



## Cloning of Outer Membrane Protein Gene Omp31 *Brucella melitensis*

Erman ORYAŞIN<sup>1</sup> Süheyla TÜRKYILMAZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Adnan Menderes University, Recombinant DNA and Recombinant Protein Center (REDPROM), Aydın, Turkey

<sup>2</sup> Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Aydın, Turkey

Received: 09.04.2019

Accepted: 22.07.2019

### ABSTRACT

Brucellosis is one of the most important zoonotic diseases transmitted to humans from animals or animal products. *Brucella melitensis* is the most pathogenic species in the genus brucella. The outer membrane protein 31 (Omp31) of *B. melitensis* is considered to be a protective immunogen and an important candidate vaccine. In this study, cloning from *B. melitensis* Rev 1 strain of Omp31 coding gene (*omp31*) was aimed. *Brucella melitensis* REV-1 live vaccine strain was used in the study. After reactivation of strain, DNA was extracted from bacterial culture. Gene sequence which encodes outer membrane protein was obtained from Gene Bank. Primers were designed to clone this region. After primer design, the gene region amplified by the polymerase chain reaction was cloned into the pET28a expression vector and transformed into *Escherichia coli* BL21 bacteria. Plasmid extraction was performed from *E. coli* BL21. The insert and plasmid were separately observed as a result of cutting with the restriction enzyme used for cloning. Expected size (790 bp) insert amplified with cloning primers again and amplicon was sequenced. The sequence obtained after sequencing analysis was compared to the gene bank and confirmed to be the outer membrane protein of *B. melitensis*. Further studies are required to investigate the antigenic properties of the cloned recombinant outer membrane protein Omp31 (rOmp31) and determine the potential to be a candidate for vaccination.

**Keywords:** *Brucella melitensis*, Cloning, Omp31

### ÖZ

### *Brucella melitensis* dış membran protein geni Omp31'in klonlanması

Bruseloz hayvanlardan veya hayvansal ürünlerden insanlara bulaşan en önemli zoonotik hastalıklardan birisidir. *Brucella melitensis*, brusella cinsi içerisinde en patojen türlerden birisidir. *B. melitensis*'in dış membran proteini 31 (Omp31) koruyucu bir immünojen ve önemli bir aday aşı olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada, *B. melitensis* Rev 1 suşundan Omp31'i kodlayan genin (*omp31*) klonlanması amaçlandı. Çalışmada materyal olarak *B. melitensis* REV-1 canlı aşı suşu kullanıldı. Suşun canlandırılmasının ardından, DNA ekstraksiyonu yapıldı. Dış membran proteini kodlayan gen bölgesi, gen bankasından bulundu. Bu bölgeyi klonlamak için gerekli primerler manuel olarak dizayn edildi. Primer dizaynından sonra polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla çoğaltılan gen bölgesi, pET28a ekspresyon vektörüne klonlanarak *Escherichia coli* BL21 bakterisine transformasyonu gerçekleştirildi. *E. coli* BL21'den plazmid ekstraksiyonu yapıldı. Klonlama için kullanılan restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda insert ve plazmid ayrı olarak gözlemlendi. Beklenen büyüklükte (790 bp) bulunan insert, tekrar klonlama primeri ile çoğaltılarak doğrulamak amacıyla sekans analizi yapıldı. Sekans analizi sonrasında elde edilen dizi gen bankası ile karşılaştırıldı ve insertin *B. melitensis* dış membran proteini olduğu doğrulandı. Bundan sonraki yapılacak çalışmalarla da klonlanan rekombinant dış membran proteini Omp31 (rOmp31)'in antijenik özelliğinin araştırılarak aşı adayı olma potansiyelinin belirlenmesi gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Brucella melitensis*, Klonlama, Omp31

### GİRİŞ

Bruseloz, Brusella etkenlerinin hayvanlarda özellikle genital organlara yerleşerek abortusa ya da infertiliteye sebep olduğu kronik seyirli, oldukça bulaşıcı ve yangısal reaksiyonlarla kendini gösteren bir hastalıktır. Tüm dünyada yaygın olmakla birlikte yurdumuzda da bildirilen hastalık, ekonomik kayıplara neden olmasının yanı sıra,

etkenlerin enfekte hayvanlardan insanlara kolaylıkla bulaşması hastalığın halk sağlığını tehdit eden bir zoonoz olarak kabul edilmesine neden olmuştur. Hastalığın eradikasyonunun zor olması, insanlardaki tedavisinin uzun sürmesi ve pahalı olması, hayvanlarda ihbarı mecburi bir hastalık olması gibi nedenler hastalığın önemini artırmaktadır (GKGM 2012; OIE 2016). Aşılama brusellozu kontrol etmenin en etkili ve ekonomik yoludur.

