مجلـه دانشگـاه علـوم پـــزشکـی اردبیـل

دوره دوازدهم، شماره اول، بهار ۱۳۹۱، صفحات ۳۳ الی ۳۹

# کلون و بیان پروتئین غشای خارجی ۳۱ کیلودالتونی بروسلا ملی تنسیس در اشریشیاکلی

**صاینه خدادادی[۱]، اشرف محبتی مبارز*[۲]، ناصر هرزندی[۱]، بهمن تبرایی[۳]، نیما خرم آبادی[۲]، امیر بختیاری[۱]، هانیه آقابابا[۲]**

[۱] گروه میکروبشناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران [۲] گروه باکتریشناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران [۳] بخش تولید واکسن‌های باکتریایی، انستیتو پاستور ایران، البرز، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۳۸۶۲ فاکس: ۰۲۱۸۲۸۸٤۵۵۵ آدرس پست الکترونیک: mmmobarez@modares.ac.ir

## چکیده

**زمینه و هدف:** شناسایی آنتی‌ژن‌هایی از بروسلا که بتوانند پاسخ ایمنی پروتکتیو تولید کند بسیار مورد علاقه محققین می‌باشد. لذا بایستی آنتی‌ژن‌های مختلف بروسلا برای دستیابی به این اهداف مورد ارزیابی قرار بگیرد. در این مطالعه ما ژن ۳۱ کیلودالتونی بروسلا ملی تنسیس M16 را در اشیرشیا کلی کلون و بیان نمودیم.

**روش کار:** ژن کدکننده پروتئین غشای خارجی ۳۱ کیلودالتونی بروسلا ملیتنسیس با پرایمرهای اختصاصی تکثیر و در حامل پلاسمیدی pJET1/2 و متعاقبا در pET28a (+) کلون شد و در هر دو پلاسمید تعیین توالی شد. القای تولید پروتئین نوترکیب با IPTG صورت گرفت. پروتئین نوترکیب با رزین نیکل جداسازی شد و خاصیت آنتی ژنیک آن با وسترن بلات و آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی تایید شد.

**یافته ها:** پروتئین غشای خارجی ۳۱ کیلودالتونی بروسلا ملیتنسیس حاوی ۲٤۱ اسید آمینه است که با موفقیت کلون و با تعیین توالی تأیید شد. این آنتی ژن در میزبان اشریشیاکلی بیان و تخلیص شد. نتایج وسترن بلات و تعیین توالی نشان‌دهنده صحت تولید پروتئین نوترکیب و حفظ ساختار اپی توپی آن می‌باشد.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که اشریشیاکلی میزبان بیانی خوبی جهت تولید پروتئین غشای خارجی ۳۱ کیلودالتونی بروسلا ملیتنسیس محسوب می‌شود.

**کلمات کلیدی:** بروسلا ملیتنسیس؛ کلونینگ؛ پروتئین غشای خارجی ۳۱ کیلو دالتونی

**دریافت:** ۹۰/٤/۱۲ **پذیرش:** ۹۰/۹/۲۵

## مقدمه

بروسلوز به عنوان یک بیماری مشترک میان انسان و دام، اساساً حیوانات را مبتلا کرده و تحت شرایطی به انسان نیز قابل انتقال است [۱].

پیشگیری از این بیماری با واکسیناسیون دام‌ها، از بین بردن دام‌های آلوده و نیز پاستوریزاسیون محصولات لبنی حاصل می‌شود. هر چند برای دام‌ها واکسن‌های تجاری که سویه‌های تخفیف حدت یافته‌اند، استفاده می‌شود. اما استفاده از آنها موجب بروز اختلال سرولوژیک در روش‌های تشخیصی شده و موجب بیماری انسان نیز می‌شوند [۲].

لذا نیاز است که استراتژی طراحی واکسن‌ها جهت بروسلوز مورد بازنگری قرار گیرد. یکی از این استراتژی‌ها، استفاده از واکسن‌های زیر واحدی است. ایمنی موثر نسبت به بروسلوز ایمنی سلولی است [۳].

