

## *Expression of Brucella abortus Omp25 Protein in Lactococcus lactis Probiotic Bacteria*

Somayeh Tirbakhsh Gouran<sup>1</sup>,  
Abbas Doosti<sup>2</sup>,  
Mohammad-Saeid Jami<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> PhD Student in Molecular Genetics, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Research Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

<sup>4</sup> Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

(Received October 2, 2022 ; Accepted December 20, 2022)

### **Abstract**

**Background and purpose:** The sequence of *Omp25* is conserved in all *Brucella* species. The high antigenicity of the product of this gene stimulates the host's immune system. Using engineered probiotic bacteria is an appropriate method for vaccine transport. The aim of this study was to express the *Omp25* of the *Brucella abortus* pathogenic bacterium in *Lactococcus lactis* probiotic bacterium.

**Materials and methods:** In this experimental study, the required vector was designed and synthesized to include the gene of interest and a signal peptide (pNZ8148-Usp45-*Omp25*). *E. coli* strain TOP10F was transformed using the pNZ8148-Usp45-*Omp25* expression vector based on induction by nisin. The recombinant plasmid was extracted from the transformed bacteria using a plasmid extraction kit. The *L. lactis* was transformed by pNZ8148-Usp45-*Omp25* vector using electroporation. Evaluation of the expression of *Omp25* gene at the RNA level was assessed by reverse transcription method and confirming the presence of recombinant *Omp25* protein in the engineered bacteria using SDS-PAGE method.

**Results:** Successful expression of *B. abortus Omp25* in *L. lactis* was verified by RT-PCR. Subsequently, the proteins were separated based on molecular weight using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The protein expression analysis showed the expression of *Omp25* as a 25kDa extra band in transformed *L. lactis* compared to the *L. lactis* receiving the vector lacking the target gene.

**Conclusion:** This study shows that *Omp25* is expressed in *L. lactis* transformed via pNZ8148-Usp45-*Omp25* by electroporation. Transformed *L. lactis* can be successfully used as a subunit oral vaccine in prevention of Brucellosis.

**Keywords:** *Brucella*, *Omp25*, *Lactococcus lactis*, probiotic, electroporation

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 32 (217): 16-31 (Persian).

**Corresponding Author:** Abbas Doosti - Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. (E-mail: abbasdoosti@yahoo.com)

# بیان پروتئین Omp25 بروسلا آبورتوس در باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس

سمیه تیربخش گوران<sup>1</sup>عباس دوستی<sup>2</sup>محمدسعید جامی<sup>3و4</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** در تمام گونه‌های باکتری بروسلا، توالی ژن Omp25 حفاظت شده است. خاصیت آنتی ژنیسته بالای محصول این ژن باعث تحریک سیستم ایمنی میزبان می‌شود. استفاده از باکتری پروبیوتیک مهندسی شده، روش مناسبی برای انتقال واکسن است. این مطالعه با هدف بیان Omp25 باکتری بیماری‌زای بروسلا آبورتوس در باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس، انجام پذیرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، وکتور مورد نظر به همراه ژن و سیگنال پپتید (pNZ8148-Usp45-Omp25) طراحی و سنتز گردید. باکتری *E. coli* سویه TOP10F با وکتور بیانی pNZ8148-Usp45-Omp25 مبتنی بر القا توسط نیسین ترانسفورم شد. با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، از باکتری‌های ترانسفورم شده پلاسمید نو ترکیب استخراج گردید. ترانسفورماسیون باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس با وکتور pNZ8148-Usp45-Omp25، توسط روش الکتروپوریشن انجام گرفت. بررسی بیان ژن Omp25 در سطح RNA، به روش رونوشت‌برداری معکوس و تایید حضور پروتئین نو ترکیب Omp25 در باکتری مهندسی شده با روش SDS-PAGE، ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** بیان موفقیت‌آمیز پروتئین Omp25 بروسلا آبورتوس در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس با RT-PCR تأیید شد. با استفاده از روش سدیم دودسیل سولفات - پلی‌آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE)، پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی از یکدیگر تفکیک شدند. آنالیز بیان پروتئین‌ها، بیان Omp25 را به صورت یک باند پروتئینی 25 کیلو دالتونی اضافه در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با pNZ8148-Usp45-Omp25 در مقایسه با لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با pNZ8148 (وکتور فاقد ژن هدف) نشان داد.

**استنتاج:** مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین Omp25 در باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده توسط الکتروپوریشن با وکتور نو ترکیب pNZ8148-Usp45-Omp25 بیان می‌شود. باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده، می‌تواند در مطالعات آینده به عنوان واکسن زیر واحدی خوراکی جهت پیشگیری از بروسلوز، مناسب باشد.

**واژه‌های کلیدی:** بروسلا، Omp25، لاکتوکوکوس لاکتیس، پروبیوتیک، الکتروپوریشن

## مقدمه

شناخته شد (1). بروسلوز نوعی بیماری مشترک بین انسان و دام است. این بیماری در بیش از 170 کشور و منطقه در

از زمان کشف *Brucella melitensis* توسط David Bruce در سال 1887، بروسلوز یا تب مالت

E-mail: abbasdoosti@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** عباس دوستی - شهر کرد؛ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر کرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

1. دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد، ایران

2. دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد، ایران

3. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران

4. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد، شهر کرد، ایران

تاریخ دریافت: 1401/7/10 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/7/17 تاریخ تصویب: 1401/9/29

بر روی 1698 بیمار از 30 استان ایران، میانگین بروز بروسلوز 29/83 در 100000 جمعیت (55 درصد مرد و 45 درصد زن) گزارش شد (9). در پژوهشی دیگر، کسیری و همکاران نشان دادند که بروز بروسلوز در غرب ایران 59/31 در 100000 نفر جمعیت (34/9 درصد زن و 65/1 درصد مرد) بوده است و نزدیک به 95/2 درصد موارد مبتلا در روستا و 4/8 درصد در مناطق شهری ساکن هستند. هم‌چنین میزان بروز تب مالت در کودکان این منطقه از ایران 41/4 در 100000 نفر جمعیت (68/9 درصد پسر و 31/1 درصد دختر) است که از این میان 87/8 درصد در مناطق روستایی ساکن بوده‌اند (10). از سوی دیگر، گزارش بوکائی و همکاران نشان داد که میزان بروز تب مالت 37 نفر در 100000 نفر جمعیت در شرق ایران است (11). در مورد شیوع بروسلوز بر حسب سن، میانگین سنی 31/3 سال توسط زینلیان دستجردی و همکاران گزارش شده است. شیوع بروسلوز در کشورهای صنعتی در مردان بیش‌تر از زنان است. اما در ایران به دلیل همکاری نزدیک زنان با مردان در مشاغل دامداری و کشاورزی، این بیماری در زنان نیز بسیار شایع است (12). علاوه بر این، بررسی جهانی الگوی فصلی تب مالت نشان می‌دهد که این بیماری در نیمه اول سال که فصل زاد و ولد دام است، شیوع بیش‌تری دارد. میزان تب مالت در فصل بهار و تابستان به دلیل عواملی مانند تماس مستقیم بین دامداران و جنین‌های سقط شده و هم‌چنین مصرف لبنیات آلوده افزایش می‌یابد. در مقابل میزان ابتلا به این بیماری در نیمه دوم سال کاهش می‌یابد. تعیین الگوی فصلی بروسلوز در ایران با استفاده از متاآنالیز نشان داد که بیش‌ترین میزان بروز بروسلوز در فصل بهار و تابستان و کم‌ترین آن در زمستان و پاییز رخ داده است (13).

