

Original Article

Design and construction of expression vector containing the chimeric antigen of *B. melitensis* Omp25-Omp31 to production of a vaccine against brucellosis

Ali Akbar Khabiri¹ , Mohammad Soleimani^{1*}, Mohammad Hadi Sekhavati², Mojtaba Tahmoorespur²

¹Department of Microbiology, School of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

²Department of Animal Science, School of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

*Corresponding author; E-mail: soleimanidor@yahoo.com

Received: 15 October 2016 Accepted: 27 November 2016 First Published online: 13 December 2018
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 December - 2019 January; 40(5):31-37

Abstract

Background: Brucella is gram-negative intracellular bacterial pathogens of both humans and animals. Among the six recognized Brucella species, Brucella melitensis is the main etiologic agent involved in ovine and caprine brucellosis and is also the most pathogenic species of humans.

Methods: We amplified by specific primers, two of the best outer membrane antigens Omp31 and Omp25 for this disease, and the construction of recombinant chimeric Omp31-Omp25 combination of them, with using the (EAAAK)₂ linker.

Results: The sequence analysis results showed that strain Rev1 of melitensis for Omp25 antigen has most homology with the strains melitensis M16 and also Omp31 antigen showed the most homology with of *B. Ovis melitensis* species.

Conclusion: Then recombinant chimera Omp31-Omp25 was cloned into Pet32a vector and transform into BL21 (DE3) host cell for expression.

Keywords: Brucella melitensis, Vector, OMPs, Linker, Chimera

How to cite this article: Khabiri A A, Soleimani M, Sekhavati M H, Tahmoorespur M. [Design and construction of expression vector containing the chimeric antigen of *B. melitensis* Omp25-Omp31 to production of a vaccine against brucellosis]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 December - 2019 January;40(5):31-37. Persian.

مقاله پژوهشی

طراحی و ساخت وکتور بیانی حاوی آنتی ژن کایمیریک *Omp25-Omp31* بروسلا ملیتینسیس با هدف تولید واکسن نو ترکیب علیه بیماری بروسلوز

علی اکبر خبیری^۱، محمد سلیمانی^{۲*}، محمد هادی سخاوتی^۳، مجتبی طهمورث پور^۴

^۱گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران
^۲گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
^{۳*}نویسنده مسئول: ایمیل soleimanidor@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۵/۷/۲۴ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۷ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۹/۲۲
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۷ آذر و دی؛ ۴۰(۵):۳۱-۳۷

چکیده

زمینه: بروسلوز یا تب مالت (تب مدیترانه ای) به واسطه رشد و تکثیر باکتری کوکوباسیل گرم منفی بروسلا در سلول های پستانداران رخ می دهد. این بیماری به عنوان یک بیماری مشترک بین انسان و دام شناخته شده است. تا به حال ۶ گونه بروسلا شناسایی شده اند بطوریکه مهمترین آنها که در انسان ایجاد بیماری می کند، بروسلا ملیتینسیس می باشد. اولین قدم در رسیدن به واکسن نو ترکیب انتخاب بهترین آنتی ژن هایی است که بیشترین نقش را در ایجاد بالاترین سطح ایمنی داشته باشد.

روش کار: این پژوهش با هدف خالص سازی دو عدد از بهترین آنتی ژن های محرک بیماری بروسلوز و ساخت کایمر ترکیبی متشکل از این دو آنتی ژن، بواسطه جداسازی و کلونینگ آنتی ژن های *Omp25* و *Omp31* از باکتری کوکوباسیل بروسلا و هم چنین انجام فعالیت های بیوانفورماتیک و تهیه وکتور بیانی کایمر شده از این آنتی ژن ها و کایمر ساخته شده آنها، توسط روش های مهندسی ژنتیک با هدف تولید واکسن نو ترکیب به منظور پیشگیری از این بیماری خواهد بود.

یافته ها: توالی های آنتی ژنی مورد نظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و توالی یابی شدند. عمل اتصال و تولید کایمر دو آنتی ژن با استفاده از لینکر *(EAAAK)* بدون وجود جهش و تغییر در ساختار پروتئین آن انجام شد. قطعه کایمر ساخته شده مورد نظر به داخل میزبان بیانی BL21 (DE3) بعد از عمل کلون، در وکتور بیانی *Pet32 a* انتقال داده شد.

