

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
имени В.М. Горбатова»

РЕФЕРАТ

по иностранному языку

**Тема: «Создание вакцины из штамма *Lactococcus lactis* с
использованием вирулентного аэролизин - гена *Aeromonas hydrophila*
(перевод статьи)»**

Аспирант:

Еремцова Анжелика Александровна

Научный руководитель:

к.т.н., доцент

Минаев Михаил Юрьевич

Преподаватель:

уч. звание, уч. степень д.п.н., проф.

Ф.И.О. Полушина Л.Н.

Москва, 2015

Содержание:

Конспект, ключевые слова	3
Введение	4
1. Материалы и методы. Бактериальные штаммы, плазмиды, праймеры и среды роста.	6
2. Выделение ДНК и постановка ПЦР	8
3. Клонинг и трансформация интересующих генов в грамм-положительный микроорганизм <i>L. lactis</i> NZ9000	11
4. Обсуждения	13
5. Список литературы	15

В этом исследовании были разработаны форвард и реверс праймеры на участки (примерно 250-650) базовых пар, кодирующих последовательность 1 и 4 участков гена аэролизина *Aeromonas hydrophila*. Эти два участка задействованы в патогенезе аэролизин-гена. Последовательности двух ферментов рестрикции *Pst* I and *Hind* III были включены в форвард и реверс праймеры соответственно. Эти сайты были использованы, потому что они не присутствуют в интересующих генах, но представлены в нескольких сайтах клонирования плазмиды pNZ8048. Амплифицированный ПЦР-продукт анализировали электрофорезом в 1%-агарозном геле и результат оказался высокоспецифичным. По сравнению с ДНК-маркером, размер ПЦР-продукта был определен примерно в 250-650 базовых пар. ПЦР-продукт был очищен с помощью набора для очистки ДНК, расщеплен ферментами рестрикции и лигирован с линеаризированной плазмидой pNZ8048 с помощью лигазы T4. Трансформацию *Lactococcus lactis* NZ9000 выполняли методом электропорации. Проверка клонирования вирулентных генов выполняли с помощью RE-digestion и ДНК-сиквенса. Поскольку некоторые антигены (бактериальные и вирусные) и цитокины эффективно продуцировались *L. lactis*, производство, экспрессия и использование рекомбинантного *L. lactis* с вирулентным участком гена аэролизина *Aeromonas hydrophila* может вырабатывать антитела в рыбе против этого патогена.

Ключевые слова: аэролизин, *Aeromonas hydrophila*, *Lactococcus lactis*, живые вакцины.

Введение

Аэромонас гидрофила часто ассоциируется с болезнями у карпа, угря, молочной рыбы, канального сома, форели, тилапии, аю и других животных. Эта бактерия вызывает высокую смертность и большие экономические потери в пресноводных рыбных хозяйствах всего мира. Многие внеклеточные продукты, связанные с этой бактерией вместе с цитотоксинами, гемолизинами (аэролизин) и протеазами являются наиболее важными. Среди них аэролизин-ген наиболее распространенный вирулентный ген и встречается практически во всех штаммах аэромонас. Антибактериальная терапия аэромонас имеет некоторые недостатки, такие как увеличение плазмид-кодирующей антибиотической устойчивости и задержка реализации рыбы из-за необходимости очищения ее от антибиотиков до потребления человеком. Кроме того, лечение антибиотиками непомерно на многих фермах неразвитых и развивающихся стран. Поскольку многие исследования показали, что вакцинные препараты могут обеспечивать защиту, иммунная профилактика против *A. Hydrophila* является привлекательным вариантом. Антигенное разнообразие аэромонас гидрофила затруднило производство вакцины для защиты, и в настоящее время, нет экономически доступной вакцины против аэромонас гидрофила. В этой ситуации, поиск общих защитных антигенов *A. hydrophila* становится критическим для разработки общей вакцины против этой бактерии. Одними из кандидатов консервативных антигенов могут являться внеклеточные продукты бактерии, участвующие в патогенезе рыбы. Это можно предотвратить блокированием бактериальных антигенов (вирулентных генов) в рыбе с антителами против аэролизина аэромонас гидрофила. Бактериальные системы на основе живых векторов для доставки гетерологичных антигенов предлагают ряд преимуществ в качестве стратегии вакцинации. Использование молекулярной биологии, генетики и техники рекомбинантной ДНК, позволило вставку кодирующих антигенов ,

которые будут доставлены в непатогенные носители для экспрессии. *Lactococcus Lactis* является одним из молочнокислых бактерий (LAB), которые являются грам-положительных и обозначается в целом безопасными (GRAS) организмами. Они не являются патогенными, неинвазивный, не колонизаторской и они не представляют никакой угрозы для здоровья человека и животных. Они также имеют способность к секреции белков, обеспечивающих экспрессию поверхности или внеклеточного гетерологичных ферментов или белков. Разработки в области генной инженерии дали эти грамположительные молочнокислые бактерии (LAB) преимущество для использования в качестве системы экспрессии хозяина для доставки антигена, чтобы индуцировать иммунный ответ. В этом исследовании, клонирование доменов 1 и 4 гена *aerolysin* из изолированного *A. hydrophila* проводили в *L. Lactis* бактерий впервые. Такие безопасные, пробиотические, генно-инженерные и живые рекомбинантные бактерии, несущие чужеродные вирулентные гены могут вызвать иммунный ответ против болезнетворных микроорганизмов в живых системах.

