مقاله پژوهشی

Comparison of expression of recombinant binding region (RBD) of SARS-CoV-2 virus in *Escherichia coli* and insect cells, evaluation of recombinant protein function with patient serum

Zahra Rahbar[1], Shahram Nazarian[2], Roohollah Dorostkar[3], Fattah Sotoodehnejadnematalah[1], Jafar Amani[*4]

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Imam Hossein University, Tehran, Iran
3. Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4.Applied Microbiology Research Center, System Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: COVID-19, an infectious viral disease caused by severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV-2) with more than 260 million infections as of December 2019, is a serious threat to the health and economy of human societies. Designing and producing a suitable vaccine can Reduce the incidence of this disease. Therefore, it is very important to find effective and safe neutralizing antibodies and vaccines for COVID-19. The RDB section of the spike protein is a suitable option for the production of subunit vaccines and neutralizing antibodies. This research aims to introduce the RBD section as a vaccine candidate.

Material and Methods: The RBD was recombinantly expressed in two hosts, *Escherichia coli (E.coli)* and insect cells, and its production rate was compared. Using the western blotting method, protein production was confirmed. To evaluate the function of the protein expressed in two prokaryotic and eukaryotic hosts, using the serum of patients recovered from COVID-19 (wild type and delta), the ELISA method was used.

Results: Despite the higher production of recombinant protein by *E.coli*, the affinity of the antibodies in the serum of the patients to the protein expressed in the insect cell was higher**.**

Conclusion: In this study, the RBD was expressed in two different hosts. The results show that RBD is mentioned as a vaccine candidate. Homozygous in the insect cell preserves the biological activity of the protein by carrying out the process of post-translational changes such as glycosylation.

Keywords: COVID-19, vaccine, RBD recombinant protein, insect cell, Iau Science.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-25]

Corresponding author:
Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences
Email: jafar.amani@gmail.com

مقاله پژوهشی

مقایسه بیان پپتید نوترکیب بخش اتصالی (RBD) ویروس SARS-CoV-2 در میزبان های *اشریشیاکلی* و سلول حشره و ارزیابی عملکرد پروتئین نوترکیب با سرم بیمار

زهرا راهبر[۱]، شهرام نظریان[۲]، روح الله درستکار[۳]، فتاح ستوده نژاد نعمت الهی[۱]، جعفر امانی*[۴]

۱. گروه زیست شناسی ، واحد علوم وتحقیقات ، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران، ایران
۲. گروه زیست شناسی ، دانشگاه امام حسین (ع) ، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) ، تهران، ایران
۴. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو بیولوژی و سم شناسی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)،تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیماری کووید- ۱۹، بیماری ویروسی عفونی ناشی از سندرم حاد تنفسی شدید (SARS-CoV-2) با بیش از ۲۶۰ میلیون عفونت از دسامبر۲۰۱۹، یک تهدید جدی برای سلامت و اقتصاد جوامع بشری به شمار می‌آید. طراحی و تولید یک واکسن مناسب می‌تواند موارد ابتلا به این بیماری را کاهش دهد. بنابراین، یافتن واکسن و آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده مؤثر و ایمن برای کنترل همه‌گیری کووید-۱۹، بسیار مهم است. این پژوهش با هدف معرفی کاندید مناسب برای تولید واکسن نوترکیب ویروس SARS-CoV-2 با استفاده از بخش اتصالی RBD پروتئین اسپایک انجام شد.

مواد و روش‌ها: بخش RBD به صورت نوترکیب در دو میزبان *اشریشیاکلی* (*E.coli*)و سلول حشره(*SF9*) بیان و میزان تولید آن مقایسه شد. بیان پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلاتینگ مورد ارزیابی قرارگرفت. ازریابی عملکرد پروتئین بیان شده در دو میزبان ذکرشده با استفاده از سرم بیماران بهبود یافته از کووید-۱۹ (سویه وحشی و دلتا) و روش الایزا مورد بررسی قرارگرفت.

