

## **Cloning and expression of the *Vibrio cholera* recombinant FlaA Flagellin protein and evaluation of its antigenicity characteristics**

Kazemian H(M.Sc)<sup>1</sup>, Najafimosleh M(Ph.D)<sup>2\*</sup>, Abtahi H(Ph.D)<sup>3</sup>

1-Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2- Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

3- Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 3 Jan 2011, Accepted: 2 May 2012

### **Abstract**

**Background:** *Vibrio cholera* is an important agent causing cholera in human. The expression of Flagellum and the movement of the bacterium are critical in the colonization and virulence of *Vibrio cholera*. FlaA gene is one the five genes encoding Flagellin which plays an important role in the activity and movement of the bacterium and its colonization which has a significant role in its immunogenicity. The aim of this study was to express and produce the recombinant FlaA protein in *E.coli* using Western blot method.

**Materials and Methods:** In this experimental study, FlaA gene was proliferated by PCR method using the specific primers and cloned with BamHI and XhoI in pTz57R/T. Then it was proliferated and sequenced in DH5a vector of *E.coli*. The cloned FlaA gene was inserted into pGEX-4T-1 vector. The cloned vector was transformed to BL21-DE3 of *E. coli* and successfully expressed by induction of IPTG. The expressed protein was purified by GST affinity resin. For preparation of the primary antibody, the purified recombinant protein was injected to rats. Western blot assay method was used for determining the antigenicity of the recombinant FlaA.

**Results:** Determination of gene sequencing showed that this gene has been proliferated properly and the antibody used in Western blot verified the production of the recombinant protein.

**Conclusion:** The results of this study demonstrate that FlaA protein is immunogenic and can be evaluated in vaccine designing and as a diagnostic tool for detection of cholera infection.

**Keywords:** *E. coli*, FlaA, gene expression, recombinant protein, *Vibrio cholera*

\*Corresponding author:

Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Email: n\_mosleh@yahoo.com

## کلونینگ و بیان پروتئین نو ترکیب فلاژین FlaA ویبریو کلرا و بررسی خواص آنتی ژنیکی آن

حمید کاظمیان<sup>1</sup>، محمد نجفی مصلح<sup>2\*</sup>، حمید ابطحی<sup>3</sup>

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

2- استادیار، گروه میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

3- دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 90/10/14 تاریخ پذیرش: 91/2/13

### چکیده

**زمینه و هدف:** ویبریو کلرا عامل بیماری کلرا در انسان می‌باشد. بیان فلاژل و تحرک باکتری در کلونیزاسیون و ویرولانسی آن عامل بسیار مهمی است. ژن FlaA یکی از پنج ژن کد کننده فلاژلین می‌باشد که نقش اصلی در حرکت باکتری و کلونیزاسیون آن دارد و از نظر ایمنی بخشی نیز مورد توجه می‌باشد. در این مطالعه کلونینگ و بیان ژن FlaA در باکتری اشرشیاکلی و بیان پروتئین نو ترکیب با روش وسترن بلات تأیید می‌شود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ژن flaA با پرایمرهای اختصاصی با PCR تکثیر و با آنزیم‌های BamHI و XhoI در وکتور pTZ57R/T کلون و در E.coli سویه DH5α تکثیر و تعیین توالی شد. در وکتور PGEX4T-1 و در E.coli سویه BL21- DE3 با القا IPTG بیان شد. از کیت G.S.T جهت خالص سازی پروتئین نو ترکیب استفاده شد و پروتئین به موش تزریق و آنتی بادی اختصاصی سنتز شده در موش برای تایید نهایی پروتئین نو ترکیب در وسترن بلات مورد استفاده گرفت.

**یافته‌ها:** تعیین توالی نشان داد که ژن فوق بدرستی تکثیر شده است و آنتی بادی استفاده شده در وسترن بلات، تولید پروتئین نو ترکیب را نشان داد.

**نتیجه گیری:** پروتئین نو ترکیب flaA در میزبان E.coli با مقدار مناسب بیان گردید. تزریق پروتئین تولید شده به موش نشان داد که این پروتئین ضمن داشتن خاصیت آنتی ژنی به خوبی آن را حفظ می‌کند. بنابراین می‌توان از آن به عنوان یکی از اجزا موثر در طراحی یک واکسن ایمنی بخش و نیز به عنوان یک ابزار تشخیصی استفاده نمود.