Günümüzde *Brucella melitensis* Rev1, *Brucella abortus* S19 ve RB51 gibi zayıflatılmış suşlar evcil hayvanlarda brusellozu kontrol etmek için aşı suşu olarak kullanılmaktadır. Mevcut olan bu canlı aşılardan ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Bu yan etkilerin en önemlilerinden birisi aşı suşlarının insanlarda enfeksiyon oluşturma yeteneğine sahip olmalarıdır. Son çalışmalar koruyucu bağışıklık mekanizmalarının çözülmesine ve etkili bir bruselloz aşısının geliştirilmesine odaklanmıştır (Vahedi et al, 2011; Shojaei et al. 2018).

Brusella dış membran proteinlerinin tanımlanması ve çalışılması, bu bakterilerin virulens özelliklerinin anlaşılmasında önemli bir adımdır. *Brucella sp.*'nin dış membran proteinleri (Omps) 1980'lerin başlarında tanımlanmıştır (Dubray ve Bezar 1980) ve immünojenik potansiyeli olan ve koruyucu antijenler olarak karakterize edilmiştir (Cassataro et al. 2007).

Moleküler ağırlıklarına göre üç Omp bildirilmektedir; Omp25 (25-27 kDa), Omp2b (36-38 kDa) ve Omp31 (31-34 kDa). Omp31 geninin *B. abortus* hariç bütün brusella türlerinde bulunduğu tespit edilmiş (Cloeckert et al. 2002) ve Omp31 serolojik olarak immünodominant bir antijen olarak bildirilmiştir (Kittelberger et al. 1995). Bu özellikler Omp31'i bruselloza karşı umut verici bir subunit aşı adayı olarak desteklemekte, bruselloza karşı aşı geliştirmek için potansiyel bir aday olarak önerilmesine sebep olmaktadır. İran'da yapılmış bir çalışmada da omp31 geninin saflaştırılıp bir aşı adayı olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir (Vahedi et al. 2011).

Bu çalışmada, *B. melitensis* Rev 1 suşundan Omp31'i kodlayan genin (omp31) klonlanması amaçlandı. Bu çalışmanın aşı veya hızlı tanı kiti geliştirmek gibi daha ileri çalışmalarda kullanılacak yerli ve bir ön çalışma olacağı düşünülmektedir.

## MATERYAL ve METOT

**Brucella melitensis suşu:** Klonlama çalışmasında kullanılan *B. melitensis* suşu, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından üretilen liyofilize *B. melitensis* Rev.1 aşı suşunun canlandırılması ile elde edildi. Primerler: *B. melitensis* suşunun dış membran protein geni omp31'in klonlama amaçlı çoğaltılmasında bu çalışma için manuel olarak dizayn edilen aşağıda belirtilen primer çifti Tablo 1'de verilmiştir.

Bu primerlerin dizaynı için gen bankasından *B. melitensis*'e ait omp31 geni tarandı ve gene ait olan dizi üzerinde başlangıç kodonu ile stop kodonları işaretlendi. Dizayn edilen primerde bu bölgelerini içine almasına dikkat edildi. Klonlama işlemini sağlamak amacıyla dizayn edilen primerlere restriksiyon kesim bölgesi eklendi. Eklenen restriksiyon enziminin tanıma bölgesinin genin içerisinde olmamasına dikkat edildi.

**Plazmid:** *B. melitensis* suşundan çoğaltılan omp31 ampikonunun klonlanması için pET28a ekspresyon plazmidini ticari olarak temin edildi.

