



Cloning and Expression of Recombinant HBHA-OmpL Construct in a Prokaryotic System to Develop a Candidate Vaccine Against *Salmonella Typhimurium*

Marzieh Bazgir¹, Nemat Shams², Ali Forouharmehr³, Amin Jaydari², Narges Nazifi⁴

¹ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

² Department of Microbiology and Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

³ Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

⁴ Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 24 Dec 2025, Receiver in revised from: 24 Feb 2026, Accepted: 3 Mar 2026, Available online: 21 Jun 2026

[10.22059/jvr.2025.394184.3504](https://doi.org/10.22059/jvr.2025.394184.3504)

J Vet Res, Volume 81, Number 2, 2026, 137-147

Abstract

BACKGROUND: *Salmonella Typhimurium*, a Gram-negative bacterium, causes salmonellosis in humans and livestock. Beyond hygiene measures, vaccination with next-generation vaccines exhibiting minimal side effects represents a fundamental approach to combating this deadly disease.

OBJECTIVES: This study aimed to design and create a recombinant immunogenic chimera construct comprising the OmpL antigen from *Salmonella Typhimurium* and the HBHA adjuvant, and to evaluate its expression in a prokaryotic system.

METHODS: The DNA was first extracted from *Salmonella Typhimurium* bacteria and the B.C.G vaccine. Each of the OmpL and HBHA genes was amplified using linker primers and connected to each other using the SOE-PCR reaction. Next, to connect the recombinant HBHA-OmpL chimera to the pET22b(+) expression vector, both were first subjected to double-digestion treatment and then ligated together using T4 ligase enzyme. Finally, the recombinant construct was transferred into *E. coli* (DH5 α) and *E. coli* BL21 (DE3) using a heat shock process. After gene expression induction, protein purification was performed using a nickel NTA chromatography resin column. Finally, the quality of recombinant protein expression was evaluated using a 12% SDS-PAGE gel.

RESULTS: The amplification of HBHA and OmpL genes, construction of the chimeric structure, and transformation of the expression vector into DH5 α and BL21(DE3) cells were validated by PCR, SOE-PCR, and colony-PCR tests, respectively. Successful expression and purification of the 49.5 kDa recombinant HBHA-OmpL protein was confirmed by 12% SDS-PAGE gel.

CONCLUSIONS: The expression of recombinant HBHA-OmpL immunogenic construct in a prokaryotic system is feasible for developing a candidate vaccine against *Salmonella Typhimurium*.

Keywords: HBHA, OmpL, Prokaryotic System, Recombinant vaccine, *Salmonella Typhimurium*

Copyright © The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Nemat Shams, Tel/Fax: +9866-33120109 / +9866-33120109



How to cite this article:

Bazgir M, Shams N, Forouharmehr A, Jaydari A, Nazifi N. Cloning and expression of recombinant HBHA-OmpL construct in a prokaryotic system to develop a candidate vaccine against *Salmonella Typhimurium*. Journal of Veterinary Research, 2026; 81(2): 137-147. doi: 10.22059/jvr.2025.394184.3504

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Characteristics of the primers. *Bold and underlined parts correspond to the enzyme cleavage site.

Figure 1. A: Result of DNA extraction from (A) *Salmonella typhimurium* and (B) *Mycobacterium tuberculosis*. The ladder lane was added solely to confirm proper execution of the electrophoresis system.

Figure 2. PCR results for specific amplification of the HBHA and OmpL genes with 600 bp and 667 bp sizes, respectively.

Figure 3. Amplification of the recombinant HBHA-OmpL chimera (1267 bp) using SOE-PCR.

Figure 4. Colony PCR products of the recombinant chimera (1592 bp) in *E. coli* DH5 α , amplified using T7 primers.

Figure 5. Expression of the recombinant HBHA-OmpL chimera protein at different times. Lane 0: Uninduced control (before induction of BL21(DE3) expression by IPTG); Lanes 1–5: Expression at 1, 2, 3, 4, and 5 hours post-IPTG induction, respectively.

Figure 6. The HBHA-OmpL protein (49.5 kDa) purified using a Nickel NTA chromatography column and a 250-mM imidazole solution.



همسانه‌سازی و بیان سازه نو ترکیب HBHA-OmpL در سیستم بیانی پروکاریوتی با هدف معرفی یک سازه واکسن کاندید علیه سالمونلا تیفیموریوم

مرضیه بازگیر^۱، نعمت شمس^۲، علی فروهر مهر^۳، امین جایدری^۴، نرگس نظیفی^۴

^۱ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

^۲ گروه میکروبیولوژی و بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

^۳ گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

^۴ گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۳ دی ۱۴۰۴، تاریخ بازنگری: ۵ اسفند ۱۴۰۴، تاریخ پذیرش: ۱۲ اسفند ۱۴۰۴، تاریخ انتشار: ۳۱ خرداد ۱۴۰۵

doi: [10.22059/jvr.2025.394184.3504](https://doi.org/10.22059/jvr.2025.394184.3504)

دوره ۸۱، شماره ۲، ۱۴۰۵، ۱۴۷-۱۳۷

چکیده

زمینه مطالعه: باکتری گرم منفی سالمونلا تیفی موریوم به‌عنوان عامل ایجادکننده بیماری سالمونلوز در انسان و دام مطرح است. در کنار رعایت موارد بهداشتی، یکی از اصولی‌ترین راه‌های مقابله با این بیماری، مایه‌کوبی توسط نسل جدید واکسن‌ها است که کمترین عوارض جانبی را دارند.

هدف: مطالعه حاضر با هدف طراحی و ساخت سازه نو ترکیب ایمونوژن، متشکل از آنتی‌ژن OmpL از باکتری سالمونلا تیفی موریوم و ادجوانت HBHA و ارزیابی بیان آن در سیستم پروکاریوتی انجام شد.

روش کار: فرایند استخراج DNA از باکتری‌های سالمونلا تیفی موریوم و همچنین واکسن ب.ث.ا. انجام شد. هریک از ژن‌های HBHA و OmpL توسط پرایمرهای لینکر دار تکثیر و با به‌کارگیری واکنش SOE-PCR به یکدیگر متصل شدند. در ادامه برای اتصال کایمر نو ترکیب HBHA-OmpL به وکتور بیانی pET22b(+), ابتدا هر دو تحت تیمار هضم دوآنزیمی قرار گرفتند و سپس با استفاده از آنزیم T4 لیگاز به یکدیگر متصل شدند. در نهایت نیز سازه کایمر شده با استفاده از فرایند شوک حرارتی به داخل سلول‌های مستعد همسانه‌سازی *E. coli (DH5α)* و سلول‌های مستعد بیانی *E. coli BL21 (DE3)* منتقل شد. پس از القای بیان ژن، خالص‌سازی پروتئین‌ها توسط ستون رزین کروماتوگرافی نیکل NTA انجام شد. در نهایت نیز کیفیت بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد ارزیابی شد.

