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

Taheri M., BS[1], Nazarian SH., PhD[2], Ebrahimi F., PhD[3], Bakhshi M., PhD[4], Fathi J., BS[5]

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 immunogenecity 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و دوم / بهمن و اسفند ۱۳۹۶/۶۲-۴۹

ارزیابی ایمنی زائی پروتئین کایمر نوترکیب در بردارنده EspA -Stx2b –Intimin علیه باکتری *E.coli* O157 H7

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 (مولف مسوول)، تلفن ثابت:۷۷۱۰۴۹۳۴-۰۲۱، nazarian56@gmail.com

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

۴. دکتری تخصصی نانوبیوتکنولوژی، 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 گسترده ای از عفونت ها مانند اسهال، کولیت هموراژی و سندرم همولیتیک اورمیک می شود. با توجه به خطرات ناشی از درمان آنتی بیوتیکی در عفونت *E.coli* O157: H7 ، واکسن ها روشی امید بخش برای پیشگیری از عفونت را ارائه می کنند. پروتئین های کایمر نوترکیب دربردارنده چندین ایمونوژن می توانند ایجاد ایمنی علیه عفونت های باکتریایی را القاء کنند. هدف از این مطالعه بررسی ایمنی زایی آنتی ژن کایمر سه ظرفیتی EspA -Stx2b –Intimin علیه باکتری *E.coli* O157 H7 بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی، پروتئین کایمر نوترکیب تحت تاثیر IPTG در *E.coli* BL21 DE3 بیان شد. بیان پروتئین توسط SDS- PAGE و وسترن بلات ارزیابی شد. پروتئین نوترکیب با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTAتخلیص گردید. ایمنی زایی در موش ها با پروتئین خالص انجام و تیتر آنتی بادی توسط ELISA تعیین شد. بعد از ایمنی زایی، موشها با باکتری آلوده ، ریزش باکتری و مرگ و میر حیوان ها بررسی گردید. بررسی آماری با آزمون های دانکن و T-test با نرم افزار SPSS انجام شد.

یافته ها: پروتئین در میزبان *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 وStx2b را القاء کرد. ریزش باکتری در موش های ایمن تا $۱۰^{۲}$ cfu/ml و مرگ و میر نیز تا ۶۰ درصد کاهش یافت.

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

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

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]

مقدمه

عفونت‌های دستگاه گوارش و اسهال از مهمترین علل مرگ‌ومیر و ناتوانی به خصوص در کودکان زیر پنج سال می‌باشد. سه شاخصه بیماری‌زایی اصلی که پاتوژن‌های مسبب بیماری‌های روده‌ای از طریق آن عمل می‌کنند عبارت‌اند از: اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده، حمله به سلول‌های اپیتلیال و اپیتلیوم، تولید توکسین ها که ممکن است برای سلول‌ها کشنده باشد و یا منجر به از دست رفتن آب شوند(۲و۱). باکتری *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 میکروارگانیسمی است که از طریق فرآورده های غذایی و آب آلوده به انسان منتقل می شود و پس از لانه گزینی در روده منجر به آسیب های شدیدی همچون کولیت خونریزی دهنده (Hemorrhagic Colitis) و سندرم ادراری خونریزی دهنده (Hemolytic Uremic Syndrome) می شود(۴و۳). لانه گزینی این باکتری در لوله گوارش به واسطه عوامل و فاکتور هایی است که تحت کنترل جزایر بیماری زایی می باشد. این جزایر ژنتیکی شامل عوامل بیماری زایی از قبیل ژن های تهاجم، اتصال و سیستم ترشحی می باشد. سیستم ترشحی در ترشح پروتئین های مختلف از جمله EspD، EspB، EspA و Tir نقش دارد(۵). EspA توسط ژن *espA* کد می شود و روی سطح باکتری ساختاری فیلامنی برای تزریق Tir، EspD و EspB تشکیل می دهد. چسبندگی اولیه باکتری به سلول های اپی تلیال توسط پیلی تشکیل دهنده دسته (Bundle forming pilus) انجام می شود. سپس پروتئین EspA با شکل دادن یک کانال شرایط را برای انتقال سایر فاکتورهای دخیل در لانه گزینی باکتری فراهم می کند(۶). ژن *eae* کد کننده پروتئین غشایی Intimin می باشد که جهت اتصال باکتری به سلول میزبان ضروری است. متعاقب اتصال Intimin به Tir ، باکتری EHEC به سطح سلول روده ای متصل و موجب بازآرایی اسکلت سلولی اکتین در آن ناحیه می گردد. تحقیقات نشان داده که Intimin نقش کلیدی و مهمی در اتصال باکتری 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 شیگا از اهمیت بالینی ویژه‌ای برخوردار است. توکسین شبه شیگلا (Stx) پروتئین هگزامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ کیلو دالتون بوده و از یک زیرواحد سمی و آنزیمی به نام StxA و پنج زیرواحد 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 می گیرد، 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 زائی پروتئین دوگانه EspA-Intimin را بررسی و نشان دادند که آنتی بادی تولید شده علیه این دوگانه پروتئین نوترکیب می تواند 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 می شود(۱۰). با پیشرفت‌های ایجاد شده در روش‌های مهندسی ژنتیک امکان طراحی و ساخت ژنهای کایمر دربردارنده چند ایمنوژن فراهم شده است. از محاسن استفاده از پروتئین‌های کایمر نوترکیب می توان به کاهش هزینه تولید آنتی‌ژن ها و سهولت نگهداری یک پروتئین چندگانه در مقایسه با چند پروتئین نوترکیب مجزا که هر یک شرایط نگهداری خاصی را می طلبند، اشاره کرد. استفاده از ادجوانت های پروتئین در ساختار پروتئین کایمر نیز می تواندپاسخ های ایمنی علیه ایمنوژنها را تقویت کند.

