

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

Somayeh Tirbakhsh Gouran¹,
Abbas Doosti²,
Mohammad-Saeid Jami^{3,4}

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

² Associate Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

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

⁴ 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 گوران¹عباس دوستی²محمد سعید جامی^{3,4}

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. ترانسفورمسیون 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 - پلی آکریل 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

از زمان کشف *Brucella melitensis* توسط David Bruce در سال 1887، بروسلوز یا تب مالت شناخته شد (1). بروسلوز نوعی بیماری مشترک بین انسان و دام است. این بیماری در بیش از 170 کشور و منطقه در

E-mail: abbasdoosti@yahoo.com

مؤلف مسئول: عباس دوستی - شهرکرد؛ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

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

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

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

4. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

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

سرتاسر جهان گسترش یافته است و یک نوع بیماری بومی در جوامع انسانی به حساب می آید که خسارات اقتصادی زیادی را در صنعت دامپروری ایجاد می کند (2). عامل بیماری بروسلاز باکتری بروسلا است. بروسلا 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، بروسلا به دو صورت حاد و مزمن باعث عفونت های سیستمیک می شود (5). بروسلاز یک بیماری ناتوان کننده 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 می شود. بروسلا به فاگوسیت ها و چندین سلول غیر فاگوسیتی که باعث بیماری مزمن می شوند، حمله می کند، در آن ها تکثیر می شود و زنده می ماند. بیماری مزمن می تواند عوارض شدیدی مانند استئوآرتیکولار، نوروبروسلاز و اندوکاردیت را ایجاد کند که مورد اخیر علت اصلی مرگ و میر نادر ناشی از بروسلاز انسانی است (6). بروسلا تا به امروز شامل 12 گونه پذیرفته شده است. فقط *B. melitensis*، *B. abortus*، *B. suis* و در موارد نادر *B. canis* به عنوان پاتوژن های انسانی معرفی شده اند (7). از اواخر دهه 1980، اپیدمی بیماری بروسلاز در برخی کشورها و مناطق به سرعت در حال افزایش است. بروسلاز 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 بروسلاز مبتلا می شوند. بالاترین میزان بروز سالانه در یمن (88/6 مورد/100000 نفر در سال)، سوریه (100000/40/6) و ایران (100000/18/6) در سال های 2014-2017 ثبت شده است (8).

اکثر مناطق ایران برای بروسلاز بومی به حساب می آیند، به ویژه مناطقی که انسان در تماس نزدیک با دام زندگی می کند. در مطالعه اخیر رستمی و همکاران

بر روی 1698 بیمار از 30 استان ایران، میانگین بروز بروسلاز 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 بروسلاز 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. هم چنین 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 بوده اند (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 بروسلاز بر حسب سن، میانگین سنی 31/3 سال توسط زینلیان دستجردی و همکاران گزارش شده است. شیوع بروسلاز در کشورهای صنعتی در مردان بیش تر 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 می دهد که این بیماری در نیمه اول سال که فصل زاد و ولد دام است، شیوع بیش تری دارد. میزان تب مالت در فصل بهار و تابستان به دلیل عواملی مانند تماس مستقیم بین دامداران و جنین های سقط شده و هم چنین مصرف لبنیات آلوده افزایش می یابد. در مقابل میزان ابتلا به این بیماری در نیمه دوم سال کاهش می یابد. تعیین الگوی فصلی بروسلاز در ایران با استفاده از متاآنالیز نشان داد که بیش ترین میزان بروز بروسلاز در فصل بهار و تابستان و کم ترین آن در زمستان و پاییز رخ داده است (13).

آمار واقعی بروسلاز ممکن است بسیار بیش تر از ارقام گزارش شده باشد زیرا داده ها اغلب ناقص هستند. به عنوان مثال، بررسی های آماری یک روستا در ایران بیانگر این است که بیش از 40 درصد از بیماران مبتلا به بروسلاز به مقامات نظارتی وزارت بهداشت گزارش

