JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2019; 22(1)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

Design, Construction, Expression and Purification of the Gene Encoding Chimeric Cfae, Cotd Protein, from *Enterotoxigenic Escherichia Coli*

Pooneh Roghanian[1], Jafar Amani[2*], Shoreh Zare[3], Zahra Nour Mohammadi[1]

1. Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history

Received: 02 July 2018

Accepted: 19 December 2018

Published online: 20 April 2019

Keywords

CfaE

Enterotoxigenic Escherichia coli

Fimbriae proteins

Recombinant protein

*** Corresponding Author:**

Jafar Amani; P.O. Box 19395- 5487, Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, After Sheykh Bahaei Ave, Vanak Sq. Molasadra St. Tehran, Iran.

Fax: +98 21 8248 2549

Email: jafar.amani@gmail.com

ABSTRACT

Background and Aim: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is one of the most common bacterial causes of diarrhea deaths among children and travelers in developing countries. The ETEC colonization factors, such as CFA/I and CS2 play an important role in the development of the disease. In this study, to produce the CFaE fusion recombinant protein, the tip subunits CFA/I(CfaE) and sub structural unit of CS2 (CotD) from ETEC, were used. Since mucosal immune responses to CFs can prevent disease, the aim of this study was to develop a chimeric antigen for developing the effective vaccine.

Materials and Methods: In order to amplify the cfae-cotd gene, a dual gene construct consisting of cfae and cotd, the PCR reaction was performed by designed primers. The propagated gene was cloned in the expression vector pET28a. Following the induction of a recombinant gene construct with IPTG, the recombinant protein was expressed and purified by Ni-NTA chromatography column and confirmed by western blotting by Anti-Histag.

Ethical Considerations: This study with research ethics code IR.IAU.SRB.REC.1397.066 has been approved by research ethics committee at Islamic Azad University, Science and Research Branch of Tehran, Iran.

Findings: Cloning accuracy was confirmed by PCR and enzyme digestion reaction. The presence of the band in the SDS-PAGE 10% gel in the 68 kDa region, the expression of the recombinant protein, and the presence of the band on the nitrocellulose paper in the Western blotting test confirmed the production of recombinant protein.

Conclusion: Optimization of codon and expression in heterologous hosts is a useful method for the production of recombinant proteins. The production of ETEC antigens as a candidate for vaccination against this bacterium is also prominent.

© Copyright (2019) Arak University of Medical Sciences

Use your device to scan and read this article online:

Roghanian P., Amani J., Zare SH., et al. Design, Construction, Expression and Purification of the Gene Encoding Chimeric Cfae, Cotd Protein, from Enterotoxigenic Escherichia Coli. J Arak Uni Med Sci. 2019; 22(1): 96-107.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

JAMS
مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک
دوره بیست و دو، شماره یک، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸
journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

مقاله پژوهشی

طراحی، ساخت، بیان و تخلیص ژن کدکننده پروتئین کایمر CfaE, CotD از باکتری *Enterotoxigenic Escherichia coli*

پونه روغنیان[۱]، جعفر امانی[۲*]، شهره زارع[۳]، زهرا نورمحمدی[۱]

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.

۳. گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۹/۲۸

تاریخ انتشار: ۹۸/۰۱/۳۱

واژگان کلیدی

پروتئین نوترکیب

CfaE

Enterotoxigenic *Escherichia coli*

Fimbriae proteins

***نویسنده مسئول:**

جعفر امانی

آدرس پستی: ایران، تهران، خیابان ملاصدرا، میدان ونک، بعد از خیابان شیخ بهایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی.

صندوق پستی: ۵۴۸۷-۱۹۳۹۵.

نمابر: +98 21 8248 2549

E-mail: jafar.amani@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) یکی از رایج‌ترین علل باکتریایی مرگ و میر ناشی از اسهال در کودکان و مسافران کشورهای در حال توسعه می‌باشد. فاکتورهای کلونیزاسیون ETEC مانند CFA / I و CS2 نقش مهمی در ایجاد بیماری دارند. در این مطالعه برای ساخت پروتئین نوترکیب از همجوش زیرواحد راسی CFA / I (CfaE) و زیر واحد ساختاری CS2 (CotD) از ETEC استفاده شده است. از آن‌جایی که پاسخ‌های ایمنی مخاطی روده علیه CFها می‌تواند مانع از ایجاد بیماری شود، مطالعه حاضر با هدف تولید آنتی‌ژن کایمریک به جهت ساخت واکسن موثر علیه باکتری ETEC انجام شد.

مواد و روش‌ها: به منظور تکثیر ژن cotd-cfae، از ساختار ژنی دوگانه متشکل از cfae و cotd، واکنش PCR توسط پرایمرهای طراحی‌شده انجام شد. ژن تکثیر شده در وکتور بیانی pET28a همسانه‌سازی شد. در پی القای سازه ژنی نوترکیب با ماده‌ی IPTG، پروتئین نوترکیب بیان و با ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی، خالص‌سازی و به وسیله وسترن بلاتینگ توسط Anti-Histag تایید شد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه با کد IR.IAU.SRB.REC.1397.066 در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به تصویب رسیده است.

یافته‌ها: صحت همسانه سازی با استفاده از کلونی PCR و واکنش هضم آنزیمی تایید شد. حضور باند در ژل 10% SDS-PAGE در محدوده‌ی ۶۸ کیلو دالتونی، بیان پروتئین نوترکیب و هم‌چنین حضور باند بر کاغذ نیتروسلولز در محدوده مذکور در آزمون وسترن بلاتینگ، تاییدی بر تولید پروتئین نوترکیب بود.