**واژگان کلیدی:** اشرشیاکلی، فلاژلین، بیان ژن، پروتئین نو ترکیب، ویبریو کلره

\* نویسنده مسئول: گروه میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

Email: n\_mosleh@yahoo.com

## مقدمه

نو ترکیب آن به مقادیر بالا؛ روش بهینه کردن تولید آن نیز مشخص گردد. در این مطالعه با استفاده از استخراج ژن FlaA از سویه ویبریوکلرای سروتایپ اینابا، کارهای مربوط به کلونینگ، تکثیر ژن در میزبان اول و تعیین توالی آن انجام شد و سپس بیان ژن در میزبان دوم و تخلیص پروتئین نو ترکیب و تلقیح آن به رت و تولید آنتی بادی‌های اختصاصی پی گرفته شد.

## مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، از سویه اینابا (Inaba) ویبریو کلرا استفاده گردید. DNA ژنوم کروموزومی پس از کشت باکتری در محیط‌های غنی شده مناسب از این سویه استخراج گردید. اشریشیا کلی سویه DH5 $\alpha$  برای تکثیر ژن FlaA و اشریشیا کلی سویه BL-21 برای بیان فلاژلین پروتئین FlaA DE3 که از شرکت فرمنتاز تهیه شده بود مورد استفاده قرار گرفت. جهت تکثیر ژن FlaA، از پلاسمید وکتور pET32a و از باکتری E.Coli سویه DH5 $\alpha$  به عنوان میزبان اولیه استفاده شد. سپس برای کلونینگ و بیان ژن مورد نظر، وکتور PGEX4T-1 حامل ژن به باکتری E.Coli سویه DE3-BL21 انتقال یافت. ناترینت برات و ناترینت آگار محیط کشت‌های مورد استفاده در این مطالعه بود.

برای تکثیر و جداسازی ژن flaA ابتدا کروموزوم باکتری جداسازی گردید. DNA کروموزومی با استفاده از روش CTAB/NaCl تهیه گردید. ابتدا ویبریوکلرا سویه اینابا به مدت 2 دقیقه و با دور 5000 سانتیفریوژ شد. مقدار 1/5 میلی‌لیتر از محلول حاصل در 567 میکرولیتر بافر TE حل شد. سپس سلول باکتری توسط SDS و پروتئیناز K لیز شده و DNA توسط محلول CTAB/NaCl استخراج گردید. پروتئین‌ها و مواد اضافی با دو بار اضافه کردن محلول فتل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل (1/24/25) از محلول خارج شد. برای رسوب DNA از ایزوپروپانول استفاده شد. در پایان آن را با اتانول 70 درصد شستشو داده و در 100 میکرولیتر بافر TE محلول گردید.

ویبریوکلرا یک باسیل گرم منفی و عامل بیماری وبا در انسان می‌باشد (1، 2). این باکتری از طریق آب و غذای آلوده منتقل شده و به واسطه فلاژل قطبی قادر است خود را به دستگاه گوارش انسان رسانده و توسط عوامل چسبندگی خود در اپیتلیوم مخاط روده میزبان مستقر گردد (3-5). در سطح مخاط عوامل بیماری‌زایی باکتری که مهم‌ترین آن توکسین وبا (کلرا توکسین) است رها می‌گردد. کلرا توکسین از طریق تاثیر بر روی آدنیلات سیکلاز و افزایش میزان cAMP در سطح غشا انتروسیت‌ها سبب دفع آب و الکترولیت‌های داخل سلول به مجرای گوارشی شده و باعث اسهال مشخص وبا می‌گردد (6-9). در بیماری‌زایی ارگانسیم، مکانسیم‌های متعددی دخیل بوده و یکی از عوامل مهم فلاژل می‌باشد (10-12). سویه‌های غیر متحرک بیماری‌زایی کمتری نسبت به سویه‌های متحرک دارا می‌باشند. بنابراین فلاژل و حرکت در باکتری به عنوان یک عامل مهم در کلونیزاسیون و بیماری‌زایی باکتری مطرح می‌باشد (2، 10، 13-17). ژنوم ویبریوکلرا شامل 5 ژن کد کننده فلاژل است. این ژن‌ها پروتئین‌های فلاژلین FlaA، FlaB، FlaC، FlaD، FlaE را کد می‌کنند (1، 2، 5). پروتئین FlaA برای تجمع زیر واحدها و عملکرد فلاژل ضروری بوده و سویه‌های جهش یافته فاقد این ژن قدرت ایجاد فلاژل و حرکت را دارا نمی‌باشند؛ بنابراین قدرت بیماری‌زایی خود را نیز از دست می‌دهند. فلاژلین خالص شده از ویبریوکلرا دارای خواص آنتی ژن و محافظتی می‌باشد (1، 4). پروتئین‌های فلاژلین ویبریوکلرا فعال کننده‌های قوی ایمنی التهاب و سلولی می‌باشند (18). به دلیل این که تخلیص شکل طبیعی پروتئین از باکتری در مقادیر بالا کاری سخت و دشوار و دارای راندمان پائین می‌باشد و هم‌چنین تولید پروتئین به این شکل نیازمند صرف هزینه‌های بالا خواهد بود و با توجه به این که هنوز بر روی شکل نو ترکیب این پروتئین و نحوه بیان آن اقدامی صورت نگرفته است؛ لذا ضرورت تولید شکل نو ترکیب پروتئین FlaA لازم بود و سعی شده است در این مطالعه ضمن موفقیت تولید شکل