نتایج: مطابق یافته‌های مشاهده‌شده، فرایندهای PCR، SOE-PCR و Colony-PCR به ترتیب، تکثیر صحیح ژن‌های HBHA و OmpL، ساخت سازه نو ترکیب و همچنین تأیید انتقال وکتور بیانی نو ترکیب به سلول‌های مستعد *DH5α* و *BL21 (DE3)* را تأیید کردند. از طرفی بررسی بیان و خالص‌سازی پروتئین نو ترکیب HBHA-OmpL با وزن مولکولی ۴۹/۵ kDa نیز توسط ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد تأیید و موفق بودن این مرحله نیز تأیید شد. **نتیجه‌گیری نهایی:** براساس مشاهدات، بیان سازه نو ترکیب ایمونوژن HBHA-OmpL در سیستم بیانی پروکاریوتی با هدف تولید یک واکسن کاندید علیه سالمونلا تیفی موریوم با موفقیت امکان‌پذیر است.

کلمات کلیدی: سالمونلا تیفی موریوم، سیستم پروکاریوتی، واکسن نو ترکیب، HBHA، OmpL

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

کپی‌رایت © نویسندگان.



نویسنده مسئول: نعمت شمس، گروه میکروبیولوژی و بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

مقدمه

سالمونلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک انسان و دام با گستردگی جهانی است که باعث مشکلات فراوانی در بهداشت و اقتصاد کشورها می‌شود (۱، ۲). عامل ایجادکننده این بیماری، یک باکتری تاژک‌دار گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری از جنس سالمونلا و خانواده آنتریباکتریاسه است. این بیماری در انسان سالانه سبب ایجاد حدود ۲۰۰۰۰۰ مرگ در سطح جهان می‌شود (۳) و در دام می‌تواند سبب ورم معده و روده همراه با اسهال استفراغ، ورم مفاصل، ورم و بزرگ شدن کبد، سقط جنین، گاسترانتریت و غیره شود (۴). عمده‌ترین راه انتقال آن،

از طریق دستگاه گوارش است. مصرف آب و غذاهای آلوده، علوفه خشبی یا سایر غذاهایی که توسط مدفوع، ادرار و خون ناقلین آلوده شده‌اند، از راه‌های انتقال این باکتری می‌باشند (۵). *سالمونلا تیفی موربیوم* سروواری از *سالمونلا* است که باعث بروز عفونت‌های روده‌ای یا خارج روده‌ای با شیوع بالا، در انسان، دام و پرندگان می‌شود. در مطالعات متعدد، میزان شیوع آن از ۲/۷۴ درصد در آمریکا و ۳/۸ درصد در ایران گزارش شده است (۶، ۷). امروزه استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک برای فراهم آوردن واکسن‌های جدید مؤثر به راهکارهای متداولی در مبارزه با بسیاری از عفونت‌های میکروبی تبدیل شده‌اند. واکسن‌های حاوی پروتئین‌های نوترکیب کایمر شده با ادجوانت‌های مولکولی با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، علاوه بر اینکه می‌توانند باعث پاسخ بهتر سیستم ایمنی شوند، می‌توانند از عوارض ناخواسته واکسن‌های کشته‌شده که ناشی از اجزای مختلف پیکره باکتری است نیز پیشگیری کنند (۸).

پروتئین‌های غشای خارجی (Omps) *سالمونلا*، از جمله آنتی‌ژن‌های کاندید برای توسعه واکسن‌های محافظ در زمینه کنترل سالمونلوز به شمار می‌روند (۹). مطالعات در مورد باکتری‌های گرم منفی نشان داده است پورین‌ها فراوان‌ترین دسته از OMPها می‌باشند که بسیار محافظ نیز می‌باشند (۱۰-۱۲). پروتئین غشای خارجی پورین L (OmpL که YshA نیز نامیده می‌شود) پروتئینی است که به‌طور گسترده‌ای در بین سروتیپ‌های مختلف *سالمونلا* توزیع شده است. OmpL یک پروتئین بشکه‌ای β تراغشایی (Transmembrane β -barrel) است که شامل ۱۲ رشته β تراغشایی و یک توالی سیگنال N ترمینال می‌شود. زمانی که OmpL نوترکیب در *اشریشیا کلی* بیان می‌شود به سمت غشای خارجی باکتری محلی می‌شود (۱۳).

مطالعات نشان داده‌اند پروتئین OmpL از باکتری *سالمونلا تیفی موربیوم* بسیار ایمنی‌زا است، زیرا می‌تواند پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی را برانگیزد و از موش‌های ایمن‌شده در زمان چالش با دُزهای بسیار بالای *سالمونلا تیفی موربیوم* به‌خوبی محافظت کند (۱۴)؛ بنابراین OmpL یک کاندید بالقوه برای توسعه یک واکسن زبرواحدی محافظ در برابر عفونت *سالمونلا* است؛ بدین ترتیب با به‌کارگیری این آنتی‌ژن ارزشمند، هدف مطالعه حاضر تهیه یک پروتئین ایمنوزن کایمر شده متشکل از آنتی‌ژن OmpL از باکتری *سالمونلا تیفی موربیوم* و همچنین ادجوانت مولکولی HBHA (Heparin-Binding Haemagglutinin Adhesin) می‌باشد.

مواد و روش کار

در مطالعه Bazgir و همکاران در سال ۲۰۲۳ طراحی و مطالعات ایمونوفورماتیک سازه نوترکیب متشکل از یک دامنه ادجوانتی (HBHA) و یک دامنه آنتی‌ژنی (OmpL) به‌طور مفصل بررسی شده است. به‌طور خلاصه، در مطالعه پیشین نشان داده شد این سازه با ۴۳۴ اسید آمینه و وزن مولکولی ۴۹/۴۵ کیلودالتون، دارای ساختاری پایدار، آب‌دوست و کروی است. این سازه نوترکیب دارای ۱۷/۸۱ و ۲۶/۲۶ درصد ساختارهای صفحات گسترده و رندوم کوئل می‌باشد. آنتی‌ژنیسیته محاسبه شده برای این سازه ۰/۶۸۸۲ گزارش شد. علاوه بر این مطالعات بیوانفورماتیک نشان داد سازه نوترکیب طراحی شده به‌طور صحیحی قابلیت اتصال خود را از طریق دمین HBHA با گیرنده سطح سلول TLR4 حفظ کرده است (۱۵).