نتیجه‌گیری: بهینه سازی کدون و بیان در میزبان‌های هترولوگ یک روش مفید در تولید پروتئین‌های نوترکیب است. هم‌چنین تولید آنتی ژن‌های ETEC به عنوان کاندید واکسیناسیون بر علیه این باکتری مطرح می‌باشد.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

۱. مقدمه

بیماری ناشی از *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) یکی از مشکلات اصلی سلامت در کشورهای درحال توسعه به شمار می‌رود. اسهال ناشی از ETEC در میان نوزادان و مسافران، به ویژه در کشورهای جهان سوم به دلیل عدم وجود امکانات بهداشتی و درمانی، شیوع دارد و سالانه تلفات انسانی و زیان‌های اقتصادی زیادی را به جوامع تحمیل می‌کند. مطالعات حاکی از ۸۴۰ میلیون مورد فرد مبتلا به ETEC در سال می‌باشد که حدود ۲۸۰ میلیون نفر از این تعداد کودکان زیر ۵ سال هستند و سالیانه تعداد زیادی از آن‌ها به همین علت فوت می‌شوند (۱). عفونت ETEC از طریق مدفوع منتقل می‌شود. باکتری ETEC بعد از ورود به بدن انسان از طریق مواد غذایی و آب آشامیدنی آلوده، توسط فاکتورهای کلونیزاسیون (Colonization factor) (CF) و آنتی‌ژن‌های سطحی کلی (Coli surface) (CS) در سطح سلول‌های روده کوچک کلونیزه می‌شود. سپس، انتروتوکسین‌های حساس به حرارت (Heat labile enterotoxin) (LT) و مقاوم به حرارت (Heat stable enterotoxin) (ST) را ترشح می‌کنند که باعث خروج آب و الکترولیت‌ها می‌شوند (۲، ۳). باکتری ETEC باعث اسهال آبکی خفیف تا شدید می‌گردد و به طور معمول حاوی خون نمی‌باشد. بیماری ایجادشده مشابه وبا است و به سرعت می‌تواند سبب کم‌آبی شود (۴). اهمیت بیماری اسهال ناشی از ETEC و هم‌چنین روند افزایشی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، سازمان‌های بهداشتی را بر آن داشته تا به دنبال طراحی و تهیه واکسن کارآمد باشند (۵، ۶). تنوع فاکتورهای کلونیزاسیون به دلیل تفاوت در توالی‌های آمینواسیدی زیر واحدهای ساختاری فیمبریه چسبنده می‌باشد و تاکنون بیش از ۲۵ نوع از CF شناسایی شده است. سویه‌های مختلف ETEC در انسان، تعداد زیادی فیمبریای متمایز را از نظر سرولوژیکی بیان می‌کنند که از طریق مسیر متناوب چاپرون (Alternate Chaperon Pathway) (ACP) یا مسیر راهنما/چاپرون (Chaperon/usher pathway) (CUP) گرد هم می‌آیند (۷). تاکنون تعداد زیادی از آنتی‌ژن‌های (Ag) عامل کلونیزاسیون شناسایی شده‌اند که شامل CFA/I، CFA/III، CFA/IV و تعداد زیادی از آنتی‌ژن‌های سطحی (CS) می‌باشند. شواهد زیادی مبنی بر ایجاد مصونیت گسترده علیه این بیماری توسط فاکتورهای کلونیزاسیون وجود دارد. بنابراین طراحی واکسن بر اساس این فاکتورهای کلونیزاسیون می‌تواند برای مقابله با این بیماری امری ضروری به نظر رسد (۸، ۹). از میان انواع CFهای شناخته شده در میان سویه‌هایETEC، CFA/I از رایج‌ترین و اصلی‌ترین آنتی‌ژن‌های کلونیزاسیون فاکتور می‌باشد. CFA/I دارای ساختار رشته‌ای می‌باشد و از هزاران زیرمجموعه ساختاری CFaB که تشکیل ساقه را می‌دهند و همین‌طور از یک یا چند زیرواحد CFaE که در نوک ساقه قرار گرفته‌اند، تشکیل شده است (۱۰، ۱۱). به نظر می‌رسد در سال‌های اخیر برای توسعه واکسن‌های نوترکیب علیه باکتری ETEC، به دلیل نیاز باکتری برای اتصال به سلول‌های اپتلیال به زیرواحد CFaE، به این زیرواحد توجه زیادی شده است (۱۲، ۱۳). زیرواحد CfaE برای اتصال باکتری ضروری است و آنتی‌بادی‌های (Ab) علیه این زیرواحد می‌تواند از اتصال آن به روده جلوگیری کند و مانع ایجاد بیماری شود (۱۰). مطالعات منصوری و همکاران نشان داد که CfaE می‌تواند به عنوان یک ایمونوژن قوی برای تولید واکسن مطرح باشد (۱۳). از دیگر انواع CFهای حائز اهمیت می‌توان به CFA/II اشاره کرد که شامل سه آنتی‌ژن سطحی Coli به نام‌های CS1، CS2 و CS3 می‌باشد. مطالعات بر روی انسان و حیوانات نشان داد CFA/II از فاکتورهای مهم برای کلونیزاسیون روده توسط ETEC است. آنتی‌بادی‌های علیه CFA/II نیز در جلوگیری از کلونیزه کردن نقش مهمی ایفا می‌کنند و همین‌طور ایمن‌سازی با باکتری CFA/II^{+} خالص‌شده در انسان تحریک ایمنی را به دنبال داشته است (۱۴). برخلاف CFA و پیلی CS1 که در پلاسمید کدگذاری می‌شوند، پیلی CS2 توسط ژن‌های کروموزومی بیان می‌شود و برای کدشدن نیازمند به ۴ ژن پیوسته *cota*، *cotb*، *cotc* و *cotd* می‌باشد (۱۵). فیمبریه CotD پروتئینی با وزنی حدود ۳۸/۹ کیلودالتون بوده که در نوک فیمبر یافت شده است و زیرواحد کوچک فیمبریا (minor fimbria subunit) می‌باشد

(۱۶). زینال زاده و همکاران در سال۲۰۱۷، پروتئین همجوشی به نام 3CL را طراحی نموده و ساختند که شامل CFaB و CFA/I واحد ساختاری CS6 و نیز زیرواحد B سم LT و STa می‌باشد. برای رسیدن به سطح بالایی از بیان ژن 3CL از ترجیح کدونی *E. coli* استفاده کردند. هم‌چنین ایمنی‌زایی آن در موش‌ها، بررسی و حفاظت از موش‌ها را در چالش مقابله با ETEC به دنبال داشت (۱۷). در سال ۲۰۱۶، غیبی و همکاران بر روی ساخت و ساز و خواص ایمنی یک پروتئین کایمریک شامل CFaB، CFaE و LTB علیه اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک کار کردند. آن‌ها پروتئین نوترکیب تولیدی و تخلیص‌شده را برای بررسی ایمنی‌زایی به موش تزریق کردند. تیتر آنتی‌بادی تولیدشده حاکی از افزایش قابل‌توجه IgG بود. هم‌چنین سلول‌های ETEC با سرم موش ایمن‌شده، تیمار شد و توانایی اتصال باکتری ETEC را به سلول و HT2 آدنوکارسینوما انسانی کاهش داد (۱۲). در این مطالعه تلاش بر این شد که یک کاندیدای واکسن جدید علیه این بیماری طراحی گردد. هدف از این تحقیق، استفاده از یک پروتئین کایمر متشکل از زیر واحد اصلی آنتی‌ژن عامل کلونیزاسیون CFA/I و CS2 و همسانه‌سازی و بیان ژن *cfae-cotd* در ناقل بیانی pET28a به منظور تولید پروتئین نوترکیب می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

