

ABSTRACT

Cloning and expression of stxB Gene from *Shigella dysenteriae* Gype I in E.coli Rosseta DE3

Hamid Madanchi, Hossein Honari *, Mahdi Hesaraki, Ali Sayadnanesh

Shigellosis is a global human health problem. Currently, no vaccine exists against *Shigella* infection. Shiga Toxin (ST) is a main virulence factor in *Shigella dysenteriae* type I that is encoded by the stx gene.

This toxin is a hexameric protein with a molecular mass of 70.5 kDa, which is composed of a StxA monomer and a receptor-binding StxB homopentamer subunit. The Shiga toxin A subunit (STxA) mediates toxicity and the B subunit (STxB) is a non-toxic protein responsible for toxin binding and internalization into target cells. STxB is a candidate vaccine antigen for Shigellosis. In this work, the primer was designed using the stxB gene sequence obtained from the NCBI gene bank.

The stxB gene was amplified by PCR and then cloned in pGEM- T Easy Vector and subcloned in pET-28a (+) as an expression vector. The stxB gene was expressed in *Escherichia coli* Rosetta DE3, and purified by a Ni-NTA resin column; then, its molecular weight and immunogenicity were determined using SDS-PAGE and Western-blot. The goal of this work was to produce STxB protein. The purified protein was used in our next studies such as immunization and production of polyclonal antibody against Shiga toxin.

Key words: *Shigella dysenteriae* I; Shiga Toxin 2 B Subunit; *Escherichia coli* Rosetta DE3.

*** Hossein Honari, PhD**

Department of Biology Sciences, Faculty of science,
Imam Hossein University, Tehran, Iran.

Email: honari.hossein@gmail.com

Submission Date: 1. Mar. 2012 • Acceptance Date: 15. May. 2012

کلونینگ و بیان ژن (stx B) شیگلا دیسانتری تیپ یک در

باکتری Roetta DE3 E. coli

حمید معدنچی^۱، حسین هنری^{۱*}، مهدی حصارکی^۲، علی صیادمناش^۱

۱. گروه و مرکز تحقیقات علوم زیستی - دانشگاه جامع امام حسین(ع) - تهران، ایران. ۲. پژوهشگاه سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان - تهران، ایران.

چکیده/ شیگلوزیس یک مسئله جهانی مهم برای سلامتی بشر محسوب می‌شود. تا به امروز واکسن موثری علیه شیگلا یافت نشده است. یکی از مهمترین فاکتورهای بیماری‌زای اصلی در شیگلا دیسانتری تیپ ۱، انتروتوکسین شیگلا یا ST می‌باشد که توسط ژن stx کد می‌شود. شیگا توکسین یک پروتئین شش زیر واحدی با وزن مولکولی ۷۰/۵ کیلو دالتون بوده که از یک زیر واحد به نام STxA و یک زیر واحد پنتامریک غیر سمی متصل شونده به رسپتور به نام زیر واحد B یا STxB تشکیل شده است. زیر واحد اخیر باعث اتصال و ورود سم به درون سلول و اثرات آن می‌شود. STxB یک آنتی ژن کاندید واکسن برای شیگلوزیس محسوب می‌شود. در این مطالعه با استفاده از توالی ژن stxB بدست آمده از بانک ژنی NCBI طراحی پرایمر صورت گرفت. ژن مورد نظر با استفاده از روش PCR از باکتری شیگلا دیسانتری تیپ ۱ تکثیر یافت و در پلاسمید pGEM-T Easy Vector کلون و سپس در وکتور بیانی pET-28a(+) ساب کلون شد. ژن STxB در باکتری E. coli سویه Rosetta DE3 بیان گردید. پروتئین تولیدی توسط ستون نیکل تخلیص و از لحاظ وزن مولکولی و ایمونوبلوتینگ توسط ژل SDS-PAGE و وسترن بلات مورد تایید قرار گرفت. هدف از انجام این مطالعه تولید پروتئین STxB به منظور استفاده آن در بررسی ایمنی‌زایی و تولید آنتی‌بادی پلی کلونال علیه سم شیگلا (شیگا توکسین) بود.

