

## Expression of the Gene Encoding the *Brucella abortus* BAB1-0278 Antigen in Probiotic *Lactococcus lactis* Bacteria

Donya kazemi <sup>1</sup>, Abbas Doosti <sup>2</sup>, Mostafa Shakhshi-niaei <sup>3</sup>

1.Ph.D. Candidate, Dept. of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. ORCID ID: 0000-0001-9067-7848

2. Professor, Department of Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. (Corresponding Author), Tel:083-46228013, Email: abbasdoosti@yahoo.com. ORCID ID: 0000-0001-8052-5963

3. Assistant Professor, Department of Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. ORCID ID: 0000-0002-9863-2588

### ABSTRACT

**Background and Aim:** The *BAB1-0278* has an essential role in *abortus* infection. This antigen encodes a protein called GcrA, which plays an essential role in the transcription of target genes in the cell cycle. Thus, *BAB1-0278* has unique potential in therapeutic strategies against *B. abortus*. The purpose of this research is to produce engineered *Lactococcus lactis* bacteria expressing the *BAB1-0278* protein of *B. abortus*.

**Materials and Methods:** The gene construction design contains a signal peptide sequence in the nisin-based expression vector (pN3z8148-Usp45-*BAB1-0278*) and is synthesized by GENEray. The recombinant plasmid transformed into *Escherichia coli* bacteria. The recombinant plasmid was extracted from transformed bacteria. *L. lactis* transformed by electroporation both with the recombinant plasmid containing the target gene pNZ8148-Usp45-*BAB1-0278* and the plasmid without the target gene. *BAB1-0278* expression was confirmed by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR) and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot techniques.

**Results:** *B. abortus* BAB1-0278 was expressed in *L. lactis* and confirmed by RT-PCR. SDS-PAGE analysis of proteins isolated from *L. lactis* transformed with recombinant plasmid, compared to untransformed *L. lactis*, showed a protein with a molecular weight of 13 kDa.

**Conclusion:** The results of PCR, restricted enzyme digestion, and sequencing by GENEray revealed that *BAB1-0278* was cloned correctly in pNZ8148-Usp45. SDS-PAGE and Western blot were used to analyze *BAB1-0278* protein expression. Transformed *L. lactis* can be a crucial step for oral vaccine research against *B. abortus*.

**Keywords:** *Brucella abortus*, *BAB1-0278*, *Lactococcus lactis*, Vaccine, Probiotic, Electroporation

**Received:** July 15, 2023

**Accepted:** Feb 15, 2024

**How to cite the article:** Donya kazemi, Abbas Doosti, Mostafa Shakhshi-niaei. Expression of the Gene Encoding the *Brucella abortus* BAB1-0278 Antigen in Probiotic *Lactococcus lactis* Bacteria. SJKU 2024;29(4):1-13.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

## بیان ژن کد کننده آنتی ژن *BABI-0278* باکتری *بروسلا آبورتوس* در باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس

دنیا کاظمی<sup>۱</sup>، عباس دوستی<sup>۲</sup>، مصطفی شخصی نیایی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری. گروه زیست شناسی، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد، ایران. کد ارکید: ۷۸۴۸-۹۰۶۷-۰۰۰۱-۰۰۰۰-۰۰۰۰

۲. استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد، ایران. (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com، تلفن:

۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰، کد ارکید: ۵۹۶۳-۸۰۵۲-۰۰۰۱-۰۰۰۰-۰۰۰۰

۳. استادیار، گروه زیست شناسی، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد، ایران. کد ارکید: ۲۵۸۸-۹۸۶۳-۰۰۰۲-۰۰۰۰-۰۰۰۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** آنتی ژن *BABI-0278* بروسلا آبورتوس در ایجاد بیماری بروسلوز نقش دارد. این آنتی ژن، پروتئینی به نام GcrA را رمزگذاری می کند که نقش اساسی در رونویسی ژن های هدف در چرخه سلولی دارد. از این رو *BABI-0278* دارای پتانسیل های منحصر به فردی در استراتژی های درمانی علیه بروسلا آبورتوس می باشد. هدف از مطالعه حاضر تولید باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس مهندسی شده بیان کننده پروتئین *BABI-0278* بروسلا آبورتوس می باشد.

**مواد و روش ها:** طراحی سازواره ژنی حاوی یک توالی سیگنال پپتیدی درون ناقل بیانی مبتنی بر القا با نیسین (-pN3z8148-*Usp45-BABI-0278*) صورت گرفت و سنتز آن توسط شرکت GENERay انجام شد. پلاسمید نو ترکیب در باکتری اشریشیا کلی ترانسفورم شد. استخراج پلاسمید نو ترکیب از باکتری های ترانسفورم شده صورت گرفت. لاکتوکوکوس لاکتیس توسط الکتروپوریشن هم با پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن هدف *pNZ8148-Usp45-BABI-0278* و هم با پلاسمید فاقد ژن هدف ترانسفورم شد. تایید بیان *BABI-0278* توسط تکنیک های واکنش زنجیره پلیمرز معکوس (RT-PCR) و سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید الکتروفورز ژل (SDS-PAGE) و وسترن بلات انجام شد.

**یافته ها:** *BABI-0278* بروسلا آبورتوس در لاکتوکوکوس لاکتیس بیان و به وسیله RT-PCR مورد تایید قرار گرفت. تجزیه و تحلیل SDS-PAGE پروتئین های جدا شده از لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با پلاسمید نو ترکیب در مقایسه با لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم نشده پروتئینی با وزن مولکولی ۱۳ کیلو دالتون را نشان داد.

**نتیجه گیری:** نتایج PCR، هضم آنزیم محدود کننده و تعیین توالی توسط شرکت GENERay نشان داد که *BABI-0278* به درستی در pNZ8148-Usp45 کلون شده است. SDS-PAGE و وسترن بلات برای آنالیز بیان پروتئین *BABI-0278* استفاده شد. لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده می تواند گام مهمی جهت تحقیقات واکسن خوراکی علیه بروسلا آبورتوس باشد.

**کلمات کلیدی:** بروسلا آبورتوس، *BABI-0278*، لاکتوکوکوس لاکتیس، واکسن، پروبیوتیک، الکتروپوریشن

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۱۰/۱۵ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۲/۱۱/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۵

بزرگ DNA ژنومی، مانند توالی‌های DNA تحت عنوان جزایر ژنومیک (GIs) از سایر باکتری‌ها یا از دست دادن آن قطعات می‌باشد. یکی از جزایر ژنومی در بروسلا آبورتوس تحت عنوان GI-3 می‌باشد. این جزیره چندین بخش قالب خواندن باز (Open Reading Frame, ORF) همچون *BABI-0278* را کد می‌کند که آمینو اسیدهایی را بیان می‌کند که نقش مهمی در ماندگاری و بیماری‌زایی درون سلولی ارگانسیم دارند (۱۱ و ۱۰). از این رو در این مطالعه به بررسی باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان یک سیستم بیانی زنده برای بیان پروتئین *BABI\_0278* بروسلا آبورتوس پرداخته شده است.

### مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و روش گردآوری اطلاعات از نوع مطالعات کتابخانه‌ای و تجربیات آزمایشگاهی می‌باشد. لازم به ذکر است که تمام کارهای پژوهشی این مقاله با رعایت کامل اصول اخلاقی (کد اخلاق: IR.IAU.SHK.REC.1401.002) انجام گرفته است.

### سویه‌های باکتریایی و شرایط رشد

لاکتوکوکوس لاکتیس (مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی، ایران. PTCC: 1336) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی محیط کشت M17 (مرک، آلمان) حاوی ۵٪ گلوکز (GM17) رشد کرد. *E. coli* سویه Top10F (مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران) در دمای ۳۷ درجه سلیسوس روی محیط کشت لوریا برتانی (LB) (مرک، آلمان) رشد کرد. به منظور غربالگری باکتری‌های ترانسفورم شده از آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان شاخص انتخابی استفاده شد. غلظت بهینه آنتی بیوتیک کلرامفنیکل برای اشریشیا کلی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای لاکتوکوکوس لاکتیس ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر است (۱۲).

بروسلا آبورتوس یک باکتری درون سلولی اختیاری است که باعث تب مالت یا بروسلوز می‌شود. بروسلوز از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است که از حیوانات اهلی به انسان منتقل می‌گردد (۱). انتقال این بیماری معمولاً با مصرف محصولات حیوانی غیر پاستوریزه مرتبط است. با این حال، مکانیسم دیگر انتقال شامل تماس پوست یا غشاهای مخاطی با بافت حیوانی آلوده است (۲). بروسلوز باعث سقط جنین و کاهش قدرت باروری در حیوانات، تب و خستگی همراه با درد مفاصل در انسان می‌شود، و بیشتر در کشورهای در حال توسعه و گرمسیر یافت می‌شود (۳). پاسخ ایمنی به گونه‌های مختلف بروسلا عمدتاً بر روی موش مورد مطالعه قرار گرفته است. در این مدل حیوانی به نظر می‌رسد که ایمنی زایی از طریق فعال شدن ایمنی هومورال و سلولی ایجاد می‌شود (۴ و ۵). واکنش‌های زنده ضعیف شده قادر به تحریک پاسخ‌های ایمنی قوی وابسته به سلول (Cell-Mediated Immunity, CMI) در برابر بروسلوز هستند. سویه‌های ضعیف شده بروسلا همچون بروسلا ملتینسیس Rev1 و بروسلا آبورتوس S19 و RB51 برای کنترل بروسلوز در حیوانات اهلی استفاده می‌شوند. استفاده از این سویه‌های ضعیف شده، دارای عوارض جانبی قابل توجهی مانند آلوده کردن شیر، خطر برای انسان، سقط جنین در حیوانات باردار و عود مجدد بیماری در موجود زنده است (۶ و ۷). استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک زنده، به دلیل عدم تولید لیپوپلی ساکارید (Lipopolysaccharide, LPS) و عدم تولید هر گونه محصول متابولیک سمی دیگر، به عنوان یک سیستم تحویل دهنده آنتی‌ژن روشی امیدوار کننده برای تهیه واکنش‌های DNA می‌باشد (۸). علاوه بر این، همه سویه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس برخلاف گونه‌های لاکتوباسیلوس می‌توانند در دستگاه گوارش زنده بمانند (۹). یکی از ویژگی‌های باکتری‌ها توانایی آن‌ها در بدست آوردن قطعات

### تهیه و تائید صحت کلون شدن ژن *BABI-0278* در سازه بیانی نو ترکیب

ژن *BABI-0278* (شماره دسترسی CAJ10234) به طول ۲۳۷ جفت باز برگرفته از بانک ژن NCBI همراه با توالی سیگنال پپتید ۳۱ آمینو اسیدی بنام Usp45 با شماره دسترسی ABY84357 انتخاب شد. سپس ژن به همراه سیگنال پپتید بصورت مصنوعی در وکتور بیانی مبتنی بر نیسین pNZ8148 توسط شرکت GENEray چین تهیه و ارسال شد. با استفاده از سایت Addgene.org اطلاعات مربوط به توالی وکتور بیانی مبتنی بر نیسین pNZ8148 بدست آمد و با استفاده از نرم افزار Gene Runner (version 3.05) جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده مشخص شد. در اولین مرحله از تائید صحت کلون شدن ژن مورد نظر در وکتور مربوطه، سایت برش آنزیمی برای آنزیم‌های *XbaI* و *KpnI* در نظر گرفته شد و هضم آنزیمی توسط شرکت GENEray صورت گرفت. در مرحله دوم توالی یابی نوکلئوتیدی برای تائید صحت جهت گیری '۵' و '۳' توالی DNA، در وکتور نو ترکیب توسط شرکت GENEray انجام پذیرفت. صحت کلون شدن ژن *BABI-0278* با استفاده از تکنیک PCR بوسیله پرایمرهای اختصاصی طراحی شده با نرم افزار Gene Runner که برای تولید به شرکت سیناژن ارسال شدند، انجام گرفت. جفت پرایمرها شامل:

توالی پرایمر رفت 5' ' ATGCACTGGAAAAGCAGAAGTC3  
توالی پرایمر برگشت ' 5' TTAACGACTACCAGCTTTACCA3  
در نظر گرفته شد. طول پرایمر رفت و برگشت ۲۲ نوکلئوتید و دمای اتصال آن‌ها ۵۴ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید. واکنش PCR توسط مسترمیکس امپلیکون (Ampliqon PCR Kit) دانمارک) انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل، یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۰ مرحله تکراری شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد

به مدت یک دقیقه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی یک مرحله‌ای در ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. نتایج روی ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید، الکتروفورز و باندها بررسی شدند. ژل الکتروفورز شده با اشعه UV حاصل از دستگاه ژل داک (UVI Tech، انگلستان)، مشاهده و ثبت شد.