الف. طراحی و آنالیز نرم‌افزاری پرایمرها جهت تکثیر ژن *cafe-cotd*

جهت تکثیر ژن‌های *cfae* و *cotd* از توالی ژن دو قسمتی کایمریک ساخته‌شده توسط شرکت Biomatik، پرایمر رفت و برگشت طراحی شد. پرایمر رفت دارای جایگاه برشی آنزیم *Eco*RI در ابتدای ۵' و ترادف 5'-ATCATA GAATTC ATGCAGTCTTGGCATACCAATGTC-3' و پرایمر برگشت واجد جایگاه برشی آنزیم *Hin*dIII و کدون خاتمه رونویسی در ابتدای ۵' و ترادف 5' ATCATAT - AAGCTT TTAAAATTGCGGCAGCCAGATC-3' بود. پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت سیناکلون سنتز شد. آنالیز انجام شده توسط نرم‌افزار Oligo6 انجام شد.

ب. تخلیص پلاسمید pET28a و pBad-C20

کلون حاوی پلاسمید pET28a و pBad-C20 در محیط LB (LB: Luria Bertani) مایع دارای آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین (۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کاناماسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تلقیح شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون شیکر انکوباتور نگهداری شد. به منظور تخلیص پلاسمید pBad-C20 و pET28a، از روش لیز قلیایی طبق پروتکل استخراج پلاسمید کیت استخراج شرکت Genet Bio، استفاده شد.

ج. واکنش PCR جهت تکثیر ژن کایمریک *cfae – cotd*

واکنش PCR با آنزیم پلیمراز با خاصیت غلط‌گیری بالا (High Fidelity) (شرکت Fermentas) آنزیم *Pfu* پلیمرازی (۲/۵ واحد بر میکرولیتر) در شرایط غلظت ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم و ۱۰ پیکومول از هر پرایمر،۵۰ میلی‌مولار dNTP و ۱ میکرولیتر از *پلاسمید* pBad-C20 حاوی سازه ژنی دو قسمتی به عنوان الگو، در دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد بهینه‌سازی شد. مراحل PCR شامل یک مرحله واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل مرحله واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به رشته الگو در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر قطعه موردنظر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. درنهایت، برای تأیید محصول روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد.

د. همسانه سازی ژن *cfae-cotd* در ناقل pET28a

ابتدا واکنش هضم آنزیمی بر روی محصول PCR و پلاسمید بیانی pET28a با دو آنزیم محدودالاثر *Eco*RI و *Hin*dIII به مدت ۲ ساعت در میکروتیوب‌های جداگانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هضم آنزیمی انجام شد. محصول برش خورده با کمک کیت تخلیص محصول PCR (Genet Bio) تخلیص شد. واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T4 لیگاز به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انجام و با روش شوک حرارتی به

میزبان اشریشیا کلی مستعد سویه DH5α ترنسفورم شد. برای بررسی صحت همسانه سازی، از کلونی‌های رشدیافته روی پلیت حاوی محیط کشت LB آگار حاوی کانامایسین (غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) جهت انجام عمل کلونی PCR استفاده گردید. روش‌های زیر برای تأئید صحت همسانه‌سازی صورت گرفت:

الف) واکنش PCR: جهت تکثیر ژن *کایمریک cotd - cfae* از ۱۵ کلون از کلونی‌های تشکیل شده به عنوان DNA الگو برای واکنش کلونی PCR استفاده شد.

ب) هضم آنزیمی پلاسمید و خروج قطعه مورد نظر: واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودالاثر *EcoRI* و *Hin*dIII بر پلاسمید تخلیص شده صورت گرفت.

ه. بررسی بیان سازه ژنی pET28a-cfae-cotd

پس از تایید همسانه‌سازی، پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه ژنی *cfae-cotd* از سویه DH5α با روش لیز قلیایی استخراج و با روش شوک حرارتی به اشریشیا کلی مستعد سویه BL21 (DE3) انتقال داده شد و هم‌چنین مراحل تایید ترنسفورم شدن ذکرشده بر روی آن اعمال گردید.از کشت شبانه سویه‌های نوترکیب واجد پلاسمید pET28a-*cfae-cotd* میزان ۵۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB حاوی غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین تلقیح گردید و پس از رسیدن جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ تا ۰/۸ القاکننده IPTG با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت اضافه و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور نگهداری و به وسیله سانتریفیوژ جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها جهت بررسی بیان با Sample Buffer با رقت 1x (Tris- HCl (۱ میلی مولار ۶/۸ =pH)، گلیسرول (۵۰ درصد)، SDS (۱۰ درصد)، ۲- مرکاپتو اتانول، بُرمو فنل بُلو (۱ درصد)) مخلوط و پس از جوشانیدن به مدت ۱۰ دقیقه و بر روی ژل SDS-PAGE 10% مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ن. تعیین میزان محلول و غیر محلول بودن پروتئین

به منظور تعیین حلالیت پروتئین نوترکیب، رسوب سلولی حاصل از بیان باکتری با استفاده از بافر لیزکننده (حاوی لیزوزیم با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) لیز شد. سپس، بعد از انجام سانتریفیوژ، محلول رویی به عنوان فاز محلول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به رسوب باقی‌مانده مقدار ۱ میلی‌لیتر بافر لیزکننده با pH= ۸ (حاوی اوره ۸ مولار) افزوده و پس از انجام سانتریفیوژ، محلول رویی به عنوان فاز نامحلول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هر نمونه به همراه نشان‌گر پروتئینی روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد الکتروفورز و بررسی انجام گرفت.

و. تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA

تخلیص پروتئین نوترکیب به‌وسیله‌ی ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA و با روش Denature و Native نوترکیب طبق کاتالوگ شرکت کیاژن انجام گرفت. به دلیل همسانه‌سازی توالی ژن موردنظر در ناقل بیانی pET، پروتئین نوترکیب دارای دنباله هیستیدینی در ابتدای خود می‌باشد. نمونه‌های تخلیص روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد الکتروفورز شد.

