

Immunogenic evaluation of recombinant chimeric protein containing EspA -Stx2b- Intimin against *E.coli* O157 H7

Taheri M., BS¹, Nazarian SH., PhD², Ebrahimi F., PhD³, Bakhshi M., PhD⁴, Fathi J., BS⁵

1. MSc Student, Biology Research Center, Faculty of Science, Imam Hussein University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Biology Research Center, Faculty of Science, Imam Hussein University, Tehran, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-21-77104934, nazarian56@gmail.com

3. Assistant Professor, Biology Research Center, Faculty of Science, Imam Hussein University, Tehran, Iran

4. PhD in Nanobiotechnology, Biology Research Center, Faculty of Science, Imam Hussein University, Tehran, Iran

5. MSc student, Biology Research Center, Faculty of Science, Imam Hussein University, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background and Aim : Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) cause a wide spectrum of infections, such as diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic–uremic syndrome. Considering the risks associated with antibiotic therapy against EHEC infection, vaccines can be a promising method for prevention of infections. Recombinant chimeric proteins containing multiple immunogens could induce immunity against bacterial infections. The aim of this study was to evaluate immunogeneity of trivalent chimeric antigen EspA -Stx2b - Intimin against *E.coli* O157 H7 infection.

Material and Methods: In this descriptive-laboratory study,recombinant chimeric protein was expressed in *E.coli* BL21 DE3 by use of IPTG. The protein expression was evaluated by SDS-PAGE and western blotting analysis. The recombinant protein was purified using Ni-NTA affinity chromatography. The immunization was conducted in mice with purified protein and antibody titers were determined by ELISA. Following immunization, mice were infected with *E.coli* O157:H7 and evaluated for bacterial shedding and mortality. Using SPSS software, statistical analysis was performed by Duncan's test and T-test.

Results: The protein was expressed in *E.coli* BL21 (DE3) and SDS-PAGE analysis showed expression of recombinant protein with molecular weight of 63kD. Western blot analysis confirmed presence of chimeric protein. ELISA results showed that immunogenic properties of chimeric protein induced humoral response to EspA, intimin and Stx2b. Bacterial shedding in immunized mice decreased to 10^2 cfu/ml and mortality rate was reduced to 60%.

Conclusion: The results showed that the chimeric protein induced humoral response and protected the mice against *E.coli* O157:H7.

Keywords: Enterohemorrhagic *Escherichia coli*; Intimin; Shiga toxin; *E.coli* secreted protein A, Chimeric protein, Immunogenicity.

Received: Sep 5, 2017 **Accepted:** Oct 10, 2017

ارزیابی ایمنی زائی پروتئین کایمر نوترکیب در بردارنده *E.coli* O157 H7 علیه باکتری

مجتبی طاهری^۱، شهرام نظریان^۲، فیروز ابراهیمی^۳، مصطفی بخشی^۴، جواد فتحی^۵

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران.

۲. استادیار مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران (مؤلف مسؤول)، تلفن ثابت: ۰۲۱-۷۷۱۰۴۹۳۴؛ nazarian56@gmail.com

۳. استادیار مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

۴. دکتری تخصصی نانوپوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

۵. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

چکیده:

زمینه و هدف: انتروهموراژیک اشرشیا کلی (EHEC) باعث طیف گسترده‌ای از عفونت‌ها مانند اسهال، کولیت هموراژی و سندروم همولیتیک اورمیک می‌شود. با توجه به خطرات ناشی از درمان آنتی‌بیوتیکی در عفونت *E.coli* O157: H7، واکسن‌ها روشی امید بخش برای پیشگیری از عفونت را ارائه می‌کنند. پروتئین‌های کایمر نوترکیب در بردارنده چندین ایمونوژن می‌توانند ایجاد ایمنی علیه عفونت‌های باکتریایی را القاء کنند. هدف از این مطالعه بررسی ایمنی زایی آنتی‌ژن کایمر سه ظرفیتی *E.coli* O157 H7 علیه باکتری EspA -Stx2b -Intimin بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی، پروتئین کایمر نوترکیب تحت تاثیر IPTG در *E.coli* BL21 DE3 تولید شد. بیان پروتئین توسط SDS-PAGE و وسترن بلات ارزیابی شد. پروتئین نوترکیب با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی *Ni-NTA* تخلیص گردید. ایمنی زایی در موش‌ها با پروتئین خالص انجام و تیتر آنتی‌بادی توسط ELISA تعیین شد. بعد از ایمنی زایی، موشها با باکتری آلووده، ریزش باکتری و مرگ و میر حیوان‌ها بررسی گردید. بررسی آماری با آزمون‌های دانکن و T-test با نرم افزار SPSS انجام شد.

یافته‌ها: پروتئین در میزان (DE3) *E.coli* BL21 (DE3) بیان شد و آنالیز SDS-PAGE بیان پروتئین نوترکیب با وزن مولکولی ۶۳ kD را نشان داد. پروتئین کایمر توسط وسترن بلات تایید شد. نتایج ELISA نشان داد که ایمنی زایی با پروتئین پاسخ هومورال به EspA، Intimin و Stx2b را القاء کرد. ریزش باکتری در موش‌های ایمن تا 10^1 cfu/ml و مرگ و میر نیز تا 60 درصد کاهش یافت.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که پروتئین کایمر پاسخ ایمنی هومورال را تحریک کرده و باعث حفاظت موش‌ها در برابر چالش با *E. coli* O157: H7 می‌شود.

کلمات کلیدی: انتروهموراژیک اشرشیا کلی؛ اینتیمین؛ شیگا توکسین؛ پروتئین ترشحی اکلای؛ پروتئین کایمر؛ ایمنی زایی

وصول مقاله: ۹۶/۶/۱۴؛ اصلاحیه نهایی: ۹۶/۷/۱۸؛ پذیرش: ۹۶/۷/۱۲

مقدمه

EHEC به سلولهای میزبان را بر عهده دارد^(۷). عامل بیماری‌زای روده‌ای *E.coli* O157:H7 به سبب انتقال از طریق آب و غذای آلوده و توانایی در تولید توکسین شبه شیگلا از اهمیت بالینی ویژه‌ای برخوردار است. توکسین شبه شیگلا (Stx) پروتئین هگزامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ کیلو StxA دالتون بوده و از یک زیر واحد سمی و آنزیمی به نام StxB و پنج زیر واحد متصل شونده به گیرنده به نام StxB تشکیل شده است^(۸). از آنجا که بیماری زایی این باکتری در دو مرحله کلیدی اتصال به سلول میزبان و سپس ترشح توکسین صورت می‌گیرد، لذا تحقیقات توسعه واکسن علیه این عامل باید در برگیرنده ایمنی در برابر عملکرد اتصال باکتری و تولید توکسین آن باشد. سلمانیان و همکاران ایمنی زایی پروتئین دوگانه EspA-Intimin را بررسی و نشان دادند که آنتی بادی تولید شده علیه این دوگانه پروتئین نوترکیب می‌تواند عملکرد اتصال باکتری به سلول هدف را تضعیف کند^(۹). باران وند و همکاران با بررسی ایمنی زایی پروتئین نوترکیب StxB شیگلا دیسانتری تیپ یک نشان دادند که این پروتئین باعث مقاومت موش در برابر *E.coli* O157:H7 نیز می‌شود^(۱۰). با پیشرفت‌های ایجاد شده در روش‌های مهندسی ژنتیک امکان طراحی و ساخت ژنهای کایمر در بردارنده چند ایمنوژن فراهم شده است. از محاسن استفاده از پروتئین‌های کایمر نوترکیب می‌توان به کاهش هزینه تولید آنتی ژن‌ها و سهولت نگهداری یک پروتئین چندگانه در مقایسه با چند پروتئین نوترکیب مجزا که هر یک شرایط نگهداری خاصی را می‌طلبند، اشاره کرد. استفاده از ادجوانات‌های پروتئین در ساختار پروتئین کایمر نیز می‌تواند پاسخ‌های ایمنی علیه ایمنوژنها را تقویت کند.

هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی ایمنی زایی پروتئین کایمر سه ظرفیتی در بردارنده زیر واحدهای اتصالی و توکسین باکتری *E. coli* O157:H7 بود.

عفونت‌های دستگاه گوارش و اسهال از مهمترین علل مرگ‌وimir و ناتوانی به خصوص در کودکان زیر پنج سال می‌باشد. سه شاخصه بیماری زایی اصلی که پاتوزن‌های مسبب بیماری‌های روده‌ای از طریق آن عمل می‌کنند عبارت‌اند از: اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده، حمله به سلول‌های اپیتلیال و اپیتلیوم، تولید توکسین‌ها که ممکن است برای سلول‌ها کشنده باشد و یا منجر به از دست رفتن آب شوند^(۱۱). باکتری اشربیشیا کلی سویه O157:H7 میکروارگانیسمی است که از طریق فرآورده‌های غذایی و آب آلوده به انسان منتقل می‌شود و پس از لانه گزینی در روده منجر به آسیب‌های شدیدی همچون کولیت خونریزی دهنده (Hemorrhagic Colitis) و سندرم ادراری (Hemolytic Uremic Syndrome) خونریزی دهنده (Hemolytic Uremic Syndrome) می‌شود^(۱۲). لانه گزینی این باکتری در لوله گوارش به واسطه عوامل و فاکتورهایی است که تحت کنترل جزایر بیماری زایی می‌باشد. این جزایر ژنتیکی شامل عوامل بیماری زایی از قبیل ژن‌های تهاجم، اتصال و سیستم ترشحی می‌باشد. سیستم ترشحی در ترشح پروتئین‌های مختلف از جمله EspA، EspB، EspD، Tir و EspD نقش دارد^(۱۳). EspA توسط ژن espA کد می‌شود و روی سطح باکتری ساختاری فیلامنی برای تزریق Tir، EspD و EspB تشکیل می‌دهد. چسبندگی اولیه باکتری به سلول‌های اپی تیال توسط پیلی تشکیل دهنده دسته (Bundle forming pilus) انجام می‌شود. سپس پروتئین EspA با شکل دادن یک کانال شرایط را برای انتقال سایر فاکتورهای دخیل در لانه گزینی باکتری فراهم می‌کند^(۱۴). ژن eae کد کننده پروتئین غشاء‌ای Intimin می‌باشد که جهت اتصال باکتری به سلول میزبان ضروری است. متعاقب اتصال Tir، باکتری EHEC به Intimin به سطح سلول روده ای متصل و موجب بازآرایی اسکلت سلولی اکتین در آن ناحیه می‌گردد. تحقیقات نشان داده که Intimin نقش کلیدی و مهمی در اتصال باکتری

مایع جدید دارای $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ آنتی بیوتیک کانامایسین تلقیح و تا رسیدن باکتری‌ها با مرحله رشد لگاریتمی (جدب نوری $0/5$ در طول موج 600 نانومتر) درون شیکر انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی گراد قرار گرفت. به هر یک از نمونه‌ها به استثنای نمونه شاهد، القا گر IPTG با غلظت نهایی یک میلی مولار اضافه و به مدت 5 ساعت در دمای 30 درجه سانتی گراد در شیکر انکوباتور با سرعت 120 دور در دقیقه گرم‌گذاری شد. رسوب سلولی مربوط به $1/5$ میلی-لیتر از هر کدام از نمونه‌های تست و شاهد جمع آوری و در 100 میکرولیتر بافر لیز کننده یکنواخت گردید. دیواره سلولی از طریق سونیکاسیون (قدرت 75 درصد در 4 سیکل: 10 ثانیه سونیکاسیون و 15 ثانیه در یخ) شکسته و پس از سانتریفیوژ محلول رویی جداسازی شد. برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب از ژل SDS-PAGE 12 درصد استفاده شد.⁽¹⁷⁾

تخلیص پروتئین نوترکیب ESI به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی (ستون Ni-NTA) با بررسی محلول و یا غیر محلول بودن پروتئین نوترکیب ESI مشخص گردید که به دلیل بیان بالا، این پروتئین در سلول با یکدیگر تجمع یافته و باعث تشکیل اجسام نامحلول می‌شود. با در نظر گرفتن این شرایط از روش دناتوره برای تخلیص پروتئین نوترکیب استفاده گردید. به رسوب سلولی حاصل از القاء بیان 20 میلی لیتر کشت باکتری، 5 میلی لیتر بافر B (Tris- HCl, NaH₂PO₄) ؛ اوره با pH 8 اضافه و همگن گردید. نمونه‌ها با شرایط قدرت 70 درصد و پالس $0/75$ به تعداد 6 مرتبه سونیکه شده و سپس به مدت 45 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ محلول رویی حاوی پروتئین نوترکیب جدا و از رزین گرماتوگرافی گذرانده شد. در هر مرحله خروجی ستون جداگانه جمع آوری و نگهداری گردید. بافرهای شستشوی (Tris- HCl, NaH₂PO₄) ؛ اوره با pH $6/3$ ، C (Tris- HCl, NaH₂PO₄) ؛ اوره با pH $5/9$ ، D (Tris- HCl, NaH₂PO₄) ؛ اوره با pH $5/4$ بافر استخراج

روش بررسی

طراحی بیانفورماتیکی کاست ژنی:

توالی نوکلئوتید و آمینواسیدی پروتئین‌های Intimin از باکتری اشریشیا کلی انتروهموراژیک استخراج و بررسی شد. توالی‌ها از پایگاه داده NCBI با فرمت FASTA اقتباس گردید و انتخاب بخشی از این پروتئین‌ها جهت ساخت کایمر سه‌ظرفیتی بر اساس منابع و تحلیل نتایج آن منابع انجام گرفت.⁽¹¹⁾ آنالیز هر یک از توالی‌ها به‌منظور تعیین درصد GC، ضریب سازگاری کدونی (CAI)، توزیع فراوانی کدونی و میزان کدون‌های نادر انجام شد. پس از طراحی اولیه پروتئین کایمر، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن با استفاده از نرم‌افزار تحت شبکه Expasy's ProtParam tool محاسبه گردید.⁽¹²⁾ پیش‌بینی ساختار ثانویه mRNA و پارامترهای Mfold مختلف ژن کایمر از طریق نرم‌افزار تحت شبکه I-TASSER پیش‌بینی گردید. ساختار سوم پروتئین کایمر با استفاده از نرم‌افزار تحت شبکه ProS A استفاده شد.⁽¹⁴⁾ پیش‌بینی ابی توب‌های توالی مورد نظر با استفاده از نرم افزار BCpreds analysis tool صورت پذیرفت.⁽¹⁵⁾

آماده سازی کاست ژنی و انتقال به میزبان shingene ترادف مورد نظر برای ساخت به شرکت (چین) سفارش داده و ژن کایمر pET28a در ese در استر سلولهای مستعد BL21(DE3) گردید. سلول‌های میزبان ترازیخت شده بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین ($80\text{ }\mu\text{g/ml}$) کشت داده و به صورت شبانه در دمای 37 درجه سانتی گراد گرم‌گذاری شد.⁽¹⁶⁾

بیان پروتئین نوترکیب ESI در باکتری E. coli در میکرولیتر از هر یک از محیط‌های کشت حاوی باکتری ترازیخت شده با پلاسمید نوترکیب در 5 میلی لیتر محیط

در آب اضافه و سپس محتویات همگن گردید. در پایان به هر موش تست ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه تهیه شده که حاوی ۲۰ میکروگرم آنتی زن مورد نظر بود به صورت زیر جلدی و یا داخل صفاقی تزریق شد. یک هفتہ پس از تزریقات دوم، سوم، چهارم از موش‌ها خون گیری و سرم‌ها جدا شده و برای مراحل بعدی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد(۱۹).

بررسی تیتر آنتی بادی به روش الایزای غیر مستقیم: به منظور بررسی تیتر آنتی بادی از روش الیزا استفاده گردید. ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ داخل هر یک از چاهک‌های الایزا تثیت شد. شستشو با بافر PBS و اجد تویین (PBS-Tween) در هر مرحله صورت گرفت. میکروپلیت با PBST حاوی ۵ درصد شیر خشک بدون چربی مسدود و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سرم‌ها از رقت ۱:۲۰۰ تا ۱:۲۵۶۰۰ در PBST رقیق و به چاهک‌ها اضافه و میکروپلیت به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در مرحله بعد، رقت (۱:۲۰۰۰) از آنتی بادی گونزوگه موشی در PBST تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. پس از گرم‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت نیم ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر سوسترا (۲ میلی گرم Dihydrochloride OPD (o-Phenylenediamine در ۵ میلی لیتر بافر فسفات حاوی ۲/۵ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد) به هر چاهک اضافه شد. با ایجاد رنگ زرد، واکنش با اسید سولفوریک یک مolar متوقف و جذب در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد (۱۹).

بررسی تیتر آنتی بادی ضد پروتئین کایمر علیه پروتئین‌های Stx2B، Intimin، EspA:

جهت تعیین تیتر آنتی بادی تولید شده توسط موش علیه اجزای تشکیل دهنده پروتئین کایمر ESI از روش الایزای غیر مستقیم استفاده شد. در هر استریپ پروتئین‌های EspA، Intimin، Stx2B (۲۰) که قبلاً در مرکز

pH E و بافر MES از ستون عبور داده شد. برای بررسی SDS-PAGE از ژل ۱۲ درصد استفاده شد.

تایید پروتئین نوترکیب:

برای تایید پروتئین نوترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی بادی ضد tag His استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه گذاری وسترن ۱۹۲ (Mini Protean) Bio-rad میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و pH: ۸/۳ متابولیز با استفاده از بافر ۳۷ NaCl (PBST) Na₂HPO₄.۷H₂O میلی مولار، KCl ۲/۷ میلی مولار، ۵ میلی مولار، تویین ۲۰ درصد و pH: ۷/۲) حاوی ۴/۳ درصد شیر خشک به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شستشو با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱/۱۰۰۰ آنتی بادی ضد His-tag(ebcam) کاژنوگه دار در بافر در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت پس از سه بار شستشو با بافر ۵۰ mM PBST، برای آشکارسازی از سویسترا (باfer تریس H₂O₂ ۱۰ µl، DAB ۶ mg pH: ۷/۸) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین آنزیم کاژنوگه و سویسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیترو سلولزی، واکنش با استفاده از آب مقطر متوقف گردید(۱۸).

ایمنی زایی موش‌های آزمایشگاهی:

در این آزمایش از موش سوری که هیچ دارو یا واکسنی دریافت نکرده بودند، استفاده شد. موش‌ها دارای وزن ۲۵ گرم بوده و در مدت آزمایش تحت شرایط یکسان از جمله میزان غذا و آب مصرفی، شرایط نگهداری، دمای محیط و ... قرار داشته‌اند. به منظور بررسی پاسخ ایمنی از ۴۰ عدد موش به عنوان تست و ۲۰ عدد به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای هر موش ۲۰ میکروگرم پروتئین تخلیص شده با PBS استریل به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. جهت آماده سازی نمونه‌ها برای تزریق، هم حجم آن ادجوانت روغن

آنالیز آماری:

برای تعیین نرمال بودن داده ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. آنالیز واریانس داده ها با استفاده از انوای یک طرفه انجام و مقایسه میانگین در سطح تجویز دوم، سوم و چهارم و ریزش باکتری در گروه غیر ایمن و گروه های ایمن شده با پروتئین کایمر با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت. عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 22 انجام شد.

یافته ها

طراحی بیوانفورماتیکی پروتئین کایمر:

بر اساس نتایج بررسی های بیوانفورماتیکی پروتئین کایمر با ترتیب Intimin، Stx2B و EspA انتخاب شد. با استفاده از توالی آمینواسیدی و نوکلئوتیدی زیرواحدهای کایمر و به کارگیری نرم افزارهای تحت شبکه Genscript و ProtParam اطلاعات بیوشیمیایی مربوط به کایمر همان طور که در جدول ۱ بیان شده است استخراج گردید تا مبنای برای ورود به بخش تجربی و انجام آزمایش های در ارتباط با بیان نوترکیب، تخلیص و پایدار نمودن پروتئین باشد.

پس از مشخص شدن اطلاعات بیوشیمیایی برای کایمر، نحوه تاخوردگی mRNA حاصل از ژن کد کننده آن نیز توسط نرم افزار Mfold پیش‌بینی شد و بر اساس مدل ارائه شده توسط نرم افزار مشخص گردید که ΔG ساختار پس از بهینه‌سازی کدون ها در حد مطلوبی است (-۴۱۸) و کدون آغاز در بخش ساقه و در مجاورت حلقه ساختار تاخورد واقع شده است.