استفاده از ژن T4 DNA لیگاز در حرارت 22 درجه سانتی‌گراد در پلاسمید PGEX4T-1 وارد گردید. پلاسمید حامل ژن وارد باکتری اشرشیاکلی سویه DH5a و سپس به درون باکتری اشرشیاکلی سویه BL21- DE3 ترانس فرم شد. ازمحیط کشت ناترینت آگار و ناترینت براث حاوی آنتی بیوتیک برای غربال‌گری باکتری‌های ترانسفرم شده استفاده گردید (17، 19).

### بیان و خالص سازی ژن flaA

از کلنی حاوی پلاسمید در محیط ناترینت براث حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. 500 میکرولیتر از باکتری به 50 میلی‌لیتر از محیط لوریا برتانی براث اضافه و بر روی انکوباتور شیکردار و حرارت 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا به OD 0/5 در طول موج 600 نانومتر رسید. سپس 50 میکرولیتر IPTG را به محیط کشت اضافه کرده و تا 6 ساعت OD آن مورد محاسبه قرار گرفت. با استفاده از کیت G.S.T و بر اساس پروتکل، پروتئین بیان شده تخلیص گردید. در پایان پروتئین خالص شده با استفاده از SDS-PAGE و روش برادفورد مورد ارزیابی قرار گرفت (11).

### تزریق پروتئین flaA تولید شده به رت

برای بررسی ایمنی‌زایی flaA نوترکیب تولید شده، از 3 گروه رت استفاده شد. گروه اول رت‌های کنترل منفی بودند که تزریقی روی آنها انجام نگرفت. گروه دوم رت‌های کنترل مثبت بود که ویبریوکلرا کشته شده به آنها تزریق شد و گروه سوم رت‌هایی بودند که flaA نوترکیب تولید شده به آنها تزریق گردید. برای تولید باکتری کشته شده از فرمالین استفاده شد. باکتری زنده از استوک بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شد و سپس به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. مقدار زیادی از باکتری در فرمالین 1 درصد وارد و مخلوط گردید. سوسپانسیون باکتری به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای اطمینان از کشته شدن باکتری از سوسپانسیون باکتری بر روی محیط بلاد آگار کشت داده و به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای تزریق به رت‌های کنترل مثبت، 1 میلی‌لیتر از

طراحی پرایمرهای مورد نیاز بر اساس ترادف‌های به دست آمده و در نظر گرفتن نکات استاندارد در طراحی پرایمر از جمله طول پرایمر (تقریباً 25 باز)، دمای اتصال، G+C% (بیش از 50 درصد)، ایجاد دایمر، تولید لوپ یا حلقه در درون هر یک از پرایمرها،  $\Delta G$  مناسب و سایر موارد انجام گردید. پرایمرهای رفت

و برگشت  
(5'CTGGATTCATGACCATTAACGTA AAA3')  
(5'CCTCGAGCTGCAATAACGAGATT3')

