مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۵، شماره۱ (شماره پیاپی ۶۰)، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۱، ۴۲-۳۵

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

راضیه خالصی[۱]، جعفر سلیمیان[۲*]، شهرام نظریان[۱]، زهرا احصائی[۱]، علی اصغر رحیمی[۳]، نفیسه امینی[۱]، سید محمد مؤذنی[۴]

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

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

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

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

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲۵

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 ۰/۰۲ مولار در pH=۸ 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 خنثی کنندگی آنتی بادی ضد زیر واحد B روی توکسین حساس به حرارت نیز به این روش مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: وجود باندهای ۲۸ و ۱۲ 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 ۸۰ 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 زیرواحد 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

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

باکتری *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC) مهم‌ترین عامل باکتریایی ایجاد کننده اسهال(۱) و مسئول میزان قابل توجهی از بیماری‌ها و مرگ و میر ناشی از اسهال در میان کودکان (زیر ۵ سال) در کشورهای در حال توسعه، مسافرین به مناطق گرمسیری و اندمیک می‌باشد(۲، ۳). حدود ۷۰-۳۰ درصد موارد اسهال به دلیل عفونت‌های باکتریایی بوده(۴) و شایع‌ترین باکتری جدا شده از بیماران، *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک می‌باشد(۵). فاکتورهای ویرولانس اختصاصی مانند انتروتوکسین‌ها و فاکتورهای کلونیزاسیون، ETEC را از سایر گروه‌های اشریشیاکلی ایجاد کننده اسهال متمایز می‌سازد. این باکتری قادر به تولید توکسین‌های حساس به حرارت (LT) و یا مقاوم به حرارت (ST) می‌باشد(۶).

انتروتوکسین LT با وزن مولکولی تقریبی ۸۶ کیلودالتون، از نظر ساختاری و عملکردی متعلق به خانواده توکسین‌های AB5 است(۶، ۷) و از یک زیرواحد A به وزن مولکولی ۲۸ کیلودالتون و پنج زیرواحد B به وزن مولکولی ۵۷ کیلودالتون (هر زیر واحد ۱۱/۵ کیلودالتون) تشکیل شده است(۵، ۸). هر کدام از این زیرواحدها به عنوان یک پلی پپتید پیش ساز سنتز می‌شوند(۹) و پس از شکست پپتید نشانه، هوموپنتامر B به وسیله پیوند غیرکووالانسی به زیرواحد A متصل شده و توکسین کامل ایجاد می‌گردد(۱۰). زیرواحد A دارای فعالیت توکسیک و زیر واحد B مسئول اتصال توکسین به گیرنده GM1 موجود در سطح انتروسیت‌های روده می‌باشد(۶، ۷). در اتصال توکسین، ۵ زیرواحد B به ۵ گیرنده GM1 متصل می‌شوند(۱۱). سپس کمپلکس GM1-LT به درون سلول اندوسیتوز گشته و زیرواحد 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(۵).

گزارشات قبلی نشان می‌دهد که خالص سازی توکسین LT به منظور کاربرد در تولید واکسن و هم‌چنین سنجش میزان آنتی بادی خنثی کننده در مدل های واکسن استفاده می‌شود(۱۲). استراتژی تولید واکسن بر اساس توکسین LT یکی از رویکردهای توسعه واکسن علیه ETEC است(۱۳). بر اساس این رویکرد از این توکسین در نوارهای جذب پوستی جهت ایمن سازی افراد در آزمون بالینی استفاده و هم‌چنین واکسن‌های کانژوگه توکسین با سایر اجزای باکتری نیز گزارش شده است. نتایج حاکی از تولید آنتی توکسین خنثی کننده سیستمی و موضعی می باشد(۱۴، ۱۵). از توکسین LT برای سنجش میزان آنتی بادی‌های خنثی کننده در الایزا و به چالش کشیدن مدل‌های حیوانی واکسینه نیز استفاده می‌شود(۱۲).

ما در مطالعات قبلی تهیه و تخلیص اجزای ایمونوژن باکتری (LTB, CfaB, CfaE) را به عنوان کاندیدای جزئی از واکسن گزارش کردیم(۱۷-۱۵). 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 الایزای مبتنی بر گیرنده گانگلیوزیدی GM1 (GM1-ELISA) و شناسایی ETEC مولد توکسین بهره جست.

مواد و روش‌ها

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

جهت تولید توکسین، باکتری ETEC در محیط کشت حاوی کازآمینو اسید ۲ درصد، عصاره مخمر ۰/۱۵ درصد، محیط نمکی(CYE) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۲۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد(۱۸). سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۶۰۰۰g سانتریفیوژ گردید و مایع رویی تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آمونیوم سولفات (اشباع ۹۰ درصد) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد همراه با هم زدن به مایع رویی افزوده شد. پس از گذشت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، رسوب حاصل جمع‌آوری و در تریس ۰/۰۲ مولار حل گردید. محلول حاصل به مدت ۲۰-۱۸

Archive of SID

www.SID.ir

ساعت بر روی محلول تریس۰/۰۲ مولار در ۴ درجه سانتی‌گراد دیالیز و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۱۹،۵).

