

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 immunogenicity 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 10² 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 نو ترکیب 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 (مؤلف مسوول)، تلفن ثابت: ۰۲۱-۷۷۱۰۴۹۳۴

nazarian56@gmail.com

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

۴. دکتری تخصصی نانو بیوتکنولوژی، 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/شرشیا 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 نو ترکیب در بردارنده 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 نو ترکیب تحت تاثیر IPTG در *E. coli* BL21 DE3 بیان شد. بیان پروتئین توسط SDS-PAGE و وسترن بلات ارزیابی شد. پروتئین نو ترکیب با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA تخلیص گردید. ایمنی زایی در موش ها با پروتئین خالص انجام و تیتراژ آنتی بادی توسط ELISA تعیین شد. بعد از ایمنی زایی، موش ها 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 نو ترکیب 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، Stx2b و Intimin را القاء کرد. ریزش باکتری در موش های ایمن تا 10^2 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/شرشیا کلی؛ اینتیمین؛ شیگا توکسین؛ پروتئین ترشحی اکلا؛ پروتئین کایمر؛ ایمنی زایی

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

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 توکسین‌ها که ممکن است برای سلول‌ها کشنده باشد و یا منجر به از دست رفتن آب شوند (۱ و ۲). باکتری *شریشیا کلی* سویه 0157:H7 میکروارگانیسمی است که از طریق فرآورده‌های غذایی و آب آلوده به انسان منتقل می‌شود و پس از لانه‌گزینی در روده منجر به آسیب‌های شدیدی همچون کولیت خونریزی‌دهنده (Hemorrhagic Colitis) و سندرم ادراری خونریزی‌دهنده (Hemolytic Uremic Syndrome) می‌شود (۳ و ۴). لانه‌گزینی این باکتری در لوله گوارش به واسطه عوامل و فاکتور‌هایی است که تحت کنترل جزایر بیماری‌زایی می‌باشد. این جزایر ژنتیکی شامل عوامل بیماری‌زایی از قبیل ژن‌های ته‌اجم، اتصال و سیستم ترشحی می‌باشد. سیستم ترشحی در ترشح پروتئین‌های مختلف از جمله EspA، EspB، EspD، Tir و نقش دارد (۵). 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 اپی‌تلیال توسط پیل‌ی تشکیل‌دهنده دسته (Bundle forming pilus) انجام می‌شود. سپس پروتئین EspA با شکل دادن یک کانال شرایط را برای انتقال سایر فاکتورهای دخیل در لانه‌گزینی باکتری فراهم می‌کند (۶). ژن *eae* کدکننده پروتئین غشایی Intimin می‌باشد که جهت اتصال باکتری به سلول میزبان ضروری است. متعاقب اتصال Intimin به Tir، باکتری EHEC به سطح سلول روده‌ای متصل و موجب بازآرایی اسکلت سلولی اکتین در آن ناحیه می‌گردد. 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* 0157:H7 به سبب انتقال از طریق آب و غذای آلوده و توانایی در تولید توکسین شبه شیکا از اهمیت بالینی ویژه‌ای برخوردار است. توکسین شبه شیکا (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 بیماری‌زایی 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 زائی پروتئین دوگانه EspA-Intimin را بررسی و نشان دادند که آنتی‌بادی تولید شده علیه این دوگانه پروتئین نو ترکیب می‌تواند عملکرد اتصال باکتری به سلول هدف را تضعیف کند (۹). باران وند و همکاران با بررسی ایمنی زایی پروتئین نو ترکیب StxB شیکا دیسانتری تیپ یک نشان دادند که این پروتئین باعث مقاومت موش در برابر *E. coli* 0157:H7 نیز می‌شود (۱۰). با پیشرفت‌های ایجاد شده در روش‌های مهندسی ژنتیک امکان طراحی و ساخت ژنهای کایمر دربردارنده چند ایمونژن فراهم شده است. از محاسن استفاده از پروتئین‌های کایمر نو ترکیب می‌توان به کاهش هزینه تولید آنتی‌ژن‌ها و سهولت نگهداری یک پروتئین چندگانه در مقایسه با چند پروتئین نو ترکیب مجزا که هر یک شرایط نگهداری خاصی را می‌طلبند، اشاره کرد. استفاده از ادجوانت‌های پروتئین در ساختار پروتئین کایمر نیز می‌تواند پاسخ‌های ایمنی علیه ایمونژنها را تقویت کند.

هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی ایمنی‌زایی پروتئین کایمر سه ظرفیتی در بردارنده زیرواحدهای اتصال و توکسین باکتری *E. coli* 0157:H7 بود.

روش بررسی

طراحی بیوانفورماتیکی کاست ژنی:

توالی نوکلئوتید و آمینواسیدی پروتئین‌های Intimin, Stx2B و EspA از باکتری *شریشیا کلی* انتروهوموراژیک استخراج و بررسی شد. توالی‌ها از پایگاه داده NCBI با فرمت FASTA اقتباس گردید و انتخاب بخشی از این پروتئین‌ها جهت ساخت کایمر سه‌طرفیتی بر اساس منابع و تحلیل نتایج آن منابع انجام گرفت (۱۱). آنالیز هر یک از توالی‌ها به منظور 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 پیش‌بینی گردید. برای بررسی کیفیت ساختار از نرم‌افزار ProS A استفاده شد. (۱۴) پیش‌بینی اپی توپ‌های توالی مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار BCPreds analysis tool صورت پذیرفت (۱۵).

آماده‌سازی 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. سلول‌های میزبان تراریخت شده بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین ($80 \mu\text{g/ml}$) کشت داده و به صورت شبانه در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد (۱۶).

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

50 میکرولیتر از هر یک از محیط‌های کشت حاوی باکتری تراریخت شده با پلاسمید نوترکیب در 5 میلی‌لیتر محیط

LB مایع جدید دارای $20 \mu\text{g/ml}$ آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح و تا رسیدن باکتری‌ها با مرحله رشد لگاریتمی (جذب نوری 0.5 در طول موج 600 نانومتر) درون شیکر انکوباتور با دمای 37°C درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به هر یک از نمونه‌ها به استثنای نمونه شاهد، القاگر IPTG با غلظت نهایی یک میلی‌مولار اضافه و به مدت 5 ساعت در دمای 30°C درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور با سرعت 120 دور در دقیقه گرماگذاری شد. رسوب سلولی مربوط به $1/5$ میلی‌لیتر از هر کدام از نمونه‌های تست و شاهد جمع‌آوری 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 (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 دنا توره برای تخلیص پروتئین نوترکیب استفاده گردید. به رسوب سلولی حاصل از القاء بیان 20 میلی‌لیتر کشت باکتری، 5 میلی‌لیتر بافر B (Tris-HCl , NaH_2PO_4)؛ اوره با $\text{pH } 8$ 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°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ محلول رویی حاوی پروتئین نوترکیب جدا و از رزین گروماتوگرافی گذرانده شد. در هر مرحله خروجی ستون جداگانه جمع‌آوری و نگهداری گردید. بافرهای شستشوی (Tris-HCl , NaH_2PO_4)؛ اوره با $\text{pH } 6.3$ (C، Tris-HCl , NaH_2PO_4)؛ اوره با $\text{pH } 5.9$ (D، بافر استخراج Tris-HCl , NaH_2PO_4)؛ اوره با $\text{pH } 5.4$

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

تایید پروتئین نو ترکیب:

برای تایید پروتئین نو ترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی بادی ضد His-tag استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه گذاری و سترن (Mini Protean) Bio-rad و بافر انتقال (گلاسیفیکاسیون ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و pH: ۸/۳) روی کاغذ نیتروسولوز منتقل شد. کاغذ نیتروسولوز با استفاده از بافر PBST (۳۷ NaCl) میلی مولار، KCl ۲/۷ میلی مولار، $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۴/۳ میلی مولار، توین ۲۰ درصد و pH: 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 (با فر تریس ۵۰ mM و pH: ۷/۸ حاوی ۶ mg DAB، H_2O ۱۰ μl) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین آنزیم کانژوگه و سوبسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیتروسولوزی، واکنش با استفاده از آب مقطر متوقف گردید (۱۸).