لطفا به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Khodadadi S, Mohabati Mobarez A, Harzandi N, Tabaraei B, Khoramabadi N, Bakhtiyari A, Aghababa H. Cloning and Expression of 31kDa Outer Membrane Protein of *Brucella melitansis* in *E.coli*. J Ardabil Univ Med Sci. 2012; 12(1): 33-39. (Full Text in Persain)

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10 ]

بر خلاف بروسلوز حیوانی، واکسن‌های تأیید شده‌ای برای پیشگیری از بروسلوز انسانی هنوز در دسترس نیست. لذا چاره جویی برای یافتن راه حل‌های دیگری جهت واکسیناسیون انسان و دام با استفاده از انواع آنتی‌ژن‌های پروتئینی و غیر پروتئینی بروسلاها و یا ترکیبی از آن‌ها لازم به نظر می‌رسد. به منظور ساخت این واکسن‌ها پی بردن به خواص آنتی ژنیک و شیمیایی انواع آنتی ژن‌های بیان شده در این باکتری الزامی است.

پروتئین‌های غشای خارجی بروسلا در ایجاد پاسخ ایمنی سلولی در این باکتری نقش کلیدی دارند [۳]. به همین خاطر تعدادی از این پروتئین‌های غشای خارجی کلون و بیان شده‌اند. پروتئین‌های بروسلا ملیتنسیس شامل 20 kDa، 28kDa، و 31kDa، پروتئین‌های غشای خارجی بروسلا ابورتوس شامل 17 kDa،16.5 kDa،25kDa، 22 kDa و 36 kDa و پروتئین 25 kDa بروسلا اوویس [٤].

در این مطالعه پروتئین غشای خارجی ۳۱ کیلو دالتونی (Omp31) بروسلا ملیتنسیس به صورت نوترکیب تولید شده است.

پروتئین Omp31 اولین بار در بروسلا ملیتنسیس گزارش شده و یک پورین است و در تمام گونه‌های بروسلا بجز بروسلا آبورتوس وجود دارد و منجر به سوئیچ پاسخ ایمنی میزبان به سمت ایمنی سلولی می‌شود [٤].

Omp31 یک پروتئین غشای خارجی است که در سطح بروسلا ملیتنسیس صاف قرار دارد و کاندیدای واکسن زیر واحدی در برابر بروسلوز است [۵]. هدف از این تحقیق کلون ژن کدکننده پروتئین Omp31 در یک پلاسمید بیانی و سپس تولید این پروتئین به صورت نوترکیب در باکتری میزبان E. coli می‌باشد.

## روش کار

### تکثیرژن Omp31

ژنوم سویه استاندارد بروسلا ملیتسیس تحت گونه 16M با استفاده ازکیت استخراج ژنوم بایونیر (ساخت کره) تخلیص و به منظور کپی برداری از ژن Omp31 (NC-004311) با به کارگیری یک جفت پرایمر (ساخت شرکت بایونیر؛ کره) زیر مورد استفاده قرار گرفت:

پرایمر پیشرو Sbmo31F

3'AATGAGCTCATGAAATCCGTAATTTTG GCGTCCATC 5'

پرایمر پیرو Sbmo31R

3'ACAAAGCTTTTAGAACTTGTAGTTCAG ACCGACGCG 5'

پرایمر پیشرو دارای جایگاه برای آنزیم SacI و پرایمر پیرو دارای جایگاه برای آنزیم HindIII می‌باشد (علامت گذاری شده‌اند). طراحی پرایمرها بر اساس توالی ژن کدکننده پروتئین غشای خارجی ۳۱ کیلو دالتونی صورت گرفته است (تکاپو زیست). به کمک آنزیم Prim STAR® HS DNA polymerase (تاکارا - ژاپن) که خاصیت تصحیح اشتباه بالایی دارد، از روی ژن اصلی کپی برداری شد. مواد مورد نیاز جهت ازدیاد ژن عبارت بودند از الگوDNA ژنومیک، پرایمر پیشرو و پیرو، dNTP، بافر، کلرید منیزیم، آب مقطر استریل و آنزیم PrimSTAR®. انجام PCR با مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۸ درجه سانتی‌گراد (Hot start) آغاز گردیده و با انجام ۳۵ سیکل متوالی (۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه) به اتمام رسید. ژل آگاروز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید در الکتروفورز برای مشاهده محصول تکثیر شده کپی برداری مورد استفاده قرار گرفت.