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]

روش بررسی

طراحی بیوانفورماتیکی کاست ژنی:

توالی نوکلئوتید و آمینواسیدی پروتئین‌های Intimin، Stx2B و EspA از باکتری *شریشیا 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(۱۱). 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(۱۲). پیش‌بینی ساختار ثانویه mRNA و پارامترهای مختلف ژن کایمر از طریق نرم‌افزار تحت شبکه Mfold انجام شد(۱۳). ساختار سوم پروتئین کایمر با استفاده از نرم‌افزار تحت شبکه I-TASSER پیش بینی گردید. برای بررسی کیفیت ساختار از نرم‌افزار ProS A استفاده شد.(۱۴) پیش بینی اپی توپ های توالی مورد نظر با استفاده از نرم افزار BCPreds analysis tool صورت پذیرفت(۱۵).

آماده سازی کاست ژنی و انتقال به میزبان *E.coli*:

ترادف مورد نظر برای ساخت به شرکت shingene (چین) سفارش داده و ژن کایمر *ese* در pET28a سنتز شد. پلاسمید حاوی ژن *ese* با روش شوک حرارتی به سلولهای مستعد *E.coli* BL21(DE3) منتقل گردید. سلول های میزبان تراریخت شده بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۸۰ µg/ml) کشت داده و به صورت شبانه در دمای ۳۷درجه سانتی گراد گرماگذاری شد (۱۶).

بیان پروتئین نوترکیب ESI در باکتری *E. coli*:

۵۰ میکرولیتر از هر یک از محیط‌های کشت حاوی باکتری تراریخت شده با پلاسمید نوترکیب در ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع جدید دارای ۲۰µg/ml آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح و تا رسیدن باکتری‌ها با مرحله رشد لگاریتمی (جذب نوری ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) درون شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به هر یک از نمونه‌ها به استثنای نمونه شاهد، القا گر IPTG با غلظت نهایی یک میلی‌مولار اضافه و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه گرما گذاری شد. رسوب سلولی مربوط به ۱/۵ میلی-لیتر از هرکدام از نمونه های تست و شاهد جمع آوری و در ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده یکنواخت گردید. دیواره سلولی از طریق سونیکاسیون (قدرت ۷۵ درصد در ۴ سیکل: ۱۰ ثانیه سونیکاسیون و ۱۵ ثانیه در یخ) شکسته و پس از سانتریفیوژ محلول رویی جداسازی شد. برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب از ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد استفاده شد(۱۷).

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 ۲۰ میلی لیتر کشت باکتری، ۵ میلی‌لیتر بافر B ($Tris\text{-}HCl$،NaH_2PO_4 ؛ اوره با pH ۸) اضافه و همگن گردید. نمونه‌ها با شرایط قدرت ۷۰ درصد و پالس ۰/۷۵ به تعداد ۶ مرتبه سونیکه شده و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از سانتریفوژ محلول رویی حاوی پروتئین نوترکیب جدا و از رزین گروماتوگرافی گذرانده شد. در هر مرحله خروجی ستون جداگانه جمع‌آوری و نگهداری گردید. بافرهای شستشوی C ($Tris\text{-}HCl$،NaH_2PO_4 ؛ اوره با pH ۶/۳)، D (pH ۵/۹ ؛ $Tris\text{-}HCl$،NaH_2PO_4)، بافر استخراج ($Tris\text{-}HCl$،NaH_2PO_4 ؛ اوره با ۵/۴

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]

pH) E و بافر MES از ستون عبور داده شد. برای بررسی روند تخلیص پروتئین از ژل SDS-PAGE ۱۲درصداستفاده شد.

