Original Article

Production of Chimeric Tir-intimin Protein from *E. coli* O157:H7 in the Tobacco *(Nicotiana tobbacum)* Plant and its Immunological Evaluation in an Animal Model

Farideh Saberi[1], Ali Hatef Salmanian[2*], Jafar Amani[3], Mahyat Jafari[1]

1- M.Sc., Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
2- Associated Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah Medical Science University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1417863171, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran*
Email: salman@nigeb.ac.ir

Received: 25/Jun/2012, Accepted: 27/Nov/2012

Abstract

Objective: *Escherichia coli (E.coli)* O157:H7 is one of the most important pathogenic causes of hemorrhagic colitis in humans. Cattle are the main reservoirs of this bacteria and vaccination is a key mechanism for its control. The intimin, translocated intimin receptor (tir), and EspA proteins are virulence factors expressed by the LEE locus of enterohemorrhagic *E. coli*. EspA protein is a member of the type III secretion system (TTSS) needle complexes that delivers the tir protein into the host cell. Surface arrayed intimin docks the bacterium to the translocated intimin receptor (Tir). This intimate linkage is the starting point for attachment and effacing lesions. We hypothesize that the chimeric recombinant forms of two of these three effectors, as edible-based immunogens, would reduce colonization of *E. coli* O157:H7 in the mice model.

Methods: We constructed a synthetic gene (*it*) composed of *eae* (*i*) and *tir* (*t*) attached together by a peptide linker. The synthetic gene (*it*) was codon optimized based on the tobacco (*Nicotiana tobbacum*) plant and cloned into plant expression vectors adjacent to CaMV35S promoters for expression in transgenic tobacco plants. The antigen produced in this plant was orally fed to mice.

Results: Immunization of the mice model by the transgenic plant that contained the divalent immunogen showed the presence of IgG antibodies against *E. coli* O157:H7.

Conclusion: This method could be an effective tool for protecting against *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis.

Keywords*:* *Escherichia coli* O157:H7, Edible vaccine, Intimin, Tir

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 3, Autumn 2012, Pages: 23-36

مقاله اصیل

تولید پروتئین دوگانه Tir–اینتیمین از باکتری اشریشیا کلی O157:H7 در گیاه توتون (*Nicotiana tobbacum*) و بررسی ایمنی‌زایی آن در موش آزمایشگاهی

فریده صابری[1]، علی‌هاتف سلمانیان[2*]، جعفر امانی[3]، محیات جعفری[1]

۱- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۸۶۳۱۷۱، کیلومتر ۱۵ تهران- کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، گروه بیوتکنولوژی گیاهی
Email: salman@nigeb.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۱/۰۴/۰۵ پذیرش مقاله: ۹۱/۰۹/۰۷

چکیده

هدف: اشریشیا کلی سویه O157:H7 یکی از مهم‌ترین بیماری‌زاهای تولید کننده بیماری کولیت خونریزی دهنده در انسان است. دام‌های اهلی اصلی‌ترین مخزن این باکتری هستند. پروتئین‌های اینتیمین، Tir و EspA از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی این باکتری محسوب می‌شوند. پروتئین EspA در ساخت کانال ارتباطی نقش داشته و مانند یک رابط سبب انتقال پروتئین Tir به سلول میزبان می‌شود و پروتئین اینتیمین که در غشای باکتری جای گرفته است با متصل شدن به پروتئین Tir به غشای میزبان منتقل و منشأ اصلی آن نیز باکتری مهاجم است، سبب اتصال محکم و اختصاصی باکتری به سلول میزبان می‌شود. این اتصال باعث ایجاد ضایعه تخریب دیواره سلول میزبان می‌شود. انجام تحقیق بر این اصل است که تولید دو عامل اصلی بیماری‌زایی که باعث اتصال باکتری به میزبان می‌شود به صورت دوگانه و تجویز آن به عنوان یک ایمنی‌زای خوراکی می‌تواند با تحریک مناسب سیستم ایمنی هومورال و به‌ویژه مخاطی میزبان مانع کلونیزاسیون باکتری اشریشیا کلی O157:H7 در مدل حیوانی شود.

مواد و روش‌ها: ابتدا به صورت تئوری یک سازه ژنی حاوی قسمت‌هایی از اینتیمین (I) و Tir (t) با استفاده از یک رابط جدا کننده پپتیدی به یکدیگر متصل و ژن آن به طور مصنوعی ساخته شد. این ژن مصنوعی براساس کدون‌های گیاه توتون بهینه‌سازی و سپس تحت کنترل پروموتر CaMV35S در ناقل بیانی گیاه کلون و پس از آن تراریختی و باززایی گیاه توتون با آن انجام گرفت. سپس حیوان مدل با برگ‌های گیاه تراریخت تغذیه شد.

نتایج: ایمن‌سازی حیوان با استفاده از بافت گیاه تراریخت حاوی این ایمنی‌زای دوگانه موجب تحریک و تولید IgG سرمی بر علیه باکتری فوق شد.

نتیجه‌گیری: روش تغذیه و ایمن‌سازی با ایمنی‌زاهای خوراکی می‌تواند به عنوان یک ابزار مناسب برای ایجاد ایمنی و احتمالاً محافظت حیوانات در برابر حضور و بیماری‌زایی باکتری اشریشیا کلی O157:H7 عمل نماید.

کلیدواژگان: واکسن خوراکی، اشریشیا کلی O157:H7، اینتیمین، Tir

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحات: ۲۳-۳۶

مقدمه

اشریشیا کلی انتروهموراژیک (Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) سویه O157:H7 در انسان موجب بروز عفونت‌های روده‌ای از شکل اسهال بدون خونریزی تا التهاب شدید روده به همراه خونریزی [کولیت هموراژیک (Hemorrhagic colitis)] و در برخی موارد سبب نشانگان خونریزی دهنده ادرار [اورمی همولیتیک (Hemolytic uremic syndrome)] می‌شود. انتقال باکتری اشریشیا کلی O157:H7 به انسان به طور عمده از طریق آب و غذای آلوده بوده و مهم‌ترین و اصلی‌ترین مخزن این باکتری روده حیوانات اهلی مانند گاو و گوسفند است. هنگام بروز عفونت این باکتری قادر است که آسیب‌های تخریبی شدید (Attaching/Effacing: A/E) در سلول‌های پوششی روده میزبان ایجاد کند [۱]. میزان شیوع باکتری EHEC سویه O157:H7 در برخی از کشورهای غربی از سال ۱۹۹٤ تا ۲۰۰۰ تقریباً به دو برابر رسیده است. طی پژوهشی که در سال ۲۰۰۰ در کشورهای اروپایی صورت گرفت ۲۸ درصد گوشت گاوها به این باکتری آلوده بود [۲]. گرچه اولین گزارش‌ها مربوط به جوامع غربی است اما آلودگی به این باکتری محدود به این کشورها نشده و پراکندگی آن در سراسر جهان از جمله ایران نیز گزارش شده است. در ایران نیز عمده این آلودگی‌ها مربوط به گوشت و شیر آلوده بوده است [۳، ٤]. مشکلات اقتصادی و بهداشتی ناشی از حضور این باکتری در دامداری‌ها و متعاقب آن آلودگی فرآورده‌های لبنی و سپس جوامع انسانی موجب شده است که توجه ویژه‌ای به کنترل آن معطوف شود. در صنایع دامپروری این باکتری به طور عمده دام‌های جوان را مورد حمله قرار می‌دهد و طبق آمارهای موجود عفونت‌های با علامت و بدون علامت این باکتری در حدود ۱۵ تا۳۰ درصد از دام‌ها را درگیر می‌نماید [۲، ۵] رعایت اصول و نکات بهداشتی می‌تواند تا حد زیادی از شیوع این باکتری در بین دام‌ها جلوگیری به عمل آورد. در موارد حاد بیماری نیز استفاده از درمان‌های آنتی‌بیوتیکی اجتناب‌ناپذیر است.