1. Материалы и методы. Бактериальные штаммы, плазмиды, праймеры и среды роста

Бактериальные клетки и плазмиды, используемые в данном исследовании приведены в таблице 1. *Aeromonas hydrophila* АНМР был выделен из зараженной рыбы и клетки выращивались на среде LB-бульон и LB-агар, затвердевающий с 1,2 % бактериологического агара (вес/объем) при 37°C. *Lactococcus lactis* NZ9000 (клетки-хозяины) and *L. lactis* pNZ8048 (содержащие в себе pNZ8048 экспрессионные плазмиды). Клетки выращивались на SGM17-бульоне и SGM17-агар, содержащий 0,5% глюкозы и 0,5М сахарозы при 30°C. Хлорамфеникол был использован в концентрации 7,5 мкг/мл. Праймеры для амплификации полной длины сегмент гена, кодирующего домены и 4 aerolysin *A. hydrophila* АНМР были обозначены в соответствии с опубликованной последовательностью (Rossjohn др., 1997, Wang и др и др., 2003). Последовательности для двух ферментов рестрикции, PstI и Hind III, были включены в форвард и реверс праймеры соответственно (таблица 2). Эти сайты ферментов рестрикции (REs) были использованы, потому что они не присутствуют в генах нас интересующих, но доступны в нескольких сайтах клонирования (MCS) плазмиды pNZ 8048.

Бактериальные штаммы и плазмиды	Особенности	Ссылки
Бактерии		
<i>L. lactis</i> NZ9000	MG1363 <i>pepN::nisRK</i>	Kuipers, 1998
<i>L. lactis</i> NZ8048	<i>L. lactis</i> NZ9000 клетки, включающие	Kuipers, 1998
	pNZ8048 вектор	
<i>A. hydrophila</i> АНМР	Выделен из зараженной рыбы	Sasan, 2007
Плазмиды		
pNZ 8048	Promoter: <i>nisA</i> , Antibiotic: Chlor., Expression	Kuipers, 1998
	Vector for <i>Lactococcus</i>	
pNZ 8048D1Aer	<i>L. lactis</i> плазмида, несущая домен 1	Текущая работа
	аэролизин-гена <i>A. hydrophila</i>	
pNZ 8048D4Aer	<i>L. lactis</i> плазмида, несущая домен 4	Текущая работа
	Аэролизин-гена <i>A. hydrophila</i>	

Праймеры	TM (°C)	Последовательности
D1AerF	60	5'- ATG <u>CTGCAG</u> AAATGATGAATAGAA TA
		ATTACCGC-3'
D1AerR	64	5'- ATGC <u>AAGCTT</u> GCCCCATAATCTCC CA
		GCGAT-3
D4AerF	64	5'- ATG <u>CTGCAG</u> AAAACTCGCCATCGA GA
		TCGCT-3'
D4AerR	60	5'- ATGC <u>AAGCTT</u> GTTATTGAACCGGA AC
		TATGGTC-3'

* Подчеркнутые линии: сайты эндонуклеаз рестрикции, CTGCAG; *Pst*I и AAGCTT; *Hind*III

2. Выделение ДНК и постановка ПЦР

Геномная ДНК *A. hydrophila* АНМР была выделена с использованием модифицированного мини способа получения (Ausbel др., 1987) с незначительной модификацией. ПЦР-амплификацию проводили с использованием пары праймеров: D1AerF (5'-GCT AT 3') и D1AerR (5'-GCA HA -3.) Для амплификации последовательности ДНК, ~ 250 п.н. кодирующие домен 1, пара праймеров: D4AerF (5'-GCT HA-3') и D4AerR (3-5'-GCA HA') для амплификации другой последовательности, ~ 650 п.н., кодирующий домен 4 гена –аэролизина от *A. hydrophila* АНМР (Таблица 2).

ПЦР-анализ проводили с использованием смеси ПЦР, содержащей 3 мкл ДНК-матрицы (100 нм). 2 мкл 10 мМ трифосфата дезоксинуклеозида (дNTP), 3 мкл раствора 25 мМ MgCl₂, 2 мкл 20 мМ раствора каждого праймера, 0,3 мкл Taq полимеразы (5U / мкл), 5 мкл 10-кратного ПЦР буфера и 32.70 мкл dH₂O воды, чтобы сделать окончательный объем 50 мкл. Программа амплификации состояла из 27 циклов при следующих условиях: начальная денатурация 5 мин при 95°C с последующими 27 циклами, каждый из 1 минуты при 95 °C, 1 минуты при 60° C и 1 мин при 72 °C и дополнительную заключительную элонгацию при 72° C в течение 10 минут. Наконец, 10 мкл ПЦР-продукта переносили на гель-электрофореза.

Очистка плазмид. Подготовка компетентных клеток *Lactococcus lactis*. Обработка рестриктазами и лигирование.

Плазмиды из pNZ8048 из *L. Lactis* pNZ 8048 и рекомбинантные плазмиды: pNZ8048D1Aer и pNZ8048D4Aer от трансформированных штаммов *L. Lactis* (таблица 1) были выделены в соответствии с методикой Leenhouts и Venema 1993 с небольшим изменением.

Подготовка компетентных клеток *L. Lactis* NZ 9000 проводилась в соответствии с опубликованным способом (Холо и Нес, 1989). 24 - часовые колонии *L. Lactis* NZ 9000 культивировали в SGM17 (M17 0,5 М сахарозы и 0,5% глюкозы) с добавлением 1,5% глицина и инкубировали при 30° С в течение 24 часов. Один мл ночной культуры был добавлен в 100 мл свежей среды SGM17 + 1,5% глицин, инкубировали при 30° С, в течение нескольких часов, пока OD 600 не достигло 0,3-0,6.