سویه‌های باکتری و استخراج DNA: در مطالعه حاضر سروتیپ‌های باکتریایی *سالمونلا سویه تیفی موربیوم*، *اشریشیا کلی سویه DH5 α* و *اشریشیا کلی سویه BL21* تهیه شدند (دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان) و مورد استفاده قرار گرفتند. فرایند استخراج DNA براساس پروتکل ارائه شده توسط کیت اختصاصی استخراج DNA از باکتری (سیناکلون، ایران)، از باکتری *سالمونلا تیفی موربیوم* برای تکثیر توالی ژن OmpL و از واکسن ب.ث.ژ برای تکثیر توالی ژن HBHA، به‌عنوان ادجوانت مولکولی انجام شد. کیفیت استخراج DNA موردنظر با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

تکثیر توالی DNA آنتی‌ژن OmpL و مولکول HBHA: برای تکثیر توالی آنتی‌ژن OmpL و مولکول HBHA از پرایمرهای اختصاصی که در جدول ۱ نشان داده شده است استفاده شد. لازم به ذکر است که پرایمر رفت در فرایند تکثیر HBHA در ناحیه ۵' خود دارای جایگاه برش آنزیم *NcoI* می‌باشد در حالیکه پرایمر برگشتی که برای تکثیر ژن OmpL استفاده شد در ناحیه ۳' خود دارای جایگاه برشی آنزیم *EcoRI* بود.

تکثیر ژن موردنظر توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مواد تشکیل دهنده واکنش PCR برای تکثیر آنتی‌ژن OmpL و مولکول HBHA شامل ۲ میکرولیتر Templat، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X)، ۲ میکرولیتر dNTP (۲/۵ میلی‌مولار)، ۱/۵

میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر (۱۰ پیکومول) از هر یک از پرایمرهای لینکر دار فوروارد و ریورس، ۱ میکرولیتر آنزیم تک پلیمرز (۰/۱۲۵) واحد بر میکرولیتر) بودند. سیکل‌های دمایی به کار گرفته شده برای اجرای فرایند تکثیر به این صورت بود که در ابتدا مواد در دمای واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس در ۳۵ سیکل متوالی دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشت‌سازی را به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال پرایمرها را به مدت ۳۵ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد را برای ۳۰ ثانیه متحمل شدند. در نهایت نیز تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. کیفیت‌سنجی محصولات تکثیر شده توسط سیستم الکتروفورز و ژل آگارز ۱ درصد انجام شد.

الحاق توالی نوکلئوتیدی آنتی‌ژن *OmpL* به مولکول *HBHA* به کمک روش *SOE-PCR*: فرایند (Splicing-by-Overlap)

SOE-PCR (Extension PCR) در دو مرحله اجرا می‌شود. در مرحله اول محصولات *PCR* به دست آمده از مرحله قبل (آنتی‌ژن *OmpL* و مولکول *HBHA*) به یکدیگر متصل شدند. بدین منظور محصولات به دست آمده از *PCR* مرحله قبل به عنوان الگو، در *PCR* مرحله ۱ استفاده شدند. واکنش *SOE-PCR* (I) از ۱ میکرولیتر از هر محصول *PCR* رقیق شده *OmpL* و *HBHA*، ۱/۵ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلیمرز، ۱/۲ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۲ میکرولیتر *dNTP* و ۱۶/۸ میکرولیتر آب مقطر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده در این واکنش نیز همانند برنامه ذکر شده در مرحله قبل بود. با این تفاوت که تعداد سیکل‌های تعیین شده، ۱۵ عدد بود. سپس محصول واکنش اول *SOE-PCR* به عنوان الگو برای واکنش دوم *SOE-PCR* استفاده شد. بدین منظور از ۱/۵ میکرولیتر از *DNA* الگو، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رفت ژن *OmpL* با غلظت ۱۰ پیکومول، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر برگشت ژن *HBHA* با غلظت ۱۰ پیکومول، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلیمرز، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۲ میکرولیتر *dNTP* با غلظت ۲/۵ میلی مولار و ۱۶ میکرولیتر آب مقطر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. برنامه دمایی استفاده شده برای واکنش *SOE-PCR*(II) به این صورت بود که ابتدا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به عنوان واسرشت‌سازی اولیه در نظر گرفته شد. سپس واکنش در ۳۵ سیکل متوالی با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشت‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۹ درجه سانتی‌گراد برای اتصال پرایمرها به مدت ۳۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای تکثیر پیش رفت. در نهایت نیز به مدت ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر نهایی اعمال شد.

هضم آنزیمی وکتور (+) *pET22b* و کایمر نوترکیب *HBHA-OmpL*: هضم آنزیمی دوگانه روی وکتور بیانی (+) *pET22b* (Invitrogen, USA) و کایمر نوترکیب *HBHA-OmpL* انجام شد. برای انجام هضم دوگانه سازه نوترکیب *HBHA-OmpL* و وکتور (+) *pET22b* از دو آنزیم *NcoI* و *EcoRI* و بافر *Tango* به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور بدون شیک استفاده شد. در نهایت هر دو محصول هضم شده روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند. فرایند استخراج از ژل آگارز توسط کیت اختصاصی (Termo, USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. بعد از استخراج از ژل، محصول استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ کمیت‌سنجی شدند.

اتصال قطعه نوترکیب *HBHA-OmpL* به پلاسمید (+) *pET22b* و انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری بیانی *BL21 (DE3)* بعد از تعیین غلظت قطعات هضم شده *HBHA-OmpL* و وکتور بیانی، فرایند اتصال با استفاده از آنزیم *T4 DNA Ligase* در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به صورت شبانه انجام شد. سپس فرایند انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول‌های مستعد *DH5α* با استفاده از روش شوک حرارتی انجام شد. محصولات لایگیت شده روی یک پلیت *LB* آگار حاوی آنتی‌بیوتیک (۱/۰ میلی گرم بر میلی لیتر) کشت داده شدند و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ظاهر شدن کلنی‌های تک، جهت تأیید حضور قطعه کایمر شده درون کلنی‌های مشاهده شده روی محیط کشت، از واکنش *Colony PCR* و همچنین پرایمر جهانی *T7* استفاده شد.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای استفاده شده.

نام ژن	توالی پرایمر	دمای T_m (درجه سانتی‌گراد)
HBHA	F: 5' CCATGGGGATGGCTGAAAACCTCGAACATTGATGACATC3'	۷۷
	R: 5' TTTAGCGGCAGCTTCCTTCTGGGTGACCTTCTTGCCGCC3'	۸۳
OmpL	F: 5' GAAGCTGCCGCTAAAATGAAATCTCTGAATACTCTAGTG3'	۷۵
	R: 5' GAATTCGCCGAAGAAATACTTCGCCCCGATACG3'	۷۴

* قسمت‌های پررنگ شده و زیرخط‌دار مربوط به جایگاه برش آنزیم می‌باشد.