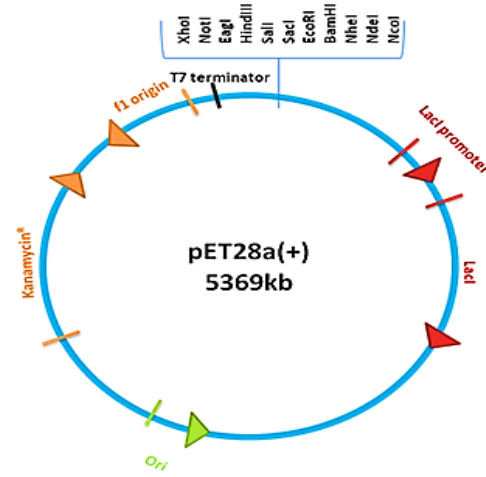
**Brucella melitensis suşundan total DNA ekstraksiyonu:** Ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (InstaGen Matrix, Bio-Rad) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. İzole edilen DNA'lar da degradasyon olup olmadığını kontrol etmek amacıyla DNA'lar 100 V'ta 45 dk. süre ile %1 agaroz içeren jelde yürütüldü. Elektroferez sonucunda, başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu gösterdi (Sambrook ve Russel, 2001). DNA'ların saflık kontrolleri ve miktar tayinleri Nanodrop (Maestro) ile yapıldı.

Cihaz ile DNA'ların 260 nm ve 280 nm'deki absorbanları hesaplandı. OD260/OD280 oranının 1.8-2.0 arasında olması DNA'nın saf olduğunu gösterdi (Turner et al. 2004).

**Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR):** Tüm PZR reaksiyonlarında bir örnek için PZR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, dNTP 0.2 mM, primer (her biri için) 0.4 pmol, Taq DNA polimerase 1.5 U olacak şekilde gerçekleştirildi.

PZR işlemi sonrasında hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip cihaz programlandı. Sikluslar 94 °C'de 4 dk. başlangıç denatürasyonu takiben; 94 °C'de 30 sn denatürasyon, 52 °C'de 30 sn., 72 °C 60 sn. uzama toplam 35 siklus, 72 °C'de 8 dk. son uzama olacak şekilde ayarlandı. Yüz voltta 45 dakikalık elektroforez süresinin ardından SafeView Classic (ABMgood, USA) ile boyanan jel UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları değerlendirildi. Pozitif amplifikasyon görülen ampikonlar klonlama işlemi için -20 °C'de muhafaza edildi.

**pET28a içeren Escherichia coli BL21 suşundan plazmid ekstraksiyonu:** Plazmid Miniprep Kit (Fermentas, K0502) kullanılarak üretici firmanın belirttiği şekilde gerçekleştirildi. PZR ile *B. melitensis* suşundan çoğaltılan omp31 ampikonunun klonlanması için seçilen pET28a ekspresyon plazmid vektörünün yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. pET28a plazmidinin yapısı (5369 bp)

Figure 1. Construction of pET28a (5369 bp)

**pET28a plazmidini ile klonlanacak omp31 genini içeren ampikonların restriksiyonu:** İzolasyonu yapılan pET28a plazmid DNA'sı ile restriksiyon kesim yerleri eklenmiş modifiye primerler ile çoğaltılan omp31 geni ampikonları *EcoRI* endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Kullanılan primerlere klonlamayı yapabilmek amacıyla eklenen *EcoRI* endonükleazı genom üzerinde 5'-GAATTC-3' dizisini tanıyan ve DNA'yı keserek yapışkan uç oluşturan enzimdir. pET28a plazmid DNA'sının *EcoRI* endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri Tablo 2'de, omp31 fragmanını içeren ampikonun *EcoRI* endonükleazı ile kesim reaksiyon bileşenleri ise Tablo 3'de verilmiştir. Kesim reaksiyonları 37°C'de yaklaşık 30 dk. inkübe edildikten sonra 5'er µl'leri alındı ve DNA markırı ile %1 w/v'lik agaroz jelde incelendi. Geriye kalan reaksiyon ürünleri presipitasyon ile saflaştırıldı (Sambrook ve Russel 2001).