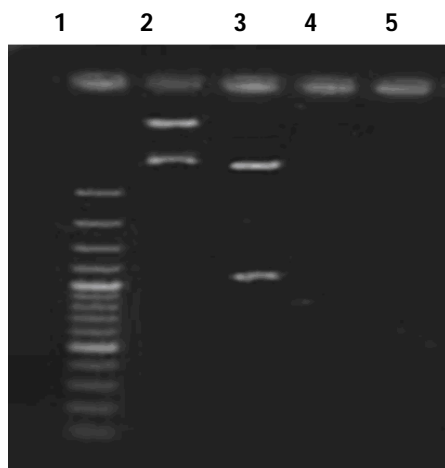
برای جداسازی ژن flaA از باکتری ویبریو کلرا مورد استفاده قرار گرفت. جهت سهولت در مراحل کلونینگ و با توجه به جایگاه‌های ممکن برای کلون سازی در پلاسمید دو جایگاه آنزیمی BamHI و XhoI در ابتدا و انتهای پرایمر طراحی گردید (19).

پس از جدا سازی کروموزوم، تکثیر و جداسازی ژن انجام گرفت که این فرایند به روش PCR صورت گرفت. حرارت 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه برای شروع انتخاب شد. فرایند واسرشت در حرارت 94 درجه سانتی‌گراد در 30 سیکل به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال در 63 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و باز آرایبی در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام گرفت. مواد به کار رفته در فرایند PCR شامل 500 نانوگرم DNA الگو، 2/5 میلی مول کلرید منیزیم، 1 میکرولیتر پرایمر رفت، 1 میکرولیتر پرایمر برگشت، 200 میکرولیتر dNTP، 0/5 میکرولیتر بافر و 0/5 میکرولیتر آنزیم expand پلیمرز می‌باشد (فرمتاز). محصول PCR در ژل آگاروز 1 درصد و با دستگاه الکتروفورز افقی و در محلول رنگی اتیدیوم بروماید با استفاده از نور UV مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت. محصول PCR از ژل آگاروز جدا و فرایند خالص سازی طبق پروتوکل انجام و با الکتروفورز در ژل آگاروز 1 درصد مورد ارزیابی قرار گرفت (20).

### کلونینگ ژن flaA در وکتور بیان کننده پروتئین

محصول PCR و پلاسمید PGEX4T-1 هم‌زمان با دو آنزیم BamHI و XhoI برش داده شد و ژن flaA با

کلونینگ ژن در وکتور pTZ PCR-Blunt cloning vector: جهت اطمینان از کلون شدن ژن flaA در PCR-Blunt cloning vector از هضم آنزیمی و PCR استفاده شد. نتایج به دست آمده از هضم آنزیمی با آنزیم‌ها (XhoI و BamHI) و PCR پلاسمیدهای حاوی ژن flaA نشان می‌دهند که این ژن در ناقل پلاسمیدی کلون شده است. نتایج هضم آنزیمی در شکل 2 آمده است.



شکل 2. برش آنزیمی flaA - pTZ با آنزیم های BamHI و xhoI.

ستون 1: مارکر، ستون 2: پلاسمید برش نیافته flaA - pTZ، ستون 3: برش آنزیمی flaA - pTZ با آنزیم های BamHI و xhoI.

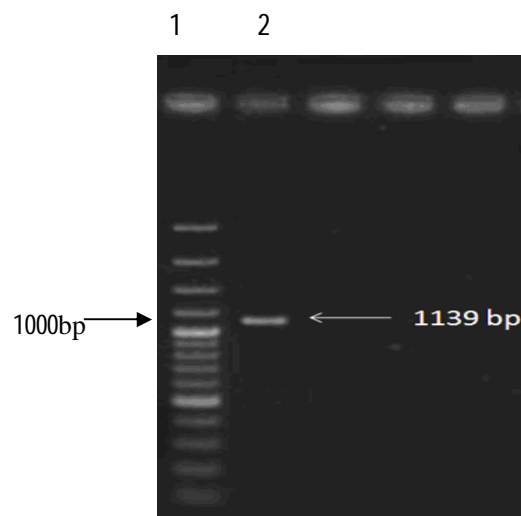
نتایج تعیین توالی ژن sequencing و هم ردیفی Alignment: تعیین ترادف ژن‌ها به روش ختم زنجیره (روش Sanger) انجام گرفت. ژن از هر دو طرف خوانده شد. نتایج به دست آمده از ترادف نوکلئوتیدی ژن flaA دال بر صحت ترادف جدا شده بود.