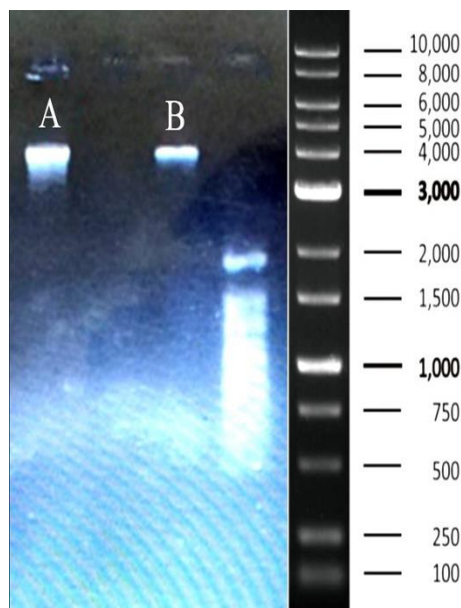
استخراج پلاسمید نوترکیب، تعیین توالی و زیرهمسانه‌سازی به وکتور بیانی: فرایند استخراج پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه HBHA-OmpL از باکتری *DH5α*، با استفاده از کیت تخصصی استخراج پلاسمید نوترکیب (Thermo, USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و برای تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای T7 به شرکت بایونیر کره ارسال شد. بعد از تأیید حضور قطعه نوترکیب داخل پلاسمید pET22b(+) مجدداً انتقال وکتور به درون باکتری مستعد بیانی *BL21(DE3)* به روش شوک حرارتی انجام شد و محصولات روی محیط کشت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین (۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۱۶ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. تأیید صحت اجرای مرحله انتقال نیز توسط فرایند Colony-PCR با به‌کارگیری پرایمر جهانی T7 بررسی شد.

بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب تولیدشده HBHA-OmpL: به‌منظور القای بیان پروتئین HBHA-OmpL، باکتری *BL21(DE3)* (حاوی pET22b(+) نوترکیب)، در ۵ تا ۶ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی آمپی‌سیلین (۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت، در دمای ۳۷ درجه کشت داده شد. پس از جوان‌سازی مجدد باکتری‌ها در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی آمپی‌سیلین (۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، القای بیان ژن موردنظر توسط IPTG (۰/۵ میلی‌مولار) انجام شد. برای بررسی فرایند بیان پروتئین هر ۱ ساعت ۱ بار نمونه‌برداری شد. درنهایت نیز ارزیابی کیفی القای بیان ژن توسط ژل SDS-PAGE با غلظت ۱۲ درصد بررسی شد.

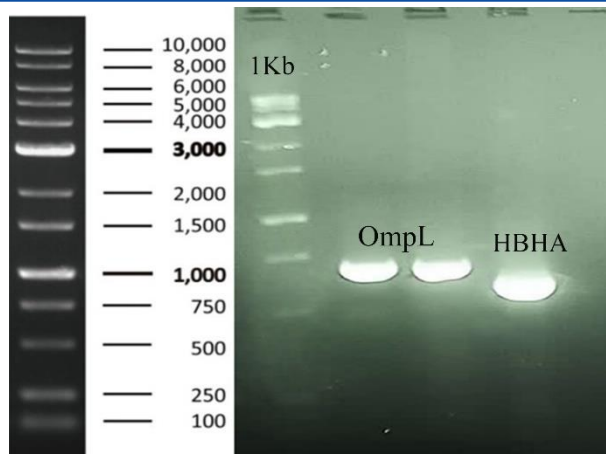
خالص‌سازی و جمع‌آوری پروتئین نوترکیب تولیدشده، با روش His-Taq purification و به‌کارگیری ستون رزین کروماتوگرافی نیکل NTA انجام شد. در این روش، جمع‌آوری نهایی پروتئین‌ها توسط محلول ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار و ارزیابی کیفی پروتئین‌های جمع‌آوری‌شده توسط ژل SDS-PAGE با غلظت ۱۲ درصد انجام شد.

نتایج

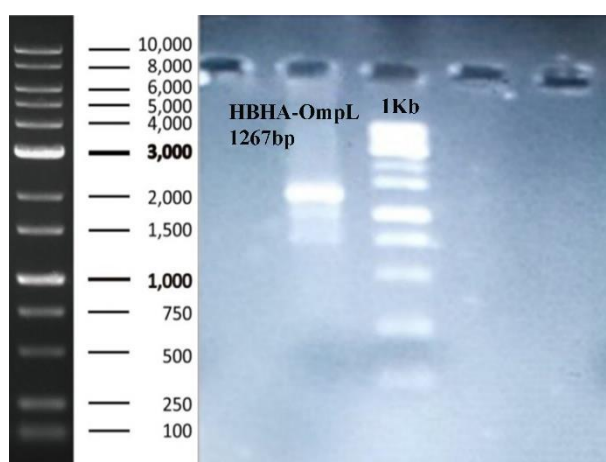
استخراج DNA و تکثیر ژن‌های اختصاصی: به‌منظور تکثیر ژن‌های HBHA به‌عنوان ادجوانت مولکولی و OmpL به‌عنوان آنتی‌ژن، استخراج DNA به‌ترتیب از واکسن ب.ث.ژ و باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* با موفقیت انجام شد (تصویر ۱). سپس هریک ژن‌های HBHA و OmpL که به‌ترتیب دارای طول ۶۰۰ و ۶۶۷ جفت باز می‌باشند، توسط پرایمرهای اختصاصی و واکنش PCR بدون هیچ آلودگی و باند غیر اختصاصی با موفقیت تکثیر شد (تصویر ۲).



تصویر ۱. ستون A: نتیجه استخراج DNA از باکتری *سالمونلا تیفی موریوم*. ستون B: نتیجه استخراج DNA از باکتری *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*. ستون مربوط به لدر صرفاً جهت تأیید اجرای صحیح سیستم الکتروفورز اضافه شد.



تصویر ۲. نتایج واکنش PCR با هدف تکثیر اختصاصی ژن‌های HBHA و OmpL به ترتیب با طول‌های ۶۰۰ و ۶۶۷ جفت باز.



تصویر ۳. نتیجه تکثیر کایمر نو ترکیب HBHA-OmpL به طول ۱۲۶۷ جفت باز با استفاده از روش SOE-PCR.

