

Production and purification of heat-labile toxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* and its detection by GM1 ganglioside receptor-ELISA based method

Khalesi R(M.Sc)¹, Salimian J(Ph.D)^{1*}, Nazarian SH(M.Sc)¹, Ehsaei Z(M.Sc)¹, Rahimi AA(Ph.D)¹,
Amini N(M.Sc)¹, Moazzeni SM(Ph.D)²

1- Department of Biology, Imam Hossein University, Tehran, Iran

2- Department of Immunology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 16 Jan 2011, Accepted: 15 March 2011

Abstract

Background: Enterotoxigenic *Escherichia coli* bacterium is the most important bacterial agent causing diarrhea. Specific virulence factors, such as enterotoxins and colonization factors, distinguish ETEC from other classes of diarrheagenic *E.coli*. In this study, heat-labile toxin was purified which could be utilized for anti-toxin assay in GM1 ganglioside receptor-ELISA based method and for identification of ETEC producing toxin.

Materials and Methods: In this experimental study, bacterial strain producing heat-labile toxin was first cultivated for production and purification of toxin. Then supernatant soluble proteins were precipitated with ammonium sulfate and purified using biochemical methods. Finally, purified protein was dialyzed against Tris 0.02 mM pH 8 and analyzed on gel electrophoresis. GM1 ganglioside receptor-ELISA based method was used for detection and assessment of the purified toxin. Through this method, the effect of anti-recombinant heat-labile toxin B subunit neutralization on heat-labile toxin was investigated.

Results: Toxin purification was revealed by the presence of 12 and 28 KD protein bands. This study demonstrated that anti-recombinant heat-labile toxin B subunit antibody can detect the purified toxin and can inhibit its binding to GM1 receptor up to 80%.

Conclusion: Purification of heat-labile toxin and ganglioside receptor-ELISA assay can be used for accurate detection and epidemiological study of clinical isolates.

Keywords: Antibody against recombinant B subunit, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, GM1 ganglioside receptor-ELISA, Heat-labile enterotoxin

*Corresponding author:

Address: Department of Biology, Imam Hossein University, Tehran, Iran
Email: salimian@modares.ac.ir

تولید و تخلیص توکسین حساس به حرارت باکتری اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک و شناسایی آن با روش الایزای مبتنی بر گیرنده گانگلیوزیدی GM1

راضیه خالصی¹، جعفر سلیمیان^{2*}، شهرام نظریان¹، زهرا احصائی¹، علی اصغر رحیمی³، نفیسه امینی¹، سید محمد مؤذنی⁴

1- کارشناس ارشد زیست شناسی علوم سلولی - مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

2- استادیار، دکترای ایمونولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

3- دکترای بیوتکنولوژی مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

4- استاد، دکترای ایمونولوژی، گروه علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 89/10/26 تاریخ پذیرش: 89/12/25

چکیده

زمینه و هدف: باکتری اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک مهم‌ترین عامل باکتریایی ایجاد کننده اسهال است. عوامل حدت زای اختصاصی مانند انتروتوکسین‌ها و عوامل کلونیزاسیون، این باکتری را از سایر گروه‌های ای.کلی متمایز می‌کند. در این مطالعه توکسین حساس به حرارت تخلیص شده و از آن می‌توان جهت سنجش آنتی توکسین در روش الایزای مبتنی بر گیرنده گانگلیوزیدی GM1 و شناسایی باکتری مولد توکسین استفاده کرد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع تجربی است. جهت تولید و تخلیص توکسین، ابتدا سویه باکتری مولد توکسین حساس به حرارت کشت داده شد. پروتئین‌های محلول در مایع رویی با سولفات آمونیوم ترسیب و توکسین با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی تخلیص شد و پروتئین تخلیص شده علیه تریس 0/02 مولار در pH=8 دیالیز و نمونه بر روی ژل الکتروفورز بررسی گردید. از روش الایزای مبتنی بر گیرنده گانگلیوزیدی GM1 جهت شناسایی و سنجش میزان توکسین تخلیص شده استفاده شد و اثر خنثی‌کنندگی آنتی بادی ضد زیر واحد B روی توکسین حساس به حرارت نیز به این روش مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: وجود باندهای 28 و 12 کیلودالتونی نشان‌گر تخلیص توکسین بود. این مطالعه نشان داد که آنتی بادی ضد زیر واحد B نوترکیب، توانایی شناسایی توکسین تخلیص شده و مهار اتصال آن به گیرنده GM1 را داراست. آنتی بادی ضد زیر واحد B نوترکیب می‌تواند تا 80 درصد از اتصال توکسین به گیرنده GM1 جلوگیری نماید.