نمی‌شوند. این امر می‌تواند منجر به تغییرات قابل توجهی در میزان بروز در مناطق مختلف شود. تفاوت در بروز به شرایط جمعیتی، شغلی و اجتماعی-اقتصادی نسبت داده می‌شود. بنابراین، به نظر می‌رسد که وضعیت بیماری فعلی به ویژه در مناطق روستایی با موقعیت‌های اجتماعی-اقتصادی پایین و در میان آن دسته از مشاغلی که در معرض دام هستند، مانند دامپروری، بسیار پیچیده‌تر است (14). برخی از واکسن‌های زنده ضعیف شده که در حال حاضر برای تب مالت استفاده می‌شوند، عبارتند از واکسن S19 که در گوساله‌های ماده 3-6 ماهه فقط یک بار مورد استفاده قرار می‌گیرد، واکسن Rev.I که جهت پیشگیری از بیماری بروسلوز در گوسفند و بز مورد استفاده قرار می‌گیرد و واکسن RB51 که برای گاوهای با سن بیش از شش ماه مناسب است (15). استفاده از واکسن‌های زنده ضعیف شده علی‌رغم عملکرد خوب آن‌ها در کنترل بیماری بروسلوز 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 واکسن‌های زنده ضعیف شده، به نظر می‌رسد جایگزینی این واکسن‌ها توسط واکسن‌های 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، باکتری‌های غیر بیماری‌زا مانند پروبیوتیک‌ها به عنوان حامل واکسن توصیه می‌شوند (18). در میان پروبیوتیک‌ها، LAB یا *Lactic Acid Bacteria* به دلیل ایمنی زایی ذاتی پایین و مزایای زیادی که نسبت به واکسیناسیون‌های سیستمیک فعلی دارند، کاندیدای مناسبی برای GELV هستند. پروبیوتیک‌ها پتانسیل قابل توجهی برای ایمنی زایی خوراکی و مخاطی دارند. بیان ترکیبات فعال در سطح سلول LAB می‌تواند پاسخ‌های ایمنی مناسب را تحریک کند (19). باکتری‌های اسید

لاکتیک، به ویژه لاکتوباسیل‌ها و لاکتوکوکوس‌ها، ساکنان رایج دستگاه گوارش پستانداران هستند. این باکتری‌ها به دلیل فوایدی که برای سلامتی دارند، مورد توجه قرار گرفته‌اند (20). لاکتوکوکوس لاکتیس، به عنوان یک مدل از LAB، قادر است بدون کلونی‌زایی در روده زنده بماند. این میکروارگانیسم گرم مثبت و فاقد Lipopolysaccharide: LPS) و اندوتوکسین است (21). پروتئین‌های غشای خارجی گونه‌های بروسلا ابتدا در دهه 1980 مورد کاوش قرار گرفتند و به عنوان آنتی ژن‌های ایمنی‌زا و محافظ بالقوه شناسایی شدند (22). برخی از ویژگی‌های پروتئین‌های غشا خارجی بروسلا کاملاً متمایز است و نقش مهمی در تعیین خصوصیات بروسلا ایفا می‌نمایند. در بررسی‌های 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 Omp16، Omp10، Omp19، Omp25، Omp28 و Omp25 است (23). Omp25 توسط ژن Omp3a کد می‌شود و جرم مولکولی آن 25 کیلو دالتون می‌باشد (24). هضم آنزیمی Omp25 با استفاده از تکنیک Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) نشان داد که Omp25 در گونه‌های مختلف بروسلا بسیار حفاظت شده است (25). آنتی ژن Omp25 یکی از اصلی‌ترین آنتی ژن‌های بروسلا است. بیماری‌زایی گونه‌های مختلف بروسلا با Omp25 در آن‌ها ناکوت شده، در موش‌ها، بسیار ضعیف است (26). چندین گزارش نشان داده است که تجویز واکسن ژنی Omp25 یا واکسن نوترکیب rOmp25 علیه *B. melitensi* یا *B. abortus* باعث ایجاد محافظت در موش می‌شود. این یافته‌ها Omp25 را به عنوان یک هدف مناسب برای طراحی و تولید واکسن پروبیوتیک تأیید می‌کنند (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 آبرتوس

در باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، روش گردآوری اطلاعات از نوع مطالعات کتابخانه ای 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 آنتی ژن ایده آل با توانایی آنتی ژنیسیته بالا به عنوان کاندیدا برای ساخت واکسن نوترکیب علیه بروسلوزیس مطرح است (29). از ژن کدکننده 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 نرم افزار Gene Runner جایگاه برش آنزیم های محدود کننده مشخص شد. اندازه این وکتور 3167bp است و دارای یک مارکر مقاومت به آنتی بیوتیک 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 جایگاه های برش *KpnI* و *XbaI* ساخته شد.