اما استفاده از رژیم‌های دارو و درمانی سبب مشکلاتی مانند بروز مقاومت در ارگانیسم‌های بیماری‌زا، از بین بردن فلور طبیعی یا تغییر در جمعیت میکروارگانیسم‌ها و در نهایت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود [۲]. علاوه بر آن؛ گاهی این میکروارگانیسم به صورت غیر علامت‌دار در دستگاه گوارش گاوها زندگی می‌کند. به عبارت دیگر این باکتری می‌تواند به صورت دایم نیز از دستگاه گوارش حیوانات اهلی دفع شود. در این مورد استفاده از فضولات دامی برای مصارف کشاورزی (کودهای طبیعی) می‌تواند نقش مؤثری در انتشار این باکتری داشته باشد. در حال حاضر واکسیناسیون یکی از مهم‌ترین روش‌هایی است که برای کنترل باکتری EHEC سویه O157:H7 در حیوانات نشخوار کننده به‌کار می‌رود [٦]. بر مبنای مطالعات صورت گرفته اساس تولید واکسن‌های موجود روی مکانیسم بیماری‌زایی این ارگانیسم استوار شده است. این باکتری در دو مرحله به ایجاد ضایعات و ایجاد بیماری می‌پردازد. در مرحله اول با استفاده از اجزای سلولی نظیر فیمبریا (Fimbria) خود را به سطح سلول‌های میزبان نزدیک کرده و به آن متصل می‌شود. این اتصال قادر است عملکرد سلول را مختل نموده و برخی از علایم بیماری (A/E) را ایجاد نماید. در مرحله بعد با تولید سموم میکروبی، آثار عمیق‌تری روی سلول‌های مجاور می‌گذارد و با منتقل شدن این سموم به بافت‌های دورتر (نظیر کلیه) سایر علایم خود را بروز می‌دهد [۷].

مطالعات متعددی برای تهیه واکسن علیه EHEC در گاو انجام شده که بیشتر بر ایمن‌سازی در مقابل محصولات ژن‌های LEE (Locus of Enterocyte Effacement) تمرکز دارد. پروتئین‌های کد شده توسط این ژن‌ها نقش کلیدی در کلونیزاسیون این باکتری در روده را بر عهده دارد. عمده واکسن‌هایی که علیه این باکتری ساخته شده حاوی یکی از آنتی‌ژن‌های مهم آن به صورت نوترکیب یا باکتری کامل و کشته است. اما به‌کارگیری آن‌ها نتوانسته به طور قابل توجهی از کلونیزاسیون این باکتری در روده حیوانات جلوگیری کند [۸]. پروتئین‌هایی که در اتصال باکتری به سطح پوشش روده

نقش اصلی را بر عهده دارد شامل سه پروتئین اینتیمین (Intimin)، Tir و EspA است. با توجه به این‌که این پروتئین‌ها نقش اساسی در اتصال و کلونیزاسیون باکتری دارد، جلوگیری از عملکرد آن‌ها می‌تواند از اتصال و در نهایت بروز بیماری جلوگیری کند. مطالعات انجام شده در مورد این پروتئین‌ها نشان می‌دهد که می‌تواند به عنوان کاندیداهای مناسبی برای تولید مواد ایمنی‌زا علیه این باکتری استفاده شود. پروتئین EspA که از اجزای سیستم ترشحی تیپ III (Type Three Secretion System: TTSS) است، یک مجرای انتقال دهنده در سطح باکتری تولید و پروتئین Tir را از دورن خود به درون غشای میزبان منتقل می‌کند. این پروتئین می‌تواند به عنوان یک گیرنده برای اینتیمین که یک پروتئین غشایی در بدنه باکتری است، عمل نماید [۹، ۱۰]. با توجه به اهمیت این مجموعه اتصالی، جلوگیری از عملکرد سیستم متصل کننده باکتری به میزبان می‌تواند بیماری‌زایی باکتری را در مراحل اولیه متوقف کند. اطلاع از عملکرد این اجزا باعث شده است که این پروتئین‌ها به عنوان یکی از اهداف اصلی در مطالعات واکسن علیه این باکتری مورد توجه قرار گیرد. به طور کلی واکسن‌های تولید شده علیه این باکتری به صورت تزریقی [۱۰] و در مطالعات جدید به صورت خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۱]. در سیستم‌های جدید تولید و ارایه مواد ایمنی‌زا، واکسن‌های خوراکی (Edible Vaccine) به طور عمده شامل اجزایی از گیاهان تراریخت است که می‌تواند آنتی‌ژن مورد نظر را در بافت‌های خوراکی خود تولید کند. از مهم‌ترین مزیت استفاده از گیاهان برای تولید آنتی‌ژن‌ها، سالم بودن فرآورده حاصل از آن‌ها و عدم آلودگی به بیماری‌زاهای انسانی است. یک گیاه ایده‌آل برای تولید واکسن خوراکی باید توانایی تراریخت و باززایی شدن را داشته باشد و امکان مصرف بخشی از گیاه که حاوی پروتئین نوترکیب است بدون پخته شدن میسر باشد [۱۲، ۱۳]. در مطالعات گذشته کارآیی ژن سه قسمتی Tir، اینتیمین، EspA در مدل موشی به نمایش در آمده بود. سؤال اصلی اینجاست که آیا می‌توان با به‌کارگیری بخش‌های کوچک‌تری از آنتی‌ژن (ژن دو قسمتی به جای سه قسمتی) به همان نتیجه دست یافت؟ بنابراین در این تحقیق بخشی از ژن‌های مربوط به دو پروتئین اینتیمین و Tir که محصول پروتئینی آن‌ها در کلونیزاسیون باکتری به سطح روده میزبان نقش اصلی را بر عهده دارد انتخاب شد. فرضیه این تحقیق بر این پایه استوار است که با ایجاد ایمنی هومورال علیه اینتیمین و Tir از عملکرد مناسب این پروتئین‌ها و در نتیجه از اتصال مؤثر و تجمع باکتری اشریشیا کلی O157:H7 در روده میزبان جلوگیری به عمل می‌آید. برای اجرایی کردن این کار دو پروتئین اینتیمین و Tir به کمک یک رابط (Linker) پپتیدی آب‌گریز که از بر هم کنش بین دو پروتئین جلوگیری می‌کند به یکدیگر متصل شده و ترادف ژن مصنوعی به‌دست آمده براساس کدون‌های گیاه توتون بهینه‌سازی شد. ژن مربوط به پروتئین دوگانه با استفاده از پروموتر عمومی CaMV35S در گیاه مدل توتون بیان شد. پس از تولید پروتئین نوترکیب در گیاه، موش‌های آزمایشگاهی با برگ‌های حاصل از گیاه تراریخت تغذیه شده و تحریک اختصاصی سیستم ایمنی آن‌ها از طریق خوراکی و با روش‌های ایمونولوژیک نظیر الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) اثبات شد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده

موادی از قبیل آنتی‌بادی کنژوگه از شرکت Sigma (آلمان) و High fidelity DNA polymerase از شرکت Roche (آلمان) خریداری شد. آغازگرها (Primers) و پروب‌های (Probes) مورد نیاز از شرکت ژن فن‌آوران (ایران) تهیه شد. سایر مواد از قبیل *Taq* DNA polymerase، dNTP، آگارز و آنزیم‌های محدودگر از شرکت Fermentas (روسیه) تهیه شد. هورمون‌های مورد استفاده در محیط کشت گیاه نظیر ٦- بنزیل آمینو پورین (6-Benzylaminopurine: 6-BAP) و ۱- نفتالین

استیک اسید (1-Naphthaleneacetic acid: 1-NAA) از شرکت Fluka (آلمان) تهیه شد.

