مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۸
صفحات: ۱۰۰- ۹۵

هم‌سانه‌سازی و بیان ژن زیرواحد B توکسین حساس به حرارت (LTB) باکتری *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک به‌عنوان کاندیدای واکسن

راضیه خالصی[۱] *BSc*، شهرام نظریان [۱] *MSc*، جعفر امانی[۲] *MSc*، زهرا احصایی[۱] *BSc*، میثم منصوری[۱] *BSc*، سید محمد مؤذنی[۳] *PhD*، جعفرسلیمیان[*] *MSc*

چکیده

اهداف. باکتری *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC) یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری اسهال است که هر ساله سبب مرگ تعداد زیادی در جهان می‌شود. طراحی و ساخت واکسن علیه این بیماری از اهداف سازمان‌های بهداشتی نظیر سازمان بهداشت جهانی است. از مهم‌ترین عوامل ویرولانس باکتری، توکسین حساس به حرارت (LT) است که به‌عنوان کاندیدای واکسن نیز مطرح است. هدف این مطالعه، بیان ژن زیرواحد B توکسین حساس به حرارت (LTB) به‌منظور بررسی ایمنی‌زایی بود.

مواد و روش‌ها. اطلاعات مربوط به ژن LTB از بانک ژن استخراج و طراحی پرایمر صورت گرفت. با استفاده از واکنش PCR، ژن مورد نظر از ژنوم باکتری تکثیر شده و با آنزیم‌های محدودالاثر در وکتور pBluescriptII SK و سپس در وکتور بیانی pET28a، همسانه‌سازی شد. تحت القای IPTG، بیان ژن LTB بهینه‌سازی شد و پروتئین مورد نظر توسط الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها. پروتئین نوترکیب با وزن مولکولی ۱۵/۵ کیلودالتونی در مقایسه با کنترل دارای بیان قابل ملاحظه‌ای بود. پروتئین مورد نظر با استفاده از آنتی‌بادی ضدزیرواحد B کلراتوکسین با روش ایمونوبلاتینگ مورد تایید قرار گرفت.

نتیجه‌گیری. با توجه به ایمونوژن بودن پروتئین LTB، می‌توان از آن در طراحی واکسن همچنین به‌عنوان ادجوان قوی سیستم ایمنی مخاطی استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک، زیرواحد B توکسین حساس به حرارت، واکسن نوترکیب

دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۵/۱۳ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۶/۱۹

* نویسنده مسئول: گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران jafarsalimyan@yahoo.com

۱ گروه علوم زیستی، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
۲ دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
۳ گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

هر ساله تقریباً ۳ میلیون نفر در جهان به دلیل بیماری اسهال می‌میرند [۱، ۲، ۳]. در کشورهای توسعه‌یافته عامل بیماری‌ها بیشتر ویروسی و در کشورهای درحال‌توسعه عامل بیماری‌ها بیشتر باکتریایی است [۱، ۴]. در میان عوامل باکتریایی، باکتری *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC) شایع‌ترین عامل بیماری است [۵].

در دوره بیماری این باکتری هر ساله باعث ایجاد ۴۰۰-۲۸۰ میلیون بیماری اسهال درکودکان کمتر از ۵ سال می‌شود [۶، ۷]. علاوه بر کودکان و بالغین در کشورهای درحال‌توسعه، افرادی که به کشورهای اندمیک مسافرت می‌کنند به این بیماری مبتلا می‌شوند. از این‌رو به بیماری مسافران نیز شهرت دارد [۴، ۵، ۶، ۷، ۸]. این بیماری در حوادث غیرمترقبه مانند سیل و زلزله نیز شیوع زیادی دارد [۶، ۹، ۱۰].