تأیید صحت کلون شدن Omp25 در وکتور pNZ8148 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 توالی یابی وکتور نوترکیب توسط شرکت GENEray با استفاده از آنزیم های 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 باکتری ها با اسپکتروفتومتر (Jenway، انگلستان) سنجیده شد. سپس رسوب باکتری درمحلول کلسیم کلراید 0/1 مولار (سیگما، آلمان) سرد و استریل در دمای 4 درجه سانتی گراد به حالت سوسپانسیون در آمد. جهت ترانسفورماسیون، مقدار 10 میکرولیتر وکتور نوترکیب (غلظت 0/2 میکروگرم/میکرولیتر) به 100 میکرولیتر سوسپانسیون باکتری های مستعد (OD600=0/3) افزوده شد. در مرحله دوم به باکتری های مستعدی که وکتور نوترکیب به آن ها اضافه شده است، یک شوک حرارتی 42 درجه سانتی گراد به مدت 90 ثانیه و بلافاصله یک شوک سرد 4 درجه سانتی گراد به مدت 4 دقیقه داده شد. سپس 1000 میکرولیتر محیط LB-Broth (مرک، آلمان) فاقد آنتی بیوتیک به سوسپانسیون باکتری اضافه شد. پس از 1 ساعت نگهداری در دمای 37 درجه سانتی گراد بر روی محیط LB-Agar (مرک، آلمان) حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (Chloramphenicol: CM)، (سیگما، آلمان) با غلظت 25 mg/mL کشت داده شد. باکتری هایی 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

پرایمرها	توالی (5' to 3')	دمای اتصال پرایمر	طول محصول
Omp25-F	ATGACCTTTAAAAATTACTTGGTG	52 °C	698bp
Omp25-R	TTAAAAATTATAAGGCACACCAAG	52 °C	

ترانسفورماسیون لاکتوکوکوس لاکتیس با pNZ8148-
Usp45-Omp25

پس از تأیید صحت و غلظت و کتور نو ترکیب، 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 Bio-Rad، Pulser Gene Xcell، آمریکا) استفاده شد. دو محلول برای مستعد کردن باکتری یکی برای 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 (OD600=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 نو ترکیب 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 آنتی بیوتیک کلرامفنیکل رشد کرده و تشکیل کلنی دادند. خالص‌سازی وکتور به کمک کیت Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN)، تایوان) انجام گرفت. تأیید حضور وکتور 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 وکتور نو ترکیب 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 پرایمرها به توالی ژن مربوطه با استفاده از BLAST کردن مورد بررسی قرار گرفت. از این پرایمرها (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 MgCl2 (یکتا تجهیز آزما، ایران)، 200 میکرومولار dNTPs (یکتا تجهیز آزما، ایران)، 10 پیکومول از هر یک از پرایمرها (سیناژن، ایران)، 100 نانوگرم از DNA پلاسمید و 1 واحد آنزیم DNA پلی‌مراز Taq (یکتا تجهیز آزما، ایران) در دستگاه ترمال سایکلر گرادینانت (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 1 درصد حاوی اتیدیدیم 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 نو ترکیب و کووت حاوی باکتری و وکتور فاقد ژن هدف داده شد. به عبارتی، همزمان با ترانسفورم کردن لاکتوکوکوس لاکتیس با وکتور نو ترکیب 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 محلول ها	نحوه ساخت محلول های 1 و 2
محلول 1: قبل از الکتروپوریشن	200 میلی مولار سو کروژ EDTA 70 میلی مولار کلسیم 300 میلی مولار گلابین	86 گرم سو کروژ EDTA 20 گرم کلسیم 25 گرم گلابین 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 اتو کلاو شد.
محلول 2: بعد از الکتروپوریشن	7 میلی مولار لاکروژ 7 میلی مولار کلرید کلسیم 90 میلی مولار کلرید منیزیم	25 گرم لاکروژ 11 گرم کلرید کلسیم 9/5 گرم کلرید منیزیم 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 نو ترکیب 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 نو ترکیب 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.

