

Expression and purification of recombinant chimeric protein contains CtxB and TcpA from *Vibrio cholera* and investigation of antibody titer in mouse

Milad Amerian¹, Shahram Nazarian^{2*}

1- M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossain University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossain University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 1651136771, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossain University, Tehran, Iran
Email: nazarian56@gmail.com

Received: 05/Aug/2017, Accepted: 02/Oct/2017

Abstract

Objective: The *TcpA* colonization factor of pili A and the cholera toxin are the most important pathogenesis factors of *Vibrio cholera* that have the ability to stimulate the immune system. The aim of this study is a bioinformatics analysis of the expression of CtxB-TcpA recombinant chimeric protein in *E. coli*, and production of antibody against it in mice.

Methods: We designed a gene cassette that contained the *CtxB* and *TcpA* genes, and a spacer linker by using bioinformatics. Characteristics that include the structure of the chimer protein and epitopes were studied. In order to build a gene cassette, *TcpA* and *CtxB* genes were proliferated and cloned in pET28a(+). *CtxB-TcpA* gene expression was induced by IPTG. The produced CtxB-TcpA recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blot analyses. Antibody produced from mice serum was isolated and confirmed by ELISA.

Results: The codon adaptation index of the optimized gene was 0.9. The prevalence ratio codons increased to 74% through codon optimization. Enzyme analysis verified the chimeric gene *CtxB-TcpA* cloning in the pET28a (+) expression vector. A protein with a molecular weight of 35 kDa was seen on SDS-PAGE. Its reaction with anti-histidine antibodies was confirmed by Western blot. The purified protein was 33.100 mg/l. Immunization of mice induced a serum antibody response.

Conclusion: The chimeric protein can be considered a good candidate for effective immunity against cholera.

Keywords: Colonization factor, *Vibrio cholera*, Bioinformatics, Recombinant chimeric protein

Pathobiology Research, Vol. 20 (2017), No.3, Pages: 33-48

بیان و تخلیص پروتئین کایمر نو ترکیب در بردارنده CtxB و TcpA از ویريوكلرا و بررسی تیترا آنتی بادی در موش

میلاذ عامریان^۱، شهرام نظریان^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۶۵۱۱۳۶۷۷۱، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، گروه زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه
Email: nazarian56@gmail.com

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۷/۱۰

دریافت مقاله: ۹۶/۰۵/۱۴

چکیده

هدف: عامل کلونیزاسیون پیلای *tcpA* و توکسین کلرا مهم ترین عوامل بیماری زایی ویريوكلرا هستند و توانایی تحریک سیستم ایمنی را دارند. هدف از این تحقیق بررسی بیوانفورماتیکی، بیان پروتئین کایمر نو ترکیب CTXB-TCPA در باکتری اشریشیا کلی و تولید آنتی بادی علیه آن در موش بود.

مواد و روش ها: کاست ژنی در بردارنده ژن های *tcpA*، *ctxB* و فاصله انداز با روش بیوانفورماتیکی طراحی شد. شاخصه هایی از قبیل ساختار پروتئین کایمر و اپی توپ ها بررسی شد. برای ساخت کاست ژنی، ژن های *tcpA* و *ctxB* تکثیر و در ناقل pET28a همسانه سازی شدند. بیان ژن های *ctxB-tcpA* در pET28a(+) تحت القای IPTG انجام شد. پروتئین نو ترکیب CTXB-TCPA به روش SDS-PAGE و لکه گذاری وسترن تأیید شد. تیترا آنتی بادی تولید شده در سرم موش با روش الیزا بررسی شد.

نتایج: شاخص انطباق پذیری در ژن بهینه سازی شده به ۰/۹ تغییر کرد. با بهینه سازی ژنی درصد کدون های با ترجیح بالا به ۷۴ درصد افزایش یافت. تحلیل آنزیمی همسانه سازی کایمر ژنی *ctxB-tcpA* در ناقل بیانی pET28a(+) را تأیید کرد. پروتئینی با وزن مولکولی ۳۵ کیلو دالتون در SDS-PAGE دیده شد. واکنش پروتئین با آنتی بادی ضد سم کلرا در وسترن بلات تأیید شد. میزان پروتئین خالص شده ۳۳/۱ میلی گرم در لیتر بود. ایمن سازی موش ها پاسخ آنتی بادی سرمی را القا کرد.

نتیجه گیری: پروتئین کایمر می تواند برای بررسی های ایمنی علیه وبا در نظر گرفته شود.

کلیدواژگان: عامل کلونیزاسیون، ویريوكلرا، بیوانفورماتیک، پروتئین کایمر نو ترکیب

پژوهش های آسیب شناسی زیستی، دوره ۲۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحات: ۳۳-۴۸

مقدمه

این بیماری در مناطق آسیا و از جمله کشور ایران به صورت بومی وجود دارد و گاهی به صورت همه گیری (Epidemia) ظاهر می شود. بیماری وبا چه به صورت همه گیری جهانی

وبا (Cholera) بیماری اسهالی است که در صورت عدم تشخیص به موقع، مرگ و میر زیادی را در پی دارد. عامل این بیماری باکتری ویريوكلرا (*Vibrio cholera*) است [۱، ۲].

پروتئین کایمر TcpA-CtxB علیه ویبریولرا

از دو زیر واحد CTA₁ و CTA₂ تشکیل شده که با پیوند دی سولفیدی به هم متصل اند. CTA₁ مسئول فعالیت توکسیک سم CT بوده و دارای خاصیت ADP ریبوزلازی (ADP ribosylation) است. قطعه مارپیچی CTA₂ مسئول فرورفتن و اتصال بخش CTA₁ به درون ساختار پتامر CTB است [۱۱]، [۱۲]. زیر واحد B مسئول اتصال سم به گیرنده‌های موجود در غشا سیتوپلاسمی سلول میزبان بوده و فاقد خاصیت سمی است. امروزه CTB را ایمونوآدجوانت (Immunoadjuvant) قوی در ایمنی‌زایی وابسته به مخاط می‌دانند، زیرا این پروتئین یک انتقال‌دهنده بسیار مؤثر برای ترشح آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌ها است [۱۳]. ژن سازنده این پروتئین دارای ۳۰۹ جفت باز است [۱۴].

واکسن‌ها و ایمنی‌زاهای (Immunogenes) نوترکیب دربردارنده اپی‌توپ‌های یک یا چند آنتی‌ژن است که سیستم ایمنی را علیه بیماری‌زای مورد نظر تحریک می‌کند. تولید واکسن نوترکیب به دلیل ایجاد سطوح ایمنی بالا و پایدار، مقرون به صرفه بودن و تولید در حجم بالا ضروری به نظر می‌رسد [۱۳]. از طرفی یکی از راه‌های تقویت اثر واکسن‌ها استفاده از آدجوانت‌ها است که می‌توان با ممزوج کردن آنتی‌ژن‌های کاندیدای واکسن با آدجوانت CtxB به تهیه ایمنی‌زای مناسب پرداخت [۱۵]. در بین ساز و کارهای واکسیناسیون به ایمنی‌زاهای واکسن‌های زیر واحدی نوترکیب توجه زیادی شده است [۱۶]. واکسن‌های زیر واحدی اختصاصی‌تر بوده و واکنش‌های غیراختصاصی کمتری را در سیستم ایمنی به راه می‌اندازند. با وجود خواص ایمونولوژیکی کلراتوکسین که بسیار مورد توجه محققان است ولی سمیت آن موجب محدود شدن استفاده برای واکسیناسیون انسانی شده است. با این حال عدم خاصیت سمی زیر واحد B، استفاده از CtxB به طور وسیعی به عنوان ایمنی‌زای مخاطی در حال بررسی است. استفاده از ایمنی‌زاهای کایمری و واکسن‌های چند زیر واحدی به جای تک زیر واحدی‌ها به دلیل پاسخ کامل و ایمن‌تر مورد توجه قرار می‌گیرد. پروتئین‌های کایمر

(Pandemic) و چه به صورت بومی (Endemic) طی هزاران سال گذشته خسارت‌های جبران‌ناپذیری را به وجود آورده است. [۳، ۴]. ویبریولرا مدت زیادی در آب زنده می‌ماند و در مناطقی که سطح آب‌های زیرزمینی آن بالا است بیشتر شایع است و عامل بیماری‌زا بیشتر از طریق مدفوع و فاضلاب قابل انتقال است [۵، ۶].

