ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸
صفحه ۱۳٤ - ۱۲۵

ارزیابی میزان ایمنی زایی آنتی ژن IpaD متصل شده به لیگاندهای Co1 و STxB به‌صورت نازال بر علیه باکتری *E. coli* سویه O157:H7 در موش سوری

Immunogenic evaluation of nasal administration of conjugated IpaD with Co1 and STxB ligands against *E.coli O157: H7* in mice

مجتبی زمانی فردانیه[۱]، عبدالهادی حسین‌زاده[۱]، حسین هنری[۲]، هوشنگ علیزاده*[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، کرج، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

Zamani Faradonbe M[1], Hosseinzade A[1], Honari H[2], Alizade H[*1]

1- PhD Student, Associate Professors, Department of Agronomy and plant Breeding, Agricultural College, university of Tehran, Karaj, Iran
2- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hosein University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: halizade@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

باکتری شیگلا، شایع‌ترین عامل اسهال بوده و تاکنون واکسن موثری علیه آن یافت نشده‌است. پروتئین IpaD و زیر واحد B انتروتوکسین شیگلا (STxB) نقش مهمی در تهاجم، بیماری‌زایی و ایجاد عفونت توسط شیگلا دارد. از طرفی، لیگاند Co1 به‌عنوان یکی از سیستم‌های انتقالی آنتی ژن‌ها به سلول‌های M در لایه مخاطی، شناخته شده‌است. برای بررسی و مقایسه میزان ایمنی‌زایی هر یک از پروتئین‌های IpaD، IpaD-STxB و IpaD-Co1 از مدل حیوانی موش سوری و روش نازال استفاده شد. توالی کدکننده این پروتئین‌ها در ناقل pET28a کلون و به درون باکتری *E.coli* BL21 (DE3) منتقل شد. بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از تکنیک لکه‌گذاری وسترن، مورد ارزیابی قرار گرفت. پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی جذبی تخلیص و در چهار نوبت متوالی به موش سوری به‌صورت نازال داده شد. از نوبت دوم (یادآور اول) به بعد، یک هفته پس از دادن آنتی ژن، خون‌گیری انجام و سرم مورد آزمایش الایزا قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان تولید آنتی بادی IgG علیه پروتئین IpaD-STxB بیش‌ترین و پروتئین IpaD-Co1 بعد از آن قرار داشت. چالش ایمنی‌زایی این پروتئین‌ها با استفاده از سم فعال باکتری *E. coli* سویه O157:H7 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که موش‌های ایمن شده توانستند در گام اول پنج برابر LD50 شیگا توکسین *E. coli* O157:H7 را تحمل نمایند؛ اما با تزریق ۱۰ برابری LD50، پس از ۲٤ ساعت موش‌های ایمن شده با IpaD و IpaD-Co1 و پس از ۷۲ ساعت موش‌های ایمن شده با IpaD-STxB از بین رفتند. بر طبق نتایج مشخص شد که پروتئین IpaD-STxB در قیاس با فیوژن IpaD-Co1 قدرت ایمنی‌زایی بیش‌تری در موش سوری نسبت به شیگا توکسین دارد.

واژه‌های کلیدی

سلول‌های M
نازال
IpaD-Co1
IpaD-STxB

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.4.0]

مقدمه

شیگلوز آلودگی روده‌ای می‌باشد که علائم آن می‌تواند از اسهال خفیف تا دیسنتری حاد و گرفتگی عضلات شکمی، تب و وجود خون و بلغم در مدفوع همراه باشد (Schroeder and Hilbi. 2008). بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۲ حدود ۱/۵ میلیون مورد مرگ در سراسر جهان به‌واسطه انواع شیگلوز گزارش شده‌است (The et al. 2016). باکتری گرم منفی شیگلا (shigella) عامل بیماری شیگلوز، در سال ۱۸۹۸ توسط کیوشی شیگا در ژاپن جداسازی و نام‌گذاری شد. مهم‌ترین شیگلاهایی که در سال‌های بعد بر اساس بیماری‌زایی و بروز اپیدمی‌ها، شناسایی شدند در چهار سروتیپ بودند که بر اساس پلی ساکارید اختصاصی O لیپوپلی ساکارید طبقه‌بندی می‌شوند و به نام‌های شیگلا دیسانتری (*S.dysenteria*)، شیگلا سونئی (*S.sonneii*)، شیگلا فلکسنری (*S.flexneri*) و شیگلا بویدی (*S.boydii*) که عامل اسهال خونی است، نام‌گذاری شدند (Kahsay and Muthupandian 2016). مکانیسم بیماری‌زایی این باکتری شامل دو مرحله کلیدی است. در مرحله اول اتصال باکتری و تکثیر آن در سطح سلول‌های اپی تلیال روده کوچک صورت می‌گیرد. این امر باعث تورم و ایجاد زخم‌های سطحی، تجمع گرانولوسیت‌ها در ناحیه آلودگی و بالاخره مرگ سلول‌های آلوده شده و خون‌ریزی می‌شود. در مرحله دوم باکتری تولید شیگا توکسین کرده و به سلول‌های اپیتلیال روده بزرگ حمله و سبب تورم و زخم‌هایی روی دیواره روده می‌شود که نتیجه آن اسهال خونی است. پروتئین Invasion plasmid antigen (IpaD) D به‌همراه بقیه Ipaها کمپلکس ترشح پروتئین نوع III را در این باکتری به‌وجود می‌آورد. این کمپلکس در اتصال به سلول میزبان و ایجاد مجرای ورودی پروتئین‌های باکتری به درون سلول میزبان، نقش ایفا می‌کند (Martinez et al. 2012). ناحیه N–ترمینال IpaD که در ورود باکتری به سلول‌های میزبان نقش دارد، به‌عنوان کاندیدای واکسن مورد توجه محققین می‌باشد. شیگا توکسین‌ها (STxs) گروهی از پروتئین‌های سمی AB5 باکتریایی هستند که حدود ۷۰ کیلو دالتون وزن داشته و در سلول‌های یوکاریوتی حساس، موجب ممانعت سنتز پروتئین می‌شوند. زیر واحد A این توکسین‌ها باعث حذف یک آدنین از مولکول 28S rRNA در زیر واحد 60s ریبوزوم و در نتیجه باعث بلوکه شدن سنتز پروتئین می‌شود. ساختار پنتامر زیر واحدهای B این توکسین‌ها به گیرنده سلولی globotiaosylceramide (Gb3) در سطح سلول متصل می‌شود (Melton-Celsa AR. 2014). اتصال زیر واحد B شیگا توکسین به آنتی ژن در تحقیقات زیادی منجر به موفقیت شده‌است (Batisse et al. 2015).