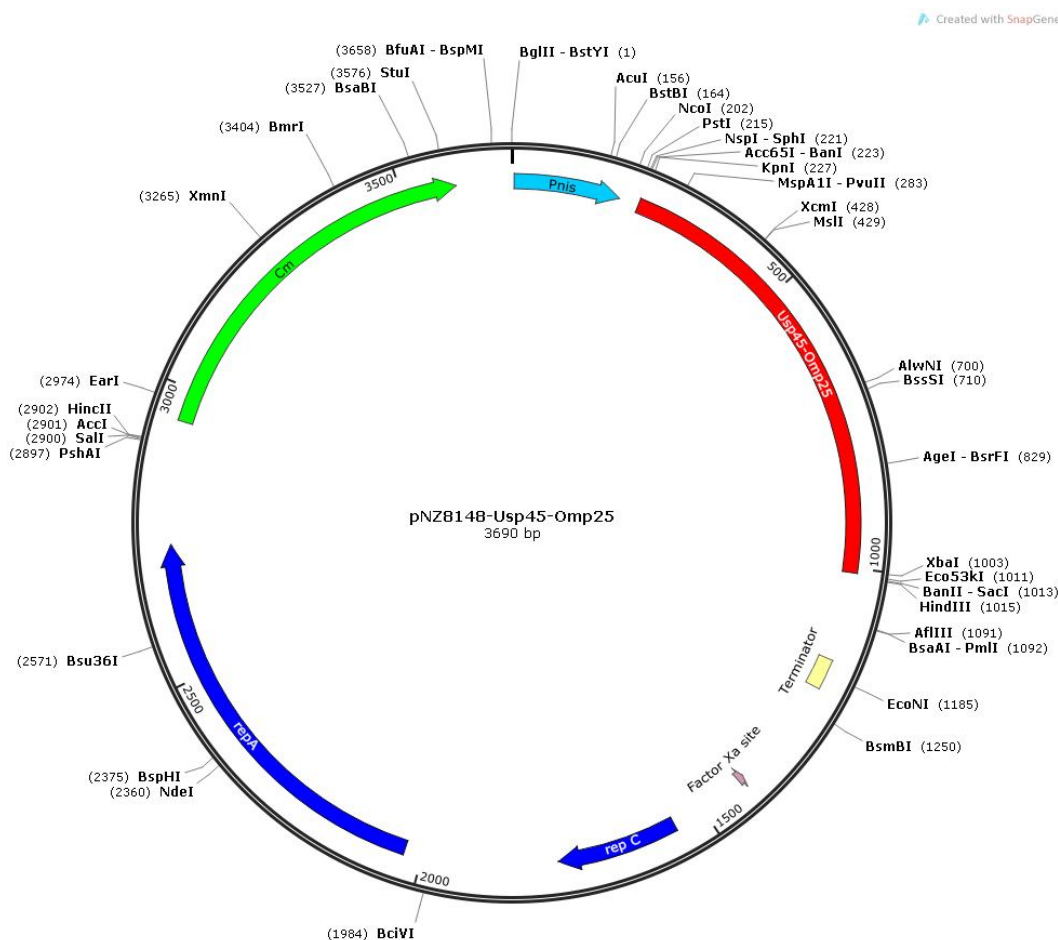
برای بررسی تولید محصول ژن *Omp25* کلون شده در وکتور بیانی مبتنی بر القا به وسیله نیسین pNZ8148 در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس از روش الکتروفورز روی ژل عمودی Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) استفاده شد. به دلیل وجود سیگنال پپتید Usp45 در وکتور به منظور ترشح باکتری، از 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 چاهک‌های ژل وارد شد. هم‌چنین، در یکی از چاهک‌ها 5

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.

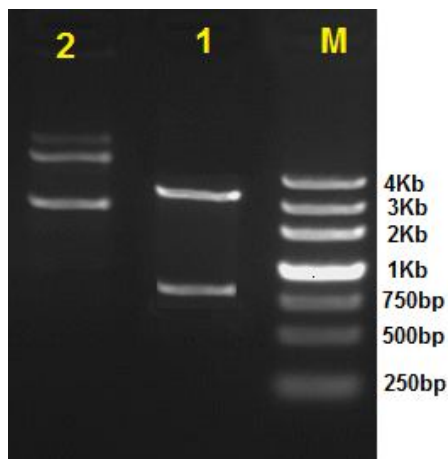
یافته ها

نقشه ژنی وکتور نو ترکیب

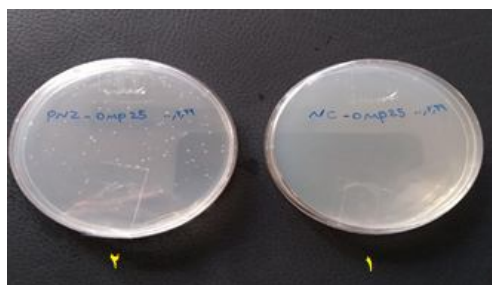
تصویر شماره 1، شماتیک وکتور طراحی شده و جایگاه قرارگیری ژن *Omp25* و شاخص انتخابی کلرامفنیکل را نشان می‌دهد.