ایمنی زایی موش های آزمایشگاهی:

در این آزمایش از موش سوری که هیچ دارو یا واکنشی 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 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 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 تیتراژ آنتی بادی به روش الایزای غیر مستقیم:

به منظور بررسی تیتراژ آنتی بادی از روش الیزا استفاده گردید. ۵ میکروگرم پروتئین نو ترکیب در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ داخل هر یک از چاهک های الیزا تثبیت شد. شستشو با بافر PBS واجد توین (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 o-Phenylenediamine OPD 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 تیتراژ آنتی بادی ضد پروتئین کایمر علیه پروتئین های EspA، Intimin و Stx2B:

جهت تعیین تیتراژ آنتی بادی 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

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 ProtParam و Genscript اطلاعات بیوشیمیایی مربوط به کایمر همان طور که در جدول ۱ بیان شده است استخراج گردید تا مبنایی برای ورود به بخش تجربی و انجام آزمایش های در ارتباط با بیان نو ترکیب، تخلیص و پایدار نمودن پروتئین باشد.

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

ایمنی همورال به واسطه B-cell می تواند از یک آنتی ژن مناسب کاندید واکسن حاصل شود. اپی توپ ها بر مبنای معیارهای ذکر شده در نرم افزار 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

تحقیقات زیست شناسی دانشگاه امام حسین(ع) همسانه سازی و بیان شده بود به طور جداگانه تثبیت شد. سایر مراحل الیزامشابه آنچه که در بالا اشاره گردید، انجام شد. بررسی ریزش باکتری در موش های 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 آزمون ها به آب موش ها آنتی بیوتیک 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 خوراندند. نمونه مدفوع موش های 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 تیوب ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. پس از اتمام زمان گرماگذاری، رقت های متوالی از مایع رویی تهیه شد و بر روی محیط کشت اختصاصی سوربیتول مکانیکی 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 سانتی گراد گرماگذاری و کلنی های 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 و MLD 100 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.

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

جدول ۱: اطلاعات بیوشیمیایی مستخرج از توالی آمینواسیدی و نوکلئوتیدی آنتی ژن کایمر قبل و بعد از بهینه سازی.

مؤلفه	قبل از بهینه سازی	بعد از بهینه سازی
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
نیمه عمر در باکتری	بیش از ۱۰ ساعت	بیش از ۱۰ ساعت
شاخص ناپایداری	۲۷	۲۷

جدول ۲: پیش بینی اپی توپ های B-cell خطی.

موقعیت آمینو اسیدی	امتیاز	اپی توپ
۵۳۴	۰/۹۹۹	LITQNPLPGVNVNTPNVA
۳۲۸	۰/۹۹۷	NGKSQTQATTGNDGRATITL
۳۰۷	۰/۹۶۸	MKNGQPVNQSVTFSTNFGM
۵۱۲	۰/۹۶۴	SITAWIKQTSSEQRSGVSST
۴۰۶	۰/۹۳۹	KLKASGGDGTYSWYSENTSI
۴۵۹	۰/۹۲۶	KAPSYMIVDKQAYYADAMS
۲۷	۰/۹۰۸	VQSSTDKNKAKLPQDVIDY
۴۹۱	۰/۸۸۴	LSDIYDSWGAANKYSHYSSM
۲۸۲	۰/۸۵۲	ITEIKADKTTAVANGKDAIK
۱	۰/۸۵۱	ADMNEASKASTTAQKMANLV
۸۳	۰/۸۴۸	NNLTTVVNNSQLEIQMSNT
۳۷۵	۰/۸۴۳	FDELKIDNKVDIIGNNVRGE
۴۳۶	۰/۸۲۸	LNGKGSVVIKATSGDKQTVS
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