کلیه روش‌های ساخت محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها، اندازه‌گیری غلظت DNA، تخلیص و هضم آنزیمی پلاسمید، تخلیص محصول هضم آنزیمی، الحاق قطعه هدف در ناقل، تهیه سلول‌های مستعد و غربالگری کلونی‌ها براساس کتب مرجع در روش‌های آزمایشگاهی مولکولی انجام شد [١٤].

تکثیر ژن IT (اینتیمین- Tir) از طریق واکنش PCR

ژن سه قسمتی *eae*، *espA* و *tir* (اینتیمین) قبلاً توسط امانی و همکاران بهینه‌سازی و در بانک ژنی ثبت شده بود [١٣]. در این بررسی از دو قسمت اینتیمین- Tir (IT) به عنوان آنتی‌ژن مورد نظر استفاده شد. به منظور جداسازی این دو قسمت از ساختار اصلی آغازگر برای دو سر ژن مورد نظر توسط نرم‌افزار Oligo 5 طراحی شد. در آغازگر جلویی (Forward) (TCTAGAGCCACCATGGTCGATCAAACTAAGGCTTC) برای افزایش بیان ساختار ژنی در سیستم یوکاریوتی (گیاه) توالی کوزاک (Kozak sequence) تعبیه و همچنین محل اثر آنزیم *Xba*I قرار داده شد. در آغازگر برگشتی (Reverse) (GAGCTCTCAAAGCTCATCCTTTCCAGCTCC) محل اثر آنزیم *Sac*I به همراه توالی اسید آمینه KDEL طراحی شد. واکنش PCR با آنزیم High fidelity DNA polymerase (Roche، آلمان) و با استفاده از آغازگرهای طراحی شده و به‌کارگیری ۱۰ نانوگرم DNA الگو (پلاسمید حاوی ژن سه قسمتی) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و غلظت ۲ میلی‌مول منیزیوم (Mg^+) انجام شد. برنامه واکنش برای تکثیر قطعه مورد نظر به شرح زیر انجام گرفت، ۲ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه (Initial Denaturation) در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۰ چرخه تکثیر که هر چرخه شامل یک دقیقه دمای واسرشت‌سازی در ٩٤ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه دمای اتصال (Annealing) در ٦٠ درجه سانتی‌گراد، یک و نیم دقیقه دمای طویل‌سازی (Extension) در ٧٢ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۲۰ دقیقه دمای طویل‌سازی انتهایی در ٧٢ درجه سانتی‌گراد بود. برای اطمینان A در انتهای قطعات PCR شده قرار داده شد. کیفیت محصول واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) بررسی شد.

تهیه سازه ژنی pBI121-IT

با استفاده از محصول PCR که دارای انتهای A بود و ناقل pTZ57R/T (Fermentas، روسیه) که دارای انتهای T بود واکنش اتصال انجام گرفت. برای الحاق ژن به ناقل TA مخلوط اتصال به مدت یک شب در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. همزمان ناقل pBI121 از درون باکتری اشریشیا کلی DH5α به روش لیز قلیایی استخراج شد و هضم آنزیمی آن (*Xba*I/*Sac*I) مطابق با روش استاندارد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ ساعت انجام شد. در این مرحله و با این هضم آنزیمی، ژن گزارشگر بتا گلوکورونیداز (GUS) به وزن تقریبی ۲ کیلوجفت‌باز از بدنه ناقل خارج شد و بدنه ناقل با استفاده از کیت استخراج از روی ژل آگارز تخلیص شد. قطعه حاصل از تکثیر نیز با هضم آنزیمی از ناقل pTZ57R-IT خارج و با استفاده از ناقل pBI121 برش خورده واکنش اتصال قطعات انجام گرفت. پس از پایان واکنش، مخلوط به درون میزبان اشریشیا کلی منتقل و کلونی‌های مورد نظر در شرایط مناسب انتخاب شد. پس از اطمینان از مراحل اتصال، پلاسمید استخراج و به باکتری آگروباکتریوم (*Agrobacterium*) منتقل شد.

انتقال ژن به گیاه و باززایی آن

برای کشت گیاه توتون، بذر گیاه توتون (*Nicotiana tobbacum*) رقم Samsun (Samsun Caltivar) ابتدا ضد عفونی، سپس استریل و برای کشت به صورت فاصله‌دار روی محیط MS و در شرایط نوری ۱۰۰۰ لوکس و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در گلخانه قرار گرفت [١٥]. برای تراریختی گیاه توتون با آگروباکتریوم نوترکیب واجد pBI121-IT، کشت شبانه

از آگروباکتریوم تومی‌فاشینس (*Agrobacterium tumefaciens*) در غلظت‌های مناسب کانامایسین (Kanamycin) (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ریفامپیسین (Rifampicin) (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) انجام شد. سپس باکتری‌های رشد یافته در شرایط ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و به رسوب حاصل مقدار ۵-۱۰ میلی‌لیتر محلول MS بدون قند و استریل اضافه شد تا جذب نوری (Optical Density: OD) آن در طول موج ٦۰۰ نانومتر به ۰/۵ برسد. برگ‌های استریل و جوان گیاه یک ماهه توتون به صورت عرضی برش (ایجاد قطعات یک در یک سانتی‌متر مربع) داده شد و سپس این تکه برگ‌ها به درون سوسپانسیون باکتری منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در این شرایط قرار گرفت. پس از آن در پلیت‌های حاوی محیط هم‌کشتی حاوی هورمون‌های گیاهی (NAA ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، BAP ۲ میلی‌گرم در لیتر) به مدت ٤۸ ساعت کشت داده شد. در این مدت شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اعمال شد. سپس تکه برگ‌های آغشته به آگروباکتریوم برای باززایی به محیط گزینش‌گر با غلظت مناسب کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و سفوتاکسیم (Cefotaxime) (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) انتقال یافت. بعد از گذشت ١٤ روز جوانه‌ها از کنار برگ‌ها شروع به باززایی کردند. پس از ظاهر شدن برگ‌های اولیه این جوانه‌ها برای رشد کامل‌تر به درون شیشه و روی همان محیط قبلی انتقال یافتند. در مرحله بعد به منظور ریشه‌زایی هورمون‌های BAP و NAA از محیط کشت حذف شد و پس از رشد ریشه‌ها، گیاهان به خاک منتقل شدند و در نهایت پس از گل‌دهی بذر گیاه تراریخت به‌دست آمد.