تایید پروتئین نوترکیب:

برای تایید پروتئین نوترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی بادی ضد His-tag استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال(گلایسین ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و pH: ۸/۳) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (NaCl ۳۷ میلی مولار، KCl ۲/۷ میلی مولار، $Na_2HPO_4.7H_2O$ ۴/۳ میلی مولار، توبین۲۰ درصد وpH: ۷/۲) حاوی ۵ 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 ۱/۱۰۰۰۰ آنتی بادی ضد(His-tag(ebcam کانژوگه دار در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت پس از سه بار شستشو با بافر PBST، برای آشکارسازی از سوبسترا(بافر تریس ۵۰mM و pH:۷/۸ حاوی DAB ۶ mg، H_2O_2 ۱۰ µl) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین آنزیم کانژوگه و سوبسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیترو سلولزی، واکنش با استفاده از آب مقطر متوقف گردید(۱۸).

ایمنی زایی موش های آزمایشگاهی:

در این آزمایش از موش سوری که هیچ دارو یا واکسنی دریافت نکرده بودند، استفاده شد. موش ها 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 داشتند. به منظور بررسی پاسخ ایمنی از۴۰ 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 نمونه ها برای تزریق، هم حجم آن ادجوانت روغن 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 ژن مورد نظر بود به صورت زیر جلدی و یا داخل صفاقی تزریق شد. یک هفته پس از تزریقات دوم، سوم، چهارم از موش ها خون گیری و سرم ها 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 چاهک های الایزا تثبیت شد. شستشو با بافر PBS واجد توبین (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. سرم ها از رقت ۱:۲۰۰ تا ۱:۲۵۶۰۰ در PBST رقیق و به چاهک ها اضافه و میکروپلیت به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در مرحله بعد، رقت (۱:۲۰۰۰) از آنتی بادی گونژوگه موشی در PBST تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. پس از گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت نیم ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا (۲ میلی گرم OPD (o-Phenylenediamine Dihydrochloride 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 مولار متوقف و جذب در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد (۱۹).

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

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]

تحقیقات زیست شناسی دانشگاه امام حسین(ع) همسانه سازی و بیان شده بود به طور جداگانه تثبیت 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:

دوهفته 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 $۱۰^{۹}$ 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 میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB به هر میکروتیوب اضافه شد و این تیوب‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از اتمام زمان گرماگذاری، رقت‌های متوالی از مایع رویی تهیه شد و بر روی محیط کشت اختصاصی سوربیتول مکانکی آگار (محتوی ۲/۵mg/ml تلوریت پتاسیم و ۰/۰۵mg/ml سفکسیم) کشت داده و پلیت ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری و کلنی‌های سفیدرنگ باکتری شمارش شد (۲۱).

بررسی زنده مانی موش های ایمن شده:

۱۴ روز پس از آخرین مرحله ایمن سازی، موش های ایمن به سه گروه تقسیم شده و به هر گروه به ترتیب MLD 10، 50 MLDو 100 MLD از باکتری به صورت درون صفاقی تزریق شد. چنین روشی نیز برای موش های کنترل انجام شد. در طی مدت ده روز زنده ماندن موشها بررسی گردید.

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 به‌کارگیری نرم‌افزارهای تحت شبکه ProtParam و Genscript اطلاعات بیوشیمیایی مربوط به کایمر همان‌طور که در جدول ۱ بیان شده است استخراج گردید تا مبنایی برای ورود به بخش تجربی و انجام آزمایش‌های 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 کدکننده آن نیز توسط نرم‌افزار Mfold پیش‌بینی شد و بر اساس مدل ارائه شده توسط نرم‌افزار مشخص گردید که ΔG ساختار پس از بهینه‌سازی کدون‌ها در حد مطلوبی است (۴۱۸-) و کدون آغاز در بخش ساقه و در مجاورت حلقه ساختار تاخورده واقع شده است.