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 موفقیت‌آمیز باکتری *E. coli* با وکتور نوترکیب و رشد آن روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان شاخص انتخابی است.

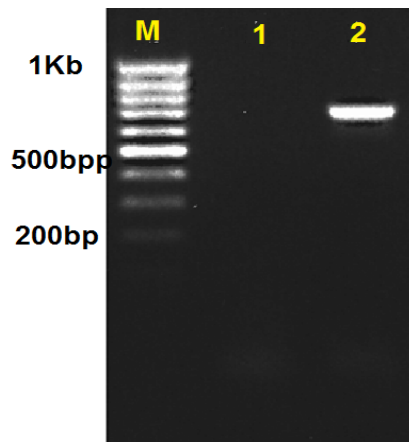
استخراج و تخلیص pNZ8148-Usp45-Omp25

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

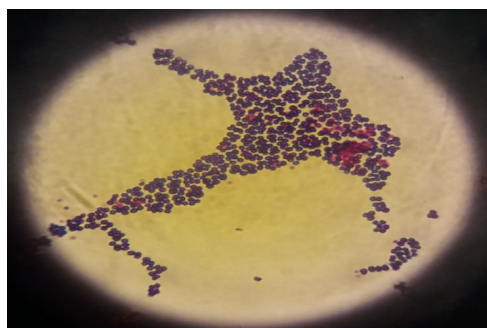
پپتید Usp45 در وکتور نوترکیب pNZ8148 توسط شرکت GENEray با استفاده از روش هضم آنزیمی دو گانه (با کمک آنزیم‌های محدودکننده *XbaI* و *KpnI*) و توالی‌یابی وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-Omp25 تأیید شد و نتیجه به صورت عکس ژل ارسال شد (تصویر شماره 3).

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

ترانسفورم کردن باکتری اشریشیا کلی با موفقیت انجام شد. نتایج کشت روی محیط LB-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و کنترل منفی، نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز 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.



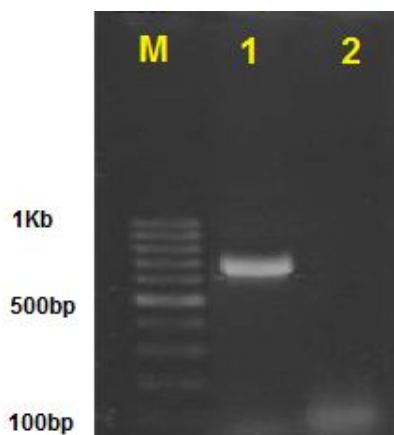
تصویر شماره 5: تصویر میکروسکوپ نوری از رنگ آمیزی لاکتوکوکوس لاکتیس با بزرگنمایی 100x

ترانسفورماسیون لاکتوکوکوس لاکتیس با pNZ8148-Usp45-Omp25

برای انتقال وکتور 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

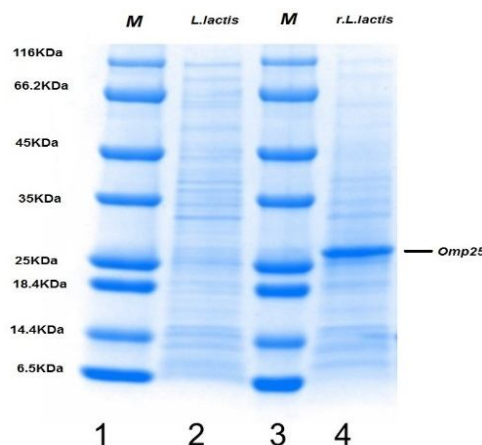
برای تأیید بیان ژن در سطح DNA با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصی، باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس در یافت کننده وکتور pNZ8148-Usp45-Omp25 و pNZ8148 فاقد ژن هدف از لحاظ وجود ژن Omp25 غربالگری شدند. باند 693bp ژن Omp25 در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با pNZ8148-Usp45-Omp25 توسط الکتروفورز روی ژل آگارز 1 درصد مشاهده و تأیید شد. در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با pNZ8148 هیچ گونه باندهای 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 آن ها 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، 1 *B. melitensis* Rev. و *B. abortus* S19 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 آن ها 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 ملیتینسیس 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).