طراحی و تهیه واکسن از اهداف سازمان‌های بهداشتی نظیر WHO است [۱۱]. یکی از مهم‌ترین عوامل ویرولانس باکتری، توکسین حساس به حرارت (LT) است که به‌عنوان کاندیدای واکسن نیز مطرح است [۶، ۱۲، ۱۳]. انتروتوکسین حساس به حرارت در سویه‌های *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC) عامل ایجادکننده اسهال در انسان و حیوان است [۱۴]. این توکسین دو زیرواحد سنگین (LTA) و سبک (LTB) دارد که زیرواحد سبک به شکل پنتامر و از پنج مونومر یکسان تشکیل شده است [۱۴]. زیرواحد A با وزن مولکولی ۲۷ kD جزء سمی توکسین محسوب شده و خاصیت ADP- ریبوزیل‌ترانسفرازی دارد و می‌تواند آدنیلات سیکلاز را فعال ساخته و موجب افزایش cAMP شود، که این عامل منجر به از دست دادن آب و الکترولیت‌ها از سلول‌های اپی‌تلیال می‌گردد [۱۴]. زیرواحد B با وزن مولکولی ۱۱/۸ kD به صورت پنتامر و غیرکووالان به زیرواحد A متصل می‌شود [۱۵]. نقش این زیرواحد، اتصال توکسین به گیرنده‌های GM1 سطح سلول‌های اپی‌تلیالی روده است [۱۴، ۱۵، ۱۶]. این توکسین از نظر ساختار، عملکرد و خاصیت ادجوانی، شباهت زیادی به زیرواحد B توکسین کلرا دارد [۶، ۱۴، ۱۷].

این توکسین به‌تنهایی به‌عنوان واکسن در فاز یک کارآزمایی بالینی [۱۸، ۱۹] و هم‌چنین به همراه سایر ایمونوژن‌های باکتری نظیر عوامل کلونیزاسیون مورد استفاده قرار گرفته است [۶].

با توجه به نقش مهم این توکسین در بیماری‌زایی، گزارشات متعددی در استفاده از این جزء به‌عنوان واکسن وجود دارد [۶]. این جزء را به‌تنهایی از طریق دهانی، خوراکی، تنفسی و جذب پوستی به‌عنوان واکسن استفاده کرده‌اند [۶]. هدف این مطالعه، بیان ژن LTB به‌منظور بررسی ایمنی‌زایی به تنهایی و به همراه سایر عوامل ایمونوژن باکتری است.

مواد و روش‌ها

استخراج ترادف ژن LTB مربوط به باکتری ETEC از بانک ژن و طراحی پرایمر: ژن توکسین حساس به حرارت زیرواحد B باکتری ETEC از بانک ژن (M17874) استخراج شد و به کمک نرم‌افزارهای Oligo و DNASIS طراحی پرایمر صورت گرفت و توسط شرکت بایونیر (Bioneer؛ کره‌جنوبی) سنتز شد. پرایمر بالادست دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر Eco*RI* و پرایمر پایین‌دست دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر Hind*III* است.

توالی پرایمر رفت:

5' TGTGCAGAATTCGCTCCTCAGTC 3'

توالی پرایمر برگشت:

5'TTACAAGCTTCTAGTTTCCATACTGA TTG 3'

تکثیر ژن LTB با روش PCR: باکتری ETEC (از آزمایشگاه رفرانس بیمارستان بوعلی) در محیط کشت مایع LB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت کشت داده شد. ژنوم باکتری با کمک روش CTAB-NaCl استخراج و با استفاده از اسپکتروفوتومتری تعیین غلظت گردید و به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد [۲۰]. واکنش PCR برای تکثیر ژن LTB ابتدا با آنزیم Taqپلی‌مراز (سیناژن) در غلظت ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۸ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۴ میلی‌مولار dNTPs و در دمای اتصال ۵۹ درجه سانتی‌گراد بهینه‌سازی شد. به‌منظور جلوگیری از جهش‌های ناخواسته تکثیر نهایی ژن با استفاده از آنزیم Pfuپلی‌مراز (Fermentas) در حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. هر واکنش PCR شامل ۰/۸ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۴میلی‌مولار از مخلوط نوکلئوتیدهای dATP، dTTP، dGTP و dCTP، ۲ واحد آنزیم DNAپلیمراز Pfu، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR و $MgSo_4$ با غلظت نهایی

Archive of SID

www.SID.ir

۲/۵ میلی‌مولار و ۵۰ نانوگرم از ژنوم استخراج‌شده ETEC بود. چرخه‌های PCR شامل یک مرحله واسرشت‌شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود.