ایمنی هومورال به‌واسطه B-cell می‌تواند از یک آنتی‌ژن مناسب کاندید واکسن حاصل شود. اپی‌توپ‌ها بر مبنای معیارهای ذکرشده در نرم‌افزار تحت شبکه BCPred بررسی شدند که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. همانطور که مشاهده می شود اپی توپ ها در تمام طول پروتئین کایمر پراکنده هستند. از این رو می توان انتظار

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]

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

جدول ۱: اطلاعات بیوشیمیایی مستخرج از توالی آمینواسیدی و نوکلئوتیدی آنتی‌ژن 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 کدونی	۰/۶۸	۰/۸۲
درصد GC	۴۱/۶۷	۴۷/۷۹
تعداد عناصر CIS منفی	۶	۱
pH ایزوالکتریک نظری	۸/۶۵	۸/۶۵
نیمه‌عمر در باکتری	بیش از ۱۰ ساعت	بیش از ۱۰ ساعت
شاخص ناپایداری	۲۷	۲۷

جدول ۲: پیش‌بینی اپی‌توپ‌های B-cell خطی.

موقعیت آمینو اسیدی	امتیاز	اپی توپ
۵۳۴	۰/۹۹۹	LITQNPLPGVNVNTPNVYAV
۳۲۸	۰/۹۹۷	NGKSQTQATTGNDGRATITL
۳۰۷	۰/۹۶۸	MKNGQPVNNQSVTFSTNFGM
۵۱۲	۰/۹۶۴	SITAWIKQTSSEQRSGVSST
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	LNGKGSVVIKATSGDKQTVS
۱۸۲	۰/۷۸۷	VKVAGKEYWTSRWNLQPLLQ

بیان پروتئین نوترکیب :

با توجه به اینکه در طراحی کاست ژنی جایگاه‌های برشی *Eco*RI و *Hin*dIII در پایانه‌های ´۵ و ´۳ آن تعبیه شده بود، لذا از همین آنزیم‌ها نیز برای تائید وجود ژن در 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]

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

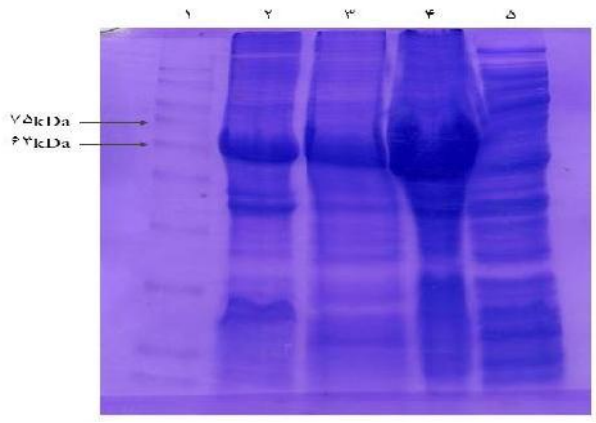
فرآیند القاء بیان پروتئین نوترکیب کایمر ESI صورت پذیرفت و نمونه‌ها پس از آماده‌سازی، بر روی ژل آکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند و با رنگ‌آمیزی ژل باند بیانی متعلق به پروتئین کایمر با وزن ۶۳ کیلو دالتون در نمونه‌های القاء شده در قیاس با نمونه‌های کنترل (القاء نشده) نمایان گشت (شکل ۱). پس از اسکن نمودن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

تخلیص پروتئین نوترکیب به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی:

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

تائید پروتئین نوترکیب ESI به روش وسترن بلات:

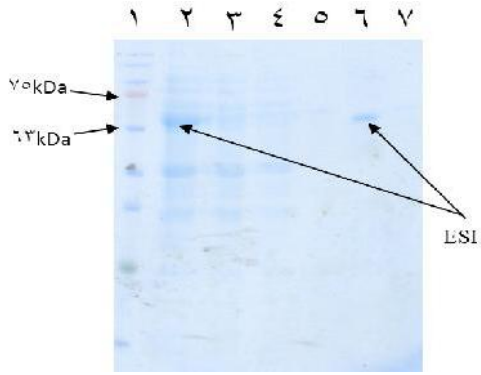
با در نظر گرفتن این موضوع که کایمر ESI حاوی یک دنباله هیستیدینی در انتهای آمین بود، لذا برای انجام فرآیند لکه‌گذاری وسترن از آنتی‌بادی ضد دنباله هیستیدینی کونژوگه به HRP برای تائید آن استفاده شد. پس از انجام این آزمون، رنگ‌پذیری کاغذ نیتروسلولز در مقابل باند ۶۳ کیلو دالتونی نشانگر ملکولی پروتئین دیده شد (شکل ۳).



