Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۶، شماره ۳، بهار ۱۳۸٤

کلون‌کردن ژن آنتی‌ژن ایمنی‌بخش *Bacillus anthracis* در *Bacillus subtilis*

مجید مقبلی[1*] (M.Sc)، فریدون ملک‌زاده[1] (Ph.D)، سیروس زینلی[2] (Ph.D)، کاظم پریور[1] (Ph.D)، مهناز مظاهری‌اسدی[3] (Ph.D)

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

۲- انستیتوپاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی

۳- سازمان حفاظت محیط زیست ایران

چکیده

سابقه و هدف: آنتی‌ژن ایمنی‌بخش (Protective antigen) (PA) *Bacillus anthracis* به‌عنوان واکسن سیاه زخم مورد استفاده قرار می‌گیرد. کلون و بیان ژن PA در سویه‌های مختلف گزارش شده است که بیش‌ترین بیان، در *B. subtilis* تا ۱۶۰ µg/ml بوده است. هدف از این تحقیق کلون کردن ژن PA در ناقل بیان‌کننده pWB980 و انتقال آن به *B. subtilis* سویه WB600 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پلاسمید pXO1 از *B. anthracis* سویه Stern با روش قلیا جدا و ترادف بازی ۲/۴ kb ژن با استفاده از PCR تکثیر گردید. قطعه تکثیر یافته به‌طور مستقیم بر روی ناقل pTZ57R کلون و با استفاده از روش $CaCl_2$ به *E.coli* سویه DH5α انتقال یافت. سپس ژن با آنزیم‌های *Sal*I و *Kpn*1 از روی T-Vector جدا گردید. واکنش اتصال بین قطعه ژن خالص شده PA و ناقل pWB980 گذاشته شد و سپس با روش Electroporation در ۱۰۰۰ V به *B. subtilis* منتقل شد.

یافته‌ها: در این تحقیق توانستیم ژن PA را به‌وسیله PCR از *B. anthracis* سویهٔ Stern جدا و ابتدا در پلاسمید pTZ57R کلون کرده و وجود ژن با تجزیه و تحلیل آنزیمی، واکنش PCR و تعیین ترادف بازی (Sequencing) تأیید گردید. سپس ژن بر روی ناقل بیان‌کننده pWB980 و در *B. subtilis* کلون و وجود ژن در دو کلنی مقاوم به کانامایسین AMN1 و AMN3 با استفاده از تجزیه و تحلیل آنزیمی و واکنش PCR تأیید گردید.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق با تغییر در روش‌های مورد استفاده و استفاده از ناقل بیان‌کننده pWB980 توانستیم ژن PA را در *B. subtilis* کلون کنیم. این ژن برای اولین بار در ایران جدا و کلون شده است؛ هم‌چنین این تحقیق اولین کار کلون کردن ژن در میزبان *B. subtilis* در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Bacillus subtilis*، *Bacillus anthracis*، کلون کردن، آنتی‌ژن ایمنی‌بخش، pWB980، سیاه زخم

مقدمه

Bacillus anthracis یک باکتری اسپوردار و عامل بیماری سیاه زخم است. سویه غیربیماری‌زای فاقد کپسول دو نوع سم ترشح می‌کند که از سه جزء پروتئینی آنتی‌ژن ایمنی‌بخش یا Protective antigen (PA) (۸۳ KD)، عامل کشنده یا Lethal factor (LF) (۸۵ KD) و عامل خیز یا

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۵۳۷۴۷، نمابر: ۰۲۱-۲۲۴۵۳۷۴۷، E-mail: moghbeli44@yahoo.com

www.SID.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۳/۸/۹؛ تاریخ پذیرش: ۸۴/۴/۱۳