تأیید تراریختی گیاهان توتون از طریق PCR

با استفاده از روش بهینه شده استخراج ژنوم از گیاه [١٦]، DNA ژنومی از نمونه‌ها استخراج شد. گیاهان تراریخت با استفاده از آزمون PCR و جفت آغازگرهای ذکر شده ارزیابی شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید ارزیابی شد.

ایمن‌سازی حیوان آزمایشگاهی با استفاده از پروتئین نوترکیب دوگانه

آماده‌سازی برگ‌های گیاه تراریخت برای ایمن‌سازی موش‌ها

برای آب‌گیری نسبی، برگ‌ها به مدت ٢٤ ساعت در سرما و با کمک خلأ لیوفلیزه (Lyophilization) شد. سپس نمونه‌ها درون هاون چینی با کمک ازت مایع به طور کامل ساییده شد. بافت یکنواخت شده به کمک کمی شکر و آرد به صورت منسجم (کوکتل شده) درآمد و برای ایمن‌سازی موش‌ها از طریق خوراکی استفاده شد. با توجه به مقادیر محاسبه شده پروتئین نوترکیب هر بسته توتون کوکتل شده از نظر وزنی به گونه‌ای آماده شد که حاوی ۱۰ میکروگرم پروتئین دوگانه نوترکیب مورد نظر باشد. غذا وآب بین هر دوز آنتی‌ژن به میزان کافی برای موش‌ها مهیا شد.

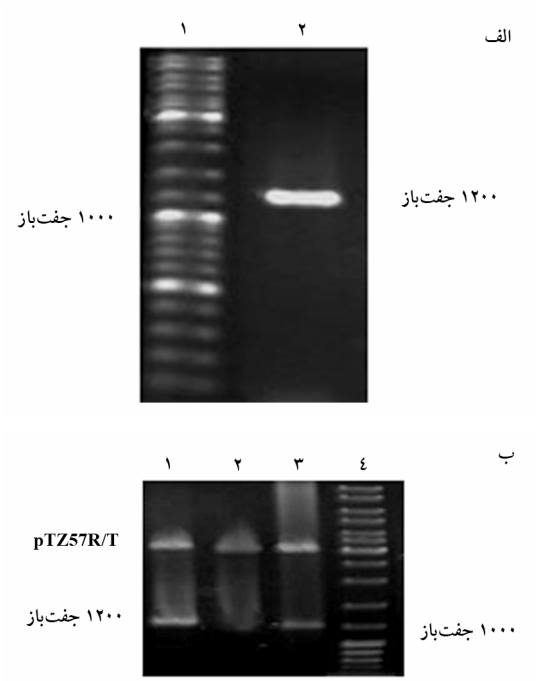
تعیین غلظت پروتئین نوترکیب تولید شده در گیاه با استفاده از روش ELISA

با استفاده از روش ELISA، پروتئین IT (rIT) که قبلاً در باکتری اشریشیا کلی به صورت نوترکیب تولید شده بود [۱۷] به صورت سریال رقت از ۵ میگروگرم تا ۲ نانوگرم کف پلیت تثبیت (coat) شد. سپس با استفاده از آنتی‌بادی علیه IT نمودار استاندارد پروتئین IT (پروتئین دوگانه اینتیمین و Tir) رسم شد. پس از این مرحله پروتئین تام از گیاه تراریخت استخراج و با استفاده از روش برادفورد (Bradford) غلظت آن محاسبه شد. میزان ۱۰ میکروگرم از پروتئین تام گیاه تراریخت در پلیت ELISA بارگیری شد و سپس با استفاده از آنتی‌بادی ذکر شده [۱۷] واکنش ELISA انجام گرفت. میزان OD به‌دست آمده در نمودار استاندارد قرار داده شد و براساس آن میزان غلظت پروتئین نوترکیب IT تولید شده در گیاه محاسبه شد. این آزمایش سه بار تکرار شد.

نتایج

تکثیر ژن دو قسمتی *it* وکلون آن در ناقل TA (pTZ57R)

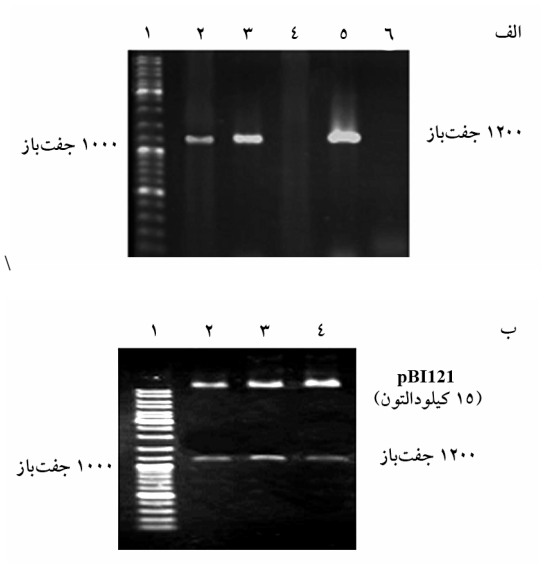
با استفاده از ژن کایمریک سه قسمتی با ترجیح کدونی گیاه به عنوان الگو [۱۳]، ژن *it* از طریق واکنش PCR تکثیر و محصول واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. نتیجهٔ این تکثیر در شکل ۱ بخش الف نمایش داده شده است. پس از کلون کردن قطعه PCR در ناقل pTZ57R/T محصول اتصال به درون سلول مستعد اشریشیا کلی DH5α از طریق شوک حرارتی انتقال داده شد. از کلونی رشد یافته استخراج پلاسمید انجام شد و هضم آنزیمی با کمک آنزیم‌های دو سر ژن برای تأیید کلون‌های مربوط صورت گرفت (شکل ۱ بخش ب).



شکل ۱ (الف) محصول PCR ژن *it* با ترجیح کدونی گیاهی با آنزیم High fidelity DNA polymerase؛ **ستون ۱)** نشانگر اندازهٔ DNA ۱۰۰ جفت‌بازی، **ستون ۲)** محصول PCR ژن *it* با ترجیح کدونی اشریشیا کلی به عنوان کنترل مثبت؛ **(ب)** محصولات هضم آنزیمی بر روی چند کلونی مختلف از pTZ57R/T نوترکیب حاوی ژن *it*؛ **ستون ۱)** نشانگر اندازه DNA ۱۰۰ جفت‌بازی، **ستون‌های ۲-۴)** پلاسمید pTZ57R/T حاوی قطعات دوگانه *it*، برش خورده با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI*

زیر همسانه‌سازی ژن دوگانه *it* در ناقل بیانی pBI121 در گیاه و انتقال به داخل آگروباکتریوم

ناقل pBI121 دارای پروموتر عمومی CaMV35S برای بیان در کل ساختار گیاه است. برای این منظور ناقل pBI121 و ناقل نوترکیب pTZ57R/T حاوی سازه ژنی با دو آنزیم *XbaI* و *SacI* هضم و پس از خالص‌سازی قطعات مورد نظر، واکنش اتصال و عمل انتقال پلاسمید نوترکیب به درون سلول مستعد اشریشیا کلی DH5α از طریق شوک حرارتی انجام گرفت. برای تأیید کلون‌ها از دو روش PCR (شکل ۲ الف) و هضم آنزیمی (شکل ۲ ب) استفاده شد.