ی. تأیید پروتئین نوترکیب

برای تأیید پروتئین نوترکیب بیان‌شده از روش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی Anti-His tag متصل به HRP استفاده شد. پس از الکتروفورز پروتئین کایمر با استفاده از بافر انتقال (گلایسین ۳۹ میلی‌مولار، تریس ۴۸ میلی‌مولار، SDS ۳درصد و متانول ۲۰ درصد) به کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر بلوکه‌کننده (۵ گرم Skim Milk در ۱۰۰ میلی لیتر TBS (1X)) به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون انجام گرفت. آنتی بادی ضدهیستیدین با رقت ۱:۲۰۰۰ در داخل بافر TBS(1x) تهیه و روی غشای PVDF ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد داخل شیکر انکوباتور قرار گرفت. سپس سه بار با بافر TBS و هربار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شد. از سوبسترای DAB و H2O2 ۳۰ درصد به عنوان کاتالیزور

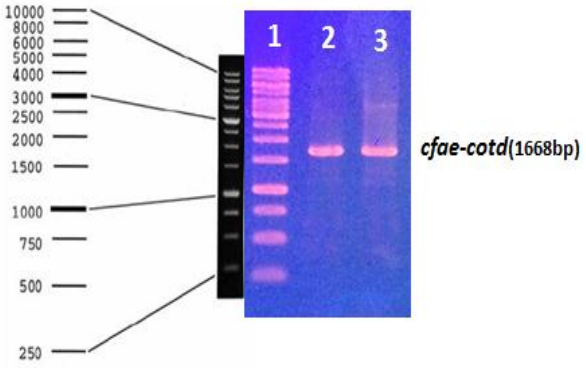
به غشا اضافه شد و پس از ظهور باندها واکنش با آب مقطر مهار شد.

۳. ملاحظات اخلاقی

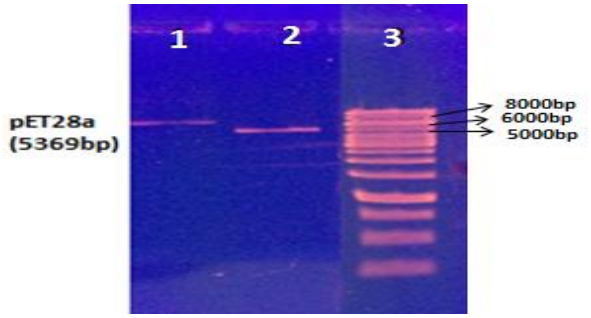
این مطالعه با کد IR.IAU.SRB.REC.1397.066 در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به تصویب رسیده است.

۴. یافته‌ها

ژن کدکننده *cfae-cotd* با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت اختصاصی، تکثیر شد (شکل ۱). محصول PCR روی ژل با اندازه ۱۶۶۸ جفت باز مشاهده گردید. پس از هضم آنزیمی، محصول PCR و پلاسمید pET28a جهت همسانه‌سازی با دو آنزیم *Eco*RI و *Hin*dIII هضم و محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد (شکل ۲).

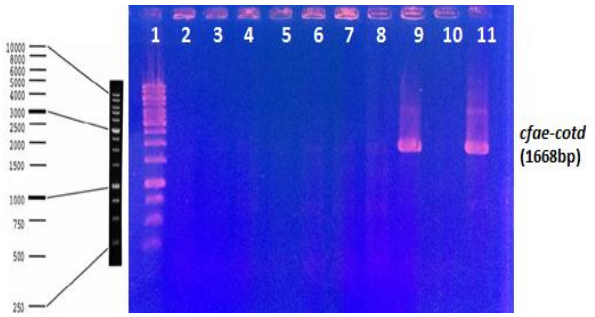


شکل ۱. الگوی الکتروفورز محصول PCR بهینه‌سازی شده با آنزیم Pfu. ستون ۱: نشان‌گر اندازه DNA (1kb DNA Ladder). ستون ۲ و ۳: قطعه ژنی cfae-cotd به اندازه ی bp ۱۶۶۸.



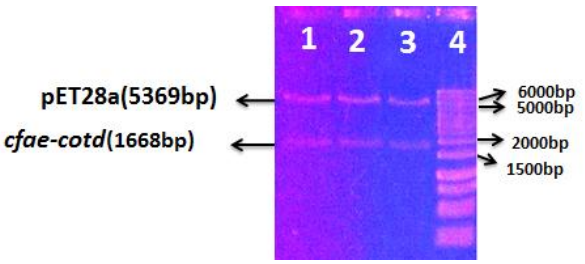
شکل ۲. الگوی الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمید pET28a با دو آنزیم HindIII و EcoRI روی ژل آگارز ۱ درصد. ستون ۱: وکتور pET28a هضم‌نشده. ستون ۲: وکتور pET28a هضم شده به اندازه bp ۵۳۶۹. ستون ۳: نشان‌گر اندازه DNA (1kb DNA Ladder).

پس از انجام الحاق و همسانه‌سازی، ژن موردنظر در ناقل pET28a به‌وسیله روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد ترنسفورم و روی محیط LB آگار حاوی کانامایسین قرار داده شد. جهت تایید همسانه‌سازی ژن *cfae-cotd*، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، کلونی PCR انجام گرفت (شکل۳).



شکل ۳. الگوی الکتروفورز کلونی PCR و تایید ترنسفورم شدن کلون‌های حاصل شده. ستون ۱: نشان‌گر اندازه DNA (DNA Ladder 1kb). ستون ۹ – ۲: بررسی کلونی‌های نوترکیب. ستون ۱۰: کنترل منفی. ستون ۱۱: کنترل مثبت با استفاده از قطعه تکثیر شده از روی پلاسمید pBad.

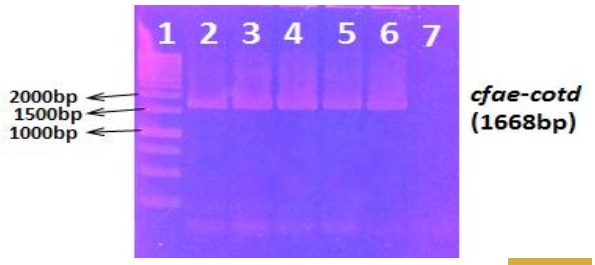
برای تأیید کلون‌های به‌دست آمده، هضم آنزیمی با دو آنزیم *Hin*dIII و *Eco*RI انجام گرفت. محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید که نتایج آن در شکل ۴ ارائه شده است.



شکل ۴. الگوی الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمید pET28a حاوی ژن cfae – cotd با دو آنزیم HindIII و EcoRI روی ژل آگارز۱ درصد. ستون ۳-۱: وکتور pET28a نوترکیب هضم شده. ستون ۴: نشان‌گر اندازه DNA (DNA Ladder 1kb).