### ترانسفورماسیون *E. coli* با pNZ8148-Usp45- *BABI\_0278*

تکثیر وکتور در *E. coli* با تکنیک ترانسفورماسیون کلسیم کلراید همراه با یک شوک حرارتی انجام شد. بدین صورت که *E. coli* با بافر کلسیم کلراید (۱/۰ مولار) در دمای ۴ درجه سلیسیوس به حالت سوسپانسیون درآمد. سپس جهت ترانسفورماسیون، پلاسمید نو ترکیب به سوسپانسیون سلول‌های مستعد افزوده شد. مخلوط در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه شوک حرارتی داده شد. بلافاصله شوک سرد در ۴ درجه سلیسیوس صورت گرفت. سپس ۱ میلی لیتر محیط لوریا برتانی مایع فاقد آنتی‌بیوتیک به سوسپانسیون باکتری اضافه شد. پس از ۱ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس روی محیط کشت LB آگار کشت داده شد (۱۳). این محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (سیگما، آلمان) با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان شاخص انتخابی باکتری‌های دریافت کننده وکتور نو ترکیب pNZ8148- *BABI-0278* است. سپس به کمک کیت Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN، تایوان) خالص‌سازی وکتور صورت گرفت. به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ (ترموفیشر ساینٹیفیک، ایالت متحده) غلظت و خلوص پلاسمید نو ترکیب استخراج شده، مورد سنجش قرار گرفت.

### ترانسفورماسیون لاکتوکوکوس لاکتیس با pNZ8148- *Usp45-BABI-0278*

در این مرحله استخراج کل RNA موجود از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور حامل ژن هدف انجام گرفت.

### استخراج RNA از رسوب باکتری به کمک YTzol pure RNA

نمونه‌های رسوب باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده به میکروتیوب منتقل شده و مقدار  $1000 \mu\text{l}$  وایتیزول (یکتا تجهیز آزما، ایران) سرد به محتویات اضافه شد. سپس به شدت تکان داده شد تا سلول‌ها کاملاً لیز شوند و یک محلول همگن به دست آید. در مرحله بعد  $200 \mu\text{l}$  کلروفرم برای جداسازی فازها به میکروتیوب حاوی وایتیزول اضافه و چند بار اینورت انجام شد. میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه با دور  $13000 \text{rpm}$  در دمای  $4^\circ\text{C}$  سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ کردن ۳ فاز تشکیل شد. لایه زیرین حاوی رسوب لاشه و اجزای سلول و لایه میانی حاوی رسوب سفید رنگ حاوی پروتئین‌های سلولی و فاز آبی رویی حاوی RNA می‌باشد. به آرامی و با دقت فاز رویی حاوی RNA را بدون برخورد به لایه زیرین توسط سمپلر، به مقدار  $400 \mu\text{l}$  برداشته و به یک میکروتیوب جدید  $1/5$  منتقل شد. سپس به همان مقدار ( $1 \mu\text{l}$ )  $400$  ایزوپروپانول سرد به میکروتیوب افزوده و به مدت ۱ ساعت در دمای  $20^\circ\text{C}$  - انکوبه شد. برای به دست آوردن رسوب در این مرحله به مدت ۱۵ دقیقه با دور  $13000 \text{rpm}$  در دمای  $4^\circ\text{C}$  سانتریفیوژ انجام شد. فاز رویی به‌طور کامل توسط سمپلر تخلیه گردید تا فقط رسوب RNA در ته میکروتیوب باقی بماند. سپس به رسوب RNA، میزان  $1000 \mu\text{l}$  اتانول  $75$  درصد برای شستشو اضافه گردید. مجدداً سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور  $10000 \text{rpm}$  در دمای  $4^\circ\text{C}$  انجام شد. پس از سانتریفیوژ الکل به طور کامل خارج گردید. در مرحله بعد میکروتیوب بر روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت تا رسوب RNA کاملاً خشک گردد. بر اساس حجم کلاف به دست آمده در انتها به مقدار  $30-50 \mu\text{l}$  آب دیس اضافه گردید و پیپتینگ انجام گرفت تا رسوب RNA کاملاً حل

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و نه / مهر و آبان ۱۴۰۳

برای ترانسفورم کردن این باکتری از روش الکتروپوریشن (دستگاه Bio-Rad، Pulser Gene Xcell، ایالات متحده) استفاده شد. دو محلول برای ترانسفورم باکتری‌های مستعد استفاده شد. محلول اول برای قبل از الکتروپوریشن آماده گردید. بدین ترتیب که مقدار  $20$  گرم EDTA  $86$  گرم سوکروز و  $25$  گرم گلیسین در  $500$  میلی لیتر آب مقطر حل شدند. حجم نهایی با آب مقطر به  $1000$  میلی لیتر رسید. در نهایت برای استریل شدن اتوکلاو شد. محلول دوم برای بعد از الکتروپوریشن آماده گردید. مقدار  $2/5$  گرم لاکتوز،  $1/1$  گرم کلرید کلسیم و  $9/5$  گرم کلرید منیزیم در  $500$  میلی لیتر محیط M17-Broth حل شد. حجم نهایی با محیط مایع M17 به  $1000$  میلی لیتر رسید و با فیلتر  $0/2$  استریل و آماده شد. سلول‌های مستعد با پلاسمیدهای نو ترکیب به صورت الکتریکی ترانسفورم (Bio-Rad، Gene Pulser، ایالت متحده) شدند. در دمای  $30$  درجه سلیسیوس به مدت  $48$  ساعت انکوبه شدند (۱۴). همزمان با ترانسفورم کردن لاکتوکوکوس لاکتیس با وکتور نو ترکیب در یک کووت جداگانه لاکتوکوکوس لاکتیس با وکتور pNZ8148 فاقد *BABI-0278* ترانسفورم شد.

### استخراج پلاسمید از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس و پیگیری *BABI-0278*

برای استخراج پلاسمید از لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده از کیت استخراج پلاسمید Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN، تایوان) استفاده شد. ردیابی ژن *BABI-0278* در وکتور توسط واکنش PCR انجام گرفت. به منظور ارزیابی صحت کلونینگ و صحت بیان در سطح پروتئین پس از الکتروپوریشن، کلون‌های مثبت با انجام استخراج RNA و سنتز cDNA با ۳ تکنیک RT-PCR و روش الکتروفورز روی ژل عمودی SDS-PAGE و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفتند.

