مقاله پژوهشی

ایجاد پاسخ ایمنی علیه پروتئین نوترکیب ناحیه N- ترمینالIpaD شیگلا دیسانتریه در خوکچه هندی

مهدی حصارکی[۱]، مجتبی سعادتی[۲و۱*]، حسین هنری[۱]، غلامرضا اولاد[۱]، رضا رنجبر[۲]، محمد هیئت[۲]، مهدی تات[۱]

۱-گروه علوم زیستی ، دانشکده علوم، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران،ایران

۲-مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) ، تهران ، ایران

چکیده

شیگلوزیز به عنوان یک بیماری واگیر دار، سالانه زندگی میلیون‌ها نفر را در سرتاسر جهان تهدید می‌کند. ایجاد سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک، سبب شده که سازمان بهداشت جهانی تهیه واکسن علیه این بیماری را در اولویت قرار دهد. این باکتری به کمک عوامل تهاجمی خود با اتصال به M-cellهای جدار روده، ایجاد اسهال خونی شدید می نماید. پروتئین IpaD نقش مهم و کلیدی در تهاجم شیگلا دارد. عملکرد IpaD به ناحیه N- ترمینال آن وابسته است. هدف از این مطالعه تولید و تخلیص آنتی بادی پلی کلونال علیه ناحیه N- ترمینال IpaD می باشد.

جهت تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل استفاده گردید. از پروتئین تخلیص شده جهت تولید آنتی بادی پلی کلونال درخوکچه هندی استفاده شد. تیتر آنتی بادی تولیدی به وسیله تست الایزا بررسی گردید. این آنتی بادی پس از تخلیص با ستون پروتئین G، به وسیله وسترن بلات بررسی شد.

نتایج حاصل از وسترن بلات تایید کننده پروتئین بیانی تخلیص شده بود. تست الایزا تیتر بالایی از آنتی بادی در سرم حیوانات ایمن با این پروتئین را نشان داد. صحت آنتی بادی پلی کلونال تخلیص شده با ستون کروماتوگرافی پروتئین G به وسیله ایمنوبلات تایید شد.

واژگان کلیدی: شیگلوزیز؛ IpaD؛ پروتئین نوترکیب؛ آنتی بادی پلی کلونال

مقدمه:

گونه‌های شیگلا به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده بیماری‌های عفونی و واگیر دار مطرح هستند. شیگلوزیز که توسط این گونه باکتریایی ایجاد می‌شود، در سراسر جهان شیوع گسترده دارد. دوز عفونت زایی پایین این باکتری (کمتر از۲۰۰ عدد باکتری) و مقاومت‌های آنتی بیوتیکی متنوعی که از این باکتری گزارش می‌شود{۱}، طراحی و تولید یک واکسن را برای این باکتری در اولویت فعالیت‌های سازمان WHO قرار داده است. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۹، تعداد ۱۶۴/۷ میلیون نفر در جهان به بیماری شیگلوزیز مبتلا شده اند که از این میان ۱۶۳/۲ میلیون نفر در کشورهای در حال توسعه و ۱/۵ میلیون نفر در کشورهای توسعه یافته بوده است. این بیماری هر ساله زندگی ۱/۱ نفر را تهدید می‌کند که از این میان ۶۹ درصد تمام مبتلایان و ۶۱ درصد مرگ و میر آن متعلق به کودکان کمتر از ۵ سال است{۲}. شیوع شیگلا در ایران با کمک مطالعاتی که اخیرا منتشر شده است بیان

* مجتبی سعادتی، PhD

گروه علوم زیستی ، دانشکده علوم، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران،ایران

مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) ، تهران ، ایران

پست الکترونیک: saadati_m@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۲/۶