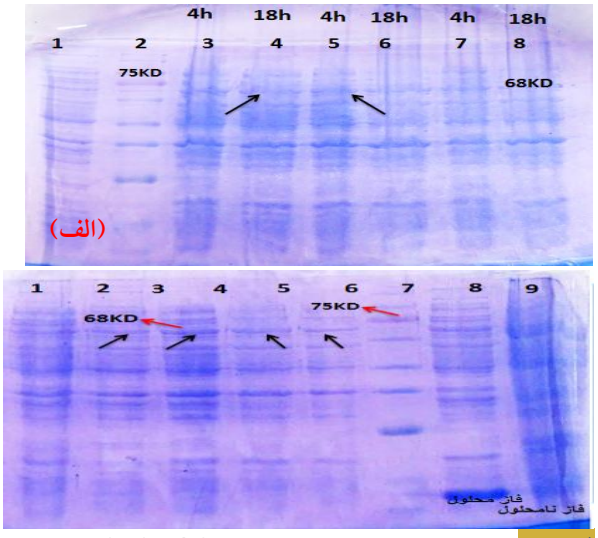
پس از استخراج پلاسمید نوترکیب از میزبان DH5α، عمل ترنسفورم به سلول مستعد *E. coli* BL21 (DE3) انجام شد. برای صحت ترنسفورمیشن وکتور نوترکیب عمل کلونی PCR

صورت گرفت. شکل ۵ نشان‌دهنده نتیجه حاصل از کلونی PCR از کلونی‌های ترنسفورم شده Bl21DE3 می‌باشد.



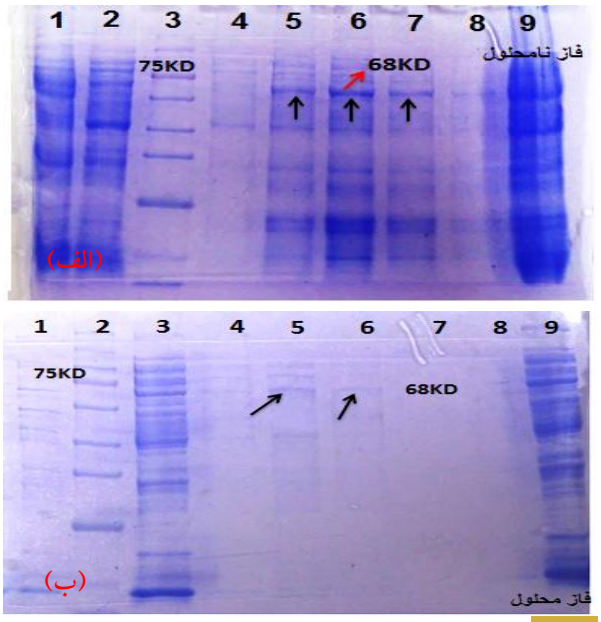
شکل ۵. الگوی الکتروفورز کلونی PCR از کلونی‌های ترنسفورم‌شده Bl21DE3. ستون۱: نشان‌گر اندازه DNA (DNA Ladder Mix). ستون۶-۲: قطعات تکثیرشده از کلونی‌های متفاوت ترنسفورم شده Bl21(DE3) . ستون ۷: کنترل منفی.

به منظور بیان پروتئین نوترکیب، القای بیان پروتئین در مدت زمان‌های ۴ ساعت و ۱۸ ساعت، تحت تأثیر IPTG قرار گرفت و باند پروتئین نوترکیب در محدوده مورد انتظار ۶۸ کیلو دالتون روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد مشاهده شد (شکل ۶).



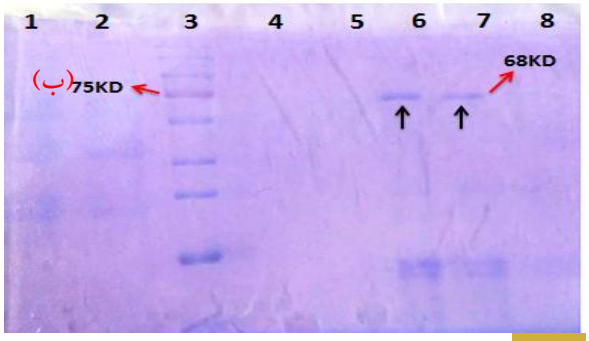
شکل ۶. بررسی بیان ژن کایمر بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد با رنگ‌آمیزی کوماسی بلو. الف) ستون ۱: نمونه قبل از القا. ستون ۲: نشان‌گر اندازه پروتئین. ستون ۸ – ۳: نمونه‌های بعد از القا در مدت زمان ۴ ساعت و ۱۸ ساعت. ب) ستون ۱: نمونه قبل از القا. ستون ۶-۲: باندهای بیانی نمونه‌های بعد از القا به وزن ۶۸ کیلو دالتون. ستون ۷: نشان‌گر اندازه پروتئین. ستون ۸: باندهای بیانی فاز محلول. ستون۹: باندهای بیانی فاز نامحلول.

تخلیص پروتئین نوترکیب به‌وسیله‌ی ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA و روش Denature و Native انجام شد. در شکل ۷ نتیجه‌ی تخلیص پروتئین نوترکیب Cotd-CfaE به اندازه ۶۸ کیلو دالتون مشاهده می‌شود.



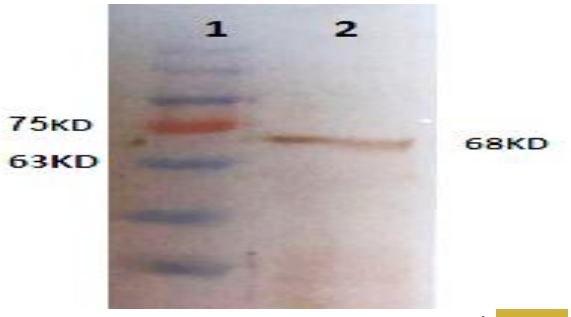
شکل۷. تخلیص پروتئین نوترکیب CotD - CfaE. الف) ستون ۱: نمونه خروجی از ستون قبل از شستشو. ستون۲: نمونه خروجی از ستون کروماتوگرافی پس از شستشو با بافر Washing. ستون۳: نشان‌گر اندازه پروتئین. ستون ۷- E۵: (بافر استخراج کننده). ستون ۸: شستشو با بافرMES . ستون ۹: عصاره پروتئینی لیز سلولی (فاز نامحلول) .ب) ستون ۱: نمونه خروجی از ستون قبل از شستشو. ستون۲: نشان‌گر اندازه پروتئین. ستون۳: نمونه خروجی از ستون کروماتوگرافی پس از شستشو با بافر Washing . ستون ۷-۵: E (بافر استخراج کننده). ستون ۸: شستشو با بافرMES . ستون ۹: عصاره پروتئینی سلول (فاز محلول).