واژگان کلیدی: شیگلا دیسانتری تیپ ۱؛ زیر واحد B سم شیگا (STxB)؛ E. coli سویه Rosetta DE3.

مقدمه

شناسایی شدند اما مهمترین آن‌ها از نظر بیماری‌زایی و بروز اپیدمی‌ها چهار سروتیپ بود که بر اساس پلی ساکارید اختصاصی O شان (osp) در LPS طبقه بندی می‌شوند و به نام‌های شیگلا دیسانتری (S.dysenteria)، شیگلا فلکسنری (S.flexneri)، شیگلا سونئی (S.sonnei)، شیگلا بویدی (S.boydii) نامگذاری شدند. اسهال خونی با عامل شیگلا در بیشتر موارد جدی بوده و در صورت عدم درمان به موقع به مرگ می‌انجامد (۲۰۱). از این لحاظ واکسیناسیون علیه شیگلا دارای اهمیت فراوانی است، علاوه بر این هنوز واکسن مناسبی علیه شیگلوزیس وجود ندارد. سالیان زیادی است که شیگا توکسین یا STx (به افتخار آقای کیوشی شیگا نامگذاری شد) به عنوان یکی از عوامل ویرولانسی شیگلا دیسانتری تیپ یک در ایجاد اسهال خونی و دیسانتری

باکتری شیگلا اولین بار توسط آقای کیوشی شیگا در سال ۱۸۹۸ در ژاپن از افراد مبتلا به دیسانتری جداسازی و به افتخار ایشان شیگلا نامیده شد. شیگلاهای زیادی در طی سال‌های بعد

* حسین هنری، PhD

استادیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم،

دانشگاه امام حسین، تهران، ایران

پست الکترونیک: honari.hosein@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۱ • تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۲۶

فلوروسنت استفاده می‌گردد (۶ و ۵). در این مطالعه هدف تولید پروتئین STxB در باکتری E. coli بود. این پروتئین در باکتری E. coli BL21 بیان کمی از خود نشان داده بود (نتیجه بدست آمده توسط همین گروه) به این منظور در این تحقیق بیان ژن STxB در باکتری E. coli Rosetta DE3 مورد بررسی قرار گرفت. هدف از انجام این پروژه تولید پروتئین STxB به منظور مطالعات بعدی ما در زمینه ایمنی زایی و تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه شیگلا توکسین بود.

مواد و روش‌ها

الف. آنزیم‌ها، وکتورها و سویه‌های باکتریایی

آنزیم‌های Pfu و Taq پلی مراز (2.5U/μl, Fermentas, Lithuania)، آنزیم‌های Hind III و Sal I T4 لیگاز (IPTG, Fermentas, Lithuania)، وکتور pGEM-T (Promega, USA)، وکتور (Vivantis, Malesia)، وکتور pET-28a(+) (Novagen USA)، وکتور pGEM-T حاوی ژن stx به عنوان الگوی PCR (بانک وکتور دانشگاه جامع امام حسین (ع)، (سویه‌های باکتریایی E. coli DH5α و E. coli Rosetta (DE3)) دانشگاه امام حسین (ع)) به ترتیب برای استفاده به عنوان میزبان همسانه‌سازی و بیانی مورد استفاده قرار گرفتند.

ب. مراحل طراحی پرایمر و همسانه‌سازی در وکتور

pGEM-T-easy

ژن STxB (۲۰۷ جفت‌باز) باکتری شیگلا دیسانتری تیپ ۱ که در یک وکتور که دارای ژن stx از قبل کلون شده بود توسط PCR به کمک پرایمرهای زیر تکثیر یافت. پرایمر با برنامه Primer 3 و Genescript طراحی و با نرم‌افزار Oligo مورد بررسی قرار گرفت. در طراحی این پرایمرها از جایگاه‌های برشی Sal I و Hind III استفاده گردید.