هم‌سانه‌سازی قطعه حاصل از واکنش PCR: محصول PCR با کمک DNA نردبانی ۱۰۰ bp (Fermentas) روی ژل آگاروز (سیناژن) ۱٪ مورد تأیید واقع شد. هضم آنزیمی محصول PCR با کمک آنزیم Cfr9I (Fermentas) نیز تأیید دیگری بر این مسأله بود. با استفاده از دو آنزیم Hind*III* و Eco*RI* (Fermentas) در واکنش هضم دوگانه با بافر Y/TANGO، محصول PCR مورد هضم قرار گرفت تا در انتهای ´۳ و ´۵ انتهای چسبنده ایجاد کند. وکتورهای انتخاب‌شده در این مطالعه، وکتور کلونینگ pBluescriptII SK (Fermentas) و وکتور بیانی pET28a (Qiagene) بودند که با دو آنزیم فوق مورد هضم قرار گرفتند. سپس وکتور psk و محصول PCR روی ژل آگاروز با دمای ذوب پایین با غلظت ۱٪ منتقل و با کیت خالص‌سازی (Fermentas)، محصول PCR و وکتور تخلیص شد. با کمک آنزیم DNAلیگاز T4 (Fermentas) فرآیند اتصال قطعه با وکتور در دمای ۱۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ ساعت انجام شد و سپس پلازمیدهای نوترکیب با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *E. coli* سویه TOP10 (Invitrogen) انتقال داده شد و روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (غلظت ۸۰ µg/ml) کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد [۲۰].

کلون‌های حاوی قطعه موردنظر به کمک PCR و هضم آنزیمی و در نهایت با تعیین توالی تأیید شد. قطعه کلون‌شده مجدداً با دو آنزیم نام برده مورد برش قرار گرفت و برای بیان شدن به وکتور pET28a منتقل و در میزبان *E. coli* سویه BL21DE3 plyss (Stratagen) تراریخت شد.

بیان ژن مورد نظر: از کشت شبانه کلون‌های جداسازی‌شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع تلقیح و پس از رسیدن به ۰/۶ OD در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر (برای به‌دست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پروموتر (IPTG) (Fermentas) با غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

تعیین غلظت پروتئین: غلظت پروتئین بیان‌شده به کمک روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) (سیناژن) به‌عنوان استاندارد انجام گرفت [۲۱].

الکتروفورز SDS-PAGE: نمونه‌های قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (Fermentas; SM0431) تحت شرایط دناتوره، الکتروفورز شد. غلظت ژل ۱۲٪ با جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر بود [۲۱].

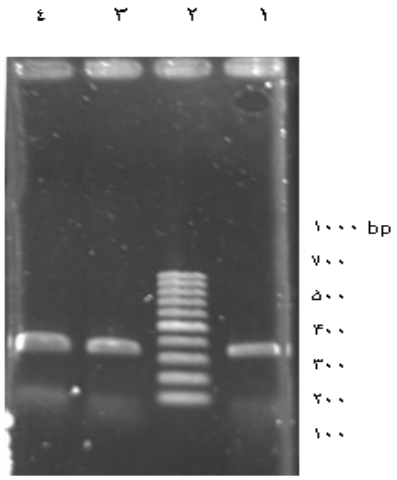
تولید آنتی‌بادی برعلیه CTXB: با توجه به این‌که بین پروتئین LTB و CTXB مشابهت ساختمانی وجود دارد، لذا پروتئین زیرواحد B توکسین کلرا (Sigma; C9903) تهیه و مقدار ۱۰۰ µg از آن در چهار نوبت، بار اول همراه با ادجوان کامل و در نوبت‌های بعدی با ادجوان ناقص فروند به خرگوش تزریق و در نهایت از خرگوش خون‌گیری و آنتی‌بادی ضد CTXB تهیه شد.