ویبریولرا دارای عوامل بیماری‌زایی متعددی از جمله آنزیم‌ها و سموم مختلف است که مهم‌ترین آن‌ها کلرا توکسین (Cholera toxin) است که یک انتروتوکسین بوده و عامل اصلی بیماری وبا است [۷، ۸]. در نتیجه عملکرد توکسین، آب و الکترولیت‌ها از بدن خارج و باعث کاهش شدید حجم پلاسمای خون و در نهایت مرگ در عرض چند ساعت خواهد شد. ویبریون (Vibrio) وبا از راه دستگاه گوارش با خوردن غذا و یا آشامیدن آب آلوده وارد بدن می‌شود و پس از عبور سد اسیدی شیره معده در محیط قلیایی روده کوچک در بین پرزهای لایه مخاطی چسبیده و شروع به تکثیر می‌نماید [۹].

پروتئین TcpA (Toxin co regulated piliA) به صورت یک پیلی رشته‌ای نازک است و دسته مشخصی را در سطح باکتری ویبریولرا ایجاد می‌کند. پیلی به شکل فیبری است که از پلیمرهای یکسانی از TcpA تشکیل یافته و به عنوان یک پروتئین پیشرو در قسمت سیتوپلاسمیک غشا داخلی ویبریولرا به وسیله یک پروتئین، مورد پردازش قرار می‌گیرد. TCPJ (Toxin co-regulated pili J) نقش این پیتیداز را به عهده دارد. ژن سازنده این پروتئین دارای ۵۴۳ جفت باز است [۱۰].

مطالعات اولیه پیشنهاد می‌کرد که سم کلرا (Cholera toxin) CT از یک زیر واحد پروتئینی منفرد ۸۴ کیلو دالتونی ساخته شده است. اما تجزیه و تحلیل به کمک الکتروفورز SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) نشان داد که سم کلرا از یک زیر واحد بزرگ A (CTA) به وزن مولکولی ۲۷ کیلو دالتون و یک زیر واحد پتامریک CTB (Cholera toxin B) با مونومرهایی به وزن مولکولی ۱۰/۶ کیلو دالتون تشکیل شده است. زیر واحد A

Gel Extraction از شرکت Bioneer (کره جنوبی) تهیه شد. ستون Ni-NTA agarose resin برای تخلیص پروتئین نو ترکیب از شرکت Qiagen (آمریکا) خریداری شد.

طراحی کاست ژنی *tcpA* و *ctxB*

توالی ژن‌های *tcpA* و *ctxB* به ترتیب از پایگاه داده Gene Bank با شماره دسترسی (AB699248.1)، (AB449339) و توالی پروتئینی ژن‌ها از پایگاه بیوانفورماتیکی Uni Prot استخراج و در فرمت FASTA ذخیره شد [۲۰]. برای حفظ انسجام ساختاری پروتئین کایمر و عدم تداخل زیر واحدها از فاصله انداز (EAAAK) شامل اسید آمینه‌های گلو تامیک، آلانین و لیزین استفاده گردید. از نرم افزار Optimizer برای بهینه‌سازی کدون‌ی و احتمال افزایش بیان کایمر استفاده شد [۲۱]. بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین کایمر با استفاده از سرور آنلاین VaxiJen انجام شد [۲۲]. ویژگی فیزیکی و شیمیایی سازه طراحی شده از قبیل وزن مولکولی، ترکیب اسیدهای آمینه تشکیل دهنده پروتئین، تکرار آن‌ها، تعداد اسیدهای آمینه باردار مثبت و منفی، خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین، نیمه عمر، شاخص ناپایداری، انعطاف پذیری پروتئین، نقطه ایزو الکتریک و ساختار دوم پروتئین با استفاده از برنامه ProtParam و ProtScale پیش بینی شد [۲۳، ۲۴]. ساختار ثانویه mRNA پس از بهینه‌سازی کدون‌ها ارزیابی شد. به همین جهت از برنامه RNA Fold، استفاده شد [۲۵]. ژن کدکننده *TcpA* مورد نظر برای سنتز به شرکت Biomatik (کانادا) سفارش داده شد.

همسانه سازی ژن‌ها

ژن *ctxB* با آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) به روش PCR تکثیر شد و پس از برش با آنزیم‌های محدودگر *EcoRI* و *HindIII* در ناقل pET28a(+) همسانه سازی شد. ژن *tcpA* با آغازگرهای اختصاصی که در آن فاصله انداز (EAAAK)

دربدارنده زیر واحدهای پروتئینی، فاصله اندازها و توالی‌هایی با خاصیت ادجوانتی، می‌توانند سبب افزایش خاصیت ایمونوژنیسیته پروتئین‌های نو ترکیب شوند [۱۷، ۱۸].

کوندو (Kundu) و همکاران ایمنی‌زایی پروتئین‌های نو ترکیب *TcpA* و *CtxB* را به صورت جداگانه و ترکیبی علیه ویبریو کلرا O₁ مطالعه کرده‌اند. استفاده از آنتی ژن *CtxB* به عنوان ایمنی‌زا مصونیت بخشی ۷۰/۴۵ درصد و آنتی ژن *TcpA* مصونیت بخشی ۴۱/۱ درصد را نشان داد. این در حالی بود که استفاده همزمان هر دو آنتی ژن سبب مصونیت ۱۰۰ درصدی در مدل حیوان شد [۱۹].

هدف از این تحقیق طراحی ایمنی‌زای کایمر نو ترکیب علیه عوامل اتصال و توکسین باکتری ویبریو کلرا و همچنین بررسی تیتراژ آنتی‌بادی آن در موش بود.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشگاهی، پلاسمید و سوش‌های باکتری

در این مطالعه از باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) سویه DH5α برای همسانه‌سازی ژن‌های *ctxB* و *tcpA* و سویه BL21(DE3) برای بیان پروتئین استفاده شد. از محیط‌های کشت لوریا برتونی مایع (Luria-Bertani Broth: LB) و آگار شرکت Scharlau (اسپانیا) برای رشد باکتری اشریشیا کلی استفاده شد. برای انتخابی نمودن رشد باکتری از آنتی‌بیوتیک کانامایسین (Kanamycin) شرکت Fermentas (اوکراین) استفاده شد. به منظور تأیید همسانه‌سازی ژن در ناقل بیانی، از آنزیم‌های محدود الاثر *XhoI* و *HindIII* ساخت شرکت Fermentas (اوکراین) استفاده شد. آنتی‌بادی اختصاصی تهیه شده علیه کلرا توکسین از شرکت Sigma (آمریکا) تهیه شد. غشای نیترو سلولز از شرکت Roche (آلمان) و پلیت‌ایز (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) از شرکت Nunck (آمریکا) استفاده شد. کیت‌های تخلیص شامل: کیت‌های PCR Product Purification و Plasmid Extraction و PCR Clean-up

پروتئین کایمر TcpA-CtxB علیه ویبریولرا

DH5α ترانسفورم و غربال‌گیری کلونی‌ها روی محیط کشت LB agar واجد ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک کانامایسین انجام گرفت. ساخت سازه ژنی به روش PCR و هضم آنزیمی تأیید شد. کلون‌های مثبت کشت داده شد و پلاسمیدهای نوترکیب تخلیص شده به درون سلول‌های مستعد اشریشیا کلی BL21 DE3 ترانسفورم شد.