نتیجه گیری: تخلیص توکسین حساس به حرارت و راه اندازی روش الایزای مبتنی بر گیرنده گانگلیوزیدی GM1 که می‌تواند در شناسایی دقیق و بررسی اپیدمیولوژیک جدایه‌های کلینیکی مورد استفاده واقع شود.

واژگان کلیدی: آنتی بادی ضد زیر واحد B نوترکیب، اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک، روش الایزای مبتنی بر گیرنده گانگلیوزیدی GM1، انتروتوکسین حساس به حرارت

*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

Email: salimian@modares.ac.ir

مقدمه

باکتری اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک (EPEC) مهم‌ترین عامل باکتریایی ایجاد کننده اسهال (1) و مسئول میزان قابل توجهی از بیماری‌ها و مرگ و میر ناشی از اسهال در میان کودکان (زیر 5 سال) در کشورهای در حال توسعه، مسافری به مناطق گرمسیری و اندمیک می‌باشد (2، 3). حدود 70-30 درصد موارد اسهال به دلیل عفونت‌های باکتریایی بوده (4) و شایع‌ترین باکتری جدا شده از بیماران، اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک می‌باشد (5). فاکتورهای ویروالانس اختصاصی مانند انتروتوکسین‌ها و فاکتورهای کلونیزاسیون، EPEC را از سایر گروه‌های اشریشیا کلی ایجاد کننده اسهال متمایز می‌سازد. این باکتری قادر به تولید توکسین‌های حساس به حرارت (LT) و یا مقاوم به حرارت (ST) می‌باشد (6).

انتروتوکسین LT با وزن مولکولی تقریبی 86 کیلودالتون، از نظر ساختاری و عملکردی متعلق به خانواده توکسین‌های AB5 است (6، 7) و از یک زیر واحد A به وزن مولکولی 28 کیلودالتون و پنج زیر واحد B به وزن مولکولی 57 کیلودالتون (هر زیر واحد 11/5 کیلودالتون) تشکیل شده است (5، 8). هر کدام از این زیر واحدها به عنوان یک پلی پپتید پیش ساز سنتز می‌شوند (9) و پس از شکست پپتید نشانه، هوموپنتامر B به وسیله پیوند غیر کووالانسی به زیر واحد A متصل شده و توکسین کامل ایجاد می‌گردد (10). زیر واحد A دارای فعالیت توکسیک و زیر واحد B مسئول اتصال توکسین به گیرنده GM1 موجود در سطح انتروسیت‌های روده می‌باشد (6، 7). در اتصال توکسین، 5 زیر واحد B به 5 گیرنده GM1 متصل می‌شوند (11). سپس کمپلکس GM1-LT به درون سلول اندوسیتوز گشته و زیر واحد A با اثر سمی خود منجر به ترشح آب و الکترولیت‌ها و مهار جذب یون‌های نمک (NaCl) از سلول‌های رأسی ویلی و ایجاد اسهال می‌گردد (5).

گزارشات قبلی نشان می‌دهد که خالص سازی توکسین LT به منظور کاربرد در تولید واکسن و هم‌چنین سنجش میزان آنتی بادی خنثی کننده در مدل‌های واکسن

استفاده می‌شود (12). استراتژی تولید واکسن بر اساس توکسین LT یکی از رویکردهای توسعه واکسن علیه EPEC است (13). بر اساس این رویکرد از این توکسین در نوارهای جذب پوستی جهت ایمن سازی افراد در آزمون بالینی استفاده و هم‌چنین واکسن‌های کانژوگ توکسین با سایر اجزای باکتری نیز گزارش شده است. نتایج حاکی از تولید آنتی توکسین خنثی کننده سیستمی و موضعی می‌باشد (14، 15). از توکسین LT برای سنجش میزان آنتی بادی‌های خنثی کننده در الایزا و به چالش کشیدن مدل‌های حیوانی واکسینه نیز استفاده می‌شود (12).