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10 ]

**آنزیم های محدودالاثر و تهیه پلاسمید نوترکیب**

ژن پروتئین غشای خارجی ۳۱کیلودالتونی در پلاسمید pJET1/2blont (کیت فرمنتاز-لتونی) کلون شد. پلاسمیدهای pJET1/2 نوترکیب حاصل به درون باکتری صلاحیت‌دار شده E.coli DH5α منتقل شد. ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی انجام گردید. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت بایونیر استخراج شده و به وسیله هضم آنزیمی (*Sac*I و *Hind*III) تأیید شدند و برای اطمینان از عدم بروز موتاسیون و صحت ترادف کاست بیانی، پلاسمید استخراج شده با تعیین توالی مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن Omp31 با هضم آنزیمی دوگانه (SacI و HindIII) از پلاسمید pJET1/2 خارج شده و در پلاسمید pET28a (+) (نواژن) که با همان دو آنزیم برش داده شده و به صورت خطی در آمده بود کلون شد. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی و واکنش PCR برای حضور ژن مورد نظر بررسی شدند.

**بیان پروتئین غشای خارجی ۳۱ کیلودالتونی در E.coliBL21**

پلاسمیدهای نوترکیب pET28a (+) به باکتری‌های مستعد شده E.coli BL21، به عنوان میزبان بیانی وارد شدند و بیان با استفاده از ایزوپروپیل- بتا- دی- تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) یک میلی مولار القا شد. میزان بیان، هر یک ساعت پس از القا تا ٤ ساعت متوالی با روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت که ژل پلی آکریل آمید جدا کننده ۱۲/۵٪ مورد استفاده قرار گرفت (بایو- رد). نمونه‌ها بوسیله بافر نمونه که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر بافر ژل متراکم کننده، ۵ میلی‌لیتر گلیسرول، ۱ گرم اس دی اس، ۰/۲ میلی‌لیتر محلول بروموفنل ۰/۵٪ در اتانل و ۱ میلی‌لیتر ۲- مرکاپتواتانل که با آب مقطر به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسیده است، آماده شدند. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شده و نهایتاً ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه روی ژل بررسی شد. پس از آماده شدن ژل، رنگ آمیزی با کوماسی بلو جی- ۲۵۰ انجام گرفت.

**تخلیص پروتئین نوترکیب**

تخلیص پروتئین تحت شرایط denaturing بر اساس دستورالعمل شرکت QIAGEN انجام شد. پروتئین‌ها پس از القاء توسط IPTG به صورت اجسام توده‌ای نامحلول در سیتوپلاسم در می‌آیند، با استفاده از ستون کروماتوگرافی و بافرهایی که حاوی اوره هستند، پروتئین خالص، جدا می‌شود. حذف اوره روی ستون با شستشو توسط محلول‌های حاوی رقت‌های کاهشی اوره و پیش از جدا کردن پروتئین از رزین انجام می گیرد.

**ارزیابی پروتئین تخلیص شده**

برای بررسی مراحل خالص سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها از روش SDS-PAGE استفاده شد. برای تعیین غلظت کلی پروتئین نمونه از روش برادفورد استفاده گردید.

**آنالیز پروتئین نوترکیب به روش وسترن بلات**

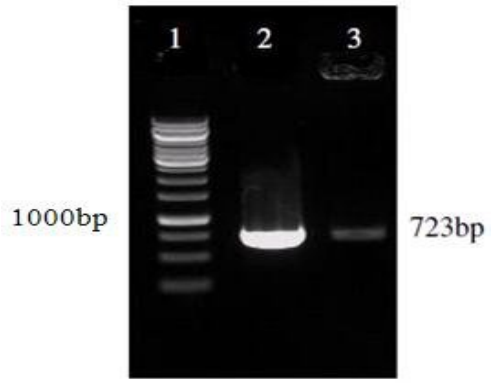
پروتئین ها از روی ژل SDS-PAGE به کمک روش انتقال در تانک به غشاء نیتروسلولزی انتقال یافت. سپس به دلیل اینکه غشای مورد استفاده در بلاتینگ برای گرفتن پروتئین‌ها ظرفیت زیادی دارد، برای جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی پروتئین‌های نشان دار، مناطق آزاد غشاء قبل از مرحله تشخیص به وسیله توئین ۲۰ بلوکه شدند. در ادامه غشاء در سرم خرگوش حاوی آنتی‌بادی پلی‌کلونال با رقت ۱:۱۰.۰۰۰ (تولید شده در بخش باکتری‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس) که در واقع همان آنتی‌بادی اولیه ما می‌باشد قرار داده شد (برای جلوگیری از واکنش های متقاطع بین آنتی بادی پلی‌کلونال تولید شده علیه بروسلا با پروتئینهای میزبان بیانی، سرم خرگوشی ۲٤ ساعت با لیزات سلول *E.coli*BL21 فرمالینه انکوبه و سپس ۱ ساعت در ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ شد. از این سرم تیمار شده