Archive of SID

www.SID.ir

می‌کند که تا چند سال گذشته (اوایل دهه ۸۰ شمسی) شیگلا فلکسنری شایعترین شیگلا در ایران بوده است، اما در حال حاضر شیگلا سونئی فراوانی بیشتر را در مقایسه با سه گونه دیگر دارا می‌باشد {۳}.
عوامل مختلفی در بیماری زایی و تهاجم شیگلا نقش کلیدی بازی می‌کنند که یکی از این عوامل، محصولات پلاسمید بزرگ تهاجمی شیگلا (kb۲۰۰) می‌باشند. پروتئین‌های IpaA/B/C/D/H مهمترین محصولات پلاسمید تهاجمی شیگلا می‌باشند. کمپلکس ایجاد شده از سه پروتئین IpaB/C/D نقش بسیار مهمی در اتصال به سلول‌های اپیتلیالی روده (M–cell) و فرار از فاگوزوم ماکروفاژها بازی می‌کند {۴و۵}. مکانسیم اصلی فعالیت IpaD در سال ۲۰۰۸ توسط دکتر اف. استنسرود و همکارانش در دانشگاه کانزاس مورد مطالعه قرار گرفت. طبق نتایج این گزارش در صورتی که باکتری در محیط فاقد نمک‌های صفراوی رشد کند، IpaD تنها عضو از خانواده Ipa و سایر ناقل‌ها و افکتورها می باشد که از جسم باکتری بیرون می‌آید و در راس سوزن TTSS قرار می‌گیرد. ظهور IpaD بر روی سطح شیگلا بیانگر این مطلب است که IpaD مستقل از اثر هر القاگری، به صورت پیش فرض تولید شده و در راس سوزن TTSS استقرار می یابد. این مطالعه همچنین نشان داد که شیگلا اگر در محیط حاوی نمک صفراوی دزوکسی کولات و یا در محیط کشت XLD که حاوی نمک‌های صفراوی است رشد داده شود، عضو دیگر خانواده Ipa یعنی IpaB نیز در مجاورت با IpaD در نوک سوزن TTSS مستقر می‌گردد و یک کمپلکس سه گانه (IpaD,IpaB,MxiH) را تشکیل می‌دهد {۶}. در حقیقت فعل و انفعالاتی که ما بین دزوکسی‌کولات و سایر نمک‌های صفراوی با IpaD رخ می‌دهد باعث فراخوانی و به کارگیری IpaB و قرارگیری آن در راس دستگاه ترشحی نوع سوم (TTSS) در مجاورت IpaD می‌گردد. در این حالت (TTSS دارنده کمپلکس سه گانه IpaD, IpaB, MxiH) شیگلا را برای اتصال و تهاجم به سلول میزبان مهیا می سازد. دزوکسی‌کولات به صورت مستقیم به IpaD در محلی ما بین MixH و IpaD در نوک سوزن متصل می‌شوند. محل اتصال مولکول دزوکسی کولات به IpaD، نواحی N– ترمینال نزدیک به مرکز پروتئین یعنی نواحی ما بین اسید آمینه‌های ۱۶۲–۷۲ می باشد {۶}.
توالی نوکلئوتیدی IpaD در بین گونه‌های شیگلا شباهت زیادی نسبت به هم دارد. این امر سبب می‌شود که پروتئین‌های تولید شده از این ژن‌ها نیز علاوه بر شباهت ساختاری یکسان، از لحاظ توالی اسید آمینه ای نیز شباهت قابل توجه ای نیز به هم داشته باشند. مقایسه توالی N– ترمینال IpaD شیگلا دیسانتریه سروتیپ I با توالی این ناحیه در انواع دیگر شیگلا نشان می‌دهد که این ناحیه با شیگلا بوئیدی ۹۸٪، شیگلا سونئی۹۵٪ و شیگلا فلکسنری ۹۴٪ کاملا همولوژی دارد. با توجه به اهمیت و نقش ویژه IpaD و بویژه ناحیه N– ترمینال آن در فرآیند بیماری زایی و معرفی آن به عنوان کاندید واکسن، در ابتدا این ناحیه از پروتئین در باکتری E. coli BL۲۱ همسانه سازی گردید {۷}. در ادامه، این مطالعه به تولید و تخلیص ناحیه N– ترمینال IpaD و تولید آنتی بادی پلی کلونال (IgG) علیه آن پرداخته است.

مواد و روش

همسانه سازی ناحیه N– ترمینال IpaD شیگلا دیسانتری در باکتری E. coli BL۲۱DE۳ توسط پلاسمید بیانی pET۲۸a انجام پذیرفت و توسط تست‌های تشخیص افتراقی (PCR، آنزیم‌های برش دهنده و بررسی توالی) صحت فرآیند تایید شد. در ادامه به دلیل حضور پروموتور T۷ در پلاسمید، با کمک القاگر IPTG بیان پروتئین بررسی و مراحل تخلیص و ایمنی زایی پروتئین نوترکیب به ترتیب صورت پذیرفت.