### RT-PCR

۲۸۰ نانومتر نشان دهنده ی پروتئین و طول موج ۲۶۰ نانومتر نشان دهنده ی اسید نوکلئیک و نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰، معرف نسبت اسید نوکلئیک به پروتئین است. از این نسبت می توان به میزان خلوص RNA استخراج شده پی برد. اگر این عدد بین ۱/۸ - ۲/۲ باشد RNA دارای کیفیت مناسب می باشد. هرچه این عدد پایین تر باشد میزان آلودگی با پروتئین یا مواد آروماتیک مانند فنل در نمونه بیش تر است. از نمونه هایی که نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر میان ۱/۸ تا ۲/۲ داشتند برای سنتز cDNA استفاده شد.

#### سنتز cDNA

غلظت نمونه ی RNA تخلیص شده از مرحله ی قبل حدود ۱۰۰ نانوگرم در ۱ µl تشخیص داده شد و طبق پروتکل کیت (یکتا تجهیز آزما، ایران) برای سنتز cDNA به حداقل غلظت ۵۰۰ ng نیاز است. در این مرحله ۵ µl RNA استخراج شده جهت سنتز cDNA طبق جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱: ترکیبات واکنش سنتز cDNA (مرحله اول)

| ت ترکیب                           | حجم (بر حسب میکرولیتر) |
|-----------------------------------|------------------------|
| RNA الگو (۱۰۰ میکروگرم)           | ۵ µl                   |
| پرایمر رندوم هگزامر (۵۰ میکرومول) | ۱ µl                   |
| آب دیس                            | ۷/۵ µl                 |
| حجم نهایی                         | ۱۳/۵ µl                |

یخ قرار گرفتند و سپس سایر ترکیبات طبق جدول ۲ به آنها اضافه شد.

شد. میکروتیوب حاوی RNA بلافاصله به فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  منتقل گردید و تا زمان ساخت cDNA ذخیره شد. آنزیم DNase I یک اندونوکلاز است که قادر به هضم دو رشته و تک رشته DNA است. از این آنزیم برای حذف آلودگی با DNA در جهت دستیابی به RNA عاری از DNA استفاده شد.

#### سنجش غلظت و خلوص RNA کل

در این مرحله مقدار و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد. برای این کار از دستگاه نانودراپ شرکت Thermo Scientific مدل نانودراپ ۲۰۰۰ استفاده شد. ابتدا با آب دیس دستگاه بلانک گردید. به این صورت که ۲ µl از آب دیس در جایگاه مخصوص دستگاه نانودراپ قرار گرفت. نمونه ها به نسبت ۲ به ۹۸ میکرولیتر با آب دیس رقیق شدند و سپس جذب نوری (OD) نمونه ها در طول موج تعیین شده (ssRNA) سنجیده شدند. طول موج

میکروتیوب های ۰/۲ میکرولیتری حاوی مخلوط فوق به مدت ۵ دقیقه در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند و پس از آن فوراً بر روی

جدول ۲: ترکیبات واکنش سنتز cDNA (مرحله دوم)

| ت ترکیب  | حجم مورد استفاده |
|--|------------------|
| مخلوط حاصل از مرحله قبل                                | ۱۳/۵ µl          |
| بافر ۵X  | ۴ µl             |
| دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات ها (۱۰ mM)                  | ۱ µl             |
| محدود کننده آنزیم RNase ( $40 \text{ U}/\mu\text{L}$ ) | ۰/۵ µl           |
| آنزیم M-MLV  | ۱ µl             |
| حجم نهایی  | ۲۰ µl            |

#### SDS PAGE

پروتئین‌ها را دارد، منتقل می‌شوند. در عمل بلاتینگ مولکول‌های پروتئین از زمینه ژل خارج می‌شوند و در سطح غشا در همان موقعیت قرار می‌گیرند. جهت بلاتینگ پروتئین (انتقال باندهای پروتئینی از ژل SDS-PAGE به کاغذ (PVDF)، ابتدا ژل پس از بریدن بخش متراکم‌کننده آن، حداقل ۱۰ دقیقه در بافر تانک، در یک ظرف پلاستیکی یا شیشه‌ای تمیز، قرار داده شد. با کمک پنس، قیچی و دستکش تمیز یک ورقه از غشا PVDF به اندازه ژل آماده و در متانول خیس و سپس در ظرف حاوی بافر انتقال قرار داده شد. همچنین چندین لایه کاغذ صافی متناسب با ابعاد ژل تهیه و همراه اسفنج‌ها در بافر خیس شد. این مجموعه از پایین به بالا شامل اسفنج، چند لایه کاغذ صافی، ژل، غشا، چند لایه کاغذ صافی و لایه اسفنج می‌باشد. بعد از گذاشتن هر لایه، حباب‌های هوای احتمالی را با یک میله شیشه‌ای یا لوله آزمایش از حد فاصل لایه‌ها خارج شد. جهت حصول اطمینان از انجام انتقال باندهای پروتئینی از ژل به غشا و بلاتینگ صحیح پروتئین در این مرحله غشا به مدت ۵-۱۰ دقیقه در مقدار کافی محلول رنگ پانسو-اس قرار داده شد. سپس با آب مقطر شستشو داده تا زمینه غشا بی‌رنگ شود. باندهای پروتئینی بعد از رنگ‌آمیزی به رنگ قرمز ظاهر می‌شوند. پس از انتقال باندهای پروتئینی از ژل به غشا و تایید انتقال با رنگ-آمیزی پانسو-اس، از بافر بلوکه‌کننده شامل شیرخشک بدون چربی ۵ درصد به مدت ۲ ساعت در دمای محیط بر روی روتاتور جهت مسدودسازی فضاهای خالی غشا استفاده شد. پس از مرحله مسدودسازی، غشا ۳ مرتبه و به مدت ۵ دقیقه در هر مرتبه با بافر TBS-T (TBS-Tween 20 -tris-buffered saline) شستشو داده شد. آنتی بادی ضد هیسیتیدین نشان دار شده با پراکسیداز ترب کوهی (horseradish peroxidase) (HRP) افزوده شد. در ادامه مرحله شستشوی غشا ۳ مرتبه و به مدت ۵ دقیقه در هر مرتبه با بافر TBS-T انجام گرفت. سپس در محیط تاریک غشا در معرض مقدار کافی از محلول

به منظور القای بیان *BABI-0278* در وکتور نو ترکیب *pNZ8148-Usp45-BABI-0278* میزان  $100-150 \mu\text{l}$  از کشت لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور نو ترکیب تهیه و در محیط GM17-Broth به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد دما دهی شد. هنگامی که OD600 باکتری به  $0.2$  رسید،  $10$  نانوگرم/میکرولیتر نیسین (nisin) به عنوان ماده‌ی القاء کننده به لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده به مدت ۳ ساعت القا گردید. زمانیکه OD600 باکتری به  $1$  رسید، لاکتوکوکوس لاکتیس به مدت ۱۵ دقیقه با دور  $6000$  در دمای  $4$  درجه سلیسیوس سانتریفیوژ گردید (۱۵).