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10 ]

برای ردیابی پروتئین های بروسلا استفاده شد). بعد از شستشو با بافرتریس نمکی حاوی توین ۰/۰۵٪، غشاء داخل آنتی‌بادی ثانویه ضد IgG خرگوشی که با آنزیم پراکسیداز کونژوگه شده با رقت ۱:۵۰۰۰ قرار داده شد (تولید شرکت رازی فراز طب). مجدداً مرحله شستشو با بافر TBS تکرار شد و نهایتاً غشاء در معرض مقدار کافی از محلول سوبسترای آنزیم پراکسیداز شامل دی آمینوبنزیدین ۵ میلی-گرم در میلی‌لیتر و پرکسیداز هیدروژن ۱٪ در بافر تریس نمکی با pH ۵/۷ قرار گرفت. به محض ظهور باندها غشاء با مقدار زیادی آب مقطر شسته شد.

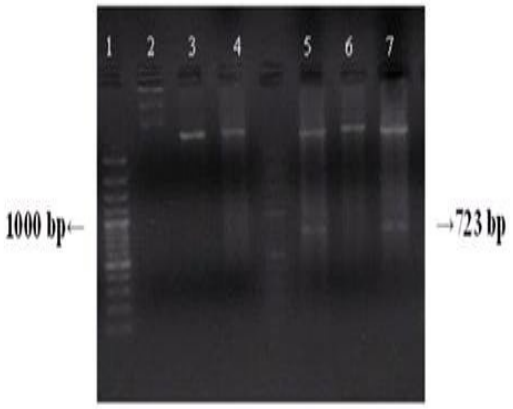
## یافته ها

ژن پروتئین Omp31 توسط پرایمرهای طراحی شده و با آنزیم PrimSTAR تکثیر شد (شکل۱).

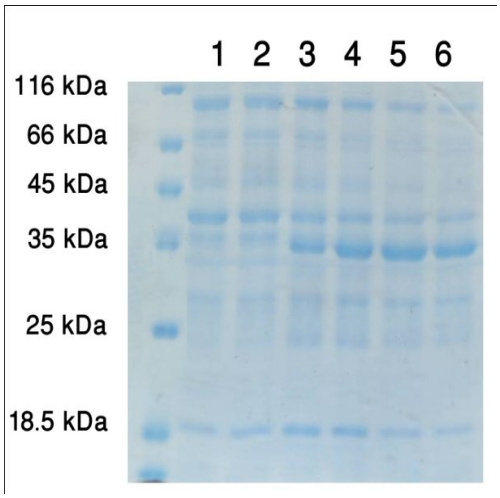



**شکل ۱. محصول واکنشPCR برروی ژل آگاروز یک درصد**
**چاهک ۱: سایز مارکر (fermentase)، چاهک۲: محصول PCR(۷۲۳جفت باز)**

آنالیز هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET28a(+) با آنزیم‌های SacI وHindIII (شکل۲) نشان داد که قطعه حاوی ژن Omp31 در پلاسمید بیانی قرار گرفته است. بررسی نرم افزاری حاکی از آن بود که این ژن پروتئینی به وزن ۳۱ کیلودالتون را کد کرده و دارای ۲٤۱ اسیدآمینه می‌باشد. بیان پروتئین در باکتری‌های تحریک شده با IPTG یک میلی مولار تا ٤ ساعت بعد از القاء ردیابی و پروتئین در حدود وزنی پیش‌بینی شده مشاهده شد (شکل ۳) و با وسترن بلات تأیید گردید (شکل ٤).