Archive of SID

Edema factor (EF) (۸۹ KD) تشکیل شده است [۹]. این پروتئین‌ها به ترتیب به‌وسیله ژن‌های cya، lef و pag رمزدهی می‌گردد [۱۷،۱۲،۲]. این ژن‌ها به‌وسیله پلاسمید pXOl (185kb) حمل می‌شود [۱۱]. هر کدام از دو فاکتور LF و EF همراه با PA اثر خود را اعمال می‌کنند. توکسین مرگ‌آور یعنی مخلوط PA و LF باعث مرگ حیوانات آزمایشگاهی بعد از تزریق درون رگی می‌شود. توکسین خیزدهنده یعنی ترکیب PA و EF تشکیل خیز در محل تزریق را القاء می‌کند. PA عامل اتصال و EF و LF آنزیم‌های درون سلولی هستند که سلول‌ها را از بین می‌برند [۱۰]. مولکول PA از چهار ناحیه (Domain) تشکیل شده است. PA از طریق انتهای کربوکسیل خود (ناحیه ۴) به گیرنده‌های سلولی متصل و باعث اتصال و ورود EF و LF به درون سلول می‌گردد [۳]. PA به تنهایی سمی نیست و یک پاسخ ایمنی محافظت کننده را القاء می‌کند. واکسن کنونی ضد سیاه زخم انسانی در انگلستان و امریکا بر اساس رسوب عصاره سلولی *B. anthracis* می‌باشد. واکسن آمریکایی VT 10-NP I-R صاف شده سلولی جذب شده روی ژل هیدروکسید آلومینیوم و واکسن انگلیسی عصاره سویه استرن 34F2 رسوب داده شده با زاج (آلوم) می‌باشد [۵]. از آن‌جا که سویه استرن در گروه‌بندی باکتری‌ها از نظر بیماری‌زایی جزو گروه سوم باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد، کار با آن جهت تولید واکسن نیاز به استفاده از تجهیزات خاص و گران قیمت دارد. هم‌چنین علاوه بر PA، این واکسن‌ها دارای مقادیر جزیی از EF و LF می‌باشند که هر کدام ممکن است اثرات جانبی در بعضی از افراد واکسینه شده ایجاد نماید [۱۵]. جهت غلبه بر این مشکلات کوشش‌هایی جهت تهیه و تولید PA نوترکیب در تعدادی از میزبان‌های باکتریایی شامل *Bacillus subtilis* [۷،۱]، *E. coli* [۱۴]، *Salmonella typhimorium* [۴]، *Lactobacillus casei* [۲۰] و میزبان‌های ویروسی شامل *Baculo virus* و *Vaccinia virus* [۶] انجام گردیده است. در میان این میزبان‌ها فقط *B. subtilis* قادر به بیان ژن در مقیاس بالا بود [۱]. گونه‌های باسیلوس به‌طور کلی و *B. subtilis* به‌طور ویژه به خاطر توانایی در ترشح پروتئین، به‌طور مستقیم در محلول رویی محیط کشت درحد گرم در لیتر دارای ارزش بالایی می‌باشد [۱۶]. ظرفیت ترشح بالا هم‌راه با شرایط کشت راحت و ایمنی مناسب، *B. subtilis* را به عنوان میزبانی مهم برای ترشح مقدار بالایی از دسته وسیعی از پروتئین‌های هترولوگ قرارداده است [۱۶]. *B. subtilis* هفت پروتئاز خارج سلولی به محیط کشت ترشح می‌کند. پروتئین‌های هترولوگ اغلب به شدت به این پروتئازها حساس هستند، لذا کوشش‌هایی جهت تولید سویه‌های فاقد پروتئاز نظیر سویه WB600 انجام شده است [۱۸]. تاکنون شش ژن پروتئاز خارج سلولی در این سویه غیرفعال شده و فقط ۰/۳۲٪ از فعالیت پروتئازی سلول طبیعی باقی مانده است ولی تجزیه پروتئولیتکی پروتئین‌های هترولوگ به‌طور کامل حذف نشده است [۱۸].

هدف از پژوهش حاضر کلون کردن ژن PA از *B. anthracis* در *B. subtilis* سویهٔ WB600 با استفاده از ناقل بیان‌کننده pWB980 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پلاسمیدها، سویه‌های باکتریایی و شرایط رشد. سویه‌های باکتریایی عبارتند از *B. subtilis* سویهٔ WB600 [۸] و *E. coli* k12 سویهٔ DH5α [۲۰] که از بانک ژن انستیتوپاستور ایران تهیه شد. تمام سویه‌ها روی محیط‌های کشت BHI Agar و LB Agar (Difco, USA) یا درون محیط‌های BHI broth و LB broth (Difco, USA) دارای آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰۰μg/ml)، اریترومایسین (۵μg/ml) و یا کانامایسین (۱۰μg/ml) (Sigma, USA) کشت داده شد. پلاسمیدهای مورد استفاده عبارت بودند از: پلاسمید pTZ57R (Fermentas, Lithuania) به عنوان T-vector و پلاسمید pWB980 به‌عنوان ناقل بیان‌کننده که از بانک ژن انستیتوپاستور ایران تهیه شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی پلاسمید و PCR. جداسازی پلاسمید از *B. anthracis* سویه stern و *B. subtilis* سویهٔ WB600 و *E. coli* با استفاده از روش‌های استاندارد [۱۳،۸] انجام گردید. جهت جداکردن ژن PA پرایمر F با ترادف بازی