نتیجه گیری: امکان اتصال دو آنتی ژن با لینکر مورد نظر بدون جهش وجود داشت. و علاوه بر آن امکان انتقال توالی کایمری ساخته شده به درون وکتور بیانی و میزبان بیانی امکان پذیر بود. علاوه بر این نتایج بیوانفورماتیک درخت فیلوژنتیکی نشان داد که سویه ملیتینسیس *Rev1* بیشترین همولوژی را برای آنتی ژن *Omp25* با سویه ملیتینسیس *M16* و همچنین بیشترین همولوژی را در بررسی ها برای آنتی ژن *Omp31* بعد از ملیتینسیس با گونه بروسلا *Ovis* دارا می باشد.

کلید واژه ها: بروسلوز، وکتور، بروسلا ملیتینسیس، OMPs، لینکر

نحوه استناد به این مقاله: خبیری ع ا، سلیمانی م، سخاوتی م، طهمورث پور م. طراحی و ساخت وکتور بیانی حاوی آنتی ژن کایمیریک *Omp25-Omp31* بروسلا ملیتینسیس با هدف تولید واکسن نو ترکیب بر علیه بیماری بروسلوز. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۰(۵):۳۱-۳۷

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

بروسلا باکتری داخل سلولی گرم منفی، است که می تواند بسیاری از گونه های حیوانات و انسان را آلوده کند (۱). علائم این بیماری، سقط جنین، کاهش باروری در حیوانات یا عفونت های مزمن با علائمی مانند تب، آرتریت و استئومیلیت در انسان می باشد (۲). بروسلا به شش گونه مختلف شامل بروسلا ملیتنسیس، بروسلا آورتوس، بروسلا سوئیس، بروسلا کنیس، بروسلا ماریس و بروسلا اویس دسته بندی می شود که بیشتر پستانداران خشکی را تحت تاثیر قرار می دهد (۳). اگرچه، در سال های اخیر تعداد فزاینده ای از گونه های بروسلا از پستانداران دریایی جدا شده است، که دو گونه جدید پیشنهادی، شامل بروسلا ستاسا و بروسلا پینی پدیا می باشند (۴). این ها طبقه بندی هایی است که عمدتاً در تفاوت با بیماری زایی و گزینش میزبان ها صورت می گیرد (۵). عفونت انسانی با بروسلا ملیتنسیس در بسیاری از کشورهای در حال توسعه به صورت همه گیر در آمده است (۶). اولین گونه بیماری زا در حیات وحش گونه بروسلا ملیتنسیس می باشد که علاوه بر عامل بیماری در بز و گوسفند یکی از عوامل بیماری زایی اصلی در انسان نیز می باشد (۷). در میان سویه های مختلف ملیتنسیس، Rev1 برای واکسن های موجود علیه بیماری بروسلا در گوسفند و بز استفاده می شود (۸). و به دلیل افزایش مقاومت در استفاده از استرپتومایسین برای درمان علیه بیماری تب مالت برای انسان، مقامات بهداشتی استفاده از این طریق درمان ها را علیه بیماری در انسان ممنوع کرده اند (۹). آنتی ژن های موجود در غشاهای خارجی باکتری ها (OMPs) نقش اساسی در تحریک سیستم ایمنی ایفا می کنند. Omp_s برای اولین بار در اوایل دهه ۱۹۸۰ تشخیص داده شدند (۱۰). و بطور گسترده به عنوان یک ویژگی ایمونوژنیک و حفاظتی شناخته شده اند (۱۱). آنالیزهای PCR_RFLP از Omp25 نشان دادند که ژن Omp25 در گونه های مختلف بروسلا بسیار حفاظت شده می باشد (۱۲). سطح بالای حفاظت شده Omp25 بوسیله مشخص کردن توالی های مختلف از Omp25 در ۶ گونه بروسلا شناخته شده مورد تایید قرار گرفت (۱۳). همچنین مشخص کردند که ژن Omp31 علیه بیماری بروسلا بسیار کاربردی می باشد (۱۴). در یک مطالعه، واکسنی بوسیله ژن Omp31 تولید شد و نقش آن را در کنترل تب مالت مشخص کردند که این ژن با تحریک سلول های CD8⁺ T می تواند باعث جلوگیری از بیماری شود (۱۵). بر اساس مطالعات گذشته در سال های اخیر استفاده از لینکرهای مختلفی برای اتصال در پپتید به منظور افزایش عملکرد نسبت به حالت انفرادی آنها، و افزایش سطح بیان آنها مورد تایید قرار گرفته است. در بسیاری از این مطالعه در بین لینکرهای مطرح شده در بررسی های مختلف، از لینکر آلفا هیلکس (EAAAK)_n (n ≤ 2) با دو تکرار استفاده شد. و نتایج آن بر اساس مطالعات انجام شده با دادهای تجربی در

تعداد تکرار، برای تکرار دو به بالا بهترین میزان بیان، در تولید پروتئین گزارش شده است (۱۷-۱۶). یکی دیگر از موارد استفاده از این نوع لینکر دلیل ساختار آن می باشد، این لینکر در گروه لینکرهای سخت طبقه بندی می شود و دلیل استفاده از لینکر سخت در این مطالعه، این می باشد که دو قطعه آنتی ژنی مورد نظر کمترین اثر را بر روی همدیگر و عملکرد فیزیولوژیکی یکدیگر داشته باشند، و به عبارت دیگر کمترین ایتراکشن را نسبت به عملکرد یکدیگر داشته باشند.

