

تعیین میزان ایمنی‌زایی واکسن ژنی دو گانه حامل ژن‌های پروتئین متصل شونده به پریپلاسم و پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی لایه خارجی بروسلا ملیتنسیس در موش‌های بालب - سی

چکیده:

مقدمه و هدف: بروسلا یک باکتری داخل سلولی اختیاری است که عامل بیماری بروسلوز بوده و می‌تواند در انسان و دام‌ها ایجاد عفونت نماید. سویه‌های تضعیف شده این باکتری نظیر بروسلا ملیتنسیس سویه Rev1 و بروسلا آپورتوس سویه‌های S19 و Rb51 هم‌اکنون به منظور پیشگیری از بروسلوز در دام‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما تا کنون واکسن مناسبی علیه بروسلا برای انسان شناخته نشده است. هدف از این تحقیق تعیین میزان ایمنی‌زایی واکسن ژنی دو گانه حامل؛ ژن‌های پلاسمید نوترکیب حامل ژن‌های مسئول سنتز پروتئین متصل شونده به پریپلاسم و پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی لایه خارجی بروسلا ملیتنسیس در موش‌های بालب - سی بود.

مواد و روش‌ها: این پژوهش یک مطالعه تجربی است که بر روی ۲۴ موش بालب - سی در تابستان سال ۱۳۸۶ در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، انجام گرفته است. به این منظور ابتدا با کلون‌سازی ژن‌های مسئول سنتز آنتی‌ژن‌های مذکور، پلاسمید نوترکیب به عنوان واکسن ژنی تهیه گردید و سپس، مقدار ۱۰۰ میکروگرم از آن در حجم ۰.۵ میکرولیتر به عضله ران ۱۲ سر موش بालب - سی تزریق گردید و از ۱۲ موش بालب - سی دیگر نیز به عنوان گروه شاهد استفاده شد که به آنها به صورت مشابه بافر فسفات‌نمکی تزریق گردید. این تزریقات در طی ۴ مرحله یعنی در روزهایی به فاصله ۱، ۱۵، ۷ و ۳۰ انجام شد و میزان پاسخ ایمنی حاصل علیه بروسلوز به روش الیزا بررسی گردید. برای آنالیز داده‌ها از آزمون تی و نرم‌افزار SPSS استفاده گردید.

یافته‌ها: تزریقات عضلانی این واکسن ژنی دوگانه موجب بروز ایمنی سلولی در موش‌های بालب - سی گردیده و نتایج اندازه‌گیری میزان سایتوکاین‌ها از طریق الیزا، نشان دهنده افزایش سطح اینترفرون گاما و تغییرات کم سطح اینترلوکین ۴- در موش‌های واکسینه شده در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: کاربرد توأم دو آنتی‌ژن پروتئین متصل شونده به پریپلاسم و پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی لایه خارجی بروسلا، قادر به ایجاد ایمنی حفاظتی بالایی علیه بروسلوز می‌باشد که استفاده از فیوژن پروتئین نوترکیب حاصل از بیان این ژن‌ها نیز می‌تواند در راستای بررسی ایمنی‌زایی علیه بروسلا در تحقیقات آینده مد نظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بروسلوز، واکسن ژنی، موش‌های بालب - سی