**pET28a plazmidini ile klonlanacak omp31 genini içeren ampikonun ligasyonu:** Presipitasyon aşamasında birleştirilmiş pET28a vektörü ile ampikon ligasyona hazır

hale getirildi. *omp31* geni amplikonu ile pET28a vektörü için ligasyon reaksiyonu bileşenleri Tablo 4’de verilmiştir. Elde edilen ligasyon reaksiyonu 22°C’de bir gece inkübe edildi. Daha sonra ligasyon ürünleri için de presipitasyon işlemi uygulanarak enzim ve diğer kimyasallar gibi inhibitörlerden arındırıldı. Son olarak ligasyon karışımı *E. coli* BL21 bakterisine transferde kullanılmak üzere 10 µl steril distile su ile sulandırıldı ve transformasyona kadar -20 °C’de saklandı.

**Elektrokompetan *E. coli* BL21 hücrelerinin hazırlanması:** Kompetan bakteri oluşturmada kullanılan *E. coli* BL21 bakterisi daha önce bildirilen protokol uygulanarak kompetan hale getirildi ve ligasyon reaksiyon ürünü ile elektrotransformasyonda kullanıldı (Sambrook ve Russel 2001).

**Kanamisin içeren seçici besiyerinin hazırlanması:** Plaklarda rekombinantların seçimine dayalı besiyeri içerisine pET28a vektöründe yer alan kanamisin direnci ile ayırım için 50 µg/ml olacak şekilde kanamisin ilave edildi.

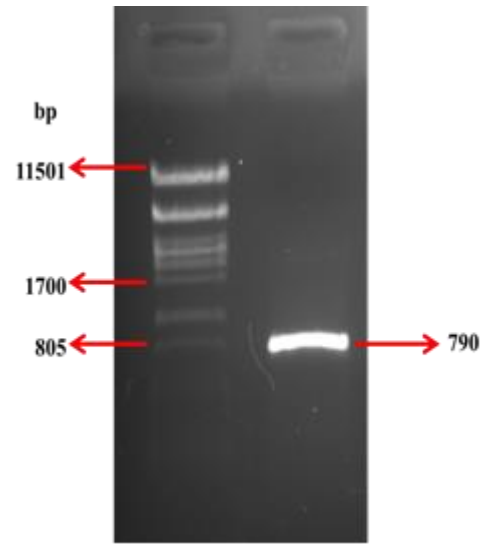
**Ligasyon ürünlerinin elektrotransformasyonu:** *omp31* genini taşıyan amplikon ile ligasyonu yapılan pET28a vektöründen 10 µl, hazırlanan *E. coli* BL21 kompetan hücresinden ise 100 µl alınarak aynı tüpte birleştirildi ve elektrotransformasyon küvetine alındı. Daha sonra elektrotransformasyon küveti elektroporatör cihazına (Thermo, Micropulser) yerleştirilerek kapasitansı 15 µF’e, rezistans 335Ω’a ve voltaj 2.5 KV’a getirilip elektrik şoku verildi. Elektrik şokundan hemen sonra cihazdan alınan küvet içerisine 1 ml Tryptic Soy Broth (TSB) eklenerek steril bir Ependorf tüpü içerisinde 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası her bir transformasyon için seçici kanamisin içeren besiyerine 50 ve 200’er µl’lik hacimler halinde yayma ekim yapıldı. Ertesi gün seçici besiyeri üzerinde üreyen koloniler değerlendirilmeye alındı.

**İnsert alan rekombinant plazmidleri içeren kolonilerin seçimi ve doğrulanması:** Seçici kanamisinli besiyeri plaklarında üreyen pET28a plazmid içerisine hedef DNA fragmanının (*omp31* geni) eklendiği düşünülen koloniler seçildi ve klonlama için kullanılan primerler ile PZR yapılarak kontrol edildi. Ayrıca PZR sonucunda pozitif olan koloniler 50 µg/ml kanamisin içeren TSB broth besiyerinde 37 °C’de inkübe edilerek geliştirildi. Tüpte üreyen transformantlardan plazmid ekstraksiyonu yapılarak klonlamak için kullanılan *EcoRI* enzimiyle kesilerek, elektroforezi yapıldı ve plazmid ile insert incelendi.

**Sekans analizi:** Seçici kanamisinli besiyerinden seçilen klonların doğrulanması yapıldıktan sonra elde edilen klondan klonlama primerleri ile PZR yapıldı ve sekans analizi için özel bir firmaya (Macrogen, Güney Kore) gönderildi. Firma saflaştırmayı takiben sekans analizini gerçekleştirdi. Fasta formatında tarafımıza gönderilen bu sekans gen bankası (NCBI) ile karşılaştırıldı. Bunun için Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanıldı.