ما در مطالعات قبلی تهیه و تخلیص اجزای ایمونوژن باکتری (LTB, CfaB, CfaE) را به عنوان کاندیدای جزئی از واکسن گزارش کردیم (17-15). در این مطالعه توکسین LT تخلیص شد. از این توکسین می‌توان جهت سنجش آنتی توکسین به دست آمده از حیوان مدل با استفاده از تکنیک الایزا مبتنی بر گیرنده گانگلیوزیدی GM1 (GM1-ELISA) و شناسایی EPEC مولد توکسین بهره جست.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از سویه باکتری EPEC مولد LT (ATCC 35401) جهت تخلیص توکسین استفاده شد.

جهت تولید توکسین، باکتری EPEC در محیط کشت حاوی کاز آمینو اسید 2 درصد، عصاره مخمر 0/15 درصد، محیط نمکی (CYE) و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با 200 دور در دقیقه و به مدت 18 ساعت کشت داده شد (18). سپس به مدت 20 دقیقه در 16000g سانتریفیوژ گردید و مایع رویی تا زمان استفاده در 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آمونیوم سولفات (اشباع 90 درصد) در دمای 4 درجه سانتی‌گراد همراه با هم زدن به مایع رویی افزوده شد. پس از گذشت یک شب در دمای 4 درجه سانتی‌گراد، رسوب حاصل جمع‌آوری و در تریس 0/02 مولار حل گردید. محلول حاصل به مدت 20-18

درجه سانتی گراد صورت پذیرفت. پس از شستشو و خشک کردن، توکسین تخلیص شده با سریال رقت از 2 میکروگرم تا 125 نانوگرم به هر چاهک اضافه و به مدت 1 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد نگهداری شد. بقیه مراحل با آنتی بادی ضد rLTB با رقت 1/200 و کانژوگه موشی با رقت 1/2000 صورت گرفت.

با توجه به این که توکسین LT دارای دو زیر واحد A و B می باشد لذا می توان از آنتی بادی ضد LTB نو ترکیب در شناسایی این توکسین سود جست. برای این منظور، از این آنتی بادی در مهار اتصال توکسین با گیرنده GM1 استفاده نمودیم. برای این کار ابتدا 2 میکروگرم از توکسین LT تخلیص شده به سریال رقت آنتی بادی (1:2 تا 1:64) اضافه گردید و به مدت 1 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد نگهداری شد، سپس این مخلوط به میکروپلیت های حاوی سه میکروگرم از GM1 افزوده شد. بقیه مراحل همانند GM1-ELISA بود.

یافته ها

پس از رشد باکتری در محیط کشت مناسب، ابتدا توکسین LT با استفاده از روش های رسوب دهی - دیالیز تخلیص و میزان خلوص آن بر روی ژل 12 درصد SDS-PAGE بررسی گردید. شکل 1، دو باند 11/5 و 28 کیلودالتونی را نشان می دهد که به ترتیب مربوط به زیر واحد B و A توکسین LT تخلیص شده می باشد. تکنیک ایمونوبلات با استفاده از Anti-rLTB نشان دهنده حضور زیر واحد B توکسین است.

با استفاده از روش GM1-ELISA، پیوند هولوتوکسین تخلیص شده با گیرنده گانگلیوزیدی GM1 بررسی گردید. نمودار 1 نمایانگر پیوند توکسین LT تخلیص شده به گیرنده خود از 2 میکروگرم تا 125 نانوگرم می باشد.