یافته‌ها: علیرغم تولید بیشتر پروتئین نوترکیب توسط *اشریشیاکلی*، تمایل آنتی بادی های موجود در سرم بیماران به پروتئین بیان شده در سلول حشره بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: بیان پپتید نوترکیب بخش اتصالی RBD در دو میزبان *E.coli* و SF9 انجام شد. ارزیابی عملکرد آن توسط سرم بیماران مبتلا به کووید- ۱۹ نشان داد ،RBD را می‌توان به عنوان کاندید واکسن نوترکیب معرفی کرد.

واژگان کلیدی: کووید- ۱۹ ، واکسن، پروتئین نوترکیب RBD، سلول حشره، Iau Science.

مقدمه

با پیدایش کروناویروس جدید در سال ۲۰۱۹، در ووهان چین و گسترش سریع آن در سراسر جهان یک وضعیت اضطراری بهداشتی ایجاد شد(۱). کرونا ویروس جدید از خانواده بتاکروناویروس‌ها و severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) نامیده شد. چهار پروتئین اصلی این ویروس شامل پروتئین M(پروتئین غشایی)، پروتئین E(پروتئین پوششی)، پروتئین N(نوکلئوپروتئین) و پروتئین S(پروتئین اسپایک) می‌باشد. گلیکوپروتئین اسپایک یک پروتئین غشایی چند عملکردی بزرگ (۱۲۷۳ اسید آمینه) است که از دو زیر واحد S1 و S2

نویسنده مسئول:
مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو بیولوژی و سم شناسی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)،تهران، ایران
پست الکترونیکی: jafar.amani@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۸

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-25]

تشکیل شده است و نقش اساسی در اتصال، همجوشی و ورود ویروس به سلول میزبان دارد، از این رو اهمیت زیادی دارد. در زیرواحدS1 این پروتئین بخشی به نام RBD[1] وجود دارد که مسئول اتصال ویروس به Angiotensin - converting enzyme2(ACE2) سلول انسانی می باشد. زیر واحدS2 در همجوشی و ورود ویروس به سلول میزبان نقش دارد. بنابراین آنتی بادی های ضد RBD می‌توانند از اتصال ویروس به گیرنده ACE2 ممانعت کنند (۵-۲). با شروع همه گیری بیماری کووید-۱۹، تولید واکسن کارا و موثر، ضروری می باشد. چندین الگو برای ساخت واکسن وجود دارد. یکی از این الگوها، استفاده از واکسن‌های زیر واحدی (subunit) با استفاده از تکنولوژی پروتئین نوترکیب است. در این روش پروتئینی که خاصیت آنتی ژنیک بالایی دارد و می‌تواند سیستم ایمنی را تحریک کند با استفاده از سیستم بیانی مناسب تولید می‌شود. در حال حاضر، چندین واکسن زیر واحد برای استفاده در سراسر جهان مجاز شده است. از جمله واکسن‌های ویروس هپاتیت B و ویروس پاپیلومای انسانی که قبلاً کارایی بالای خود را نشان داده‌اند(۶). مطالعات گذشته بر روی SARS-CoV نشان می دهد، با تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده بر علیه RBD و ایجاد ایمنی مناسب، می‌توان آن را به عنوان کاندید مناسب برای واکسن معرفی کرد(۷, ۸). آنتی‌بادی هایی که توسط واکسن تولید می شوند ترجیحا باید روی اپی توپ‌هایی متمرکز باشند که از اتصال ویروس به سلول جلوگیری کنند. بررسی‌ها نشان می‌دهند این اپی توپ‌ها عمدتا در بخش RBD واقع شده اند (۹،۱۰). همچنین یکی از بیشترین منابع حفاظت شده پروتئین اسپایک، RBD می‌باشد. محققین برای باورند واکسن بر پایه RBD نسبت به کل پروتئین اسپایک ایمن تر خواهد بود (۶). از این رو بخش RBD ویروس کاندید مناسبی برای تولید واکسن نوترکیب است. در این مطالعه بخش RBD از ویروس SARS-CoV2 که برای اولین بار در ووهان چین (سویه وحشی)شناسایی شد، در دو سیستم بیانی پروکاریوتی (*اشریشیاکلی*[2]) و یوکاریوتی (سلول حشره[3]) بیان شد. عملکرد این پروتئین نوترکیب به عنوان آنتی ژن و توانایی اتصال آن به آنتی بادی های موجود در سرم بیماران بهبود یافته از کووید-۱۹ (سویه وحشی و دلتا) با استفاده از روش الایزا به منظور تولید واکسن مناسب مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه پژوهشی حاضر، توالی RBD از پروتئین اسپایک(سویه وحشی- سویه جدا شده در ووهان چین) به شماره دسترسی MN908947 از پایگاه داده های توالی پروتئینی NCBI استخراج شد. بهینه سازی کدون برای میزبان *اشریشیاکلی* سویه BL21(DE3) (اینویتروژن؛ ایالات متحده) و سلول حشره (مرکز ذخایر بیولوژیک ایران) انجام شد. از ناقل های pET28a(+) (نواژن ـایران) و pFastBac HTA (اینویتروژن ـ ایالات متحده) به ترتیب به عنوان ناقل بیانی باکتری *اشریشیاکلی* و سلول حشره استفاده شد.