آمار واقعی بروسلوز ممکن است بسیار بیش‌تر از ارقام گزارش شده باشد زیرا داده‌ها اغلب ناقص هستند. به عنوان مثال، بررسی‌های آماری یک روستا در ایران بیانگر این است که بیش از 40 درصد از بیماران مبتلا به بروسلوز به مقامات نظارتی وزارت بهداشت گزارش

سرتاسر جهان گسترش یافته است و یک نوع بیماری بومی در جوامع انسانی به حساب می‌آید که خسارات اقتصادی زیادی را در صنعت دامپروری ایجاد می‌کند (2). عامل بیماری بروسلوز باکتری بروسلای است. بروسلای یک نوع باکتری کوکوباسیل، درون سلولی، گرم منفی و غیر متحرک با طول 1/5-0/6 میکرومتر و قطر 0/5-0/7 میکرومتر است (3،4). در انسان، بروسلای به دو صورت حاد و مزمن باعث عفونت‌های سیستمیک می‌شود (5). بروسلوز یک بیماری ناتوان‌کننده و به ندرت کشنده است. بیماری حاد انسانی با علائم بالینی غیر شاخص مانند تب شدید، تعریق شبانه، بزرگ شدن طحال، کاهش وزن، درد ماهیچه و درد مفاصل تشخیص داده می‌شود. بروسلای به فاگوسیت‌ها و چندین سلول غیر فاگوسیتی که باعث بیماری مزمن می‌شوند، حمله می‌کند، در آن‌ها تکثیر می‌شود و زنده می‌ماند. بیماری مزمن می‌تواند عوارض شدیدی مانند استئوآرتیکولار، نوروبروسلوز و اندوکاردیت را ایجاد کند که مورد اخیر علت اصلی مرگ و میر نادر ناشی از بروسلوز انسانی است (6). بروسلای تا به امروز شامل 12 گونه پذیرفته شده است. فقط *B. melitensis*، *B. abortus*، *B. suis* و در موارد نادر *B. canis* به عنوان پاتوژن‌های انسانی معرفی شده‌اند (7). از اواخر دهه 1980، اپیدمی بیماری بروسلوز در برخی کشورها و مناطق به سرعت در حال افزایش است. بروسلوز انسانی در اکثر کشورهای خاورمیانه بومی است. سوریه، عراق، عربستان سعودی، ترکیه و ایران بالاترین میزان بروز این بیماری در جهان را دارند. طبق آخرین گزارش منتشر شده توسط وزارت بهداشت، سالیانه 15103 نفر یعنی 18/6 نفر از هر 100000 ایرانی به بروسلوز مبتلا می‌شوند. بالاترین میزان بروز سالانه در یمن (88/6 مورد/100000 نفر در سال)، سوریه (100000/40/6) و ایران (100000/18/6) در سال‌های 2014-2017 ثبت شده است (8).

اکثر مناطق ایران برای بروسلوز بومی به حساب می‌آیند، به ویژه مناطقی که انسان در تماس نزدیک با دام زندگی می‌کند. در مطالعه اخیر رستمی و همکاران

لاکتیک، به ویژه لاکتوباسیل ها و لاکتوکوکوس ها، ساکنان رایج دستگاه گوارش پستانداران هستند. این باکتری ها به دلیل فوایدی که برای سلامتی دارند، مورد توجه قرار گرفته اند (20). لاکتوکوکوس لاکتیس، به عنوان یک مدل از LAB، قادر است بدون کلونی زایی در روده زنده بماند. این میکروارگانیسم گرم مثبت و فاقد Lipopolysaccharide: LPS) و اندوتوکسین است (21). پروتئین های غشای خارجی گونه های بروسلا ابتدا در دهه 1980 مورد کاوش قرار گرفتند و به عنوان آنتی ژن های ایمنی زا و محافظ بالقوه شناسایی شدند (22). برخی از ویژگی های پروتئین های غشا خارجی بروسلا کاملا متمایز است و نقش مهمی در تعیین خصوصیات بروسلا ایفا می نمایند. در بررسی های انجام شده در سال 2019 گزارش شد که طیف وسیعی از Omp ها یا Outer membrane proteins باکتریایی با ایمنی زایی در *Brucella* مرتبط هستند، که شامل *Omp10*، *Omp16*، *Omp19*، *Omp25* و *Omp28* است (23). *Omp25* توسط ژن *Omp3a* کد می شود و جرم مولکولی آن 25 کیلو دالتون می باشد (24). هضم آنزیمی *Omp25* با استفاده از تکنیک Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) نشان داد که *Omp25* در گونه های مختلف بروسلا بسیار حفاظت شده است (25). آنتی ژن *Omp25* یکی از اصلی ترین آنتی ژن های بروسلا است. بیماری زایی گونه های مختلف بروسلا با ژن *Omp25* در آن ها ناک اوت شده، در موش ها، بسیار ضعیف است (26). چندین گزارش نشان داده است که تجویز واکسن ژنی *Omp25* یا واکسن نو ترکیب *rOmp25* علیه *B. melitensi* یا *B. abortus* باعث ایجاد محافظت در موش می شود. این یافته ها *Omp25* را به عنوان یک هدف مناسب برای طراحی و تولید واکسن پروبیوتیک تأیید می کنند (27). توالی نوکلئوتیدی *Omp25* با اندازه 693bp از سویه A9 *B. abortus* به دست آمده و در NCBI ثبت شده است (28). هدف از مطالعه حاضر بیان پروتئین *Omp25* بروسلا آبورتوس

نمی شوند. این امر می تواند منجر به تغییرات قابل توجهی در میزان بروز در مناطق مختلف شود. تفاوت در بروز به شرایط جمعیتی، شغلی و اجتماعی - اقتصادی نسبت داده می شود. بنابراین، به نظر می رسد که وضعیت بیماری فعلی به ویژه در مناطق روستایی با موقعیت های اجتماعی - اقتصادی پایین و در میان آن دسته از مشاغلی که در معرض دام هستند، مانند دامپروری، بسیار پیچیده تر است (14). برخی از واکسن های زنده ضعیف شده که در حال حاضر برای تب مالت استفاده می شوند، عبارتند از واکسن S19 که در گوساله های ماده 6-3 ماهه فقط یک بار مورد استفاده قرار می گیرد، واکسن Rev.I که جهت پیشگیری از بیماری بروسلا در گوسفند و بز مورد استفاده قرار می گیرد و واکسن RB51 که برای گاوهای با سن بیش از شش ماه مناسب است (15). استفاده از واکسن های زنده ضعیف شده علی رغم عملکرد خوب آن ها در کنترل بیماری بروسلا در حیوانات، معایبی مانند آلوده کردن شیر، خطر برای انسان، سقط جنین در حیوانات باردار و عود مجدد بیماری در موجود زنده را به دنبال دارند (16). با توجه به معایب واکسن های زنده ضعیف شده، به نظر می رسد جایگزینی این واکسن ها توسط واکسن های زیر واحدی به دلیل پیشرفت و ایمنی زایی خوبی که دارند مناسب است (17). سیستم واکسن زنده ژنتیکی مهندسی شده (Genetically Engineered Live Vaccine: GELV) روشی مناسب برای انتقال و تحویل واکسن است. برای تولید GELV، باکتری های غیر بیماری زا مانند پروبیوتیک ها به عنوان حامل واکسن توصیه می شوند (18). در میان پروبیوتیک ها، LAB یا *Lactic Acid Bacteria* به دلیل ایمنی ذاتی پایین و مزایای زیادی که نسبت به واکسیناسیون های سیستمیک فعلی دارند، کاندیدای مناسبی برای GELV هستند. پروبیوتیک ها پتانسیل قابل توجهی برای ایمنی زایی خوراکی و مخاطی دارند. بیان ترکیبات فعال در سطح سلول LAB می تواند پاسخ های ایمنی مناسب را تحریک کند (19). باکتری های اسید

در باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، روش گردآوری اطلاعات از نوع مطالعات کتابخانه‌ای و تجربیات آزمایشگاهی است. لازم به ذکر است که تمام کارهای پژوهشی این مطالعه با رعایت کامل اصول اخلاقی (کد اخلاق: IR.IAU.SHK.REC.1401.001) انجام گرفته است. *Omp25* در مطالعات مختلف به عنوان یک آنتی‌ژن ایده‌آل با توانایی آنتی ژنیسیته بالا به عنوان کاندیدا برای ساخت واکسن نوترکیب علیه بروسلوزیس مطرح است (29). از ژن کدکننده‌ی این پروتئین در ساخت واکسن نوترکیب پروبیوتیک استفاده شده است. اطلاعات مربوط به توالی وکتور القایی pNZ8148 از سایت Addgene به دست آمد و با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده مشخص شد. اندازه این وکتور 3167bp است و دارای یک مارکر مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان شاخص انتخاب گر و یک جایگاه برش چندگانه برای ورود ژن است. در بالا دست Multiple Cloning Site (MSC) یک پروموتور Pnis و در پایین دست آن یک خاتمه گر وجود دارد. *Omp25* با کد دسترسی JQ839278 به طول 693bp همراه یک توالی سیگنال پپتید 31aa به نام *Usp45* با کد دسترسی ABY84357 انتخاب شد و وکتور نهایی طراحی گردید. سپس ژن به همراه سیگنال پپتید به صورت سنتتیک در وکتور القایی pNZ8148 توسط شرکت GENEray چین کلون شد. در نهایت وکتور نوترکیب pNZ8148-*Usp45-Omp25* با اندازه 3690bp با استفاده از جایگاه‌های برش *KpnI* و *XbaI* ساخته شد.

تأیید صحت کلون شدن *Omp25* در وکتور pNZ8148 و واکنش PCR برای ردیابی *Omp25* به وسیله پرایمرهای اختصاصی و برنامه دمایی اشاره شده در ذیل انجام و محصول PCR روی ژل آگارز 1 درصد، الکتروفورز

شد. هضم آنزیمی و توالی‌یابی وکتور نوترکیب توسط شرکت GENEray با استفاده از آنزیم‌های برشی *KpnI* و *XbaI* انجام شده و نتایج دریافت شدند.

ترانسفورماسیون *E.coli* سویه *TOP10F* با pNZ8148-*Usp45-Omp25*

تکثیر وکتور با روش استاندارد کلسیم کلراید بر اساس روش Cohen انجام شد (30). باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli: E. coli*) سویه *TOP10F* (مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران) به عنوان میزبان کلونینگ برای تکثیر وکتور نوترکیب pNZ8148-*Usp45-Omp25* مورد استفاده قرار گرفت. ترانسفورماسیون طی دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول ابتدا میزان رشد باکتری‌ها با اسپکتروفتومتر (Jenway، انگلستان) سنجیده شد. سپس رسوب باکتری در محلول کلسیم کلراید 0/1 مولار (سیگما، آلمان) سرد و استریل در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به حالت سوسپانسیون در آمد. جهت ترانسفورماسیون، مقدار 10 میکرولیتر وکتور نوترکیب (غلظت 0/2 میکروگرم/میکرولیتر) به 100 میکرولیتر سوسپانسیون باکتری‌های مستعد (OD600=0/3) افزوده شد. در مرحله دوم به باکتری‌های مستعدی که وکتور نوترکیب به آن‌ها اضافه شده است، یک شوک حرارتی 42 درجه سانتی‌گراد به مدت 90 ثانیه و بلافاصله یک شوک سرد 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 4 دقیقه داده شد. سپس 1000 میکرولیتر محیط LB-Broth (مرکز، آلمان) فاقد آنتی‌بیوتیک به سوسپانسیون باکتری اضافه شد. پس از 1 ساعت نگهداری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد بر روی محیط LB-Agar (مرکز، آلمان) حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (Chloramphenicol: CM)، (سیگما، آلمان) با غلظت 25 mg/mL کشت داده شد. باکتری‌هایی که وکتور نوترکیب pNZ8148-*Usp45-Omp25* را دریافت نموده بودند، به دلیل وجود ژن مقاومت به کلرامفنیکل به عنوان شاخص انتخابی در این وکتور، روی محیط

جدول شماره 1: توالی و مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای *Omp25*

| پرایرها        | توالی (5' to 3')          | دمای اتصال پرایمر | طول محصول |
|----------------|---------------------------|-------------------|-----------|
| <i>Omp25-F</i> | ATGACCTTTAAAAATTTACTTGGTG | 52 °c             | 693bp     |
| <i>Omp25-R</i> | TTAAAAATTTATAAGGACACCAAG  | 52 °c             |           |

ترانسفورماسیون لاکتوکوکوس لاکتیس با *pNZ8148-Usp45-Omp25*

پس از تأیید صحت و غلظت و کنتور نوترکیب، ترانسفورم کردن لاکتوکوکوس لاکتیس انجام شد. به منظور ترانسفورم کردن *L.lactis* ابتدا سویه *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی (PTCC:1336)، ایران) تهیه شد. دما و زمان رشد این باکتری 30 درجه سانتی‌گراد و 72 ساعت می‌باشد. شناسایی اولیه سویه لاکتوکوکوس لاکتیس جهت تأیید سویه مورد نظر توسط دو روش رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش کاتالاز انجام شد. برای ترانسفورم کردن این باکتری از روش الکتروپوریشن (دستگاه *Pulser Gene Xcell*، Bio-Rad، آمریکا) استفاده شد. دو محلول برای مستعد کردن باکتری یکی قبل از الکتروپوریشن (محلول شماره 1) و یکی برای بعد از الکتروپوریشن (محلول شماره 2) آماده شد. اطلاعات محلول‌ها در جدول شماره 2 آورده شده است. برای انجام ترانسفورماسیون رسوب باکتری طی دو مرحله با 1000 و 700 میکرولیتر از محلول شماره 1 سرد و استریل شستشو داده شد. بعد از هر بار شستشو، رسوب‌گیری توسط سانتریفیوژ در 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه با سرعت 4000 rpm انجام شد. رسوب حاصل از مرحله دوم شستشو با 500 میکرولیتر از محلول شماره 1 حل شد. 394 میکرولیتر ( $OD_{600}=0/3-0/2$ ) از باکتری مستعد در کووت 0/4 (Bio-Rad، آمریکا) سرد و استریل مخصوص الکتروپوریشن ریخته شد. سپس مقدار 6 میکرولیتر از وکتور القایی نوترکیب *pNZ8148-Usp45-Omp25* و وکتور فاقد ژن هدف (غلظت 0/2 میکروگرم/میکرولیتر) جداگانه، در شرایط استریل و زیر هود به باکتری اضافه شد تا حجم نهایی به 400 میکرولیتر برسد. کووت‌ها به مدت

حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل رشد کرده و تشکیل کلنی دادند. خالص‌سازی و کنتور به کمک کیت Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN)، تایوان) انجام گرفت. تأیید حضور و کنتور با استفاده از Loading Buffer 6x (یکتا تجهیز آزما، ایران) روی ژل آگارز به همراه مارکر 1000bp انجام شد. به منظور تعیین غلظت و خلوص و کنتور نوترکیب استخراج شده، از دستگاه نانودراپ (ترمو ساینترفیک، آمریکا) استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی با کمک نرم‌افزار Gene Runner version 3.05 برای تکثیر ژن *Omp25* طراحی و جهت تولید به شرکت سیناژن ارسال شدند. صحت اتصال پرایرها به توالی ژن مربوطه با استفاده از BLAST کردن مورد بررسی قرار گرفت. از این پرایرها (جدول شماره 1) برای تأیید صحت ترانسفورماسیون در سطح DNA به کمک تکنیک PCR استفاده شد. دمای بهینه اتصال با انجام شیب دمایی در طیف 49 تا 56 درجه سانتی‌گراد تعیین شد. واکنش PCR در حجم نهایی 20 میکرولیتر حاوی 2 میکرولیتر از بافر PCR 10x (یکتا تجهیز آزما، ایران)، 2 میلی‌مولار  $MgCl_2$  (یکتا تجهیز آزما، ایران)، 200 میکرومولار dNTPs (یکتا تجهیز آزما، ایران)، 10 پیکومول از هر یک از پرایرها (سیناژن، ایران)، 100 نانوگرم از DNA پلاسمید و 1 واحد آنزیم DNA پلی‌مراز Taq (یکتا تجهیز آزما، ایران) در دستگاه ترمال سایکلر گرادینت (پندورف، آلمان) انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل، یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه و در ادامه 30 مرحله تکراری شامل 94 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، 52 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و 72 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت طولیل شدن نهایی یک مرحله‌ای در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیم بروماید، الکتروفورز شد و باندها با دستگاه عکس‌برداری از ژل (UVI Tech، انگلستان)، مشاهده و ثبت گردید.

