ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2019;22(2):69-75

Expression of the Recombinant Protein Containing CfaB, ST, CfaE, and LtB from Enterotoxigenic Escherichia coli and Loading It in Chitosan Nanoparticles

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Hosseini Z.S.[1] *MSc,*
Amani J.*[2] *PhD,*
Hosseini F.[1] *PhD*

How to cite this article
Hosseini Z.S, Amani J, Hosseini F. Expression of the Recombinant Protein Containing CfaB, ST, CfaE, and LtB from Enterotoxigenic Escherichia coli and Loading It in Chitosan Nanoparticles. Pathobiology Research .2019;22(2):69-75.

[1]Cell & Molecular Biology-Biotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

***Correspondence**
Address: Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Mollasadre Street, Vanak Square, Tehran, Iran.
Phone: +98 (21) 82482556
Fax: +98 (21) 82482592
jafar.amani@gmail.com

Article History
Received: July 2, 2018
Accepted: February 4, 2019
ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Aims Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) is the most important bacteria causing traveler's diarrhea. The bacterium has several virulence factors, including colonization factors (CFs) or Escherichia coli adhesins, heat-labile (LT), and heat-stable (ST) toxins. The design and production of vaccine against this disease is one of the goals of the World Health Organization due to increased antibiotic resistance and a reduction of healthy water sources. An effective subunit vaccine against ETEC could include a toxoid from both toxins and colonization factors. The aim of the current study was to express, purify, and encapsulate the recombinant protein in chitosan nanoparticles.

Materials & Methods In the present experimental study, the E. coli BL21DE3 harbring pET-28a-cscl vector was used. The chimeric cscl gene is composed of cfab along with st toxin, cfae, and ltb. After the expression and purification of recombinant protein, using Ni-NTA column, Western blotting was performed with anti-His antibody. Then, the CSCl protein was encapsulated in chitosan nanoparticles and the particle size was measured.

Findings The recombinant CSCL protein was purified by Ni-NTA column and urea denaturation method. Then, this purified protein (~57kDa) was confirmed by Western blotting and the size of the nanoparticles was estimated as 112.0 nm with 98.8% of encapsulation efficiency.

Conclusion With some advantages, including the presence of surface and important antigens of ETEC and encapsulating in chitosan nanoparticles, the CSCL recombinant protein can be considered as a candidate for producing oral nanovaccine and stimulating of mucosal and systemic immune response.

Keywords Enterotoxigenic Escherichia coli; Heat-labile toxin; Heat-stable toxin; Chitosan nanoparticles; Escherichia coli adhesins; Traveler's diarrhea

CITATION LINKS

[1] Recent advances in understanding ... [2] Global, regional, and national causes of child ... [3] Analysis of strategies to successfully vaccinate ... [4] In Situ Analyses Directly in Diarrheal Stool Reveal Large Variations in Bacterial ... [5] Identification of enterotoxigenic ... [6] ANIMAL ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA ... [7] Molecular Characterization of ... [8] Optimization of gene expression and purification ... [9] Heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic ... [10] Nanoparticulated heat-stable (STa) and heat- ... [11] Clinical trial to evaluate safety and ... [12] From cholera to enterotoxigenic ... [13] A receptor-binding site as revealed by the crystal ... [14] Construction and immunogenic properties of a chimeric ... [15] Current state and challenges ... [16] The potential adjuvanticity of quaternized chitosan ... [17] CssB and LTB chimeric protein induces ... [18] The vaccine adjuvant chitosan promotes ... [19] Nanoparticles as potential oral delivery ... [20] Chitin and chitosan derivatives: advances ... [21] Preparation, characterization, and potential application ... [22] Preparation and antibacterial activity of ... [23] Nanoparticles in vaccine ... [24] Protein ... [25] Preparation and efficacy of Newcastle disease ... [26] Insights into enterotoxigenic Escherichia ...[27] Bioactive immune components ... [28] Acute diarrhea due to enteropathogenic ... [29] Disease burden due to enterotoxigenic ... [30] High frequency of antimicrobial drug resistance ... [31] Resistance pattern and molecular characterization ... [32] Antimicrobial resistance of Escherichia coli and ... [33] Current state on the development of nanoparticles ... [34] Status of vaccine research and development ... [35] Novel antigens for enterotoxigenic ... [36] A PLGA-encapsulated chimeric protein protects ... [37] Design and characterization of a chimeric ... [38] Development of live attenuated bacterial vaccines ... [39] Recent development of chitosan-based ... [40] Targeted delivery of low molecular ... [41] Immunogenicity of enterotoxigenic ... [42] Approaches to Enhance and Evaluate the ... [43] Delivery strategies to enhance ... [44] Immunogenicity of the nanovaccine... [45] Chitosan-coated poly (lactic-co-glycolic) acid ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

بیان پروتئین نوترکیب حاوی CfaB، ST، CfaE و LtB از باکتری *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک و بارگذاری آن در نانوذرات کیتوسان