Forward primer (stxB):

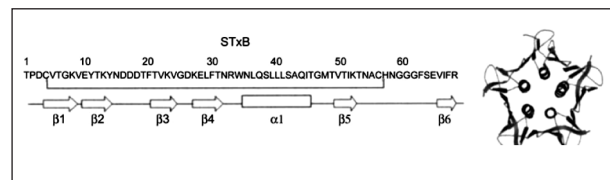
5' GTCGACGGATCCGGCCCGGGCCCGGAATTCGAGCTCAA-GCTTCGTGCGCGTCGTATGACGCCTGATTGTGTAAGTGG-3'

Reverse primer (stxB):

5' AAGCTTATTATCAACGAAA AATAACTTC 3'

چون این مطالعه در ادامه مطالعه قبلی ما در زمینه فیوژن STxB با ایمنوآدجوانت CTxB بود به همین منظور ما از پرایمر

مطرح است. توکسین شیگلا STx یک پروتئین هگزامر با وزن مولکولی ۷۰/۵ کیلودالتون بوده که از یک زیر واحد منومریک سمی و آنزیماتیک به نام STxA و از یک زیر واحد متصل شونده به رسپتور هموپنتامریک به نام STxB تشکیل شده است. قسمت غیرسمی STxB برای ورود و عملکرد قسمت سمی یا STxA ضروری می‌باشد. STxB ساختار هموپنتامریک (۵ زیر واحدی) دارد. هر منومر آن از ۶۹ اسید آمینه (۲۰۷ جفت‌باز) تشکیل شده و وزن ملکولی حدود ۷/۷ کیلودالتون دارد (شکل ۱).



شکل ۱: ساختار سه بعدی و توالی آمینواسیدی STxB: هر منومر STxB از ۶۹ اسید آمینه تشکیل شده و وزن مولکولی حدود ۷/۷ کیلودالتون دارد [۴].

STxB به گیرنده سطح سلولی خود به نام Gb3 متصل می‌گردد که روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود. می‌توان حدس زد که با تولید آنتی بادی علیه STxB و خنثی‌سازی آن می‌توان از اتصال و ورود قسمت سمی (STxA) به درون سلول هدف جلوگیری به عمل آورد. ناحیه STxA دارای وزن مولکولی در حدود ۳۲ کیلودالتون بوده که خود از دو قطعه که با پیوند کووالانس به هم متصل شده‌اند: قطعه اول A1 نام دارد که وزن آن در حدود ۲۸ کیلودالتون بوده و قطعه دوم بنام A2 دارای وزنی در حدود ۴ کیلودالتون می‌باشد.

STxA باعث دپورینه شدن آدنوزین در 28S rRNA در زیر واحد ۶۰S ریبوزوم می‌گردد. این تغییر در ریبوزوم باعث می‌شود که tRNA نتواند به کمپلکس پروتئین‌سازی متصل شود و در نتیجه پروتئین‌سازی در سلول هدف مهار می‌گردد. شیگلا توکسین می‌تواند مشکلات سیتوتوکسیک و نوروٹوکسیک ایجاد نماید (۴ و ۳). از این رو STx یکی از کاندیداهای مهم برای تولید واکسن علیه توکسین شیگلا دیسانتری تیپ ۱ محسوب می‌گردد.

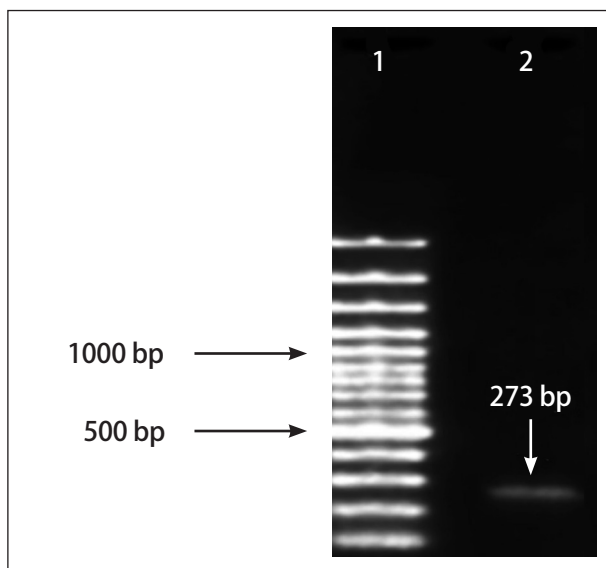
علاوه بر این از این زیر واحد در زمینه‌های مختلفی همچون انتقال دهنده آنتی ژن‌ها و داروهای ضد سرطان به سلول سرطانی و همچنین تصویر برداری از تومور به کمک مواد