واکسیناسیون را می‌توان مهم‌ترین روش مؤثر در مبارزه با بیماری‌های واگیردار و عفونی دانست. لایه مخاطی به‌دلیل رویارویی با حجم بالایی از عوامل بیماری‌زا و میکروب‌ها، در خط مقدم مقابله با این عوامل می‌باشد، همین امر باعث شده‌است که واکسیناسیون این ناحیه از بدن، به‌عنوان یک هدف ایده‌ال مطرح شود. از طرفی واکسیناسیون از طریق لایه مخاطی می‌تواند در قیاس با سیستم‌های رایج تزریق، علاوه بر تحریک سیستمیک سیستم دفاعی بدن، سیستم دفاع مخاطی را نیز تحریک کند. از طرفی تزریق با سرنگ واکسن دارای معایب و خطراتی می‌باشد. از جمله این خطرات انتقال آلودگی از بیمار به کادر مراقبتی بیماران در اثر فرورفتن سوزن به‌صورت ناخواسته به بدن پرستاران و دیگر کادر مراقبتی را می‌توان نام برد. به‌همین دلیل امروزه بر انواع روش‌های رساندن واکسن به بدن بر پایه لایه مخاطی توجه فراوان می‌شود. این روش‌ها شامل به‌کارگیری خوراکی، نازال (دماغی)، چشمی، ریوی، واژینال و رکتال می‌باشند (Karande and Mitragotri. 2010). نمونه‌های موفق فراوانی از کاربرد خوراکی واکسن‌ها و یا نازال در حال حاضر وجود دارد. باکتری عامل بیماری و با *Vibrio cholera* به‌صورت باکتری کشته شده به‌صورت خوراکی و با نام تجاری Dukoral و Shanchol در دسترس بوده و استفاده می‌شود. از دیگر نمونه‌های موفق واکسن‌های خوراکی، واکسن تیفوئید (عامل بیماری *Salmonella typhi*) با نام تجاری Vivotif را می‌توان نام برد. روتاویروس و پولیوویروس دو عامل بیماری دیگر هستند که بر ضد آن‌ها واکسن خوراکی معرفی شده‌است. FluMist Quadrivalent و Nasovac دو داروی موثر معرفی شده برای بیماری آنفولانزا می‌باشند که به‌صورت نازال مورد استفاده قرار می‌گیرند (Azegami et al. 2014). از میان واکسن‌های مخاطی موجود، سیستم واکسیناسیون خوراکی به‌دلیل سهولت و هزینه

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.4.0]

پایین‌تر نسبت به بقیه سیستم‌های واکسیناسیون، جذاب‌تر است. اما در این روش هم به‌دلیل میزان زیاد القاء مقاومت بر ضد آنتی ژن خوراکی و نیز کم بودن جذب این آنتی ژن‌ها به درون لنف سطوح مخاطی، میزان تحریک پاسخ ایمنی معمولاً ضعیف می‌باشد (Kim et al. 2012). سطح داخلی لوله گوارش انسان، همواره با عوامل بیماری‌زا در تقابل است. لذا ساختار اختصاصی برای مقابله با این عوامل در این ناحیه ایجاد شده که gut-associated lymphoid tissue (GALT) نامیده می‌شود. در بین سلول‌های لایه مخاطی GALT، حدود ۵ تا ۱۰ درصد سلول‌ها به‌صورت تخصص یافته برای جذب آنتی ژن‌ها به لنف و تحریک سیستم ایمنی مخاطی به‌کار می‌روند. این سلول‌ها را M-cell می‌نامند. این سلول‌های تخصص یافته دارای لیزوزیم کمتر بوده و به‌همین خاطر می‌توانند آنتی ژن را بدون تجزیه کردن به سیستم لنفاوی منتقل کنند. وجود این ویژگی‌ها باعث شده‌است تا این سلول‌ها به‌عنوان کاندید مناسب برای جذب واکسن‌های خوراکی، مطرح شده و امروزه بیش‌ترین تمرکز تحقیقاتی بر روی آن‌ها می‌باشد (Ohno 2016). اما همان طور که ذکر شد، با وجود جذب آنتی ژن‌های کوچکی مانند IpaD، پاسخ ایمنی ضعیفی دیده می‌شود که این امر استفاده از لیگاندهای ادجوانتی را ضروری می‌کند. به‌کارگیری آنتی ژن حفاظتی خالص شده مانند IpaD به‌عنوان واکسن، به‌علت ایمنی‌زایی پایین آنتی ژن‌های محلول و نبودن ادجوانت مخاطی موثر و ایمن، دچار اختلال شده‌است. برای برطرف کردن این نقص و بالا بردن خاصیت آنتی ژنی، آن را با ادجوانت همراه می‌کنند.

در راستای تهیه ادجوانت مناسب برای انتقال دارو به‌صورت خوراکی و از طریق سلول‌های M در اپیتلیال روده و بافت‌های مخاطی (Kim et al. (2010 به‌کمک روش نمایش فاژی موفق به معرفی پپتید کوتاه Co1 به‌عنوان لیگاندی کارا برای انتقال مولکول‌های متصل شده به آن به سلول‌های شبه M-Cell در محیط کشت آزمایشگاهی شدند (Kim et al. 2010). بر اساس نتایج تحقیقات متعدد در سال‌های اخیر، STxB به‌صورت موفقیت آمیزی در انتقال دارو و آنتی ژن فیوژ شده با آن، به‌صورت نازال و یا گاواژ استفاده شده‌است (Honari et al.2013). لذا هدف از انجام این تحقیق، بررسی میزان و امکان بیان هر یک از این سازه‌ها در سیستم باکتریایی BL 21(DE3) و مقایسه میزان کارایی ادجوانت‌های STxB و Co1 در تحریک سیستم دفاعی مخاطی با روش نازال (دماغی) بوده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه کاست ژنی IpaD-STxB که در ناقل pET28a کلون شده بود از دانشگاه امام حسین(ع) تهیه شد. در انتهای ۵ پریم این کاست ژنی نوکلئوتیدهای ۱۶۳ تا ٤٨٣ IpaD با شماره دسترسی GQ201921.1 (یعنی ناحیه N ترمینال توالی کامل با طول ۳۲۱ نوکلئوتید، وسپس لینکر فورینی (RARR) و در سمت ۳ پریم هم ۲۰۷ نوکلئوتید از توالی STxB قرار دارد. برای الحاق قطعه ۳٦ نوکلئوتیدی Co1 (Kim et al. 2010) به انتهای C- ترمینال IpaD، این توالی به‌صورت انتهای آویزان در آغازگر پیرو اضافه و سنتز شد (شرکت سیناکلون، جدول ۱). برای ساخت سازه مربوط به IpaD (بدون لیگاند) نیز از پرایمرهای پیرو و پیشرو موجود در جدول ۱ استفاده شد. سایت‌های برشی *Eco*RI و*Xho*I به‌ترتیب بر روی پرایمرهای پیشرو و پیرو اضافه شدند. PCR این قطعات با آنزیم *Pfu* (شرکت توپاز ژن کاوش) و واکنشPCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل۱۰۰ نانوگرم DNA الگو (پلاسمید pET28a حاوی قطعه سنتزی IpaD-STxB)، ۰/٤ میکرومولار آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، یک واحد آنزیم (*Pfu* DNA polymerase) و ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به مدت چهار دقیقه، ۳۲چرخه شامل ۹٤ درجه به مدت ٤۰ ثانیه، ٦۰ درجه به مدت ٤۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان یک مرحله بسط نهایی در دمای۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه بود. قطعات حاصل از PCR بر روی ژل اگارز ۱/۵ درصد تفکیک و باندهای مربوطه جداسازی و به روش Glass milk (شرکت sigma به شماره کد S5631) بر طبق پروتکل شرکت تخلیص شدند. پس از تخلیص به کمک آنزیم *Taq* و در حضور dATP قطعات آدنین‌دار شده و بر روی ژل ران و قطعات مربوطه جدا و به روش Glassmilk تخلیص شدند. اتصال قطعات تخلیص شده به تی- وکتور pTG19