بیان RBD نوترکیب و تایید آن با روش وسترن بلاتینگ

با استفاده از روش SDS-PAGE پروتئین حاصل، توسط بافر انتقال (۱۲۰ میلی مولار گلیسین،۱۵/۶ میلی مولار تریس بیس و ۲۰ درصد متانول) به غشای نیتروسلولز(شرکت سیگما) منتقل شد. برای جلوگیری از اتصال آنتی بادی غیراختصاصی، غشاء با شیر بدون چربی ۵ درصد به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس مسدود شد وکاغذ نیتروسلولز در هر مرحله باTBST شسته شد. سپس غشاء در رقت ۱:۲۰۰۰ آنتی‌بادی مونوکلونال HRP کونژوگه ضد-His(tagشرکت سیگما)در بافر (1×) PBS، با تکان دادن ملایم در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت انکوبه شد. پروتئین با استفاده از دی آمینو بنزیدین (شرکت سیگما) و H_2O_2 به عنوان سوبسترا و کاتالیزور شناسایی شد. پس از ظهور باندها، واکنش با آب مقطر متوقف شد.

تخلیص و تعیین غلظت RBD نوترکیب

تخلیص پروتئین بیان شده در هر دو میزبان با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA (شرکت کیاژن) انجام شد. غلظت پروتئین تولید شده در میزبان *اشریشیا کلی* و سلول حشره با روش برادفورد اندازه گیری شد. نمونه پروتئین تخلیص شده بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد تجزیه و تحلیل شد.

مقایسه عملکرد RBD بیان شده در سلول باکتریایی و حشره با سرم بیماران

[1] - Receptor Binding Domain

[2] -*E-coli*

[3] -*Spodoptera frugiperda (Sf9)*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-25]

مقاله پژوهشی

به منظور بررسی قابلیت ایمنی زایی RBD نوترکیب به عنوان واکسن در انسان، نمونه های سرمی از ۲۰بهبودیافته بیماری کووید-۱۹، بستری در بخش مراقبت های ویژه و دارای علایم مربوط به ابتلا با ویروس SARS-CoV-2 و همچنین تست PCRمثبت از بیمارستان بقیه الله تهران برای سویه وحشی ویروس و بیمارستان نبی اکرم زاهدان برای سویه دلتا ونیز سرم افراد سالم به عنوان کنترل جمع آوری گردید. با استفاده از روش الایزا، میزان اتصال پروتئین نوترکیب RBD به عنوان آنتی ژن به آنتی بادی‌های موجود در سرم بهبود یافتگان ارزیابی شد. مقدار ۵۰۰ نانوگرم از پروتئین خالص شده در بافر پوشاننده سدیم بیکربنات ۰/۲مولار با pH برابر با ۹/۸ ترکیب و در هر چاهک از میکروپلیت قرار گرفت. پس از مسدود کردن با شیر بدون چربی ۵ درصد، سرم های بیماران در رقت ۱:۵ اضافه شد و پلیت‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس چهار بار شستشو با PBST انجام شد. میزان اتصال آنتی‌بادی های موجود در سرم بیماران به آنتی ژن (RBD) توسط آنتی بادی ضد_انسانی کونژوگه horse radish peroxidase (شرکت سیگما)تعیین گردید. آزمایش با سه بار تکرار انجام شد و نتایج در نمودار استاندارد قرار داده شد.