اجرای واکنش SOE-PCR برای اتصال قطعه آنتی ژن (۶۶۷ جفت باز) OmpL و قطعه مولکولی (۶۰۰ جفت باز) HBHA:

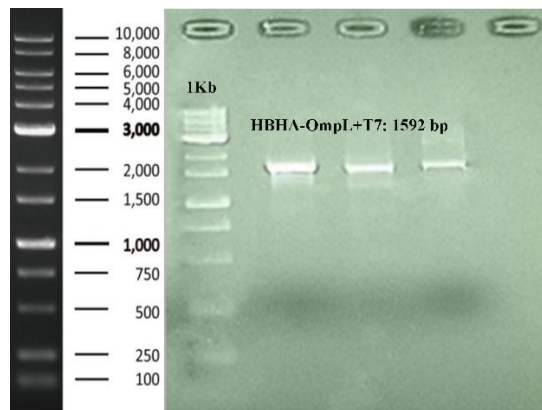
بعد از تکثیر، از محصولات PCR شده هریک از ژن‌های HBHA و OmpL به عنوان نمونه الگو برای ساخت کایمر نو ترکیب HBHA-OmpL استفاده شد. در این مرحله با استفاده از روش Splicing-by-Overlap Extension توالی آنتی ژن OmpL و مولکول HBHA با استفاده از پرایمرهای لینکر دار به یکدیگر متصل شدند و قطعه کایمر نو ترکیب HBHA-OmpL جدید دارای ۱۲۶۷ جفت باز حاصل شد که نتایج الکتروفورز تکثیر صحیح این قطعه را تأیید می‌کند (تصویر ۳).

فرایند هضم دو آنزیمی، واکنش اتصال و انتقال پلاسمید نو ترکیب به درون باکتری‌های مستعد: کایمر نو ترکیب HBHA-OmpL

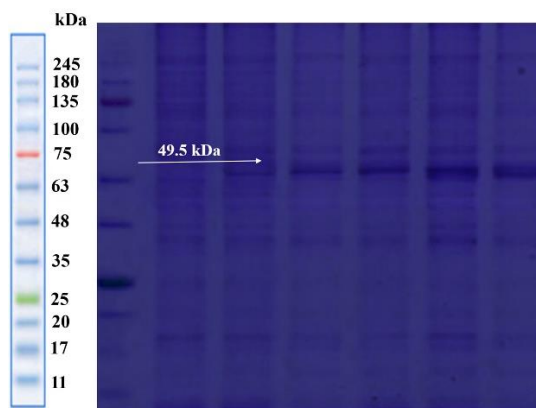
OmpL ساخته شده و همچنین وکتور بیانی pET22b(+) تحت تیمار هضم دو آنزیمی توسط آنزیم‌های محدود کننده *EcoRI* و *NcoI* قرار گرفتند و پس از استخراج از ژل هریک از محصولات ذکر شده، فرایند اتصال با استفاده از آنزیم T4 لیگاز نیز با موفقیت انجام شد. سپس محصول به دست آمده به درون باکتری مستعد DH5 α انتقال داده شد. نتایج الکتروفورز، محصولات حاصل از فرایند Colony-PCR موفقیت اجرای فرایندهای اتصال قطعه نو ترکیب به وکتور بیانی pET22b(+) و انتقال وکتور نو ترکیب به باکتری DH5 α را تأیید کرد (تصویر ۴). در فرایند Colony-PCR، پرایمر T7، ۳۲۵ جفت باز را به توالی کایمر نو ترکیب HBHA-OmpL اضافه می‌کند و یک قطعه ۱۵۹۲ جفت بازی را تولید می‌کند.

نتایج توالی‌یابی پلاسمید نو ترکیب pET22b(+) حاوی پروتئین نو ترکیب HBHA-OmpL: نتایج توالی‌یابی از روی پلاسمید

حاوی قطعه کایمر شده HBHA-OmpL، با استفاده از پرایمرهای T7 نشان داد توالی مدنظر هیچ جهشی ندارد و فریم خوانش صحیح می‌باشد. پس از تأیید نتایج توالی‌یابی، پلاسمید نو ترکیب pET22b(+) طی فرایند شوک حرارتی به درون باکتری بیانی BL21 (DE3) موفقیت انتقال یافت.



تصویر ۴. محصولات کلنی PCR کایمر نوترکیب به طول ۱۵۹۲ جفت باز موجود در باکتری اشریشیا کلی سویه DH5α با استفاده از پرایمرهای T7.



تصویر ۵. بیان پروتئین کایمر نوترکیب HBHA-OmpL در زمان‌های مختلف. ستون صفر قبل از القای بیان باکتری‌های BL21 (DE3) توسط IPTG است، درحالی‌که سایر ستون‌ها به ترتیب ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت بعد از القای بیان می‌باشند.



تصویر ۶. پروتئین خالص‌سازی شده HBHA-OmpL با وزن ۴۹/۵ کیلو دالتون که توسط ستون رزین کروماتوگرافی نیکل NTA و محلول ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار خالص شده است.

بررسی القای بیان و خالص‌سازی توالی پروتئین نوترکیب HBHA-OmpL: القای بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از IPTG

با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار انجام شد. میزان بیان هر ۱ ساعت پس از القا تا ۵ ساعت متوالی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از ژل SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت (تصویر ۵) و همان‌طور که ملاحظه می‌شود با گذشت زمان غلظت پروتئین بیان‌شده افزایش

یافته است. به منظور خالص سازی پروتئین تولیدشده، از ستون رزین کروماتوگرافی نیکل استفاده شد. پس از اتمام فرایند تخلیص پروتئین HBHA-OmpL با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی به روش طبیعی (توسط تغییر غلظت ایمیدازول)، پروتئین های خالص شده روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بارگزاری و ارزیابی شدند و در نهایت پروتئین مورد انتظار با وزن مولکولی تقریباً ۴۹/۴۵ کیلو دالتون، روی ژل SDS-PAGE مورد تأیید قرار گرفت (تصویر ۶).