فاز رویی (سوپرناتانت) و رسوب باکتری برای بررسی میزان بیان ژن روی SDS-PAGE بارگذاری شد. رسوب و سوپرناتانت باکتری با بافر نمونه مخلوط گردید. محلول رویی و سوسپانسیون رسوب توسط سرنگ همیلتون به درون چاهک‌های ژل تزریق شد. در ادامه  $5$  میکرولیتر نشانگر پروتئین سیئومتین ژن در یکی از چاهک‌ها قرار داده شد. به مدت ۳ ساعت الکتروفورز عمودی با ولتاژ  $200$  ولت انجام شد. بعد از رسیدن رنگ بارگذاری نمونه به انتهای ژل، با قطع ولتاژ واکنش متوقف شد. برای آشکارسازی خطوط پروتئینی از رنگ Coomassie Brilliant Blue R250 (سیگما، آلمان) استفاده شد. در پایان از ژل عکس برداری انجام گرفت.

### وسترن بلات

روش وسترن بلات که به ایمونوبلات نیز معروف است بر پایه واکنش اولیه آنتی ژن-آنتی بادی می‌باشد. به طور کلی، در این روش پس از الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از کشت لاکتوکوکوس لاکتیس نو ترکیب بر روی ژل  $12$  درصد SDS-PAGE، انتقال باندهای پروتئینی به دست آمده به کاغذ PVDF انجام می‌گیرد، در این تکنیک باندهای پروتئینی از ژل به غشای PVDF که قابلیت اتصال و تثبیت

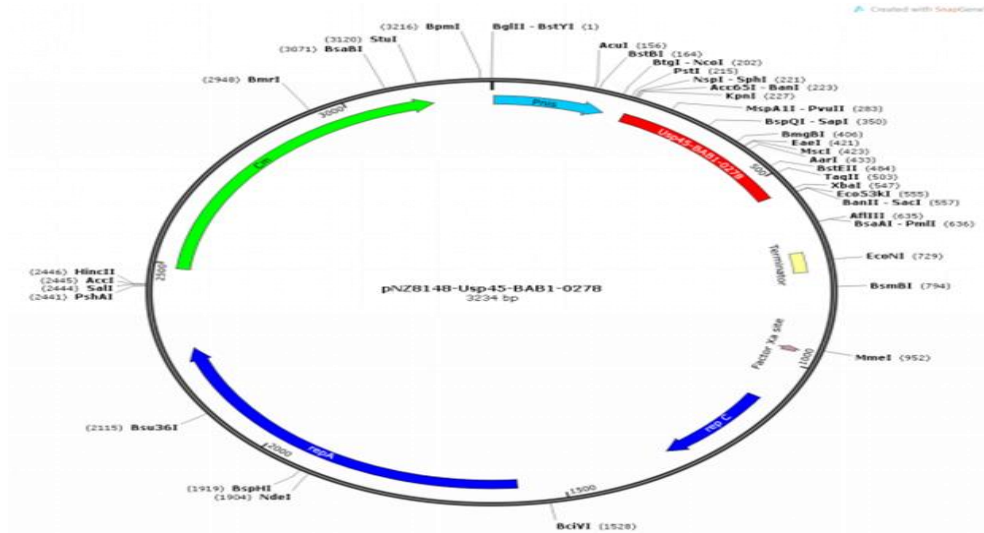
**یافته‌ها**

**نقشه ژنی پلاسمید نوترکیب**

نقشه ژنی پلاسمید نوترکیب pNZ8148--*BABI-0278* Usp45 نشان داده شده است اندازه این وکتور ۳۲۳۴ جفت باز است (شکل ۱).

سویسترا دی آمینو بنزیدین (Diaminobenzidine, DAB)

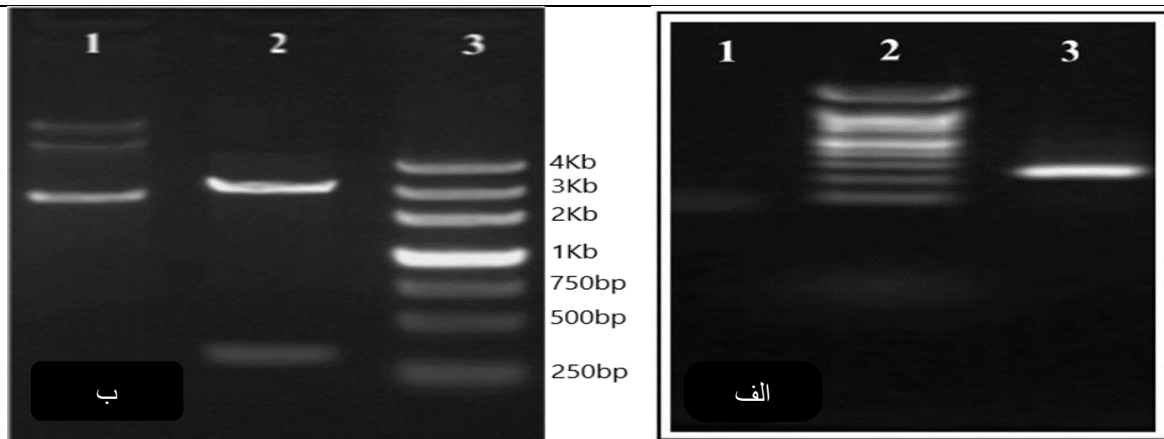
قرار داده شد. ظهور باندها معمولا ۵-۱۵ دقیقه طول می کشد. پس از ظهور باندها، غشا در آب مقطر زیاد شستشو داده می- شود. سپس غشا خشک و در محل تاریک قرار داده می شود.



شکل ۱. نقشه پلاسمید نوترکیب طراحی شده حاوی پروموتور *Pnis*، *BABI-0278* و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل. جایگاه و جهت الحاق *BABI-0278* در پایین دست پروموتور *Pnis* با رنگ قرمز نشان داده شده است.

صحت قرار گرفتن ژن *BABI-0278* به همراه سیگنال پپتید Usp45 در وکتور نوترکیب pNZ8148 توسط شرکت GENEray با استفاده از روش هضم آنزیمی دوگانه (با کمک آنزیم‌های محدود کننده *XbaI* و *KpnI*) و توالی‌یابی وکتور نوترکیب *pNZ8148-Usp45-BABI-0278* تایید و نتیجه بصورت عکس ارسال شد (شکل ۲-ب).