Затем клетки концентрировали центрифугированием при 3500 оборотах в минуту в течение 10 мин при 4° С и дважды промывали половиной объема ледяной смеси - 0,5 М сахарозы с 15% глицерина. Центрифугирование проводили снова, прежде чем клетки ресуспендировали в 1/200 объема культуры 0,5 М сахарозы с 15% глицерина. При подготовке компетентных клеток, очень важно, чтобы эти клетки поддерживали все время в условиях холода. Объем 40 мкл клеточной суспензии переносили в свежую пробирку 1,5 мл и хранили в - 80 ° С до использования для электро-преобразования (электропорации).

Смесь ферментов рестрикции включала 1 мкг ДНК субстрата (ПЦР-продукт или плазида), 2 мкл 10X RE реакционного буфера, 1 мкл фермента 1, 1 мкл фермента 2 и соответствующий объем стерильной воды, для доведения до общего объема 20 мкл. Реакционную смесь инкубировали при оптимальной температуре, 37 ° С в течение 3 часов. Лигирование двухцепочечной ДНК содержало 1 единицу T4 ДНК-лигазы (Fermentas), 2 мкл 10X буфера лигазы, 1000 нг векторной ДНК, 5-кратный избыток вставки и стерильной дистиллированной воды до конечного объема 20 мкл. Реакционную смесь инкубировали при 16 С° в течение 8 часов. Рекombинантные плазмиды были вырезаны из агарозного геля и очищены с помощью набора очистки от геля согласно протоколу.

Трансформация рекомбинантными плазмидами *Lactococcus lactis* NZ9000 и проверка.

Общий объем ночной лигазной смеси от 3 до 5 мкл был использован для трансформации компетентных клеток *Lactococcus lactis* NZ9000.

Различные рекомбинантные плазмиды *L.lactis* 8048, произведенные в этой работе (pNZ8048D1Aer и pNZ8048D4Aer), который несут в себе гены вирулентности *A. hydrophila* были преобразованы в *L. Lactis* NZ9000 согласно предлагаемому протоколу (Холо и Нес 1989 г.) с небольшим изменением. Объем 10 мкл смеси лигирования (около 1 мкг плазмидной ДНК) смешивали с 40 мкл аликвоты компетентных клеток.

Смесь переносили в охлажденную льдом кювету для электропорации (2 мм зазор между электродами) и подвергали воздействию одного электрического импульса на уровне 2,3 кВ (емкость 25 мкФ и сопротивление 200 Ω). Электрический импульс был доставлен с помощью системы электропорации BioRad, США Gene Pulser, оснащенной блоком управления импульса. Сразу же после разряда, электропорированные клетки смешивали с 960 мкл охлажденного льдом SGM17MC бульона (SGM17 + 20 mM MgCl₂ + 2 mM CaCl₂) и оставляли на льду в течение 10 минут.

Электропорированные клетки инкубировали при 30 ° C без встряхивания в течение 2-3 часов, для проявления фенотипической экспрессии. Объем 100 мкл клеток затем вносили на SGM17 агар, содержащей хлорамфеникол при конечной концентрации 7,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ и инкубировали на 30 ° в течение 2-3 дней. Несколько хорошо изолированных колоний субкультивировали на свежем SGM17 агаре, содержащем 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ хлорамфеникола. Трансформанты культивировали в бульоне SGM17 для выделения плазмиды и анализа. Проверку клонированных генов в *L.lactis* проводили с использованием анализа обработки ферментами рестрикции и секвенирования ДНК.

Праймеры были спроектированы в соответствии с опубликованными последовательностями (Ванг.,2003 г., Россджон., 1997 г.) для

амплификации двух участков, 1-го и 2-го гена аэролизина *Aeromonas hydrophila*, содержащие около 250 базовых пар и 650 базовых пар соответственно. Кроме того, специфические сайты PstI и Hind3 были помещены в форвард и реверс праймеры соответственно, для направленного клонирования в экспрессионный вектор *L. lactis*, pNZ8048. Амплифицированные ПЦР-продукты были анализированы с помощью 1%-агарозного гель-электрофореза и результаты показали, что амплификации прошли высоко специфично. В сравнении с ДНК-маркерами, размеры амплифицированных ПЦР-продуктов были определены в примерно 250 и 650 базовых пар соответственно. Эти группы, примерно 250 и 650 базовых пар (рис. 1 линии 1,2,3), полностью совпадали с ожидаемыми значениями. Специфические группы соответствующие ожидаемым размерам указали, что праймеры для амплификации участков 1 и 4 аэролизин гена имеют высокую эффективность и специфичность.

3. Клонинг и трансформация интересующих генов в грамм-положительный микроорганизм *L. lactis* NZ9000

Амплифицированные ДНК-группы, представляющие интерес, были вырезаны из геля на участках в 250 и 650 базовых пар. Эти ПЦР-продукты были очищены с использованием набора для очистки ДНК, переварены с ферментами рестрикции и лигированы с линейаризованной плазмидой pNZ8048 используя T4 ДНК-лигазу. Трансформация клеток *L. lactis* NZ9000 была проведена в соответствии с протоколом Holo и Nes (1989). Рисунок 2 показывает карты клонирования участка 1 аэролизин-гена в pNZ8048 вектор, который D1Aer является участком 1 аэролизин гена, содержащий от 211 до 433 базовых пар и включающий Pst I с Hind3 RE-сайтом. Аналогично, рисунок 3 показывает карты клонирования участка 4 аэролизин-гена содержащего от 211 до 855 базовых пар. Карты были сделаны с помощью компьютерной программы Clone Manager. От десяти до пятнадцати хорошо выросших колоний каждого трансформированного