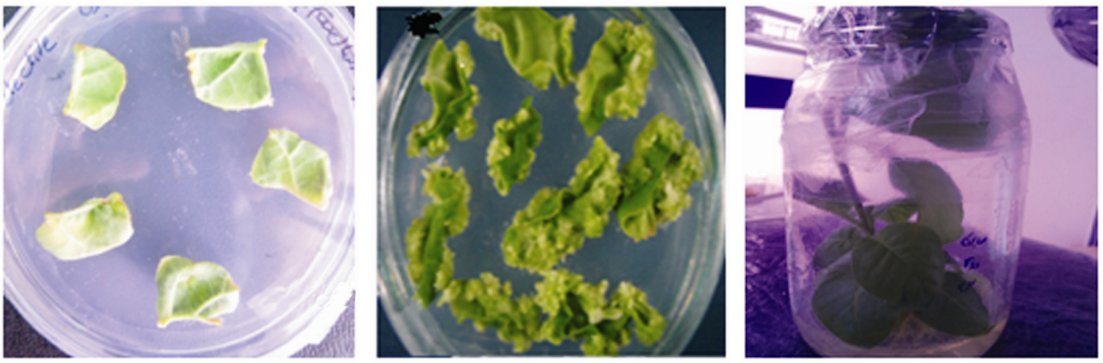
شکل ۲ (الف) الگوی الکتروفورز محصول PCR از کلون‌های حاوی قطعه دوگانه دو قسمتی *it* در ناقل pBI121 روی ژل آگارز یک درصد؛ **ستون ۱)** نشانگر اندازه DNA، **ستون‌های ۲-۶)** تجزیه و تحلیل کلون‌های حاوی قطعه دوگانه مورد نظر؛ **(ب)** الگوی الکتروفورز محصول هضم آنزیمی pBI121 نوترکیب حاوی قطعه دوگانه دو قسمتی *it* با دو آنزیم *XbaI* و *SacI* روی ژل آگارز یک درصد؛ **ستون ۱)** نشانگر اندازه DNA، **ستون‌های ۲-۴)** پلاسمید pBI121 حاوی قطعه دوگانه دو قسمتی *it* برش خورده با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI*

انتقال pBI121 نوترکیب به داخل آگروباکتریوم انجام و حضور سازه‌های ژنی در باکتری‌های نوترکیب از طریق PCR

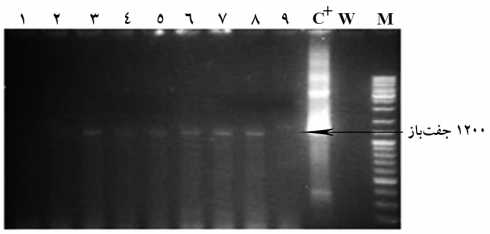
با آغازگرهای اختصاصی ارزیابی و حضور ژن تأیید شد (داده‌ها ارایه نشده است). مراحل تراریختی و باززایی نیز طبق روش‌های استاندارد (بخش مواد و روش‌ها) انجام شد.

کشت بافت و تراریختی گیاه توتون

از برگ‌های جوان گیاه توتون (سه هفته‌ای) به عنوان بافت هدف برای انتقال ژن به گیاه استفاده شد. برای تراریختی از قطعات برگ گیاه جوان استفاده شد. این برگ‌ها با آگروباکتریوم نوترکیب آغشته و سپس در پلیت‌های حاوی محیط هم‌کشتی حاوی هورمون (به بخش مواد و روش‌ها مراجعه شود) به مدت ٤٨ ساعت کشت داده شد. پس از ظاهر شدن برگ‌های اولیه این جوانه‌ها برای رشد کامل‌تر به درون شیشه‌ها انتقال یافتند و در نهایت ١٠ گیاه رشد کافی داشتند و تبدیل به گیاه کامل شدند (شکل ٣).



شکل ٣ مراحل انتقال سازه ژنی به گیاهان توتون، جداسازی گیاهان تراریخت از غیر تراریخت



شکل ٤ آزمون PCR روی DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان تراریخت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *it*؛ **چاهک ١ تا ٩)** محصول PCR از DNA های گیاهان تراریخت، همه نمونه‌های گیاهی واجد ژن مورد نظر هستند. **چاهک W)** محصول PCR با استفاده از DNA ژنومی از گیاه غیرتراریخت (کنترل منفی)، **چاهک C^+)** محصول PCR با استفاده از پلاسمید نوترکیب (کنترل مثبت)، **چاهک M)** نشانگر اندازه DNA ١٠٠ جفت‌بازی

تجزیه و تحلیل مولکولی گیاه تراریخت

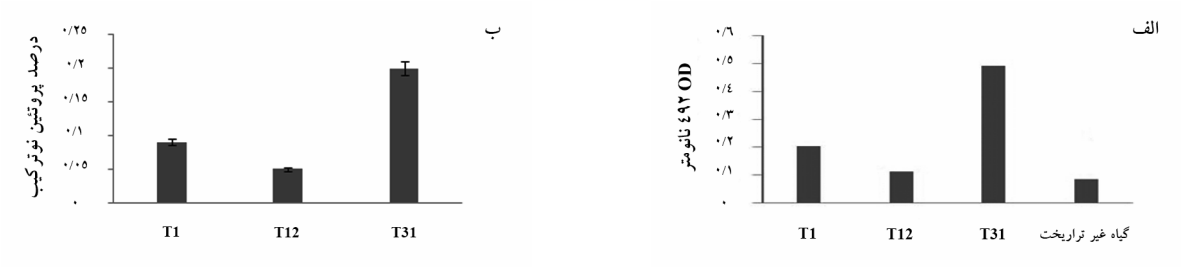
آزمون PCR به منظور اثبات حضور سازه ژنی در گیاهان تراریخت شده

DNA از بافت گیاهان تراریخت استخراج شد. با استفاده از این DNA خالص شده واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *it* انجام شد و محصول آن روی ژل آگارز ١ درصد الکتروفورز شد. از محصول PCR انجام شده قطعه‌ای به اندازه تقریبی ١٢٠٠ جفت‌باز ایجاد شد. نتیجه این تکثیر در شکل ٤ قابل مشاهده است.