## BULGULAR

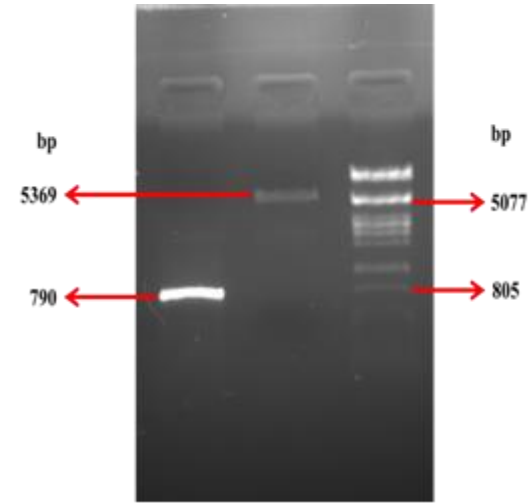
***omp31* geninin PZR amplifikasyonu:** Çalışmada kullanılan *B. melitensis*’e ait *omp31* geninin amplifikasyonu için dizayn edilen primerler ve belirtilen reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen PZR sonrası elde edilen amplikonun elektroforez sonrası jel görüntüsü Şekil 2’de gösterilmiştir.



**Şekil 2.** *omp31* geninin amplifikasyonu için gerçekleştirilen PZR

**Figure 2.** Amplification of *omp31* gene

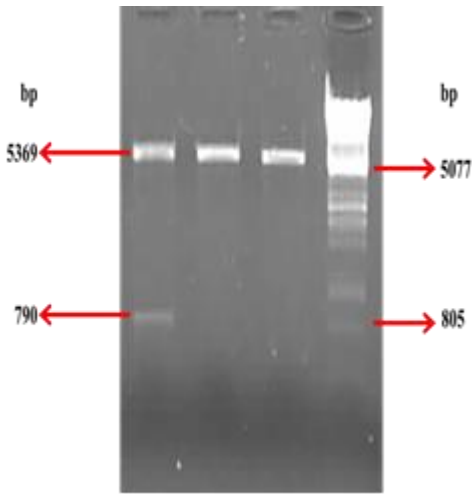
Çoğaltılan *omp31* geni ve pET28a vektörü restriksiyonu: Amplifikasyonu gerçekleştirilen *omp31* geninin ve klonlama vektörü olan pET28a’nın kesimleri gerçekleştirildi. Bu amaçla dizayn edilen primerlere eklenen restriksiyon tanıma bölgelerinden *EcoRI* enzimi ile hem amplikon hem de pET28a plazmidini ayrı ayrı restriksiyon işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3).



**Şekil 3.** *omp31* geni ve pET28a vektörüne ait restriksiyon elektroforez görüntüsü

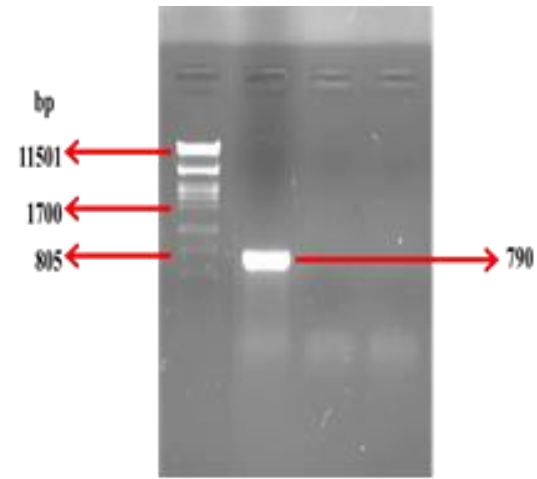
**Figure 3.** Electrophoresis of *omp31* gene and pET28a

**Restriksiyon sonrası ligasyon ve transformasyon:** Restriksiyon reaksiyonundan sonra ürünlerin ligasyonu yapıldı ve ardından transformasyon sonrası elde edilen rekombinant bakteri kolonileri kanamisin içeren Tryptic Soy Agar besiyerinde seçildi. Seçim sonrası rekombinant kolonilerden plazmid ekstraksiyonu yapılarak restriksiyon ile insert ve vektör kontrol edildi. Bu amaçla elde edilen plazmid *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Restriksiyon sonrası insert ve plazmid birbirinden ayrılarak lineer halde jelde iki bant oluşturdu. Bu profile uyan numaralandırılmış klonlar PZR sonrası sekans analizi ile doğrulanmak amacıyla stoklandı.