типа клеток были отобраны и подвержены плазмидному анализу. Рисунок 4 показывает анализ рестрикции как рекомбинантных так и нерекомбинантных рNZ8048 плазмид. Проверка клонирования вирулентного гена была проведена с помощью рестрикции и Днк-сиквенса. Рисунок 4 показывает схему рестрикции и рекомбинантных и нерекомбинантных плазмид. Линия 1 это рекомбинантная рNZ8048D4Aer со свободной рестрикцией. Линия 3- не рекомбинантная плазида со свободной рестрикцией. На двойной рестрикции трансформанта рNZ8048D4Aer с Pst 1 с Hind3, молекулярный вес примерно 3340 базовых пар и 650 базовых пар были показаны гель электрофорезом. Эти размеры коррелируют в пределах ошибки и ожидаемых данных. Поэтому, размер и ориентация предполагаемого клона были получены в соответствии с предполагаемым рекомбинантом, подтверждающим наличие участка 4 аэролизин гена *Aeromonas hydrophyla* АНМР вставка в рNZ8048 экспрессионный вектор. Аналогично. Двойная рестрикция линии 7 показывает клонирование и наличие участка 1 аэролизин гена *Aeromonas hydrophyla* АНМР вставка в рNZ8048 экспрессионный вектор. Дальнейшая проверка проводилась с помощью ДНК сиквенса используя праймеры на интересующие гены. Анализ участков показал 97% совпадение между участками 1 и 4 аэролизин гена с опубликованными данными соответственно (Sasan 2007).

4. Обсуждения

В данном исследовании были сконструированы праймеры на участки 1 и 4 аэролизин гена *Aeromonas hydrophyla* и ПЦР анализ показал их высокую специфичность. Интересующие гены были клонированы в вектор рNZ8048 , экспрессионный вектор *L. lactis* и впервые с использованием метода электропорации. Проверка клонирования была осуществлена рестрикционным методом и секвенированием. Аэролизин – это широкоизвестный и пороформирующий белковый токсин и главный вирулентный фактор который был впервые выделен из грамм-

отрицательного патогенна. *A. hydrophila* – бактерия, способная поражать клеточные цели, формируя каналы в их мембранах. Также сообщали, что некоторые участки аэролизин белка, особенно участки 1 и 4, выполняют главную роль в его патогенности. Кроме того, результаты показали, что молекула токсина имеет гемолитическую, цитотоксическую и энтеротоксинную активности. Кроме того, недавние исследования показали, что аэролизин способен нейтрализовать человеческий вирус иммунодефицита типа 1 в дозе, зависящей от присутствия белка типа 1 на оболочке вируса. Более того, было показано, что мутантный штамм *A. hydrophila* дефицитный в выработке аэролизина и менее вирулентный, чем дикий штамм. Кроме этого, специфичные нейтрализующие антитела к аэролизину были обнаружены у выживших после инфекции животных.

Молочнокислая бактерия включает большое количество грамм-положительных коков и бацилл, принадлежащих филогенетически разным генным группам. Их традиционное использование в пищевой промышленности подтверждает у них отсутствие патогенности; они считаются полностью рассматриваемыми как безопасные микроорганизмы (GRAS). Эта группа бактерий имеет ряд преимуществ, таких как производство различных белков в биореакторах, в ферментированной пищевой продукции или непосредственно в пищеварительном тракте человека и различных животных. Кроме таких природных преимуществ, есть новое применение для молочнокислых микроорганизмов, и возможно более перспективное, это их использование в качестве живой доставки векторов для антигенов и доставки терапевтических белков к слизистым поверхностям. Некоторые инженерные штаммы молочнокислых микроорганизмов способны вызывать как слизистые так и систематические иммунные ответы. Некоторые исследования показали и подтвердили эффективность *L. lactis* в представлении антигена слизистой иммунной системы вызывать специфичный ответ. Интересно, несколько гомологичных и гетерологичных генов, несколько

антигенов(бактериальных и вирусных) и цитокинов имеют успешную экспрессию в *L. lactis*. Некоторые из них включают несколько лизоцим-генов, нейтральную протеазу *B. Subtilis*, белковые фрагменты столбнячного токсина, генов *E. Coli* и т .д. Растет число исследований, делающих вывод о роли МКБ в рыбных инфекциях, в о время как вакцинация еще используется не в полном объеме. Одними из наиболее перспективных и актуальных применений МКБ исследовать их использование как пробиотиков против бактерий так и источниками иммуностимуляции. Потенциал *L. lactis* как вакцинного вектора был показан в нескольких недавних публикациях, таких как вакцина на основе *L. lactis* против *Brucella abortus* *Helicobacter pylori*. Поэтому данный микроорганизм находит широкое применение в производстве разных терапевтических белков. Это уже используется как средство передвижения(доставка) для вакцинации против столбняка, вирусов и в последнее время, для лечения мышинного колита. Для этого, производство таких генно-инженерных безопасных микроорганизмов которые сделаны в текущей работе, могут стать результатом защиты живого от патогенов. Будущая работа будет включать изучение иммунологического ответа рыб и введение нескольких эпитопов вакцины.