5' GTA GGT ACC TAA AAA GGA GAA CGT ATA TGA 3' (30 bp)

و پرایمر R با ترادف بازی

5' TAG TCG ACT GTT TAA AAC ATA CTC TCC TTG 3' (30bp)

طراحی گردیدند.

PCR بر روی پلاسمید pXOI جدا شده از *B. anthracis* سویهٔ استرن با آنزیم‌های Taq DNA Polymerase (Promega, USA) و High fidelity (Roche, Germany) expand DNA Polymerase با شرایط زیر انجام گرفت:

یک مرحله ۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه، ۳۰مرحله شامل ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه ۶۴ درجه به مدت یک دقیقه و۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و چهل ثانیه و یک مرحله ۷۲ درجه‌ای به مدت ده دقیقه. پرایمرها توسط شرکت Genset (France) سنتز گردید.

آنزیم‌ها و شرایط فعالیت آن‌ها. آنزیم‌های T4 DNA Ligase، *Hind*III، *Eco*RI، *Bam*HI، *Sal*I و *Kpn*I از شرکت‌های سیناژن (ایران) و پرومگا (آمریکا) تهیه و شرایط هضم آنزیمی و اتصال (Ligation) طبق روش‌های استاندارد [۱۳] انجام شد.

کلون کردن ژن PA در *E.coli* و *B. subtilis*. جهت تهیه *E. coli* حامل ژن PA، واکنش اتصال (Ligation) بین ۵۰۰ng محصول PCR و ۲۰۰ng T- Vector گذاشته شد و سپس با روش استاندارد [۱۳] به *E. coli* انتقال داده شد. ۱۰۰ µl مخلوط انتقال برروی محیط کشت LB Agar حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰µg/ml) (Sigma,USA)، X-gal (30µg/ml) و IPTG (2mM) کشت داده شد. کولونی‌های سفید رنگ، جداگانه کشت داده شد و از آن‌ها پلاسمید استخراج گردید و کلون‌های مورد نظر حامل ژن PA بر اساس اندازه، تجزیه و تحلیل با آنزیم‌های تحدیدی و سپس تعیین ترادف بازی (Genset,France) انتخاب شدند. جهت تهیه *B. subtilis* حامل ژن PA، T-Vector حامل ژن PA با آنزیم‌های *Kpn*I و *Sal*I جداگانه هضم شد و سپس با کیت خالص‌سازی DNA از ژل (Qiagen, Germany) خالص گردید. پلاسمید pWB980 نیز جداگانه با آنزیم‌های مذکور هضم و با کیت، خالص گردید. واکنش اتصال برای ۱µg پلاسمید و ۳µg قطعهٔ ژن گذاشته شد و سپس ۱۰µl واکنش اتصال با روش Electroporation (Biorad, USA) به *B. subtilis* در ۱۰۰۰V و ۸/۵msec در تیوب ۰/۱ cm انتقال داده شد. ۲۰۰µl مخلوط انتقال بر روی محیط کشت LB Agar حاوی کانامایسین (۱۰µg/ml) کشت و مدت ۴۸ ساعت در ۳۷°C قرار داده شد.