همان‌طور که مشاهده می‌شود در ستون استخراج، علاوه بر پروتئین کایمریک باندهای غیراختصاصی دیگر نیز وجود دارند. این باندهای غیراختصاصی با تغییر حجم شستشوها حذف شدند (شکل ۸).



شکل ۸. بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب کایمریک CotD-CfaE با ستون میل ترکیبی Ni-NTA بر روی ژل SDS- PAGE ۱۰ درصد. ستون۱: نمونه خروجی از ستون کروماتوگرافی قبل از شستشو. ستون۲: نمونه خروجی از ستون پس از شستشو با بافر Washing. ستون ۳: نشان‌گر اندازه‌پروتئین. ستون ۷-۵: E (بافر استخراج‌کننده). ستون ۸: پروتئین تخلیصی با بافرMES.

تأیید محصول پروتئینی نوترکیب با استفاده از روش وسترن بلاتینگ و آنتی بادی Anti-His Tag انجام گرفت. نتیجه وسترن بلاتینگ پروتئین‌های نوترکیب خالص‌شده، بر روی کاغذ نیتروسلولز در شکل ۹ مشاهده می‌شود. با انجام وسترن بلات مشخص شد که Anti His-Tag به طور اختصاصی با توالی هیستیدین پروتئین‌های نوترکیب واکنش می‌دهد.



شکل ۹. تأیید پروتئین‌های نوترکیب به روش وسترن بلاتینگ با استفاده از Anit-His Tag. ستون ۱: نشان‌گر اندازه پروتئین. ستون ۲: پروتئین‌های نوترکیب CfaE-CotD.

۵. بحث

اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) عامل اصلی ایجاد اسهال در کشورهای در حال توسعه می‌باشد و منجر به مرگ‌ومیر سالانه هزاران نفر به خصوص کودکان زیر ۵ سال و مسافران می‌شود (۱، ۱۸). باکتری ETEC طی دو مرحله ایجاد عفونت می‌کند؛ در مرحله اول به وسیله فاکتورهای کلونیزاسیون به سطح سلول‌های اپیتلیال متصل و در مرحله‌ی بعدی با ترشح انتروتوکسین‌ها، موجب اختلال در هموستاز مایع روده و در نهایت منجر به بروز اسهال می‌شود. بنابراین یکی از راه‌کارهای اصلی جلوگیری از ایجاد عفونت توسط این باکتری، ممانعت از اتصال آن به سطح روده می‌باشد. اگرچه آنتی بیوتیک‌های تجویزشده برای بهبود این بیماری موثر هستند، اما مقاومت دارویی به دلیل توانایی بالای این باکتری در تبادل پلاسمیدهای مقاومت، در حال افزایش است و این امر عوارضی مانند از بین بردن میکروارگانیسم‌های طبیعی یا تغییر در جمعیت میکروارگانیسم‌ها را به دنبال دارد؛ از این‌رو، سازمان‌های بهداشتی متعددی نظیر سازمان بهداشت جهان را بر آن داشته تا به دنبال طراحی و تهیه واکسن مناسب باشند (۵، ۱۹). مطالعات اپیدمیولوژیکی فاکتور کلونیزاسیون نوع CFA/I را به عنوان رایج‌ترین فاکتور کلونیزاسیون در سویه‌های ETEC گزارش می‌دهند. هم‌چنین از ادهسین‌های مهم دیگر می‌توان به CFA/II (CS1/2/3) اشاره کرد (۲۰). در مطالعه نظریان در سال ۲۰۱۳، همجوشی واحدهای ساختاری عوامل کلونیزه‌کننده CFA/I، CS2، CS3 و LT انجام گرفت و ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب در حیوان مدل بررسی شد. بررسی‌های ایمنی‌زایی تیتر بالای آنتی بادی را علیه این پروتئین نوترکیب نشان داد (۲۱). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط توبیاس و همکاران انجام شد، زیرواحدهای اصلی فاکتورهای CFA/I و CS2 به صورت همجوش در سطح باکتری اشرشیاکلی ارائه گردید. در تحقیق انجام شده توسط توبیاس نیز فقط تولید آنتی بادی بر ضد دو فاکتور کلونیزاسیون شایع مدنظر قرار گرفت (۲۲). در این مطالعه تلاش شد که پروتئین کایمر جهت تولید واکسن جدید در مطالعات آتی، علیه این بیماری طراحی گردد. در این تحقیق یک پروتئین کایمر متشکل زیرواحد CfaE و CotD، عامل کلونیزاسیون تولید گردید. زیرواحدCfaE (از زیرواحدهای CFA/I) برای اتصال باکتری ضروری است و آنتی بادی‌های علیه این زیرواحد می‌تواند از اتصال آن به روده و در نهایت از ایجاد بیماری جلوگیری کند (۱۰) و در سال‌های اخیر برای توسعه واکسن‌های نوترکیب علیه باکتری ETEC، به دلیل نیاز باکتری برای اتصال به سلول‌های اپتلیال به زیرواحد CfaE، به این زیرواحد توجه زیادی شده است (۱۲، ۱۳). مطالعات منصوری و همکاران نشان داد که CfaE می‌تواند به عنوان یک ایمونوژن قوی برای تولید واکسن مطرح باشد. نتایج مطالعات آن‌ها حاکی از این بود که باکتری‌های مجاورشده با سرم موش‌های ایمن در مقایسه با سرم موش‌های کنترل قادر به هموگلوتیناسیون نبودند. این امر می‌تواند ناشی از اتصال آنتی بادی تولیدشده به زیرواحد فرعی CFA/I و خنثی‌سازی آن باشد، به طوری‌که باکتری دیگر قادر نخواهد بود به رسپتور خود در سطح سلول متصل شود (۱۳). سیک لاریس و همکاران نشان دادند که وجود توالی مشخص و حفاظت‌شده CfaE که در آن‌ها