Авторы статьи:

1. Foo Hai Ling;
2. Hassan Mohd Davoud;
3. Raha Abd Rahim;
4. Sasan, H;
5. Son Radu.

Construction of vaccine from *Lactococcus lactis* bacteria using *Aeromonas hydrophila* virulent Aerolysin gene

Sasan, H.^{1*}; Raha Abd Rahim²; Foo Hai Ling²; Son Radu³;
Hassan Mohd Davoud⁴

Received: July 2009

Accepted: March 2010

Abstract

In this study the forward and reverse primers were designated to amplify the segments (~250 bps and ~650 bps) of the gene coding domains 1 and 4 of aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. These two domains are involved in pathogenesis of the aerolysin gene. Sequences for two restriction enzymes, *Pst* I and *Hind* III, were included in the forward and reverse primers respectively. These restriction enzyme sites were used because they are not present within the genes of interest but are available in the multiple cloning sites of plasmid pNZ8048. Amplified PCR products were analyzed with 1% agarose gel electrophoresis and results showed that amplifications were very specific. In comparison with the DNA marker, the sizes of the amplified PCR products were determined to be approximately ~250 bps and ~650 bps respectively. PCR products were then purified by the DNA purification kit, digested with REs and ligated with linearised pNZ8048 plasmid using T4 DNA ligase. Transformation of *Lactococcus lactis* NZ9000 cells was performed by the electroporation method. Verification for cloning of virulent genes was performed by REs digestion and also DNA sequencing. Since several antigens (bacterial and viral) and cytokines have been efficiently produced in *L. lactis*, constructing and expression and utilization of recombinant *L. lactis* harboring the aerolysin domains (virulent) genes from *A. hydrophila* may induce production of antibodies in fish against this pathogen.

Keywords: Aerolysin, *Aeromonas hydrophila*, *Lactococcus lactis*, Live vaccines

1-Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. 2-Department of Molecular Biology, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University Putra Malaysia, Serdang, 43400, Malaysia.

3-Faculty of Food Sciences and Biotechnology, University Putra Malaysia, Serdang, 43400, Malaysia. 4-Faculty of Veterinary, University Putra Malaysia, Serdang, Selangor, 43400, Malaysia.

*Corresponding author's email: Hosali_s@yahoo.com

Introduction

Aeromonas hydrophila is frequently associated with disease in carp, eels, milkfish, channel catfish, tilapia, trout, ayu and a few other animals. This bacterium causes high mortality and great economic losses in freshwater fish farming worldwide. Many of the extracellular products (ECPs) are related to the virulence of this bacterium with cytotoxins, haemolysins (aerolysin) and proteases being the most important. Among them aerolysin is the most common virulence gene in almost all *A. hydrophila* strains. Antibiotic treatment of *A. hydrophila* has some disadvantages such as increase in plasmid-encoding antibiotic resistance and delay in fish sales as they need to be clear of the antibiotics before human consumption. In addition, antibiotic treatment is cost-prohibitive to farmers of many undeveloped and developing countries (Rahman et al., 1997; Vijai et al., 2009; Sasan 2010).

Since several studies have shown that different vaccine formulations may provide protection, the immune prophylaxis against *A. hydrophila* becomes an attractive option. The antigenic diversity of *A. hydrophila* has posed a great difficulty in developing a vaccine, and at present, no vaccine for protection against *A. hydrophila* is commercially available. In this situation, the search for common protective antigens of *A. hydrophila* becomes critical for developing a common vaccine against this bacterium (Leung et al., 1997, 1998). One of the potential candidates of conserved antigens would be some extracellular

products of this bacterium involved in the pathogenicity to fish. It may be possible to prevent *A. hydrophila* infection by blocking bacterial antigens (virulence genes) into fish with antibodies against aerolysin of *A. hydrophila* (Vaughan et al., 1993; Zhu et al., 2007).

Bacterial-based systems as live vectors for the delivery of heterologous antigens offer a number of advantages as a vaccination strategy. Using molecular biology, genetics and recombinant DNA techniques has allowed the insertion of genes encoding the antigens to be delivered into non-pathogenic carrier for expression (Liljeqvist and Stahle, 1999; Lee et al., 2001). *Lactococcus lactis* is among the Lactic Acid Bacteria (LAB) that are Gram-positive and designated Generally Recognized as Safe (GRAS) organisms. They are non-pathogenic, non-invasive, non-colonising and they bare no threat to human and animal health (Wells et al., 1993; Raha et al., 2005). They also have the capacity to secrete proteins allowing surface expression or extracellular production of heterologous enzymes or proteins. Developments in genetic engineering have given these Gram-positive Lactic Acid Bacteria (LAB) the advantage to be used as a host expression system for antigen delivery to induce immune responses (Robinson et al., 1997; Naima et al., 2007).

In this study, cloning of domains 1 and 4 of aerolysin gene from isolated *A. hydrophila* was carried out into *L. lactis* bacteria for the first time. Such safe, probiotic, genetically engineered and live recombinant bacteria harboring the foreign virulent genes may induce immune responses against pathogens in living things.

Materials and methods

Bacterial Strains, Plasmids, Primers, and Growth Media

The bacterial cells and plasmids used in this study are listed (Table 1). *Aeromonashydrophila* AHMP was isolated from diseased fish and cells were grown on Luria Bertani (LB) broth or LB agar solidified with 1.2% (w/v) bacteriological agar at 37° C. *Lactococcus lactis* NZ9000 (host cells) and *L. lactis* pNZ8048 (harboring pNZ8048 expression plasmids) cells were grown on SGM17 broth and SGM17 agar containing glucose (0.5 % w/v) and 0.5 M sucrose at 30° C.