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.4.0]

(TA010) شرکت Vivantis و طبق دستورالعمل شرکت صورت گرفت. آنزیم T4 لیگاز شرکت فرمنتاز جهت اتصال قطعات به پلاسمید به‌کار رفت. واکنش اتصال به سلول‌های مستعد *E.coli* سویه DH5α انتقال یافت. کلون‌های حاصل، کشت شبانه و سپس به روش لیز قلیایی پلاسمید استخراج و چک کردن پلاسمیدها به کمک هضم آنزیمی با *Bam*HI و PCR انجام شد (Sambrook and Russell 2001). در نهایت دو سازه حاصل برای توالی‌یابی ارسال شد. سازه‌های تایید شده به سویه *E.coli* BL21 DE3 منتقل شد. از کشت شبانه کلون‌های حاصل در محیط LB مایع در دمای۳۷ درجه، به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق سازی انجام شد و رشدباکتری رقیق شده تا رسیدن به OD=0.6 در ٦۰۰ نانومتر ادامه یافت. علاوه بر ۳ سازه مورد نظر، سویه ترانسفرم نشده نیز به‌عنوان کنترل منفی کشت شد. پس از رسیدن به‌غلظت مورد نظر، IPTG (شرکت سیناکلون) به‌غلظت ۰/۸ میلی‌مولار به محیط کشت LB اضافه شد. پس از ٤ ساعت رسوب‌دهی باکتری و استخراج پروتئین با بافر اوره و PBS انجام شد. از باکتری‌های رقیق شده قبل از القاء نیز نمونه‌گیری شد (Daniel 1992; Sambrook and Russell 2001). پس از القاء تولید پروتئین در سویه (BL21 (DE3 ترانسفرم شده با هر کدام از ۳ سازه مورد ارزیابی، پروتئین کل به ۲ روش استخراج شد. پروتئین کل بوسیله بافر اوره با انکوباسیون در دمای محیط به مدت ۱۰ دقیقه و در بافر PBS با کمک امواج فراصوت، استخراج شد. پروتئین حاصل از استخراج هر یک از سازه‌ها در دو زمان قبل وبعد از القا با IPTG و دو حالت استخراج با اوره و PBS (۱۳۷میلی‌مولار NaCl، ۲/۷میلی‌مولارKCL ، ۱۰ میلی‌مولار Na_2HPO_4 و ۱/۸ میلی‌مولار KH_2PO_4 pH=7.4) بر روی ژل پلی اکریلامید ۱۰ درصد برده شد (Daniel 1992; Sambrook and Russell 2001). غلظت پروتئین کل استخراج شده به کمک روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد انجام شد. تخلیص پروتئین‌های نوترکیب حاصل تحت شرایط واسرشت شده و با استفاده از ستون Ni-NTA آگارز شرکت کیاژن و طبق پروتکل شرکت انجام شد. برای تایید بیان و وجود ۳ پروتئین نوترکیب مورد نظر از تکنیک ایمنوبلات با آنتی‌بادی ضد IpaD استفاده شد. پروتئین کل استخراج شده با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترنMini Protean ساخت شرکت Bio-rad و با بافر انتقال(گلایسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۱ درصد SDS و متانول ۲۰ درصد با pH=8.5) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. جهت بلاک کردن کاغذ نیتروسلولزی، از بافر PBS-T (PBS بههمراه ۵۰ میکرولیترتوئین ۲۰ در ۱۰۰ میلی‌لیتر) بههمراه ۵ درصد شیرخشک به مدت ١٦ ساعت و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، استفاده شد. سپس نمونه به مدت ۱ ساعت با آنتی‌بادی اختصاصی با رقت ۱/٤۰۰ در بافر PBS-T در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت کاغذ وسترن با HRP کانژوگه موشی به‌غلظت ۱/۲۵۰۰ در PBS-T پوشانده شده و پس از یک ساعت، برای آشکارشدن باند پروتئین از سوبسترای DAB (۵۰ میلی‌مولار بافر Tris با pH=7.8 حاوی ٦ میلی‌گرم DAB و ۱۰ میکرولیتر H2O2) استفاده شد. پس از ظاهر شدن باند، واکنش با H2O متوقف شد (Daniel 1992; Madanchi et al. 2012; Tonello et al. 1999;.

جدول۱- توالی آغازگرهای مربوط برای تکثیرو جداسازی IpaD و اتصال Co1 به IpaD. توالی *Xho*I بر روی پرایمر پیرو و توالی *Eco*RI بر روی پرایمر پیشرو قرار گرفته است.