زهره‌سادات حسینی MSc
گروه سلولی و مولکولی- بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
جعفر امانی* PhD
مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکي بقیه‌الله(عج)، تهران، ایران
فرزانه حسینی PhD
گروه سلولی و مولکولی- بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده
اهداف: *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC)، مهم‌ترین عامل باکتریایی مولد اسهال مسافرتی است. این باکتری دارای عوامل متعدد بیماریزا از جمله، عوامل کلونیزاسیون (CFs)، توکسین حساس به حرارت (LT) و توکسین پایدار به حرارت (ST) است. طراحی و تولید واکسن علیه این بیماری به‌دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و کاهش منابع آب سالم، از اهداف سازمان بهداشت جهانی است. یک واکسن زیرواحدی موثر علیه ETEC، می‌تواند شامل توکسوئیدی از هر دو سم و نیز عوامل کلونیزه‌کننده شایع باشد. هدف مطالعه حاضر بیان، تخلیص و کپسوله‌کردن پروتئین نوترکیب در نانوذرات کیتوسان بود.
مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر از باکتری *E. coli* BL21DE3 دارای ناقل pET-28a استفاده شد. این ناقل دارای ژن نوترکیب کایمر *cscl* شامل *cfab* به‌همراه سم *st*، *cfae* و *ltb* است. پس از القای بیان ژن و تخلیص پروتئین نوترکیب با ستون Ni-NTA، وسترن‌بلاتینگ به‌منظور تایید انجام شد. سپس پروتئین CSCl در نانوذرات کیتوسان کپسوله و اندازه آن توسط دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر اندازه‌گیری شد.
یافته‌ها: پروتئین نوترکیب CSCL توسط ستون Ni-NTA به روش دناتوره (اوره) تخلیص شد. سپس این پروتئین تخلیص‌شده (~۵۷کیلودالتون) توسط وسترن‌بلاتینگ تایید و اندازه نانوذرات حاوی این پروتئین ۱۱۲/۰نانومتر با بازده بارگذاری ۹۸/۸% تخمین زده شد.
نتیجه‌گیری: پروتئین نوترکیب کایمر با مزایایی از جمله، داشتن آنتی‌ژن‌های سطحی و مهم ETEC و کپسوله‌شدن در نانوذرات کیتوسان، می‌تواند به‌عنوان کاندیدی مناسب برای ساخت یک نانوواکسن خوراکی به‌منظور ایجاد هر دو پاسخ ایمنی مخاطی و سیستمیک، مورد توجه قرار گیرد.
کلیدواژه‌ها: *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک، توکسین حساس به حرارت، توکسین پایدار به حرارت، نانوذرات کیتوسان، عوامل کلونیزاسیون، اسهال مسافرتی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۵
*نویسنده مسئول: jafar.amani@gmail.com

مقدمه
اشریشیا کلی باکتری گرم‌منفی و میله‌ای‌شکل از خانواده انتروباکتریاسه است[1]. با توجه به تلاش‌های زیاد در سطح جهانی برای کاهش عوامل مرگ‌ومیر ناشی از اسهال، همچنان اسهال ناشی از *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC) و *ویبریو کلرا* (*Vibrio cholerae*)، دومین عامل مرگ‌ومیر در کودکان زیر ۵ سال، در کشورهای در حال توسعه را به خود اختصاص داده است[2-4]. باکتری ETEC توسط یک سازوکار بیماری‌زایی ویژه به‌وسیله عوامل کلونیزاسیون (CFs) به‌طور اختصاصی به اپیتلیوم روده متصل و انتروتوکسین پایدار به حرارت(ST) و ناپایدار به حرارت (LT) را سنتز و ترشح می‌کند و منجر به اسهال می‌شود[5-7]. در سال‌های اخیر، به‌منظور تهیه واکسن علیه ETEC آنتی‌ژن‌های مختلفی از این باکتری کاندیدای واکسن شده‌اند. مطالعات نشان داده است که زیرواحد LT-B، یک ایمونوژن قوی محسوب شده و در بیشتر سویه‌ها وجود دارد و می‌تواند کاندید مهمی در تولید واکسن باشد[8]. از دیگر مولکول‌های کاندید واکسن می‌توان به ST اشاره کرد که مولکولی با وزن کم و غیرایمنوژن است و در صورت اتصال به LT-B می‌تواند ایمنی‌زایی موثری ایجاد کند[9, 10]. CFها نیز از دیگر کاندیدای ساخت واکسن به شمار می‌آیند که برای ایجاد حفاظت و پاسخ ایمنی مخاطی بیشتر در برابر عفونت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند[11, 12]. یکی از مهم‌ترین عوامل کلونیزاسیون، CFA/I است که از بخش‌های مختلفی مانند CFaA، CFaB، CFaC و CFaE تشکیل شده است. از مهم‌ترین این بخش‌ها، می‌توان به CFaB و یک پروتیئن انتهایی به نام CFaE اشاره کرد که نقش مهمی در اتصال باکتری به اپیتلیوم روده ایفا می‌کنند[13, 14].

با توجه به این حقیقت که بیماری‌های عفونی همچنان یکی از بزرگ‌ترین علل مرگ‌ومیر محسوب می‌شود، واکسیناسیون می‌تواند به‌عنوان یک راه حل برای جلوگیری از این بیماری‌ها مطرح شود. واکسن‌های زنده ضعیف‌شده با ایجاد اثری مشابه با عفونت معمولی، موجب تولید آنتی‌بادی می‌شوند اما مشکلاتی مانند ایجاد بیماری کنترل‌نشده و التهاب را در پی دارند[15]. ازاین‌رو، واکسن‌های غیرفعال‌شده که نسبت به واکسن‌های زنده از ایمنی‌زایی ذاتی ضعیف‌تری برخوردار هستند، مورد استفاده قرار گرفتند. این واکسن‌ها ضمن داشتن اثرات جانبی، نیازمند ترکیب با ادجوانت برای افزایش اثربخشی و ایمنی‌زایی هستند[16]. بنابراین، واکسن‌های زیرواحدی متشکل از زیرواحدهای پروتئینی مورد توجه قرار گرفتند تا بتوانند سیستم ایمنی را در محل مورد نظر به‌خوبی تحریک کنند[17]. استفاده از تکنیک ساخت واکسن‌های زیرواحدی به‌همراه کپسوله‌کردن اجزای آن در نانوذرات کیتوسان موجب تحریک بهتر سیستم ایمنی می‌شود زیرا کیتوسان به‌عنوان یک ادجوانت، به‌خوبی می‌تواند ایمنی سلولی را از طریق تولید سایتوکین‌ها و فعال‌سازی سلول‌های دندریت القا کند[18]. همچنین نانوذرات کیتوسان در دستگاه گوارش توسط سلول M در پلاک پی‌یر جذب شده و در مراحل بعدی توسط لنفوسیت‌ها به شکل وزیکولی حمل می‌شوند که به‌دنبال آن پاسخ‌های ایمنی و تولید IgA شروع می‌شود[19]. کیتوسان، یک پلیمر طبیعی از D-گلوکز آمین و N-استیلD-گلوکز آمین است که در باکتری‌های گرم منفی خاصیت ضدباکتری بیشتری از خود نشان می‌دهد[20]. از جمله مزیت‌هایی که موجب شده کیتوسان به‌عنوان یک حامل مناسب در تحویل واکسن، نسبت به دیگر پلی‌ساکاریدها برتری داشته باشد، خاصیت موکوادهسینی آن است. این خاصیت به‌دلیل داشتن واکنش‌های الکترواستاتیک بین بار مثبت گروه یونیزه‌کننده $R\text{-}NH_3^+$ و بار منفی سطوح مخاطی ایجاد می‌شود[21]. همچنین می‌توان به خاصیت زیست‌تخریب‌پذیری، سازگاری زیستی، سهولت در ساخت، توانایی در تحریک هر دو ایمنی سلولی و هومورال نیز اشاره کرد که به‌عنوان یک حامل با خاصیت ادجوانتی ذاتی برای مسیرهای غیرتهاجمی تجویز دارو مثل تجویز از راه چشم، بینی، دهان و ریه مورد توجه قرار گرفته است[22, 23].