Chloramphenicol was used at a concentration of 7.5 µg/ml (Sasan et al., 2007). Primers to amplify the full length segment of the gene coding for domains 1 and 4 of aerolysin of *A. hydrophila* AHMP were designated according to the published sequences (Rossjohn et al., 1997, Wang et al., 2003). Sequences for two restriction enzymes, *Pst*I and *Hind* III, were included in the forward and reverse primers respectively (Table 2). These restriction enzyme sites (REs) were used because they are not present within the genes of interest but are available in the multiple cloning sites (MCS) of plasmid pNZ8048.

Table 1: Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains and Plasmids	Features	References
Bacteria		
<i>L. lactis</i> NZ9000	MG1363 <i>pepN::nisRK</i>	Kuipers, 1998
<i>L. lactis</i> NZ8048	<i>L. lactis</i> NZ9000 cells harboring pNZ8048 vector	Kuipers, 1998
<i>A. hydrophila</i> AHMP	Isolated from diseased fish	Sasan, 2007
Plasmids		
pNZ 8048	Promoter: <i>nisA</i> , Antibiotic: Chlor., Expression vector for <i>Lactococcus</i>	Kuipers, 1998
pNZ 8048D1Aer	<i>L. lactis</i> plasmid carrying the Domain 1 of Aerolysin gene from <i>A. hydrophila</i>	Current work
pNZ 8048D4Aer	<i>L. lactis</i> plasmid carrying the Domain 4 of Aerolysin gene from <i>A. hydrophila</i>	Current work

Table 2: Primers used for amplification of two domains of aerolysin genes of *A. hydrophila* AHMP

Primers	TM (°C)	Sequences
D1AerF	60	5'-ATG <u>CTGCAG</u> AAATGATGAATAGAATA ATTACCGC-3'
D1AerR	64	5'-ATGCA <u>AAGCTT</u> GCCCCATAATCTCCA GCGAT-3'
D4AerF	64	5'-ATG <u>CTGCAG</u> AAAACCTCGCCATCGAGA TCGCT-3'
D4AerR	60	5'-ATGCA <u>AAGCTT</u> GTTATTGAACCGGAAC TATGGTC-3'

* Underlined sequences: RE sites, CTGCAG: *Pst*I and AAGCTT: *Hind*III

DNA Extraction and PCR Amplification

Genomic DNA of *A. hydrophila* AHMP was extracted using the modified mini preparation method (Ausbel et al., 1987) with minor modification. PCR amplifications were performed using a pair of primers: D1AerF (5'- AT GCT.....3') and D1AerR (5'-AT GCA..... -3') to amplify a segment DNA, ~250-bp coding for domain1, a pair of primers: D4AerF (5'- AT GCT -3') and D4AerR (5'- AT GCA.....-3') to amplify another segment, ~650-bp coding for domain 4 of aerolysin gene, from *A. hydrophila* AHMP (Table 2).

PCR assay was performed using a PCR mixture containing 3 µl of template DNA (100 nM) and 2 µl of 10 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 3 µl of the 25 mM MgCl₂ solution, 2 µl of the 20 mM solution of each primer, 0.3 µl of *Taq* polymerase (5u/µl), 5 µl of 10 × PCR buffer and 32.70 µl of dH₂O water, to make the final volume of 50 µl. The amplification program consisted of 27 cycles of amplification under the following condition: an initial denaturation of 5 minutes at 95° C followed by 27 cycles each of 1 minute at 95 °C, 1 minute at 60° C and 1 minute at 72 °C and additional final extension at 72° C for 10 minutes. Finally, 10 µl of PCR product was loaded on electrophoresis gel.

Plasmid Extraction, *Lactococcus lactis* NZ9000 Competent Cell Preparation,

RE Digestion and Ligation

Plasmids pNZ8048 from *L. lactis* pNZ8048 and recombinant plasmids, pNZ8048D1Aer and pNZ8048D4Aer from *L. lactis* transformants (Table 1) were extracted according to Leenhouts and Venema 1993 with minor modification.

Preparation of *L. lactis* NZ9000 competent cells was done according to the published method (Holo and Nes, 1989). A 24 hours old *L. lactis* NZ9000 colony was cultured in SGM17 (M17 with 0.5 M sucrose and 0.5% glucose) supplemented with 1.5% glycine and incubated at 30° C for 24 hours. One ml of an overnight culture was added into 100 ml fresh SGM17 + 1.5% glycine and incubated at 30° C, a few hours until the OD₆₀₀ of 0.3-0.6 was achieved.

The cells were then collected by centrifugation at 3500 rpm for 10 min at 4° C and washed twice with half volume ice-cold 0.5 M sucrose with 15% glycerol. Centrifugation was done again before the cells were resuspended in 1/200 culture volume of 0.5 M sucrose with 15% glycerol. While preparing competent cells, it is very important that the cells are kept cold at all times. A volume of 40 µl of cell suspensions were transferred to fresh 1.5 ml tube and kept in -80°C until usage for electro-transformation (electroporation).

Restriction enzyme (RE) digestion mixture was included of 1 µg of substrate DNA (PCR product or plasmid), 2 µl of 10X RE reaction buffer, 1 µl of enzyme 1, 1 µl of enzyme 2 and an appropriate volume of sterile water to make up a total volume of 20 µl. The reaction mixtures were incubated according to the RE's optimum temperature, 37° C for 3 hours. Ligation of double stranded DNA contained 1 unit of T4 DNA Ligase (Fermentas), 2 µl of 10X ligase buffer, 1000 ng of vector DNA, 5 folds excess of insert and sterile distilled water to make up a final volume of 20 µl. The reaction mixture was incubated at 16° C for 8

hours. The recombinant plasmids were excised from the agarose gel (1% (w/v)) and purified with Gel Purification Kit (Qiagen, Germany) according to the protocol.