دکتر عباس دوستی *

دکتر غلامرضا جوادی **

دکتر سروش سرداری ***

دکتر محمدعلی شکرگزار ****

پوریا قاسمی دهکردی *****

* دکترای ژنتیک مولکولی، استادیار دانشگاه آزاد

اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران،

گروه زیست‌شناسی

** دکترای ژنتیک انسانی، دانشیار دانشگاه آزاد

اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران،

گروه زیست‌شناسی

*** دکترای بیوتکنولوژی دارویی، استادیار انستیتو

پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

**** دکترای بیوتکنولوژی پزشکی، استادیار انستیتو

پاستور ایران، بانک سلولی ایران

***** دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشگاه آزاد

اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

تاریخ وصول: ۱۳۸۶/۹/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۱۱/۱

مؤلف مسئول: دکتر عباس دوستی

پست الکترونیک: doostiirani@yahoo.com

مقدمه

بروسلاها باکتری‌های گرم منفی، بدون اسپور و غیر متحرک هستند که قادرند به صورت اختیاری و داخل سلولی زندگی کنند(۱). این باکتری اغلب به دستگاه رتیلولوآندوتلیال حمله کرده و استقرار ماکروفاژهای آلوده در مناطق به خصوصی از بدن نظیر؛ طحال، مغز، کبد و مغز استخوان موجب ایجاد عفونت موضعی می‌شود(۲).

بروسلوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که علاوه بر انسان طیف وسیعی از دام‌ها و نیز حیوانات وحشی را درگیر می‌کند. بیماری بروسلوز در کشورهای در حال توسعه، بومی می‌باشد و باعث زیان‌های فراوان در تولیدات دامی و سلامت جوامع انسانی می‌گردد. با توجه به خسارات ناشی از بروسلوز، کنترل و پیشگیری آن از اولویت ویژه‌ای برخوردار است. واکسیناسیون بهترین راه کنترل این بیماری است، ولی تا کنون هیچ گونه واکسن مؤثری علیه بروسلا برای انسان شناخته نشده است و واکسن‌های مورد استفاده در دام‌ها، برای انسان خطرناک می‌باشند(۳).

استفاده از واکسن‌های ژنی راهکار جدیدی جهت ایجاد ایمنی علیه بیماری‌هاست. استفاده از این تکنیک امروزه در حال گسترش است، چرا که واکسن‌های ژنی قادر به القای پاسخ ایمنی سلولی یا هومورال و یا هر دو می‌باشند(۴). امروزه از پلاسمیدهای حامل قطعات دی ان ای^(۱) خارجی به

عنوان ایمونوژن استفاده می‌شود(۵). در مدل‌های حیوانی مشاهده شده که واکسیناسیون به وسیله دی ان ای سبب ایجاد ایمنی علیه بسیاری از عوامل عفونی شده است (۶). برخی از ژن‌های مسئول آنتی‌ژن‌های بروسلائی نیز به عنوان واکسن ژنی به کار برده شده و در مدل‌های حیوانی ایمنی حفاظتی مؤثر علیه بروسلا به وجود آورده است(۷). آنتی‌ژن پروتئین متصل شونده به پریپلاسم^(۲) که در همه گونه‌های بروسلا موجود می‌باشد موجب تحریک سلول‌های تی^(۳) می‌شود(۸). همچنین پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی لایه خارجی^(۴) سبب القای پاسخ ایمنی هومورال می‌گردد(۹).

هدف از این تحقیق تعیین میزان ایمنی‌زایی واکسن ژنی دو گانه حامل ژن‌های پروتئین متصل شونده به پریپلاسم و پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی لایه خارجی بروسلا ملتینسیس در موش‌های بальب - سی است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی است که بر روی ۲۴ موش بальب - سی در تابستان سال ۱۳۸۶ در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، انجام گرفته است.

1-DNA
2-Priplasmic Binding Protein : P39
3-T-Cell
4-Outer Membrane Protein 31: Omp31