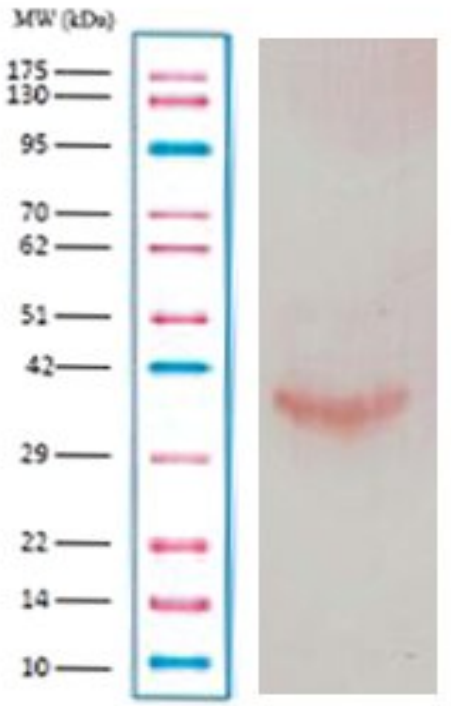



**شکل ۲. هضم تک آنزیمی و دو آنزیمی با آنزیم های محدودالاثر پلاسمید (SacI, HidIII) برروی ژل آگاروز۱٪**
**چاهک ۱ و ۵: سایز مارکر (fermatas)، چاهک ۲: پلاسمید (+) pET28a نوترکیب بدون هضم آنزیمی، چاهک٤و۷،۳: پلاسمید(+) pET28a نوترکیب با هضم تک آنزیمی، چاهک ۶و۸: پلاسمید(+) pET28a نوترکیب با هضم دو آنزیمی**




**شکل ۳. بیان با استفاده از ایزوپروپیل- بتا- دی- تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) یک میلی مولار القا شد.**
**میزان بیان، هر یک ساعت پس از القا تا ٤ ساعت متوالی با روش SDS-PAGE با ژل پلی آکریل آمید جدا کننده ۱۲/۵٪ مورد استفاده قرار گرفت. چاهک ۱: ساعت اول بعد از القا، چاهک ۲: ساعت دوم بعد از القا با IPTG، چاهک ۶،۵،٤،۳: ساعت چهارم بعد از القاء، بهترین بیان پروتئین، ۳-٤ ساعت بعد از القاء با IPTG می باشد.**

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10 ]




**شکل ٤. وسترن بلات پروتئین غشای خارجی ۳۱ کیلو دالتونی نوترکیب خالص شده با آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی**

## بحث

بروسلوز (تب مدیترانه‌ای، تب مواج) جزءِ بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است. در حیوانات بروسلا ترجیحا در ارگان‌های تولید مثل و بافت جنینی جایگزین می‌شود که سبب بروز سقط جنین و ناباروری می‌شود و به دنبال آن خسارت‌های اقتصادی مهمی را حاصل می‌کند. جهت کنترل بروسلوزیس آزمایش و کشتار توام حیوانات و واکسیناسیون از مهمترین برنامه‌ها کنترل بیماری هستند. لذا جلوگیری از بروسلوز انسانی وابسته به کنترل بیماری در حیوانات است. واکسن‌هایی برای پیشگیری بروسلوز حیوانی که سویه‌های زنده تخفیف حدت یافته‌اند در دسترس است ولی برای بروسلوز انسانی هنوز واکسن تأیید شده‌ای وجود ندارد [۶] .

این واکسن‌ها معایبی دارند که استفاده از آنها را با مشکل مواجه کرده است از قبیل: عدم انگیزش پاسخ سرولوژیکی پایدار، سقط جنین در حیوانات باردار و خطر آلوده شدن انسان از مهمترین موارد می‌باشند. به این دلایل دانشمندان تلاش می‌کنند تا واکسن‌های امن و غیر تکثیر شونده‌ای را فراهم کنند که تولید آنها آسان باشد [۷].

بنابراین شناسایی آنتی‌ژن‌های حفاظت بخش بروسلا برای تولید واکسن‌های ساب سلولار ضروری می‌باشد [۸].

پروتئین های غشای خارجی بروسلا به طور گسترده به عنوان آنتی‌ژن‌های ایمونوژنیک و حفاظت بخش شناسایی شده‌اند، بنابراین در تولید روش‌های تشخیصی و واکسن‌ها می‌توانند آنتی‌ژن‌های سودمندی باشند [۷].

تهیه پروتئین طبیعی بروسلا نیاز به کشت انبوه و خالص‌سازی پروتئین دارد که هم پروسه تولید بسیار مشکل و خطرآفرین است و هم سطح پروتئین‌های غشایی سطحی به حدی نیست که خالص‌سازی فرم طبیعی آن به صرفه باشد. در این مطالعه از تکنیک نوترکیبی جهت تولید پروتئین استفاده نمودیم که قادر است میزان بالای پروتئین را در اختیار ما بگذارد. جهت تولید این پروتئین بصورت نوترکیب از وکتورهای دیگر مثل وکتورpTargeT , pNV3123 نیز استفاده شده است [۹]، ولی طبق تحقیقات انجام شده تولید این پروتئین با وکتور بیانی pET28a (+) سازگاری بهتری دارد. در این بررسی از سیستم pET28a (+) استفاده شد که از نظر کار آمدی و تولید پروتئین نوترکیب بازدهی قابل قبولی داشت. در این مطالعه پروتئین نوترکیب OMP31 با موفقیت بیان و صحت نتایج با استفاده از SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید شد.