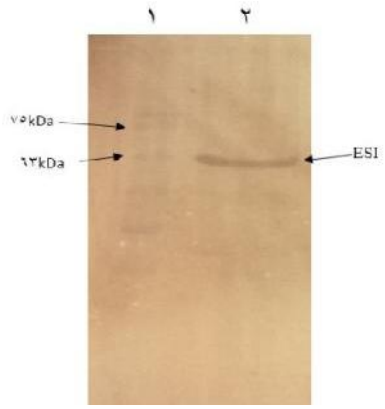
شکل(۱): بررسی بیان کاست ژنی *eae*-pET28a(+) روی ژل SDS-PAGE، ردیف ۱– نشانگر ملکولی پروتئین(Cat. No. (PR911654، ردیف ۲، ۳و ۴– نمونه القا شده با IPTG، ردیف ۵–نمونه القا نشده

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]



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 C. ردیف ۵– نمونه مربوط به شستشوی ستون با بافر D. ردیف ۶– نمونه مربوط به شستشوی ستون با بافر E. ردیف ۷– نمونه مربوط به شستشوی ستون با بافر MES.



شکل۳: الگوی آنالیز وسترن بلات تائید آنتی‌ژن کایمر ESI. ردیف ۱: نشانگر ملکولی پروتئین. ردیف ۲: باند متعلق به آنتی‌ژن ESI حاوی دنباله هیستیدین در انتهای آمین. باند رنگ گرفته در ردیف ۲ متناظر با باند محدوده ۶۳kDa نشانگر ملکولی پروتئین می‌باشد.

بررسی تیتر آنتی‌بادی سرم موش‌های ایمن شده با پروتئین کایمر:

حساسیت آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده علیه آنتی‌ژن کایمرESI از طریق الیزا بررسی شد. همانطور که در نمودار ۱ دیده می شود تجویز درون صفاقی و زیر پوستی پروتئین کایمر منجر به تحریک سستم ایمنی و تولید آنتی سرم شد. هرچند تیتر آنتی بادی روش تجویز درون صفاقی کمتر از تجویز زیر پوستی بود با این حال این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار نبود($p>۰/۰۵$) .

تیتر آنتی بادی علیه پروتئین کایمر پس از هر بار تزریق افزایش داشت. افزایش تیتر آنتی بادی در تزریق چهارم نسبت به تزریق سوم به لحاظ آماری معنی دار نبود ($p>۰/۰۵$).

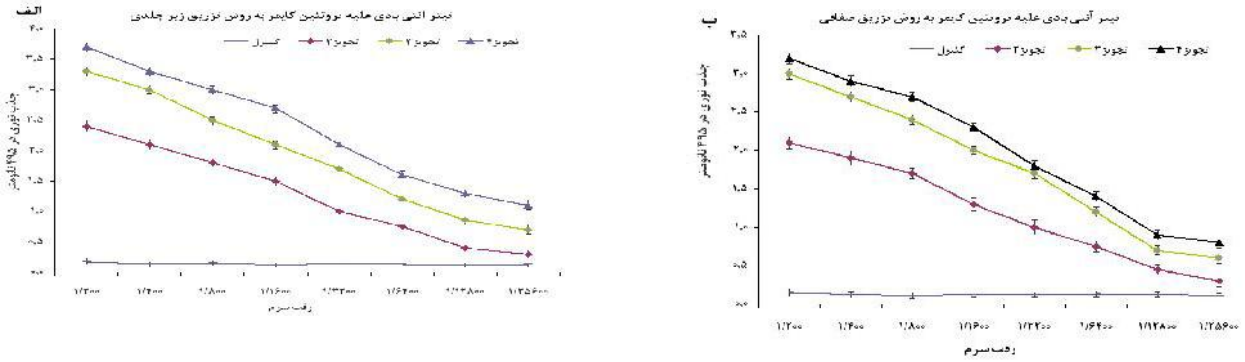
بررسی تیتر آنتی بادی علیه اجزا تشکیل دهنده پروتئین کایمر :

