Archive of SID

# همسانه‌سازی و بیان ژن پروتئین غشای خارجی ۳۱ (Omp 31) باکتری بروسلا ملی‌تنسیس *Rev1*

سهیل یوسفی[۱]، مجتبی طهمورث‌پور[۲*] و محمدهادی سخاوتی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۱

## چکیده

بیماری بروسلوز به عنوان یک بیماری مشترک بین انسان و دام به واسطه‌ی تکثیر باکتری بروسلا در داخل سلول‌های پستانداران اتفاق می‌افتد. Omp31 یکی از پروتئین‌های غشای خارجی این باکتری می‌باشد که به واسطه‌ی نقش مهمی که در تحریک سلول‌های $CD8^+T$ و $CD4^+T$ دارد می‌تواند سبب مهار بیماری بروسلوز گردد. در این بررسی ژن Omp31 به عنوان یکی از ژن‌های مؤثر در بیماری بروسلا مورد بررسی مولکولی از نظر آنالیز فیلوژنی و همچنین مستعد بودن پروتئین نوترکیب این ژن جهت طراحی واکسن بر علیه بیماری بروسلوز مورد مطالعه قرار گرفته است. از آغازگرهای اختصاصی به منظور تکثیر DNA مستخرج از باکتری بروسلا ملیتنسیس سویه *Rev1* و تأیید مراحل مطالعه استفاده گردید. جهت تکثیر این ژن از وکتور کلونینگ pMB57R/T و جهت بیان از وکتور pET32a که دارای ساختار trx جهت افزایش بیان می‌باشد استفاده گردید. پس از تکثیر قطعه‌ی bp ۷۲۳، قطعه‌ی مورد نظر به روش TA کلونینگ درون وکتور کلونینگ منتقل و به روش شوک حرارتی وارد میزبان کلونینگ گردید. سپس نمونه‌ی تأیید شده به درون وکتور بیانی ساب کلون گردید. القا بیان با IPTG صورت گرفت و آنالیز پروتئین‌های تولید شده با ژل نشان‌دهنده‌ی بیان موفقیت‌آمیز پروتئین نوترکیب می‌باشد. نتایج مفید حاصل از این مطالعه بیان‌گر این است که این آنتی‌ژن می‌تواند به عنوان یه کاندید مناسب در پژوهش‌های آتی به منظور طراحی واکسن نوترکیب بر علیه بیماری بروسلا استفاده گردد.

**کلمات کلیدی:** بروسلا، Omp31، همسانه‌سازی، بیان ژن

## مقدمه

بروسلوز یا تب مالت (تب مدیترانه‌ای) به واسطه‌ی رشد و تکثیر باکتری کوکوباسیل گرم منفی بروسلا در داخل سلول‌های پستانداران رخ می‌دهد. انواع گونه‌های بیماری‌زای بروسلا در موجودات مختلف شامل: بروسلا آبورتوس در گاو، بروسلا ملی تنسیس در بز و گوسفند، بروسلا اوویس در قوچ، بروسلا کنیس در سگ، بروسلا سوئیس در خوک، بروسلا نئوتوم در نوع به خصوصی از موش صحرایی، بروسلا میکروتی در گروهی از جوندگان و بروسلا ماریس در حیوانات دریایی می‌باشند. از گونه‌های نام برده شده، بروسلا ملی تنیس، بروسلا آبورتوس، بروسلا سوئیس، بروسلا کنیس و بروسلا ماریس در انسان ایجاد بیماری می‌کنند که مهم‌ترین آن‌ها بروسلا ملی تنسیس می‌باشد (Pappas et al. 2005).

بیماری بروسلوز به عنوان یک بیماری مشترک بین انسان و دام شناخته شده است. این بیماری در دام می‌تواند سبب جفت ماندگی، کاهش باروری، کاهش تولید شیر و ... شود. این بیماری به واسطه‌ی تماس انسان با دام آلوده و یا استفاده از فراورده‌های لبنی آلوده منتقل می‌شود و عوارضی نظیر تب‌های طولانی مدت، التهاب مفصل و استخوان و ... را می‌تواند برای انسان به همراه

[۱] دانش‌آموخته‌ی دکترای ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
[۲*] استاد گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد E-mail: m_tahmoorespur@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)
[۳] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد


www.SID.ir

Archive of SID

داشته باشد. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، این بیماری در بسیاری از نقاط جهان به ویژه در کشورهای حوزه‌ی مدیترانه، خاورمیانه، شبه جزیره‌ی عربستان، آمریکای مرکزی و جنوبی، آسیا و آفریقا شایع است و تنها ۱۷ کشور به طور رسمی عاری از برسلوز اعلام شده‌اند.