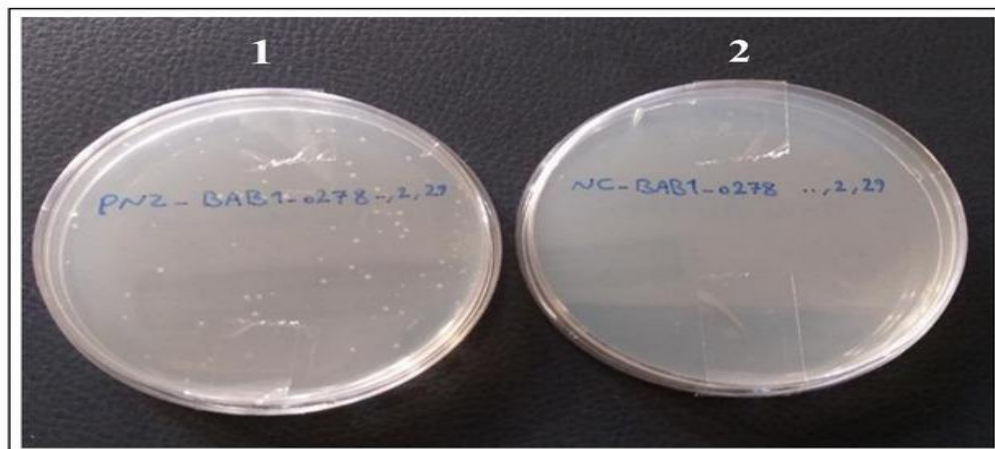
**تأیید صحت کلون شدن *BABI-0278* در وکتور pNZ8148**  
 نتیجه واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *BABI-0278*، به منظور تایید حضور این ژن در وکتور pNZ8148 مشاهده یک باند ۲۳۷ جفت بازی روی ژل آگارز ۱٪ بود که تأییدی بر نوترکیب بودن وکتور pNZ8148 است. (شکل ۲- الف)



شکل ۲. الف. PCR برای ژن BAB1-0278: باندها به ترتیب نشان دهنده ی ۱: کنترل منفی ۲: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی ۳: باند ۲۳۷ جفت بازی ژن BAB1-0278. ب. هضم آنزیمی و کتور نو ترکیب pNZ8148-Usp45-BAB1-0278: باندهای چاهک ۱ مربوط به وکتور است، به ترتیب از بالا به پایین نشان دهنده ی: فرم دایره‌ای، خطی و فوق مارپیچ. چاهک ۲ مربوط به هضم آنزیمی دو گانه است. باند ۲۳۷ جفت بازی ژن به همراه باند ۹۳ جفت بازی سیگنال پپتید. ۳. نشانگر 1Kb (Geneaid Biotech Ltd، تایوان).

کلنی باکتری نو ترکیب در محیط LB آگار حاوی کلرامفنیکل رویت گردید (شکل ۳).

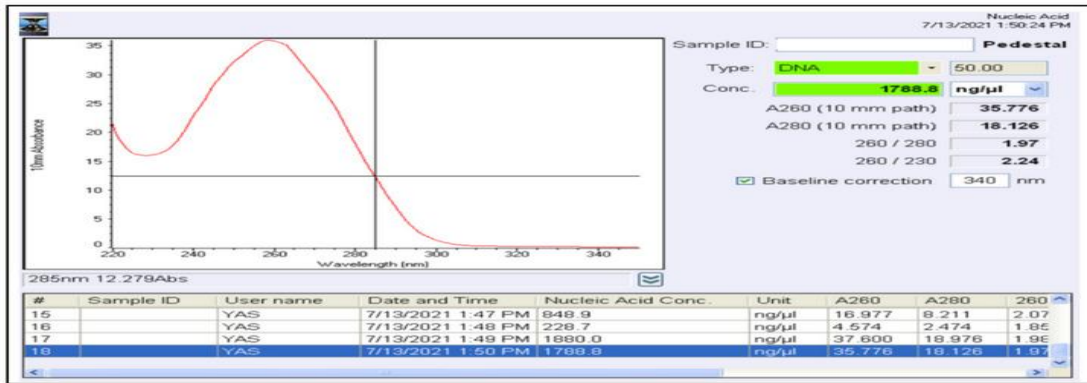
ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* با پلاسمید نو ترکیب دارای شاخص انتخابی کلرامفنیکل



شکل ۳. ترانسفورم کردن *E. coli*: پلیت (نشان دهنده ی ترانسفورم شدن موفقیت آمیز *E. coli* با وکتور نو ترکیب است. پلیت ۲ کنترل منفی، و عدم رشد باکتری نشان دهنده ی ترانسفورم نشدن باکتری است).

شد. خلوص نمونه DNA با نسبت ۲۶۰/۲۸۰ مقدار ۱/۹۷ نانوگرم/میکرولیتر و نسبت ۲۶۰/۲۳۰ مقدار ۲/۲۴ نانوگرم/میکرولیتر برآورد گردید (شکل ۴).

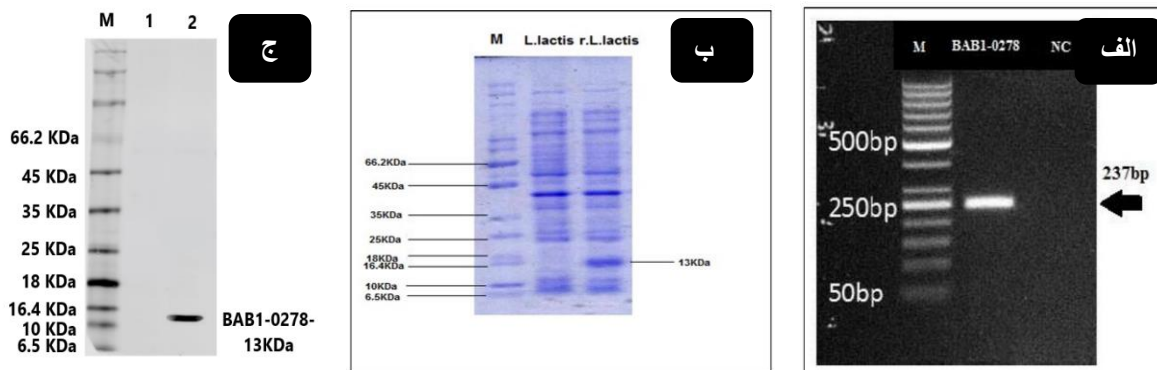
بررسی غلظت پلاسمید نو ترکیب استخراج شده از *E. coli* غلظت و خلوص پلاسمید استخراج شده به ترتیب ۱۷۸۸/۸ نانوگرم/میکرولیتر و ۱/۹۷ نانوگرم/میکرولیتر اندازه گیری