از آنجایی که سازه ژنی *cscl* شامل *cfab* به‌همراه سم *st*، *cfae* و *ltb* است و به‌طور هم‌زمان چهار مولکول مهم دخیل در بیماری‌زایی این باکتری به سیستم ایمنی عرضه می‌کند، انتظار می‌رود، تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضدپروتئین CSCL، اثرات حفاظتی مناسبی را در میزبان ایجاد کرده و بتواند ایمنی مناسب‌تری را در

مقابل طیف وسیعی از سویه‌های باکتری ETEC تولیدکننده عوامل کلونیزه‌کننده، تولیدکننده فقط یک سم یا هر دو سم به وجود بیاورد. ازاین‌رو هدف مطالعه حاضر، بیان و تخلیص پروتئین کایمر نوترکیب CSCL، بود. بنابراین، می‌تواند به‌عنوان کاندیدای مهم و موثر در تولید واکسن خوراکی مورد توجه قرار گرفته و با تحریک ترشح سایتوکین‌ها، ایمنی سلولی را القا کند. همچنین، با کپسوله‌کردن این پروتئین در نانوذرات کیتوسان انتظار می‌رود که کیتوسان به‌عنوان حاملی با خاصیت ادجوانتی، ایمونوژن را به محل مناسبی در دستگاه گوارش تحویل داده تا ضمن در امان نگه‌داشتن این پروتئین از هضم و تخریب، ایمنی بیشتری را در سطح مخاط القا کند.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی است.

توالی ژن انتخابی: سازه ژنی انتخاب‌شده با کد ژنتیکی (ID: MF774033) در بانک ژن است. این سازه ژنی دارای زیرواحد *cfab* به‌همراه سم *st*، *cfae* و *ltb* است و محصول آن در این پژوهش، تحت عنوان پروتئین نوترکیب کایمر CSCL نام برده شده است. ژن نوترکیب *cscl* در ناقل pET28a (بیوماتیک؛ کانادا) زیرهمسانه‌سازی شده است.

تهیه ناقل حاوی ژن نوترکیب *cscl*: ناقل pET28a واجد سازه ژنی *cscl* به سویه *E .coli* DH5α منتقل شد. اندازه ژن همسانه‌سازی‌شده در ناقل ۱۴۴۹جفت‌باز است. همچنین به‌منظور بیان پروتئین از سویه *E. coli* BL21DE3 واجد ناقل نوترکیب pET28a-*cscl* استفاده شد.

تایید پلاسمید نوترکیب با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و هضم آنزیمی: استخراج پلاسمید توسط کیت GeNet Bio (Gobiz؛ کره‌جنوبی) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعه مورد نظر *cscl* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. آغازگرهای پیشرو با ۳۴باز و پیرو با ۳۵باز، به‌ترتیب دارای جایگاه آنزیم‌های محدودالاثر *Eco*RI و *Hind*III هستند (جایگاه شناسایی این آنزیم‌ها در توالی آغازگرها به‌صورت زیرخط‌دار نشان داده شده است). محصول PCR با آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III به‌منظور تایید حضور ژن نوترکیب *cscl* در ناقل pET-28a، برای رویت به ژل آگارز ۱% منتقل و الکتروفورز انجام شد.

آغازگر پیشرو: 5′ ATCATA <u>GAATTC</u> ATTGATCTACTCCAGGCAGATG 3′

آغازگر پیرو: 3′ ATATACT <u>AAGCTT</u> TTAGTGATGGTGATGATGGTGA 5′

بیان و تخلیص پروتئین CSCL: سویه *E. coli* BL21DE3 دارای ناقل pET28a-*cscl* در محیط لوریا برتانی (LB) مایع، دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر؛ فرمنتاز؛ کانادا) کشت داده شد تا جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰نانومتر به ۰/۷-۰/۵ برسد. سپس ایزوپروپیل بتا-دی-گالاکتوپیرانوزید (IPTG یک‌میلی‌مولار؛ فرمنتاز؛ کانادا) به‌عنوان ماده القاکننده افزوده شد. محیط کشت حاوی باکتری در بازه‌های زمانی مختلف (۲ساعت، ۴ساعت، ۶ساعت، شبانه) و در دمای ۳۷°C مورد بررسی قرار گرفت تا بهترین مدت‌زمان برای بیان به دست آید. همچنین نمونه قبل از القای IPTG به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. بعد از هر بار بیان، سلول‌ها به‌وسیله سانتریفیوژ در دور ۳۵۰۰rpm به‌مدت ۵دقیقه جمع‌آوری شدند و بررسی حلالیت به‌منظور تعیین فاز محلول و فاز نامحلول (انکلوژن‌بادی) مورد ارزیابی قرار گرفت. در تمام ارزیابی‌ها، نمونه‌ها روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰% (کیاژن؛ آلمان) به روش الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید-سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS-PAGE) الکتروفورز شدند. همچنین، در مرحله تخلیص به‌دلیل حضور His-tag در ژن *cscl*، از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل Ni-NTA (کیاژن؛ آلمان) استفاده شد. در این مرحله با توجه به فرم نامحلول پروتئین بیان‌شده، رسوب محیط کشت حاوی باکتری، بعد از القای IPTG به‌وسیله سانتریفیوژ در دور ۳۵۰۰rpm به‌مدت ۵دقیقه جمع‌آوری شد. سپس، در ۴میلی‌لیتر بافر مناسب شرایط دناتوره (NaH_2PO_4؛ ۱۰۰میلی‌مولار)، تریس-HCL؛ ۱۰میلی‌مولار)، اوره؛ ۸مولار) با pH برابر با ۸ حل شد، سپس به‌مدت ۱۰دقیقه با دانه‌های شیشه‌ای (Glass bead) ورتکس و به‌مدت یک شبانه‌روز در شیکر انکوباتور قرار داده شد. در مرحله بعد و با گذشت زمان فوق، محلول شفاف رویی حاوی پروتئین در فاز نامحلول به‌وسیله سانتریفیوژ در دور ۳۵۰۰rpm به‌مدت ۱۰دقیقه جمع‌آوری شد. سپس، بعد از عبوردادن ۵میلی‌لیتر بافر مناسب شرایط دناتوره با pH برابر با ۸ (بافر لیزکننده) از ستون، محلول شفاف حاوی پروتئین از ستون عبور داده شد و به‌ترتیب بافرهای مناسب با شرایط دناتوره با pH برابر با ۵/۷ (بافر شست‌وشو) و ۴/۵ (بافر استخراج) از ستون عبور داده شد و در انتها با عبور بافر ام‌ای‌اس (MES)، خروجی ستون در هر مرحله جمع‌آوری و روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰% الکتروفورز شد. در مرحله آخر برای تعیین غلظت پروتئین روش برادفورد به کار رفت[24].