بحث

در حال حاضر میزان مرگومیر و مشکلات بهداشت عمومی مرتبط با سالمونلا تیفی موریوم به حدی افزایش یافته است که آن را به موضوع مهمی برای جوامع بشری تبدیل کرده است. این باکتری در برابر درمان های آنتی بیوتیکی رایج به راحتی مقاوم می شود و این مسئله مشکلات زیادی را در درمان انسان ها و حیوانات در سراسر جهان به وجود آورده است (۱۶)؛ بنابراین نیاز به دسترسی به یک واکسن کارآمد با قابلیت مناسب تحریک سیستم ایمنی و با کمترین عوارض جانبی به شدت احساس می شود. امروزه به کارگیری علم زیست فناوری در تولید پروتئین نو ترکیب، اجازه جایگزینی آنتی ژن های پروتئینی را با باکتری ها و ویروس های زنده ضعیف شده یا غیرفعال در ساختار واکسن های نسل جدید داده است. علاوه بر این تولید پروتئین های نو ترکیب در مقیاس بزرگ با هزینه کمتر یکی از مزایای عمده این فرایند است (۱۷). براساس مطالعات پیشین، پروتئین های غشای خارجی سالمونلا، آنتی ژن هایی فعال / محافظت کننده در برابر سالمونلا می باشند و این پتانسیل را دارند که به عنوان یک کاندید در طراحی واکسن ها مورد استفاده قرار گیرند (۱۲، ۱۸). در مورد اهمیت به کارگیری آنتی ژن OmpL می توان به این نکته اشاره کرد که این آنتی ژن، به عنوان یک پروتئین غشایی، به دلیل موقعیت آن بر روی سطح باکتری و همچنین بیان فراوان آن در میان سرووارهای مختلف سالمونلا در مطالعه های مربوط به طراحی واکسن علیه سالمونلوز مورد توجه است (۱۴، ۱۹). به عنوان مثال Yang و همکاران در سال ۲۰۱۳ در یک مطالعه به شناسایی و توصیف واکسنی متشکل از آنتی ژن OmpL به عنوان یک واکسن بالقوه برای محافظت در برابر سالمونلوز در موش پرداختند و گزارش کردند در موش های واکسینه شده با rOmpL تمام ایزوله های باکتری توسط سرم rOmpL کشته شدند، ولی سرم موش های بدون مایه کوبی قادر به کشتن عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی برای همه سرووارهای آزمایش شده تا ۱۸۰ دقیقه نبود. آن ها به این نتیجه رسیدند که پروتئین OmpL یک آنتی ژن امیدوارکننده و محافظ برای توسعه یک واکسن کاندید علیه عفونت سالمونلا ارائه می کند (۱۴). بر همین اساس در مطالعه حاضر نیز از آنتی ژن OmpL همراه با ادجوانت HBHA در سیستم بیانی پروکاریوتی (باکتری بیانی BL21(DE3) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده بیان موفق این سازه نو ترکیب در سیستم بیانی پروکاریوتی بود. به کارگیری سیستم بیانی کاربر پسند و مقرون به صرفه پروکاریوتی بسیار مورد توجه و علاقه محققین است.

در راستای مطالعه حاضر، Jahandar و همکاران در سال ۲۰۱۵ ژن InvG از باکتری سالمونلا را با طراحی آغازگر اختصاصی و استفاده از روش PCR تکثیر و بیان آن را در سیستم بیانی پروکاریوتی BL21(DE3) ارزیابی کردند. نتایج نشان داد تولید پروتئین نو ترکیب InvG از باکتری سالمونلا با وزن ۸۱ کیلو دالتون در میزبان بیانی پروکاریوتی (شریشیا کلی) امکان پذیر است (۲۰) که این نتایج در راستای اهمیت و توانمندی سیستم پروکاریوتی در تهیه پروتئین های نو ترکیب می باشد. علاوه بر این مطالعات پیشین نشان داده اند مطالعه های بسیاری در زمینه بیان انواع پروتئین های آنتی ژنیک و معرفی به عنوان کاندید واکسن های نو ترکیب زیرواحدی، متشکل از آنتی ژن های قدرتمند علیه پاتوژن هایی نظیر بروسلا و کوکسیلا انجام شده است که از همین سیستم بیانی پروکاریوتی و همچنین پلاسمیدهای اختصاصی با موفقیت استفاده کرده اند (۲۱-۲۳). سیستم بیانی وکتور pET نیز قوی ترین سیستمی است که برای بیان پروتئین نو ترکیب در میزبان های پروکاریوتی به کار گرفته می شود (۲۴). در مطالعه حاضر تولید پروتئین HBHA-OmpL در باکتری /شریشیا کلی به شکل نو ترکیب با استفاده از ناقل پلاسمیدی سیستم pET22b(+) با موفقیت انجام گرفت. دلیل انتخاب پلاسمید pET22b(+) کارایی بالای آن در کلونینگ و تولید پروتئین نو ترکیب است (۲۰). سپس پروتئین نو ترکیب در باکتری تجاری /شریشیا کلی BL21 (DE3) بیان و خالص سازی شد و در نهایت نیز توسط SDS-PAGE مورد تأیید قرار گرفت.

در راستای مطالعه حاضر، تاکنون مطالعات متعددی در زمینه طراحی و یا ساخت سازه های آنتی ژنیک نو ترکیب با هدف توسعه واکسن های زیرواحدی صورت گرفته است. در این خصوص Adeli و همکاران در سال ۲۰۱۶ با هدف توسعه یک واکسن زیرواحدی علیه بیماری سالمونلوز به بیان پروتئین نو ترکیب fliC پرداختند. در آن مطالعه برای بیان حداکثری، ژن مورد نظر با توجه به ترجیح کدونی

باکتری *E. coli* سنتز و درون وکتور بیانی pET28a+ زیرهمسانه‌سازی شد و سپس به میزبان بیانی پروکاریوتی *اشریشیا کلی* (*BL21 (DE3)*) منتقل شد. بیان و خلوص پروتئین ۵۱ کیلو دالتونی مذکور با استفاده از SDS-PAGE تأیید شد (۲۵). Verma و همکاران در سال ۲۰۰۹، مطالعه‌ایی با هدف به‌کارگیری پروتئین‌های غشای خارجی OmpF و OmpC از *سالمونلا آنتریکا* سرووار تیفی (*S. Typhi*) در ساختار یک واکسن کاندید برای پیشگیری از تب تیفوئید انجام دادند. پروتئین‌های OmpF و OmpC از *S. Typhi* در وکتور pQE30UA همسانه‌سازی و سپس در باکتری بیانی *اشریشیا کلی* (*BL21 (DE3)*) بیان شدند. پروتئین‌های تولیدشده با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی (کروماتوگرافی تعویض یونی) خالص‌سازی و سپس به موش‌ها تزریق شدند تا پاسخ ایمنی آن‌ها بررسی شود. آزمایش‌های سرمی برای اندازه‌گیری تولید آنتی‌بادی‌ها نشان داد پروتئین‌ها می‌توانند پاسخ ایمنی مؤثری ایجاد کنند و به‌عنوان آنتی‌ژن‌های بالقوه برای واکسن‌های ضد *S. Typhi* در نظر گرفته شوند (۲۶).