ج. آنالیز با وسترن بلات

به منظور تایید اختصاصی پروتئین‌های تخلیص شده stxB، پروتئین‌ها با روش حساس وسترن بلات بررسی شدند. برای انجام وسترن بلاتینگ پس از اینکه پروتئین‌ها روی ژل آکریل امید برده شد، پروتئین‌ها ابتدا به غشاء نیتروسولوزی انتقال داده شدند و با آنتی سرم خرگوشی ضد His-tag (Anti-His tag) و آنتی بادی دوم آنتی - آنتی بادی IgG خرگوشی نشاندار با HRP انکوبه گردید. سپس باند ایجاد شده از لحاظ صحت مکان حضور مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

الف. مراحل تکثیر ژن، همسانه‌سازی و زیرهمسانه‌سازی آن در pET 28a(+).
ژن stxB از طریق واکنش PCR با آنزیم Pfu، DNA الگو تکثیر و استخراج گردید و به منظور تایید روی ژل آگارز برده شد قطعات در راستای جایگاه ۲۷۳ جفت بازی (۲۰۷ جفت باز خود ژن + ۶۶ پرایمر) قرار گرفت (شکل ۲) سپس محصول PCR توسط



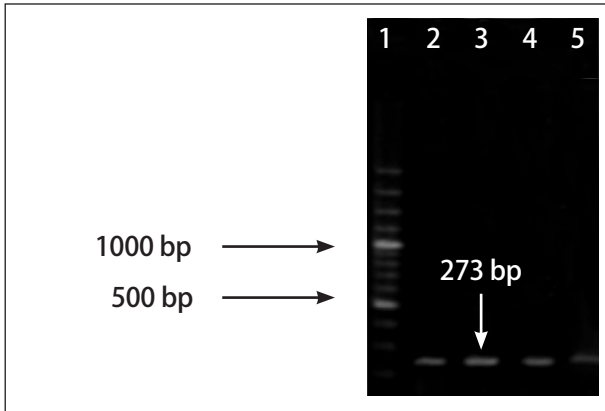
شکل ۲: تکثیر ژن stxB به کمک PCR توسط آنزیم Pfu و تایید آن توسط الکتروفورز روی ژل آگارز.
ستون ۱: نشانگر DNA ۱۰۰ جفت بازی.
ستون ۲: باند ظاهر شده بعد از تخلیص که در مکان مورد انتظار یعنی در راستای ۲۷۳ جفت بازی قرار گرفت.

قبلی stxB استفاده کردیم (V). ژن stxB با پرایمر فوق توسط PCR با آنزیم Pfu تکثیر یافت. محصول PCR به کمک آنزیم Taq پلی مرز با dATP دنباله دار شد و سپس در وکتور pGEM-T-easy همسانه‌سازی شد و وکتور نو ترکیب pGEM-stxB بدست آمد. سازه اخیر در باکتری E. coli DH5α ترانسفورم گردید. حضور پلاسمید نو ترکیب pGEM-STxB در باکتری میزبان به کمک کنترل آنتی بیوتیکی (آمپی سیلین)، PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد تایید قرار گرفت.