کلونینگ ژن در pGEX-4T-1: جهت اطمینان از کلون شدن ژن flaA در pGEX-4T-1 از هضم آنزیمی و PCR استفاده شد. نتایج به دست آمده از هضم آنزیمی با آنزیم‌های BamHI و XhoI و PCR پلاسمیدهای حاوی ژن flaA نشان می‌دهند که این ژن در ناقل پلاسمیدی pGEX-4T-1 کلون شده است. نتایج هضم آنزیمی و PCR در شکل 3 آمده است.

سوسپانسیون باکتری کشته شده با 1 میلی لیتر از ادجوانت کامل فروند مخلوط و به هر موش 200 میکرولیتر به شکل زیر جلدی تزریق گردید. بعد از 20 روز، تزریق فوق دوباره همراه ادجوانت ناقص فروند انجام گرفت. تزریق سوم به همین ترتیب بعد از گذشت 10 روز همراه با ادجوانت ناقص انجام شد. دو هفته بعد از سومین تزریق از رت‌ها خون‌گیری شد و از سرم آن به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. پروتئین نو ترکیب نیز به همین ترتیب تزریق شد. از موش‌های کنترل منفی نیز خون‌گیری کرده و از سرم آن به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. از سرم رت‌ها برای وسترن بلاتینگ استفاده شد (18).

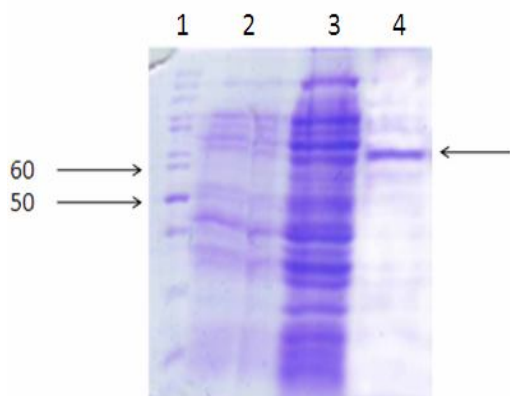
### یافته ها

تکثیر ژن flaA توسط PCR: برای تکثیر ژن فوق از غلظت‌های مختلف یون منیزیم و دماهای متفاوت اتصال پرایمرها استفاده گردید. بهترین غلظت یون منیزیم برای تکثیر ژن flaA غلظت 1/5 میلی مولار و دمای مناسب برای اتصال پرایمرها به ژن فوق 52 درجه سانتی گراد بود. نتیجه مربوط به محصول PCR این ژن بر روی ژل آگارز 1 درصد در شکل 1 آمده است.

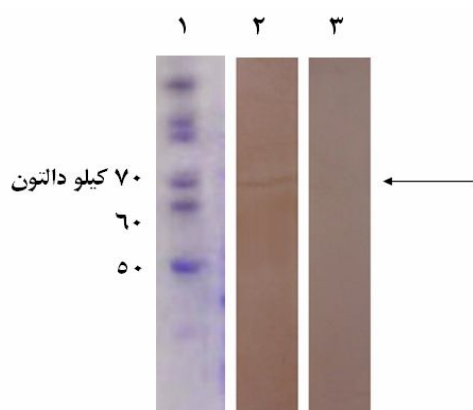


شکل 1. تکثیر ژن flaA توسط PCR. ستون 1: مارکر. ستون 2: محصول PCR.

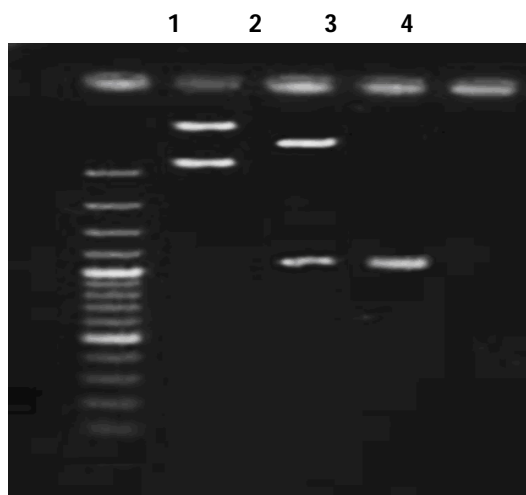
تخلیص پروتئین نو ترکیب: خالص سازی پروتئین flaA با استفاده از کیت G.S.T انجام گرفت (شکل 5). پس از تخلیص، محلول پروتئین تغلیظ گردید. غلظت پروتئین با استفاده از روش براد فورد (Bradford) سنجیده شد. وسترن بلات: برای این منظور موش قبلا با عصاره کشت ویبریوکلرا ایمونیزه شد (تزریق اول از ادجوانت کامل و به فاصله 2 هفته ادجوانت ناقص استفاده شد). پس از بالا رفتن تیتراژ آنتی بادی بر علیه این پروتئین، سرم حیوان تهیه گردید. نتایج نشان داد که پروتئین نو ترکیب ما خاصیت آنتی ژنیسته دارد و می تواند با سرم رت های ایمن شده واکنش نشان دهد. نتیجه وسترن بلات در شکل 6 آمده است.