**Şekil 4.** Seçilen transformantlardan plazmid restriksiyonu. İlk sıradaki klonda restriksiyon sonrası insert ve plazmid açığa çıktığından doğru klon olarak seçildi

**Figure 4.** Plasmid restriction from selected transformants Şekil 4'de görüldüğü gibi restriksiyon sonrası A klonunun beklenen büyüklükteki (790 bp) inserti aldığı tespit edildi. Sonrasında yine aynı koloniden PZR yolu ile klonlama için kullanılan primerler ile amplifikasyon yapılarak doğru büyüklükte olup olmadığı incelendi (Şekil 5)



**Şekil 5.** Seçilen klonların PZR ile doğrulanması

**Figure 5.** PCR confirmation of selected clones

*Sekans analizi ile seçilen klonun doğrulanması:* PZR amplifikasyonu sonrası sekans analizine gönderilen amplicon Gen Bankası ile karşılaştırılarak çoğaltılan ürünün *omp31* genine ait olup olmadığı kontrol edildi. Bu amaçla fasta formatında gelen DNA dizisi BioEdit programı ile açılarak <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> adresine girildi ve BLAST analizi gerçekleştirildi. Gen bankasında ACV07678.1 no'lu dizi %99,58 oranında benzerlik gösterdiği bulundu. Analize ait şekil aşağıda verilmiştir (Şekil 6, Şekil 7).

**Tablo 1.** *B. melitensis omp31* geninin amplifikasyonunda kullanılan primerler

**Table 1.** The primer sequences used in PCR assays for *B. melitensis omp31* gene

Primer	Dizi (5'-3')	Hedef Gen	Ürün uzunluğu(bp)	Tm (°C)
Omp31FEco	AAGAATTCACAGACTTTTTCGCCG			48
Omp31REco	TTGAATTCCGTGGATTAGAACTTGTAG	omp31	790	54

**Tablo 2.** pET28a plazmid DNA'sının *EcoRI* endonükleazı ile kesim reaksiyonu

**Table 2.** Restriction reaction of pET28a plasmid with *EcoRI*

İçerik	Alınan Miktar ( µl)
pET28a plazmid DNA'sı	10
Fast Digest Buffer	2
<i>EcoRI</i>	1
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	1
Deionize Su	6
<b>TOPLAM</b>	<b>20</b>