اسید آمینه‌های گلوتامیک، آلانین و لیزین طراحی شده بود تکثیر شد و پس از هضم آنزیمی در جایگاه آنزیم‌های *XhoI* و *HindIII* به سازه ژنی pET28a(+)-*ctxB* الحاق شد. الحاق قطعات با استفاده از آنزیم *T4 DNA ligase* و در شرایط دمایی ۱۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ ساعت انجام شد. پلاسمید نوترکیب به درون سلول‌های مستعد اشریشیا کلی

جدول ۱ توالی آغازگرها برای همسانه‌سازی ژن‌های *ctxB* و *tcpA*

ژن هدف	توالی آغازگر	آنزیم محدودگر	محصول PCR (جفت باز)
<i>ctxB</i>	<i>ctxB</i> /F=TCGAGAATTCACACCTCAAATATTACTG	<i>EcoRI</i>	۳۲۹
	<i>ctxB</i> /R=TCATCAAGCTTATTTGCCATACTAATTGC	<i>HindIII</i>	
<i>tcpA</i>	<i>tcpA</i> /F with linker=AGTTAAGCTTGGCAAGCTGCGGCAAAAATGACATTACTCG	<i>HindIII</i>	۵۷۸
	<i>tcpA</i> /R=AAT ACTCGAGTTAGCTGTACCAAATGC	<i>XhoI</i>	

بررسی شد.

بیان پروتئین نوترکیب کایمر CTXB-TCPA

برای بیان کایمر ژنی *ctxB-tcpA* از کشت شبانه کلون‌های جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین تلقیح و پس از رسیدن چگالی نوری (Optical Density) در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ القاکننده (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) IPTG (Fermentas) (اوکراین) با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. رسوب سلولی در بافر لیزکننده واجد اوره ۸ مولار (NaH₂PO₄ ۱۰۰ میلی‌مولار)، Tris base (۱۰ میلی‌مولار)، اوره (۸ مولار) با pH برابر ۸) یکنواخت و دیواره سلول‌ها از طریق سونیکاسیون تخریب شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی با نسبت یک (بافر نمونه) به پنج (نمونه) با بافر نمونه دارای غلظت ۵x مخلوط و به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. نمونه‌های تیمار شده توسط SDS-PAGE ۱۲ درصد از لحاظ بیان پروتئین‌های نوترکیب

تخلیص پروتئین نوترکیب و تأیید آن به روش وسترن بلات

برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون نیکل-نیتربیلو استیک اسید (Ni-NTA) استفاده و با توجه به اینکه پروتئین نوترکیب به دست آمده به صورت نامحلول بود، از بافرهای واجد اوره با ترکیب یکسانی از مواد تشکیل‌دهنده بافر B با pHهای مختلف برای شستشوی ستون استفاده شد (بافر C با pH برابر ۶/۳، بافر D با pH برابر ۵/۹، بافر E با pH برابر ۴/۵، بافر ایمیدازول (Imidazole) ۲۵۰ میلی‌مولار واجد اوره). برای تأیید پروتئین نوترکیب از روش وسترن بلات (Western Blotting) استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه‌گذاری وسترن Bio-rad و بافر انتقال (گالیسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و pH=۸/۳) روی کاغذ نیترو سلولز منتقل و به منظور پر کردن جایگاه‌های خالی (Blocking)، کاغذ به مدت

یک شب در محلول ۵ درصد شیر خشک در PBST (Phosphate Buffered Saline with Tween) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس سه مرتبه با PBST شستشو داده شد. کاغذ با آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد کلرا توکسین (Sigma، آمریکا) با رقت ۱ به ۲۰۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. فرآیند شستشو با PBST سه بار انجام گرفت. کونژوگه خرگوشی (Dako، دانمارک) با رقت ۱ به ۵۰۰۰ به عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شد. همانند مرحله قبل گرماگذاری انجام شد. فرآیند شستشو نیز همانند مراحل قبلی انجام شد. در نهایت، کاغذ نیترو سلولز در محلول سوبسترای DAB (Diaminobenzidine) ۶ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر (۸) تا ظهور باند پروتئینی قرار گرفت. برای توقف واکنش، کاغذ در آب مقطر قرار داده شد.

ایمنی‌زایی موش با آنتی‌ژن کایمر نو ترکیب

در این آزمایش از موش‌های سوری که هیچ دارو یا واکنشی دریافت نکرده بودند، استفاده شد. موش‌ها دارای وزن ۲۵ گرم بود و در مدت آزمایش تحت شرایط یکسان از جمله میزان غذا و آب مصرفی، شرایط نگهداری، دمای محیط و ... قرار داشت. به منظور بررسی پاسخ ایمنی، با توجه به رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات از ۶ عدد موش سوری ماده به عنوان آزمون و ۶ عدد به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای هر موش، ۲۰ میکروگرم پروتئین تخلیص شده با PBS (Phosphate Buffered Saline) استریل به حجم ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها برای تزریق، هم حجم آن ادجوانت کامل فروند (Complete freund's adjuvant) در تزریق اول و ادجوانت ناقص فروند (Incomplete freund's adjuvant) در تزریق‌های بعدی اضافه و محتویات همگن و در چهار دوره به موش‌ها تزریق شد. یک هفته بعد از تجویزهای دوم، سوم و چهارم از

موش‌های آزمون و شاهد خون‌گیری و سرم‌های جداسازی شده برای بررسی تیتراژ آنتی‌بادی استفاده شد. کایمر پروتئینی تخلیص شده با غلظت ۵ میکروگرم در هر چاهک به مدت ۲ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تثبیت شد. چاهک‌ها با بافر شستشو (PBS حاوی ۵ درصد توئین B) سه مرتبه شستشو داده شد. در این مرحله داخل تمام چاهک‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بافر پوشاننده (۵ درصد شیر خشک بدون چربی) در بافر شستشو ریخته و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از شستشو، سرم موشی تهیه شده با رقت‌های ۱:۲۰۰ تا ۱:۲۵۶۰۰ به چاهک‌ها اضافه شد و میکروپلیت به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله بعد، رقت ۱:۲۰۰ تا ۱:۲۵۶۰۰ از آنتی‌بادی گائزوگه موشی در PBST تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و میکروپلیت به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. در ادامه، سوبسترای OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride) و H_2O_2 به چاهک‌ها افزوده و بعد از ۱۵ دقیقه مهار واکنش با اسید سولفوریک صورت گرفت. پس از توقف کامل واکنش، جذب نوری چاهک‌ها توسط قرائت‌گر ELISA (ELISA reader) در طول موج ۴۹۵ نانومتر خوانده شد.