تأیید پروتئین نوترکیب: برای تأیید پروتئین نوترکیب بیان‌شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی‌بادی ضدتوکسین کلرا استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم وسترن بلاتینگ Bio-rad (Mini Protean) و بافر انتقال (گلایسین ۳۹ میلی‌مولار، تریس ۴۸ میلی‌مولار، SDS ۰/۰۳۷٪ و متانول ۲۰٪) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (NaCl ۳۷ میلی‌مولار، KCl ۲/۷ میلی‌مولار، $Na_2Hpo_4.7H_2O$ ۴/۳ میلی‌مولار، توین۲۰ ۵٪ و pH ۷/۲) حاوی ۵٪ شیرخشک به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شست‌وشو با بافر PBST به مدت یک ساعت با رقت ۱/۵۰۰ آنتی‌بادی ضد توکسین کلرا در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. نمونه پس از شست‌وشوی مجدد با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱/۲۰۰۰ از آنتی‌بادی کانژوگه خرگوشی (Dako) در بافر PBST در دمای اتاق قرار گرفت و در نهایت پس از سه بار شست‌وشو با بافر PBST، برای آشکارسازی از بافر تریس ۵۰mM حاوی ۶ mg DAB و ۱۰µl H_2O_2 استفاده شد. واکنش با استفاده از PBS متوقف گردید [۲۲].

Archive of SID
www.SID.ir

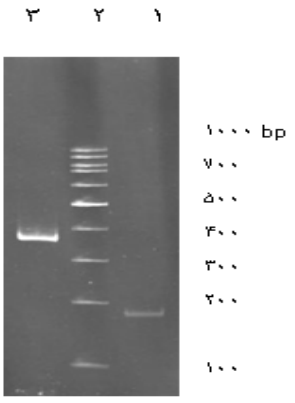
نتایج

واکنش PCR: پس از طراحی پرایمر، صحت آن با نرم‌افزار BLAST بررسی شد که با ETEC موجود در بانک ژنی بالاترین اختصاصیت را نشان می‌داد. پس از تکثیر ژن LTB به روش PCR، محصول روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت و همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با ژن هدف ما هم‌خوانی داشت (۳۱۲ جفت باز).



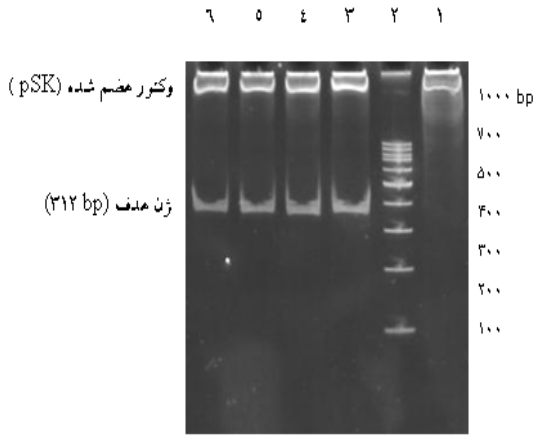
شکل ۱) نتایج محصول PCR ژن LTB روی ژل آگاروز ۱٪
ستون ۱، ۳ و ۴: ژن LTB؛ ستون ۲: نردبان DNA

تأیید PCR: برای تأیید محصول PCR قبل از هم‌سانه‌سازی از آنزیم Cfr9I استفاده شد که طبق آنالیز با نرم‌افزار DNASIS، هضم آنزیمی محصول PCR، دو قطعه به طول ۱۵۶ جفت باز را به‌وجود می‌آورد که نتایج آن در شکل ۲ قابل مشاهده است.

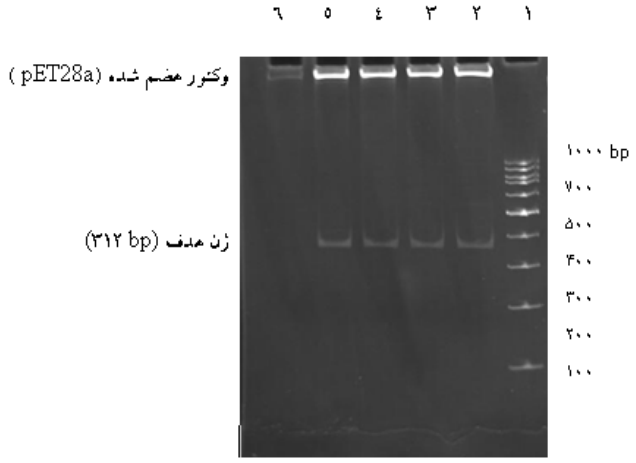


شکل ۲) تأیید محصول PCR ژن LTB
با استفاده از هضم آنزیمی (Cfr9I)
ستون ۱: هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم Cfr9I؛ ستون ۲: نردبان DNA؛ ستون ۳: محصول PCR