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10 ]

## نتیجه گیری

ژن Omp31، یک پروتئین مهم از نظر تحقیقات ایمونولوژی مطرح است. این پروتئین دارای قدرت بالقوه برای تحریک پاسخ های ایمنی است و می توان در تشخیص بیماری توسط ارزیابی سرم از آن بهره گرفت [۹].

این پروتئین نوترکیب، پتانسیل استفاده برای بررسی ایمنی زایی و همینطور تشخیص بروسلوز را در تحقیقات آینده دارا می‌باشد.

## Reffernces


1- Boschiroli ML, Foulongne V, O'Callaghan D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. Curr Opin Microbiol. 2001 Feb; 4(1): 58-64.

2- Ashford DA, di Pietra J, Lingappa J, Woods C, Noll H, Neville B, et al. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51.Vaccine 2004 Sep; 22(25-26): 3435-9.

3- Skendros P, Pappas G, Boura P. Cell-mediated immunity in human brucellosis. Microbes Infect. 2011 Feb; 13(2):134-42.

4- Cloeckaert A, Vizcaino N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of Brucella spp. past, present and future. Vet Microbiol. 2002 Dec; 90(1-4):229-47.

5- Vizcaino N, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Dubray G. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella Melitensis* Omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. Infect immun. 1996 Sep; 64(9):3744-51.

6- Estein SM, Cassataro J, Vizcaíno N, Zygmunt MS, Cloeckaert A, Bowden RA. The recombinant Omp31 from Brucella melitensis alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against Brucella ovis infection in BALB/c mice. Microb infect. 2003 Feb; 5(2):85-93.

7- Mahajan NK, Kulshreshtha R, Malik G, Dahiya J. Immunogenicity of major cell surface protein (s) of *Brucella Melitensis* Rev 1. Vet Res Commun. 2005 Apr; 29(3):189-99.

8- Pasquevich KA, Estein SM, Garcia Samartino C, Zwerdling A, Coria LM, Barrionuevo P, et al. Immunization with recombinant Brucella species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. Infect Immun. 2009; Jan; 77(1):436-452.

9- Guilloteau LA, Laroucau K, Vizcaino N, Jacques I, Dubray G. Immunogenicity of recombinant *Escherichia coli* expressing the omp31 gene of *Brucella melitensis* in BALB/c mice. Vaccine. 1999; Jan; 28; 17(4):353-61.


[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10 ]

# Cloning and Expression of 31kDa Outer Membrane Protein of *Brucella melitansis* in *E.coli*

**Khodadadi S[1]; Mohabati Mobarez A*[2], Harzandi N[1]; Tabaraei B[3]; Khoramabadi N[2]; Bakhtiyari A[1]; Aghababa H[2]**

[1] Department of Microbiology, School of Sciences, Islamic Azad University, Alborz, Iran.
[2]Department of Bacteriology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[3]Vaccine Production Department, Pasteur Institute of Iran, Alborz, Iran.

*Corresponding Author. Tel: 02182883862 Fax: 02182884555 E-mail: mmmobarez@modares.ac.ir

Received: 3 July 2011 Accepted: 16 December 2011

**ABSTRACT**

***Background & Objectives:*** The identification of *Brucella spp*. antigens with the capacity to elicit a protective immune response is of the great interest for the researchers. So, characterization and assessment of diverse antigens of Brucella need to be evaluated. In this study, we report the cloning and expression of the gene coding for 31 KDa OMP (OMP31) of *Brucella melitensis 16M.*

***Methods:*** *Brucella melitensis* Omp31 gene was amplified with specific primers, cloned into pJET1/2 and subsequently subcloned in pET28a (+) vector. Both these recombinant plasmids were sequenced and then after, expression of recombinant protein was induced by 1mM IPTG. Western blot analysis was also performed by polyclonal rabbit antiserum.

***Results:*** Omp31 successfully was cloned in both plasmid vectors. The recombinant Omp31 was expressed in *E.*coli host and purified with significant yield. Western blot results along with those of sequencing ensured accurate production of recombinant omp31 and retaining of its partial epitopes.

***Conclusion:*** Our results show that, an expression host such as E. coli is suitable for omp31 production.

***Key words:*** *Brucella melitensis;* Cloning; Outer Membrane Protein31

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-10 ]