باکتری بروسلا ملیتنسیس سویه ۱۶ ام از موسسه رازی کرج دریافت شد و در محیط کشت اختصاصی بروسلا شامل؛ محیط بروسلا آگار کشت داده شد. از باکتری‌های رشد یافته با استفاده از روش استاندارد فنل - کلروفرم، استخراج دی ان ای صورت پذیرفت و کیفیت دی ان ای تخلیص شده، پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز روی دی ان ای مذکور انجام شد و ژن‌های مسئول سنتز هر یک از آنتی‌ژن‌های پروتئین متصل شونده به پرپلاسما و پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی لایه خارجی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این دو ژن تکثیر گردیدند (۸ و ۱). محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به روش همسانه‌سازی تی/ای^(۱) با استفاده از کیت شرکت اینویترژن^(۲) و بر اساس دستورالعمل این کیت، کلون شدند. سپس ژن‌های مذکور در پلاسمید pcDNA3 که قادر به بیان ژن در سلول‌های یوکاریوت می‌باشد، در کنار هم کلون شدند. به منظور تأیید ساختار حاصل که شامل وکتور pcDNA3 حامل ژن‌های مسئول سنتز دو آنتی‌ژن پروتئین متصل شونده به پرپلاسما و پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی لایه خارجی می‌باشد، از روش هضم برشی به وسیله آنزیم‌های محدودالثر بهره گرفته شد و برای تأیید نهایی، ساختار حاصل تعیین توالی گردید. به منظور بررسی ایمنی‌زایی پلاسمید نو ترکیب حاصل، مقدار ۱۰۰ میکروگرم از آن در حجم ۵۰ میکرولیتر به عضله ران ۱۲ سر موش بальب - سی تزریق گردید و این

تزریقات در طی ۴ مرحله یعنی در روزهایی به فاصله ۱، ۷، ۱۵ و ۳۰ انجام شد. به عنوان شاهد، از ۱۲ سر موش بальب - سی دیگر که به جای واکسن ژنی به آنها ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات‌ه نمکی تزریق گردید، استفاده شد. به منظور تعیین سطح ایمنی ایجاد شده علیه بروسلا ملیتنسیس، مطابق کارهای صورت گرفته به وسیله دیگر محققین میزان اینترفرون گاما^(۳) و اینترلوکین -۴^(۴) به روش الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۰ و ۸). جهت بررسی میزان اینترفرون گاما و اینترلوکین -۴، پس از تشریح موش‌های بальب - سی مورد آزمایش در شرایط کاملاً استریل، استخراج طحال صورت پذیرفت و از محتویات داخل طحال سوسپانسیون سلولی تهیه گردید. نمونه‌های به دست آمده با استفاده از محیط کشت کامل ار پی ام آی ۱۶۴۰^(۵) رقیق شده و در پلیت‌های کشت سلول ۲۴ چاهکی پلی استیرنی ته صاف در حضور یا عدم حضور فیتوهم‌گلوتینین^(۶) به میزان ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، باکتری کشته شده بروسلا ملیتنسیس به تعداد 1×10^2 باکتری در هر میلی‌لیتر و یا بدون افزودن هیچ‌گونه آنتی‌ژنی در شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سوپ کشت‌های سلولی بعد از گذشت ۷۲ ساعت جمع‌آوری و تا زمان انجام

1-T/A Cloning
2-Invitrogen
3-IFN-g
4-IL-4
5-RPMI1640
6-PHA

تست الایزا در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از کیت‌های الایزای شرکت بیندرمد سیستم^(۱) جهت اندازه‌گیری میزان تغییرات اینترفرون گاما، اینترلوکین - ۴ و ایمونوگلوبولین جی^(۲) مطابق دستورالعمل کیت، استفاده شد. به منظور مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تی^(۳) استفاده شد و اختلافات بیشتر از ۹۵ درصد دامنه اطمینان در تمام آزمایش‌ها با مقدار $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS^(۴) استفاده گردید.

یافته‌ها

استخراج دی ان ای ژنومی از بروسلا ملیتسیس با موفقیت انجام شد و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با پرایمرهای اختصاصی هر یک از دو ژن فوق‌الذکر موجب تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۲۰۴ جفت باز برای ژن مسئول سنتز آنتی‌ژن ژن پروتئین متصل شونده به پریپلاسما و قطعه تکثیر شده دیگری به طول ۷۲۰ جفت باز برای ژن کدکننده پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی لایه خارجی گردید که شامل؛ توالی کامل هر یک از این ژن‌ها می‌باشد. تست‌های تأییدی به کار رفته در خصوص صحت همسانه‌سازی ژن‌ها، مؤید تولید وکتور نوترکیب pCDNA3 حامل ژن‌های مسئول سنتز دو آنتی‌ژن پروتئین متصل شونده به پریپلاسما و پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی لایه خارجی می‌باشد. بررسی تأثیر اختلاف در الگوی ترشح سایتوکاینی در پاسخ ایمنی سلولی بین گروه واکسینه