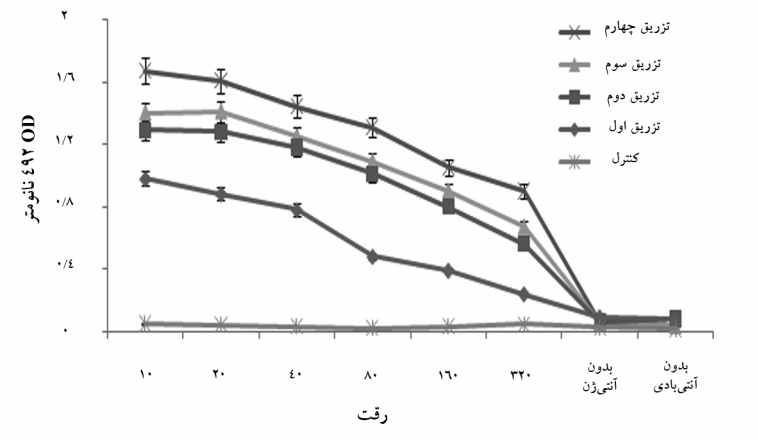
بررسی میزان تولید پروتئین نوترکیب IT در گیاهان تراریخت

برای بررسی کمّی تولید پروتئین نوترکیب درون گیاه توتون پس از استخراج پروتئین کل از مقدار مشخصی از برگ، میزان پروتئین محلول به روش برادفورد تعیین شد و میزان ١٠ میکروگرم از این پروتئین (Total Soluble Protein: TSP) درون چاهک‌های ELISA تثبیت شد. با استفاده از آنتی‌بادی علیه IT تولید شده در مطالعات قبلی همین

گروه [۱۷] حضور پروتئین مورد نظر ارزیابی شد. در این آزمون OD های به‌دست آمده با نمودار استاندارد ELISA مقایسه شد. نتایج نشان داد که در بهترین حالت میزان ۰/۲ درصد از کل پروتئین‌های برگ متعلق به پروتئین نوترکیب IT است. نتایج این تجزیه و تحلیل روی سه گیاه (رده‌های ۱، ۱۲، ۳۱) انجام شد که نتیجه آن در شکل ۵ آمده است.



شکل ۵ تعیین میزان پروتئین نوترکیب در برگ گیاه تراریخت توتون به روش ELISA؛ **(الف)** مقایسه OD های به‌دست آمده گیاهان تراریخت و گیاه غیرتراریخت به عنوان کنترل برای محاسبه غلظت پروتئین نوترکیب، **(ب)** بررسی میزان بیان پروتئین نوترکیب IT در گیاهان تراریخت، ستون T1 و T12 و T31 معرف رده‌های گیاهان تراریخت است.



شکل ٦ نتایج ELISA برای تعیین تیتر آنتی‌بادی از کلاس IgG علیه پروتئین نوترکیب دو قسمتی IT؛ محور افقی: رقت‌های تهیه شده از سرم موش‌های ایمن، محور عمودی: میزان OD که از رقت‌های مختلف سرم موش ایمن علیه پروتئین‌های نوترکیب دو قسمتی IT به‌دست آمده است.

ارزیابی تولید آنتی‌بادی به روش ELISA

برای تعیین تیتر آنتی‌بادی تولید شده از کلاس IgG در بدن حیوان (پس از خوراک‌دهی با برگ‌های گیاه تراریخت) علیه پروتئین نوترکیب روش ELISA استفاده شد. نمودار ارایه شده در شکل ٦ بیانگر تیتر آنتی‌بادی تولید شده در حیوانات و پس از هر بار ایمن‌سازی با دوز خوراکی گیاه تراریخت است. نتایج حاصل از آزمایش نشان می‌دهد که پس از هر مرحله ایمن‌سازی با دوز خوراکی، افزایش تیتر آنتی‌بادی در مقایسه با کنترل قابل توجه است. به عبارت دیگر؛ این پروتئین‌ها پس از ورود به بدن حیوان و از طریق خوراکی قدرت تولید آنتی‌بادی را دارد.

بحث

تحقیقاتی که قبلاً روی سویه‌های بیماری‌زای اشریشیا کلی

O157:H7 انجام شده نشان دهنده آن است که استفاده از کل باکتری به صورت تخفیف حدت داده شده می‌تواند در بدن حیوان ایجاد ایمنی نماید ولی همواره این خطر وجود دارد که باکتری به حالت وحشی برگردد [۱]. علاوه بر آن واکسن‌های ضعیف شده در کنار مزایای خود در مورد تولید آنتی‌ژن به صورت طبیعی، ممکن است با ارگانیسم‌های رقیب، آنتی‌بیوتیک‌ها یا پادتن (آنتی‌بادی) های موجود مهار شود. توجه به این نکته نیز مهم است که به دلیل احتمال آلوده شدن سایر حیوانات غیر هدف با این ارگانیسم‌ها، امنیت لازم نیز تضمین نمی‌شود. بنابراین رویکرد جدیدی در تولید مواد ایمنی‌زا به صورت نوترکیب و تجویز آن مطرح شد. در سال‌های اخیر علاوه بر سیستم‌های پروکاریوتیک و یوکاریوت ساده، گیاهان تراریخت نیز به عنوان تولید کننده زیستی برای تولید مواد آنتی‌ژنی مطرح شده‌اند. توانایی این میزبان‌ها در تولید و در شرایط خاص عرضه مولکول‌های ایمنی‌زا به دستگاه گوارش (محل عفونت بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا از جمله اشریشیا کلی) سبب شده که این گیاهان بتوانند پاسخ‌های سیستم ایمنی مخاطی را به‌ویژه در محل اصلی و سپس ایمنی سیستمیک را در کل بدن موجود زنده تحریک نمایند [۱۱]. علاوه بر آن؛ گیاهان قادر به تولید فرآورده‌هایی هستند که فاقد آلودگی به بیماری‌زاهای انسانی است و همچنین دارای امکانات سلول‌های یوکاریوتی برای پردازش پس از ترجمه پروتئین‌ها (نظیر افزودن مولکول‌های قندی و تاخوردگی (Folding) مناسب) هستند. از نظر اقتصادی نیز هزینهٔ تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخت کمتر از هزینه تولید آن‌ها در سلول‌های پروکاریوتی نظیر باکتری اشریشیا کلی است. توجه به این نکته نیز اهمیت دارد که سلول‌های گیاهی به عنوان میکروکپسول‌های محافظتی عمل می‌کنند و می‌توانند آنتی‌ژن‌هایی با عملکرد واکسن را پیش از رسیدن به بافت‌های هدف (نظیر روده)، از تجزیه در دستگاه گوارش فوقانی حفظ نمایند.

مطالعات صورت گرفته در مورد باکتری اشریشیا کلی O157:H7 مشخص کرده است که مهم‌ترین عامل بیماری‌زایی این باکتری ابزارهای اتصال باکتری به سلول‌های روده میزبان است [۱]. برای اتصال باکتری به سلول‌های میزبانی چندین پروتئین نقش دارد که پروتئین‌های Tir و اینتیمین و EspA مهم‌ترین نقش را ایفا می‌نماید [٦]. EspA با تولید یک کانال ارتباطی نقش اولیه را برای انتقال پروتئین‌های مهم در میانکنش باکتری با سطح سلول‌های میزبانی بر عهده دارد. اما آن‌چه وظیفه اتصال پایدار را بر عهده دارد، ارتباط بین پروتئین Tir (که به واسط عملکرد EspA به سلول میزبان منتقل و در غشای آن جایگزین شده) و پروتئین غشایی اینتیمین (از سلول باکتری) است. از آن‌جا که پروتئین‌های EspA، EspB، EspE، Tir و اینتیمین نقش اساسی در اتصال و کلونیزاسیون باکتری دارد و جلوگیری از اتصال می‌تواند از بروز بیماری جلوگیری کند، این پروتئین‌ها به عنوان کاندیداهای خوبی برای ایجاد واکسن شناخته شده‌است. در تحقیقی که در سال ۲۰۱۰ توسط فان (Fan) و همکارانش انجام شد [۱۸] نشان دادند که Tir خالص شده باعث افزایش تیتر IgG و IgA در سرم و مدفوع انسان و دام می‌شود. همچنین در مدل‌های مورد آزمایش کاهش میزان اشریشیا کلی O157:H7 در مدفوع نیز دیده می‌شود. این نتایج پتانسیل Tir را در فرمولاسیون واکسن موکوسی برای پیشگیری تجمع و ریزش O157:H7 نشان می‌دهد. در مطالعه دیگری نشان داده شد که واکسن خوراکی حاوی EspA، EspB و اینتیمین میزان اشریشیا کلی O157:H7 را در ریزش مدفوعی گوسفند کاهش داده است و این اولین گزارش در مورد هدف قرار دادن سیستم ایمنی گوسفند برای کاهش ریزش مدفوعی بود [۱۹]. نتایج تحقیقاتی که در ایران انجام شده نشان می‌دهد که تولید بخش‌های ایمنی‌زا از پروتئین‌های EspA (E)، اینتیمین [Intimin (I)] و Tir (T) در گیاه تراریخت و ایمن‌سازی حیوانات مدل از طریق خوراکی می‌تواند موجب تحریک ایمنی هومورال (IgG) و مخاطی (IgA) شود [۱۳]. در تحقیقی دیگر نشان داده شد که خوراندن سالمونلای (*Salmonella*) زنده و ضعیف شده به موش که قادر به بیان یک پروتئین دوگانه شامل قطعاتی از EspA،