روش کار

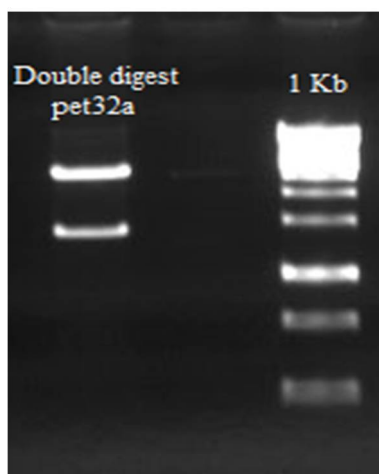
در این مطالعه باکتری بروسلا ملیتنسیس، سویه Rev1 از مجموعه کشت شده در موسسه سرم سازی رازی مشهد تهیه و کشت داده شد. DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج (Bioneer, South Korea)، استخراج شد. کیفیت DNA استخراج شده بر روی ژل الکتروفورز ۰.۸٪ آگارز مورد بررسی قرار گرفت و مقدار خلوص آن توسط دستگاه نانودراپ استکتومتر (ND-2000 Thermo- USA) اندازه گیری شد. از وکتور کلونینگ (Thermo-USA) PTZ57R/T برای کلونینگ و توالی یابی ژنهای بدست آمده استفاده شد. و همچنین از سویه DH5α باکتری اشرشای کولای به عنوان میزبان برای نگهداری قطعات آنتی ژن بدست آمده و در مرحله بعدی کار برای کایمر ساخته شده مورد استفاده قرار گرفت. و در نهایت کایمر ساخته شده به درون وکتور بیانی Pet32 a جهت بیان ساب کلون گردیدند و به منظور اندازه گیری مقدار بیان و سنجش ایمنی زایی برای مراحل بعدی کار با موفقیت به درون میزبان بیانی BL21 (DE3) منتقل شدند. DNA ژنومی باکتری بروسلا ملیتنسیس سویه Rev1 به عنوان الگو در فرآیند PCR برای بدست آوردن کل توالی خوانش شده (ORF) از ژن Omp25 (640bp)، Omp31(720bp) با استفاده از DNA پلی مزاز EX Taq (Takara, Japan) مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای اختصاصی با مکان های برشی مناسب با استفاده از نرم افزار Primer premier5 بر طبق توالی نوکلئوتید موجود در بانک اطلاعاتی NCBI طراحی شده و آنزیم های برشی مناسب در دو انتهای پرایمرها طراحی شدند. برای تکثیر توالی آنتی ژن Omp25 به طول ۶۴۰ جفت باز از یک جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده با توالی F:5'CCATGGATGCGCACTCTTAAGTCTC و R:3' به همراه توالی آنزیم برشی NcoI و R:5'GAATTCGAAGTCTTGTAGCCGATGCC 3 به همراه توالی آنزیم برشی EcoRI استفاده شد و همچنین برای تکثیر توالی آنتی ژن Omp31 به طول ۷۲۰ جفت باز از یک جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده با توالی F:5'GAATTCATGAAAT و R:3' به همراه توالی آنزیم برشی EcoRI و