شکل 5. تخلیص پروتئین flaA  
ستون 1: مارکر پروتئین؛ ستون 2: نمونه قبل از القا؛ ستون 3: نمونه بعد از القا؛ ستون 4: نمونه تخلیص شده

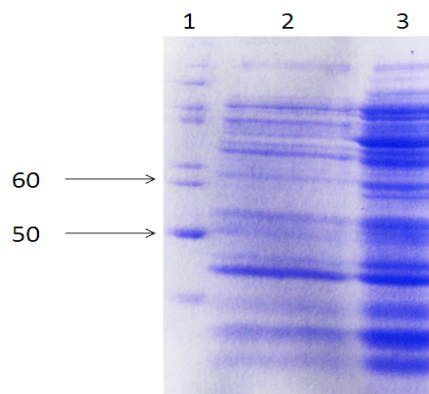


شکل 6. وسترن بلات پروتئین نو ترکیب فلاژین ویبریوکلرا؛ ستون 1: مارکر، ستون 2: وسترن بلات پروتئین نو ترکیب با سرم رت ایمن شده؛ ستون 3: کنترل منفی



شکل 3. تایید کلونینگ ژن flaA در پلاسمید pGEX-4T-1 با کمک PCR و هضم آنزیمی  
ستون 1: مارکر؛ ستون 2: پلاسمید برش نیافته pGEX-4T-1- flaA؛ ستون 3: برش آنزیمی pGEX-4T-1- flaA با آنزیم های BamHI و xhoI؛ ستون 4: محصول PCR ناشی از pGEX-4T-1- flaA

بیان پروتئین flaA: القای تولید پروتئین با استفاده از IPTG انجام می گیرد. برای القای پروتئین flaA در غلظت نهایی یک میلی مولار از IPTG و در OD600 با مقادیر 0/6 و 0/8 و 1 انجام شد و بالاترین مقدار پروتئین در جذب نوری 0/8 و محیط فاقد گلوکز تولید شد. نتیجه القای پروتئین flaA در شکل 4 آمده است.



شکل 4. القا پروتئین pGEX-4T-1-flaA توسط باکتری اشرشیاکلی با استفاده از IPTG؛ ستون 1: مارکر؛ ستون 2: نمونه قبل از القا؛ ستون 3: نمونه بعد از القا

## بحث

در ایجاد بیماری کلرا عوامل مختلفی دخالت دارند. از جمله یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی، فلاژل باکتری است که از مجموع پروتئینی بنام فلاژلین تشکیل شده است (21، 22). فلاژل باعث افزایش تحرک باکتری و افزایش چسبندگی باکتری در سطح مخاط میزبان می‌گردد (2، 22). شواهد ژنتیکی نشان می‌دهد که فنوتایپ‌های متحرک و بیان برخی از ژن‌های ویروالانس در ویبریو کلرا با یکدیگر در ارتباط است؛ موتانت‌های غیر متحرک ارگانسیم نسبت به سویه‌های متحرک آن از ویروالانس کمتری برخوردارند (16، 23).

از طرفی فلاژلین به عنوان یکی از اهداف مهم سیستم ایمنی به شمار رفته و به عنوان یک لیگاند برای گیرنده TLR5 (Toll-like receptor 5) سلول‌های میزبان عمل می‌نماید (15). تحریک TLR5 توسط پاتوژن‌های مختلف از جمله عامل کلرا منجر به فعال سازی پاسخ‌های ایمنی ذاتی و به دنبال آن ایمنی اکتسابی می‌گردد (24، 25). چون نو ترکیبی ژنتیکی در ژن‌های کد کننده فلاژلین در ویبریوکلرا اتفاق نمی‌افتد و هر پنج پروموتور ژن‌های کد کننده فلاژلین به طور هم‌زمان بیان می‌شوند، بنابراین فلاژلین ویبریوکلرا به عنوان یکی از اهداف مناسب برای مطالعات ایمنی‌زایی مورد توجه می‌باشد (26، 27).