بررسی وضعیت حلالیت پروتئین نوترکیب

جهت انجام فرآیند تخلیص پروتئین، باید وضعیت پروتئین از لحاظ محلول یا نا محلول (انکلوژن بادی) بودن مشخص شود. زیرا مشخص شدن وضعیت پروتئین نوترکیب در سلول کمک مهمی به تخلیص پروتئین در غلظت بالا و حفظ شرایط ساختمانی آن می‌کند. از این رو بیان پروتئین (در حجم ۱۰میلی لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با غلظت ۰/۷ میلی مولار IPTG طی ۳ ساعت القا انجام و سلول‌ها جمع آوری شدند. رسوب سلولی را در بافر PBS (۱ میلی لیتر) حل کرده و در ادامه سونیکاسیون (قدرت۰/۷و پالس ۰/۵) انجام شد. سپس بعد از سانتریفوژ (oc۴، به مدت ۱۰ دقیقه، rpm۵۰۰۰) محلول رویی جدا سازی گردید (نمونه ۱). به رسوب حاصل، بافر B دناتوره تخلیص پروتئین (حاوی اوره ۸ مولار) اضافه شده و بعد از یکنواخت سازی محلول، تحت شرایط فوق نمونه سانتریفوژ گردید. فاز رویی جداسازی شده (نمونه ۲) و همراه با نمونه ابتدایی بر روی ژل SDS PAGE–۱۲٪ الکتروفورز گردید و حلالیت پروتئین نوترکیب در سلول مورد مطالعه قرار گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

تخلیص پروتئین با کمک Ni-NTA

پس از مشخص شدن نا محلول بودن پروتئین نوترکیب (انکلوژن بادی)، بیان پروتئین در مقیاس بالا (تحت شرایط فوق) صورت پذیرفت و رسوب سلولی در ویال جمع آوری شد. به جهت انجام فرآیند استخراج پروتئین و محلول نمودن پروتئین، از روش شیب اوره استفاده شد {۸} و برای افزایش طول عمر ستون کروماتوگرافی بعد از عبور محلول نهایی فرآیند استخراج شیب اوره از فیلتر μ m ۰/۴۸ نمونه حاوی پروتئین درون ستون کروماتوگرافی تلقیح گردید. در انتها تمامی بافرهای مورد استفاده در ستون، بر روی ژل ۱۲٪-SDS PAGE الکتروفورز شدند.

تخمین غلظت نسبی پروتئین و حذف اوره

غلظت پروتئین تخلیص شده به کمک روش برادفورد {۹} با کمک آلبومین سرم گاوی (سیناژن، ایران) محاسبه گردید. در ادامه، نمونه‌هایی که از غلظت پروتئینی مناسبی برخوردار بودند با کمک کیسه دیالیز و توسط ۱ لیتر بافر PBS (pH ۷,۲=) دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۸ ساعت نگهداری گردید تا اوره از پروتئین نوترکیب جدا گردد.

تایید پروتئین تخلیص شده توسط وسترن بلات

به منظور تایید صحت پروتئین بیان شده از روش وسترن بلاتینگ و آنتی بادی بر ضد ناحیه His-Tag استفاده گردید. در این روش بعد از الکتروفورز پروتئین تخلیص شده در کنار نشانگر پروتئینی و عصاره سلولی بدون القاء بر روی ژل SDS-PAGE- ۱۲٪ الکتروفورز گردید. با منتقل کردن محتویات ژل بر روی کاغذ نیتروسلولز و اضافه کردن آنتی بادی ضد His-Tag، صحت پروتئین تخلیص شده مورد بررسی قرار گرفت.

ایمنی زایی علیه ناحیه N- ترمینال IpaD درخوکچه هندی

مقدار ۲۰۰ میکروگرم پروتئین تخلیص شده با ۶۰۰ میکرولیتر ادجوانت کامل فروند مخلوط و حجم نهایی با PBS استریل به ۱/۲ میلی لیتر رسانده شد. ۸ خوکچه هندی با وزن تقریبی ۳۵۰ گرم را به دو گروه چهار تایی (تست و کنترل) تقسیم کرده و به هر حیوان گروه تست ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه فوق به صورت درون سفاقی تزریق گردید. در تزریق بوسترها، ادجوانت ناقص فروند مورد استفاده قرار گرفت و دو بوستر دیگر به فاصله ۱۴ هفته از یکدیگر تزریق شد. همزمان با تزریق به گروه تست، به حیوانات کنترل تنها PBS استریل همراه با ادجوانت مناسب هر مرحله تزریق گردید.