درمان این بیماری نیز در انسان آسان نبوده و امروزه برای درمان آن از آنتی‌بیوتک‌های مرسوم استفاده می‌شود که ممکن است در مواردی با شکست درمان و حتی عود بیماری همراه باشد (Pappas et al. 2005). در دام‌ها نیز به سبب احتمال ایجاد مقاومت دارویی و همچنین اقتصادی نبودن انجام نمی‌شود و معمولاً پس از شناسائی، دام آلوده کشتار و حذف می‌شود. پیش‌گیری و کنترل بیماری در حیوانات از طریق مایه‌کوبی دام‌ها و رعایت اصول بهداشتی و شناسایی و حذف دام‌های آلوده انجام می‌گیرد (Pappas et al. 2005).

تا کنون برای ساخت واکسن بروسلا از سویه‌های ضعیف شده‌ی زنده‌ی آن‌ها استفاده شده است. واکسن-های موجود در جلوگیری از علایمی از بروسلوز، مانند واگیری و سقط جنین موثراند، اما در جلوگیری از بروز عفونت ضعیف عمل می‌کنند. همچنین این واکسن‌ها می-توانند در حیوانات باردار باعث سقط جنین نیز شوند. علاوه بر این، واکسن‌های فوق‌الذکر به دلیل آن که در تست‌های سرولوژیک (تست‌هایی که برای تشخیص بیماری به کار می‌روند) دخالت ایجاد کرده و باعث ایجاد مقاومت به استرپتومایسین (آنتی‌بیوتیکی که برای درمان به کار می‌رود) و ایجاد عفونت و بیماری در انسان می‌شوند، دارای نقایصی می‌باشند (Pappas 2010).

با توجه به اهمیت این بیماری از لحاظ سلامتی، اقتصادی و مشترک بودن این بیماری بین انسان و دام و همچنین معایب و نقایصی که در روش‌های تشخیصی و درمانی مرسوم وجود دارند، همواره لزوم روش‌های تشخیصی و درمانی دقیق، سریع و کارآمد برای این بیماری احساس می‌شود که با توجه به پیشرفت‌های روزافزون دانش و کسب یافته‌های جدید در مورد این بیماری همواره تلاش‌های بسیاری جهت پیش‌گیری و درمان این بیماری در سال‌های اخیر صورت گرفته است.

Omp31 یکی از پروتئین‌های غشای خارجی باکتری بروسلا به طول ۷۲۳ جفت باز با وزن مولکولی حدود ۳۱ کیلو دالتون می‌باشد. توالی این ژن حدود ۳۴ درصد با توالی Omp25 شباهت دارد. این ژن به واسطه‌ی نقش مهمی که در تحریک سلول‌های $CD8^+$ T و $CD4^+$ T دارد می‌تواند سبب مهار بیماری بروسلوز گردد. پروتئین Omp31 اولین بار در بروسلا ملیتنسیس گزارش شده و در تمام گونه‌های بروسلا به جز بروسلا آبورتوس وجود دارد و منجر به سوئیچ پاسخ ایمنی میزبان به سمت ایمنی سلولی می‌شود (Cloeckaert et al. 2002). همچنین Vizcaino و همکاران در سال ۱۹۹۶ ژن Omp31 را به عنوان یکی از آنتی‌ژن‌های غالب در گونه‌های بروسلا شناسایی و به عنوان یک کاندید مناسب جهت طراحی واکسن معرفی کردند.

در این بررسی ژن Omp31 به عنوان یکی از ژن‌های مؤثر در بیماری بروسلا مورد بررسی مولکولی و پروتئینی از نظر مستعد بودن پروتئین نوترکیب این ژن جهت طراحی واکسن بر علیه بیماری بروسلوز مورد مطالعه قرار گرفته است.