هم‌سانه‌سازی در وکتورهای pET28a و pBlueskriptII SK: محصول PCR تأییدشده به کمک دو آنزیم Eco*RI* و Hind*III* مورد هضم قرار گرفت و سپس قطعه ژنی موردنظر روی ژل آگارز مشاهده شد. برای تأیید بیشتر، از پلازمید استخراج‌شده به‌عنوان الگو در PCR استفاده شد. سپس قطعه ژنی از وکتور کلونینگ (pSK) به وکتور بیانی (pET28a) منتقل شد و با دو روش قبلی مورد تأیید قرار گرفت (شکل‌های ۳ و ۴).



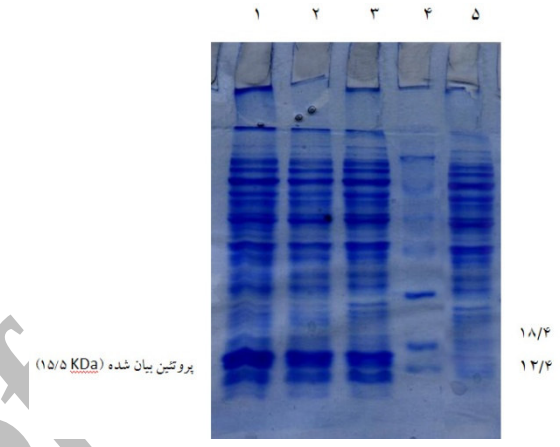
شکل ۳) آنالیز وکتور pSK حاوی قطعه موردنظر
با استفاده از هضم آنزیمی (Eco*RI* ,Hind*III*)
ستون ۱: کنترل منفی، وکتور بدون ژن هدف، ستون ۲: نردبان DNA، ستون ۶-۳: ژن هدف (۳۱۲ bp – وکتور هضم‌شده pSK)



شکل ۴) آنالیز وکتور pET28a حاوی قطعه موردنظر با استفاده از هضم آنزیمی (Eco*RI* ,Hind*III*).
ستون ۱: نردبان DNA، ستون ۵-۲: ژن هدف (۳۱۲ bp)- وکتور هضم‌شده pET28a، ستون ۶: کنترل منفی، وکتور بدون ژن هدف

www.SID.ir

نمونه‌ها پس از القاء در ناحیه ۱۵/۵ کیلودالتونی دارای باندی واضح بودند که وجود مارکر پروتئینی آن را تأیید می‌کند، درحالی‌که نمونه قبل از القاء دارای چنین باندی نیست (شکل ۵). برای تأیید محصول پروتئین از تکنیک وسترن بلات استفاده شد که نتیجه آن در شکل ۶ مشاهده می‌شود. با استفاده از ضدCTXB در نمونه آزمون، باندی در مقیاس کیلودالتونی ظاهر شد، درحالی‌که در ستون کنترل هیچ باندی مشاهده نشد.



شکل ۵) الکتروفورز PAGE

ستون ۱، ۲ و ۳: نمونه‌های بیان‌شده ژن LTB، پروتئین با وزن ملکولی ۱۵/۵ در مقایسه با کنترل، ستون ۴: نشان‌گر اندازه پروتئین، ستون ۵: نمونه القانشده (کنترل منفی)

بحث

سالانه ۲۰۰ میلیون کودک زیر ۵ سال به بیماری اسهال ناشی از باکتری *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک مبتلا شده و هر سال در حدود ۸۰۰–۴۰۰هزار نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند [۶، ۹]. به همین دلیل، طراحی و تهیه واکسن علیه این بیماری از اهداف سازمان‌های بهداشتی از جمله WHO است [۲۲].