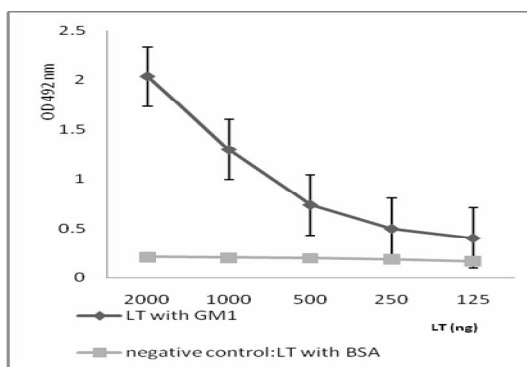
نمودار 2 نشان می دهد که آنتی بادی ضد LTB نو ترکیب، توانایی شناسایی توکسین تخلیص شده و مهار اتصال آن به گیرنده GM1 را داراست. نمودار 2 حاکی از

ساعت بر روی محلول تریس 0/02 مولار در 4 درجه سانتی گراد دیالیز و در 20- درجه سانتی گراد نگهداری شد (19،5).

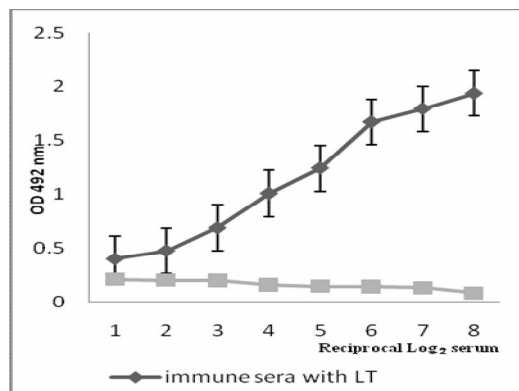
پس از کشت باکتری و انجام مراحل ترسیب و جمع آوری پروتئین، غلظت نمونه توکسین حاصل به کمک روش برادفورد تعیین گردید. در این روش از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد استفاده شد (22). سپس جهت بررسی توکسین و زیر واحدهای آن، نمونه توکسین تخلیص شده همراه با مارکر پروتئینی (SM0671 فرمنتاز) تحت شرایط دناتورده روی ژل 12 درصد SDS-PAGE الکتروفورز گردید و زیر واحدهای A و B آن مورد بررسی قرار گرفت (20). هم چنین این نمونه بر روی غشای نیتروسولوز منتقل شد و ایمونوبلات (Biorad) با استفاده از آنتی بادی ضد LTB نو ترکیب (15، 16) جهت شناسایی زیر واحد B توکسین صورت گرفت (20).

به منظور شناسایی و سنجش میزان توکسین LT از تکنیک GM1 الایزا (GM1-ELISA) (DYNEX) استفاده شد. روش GM1-ELISA یک روش استاندارد برای تشخیص و سنجش میزان اتصال توکسین LT به گیرنده گانگلیوزیدی GM1 است. در این روش ساختار پنتامری زیر واحد B توکسین نیز مورد تأیید قرار می گیرد. روش GM1-ELISA در ابتدا توسط سونر هولم (1983) ابداع شد و سپس توسط ما (Ma-2006) مورد تغییر قرار گرفت (21-23).

طبق روش استاندارد، سه میکروگرم گانگلیوزید GM1 (Sigma G-7641) در 100 میکرولیتر بافر کربنات - بی کربنات (pH=9/6) به هر چاهک میکروپلیت (Nunc, Denmark) اضافه و به چاهک های کنترل منفی BSA افزوده شد و به مدت 2 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد قرار داده شد. در بین تمامی مراحل الایزا، شستشو با بافر PBST (pH=7/2 و 0/05 درصد توئین 20) انجام شد. سپس مرحله بلوکه کردن با افزودن محلول شیر خشک 2 درصد در بافر PBST به مدت 1 ساعت در 37



نمودار 1. شناسایی و سنجش میزان توکسین LT با تکنیک الایزای مبتنی بر گیرنده گانگلیوزیدی M1