3--CCATGGATGCGCACTCTTAAGTCTC- دارای توالی
 برشی آنزیم NcoI در ناحیه ۵، و پرایمر برگشت Omp25R (۵-
 GAAGCAGCGGCTAAAGAAGCGGCGGCAAAAATG
 3-AAATCCGTAATTTTG- بدون داشتن ناحیه برشی و بدون
 داشتن کدون پایان استفاده شد (PCR1). همچنین برای آماده کردن
 ژن Omp31 در PCR2 نیز از وکتور کلونینگ PTZ57R/T که در
 مراحل قبل قطعه Omp31 را در آن قرار داده‌ایم به عنوان الگو مورد
 استفاده قرار گرفت و از پرایمر رفت Omp31F (۵-
 TTTAGCCGCTGCTTCTTTTGCCGCAGCTTCGA
 3-TGTAGCCGATGC- بدون ناحیه برشی در ناحیه ۵، و
 پرایمر برگشت Omp31R (۵-
 3-GGATCCTTAGAACTTGTAGTTCAGACCG) که
 دارای ناحیه برشی آنزیم BamHI در انتهای ۳ می‌باشد استفاده شد
 (PCR2). نواحی برشی در توالی‌ها به صورت پرنک تر نشان داده
 شده است. در دومین مرحله محصولات PCR بدست آمده پس از
 ارزیابی توسط ژل آگارز، خالص‌سازی از محلول روی هر دو
 نمونه انجام گرفت و سپس هر دو محصول خالص شده حاصل از
 PCR1 و PCR2 با یکدیگر به همراه یک واحد آنزیم EX Taq
 پلیمرز (۱۲۵/۰۱ U/μl) مخلوط شدند. مخلوط حاصل در PCR3 با
 بیست تکرار، هر کدام شامل واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتیگراد
 یک سیکل ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتیگراد یک سیکل
 ۸۰ ثانیه، مرحله گسترش ۷۲ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه قرار گرفتند
 (PCR3). در آخرین مرحله، محصول PCR3 خالص‌سازی شد و
 با استفاده از پرایمرهای Omp25F و Omp31R در دمای اتصال ۶۴
 درجه سانتیگراد یک سیکل ۲۰ دقیقه گذاشته شد (PCR4).
 محصول PCR4 با استفاده از آنزیم‌های برشی NcoI و BamHI
 تحت واکنش هضم آنزیمی قرار گرفت و به داخل وکتور بیانی
 Pet32 a جهت بیان، ساب کلون گردید و به منظور اندازه‌گیری
 مقدار بیان و سنجش ایمنوزایی برای مراحل بعدی کار به درون
 میزبان بیانی BL21 (DE3) منتقل شدند. با استفاده از ابزار
 BLAST و روش blastn در پایگاه NCBI میزان همپوشانی و همولوژی
 توالی‌های بدست آمده سنجیده شد. کیفیت توالی‌های ارسالی از
 شرکت به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی گونه مورد مطالعه،
 بوسیله نرم افزار Mega v.5.2 مورد محاسبه قرار گرفت. همچنین
 از روش neighbor-joining این نرم‌افزار برای ترسیم نمودار
 درختی استفاده گردید. از الگوریتم و نرم افزار PHRED به منظور
 اصلاح نوکلئوتیدی توالی‌ها استفاده شد. برای بررسی تفاوت‌های
 تک نوکلئوتیدی از نرم افزار CLC Main Workbench نیز کمک
 گرفته شد. بررسی کیفیت خوانش توالی‌های ارسالی شده با استفاده
 از نرم افزارهای Chromas Lite و BioEdit مورد بررسی قرار
 گرفت.

3`R:5`GGATCCTTAGAACTTGTAGTTCAGACCG به
 همراه آنزیم برشی BamHI استفاده شد. انجام واکنش زنجیره‌ای
 پلیمرز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با اجزای واکنش PCR و
 غلظت مواد تشکیل دهنده، انجام شد که عبارت بودند از ۱/۵
 میکرولیتر از DNA ژنومی (۱۰۰، ۵۰ نانوگرم)، یک واحد آنزیم
 EX Taq پلیمرز (۱۲۵/۰۱ U/μl) (Takara, Japan)، ۰/۵ میکرولیتر
 dNTPs (۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر MgCl2 ۵۰ میلی‌مولار، ۱
 میکرولیتر مخلوط پرایمر ۵ میکرومولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X و
 ۱۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده؛ با استفاده از دستگاه
 ترموسایکلر Biometra (آلمان -T-personal) در ۳۵ سیکل و با
 برنامه حرارتی بصورت، واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه
 سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه برای ۳۰ ثانیه،
 تکثیر در دمای ۷۲ درجه برای ۴۵ ثانیه، همچنین، یک مرحله
 واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه و
 یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه نیز انجام
 شد. محصولات PCR توسط ژل آگارز ۱/۸٪ در دستگاه
 الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت و جهت توالی‌یابی با استفاده
 از پرایمرهای اختصاصی ارسال گردیدند (Macrogen, south
 Korea). توالی‌های حاصله با دیگر توالی‌های موجود در بانک ژنی
 NCBI با استفاده از ابزار BLAST مورد بررسی و همولوژی قرار
 گرفت و از نرم افزار CLC Main workbench 5.5 برای بررسی
 توالی‌ها و نرم افزار MEGA 5 برای رسم درخت فیلوژنتیکی
 استفاده شد. محصولات PCR توسط کیت (Bioneer, German)
 Ron's Agarose Gel mini perp kit، بر طبق دستورالعمل شرکت
 مربوطه خالص‌سازی شد. محصولات PCR خالص شده به داخل
 وکتور کلونینگ PTZ57R/T توسط روش T/A کلونینگ بر طبق
 دستورالعمل شرکت (Thermo, USA) صورت گرفت. برای
 سلولهای مستعد میزبان از اشریشیاکلای DH5α استفاده شد و
 ترنسفورمیشن در ادامه آن با روش Sambrook and Russell
 صورت گرفت. وکتورهای PTZ57R/T حاوی ژن به داخل سلول
 های میزبان اشریشیاکلای DH5α انتقال داده شد. کلنی‌های باکتری
 رشد کرده بر روی محیط، که حاوی پلاسمید بود برای تاکید بر
 وجود قطعه در پلاسمید انتقال داده شده، با روش کلنی PCR مورد
 انتخاب قرار گرفتند. کلونی‌های حاوی پلاسمید دارای قطعه کشت
 داده شدند، و پلاسمیدهای آن‌ها توسط کیت Ron's plasmid mini
 kit (Bioneer, German) استخراج شدند و با عمل هضم آنزیمی
 که بر روی آنها صورت گرفت مورد تایید قرار گرفتند. کایمر دو
 ژن با استفاده از متد (۱۷) Splicing-by-Overlap Extension با
 مقداری تغییر در دستورالعمل اولیه آن انجام گرفت. در مرحله اول،
 برای آماده کردن ژن Omp25 در PCR1 از وکتور کلونینگ
 PTZ57R/T که در مراحل قبل قطعه Omp25 را در آن قرار داده
 ایم به عنوان الگو استفاده شد، و از پرایمر رفت Omp25F (۵-