بیان پروتئین نو ترکیب:

با توجه به اینکه در طراحی کاست ژنی جایگاه های برشی *HindIII* و *EcoRI* در پایانه های ۵' و ۳' آن تعبیه شده بود، لذا از همین آنزیم ها نیز برای تأیید وجود ژن در

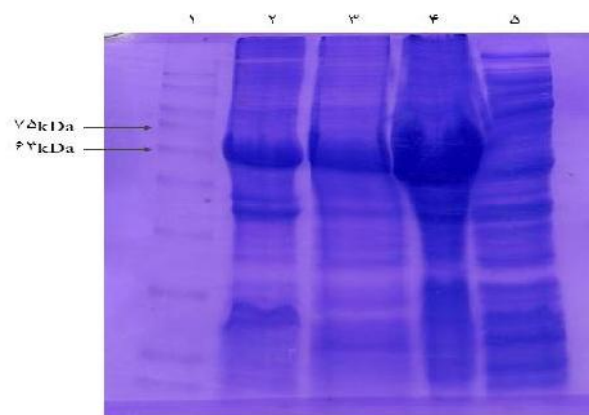
تخلیص پروتئین نو ترکیب به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی:

با محلول سازی کنجاله های نامحلول درون سلول های تراریخت میزبان 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 شد. (شکل ۲).

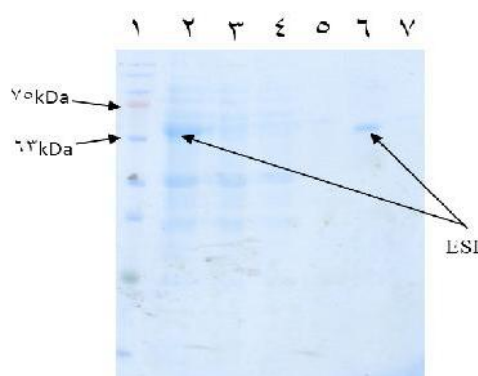
تائید پروتئین نو ترکیب ESI به روش وسترن بلات: با در نظر گرفتن این موضوع که کایمر ESI حاوی یک دنباله هیستیدینی در انتهای آمین بود، لذا برای انجام فرآیند لکه گذاری وسترن از آنتی بادی ضد دنباله هیستیدینی کوئزوگه به HRP برای تائید آن استفاده شد. پس از انجام این آزمون، رنگ پذیری کاغذ نیتروسولوز در مقابل باند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

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

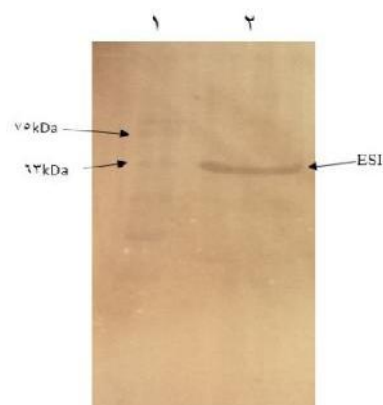
فرآیند القاء بیان پروتئین نو ترکیب کایمر ESI صورت پذیرفت و نمونه ها پس از آماده سازی، بر روی ژل آکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند و با رنگ آمیزی ژل باند بیانی متعلق به پروتئین کایمر با وزن ۶۳ کیلو دالتون در نمونه های القاء شده در قیاس با نمونه های کنترل (القاء نشده) نمایان گشت (شکل ۱). پس از اسکن نمودن ژل مربوط به بیان پروتئین کایمر ESI در لیز سلولی کامل و آنالیز تصویر آن توسط نرم افزار Gen Analyzer، در مجموع تعداد ۱۶ باند شاخص پروتئینی توسط نرم افزار بر روی ژل اسکن شده شناسایی شد. سطح زیر پیک مربوط به باند کایمر 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* روی ژل SDS-PAGE. ردیف ۱- نشانگر ملکولی پروتئین (PR911654). Cat. No. (۱۳۹۶) / 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 دنا توره. 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.