10 دقیقه روی یخ قرار گرفتند و سپس در دستگاه الکتروپوریشن قرار داده شدند. چهار مرتبه پالس بهینه با ظرفیت: 25 میکروفاراد، مقاومت: 200 اهم، ولتاژ: 2500 ولت، زمان: 4-5 میکروثانیه، کووت 0/4 به کووت حاوی باکتری و وکتور نوترکیب و کووت حاوی باکتری و وکتور فاقد ژن هدف داده شد. به عبارتی، همزمان با ترانسفورم کردن لاکتوکوکوس لاکتیس با وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp25 در یک کووت جداگانه لاکتوکوکوس لاکتیس با وکتور pNZ8148 فاقد Omp25 ترانسفورم شد.

جدول شماره 2: مشخصات محلول‌های لازم برای تهیه باکتری مستعد لاکتوکوکوس لاکتیس

| محلول‌های مستعد سازی لاکتوکوکوس لاکتیس | مشخصات اجزای محلول‌ها   | نوع ساخت محلول‌های 1 و 2                                     |
|--|---|--|
| محلول 1: قبل از الکتروپوریشن           | 200 میلی مولار سوکروز<br>70 میلی مولار EDTA<br>300 میلی مولار کلاسین  | 86 گرم سوکروز<br>20 گرم EDTA<br>25 گرم کلاسین                |
| محلول 2: بعد از الکتروپوریشن           | 7 میلی مولار لاکتوز<br>7 میلی مولار کلرید کلسیم<br>90 میلی مولار کلرید منیزیم   | 25 گرم لاکتوز<br>111 گرم کلرید کلسیم<br>9/5 گرم کلرید منیزیم |
|  | در 500 میلی لیتر آب مقطر حل شدند و حجم نهایی با آب مقطر به 1000 میلی لیتر رسید و در نهایت برای استریل شدن اتوکلاو شد. |  |
|  | در 500 میلی لیتر محیط M17-Broth حل شدند و حجم نهایی با محیط مایع M17 به 1000 میلی لیتر رسید و با فیلتر 0/2 استریل شد. |  |

بلافاصله بعد از الکتروپوریشن به هر دو کووت حاوی باکتری و وکتور نوترکیب و باکتری و وکتور فاقد ژن هدف، 1 دقیقه شوک سرد داده شد. محتویات کووت‌ها به میکروتیوب استریل جدید انتقال یافت. به محتویات میکروتیوب‌های جدید 500 میکرولیتر محلول شماره 2 اضافه شد (1 ساعت قبل از استفاده، محلول 2 در 30 درجه سانتی گراد نگهداری شود) و به مدت 1/5 ساعت در 30 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس باکتری‌های الکتروپوریت شده بر روی محیط M17-Agar (کیولب، کانادا) حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (25 mg/mL) کشت داده شدند و به مدت 72 ساعت در دمای 30 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پلیت کنترل منفی که شامل

سوسپانسیون باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس الکتروپوریت شده بدون اضافه کردن وکتور نیز روی محیط M17-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل کشت داده شد.

استخراج DNA از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس و ردیابی Omp25

برای استخراج DNA از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) استفاده شد. به منظور ردیابی Omp25 در DNA استخراج شده، از واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای Omp25 استفاده شد.

ابتدا برای القای بیان ژن Omp25 در وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp25 از 100 ng/mL nisin به مدت 6 ساعت استفاده شد.

بیان ژن Omp25 در سطح RNA با تکنیک Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) سنجیده شد. در ابتدا RNA باکتری به وسیله کیت استخراج RNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) استخراج شد. سپس تیمار حذف DNA با DNase I (یکتا تجهیز آزما، ایران) انجام شد. تیمار حذف DNA به صورت زیر انجام پذیرفت.

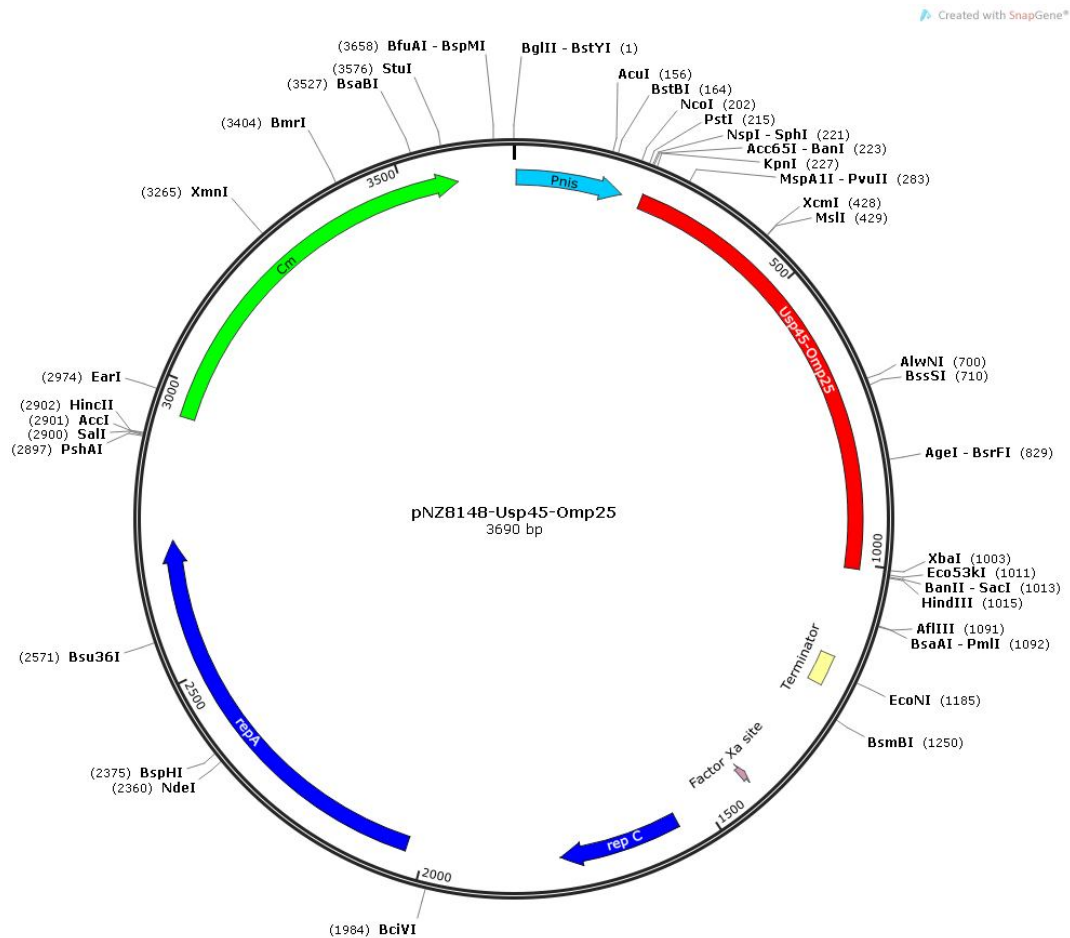
ابتدا 0/5 میکرولیتر DNaseI (6 واحد/ میکرولیتر) و 1 میکرولیتر بافر 10 x DNaseI (یکتا تجهیز آزما، ایران) به 5 میکرولیتر از RNA استخراج شده اضافه شد. سپس با اضافه کردن 3/5 میکرولیتر DEPC Water (آر کا طب روهم، ایران) حجم نهایی به 10 میکرولیتر رسید و 30 دقیقه در 37 درجه سانتی گراد دما دهی شد. 1 میکرولیتر Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) اضافه و 10 دقیقه در 65 درجه سانتی گراد دما دهی شد. در نهایت cDNA به وسیله کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) سنتز شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Omp25 و برنامه دمایی اشاره شده در متن، تأیید بیان ژن Omp25 در سطح RNA به وسیله RT-PCR انجام پذیرفت.