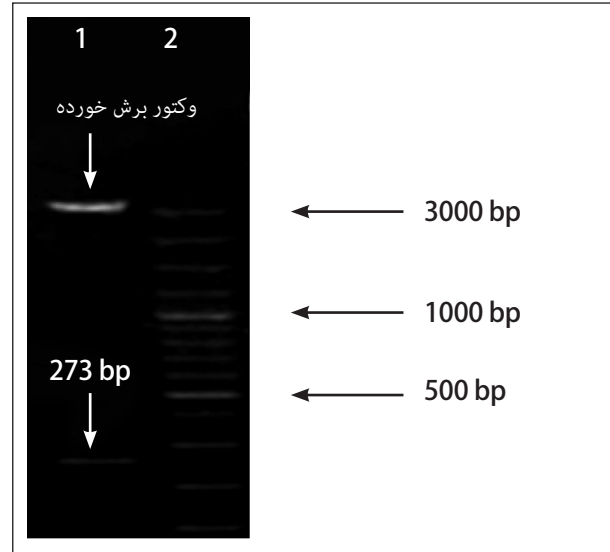
ج. زیرهمسانه‌سازی قطعه stxB در وکتور بیانی pET28a(+)
قطعه stxB با هضم آنزیمی وکتور نو ترکیب pGEM-stxB توسط آنزیم‌های Hind III و Sal I بدست آمد و در وکتور بیانی pET28a(+) که با همین آنزیم‌ها برش خورده بود زیر همسانه‌سازی گردید (A). پلاسمید نو ترکیب pET28a/stxB در میزبان بیانی E. coli Rosetta (DE3) ترانسفورم گردید. کلنی‌های نو ترکیب با غربالگری آنتی بیوتیکی کانامایسین جدا شدند و حضور پلاسمید نو ترکیب با PCR و هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت.

د. بیان و تخلیص پروتئین stxB کلنی انتخابی در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد.
پس از اینکه میزان جذب (OD) به ۰/۶ رسید با محلول ۱ میلی مولار بر لیتر ایزوپروپیل تیو-β-D - گالاتوزید (IPTG) القاء گردید و به مدت ۶ ساعت در ۳۷ درجه با شیک ۱۵۰ دور بر دقیقه انکوبه گردید (A). پس از انکوباسیون باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ جمع شدند. دیواره پلاک سلولی توسط بافر B (NaH₂PO₄:13/8gr, Tris.HCl:1/2gr, urea 480/5gr, add DDW to 1liter, pH in 8) شکسته و مجدداً سونیکیت گردید. میزان بیان و وزن مولکولی پروتئین نو ترکیب stxB به کمک الکتروفورز روی ژل سدیم دودسیل سولفات - پلی اکریل امید (SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های لیز شده با سانتریفیوژ در 14000 rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه جمع شدند. سپس تمام پروتئین‌های نو ترکیب به کمک توالی His-tag در انتهای N خود توسط ستون کروماتوگرافی تمایلی با رزین Ni-NTA تخلیص گردیدند و توسط SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند.

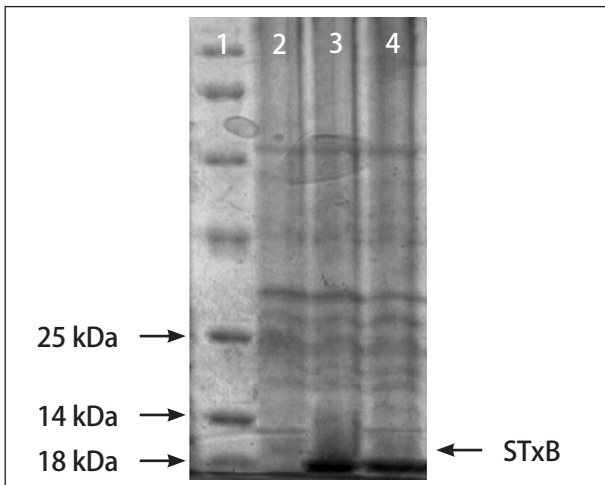
دالتون خود پروتئین است و حدود ۴ کیلو دالتون وکتور به آن اضافه می‌کند) قرارگرفت در حالی که در کنترل‌ها هیچ بانندی



شکل ۴: تائید کلنی‌های حاوی وکتور بیانی نوترکیب pET28a (+)-stxB توسط PCR از کلون‌های منتخب **ستون ۱:** نشان‌گر DNA ۱۰۰ جفت باز. **ستون ۲ و ۳، ۴، ۵:** باند ظاهر شده محصولات PCR از کلون‌های نوترکیب حاوی وکتور بیانی نوترکیب pET28a (+)-stxB که در ناحیه ۲۷۳ جفت باز (۲۷۳ با پرایمر) باند تشکیل داده است.