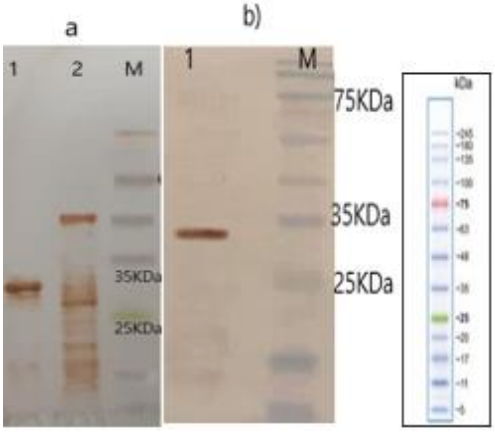
تجزیه وتحلیل آماری

نتایج الایزا برای پاسخ‌های آنتی‌بادی بین سرم بیماران و پروتئین نوترکیب RBD با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ و آنالیز واریانس یک طرفه آنالیز شد. چنانچه P_{value}<۰/۰۵ باشد، تفاوت ها از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته می‌شود.

نتایج

تایید بیان پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلاتینگ

صحت بیان پروتئین نوترکیب در میزبان های *اشریشیاکلی* و حشره با روش وسترن بلاتینگ بررسی شد. حضور باندهای پروتئینی ۳۰ و ۳۴ کیلودالتون به ترتیب برای سلول *اشریشیاکلی* و سلول حشره نشان دهنده بیان صحیح پروتئین نوترکیب می‌باشد (شکل۱).



شکل۱: تایید بیان RBD با استفاده از وسترن بلاتینگ.

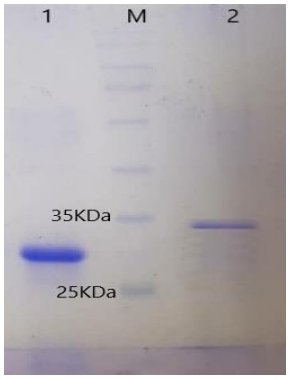
a) نتیجه وسترن بلاتینگ پروتئین RBD در میزبان *اشریشیاکلی* ۱: پروتئین با وزن ۳۰کیلودالتون.۲ :کنترل مثبت ، M : نشانگر وزن پروتئین. b) نتیجه وسترن بلاتینگ در میزبان سلول حشره . ۱: پروتئین با وزن ۳۴ کیلودالتون،M: نشانگر وزن پروتئین.

تخلیص و تعیین غلظت پروتئین RBD نوترکیب

تخلیص پروتئین نوترکیب بر روی ژل۱۲ درصد SDS-PAGE بررسی شد(شکل ۲) تخمین غلظت پروتئین نوترکیب خالص شده با روش برادفورد نشان داد که غلظت RBD در میزبان *اشریشیاکلی* و سلول حشره به ترتیب ۱۷۶µg/ml و ۷۰µg/ml می باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-25]

مقاله پژوهشی

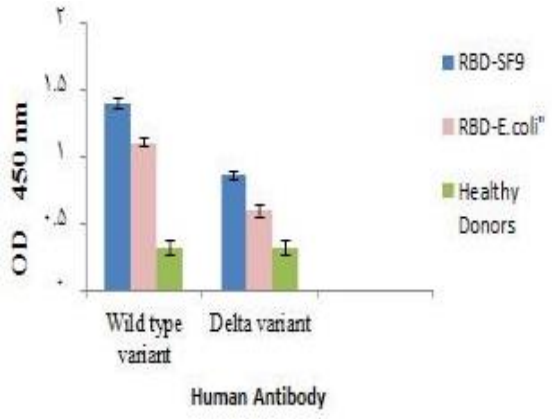


شکل ۲- پروتئین تخلیص شده توسط ستون کروماتوگرافی Ni-NTA .