بررسی تیتر آنتی بادی علیه آنتی ژن تزریق شده

جهت بررسی تیتر آنتی بادی، یک هفته پس از هر تزریق و دو هفته بعد از تزریق نهایی از حیوانات خونگیری به عمل آمد. برای جداسازی سرم از خون، سانتریفوژ با دور rpm۱۵۰۰ و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد و سرم‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

جهت تعیین تیتر آنتی بادی به روش الایزا غیر مستقیم، ۲ میکروگرم از آنتی ژن در کف میکروپلیت توسط بافر کربنات- بی کربنات (pH=۹,۶) اتصال داده شد و چاهک‌ها با بافر PBST (حاویTween-۲۰) شستشو داده شدند. در ادامه از سرم‌های جدا شده از سه نوبت خونگیری با رقت مشخص برای هر سرم در هر چاهک استفاده گردید.

سپس بعد از شستشو چاهک‌ها، کانژوگه HRP IgG ضدخوکچه هندی (DAKO/دانمارک) با PBST به رقت ۱/۲۰۰۰ رسانده شده و درون هر چاهک به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر تلقیح گردید. پس از آن، سوبسترا (OPD,H۲O۲، بافر سیترات فسفات) به هر چاهک اضافه و میکروپلیت به محل تاریک جهت انجام واکنش انتقال داده شد. در انتها، جذب نوری توسط دستگاه در طول موج ۴۹۵ نانومتر خوانده شد.

تخلیص آنتی بادی ضد IpaD با ستون پروتئین G

برای تخلیص آنتی بادی (IgG) علیه ناحیه N- ترمینال IpaD، از ستون پروتئین G استفاده شد. ابتدا ستون در سه نوبت (هر نوبت ml۵) با محلول‌های ۱۰۰ و ۱۰ میلی مولار تریس (pH=۸) شسته شد. سپس، معادل ۰/۱ حجم سرم جداسازی شده، محلول ۱ میلی مولار تریس (pH=۸) به آن افزوده و پس از مخلوط نمودن به ستون منتقل گردید، و در نهایت خروجی ستون جمع آوری شد. در ادامه ستون با محلول ۱۰۰ میلی مولار گلیسین (pH=۳) شسته و خروجی ستون در تیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری جمع آوری شد.

مجددا، ستون همانند مرحله اول با محلول‌های ۱۰۰ و ۱۰ میلی مولار تریس (pH=۸) شسته و خروجی ستون در تیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری جمع آوری گردید. در آخر پس از تعیین غلظت نمونه‌های جمع آوری شده، سرم تخلیص شده بر روی ژل ۱۰ ٪- SDS-PAGE الکتروفورز گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

تایید آنتی بادی تخلیص شده با وسترن بلاتینگ

جهت ارزیابی آنتی بادی تخلیص شده توسط ستون کروماتوگرافی پروتئین G، تست وسترن بلات انجام پذیرفت. در این مرحله بعد از انتقال محتویات ژل الکتروفورز بر روی کاغذ نیتروسلولز،آنتی بادی تخلیص شده از ستون را با غلظت مشخص اضافه و در ادامه با کنژوگه ضد خوکچه هندی تست وسترن انجام پذیرفت (تصویر ۳).

نتایج

بررسی محلول یا نامحلول بودن پروتئین نوترکیب

وجود مقدار ناچیز پروتئین نوترکیب در نمونه حاوی PBS (نمونه۱) در مقایسه با نمونه حاوی اوره ۸ مولار (نمونه۲)، نشان می‌دهد که ناحیه N- ترمینال IpaD در سلول تشکیل انکلوژن بادی می‌دهد (تصویر۱).

تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی

در این فرآیند بعد از تلقیح نمونه به دست آمده از فرآیند استخراج به درون ستون، بافرهای تخلیصی به ترتیب درون ستون تلقیح شد و بافرهای خروجی جمع آوری شدند. بررسی بافرهای خروجی نشان داد که پروتئین نوترکیب در بافر شستشو E دارای غلظت بالاتری در قیاس با بافرهای دیگر (D و MES) است (تصویر۲).

تعیین غلظت پروتئین تخلیص شده

پس از رسم منحنی استاندار آلبومین سرم گاوی، تیتر OD پروتئین اندازه گرفته شده و با منحنی استاندارد BSA مقایسه گردید و غلظت ۱/۴ میکروگرم در میکرولیتر برای پروتئین نوترکیب تخمین زده شد.

تولید آنتی بادی علیه ناحیه N- ترمینال IpaD

بررسی تیتر آنتی بادی ضد ناحیه N- ترمینال IpaD (نمودار ۱) توسط سرم جداسازی شده از هر مرحله خونگیری با رقت مشخص، تیتر قابل قبولی از IgG علیه پروتئین نوترکیب را نشان میدهد. همان طورکه در نمودار ۱ مشخص است پس از تزریق اول در بوسترهای دوم و سوم تیتر آنتی بادی تولیدی به صورت صعودی بالا رفته است. این روند به گونه ای بوده است که در سرم حاصل از آخرین تزریق مقدار آنتی بادی تا رقت۱/۱۶۰۰ از توان محاسباتی دستگاه (OD۴۹۵ = ۴) فراتر بوده است.

بحث

باکتری شیگلا یکی از عوامل شایع اسهال‌های عفونی است که درمان آن فقط به مصرف انواع آنتی بیوتیک محدود نمی شود و بیمار نیاز به جایگزین کردن املاح و آب از دست رفته را دارد. گزارش‌های مقاومت باکتری به آنتی بیوتیک‌های مختلف در سراسر دنیا تهیه واکسنی مناسب را برای این بیماری مانند سایر بیماری‌های واگیر دار باکتریایی در اولویت قرار می‌دهد{۱۰و۱۱}. شیگلا دارای پلاسمید تهاجمی Kb۲۰۰ است که محصولات این پلاسمید نقش مهمی در تهاجم و بیماری زایی این باکتری بازی می‌کند. پروتئین‌های سطحی خانواده Ipa در این میان از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند. اتصال IpaC/D/B به هم در سطح باکتری در روند ورود باکتری به سلول هدف (M-Cell) و فرار از ماکروفاژها نقش کلیدی دارد{۱۲، ۱۳ و۱۴} این امر سبب شده که این ترکیبات در کنار ترکیبات دیگر از قبیل LPS و Stx به عنوان کاندید واکسن شیگلا مطرح باشند. مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر بر روی ساختار و اتصالات IpaD نشان داده است که ناحیه N- ترمینال این پروتئین در فرآیند بیماری زایی تاثیر گذار است{۶}.

پس از تهیه باکتری همسانه سازی شده با ناحیه N- ترمینال IpaD (در مطالعات پیشین) تخلیص و غلظت سنجی پروتئین صورت پذیرفت. در ادامه به جهت ارزیابی قدرت تحریک سیست ایمنی پروتئین نوترکیب به خوکچه هندی در فواصل زمانی مشخص تزریق گردید و درنهایت مقدار کمی آنتی بادی پلی کلونال تولید شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ابتدایی نشان داد که این پروتئین نوترکیب توانسته است با تحریک مناسب سیستم ایمنی حیوانات مورد آزمایش، تیتر قابل توجه ای از IgGرا به صورت پلی کلونال علیه خود تولید کند. این مقدار تا حدی بوده است که تقریبا در تمامی حیوانات ایمن شده با این ناحیه از پروتئین IpaD، تیتر آنتی بادی در زمان دو هفته بعد از تزریق سوم در رقت ۱/۶۴۰۰ درحدود ۲ بود که این مقدار تحریک مناسب سیستم ایمنی را نشان می‌دهد.