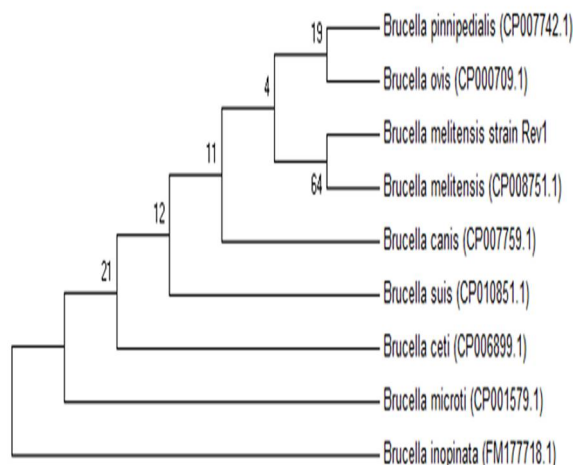
یافته‌ها

بعدی کار به درون میزبان بیانی (BL21 (DE3) منتقل شدند. بعد از انتقال وکتور بیانی Pet32 a حاوی کانستراک *Omp25-Omp31* به داخل میزبان بیانی (BL21 (DE3) جهت تایید وجود قطعه در داخل وکتور Pet32 a، میزبان بیانی (BL21 (DE3) تحت عمل استخراج پلاسمید قرار گرفت و عمل هضم روی آن صورت گرفت. (شکل ۲).



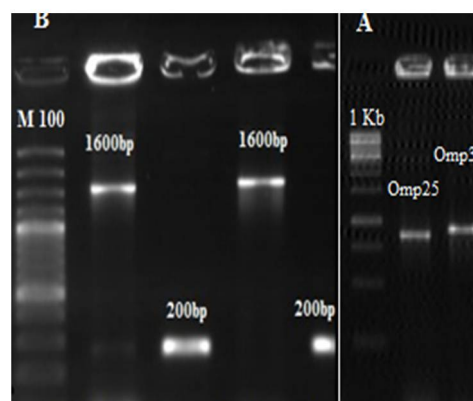
شکل شماره ۲: هضم کایمر ساخته شده داخل وکتور Pet32 a حاوی کایمر ژن‌های *Omp25-Omp31* با طول تقریبی ۱۴۰۰ bp.

توالی آنتی ژنهای *Omp25,31* با توالی این دو آنتی ژن در گونه‌های دیگر مورد مقایسه قرار گرفتند. (شکل ۳).



شکل شماره ۳: نمودار فیلوژنتیک (نمودار درختی N-J) توالی *Omp31* بروسلا ملیتینسیس Rev1 و سایر گونه‌های بروسلا.