## مواد و روش کار

DNA استخراج شده از باکتری بروسلا ملیتنسیس سویه‌ی *Rev 1* از مؤسسه‌ی سرم و واکسن‌سازی رازی مشهد گرفته شد.

به منظور تکثیر قطعه‌ی ۷۲۳ جفت بازی ژن Omp31 پرایمرهای اختصاصی لینکردار با استفاده از نرم‌افزار Primer primier 5 طراحی شدند. به طوری که در ابتدای آغازگر رفت یک جایگاه برشی آنزیم I *EcoR* و در انتهای آغازگر برگشت یک جایگاه برشی I *BamH* به منظور سهولت و افزایش راندمان همسانه‌سازی قرار داده شد. آغازگرهای طراحی شده ذیل جهت سنتز به شرکت Bioneer (کشور کره) ارسال گردید.


www.SID.ir

Archive of SID

F: 5`-*GAATTC*ATGAAATCCGTAATTTTGGC-3` (*EcoRI*)
R: 5`-*GGATCC*TTAGAA CTTGTAGTTCAGACCG-3` (*BamHI*)

تکثیر ژن مورد نظر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۲ میکرولیتر 2/5mM dNTP، ۱/۵ میکرولیتر 10X MgCl2، 1U آنزیم EXTaq (Takara, Japan) و ۵۰ نانوگرم از DNA الگو انجام شد. چرخه‌های حرارتی برای انجام واکنش PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۳۲ چرخه‌ی حرارتی ۳ مرحله‌ای شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت یک چرخه جهت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز، صحت قطعه‌ی تکثیر شده توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با Gel Red (England, biotium) تأیید گردید.

جهت انجام همسانه‌سازی از پلاسمید pMB57R/T استفاده شد که از محتویات کیت TAclone™ ساخت شرکت Mehrsun Biotech (کشور ایران) می‌باشد. این پلاسمید به شکل خطی است و در دو انتهای `3 خود حاوی ddT است که این خصوصیت آن با توجه به این که آنزیم Taq پلیمراز هم به انتهای `3 محصولات تولیدی خود ddA را اضافه می‌کند موجب شده است که جهت همسانه‌سازی TA مناسب گردد. جهت انجام واکنش الحاق ۱ میکرولیتر از ناقل pMB57R/T، ۴ میکرولیتر بافر 5x، ۱ میکرولیتر از آنزیم T4 و ۳ میکرولیتر از قطعه‌ی مورد نظر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با هم مخلوط شدند. واکنش الحاق به مدت ۲۱ ساعت در دمای ۱۶ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت. محصول الحاق با استفاده از روش شوک حراراتی به درون سلول‌های مستعد باکتری اشریشیا کلی سویه‌ی TOP10 وارد و بر روی محیط LB جامد حاوی آمپی‌سیلین گسترده گردید. به منظور انتخاب کلونی‌های حاوی قطعه‌ی الحاقی مورد نظر از روش Colony PCR با استفاده از پرایمرهای مرسوم M13 استفاده گردید. سپس پلاسمیدهای نوترکیب استخراج و به وسیله‌ی هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت و پلاسمید نوترکیب جهت تأیید حضور و صحت قرارگیری ژن مورد نظر جهت توالی‌یابی ارسال گردید.

جهت ساب کلونینگ قطعه‌ی مورد نظر از وکتور کلونینگ به درون وکتور بیانی از ناقل بیانی pET-32a جهت بیان ژن Omp31 استفاده گردید. از ویژگی‌های این ناقل بیانی داشتن یک توالی trx و دو توالی Histaq ابتدایی و انتهایی است که نقش مؤثری در افزایش راندمان بیان و همچنین خلوص پروتئین دارد. به منظور ساب کلون کردن قطعه‌ی مورد نظر به درون ناقل بیانی ابتدا محصول کلونینگ جهت استخراج پلاسمید کشت داده شد و پس از ۱۶ ساعت استخراج پلاسمید گردید. محصول استخراج پلاسمید که حاوی وکتور کلونینگ و ژن مورد نظر بود به همراه ناقل بیانی pET-32a با دو آنزیم برشی *EcoR* I و *BamH* I به صورت جداگانه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت هضم آنزیمی شدند. محصولات حاصل از هضم بر روی ژل اگارز ۱ درصد الکتروفورز شده و پس از آن قطعات مورد نظر از ژل بریده و باکیت استخراج از ژل شرکت (Thermo, USA) از ژل تخلیص شدند. واکنش الحاق در حجم ۲۰ میکرولیتر با غلظت ۱۶۰ نانوگرم از وکتور pET32a و ۹۰ نانوگرم از قطعه‌ی ژنی هضم شده و ۱ واحد آنزیم DNA ligase T4 و ۴ میکرولیتر بافر 5x در دمای ۱۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. محصول الحاق با روش شوک حرارتی به باکتری مستعد *E. coli* سوش BL21 (D3) انتقال و غربالگری باکتری‌های دریافت‌کننده‌ی وکتور بر روی محیط کشت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین انجام شد. به منظور صحت کلونینگ از روش کلونی PCR با پرایمرهای مرسوم T7 و هضم آنزیمی با آنزیم‌های *EcoR* I و *BamH* I استفاده گردید. جهت