شده و گروه شاهد، نشان دهنده نتایج زیر در مقادیر تولید اختصاصی (تحریک آنتی‌ژنی) و غیر اختصاصی (تحریک میتوژنی) اینترفرون گاما و اینترلوکین - ۴ می‌باشد.

نمودار ۱ نتایج تولید اینترفرون گاما را نشان می‌دهد. مقایسه میزان اینترفرون گاما در گروه موش‌های واکسینه شده و گروه شاهد، بر حسب تحریک غیر اختصاصی با میتوژن فیتوهمگلوتینین یا تحریک اختصاصی با باکتری‌های کشته شده بروسلا ملیتسیس نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با $p < 0.05$ می‌باشد. فیتوهمگلوتینین باعث تولید مقادیر زیاد اینترفرون گاما در تمامی گروه‌ها گردید. اعضای گروه شاهد نیز نسبت به فیتوهمگلوتینین پاسخ داده و میانگین تولید اینترفرون گاما در آنها نسبتاً بالا است. تحریک آنتی‌ژنی که به وسیله باکتری‌های کشته شده صورت گرفته، باعث افزایش تولید اینترفرون گاما در موش‌های واکسینه شده با واکسن ژنی به کار رفته در این تحقیق شده، در حالی که تولید این سایتوکاین در گروه شاهد تفاوت معنی‌داری از لحاظ مقدار با گروه واکسینه شده نشان داد. مقایسه میزان اینترفرون گاما در گروه موش‌های واکسینه شده و گروه شاهد، بر حسب تحریک غیر اختصاصی با میتوژن فیتوهمگلوتینین یا تحریک اختصاصی با باکتری‌های