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

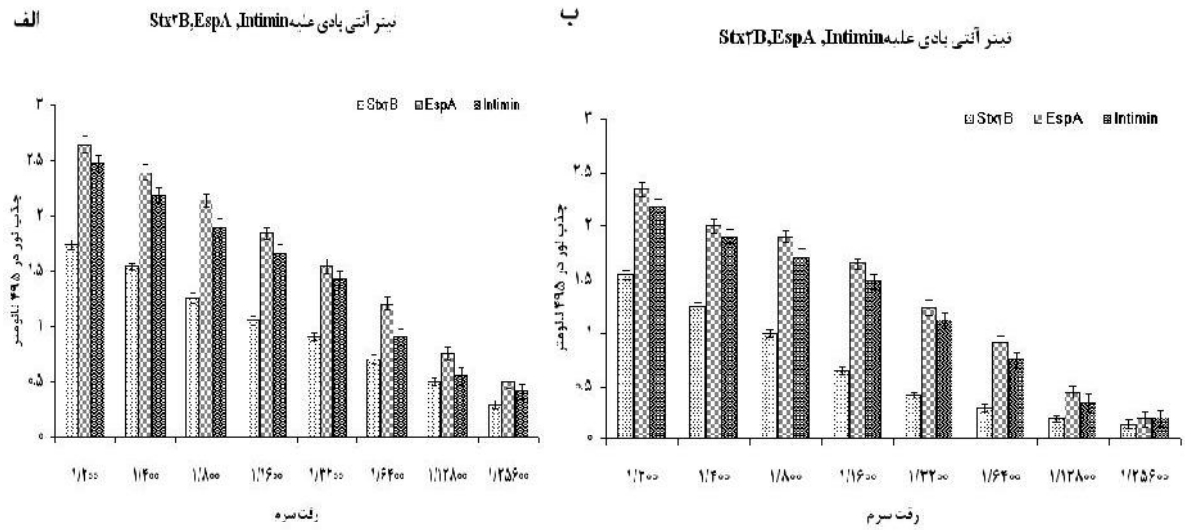
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]

همانطور که در نمودار ۲ دیده می شود آنتی بادی علیه هر سه جز پروتئین تولید شده است. تیتر آنتی بادی علیه Stx2B کمتر از تیتر آنتی بادی علیه پروتئین های Intimin و EspA بود که این تفاوت معنی دار بود($p<۰/۰۵$). تیتر آنتی بادی علیه EspA بالاتر از Intimin بود که از لحاظ آماری این تفاوت معنی دار نبود($p>۰/۰۵$). تفاوت تیتر آنتی بادی علیه هر کدام از پروتئین های نوترکیب Intimin، Stx2B و EspA در روش زیر پوستی و درون صفاقی تفاوت معنی داری را نشان نداد($p>۰/۰۵$).



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



نمودار۲: 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)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

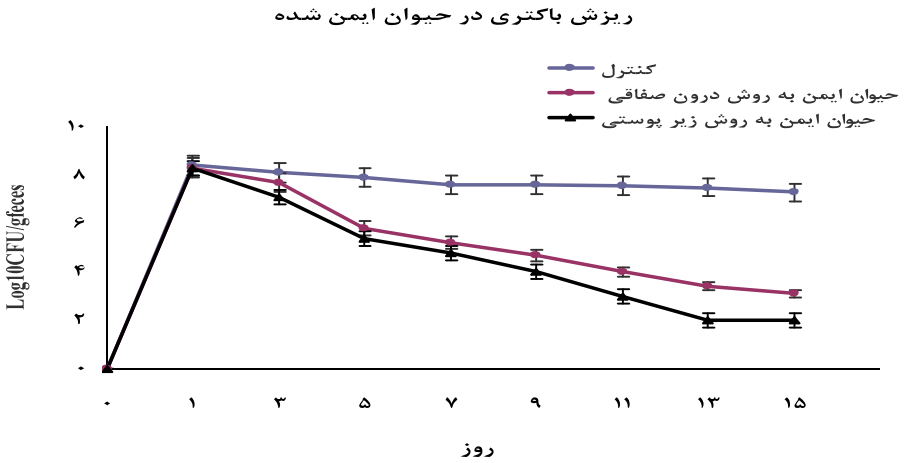
[DOI: 10.22102.22/6.49]

چالش موشهای ایمن با باکتری زنده *E.coli* O157:H7:

به منظور بررسی ریزش باکتری در هر گروه ۵ موش به عنوان تست و ۵ موش به عنوان کنترل استفاده شد که به گروه تست 10^9 cfu/ml باکتری بیماریزای *E.coil* O157:H7بصورت خوراکی تلقیح شد و به مدت ۱۵ 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 ۳ دیده می شود میزان دفع باکتری در حیوان کنترل پس از گذشت ۱۵ روز در حدود 10^8 cfu/ml ثابت ماند. این در حالی است که میزان دفع باکتری در موش های ایمن شده به روش زیر پوستی سیر نزولی داشته و در پایان روز ۱۵، به حدود 10^2 cfu/ml کاهش یافته است. این در حالی است که در پایان روز ۱۵، میزان دفع باکتری از موش های ایمن شده به روش صفاقی، حدود 10^3 cfu/ml بود. تفاوت ریزش باکتری در موش های کنترل با موش های ایمن شده به روش زیر پوستی و درون صفاقی از لحاظ آماری معنی دار بود($p<0/05$).

بررسی زنده ماندن موش‌های ایمن شده:

با توجه به اینکه در بررسی میزان ریزش باکتری، موش های 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 MLD ۱۰ از باکتری، در طی مدت ۹ 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 MLD۵۰ از باکتری، در طی مدت ۶ روز مردند. این در حالی بود که ۸۰ درصد موش‌های ایمن این دوز را تحمل کرده و زنده ماندند. موش‌های کنترل که ایمن نشده بودند بعد از دریافت MLD ۱۰۰ از باکتری، در طی مدت ۵ روز مردند. در چنین شرایطی ۴۰ درصد موش‌های ایمن این دوز را تحمل کرده و زنده ماندند.



نمودار۳: بررسی ریزش باکتری در موش های ایمن شده به روش درون صفاقی ،زیر پوستی و موش های غیر ایمن پس از چالش با 10^9 باکتری *E.coli* O157:H7 .پس از چالش موشهای غیر ایمن، آلودگی را به صورت تقریبا پایدار نشان داده در حالیکه آلودگی در موشهای ایمن شده پس ازیک هفته به صورت قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]

بحث

با توجه به سازوکار بیماری‌زایی *E.coli* O157:H7 نقش اساسی پروتئین‌های EspA و Intimin در آغاز فرآیند لانه گزینی باکتری کاملاً آشکار می‌گردد. از طرفی قابلیت ترشح توکسین شبه شیگا توسط این بیماری زای ناتوان کنند،منجر به این شده که مقابله با باکتری و فاکتورهای ناتوان‌کننده آن به لحاظ بالینی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد. مؤثرترین روش مقابله با این‌گونه عوامل باکتریایی، پیشگیری از بروز بیماری است بنابراین با مقابله با عملکرد پروتئین‌های آغازگر لانه گزینی این باکتری در روده می‌توان تا مقدار زیادی از قابلیت باکتری برای بیماری‌زایی جلوگیری نمود. پروتئین‌های 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 بیماری‌های HC و HUS را ایجاد می کند. لذا بخشی از این توکسین نیز که در ورود بخش فعال توکسین به سلول‌های هدف نقش دارد و نه در سمیت آن می‌تواند کاندید مناسب دیگری برای مقابله با این بیماری زا باشد. بر این اساس در تحقیق حاظر فاکتور های بیماری زای EspA، Intimin و Stx2B جهت ایجاد ایمنی علیه 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 هدف‌گذاری شده برای مقابله با بیماری زا *E.coli* O157:H7 را به‌صورت 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 خنثی نمودن توکسین آن را به‌صورت یکجا در اختیار داشت. برای دستیابی به اهداف فوق راهبرد طراحی و ساخت یک ایمونوژن کایمر متشکل از آنتی‌ژن‌های EspA، Intimin و Stx2B مدنظر قرار گرفت. ایمونوژن های کایمر، پروتئین‌های چند ظرفیتی هستند که از چند اپی‌توپ مؤثر، از یک آنتی‌ژن یا از چند آنتی‌ژن مختلف تشکیل می‌شوند. همچنین، این نوع پروتئین ها می‌توانند از امتزاج چند آنتی‌ژن، از چند گونه، جنس، تیپ و یا سروتیپ مختلف تشکیل شوند(۲۲). در این پژوهش توالی‌های نوکلئوتیدی دقیق کدکننده پروتئین‌های EspA، Intimin و زیرواحد B توکسین شبه شیگای ۲ از ژنوم باکتری *E.coli* O157:H7 استخراج شد. با بررسی منابع مشخص گردید که فقط بخش انتهای کربوکسیل پروتئین Intimin در برهم کنش 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 اسیدآمینه ابتدایی آن صرف نظر شد اما توالی کامل Stx2B در طراحی سازه کایمر 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 بیماری‌زای آن پرداختند. ازجمله این موارد می‌توان به پروتئین‌های *Stx2A*، *Stx1B* و *Stx2B* پروتئین‌های سیستم ترشحی نوع ۳، Intimin، $EspA_{c120}$، Tir، ferric enterobactin protein (*FepA*) اشاره نمود(۱۱). در اکثرا مطالعات انجام شده مشخص شد که آنتی‌ژن‌های EspA، Intimin و Stx2B نقش مهمی را در طراحی یک کاندید واکسن مناسب ایفا می‌کنند. مطالعات مختلفی در زمینه طراحی سازه‌های کایمر انجام شده است که ازجمله این سازه‌ها می‌توان به آنتی‌ژن کایمر Tir-intimin (۹)، H7-HCP-Tir-Intimin (۲۵)، EspA-Intimin-Stx (۲۶)، EspA-Stx2A1 (۲۷) اشاره نمود. اگرچه آنتی‌ژن‌های مورد استفاده در کایمر طراحی‌شده توسط Go و همکاران (۲۰۰۹) با آنتی‌ژن‌های این پژوهش مشترک هستند (۲۶) اما تفاوت‌های ساختاری