ایمنی همورال به واسطه B-cell می‌تواند از یک آنتی ژن مناسب کاندید واکسن حاصل شود. اپی‌توب‌ها بر مبنای BCpred معیارهای ذکر شده در نرم افزار تحت شبکه بررسی شدند که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود اپی‌توب‌ها در تمام طول پروتئین کایمر پراکنده هستند. از این رو می‌توان انتظار

تحقیقات زیست شناسی دانشگاه امام حسین(ع) همسانه سازی و بیان شده بود به طور جداگانه ثبت شد. سایر مراحل الیزا مشابه آنچه که در بالا اشاره گردید، انجام شد. بررسی ریزش باکتری در موش‌های ایمن با استفاده از باکتری *E.coli* O157:H7:

دو هفته پس از خاتمه ایمن سازی، با استفاده از روش بررسی ریزش (shedding) باکتری، چالش انجام شد. ۴۸ ساعت قبل از شروع آزمون‌ها به آب موش‌ها آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین سولفات (۵mg/ml) اضافه و ۱۲ ساعت قبل از شروع آزمون غذای حیوانات حذف گردید. به هر موش تعداد 10^9 باکتری *E.coli* O157:H7 که در ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS حل شده بود خورانده شد. نمونه مدفوع موش‌های کنترل و تست یک روز در میان به مدت دو هفته جمع آوری گردید. برای اندازه گیری ریزش مدفوعی میزان ۱ گرم از مدفوع هر گروه وزن و به درون میکروتیوب استریل انتقال داده شد. سپس یک میلی لیتر محیط کشت مایع LB به هر میکروتیوب اضافه شد و این تیوب‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم‌گذاری شدند. پس از اتمام زمان گرم‌گذاری، رقت‌های متواتی از مایع رویی تهیه شد و بر روی محیط کشت اختصاصی سوربیتول مکانکی آگار (محتوی $2/5\text{mg}/\text{ml}$ تلوریت پتاسیم و $0/05\text{mg}/\text{ml}$ سفکسیم) کشت داده و پلیت‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم‌گذاری و کلنی‌های سفیدرنگ باکتری شمارش شد (۲۱).

بررسی زنده مانی موش‌های ایمن شده:

۱۴ روز پس از آخرین مرحله ایمن سازی، موش‌های ایمن به سه گروه تقسیم شده و به هر گروه به ترتیب MLD ۱۰، 50 و 100 MLD از باکتری به صورت درون صفاقی تزریق شد. چنین روشهای نیز برای موش‌های کنترل انجام شد. در طی مدت ده روز زنده ماندن موشها بررسی گردید.

داشت که آنتی بادی علیه هر جزء پروتئین کایمر ایجاد شود.

جدول ۱: اطلاعات بیوشیمیابی مستخرج از توالی آمینواسیدی و نوکلئوتیدی آنتی ژن کایمر قبل و بعد از بهینه‌سازی.

مؤلفه	قبل از بهینه‌سازی	بعد از بهینه‌سازی
تعداد باقیمانده	۵۵۷	۵۵۷
وزن ملکولی	۵۹۱۴۵/۴	۵۹۱۴۵/۴
ضریب سازگاری کدونتی	۰/۸۲	۰/۶۸
درصد GC	۴۷/۷۹	۴۱/۶۷
تعداد عناصر CIS متفق	۱	۶
pH ایزوکلتريک نظری	۸/۶۵	۸/۶۵
نیمه عمر در باکتری	بیش از ۱۰ ساعت	بیش از ۱۰ ساعت
شاخص ناپايداري	۲۷	۲۷

جدول ۲: پيش‌بيش ابي ترپ‌های B-cell خطی.

موقعیت آمینواسیدی	امتیاز	ابی توپ
۵۳۴	۰/۹۹۹	LITQNPLPGVNVNTPNVYAV
۳۲۸	۰/۹۹۷	NGKSQTQATTGNDGRATITL
۳۰۷	۰/۹۶۸	MKNGQPVNNQSVTNSTNFGM
۵۱۲	۰/۹۶۴	SITAWIKTSSEQRSQGSST
۴۰۶	۰/۹۳۹	KLKASGGDGTYSWYSENTSI
۴۵۹	۰/۹۲۶	KAPSYMIKVDKQAYYADAMS
۲۷	۰/۹۰۸	VQSSTDKNAKAKLPQDVIDY
۴۹۱	۰/۸۸۴	LSDIYDSWGAANKYSHYSSM
۲۸۲	۰/۸۵۲	ITEIKADKTTAVANGKDAIK
۱	۰/۸۵۱	ADMNEASKASTTAQKMANLV
۸۳	۰/۸۴۸	NNLTTVVNNSQLEIQQMSNT
۳۷۵	۰/۸۴۳	FDELKIDNKVDIIGNNVRGE
۴۳۶	۰/۸۲۸	LNGKGSSVIKATSGDKQTVS
۱۸۲	۰/۷۸۷	VKVAGKEYWTSRWNLQPLLQ

پلاسمید pET28(a) استفاده شد. با انجام واکنش آنزیمی، قطعه ژنی جدا شده از وکتور با اندازه ۱۷۰۰ جفت باز مشاهده شد. بر این اساس همسانه سازی ژن بهینه سازی شده

بيان پروتئين نوترکيب: با توجه به اينکه در طراحی کاست ژنی جايگاه‌های برشی در پایانه‌های *HindIII* و *EcoRI* بود، لذا از همين آنزيم‌ها نيز برای تائيد وجود ژن در

تخلیص پروتئین نوترکیب به کمک کروماتوگرافی میل

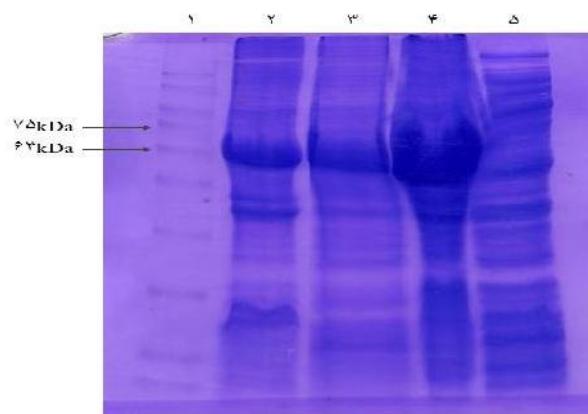
ترکیبی:

با محلول سازی کنجاله های نامحلول درون سلول های تاریخت میزان بیانی و آماده نمودن آنها، فرآیند عبور محلول مذکور از ستون کروماتوگرافی محتوی رزین نیکل انجام شد. با الکتروفورز نمونه های عبوری و شسته شده از ستون مشخص گردید تخلیص پروتئین با بافر E انجام شده (شکل ۲).