پروتئین خالص شده فلاژلین در ویبریوکلرا یک آنتی ژن محافظت کننده می‌باشد. بنابراین پروتئین فلاژلین به عنوان یکی از اهداف مناسب و کاربردی در تهیه و تولید واکسن بیماری و با مورد مطالعه قرار گرفته است (28، 29).

یکی از مسائل مهم در پیش‌گیری از وبا ایمن سازی با واکسن می‌باشد. با این وجود نبود یک مدل حیوانی مناسب برای مطالعات در زمینه ساخت واکسن؛ نداشتن کارایی مناسب؛ زمان محدود مصونیت و از همه مهم‌تر عوارض جانبی و شدت‌نگ باکتری در محیط زیست از جمله معایب اکثر واکسن‌های فعلی است. به دست آوردن فلاژلین در مقادیر بالا کاری سخت و پرهزینه است، بنابراین بیان

نو ترکیب پروتئین flaA در شرایط آزمایشگاه می‌تواند در جهت حل مشکلات فوق موثر باشد (27، 30).

## نتیجه‌گیری

همان‌طور که در این مطالعه نشان داده شد با موفقیت کامل ژن flaA از ژنوم باکتری با آنزیم‌های مناسب برش داده شد و بعد از وارد کردن آن در وکتور و میزبان اولیه تکثیر گردید. کلونینگ ژن و وارد کردن آن در میزبان بیان کننده ژن با موفقیت انجام شد و پروتئین ژن flaA در مقادیر مناسبی به دست آمد. نتایج وسترن بلات ضمن تأیید مجدد درست بودن پروتئین نو ترکیب نشان داد که این پروتئین از قدرت آنتی ژنیسته مناسبی برخوردار بوده و می‌تواند به عنوان یک کاندید مناسب برای تولید واکسن و نیز ابزار تشخیصی برای بیماری و با مورد استفاده قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

این پایان نامه مطابق تصویب نامه شماره 600 با هزینه دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام گرفته است. بدین وسیله از دانشگاه علوم پزشکی اراک و اعضای هیئت علمی گروه میکروبی شناسی آن دانشگاه به ویژه جناب آقای دکتر ابطی به دلیل مساعدت‌های بی‌دریغ ایشان تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

- Harrison LM, Rallabhandi P, Michalski J, Zhou X, Steyert SR, Vogel SN, et al. Vibrio cholerae flagellins induce Toll-like receptor 5-mediated interleukin-8 production through mitogen-activated protein kinase and NF- $\kappa$ B activation. *Infection and immunity*. 2008; 76(12): 5524-34.
- Sarkar M, Chaudhuri K. Association of adherence and motility in interleukin 8 induction in human intestinal epithelial cells by Vibrio cholerae. *Microbes and infection*. 2004;6(7):676-85.
- Moisi M, Jenul C, Butler SM, New A, Tutz S, Reidl J, et al. A novel regulatory protein