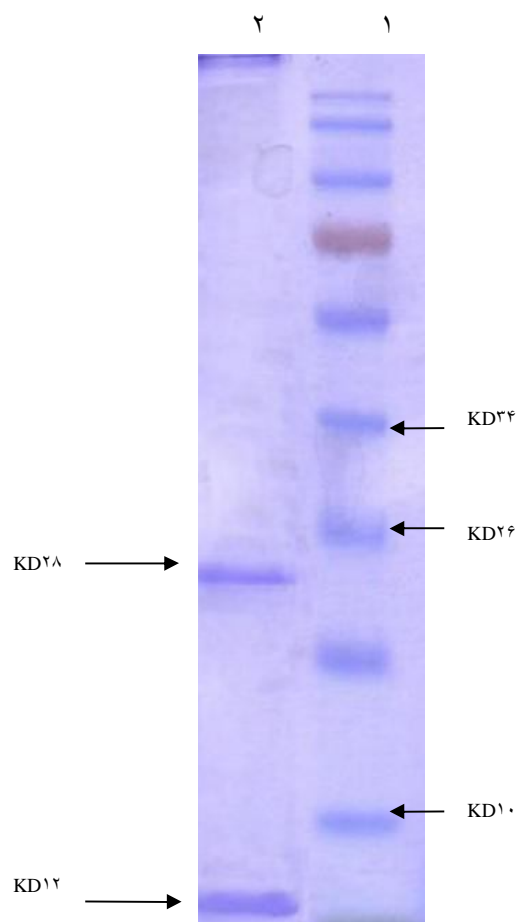


نمودار 2. بررسی اثر مهار آنتی بادی ضد LTB نو ترکیب بر روی توکسین LT با تکنیک الایزای مبتنی بر گیرنده گانگلیوزیدی M1

بحث

از رایج‌ترین اصول در مدیریت بیماری اسهال ناشی از ETEC، تامین مایعات و دارو درمانی است. آنتی بیوتیک‌ها یکی از عوامل مورد استفاده برای کنترل علائم هستند و باعث از بین بردن باکتری‌ها می‌شوند اما توکسین را مهار نمی‌کنند. علاوه بر آن مقاومت روز افزون باکتری به آنتی بیوتیک در مناطق اندمیک تأییدی بر لزوم تحقیق در این زمینه و تهیه واکسن موثر علیه این بیماری است. بدین منظور جهت پیش‌گیری از اسهال ناشی از این باکتری، به کارگیری عوامل مهار کننده توکسین می‌تواند حائز اهمیت باشد. برای تولید واکسن عوامل ایمونوژن متعددی وجود دارد که از جمله می‌توان به زیر واحد A، زیر واحد B و توکسوئید کامل اشاره نمود (23). اگر چه در مقالات متعدد

آن است که آنتی بادی ضد LTB نو ترکیب می‌تواند تا 80 درصد از اتصال توکسین به گیرنده GM1 متصل به میکروپلیت جلوگیری نماید. سرم‌های موش‌های غیرایمن به عنوان کنترل منفی استفاده شد، این سرم‌ها به هیچ عنوان ممانعتی را نشان ندادند.



شکل 1. الکتروفورز توکسین LT تخلیص شده روی ژل SDS-PAGE دوازده درصد

ردیف 1: نشانگر پروتئینی SM0671

ردیف 2: زیرواحد های A و B توکسین LT به ترتیب با وزن مولکولی تقریبی 28 و 12 کیلو دالتون

وارد واکنش شده و توانایی اتصال به گیرنده GM1 را از دست داده است. منز و همکاران (2006) آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی ضد LTB و آنتی بادی مونوکلونال موشی را تولید و از آن در واکنش الایزا برای تشخیص توکسین استفاده نمودند و اذعان داشتند که آنتی بادی قادر است توکسین را در شکل فضایی خود مورد شناسایی قرار دهد (6).