میکرولیتر نشانگر پروتئین (سیتومتین ژن، ایران) وارد شد و الکتروفورز عمودی با ولتاژ 200 ولت به مدت 3 ساعت انجام شد. پس از الکتروفورز، ژل با Coomassie Brilliant Blue G250 (سیگما، آلمان) رنگ آمیزی و عکس برداری شد.

## یافته ها

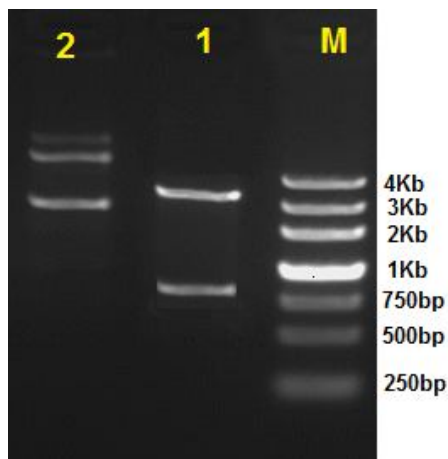
نقشه ژنی وکتور نو ترکیب تصویر شماره 1، شماتیک وکتور طراحی شده و جایگاه قرارگیری ژن *Omp25* و شاخص انتخابی کلرامفنیکل را نشان می دهد.

برای بررسی تولید محصول ژن *Omp25* کلون شده در وکتور بیانی مبتنی بر القا به وسیله نیسین pNZ8148 در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس از روش الکتروفورز روی ژل عمودی Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) استفاده شد. به دلیل وجود سیگنال پپتید Usp45 در وکتور به منظور ترشح باکتری، از رسوب و سوپرناتانت باکتری کشت شده در GM17 Broth (M17 broth+0.5% Glucose) برای بررسی وجود پروتئین استفاده شد. رسوب و سوپرناتانت باکتری با بافر بارگذاری نمونه مخلوط شد. سوسپانسیون رسوب و سوپرناتانت حاصل با سرنگ همیلتون به چاهک های ژل وارد شد. هم چنین، در یکی از چاهک ها 5

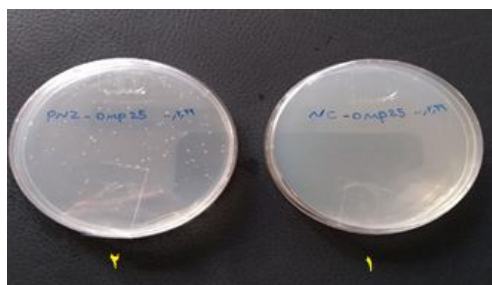


تصویر شماره 1: نقشه ژنی وکتور نو ترکیب pNZ8148-Usp45-Omp25





تصویر شماره 3: هضم آنزیمی دو گانه، M: مارکر، 1: هضم آنزیمی دو گانه که باند 786bp ژن به همراه سیگنال پپتید (93+693bp) را نشان می‌دهد، 2: باندها به ترتیب از بالا به پایین Nicked circular form و Linear form و Circular supercoiled form مربوط به وکتور هستند.



تصویر شماره 4: ترانسفورماسیون *E. coli* سویه TOP10F. 1: عدم رشد باکتری ترانسفورم نشده روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک است (کنترل منفی). 2: ترانسفورماسیون موفقیت آمیز باکتری *E. coli* با وکتور نوترکیب و رشد آن روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان شاخص انتخابی است.

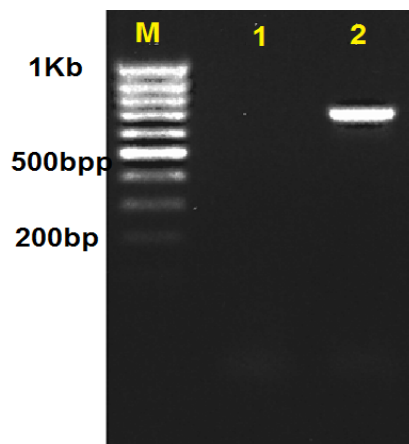
#### استخراج و تخلیص pNZ8148-Usp45-Omp25

##### کیت FAVORGEN

اشریشیا کلی ترانسفورم شده، در محیط LB-Broth حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل کشت داده شد و سپس استخراج پلاسمید با کیت استخراج پلاسمید (FAVORGEN، تایوان) انجام شد. تعیین غلظت پلاسمید استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ بیانگر کیفیت و میزان مناسب پلاسمیدهای استخراج شده بود.

#### تأیید صحت وکتور

نتیجه واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *Omp25*، به منظور تأیید حضور ژن *Omp25* در وکتور pNZ8148 مشاهده یک باند 693bp روی ژل آگارز بود که تأییدی بر نوترکیب بودن وکتور pNZ8148 است (تصویر شماره 2).



تصویر شماره 2: از سمت چپ، M: مارکر 100bp، 1: کنترل منفی، 2: باند 693bp ژن *Omp25*

#### صحت قرار گرفتن ژن *Omp25* به همراه سیگنال

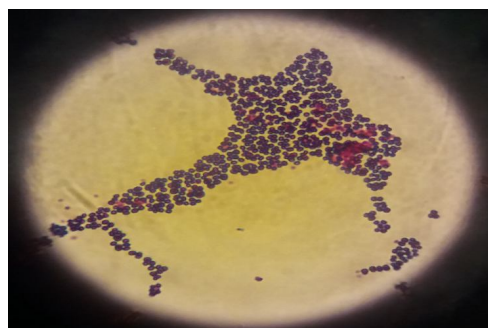
پپتید Usp45 در وکتور نوترکیب pNZ8148 توسط شرکت GENERay با استفاده از روش هضم آنزیمی دو گانه (با کمک آنزیم‌های محدودکننده *XbaI* و *KpnI*) و توالی‌یابی وکتور نوترکیب pNZ8148-*Omp25-Usp45* تأیید شد و نتیجه به صورت عکس ژل ارسال شد (تصویر شماره 3).

#### ترانسفورماسیون *E. coli* سویه TOP10F با pNZ8148-*Omp25-Usp45*

ترانسفورم کردن باکتری اشریشیا کلی با موفقیت انجام شد. نتایج کشت روی محیط LB-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و کنترل منفی، نشان‌دهنده موفقیت آمیز بودن ترانسفورماسیون باکتری‌ها برای انجام ادامه آزمایش‌ها بوده است (تصویر شماره 4).

شناسایی و تأیید لاکتوکوکوس لاکتیس

پس از انجام رنگ آمیزی گرم، لام زیر میکروسکوپ بررسی و با توجه به مورفولوژی کوکسی و رنگ بنفش باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس، گرم مثبت بودن آن تأیید شد (تصویر شماره 5) برای انجام آزمایش کاتالاز از آب اکسیژنه 3 درصد استفاده شد. باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس فاقد آنزیم کاتالاز است و نمی تواند پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل کند در نتیجه هیچ حبابی مشاهده نشد.