ژن *cfae* در ناحیه آمینی دچار جهش شده است، قابلیت اتصال به گیرنده‌های مناسب را ندارند. این مطالعات نشان می‌دهد زیرواحد CfaE می‌تواند به عنوان یک کاندیدای بالقوه در طراحی واکسن مطرح باشد (۲۳). هم‌چنین آنانتا و همکاران از انتهای آمینی و انتهای کربوکسیلی CfaE به‌طور جداگانه استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که آنتی بادی تولیدشده علیه انتهای آمینی و کربوکسیلی می‌تواند از اتصال باکتری به سلول‌های caco-2 در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند. هم‌چنین مطالعات آن‌ها حاکی از آن است که N-ترمینال *cfae* (اسیدآمینه‌ی ۲۳-۲۱۱ *cfae*) باعث ایجاد ایمنی‌زایی بیشتری در مقایسه با C–ترمینال زیرواحد *cfae* می‌شود (۲۴). منصوری و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ پروتئین نوترکیب حاوی زیرواحدهای CfaB، CfaE و LTB تولید کردند و ایمنی‌زایی آن را مورد بررسی قرار دادند. در ساخت این پروتئین نوترکیب از بخش N–ترمینال زیرواحد CfaE (۲۱۱-۲۳ اسیدآمینه، ۱۸۹ اسیدآمینه) استفاده شد. به دلیل اهمیت فاکتورهای کلونیزاسیون CotD و CfaE در ایجاد مصونیت نسبت به بیماری اسهالی، این ژن کایمریک در ناقل بیانی، همسانه‌سازی گردید و بیان پروتئین نوترکیب آن بررسی شد. ژن کایمریک *cotd-cfae* بعد از انجام مراحل کلونینگ در ناقل بیانی و در سطح پایین در میزبان *E. coli* بیان شد. یکی از دلایل بیان نه‌چندان بالای پروتئین نوترکیب در مطالعه حاضر را می‌توان به وزن بالای این پروتئین نسبت داد، از این‌رو، می‌توان در مطالعات آتی از بخش N -ترمینال *cfae* (اسیدآمینه‌ی ۲۳-۲۱۱ *cfae*) به جای ژن کامل *cfae* استفاده کرد. منصوری در مطالعات خود نشان داد که ژن *cfae* یک توالی غنی از AT دارد و هم‌چنین حاوی کدون‌های نادر است. از این‌رو، بهینه‌سازی کدون *cfae* می‌تواند بیان پروتئین نوترکیب را افزایش دهد (۱۳). در این مطالعه نیز از سازه دو قسمتی حاوی ژن‌های *cotd* و *cfae* بهینه‌سازی شده از طریق ترجیح کدونی *E. coli* استفاده شد و در مقایسه با مطالعه‌ی منصوری بیان پروتئین کمتری را به دنبال داشت. از دلایل دیگر بیان پایین پروتئین نوترکیب می‌توان به مقدار زیاد AT در توالی آن اشاره کرد که پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی از روش‌های دیگر بهینه‌سازی برای بالابردن بیان پروتئین بهره برد. در مطالعات احصایی و همکاران، همسانه‌سازی و بیان ژن *cfab* مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق، پس از زیرهمسانه‌سازی در ناقل pET28a و بررسی بیان، این نتیجه حاصل شد که تولید پروتئین نوترکیب CfaB با وارد کردن توالی طبیعی این ژن به دلیل وجود کدون‌های کمیاب پشت‌سرهم امکان‌پذیر نمی‌باشد. هم‌چنین به منظور بهینه‌سازی، تولید پروتئین در چندین محیط کشت و میزبان‌های مختلف Rosseta و Bl21DE3 تکرار شد، اما نتیجه‌ای به دنبال نداشت (۲۵). یانگ-فولی و همکاران در مطالعه‌ی خود از محیط کشت super broth استفاده کردند و دریافتند که برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، بالاتر بودن درصد تریپتون و عصاره مخمر نسبت به محیط LB تاثیر به‌سزایی دارد. (۲۶). هم‌چنین فیوری نیز برای تولید پروتئین از محیط کشت CF استفاده کرد که می‌توان این امر را به وجود نمک در ترکیب این محیط کشت نسبت داد که به صورت تنظیم‌کننده برای رونویسی از ژن مزبور عمل می‌کند (۲۷). در این مطالعه از محیط کشت LB استفاده شد. با توجه به بیان پایین پروتئین نوترکیب، می‌توان برای بهبود کیفیت تولید پروتئین از انواع محیط‌های کشت در مطالعات آینده استفاده کرد. در مطالعات یانگ فولی در سال ۲۰۰۸، ژن *cfab* به صورت الحاق با *cfae*، در وکتور pET24a همسانه‌سازی شد. در وکتور مذکور به علت عدم وجود توالی جایگاه اتصال به ریبوزوم (RBS) و توالی Histag، فاصله میان پروموتور pET24a تا منطقه همسانه‌سازی ژن بسیار کم است که نشان‌دهنده تفاوت وکتور pET24a و pET28a می‌باشد. لازم به ذکر است هر دو وکتور نامبرده از نظر پروموتور و ساختاری مشابه می‌باشند. برای استفاده از ناقل pET24a لازم است در توالی آن عناصر تنظیمی افزوده گردد (۲۶).

آنانتا و همکاران از وکتور PML-P2 دارای دنباله مالتوز بایندینگ پروتئین MBP با وزن حدوداً ۴۲ کیلودالتون استفاده کردند. پروتئین MBP ایمونوژن بوده و می‌تواند نتایج حاصل را به طور کاذب تغییر دهد (۲۴). در این مطالعه از وکتور بیانی

pET28a استفاده شد که تنها ۴ کیلو دالتون به ابتدای ژن اضافه می‌کند (۲۸). نتایج بیان پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد نیز نشان‌دهنده حضور یک باند در محدوده‌ی ۶۸ کیلو دالتونی بوده که با اندازه‌ی موردانتظار پروتئین کایمریک مطابقت داشت. پس از انجام تخلیص پروتئین با ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA، نتایج بررسی‌ها بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد نشان داد که تخلیص پروتئین همراه با چند باند غیراختصاصی صورت گرفته است. این باندهای غیراختصاصی پس از تکرار آزمایش و تغییر حجم بافر شستشو، بر روی ژل SDS-PAGE دیده نشدند. آزمون وسترن بلات با استفاده از Anit-His حضور باند ۶۸ کیلو دالتونی را در نتایج تخلیص پروتئین تایید می‌کند.

۶. نتیجه‌گیری

بهینه سازی کدون و بیان در میزبان‌های هترولوگ یک روش مفید در تولید پروتئین‌های نوترکیب است. بنابر اهمیت هر یک از زیرواحدهای به‌کار برده در تولید پروتئین مورد مطالعه در جلوگیری از عفونت ETEC، می‌توان از پروتئین نوترکیب (CotD-CfaE) به‌عنوان یک مولکول ایمونوژن و یکی از اجزای مهم در تولید واکسن علیه عفونت ETEC در مطالعات بعدی استفاده کرد.