تحلیل آماری

برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگوروف - اسمیرنوف (Kolmogorov smirnov test) و برای مقایسه تعداد دفعات تجویز فرمولاسیون در مراحل مختلف اندازه‌گیری از تحلیل واریانس مکرر استفاده شد. در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار، آزمون t زوجی بون فرونی (Paired t-test with Bon Ferroni Corrections) برای تعیین منشأ تفاوت مورد نظر قرار گرفت. آزمون دانکن (Duncan test) برای مقایسه بین گروه‌های مختلف تجویز استفاده شد. سطح معنی‌داری برای تمامی محاسبات $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

پروتئین کایمر TcpA-CtxB علیه ویبریوکرا

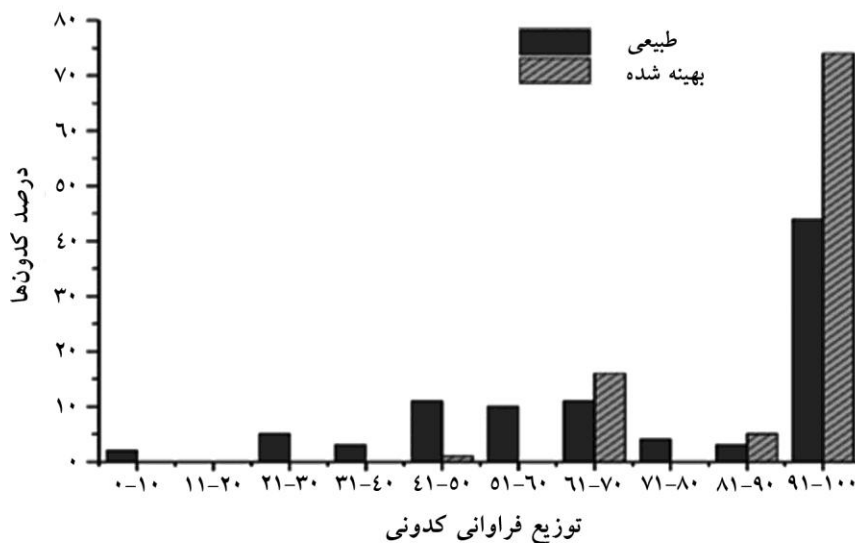
درصد به ۷۴ درصد تغییر پیدا کرد (شکل ۱). انتخاب و تغییر کدون مناسب به نحوی بود که محتوای سیتوزین و گوانین از ۴۱ درصد به ۴۴/۶ درصد افزایش یافت و شاخص انطباق پذیری کدونی از ۰/۶۶ به ۰/۹۰ تغییر کرد (شکل ۲). نتایج حاصل از تحلیل توالی کایمر با نرم افزار Blast-x تأیید نمود که اعمال تغییرات روی ژن و بهینه سازی توالی آن بدون هیچ گونه تغییری روی ردیف اسیدهای آمینه در پروتئین هدف بوده است. با استفاده از نرم افزار بیوانفورماتیکی Vaxijen آنتی ژن بودن پروتئین کایمر ۰/۴۸۵ تعیین شد. پیش بینی ساختار mRNA انجام شد. ساختار پیش بینی شده ناحیه شروع mRNA^{۵'} پس از بهینه سازی کدون های ژن کایمر در شکل ۳ قابل مشاهده است و میزان حداقل انرژی برای ساختار قبل از بهینه سازی ۲۶۹/۳۰- کیلوکالری و بعد از بهینه سازی به ۳۶۷/۸۰- رسید.

نتایج

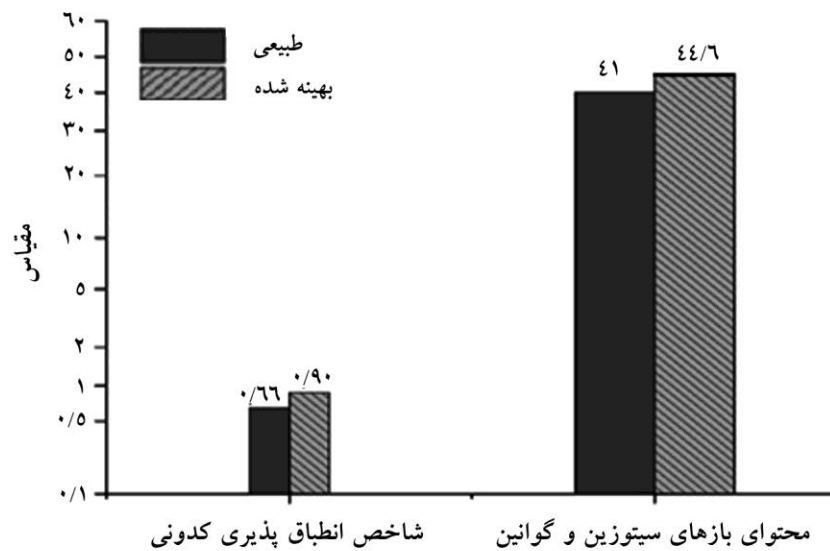
مطالعات بیوانفورماتیکی طراحی کایمر

نو ترکیب *ctxB-tcpA*

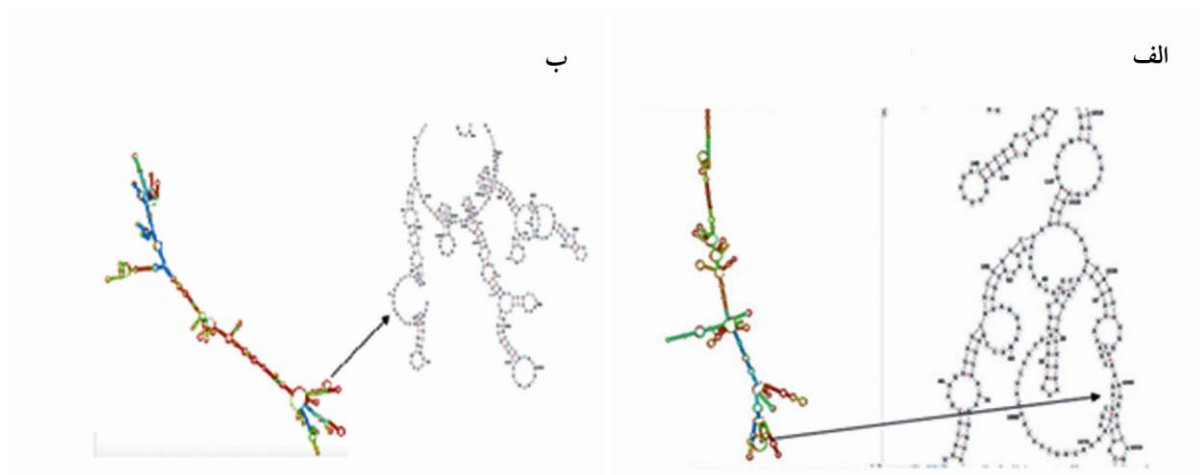
بهینه سازی در چهار بخش قابل بررسی بود که دربردارنده انعطاف پذیری ساختار پروتئین، تنظیم ترجیحی کدون ها، حلالیت و افزایش درصد فراوانی بازهای سیتوزین و گوانین است. افزایش شاخص انطباق پذیری کدونی (CAI Codon adaptation index) به ۰/۹ نشان دهنده میزان انعطاف پذیری و افزایش کدون های مورد استفاده برای بیان ژن در باکتری اشریشیا کلی بود. مزیت نسبی در بهینه سازی سازه ژنی الگوی کدونی مناسب برای افزایش کارایی الگوی انتخابی در متابولیسم باکتری اشریشیا کلی است. تعداد کدون هایی که از کیفیت مناسبی برای افزایش بیان پروتئین برخوردار بود از ۴۴



شکل ۱ درصد توزیع فراوانی کدون ها مربوط به کایمر *tcpA-CtxB* به کدون هایی که بالاترین فراوانی را دارند ارزش ۱۰۰ داده شده است.



شکل ۲ متوسط درصد بازهای GC و شاخص انطباق پذیری کدون (CAI) مربوط به کایمر *tcpA-ctxB* قبل و بعد از بهینه‌سازی



شکل ۳ ساختار دوم RNA؛ (الف) قبل از بهینه‌سازی بیوانفورماتیکی (حداقل انرژی آزاد -۲۶۹/۳۰) فلش نواحی ابتدایی mRNA^۵ است. (ب) بعد از بهینه‌سازی بیوانفورماتیکی (حداقل انرژی آزاد -۳۳۷/۸۰) فلش نواحی ابتدایی mRNA^۵ است.

