energy based method for the prediction of protein ligand binding sites, Bioinformatics. Vol. ۲۱, pp: ۱۹۰۸-۱۹۱۶.

۱۲. **Lovell, S.C.; Dawis, I.W.; Arendall, W.B.; Bakker, P.I.W.; Word, J.M.; Prisant, M.G.; Richardson, J.S. and Richardson, D.C., ۲۰۰۳.** Structure validation by calpha geometry: phi, psi and cbeta deviation, proteins, struct, funct, genet. Vol. ٥۰, pp: ٤۳۷-٤٥۰.

۱۳. **Majumdar, T.; Ghosh, D.; Datta, S.; Sahoo, C.H.; Pal, J. and Mazumder, S.H., ۲۰۰۷.** An attenuated plasmid-cured strain of *Aeromonas hydrophila* elicits protective immunity in *Clarias batrachus* L. Fish and Shellfish Immunology. Vol. ۲۳, pp: ۲۲۲-۲۳۰.

۱٤. **Marti-Renom, M.A.; Stuart, A.C.; Fiser, A.; Sanches, R.; Melo, F. and Sali. A., ۲۰۰۰.** Comparative protein structure modeling of genes and genomes.Annu, Rev, Biophys, Biomol, Struct. Vol. ۲۹, pp: ۲۹۱-۳۲٥.

۱٥. **Nayak, K.K.; Mukherjee, S.C. and Das, B.K., ۱۹۹۹.** Observation on different strains of *Aeromonas hydrophila* from various diseased fishes. Indian J. Fish. Vol. ٤٦, No. ۳, pp: ۲٤٥-۲٥۰.

۱٦. **Poobalane, S.; Thompson, K.D.; Ardo, L.; Verjan, N.; Han, H.J.; Jeney, G.; Hirono, I.; Aoki,T. and Adams, A., ۲۰۱۰.** Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish. Vaccine. Vol. ۲۸, pp: ۳٥٤۰-۳٥٤۷.

۱۷. **Pridgeon, J.W. and Klesius, P.H., ۲۰۱۱.** Development and efficacy of novobiocin and rifampicin-resistant *Aeromonas hydrophila* as novel vaccines in channel catfish and Nile tilapia.Vaccine. Vol. ۲۹, pp: ۷۸۹٦-۷۹۰٤.

۱۸. **Pridgeon, J.W.; Klesius, P.H.; Mu, X.; Carter, D.; Fleming, K.; Xu, D.; Srivastava, K. and Reddy, J., ۲۰۱۱.** Identification of unique DNA sequences present in highly virulent ۲۰۰۹ Alabama isolate of *Aeromonas hydrophila*. Vete. Microbiology. Vol. ۱٥۲, pp: ۱۱۷-۱۲٥.

۱۹. **Ranjbar, M.; Ghorban, K.H.; Alavian, S.M.; Keyvani, H.; Dadmanesh, M.; Roayaei Ardakany, A.; Motedayen, M. and Sazmand, A., ۲۰۱۳.** GB Virus C/Hepatitis G Virus Envelope Glycoprotein E۲: Computational Molecular Features and Immunoin formatics Study. Hepat Mon. Vol. ۱۳, No. ۱۲, pp: ۱-۱٤.

۲۰. **Sahoo, P.K.; Rauta, P.R.; Mohanty, B.R.; Mahapatra, K.D.; Saha, J.N.; Rye, M. and Eknath, A.E., ۲۰۱۱.** Selection for improved resistance to *Aeromonas hydrophila* in Indian majorcarp *Labeo rohita*: Survival and innate immune responses in first generation of resistant and susceptible lines. Fish and Shellfish Immunology. Vol. ۳۱, pp: ٤۳۲-٤۳۸.

۲۱. **Salehi Moghadam, F.; Mohebbi, S.R.; Hosseini, S.M.; Damavand, B. and Zali, M.R., ۲۰۱۳.** A New Subtype of Hepatitis C Virus Genotype ۳: Analysis of Available Evidence. Hepat Mon. Vol. ۱۳, No. ۱۲, pp: ۱-۷.

۲۲. **Sivakumar, K., ۲۰۰٥.** WWW. Databases, tools and prediction server for protein sequence analysis and characterization. Advance biotech. pp: ۲۷-۳۱.

۲۳. **Thampson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F. and Higgins, D.G., ۱۹۹۷.** The Clustal-X windows interface, Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. Vol. ۲٥, pp: ٤۸۷٦-٤۸۸۲.

۲٤. **Tramontano, A.; Leplae, R. and Morea, V., ۲۰۰۱.** Analysis and assessment of comparative modeling predictions in proteins. pp: ۲۲-۲۸.

۲٥. **Uma, A.; Rebecca, G.; Meena, S. and Saravanabava, K., ۲۰۱۰.** PCR detection of putative aerolysin and hemolysin genes in an Aeromonashydrophila isolate from infection Koi carp (*Cyprinus carpio*). Tamilnadu J. Veterinary and Animal Sciences. Vol. ٦, pp: ۳۱-۳۳.

۲٦. **Xia, C.H.; Ma, Z.H.; Rahman, M.H. and Wu, Z.G., ۲۰۰٤.** PCR cloning and identification of the h-haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China. Aqua. Vol. ۲۲۹, pp: ٤٥-٥۳.

۲۷. **Yeh, H.Y. and Klesius, P.H., ۲۰۱۱.**Over-expression, purification and immune responses to *Aeromonas hydrophila* AL۰۹-۷۳ flagellar proteins. Fish and Shellfish Immunology. Vol. ۳۱, pp: ۱۲۷۸-۱۲۸۳.

۲۸. **Ye, Y.W.; Fan, T.F.; Li, H.; Lu, J.F.; Jiang, H.; Hu, W. and Jiang, Q.H. ۲۰۱۳.** Characterization of *Aeromonas hydrophila* from hemorrhagic diseased freshwater fishes in Anhui Province, China. International Food Research Journal. Vol. ۲۰, No. ۳, pp: ۱٤٤۹-۱٤٥۲.

۲۹. **Zhou, L.; Wang, X.; Liu, Q.; Wang, Q.; Zhao, Y. and Zanhg, Y., ۲۰۱۰.** A novel multivalent vaccine based on secretary antigen-delivery induces protective immunity against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila*. Journal of Biotechnology. Vol. ۱٤٦, pp: ۲٥-۳۰.