پس از کشت باکتری و انجام مراحل ترسیب و جمع‌آوری 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(۲۲). سپس جهت بررسی توکسین و زیرواحدهای آن، نمونه توکسین تخلیص شده همراه با مارکر پروتئینی (SM0671 فرمنتاز) تحت شرایط دناتوره روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز گردید و زیر واحدهای A و B آن مورد بررسی قرار گرفت(۲۰). هم‌چنین این نمونه بر روی غشای نیتروسلولز منتقل شد و ایمونوبلات (Biorad) با استفاده از آنتی بادی ضد LTB نوترکیب(۱۵، ۱۶) جهت شناسایی زیر واحد B توکسین صورت گرفت(۲۰).

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 می‌گیرد. روش GM1-ELISA در ابتدا توسط *سونرهولم* (۱۹۸۳) ابداع شد و سپس توسط ما (Ma-2006) مورد تغییر قرار گرفت(۲۳-۲۱).

طبق روش استاندارد، سه میکروگرم گانگلیوزید GM1 (Sigma G-7641) در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کربنات- بی‌کربنات (pH=۹/۶) به هر چاهک میکروپلیت (Nunc, Denmark) اضافه و به چاهک های کنترل منفی BSA افزوده شد و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در بین تمامی مراحل الایزا، شستشو با بافر PBST (pH=۷/۲ و ۰/۰۵ درصد توئین۲۰) انجام شد. سپس مرحله بلوکه کردن با افزودن محلول شیر خشک ۲ درصد در بافر PBST به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. پس از شستشو و خشک کردن، توکسین تخلیص شده با سریال رقت از ۲ میکروگرم تا ۱۲۵ نانوگرم به هر چاهک اضافه و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بقیه مراحل با آنتی بادی ضد rLTB با رقت ۱/۲۰۰ و کانژوگه موشی با رقت ۱/۲۰۰۰ صورت گرفت.

با توجه به این که توکسینLT دارای دو زیر واحد A و B می‌باشد لذا می‌توان از آنتی بادی ضد LTB نوترکیب 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 ۲ میکروگرم از توکسین LT تخلیص شده به سریال رقت آنتی بادی (۱:۲ تا ۱:۶۴) اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، سپس این مخلوط به میکروپلیت‌های 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 روش‌های رسوب دهی- دیالیز تخلیص و میزان خلوص آن بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE بررسی گردید. شکل ۱، دو باند ۱۱/۵ و ۲۸ کیلودالتونی را نشان می‌دهد که به ترتیب مربوط به زیرواحد B و A توکسین LT تخلیص شده می‌باشد. تکنیک ایمونوبلات با استفاده از Anti-rLTB نشان دهنده حضور زیر واحد B توکسین است.

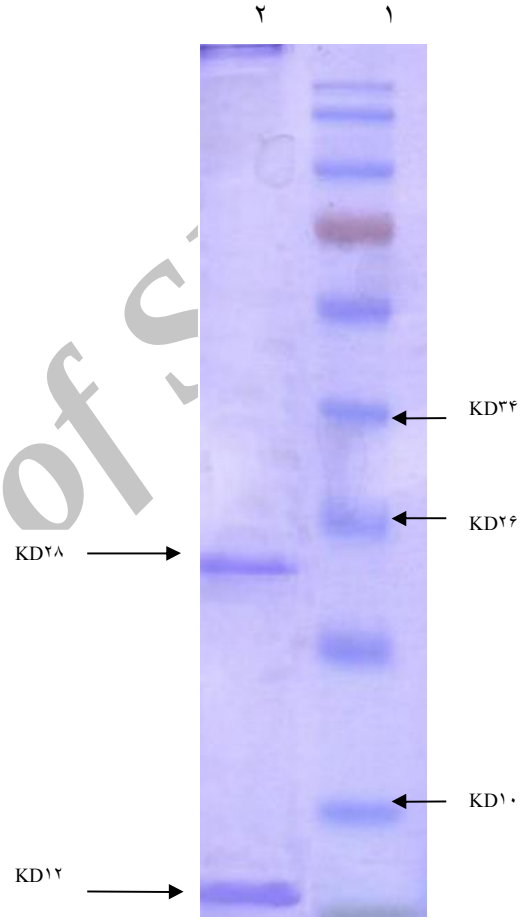
با استفاده از روش GM1-ELISA، پیوند هولوتوکسین تخلیص شده با گیرنده گانگلوزیدی GM1 بررسی گردید. نمودار ۱ نمایانگر پیوند توکسین LT تخلیص شده به گیرنده خود از ۲ میکروگرم تا ۱۲۵ نانوگرم می‌باشد.