ردیف	نام آغازگر	توالی
۱	R-Ipco1	AAA*CTCGAG*ATTACGGCAGAGGCGACCGCGCCGGCAGCTGATGAAACGAACGACGAGCACGG GTGTAAGAAGACACCGCGTGC
۲	Ipad-R	AA*CTCGAG*GGTGTAAGAAGACACCGCGTGCTC
۳	Ipad-F	AA*GAATTC*CGTACCACCAACCAGGCGCTG

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.4.0]

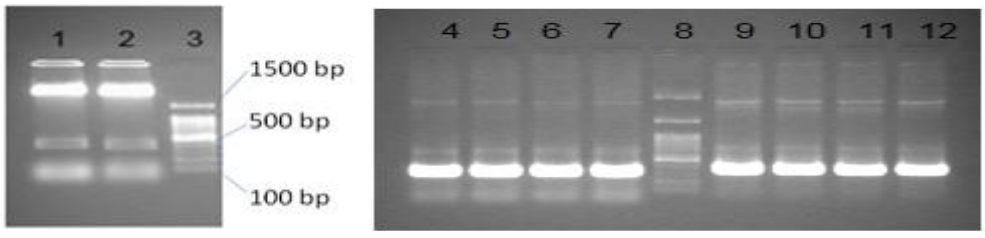
از هر کدام از پروتئین‌های خالص شده IpaD, IpaD-STxB, IpaD-Co1 به میزان ٤٠ میکروگرم در هر نوبت و در ٤ نوبت (به فواصل ١٤ روز) به‌صورت نازال به موش‌های سوری نژاد NMRI داده شد. هر یک از پروتئین‌های خالص در بافر PBS هم حجم شده و مخلوط به‌کمک سرسمپلرهای کریستالی در حفره بینی و سقف دهان موش‌ها وارد شد. هر تیمار شامل ٣ سر موش سوری ماده هم وزن بود. یک هفته پس از یادآور دوم اولین خونگیری انجام شده و خونگیری‌های بعدی به فاصله ١٤ روز از خونگیری اول انجام و سرم خون جداسازی و تیتر آنتی بادی IgG با روش الایزا صورت گرفت. برای تیتراسیون سرم حاصل، در هر چاهک پلیت الایزا میزان ٥٠٠ نانوگرم از پروتئین خالص مربوطه بارگذاری و به مدت ١ شب در ٤ درجه انکوبه شد. از بافر PBS و همچنین پروتئین مربوط به باکتری بدون سازه که از ستون خالص‌سازی پروتئین عبور داده شده بود به‌عنوان شاهد استفاده شد (Daniel 1992; Tonello et al. 1999; Madanchi et al. 2012).

پس از ایمن‌سازی موش‌ها در ٤ نوبت یاد شده، میزان ٥ برابر LD50 عصاره سلولی باکتری *E.coli* سویه O157:H7 به موش‌ها تزریق شده و حیوانات تا ١٠ روز تحت نظر قرار گرفتند. در مرحله بعد ١٠ برابر دوز مربوطه به موش‌های باقیمانده تزریق شده و میزان مرگ ومیرآن‌ها پس از تزریق سم، مورد ارزیابی روزانه قرار گرفت (Gupta et al. 2011; Honari et al. 2013). آنالیز داده‌های حاصل از تیتراسیون IgG سرم حاصل از موش‌ها و رسم نمودارها توسط نرم‌افزارهای SAS 9.1.3 و Excel 2007 انجام شد.

نتایج

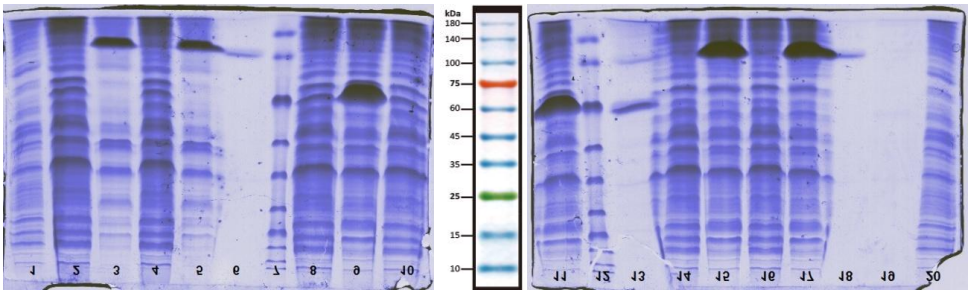
شکل ١ نشان دهنده محصول واکنش PCR جهت تکثیر IpaD-co1 و IpaD با آنزیم *pfu* در دمای ٦٠ درجه و قطعات حاصل بر روی ژل اگارز ١/٥ درصد می‌باشد. با توجه به این شکل، قطعات ٣٢١ نوکلئوتیدی مربوط به IpaD و ٣٦٩ نوکلئوتیدی Ipad-Co1 تکثیر شدند. تایید وجود قطعات یاد شده در ناقل pET28a نیز در این شکل آورده شده‌است. قطعات با آنزیم‌های *Xho*I , *Eco*RI از تی وکتور به ناقل نهایی منتقل و سپس تایید شد. نتایج توالی‌یابی قطعه IpaD-Co1 و IpaD توالی مورد انتظار (توالی IpaD موجود بر روی پلاسمید pET28a دریافتی از دانشگاه امام حسین (ع) و توالی Co1 برگرفته از مقاله Kim et al. 2010) به‌وسیله برنامه برخط CLUSTAL.W مورد برررسی قرار گرفت و نتایج نشان‌دهنده تطابق کامل این توالی‌ها با یکدیگر بود.

تصاویر ژل‌ها نشان داد که در سویه BL21 و با ناقل pET28a به عنوان وکتور بیانی، قبل از اضافه نمودن IPTG به محیط کشت باکتری، بیان پروتئین هدف به میزان قابل تشخیص بر روی ژل را در هیچ یک از سازه‌های IpaD، IpaD-STxB و IpaD-Co1 نشان ندادند. و به‌عبارت دیگر نشت پروموتوری قابل تشخیص برای این پروتئین‌ها مشاهده نشد (شکل ٢).

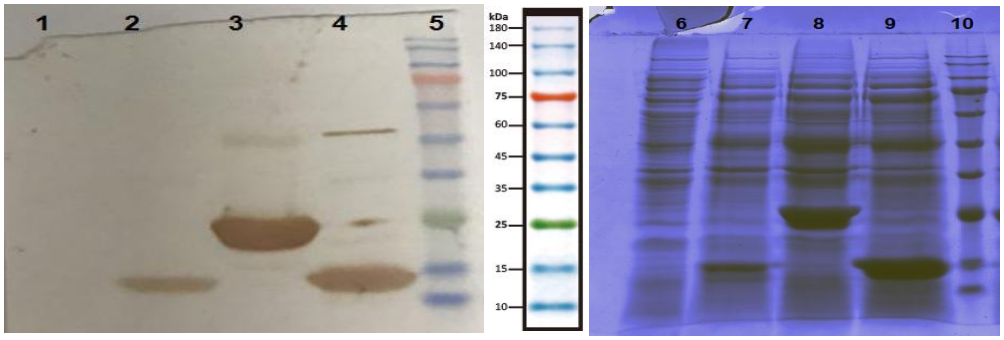


شکل ١- نتایج هضم آنزیمی پلاسمید pET28a حاوی قطعات IpaD-Co1 و IpaD و قطعات تکثیر شده آن‌ها با PCR توسط آنزیم *pfu* پلیمراز، بر روی ژل آگارز: هضم آنزیمی*Xho*I, *Eco*RI سازه pET28a حاوی قطعات IpaD-co1 (چاهک١) و IpaD (چاهک ٢) و چاهک شماره ٣ سایز مارکر SL7031 (شرکت سیناکلون). تکثیر IpaD-Co1 و IpaD توسط انزیم *pfu* پلیمراز در دمای ٦٠ درجه جهت اتصال پرایمرها. ٤ چاهک از شماره ٤ تا ٧ مربوط به IpaD، سایز مارکر SL7031 (شرکت سیناکلون) در چاهک شماره ٨، ٤ چاهک از شماره ٩ تا ١٢ مربوط به IpaD-Co1.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.4.0]