- involved in motility of *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology*. 2009;191(22):7027-38.
4. Silva AJ, Leitch GJ, Camilli A, Benitez JA. Contribution of hemagglutinin/protease and motility to the pathogenesis of El Tor biotype cholera. *Infection and immunity*. 2006; 74(4): 2072-9.
  5. Silva AJ, Benitez JA. Transcriptional regulation of *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease by the cyclic AMP receptor protein and RpoS. *Journal of bacteriology*. 2004; 186(19): 6374-82.
  6. Syed KA, Beyhan S, Correa N, Queen J, Liu J, Peng F, et al. The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. *Journal of bacteriology*. 2009; 191(21): 6555-70.
  7. Kitaoka M, Miyata ST, Unterweger D, Pukatzki S. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. *Journal of medical microbiology*. 2011;60(4):397-407.
  8. Prouty MG, Correa NE, Klose KE. The novel  $\sigma_{54}$ -and  $\sigma_{28}$ -dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. *Molecular microbiology*. 2001;39(6):1595-609.
  9. Tsou AM, Frey EM, Hsiao A, Liu Z, Zhu J. Coordinated regulation of virulence by quorum sensing and motility pathways during the initial stages of *Vibrio cholerae* infection. *Communicative & integrative biology*. 2008; 1(1): 42-4.
  10. Weber GG, Klose KE. The complexity of ToxT-dependent transcription in *Vibrio cholerae*. *The Indian journal of medical research*. 2011; 133(2):201-6.
  11. Rasmussen L, White EL, Pathak A, Ayala JC, Wang H, Wu JH, Benitez JA, Silva AJ. A high-throughput screening assay for inhibitors of bacterial motility identifies a novel inhibitor of the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor and virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(9):4134-43.
  12. Correa NE, Klose KE. Characterization of enhancer binding by the *Vibrio cholerae* flagellar regulatory protein FlrC. *Journal of bacteriology*. 2005;187(9):3158-70.
  13. Xicohtencatl-Cortés J, Lyons S, Chaparro AP, Hernández DR, Saldaña Z, Ledesma MA, et al. Identification of proinflammatory flagellin proteins in supernatants of *Vibrio cholerae* O1 by proteomics analysis. *Molecular & cellular proteomics*. 2006;5(12):2374-83.
  14. Gardel CL, Mekalanos JJ. Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infection and immunity*. 1996;64(6):2246-55.
  15. Hase CC. Analysis of the role of flagellar activity in virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Microbiology*. 2001;147(4):831-7.
  16. Martinez RM, Dharmasena MN, Kirn TJ, Taylor RK. Characterization of two outer membrane proteins, FlgO and FlgP, that influence *Vibrio cholerae* motility. *Journal of bacteriology*. 2009;191(18):5669-79.
  17. Martinez RM, Jude BA, Kirn TJ, Skorupski K, Taylor RK. Role of FlgT in Anchoring the Flagellum of *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology*. 2010; 192(8):2085-92.
  18. Klose KE, Mekalanos JJ. Differential regulation of multiple flagellins in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology*. 1998; 180(2): 303-16.
  19. Liu Z, Miyashiro T, Tsou A, Hsiao A, Goulian M, Zhu J. Mucosal penetration primes *Vibrio cholerae* for host colonization by repressing quorum sensing. *Science's STKE*. 2008;105(28):9769-74.
  20. Das M, Chopra AK, Wood T, Peterson JW. Cloning, sequencing and expression of the flagellin core protein and other genes encoding structural proteins of the *Vibrio cholerae* flagellum1. *FEMS Microbiology letters*. 1998; 165(2): 239-46.
  21. Liang H, Xia L, Wu Z, Jian J, Lu Y. Expression, characterization and immunogenicity of flagellin FlaC from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901. *Fish & Shellfish Immunology*. 2010;29(2):343-8.
  22. Correa NE, Klose KE. Characterization of enhancer binding by the *Vibrio cholerae* flagellar regulatory protein FlrC. *Journal of bacteriology*. 2005; 187(9):3158-70.
  23. Yoon SS, Mekalanos JJ. Decreased potency of the *Vibrio cholerae* sheathed flagellum to trigger host innate immunity. *Infection and immunity*. 2008;76(3):1282-8.
  24. Rui H, Ritchie JM, Bronson RT, Mekalanos JJ, Zhang Y, Waldor MK. Reactogenicity of



- live-attenuated *Vibrio cholerae* vaccines is dependent on flagellins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(9):4359-64.
25. Mizel SB, Bates JT. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *The Journal of Immunology*. 2010; 185(10): 5677-82.
26. Lee SE, Kim SY, Jeong BC, Kim YR, Bae SJ, Ahn OS, et al. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infection and immunity*. 2006;74(1):694-702.
27. Bandyopadhyaya A, Sarkar M, Chaudhuri K. IL-1 [beta] expression in Int407 is induced by flagellin of *Vibrio cholerae* through TLR5 mediated pathway. *Microbial pathogenesis*. 2008; 44(6):524-36.
28. García L, Jidy MD, García H, Rodríguez BL, Fernández R, Cedré B, et al. The vaccine candidate *Vibrio cholerae* 638 is protective against cholera in healthy volunteers. *Infection and immunity*. 2005; 73(5):3018-24.
29. Yoon SS, Mekalanos JJ. Decreased potency of the *Vibrio cholerae* sheathed flagellum to trigger host innate immunity. *Infection and immunity*. 2008; 76(3):1282-8.
30. Rodríguez BL, Rojas A, Toledo W, Campos J, Ledón T, Marrero K, et al. Vaccine strains of *Vibrio cholerae* induce a differential array of proinflammatory mediators in an intestinal epithelial cell line. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2007; 38(2).