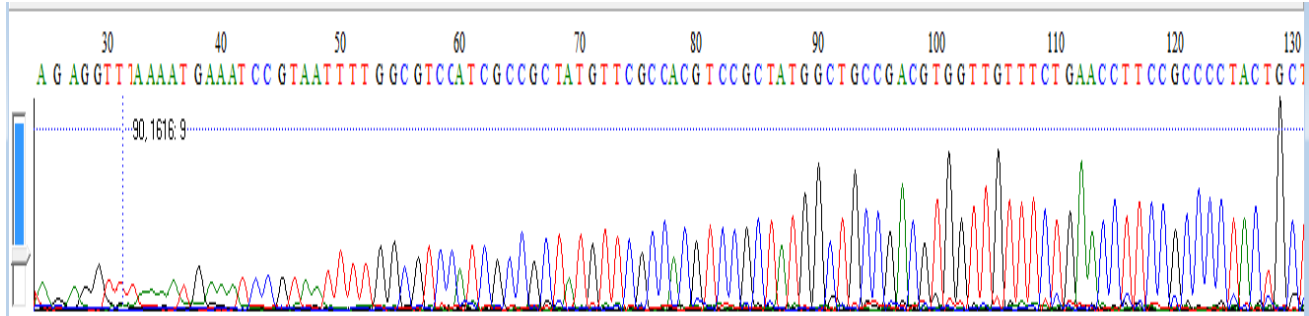
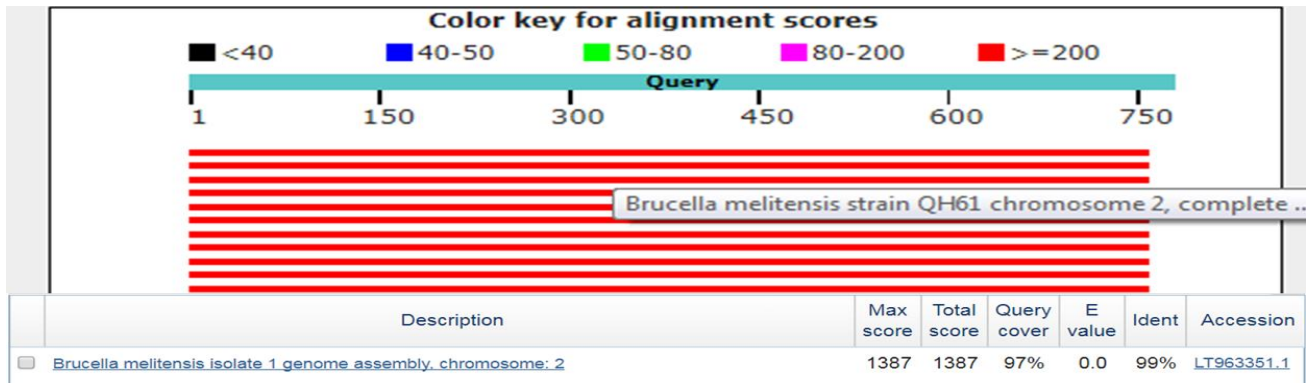
**Tablo 3.** *omp31* geni ampliconunun *EcoRI* endonükleazları ile kesim reaksiyonu

**Table 3.** Restriction of *omp31* gene amplicon with *EcoRI* endonucleases

İçerik	Alınan Miktar ( µl)
<i>omp31</i> geni ampliconu	10
Fast Digest Buffer	2
<i>EcoRI</i>	1
Deionize Su	7
<b>TOPLAM</b>	<b>20</b>

**Tablo 4.** omp31 geni ampliconu ile pET28a vektörü için ligasyon reaksiyonu bileşenleri**Table 4.** Ligation reaction components for pET28a plasmid and omp31 gene amplicon

İçerik	Alınan Miktar
omp31 geni + pET28a plazmidi	17 µl
T4 DNA Ligaz Buffer	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
<b>TOPLAM</b>	<b>20 µl</b>

**Şekil 6.** Seçilen klonun (rOmp31) PZR sonrası sekans analizi**Figure 6.** Sequence analysis of rOmp31**Şekil 7.** Sekans datasının gen bankası ile karşılaştırılması**Figure 7.** Comparison of sequence data with gene bank

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Hasta ya da portör hayvanların tespit edilmesi, bakteriyolojik identifikasyon, serolojik teşhis ve aşılama bruselloz eradikasyonunda kullanılan en pratik yöntemlerdir. Günümüzde brusellozdan korunmak için kullanılan *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* REV-1 gibi canlı attenüe aşuların pek çok dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin bu aşular gebe hayvanlarda abortuslara sebep olabildiği gibi insanlar için de virulandır. Bununla birlikte S koloni oluşturan aşı suşları ile virülen suş antijenik olarak benzer olduğu için buna karşı oluşan antikorları ölçen serolojik testler ikisini ayırt edemezler. Bunun sonucunda da yapılan serolojik incelemelerde hayvanın hasta mı yoksa aşı ile korunmakta mı olduğu anlaşılacaktır (Monreal et al. 2003).