شکل ۴. نمودار غلظت پلاسمید استخراج شده. غلظت پلاسمید استخراج شده ۱۷۸۸/۸ نانوگرم/میکرولیتر و خلوص ۱/۹۷ نانوگرم/میکرولیتر

ژل مشاهده گردید (شکل ۵-الف). در مرحله بعد شناسایی و تایید باند پروتئینی *BABI-0278* در لاکتوکوکوس لاکتیس، از SDS-PAGE استفاده شد. باند ۱۳ کیلودالتونی مربوط به محصول *BABI-0278* در رسوب لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده مشاهده شد. در پایان از ژل عکس برداری شد (شکل ۵-ب). تجزیه و تحلیل وسترن بلات نشان داد که پروتئین هدف در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب بیان شده است. در صورتیکه در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور فاقد ژن هدف بیان نشده است (شکل ۵-ج).

**بررسی ترانسفورماسیون لاکتوکوکوس لاکتیس با pNZ8148-Usp45- *BABI-0278***  
جهت ترانسفورم کردن لاکتوکوکوس لاکتیس، انتقال وکتور نوترکیب *pNZ8148-Usp45- BABI-0278* و وکتور فاقد ژن هدف pNZ8148 به باکتری توسط روش الکتروپوریشن انجام شد. دریافت و عدم دریافت وکتور نوترکیب توسط باکتری‌ها ارزیابی شد.  
**شناسایی و تایید باند پروتئینی *BABI-0278* در لاکتوکوکوس لاکتیس**  
برای تایید بیان ژن در سطح RNA تست RT-PCR انجام گرفت و باند ۲۳۷ جفت بازی مربوط به *BABI-0278* روی



شکل ۵. الف. بیان *BABI-0278* در سطح RNA: باند ۲۳۷ bp مربوط به ژن *BABI-0278* است. ب. آنالیز SDS-PAGE پروتئین تخلیص شده: از سمت چپ به راست: چاهک اول مارکر، چاهک دوم لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم نشده، چاهک سوم لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب pNZ8148-*BABI-0278* و مشاهده باند ۱۳ کیلو دالتونی مربوط به ژن *BABI-0278*. ج. آنالیز SDS-PAGE پروتئین تخلیص شده: از سمت چپ به راست: چاهک اول مارکر، چاهک دوم لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم نشده، چاهک سوم لاکتوکوکوس لاکتیس ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-*BABI-0278* و مشاهده باند ۱۳ کیلو دالتونی

## بحث

در این مطالعه باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس سویه لاکتیس با سازه بیانی مبتنی بر نیسین -pNZ8148-Usp45- *BABI-0278* جهت حمل و بیان *BABI-0278* از طریق الکتروپوریشن ترانسفورم گردید، سپس به روش RT-PCR بررسی شد. تایید بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از SDS-PAGE و وسترن بلات صورت گرفت. نتیجه ترانسفورمسیون موفقیت آمیز نشان داد که می توان از سازه بیانی -pNZ8148- *BABI-0278*-Usp45- به عنوان یک پلاسمید نو ترکیب بهره برد. این پلاسمید نو ترکیب می تواند در تولید واکسن DNA خوراکی به میزبانی پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس علیه بیماری بروسلوز برای تحقیقات آینده مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از ارگانسیم های ضعیف شده یا غیر بیماری زا به عنوان حامل آنتی ژن های هترو لوگ که قادر به ایجاد ایمنی محافظتی هستند، یکی از رویکردهای بالقوه برای توسعه واکسن های مخاطی است. در این زمینه، برای تولید واکسن خوراکی، ابتدا باید به دنبال یک باکتری مناسب به عنوان وسیله انتقال ژن باشیم. لاکتوکوکوس لاکتیس به دلیل عملکردهای مؤثر بالقوه آن در سطح سیستم گوارشی و ایمنی، به طور کلی ایمن، در نظر گرفته می شود. خطر ایجاد تحمل ایمنی را می توان در مقایسه با سویه های پایدار از طریق لاکتوکوکوس لاکتیس کاهش داد. ثانیاً، با توجه به ابعاد آن، لاکتوکوکوس لاکتیس می تواند به راحتی توسط سلول های M جذب شود (۱۶). این موضوع نشان دهنده فعالیت ادجوانتی این باکتری برای تقویت پاسخ های ایمنی می باشد (۱۷).

مطالعه داروین و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان داد که لاکتوکوکوس لاکتیس بیان کننده سوپراکسید دیسموتاز مس / روی، ایمنی زایی قابل قبولی را در موش ها ایجاد کرده است. ایمن سازی خوراکی در موش ها با لاکتوکوکوس

لاکتیس نو ترکیب منجر به القای تیرهای بالایی از آنتی بادی های sIgA گردید. همچنین پاسخ های ایمنی اختصاصی مخاطی و سیستمیک هومورال و سلولی سوپراکسید دیسموتاز در پی داشت. این پاسخ های ایمنی قادر به ایجاد محافظت کارآمد در برابر بروسلا / بورتوس سویه بدخیم ۲۳۰۸ گردید (۱۸).

این مزایای برجسته نشان می دهد که لاکتوکوکوس لاکتیس می تواند به عنوان حامل واکسن خوراکی برای تحویل آنتی-ژن های هترو لوگ استفاده شود. عفونت های بروسلا عمدتاً شامل ورود باکتری از طریق مسیرهای مخاطی می شود. بنابراین توسعه روش های موفق برای واکسیناسیون خوراکی می تواند به طور اساسی صحنه فعلی بروسلوز را تغییر دهد. شواهد نشان می دهد پروتئین SOD بروسلا یا اپی توپ های خاصی از آن می تواند ایمنی محافظتی را در موش ایجاد کند (۲۰ و ۱۹).

مطالعه گومز و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داد که ایمن سازی با واکسن های DNA چند ظرفیتی بیان کننده ژن های *BABI\_0273* و *BABI\_0278* کونژوگه شده با ژن sodC ۲۳۰۸ بروسلا / بورتوس پاسخ ایمنی هومورال و سلولی افزایش یافته ای را القا می کند. این ایمن سازی موجب افزایش آنتی بادی های IgG، IgM، و IgG2a و همچنین سطوح IFN- $\gamma$  و پاسخ تکثیر لنفاوی در بافت طحالی موش گردید (۲۱).