نتیجه گیری

یکی از راه‌های شناسایی باکتری اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک استفاده از روش‌های تشخیص ژنتیک مولکولی است. با استفاده از این روش‌ها می‌توان تنها حضور ژن در باکتری را تأیید کرد اما نمی‌توان فعال بودن ژن را مورد بررسی قرار داد. برای مثال می‌توان با طراحی یک جفت پرایمر برای توکسین LT، باکتری مولد LT را با یک واکنش PCR شناسایی نمود. از آنجایی که اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک به وسیله انتروتوکسین‌های تولید شده مورد شناسایی قرار می‌گیرد، در این مطالعه روش GM1-ELISA مورد استفاده قرار گرفت. این روش علاوه بر تأیید وجود ژن، فعال بودن و بیانی بودن ژن را نیز نشان می‌دهد. لذا راه‌اندازی روش GM1-ELISA می‌تواند در شناسایی دقیق و بررسی اپیدمیولوژیک جدایه‌های کلینیکی مورد استفاده واقع شود. هم‌چنین، بر اساس نتایج حاصل از بررسی اثر خنثی‌کنندگی آنتی بادی ضد LTB نو ترکیب بر روی توکسین LT پیشنهاد می‌شود که می‌توان از توکسین LT تخلیص شده به عنوان جزیی از کاندیدای واکنش استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات جناب آقای دکتر سلیمانان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Wenneras C, Erling V. Prevalence of Enterotoxigenic Escherichia coli-associated Diarrhoea and Carrier State in the Developing World. J HealthPopul Nutr. 2004;22(4):370-82.

بر نقش مهم زیر واحد B به عنوان ایمونوژن و ادجوان قوی تأکید شده است (24) و نشان داده‌اند که آنتی بادی علیه این زیر واحد می‌تواند از اتصال سم به گیرنده جلوگیری نماید (5، 6، 11) اما برخی مقالات بر این تأکید دارند که آنتی بادی علیه توکسین کامل می‌تواند اپی‌توپ‌های زیر واحد A و اپی‌توپ‌های مشترک میان این دو زیر واحد را شناسایی و اثرات توکسیک آن را با کارایی بالاتری مهار نماید (14، 15، 25). بنابراین می‌توان این طور بیان داشت که تخلیص توکسین حساس به حرارت باکتری اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک از اهداف این تحقیق است.

با استفاده از روش بهینه شده اوانس (19) و کانکل (20)، توکسین حساس به حرارت تخلیص و دو باند با وزن مولکولی تقریبی 28 و 12 کیلو دالتون بر روی ژل الکتروفورز در شرایط دنا توره دیده شد که با نتایج پیزا (2006) نیز هم‌خوانی دارد و نشان دهنده دو زیر واحد A و B این توکسین است (26).

سونرهولم (22) و ما (23) روش GM1-ELISA را به عنوان یک روش کارا و اقتصادی برای ردیابی و تشخیص توکسین حساس به حرارت پایه‌گذاری کردند و نشان دادند که می‌توان از آن برای اثبات وجود توکسین و شناسایی سویه‌های مولد انتروتوکسین بهره برد. با استفاده از این روش نشان دادیم که پروتئین خالص شده از باکتری اشریشیاکلی همانند توکسین توانایی اتصال به گیرنده GM1 را داراست. این مطلب می‌تواند تأییدی بر وجود انتروتوکسین حساس به حرارت و صحت خالص سازی آن باشد. هم‌چنین این آزمایش می‌تواند دال بر عدم وجود تغییرات اساسی در ساختار و فولدینگ توکسین حساس به حرارت (AB₅) باشد، زیرا توکسین تنها در حالت فولدینگ مناسب توانایی اتصال به این گیرنده را دارد.

آنتی بادی ضد زیر واحد B نو ترکیب می‌تواند به زیر واحد B پنتامر در حالت اتصال به زیر واحد A پیوند یابد و از این طریق مانع اتصال هولوتوکسین به گیرنده GM1 در واکنش الایزا گردد. این مطالعه حاکی از آن است که توکسین تخلیص شده با آنتی بادی ضد rLTB