www.SID.ir

Archive of SID

صحت ترادف و صحیح بودن قالب خواندن پلاسمید نوترکیب بیانی مورد نظر جهت توالی‌یابی ارسال گردید.

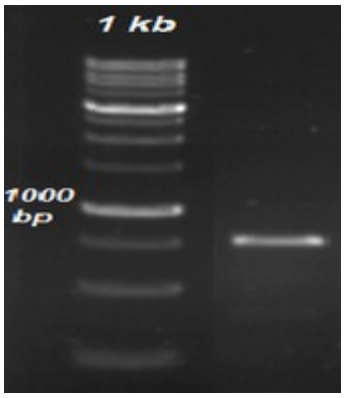
جهت بررسی بیان ژن قطعه‌ی مورد نظر، ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت شبانه‌ی باکتری‌های نوترکیب به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط LB مایع حاوی غلظت ۱۰۰ µg/ml آمپی‌سیلین تلقیح گردید و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در دور ۲۵۰ rpm کشت داده شد و پس از رسیدن محیط کشت به جذب نوری ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر جهت عمل القای بیان IPTG در غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مولار به محیط کشت اضافه گردید. نمونه‌گیری در زمان‌های ۰، ۱، ۳ و ۴ ساعت پس از القا هر بار به میزان ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت صورت گرفت.

جهت انجام SDS Page و بلاتینگ، نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و پس ازحذف مایع رویی به رسوب حاصله ۱۰۰ میکرولیتر بافر 2X SDS اضافه و پس از حل نمودن رسوب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور لیز شدن دیوار باکتریای انکوبه شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰rpm سانترفیوژ و محلول رویی بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد با ولتاژ ۱۲۰ به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز و سپس با محلول کوماسی‌بلو رنگ‌آمیزی شدند. به دلیل همسانه‌سازی ژن مورد نظر در ناقل بیانی، پروتئین نوترکیب دارای برچسب هیستیدنی در ابتدا و انتهای توالی خود می‌باشد بنابراین با استفاده از آنتی‌بادی ضد His tag وجود پروتئین مورد تأیید قرار گرفت. به طوری که ۲ میکرولیتر از پروتئین استخراج شده بر روی کاغذ نیتروسلولوز نقطه‌گذاری شد. کاغذ نیتروسلولز با بافر TBS حاوی ۱ درصد BSA به مدت یک ساعت در دمای اتاق بلاک گردید. نمونه‌ها پس از سه بار شستشو به مدت ۵ دقیقه با بافر TBS، به مدت یک ساعت با آنتی-بادی Anti-His tag (Sigma,USA) ضد موشی کنژوگه با HRP با رقت ۱/۲۰۰۰ انکوبه و پس از سه بار شستشو جهت آشکارسازی پروتئین از سوبسترای DAB (Thermo, USA) استفاده گردید.

آنالیز قطعه‌ی توالی‌یابی شده با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی CLC Main workebench 5.5 و MEGA 5 انجام گرفت. از ابزار BLAST و رویه‌ی BLASTN در پایگاه NCBI و نرم‌افزار CLC Main workebench 5.5 جهت تعیین همولوژی توالی به دست آمده با توالی‌های ثبت شده از همین ژن در NCBI استفاده شد. جهت رسم درخت فیلوژنتیکی با ۱۰۰۰ تکرار، از رویه‌ی Neighbor-Joining نرم‌افزار MEGA 5 و تعیین فاصله‌ی ژنتیکی از رویه‌ی Create Pairwise Comparison نرم‌افزار CLC Main workebench 5.5 استفاده گردید.