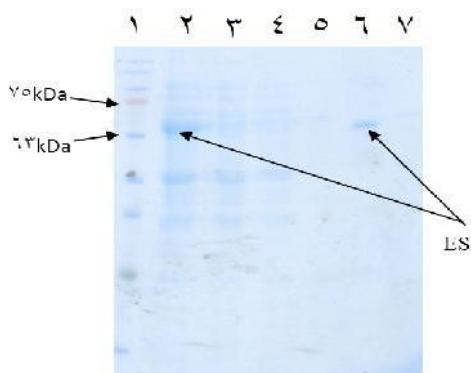
تائید پروتئین نوترکیب ESI به روش وسترن بلاست: با در نظر گرفتن این موضوع که کایمیر ESI حاوی یک دنباله هیستیدینی در انتهای آمین بود، لذا برای انجام فرآیند لکه گذاری وسترن از آنتی بادی ضد دنباله هیستیدینی کوژزو گه به HRP برای تائید آن استفاده شد. پس از انجام این آزمون، رنگ پذیری کاغذ نیتروسلولز در مقابل باند ۶۳ کیلو دالتونی نشانگر ملکولی پروتئین دیده شد (شکل ۳).

در پلاسمید تایید گردید. پلاسمید نوترکیب به سویه بیانی *E.coli* BL 21DE3 منتقل شد.

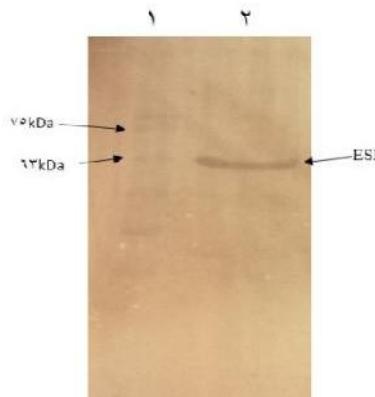
فرآیند القاء بیان پروتئین نوترکیب کایمیر ESI صورت پذیرفت و نمونه ها پس از آماده سازی، بر روی ژل آکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند و با رنگ آمیزی ژل باند بیانی متعلق به پروتئین کایمیر با وزن ۶۳ کیلو دالتون در نمونه های القاء شده در قیاس با نمونه های کنترل (القاء نشده) نمایان گشت (شکل ۱). پس از اسکن نمودن ژل مربوط به بیان پروتئین کایمیر ESI در لیز سلولی کامل و آنالیز تصویر آن توسط نرم افزار Gen Analyzer، درمجموع تعداد ۱۶ باند شاخص پروتئینی توسط نرم افزار بر روی ژل اسکن شده شناسایی شد. سطح زیر پیک مربوط به باند کایمیر ESI برابر ۱۴۹۲ بود. با احتساب سطح زیر پیک های مجموع باندهای شاخص (۲۸۳۹) معادل ۱۰۰ درصد، میزان بیان پروتئین ESI با توجه به شدت تراکم باند بر روی ژل SDS-PAGE حدود ۵۲ درصد محاسبه گردید.



شکل (۱): بررسی بیان کاست ژنی pET28a(+) -*eae*. ردیف ۱- نشانگر ملکولی پروتئین (Cat. No. PR911654). ردیف ۲، ۳ و ۴- نمونه القا شده با IPTG. ردیف ۵- نمونه القا نشده.



شکل ۲: الگوی الکتروفورز فرآیند تخلیص کایمر ESI از طریق کروماتوگرافی تمایلی با بافرهای روش دناتوره. ردیف ۱- نشانگر ملکولی پروتئین. ردیف ۲- نمونه اوره ۸ مولار حاوی کایمر ESI پیش از عبور از ستون. ردیف ۳- نمونه اوره ۸ مولار پس از عبور از ستون. ردیف ۴- نمونه مربوط به شستشوی ستون با بافر D. ردیف ۵- نمونه مربوط به شستشوی ستون با بافر C. ردیف ۶- نمونه مربوط به شستشوی ستون با بافر E. ردیف ۷- نمونه مربوط به شستشوی ستون با بافر MES.



شکل ۳: الگوی آنالیز وسترن بلات تأثیر آنتیزن کایمر ESI. ردیف ۱: نشانگر ملکولی پروتئین. ردیف ۲: باند متعلق به آنتیزن ESI حاوی دنباله هیستیدین در انتهای آمین. باند رنگ گرفته در ردیف ۲ متناظر با باند محدوده ۶۳kDa نشانگر ملکولی پروتئین می‌باشد.

تیتر آنتی بادی علیه پروتئین کایمر پس از هر یار تزریق افزایش داشت. افزایش تیتر آنتی بادی در تزریق چهارم نسبت به تزریق سوم به لحاظ آماری معنی دار نبود ($p < 0.05$)

بررسی تیتر آنتی بادی علیه اجزا تشکیل دهنده پروتئین کایمر:

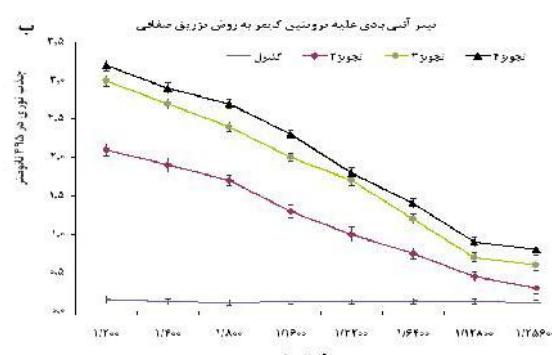
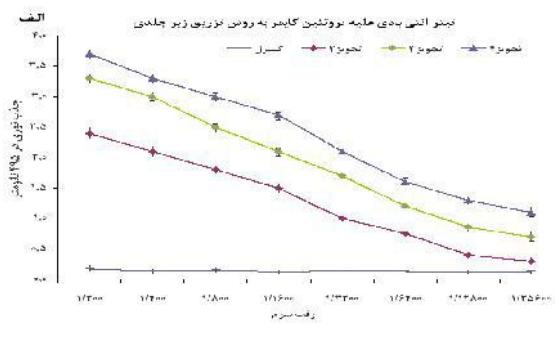
به منظور بررسی تولید آنتی بادی علیه هر یک از پروتئین‌های Intimin، Stx2B و EspA مربوط با ساختار پروتئین نوترکیب از روش الیزا استفاده شد.