شکل ۲- تصویر مربوط به ژل SDS-PAGE نمونه‌های پروتئینی استخراج شده از باکتری‌های BL واجد پلاسمید: چاهک شماره ۱ پروتئین کل باکتری *BL21(DE3)* بدون سازه، استخراج شده با بافر اوره، چاهک‌های شماره ۲ و ٤ پروتئین کل باکتری واجد پلاسمید pET28a حاوی قطعه IpaD-Co1 قبل از القاء با IPTG و به‌ترتیب استخراج با بافر اوره و PBS، چاهک‌های شماره ۳ و ۵ پروتئین کل همان باکتری ۵ ساعت پس از القاء با IPTG و به‌ترتیب استخراج با بافر اوره و PBS. ستون ٦ مربوط به پروتئین خالص شده IpaD-Co1 با ستون Ni-NTA ؛ ستون ۷ سایز مارکر پروتئینی PM2500 (شرکت SMOBIO). ستون‌های ۸ و ۱۰ پروتئین کل باکتری واجد پلاسمید pET28a حاوی قطعه IpaD-STxB قبل از القاء با IPTG و به‌ترتیب استخراج با بافر اوره و PBS، چاهک‌های شماره ۹ و ۱۱ پروتئین کل همان باکتری ۵ ساعت پس از القاء با IPTG و به‌ترتیب استخراج با بافر اوره و PBS. چاهک شماره ۱۲ سایز مارکر پروتئینی، چاهک شماره ۱۳ پروتئین خالص شده IpaD-STxB با ستون Ni-NTA. ستون‌های ١٤ و ١٦ پروتئین کل باکتری دارای پلاسمید pET28a حاوی قطعه IpaD قبل از القاء با IPTG و به‌ترتیب استخراج با بافر اوره و PBS چاهک‌های شماره ۱۵ و ۱۷ پروتئین کل همان باکتری ۵ ساعت پس از القاء با IPTG و به‌ترتیب استخراج با بافر اوره و PBS. چاهک شماره ۱۸ پروتئین خالص IpaD. چاهک شماره ۱۹ پروتئین BL21 (DE3) بدون سازه که از ستون Ni-NTA عبور داده شده‌است. و چاهک ۲۰ پروتئین کل باکتری BL21 (DE3) بدون سازه، استخراج شده با بافر PBS. میزان ۲۰ میکرولیتر (با غلظت حدود ۱۰ تا ۱۲ میکروگرم در میکرولیتر) از پروتئین در هر چاهک بارگذاری شده‌است.



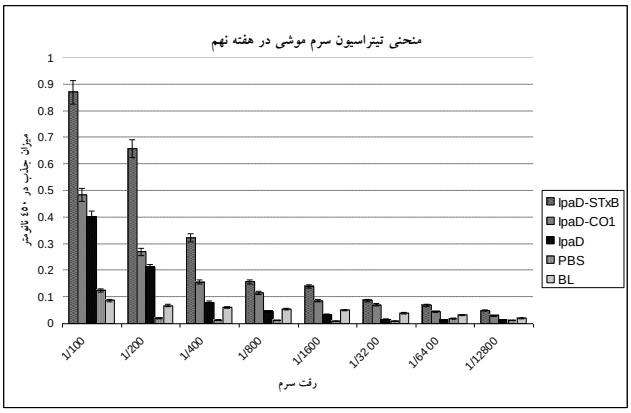
شکل ۳- تصویر کاغذ وسترن (سمت چپ) مربوط به پروتئین‌های IpaD، IpaD-STxB و IpaD-Co1 و ژل کوماسی همین نمونه‌ها (سمت راست): چاهک شماره ۱ مربوط به پروتئین کل باکتری BL21 (DE3) بدون پلاسمید، چاهک شماره ۲ حاوی پروتئین کل باکتری حاوی پلاسمید کدکننده IpaD، چاهک شماره ۳ مربوط به پروتئین باکتری حاوی پلاسمید کدکننده IpaD-STxB، چاهک شماره ٤ مربوط به پروتئین کل باکتری حاوی پلاسمید pET28a کد کتنده IpaD-Co1 و چاهک ۵ سایز مارکر پروتئینی. تصویر سمت چپ به‌ترتیب از چاهک شماره ٦ تا ۱۰ تکرار نمونه‌های مربوط به وسترن بلاتینگ.

وسترن بلاتینگ ۳ پروتئین مورد نظر به‌همراه پروتئین BL21(DE3) بدون پلاسمید انجام شد. شکل ۳ نتیجه رنگ‌آمیزی کاغذ وسترن را نشان می‌دهد که تایید کننده توالی صحیح این پروتئین‌ها و فعال بودن آن‌ها در برهم‌کنش با آنتی ژن می‌باشد. با توجه به‌طول مربوط به هر یک از قطعات، وزن مولکولی پروتئین IpaD به‌صورت *in silico* در حدود ۱۲,٦۵ کیلودالتون و IpaD-Co1 در حدود ١٤,٤۵ کیلودالتون و IpaD-STxB در حدود ۲۲,١٦ کیلودالتون محاسبه شد. نتایج حاصل از ژل‌های اکریلامید سایز مورد انتظار پروتئین‌های بیان شده را نشان می‌دهد.