شکل ۳: برش آنزیمی با آنزیم‌های Sal I و Hind III به منظور تائید همسانه‌سازی از وکتور نوترکیب pGEM-stxB. **ستون ۱:** محصول برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pGEM-stxB با آنزیم‌های نامبرده، باند در راستای جایگاه مد نظر قرارگرفت و وکتور برش خورده در بالا قرار گرفت. **ستون ۲:** نشان‌گر DNA ۱۰۰ جفت باز.



شکل ۵: الکتروفورز پروتئین‌های بیان شده STxB با استفاده از روش تیمار خام بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲ درصد. **ستون ۱:** پروتئین مارکر (cat) بدون افزودن IPTG. **ستون ۳ و ۴:** بیان پروتئین STxB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد. باند های پروتئینی در جایگاه مد نظر قرار گرفتند.

کیت تخلیص DNA از روی ژل آگارز با دمای پایین جداسازی شد و پس از دنباله‌دار شدن در وکتور pGEM-T-Easy همسانه‌سازی گردید و توسط PCR از کلنی‌ها و به کمک ژل الکتروفورز روی آگارز تائید گردید. وکتور نوترکیب pGEM-stxB توسط آنزیم‌های Sal I و Hind III برش خورد (شکل ۳). پس از تخلیص قطعه برش خورده یعنی قطعه ۲۷۳ جفت بازی stxB، در وکتور بیانی pET28a (+) زیر همسانه‌سازی شد و وکتور بیانی نوترکیب pET28a (+)-stxB حاصل شد. وکتور اخیر به باکتری (E. coli Rosetta (DE3) ترانسفورم شد. حضور پلاسمید نوترکیب با PCR و برش آنزیمی تائید گردید (شکل ۴).

ب. بیان پروتئین STxB و تخلیص آن،

کلنی انتخابی در محیط کشت LB مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد و پس از رسیدن به رشد کافی به منظور بیان پروتئین توسط IPTG 1 میلی‌مولار القاء گردید و برای بررسی بیان و کیفیت آن روی ژل SDS-PAGE برده شد (شکل ۵). باند پروتئینی مدنظر در جایگاه صحیح ۱۴ کیلودالتونی (۱۰ کیلو

می‌گردد که ممکن است به همراه سندروم اورمیک همولیتیک باشد. از طرفی شیگا توکسین می‌تواند مشکلات سیتوتوکسیک و نوروپاتی ایجاد نماید (۹). امروزه تلاش‌های زیادی برای ساخت واکسن علیه شیگلا و سم آن انجام شده و کاندیداهای زیادی گزارش شده‌است. جالب اینکه هیچ کدام از این کاندیداها به دلایل مختلف تا امروز مورد تأیید سازمان جهانی سلامت WHO و FDA قرار نگرفته‌است. اما تلاش‌ها برای ساخت واکسن علیه شیگلوز به طور جدی ادامه دارد. در این مطالعه هدف تولید پروتئین STxB به منظور استفاده در مطالعات بعدی در رابطه با مقایسه ایمنی زایی آن به صورت تنها، همراه با ادجوان‌های طبیعی، استفاده از آن به عنوان یک اجوانت موکوسی و انتقال دهنده پروتئینی به سلول‌های سرطانی می‌باشد.

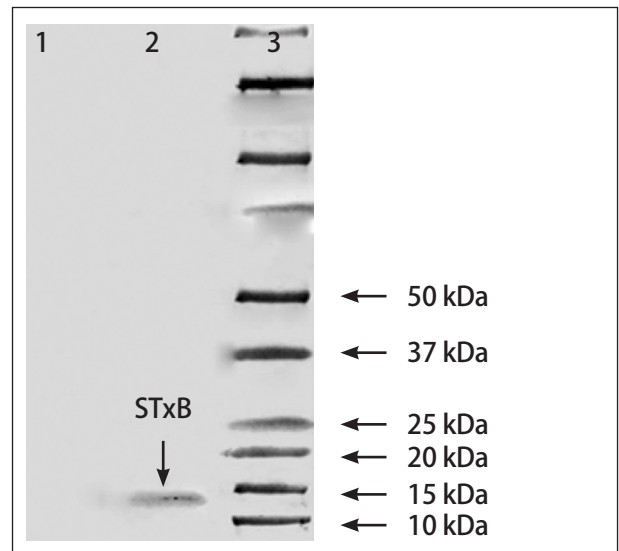
در رابطه با ژن STxB در سراسر جهان مطالعات و بررسی‌های گوناگونی به عمل آمده، ژن نامبرده در موجودات مختلفی از *E. coli* گرفته تا انواع گیاهان مثل کاهو و... همسانه‌سازی شده است. در یک تحقیق در سال ۱۹۸۸ ژن *stx* در باکتری *E. coli* همسانه‌سازی و توالی آن با توالی یابی مورد تأیید قرار گرفت (۱۰). در همین سال (Ilana Harari) و همکارانش ایمنی‌زایی یک پپتید سنتتیک از ناحیه N ترمینال STxB را انجام دادند این پپتید توانست آنتی بادی تولید کرده و در تست آنتی توکسیستی در سلول‌های هلا اتصال سم شیگا به رسپتورهای سطح سلولی را مهار کند (۱۱).