شکل ۳: الگوی آنالیز وسترن بلات تائید آنتی ژن کایمر ESI. ردیف ۱: نشانگر ملکولی پروتئین. ردیف ۲: باند متعلق به آنتی ژن ESI حاوی دنباله هپستیدین در انتهای آمین. باند رنگ گرفته در ردیف ۲ متناظر با باند محدوده ۶۳kDa نشانگر ملکولی پروتئین می باشد.

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

بررسی تیتراژ آنتی بادی علیه اجزا تشکیل دهنده پروتئین کایمر:

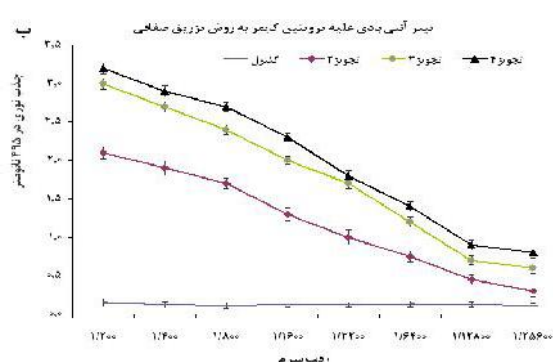
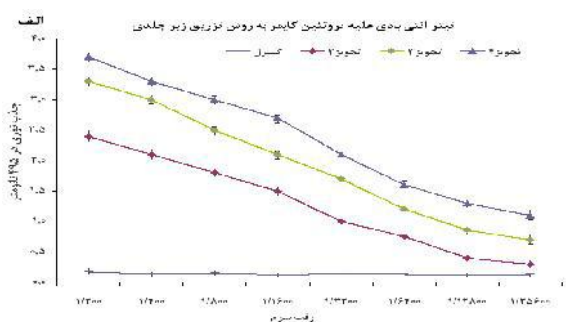
به منظور بررسی تولید آنتی بادی علیه هر یک از پروتئین های Stx2B، Intimin و EspA مربوط با ساختار پروتئین نو ترکیب از روش الیزا استفاده شد.

بررسی تیتراژ آنتی بادی سرم موش های ایمن شده با پروتئین کایمر:

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

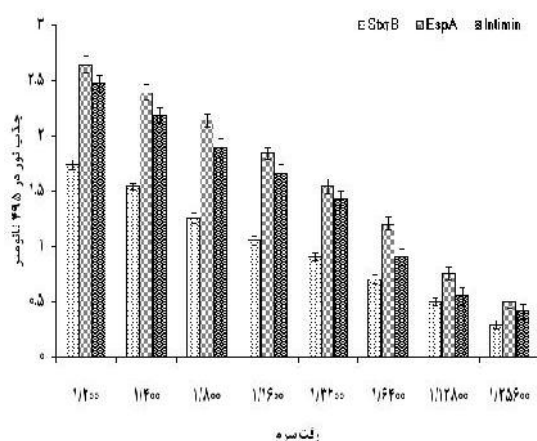
نمود (p>۰/۰۵). تفاوت تیتراژ آنتی بادی علیه هر کدام از پروتئین‌های نوترکین EspA و Stx2B، Intimin در روش زیر پوستی و درون صفاقی تفاوت معنی داری را نشان نداد (p>۰/۰۵).

همانطور که در نمودار ۲ دیده می‌شود آنتی بادی علیه هر سه جز پروتئین تولید شده است. تیتراژ آنتی بادی علیه Stx2B کمتر از تیتراژ آنتی بادی علیه پروتئین‌های EspA و Intimin بود که این تفاوت معنی دار بود (p<۰/۰۵). تیتراژ آنتی بادی علیه EspA بالاتر از Intimin بود که از لحاظ آماری این تفاوت معنی دار