شواهد نشان می‌دهد که امکان به‌وجود آمدن ایمنی محافظتی علیه این بیماری وجود دارد. افراد بالغ در کشورهای در حال توسعه کمتر به این بیماری مبتلا شده و مسافران به این مناطق نیز در صورت اقامت طولانی مدت دیگر به این بیماری دچار نمی‌شوند. سم حساس به حرارت باکتری *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک در میان سایر عوامل ویرولانس از اهمیت ویژه‌ای در طراحی واکسن برخوردار است. مطالعات گذشته‌نگر نشان می‌دهد که این پروتئین به‌عنوان واکسن مورد توجه گروه‌های مختلف بوده است. *یاماموتو* ژن LT را کلون و محصول نوترکیب آن را آنالیز کرد و اظهار داشت که برای تولید واکسن علیه اسهال ایجادشده توسط ETEC می‌تواند مفید باشد [۲۳]. *پیزا* و همکاران با ایجاد جهش در زیرواحد A، توکسین را غیرسمی نمودند و نشان دادند که می‌تواند القاکننده آنتی‌بادی باشد. در نتیجه، آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده توکسین تقریباً به‌طور کامل به‌وسیله زیرواحد B ایجاد شدند [۲۴]. *یان* و همکاران ژن LTB را به ژن دیگری (UreB) الحاق و در سیستم پروکاریوتی بیان کرده و ایمنی‌زایی و خاصیت ادجوانی آن را مورد بررسی قرار دادند. سیستم بیانی پروکاریوت، ژن هدف را با کارآیی بسیار بالا بیان کرد. ژن بیان‌شده، خاصیت ایمونوژنیسیته و آنتی‌ژنیسیته و ادجوانی مناسبی را نشان داد. همه این شواهد حاکی از لزوم استفاده از LTB در طراحی واکسن مهندسی‌شده علیه ETEC است [۲۵]. *هاجیشِنگالیس* نشان داد که LTB علاوه بر خاصیت ادجوانی دارای ویژگی تعدیل سیستم ایمنی نیز هست و باعث افزایش پاسخ ایمنی می‌شود [۲۶]. *گلِن* و *مک‌کنزی* در مرحله کارآزمایی بالینی، سم LT را از راه پوست روی گروه انسانی آزمایش کرده و نشان دادند که ایمنی مناسبی در این افراد علیه این سم به‌وجود می‌آید [۱۸، ۱۹].

با در نظر گرفتن این‌که مولکول کاندیدای واکسن بایستی بتواند علیه طیف وسیعی از سویه‌های این باکتری ایجاد ایمنی محافظتی نماید و از طرفی اکثریت سویه‌های این باکتری (نزدیک به ۷۰٪) [۱۸، ۱۹]، مولد توکسین حساس به حرارت هستند، در این مطالعات زیرواحد B این توکسین به‌تنهایی یا به‌همراه ایمونوژن‌های دیگر باکتری برای تولید واکسن مطرح بوده‌اند. در مقاله مروری *واکر* [۲۲] نیز لزوم وجود LTB به‌عنوان بخشی از واکسن مورد تأکید قرار گرفته است.

نتیجه‌گیری

ژن LTB پس از تکثیر به وکتور کلونینگ pSK انتقال یافت. تمامی نتایج از جمله تعیین توالی ژن، تعیین وزن مولکولی پروتئین بیان‌شده و واکنش آن با آنتی‌بادی ضدCTXB، مؤید بیان زیرواحد B توکسین حساس به حرارت است. لذا در مطالعات بعدی اثرات ایمنی‌زایی آن به‌تنهایی یا به‌همراه سایر عوامل ایمونوژن باکتری نظیر عامل کلونیزاسیون قابل بررسی است.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1- Jafari F, Shokrzadeh-Ahrabi L, Hamidian M, Salmanzadeh S, Zali MR. Acute diarrhea to enterotoxigenic bacteria in patients at hospital in Tehran. Jpn J Infect Dis. 2008;61:269-73.

2- Baudry B, Savarino SJ, Vali p. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*: A recently discovered diarrheal pathogen. J Infect Dis. 1990;161:1249-51.

3- Guerrant RL, Kosek M, Moore S. Magnitude and impact of diarrhea disease. Arch Med Res. 2002;33:351-5.