تصویر شماره 5: تصویر میکروسکوپ نوری از رنگ آمیزی لاکتوکوکوس لاکتیس با بزرگنمایی 100x

ترانسفورماسیون لاکتوکوکوس لاکتیس با

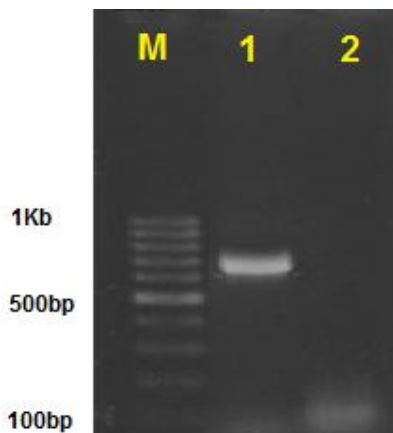
*pNZ8148-Usp45-Omp25*

برای انتقال و کتور نو ترکیب بیان کننده ژن *Omp25*

به باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس از روش الکتروپوریشن بهره گرفته شد. ترانسفورم کردن باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس به روش الکتروپوریشن با وکتور *pNZ8148-Usp45-Omp25* و *pNZ8148* فاقد ژن *Omp25* به دلیل وجود ژن مقاومت به CM در وکتور، سبب ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به کلرامفنیکل در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس شد. در نتیجه باکتری ترانسفورم شده با وکتور نو ترکیب و باکتری ترانسفورم شده با وکتور فاقد ژن هدف هر دو قادر به رشد روی محیط کشت M17-Agar حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل بودند. رشد باکتری های فاقد وکتور (کنترل منفی) روی محیط حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل مشاهده نشد.

ردیابی وکتور نو ترکیب و تأیید بیان *Omp25* در لاکتوکوکوس لاکتیس

برای تأیید بیان ژن در سطح DNA با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصی، باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس در یافت کننده وکتور *pNZ8148-Usp45-Omp25* و *pNZ8148* فاقد ژن هدف از لحاظ وجود ژن *Omp25* غربالگری شدند. باند 693bp ژن *Omp25* در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با *pNZ8148-Usp45-Omp25* توسط الکتروفورز روی ژل آگارز 1 درصد مشاهده و تأیید شد. در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با *pNZ8148* هیچ گونه باندهی مشاهده نگردید. برای تأیید بیان ژن در سطح RNA، RT-PCR انجام گرفت. نتیجه RT-PCR، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *Omp25*، مشاهده باند 693bp روی ژل بود (تصویر شماره 6).

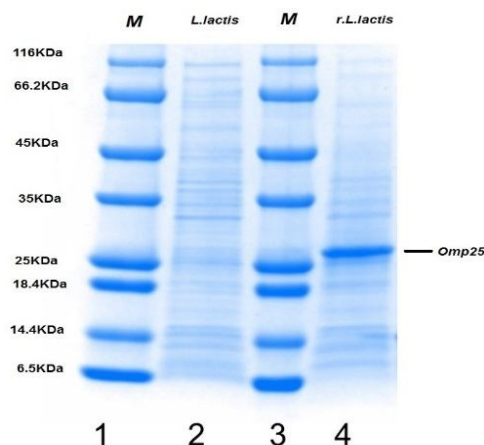


تصویر شماره 6: RT-PCR. M: مارکر، 1: بیانگر بیان ژن *Omp25* در سطح RNA و تشکیل باند 693bp در لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور نو ترکیب، 2: لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور فاقد ژن هدف

شناسایی و تأیید باند پروتئینی *Omp25* توسط SDS-PAGE

باند 25 کیلو دالتونی مربوط به محصول ژن *Omp25* در رسوب باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده مشاهده شد. باکتری لاکتوکوکوس

لاکتیس ترانسفورم نشده فاقد این باند پروتئینی است. بنابراین باکتری ترانسفورم شده یک باند پروتئینی 25 کیلو دالتونی اضافه نسبت به باکتری ترانسفورم نشده دارد (تصویر شماره 7).



تصویر شماره 7: تأیید حضور پروتئین نو ترکیب در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با استفاده از SDS-PAGE. 1: مارکر، 2: باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور فاقد ژن هدف، 3: مارکر، 4: باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور نو ترکیب pNZ8148-Usp45-Omp25

## بحث

در مطالعه حاضر، ترانسفورم کردن باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس با وکتور pNZ8148-Usp45-Omp25 به وسیله تکنیک الکتروپوریشن با موفقیت انجام شد. صحت بیان موفقیت آمیز ژن Omp25 در سطح RNA و پروتئین در باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس، با کمک RT-PCR و SDS-PAGE تأیید شد. با توجه به مطالعات و پژوهش های انجام شده، از این وکتور ژنی می توان در انجام تحقیقات واکسن علیه تب مالت استفاده کرد. به منظور نظارت، تشخیص، کنترل و درمان بیماری، باید راه حل هایی ارائه شود که قابل اجرا در کشورهای فقیری که این بیماری در آنها به یک مشکل جدی تبدیل شده است، باشند. رقم 500000 مورد ابتلا

در هر سال به طور متوالی در بررسی ها و مقالات تحقیقاتی ذکر می شود، با این حال تخمین زده می شود که این رقم بسیار بیش تر است (31). برنامه واکسیناسیون علیه تب مالت به واکسن های خوب نیاز دارد. دو واکسن زنده، *B. abortus* S19 و *B. melitensis* Rev. 1 در دهه های گذشته با موفقیت زیادی برای کنترل بروسلوز نشخوارکنندگان کوچک و گاو در سراسر جهان استفاده شده اند. *B. abortus* RB51 نیز به عنوان یک واکسن برای بروسلوز گاوی پیشنهاد شده است، اما هیچ یک از واکسن های موجود کامل نیستند. زیرا واکسن های موجود باعث سقط جنین در حیوانات هدف و غیر هدف می شوند، می توانند توسط حیوانات واکسینه شده دفع شوند و همه آنها باعث تب مالت در انسان شوند. براساس نتایج این مطالعه، به واکسن های مؤثر جدیدی نیاز است که برای حیوانات و جامعه بشری بی خطر باشند (32).

یوسفی و همکاران در مطالعات خود در سال 2016 بیان کردند که کلون سازی، بیان و تجزیه و تحلیل مولکولی یک آنتی ژن انتخابی از *B. melitensis* به نام Omp25 به منظور طراحی یک واکسن نو ترکیب، علیه بیماری بروسلوز ایمنی زایی بسیار مناسبی دارد. به منظور تولید rOmp25، کلونینگ و بیان با موفقیت انجام شد و نتایج خوانش توالی و هم چنین SDS-PAGE و وسترن بلات، rOmp25 را تأیید کرد. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک نشان داد که ژن انتخاب شده، در گونه های مختلف بروسلا تقریباً مشابه است. ارزیابی پاسخ های ایمنی همورال و سلولی در برابر عفونت بروسلا ملتینسیس در موش ها، این آنتی ژن را به عنوان کاندید مناسبی برای واکسن های نو ترکیب زیر واحدی علیه تب مالت مطرح کرد (33).

چندین گزارش نشان داده است که تجویز واکسن ژنی Omp25 یا نو ترکیب rOmp25 علیه *B. melitensis* یا *B. abortus* در موش، باعث ایجاد محافظت می شود که نشان می دهد Omp25 می تواند هدف مناسبی برای طراحی واکسن در آینده باشد (34).

مطالعه Atabey و همکاران روی زنده ماندن سلولی و انتشار سیتوکین مرتبط با Th1 نشان می‌دهد که پروتئین Omp25 یک مولکول نامزد امیدوارکننده برای توسعه واکسن است (38).

در مطالعه Li و همکاران در سال 2021، اثرات سه پروتئین غشایی خارجی ارزیابی شد که شامل پروتئین‌های گونه‌های بروسلا (*Omp25*، *Omp10* و *Omp2a*) است. اثر این آنتی‌ژن‌ها بر مهار  $\beta$ -IFN توسط ELISA سنجیده شد. هر سه پروتئین *Omp25*، *Omp10*، و *Omp2a* می‌توانند تولید  $\beta$ -IFN را مهار کنند، اما *Omp25* مهارکنندگی بسیار بالاتری را نشان داد. این مطالعه IRF3 فسفریله شده را در سیتوپلاسم و هسته شناسایی کرد. نتایج نشان داد که IRF3 فسفریله شده در هسته به‌طور قابل توجهی در سلول‌های بیان‌کننده *Omp25* نسبت به سلول‌های بدون بیان *Omp25* کاهش یافته است. بنابراین، حدس زده می‌شود که *Omp25* با انتقال IRF3 به هسته تداخل ایجاد می‌کند. در نتیجه منجر به مهار رونویسی  $\beta$ -IFN می‌گردد (39).