در سال ۱۹۹۳ ژن STxB در سطح بالایی در باکتری *E. coli* بیان شد و به خوبی به کمک ستون نیکل تخلیص و غلظت خوبی از این پروتئین فراهم گردید (۱۲). به علت شباهت ساختاری این زیر واحد سمی با هم‌تای آن در باکتری اشرشیا کلی (EHEC) یعنی در تحقیقات یک هدف مشترک از این همسانه‌سازی‌ها در نظر محققین دنبال می‌شد و آن هدف ایمنی زایی موثر علیه هر دو عامل شیگلا و اشرشیا کلی بود. در سال ۲۰۰۵ به منظور افزایش ایمنی زایی مخاطی علیه STxB تلاشی انجام شد که در طی آن پروتئین تخلیص شده STxB را به کمک میکروسفرهای لیپیدی سنتتیک به صورت نازال تلقیح کردند که نتایج آن تقویت نسبی پاسخ ایمنی را نشان می‌داد (۱۳).

در این راستا در سال ۲۰۰۸ در یک پروژه تحقیقاتی ژن STxB در باکتری *E. coli* کلون شده و بیان آن بررسی گردید و ایمنی زایی آن صورت پذیرفت که البته ژن این پروتئین به صورت

دیده نشد. پروتئین نوترکیب به کمک ستون نیکل مراحل خالص سازی گردید و غلظت پروتئین تولیدی به روش برادفورد اندازه گیری شد. میزان غلظت پروتئین ۵۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ارزیابی شد.

ج. آنالیز وسترن بلائینگ با آنتی بادی ضد His-tag. بیان پروتئین STxB به دلیل داشتن توالی His-tag به کمک وسترن بلائینگ و بکارگیری آنتی بادی علیه His-tag مورد تأیید قرار گرفت و باند وسترن در جایگاه صحیح مدنظر قرار گرفت اما در ستون کنترل هیچ باندهایی دیده نشد (شکل ۶).



شکل ۶: وسترن بلائینگ با استفاده از آنتی بادی ضد هیستیدین. **ستون ۱:** نمونه کنترل منفی می‌باشد. (عصاره باکتری *E. coli* نوترکیب می‌باشد که با IPTG القا نشده است). **ستون ۲:** باند پروتئینی ظاهر شده حاصل از بیان پروتئین STxB که در راستای ۱۴ کیلو دالتون قرار گرفت. **ستون ۳:** پروتئین سایز مارکر.

بحث

شیگلوزیس همیشه بعنوان یک اسهال خونی باسیلی حاد شناخته می‌شود که با مدفوع آبکی همراه با خون و موکوس توام با علائم بالینی چون تب، کرامپ‌های شکمی مشخص