4- Black R. Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens. Rev Infect Dis. 1990;12:573-8.

5- Allen KP, Randolph MM, Fleckenstein JM. Importance of heat-labile enterotoxin in colonization of the adult mouse small intestine by human enterotoxigenic Escherichia coli strains. Infect immun. 2006;74(2):869-75.

6- Svennerholm AM, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic Escherichia coli. Exp Rev Vaccines. 2008;7(6):795-804.

7- Wenneras C, Erling V. Prevalence of enterotoxigenic Escherichia coli-associated diarrhea and carrier state in the developing world. J Health Popul Nutr. 2004;22(4):370-82.

8- Bourgeois AL, Gardiner CH, Thornton SA, Batchelor RA, Burr DH, Escamilla J, et al. Etiology of acute diarrhea among United States military personal deployed to South America and West Africa. Am J Top Med Hyg. 1993;48:243-8.

9- Qadri F, Svennerholm AM, Faruque ASG, Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: Epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. Clin Microbiol Rev. 2005;18(3):465-83.

10- Qadri F, Khan A, Abu Syed G. Enterotoxigenic Escherichia coli and V. cholerae diarrhea. Emerg Infect Dis. 2005;11(7):1104-7.

11- World Health Organization. State of the art of vaccine research and development. [Report] 2005. Available in: www.who.int/vaccines-documents/.

12- Sanchez J, Holmgren J. Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea. Curr Opin Immunol. 2005;17(4):388-98.

13- Coster TS, Wolf MK, Hall ER, Cassels FJ, Taylor DN, Liu CT, et al. Immune response, ciprofloxacin activity and gender differences after human experimental challenge by two strains of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect Immun. 2007;75(1):252-9.

14- Hajishengallis G, Arce S, Gockel CM, Connell TD, Russell MW. Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or tolerance: Applications for oral infections. J Dent Res. 2005;84(12):1104-6.

15- Nicklasson M. Studies on the expression and regulation of enterotoxins and colonization factors in Enterotoxigenic Escherichia Coli (ETEC). Sweden: Göteborg University; 2008.

16- Leong J, Vinal AC, Dallas WS. Nucleotide sequence comparison between heat-labile toxin B-subunit cistrons from Escherichia coli of human and porcine origin. Infect Immun. 1985;48(1):73-7.

17- Yan J, Wang Y, Shao SH, Mao YF, Li HW, Luo YH. Construction of prokaryotic expression system of LTB-Ureb fusion gene and identification of the recombinant protein immunity and adjuvanticity. World J Gastroenterol. 2004;10(18):2675-9.

18- 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;25:3684-91.

19- Glenn GM, Villar CP, Flyer DC, Bourgeois AL, McKenzie R, Lavker RM, et al. Safety and immunogenicity of an enterotoxigenic Escherichia coli vaccine patch containing heat-labile toxin: Use of skin pretreatment to disrupt the stratum corneum. Infect Immun. 2007;75(5):2163-217.

20- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning laboratory manual. 4th ed. New York: CSHL Press; 2001.

21- Bollag DM, Michel DR, Edelstein SJ. Protein methods. 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 1996.

22- Walker RI, Steele D, Aguadob T. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic E. coli disease. Vaccine. 2007;25:2545-66.

23- Yamamoto T, Yokota T, Kaji A. Molecular organization of heat-labile entrotoxin genes originating in Escherichia coli of human origin and construction of heat-labile toxoid-producing strains. J Bacteriol. 1981;178:983-7.

24- 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. J Exp Med. 1994;180:2147-53.

25- Yan J, Wang Y, Shao SH, Mao YF, Li HW, Luo YH. Construction of prokaryotic expression system of ltB-ureB fusion gene and identification of the recombinant protein immunity and adjuvanticity. World J Gastroenterol. 2004;10:2675-9.

26- Hajishengallis G, Arce S, Gockel CM, Connell TD, Russell MW. Immunomodulation with entrotoxins for generation of secretory immunity or tolerance: Applications for oral infections. J Dent Res. 2005;84:1104-16.

Archive of SID

www.SID.ir