در مطالعه Liu و همکاران در سال 2020 بیان شد که برخی از سوش های LAB مانند لاکتوکوکوس لاکتیس که به عنوان پروبیوتیک شناخته می شوند و با تحریک سیستم ایمنی همراه هستند، به طور کلی بی خطر تلقی می شوند که استفاده از آنها را به یک استراتژی واکسیناسیون مخاطی جالب و مؤثر تبدیل می کند. سیستم بیان ژن *L. lactis* به وسیله Nisin، که 25 سال پیش کشف شد، کنترل می شود. Nisin یک سیستم تولید پروتئین قوی و کاملاً تنظیم شده است که به مکانیسم تنظیم خودکار باکتریسیس نیستین بستگی دارد. در حال حاضر، این سیستم بیان ژن به طور گسترده ای برای بیان پروتئین های برونزا در باکتری های گرم مثبت استفاده می شود. *L. lactis* در ترکیب با سیستم NICE تنظیم شده، دارای کاربردهای مختلفی از جمله بیان آنتی ژن های بیماری زا (Ags) برای ایمن سازی از طریق سطوح مخاطی و تولید سیتوکین های دارویی برای درمان های پزشکی است (35).

رضایی و همکاران، پروتئین Omp16 را به دلیل آنتی ژنیسته بالا، در دسترس بودن و حلقه های سطحی که توسط مطالعات جامع بیوانفورماتیک پیش بینی شده بود، به عنوان یک کاندید ایمنی زا برای تولید واکسن های موثر علیه بروسلاز در آینده انتخاب کردند. ویژگی قابل توجه Omp16 انتخاب شده در این مطالعه، این است که به عنوان یک جزء اگزوپروتئوم از باکتری بروسلا، در معرض قرار می گیرد و برای آنتی بادی های مونوکلونال قابل دسترسی است (36).

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

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

در مطالعه Li و همکاران در سال 2021، اثرات سه پروتئین غشایی خارجی ارزیابی شد که شامل پروتئین های گونه های بروسلا (*Omp25*، *Omp10* و *Omp2a*) است. اثر این آنتی ژن ها بر مهار IFN- β توسط ELISA سنجیده شد. هر سه پروتئین *Omp25*، *Omp10* و *Omp2a* می توانند تولید IFN- β را مهار کنند، اما *Omp25* مهار کنندگی 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 به طور قابل توجهی در سلول های بیان کننده *Omp25* نسبت به سلول های بدون بیان *Omp25* کاهش یافته است. بنابراین، حدس زده می شود که *Omp25* با انتقال IRF3 به هسته تداخل ایجاد می کند. در نتیجه منجر به مهار رونویسی IFN- β می گردد (39).

در مطالعه ای که Luo و همکاران در سال 2018 انجام دادند، دریافتند که گاوهای آلوده به گونه های بروسلا در طول بررسی اپیدمیولوژیک به BoHV-1 و BoHV-4 حساس بودند. این پدیده ممکن است با برخی از اجزای گونه های بروسلا مرتبط باشد، که می توانند تکثیر PRV و HSV-1 را از طریق سرکوب بیان IFN β ترویج کنند. بنابراین، آن ها نقش *Omp25* را در این فرآیند بررسی کردند، زیرا *Omp25* در مهار فعالیت سلول های T و ماکروفاژها در مطالعات قبلی آن ها نقش داشته است (40).

در مطالعه Li و همکاران در سال 2022 نشان داده شد که *Omp25* در بین گونه های بروسلا حفاظت شده است. ناک اوت شدن ژن *Omp25* باعث کاهش حدت بیماری زایی بروسلا می شود. *Omp25* می تواند پاسخ های ایمنی Th1 و Th2 را القا کند و در ماکروفاژهایی که به بروسلا آلوده هستند، تولید TNF-a را مهار کند (41).

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. هیچ گونه 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, Esmaeilzadeh 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. Vizcaino 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 γ . *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- β 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- α 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).