نتیجه گیری

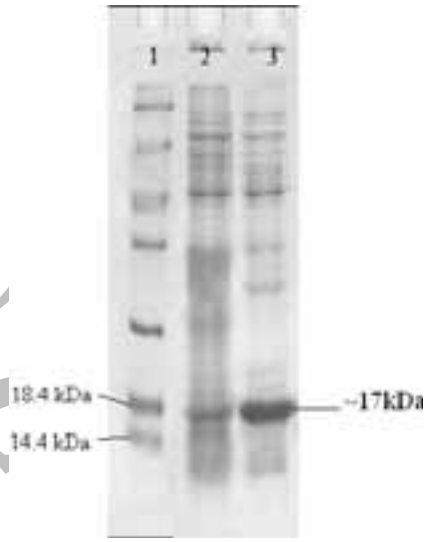
حدود ۱۰ سال است که دانشگاه مریلند آمریکا تحقیقات پیوسته ای را جهت تولید واکسن شیگلا با مرکزیت محصولات پلاسمید تهاجمی به همراه ترکیبات سطحی دیگر (LPS و Vir G) در دست مطالعه دارد. این مطالعه نشان داد که این ناحیه از پروتئین می‌تواند به عنوان یک ایمونوژن مناسب مطرح باشد و به صورت مستقل و یا به صورت ترکیب

Archive of SID
www.SID.ir

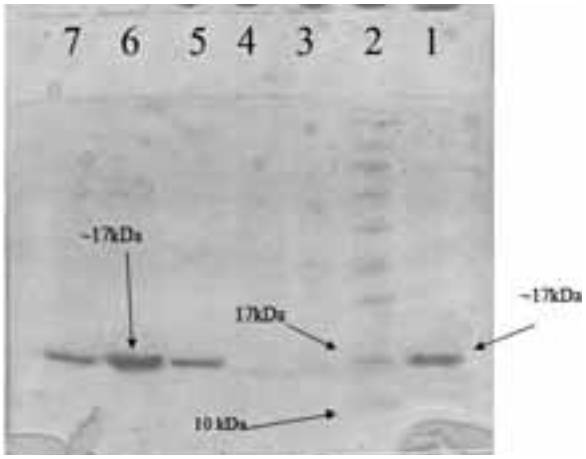
با سایر کاندیدهای دیگر مورد مطالعه و ارزیابی بیشتر قرار گیرد.

تشکر

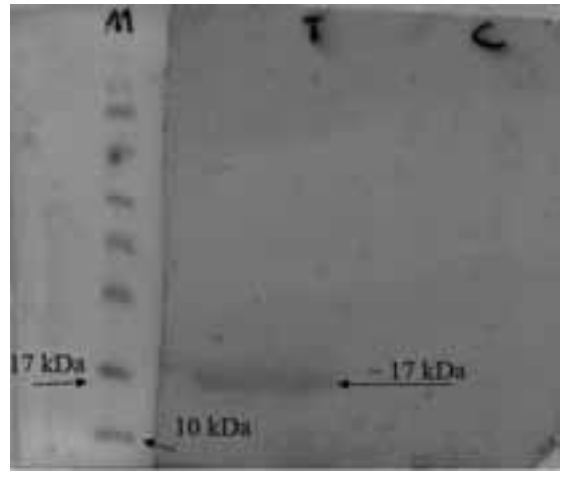
در خاتمه لازم است از سرکار خانم دکتر دیزجی شاغل در انستیتوپاستور ایران که در انجام فرآیند بالینی کمک فراوانی به این مطالعه کردند تشکر و قدردانی شود.



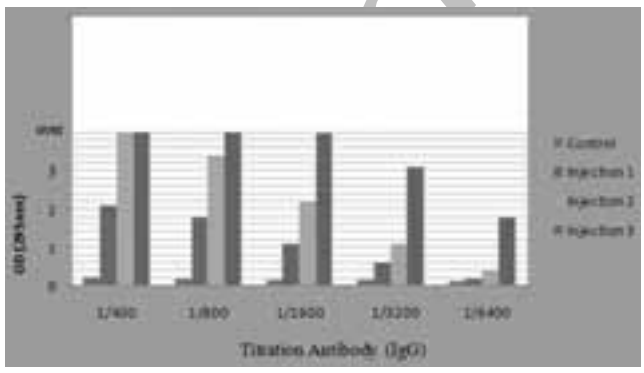
تصویر ۱- بررسی حلالیت پروتئین نوترکیب در سلول
چاهک ۱: نشانگر پروتئینی SM0431 فرمنتاز
چاهک ۲: فاز رویی محلول در PBS(نمونه۱)
چاهک ۳: فاز رویی محلول در اوره ۸ مولار (نمونه ۲)