علاوه‌براین Pandey و همکاران در سال ۲۰۱۸، طی مطالعه‌ایی به‌منظور توسعه واکسن زیرواحدی به بیان و خالص‌سازی آنتی‌ژن Omp28 از *سالمونلا آنتریکا* سرووار تیفی موریوم برای توسعه واکسن زیرواحد پرداختند. در این مطالعه توالی آنتی‌ژن Omp28 تکثیر و همسانه‌سازی و پروتئین آن نیز در سیستم بیانی پروکاریوتی بیان شد. آنتی‌ژنیک بودن پروتئین خالص‌شده از طریق وسترن بلات با آنتی‌سرم تولیدشده در خرگوش تأیید شد. آن‌ها گزارش کردند آنتی‌ژن Omp28 می‌تواند به‌عنوان یک کاندید مؤثر برای توسعه واکسن rDNA علیه سالمونلوز در نظر گرفته شود (۲۷) که با هدفی مشابه با مطالعه حاضر با موفقیت پیش رفته است. در راستای به‌کارگیری آنتی‌ژن‌های برجسته در توسعه کاندید واکسن‌های زیرواحدی، Jha و همکاران در سال ۲۰۱۲ با هدف توسعه یک واکسن نو ترکیب علیه *سالمونلا تیفی* موریوم برای طیور، از آنتی‌ژن Omp C باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم استفاده کردند. این ژن یک پروتئین غشای خارجی اصلی است که هم در اسمولاریته پایین و هم در اسمولاریته بالا به میزان زیادی بیان می‌شود. بدین‌منظور توالی DNA آنتی‌ژن مذکور تکثیر و سپس در باکتری *اشریشیا کلی* سویه *DH5α* کلون و سپس تعیین توالی شد تا امکان توسعه واکسن rDNA بررسی شود (۲۸).

یک واکسن زیرواحدی، شامل آنتی‌ژن OmpL می‌تواند واکسنی محافظ در برابر عفونت‌های سالمونلایی باشد. این پروتئین می‌تواند پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی را برای پاک‌سازی کامل عفونت باکتری *سالمونلا* تقویت کند و پتانسیل آن را برای استفاده در انواع واکسن‌ها افزایش دهد. در نتیجه واکسن مبتنی بر آنتی‌ژن OmpL این قابلیت را دارد که یک واکسن بالقوه در برابر عفونت چندگانه *سالمونلا تیفی* موریوم باشد. در مطالعه حاضر، تلاش شد یک پروتئین نو ترکیب معرفی شود که حاوی پروتئین آنتی‌ژن OmpL از باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم و ادجوانت مولکولی HBHA (HBHA-OmpL)، به‌عنوان یک جایگزین کارآمد برای واکسن‌های رایج موجود است.

نتیجه‌گیری نهایی: مطالعه حاضر با هدف ساخت یک ساختار کایمر ایمونوژنیک، شامل دو دامنه اصلی متشکل از آنتی‌ژن OmpL از باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم و مولکول HBHA، به‌عنوان ادجوانت مولکولی از باکتری *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* انجام شد. این ساختار در ابتدا طراحی و سپس امکان‌سنجی بیان پروتئین مربوط به آن در سیستم بیانی پروکاریوتی بررسی شد. همان‌طور که در نتایج مشخص گردید این پروتئین نو ترکیب با موفقیت در سیستم ارزان‌قیمت و کاربرپسند پروکاریوتی بیان و خالص‌سازی می‌گردد؛ بنابراین می‌توان در مطالعه‌های بعدی خواص ایمنی‌زایی آن را به‌عنوان یک کاندید واکسن زیرواحدی در مدل‌های حیوانی مورد مطالعه قرار داد.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر یک مطالعه *in vitro* می‌باشد و هیچ مدل انسانی یا حیوانی در آن استفاده نشده است؛ بنابراین مشمول دریافت کد اخلاق نمی‌باشد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر در راستای حمایت‌های همه‌جانبه دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان در ایران می‌باشد؛ بنابراین از همکاری مسئولین ذی‌ربط در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافعی در ارتباط با این مطالعه وجود ندارد.

References

1. Brenner F, Villar R, Angulo F, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. J Clin Microbiol. 2000;38(7):2465-7. doi: [10.1128/jcm.38.7.2465-2467.2000](https://doi.org/10.1128/jcm.38.7.2465-2467.2000) PMID: [10878026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10878026/)
2. Ramarathinam L, Niesel DW, Klimpel GR. *Salmonella typhimurium* induces IFN-gamma production in murine splenocytes. Role of natural killer cells and macrophages. J Immunol (Baltimore, Md: 1950). 1993;150(9):3973-81. doi: [10.4049/jimmunol.150.9.3973](https://doi.org/10.4049/jimmunol.150.9.3973) PMID: [8473744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8473744/)
3. Ngan GJY, Ng LM, Lin RT, Teo JW. Development of a novel multiplex PCR for the detection and differentiation of *Salmonella* enterica serovars Typhi and Paratyphi A. Res Microbiol. 2010;161(4):243-8 doi: [10.1016/j.resmic.2010.03.005](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.005) PMID: [20381608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20381608/)
4. Holschbach CL, Peek SF. *Salmonella* in dairy cattle. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2017;34(1):133. doi: [10.1016/j.cvfa.2017.10.005](https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.005) PMID: [29224803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29224803/)
5. Singh Y, Saxena A, Kumar R, Bhatt P, Saxena M. Immunogenic outer membrane proteins (Omps) of *Salmonella*: potential candidate for sub-unit vaccine. Virol & Immunol J. 2017; 1(2):1-6. doi: [10.23880/vij-16000109](https://doi.org/10.23880/vij-16000109)
6. Jamshidi AE, Basami M, Afshari NS. Identification of *Salmonella* spp. and *Salmonella typhimurium* by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad-Iran. Iran J Vet Med. 2009; 3(1):43-48. doi: [10.22059/ijvm.2009.19608](https://doi.org/10.22059/ijvm.2009.19608)
7. Pethe K, Alonso S, Biet F, Delogu G, Brennan MJ, Loch C, et al. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. Nature. 2001;412(6843):190-4. doi: [10.1038/35084083](https://doi.org/10.1038/35084083) PMID: [11449276](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11449276/)
8. Arockiasamy A, Krishnaswamy S. Crystallization of the immunodominant outer membrane protein OmpC; the first protein crystals from *Salmonella typhi*, a human pathogen. FEBS Lett. 1999;453(3):380-2. doi: [10.1016/S0014-5793\(99\)00746-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00746-2) PMID: [10405180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10405180/)
9. Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, Paniagua J, Gonzalez C, Moreno J, et al. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9, 12, d, Vi. Infec immun. 1988;56(11):2953-9. doi: [10.1128/iai.56.11.2953-2959.1988](https://doi.org/10.1128/iai.56.11.2953-2959.1988) PMID: [2844676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2844676/)
10. Thomson DU, Loneragan GH, Thornton AB, Lechtenberg KF, Emery DA, Burkhardt DT, et al. Use of a siderophore receptor and porin proteins-based vaccine to control the burden of *Escherichia coli* O157: H7 in feedlot cattle. Foodborne Pathog Dis. 2009;6(7):871-7. doi: [10.1089/fpd.2009.0290](https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0290) PMID: [19737063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19737063/)
11. Singh SP, Singh SR, Williams YU, Jones L, Abdullah T. Antigenic determinants of the OmpC porin from *Salmonella typhimurium*. Infec Immun. 1995;63(12):4600-5. doi: [10.1128/iai.63.12.4600-4605.1995](https://doi.org/10.1128/iai.63.12.4600-4605.1995) PMID: [7591112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7591112/)
12. Gil-Cruz C, Bobat S, Marshall JL, Kingsley RA, Ross EA, Henderson IR, et al. The porin OmpD from nontyphoidal *Salmonella* is a key target for a protective B1b cell antibody response. P Natl A Sci. 2009;106(24):9803-8. doi: [10.1073/pnas.0812431106](https://doi.org/10.1073/pnas.0812431106) PMID: [19487686](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19487686/)
13. Freeman Jr TC, Landry SJ, Wimley WC. The prediction and characterization of YshA, an unknown outer-membrane protein from *Salmonella typhimurium*. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2011;1808(1):287-97. doi: [10.1016/j.bbamem.2010.09.008](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.09.008) PMID: [20863811](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20863811/)
14. Yang Y, Wan C, Xu H, Wei H. Identification and characterization of OmpL as a potential vaccine candidate for immune-protection against salmonellosis in mice. Vaccine. 2013;31(28):2930-6. doi: [10.1016/j.vaccine.2013.04.044](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.04.044) PMID: [23643894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23643894/)
15. Bazgir M, Shams N, Forouharmehr A, Jaydari A, Nazifi N. Engineering a recombinant chimeric protein consisting of OmpL antigen conjugated to HBHA molecular adjuvant (HBHA-OmpL) with the aim of