بررسی الحاق و درستی همسانه‌سازی در

باکتری اشیریشیا کلی BL21(DE3)

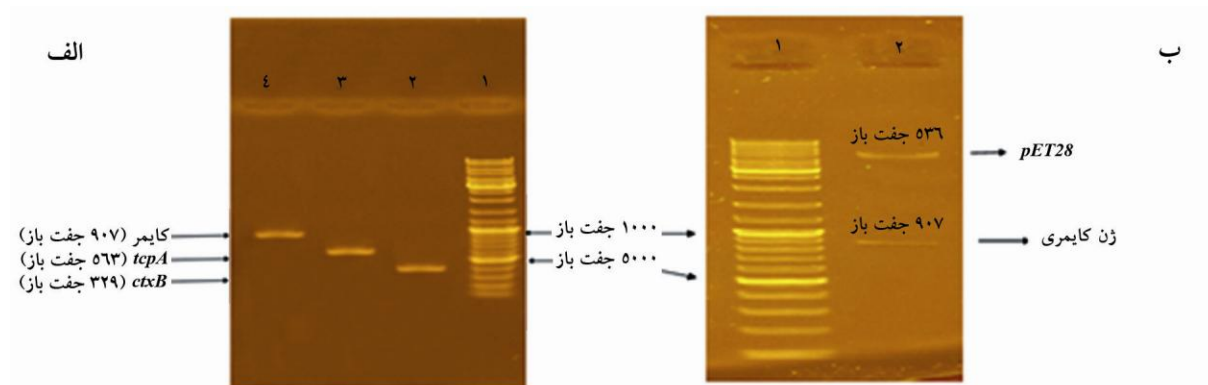
به‌منظور ساخت سازه ژنی ابتدا قطعه *ctxB* در ناقل همسانه‌سازی شد و در ادامه محصول PCR مربوط به ژن *tcpA* که واجد توالی فاصله انداز EAAAK بود، در فرودست

ژن *ctxB* وارد ناقل شد. برای تأیید همسانه‌سازی ژن‌ها و ساخت سازه ژنی از جفت آغازگرهای اختصاصی هر ژن استفاده شد. در شکل ۴ (الف) واکنش PCR مربوط به پلاسمید نوترکیب با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *ctxB* منجر به تکثیر قطعه ۳۲۹ جفت بازی، پلاسمید نوترکیب با

پروتئین کایمر TcpA-CtxB علیه ویبریوکلا

استفاده از آنزیم‌های محدود الاثر *HindIII* و *XhoI* قطعه ۹۰۷ جفت بازی از بدنه ناقل جدا شد که حضور کایمر ژنی *ctxB-tcpA* در ناقل pET28a(+) را تأیید کرد (شکل ۴ ب).

آغازگرهای اختصاصی *tcpA* با قطعه ۵۶۳ جفت بازی و کایمر نوترکیب با آغازگرهای مشترک دو ژن *tcpA* و *ctxB* با اندازه ۹۰۷ جفت بازی دیده می‌شود. در روش هضم آنزیمی با



شکل ۴ تأیید ساخت کاست ژنی با روش PCR داخلی (الف) و روش هضم آنزیمی (ب)؛ (الف) ردیف ۱: نشانگر اندازه DNA ladder mix، ردیف ۲: الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نوترکیب با جفت آغازگرهای اختصاصی *tcpA*، ردیف ۳: الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نوترکیب با جفت آغازگرهای اختصاصی *ctxB*، ردیف ۴: PCR پلاسمید pET28a با جفت آغازگرهای اختصاصی ترکیبی *tcpA* و *ctxB* (ب) ردیف ۱: نشانگر اندازه DNA ladder mix، ردیف ۲: پلاسمید نوترکیب- *tcpA*(*ctxB*-pET28a) برش خورده با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII*

بررسی بیان پروتئین کایمر نوترکیب

بیان کایمر ژنی *ctxB-tcpA* در ناقل pET28a(+) با IPTG یک میلی‌مولار القا شد. با توجه به نتایج آزمایش مشخص شد که کایمر پروتئینی CtxB-TcpA با اندازه ۳۵ کیلو دالتون به صورت نامحلول در باکتری بیان می‌شود (شکل ۵).

بررسی خلوص نوترکیبو تأیید آن به روش

وسترن بلات

در تخلیص پروتئین از روش دناتوره استفاده شد. پروتئین نوترکیب CtxB-TcpA با بافر اوره دار حاوی ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار از رزین کروماتوگرافی جدا شد (شکل ۶). میزان پروتئین تخلیص شده ۳۳/۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. به منظور تأیید محصول پروتئینی از روش وسترن بلات و آنتی‌بادی علیه کلراتوکسین استفاده شد. نتایج واکنش پروتئین ۳۵ کیلودالتونی با آنتی‌بادی ضد کلرا توکسین را تأیید کرد (شکل ۷).



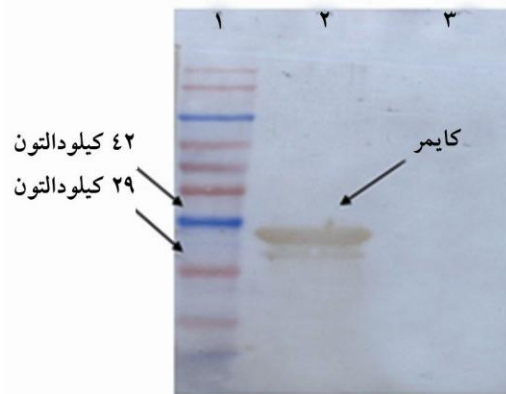
شکل ۵ الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد با رنگ‌آمیزی کوماسی بلو (Coomassie blue) حاصل از بیان پروتئین کایمر نوترکیب *TcpA-CtxB* (Coomassie blue) حاصل از بیان پروتئین کایمر نوترکیب *TcpA-CtxB* در ناقل pET28a(+) به صورت نامحلول، ستون ۱: نمونه پروتئین کایمر با القای IPTG یک میلی‌مولار در بافر واجد PBS، ستون ۲: نمونه پروتئین کایمر با القای IPTG یک میلی‌مولار در رسوب بافر لیز واجد اوره ۸ میلی‌مولار، ستون ۳: نمونه پروتئین کایمر با القای IPTG یک میلی‌مولار در محلول لیز واجد اوره ۸ میلی‌مولار (کایمر پروتئین ۳۵ کیلو دالتون)، ستون ۴: نشانگر پروتئینی

تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین کایمر نو ترکیب در موش

شکل ۸ و ۹ واکنش ELISA مربوط به پروتئین کایمر نو ترکیب تخلیص شده و سرم موش را نشان می‌دهد. یک هفته بعد از تجویزهای دوم، سوم و چهارم از موش‌های آزمون و شاهد خون‌گیری به عمل آمد و بعد از جداسازی سرم آن‌ها، آزمایش ELISA انجام گرفت (با توالی رقت ۱/۲۰۰ تا ۱/۲۵۶۰). تجزیه واریانس آثار فرمولاسیون تجویز آنتی‌ژن و تعداد دفعات تجویز با اندازه‌گیری مکرر انجام شد. بر این اساس طرح آماری برای فاکتورهای مورد ارزیابی در این تحقیق، از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$). در شکل ۸ افزایش تیتراژ آنتی‌بادی در گروه آزمون که آنتی‌ژن را به صورت درون صفاقی دریافت کرده بودند دیده می‌شود. نتایج به دست آمده از تیتراژ آنتی‌بادی نشان داد که در حیوان‌های ایمن شده تیتراژ آنتی‌بادی به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل ($P < 0/05$) بود. در هر مرحله از تزریق شاهد افزایش تیتراژ آنتی‌بادی بودیم به نحوی که بیشترین میزان جذب نوری مربوط به رقت ۱/۲۰۰ در تزریق چهارم و به میزان ۳ بود. شکل ۹ نیز بیان‌گر این است که تجویز زیرپوستی آنتی‌ژن نیز همانند گروه قبلی، منجر به افزایش تیتراژ آنتی‌بادی در هر مرحله شده است. نتایج به دست آمده تیتراژ آنتی‌بادی نشان می‌دهد که در موش‌های ایمن شده با آنتی‌ژن و به صورت زیرپوستی، تیتراژ آنتی‌بادی به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل ($P < 0/05$) بود. بیشترین میزان جذب نوری مربوط به رقت ۱/۲۰۰ در تزریق چهارم و به میزان ۳/۳ بود. تیتراژ آنتی‌بادی مربوط به تجویز آنتی‌ژن به صورت زیرپوستی (شکل ۹) نسبت به تیتراژ آنتی‌بادی آنتی‌ژن تجویز شده به درون صفاق (شکل ۸) بالاتر بود که این میزان از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

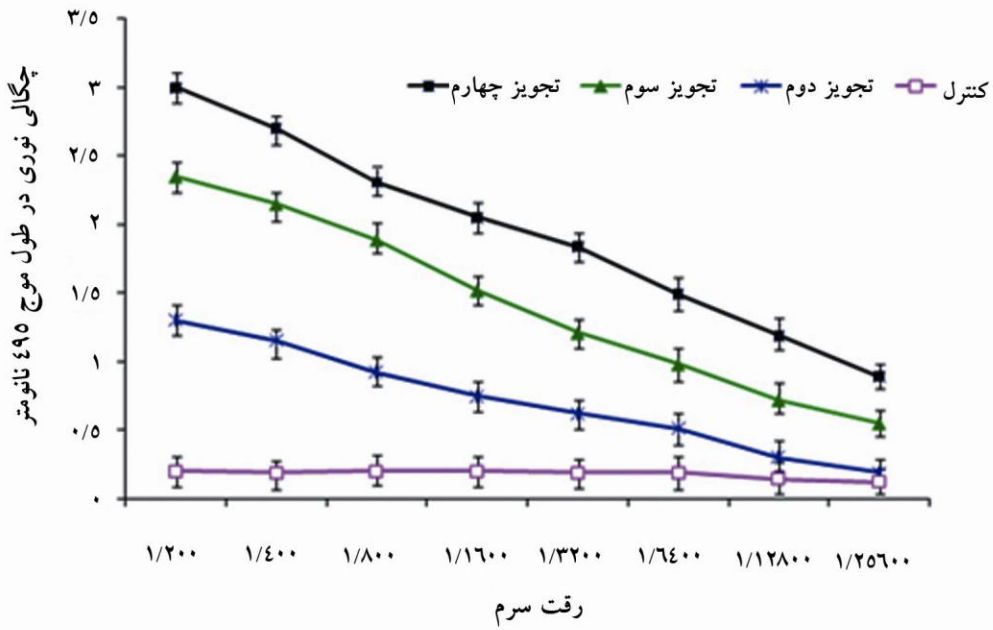


شکل ۶ الکتروفورز SDS PAGE ۱۲ درصد با رنگ آمیزی کوماسی بلو برای بررسی خلوص پروتئین نو ترکیب CtxB-TcpA: ستون ۱: عصاره پروتئینی سلول‌های القا شده قبل از بارگذاری روی ستون کروماتوگرافی Ni-NTA. ستون ۲: محلول پروتئینی خارج شده از ستون کروماتوگرافی، ستون ۳: نشانگر پروتئینی، ۴: خروجی ستون پس از شستشو با بافر C با $pH=6.3$ ، ستون ۵: خروجی ستون پس از شستشو با بافر D با $pH=5/9$ ، ستون ۶: پروتئین نو ترکیب تخلیص شده از ستون با بافر اوره‌دار واجد ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار

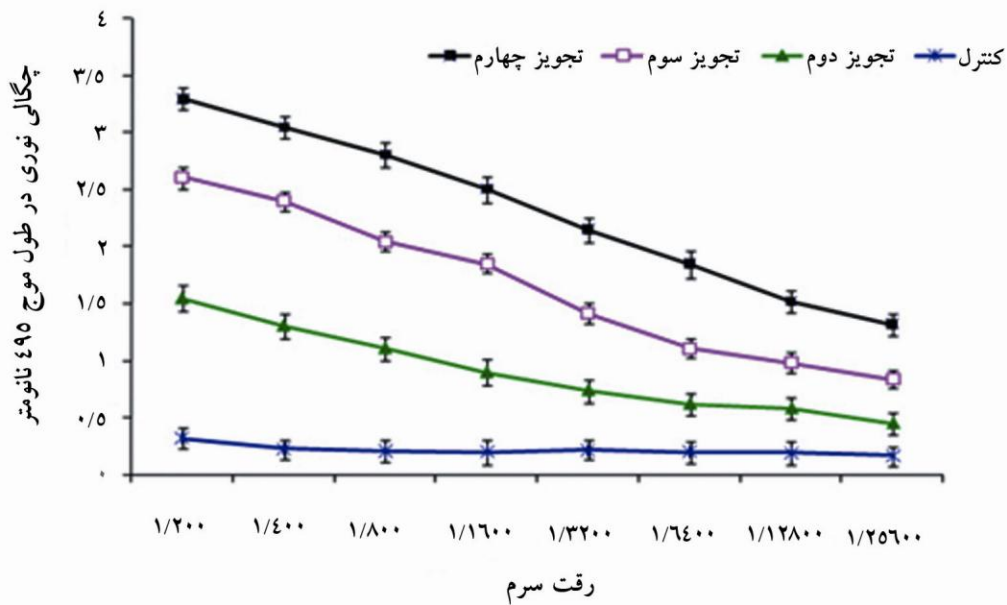


شکل ۷ تأیید پروتئین کایمر نو ترکیب CtxB-TcpA بیان شده با استفاده از روش لکه گذاری وسترن؛ تأیید پروتئین کایمر CtxB-TcpA با استفاده از آنتی‌بادی Anti-CTX، ستون ۱: نشانگر پروتئینی، ستون ۲: نمونه پروتئین CtxB-TcpA القا شده با IPTG، ستون ۳: نمونه BSA