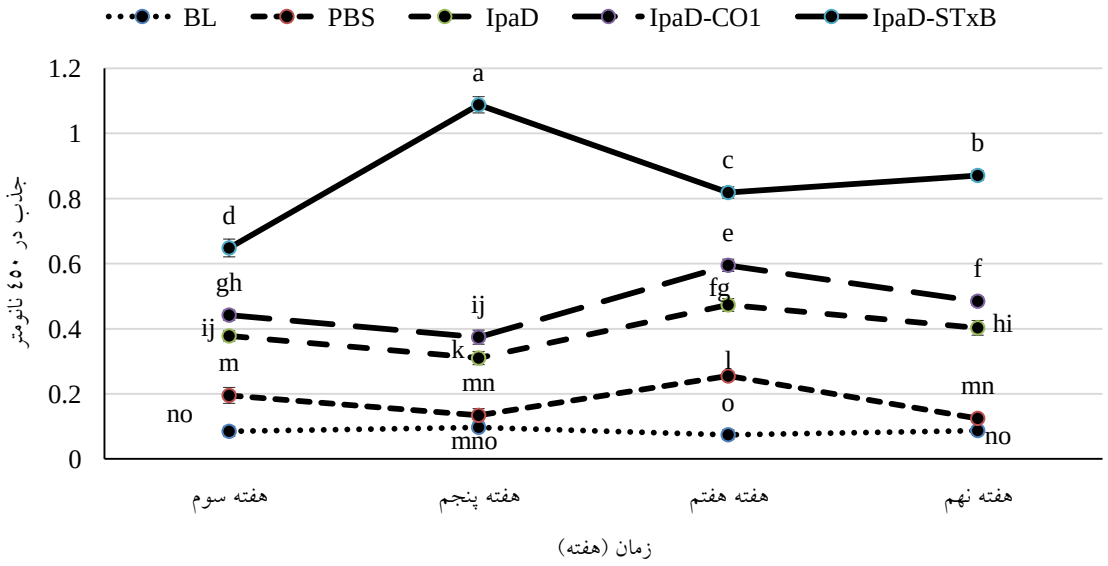
پس از نمونه‌گیری و جداسازی سرم خون موش‌ها، تیتراسیون سرم حاصل با روش الایزای غیر مستقیم صورت گرفت. رقت ۱ به ۱۰۰ در همه زمان‌ها بیش‌ترین جذب را در ٤۵۰ نانومتر به خود اختصاص داده و در ادامه تیتراسیون روند نزولی یکنواخت بین تمامی تیمارهای پروتئینی مشاهده شد. از آنجایی که چالش موش‌ها پس از خونگیری چهارم (هفته نهم) صورت پذیرفت،

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.4.0]

نمونه تیتراسیون مربوط به این زمان آورده شده‌است (شکل ٤). نتایج مقایسات میانگین و تجزیه آماری در رقت ۱/۱۰۰سرم، نشان داد که سطح آنتی بادی موشی بر ضد پروتئین‌های تزریق شده تفاوت معنی‌داری را در زمان‌های مختلف و بین ۳ نوع پروتئین IpaD، IpaD-STxB و IpaD-Co1 را داراست. برطبق این نتایج بیش‌ترین سطح آنتی بادی مربوط به هفته پنجم و مربوط به تیمار پروتئینی IpaD-STxB بوده و در کل تیترآنتی بادی این ترکیب پروتئینی در تمام زمان‌های نمونه‌گیری از بقیه تیمارها به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است. در مورد این پروتئین در طی ۹ هفته نمونه‌گیری بعد از هفته سوم از تاریخ شروع تزریق روند تولید آنتی بادی افزایشی بوده است با این تفاوت که بین هفته سوم تا هفتم یک روند افزایش شدید و سپس کاهش دیده می‌شود اما در کل در زمان چالش موش‌ها با سم باکتریایی، میزان آنتی بادی افزایش داشته است (شکل ۵). اما در مورد دو پروتئین IpaD-Co1 و IpaD روند تا هفته هفتم به‌صورت مشابه بوده وبا یک افت و سپس افزایش آنتی بادی همراه بوده است. در زمان اعمال چالش موش‌ها، تیتر آنتی بادی در IpaD-Co1 نسبت به هفته سوم افزایش مختصری را نشان می‌دهد اما در این زمان موش‌های تیمار شده با IpaD نسبت به هفته سوم تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد.



شکل ٤- نمودار ستونی تیتراسیون IgG سرم گروه‌های تیماری موشی در هفته نهم پس از شروع دادن پروتئین‌های IpaD، IpaD-STxB و IpaD-Co1 به‌صورت نازال.



شکل ۵- نمودار مربوط به تیتراسیون سرم گرفته شده از موش‌های تیمار شده با پروتئین‌های خالص IpaD، IpaD-STxB و IpaD-Co1. زمان برحسب هفته نسبت به زمان شروع تیمار موش‌ها با آنتی ژن می‌باشد. منحنی مربوط به PBS تیتر آنتی بادی ضد IpaD در گروه موش‌هایی است که به جای دریافت پروتئین، فقط PBS به صورت نازال بر آن‌ها اعمال شده‌است. در تیمار BL نیز پروتئین باکتری (DE3) BL21 بدون سازه از ستون نیکل عبور داده شده و در هر یادآور به موش‌ها داده شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.4.0]



شکل٦- بالاسمت چپ:تصویری از موش‌ها قبل از چالش با شیگا توکسین *E. coli* O157:H7 در هفته نهم. بالا سمت راست:خونگیری از موش‌ها به کمک پیپت پاستور از چشم موش. پایین تصویر: پنج گروه تیماری موش‌ها پس از اتمام چالش با شیگا توکسین *E. coli* O157:H7 در روز ١٤ پس از شروع چالش که تمام گروه‌های تیماری موش‌ها با ١٠ برابر دوز LD50 شیگا توکسین از بین رفتند.

نتایج چالش موشی نشان داد که موش‌های ایمن شده توانستند در گام اول ٥ برابر LD50 شیگا توکسین *E. coli* O157:H7 را به مدت ١٠ روز تحمل نمایند؛ موش‌های شاهد (گروه PBS و گروه BL) با این میزان از سم کاملا از بین رفته و در ٢٤ ساعت اول مردند. به موش‌های زنده مانده پس از ١٠ روز، میزان ١٠ برابری LD50 تزریق شد. پس از ٢٤ ساعت موش‌های ایمن شده با IpaD و IpaD- Co1 و پس از ٧٢ ساعت موش‌های ایمن شده -IpaD STxB از بین رفتند.