بررسی تیتر آنتی بادی سرم موش‌های ایمن شده با پروتئین کایمر:

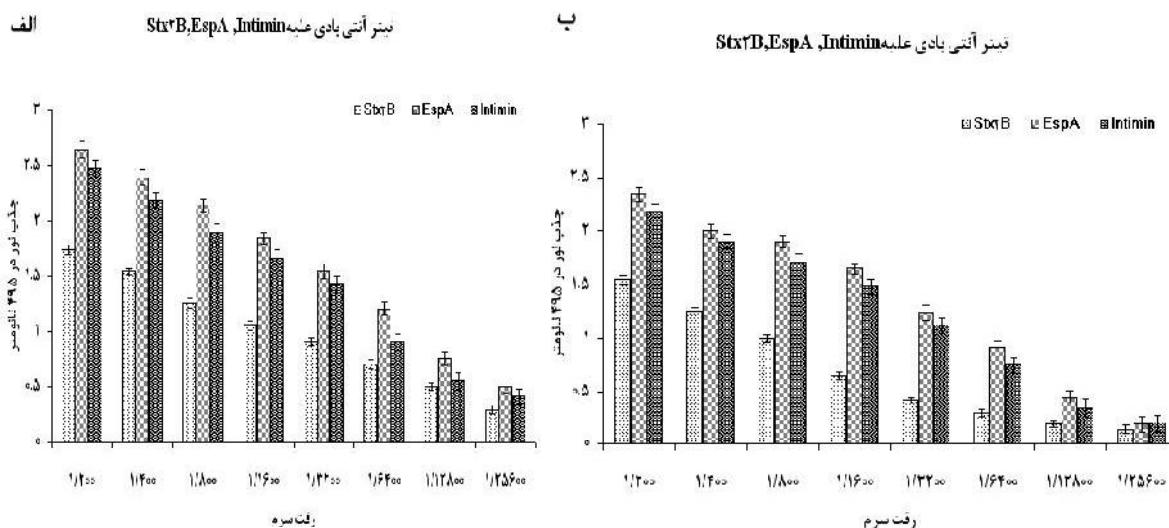
حساسیت آنتی بادی پلی‌کلونال تولید شده علیه آنتیزن کایمر ESI از طریق الیزا بررسی شد. همانطور که در نمودار ۱ دیده می‌شود تجویز درون صفاقی و زیر پوستی پروتئین کایمر منجر به تحریک سستم ایمنی و تولید آنتی سرم شد. هر چند تیتر آنتی بادی روش تجویز درون صفاقی کمتر از تجویز زیر پوستی بود با این حال این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار نبود ($p > 0.05$) .

نباود($p < 0.05$). تفاوت تیتر آنتی بادی علیه هر کدام از پروتئین های نوترکیب Intimin، Stx2B و EspA در روشن زیر پوستی و درون صفاقی تفاوت معنی داری را نشان نداد($p > 0.05$).

همانطور که در نمودار ۲ دیده می شود آنتی بادی علیه هر سه جزء پروتئین تولید شده است. تیتر آنتی بادی علیه Stx2B کمتر از تیتر آنتی بادی علیه پروتئین های EspA و Intimin بود($p < 0.05$). تیتر آنتی بادی علیه EspA بالاتر از بود که از لحاظ آماری این تفاوت معنی دار



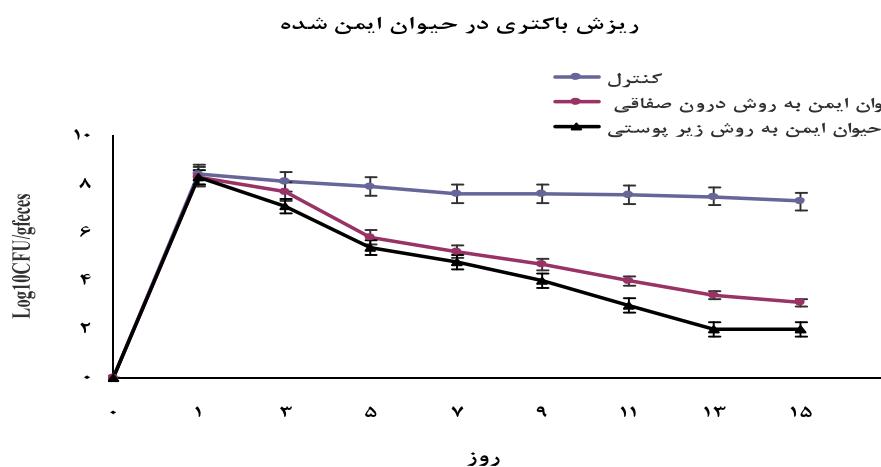
نمودار ۱: بررسی تیتر آنتی بادی علیه پروتئین نوترکیب ESI به روش تجویز زیر پوستی(الف) و درون صفاقی(ب)



نمودار ۲: بررسی تیتر آنتی بادی علیه پروتئین های Intimin، Stx2B و EspA در سرم موش های ایمن شده با پروتئین ESI به روش زیر پوستی(الف) و درون صفاقی(ب)

بررسی زنده ماندن موش‌های ایمن شده با توجه به اینکه در بررسی میزان ریزش باکتری، موش‌های ایمن شده به روش زیر پوستی میزان دفع باکتری کمتری را نشان دادند لذا در این مرحله زنده مانی حیوانات فقط با حیوانات ایمن شده به روش زیر پوستی انجام شد. پس از چالش، تمامی موش‌های کنترل که ایمن نشده بودند بعد از دریافت 10 MLD از باکتری، در طی مدت 9 روز مردند. این در حالی بود که تمام موش‌های ایمن این دوز را تحمل کرده و زنده ماندند. بر طبق نتایج تمامی موش‌های کنترل که ایمن نشده بودند بعد از دریافت 50 MLD از باکتری، در طی مدت 6 روز مردند. این در حالی بود که 80 درصد موش‌های ایمن این دوز را تحمل کرده و زنده ماندند. موش‌های کنترل که ایمن نشده بودند بعد از دریافت 100 MLD از باکتری، در طی مدت 5 روز مردند. در چنین شرایطی 40 درصد موش‌های ایمن این دوز را تحمل کرده و زنده ماندند.

چالش موش‌های ایمن با باکتری زنده *E.coli* O157:H7 به منظور بررسی ریزش باکتری در هر گروه 5 موش به عنوان تست و 5 موش به عنوان کنترل استفاده شد که به گروه تست 10^9 cfu/ml باکتری بیماری‌زای O157:H7 بصورت خوراکی تلقیح شد و به مدت 15 روز، یک روز در میان نمونه برداری از مدفوع موشها انجام گردید. تعداد باکتریهای دفع شده از مدفوع طی این مدت محاسبه شد. همانطور که در نمودار 3 دیده می‌شود میزان دفع باکتری در حیوان کنترل پس از گذشت 15 روز در حدود 10^8 cfu/ml ثابت ماند. این در حالی است که میزان دفع باکتری در موش‌های ایمن شده به روش زیر پوستی سیر نزولی داشته و در پایان روز 15 ، به حدود 10^7 cfu/ml کاهش یافته است. این در حالی است که در پایان روز 15 ، میزان دفع باکتری از موش‌های ایمن شده به روش صفاقی، حدود 10^3 cfu/ml بود. تفاوت ریزش باکتری در موش‌های کنترل با موش‌های ایمن شده به روش زیر پوستی و درون صفاقی از لحاظ آماری معنی دار بود ($p < 0.05$).



نمودار 3 : بررسی ریزش باکتری در موش‌های ایمن شده به روش درون صفاقی، زیر پوستی و موش‌های غیر ایمن پس از چالش با 10^9 MLD باکتری O157:H7. پس از چالش موش‌های غیر ایمن، آلودگی را به صورت تقریباً پایدار نشان داده در حالیکه آلودگی در موش‌های ایمن شده پس از یک هفته به صورت قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت.