2. Stauffer WM, Konop RJ, Kamat D. Traveling with infants and young children. Part III: travelers' diarrhea. *Journal of travel medicine*. 2002;9(3):141-50.
3. Steffen R, debernardis C, Baños A. Travel epidemiology—a global perspective. *International journal of antimicrobial agents*. 2003;21(2):89-95.
4. Eisenstein BI, Zaleznik DF. Enterobacteriaceae. In: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases; 2000,p:2294-309
5. Nicklasson M. Studies on the Expression and Regulation of Enterotoxins and Colonization Factors in Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) [Doctoral thesis]: University of Gothenburg. Sahlgremska Academy; 2008.
6. Menezes CA, Imamura SY, Trabulsi LR, Fernandes-Filho A, Martinez MB, Guth BEC, et al. Production, characterization, and application of antibodies against heat-labile type-I toxin for detection of enterotoxigenic Escherichia coli. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006;101(8):875-80.
7. Holmgren J. Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. 1981;292:413-7.
8. Dallas WS, Falkow S. Amino acid sequence homology between cholera toxin and Escherichia coli heat-labile toxin. 1980;288:499-501.
9. Millar DG, Hirst TR, Snider DP. Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. *Infection and immunity*. 2001;69(5):3476-82.
10. Hofstra H, Witholt B. Heat-labile enterotoxin in Escherichia coli. Kinetics of association of subunits into periplasmic holotoxin. *Journal of Biological Chemistry*. 1985;260(29):16037-44.
11. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque A, Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(3):465-83.
12. Walker RI, Steele D, Aguado T, Ad Hoc E. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic E. coli (ETEC) disease. *Vaccine*. 2007;25(14):2545-66.
13. Svennerholm AM, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic Escherichia coli. *Expert review of vaccines*. 2008;7(6):795-804.
14. Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic Escherichia coli. *Clinical microbiology reviews*. 1997;10(4):569-84.
15. McKenzie R, Bourgeois AL, Frech SA, Flyer DC, Bloom A, Kazempour K, et al. Transcutaneous immunization with the heat-labile toxin (LT) of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC): protective efficacy in a double-blind, placebo-controlled challenge study. *Vaccine*. 2007;25(18):3684-91.
16. Khalesi R, Sh N, Ehsaei Z, Mansouri M, Amani J, Salimian J, et al. Optimization of gene expression and purification of enterotoxigenic Escherichia coli recombinant LTB protein and antibody production against it. *Kowsar Medical Journal*. 2010;15(3):141-7.
17. Mansouri M. Cloning, Expression and murine antibody response assay to minor subunit Colonization factor I (CfaE). [MSc thesis]. Immam Hossein University, 2010.
18. Ehsaei Z. Cloning, Expression, Purification and Production of antibody against major subunit Colonization factor I (CfaB) as a candidate component of vaccine. [MSc thesis]. Immam Hossein University, 2010.
19. Evans DG, Evans Jr DJ, Pierce NF. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of Escherichia coli. *Infection and immunity*. 1973;7(6):873-880.
20. Kunkel SL, Robertson DC. Purification and chemical characterization of the heat-labile enterotoxin produced by enterotoxigenic Escherichia coli. *Infection and immunity*. 1979;25(2):586-96.
21. Bollag DM, Michel DR, Edelstein SJ. *Protein Methods*. 2nd edition. New York: Wiley-Liss 1996:50-127.
22. Svennerholm A, Wiklund G. Rapid GM1-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Journal of clinical microbiology*. 1983;17(4):596-600.

23. Ma X, Zheng W, Wang T, Wei D, Ma Y. Optimization and High-level Expression of a Functional GST-tagged rHLT-B in *Escherichia coli* and GM1 Binding Ability of Purified rHLT-B. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL*. 2006;44(3):293-300.
24. Chen JC, Ho TY, Chang YS, Wu SL, Hsiang CY. Anti-diarrheal effect of *Galla Chinensis* on the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and ganglioside interaction. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;103(3):385-91.
25. Hajishengallis G, Arce S, Gockel C, Connell T, Russell M. Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or tolerance: applications for oral infections. *Journal of dental research*. 2005;84(12):1104-16.
26. Pizza M, Fontana MR, Giuliani MM, Domenighini M, Magagnoli C, Giannelli V, et al. A genetically detoxified derivative of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin induces neutralizing antibodies against the A subunit. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(6):2147-53.