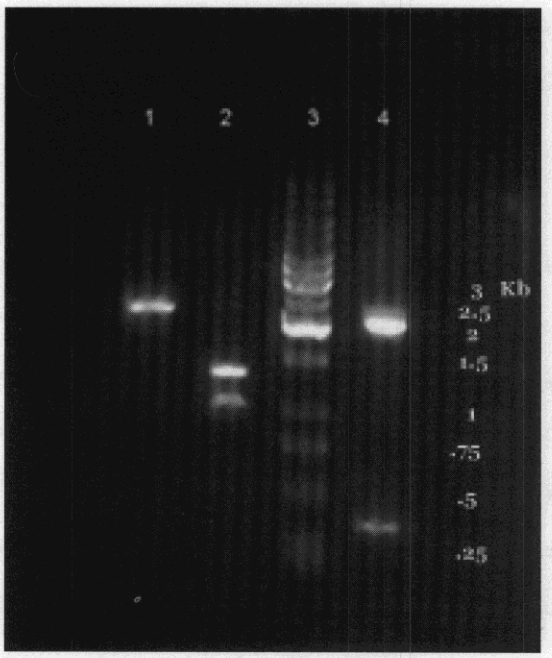
نتایج

کلون کردن ژن PA در *E. coli*. بعد از جداسازی پلاسمید pXOI از *B. anthracis* سویهٔ stern، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، PCR انجام شد و باند۲/۴kb (شکل ۱) به‌دست آمد. پرایمرها طوری طراحی شدند که ژن با سیگنال پپتید و بدون پروموتر تکثیر شود، چون در این کار از پروموتر قوی پلاسمید بیان کننده استفاده می‌گردد و به این دلیل از سیگنال پپتید ژن استفاده شد؛ چرا که اگر پرایمر F طوری طراحی می‌گردید که سیگنال پپتید ژن حذف شود، جهت قرار دادن یک جایگاه آنزیمی در ابتدای ژن دو اسید آمینه به ابتدای ژن اضافه می‌شد، که امکان داشت بر روی فعالیت پروتئین نوترکیب اثر داشته باشد. از طرف دیگر نوع سیگنال پپتید در بیان اثری نداشته و سیگنال پپتیدهای باسیلوس‌ها شباهت زیادی با هم دارند. بر روی محصول PCR واکنش هضم با آنزیم‌های *Hind*III و *Eco*RI گذاشته شد. با هضم محصول PCR با آنزیم *Eco*RI، دو باند ۱/۱ kb و ۱/۳ kb و با هضم محصول PCR با آنزیم *Hind*III، دو باند ۲ kb و ۰/۴ kb حاصل شده است (شکل ۱). بر اساس نمودار ژن (شکل ۲) و باندهای حاصل (شکل۱)، محصول

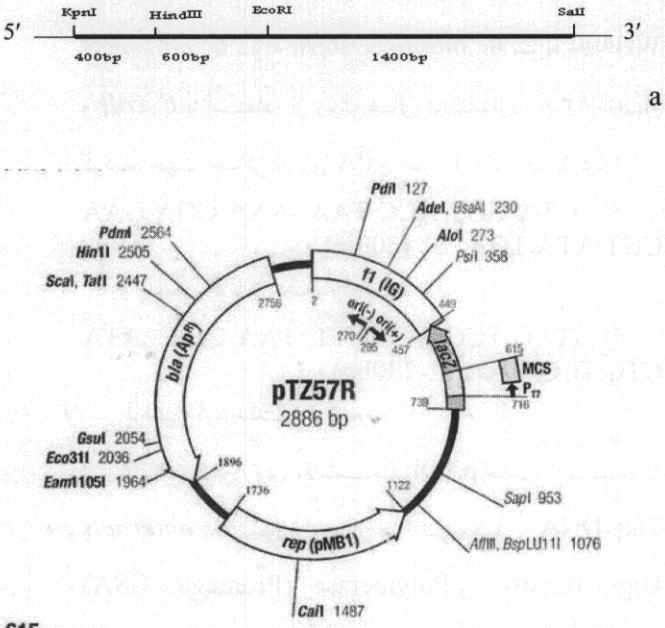
www.SID.ir

Archive of SID

PCR تأیید گردید. از انتقال واکنش اتصال بین محصول PCR و T-Vector و کشت روی محیط LB آگار حاوی X-gal، IPTG و آمپی‌سیلین، تعداد غیرقابل شمارش کلنی سفیدرنگ رشد کردند. ۵ کلنی، کشت داده شد و از آن‌ها پلاسمید استخراج گردید؛ دو نمونه دارای پلاسمیدهای بزرگ‌تر از پلاسمید بدون ژن بودند. بر روی این دو نمونه واکنش هضم با آنزیم‌های *Hind*III و *Eco*RI به‌طور جداگانه گذاشته شد و نمونه‌ها الکتروفورز گردیدند (شکل ۳). باتوجه به نتایج حاصله از واکنش‌های هضم، ژن در نمونه ۱ (pTPA1) در مسیر صحیح و در نمونه ۲ (pTPA2)، ژن در مسیر برعکس قرار گرفته است. ژن در نمونه ۱، تعیین ترادف بازی گردید که تغییر نوکلئوتیدی T به A در باز ۲۷۶، A به T در باز ۸۰۷ و G به C در باز ۱۹۴۰ نشان داد که فقط تغییر آخر باعث تغییر اسید آمینه Glu به Gln می‌گردد. این تغییر در گزارش‌های دیگر نیز آمده و هیچ‌گونه اثری بر روی فعالیت ایمونولوژیک و بیولوژیک PA نوترکیب نداشته است [۱].