1-Bendermed System

2-IgG

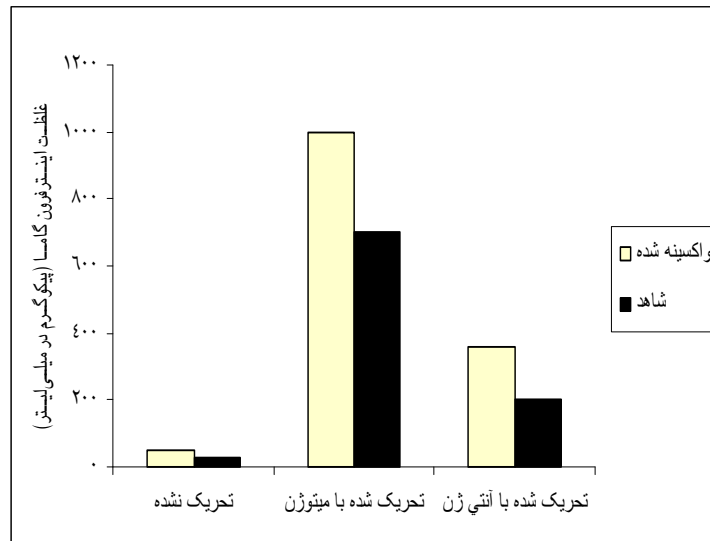
3-T test

4-Statistical Package for Social Sciences

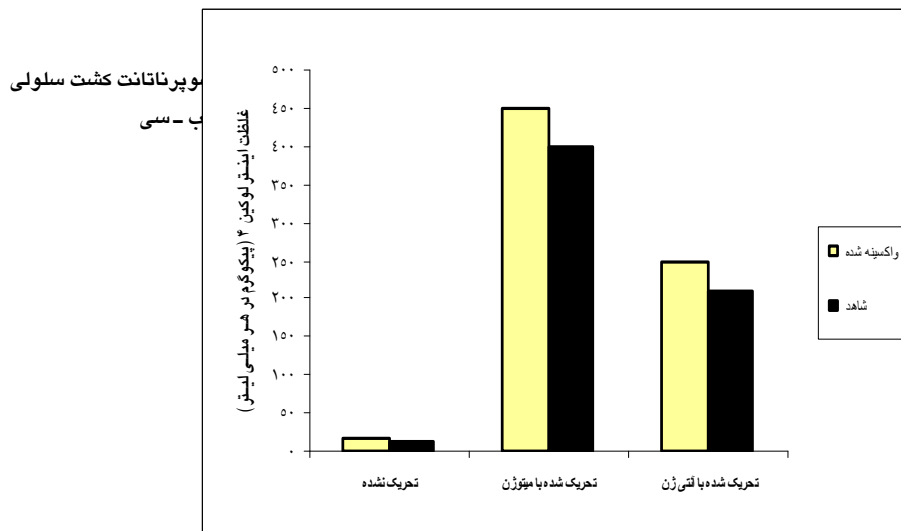
دیگر تحریک غیر اختصاصی با میتوزن فیتوهماگلوٲینین یا تحریک اختصاصی با آنتی‌ژن اختلاف زیادی بین گروه موش‌های واکسینه شده و گروه شاهد نشان نمی‌دهد (نمودار ۲).

کشته شده بروسلا ملیتنسیس نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با $p < 0/05$ می‌باشد.

بر خلاف نتایج به دست آمده برای اینترفرون گاما، تولید اینترفرون γ در گروه واکسینه شده و گروه شاهد تفاوت چشمگیری نداشته و به عبارت



نمودار ۱: تولید اینترفرون گاما در سوپ کشت سلولی طحال موش‌های بالب - سی



بحث و نتیجه گیری

گونه‌های بروسلا معمولاً در سلول‌های رتیکولو آندوتلیال تکثیر می‌یابند و پیدایش ایمنی بستگی به پاسخ مناسب سلول‌های میزبان و تولید سایتوکاین‌هایی نظیر اینترفرون گاما دارد (۱۲ و ۱۱). دستیابی به واکسنی جدید و کارآمد علیه بروسلا به عنوان یک نیاز جدی مطرح است، زیرا واکسن‌های زنده مورد استفاده حداقل دارای سه اشکال عمده هستند. اولاً، این گونه واکسن‌ها سبب ایجاد بیماری در حیوانات باردار می‌گردند. ثانیاً، برای انسان خطرناک هستند و ثالثاً، تشخیص وجود عامل بیماری‌زا در حیوان واکسینه شده دشوار می‌گردد (۱۳). ایجاد ایمنی به وسیله واکسن‌های ژنی به عنوان راهکاری جدید جهت پیشگیری از بیماری‌های عفونی مطرح است. برخی مطالعات نشان می‌دهد، استفاده مستقیم از قطعات دی ان ای جهت ایمن‌سازی، سبب القای پاسخ ایمنی سلولی یا هومورال می‌گردد (۴). هدف از این تحقیق تعیین میزان ایمنی‌زایی واکسن ژنی دو گانه حامل ژن‌های پروتئین متصل شونده به پریپلاسم و پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی لایه خارجی بروسلا ملیتسنیس در موش‌های بلب - سی است.

آنتی‌ژن پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی لایه خارجی به وسیله کاساتارو به کار برده شد و موجب ایجاد ایمنی حفاظتی بالایی علیه بروسلا شده است. همچنین ایمنی‌زایی آنتی‌ژن پروتئین متصل شونده به پریپلاسم نیز در تحقیقات گذشته به اثبات رسیده است. در این مطالعه استفاده همزمان از این دو آنتی‌ژن به عنوان

واکسن ژنی، موجب تولید مقادیر زیادی اینترفرون گاما گردید که در بروز ایمنی علیه بروسلا مؤثر است و با مدل واکسن ژنی به کار رفته به وسیله لئو و همکاران^(۱) (۲۰۰۶) مطابقت دارد (۱۳).