تصویر ۲- ژل جهت تایید تخلیص پروتئین نوترکیب.
چاهک ۱: نمونه حاوی پروتئین قبل از ستون بعد از سانتریفوژ و فیلتر کردن.
چاهک ۲: نشانگر پروتئینیSM۰۶۷۱ فرمنتاز.
چاهک ۳: بافرF بعد از عبور از ستون.
چاهک ۴: بافر C دناتوره.
چاهک ۵: بافر D دناتوره.
چاهک ۶: بافر E دناتوره.
چاهک ۷: بافر MES.



تصویر ۳- وسترن بلات جهت بررسی شناسایی آنتی بادی تخلیص شده توسط ستون G.
M: نشانگر پروتئینی SM0671.
T: پروتئین تخلیص شده توسط ستون کروماتوگرافی نیکل.
C: عصاری سلول بدون القا.



نمودار ۱- بررسی تیتر آنتی بادی تولید شده در خوکچه هندی علیه پروتئین نوترکیب بعد از هر تزریق تیتر آنتی بادی تولید به صورت قابل ملاحظه ای افزایش پیدا کرده است.

www.SID.ir

References

1. Parsot C. Shigella Spp. And Enteroinvasive Escherichia Coli Pathogenicity Factors J FEMS Microbiol Lett2005;252:11-18.
2. Available from: www.Who.Int/ Vaccine_Research /Diseases/ Diarrhoeal/ En/Index6.Html.
3. Ranjbar R, Soltan Dallal MM, Talebi M and Pourshafie MR. Increased Isolation and Characterization of Shigella Sonnei Obtained from Hospitalized Children in Tehran, Iran. J Health Popul Nutr 2008; 26(4): 426-430, 2008.
4. Sani M and Botteaux A. IpaD Is Localized at the Tip of the Shigella Flexneri Type III Secretion Apparatus, J Biochim. Biophys. Acta (BBA) 2007; 1770:307-311.
5. Man A, Prieto G and Nicoletti C. Improving M-Cell-Mediated Transport across Mucosal Barriers, J Immunology 2004; 113:15-22.
6. Stensrud K, Aam P, La Mar C, Olivec A, Lushington G, Sudharsan R, Shelton NL, and Givens R. Deoxycholate Interacts with Ipad of Shigella Flexneri in Inducing the Recruitment of Ipab to the Type III Secretion Apparatus Needle Tip, J Biological Chemistry 2008; 283(27), 18646-18654.
7. Heiat M, Saadati M, Nazarian S, Barati B, Honari H, Doroudian M, and Hesaraki M. Cloning and Exparession of N-Terminal Region of Ipad from Shigella Dysenteriae in E. Coli , J Paramedical Sciences 2010; 1(4): 12-17.
8. Palmer I, and Wingfield PT. Preparation and Extraction Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from Escherichia Coli, J Current Protocols in Protein Science 1995;6(3): 1-5.
9. Bradford MM. A Rapid and Sensitive for the Quantitation of Microgram Quantitites of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding ,J Analytical Biochemistry 1976; 72, 248-254.
10. Key, B, J Clemens, and Kotloff K. Generic Protocol to Estimate the Burden of Shigella Diarrhoea and Dysenteric Mortal , Tex. Book 1999, 146-151.
11. Johnson, J, Alverez C.M, Sanz J.C, and Ramiro R. Late Detection of a Shigellosis Outbreak in a School in Madrid, J Eurosurveillance. 2005; 10, 268-270.
12. Turbyfill, K, Kaminski R.W, and Oaks E.V. Immunogenicity and Efficacy of Highly Purified Invasion Complex Vaccine from Shigella Flexneri 2a, J.Vaccine. 2008; 26, 1353-1364.
13. Ogawa, M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, and Sasakawa C. Escape of Intracellular Shigella from Autophagy, J Science. 2005;. 307, 727-731.
14. Karen, L, Kotliff K. ‹Phase 1 Evaluation of Vir G Shigella Sonnei Live, Attenuated, Oral Vaccine Strain Wrss1 in Healthy Adults›, Journal. Infection & Immunity. 2002; 70(40), 2016-2021.

Archive of SID

www.SID.ir