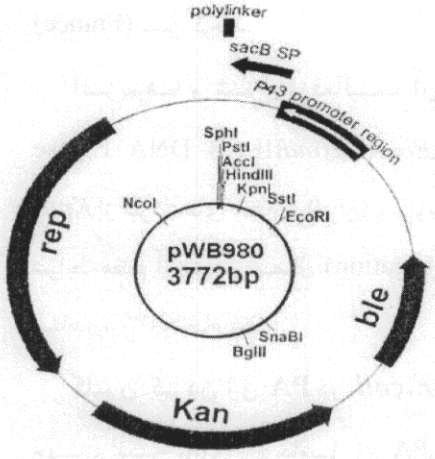


شکل ۱. محصول PCR وهضم آنزیمی آن
خط عمودی ۱: محصول PCR
خط عمودی ۲: هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *Eco*RI
خط عمودی ۳: مارکر (1 Kb ladder)
خط عمودی ۴: هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *Hind*III



a

b

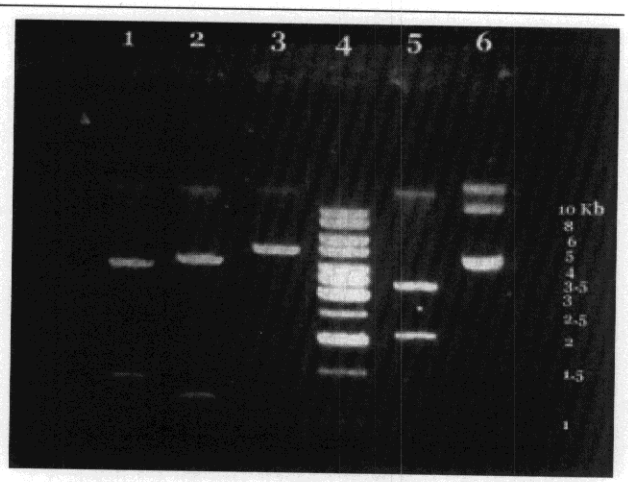


c

شکل ۲. نمودار ژن PA ، پلاسمید pTZ57R و پلاسمید pWB980
a. نمودار ژن PA: ژن PA با اندازه ۲/۴ kb که جایگاه *Kpn*I درانتهای '۵ و جایگاه *Sal*I در انتهای '۳ آن قرار گرفته و جایگاه‌های *Eco*RI و *Hind*III بر روی ژن قرار گرفته‌اند.
b. نقشه ناقل pTZ57R (T-vector) وجایگاه‌های آنزیمی درمحل M.C.S. ناقل.
c. نقشه ژنتیکی ناقل بیان کننده pWB980.

www.SID.ir

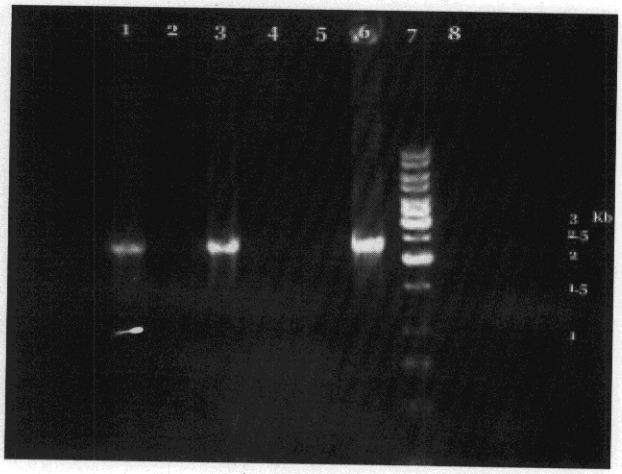
Archive of SID



شکل۳. هضم آنزیمی نمونه‌های ۱و۲.
خط عمودی۱: هضم آنزیمی نمونه ۱ با *Eco*RI
خط عمودی۲: هضم آنزیمی نمونه۲ با *Eco*RI
خط عمودی۳: هضم آنزیمی نمونه1 با *Hind*III
خط عمودی۴: مارکر(1Kb ladder)
خط عمودی ۵: هضم آنزیمی نمونه۲ با *Hind*III
خط عمودی ۶: نمونه ۱ بدون هضم آنزیمی