پروتئین کایمر TcpA-CtxB علیه ویبریوکلا



شکل ۸ بررسی تیتراژ آنتی بادی نمونه کایمر به صورت صفاقی با روش ELISA



شکل ۹ بررسی تیتراژ آنتی بادی نمونه کایمر تزریقی به صورت زیر پوستی با روش ELISA

بحث

نتایج بیوانفورماتیکی با توجه به هدف مقاله که طراحی و بیان پروتئین نو ترکیب کایمر در بردارنده پروتئین های CtxB و TcpA از باکتری ویبریو کلرا به عنوان کاندیدای ایمونوژن بود، مطلوب بود. از آنجا که توالی ژن های *tcpA* و *ctxB* دارای کدون نادر هست، تمامی توالی های نوکلئوتیدی تولیدکننده پروتئین کایمر با نرم افزار آنالین برای بیان بالا در میزبان اشریشیا کلی بهینه سازی شد. (CAI Codon adaptation Index) کایمر *ctxB-tcpA* قبل از بهینه سازی ۰/۶۶ و بعد از بهینه سازی به ۰/۹۰ افزایش یافت که این نشانگر انتخاب کدون هایی هست که tRNA بیشتری برای آن وجود داشته که باعث افزایش بیان در میزبان اشریشیا کلی می شود. همچنین به منظور بررسی پایداری ساختار RNA، میزان ΔG و وجود ساختارهایی از قبیل لوپ های کاذب ارزیابی شد. حداقل انرژی آزاد (ΔG) قبل از بهینه سازی ۲۶۹/۳۰- و بعد از بهینه سازی ۳۶۷/۸۰- بود. این تغییر نشان می دهد ساختار کایمر انتخاب شده ما پایدار بوده است. با توجه به نتایج حاصل از نرم افزارهای مختلف و همچنین تحقیقاتی که پیش از این روی این پروتئین ها و ترکیب آن ها برای افزایش پاسخ ایمونولوژیک صورت گرفته، بهترین حالت برای ساخت واکسن ترتیب این سازه نو ترکیب به صورت *ctxB-linker-tcpA* است، چرا که ترتیب ذکر شده طبق نتایج حاصل از نرم افزار ProtParam بیشترین پایداری و نیمه عمر را خواهد داشت. به کمک ابزارهای بیوانفورماتیک سازه ای طراحی شد که پیش بینی می شود پروتئین حاصل از آن به میزان زیادی در میزبان اشریشیا کلی بیان شود و می تواند به عنوان یک واکسن چندگانه علیه بیماری استفاده شود.

در این تحقیق به منظور بیان کایمر ژنی *ctxB-tcpA* از سیستم بیانی pET28a(+) استفاده شد. این سیستم به دلیل ویژگی هایی از قبیل داشتن پروموتور قوی T7 lac، His6 tag در دو طرف MCS (Multiple cloning site) برای تخلیص بهتر پروتئین کایمر و در نهایت داشتن شرایط مطلوب برای

بیان سویه های مختلف باکتری اشریشیا کلی، یکی از سیستم هایی است که غالباً برای بیان آزمایشگاهی پروتئین های نو ترکیب در اشریشیا کلی استفاده می شود.

با توجه به محل قرارگیری پروتئین TcpA در سطح باکتری و موقعیت قرارگیری آن نسبت به آنتی بادی ها، باعث شده تا کاندیدای مناسبی به منظور توسعه ایمنی علیه بیماری و با باشد. از سوی دیگر، پروتئین CtxB دارای خاصیت ادجوانتی است که باعث ایجاد ایمنی سلولی و افزایش تیتراژ آنتی بادی به صورت سیستمیک می شود.

در این بررسی سعی داریم تا با تولید پروتئین کایمر به صورت نو ترکیب زمینه ای را برای بیان مؤثر این پروتئین، هزینه کمتر، خاصیت ایمنی زایی قوی تر و در نهایت طراحی واکسن کارآمدتر فراهم کنیم. لازم به ذکر است تقویت پاسخ ایمنی مخاطی وابسته به ژن *ctxB* را می توان با کلون کردن ژن *tcpA* به همراه ژن *ctxB* به شکل یک واکسن نو ترکیب یا با اضافه کردن مستقیم پروتئین CtxB به همراه آنتی ژن مورد نظر انجام داد.

کوندو نشان داد که استفاده از پروتئین های نو ترکیب هر کدام از دو پروتئین TcpA و CtxB به تنهایی و همزمان با هم می تواند سبب ایجاد ایمنی علیه بیماری شود؛ اما زمانی که به صورت مخلوط باشند خاصیت ایمنی زایی به مراتب بالاتری دارند. به همین دلیل ژن *ctxB* را با ژن *tcpA* ممزوج کرد تا با تولید پروتئین کایمریک حاصل از این ممزوج قدرت ایمنی زایی افزایش یابد.

در طراحی کاندیدهای واکسن امروزه توجه خاصی به پروتئین های کایمر می شود. پروتئین های کایمر در بردارنده زیر واحدهای پروتئینی، فاصله اندازها و توالی هایی با خاصیت ادجوانتی، می تواند سبب افزایش خاصیت ایمنی زایی پروتئین های نو ترکیب شود. این دو قطعه پروتئینی می بایست توسط یک فاصله انداز مناسب به هم متصل شوند. برای جداسازی بهتر دو پروتئین و در معرض قرار گرفتن بهتر پروتئین کایمر در سیستم ایمنی میزبان و ایجاد تیتراژ آنتی بادی بهتر از فاصله اندازی سخت شامل اسید آمینه های EAAAK

پروتئین کایمر TcpA-CtxB علیه ویبریولکرا

فعال و باعث افزایش تیتراژ آنتی‌بادی افزایش میل پیوندی بین سلول T و B می‌شود. بنابراین هنگامی که پروتئین CtxB به صورت کونزوگه با پروتئین TcpA همراه شود ایمنی‌زایی افزایش می‌یابد. شارما (Sharma) و همکارانش روی بیان تلفیقی زیرواحد های ACFA (Accessory colonization factor subunit A) و ویبریولکرا با زیرواحد توکسین زیر واحد B در گیاه گوجه فرنگی تراریخته شده کار کردند که نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها با قسمتی از نتایج بررسی حاضر درباره بیان پروتئین CtxB هم راستا بود [27]. در سال 2008 آقای کوندو و همکارانش به ایمنی‌سازی استنشاقی از طریق زیر واحد B کلراتوکسین و زیر واحد A پیلی متحرک ویبریولکرا در خرگوش پرداختند که با پژوهش حاضر هم راستا بود [19].

نتایج ELISA نشان داد که تزریق پروتئین کایمر به روش زیر پوستی منجر به بالا رفتن تیتراژ آنتی‌بادی در مقایسه با روش درون صفاقی می‌شود که این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. با در نظر گرفتن این که تیتراژ آنتی‌بادی پس از تزریق سوم و چهارم از لحاظ آماری بی‌معنی بود می‌توان نتیجه گرفت که سه بار تزریق ایمنی‌زای کایمر نیز می‌تواند سیستم ایمنی را تحریک نماید و نیازی به تجویز چهار مرحله‌ای نیست.

نتایج این پژوهش، نقش آنتی‌ژن کایمر نو ترکیب متشکل از عوامل بیماری‌زای TcpA و CtxB را اثبات نمود و آنتی‌بادی در موش سوری تولید کرد. بنابراین نتیجه این تحقیق بیانگر آن است که پروتئین کایمر دو ظرفیتی می‌تواند کاندیدای مناسبی برای تولید واکنش علیه بیماری وبا باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از گروه زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) جهت فراهم آوردن امکانات و شرایط مورد نیاز، تشکر می‌گردد.

(اسید آمینه گلوتامیک، آلانین و لیزین) که به علت داشتن پل نمکی، با ایجاد ساختار هلیکس پایدار، مانع از به هم نزدیک شدن دومین‌های پروتئینی اسید گلوتامیک و لیزین انتهایی می‌شود، استفاده شد.

ماهیت آنتی‌ژن‌ها در روند ایمنی‌زایی تأثیر برجسته‌ای دارد. آنتی‌ژن‌ها بر اساس ماهیت ساختاری و میزان تحریک‌پذیری سیستم ایمنی میزبان به دو گروه پروتئینی و پلی‌ساکاریدی تقسیم می‌شود. آنتی‌ژن‌های پروتئینی که همان آنتی‌ژن‌های وابسته به سلول T است نقش بسیار اساسی در تولید اکثر سلول‌های خاطره دارد در حالی که آنتی‌ژن‌های پلی‌ساکاریدی باکتریایی برخلاف پروتئین‌ها، تنها سلول‌های پلاسماهای کوتاه عمر را تولید می‌نماید و سبب تولید یک نوع به خصوص سلول‌های خاطره خواهد شد [26].