تا کنون چندین واکسن ژنی علیه بروسلا ارزیابی گردیده است. کورار و اسپلیتر^(۲) (۱۹۹۷) مدلی از واکسن‌های ژنی شامل پلاسمید pCDNA3 که حامل ژن‌های مسئول سنتز پروتئین‌های ریبوزومی بروسلا بود ارائه دادند (۱۴). همچنین المریری و همکاران^(۳) (۲۰۰۱) واکسن ژنی بر اساس آنتی‌ژن پروتئین متصل شونده به پریپلاسم را آزمایش نمودند و آن را به عنوان یک عامل القاگر پاسخ ایمنی علیه بروسلا مطرح نمودند (۱۰). کاساتارو و همکاران^(۴) (۲۰۰۵) از ژن مسئول سنتز پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی لایه خارجی برای ایمن‌سازی موش‌های بلب - سی علیه بروسلا استفاده نمودند و ایمنی مؤثری علیه این عامل عفونی به دست آوردند (۱). نتایج تحقیق حاضر با نتایج حاصل از تحقیقات فوق مطابقت دارد. لئو و همکاران^(۱) (۲۰۰۶) یک واکسن ژنی دوگانه شامل؛ آنتی‌ژن پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی لایه خارجی و ژن مسئول سنتز پروتئین‌های ریبوزومی کلون شده در پلاسمید pCDNA3 در مدل حیوانی به کار بردند که بررسی ایمنی حاصل علیه بروسلا، نشان دهنده پدید آمدن ایمنی مناسب علیه بروسلا بود. به طور کلی

1-Luo et al
2-Kurar & Splitter
3-Al-Mariri et al
4-Cassataro et al

بیشتر فرم‌های واکسن‌های ژنی به کار گرفته شده علیه بروسلا در مدل‌های حیوانی کوچک نتایج مطلوبی در پی داشته است (۱۳).

در مجموع نتایج نشان می‌دهد واکسن‌های ژنی توان ایجاد پاسخ ایمنی سلولی مؤثر علیه بروسلا را دارند و در صورتی که از آنتی‌ژن‌های متعدد بروسلائی در کنار هم و به صورت دوگانه یا چندگانه بهره گرفته شود، نوید بخش دستیابی به واکسنی مناسب و کاربردی علیه بیماری مهلک بروسلون خواهد بود. همچنین پیشنهاد می‌گردد، از پروتئین‌های نوترکیب حاصل از بیان این دو ژن که به صورت فیوژن پروتئین خواهد بود نیز در راستای بررسی ایمنی‌زایی علیه بروسلا استفاده شود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات کارکنان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و مساعدت حوزه معاونت پژوهشی این واحد و همچنین از راهنمایی‌های ارزنده اساتید محترم گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران کمال تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

Evaluation of Immunogenicity of Divalent DNA Vaccine Encoding *Brucella melitensis* Omp31 and P39 Genes in Balb/c Mice

Doosti A^{*},
Javadi GR^{**},
Sardari S^{***},
Shokrgozar MA^{****},
Ghassemi-Dehkordi P^{*****}.

^{*} Assistant of Molecular Genetic, Department of Biology, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran

^{**} Professor of Human Genetic, Department of Biology, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran

^{***} Assistant Professor of Drug Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute, Tehran, Iran

^{****} Assistant Professor of Medical Biotechnology, National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute, Tehran, Iran

^{*****} DVM Student, Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

KEYWORDS:
Brucellosis,
DNA Vaccine,
Balb/c Mice

Received: 15/9/1386

Accepted: 1/11/1386

Corresponding Author: Doosti A
E-mail: doostiiranii@yahoo.com

ABSTRACT:

Introduction & Objective: *Brucella* is a facultative intracellular pathogen and one of the etiologic agents of brucellosis that can infect humans and domestic animals. Attenuated strains such as *B. melitensis* Rve1 and *B. abortus* S19 and Rb51 are being used to control brucellosis in domestic animals. However, no safe and effective vaccine is available for human use. This study was designed to evaluate the immunogenicity and the protective efficacy of a divalent fusion DNA vaccine encoding both the *B. melitensis* Omp31 protein and P39 protein, designated pCDNA3 recombinant vector.