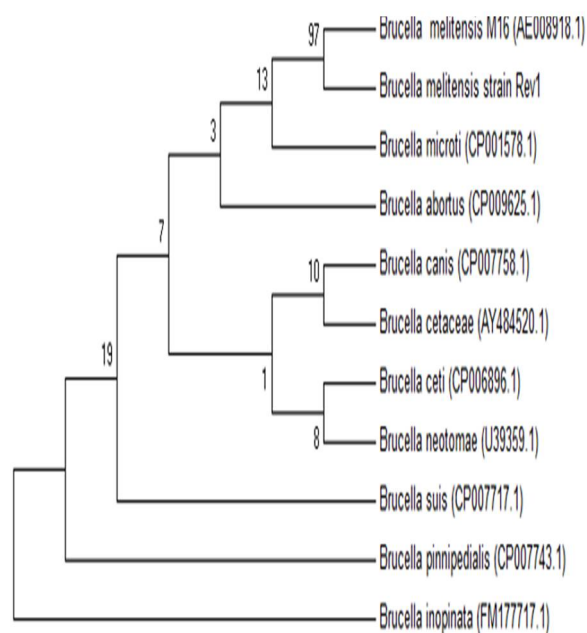
استخراج DNA از نمونه مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت با موفقیت انجام شد. قطعات اختصاصی برای ناحیه *Omp25* و *Omp31* با طول‌هایی به ترتیب ۶۴۰ و ۷۲۰ نوکلئوتید تکثیر شدند. هر یک از قطعات آنتی ژنی بدست آمده بصورت جداگانه در داخل وکتور کلونینگ PTZ57R/T با روش شرکت سازنده کیت کلون شدند و پس از عمل ترنسفورم در داخل سلول‌های مستعد، کلونی‌های اشیرشیاکلاهی *DH5α* میزبان بر روی محیط کشت رشد کرده برای تایید وجود یا عدم وجود قطعات در پلاسمید در روش کلونینگ PCR مورد انتخاب قرار گرفتند (شکل A ۱). از پلاسمیدهای حاوی ژن‌های *Omp25* و *Omp31* جهت الگو برای ساخت کایمر استفاده شد. و بعد از آن توالی کایمر ساخته شده در داخل وکتور کلونینگ PTZ57R/T کلون شد و پس از عمل ترنسفورم در داخل سلول‌های مستعد، کلونی‌های اشیرشیاکلاهی *DH5α* میزبان بر روی محیط رشد کردند. برای تایید وجود یا عدم وجود قطعه کایمر ساخته شده در پلاسمید روش کلونینگ PCR با پرایمرهای M13 مورد انتخاب قرار گرفتند این پرایمرها حدود ۲۰۰ نوکلئوتید به توالی اضافه می‌کنند (شکل B ۱).



شکل شماره ۱: A الکتروفورز محصولات کلونی PCR آنتی ژن‌های *Omp25* (840 p) و *Omp31* (920 bp) بر روی ژل آگارز ۰.۸ درصد. B الکتروفورز کایمر ساخته شده داخل وکتور کلونینگ PTZ57R/T حاوی دو آنتی ژن *Omp25-Omp31* با طول تقریبی ۱۶۰۰ bp، توالی ۲۰۰ نوکلئوتیدی نشان‌دهنده کلونی‌های حاوی وکتور و بدون وجود قطعه می‌باشند.

در مرحله بعدی تحقیق وکتورهای کلونینگ PTZ57R/T دارای آنتی ژن‌های *Omp25* و *Omp31* و همچنین کایمر ساخته شده حاوی آنتی ژن ترکیبی *Omp25-Omp31* جهت توالی یابی با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت M13 به شرکت MACRO ارسال شد. کایمر نهایی ساخته شده با استفاده از آنزیم‌های برشی *NcoI* و *BamHI* تحت واکنش هضم آنزیمی قرار گرفت و به داخل وکتور بیانی Pet32 a جهت بیان، ساب کلون گردید و به منظور اندازه‌گیری مقدار بیان و سنجش ایمنو زایی برای مراحل