۷. تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران می‌باشد و بودجه تحقیق به صورت شخصی تامین شده است. نویسندگان از تمامی کسانی که در انجام این تحقیق همکاری کردند سپاس‌گزاری می‌نمایند.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. Clinical microbiology reviews. 2013; 26(4):822-80.
2. Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic Escherichia coli infection. Microbes and Infection. 2010; 12(2):89-98.
3. Svennerholm A-M, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic Escherichia coli. Expert review of vaccines. 2008;7(6):795-804.
4. Qadri F, Svennerholm A-M, 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.
5. Svennerholm A-M, Lundgren A. Recent progress toward an enterotoxigenic Escherichia coli vaccine. Expert review of vaccines. 2012; 11(4):495-507.
6. Ahmed T, Bhuiyan TR, Zaman K, Sinclair D, Qadri F. Vaccines for preventing enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) diarrhoea. The Cochrane database of systematic reviews. 2013(7):Cd009029.
7. Mortezaei N, Singh B, Zakrisson J, Bullitt E, Andersson M. Biomechanical and structural features of CS2 fimbriae of enterotoxigenic Escherichia coli. Biophysical journal. 2015;109(1):49-56.
8. Knutton S, Lloyd DR, Candy D, McNEISH AS. Adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli to human small intestinal enterocytes. Infection and immunity. 1985;48(3):824-31.
9. Levine M, Ristaino P, Marley G, Smyth C, Knutton S, Boedeker E, et al. Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic Escherichia coli: morphology, purification, and immune responses in humans. Infection and immunity. 1984;44(2):409-20.
10. Baker K, Levine M, Morison J, Phillips A, Barry E. CfaE tip mutations in enterotoxigenic Escherichia coli CFA/I fimbriae define critical human intestinal binding sites. Cellular microbiology. 2009;11(5):742-54.
11. Liaqat I. Biofilm formation and binding specificities of CFA/I, CFA/II and CS2 adhesions of enterotoxigenic Escherichia coli and Cfae-R181A mutant. Brazilian Journal of Microbiology. 2012; 43(3):969-80.
12. Hayat S-MG, Gargari S-LM, Nazarian S. Construction and immunogenic properties of a chimeric protein comprising CfaE, CfaB and LTB against Enterotoxigenic Escherichia coli. Biologicals. 2016; 44(6):503-10.
13. Mansouri M, Mousavy SJ, Ehsaei Z, Nazarian S, Zali MR, Moazzeni SM. The codon-optimization of cfaE gene and evaluating its high expression capacity and conserved immunogenicity in Escherichia coli. Biologicals. 2013; 41(3):169-75.
14. Svennerholm A, Wennerås C, Holmgren J, McConnell M, Rowe B. Roles of different coli surface antigens of colonization factor antigen II in colonization by and protective immunogenicity of enterotoxigenic Escherichia coli in rabbits. Infection and immunity. 1990; 58(2):341-6.
15. Savelkoul PH, Willshaw GA, McConnell MM, Smith HR, Hamers AM, van der Zeijst BA, et al. Expression of CFA/I fimbriae is positively regulated. Microbial pathogenesis. 1990; 8(2):91-9.
16. Altboum Z, Barry EM, Losonsky G, Galen JE, Levine MM. Attenuated Shigella flexneri 2a ΔguaBA Strain CVD 1204 Expressing EnterotoxigenicEscherichia coli (ETEC) CS2 and CS3 Fimbriae as a Live Mucosal Vaccine against Shigella and ETEC Infection. Infection and immunity. 2001; 69(5):3150-8.
17. Zeinalzadeh N, Salmanian AH, Goujani G, Amani J, Ahangari G, Akhavian A, et al. A Chimeric protein of CFA/I, CS6 subunits and LTB/STa toxoid could protect immunized mice against enterotoxigenic Escherichia coli. Microbiology and Immunology. 2017; 61(7):272-9.
18. Fleckenstein JM, Sheikh A. Designing vaccines to neutralize effective toxin delivery by enterotoxigenic Escherichia coli. Toxins. 2014; 6(6):1799-812.
19. Ahmed T, Bhuiyan TR, Zaman K, Qadri F. Vaccines for preventing enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) diarrhoea. The Cochrane Library. 2011; (7).
20. ehsaei z, salimian j, nazrian s, mansouri m, amani j. Expression of optimized gene of Enterotoxigenic Escherichia coli CFA/I major subunit. Pathobiology Research. 2011; 13(4):0-.
21. Nazarian S, Gargari SLM, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated

chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic Escherichia coli. Microbiological research. 2014; 169(2):205-12.
22. Tobias J, Svennerholm A-M, Holmgren J, Lebens M. Construction and expression of immunogenic hybrid enterotoxigenic Escherichia coli CFA/I and CS2 colonization fimbriae for use in vaccines. Applied microbiology and biotechnology. 2010; 87(4):1355-65.
23. Sakellaris H, Munson GP, Scott JR. A conserved residue in the tip proteins of CS1 and CFA/I pili of enterotoxigenic Escherichia coli that is essential for adherence. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999; 96(22):12828-32.
24. Anantha RP, McVeigh AL, Lee LH, Agnew MK, Cassels FJ, Scott DA, et al. Evolutionary and functional relationships of colonization factor antigen i and other class 5 adhesive fimbriae of enterotoxigenic Escherichia coli. Infection and immunity. 2004; 72(12):7190-201.
25. Ahsaee z, salimian j, nazarian s, khalesi r, olad g. Cloning, bioinformatics study and evaluation expression of gene of enterotoxigenic Escherichia coli CFA/I major subunit (CfaB). J Shahrekord Univ Med Sci. 2011; 13(5):72-82.
26. Li Y-F, Poole S, Rasulova F, McVeigh AL, Savarino SJ, Xia D. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analyses of several forms of the CfaB major subunit of enterotoxigenic Escherichia coli CFA/I fimbriae. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications. 2009; 65(3):242-7.
27. Favre D, Lüdi S, Stoffel M, Frey J, Horn MP, Dietrich G, et al. Expression of enterotoxigenic Escherichia coli colonization factors in Vibrio cholerae. Vaccine. 2006; 24(20):4354-68.
28. Khalesi R, J S, S M, Jalilian A. Review of Enterotoxigenic Escherichia coli bacteria vaccines. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2013; 20(4):252-71.