## نتایج

ژن Omp31 با طول ۷۲۳ bp توسط آغازگرهای اختصاصی طراحی شده تکثیر و صحت و درستی قطعه‌ی تکثیر شده بر روی ژل اگارز ۱ درصد مشاهده گردید (شکل ۱).

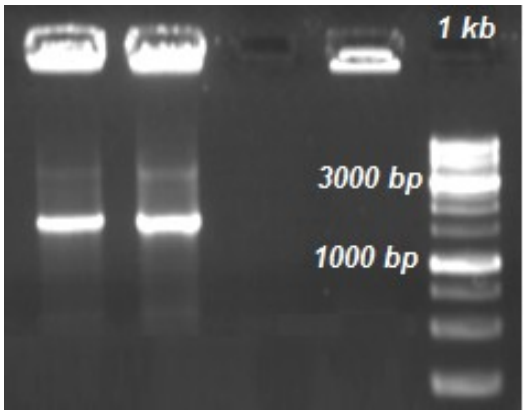



**شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر ژن Omp31 با طول ۷۲۳ bp روی ژل آگاروز ۱ درصد**

پس از کشت سلول‌های مستعد کلونی‌های حاوی وکتور بیانی نوترکیب جهت تأیید از نظر نحوه‌ی صحیح کلون شدن با پرایمرهای مرسوم T7 تکثیر و پس از خالص‌سازی پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های برشی *EcoR* I و *BamH* I هضم گردید. نتایج مربوط به کلونی PCR وکتور نوترکیب pET32a-Omp31 با آغازگرهای T7 و Tterminator و ظهور باند حدود از حضور ژن پروتئین نوترکیب در وکتور می‌باشد (شکل ۲).

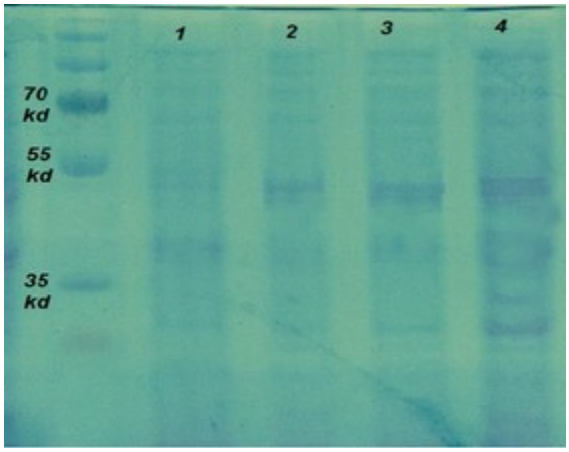

www.SID.ir

Archive of SID



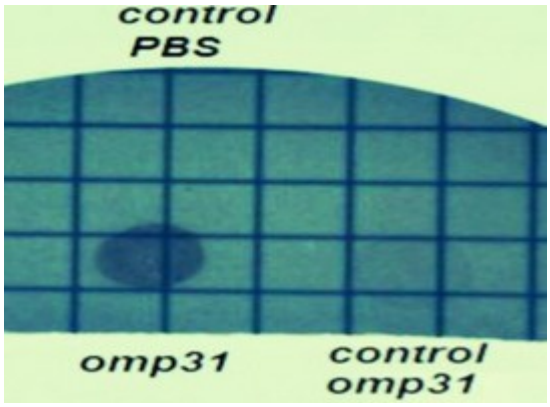

**شکل ۲: A: تأیید حضور ژن پروتئین نوترکیب با استفاده از روش کلونی PCR با آغازگرهای T7 و Tterminator**

القای بیان باکتری‌های BL21 (D3) دارای وکتور نوترکیب مورد نظر با IPTG و آنالیز پروتئین‌های تولید شده با ژل SDS-PAGE. حضور باند پروتئین نوترکیب در محدوده‌ی ۵۰ کیلو دالتونی (ژن Omp31 با وزن مولکولی حدود ۳۱ کیلودالتون با همراه توالی‌های اضافی که بر روی Pet32 (S.taq, trx, His taq) وجود دارد باید وزنی حدود ۴۸ کیلودالتون داشته باشد) نشان‌دهنده‌ی بیان موفقیت‌آمیز پروتئین نوترکیب می‌باشد (شکل ۳).