Bu nedenle, bu suşlar ile hazırlanan canlı attenüe tam bakteri aşuları yerine, bakterinin dış membran proteinlerinden birisi ile hazırlanan aşuların kullanılması hem hayvanlarda hem de insanlarda hastalığa neden olma riski taşımayacağından oldukça önemlidir. Omp31 serolojik olarak immüno-dominant bir antijen olarak bilinmektedir (Kittelberger et al. 1995). Bu nedenle

Omp31 bruselloza karşı potansiyel, ilginç ve umut verici bir alt birim aşı adayıdır. Bu çalışmada, *B. melitensis* Rev 1 suşundan dış membran proteinlerinden birisi olan omp31'i kodlayan gen olan omp31, pET28a ekspresyon plazmidi içerisine klonlandı. PZR amplifikasyonu sonrası da sekans analizi ile elde edilen ürünün omp31 genine ait olduğu doğrulandı. Bu çalışmamızda seçilen *B. melitensis* REV-1 aşı suşunun seçilme nedeni suşun dış membran proteinlerinin brusella enfeksiyonu sırasında önemli bir rol oynaması ve konak bağışık yanıtını indüklemesidir. Bu da, bu suşun aşı çalışmaları için bakterinin kullanılabilir bir komponenti olduğunu göstermektedir (Ding et al. 2005).

Daha önce yapılmış bir çalışmada omp25 ve omp31 genlerinin bağışık yanıt oluşturabilme gücünü belirleyebilmek amacıyla, hem *B. melitensis* ve *B. ovis* hem de membran proteinleri ile farelerde enfeksiyon oluşturulmuştur. Orijinal suşların oluşturduğu bağışıklık yanıtı ile membran proteinlerinin oluşturduğu bağışıklık karşılaştırılmış ve koruyuculuk düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir. Böylece bu proteinlerin, aşı olarak kullanıldıkları takdirde bağışıklık yanıtı oluşturacakları ayrıca serolojik testler ile tanıda hasta veya

aşılı hayvanların ayırt edilmesini sağladığı da bildirilmiştir (Cloekaert et al. 2002).

İnsan enfeksiyonlarını durdurmak için hayvanlarda bruselloz kontrol ve eradikasyon tedbirlerinin uygulanması gerekmektedir. Yeni aşılarda yapılmasına yönelik ilk pratik adımlar aşı adaylarının üretilmesi, ekstraksiyonu ve saflaştırılmasıdır. Bu çalışmada rOmp31 başarı ile saflaştırılmıştır. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarla da, bu klon araç olarak kullanılarak, aşı adayı olarak iyi bir rekombinant klon olup olmadığının araştırılması hedeflenmektedir.

## TEŞEKKÜR

Araştırmacılar, VTF-16008 kod numaralı proje desteği için Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, laboratuvar çalışmalarını esnasındaki katkılarından dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN' a teşekkür eder.

## KAYNAKLAR

- Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, et al. (2007).** A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev. 1 vaccination. *Vaccine*, 25, 4437-46.
- Cloekaert A, Jacques I, Grilló MJ, et al. (2004).** Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine*, 29, 2827-35.
- Cloekaert A, Vizcaino N, Paquet JY, et al. (2002).** Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol*, 90, 229-47.
- Ding XZ, Bhattacharjee A, Nikolich MP, et al. (2005).** Cloning, expression, and purification of *Brucella suis* outer membrane proteins. *Protein Expr Purif*, 40, 134-41.
- Dubray G, Bezard G (1980).** Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis. *Ann Vet Res*, 11, 367-73.
- Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü (2012).** Brusellanın konjunktival aşı ile kontrol ve eradikasyonu projesi. Genelge No: 2012/03.
- Kittelberger R, Hilbink F, Hansen MF, et al. (1995).** Identification and characterization of immunodominant antigens during the course of infection with *Brucella ovis*. *J Vet Diagn Invest*, 7, 210-8.
- Monreal D, Grilló MJ, González D, et al. (2003).** Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect Immun*, 71, 3261-71.
- Office International des Epizooties (OIE) (2016).** World Organization for Animal Health: Chapter 2.1.4. Brucellosis. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.04\\_BRUCELLOSIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf).
- Sambrook J, Russell D (2001).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shojaei M, Tahmoorespur M, Soltani M, et al. (2018).** In silico cloning and bioinformatics study of *Brucella melitensis* Omp31 antigen in different mammalian expression vectors. *J Livest Sci Technol*, 6, 65-76.
- Turner PC, McLennan AG, Bates AD, et al. (2004).** *Moleküler Biyoloji Önemli Notlar*. Nobel Yayınları.
- Vahedi F, Talebi AF, Ghorbani E, et al. (2011).** Isolation, cloning and expression of the *Brucella melitensis* Omp31 gene. *Iran J Vet Res*, 12, 156-62.