نمودار ۲ نشان می‌دهد که آنتی بادی ضد LTB نوترکیب، توانایی شناسایی توکسین تخلیص شده و مهار اتصال آن به گیرنده GM1 را داراست. نمودار ۲ حاکی از

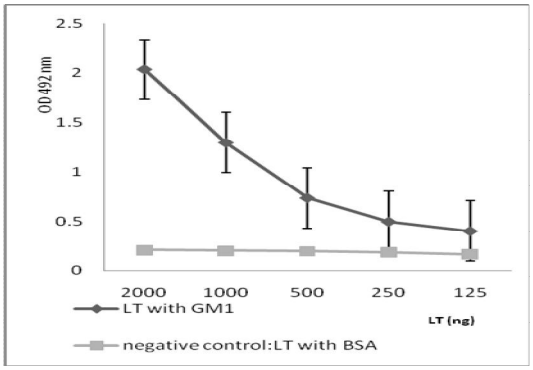
Archive of SID

www.SID.ir

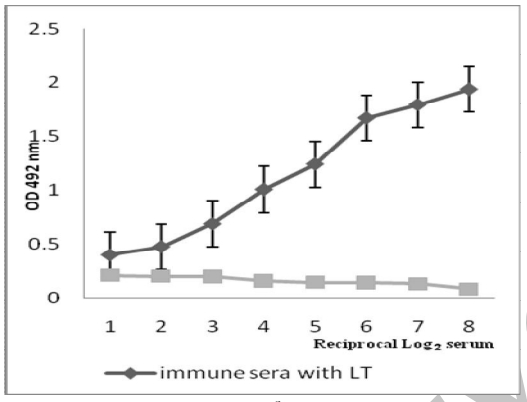
آن است که آنتی بادی ضد LTB نوترکیب می‌تواند تا ۸۰ درصد از اتصال توکسین به گیرنده GM1 متصل به میکروپلیت جلوگیری نماید. سرم‌های موش‌های غیرایمن به عنوان کنترل منفی استفاده شد، این سرم‌ها به هیچ عنوان ممانعتی را نشان ندادند.



شکل ۱. الکتروفورز توکسین LT تخلیص شده روی ژل SDS-PAGE دوازده درصد
ردیف ۱: نشانگر پروتئینی SM0671
ردیف ۲: زیرواحد های A و B توکسین LT به ترتیب با وزن مولکولی تقریبی ۲۸ و ۱۲ کیلودالتون



نمودار ۱. شناسایی و سنجش میزان توکسین LT با تکنیک الایزای مبتنی بر گیرنده گانگلیوزیدی M1



نمودار ۲. بررسی اثر مهاری آنتی بادی ضد LTB نوترکیب 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 علایم 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(۲۳). اگر چه در مقالات متعدد

Archive of SID

www.SID.ir

بر نقش مهم زیرواحد B به عنوان ایمونوژن و ادجوان قوی تأکید شده است(۲۴) و نشان داده‌اند که آنتی بادی علیه این زیر واحد می‌تواند از اتصال سم به گیرنده جلوگیری نماید(۵، ۶، ۱۱) 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(۱۴، ۱۵، ۲۵). 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*(۱۹) و *کانکل* (۲۰)، توکسین حساس به حرارت تخلیص و دو باند با وزن مولکولی تقریبی ۲۸ و ۱۲ کیلو دالتون بر روی ژل الکتروفورز در شرایط دناتوره دیده شد که با نتایج *پیزا* (۲۰۰۶) نیز هم‌خوانی دارد و نشان دهنده دو زیر واحد A و B این توکسین است(۲۶).

سونرهولم (۲۲) و *ما* (۲۳) 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 (AB_5) باشد، زیرا توکسین تنها در حالت فولدینگ مناسب توانایی اتصال به این گیرنده را دارد.

آنتی بادی ضد زیر واحد B نوترکیب می‌تواند به زیر واحد B پنتامر در حالت اتصال به زیرواحد 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 وارد واکنش شده و توانایی اتصال به گیرنده GM1 را از دست داده است. منز و همکاران (۲۰۰۶) 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(۶).

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 خنثی کنندگی آنتی بادی ضد LTB نوترکیب بر روی توکسین LT پیشنهاد می‌شود که می‌توان از توکسین LT تخلیص شده به عنوان جزیی از کاندیدای واکسن استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات جناب آقای دکتر سلمانیان 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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. Sahlgrenska 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-Liss1996:50-127.
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.

Archive of SID

www.SID.ir

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.

Archive of SID

www.SID.ir