۱ : پروتئین بیان شده در میزبان *اشریشیاکلی* با وزن ۳۰ کیلودالتون . ۲: پروتئین بیان شده در سلول حشره با وزن ۳۴ کیلودالتون .M: نشانگر وزن پروتئین.

مقایسه عملکرد RBD بیان شده در سلول باکتریایی و حشره با سرم بیماران

نتایج حاصل از الایزا نشان می‌دهد RBD بیان شده در سلول حشره تمایل اتصال بیشتری به سرم بهبود یافتگان از کووید-۱۹ (سویه وحشی و دلتا) نسبت به *اشریشیاکلی* دارد. سطح اختلاف معنی دار بین گروه‌های تست و کنترل (۰/۰۵ >P_{value}) در آنالیز آماری مشاهده شد (شکل۳).



شکل۳-تشخیص پروتئین RBD نوترکیب توسط سرم مبتلایان به کووید-۱۹ سویه وحشی و دلتا

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-25]

بحث

ویروس SARS-CoV-2 به دلیل گسترش سریع در سراسر جهان، یکی ازمهمترین و جدی ترین تهدیدات برای بهداشت و اقتصاد جوامع بشری است. واکسن هایی با الگوهای مختلف مانند ویروس کشته شده یا ضعیف شده ، واکسن‌های آدنوویروسی، واکسن بر پایه mRNA ، واکسن-های زیر واحدی، واکسن بر پایه DNA و نوکلئک اسید به سرعت برای کنترل انتشار SARS-CoV-2 در بین جمعیت ساخته شده‌اند (۱۰). امروزه واکسن‌های زیر واحدی اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند. به هنگام ساخت واکسن‌های زیر واحدی، آنچه حائز اهمیت است انتخاب سیستم بیانی مناسب برای سنتز پروتئین هدف است، به طوری‌که خاصیت آنتی ژنیک آن حفظ شود (۱۱). سیستم-های بیان متفاوتی مانند سیستم‌های میکروبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، مانند اشریشیاکلی، مخمرهای مختلف، سلول‌های پستانداران، سلول‌های حشرات و گیاهان در دسترس هستند. تولید پروتئین در سلول های باکتریایی به خوبی مطالعه شده است. *اشریشیاکلی* به دلیل رشد سریع و مقرون به صرفه و دسترسی به وسیع‌ترین طیف ابزارهای دستکاری مولکولی، برای تولید پروتئین‌های نوترکیب کاربرد گسترده دارد. آنتی ژن‌های واکسن های متعددی در *اشریشیاکلی* تولید می شود. با این وجود، سیستم های بیان *اشریشیاکلی* به طور کلی تغییرات پس از ترجمه (PTMs) مانند گلیکوزیلاسیون، که پاسخ ایمنی و در نتیجه عملکرد واکسن را تحت تاثیر قرار می‌دهد را ندارند (۱۲). در مورد سیستم بیانی سلول حشره، فرآیندهای پس از ترجمه به خوبی انجام شده به طوریکه پروتئین نوترکیب گلیکوزیله، استیله، فسفریله و همچنین پیچ وتاپ خوردگی مناسب را خواهد داشت (۱۳). در چندین مطالعه تولید RBD نوترکیب در سیستم‌های بیانی پروکاریوتی ،یوکاریوتی و سلول حشره بیان مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعات نشان می دهند مقدار پروتئین بیان شده در *اشریشیاکلی* بیشتر از سلول هایی مانند سلول تخمدان همستر چینی (CHO) و سلول حشره(SF9) می‌باشد، اما پروتئین بیان شده در سلول‌های CHO و SF9 قادر به ایجاد پاسخ‌های آنتی‌بادی اختصاصی قوی‌تری از *اشریشیاکلی* می‌باشند (۶, ۱۸-۱۴). در این مطالعه بیان و مقدار RBD نوترکیب در سیستم باکتریایی و سلول حشره مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد بازده تولید پروتئین در سیستم پروکاریوتی و سلول حشره به ترتیب ۱۷۶µg/ml و ۷۰µg/ml می‌باشد. با استفاده از روش الایزا نشان دادیم که هر دو پروتئین بیان شده با سرم افراد بهبود یافته از کووید-۱۹ (سویه وحشی و دلتا) واکنش می‌هد اما با سرم افراد سالم واکنش نمی‌دهد. با این حال RBD بیان شده در *اشریشیاکلی* تمایل کمتری به آنتی بادی سرم افراد بهبود یافته داشت. از بین سویه‌های SARS-CoV2 ، سویه دلتا قدرت بیماریزایی و سرایت بیشتری داشته است. در این سویه ۱۰ جهش در پروتئین اسپایک به وجود آمده است (نسبت به سویه وحشی). دو تا از این جهش ها در قسمت RBD رخ داده است(T478K, L452R). وجود این جهش‌ها باعث شد، گرایش RBD به گیرنده ACE2 افزایش یابد در نتیجه میزان سرایت و قدرت بیماریزایی این سویه بیشتر شد(۱۹،۲۰). این مطالعه نشان داد، RBD نوترکیب بیان شده (به عنوان آنتی ژن) توانست با آنتی بادی های موجود در سرم بیماران بهبود یافته از سویه دلتا واکنش دهد.