در مطالعه‌ای که Luo و همکاران در سال 2018 انجام دادند، دریافتند که گاوهای آلوده به گونه‌های بروسلا در طول بررسی اپیدمیولوژیک به BoHV-1 و BoHV-4 حساس بودند. این پدیده ممکن است با برخی از اجزای گونه‌های بروسلا مرتبط باشد، که می‌تواند تکثیر PRV و HSV-1 را از طریق سرکوب بیان IFN $\beta$  ترویج کند. بنابراین، آن‌ها نقش *Omp25* را در این فرآیند بررسی کردند، زیرا *Omp25* در مهار فعالیت سلول‌های T و ماکروفاژها در مطالعات قبلی آن‌ها نقش داشته است (40).

در مطالعه Li و همکاران در سال 2022 نشان داده شد که *Omp25* در بین گونه‌های بروسلا حفاظت شده است. ناک اوت شدن ژن *Omp25* باعث کاهش حدت بیماری‌زایی بروسلا می‌شود. *Omp25* می‌تواند پاسخ‌های ایمنی Th1 و Th2 را القا کند و در ماکروفاژهایی که به بروسلا آلوده هستند، تولید TNF-a را مهار کند (41).

در مطالعه Liu و همکاران در سال 2020 بیان شد که برخی از سوش‌های LAB مانند لاکتوکوکوس لاکتیس که به عنوان پروبیوتیک شناخته می‌شوند و با تحریک سیستم ایمنی همراه هستند، به‌طور کلی بی‌خطر تلقی می‌شوند که استفاده از آن‌ها را به یک استراتژی واکسیناسیون مخاطی جالب و مؤثر تبدیل می‌کند. سیستم بیان ژن *L.lactis* به‌وسیله Nisin، که 25 سال پیش کشف شد، کنترل می‌شود. Nisin یک سیستم تولید پروتئین قوی و کاملاً تنظیم شده است که به مکانیسم تنظیم خودکار باکتری‌نرین بستگی دارد. در حال حاضر، این سیستم بیان ژن به‌طور گسترده‌ای برای بیان پروتئین‌های برون‌زا در باکتری‌های گرم مثبت استفاده می‌شود. *L.lactis* در ترکیب با سیستم NICE تنظیم شده، دارای کاربردهای مختلفی از جمله بیان آنتی‌ژن‌های بیماری‌زا (Ags) برای ایمن‌سازی از طریق سطوح مخاطی و تولید سیتوکین‌های دارویی برای درمان‌های پزشکی است (35).

رضایی و همکاران، پروتئین Omp16 را به دلیل آنتی‌ژنیته بالا، در دسترس بودن و حلقه‌های سطحی که توسط مطالعات جامع بیوانفورماتیک پیش‌بینی شده بود، به‌عنوان یک کاندید ایمنی‌زا برای تولید واکسن‌های موثر علیه بروسلا در آینده انتخاب کردند. ویژگی قابل توجه Omp16 انتخاب شده در این مطالعه، این است که به‌عنوان یک جزء آگروپروتئوم از باکتری بروسلا، در معرض قرار می‌گیرد و برای آنتی‌بادی‌های مونوکلونال قابل دسترسی است (36).

در مطالعه Sáez و همکاران، تولید و هدف قرار دادن برخی از پروتئین‌های درون سلولی بروسلا به‌عنوان مثال L7/L12، پروتئین شوک حرارتی GroEL، مس، روی سوپر اکسید دیسموتاز در *Lactococcus lactis* مورد بررسی قرار گرفته است. برخی از واکسن‌ها بر علیه بروسلا متکی به شناسایی آنتی‌ژن‌های ایمنی غالب بر اساس پروتئین‌های غشایی خارجی (OMPs) هستند که قادر به ایجاد یک پاسخ ایمنی موثر هستند (37).

باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس به وسیله الکتروپوریشن و بیان Omp25 در این باکتری پروبیوتیک، با تکیه بر خاصیت آنتی ژنیسته بالای محصول این ژن، به نظر می‌رسد می‌توان از Omp25 در مطالعات واکسن‌های زیر واحدی ژنتیکی علیه تب مالت استفاده کرد. همچنین به دلیل استفاده از سیستم زنده بیولوژیکی یعنی باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس برای انتقال آنتی ژن مورد نظر به عنوان واکسن به موجود زنده، بسیاری از مشکلات واکسن‌های سنتی و قدیمی اشاره شده در متن، حل شده و چشم‌انداز روشی از واکسن‌های نو ترکیب خوراکی را خواهیم داشت.

### سپاسگزاری

این مطالعه دستاورد پایان‌نامه دکتری است. پژوهشگران و نویسندگان این مطالعه بر خود لازم می‌دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران مرکز بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، به ویژه سرکار خانم دکتر فرانک عالی که ما را در به ثمر رساندن این مطالعه یاری کردند، به آگاهی برسانند. هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

در مطالعه محمودی و همکاران در سال 1396 در وصف اهمیت واکسن‌های نو ترکیب اشاره می‌شود که، یکی از راهبردهای واکسیناسیون که در تعدادی از بیماری‌ها بررسی شده، استفاده از DNA پلاسمیدی کد کننده پروتئین‌های آنتی ژنی است که یک راست به داخل سلول گیرنده تزریق می‌شود، در نتیجه سلول‌ها DNA را برداشت کرده و آنتی ژن پروتئینی کد شده توسط آن را بیان می‌کنند، که منجر به هر دو نوع پاسخ ایمنی هومورال و سلولی می‌شود. واکسن‌های DNA به سبب این که موجب بیان دراز مدت آنتی ژن می‌شوند و خاطره ایمنی دلخواه ایجاد می‌کنند به عنوان روش پیشگیری مطلوبی شناخته شده‌اند (42).

با بررسی یافته‌های پژوهشگران دیگر (موارد اشاره شده در بالا) به خوبی نشان داده می‌شود که مثال‌های متعددی از این دست در مورد نتایج مثبت واکسن‌های ژنی وجود دارد. در مطالعه حاضر، وکتور pNZ8148-Usp45-Omp25 سنتز و تایید نهایی شده است و از این وکتور می‌توان در انجام تحقیقات واکسن علیه تب مالت استفاده کرد. با توجه به سنتز وکتور pNZ8148-Usp45-Omp25 و ترانسفورم کردن موفقیت آمیز

### References

1. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 1997; 3(2): 213-221.
2. Hou H, Liu X, Peng Q. The advances in brucellosis vaccines. *Vaccine* 2019; 37(30): 3981-3988.
3. Khan MZ, Zahoor M. An Overview of Brucellosis in Cattle and Humans, and its Serological and Molecular Diagnosis in Control Strategies. *Trop Med Infect Dis* 2018; 3(2): 65.
4. Dadar M, Tiwari R, Sharun K, Dhama K. Importance of brucellosis control programs of livestock on the improvement of one health. *Vet Q* 2021; 41(1): 137-151.
5. Dagli O, Dokur M, Guzeldag G, Özmen Y, et al. Acute renal failure due to *Brucella melitensis*. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5(12): 893-895.
6. Ferrero MC, Alonso Paiva IM, Muñoz González F, Baldi PC. Pathogenesis and immune response in *Brucella* infection acquired by the respiratory route. *Microbes Infect* 2020; 22(9): 407-415.
7. Scholz HC, Revilla-Fernández S, Dahouk SA, Hammerl JA, Zygmunt MS, Cloeckert A, et al. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(5): 2090-2098.