سنتتیک بود (۱۴). در یک مطالعه جداگانه در همین سال تلاش برای ساخت یک واکسن نازال (دماغی) از طریق خالص سازی پروتئین STxB و تلقیح آن صورت پذیرفت. در کل مطالعات نشان می دهد که به خاطر وزن مولکولی پایین STxB پاسخ ایمنی ناچیزی علیه آن دیده می شود و این امر مستلزم استفاده اجدوان به STxB را کاملاً شرح می دهد. از طرفی STxB به خاطر اتصال اختصاصی اش با گیرنده Gb3 روی اکثر سلول های سرطانی امروزه برای انتقال داروهای ضد سرطان به این سلول ها و کاهش اثرات سوء شیمی درمانی توجه دانشمندان زیادی را به خود جلب کرده است. در اغلب مطالعات بیان پروتئین STxB به صورت سنتتیک در باکتری E. coli از سویه E. coli BL21 استفاده شده بود اما استفاده

ما از سویه E. coli Rosetta DE3 از نظر بیانی برای ژن غیر سنتتیک ما بیان بهتری را نشان داد. ژن غیر سنتتیک STxB دارای چند کدون نادر می باشد که فرکانس بیان کمی در سویه E. coli BL21 داشته به همین منظور ما برای بهینه سازی بیان و تولید بیشتر پروتئین غیر سنتتیک از سویه Rosetta DE3 استفاده کردیم که دارای بیان فرکانس بیان بیشتری نسبت به سویه قبل بود. حضور His-tag در وکتور pET28a(+) کمک بزرگی برای تخلیص پروتئین با ستون نیکل و تایید پروتئین به کمک وسترن بلات نمود. با برش آنزیمی در پروتئین تخلیص شده می توان پروتئین خالص STxB بدست آورد. پروتئین تولیدی پس از تخلیص برای مطالعات بعدی ما در زمینه ایمن سازی و تولید آنتی بادی پلی کلونال مورد استفاده قرار گرفت. ■

1. Key B, Clemens J and Kotloff. Generic protocol to estimate the burden of shigella diarrhoea and dysenteric mortal. Tex. Book 1999. pp 146-151.
2. Swapan Kumar Niyogi. Shigellosis. The Journal of Microbiology 2005; 133-43.
3. Oludare Odumosu, Dequina Nicholas, Hiroshi Yano and William Langridge. AB Toxins: A Paradigm Switch from Deadly to Desirable, Toxins 2010. 2, 1612-45
4. David G. Pina, Ludger Johannes, Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications, Toxicon 2005; 389-93
5. Viel T, Dransart E, Nemat F, Henry E. In vivo tumor targeting by the B-subunit of shiga toxin. 2008; 239-47
6. Bouter A, Delord B, Dransart E, Poirier C, Johannes L, van Effenterre D. Intracellular trafficking of Shiga-toxin-B-subunit-functionalized spherulites. Biol Cell. 2008 Dec;100(12):717-25.
7. Hamid Madanchi, Hossein Honari, Mohammad Sadraeian, Mahdi Hesaraki. Fusion of CtxB with StxB, Cloning and Expression of in Escherichia coli: A challenge for Improvement of Immune Response Against StxB. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences Summer 2011: 7(3): 185-190
8. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989
9. Cherla R.P, Lee S.Y and Tesh V.L. "Shiga toxins and apoptosis.FEMS Microbiol". Lett . 2003. 228:159-166.
10. Strockbine N, Jackson M, Sung L, Holmes R, and O'brien A. Cloning and Sequencing of the Genes for Shiga Toxin from Shigella dysenteriae Type 1. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Mar. 1988, P. 1116-122
11. Harari I, Donohue-Rolfe A, Keusch G, And Arnon R. Synthetic Peptides of Shiga Toxin B Subunit Induce Antibodies Which Neutralize Its Biological Activity. INFECTION AND IMMUNITY, June 1988, p. 1618-624
12. Su G et al. High level expression of Shiga toxin B subunit of Shigella dysenteriae serotype 1 in Escherichia coli. Chin J Biotechnol, 1993, 9(1), 49 - 55
13. Kurohane K, Kobayashi C, Imai Y. Facilitated production of secretory IgA against Shiga toxin B subunits by intranasal application of antigen-coated polystyrene microspheres. Microbiol Immunol. 2005;49(2):149-54.
14. Zhu C, Yu J, Yang Z, Davis K, Rios H, Wang B, Glenn G, Boedeker EC. Protection against Shiga toxin-producing Escherichia coli infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin subunit B. Clin Vaccine Immunol. 2008 Feb;15(2):359-66.