Materials & Methods: This experimental study was performed in Biotechnology Research Center of Islamic Azad University, Shahrekord branch in summer, 1386. Construction of pCDNA3 recombinant vector containing Omp31 and P39 genes of *B. melitensis* was completed. Then, 12 Balb/c mice were immunized intramuscularly with 100 mg per 50 micro liters of this DNA vaccine. Control mice, 12 Balb/c mice, were simultaneously injected with PBS. During the 1st, 7th, 15th and 30th days the mice received the injections. Afterwards, the ELISA cytokine assay was performed and data were analyzed by SPSS software.

Results: Intramuscular injection of the divalent DNA vaccine elicited cellular immune responses in Balb/c mice. The ELISA cytokine assay with serum of vaccinated mice showed high level of IFN- γ and low changes of IL-4 in compare with control mice.

Conclusion: Use of divalent genetic vaccine based on the Omp31 and P39 genes can elicit a strong cellular immune response against Brucellosis.

REFERENCES:

1. Cassataro J, Velikovsky CA, De La Barrera S, Estein SM, Bruno L, Bowden R, et al. A DNA vaccine coding for the brucella outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infect Immun* 2005; 73(10): 6537 - 46.
2. Fernands Lago L, Rodriguz-tarazona R, Vizcaino N. Differential secretion of interleukin-12 (IL-12) subunit and heterodimeric IL-12p70 protein by DC-1 mice and murine macrophage in response to intracellular infection by brucella abortus. *J Med Microbiol* 1999; 48: 1065-73.
3. Yang X, Becker T, Walters N, Pascual DW. Deletion of znu A virulence factor attenuates brucella abortus and confers protection against wild-type challenge infect. *Immun* 2006; 74(7): 3874 - 9.
4. Srivastava IK, Liu MA. Gene vaccines. *Ann Intern Med* 2003; 138: 550-9.
5. Liu MA. DNA vaccines: a review. *J Int Med* 2003; 253:402-10.
6. Donnelly JJ, Ulmer JB. DNA vaccines for viral diseases. *Brazilian Journal for Medical and Biol Research* 1999; 32: 215-22.
7. Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 2002; 90: 479-96.
8. De-yan L, Peng L, Li X, Guang-yu Z, Wei S, Song-le Z, Xi-liang W. DNA vaccine encoding L7/L12-P39 of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Chin Med J* 2006; 119(4): 331-4.
9. Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1): 65-78.
10. Al-Mariri, A, Tibor A, Mertens P, DeBolle X, Michel P, Godfroid J, Walravens K, Letesson J. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infect Immun* 2001; 69:6264-70.
11. Hoover DL, Crawford RM, Van De Verg LL, Izadi MJ, Bhattacharjee AK, Parnavitana CM, et al. Protection of mice against brucellosis by vaccination with brucella melitensis WR201 (16M A Pur EK). *Infect Immun* 1999; 67: 5877-84.
12. Pasqual P, Adone R, Gasbarre LC, Pistoia C, Ciuchini F. Mouse cytokine profile associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. *Infect Immun* 2001; 69: 6541-4.
13. Luo D, Ni B, Li P, Shi W, Zhang S, Han Y, et al. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and omp16 genes of brucella abortus in BALB/c mice. *Infect Immun* 2006; 74(5): 2734 - 41.
14. Kurar E, Splitter GA. Nucleic acid vaccination of brucella abortus ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. *Vaccine* 1997; 15:1851-7.