8. Bagheri Nejad R, Krecek RC, Khalaf OH, Hailat N, Arenas-Gamboa AM. Brucellosis in the Middle East: Current situation and a pathway forward. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14(5): e0008071.
9. Rostami H, Mehrabi Tavana A, Tavakoli HR, Tutunchian M. Prevalence study of brucellosis in Iranian military forces during 2001-2009. *Journal of Health Policy and Sustainable Health* 2015; 2(2): 191-194.
10. Kassiri H, Amani H, Lotfi M. Epidemiological, laboratory, diagnostic and public health aspects of human brucellosis in Western Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2013; 3(8): 589-594.
11. Bokaie S, Sharifi L, Alizadeh H. Epidemiological survey of brucellosis in human and animals in Birjand, East of Iran. *Journal of Animal Veterinary Advances* 2008; 7(4): 460-463.
12. Zeinalian Dastjerdi M, Fadaei Nobari R, Ramazanpour J. Epidemiological features of human brucellosis in central Iran, 2006-2011. *Public Health* 2012; 126(12): 1058-1062.
13. Golshani M, Buozari S. A review of Brucellosis in Iran: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis, Control, and Prevention. *Iran Biomed J* 2017; 21(6): 349-359.
14. Mamani M, Majzoobi MM, Keramat F, Varmaghani N, Moghimbeigi A. Seroprevalence of Brucellosis in Butchers, Veterinarians and Slaughterhouse Workers in Hamadan, Western Iran. *J Res Health Sci* 2018; 18(1): e00406.
15. Ivanov AV, Salmakov KM, Olsen SC, Plumb GE. A live vaccine from *Brucella abortus* strain 82 for control of cattle brucellosis in the Russian Federation. *Anim Health Res Rev* 2011; 12(1): 113-121.
16. Avila-Granados LM, Garcia-Gonzalez DG, Zambrano-Varon JL, Arenas-Gamboa AM. Brucellosis in Colombia: Current Status and Challenges in the Control of an Endemic Disease. *Front Vet Sci* 2019; 6: 321.
17. Russo G, Pasquali P, Nenova R, Alexandrov T, Ralchev S, Vullo V. Reemergence of human and animal brucellosis, Bulgaria. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(2): 314-316.
18. Qin J, Wang X, Kong J, Ma C, Xu P. Construction of a food-grade cell surface display system for *Lactobacillus casei*. *Microbiol Res* 2014; 169(9-10): 733-740.
19. Song BF, Ju LZ, Li YJ, Tang LJ. Chromosomal insertions in the *Lactobacillus casei* upp gene that are useful for vaccine expression. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80(11): 3321-3326.
20. Daniel C, Poiret S, Dennin V, Boutillier D, Pot B. Bioluminescence imaging study of spatial and temporal persistence of *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* in living mice. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(4): 1086-1094.
21. Shirdast H, Ebrahimzadeh F, Taromchi AH, Mortazavi Y, Esmailzadeh A, Sekhavati MH. Recombinant *Lactococcus Lactis* Displaying Omp31 Antigen of *Brucella melitensis* Can Induce an Immunogenic Response in BALB/c Mice. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2021; 13(1): 80-89.
22. Paul S, Peddayelachagiri BV, Nagaraj S, Kingston JJ, Batra HV. Recombinant outer membrane protein 25c from *Brucella abortus* induces Th1 and Th2 mediated protection against *Brucella abortus* infection in mouse model. *Mol Immunol* 2018; 99: 9-18.
23. Masjedani Jezi F, Razavi S, Mirnejad R, Zamani K. Immunogenic and protective antigens of *Brucella* as vaccine candidates. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2019; 65: 29-36.

24. Vizcaíno N, Verger JM, Grayon M, Zygmunt MS, Cloeckert A. DNA polymorphism at the Omp-31 locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. *Microbiology (Reading)* 1997; 143( Pt 9): 2913-2921.
25. Cloeckert A, Verger JM, Grayon M. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology (Reading)* 1995; 141(Pt 9): 2111-2121.
26. Goel D, Bhatnagar R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/c mice from virulent *B. abortus* 544. *Mol Immunol* 2012; 51(2): 159-168.
27. Cui B, Liu W, Wang X, Chen Y, Du Q, Zhao X, et al. *Brucella Omp25* Upregulates miR-155, miR-21-5p, and miR-23b to Inhibit Interleukin-12 Production via Modulation of Programmed Death-1 Signaling in Human Monocyte/Macrophages. *Front Immunol* 2017; 8: 708.
28. Paul S, Peddayelachagiri BV, Nagaraj S, Konduru B, Batra HV. Protective and therapeutic efficacy study of divalent fusion protein rL7/L12-Omp25 against *B. abortus* 544 in presence of IFN $\gamma$ . *Appl Microbiol Biotechnol* 2018; 102(20): 8895-8907.
29. Carvalho TF, Haddad JP, Paixão TA, Santos RL. Meta-Analysis and Advancement of Brucellosis Vaccinology. *PLoS One* 2016; 11(11): e0166582.
30. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973; 70(11): 3240-3244.
31. O'Callaghan D. Human brucellosis: recent advances and future challenges. *Infect Dis Poverty* 2020; 9(1): 101.
32. Blasco JM, Molina-Flores B. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2011; 27(1): 95-104.
33. Yousefi S, Tahmoorespur M, Sekhavati MH. Cloning, expression and molecular analysis of Iranian *Brucella melitensis Omp25* gene for designing a subunit vaccine. *Res Pharm Sci* 2016; 11(5): 412-418.
34. Cui B, Liu W, Wang X, Chen Y, Du Q, Zhao X, et al. *Brucella Omp25* Upregulates miR-155, miR-21-5p, and miR-23b to Inhibit Interleukin-12 Production via Modulation of Programmed Death-1 Signaling in Human Monocyte/Macrophages. *Front Immunol* 2017; 8: 708.
35. Liu X, Qi L, Lv J, Zhang Z, Zhou P, Ma Z, et al. The immune response to a recombinant *Lactococcus lactis* oral vaccine against foot-and-mouth disease virus in mice. *Biotechnol Lett* 2020; 42(10): 1907-1917.
36. Rezaei M, Rabbani-Khorasgani M, Zarkesh-Esfahani SH, Emamzadeh R, Abtahi H, et al. Prediction of the Omp16 Epitopes for the Development of an Epitope-based Vaccine Against Brucellosis. *Infect Disord Drug Targets* 2019; 19(1): 36-45.
37. Sáez D, Fernández P, Rivera A, Andrews E, Oñate A, et al. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. *Vaccine* 2012; 30(7): 1283-1290.
38. Atabey T, Acar T, Derman S, Ordo E, Erdemir A, Taşlı PN, et al. In Vitro Evaluation of Immunogenicity of Recombinant OMP25 Protein Obtained from Endemic *Brucella abortus* Biovar 3 as Vaccine Candidate Molecule Against Animal Brucellosis. *Protein Pept Lett* 2021; 28(10): 1138-1147.

39. Li R, Liu W, Yin X, Zheng F, Wang Z, Wu X, et al. Brucella spp. *Omp25* Promotes Proteasome-Mediated cGAS Degradation to Attenuate IFN- $\beta$  Production. *Front Microbiol* 2021; 12: 702881.
40. Luo X, Zhang X, Wu X, Yang X, Han C, Wang Z, et al. Brucella Downregulates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  to Promote Intracellular Survival via *Omp25* Regulation of Different MicroRNAs in Porcine and Murine Macrophages. *Front Immunol* 2018; 8: 2013.
41. Li Z, Wang S, Wei S, Yang G, Zhang, Xi L, et al. Immunization with a combination of recombinant Brucella abortus proteins induces T helper immune response and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice. *Microb Biotechnol* 2022; 15(6): 1811-1823.
42. Mahmoudi Vashian Z, Doosti A. Cloning and Gene Expression of ureG Gene as a DNA Vaccine Candidate Against Helicobacter Pylori. *J Guilan Univ of Med Sci* 2017; 26(102): 20-29 (Persian).