وسترن‌بلاتینگ: ابتدا نمونه پروتئین تخلیص‌شده روی ژل SDS-PAGE ۱۰% الکتروفورز شد. پس از قراردادن غشا نیتروسلولز روی ژل، ساندویچ حاصل در داخل تانک حاوی بافر انتقال‌دهنده (متانول ۱۰%، ۱۹۲میلی‌مولار گلایسین، ۲۵میلی‌مولار تریس) قرار داده شد و انتقال به‌مدت ۲ساعت با ولتاژ ۱۰۰ انجام شد. پس از انتقال، کاغذ نیتروسلولز به‌مدت یک‌ساعت، درون بافر بلاکینگ شیر خشک بدون چربی (Skim milk5%) در ۳۷°C در شیکر انکوباتور با دور ۷۰rpm قرار داده شد. سپس با بافر TBST (توین ۲۰، تریس-HCL، کلریدسدیم، dH_2O) سه‌بار شست‌وشو داده شد. آنتی‌بادی ضددنباله هیستیدینی متصل به HRP با رقت ۱:۲۰۰۰ داخل بافر TBST تهیه و روی کاغذ نیتروسلولز ریخته شد و به‌مدت یک‌ساعت در ۳۷°C در شیکر انکوباتور با۷۰rpm قرار گرفت. سپس سه‌بار با بافر TBST و هربار به‌مدت ۵دقیقه شست‌وشو داده شد. در مرحله شناسایی، پودر سوبسترای DAB (3,3'-diaminobenzidine) در 1x PBS (دی‌سدیم‌فسفات، مونوپتاسیم‌فسفات، کلریدسدیم، کلریدپتاسیم و آب) حل شد، به آن آب اکسیژنه اضافه و روی کاغذ نیتروسلولز ریخته شد. پس از ظهور باندها، کاغذ توسط آب مقطر شست‌وشو داده شد.

تهیه نانوذرات حاوی پروتئین کایمر نوترکیب CSCL: نانوذرات کپسوله‌شده به روش کراس‌لینک یونی تهیه شد[21]. آنتی‌ژن مورد نظر با غلظت یک‌میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به محلول کیتوسان (۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر؛ سیگماآلدریچ؛ آلمان) اضافه شده و pH آن روی عدد ۵، برابر با pH ایزوالکتریک پروتئین CSCL تنظیم و محلول سدیم‌تری‌پلی‌فسفاتاز (TPP؛ Scharlau؛ اسپانیا)، به‌عنوان کراس‌لینکر یونی به آن اضافه شد. همچنین محلول فاقد آنتی‌ژن با همین شرایط به‌عنوان نمونه کنترل، آماده شد. در انتها رسوب محلول‌ها به‌وسیله سانتریفوژ در دور ۱۳۰۰۰rpm به‌مدت

۱۰دقیقه جمع‌آوری شد.

بررسی و تایید خصوصیات نانوذرات‌های سنتزشده

تعیین اندازه نانوذرات: از دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر مالورن به‌منظور تعیین اندازه نانوذرات استفاده شد. سپس نانوذرات کپسوله، در محلول سوسپانسه حاصل (PBS)، تعیین اندازه شدند.

تعیین بازده کپسوله‌شدن پروتئین (EE): برای تعیین میزان کپسوله‌شدن آنتی‌ژن در نانوذرات از روش برادفورد استفاده شد. بدین‌منظور از مایع رویی نمونه‌های حاوی نانوذرات، که حاوی پروتئین‌های کپسوله‌نشده و کیتوسان آزاد است، به محلول برادفورد اضافه شد و در جذب نوری ۵۹۵نانومتر قرائت شد. نتیجه حاصل به‌صورت درصد بازده کپسوله‌شدن پروتئین (EE) طبق فرمول زیر محاسبه شد[25]:

EE (%)=میزان کل پروتئین اضافه‌شده-میزان پروتئین کپسوله‌نشده/ (میزان کل پروتئین اضافه‌شده×۱۰۰%)

یافته‌ها

تایید حضور ژن *cscl* با هضم آنزیمی: استخراج پلاسمید از باکتری *E. coli* DH5α و هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III انجام شد. طبق انتظار یک قطعه ۱۴۴۹جفت‌بازی روی ژل آگارز ۱% مشاهده شد که حضور قطعه ژن *cscl* در ناقل pET28a را تایید کرد (شکل ۱).