طبق مطالعات به عمل آمده تیتراژ آنتی‌بادی تولید شده علیه هر آنتی‌ژن با ماندگاری خاطره اختصاصی رابطه مستقیم برقرار می‌کند، بنابراین تیتراژ آنتی‌بادی مربوط به تجویز آنتی‌ژن به صورت زیر پوستی نسبت به درون صفاقی سیستم ایمنی میزبان را بیشتر تحریک می‌کند و پاسخ ایمنی بهتری به ما می‌دهد که همان‌طور در نمودارهای مربوط به تیتراژ آنتی‌بادی مرتبط با تجویزها مشاهده می‌شود، در هر مرحله تیتراژ آنتی‌بادی به صورت تصاعدی افزایش یافته است و این بیانگر تحریک مناسب سیستم ایمنی توسط آنتی‌ژن هست. در این پژوهش از آنتی‌ژن‌های پروتئینی استفاده شده که در آن ژن CtxB با توجه به دارا بودن خاصیت ادجوانتی موجب تحریک پاسخ ایمنی به واسطه برهمکنش آنتی‌ژن با سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (Antigen-Presenting cell: APC) موجود در زیر پوست می‌شود. سلول‌های دندریتیک که جزئی از سلول‌های APC هستند، آنتی‌ژن رو به گره لنفاوی منتقل، سپس به سلول‌های T عرضه و سلول‌های T فعال می‌شود. با فعال شدن سلول T، سلول B

منابع

[1] Morris JG Jr, Szein MB, Rice EW, Nataro JP,

Losonsky GA, Panigrahi P, Tackett CO, Johnson

- JA. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. *J Infect Dis* 1996; 174(6): 1364-8.
- [2] Daten Beyeng RT, Purniti PS, Naning R. Validity of bacterial pneumonia score for predicting bacteremia in children with pneumonia. *Paediatrica Indonesiana* 2011; 51(6): 322-6.
- [3] Dick MH, Guillerm M, Moussy F, Chaignat CL. Review of two decades of cholera diagnostics--how far have we really come? *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(10): e1845.
- [4] Friedlander SL, Busse WW. The role of rhinovirus in asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(2): 267-73.
- [5] Heyman D. Control of communicable diseases manual. Washington, DC: American Public Health Association, 2004; p: 113-22.
- [6] Lima AAM. Cholera: molecular epidemiology, pathogenesis, immunology, treatment, and prevention. *Current Opinion in Infectious Diseases* 1994; 7(5): 592-601.
- [7] Mousavi SL, Iraj Rasooli, Shahram Nazarian, Jafar Amani. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, toxigenic *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhimurium* by multiplex PCR. *Iranian Journal of Clinical Infectious Disease* 2009; 4(2): 97-103.
- [8] Bharati K, Ganguly NK. Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. *Indian J Med Res* 2011; 133: 179-87.
- [9] Carpenter CCJ. Cholera and other enterotoxin-related diarrheal diseases. *The Journal of Infectious Diseases* 1972; 126(5): 551-64.
- [10] Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(9): 2833-7.
- [11] Odumosu O, Nicholas D, Yano H, Langridge W. AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable. *Toxins (Basel)* 2010; 2(7): 1612-45.
- [12] Viel T, Dransart E, Nemati F, Henry E, Thézé B, Decaudin D, Lewandowski D, Boisgard R, Johannes L, Tavitian B. In vivo tumor targeting by the B-subunit of shiga toxin. *Mol Imaging* 2008; 7(6): 239-47.
- [13] Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, Bone R, Wenzel RP, Balk R, Allred R, Pennington JE, Wherry JC, Bellamy P, Cryer H, Busuttill R, Winston D, Perry C, Leeper Jr KV, Jones C, Martin M, Tuma P, Baird I, Brooks J, Baird R, Rangel S, Wagner N, Costigan M, Gutierrez G, Johnson P, Clark C, Grover C, Gay PC, Stekelberg J, Steinburg PV, Ortiz J, Sigel P, Murphy A, Lahey W, Plouffe J, Fass RJ, Russell J, Crowell RE, Simpson SQ, Neidhart M, Dunn M, Saravolatz L, Griffin N, Samo TC, Feinstein V, Doyle K, Tuttle C, Brown R, Steingrub J, Safford MJ, Bacon III A, Holloway W, Amato S, Schneider F, Toews GB, Fekety Jr R, Kugler J, Hampton J, Kahn FA, Karnik A, Niederman M, Cunha B, Clare N, Leatherman J, Peterson PK, Doak C, Zimmerman L, Gottlieb JE, Stokes L, Sessler C, Deere K, Gloskey D, Longworth D, Liucchi L, Strange C, Oser R, Gilbert D, Leggett JE, Waite K, Christou NV, Magder S, Bonneau M, Tan JS, File T, Salstrom SJ, Eaton

- S, Garber G, Jones G, Seguin I, Chow AW, Tweeddale M, Schwartz L, Pankey G, Vollenweider J, Neu H, Garvey G, Dorney P, Jacobs RA, Bernstein M, Octavio J, Schillinger B, Iberti T, Russell J, Sheagren J, Craven D, Poole L, Myers W; Ash M, Czarny N, Arcieri G, Koch G, Prove J, Remick D, Fournel M. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *JAMA* 1995; 273(12): 934-41.
- [14] Arêas AP, Oliveira ML, Miyaji EN, Leite LC, Aires KA, Dias WO, Ho PL. Expression and characterization of cholera toxin B-pneumococcal surface adhesin A fusion protein in *Escherichia coli*: ability of CTB-PsaA to induce humoral immune response in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321(1): 192-6.
- [15] Shen MY, Sali A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci* 2006; 15(11): 2507-24.
- [16] Vartak A, Sucheck SJ. Recent Advances in Subunit Vaccine Carriers. *Vaccines (Basel)* 2016; 4(2): E12.
- [17] Nazarian S, Mousavi Gargari SL, Rasooli I, Amani J, Bagheri S, Alerasool M. An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. *J Microbiol Methods* 2012; 90(1): 36-45.
- [18] Arakawa T, Chong DK, Langridge WH. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol* 1998; 16(3): 292-7.
- [19] Kundu J, Mazumder R, Srivastava R, Srivastava BS. Intranasal immunization with recombinant toxin-coregulated pilus and cholera toxin B subunit protects rabbits against *Vibrio cholerae* O1 challenge. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 56(2): 179-84.
- [20] Leinonen R, Diez FG, Binns D, Fleischmann W, Lopez R, Apweiler R. UniProt archive. *Bioinformatics* 2004; 20(17): 3236-7.
- [21] Puigbò P, Guzmán E, Romeu A, Garcia-Vallvé S. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(Web Server issue): W126-31.
- [22] Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 4.
- [23] Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; 5(10): R80.
- [24] Zeng X, Ye H, Yang Y, Wang G, Huang H. Molecular cloning and functional analysis of the fatty acid-binding protein (Sp-FABP) gene in the mud crab (*Scylla paramamosain*). *Genet Mol Biol* 2013; 36(1): 140-7.
- [25] Mathews DH, Moss WN, Turner DH. Folding and finding RNA secondary structure. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(12): 47

- a003665.
- [26] McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol* 2011; 12(1): 24-34.
- [27] Sharma MK, Jani D, Thungapathra M, Gautam JK, Meena LS, Singh Y, Ghosh A, Tyagi AK, Sharma AK. Expression of accessory colonization factor subunit A (ACFA) of *Vibrio cholerae* and ACFA fused to cholera toxin B subunit in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). *J Biotechnol* 2008; 135(1): 22-7.