اینتیمین و زیر واحد بتای سم شیگا (Shiga Toxin) (StxB) باشد، به خوبی حیوان را در برابر دوزهای کشنده EHEC حفظ می‌نماید [۲۰].

نتایج این تحقیقات کارایی این آنتی‌ژن‌ها را در ایمن بخشی از طریق خوراکی نشان می‌دهد. اما آن‌چه در استراتژی ایمن‌سازی دارای اهمیت است، انتخاب ایمنی‌زای مناسب است. در این روش‌ها استفاده از حداقل آنتی‌ژن و ایجاد ایمنی حداکثری بسیار مهم است. به عبارت دیگر؛ تلاش شد که با حذف توالی سازنده پروتئین EspA از ساختار سه قسمتی [۱۳]، پروتئینی حاوی بخش‌های ایمنی‌زای Tir و اینتیمین ایجاد شود. این امر بدین لحاظ اهمیت دارد که از نظر کاری تشکیل این سازه ژنی کوتاه راحت‌تر بوده و بیان آن نیز در سلول میزبان با مشکل کمتری مواجه خواهد شد. همچنین با کاهش اندازه پروتئین می‌توان عوارض جانبی احتمالی حاصل از تجویز آن در بدن موجود زنده را کاهش داد.

در این تحقیق در ادامه تحقیقات قبلی ابتدا ژن مصنوعی دو قسمتی *it* که براساس کدون‌های گیاه بهینه‌سازی شده بود درون ناقل pBI121 که واجد پیشبرنده عمومی CaMV35S است، زیر همسانه‌سازی شد و از طریق آگروباکتریوم تومی‌فاشینس به گیاه توتون منتقل شد. این روش ترانسفورماسیون (Transformation) ساده‌ترین و ارزان‌ترین روش در مقایسه با سایر روش‌های ترانسفورماسیون گیاه است [۲۱]. پیش‌برنده عمومی CaMV35S از ویروس موزاییک کالی‌فلور (Cauliflower Mosaic Virus) جدا شده است و یکی از قوی‌ترین و معمول‌ترین پیش‌برنده‌های قابل استفاده در تحقیقات گیاهان تراریخت است. این پیش‌برنده در تمامی مراحل زندگی گیاه از لحظه تشکیل سلول گیاه تراریخت تا انتهای بذردهی امکان فعالیت دارد. بنابراین انتظار می‌رود که تولید پروتئین در بخش‌های مختلف گیاه تحت تأثیر مراحل رشد و نمو آن قرار نگیرد. گیاه توتون از نظر تولید پروتئین در قسمت‌های مختلف چندان توانمند نیست و تنها حدود ۰/۱ وزن برگ این گیاه شامل پروتئین‌های محلول است. در مطالعات مشابه که روی یک آنتی‌ژن باکتریایی کار شده است (Labile Toxin Beta: LTB) میزان بیان در گیاه توتون بین ۰/۱-۰/٤ درصد گزارش شده است [۱۵]. در این مطالعه نیز میزان پروتئین تولیدی به ۰/۲ درصد از پروتئین محلول رسید. گرچه در مقایسه با سایر سیستم‌های تولیدی این مقدار زیاد نیست اما در مقایسه با سایر مطالعات مشابه [۱۵، ۲۲] تولید مقادیری در حدود ۰/۲ درصد پروتئین محلول قابل قبول به نظر می‌رسد. هرچند با بهینه شدن کدون‌ها بر مبنای گیاه توتون و به‌کارگیری ترادف‌های تنظیمی که می‌تواند موجب افزایش ترجمه در میزبان گیاهی شود، انتظار می‌رفت مقادیر پروتئین تولید شده بیشتر از این مقادیر باشد. البته با در نظر گرفتن جایگاه قرارگیری ژن مورد نظر در داخل ژنوم (Positional Effect) و همچنین تعداد نسخه‌های وارد شده به گیاه، ارزیابی این نتیجه چندان هم دقیق نخواهد بود اما می‌توان میزان بیان این پروتئین دوگانه در برگ گیاه توتون را مناسب دانست.

برای تأمین مقادیر مناسب از آنتی‌ژن لازم بود که حجم برگ‌های مورد استفاده در خوراک‌دهی حیوان کاهش یابد. بدین منظور از روش خشک کردن در خلأ و سرما استفاده شد. البته توجه به این نکته‌ها حائز اهمیت است که به‌کارگیری روش خشک کردن در خلأ و سرما می‌تواند بر مقادیر آنتی‌ژن یا ساختار آن تأثیر بگذارد. به همین دلیل به نظر می‌رسد نتایج به‌دست آمده با استفاده از برگ توتون تنها به عنوان یک مدل قابل بررسی است و برای دست‌یابی به نتایج کاربردی‌تر می‌بایست نوع گیاه و بافت مورد استفاده تغییر نماید. بنابراین به‌کارگیری بخش‌های خوراکی گیاهان نظیر دانه و بذر یا میوه ارجحیت خواهد داشت [۱۱، ۲۳]. اما نتایج حاصل از ایمن‌سازی و انجام آزمون ELISA با استفاده از سرم موش‌های ایمن شده نشان داد که پس از هر بار خوراک‌دهی میزان آنتی‌بادی (از کلاس IgG) در بدن این حیوانات افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد که جذب این آنتی‌ژن‌ها از سیستم گوارش به خوبی صورت گرفته و سیستم ایمنی بدن نیز به خوبی نسبت به آن واکنش نشان داده است. البته توجه به این نکته اهمیت دارد که موش پستاندار تک معده‌ای است و آنتی‌ژن مورد نظر با تغییر کمتری به روده و محل تجمع

پلاک‌های پیر (Peyers Patch) می‌رسد اما در حیوانات (نظیر گاو) قبل از رسیدن آنتی‌ژن به بافت هدف، باید از ٤ مرحله گوارش (معده) بگذرد؛ بنابراین احتمال تغییر در آنتی‌ژن مورد نظر وجود دارد. گرچه اظهار نظر نهایی در مورد این مسئله نیاز به بررسی‌های بیشتر آزمایشگاهی دارد.