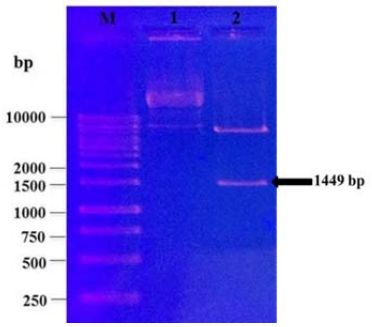
بیان و تخلیص پروتئین کایمر نوترکیب CSCL: نتیجه ژل SDS-PAGE ۱۰%،بیان پروتئین را بعد از القا به‌مدت یک شبانه‌روز (بهترین مدت‌زمان برای بیان‌شدن پروتئین)، به‌صورت باندی با وزن تقریبی ۵۷کیلودالتون نشان داد (شکل ۲). بررسی حلالیت برای تعیین فاز محلول و فاز نامحلول (انکلوژن‌بادی) روی ژل SDS-PAGE ۱۰% مورد ارزیابی قرار گرفت و بررسی ژل، بیان مناسب پروتئین نوترکیب به‌صورت پروتئین در فاز نامحلول (انکلوژن‌بادی) را نشان داد (شکل ۳). بنابراین، در مرحله تخلیص، به کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل Ni-NTA، پروتئین CSCL با استفاده از شیب pH بافرهای حاوی اوره، خالص‌سازی شد و ژل SDS-PAGE ۱۰% تخلیص مناسب پروتئین CSCL و مشاهده باندی با وزن تقریبی ۵۷کیلودالتون را نشان داد (شکل ۴).

تایید پروتئین‌های نوترکیب تخلیص‌شده CSCL با استفاده از وسترن‌بلاتینگ: محصول پروتئین نوترکیب CSCL با کمک روش وسترن‌بلاتینگ با آنتی‌بادی علیه دنباله هیستیدینی متصل به HRP شناسایی شد. نتیجه حاصل، ظهور باندی در حدود ۵۷کیلودالتون را روی کاغذ نیتروسلولز نشان داد که به منزله تایید صحت پروتئین کایمر نوترکیب CSCL قلمداد شد (شکل ۵).

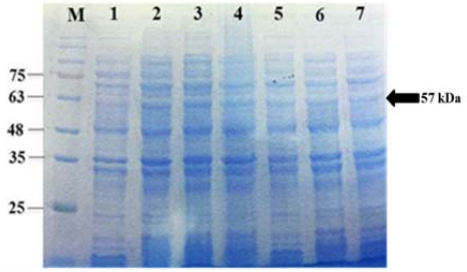
تعیین غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد: غلظت مجموع نمونه‌های پروتئینی CSCL به روش برادفورد (در ۱۰۰میلی‌لیتر محیط کشت) برابر با ۱۳٦٦/۱میکروگرم محاسبه شد.

تعیین اندازه نانوذرات: نتیجه بررسی نمودار حاصل از دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر مالورن، میانگین سایز نانوذرات را ۱۱۲/۰نانومتر در یک بازه و با پراکندگی یکسان نشان داد (نمودار ۱).

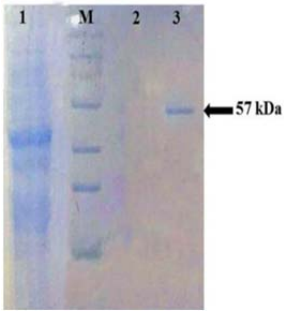
تعیین بازده کپسوله‌شدن پروتئین نوترکیب CSCL: در جذب نوری ۵۹۵نانومتر میزان پروتئین‌های کپسوله‌نشده و کیتوسان آزاد ۰/۰۲۵≥ قرائت شد. بنابراین، درصد کپسوله‌شدن پروتئین در نانوذرات کیتوسان در رسوب نمونه‌ها حدود ۹۸/۸% محاسبه شد.



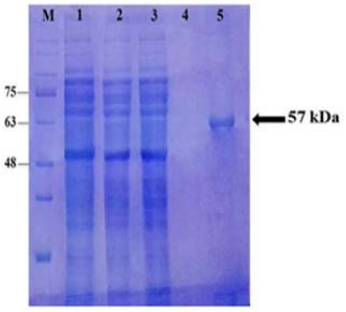
شکل ۱) تایید حضور ژن نوترکیب *cscl* در ناقل pET-28a به‌وسیله هضم با آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III روی ژل آگارز ۱%؛ چاهک ۱: پلاسمید برش‌نخورده، چاهک ۲: پلاسمید نوترکیب هضم‌شده با آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III، چاهک M: نشانگر وزن مولکولی DNA (Mix fermentas)



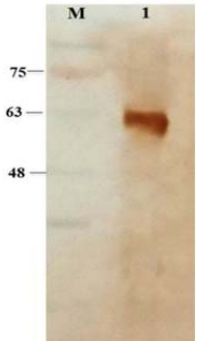
شکل ۲) نتایج بیان قطعه ژنی *cscl* (~۵۷کیلودالتون) در ناقل pET-28a با استفاده از IPTG یک میلی‌مولار روی SDS-PAGE ۱۰%؛ چاهک ۱: عصاره پروتئینی باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a پیش از القا، چاهک ۲ تا ۷: عصاره پروتئینی باکتری کلونی‌های مختلف یک شبانه‌روز پس از القا، M: نشانگر وزن پروتئین



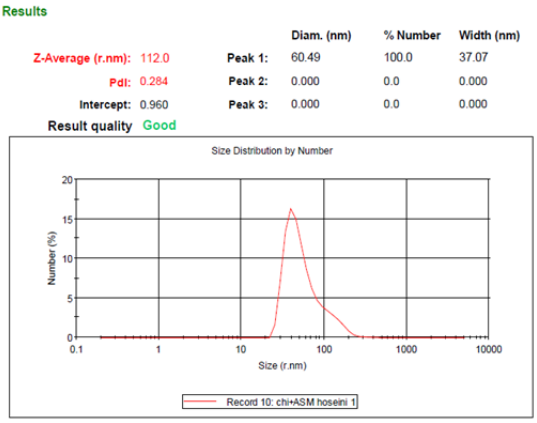
شکل ۳) بررسی حلالیت پروتئین نوترکیب CSCL؛ چاهک ۱: باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a پیش از القا، چاهک ۲: فاز محلول عصاره پروتئینی باکتری، چاهک ۳: فاز نامحلول عصاره پروتئینی باکتری، چاهک M: نشانگر وزن مولکولی پروتئین