Transformation of Recombinant pNZ8048 Plasmids into *Lactococcus lactis* NZ9000 and Verification

A total of 3–5 μl of the overnight ligation mixture was then used to transform the *L. lactis* NZ9000 competent cells by electroporation. Different recombinant *L. lactis* pNZ8048 plasmids produced in this work (pNZ8048D1Aer and pNZ8048D4Aer) which carried virulence genes of *A. hydrophila* were transformed into *L. lactis* according to the proposed protocol (Holo and Nes 1989) with minor modification. A volume of 10 μl of ligation mixture (about 1 μg of DNA plasmid) was mixed with 40 μl of aliquoted competent cells.

The mixture was transferred into an ice-cooled electroporation cuvette (2mm electrode gap) and exposed to a single electrical pulse at 2.3 kV (capacitance of 25 μF and resistance of 200 Ω). The electrical pulse was delivered using BioRad, the USA Gene Pulser Electroporation System equipped with a pulse controller unit. Immediately after the discharge, electroporated cells were mixed with 960 μl of ice-cold SGM17MC broth (SGM17 + 20 mM MgCl_2 + 2mM CaCl_2) and left on ice for 10 mins.

The electroporated cells were then incubated at 30° C without shaking for 2-3 hours to allow for phenotypic expression. A volume of 100 μl of the cells was then spread on SGM17 agar containing

chloramphenicol at a final concentration of 7.5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ and incubated at 30 °C for 2-3 days. A few well-isolated colonies were sub-cultured onto fresh SGM17 agar plates containing 7.5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ chloramphenicol. Transformants were then cultured in SGM17 broth for plasmid extraction and analysis. Verification of cloning of the genes of interest into *L. lactis* was carried out using REs digestion analysis and DNA sequencing.

Results

PCR Amplification of the genes of interest

Primers were designated (Table 2) according to the published sequences by (Wang et al., 2003; Rossjohn et al., 1997) to amplify two domains, domain 1 and 4 of aerolysin gene from *A. hydrophila* AHMP isolated from infected fish. The sizes of the genes of interest, domain 1 and domain 4 of aerolysin from *A. hydrophila* were around 250 bps and 650 bps respectively. In addition, specific RE sites, *Pst*I and *Hind*III had been placed in all forward and reverse primers respectively, for directional cloning into *L. lactis* expression vector, pNZ8048. Amplified PCR products were analysed with 1% agarose gel electrophoresis and results showed that amplifications were very specific (Fig. 1). In comparison with DNA markers, the sizes of the amplified PCR products were determined to be approximately 250 bps and 650 bps respectively. These bands, ~250 and ~650 bps (Fig. 1, Lines 1, 2, 3) completely agreed with the expected values. The specific bands relevant to the expected sizes indicated that primers for amplification of domain 1 and domain 4 of aerolysin gene have high efficiency and specificity.

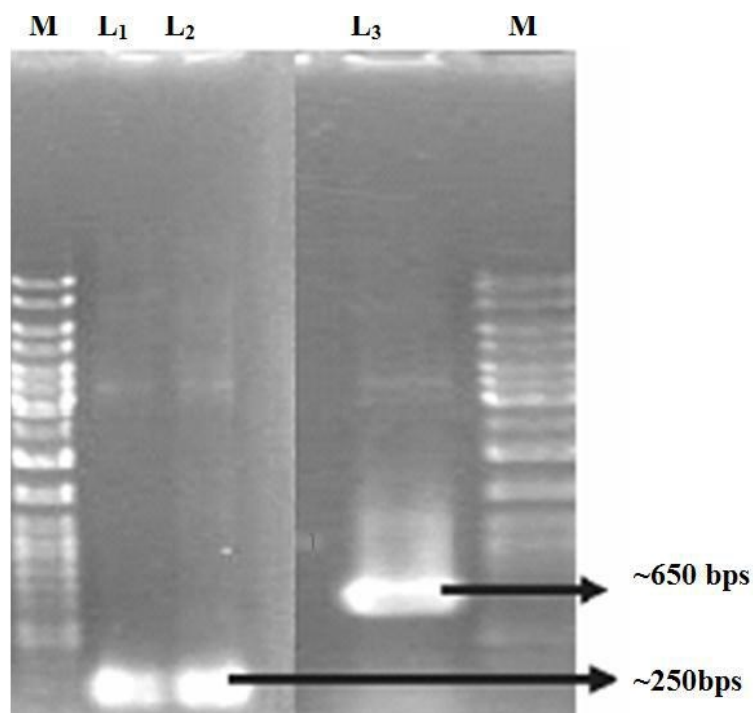


Figure 1: Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products of the virulent genes, two domains of aerolysin from *A. hydrophila* AHMP

M: Marker, 1 kb DNA ladder., Lanes 1 & 2: PCR products of domain1 of aerolysin gene from *A. hydrophila*., Lane 3: PCR amplification of domain4of aerolysin gene from *A. hydrophila*

Cloning and transformation of the genes of interest into gram-positive bacteria, *L. lactis* NZ9000