اگرچه مطالعه حاضر نشان داد، RBD بیان شده در سلول حشره، قدرت خنثی سازی بالاتری در مقایسه با *اشریشیاکلی* دارد، اما انتخاب بهترین سیستم بیانی به عواملی مانند گلیکوزیلاسیون، عملکرد، تاخوردگی مناسب و اقتصاد اهمیت دارد(۲۱). نکته قابل توجه در مورد RBD (Arg319-Phe541) این است که این ناحیه دارای دو پیوند گلیکوزیلاسیونی است (Asn331, Asn343) و محل این دو پیوند خارج از محل اسیدهای آمینه ضروری برای اتصال به ACE2 می‌باشد. نتایج مطالعات نیز نشان داده است که گلیکوزیلاسیون برای القای ایمنی محافظتی با استفاده از RBD حیاتی نیست(۲۲). همه موارد ذکر شده مبنایی برای استفاده ازRBD نوترکیب به عنوان کاندید واکسن است. همچنین از RBD نوترکیب می‌توان، در طراحی و تولید کیت‌های تشخیصی استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

در سلول حشره به دلیل انجام فرآیندهای پس از ترجمه، پروتئین بیان شده عملکرد بهتری خواهد داشت. از آنجایی که RBD بیان شده در این پژوهش، مربوط به سویه وحشی بود، اما توانست با آنتی بادی های موجود در سرم افراد بهبود یافته از سویه دلتا که یکی از مسری ترین و کشنده ترین سویه‌های این ویروس است واکنش دهد. بنابراین می-

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-25]

توان از RBD به عنوان کاندید واکسن نوترکیب و همچنین کیت های تشخیصی استفاده نمود.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر بخشی از پایان نامه دکتری تخصصی رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات می‌باشد. همچنین این مطالعه با اخذ کد اخلاق از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات به شماره(۱۴۰۰/۰۷۶ IR.IAU.SRB.REC.۲۰۱۶/۰۶/۱۶) انجام شد.

منابع مالی

این پژوهش تحت حمایت مالی هیچ نهاد و سازمانی نمی باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-25]

منابع

1. Colmenares V. Protein Structural Comparison between COVID-19 and other Coronaviruses.2020.

2. Rossi GA, Sacco O, Mancino E, Cristiani L, Midulla F. Differences and similarities between SARS-CoV and SARS-CoV-2: spike receptor-binding domain recognition and host cell infection with support of cellular serine proteases. Infection. 2020;48(5):665-9.

3. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. Nature Reviews Microbiology. 2021;19(3):141-54.