شکل ۴) خالص‌سازی پروتئین نوترکیب CSCL در فاز نامحلول با استفاده از ستون Ni-NTA؛ چاهک ۱: سلول شکسته‌شده قبل از بارگذاری روی ستون، چاهک ۲: نمونه خارج‌شده از ستون پس از بارگذاری، چاهک ۳: نمونه خارج‌شده از ستون با بافر شست‌وشو با pH برابر ۵/۹، چاهک ۴ و ۵: نمونه خارج‌شده از ستون با بافر pH برابر با ۴/۵، چاهک M: نشانگر وزن مولکولی پروتئین



شکل ۵) آنالیز و تایید پروتئین‌های نوترکیب تخلیص‌شده CSCL با استفاده از وسترن‌بلاتینگ؛ چاهک ۱: نمونه پروتئین‌های نوترکیب تخلیص‌شده CSCL با آنتی‌بادی ضد His.tag، چاهک M: نشانگر وزن مولکولی پروتئین



نمودار ۱) نتایج اندازه‌گیری نانوذرات توسط دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر مالورن که میانگین سایز نانوذرات ۱۱۲/۰نانومتر است.

بحث

اگرچه تلاش‌های زیاد در سطح جهان برای کاهش عوامل مرگ‌ومیر ناشی از اسهال انجام شده، با این حال اسهال ناشی از ETEC در مسافران، کودکان و پرسنل نظامی مستقر در کشورهای در حال توسعه، سالانه جان بیش از ۵۰۰۰۰۰ نفر را می‌گیرد[26, 27]. طبق گزارشی از بیمارستان‌های تهران، باکتری *اشریشیا کلی* بعد از شیگلا، بیشترین درصد پاتوژن جداشده از اسهال بیماران را به خود اختصاص داده است[28]. تحقیقی جالب در کشورهای در حال توسعه نشان داده است، بیشترین نسبت پاتوژن‌های جداشده از مدفوع کودکان زیر دو سال مربوط به ETEC است[29]. ازاین‌رو مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک و داروهای ضدمیکروبی مثل اریترومایسین، اسیدنالیدیکسیک، آمپی‌سیلین، استرپتومایسین، تتراسایکلین، کوتریموکسازول، داکسی‌سایکلین، آزیترومایسین، سایپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و سفتریازون در کشورهای در حال توسعه در حال افزایش است[30, 31]. این مقاومت چندداروی، به‌دلیل وجود اینتگرون‌ها است که با قرارگیری در پلاسمیدها و کروموزوم‌ها، ژن‌های مقاوت را منتقل می‌کنند[32]. بنابراین، استفاده از نانوذراتی با خواص و فعالیت ضدمیکروبی، می‌تواند راهکاری برای مقابله با مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناشی از بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا باشد[33]. با توجه به این که تاکنون هیچ واکسن دارای مجوزی علیه باکتری ETEC وجود نداشته است، با این حال، شواهد نشان‌دهنده امکان به‌وجودآمدن ایمنی به‌دنبال افزایش سن یا آلوده‌شدن دوباره بعد از یک‌بار آلوده‌شدن با ETEC به‌صورت طبیعی یا تجربی در افراد است. این نتایج، محققان را بر آن داشته است تا به‌دنبال طراحی و تهیه واکسنی موثر علیه ETEC باشند[34].

واکسن‌های معمول ساخته‌شده علیه ETEC دارای عوامل کلونیزه‌کننده شایع مانند CFA/1 به‌همراه LT-B هستند تا خاصیت ضدسمی و ادجوانتی ذاتی این مولکول‌ها حفظ شود[35]. *خالصی* و همکاران ژن *ltb* را در ناقل pET28a همسانه‌سازی کرده و به میزبان *E .coli* منتقل کردند، سپس به بیان این ژن و تزریق پروتئین تخلیص‌شده LTB نوترکیب به موش پرداختند که واکسن حاصل باعث خنثی‌شدن توکسین LT شد[8]. *نظریان* و همکاران با تجویز پروتئین کایمر شامل LTB، CFaB و چندین عوامل کلونیزه‌کننده دیگر با نانوذرات PLGA باعث ایجاد پاسخ ایمنی شدند[36]. همچنین، از آنجایی که بیشتر سویه‌ها فقط ST را تولید می‌کنند واکسنی بر پایه توکسوئید ST، علی‌رغم ایمنی‌زایی ضعیف این مولکول‌های کوچک، می‌تواند موفقیت‌آمیز باشد[35]. تحقیقات *ژو* و همکاران، *زینالزاده* و همکاران، با استفاده از فاکتورهای مهم دیگری مانند ST متصل به LTB و CFها موجب ایجاد پاسخ ایمنی شدند[37, 38]. ازاین‌رو، در این پژوهش، از ژن نوترکیب *cscl* متشکل از زیرواحدهای عوامل کلونیزه‌کننده *cfab*، *cfae* و زیرواحد *ltb* به‌همراه توکسوئید سم *st* از باکتری *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC) استفاده شد. در دهه اخیر استفاده از نانوذرات کیتوسان توجه دانشمندان زیادی را در زمینه‌های مختلف غذایی، دارویی و مهندسی بافت جلب کرده است[39]. کیتوسان در زمینه دارویی به‌منظور کپسوله‌کردن دارو استفاده می‌شود تا دارو راحت‌تر در دسترس سلول هدف قرار بگیرند. در تحقیق *پارک* و همکاران، نشان داده شد که استفاده از نانوذرات کیتوسان و مشتقات آن به‌عنوان حاملی برای رساندن دارو به سلول هدف، برای مولکول‌هایی با وزن مولکولی کم مناسب هستند[40]. تحقیق *نوروزی* و همکاران نشان داد، با کپسوله‌کردن وزیکول‌های خارج غشایی (OMV) باکتری *اشریشیا کلی* در کیتوسان، موش‌ها از طریق مهار کلونیزاسیون ETEC در روده کوچک و تولید آنتی‌بادی‌های ضدتوکسین LT واکسینه شدند[41]. در این تحقیق، به‌منظور القا و ایجاد پاسخ ایمنی در مخاط، از نانوذرات کیتوزان حاوی پروتئین نوترکیب CSCL استفاده شد تا ایمنی بیشتری در سطح مخاط القا شود. از مزایای واکسن‌های مخاطی نسبت به مسیر تزریقی، می‌توان به مواردی از جمله، عدم نیاز به پرسنل بهداشتی آموزش‌دیده، تجویز آسان و بدون درد اشاره کرد که کمترین خطر انتقال عفونت را دارند[42]. علی‌رغم این مزیت‌ها، واکسن‌های خوراکی که با مشکل تخریب در معده و روده مواجه هستند، نیازمند راهکاری برای تحویل آنتی‌ژن در محل مناسب دستگاه گوارش هستند[43]. در این تحقیق، از کیتوسان به‌عنوان راهکاری برای حل مشکل هضم‌شدن پروتئین CSCL استفاده شد، که باعث رهایش کنترل‌شده پروتئین CSCL در محل مناسبی در دستگاه گوارش می‌شود. این امر مطابق با تحقیقات *نوروزی* و همکاران و *حسینی* و همکاران بوده و می‌تواند موجب تحریک سیستم ایمنی و القای پاسخ ایمنی مطلوب در سطح مخاطی شود[41, 44]. همچنین، هر چه درصد بازده کپسوله‌شدن پروتئین در نانوذرات بیشتر باشد، میزان پروتئین بیشتری در نانوذرات وجود دارد، بنابراین میزان واکسن بیشتری در دسترس سلول‌های هدف قرار می‌گیرد که می‌تواند از عوامل موثری در ایمنی‌زایی محسوب شود[25]. در این پژوهش، اندازه نانوذرات ۱۱۲/۰نانومتر و درصد بارگذاری ۹۸/۸% ارزیابی شد. درصد بارگذاری این پژوهش نسبت