لینکر مورد نظر بودند به یک دیگر متصل شدند و قطعه کایمر جدید با طول تقریبی ۱۴۰۰bp حاصل شد. صحت فرایند اتصال و تکثیر کایمر ساخته شده بر روی ژل آگارز نشان داد که طول کایمر دقیقاً برابر مجموع هر دو ژن به همراه لینکر می‌باشد. همچنین برای تایید وجود یا عدم وجود از انجام شدن عمل کلون و ترانسفورم قطعه کایمر مورد نظر از روش کلونینگ PCR با پرایم‌های M13 مورد استفاده قرار گرفت. همانطور که در شکل ۱B نیز پیداست وجود کلون‌هایی حاوی قطعه مورد نظر مشاهده شد که برای تایید نهایی در تکثیر دقیق کایمر Omp25-Omp31 و کتورهای کلونینگ PTZ57R/T دارای آنتی ژن های Omp25 و Omp31 و همچنین و کتورهای کلونینگ PTZ57R/T کایمر ساخته شده حاوی آنتی ژن ترکیبی Omp25-Omp31 جهت توالی یابی با استفاده از پرایم‌های رفت و برگشت M13 به شرکت MACRO GEN ارسال شد. نتایج بدست آمده از خوانش توالی‌ها توسط نرم افزارهای Chromas Lite و BioEdit مورد ارزیابی و کیفیت سنجی قرار گرفتند. نتایج ارزیابی نشان دهنده کیفیت بسیار بالای توالی‌یابی بوده و انجام آنالیزهای بیوانفورماتیک امکان‌پذیر بودند. مقایسه نتایج بدست آمده از توالی‌یابی این دو آنتی ژن بصورت جدا از یکدیگر و کایمر ساخته شده از ترکیب دو آنتی ژن نشان داد که بعد از عمل اتصال این دو آنتی ژن به یکدیگر علاوه بر اینکه هیچ جهشی در توالی بوجود نیامده است، بلکه چهارچوب خوانش آن در سطح پروتئین نیز کاملاً صحیح می‌باشد. و همچنین عمل حذف کدون پایان در انتهای آنتی ژن Omp25 بصورت صحیحی انجام شده است. در بررسی درخت فیلوژنتیکی حاصل از دو آنتی ژن Omp25 و Omp31 نتایج نشان داد که تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی موجود در بین گونه‌های مختلف به مقدار بسیار کمی وجود دارد، و این تفاوت‌ها نیز منجر به تفاوت اسید آمینه‌ای در سطح پروتئین این دو آنتی ژن نشده است. برای هر دو آنتی ژن مورد مطالعه تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی موجود در توالی در بین گونه‌های مختلف در قسمت انتهایی توالی‌ها مشاهده شدند، و بر طبق مطالعات انجام شده در بررسی‌های اپیتوپی انجام شده بر روی آنتی ژن‌های مختلف گزارش شده است که تفاوت در سطح اسید آمینه‌ای اثر بسیار زیادی بر عملکرد آنتی ژن‌ها دارد، می‌شود استنباط کرد که با وجود تغییر در سطح نوکلئوتیدی به دلیل اهمیت عملکرد در طی سالیان گذشته تغییری در سطح اسید آمینه‌ای ایجاد نشده است و بصورت حفاظت شده باقی مانده است. رسم درخت فیلوژنتیکی نشان داد که سویه ملیتینسیس Rev1 بیشترین همولوژی را برای آنتی ژن Omp25 به ترتیب با سویه ملیتینسیس M16 و گونه‌های Abortus, Microti و همچنین بیشترین همولوژی در بررسی‌ها برای آنتی ژن Omp31 بعد از گونه ملیتینسیس با گونه Ovis مشاهده شد.



شکل شماره ۴: نمودار فیلوژنتیک (نمودار درختی N-J) توالی Omp25 بروسلا ملیتینسیس Rev1 و سایر گونه‌های بروسلا

بحث

نتایج طیف‌سنجی و ژل آگارز بدست آمده از استخراج نشان داد که DNA استخراج شده از نظر کیفیت و کمیت از شرایط مناسبی برای واکنش‌های PCR برخوردار است. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱/۸ درصد نشان داد که پرایم‌ها به خوبی فعالیت نموده است. همچنین، وجود یک تک بانده اختصاصی برای ژن‌های Omp25 و Omp31 بر روی ژل آگارز نشان‌دهنده این بود که توالی مشابهی برای جفت شدن آغازگرهای اختصاصی طراحی شده مورد استفاده در محل‌های دیگر ژنوم وجود نداشته است. برای تایید وجود یا عدم وجود قطعات در پلاسמיד روش کلونینگ PCR مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام PCR از پرایم‌های M13 که دارای جایگاه مکمل در وکتور بودند استفاده شد که در استفاده از این پرایم حدود ۲۰۰ نوکلئوتید به هر توالی اضافه شد که همانطور که در شکل ۱A مشاهده می‌شود کلونی‌های انتخابی دارای قطعات مورد نظر می‌باشد که گواهی بر صحت انجام فرایند های کلونینگ و ترانسفورم این دو قطعه می‌باشد. پس از بررسی اولیه صحت در فرایند کلون و ترانسفورم توالی‌های ژن‌های Omp25 و Omp31 از پلاسמיד‌های حاوی این قطعات ژنی برای الگوی ساخت کایمر Omp25-Omp31 استفاده شد. در این مرحله با روش Splicing-by-Overlap Extension دو قطعه آنتی ژنی Omp25,31 با استفاده از پرایم‌های طراحی شده که بخشی از توالی نوکلئوتیدی آنها