4. Kaur SP, Gupta V. COVID-19 Vaccine: A comprehensive status report. Virus research.2020;288:198114.

5. Lo Sasso B, Giglio RV, Vidali M, Scazzone C, Bivona G, Gambino CM, et al. Evaluation of anti-SARS-Cov-2 S-RBD IgG antibodies after COVID-19 mRNA BNT162b2 vaccine. Diagnostics.2021;11(7):1135.

6. Merkuleva IA, Shcherbakov DN, Borgoyakova MB, Shanshin DV, Rudometov AP, Karpenko LI, et al. Comparative Immunogenicity of the Recombinant Receptor-Binding Domain of Protein S SARS-CoV-2 Obtained in Prokaryotic and Mammalian Expression Systems. Vaccines. 2022;10(1):96.

7. Dong Y, Dai T, Wei Y, Zhang L, Zheng M, Zhou F. A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. Signal transduction and targeted therapy. 2020;5(1):1-14.

8. Jiang S, Bottazzi ME, Du L, Lustigman S, Tseng C-TK, Curti E, et al. Roadmap to developing a recombinant coronavirus S protein receptor-binding domain vaccine for severe acute respiratory syndrome. Expert review of vaccines. 2012;11(12):1405-13.

9. Pinto D, Park Y-J, Beltramello M, Walls AC, Tortorici MA, Bianchi S, et al. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. Nature. 2020;583(7815):290-5.

10. Min L, Sun Q. Antibodies and vaccines target RBD of SARS-CoV-2. Frontiers in Molecular Biosciences. 2021;8:247.

11. Bobbala S, Hook S. Is there an optimal formulation and delivery strategy for subunit vaccines? Pharmaceutical research. 2016;33(9):2078-97.

12. Pollet J, Chen W-H, Strych U. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. Advanced drug delivery reviews. 2021;170:71-82.

13. Soleimanjahi H, Fotouhi F. Baculoviruses and insect cells as powerful tools for gene expression. Tehran: Jahad Daneshgahi. 2009.

14. Du L, Zhao G, Chan CC, Sun S, Chen M, Liu Z, et al. Recombinant receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein expressed in mammalian, insect and E. coli cells elicits potent neutralizing antibody and protective immunity. Virology. 2009;393(1):144-50.

15. Yang J, Wang W, Chen Z, Lu S, Yang F, Bi Z, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. Nature. 2020;586(7830):572-7.
16. Srivastava V, Niu L, Phadke KS, Bellaire B, Cho MW. Induction of potent and durable neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 using a receptor binding domain-based immunogen. Frontiers in Immunology. 2021;12:588.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-25]

17. Struble LR, Smith AL, Lutz WE, Grubbs G, Sagar S, Bayles KW, et al. Insect cell expression and purification of recombinant SARS-COV-2 spike proteins that demonstrate ACE2 binding. Protein Science.2022;31(5):e4300.

18. He Y, Qi J, Xiao L, Shen L, Yu W, Hu T. Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from Escherichia coli. Engineering in Life Sciences.2021;21(6):45360.

19. Zinatizadeh MR, Zarandi PK, Zinatizadeh M, Yousefi MH, Amani J, Rezaei N. Efficacy of mRNA, adenoviral vector, and perfusion protein COVID-19 vaccines. Biomedicine & Pharmacotherapy.2022;146:112527.

20. Liu H, Wei P, Kappler JW, Marrack P, Zhang G. SARS-CoV-2 variants of concern and variants of interest receptor binding domain mutations and virus infectivity. Frontiers in Immunology. 2022;13.

21. Tahmoorespur M. Evaluation of Different Expression Systems for the Production of Pharmaceutical Recombinant Proteins with Emphasis on Mammalian Cells. Journal of Biosafety.2016;9(1):51-65.

22. Liu L, Chen T, Zhou L, Sun J, Li Y, Nie M, et al. A Bacterially Expressed SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Fused With Cross-Reacting Material 197 A-Domain Elicits High Level of Neutralizing Antibodies in Mice. Frontiers in Microbiology. 2022;13:854630-.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-25]