مشاهدات انجام شده در مورد ایمنی‌زایی نشان داد که میزان آنتی‌بادی تولید شده در اثر ایمنی‌سازی حیوانات با دو آنتی‌ژن اینتیمین و Tir کمتر از مقادیری است که با ۳ آنتی‌ژن (ساختار مصنوعی ۳ تایی) ایجاد می‌شود [۱۳]. بنابراین با وجود کوچک‌تر شدن ساختار آنتی‌ژن (دو قسمتی) و امکان تولید راحت‌تر آن در سیستم‌های مختلف، میزان ایمنی ایجاد شده کمتر است.

نکته نهایی آثار وجود این ژن‌ها روی عملکرد گیاه به عنوان میزبان است. نتایج نشان داد که گیاه تراریخت در مقایسه با گیاهان غیر تراریخت دیرتر رشد کرده و مراحل گل و بذردهی را کندتر از گیاه طبیعی طی می‌کند. گرچه این مسئله در آزمایش‌های گذشته مشاهده نشده است [۱۳]، اما این مسئله از جمله مواردی است که می‌تواند از نقاط قابل تأمل این مولکول دو قسمتی محسوب شود. از سوی دیگر؛ هرچند اثر بیان تراریخت روی میزبان از جمله مواردی است که در همه میزبان‌ها (اعم از پروکاریوت و یوکاریوت) قابل بررسی است، اما در مورد گیاه چون مراحل گل و بذردهی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در نتیجه می‌تواند انتقال تراریخت به نسل بعدی را دچار مشکل نماید، از اهمیت بیشتری برخوردار است.

در جمع‌بندی با طراحی و بیان موفق یک پروتئین دوگانه و اثبات ایمنی‌زا بودن آن هنگام مصرف خوراکی (در سطح توانایی تولید آنتی‌بادی) می‌توان انتظار داشت که مراحل بعدی شامل طراحی، ساخت و به‌کارگیری ایمنی‌زاهای مصنوعی، ایمن‌سازی از طریق دهانی را به عنوان روشی مناسب معرفی کرده و کار با قدرت بیشتری ادامه یابد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری برای تأمین منابع مالی (طرح شماره ۳٦۸)، امکانات آزمایشگاهی و شرایط انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

منابع

[1] Stevens MP, van Diemen PM, Dziva F, Jones PW, Wallis TS. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. Microbiology 2002; 148(Pt 12): 3767-78.

[2] Murphy M, Buckley JF, Whyte P, O'Mahony M, Anderson W, Wall PG, Fanning S. Surveillance of dairy production holdings supplying raw milk to the farmhouse cheese sector for *Escherichia coli* O157, O26 and O111. Zoonoses Public Health 2007; 54(9-10): 358-65.

[3] Aslani MM, Bouzari S. An epidemiological study on Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection among population of northern region of Iran (Mazandaran and Golestan provinces). Eur J Epidemiol 2003; 18(4): 345-9.

[4] Shekarforoush S, Tahamtan Y, Pourbakhsh A. Detection and frequency of Stx2 gene in *Escherichia coli* O157 and O157:H7 strains isolated from sheep carcasses in Shiraz-Iran. Pak J Biol Sci 2008; 11(8): 1085-92.

[5] Potter AA, Klashinsky S, Li Y, Frey E, Townsend H, Rogan D, Erickson G, Hinkley S, Klopfenstein T, Moxley RA, Smith DR, Finlay BB. Decreased shedding of *Escherichia coli*

O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. Vaccine 2004; 22(3-4): 362-9.

[6] Allen KJ, Rogan D, Finlay BB, Potter AA, Asper DJ. Vaccination with type III secreted proteins leads to decreased shedding in calves after experimental infection with *Escherichia coli* O157. Can J Vet Res 2011; 75(2): 98-105.

[7] Oliveira AF, Cardoso SA, Almeida FB, de Oliveira LL, Pitondo-Silva A, Soares SG, Hanna ES. Oral immunization with attenuated *Salmonella* vaccine expressing *Escherichia coli* O157:H7 intimin gamma triggers both systemic and mucosal humoral immunity in mice. Microbiol Immunol 2012; 56(8): 513-22.

[8] McNeilly TN, Mitchell MC, Rosser T, McAteer S, Low JC, Smith DG, Huntley JF, Mahajan A, Gally DL. Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of *Escherichia coli* O157:H7 following oral challenge. Vaccine 2010; 28(5): 1422-8.

[9] Kühne SA, Hawes WS, La Ragione RM, Woodward MJ, Whitelam GC, Gough KC. Isolation of recombinant antibodies against EspA and intimin of *Escherichia coli* O157:H7. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 2966-76.

[10] McNeilly TN, Mitchell MC, Nisbet AJ, McAteer S, Erridge C, Inglis NF, Smith DG, Low JC, Gally DL, Huntley JF, Mahajan A. IgA and IgG antibody responses following systemic immunization of cattle with native H7 flagellin differ in epitope recognition and capacity to neutralise TLR5 signalling. Vaccine 2010; 28(5): 1412-21.

[11] Lal P, Ramachandran VG, Goyal R, Sharma R. Edible vaccines: current status and future. Indian J Med Microbiol 2007; 25(2): 93-102.

[12] Judge NA, Mason HS, O'Brien AD. Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. Infect Immun 2004; 72(1): 168-75.

[13] Amani J, Mousavi SL, Rafati S, Salmanian AH. Immunogenicity of a plant-derived edible chimeric EspA, Intimin and Tir of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. Plant Sci 2011; 180(4): 620-7.

[14] Russel D, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2004; 1.31, 1.35, 1.84, 1.103-5.4, 5.18, 5.29.

[15] Kang TJ, Han SC, Jang MO, Kang KH, Jang YS, Yang MS. Enhanced expression of B-subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence. Appl Biochem Biotechnol 2004; 117(3): 175-87.

[16] Amani J, Kazemi R, Abbasi A, Salmanian AH. A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. Iran J Biotechnol 2011; 9(1): 69-71.

[17] Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of *Escherichia coli* O157:H7. Vaccine 2010; 28(42): 6923-9.

[18] Fan HY, Wang L, Luo J, Long BG. Protection against *Escherichia coli* O157:H7 challenge by immunization of mice with purified Tir proteins. Mol Biol Rep 2012; 39(2): 989-97.

[19] Yekta MA, Goddeeris BM, Vanrompay D, Cox

E. Immunization of sheep with a combination of intiminγ, EspA and EspB decreases *Escherichia coli* O157:H7 shedding. Vet Immunol Immunopathol 2011; 140(1-2): 42-6.

[20] Gu J, Ning Y, Wang H, Xiao D, Tang B, Luo P, Cheng Y, Jiang M, Li N, Zou Q, Mao X. Vaccination of attenuated EIS-producing *Salmonella* induces protective immunity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* in mice. Vaccine 2011; 29(43): 7395-403.

[21] Rao AQ, Bakhsh A, Kiani S, Shahzad K, Shahid AA, Husnain T, Riazuddin S. The myth of plant transformation. Biotechnol Adv 2009; 27(6): 753-63.

[22] Ghiasi SM, Salmanian AH, Chinikar S, Zakeri S. Mice orally immunized with a transgenic plant expressing the glycoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Clin Vaccine Immunol 2011; 18(12): 2031-7.

[23] Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. Biotechnol Adv 2009; 27(4): 449-67.