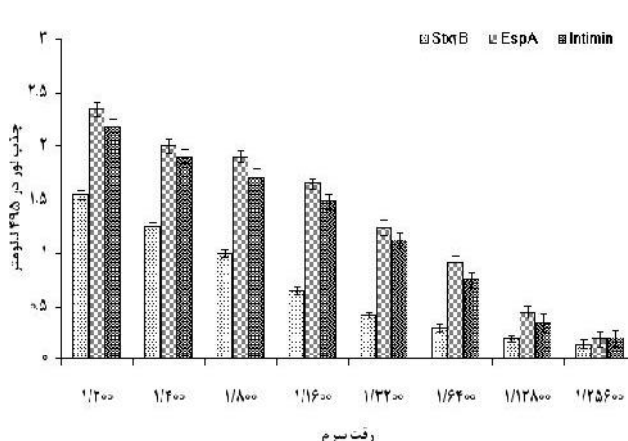


نمودار ۱: بررسی تیتراژ آنتی بادی علیه پروتئین نوترکین ESI به روش تجویز زیر پوستی (الف) و درون صفاقی (ب)

الف تیتراژ آنتی بادی علیه Stx2B, EspA, Intimin



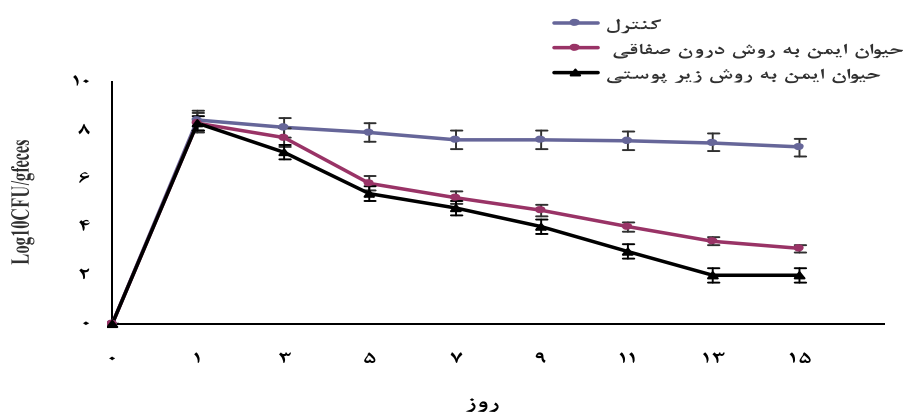
ب تیتراژ آنتی بادی علیه Stx2B, EspA, Intimin



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

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:H7 بصورت 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 ($p < 0.05$).

ریزش باکتری در حیوان ایمن شده



نمودار ۳: 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 تقریباً پایدار نشان داده در حالیکه آلودگی در موشهای ایمن شده پس از یک هفته به صورت قابل ملاحظه ای کاهش یافت.

بحث

با توجه به سازوکار بیماری‌زایی *E. coli* O157:H7 نقش اساسی پروتئین‌های EspA و Intimin در آغاز فرآیند لانه‌گزینی باکتری کاملاً آشکار می‌گردد. از طرفی قابلیت ترشح توکسین شبه شیکا توسط این بیماری‌زای ناتوان‌کننده، 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 لانه‌گزینی 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 لانه‌گزینی این بیماری‌زا هستند. از طرفی، چنانچه به هر علتی باکتری از سدهای متعدد بدن گذشت و توانست در مکان مناسب لانه‌گزینی 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 می‌کند. 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 بیماری‌زا باشد. بر این اساس در تحقیق حاضر فاکتورهای بیماری‌زای EspA، Intimin و Stx2B جهت ایجاد ایمنی علیه باکتری *E. coli* O157:H7 مورد استفاده قرار گرفت. ابزارهای توانمند بیوانفورماتیک و تکنولوژی DNA نو ترکیب شرایطی را فراهم ساخته است تا بتوان هر سه آنتی‌ژن هدف‌گذاری شده برای مقابله با بیماری‌زا *E. coli* O157:H7 را به صورت یکجا و در قالب یک سازه و یک پروتئین فراهم نمود. با فراهم شدن این امکان می‌توان هم مانع از لانه‌گزینی باکتری در روده کوچک شد و هم ابزار لازم برای خنثی نمودن توکسین آن را به صورت یکجا در اختیار داشت. برای دستیابی به اهداف فوق راهبرد طراحی و ساخت یک ایمونوژن کایمر متشکل از آنتی‌ژن‌های