- developing a vaccine against *Salmonella Typhimurium*. Vet Res Biol Produc. 2023;36(2):100-11. doi: [10.22092/vj.2022.359453.1995](https://doi.org/10.22092/vj.2022.359453.1995)
16. Solhan S, Chan PP, Kurupatham L, Foong BH, Ooi PL, James L, et al. An outbreak of gastroenteritis caused by *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* traced to cream cakes. Western Pac surveill response j WPSAR. 2011;2(1):23. doi: [10.5365/WPSAR.2010.1.1.001](https://doi.org/10.5365/WPSAR.2010.1.1.001) PMID: 23908880
 17. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. Curr Opin Biotechnol. 2002;13(2):117-23. doi: [10.1016/S0958-1669\(02\)00300-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00300-2) PMID: 11950561
 18. Hamid N, Jain S. Characterization of an outer membrane protein of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* that confers protection against typhoid. Clin. Vaccine Immunol. 2008;15(9):1461-71. doi: [10.1128/CVI.00093-08](https://doi.org/10.1128/CVI.00093-08) PMID: 18650399
 19. Chai T-j, Foulds J. Purification of protein A, an outer membrane component missing in *Escherichia coli* K-12 ompA mutants. Biochim Biophys Acta. 1977;493(1):210-5. doi: [10.1016/0005-2795\(77\)90274-4](https://doi.org/10.1016/0005-2795(77)90274-4) PMID: 328056
 20. Jahandar MH, Nasiri MR, Aslami Nezhad AA, Tahmoures Pour M. Cloning of InvG gene from *Salmonella Enterica* in the expression vector pET32a and evaluation of its expression in hosts *BL21-DE3*. Agric Biotechnol J. 2015;22;7(3):75-88. doi: [10.22103/jab.2015.1133](https://doi.org/10.22103/jab.2015.1133)
 21. Nazifi N, Tahmoorespur M, Sekhavati MH, Haghparast A, Behroozikhah MA. Engineering, cloning and expression of DNA sequence coding of OMP31 epitope of *Brucella melitensis* linked to IL-2 in *Escherichia coli*. Inte J Infect. 2018;5(3):e68974. doi: [10.5812/iji.68974](https://doi.org/10.5812/iji.68974)
 22. Bakhteyari H, Jahangiri R, Nazifi N, Kakanezhadifard A, Soleimani Z, Forouharmehr A, et al. Cloning and expression of Com1 and OmpH genes of *Coxiella burnetii* in periplasmic compartment of *Escherichia coli* with the aim of recombinant subunit vaccine production. Arch Razi Inst. 2019;74(4):341-7. doi: [10.22092/ari.2018.122911.1233](https://doi.org/10.22092/ari.2018.122911.1233) PMID: 31939250
 23. Naghavi M, Sekhavati MH, Tahmoorespur M, Nassiri M. Design and production of a novel recombinant chimeric IL2-Omp31 antigen against *Brucella* infection. Arch Razi Inst. 2018;73(3):199-206. doi: [10.22092/ari.2017.110504.1131](https://doi.org/10.22092/ari.2017.110504.1131) PMID: 30280839
 24. Mierendorf RC, Morris BB, Hammer B, Novy RE. Expression and purification of recombinant proteins using the pET system. Methods Mol Med. 1998;13:257-92. doi: [10.1385/0-89603-485-2:257](https://doi.org/10.1385/0-89603-485-2:257) PMID: 21390849
 25. Adeli Z, Farahani N, Mosavi SA, Mogarmoon M. Cloning and expression of flic as a vaccine candidate against typhoid. Studies Medical Science. 2016;27(8):683-91. URL: <http://umj.umsu.ac.ir/article-1-3346-en.html>.
 26. Verma SK, Gautam V, Balakrishna K, Kumar S. Overexpression, purification, and immunogenicity of recombinant porin proteins of *Salmonella enterica* Serovar *Typhi* (*S. Typhi*). J microbiol biotechnol. 2009;19(9):1034-40. doi: [10.4014/jmb.0812.675](https://doi.org/10.4014/jmb.0812.675) PMID: 19809263
 27. Pandey M, Saxena MK, Saxena A, Jha R, Rastogi SK, Kumar R. Cloning, expression and purification of the outer membrane protein28 of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* for subunit vaccine development-a short communication. Vet arh. 2018;88(4):559-68. doi: [10.24099/vet.arhiv.170526](https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.170526)
 28. Jha R, Kumar A, Saxena A, Tamuly S, Saxena MK. Cloning, sequencing and in silico analysis of Omp C of *Salmonella Typhimurium*. Int Sch Res Notices. 2012;2012(1):512848. doi: [10.5402/2012/512848](https://doi.org/10.5402/2012/512848)