بحث

تحقیقات زیادی برای یافتن واکسن موثر بر ضد شیگلوز تا به امروز انجام شده‌است. در سال ٢٠٠٥ در طی تحقیقی که توسط Picking و همکاران صورت گرفت برنقش کلیدی IpaD در حمله باکتری شیگلا به سلول میزبان، ایجاد منفذ ورودی برای انتقال عوامل بیماری‌زا به سلول میزبان و بیماریزایی توسط باکتری تاکید شده و این گروه ثابت کردند ناحیه N–ترمینال پروتئین IpaD نقش کلیدی در این فرآیندها بر عهده دارد(Picking et al. 2005). به‌همین دلیل بعد از آن به این پروتئین برای تولید واکسن کارا بر ضد شیگلا اهمیت زیادی داده شده‌است. اما مشکلی که این ناحیه از این پروتئین برای سنتز واکسن مناسب برای مبارزه با شیگلوز دارد ایمنی‌زایی پایین و تحریک کم سیستم ایمنی می‌باشد (Honari et al. 2013). از طرف دیگر در سال ٢٠٠٥ در تحقیقی بر روی STxB نشان داده شد که این پروتئین قادر است تحریک سیستم ایمنی را موجب شده و تقویت نسبی سیستم ایمنی را بر ضد باکتری شیگلا نشان داد (Kurohane et al. 2005). همچنین در سال ٢٠٠٨ تلاشی برای استفاده از پروتئین خالص STxB که در باکتری کلون و بیان شده بود صورت گرفت (Zhu et al. 2008). امروزه از STxB به خاطر میل ترکیبی با گیرنده Gb3 در انتقال دارو به سلول‌های خاص مانند سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود. اما براساس مطالعات صورت گرفته این پروتئین به‌دلیل وزن کم، به تنهایی قادر به تحریک شدید سیستم ایمنی نمی‌باشد (Honari et al. 2013). در سال‌های اخیر به‌منظور ایجاد واکسن مناسب برای شیگلا پروتئین شایمریک IpaD-STxB و نیز پروتئین STxB تولید شده و به‌عنوان واکسن خوراکی و همچنین تزریق مورد استفاده و مطالعه قرار گرفته است. (2016) Baranvand and Honari ٤٠ میکروگرم برای هر سر موش در روش خوراکی و نیز ٢٠ میکروگرم در روش تزریقی در نوبت اول به‌کار بردند. در یادآورهای بعدی مقادیر پروتئین مصرفی کاهش داده شد. اما در تحقیق حاضر تمام یادآورها با میزان ٤٠ میکروگرم و به‌صورت نازال به مصرف موش‌ها رسید. نتایج تحقیق حاضر با نتایج این تحقیق مشابهت داشته و در هر دو تحقیق فیوژن IpaD-STxB از دیگر تیمارها تیتر آنتی بادی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.4.0]

بیش‌تری را ایجاد کرد. در مطالعه انجام شده توسط این محققین نتایج چالش موشی نیز همانند تحقیق حاضر بوده و گروه IpaD-STxB کیتوزان خوراکی با اعمال ۱۰ برابر LD50 پس از ۷۲ ساعت مردند اما گروه تزریقی موش‌ها با این پروتئین تا ۵۰ روز بعد از چالش موش‌ها با شیگا توکسین *E. coli* O157:H7 زنده ماندند. تیتر آنتی بادی در روش تزریقی نیز به شدت بالاتر از روش خوراکی بود (Baranvand and Honari 2016). در سال ۲۰۱۳ هنری و همکاران توالی پروتئین IpaD-STxB را در پلاسمید pET28a کلون ودر باکتری BL21 (DE3) تولید کردند. نتایج SDS-PAGE در این تحقیق با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت داشته و پروتئین با حدود وزن ۲٤ کیلودالتون را مشاهده کرده و با تکنیک وسترن بلاتینگ وجود پروتئین را اثبات کردند. هنری و همکاران پروتئین خالص شده حاصل را به‌همراه ادجوانت فروند و به‌میزان ۲۵ میکروگرم به هر خوکچه هندی تزریق و تیتر آنتی بادی را در زمان های مختلف انجام دادند. نتایج مطالعه حاضر با نتایج آن‌ها همخوانی دارد چالش خوکچه‌ها با شیگا توکسین *E. coli* O157:H7 (تزریق سم) و باکتری شیگلا فلکسنری تیپ ۱ (آلوده کردن چشم) صورت گرفت نتایج نشان‌دهنده این بود که خوکچه‌های ایمن شده تا ۲۸ برابر LD50 را تحمل کردند. منحنی تیتراسیون IgG در خوکچه هندی میزان بسیار بالاتری را نسبت به حالت مصرف نازال در تحقیق حاضر نشان داد (Honari et al. 2013). یکی از دلایل این امر هم ورود حجم بالای آنتی ژن در روش تزریقی نسبت به خوراکی و نازال می‌باشد. استفاده از لیگاند Co1 با هدف افزایش جذب آنتی ژن توسط سلول‌های M سطوح مخاطی در تحقیق حاضر وارد شد تا مقایسه‌ای بین سیستم مبتنی بر STxB و این لیگاند جدید صورت پذیرد. لیگاند Co1 با گیرنده C5aR در سطح سلول‌های M در موش و سلول‌های شبه M در انسان برهم کنش کرده و موجب جذب آنتی ژن فیوژ شده با آن و تحریک سیستمیک و مخاطی سیستم ایمنی می‌شود (Kim et al. 2012). اولین مورد پس از معرفی Co1 به‌عنوان لیگاند جهت انتقال پروتئین فیوژ شده به بدن در سال ۲۰۱۳ و برای Dengue virus (DENV) صورت گرفت نتایج این تحقیق نشان داد که تیتر IgG در بدن موش به‌طور معنی‌داری افزایش داشته است (Kim et al. 2013). در تحقیق حاضر نیز افزایش سطح تیتر آنتی بادی IpaD-Co1 نسبت به شاهد دیده می‌شود. اما این افزایش در قیاس با IpaD-STxB بسیار کمتر می‌باشد. دلایل احتمالی عملکرد بهتر STxB نسبت به Co1 در تحقیق حاضر را می‌توان در دو مورد بیان نمود. اولین مورد ماهیت آنتی ژنیک بودن STxB می‌باشد (Zhu et al. 2008). آنالیز اپی‌توپ‌های IpaD-STxB و IpaD-Co1 نشان داد که در پروتئین فیوژن IpaD-STxB ۲ توالی اپی‌توپیک با امتیاز بالا وجود دارد (sysbio.unl.edu/SVMTriP). توالی QSLLLSAQITGMTVTIKTNA اسید امینه ۱۵۸ تا ۱۷۷ (توالی مربوط به STxB) و گروه دیگر در موقعیت ۲۵ تا ٤٤ و با توالی ALHSSQISMDVNKSAQLLDI قرار دارد. اما آنالیز اپی‌توپ‌های پروتئین IpaD-Co1 تنها اپی‌توپ موقعیت ۲۵ تا ٤٤ را نشان می‌دهد که متعلق به ناحیه IpaD می‌باشد. دومین دلیل احتمالی نیز می‌تواند مربوط به فراوانی سلول‌های M در مخاط باشد که سلول‌های هدف Co1 هستند. حدود ۱۰ درصد سلول‌های اپیتلیال روده در موش M-Cell هستند. اما تمام سلول‌های مخاطی می‌توانند هدف ساختار پنتامری STxB و در نتیجه انتقال آنتی ژن هدف به درون لنف باشند. به‌طور کلی با وجود اینکه تعداد معدودی گزارش از کارایی مناسب لیگاند Co1 در انتقال آنتی ژن فیوژ شده به‌صورت خوراکی به بدن موش وجود دارد، اما در این تحقیق فیوژن IpaD-STxB نسبت به فیوژن IpaD-Co1 کارایی بهتری در تحریک سیستم ایمنی و ایجاد مقاومت به شیگا توکسین را نشان داد.