بحث

EspA و Intimin، Stx2B و مدنظر قرار گرفت. ایمونوژن های کایمیر، پروتئین های چند ظرفیتی هستند که از چند اپی توپ مؤثر، از یک آنتیژن یا از چند آنتیژن مختلف تشکیل می شوند. همچنین، این نوع پروتئین ها می توانند از امتزاج چند آنتیژن، از چند گونه، جنس، تیپ و یا سروتیپ مختلف تشکیل شوند(۲۲). در این پژوهش توالی های Intimin، EspA و زیر واحد B توکسین شبه شیگای ۲ از ژنوم باکتری گردید که فقط بخش انتهای کربوکسیل پروتئین Intimin در برهم کش آن با گیرنده اش نقش دارد(۲۳)، لذا ۹۳۳ نوکلئوتید انتهای^۳ ژن eae که کد کننده این بخش بود انتخاب شد. همچنین برای پروتئین EspA نیز به سبب اینکه ۱۲۸ باقیمانده انتهایی آن در سطح سلول باکتری قرار می گیرند(۲۴)، از ۶۴ اسید آمینه ابتدایی آن صرف نظر شد اما توالی کامل Stx2B در طراحی سازه کایمیر مورد استفاده واقع شد. Garcia-Angulo و همکاران (۲۰۱۳) مطالعات و پژوهش های زیادی در حوزه طراحی واکسن نوترکیب علیه بیماری زا EHEC با استفاده از فاکتورهای بیماری زای آن پرداختند. از جمله این موارد می توان به پروتئین های Stx2A و Stx2B، Stx1B، Stx1A، Tir، EspA_{c120} Intimin، Tir-intimin (۱۱)، در اکثرا مطالعات انجام شده مشخص شد که آنتیژن های EspA، Intimin و Stx2B نقش مهمی را در طراحی یک کاندید واکسن مناسب ایفا می کنند. مطالعات مختلفی در زمینه طراحی سازه های کایمیر انجام شده است که از جمله این سازه ها می توان به آنتیژن کایمیر H7-HCP-Tir-Intimin (۹)، Tir-intimin (۲۵)، EspA-Stx2A1 (۲۷)، EspA-Intimin-Stx (۲۶) اشاره نمود. اگرچه آنتیژن های مورد استفاده در کایمیر طراحی شده توسط G0 و همکاران (۲۰۰۹) با آنتیژن های این پژوهش مشترک هستند (۲۶) اما تفاوت های ساختاری

با توجه به سازو کار بیماری زایی *E.coli* O157:H7 نقش اساسی پروتئین های EspA و Intimin در آغاز فرآیند لانه گزینی باکتری کاملاً آشکار می گردد. از طرفی قابلیت ترشح توکسین شبه شیگا توسط این بیماری زای ناتوان کنند، منجر به این شده که مقابله با باکتری و فاکتورهای ناتوان کننده آن به لحاظ بالینی از اهمیت ویژه ای برخوردار باشد. مؤثرترین روش مقابله با این گونه عوامل باکتریایی، پیشگیری از بروز بیماری است بنابراین با مقابله با عملکرد پروتئین های آغازگر لانه گزینی این باکتری در روده می توان تا مقدار زیادی از قابلیت باکتری برای بیماری زایی جلوگیری نمود. پروتئین های Intimin و EspA از این جنبه کاندیدهای مناسبی برای مقابله با لانه گزینی این بیماری زا هستند. از طرفی، چنانچه به هر علتی باکتری از سدهای متعدد بدن گذشت و توانست در مکان مناسب لانه گزینی و تکثیر نماید، در مرحله بعد توکسین تولید شده توسط آن وارد گردش خون شده و عواقب وخیم بعدی آن یعنی بیماری های HUS و HC را ایجاد می کند. لذا بخشی از این توکسین نیز که در ورود بخش فعل توکسین به سلول های هدف نقش دارد و نه در سمیت آن می تواند کاندید مناسب دیگری برای مقابله با این بیماری زا باشد. بر این اساس در تحقیق حاظر فاکتور های بیماری زایی ایجاد این میانی علیه Stx2B، Intimin، EspA باکتری *E.coli* O157:H7 مورد استفاده قرار گرفت. ابزارهای توانمند بیوانفورماتیک و تکنولوژی DNA نوترکیب شرایطی را فراهم ساخته است تا بتوان هر سه آنتیژن هدف گذاری شده برای مقابله با بیماری زا *E.coli* O157:H7 را به صورت یکجا و در قالب یک سازه و یک پروتئین فراهم نمود. با فراهم شدن این امکان می توان هم مانع از لانه گزینی باکتری در روده کوچک شد و هم ابزار لازم برای ختنی نمودن توکسین آن را به صورت یکجا در اختیار داشت. برای دستیابی به اهداف فوق راهبرد طراحی و ساخت یک ایمونوژن کایمیر مشکل از آنتیژن های

از مزایای این سیستم بیانی می‌توان به بیان سریع، بازده بالا، تولید سریع در حجم انبوه و مقرون به صرفه بودن و معایب آن تولید پروتئین به شکل غیر گلیکوزیله، تولید پروتئین به همراه اندوتوكسین اشاره کرد. سلمانیان و همکاران با طراحی پروتئین کایمری EspA-Intimin ایمنی بخشی آن را علیه *E.coli* O157:H7 بررسی کردند. در این پژوهش بعد از ایمن سازی موش‌ها با پروتئین کایمر مقدار 10^{10} cfu از طریق دهانی به موش تزریق شد، بعد از گذشت دو هفته میزان ریزش باکتری از موش‌های ایمن شد به 10^3 کاهش یافت^(۹). امانی و همکاران با طراحی پروتئین Tir کایمری متشکل از سه پروتئین EspA و Intimi ایمنی زایی این کایمر را در موش بررسی کردند. در پژوهش امانی بعد از ایمن سازی موش‌ها با پروتئین کایمر، میزان 10^{10} cfu از طریق دهانی به موش خورانده و بعد از دو هفته میزان ریزش باکتری به صفر رسید^(۷). در مقایسه با پژوهش ما اگرچه میزان ریزش باکتری به صفر رسید و نتیجه قابل قبول داشت ولی نکته مهم در تحقیق گذشته، عدم توجه به فاکتور توکسین در طراحی کایمر بود. پروتئین نوترکیب استفاده شده در تحقیق حاضر توانست ایمنی علیه سازوکار اتصال و توکسین باکتری *E.coli* O157:H7 را تحریک کند.

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که پروتئین کایمر پاسخ هومورال را در موش تحریک کرده و باعث حفاظت موش‌ها در برابر چالش با *E. coli* O157: H7 می‌شود. از پروتئین کایمر نوترکیب می‌توان در ایجاد ایمنی فعال و غیرفعال در برابر باکتری *E.coli* O157: H7 استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین(ع) سپاسگزاری و قدردانی به عمل می‌آید.