کلون کردن ژن PA در *B. subtilis*

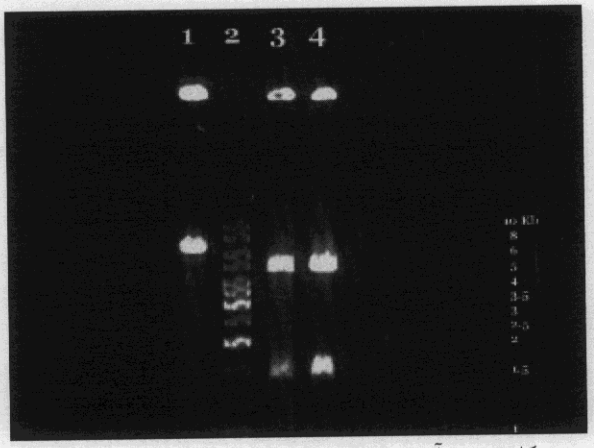
ژن PA به‌وسیله هضم جداگانه با آنزیم‌های *Kpn*I و *Sal*I از پلاسمید pTPA1 (نمونه ۱) جدا و به‌وسیله کیت، خالص گردید. پلاسمید pWB980 نیز جداگانه به‌وسیله آنزیم‌های *Kpn*I و *Sal*I هضم و به‌وسیله کیت، خالص گردید و واکنش اتصال بین این پلاسمید و ژن گذاشته شد. از انتقال واکنش اتصال به‌وسیله Electroporation، بعد از ۴۸ ساعت تعداد ۳۴ کلنی بر روی محیط رشد کردند که همگی مورد بررسی قرار گرفتند؛ از میان این ۳۴ نمونه فقط ۵ نمونه دارای پلاسمید بزرگ‌تر از pWB980 بودند. برروی هر ۵ نمونه، PCR گذاشته شد که فقط بر روی نمونه‌های ۱ و ۳ واکنش PCR صورت گرفت و باند مربوطه به‌دست آمد (شکل ۴). بر روی نمونه ۱ واکنش هضم با آنزیم‌های *Eco*RI و *Kpn*I و بر روی نمونه ۳ واکنش هضم با آنزیم *Eco*RI گذاشته شد (شکل ۵). باتوجه به نمودار کلونینگ (شکل۲)، باندهای مورد انتظار به ترتیب ۶/۲ kb، ۴/۹+۱/۳kb و ۴/۹+۱/۳kb به‌دست آمد. با توجه به طراحی پرایمر مناسب و استفاده از Electroporation، ژن PA بر روی پلاسمید pWB980 و در *B. subtilis* سویه WB600 کلون گردید. تعیین ترادف بازی ژن کلون شده، تغییر نوکلئوتیدی G به C را در باز ۱۹۴۰ که در گزارش‌های دیگر نیز آمده است نشان داد. تا کنون ژن PA در *E. coli* [۱۴]، *Salmonella* [۴]، *Lactobacil* [۲]، *Baculo virus*، *Vaccinia virus* [۶] و *B. subtilis* [۷،۱] کلون شده است؛ که بیش‌ترین بیان در *B. Subtilis* [۱] به‌دست آمده است. در این پژوهش سعی شد با انتخاب ناقل بیان کننده مناسب pWB980 که به‌وسیله آن توانسته‌اند تا حدود ۳۵۰mg/l بیان پروتئین به‌دست آورند و هنوز جهت بیان PA از آن استفاده نشده است [۸]، پروموتر مناسب همراه با rbs پلاسمید بیان کننده و سیگنال پپتید خود ژن، این ژن در *B. subtilis* کلون و بیان گردد. در قدم اول با موفقیت ژن PA در *B. subtilis* کلون گردید و امیدواریم در آینده با بهینه کردن شرایط، بیان برتر از آن‌چه در پژوهش‌های دیگر به‌دست آمده حاصل گردد. هم‌چنین با ادامه این پژوهش، انتظار داریم سیستم کلون و بیان در *B. subtilis* به‌عنوان یک سیستم برتر کلون کردن ژن نسبت به دیگر سیستم‌ها در کشور معرفی گردد.