**شکل ۳: تجزیه و تحلیل SDS-PAGE پروتئین نوترکیب. ردیف ۱: نشان‌دهنده‌ی پروتئین نوترکیب قبل از القای IPTG ردیف ۳ ، ۲ و ۴: به ترتیب نشان‌دهنده‌ی پروتین نوترکیب بیان شده در زمان های ۲، ۳ و ۴ ساعت پس از القا بیان می-باشند. نشان‌گر مولکولی وزنی پروتئین ۹ باند ( Protein ladder 250 KD, Thermo).**

در دات بلات شدت رنگ لکه‌های مربوط به سلول-های حاوی پلاسمید نوترکیب القا شده (Omp 31) و تفاوت مشخص آن‌ها با لکه‌های سلول‌های غیر ترنسفکت شده به عنوان کنترل منفی (PBS) و سلول‌های حاوی پلاسمید قبل القا با IPTG (کنترل Omp 31) نشان از بیان پلاسمیدها در این سلول‌ها بود (شکل ۴).




**شکل ۴: تأیید بیان ژن توسط روش دات بلات**

**بحث**

همان طور که اشاره شد بروسلوز یا تب مالت یه بیماری مشترک بین انسان و دام است که عامل آن باکتری کوکوباسیل گرم منفی بروسلا می‌باشد. این بیماری یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های عفونی بوده (شناسایی شده در ضایعات ستون فقرات اسکلت مردی با بیش از ۲ میلیون سال) که هر ساله بیش از ۵۰۰ هزار نفر در سر تا سر دنیا به آن مبتلا می‌شوند و به دلیل زیان‌های بهداشتی و اقتصادی ناشی از آن، این بیماری توسط سازمان جهانی سلامت جزو هفت بیماری خطرناک و شناخته شده به شمار می‌رود حتی می‌توان از آن به عنوان سلاح بیولوژی نیز استفاده نمود ( D'Anastasio et al. 2009, WHO 2014). این بیماری در تمام نقاط کشور پراکنده است ولی وفور آن در مناطق مختلف یکسان نمی‌باشد به طوری که در برخی از مناطق جنوب کشور، از کم‌ترین میزان و در اصفهان و استان مرکزی بر اساس برخی از مطالعه‌ها، از بیش‌ترین میزان برخوردار بوده است ( Mirnejad et al.



www.SID.ir

Archive of SID

2013, Zowghi et al. 1982). یکی از راه‌های پیش‌گیری این بیماری تهیه‌ی واکسن به منظور ایمن‌سازی گله‌های مستعد بیماری است که امروزه تهیه‌ی واکسن نوترکیب با روش‌های مهندسی ژنتیک گام بزرگی در نیل به این هدف می‌باشد. بر این اساس اولین قدم در رسیدن به واکسن نوترکیب انتخاب بهترین آنتی‌ژن‌هایی است که بیش‌ترین نقش را در ایجاد بالاترین سطح ایمنی داشته باشد. بدین منظور یکی از پروتئین‌های غشایی باکتری بروسلا تحت عنوان Omp 31 به عنوان کاندید جهت بررسی انتخاب گردید. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که این ژن به درستی و با صحت کامل کلون و درون وکتور بیانی ساب کلون گردید همچنین نتایج حاصل دات بلاتینگ با Anti-His tag تأیید کننده‌ی تولید پروتئین نوترکیب در pET32a است که با نتایج توالی‌یابی مطابقت دارد. در این بررسی از سیستم بیانی باکتری اشریشیاکلی سویه‌ی TOP10 F` استفاده گردید که این سویه با توجه به دست-کاری‌های ژنتیکی که بر روی آن صورت گرفته نقش مؤثری در جلوگیری از تأثیر سیستم باکتری هنگام تکثیر بر روی توالی‌های ژنی خارجی که جهت تکثیر وارد آن می‌شوند دارد. علاوه بر آن سیستم بیانی باکتریای اشرشیاکلی قادر به تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقادیر بالا و هزینه‌های پایین می‌باشد. اما بیان بالای پروتئین‌ها در سیستم بیانی E. coli باعث می‌شود که معمولاً پروتئین‌ها به شکل ایکوژن بادی تولید شوند از این رو استفاده از پلاسمید pET32a به دلیل این که یک پروتئین تیرودوکسین را به ابتدای پروتئین نوترکیب اضافه می‌کند باعث افزایش حلالیت پروتئین گردد. همچنین ناقل‌های بیانی pET تحت کنترل پروموتور T7 قرار دارند و با توجه به داشتن راه‌انداز LacO برای کنترل بیان ژن‌های خود با القای IPTG باعث رونویسی ژن T7 می‌شود که در نتیجه تولید پروتئین ژن هدف را فعال می‌کند (Elmorjani et al. 2004).