مطالعه سیسلما و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز نشان داد که تزریق داخل عضلانی DNA پلاسمید حامل ژن های *BABI\_0263* و *BABI\_0278* (به ترتیب pVF263 و pVF278) به موش های BALB/c، هر دو پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را برانگیخت. موش های تزریق شده با pVF263 یا pVF278 افزایش پاسخ ایمونوگلوبولین G2a (IgG2a) داشتند. علاوه بر این، هر دو واکسن DNA پاسخ

الکتروپوریشن در لاکتوکوس لاکتیس ترانسفورم شد. عملکرد صحیح و قابل اعتماد بودن حامل نو ترکیب تایید شد. این مطالعه با شواهد تجربی به توسعه واکنش های خوراکی نو ترکیب با استفاده از لاکتوکوکوس لاکتیس علیه تب مالت کمک می کند.

### تقدیر و تشکر

این مقاله دستاورد پایان نامه دکتری می باشد. پژوهشگران و نویسندگان این مقاله بر خود لازم می دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی مرکز شهرکرد، که ما را در به ثمر رساندن این تحقیق یاری نمودند، به آگاهی برسانند. تمام اصول اخلاقی در این مقاله رعایت شده است (IR.IAU.SHK.REC.1401.002). نویسندگان اعلام می - دارند که هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

تکثیر سلولی T را برانگیختند. این واکنش ها باعث ایجاد آنتی بادی و پاسخ های ایمنی به واسطه سلول Th1 گردیدند. در مجموع، داده های آن ها رویکرد واکنش ساینون DNA از طریق انتقال آنتی ژن BABI\_0278 را بهبود بخشید (۲۲).

بنابراین پیرامون نقش لاکتوکوکوس به عنوان یک حامل آنتی ژنتیک موفق و تاثیر DNA واکنش BABI\_0278 علیه بروسلا آبورتوس، ما نیز در مطالعه حاضر یک لاکتوکوکوس لاکتیس نو ترکیب بیان کننده پروتئین BABI-0278 بروسلا آبورتوس تهیه کردیم. برای پیشبرد اهدافی همچون واکنش زنده خوراکی مبتنی بر ناقل لاکتوکوکوس لاکتیس یک جایگزین معتبر درمانی برای محافظت در برابر عفونت های بروسلا آبورتوس باشد.

### نتیجه گیری

سازواره بیانی BABI\_0278-pNZ8148-Usp45 مبتنی بر نیسین طراحی شد. این سازه واره از طریق روش

### منابع

1. 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):65-75
2. Perez A, Berhe M. *Brucella*, a bacterium with multiple ways of causing infection. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2020;34(1):99-101.
3. Jamil T, Khan AU, Saqib M, Muhammad H, Melzer F, Rehman A, et al. Animal and Human Brucellosis in Pakistan. Front Public Health. 2021;9:660508.
4. Poveda-Urkixo I, Ramírez GA, Grilló MJ. Kinetics of Placental Infection by Different Smooth *Brucella* Strains in Mice. Pathogens. 2022;11(3):279.
5. Senevirathne A, Hewawaduge C, Lee JH. Live vaccine consisting of attenuated *Salmonella* secreting and delivering *Brucella* ribosomal protein L7/L12 induces humoral and cellular immune responses and protects mice against virulent *Brucella abortus* 544 challenge. Vet Res. 2020;51(1):6.
6. Khurana SK, Sehrawat A, Tiwari R, Prasad M, Gulati B, Shabbir MZ, et al. Bovine brucellosis - a comprehensive review. Vet Q. 2021;41(1):61-88.
7. Al-Mariri A, Al-Hallab L, Alabras R, Kherbik H, Khawajkiah M, et al. Protection against virulent *Brucella* spp. by gamma-irradiated *B. ovis* in BALB/c mice model. Clin Exp Vaccine Res. 2022;11(1):53-62.
8. Tavares LM, de Jesus LCL, da Silva TF, F L Barroso, L Batista V, et al. Novel Strategies for Efficient Production and Delivery of Live Biotherapeutics and Biotechnological Uses of *Lactococcus lactis*: The Lactic Acid Bacterium Model. Front Bioeng Biotechnol. 2020;8:517166.
9. Song AA, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. Microb Cell Fact. 2017;16(1):55.

10. Gómez L, Alvarez F, Betancur D, Oñate A. Brucellosis vaccines based on the open reading frames from genomic island 3 of *Brucella abortus*. *Vaccine*. 2018;36(21):2928-2936.
11. Gómez L, Llanos J, Escalona E, Sáez E, Álvarez F, Molina R, et al. Multivalent Fusion DNA Vaccine against *Brucella abortus*. *Biomed Res Int*. 2017;2017:6535479.
12. Fatehi Z, Doosti A, and Jami MS. "Oral vaccination with novel *Lactococcus lactis* mucosal live vector-secreting *Brucella lumazine synthase* (BLS) protein induces humoral and cellular immune protection against *Brucella abortus*. *Archives of Microbiology*. 205.4 (2023): 122.
13. Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*. 1970;53(1):159-162. doi:10.1016/0022-2836(70)90051-3
14. Welker DL, Coburn BM, McClatchy JH, Broadbent JR. Multiple pulse electroporation of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus casei*. *Journal of microbiological methods*. 2019 Nov 1;166:105741.
15. Mierau I, Olieman K, Mond J, Smid EJ. Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microb Cell Fact*. 2005;4:16. doi:10.1186/1475-2859-4-16
16. Ouwehand A, Isolauri E, Salminen S. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *Eur J Nutr*. 2002;41 Suppl 1:132-7.
17. Ahmed FE. Genetically modified probiotics in foods. *Trends Biotechnol*. 2003;21(11):491-7.
18. Sáez D, Fernández P, Rivera A, Andrews E, Oñate A. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. *Vaccine*. 2012;30(7):1283-90.
19. Tabatabai LB, Pugh GW Jr. Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine*. 1994;12(10):919-24.
20. Oñate AA, Vemulapalli R, Andrews E, Schurig GG, Boyle S, Folch H. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. *Infect Immun*. 1999;67(2):986-8.
21. Gómez L, Llanos J, Escalona E, Sáez D, Álvarez F, Molina R, et al. Multivalent Fusion DNA Vaccine against *Brucella abortus*. *Biomed Res Int*. 2017;2017:6535479.
22. Sisilema-Egas F, Céspedes S, Fernández P, Retamal-Díaz A, Sáez D, Oñate A. Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the *BABI\_0263* and *BABI\_0278* open reading frames of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine*. 2012; 30(50):7286-91.