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]

اساسی بین آن‌ها وجود دارد که عبارت‌اند از: آنتی‌ژن‌های EspA و Intimin و Stx2B در پژوهش Go و همکاران به ترتیب با ۱۹۲، ۳۰۰ و ۱۱۶ باقیمانده مورد استفاده قرارگرفته است درصورتی‌که طول توالی این سه آنتی‌ژن در این مطالعه به ترتیب ۱۲۷، ۳۱۰ و ۸۸ باقیمانده می‌باشد، ترتیب قرارگیری آنتی‌ژن‌ها در ساختار سازه کایمر در پژوهش Go و همکاران به‌صورت EspA-Intimin-Stx2B است درصورتی‌که 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 نیمه‌عمر و کمترین ضریب ناپایداری بود. همچنین نوع رابط پپتیدی مورد استفاده برای جداسازی زیرواحدها در سازه کایمر با هم متفاوت است. Go و همکارانش از توالی‌های پپتیدی YAPQDP بین EspA و Intimin و GSGGSG (متشکل از ۲ سرین و ۴ گلایسین) با ساختاری انعطاف‌پذیر بین Intimin و Stx2B استفاده نمودند درصورتی‌که در این پژوهش از رابط پپتیدی EAAAK (متشکل از یک اسیدآمینه گلوتامات، سه اسیدآمینه آلانین و یک اسیدآمینه لایزین) با سه تکرار در بین هر سه زیرواحد استفاده شد. به سبب ماهیت ساختاری این رابط پپتیدی (مارپیچ آلفا) و تکرارهای متوالی آن در بین زیرواحدهای موجود در کایمر جداسازی فضایی کامل هر سه زیرواحد در ساختار سازه دور از انتظار نمی باشد (۲۸). نظر به اینکه هدف از قرار دادن رابط پپتیدی بین زیرواحدهای آنتی‌ژن کایمر در معرض قرارگیری 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 اشاره‌شده 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. از مزایای این سیستم بیانی می توان 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 اندوتوکسین 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 موش ها با پروتئین کایمر مقدار 10^{10} cfu از طریق دهانی به موش تزریق شد، بعد از گذشت دو هفته میزان ریزش باکتری از موش های ایمن شد به 10^{3} cfu کاهش یافت(۹). امانی و همکاران با طراحی پروتئین کایمری متشکل از سه پروتئین EspA Intimi و Tir ایمنی زایی این کایمر را در موش بررسی کردند. در پژوهش امانی بعد از ایمن سازی موش ها 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 اگر چه میزان ریزش باکتری به صفر رسید و نتیجه قابل قبولی 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 موش ها در برابر چالش با *E. coli* O157: H7 می شود. از پروتئین کایمر نوترکیب می توان در ایجاد ایمنی فعال و غیر فعال در برابر باکتری *E.coli* O157: H7 استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مرکز تحقیقات زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین(ع) سپاسگزاری و قدردانی به عمل می آید.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]

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 *Salmone*lla 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 tobbacum) 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 enterohemorrhagic *Escherichia coli* vaccines using murine models of infection. Vaccine 2013;31:3229-35.
12. Garg VK, Avashthi H, Tiwari A, Pramod PAJ. MFPPI–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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]

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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.22102.22/6.49]