Izadjoo و همکاران در سال ۲۰۰۰ در بررسی که بر روی این ژن و نقش آن در مهار بیماری بروسلوز در موش انجام دادند به این نتیجه رسیدند که این ژن می‌تواند یک کاندید مناسب برای ساخت واکسن بر علیه بیماری بروسلا باشد. Cassataro و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه‌ای که بر روی واکسن تولید شده توسط این ژن و نقش آن در مهار بیماری بروسلوز انجام دادند مشاهده کردند که این ژن با تحریک سلول‌های $CD8^{+}T$ می‌تواند سبب مهار این بیماری شود. Gupta و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مطالعه‌ای که بر روی سطح ایمنی این ژن انجام دادند مشاهده کردند که این ژن می‌تواند ایمنی در حد متوسط ایجاد کند و این ژن را به عنوان یک کاندید مناسب برای طراحی واکسن معرفی نمودند. Azimi و همکاران در سال ۲۰۱۲ در بررسی مشابه بر روی موش مشاهده کردند که این ژن می‌تواند سبب مهار بیماری بروسلوز در موش‌های تیمار شده با این ژن گردند. Gupta و همکاران در سال ۲۰۱۲، Wang و همکاران در سال ۲۰۱۴ در بررسی که بر روی ایمنی‌زایی واکسن نوترکیب Omp 31 و مقایسه‌ی آن با واکسن تخفیف حدت یافته انجام دادند دریافتند که این واکسن می‌توان ایمنی‌زایی نزدیک به واکسن تخفیف حدت یافته ایجاد کند.

همچنین نتایج حاصل از قرابت ژنتیکی نشان داد که بین ژن Omp 31 از سویه‌ی بروسلا ملیتنسیس *Rev1* و سایر سویه‌ها شباهت نزدیکی وجود دارد و این ژن یکی از ژن‌های پایدار در باکتری بورسلا می‌باشد که تأیید کننده مناسب بودن آن برای بررسی به عنوان کاندید برای طراحی واکسن نوترکیب می‌باشد.

نتایج این پژوهش نشان داد که بیان این پروتئین غشایی در این میزبان باکتریایی و پلاسمید بیانی بازه بالایی دارد. امید است نتایج به دست آمده از این تحقیق راه‌گشایی برای تولید یک واکسن نوترکیب مؤثر بر علیه باکتری بروسلا باشد. در مطالعات آینده می‌توان این پروتئین نوترکیب را به حیوانات آزمایشگاهی تزریق کرد و میزان آنتی‌ژنسیته آن را مورد بررسی و جهت بهینه‌سازی آن مطالعات مختلفی را انجام داد.


www.SID.ir

Archive of SID

## منابع


Azimi, L.; Khoramabadi, N.; Mohabati Mobarez, A.; Asli, E.; Harzandi, N.; Mirnejad, R. and Rastegar Lari, A. (2012). Survey of Protection of Recombinant Cell Surface Protein 31kDa from Brucella melitensis in BALB/c Mice, Journal of Pure and Applied Microbiology, 6(1): 69-73.

Cloeckaert, A.; Vizcaino, N.; Paquet, J.Y.; Bowden, R.A. and Elzer, P.H. (2002). Major outer membrane proteins of Brucella spp. past, present and future. Veterinary Microbiology, 90(1-4):229-247.