اساسی بین آن‌ها وجود دارد که عبارت‌اند از: آنتیژن‌های Stx2B و Intimin و EspA و Go در پژوهش است درصورتی که طول توالی این سه آنتیژن در این مطالعه به ترتیب با ۱۹۲، ۳۰۰ و ۱۱۶ باقیمانده مورد استفاده قرار گرفته است درصورتی که طول توالی این سه آنتیژن در این مطالعه به ترتیب با ۱۲۷، ۳۱۰ و ۸۸ باقیمانده می‌باشد، ترتیب قرار گیری آنتیژن‌ها در ساختار سازه کایمر EspA-Intimin-Go و همکاران به صورت Stx2B است درصورتی که بر اساس اطلاعات حاصل از ارزیابی نیمه عمر پروتئین نوترکیب در سلول باکتری و همچنین ضریب ناپایداری، ترادف EspA-Stx2B-Intimin به ترتیب دارای بالاترین نیمه عمر و کمترین ضریب ناپایداری بود. همچنین نوع رابط پیتیدی مورد استفاده برای جداسازی زیرواحدها در سازه کایمر با هم متفاوت است. Go و همکارانش از توالی‌های پیتیدی GSGGSG و Intimin و EspA و YAPQDP (متشکل از ۲ سرین و ۴ گلایسین) با ساختاری انعطاف‌پذیر بین Intimin و Stx2B استفاده نمودند درصورتی که در این پژوهش از رابط پیتیدی EAAAK (متشکل از یک اسید‌آمینه گلوتamat، سه اسید‌آمینه آلانین و یک اسید‌آمینه لایزین) با سه تکرار در بین هر سه زیرواحد استفاده شد. به سبب ماهیت ساختاری این رابط پیتیدی (مارپیچ آلفا) و تکرارهای متوالی آن در بین زیرواحدهای موجود در کایمر جداسازی فضایی کامل هر سه زیرواحد در ساختار سازه دور از انتظار نمی‌باشد^(۲۸). نظر به اینکه هدف از قرار دادن رابط پیتیدی بین زیرواحدهای آنتیژن کایمر در معرض قرار گیری همه زیرواحدها در سیستم ایمنی حیوان ایمن شونده می‌باشد، لذا به نظر می‌رسد که نوع سخت (Rigid) آن انتخاب منطقی‌تری باشد. درنهایت با انجام تمام مطالعات اشاره شده در بالا و بررسی‌های متعدد ترتیب EspA-Stx2B-Intimin برای سازه کایمر مدنظر قرار گرفت و عنوان اختصاری ESI برای آن انتخاب گردید. باکتری *E.coli* یکی از اولین و وسیع‌ترین میزبان‌هایی است که برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود.

Reference

1. Nazarian S, Amani J. Pathogenesis and Vaccines against Enterotoxigenic Escherichia Coli. Journal of Babol University of Medical Sciences (JBUMS) 2017;19:13-21. [In Persian]
2. Cramer JP. Enterohemorrahagic *Escherichia coli* (EHEC): Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). Emerg Infect Dis 2014;2014: 213-27.
3. Larrie-Bagha SM, Rasooli I, Mousavi-Gargari SL, Rasooli Z, Nazarian S. Passive immunization by recombinant ferric enterobactin protein (FepA) from *Escherichia coli* O157. Iran J Microbiol 2013;5:113-19.
4. Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, toxigenic *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhimurium* by multiplex PCR. Arch Clin Infect Dis 2009;4:97-103.
5. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Medical Microbiology. Jawetz, Melnick and Adelbergs. 25th ed. McGraw-Hill Companies, 2010; 213-19.
6. Hunt JM. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Clin Lab Med 2010;30:21-45.
7. Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of *Escherichia coli* O157: H7. Vaccine 2010;28:6923-9.
8. Gyles C. Shiga toxin-producing An overview. J Animal Sci 2007;85:45-62.
9. Saberi F, Salmanian AH, Amani J, Jafari M. Production of Chimeric Tir-intimin Protein from *E. coli* O157:H7 in the Tobacco (*Nicotiana tobacum*) Plant and its Immunological Evaluation in an Animal Model. Modares J Med Sci Pathol 2012;15:23-36. [In Persian]
10. Baranvand M, Honari H. Nasal immunogenicity induced by STxB and STxB-IpaD antigens in laboratory rats. Koomesh 2015;16:397 – 403. [In Persian]
11. Garcia-Angulo VA, Kalita A, Torres AG. Advances in the development of enterohemorrahic *Escherichia coli* vaccines using murine models of infection. Vaccine 2013;31:3229-35.
12. Garg VK, Avashthi H, Tiwari A, Pramod PAJ. MFPII-Multi FASTA ProtParam Interface. Bioinformation 2016;12:74-7.
13. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res 2003;31:3406-15.
14. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic Acids Res 2007;35:407-10.
15. Ansari HR, Raghava GP. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. Immunome Res 2010;6:6.
16. Nicola C, Preston A. *E. coli* plasmid vectors. 1th ed. Humana Press, 2003;316.
17. Sweet CR. Expression of recombinant proteins from lac promoters. Methods Mol Biol 2003;235:277-88.
18. Carr DW, Scott JD. Blotting and band-shifting: techniques for studying protein-protein interactions. Trends Biochem Sci 1992;17:246-9.
19. Bagheri S, Mousavi Gargari SL, Rasooli I, Nazarian S, Alerasol M. A CssA, CssB and LTB chimeric protein induces protection against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Braz J Infect Dis 2014;18:308-14.
20. Bakhshi, M., et al., Cloning and Recombinant Expression of EspA as a Virulence Factor of *E. coli* O157:H7. J Mazandaran Univ Med Sci 2014;24:12-20. [In Persian]
21. Cook SR, Bach SJ, Stevenson SML, DeVinney R, Frohlich AA, Fang L, et al. Orally administered anti-*Escherichia coli* O157: H7 chicken egg yolk antibodies reduce fecal shedding of the pathogen by ruminants. Can J Anim Sci 2005;85: 291-9.

22. Ebrahimi F, Rasaee MJ, Mousavi SL, Babaeipour V. Production and characterization of a recombinant chimeric antigen consisting botulinum neurotoxin serotypes A, B and E binding subdomains. *J Toxicol Sci* 2010;35:9-19.
23. Frankel G, Candy D, Everest P, Dougan G. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect Immun* 1994;62:1835-42.
24. Kuhne SA, Hawes WS, La Ragione RM, Woodward MJ, Whitelam GC, Gough KC. Isolation of recombinant antibodies against EspA and intimin of *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol* 2004;42:2966-76.
25. Zhang X, Yu Z, Zhang S, He K. Immunization with H7-HCP-tir-intimin significantly reduces colonization and shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in goats. *PloS One* 2014;9:e91632.
26. Gu J, Liu Y, Yu S, Wang H, Wang Q, Yi Y, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* trivalent recombinant vaccine containing EspA, intimin and Stx2 induces strong humoral immune response and confers protection in mice. *Microbes Infect* 2009;11:835-41.
27. Cheng Y, Feng Y, Luo P, Gu J, Yu S, Zhang WJ, et al. Fusion expression and immunogenicity of EHEC EspA-Stx2Al protein: implications for the vaccine development. *J Microbiol* 2009;47:498-505.
28. Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:1357-69.