Intimin، EspA و Stx2B مدنظر قرار گرفت. ایمونوژن‌های کایمر، پروتئین‌های چند ظرفیتی هستند که از چند اپی‌توپ مؤثر، از یک آنتی‌ژن یا از چند آنتی‌ژن مختلف تشکیل می‌شوند. همچنین، این نوع پروتئین‌ها می‌توانند از امتزاج چند آنتی‌ژن، از چند گونه، جنس، تیپ و یا سرو تیپ مختلف تشکیل شوند (۲۲). در این پژوهش توالی‌های نوکلئوتیدی دقیق کدکننده پروتئین‌های Intimin، EspA و زیر واحد B توکسین شبه شیکا (۲) از ژنوم باکتری *E. coli* O157:H7 استخراج شد. با بررسی منابع مشخص گردید که فقط بخش انتهایی کربوکسیل پروتئین Intimin در برهم کنش آن با گیرنده اش نقش دارد (۲۳)، لذا ۹۳۳ نوکلئوتید انتهایی ۳' ژن *eae* که کدکننده این بخش بود انتخاب شد. همچنین برای پروتئین EspA نیز به سبب اینکه ۱۲۸ باقیمانده انتهایی آن در سطح سلول باکتری قرار می‌گیرند (۲۴)، از ۶۴ اسید آمینه ابتدایی آن صرف نظر شد اما توالی کامل Stx2B در طراحی سازه کایمر مورد استفاده واقع شد. Garcia-Angulo و همکاران (۲۰۱۳) مطالعات و پژوهش‌های زیادی در حوزه طراحی واکسن نو ترکیب علیه بیماری‌زا EHEC با استفاده از فاکتورهای بیماری‌زای آن پرداختند. از جمله این موارد می‌توان به پروتئین‌های *Stx1B*، *Stx2A* و *Stx2B* پروتئین‌های سیستم ترشحی نوع ۳، Intimin، *EspA*_{c120}، Tir، *ferric enterobactin protein* (*FepA*) اشاره نمود (۱۱). در اکثر 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 از جمله 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 طراحی شده توسط Go و همکاران (۲۰۰۹) با آنتی‌ژن‌های این پژوهش مشترک هستند (۲۶) اما تفاوت‌های ساختاری

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 قرار گرفته است در صورتی که 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 به صورت EspA-Intimin-Stx2B است در صورتی که بر اساس اطلاعات حاصل از ارزیابی نیمه عمر پروتئین نو ترکیب 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 (مشکل از ۲ سرین و ۴ گلايسين) با ساختاری انعطاف‌پذیر بین Intimin و Stx2B استفاده نمودند در صورتی که در این پژوهش از رابط پپتیدی EAAAK (مشکل از یک اسید آمینه گلو تامات، سه اسید آمینه آلانین و یک اسید آمینه 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 نمی‌باشد (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. در نهایت 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 نو ترکیب استفاده می‌شود.

از مزایای این سیستم یبانی 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 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 موش‌ها با پروتئین کایمر مقدار $10^{1.1}$ cfu از طریق دهانی به موش تزریق شد، بعد از گذشت دو هفته میزان ریزش باکتری از موش‌های ایمن شد به $10^{4.3}$ 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 موش‌ها با پروتئین کایمر، میزان $10^{1.1}$ 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 نو ترکیب 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 نو ترکیب می‌توان 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 زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) سپاسگزاری و قدردانی به عمل می‌آید.

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. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). Emerg Infect Dis 2014;20:213-27.
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 tobaccum*) 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 CsaA, CsaB 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, DeViney 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, Rasaei 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, Whitlam 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-Stx2A1 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.