نتیجه گیری کلی

واکسیناسیون به‌عنوان مهمترین روش در مبارزه با عوامل بیماریزای عفونی در انسان مطرح می‌باشد. اما رساندن دارو و محتویات واکسن با روش تزریق از پوست معایب و خطرات مختص به خود را داراست. انواع روش‌های واکسیناسیون مخاطی امروزه مورد توجه پژوهشگران قرار دارد. اما یکی از معایب این روش‌ها عدم تحریک شدید سیستم ایمنی با این روش‌ها می‌باشد. برای غلبه بر این مشکل از ادجوانت‌ها کمک گرفته شده‌است. در این تحقیق ادجوانت STxB که از شیگا توکسین باکتری شیگلا جداسازی شده‌است با ادجوانت Co1 که در سال‌های اخیر معرفی شده‌است به آنتی ژن IpaD فیوژ شد تا میزان موفقیت هر یک از

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.4.0]

این ادجوانت‌ها برای تحریک سیستم ایمنی به روش نازال مورد بررسی قرار گیرد. به‌طور کلی برتری STxB نسبت به Co1 در تحریک سیستم ایمنی بر ضد شیگا توکسین در موش‌های تیمار شده، با تیتراسیون IgG و نیز چالش موشی، مشاهده شد. لیگاند Co1 نیز در قیاس با آنتی‌ژن بدون لیگاند تیتر IgG بالاتری را نشان داد. انجام تحقیقات دیگر در آینده با کمک سایر روش‌های مبتنی بر واکسیناسیون مخاطی ممکن است پاسخ های مناسب‌تری را در مورد ادجوانت‌های STxB و Co1 نشان داده و گامی روبه جلو برای ساخت واکسن مناسب برای بیماری شیگلا در آینده را موجب شود.

منابع

Azegami T, Yuki Y, Kiyono H (2014) Challenges in mucosal vaccines for the control of infectious diseases. International Immunology 26:517-28.

Baranvand M, Honari H (2015) Nasal immunogenicity induced by STxB and STxB-IpaD antigens in laboratory rats. Koomesh 16:397-403. (In Farsi)

Baranvand M, Honari H (2016) Evaluation of Immunogenicity of Chitosan Nanoparticles Containing STxB and STxB-IpaD Antigens of Shigella Dysenteriae Type 1 in Mice . Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 23:688-697. (In Farsi).

Batisse C, Dransart R. Ait Sarkouh R, Brulle L, Bai SK, Godefroy S, Johannes L, Schmidt F (2015) A new delivery system for auristatin in STxB-drug conjugate therapy. European Journal of Medicinal Chemistry 95: 483-491.

Daniel M, Bollag S, Edelstein G. Protein methods: Wiley-Liss New York; 1992.

Donohue-Rolfe A, Acheson DWK, Keusch GT (1991) Shiga Toxin: Purification, Structure, and Function. Keusch Reviews of Infectious Diseases 13: 293-S29.

Gupta P, Singh MK, Singh Y, Gautam V, Kumar S, Kumar O, Dhaked RK (2011) Recombinant Shiga toxin B subunit elicits protection against Shiga toxin via mixed Th type immune response in mice. Vaccine 29:8094-100.

Honari H, Amlashi I, Minaei ME (2014) Expression of Recombinant Proteins IpaD-STxB and Immunogenicity STxB in the Mice. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 23: 183-193.(In Farsi)

Kahsay AG, Muthupandian S (2016) A review on Sero diversity and antimicrobial resistance patterns of Shigella species in Africa, Asia and South America, 2001-2014. BMC Research Notes 9: 422.

Karande P, Mitragotri S (2010) Transcutaneous immunization: an overview of advantages, disease targets, vaccines, and delivery technologies. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering 1:175-201.

Kim SH, Lee KY, Jang YS (2012) Mucosal Immune System and M Cell-targeting Strategies for Oral Mucosal Vaccination. Immune Netw 12: 165-175.

Kim SH, Seo KW, Kim J, Lee KY, Jang YS (2010) The M cell-targeting ligand promotes antigen delivery and induces antigen-specific immune responses in mucosal vaccination. The Journal Immunology 185: 5787-5795.

Kim SH, Jung DI, Yang IY, Jang SH, Kim J, Truong TT, Pham TV, Truong NU, Lee K, Jang YS (2013) Application of an M-cell-targeting ligand for oral vaccination induces efficient systemic and mucosal immune responses against a viral antigen International Immunology 25:623-632.

Kurohane K, Kobayashi C, Imai Y (2005) Facilitated production of secretory IgA against Shiga toxin B subunits by intranasal application ofantigen-coated polystyrene microspheres. Microbiol Immunol 49: 149-154.

Madanchi H, Honari H, Hesaraki H, Sayadnanesh A (2012) Cloning and expression of stxBgene from shigella dysenteria typeI in *E. coli* Rosseta DE3.Genetics in the 3rd millennium. P2641-7.(In Farsi)

Martinez-Becerra FJ, Kissmann JM, Diaz-McNair J, Choudhari SP, Quick AM, Mellado-Sanchez G, Clements JD, Pasetti MF, Picking WL (2012) Broadly protective Shigella vaccine based on type III secretion apparatus proteins. Infection and immunity 80: 1222-31.

Melton-Celsa AR (2014) Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. Microbiol Spectr. 2:EHEC-0024-2013.

Ohno H (2016) Intestinal M cells. The Journal of Biochemistry 159: 151-160.

Picking WL, Nishioka H, Hearn PD, Baxter MA, Harrington AT, Blocker A, Picking WD (2005) IpaD of Shigella flexneri is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. Infection and Immunity 73: 1432-40.

Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. Volume 1-3 Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

The HC, Thanh DP, Holt KE, Thomson NR, Baker S (2016) The genomic signatures of Shigella evolution, adaptation and geographical spread. Nature Reviews Microbiology 14: 235-250.

Tonello F, Pellizzari R, Pasqualato S,Grandi G, Peggion E, Montecucco C (1999) Recombinant and truncated tetanus neurotoxin light chain: Cloning, expression, purification, and proteolytic activity. Protein Expression and Purification.15:221-7.

Zhu C, Yu J, Yang Z, Davis K, Rios H, Wang B (2008) Protection against Shiga toxinproducing Escherichia coli infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin subunit B. Clin Vaccine Immunol 15: 359-366.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.4.0]