به تحقیقات *نوروزی* و همکاران با درصد بارگذاری ۹۰% و *ژائو* و همکاران با درصد بارگذاری ۹۸/۱% بیشتر بوده و نشان‌دهنده درصد مناسب بارگذاری پروتئین در نانوذرات کیتوسان است[41, 45].

از محدودیت‌های مطالعه حاضر عدم کارآیی بالا در بارگذاری پروتئین در ذرات کیتوزان را می‌توان بیان کرد. ولی در این مطالعه با تغییرات و بهینه‌سازی توانستیم راندمان بالایی در جذب پروتئین توسط نانوذره داشته باشیم.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، استفاده از پروتئین CSCL کپسوله‌شده در نانوذرات کیتوسان، می‌تواند به‌عنوان کاندیدی برای یک واکسن مخاطی مورد توجه و آزمایش بیشتر قرار بگیرد. همچنین لازم است تحقیقات بیشتر ابتدا در مدل موش و در مراحل بعدی در مدل‌های دیگر ادامه پیدا کند.

نتیجه‌گیری

پروتئین نوترکیب کایمر با مزایایی از جمله، داشتن آنتی‌ژن‌های سطحی و مهم ETEC و کپسوله‌شدن در نانوذرات کیتوسان، می‌تواند به‌عنوان کاندیدی مناسب برای ساخت یک نانوواکسن خوراکی به‌منظور ایجاد هر دو پاسخ ایمنی مخاطی و سیستمیک، مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به‌واسطه همکاریشان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تاییدیه‌اخلاقی: مطالعه حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام میدارند هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهره‌سادات حسینی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (٤٠%)؛ جعفر امانی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (٤٠%)؛ فرزانه حسینی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (٢٠%)

منابع مالی: مطالعه حاضر حمایت مالی نداشته است.

منابع

1- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev. 2013;26(4):822-80.

2- Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: An updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. Lancet. 2012;379(9832):2151-61.

3- Walker RI, Steele D, Aguado T, Committee AHETE. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic E. coli (ETEC) disease. Vaccine. 2007;25(14):2545-66.

4- Begum YA, Rydberg HA, Thorell K, Kwak YK, Sun L, Joffré E, et al. In Situ Analyses Directly in Diarrheal Stool Reveal Large Variations in Bacterial Load and Active Toxin Expression of Enterotoxigenic Escherichia coli and Vibrio cholerae. mSphere. 2018;3(1):e00517-17.

5- Von Mentzer A, Connor TR, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, et al. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) clades with long-term global distribution. Nature genetics. 2014;46(12):1321-6.

6- Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM. ANIMAL ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI. EcoSal Plus. 2016;7(1).

7- Hayat SMG, Gargari SLM, Nazarian SH, Mogarmon HM. Molecular Characterization of Virulence Factors in Enterotoxigenic Escherichia coli. J Appl Biotechnol Rep. 2015;2(2):225-9.

8- Khalesi R, Nazarian 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 Med J. 2010;15(3):141-7. [Persian]

9- Taxt A, Aasland R, Sommerfelt H, Nataro J, Puntervoll P. Heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli as a vaccine target. Infect Immun. 2010;78(5):1824-31.

10- Deng G, Zeng J, Jian M, Liu W, Zhang Z, Liu X, et al. Nanoparticulated heat-stable (STa) and heat-labile B subunit (LTB) recombinant toxin improves vaccine protection against enterotoxigenic Escherichia coli challenge in mouse. J Biosci Bioeng. 2013;115(2):147-53.

11- Lundgren A, Leach S, Tobias J, Carlin N, Gustafsson B, Jertborn M, et al. Clinical trial to evaluate safety and immunogenicity of an oral inactivated enterotoxigenic Escherichia coli prototype vaccine containing CFA/I overexpressing bacteria and recombinantly produced LTB/CTB hybrid protein. Vaccine. 2013;31(8):1163-70.

12- Svennerholm AM. From cholera to enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) vaccine development. The Indian J Med Res. 2011;133(2):188-96.

13- Li YF, Poole S, Rasulova F, McVeigh AL, Savarino SJ, Xia D. A receptor-binding site as revealed by the crystal structure of CfaE, the colonization factor antigen I fimbrial adhesin of enterotoxigenic Escherichia coli. J Biol Chem. 2007;282(33):23970-80.

14- Hayat SMG, Gargari SLM, Nazarian S. Construction and immunogenic properties of a chimeric protein comprising CfaE, CfaB and LTB against Enterotoxigenic Escherichia coli. Biologicals. 2016;44(6):503-10.