شکل ۴. PCR بر روی پلاسمیدها
خط عمودی ۱تا ۵: محصول PCR نمونه‌های ۱تا ۵
خط عمودی۶: کنترل مثبت PCR
خط عمودی۷: مارکر(1 Kb ladder)
خط عمودی ۸: کنترل منفی PCR

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۵. هضم آنزیمی پلاسمیدها

خط عمودی۱: هضم نمونه ۱ با آنزیم *Kpn*I

خط عمودی ۲: مارکر 1 kb

خط عمودی ۳: هضم نمونه۱ با آنزیم *Eco*RI

خط عمودی۴: هضم نمونه ۳ با آنزیم *Eco*RI

منابع

[1] Baillie L, Moir A, Manchee R. The expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* in *Bacillus subtilis*. J Appl Microbiol, 1998; 84(5):741-6.

[2] Bragg TS, Robertson DL. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (lef) from *Bacillus anthracis*. Gene, 1989; 81(1):45-54.

[3] Brossier F, Weber-Levy M, Mock M, Sirard JC. Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. Infect Immun, 2000; 68(4):1781-6.

[4] Coulson NM, Fulop M, Titball RW. *Bacillus anthracis* protective antigen, expressed in *Salmonella typhimurium* SL 3261, affords protection against anthrax spore challenge. Vaccine, 1994; 12(15):1395-401.

[5] Hambleton P, Carman JA, Melling J. Anthrax: the disease in relation to vaccines. Vaccine, 1984; 2(2):125-32.

[6] Iacono-Connors LC, Welkos SL, Ivins BE, Dalrymple JM. Protection against anthrax with recombinant virus-expressed protective antigen in experimental animals. Infect Immun, 1991; 59(6):1961-5.

[7] Ivins BE, Welkos SL. Cloning and expression of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene in *Bacillus subtilis*. Infect Immun, 1986; 54(2):537-42.

[8] Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol, 1981; 145(3):1365-73.

[9] Leppla SH. Production and purification of anthrax toxin. Methods Enzymol, 1988; 165:103-16.

[10] Little SF, Novak JM, Lowe JR, Leppla SH, Singh Y, Klimpel KR, et al. Characterization of lethal factor binding and cell receptor binding domains of protective antigen of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibodies. Microbiology, 1996; 142 (Pt 3):707-15.

[11] Mikesell P, Ivins BE, Ristroph JD, Dreier TM. Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. Infect Immun, 1983; 39(1):371-6.

[12] Mock M, Labruyere E, Glaser P, Danchin A, Ullmann A. Cloning and expression of the calmodulin-sensitive *Bacillus anthracis* adenylate cyclase in *Escherichia coli*. Gene, 1988; 64(2):277-84.

[13] Sambrook J, Russell D. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

[14] Sharma M, Swain PK, Chopra AP, Chaudhary VK, Singh Y. Expression and purification of anthrax toxin protective antigen from *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 1996; 7(1):33-38.

[15] Thurnbull PC. Current status of immunization against anthrax: old vaccines may be here to stay for a while. Curr Opin Infect Dis. 2000; 13(2):113-120.

[16] Thwcite JE, Baillie LW, Carter NM, Stephenson K, Rees M, Harwood CR, et al. Optimization of the cell wall microenvironment allows increased production of recombinant *Bacillus anthracis* protective antigen from *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol, 2002; 68(1):227-34.

[17] Vodkin MH, Leppla SH. Cloning of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. Cell, 1983; 34(2):693-7.

[18] Wu X, Lee W, Tran L, Wong SL. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extra cellular protease. J Bacteriol, 1991; 173(16):4952-4958.

[19] Wu SC, Wong SL. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1999; 72 (1-2):185-189.

[20] Zegres ND, Kluter E, Vanderstap H, Vandura E, Vandalen P, Shaw M, et al. Expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* by *Lactobacillus casei*: towards the development of an oral vaccine against anthrax. J Appl Microbiol, 1999; 87(2):309-14.

www.SID.ir