نتیجه گیری

بر اساس بررسی منابع صورت گرفته دو آنتی ژن از بهترین آنتی ژنهای که بیشترین مطالعات انجام شده در سالهای اخیر در ارتباط با بیماری بروسلوز به خود اختصاص می دهند انتخاب گردید. مراحل تکثیر این دو آنتی ژن با موفقیت صورت گرفت. همچنین بر اساس مطالعات گذشته صورت گرفته نیز بهترین لینکر قابل استفاده برای توالی های آنتی ژنی انتخاب شد. عمل اتصال دو آنتی ژن به یکدیگر و طراحی های لازم از قبیل حذف کدون پایان

برای آنتی ژن اول (*Omp25*) و طراحی نواحی برشی با موفقیت انجام شدند. توالی کایمر ساخته شده با موفقیت در وکتور بیانی ذکر شده وارد و بعد از آن عمل انتقال آن به ناقل بیانی صورت گرفت. توالی کایمریک ساخته شده می تواند در مطالعات آینده به منظور تولید واکسن نو ترکیب علیه بیماری بروسلوز و همچنین در بررسی های عملکردی کایمر این دو آنتی ژن از نظر ایمنی زایی در مقایسه با واکسن های موجود در بازار و واکسن این آنتی ژن ها بصورت منفرد و نه بصورت کایمر مورد استفاده قرار بگیرد.

References

- Xavier M N, Paixão T A, den Hartigh A B, Tsolis R M, Santos R L. Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal* 2010; **4**: 109-118. doi: 10.2174/1874318801004010109
- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos E. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**(2): 91-99. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70382-6
- Osterman B, Moriyon I. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; **56**: 1173-1175. doi: 10.1099/ijs.0.64349-0
- Zygmunt M, Maquart M, Bernardet N, Doublet B, and Cloeckaert A. Novel IS711-Specific Chromosomal Locations Useful for Identification and Classification of Marine Mammal *Brucella* Strains. *Journal of clinical microbiology* 2010; **4**: 3765-3769. doi: 10.1128/jcm.01069-10
- Foster G, Osterman BS, Godfroid J. *Brucella ceti* sp. Nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. Nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; **57**: 2688-2693. doi: 10.1099/ijs.0.65269-0
- Jinkyung Ko, Gary A. Splitter. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis. *Clinical microbiology reviews* 2003; **4**: 65-78. doi: 10.1128/cmr.16.1.65-78.2003
- Cloeckaert A, Vicaino N, Paquet J, Raul A., Elzer P. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp. *Veterinary Microbiology* 2002; **90**: 229-247. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00211-0
- Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. *Vaccine* 2000; **20**: 2546-2550. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00159-7
- Ghasemi A, Salari M, Zarnani A, Pourmand M, Ahmadi H, et al. Immune reactivity of *Brucella melitensis*-vaccinated rabbit serum with recombinant *Omp31* and *DnaK* proteins. *Iranian Journal of Microbiology* 2013; **3**: 19-23. doi: 10.5812/ijm.6875
- Dubray G, Christiane C. Evidence of three major polysaccharide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane. *Annales de Recherches Veterinaires* 1983; **14**: 311-318.
- Cloeckaert A, Verger J M, Grayon M, Vizcaino N. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol Lett* 1996; **145**(1): 1-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08547.x
- Vizcaino N, Verger J, Maggy, Grayon M. DNA polymorphism at the *omp-37* locus of *Brucella* spp. evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. *Microbiology* 1997; **143**: 291-292. doi: 10.1099/00221287-143-9-2913
- Moreno E, Cloeckaert A. *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology* 2002; **16**: 209-227. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00210-9
- Guilloteau S. Reconfiguring the ALMA Array. *ALMA Memo* 1999; **274**: 1-5.
- Maria C, Alejandra G, Diaz f, Vanesa Z, Guillermo H, Fernando A. Goldbaum M. The vaccine candidate BLSOmp31 protects mice against *Brucella canis* infection. *Vaccine* 2013; **6**: 6129-6135. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.07.041
- Ping Lu, Ming G. Bifunctional enhancement of a β -glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers. *Appl Microbial Biotechnology* 2008; **79**: 579-587. doi: 10.1007/s00253-008-1468-4
- Hoa S N, Hunt a H D, Horton B R M, Pullen J K, Peasea L R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 1999; **77**: 51-59. doi: 10.1016/0378-1119(89)90358-2