15- Ramirez JEV, Sharpe LA, Peppas NA. Current state and challenges in developing oral vaccines. Adv Drug Deliv Rev. 2017;114:116-31.

16- Wang YQ, Liu Y, Wang Y-X, Wu YJ, Jia P-Y, Shan JJ, et al. The potential adjuvanticity of quaternized chitosan hydrogel based microparticles for porcine reproductive and respiratory syndrome virus inactivated vaccine. Int Immunopharmacol. 2016;39:84-91.

17- Bagheri S, Gargari SLM, Rasooli I, Nazarian S, Alerasol M. A CssA, CssB and LTB chimeric protein induces protection against Enterotoxigenic Escherichia coli. Braz J Infec Dis. 2014;18(3):308-14.

18- Carroll EC, Jin L, Mori A, Muñoz-Wolf N, Oleszycka E, Moran HB, et al. The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons. Immunity. 2016;44(3):597-608.

19- des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider Y-J, Préat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. J Control Release. 2006;116(1):1-27.

20- Kim SK. Chitin and chitosan derivatives: advances in drug discovery and developments. Boca Raton: CRC Press; 2013.

21- Ahmed TA, Aljaeid BM. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in

Carbohydr polym. 2015;130:429-39.
34- Bourgeois AL, Wierzba TF, Walker RI. Status of vaccine research and development for enterotoxigenic Escherichia coli. Vaccine. 2016;34(26):2880-6.
35- Fleckenstein J, Sheikh A, Qadri F. Novel antigens for enterotoxigenic Escherichia coli vaccines. Expert review of vaccines. 2014;13(5):631-9.
36- Nazarian S, Gargari SLM, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic Escherichia coli. Microbiol Res. 2014;169(2-3):205-12.
37- Zeinalzadeh N, Salmanian AH, Ahangari G, Sadeghi M, Amani J, Bathaie SZ, et al. Design and characterization of a chimeric multiepitope construct containing CfaB, heat-stable toxoid, CssA, CssB, and heat-labile toxin subunit B of enterotoxigenic Escherichia coli: A bioinformatic approach. Biotechnol Appl Biochem. 2014;61(5):517-27.
38- Zhu C, Setty P, Boedeker EC. Development of live attenuated bacterial vaccines targeting Escherichia coli heat-labile and heat-stable enterotoxins. Vet Microbiol. 2017;202:72-8.
39- Luo Y, Wang Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. Int J Biol macromol. 2014;64:353-67.
40- Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. Adv Drug Del Rev. 2010;62(1):28-41.
41- Noroozi N, Mousavi Gargari SL, Nazarian Sh, Sarvary S, Rezaei R. Immunogenicity of enterotoxigenic Escherichia coli outer membrane vesicles encapsulated in chitosan nanoparticles. Iran J Basic Med Sc. 2018;21(3):284-91.
42- Leach S. Approaches to Enhance and Evaluate the Immunogenicity of an Oral ETEC Vaccine [Dissertation]. Gothenburg: University of Gothenburg; 2015.
43- Davitt CJ, Lavelle EC. Delivery strategies to enhance oral vaccination against enteric infections. Adv Drug Deliv Rev. 2015;91:52-69.
44- Hosseini ZS, Amani J, Baghbani Arani F, Nazarian S, Motamedi MJ, Shafighian F. Immunogenicity of the nanovaccine containing intimin recombinant protein in the BALB/c mice. Clin Exp Vaccine Res. 2018;7(1):51-60.
45- Zhao K, Zhang Y, Zhang X, Shi C, Wang X, Wang X, et al. Chitosan-coated poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles as an efficient delivery system for Newcastle disease virus DNA vaccine. Int J Nanomedicine. 2014;9:4609-19.
pharmaceutical drug delivery. Drug Des Devel Ther. 2016;10:483-507.
22- Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. Carbohydrate research. 2004;339(16):2693-700.
23- Hajizade A, Ebrahimi F, Salmanian A-H, Arpanae A, Amani J. Nanoparticles in vaccine development. J Appl Biotechnol Rep. 2014;1(4):125-34.
24- Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. Protein methods. 2nd Edition. New York: Wiley-Liss; 1996.
25- Zhao K, Zhang Y, Zhang X, Li W, Shi C, Guo C, et al. Preparation and efficacy of Newcastle disease virus DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. Int J Nanomedicine. 2014;9:389-402.
26- Sahl JW, Sistrunk JR, Baby NI, Begum Y, Luo Q, Sheikh A, et al. Insights into enterotoxigenic Escherichia coli diversity in Bangladesh utilizing genomic epidemiology. Sci Rep. 2017;7(1):3402.
27- Sears KT, Tennant SM, Reymann MK, Simon R, Konstantopoulos N, Blackwelder WC, et al. Bioactive immune components of anti-diarrheagenic enterotoxigenic Escherichia coli hyperimmune bovine colostrum products. Clin Vaccine Immunol. 2017;24(8):e00186-16.
28- Jafari F, Shokrzadeh L, Hamidian M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Zali MR. Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. Jpn J Infect Dis. 2008;61(4):269-73.
29- Qadri F, Saha A, Ahmed T, Al Tarique A, Begum YA, Svennerholm A-M. Disease burden due to enterotoxigenic Escherichia coli in the first 2 years of life in an urban community in Bangladesh. Infec Immun. 2007;75(8):3961-8.
30- Ochoa TJ, Ruiz J, Molina M, Del Valle LJ, Vargas M, Gil AI, et al. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic Escherichia coli in infants in Peru. Am J Trop Med Hyg. 2009;81(2):296-301.
31- Begum YA, Talukder K, Azmi IJ, Shahnaij M, Sheikh A, Sharmin S, et al. Resistance pattern and molecular characterization of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) strains isolated in Bangladesh. PloS one. 2016;11(7):e0157415.
32- Von Baum H, Marre R. Antimicrobial resistance of Escherichia coli and therapeutic implications. Int J Med Microbiol. 2005;295(6-7):503-11.
33- Madureira AR, Pereira A, Pintado M. Current state on the development of nanoparticles for use against bacterial gastrointestinal pathogens. Focus on chitosan nanoparticles loaded with phenolic compounds.