Cassataro, J.; Estein, S.M.; Pasquevich, K.A.; Velikovsky, C.A.; de la Barrera, S.; Bowden, R. et al. (2005). Vaccination with the recombinant Brucella outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against Brucella melitensis infection. Infection Immunology. 73(12): 8079-8088.

D'Anastasio, R.; Zipfel, B.; Moggi-Cecchi, J.; Stanyon, R. and Capasso, L. (2009). Possible brucellosis in an early hominin skeleton from Sterkfontein. South Africa, PLoS One, 4(7): e6439.

Elmorjani, K.; Lurquin, V.; Lelion, A.; Rogniaux, H. and Marion, D. (2004). A bacterial expression system revisited for the recombinant production of cystine-rich plant lipid transfer proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications, 316(4): 1202-1209.

Gupta, V.K.; Rout, P.K. and Vihan, V.S. (2007). Induction of immune response in mice with a DNA vaccine encoding outer membrane protein (omp31) of Brucella melitensis 16M. Research in Veterinary Science, 82(3): 305-313.

Gupta, V.K.; Vohra, J.; Kumari, R.; Gururaj, K. and Vihan, V.S. (2012). Identification of Brucella isolated from goats using PstI site polymorphism at Omp2 gene loci. Indian Journal of Animal Sciences, 82(3): 240-243.

Izadjoo, M.J.; Polotsky, Y.; Mense, M.G.; Bhattacharjee, A.K.; Paranavitana, C.M.; Hadfield, T.L. and Hoover, D.L. (2000). Impaired control of Brucella melitensis infection in Rag 1-deficient mice. Infection Immunology, 68(9): 5314-5320.

Mirnejad, R.; mohamadi, M.; Piranfar, V.; Mortazavi, S.M. and Kachuei, R. (2013). A duplex PCR for the rapid and simultaneous detection of Brucella spp. in human blood samples. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 6(6): 453-456.

Pappas, G.; Akritidis, N.; Bosilkovski, M. and Tsianos, E. (2005). Brucellosis. New England Journal of Medicine, 352(22): 2325-2336.

Pappas, G. (2010). The changing Brucella ecology: novel reservoirs, new threats. International Journal of Antimicrobial Agents, 36 (Suppl 1): 8-1

Vizcaino, N.; Cloeckaert, A.; Zygmunt, M.S. and Dubray, G. (1996). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the Brucella melitensis Omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. Infection Immunology, 64(9): 3744-3751.

Wang, W.; Wu, J.; Qiao, J. et al. (2014). Evaluation of humoral and cellular immune responses to BP26 and OMP31 epitopes in the attenuated Brucella melitensis vaccinated sheep. Vaccine, 32(7): 825-33.

Zowghi, E. and Ebadi, A. (1982). Typing of Brucella strains isolated in Iran. Archives of Razi Institute. 33(1): 109-144.




www.SID.ir

Archive of SID

# Cloning and expression of outer membrane protein 31 (Omp31) *Brucella melitensis Rev1*

Yousefi, S.[1]; Tahmoorespur, M.[2] and Sekhavati, M.H.[3]

Received: 18.10.2016 Accepted: 11.06.2017

**Abstract**

Brucellosis is a well-known infection among domestic animals caused by Brucella bacterium. Omp31 is outer membrane proteins that play important role in simulate $CD4^+$ T and $CD8^+$ T cells. In current study, cloning, expression and also phylogenic analysis of Omp31 gene as a candidate for designing subunit vaccine against Brucella was investigated. Amplifying was performed using specific primers. Cloning of this gene was performed using pMB57R/T vector in TOP10F`strain of *E.coli*. Also, pET32a vector used for expression. Omp31 gene with 723 bp was amplified successfully. It , then, was coloned using TA cloning approach within cloning vector. Expression of this gene has done in pET32a vector by inducing IPTG. Results confirmed with sequencing and SDS-PAGE. According to this result, we can propose this gene as a candidate for designing subunit vaccine against Brucella in future study.

**Key words**: Brucella, Omp31, Cloning, Expression

1- PhD Graduated of Genetics and Animal breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
**Corresponding Author**: Tahmoorespur, M., E-mail: m_tahmoorespur@yahoo.com

www.SID.ir