The amplified DNA bands of interest were excised from the gel at ~650 bps and ~250 bps position. These PCR products were then purified using the DNA purification kit, digested with restriction enzymes (*Pst* I and *Hind* III) and ligated with linearised pNZ8048 plasmid using T4 DNA ligase. Transformation of *L. lactis* NZ9000 cells was performed according to the protocol from Holo and Nes (1989). Figure 2 shows the maps of cloning of domain 1 of aerolysin into pNZ8048 vector, which D1Aer is domain 1 of aerolysin gene and contains from 211 bp to 433 bps and also *Pst* I with *Hind* III RE sites. Similarly,

figure 3 shows the maps of cloning of domain 4 of aerolysin into pNZ8048 vector, which D4aer is domain 4 of aerolysin containing from 211 to 855 bps. Maps were made by Clone Manager Computer Software. Ten to fifteen well-grown colonies of each transformant cell types were selected and subjected to plasmid analysis. Figure 4 shows the RE digestion analysis of both recombinant (pNZ8048D4Aer and pNZ8048D1Aer) and non-recombinant pNZ8048 plasmids. Verification for cloning of the virulent genes was performed by REs digestion and DNA sequencing. Figure 4 shows the pattern of RE digestion of recombinant and non-recombinant pNZ8048 plasmids. Line 1 is recombinant pNZ8048D4Aer

with single digestion. Line 3 is non-recombinant pNZ8048 plasmid with single digestion. Upon double digestion of transformant pNZ8048D1Aer plasmids with *Hind* III and *Pst* I, the molecular sizes of ~3340 bps and ~650 bps were shown by gel electrophoresis (Fig. 4, L₂). These sizes correlated to the estimated and expected data. Therefore, the size and orientation of this putative clone obtained was in agreement with the expected recombinant, confirming the presence of domain 4 of aerolysin gene from *A. hydrophila* AHMP

insert in pNZ8048 expression vector. Similarly, double digestion of line 7 shows cloning and presence of domain 1 of aerolysin gene from *A. hydrophila* AHMP insert in pNZ8048 expression vector. Further verification was carried out by DNA sequencing using the primers of the genes of interest. Blast analysis showed 97% similarity between sequences of domain 1 and domain 4 of aerolysin gene with the published data respectively (Sasan 2007).

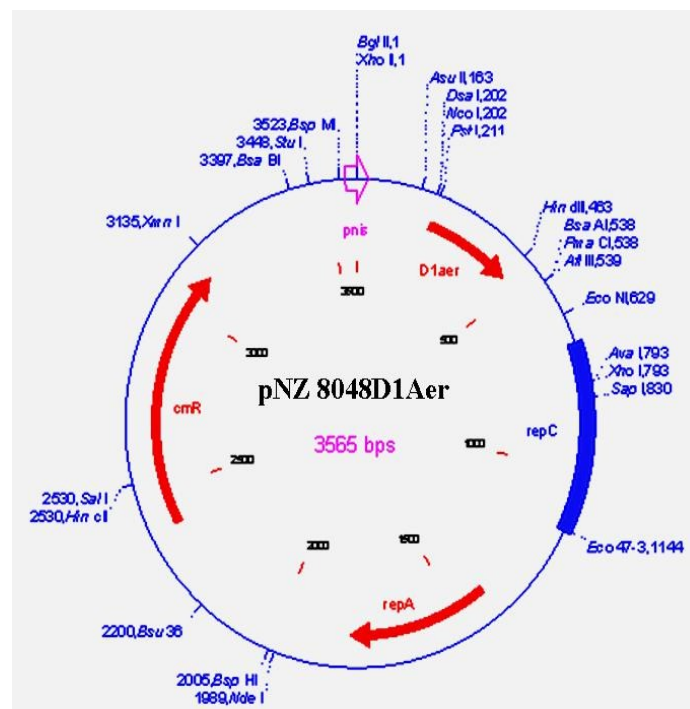


Figure 2: Map of pNZ8048D1Aer construct indicating the site of the insertion of the domain 1 of aerolysin (D1Aer) gene and the orientation of this gene

The vector contains nis promoter, start of an open reading frame, MCS, cmr, chloramphenicol resistance gene (Kuipers, 1998).

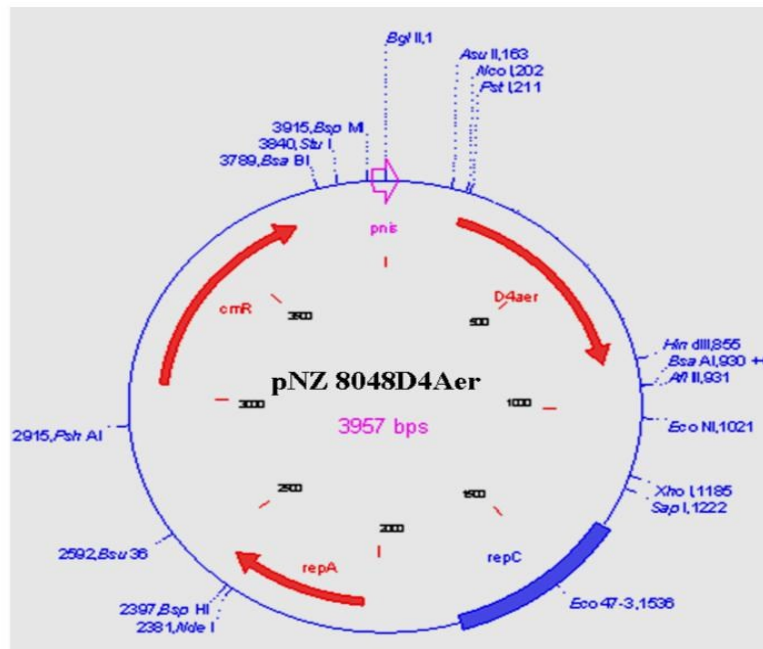


Figure 3: Map of pNZ8048D4Aer construct indicating the site of the insertion of the domain 4 of aerolysin (D4Aer) gene and the orientation of this gene.

The vector contains nis promoter, start of an open reading frame, MCS, cmr, chloramphenicol resistance gene.

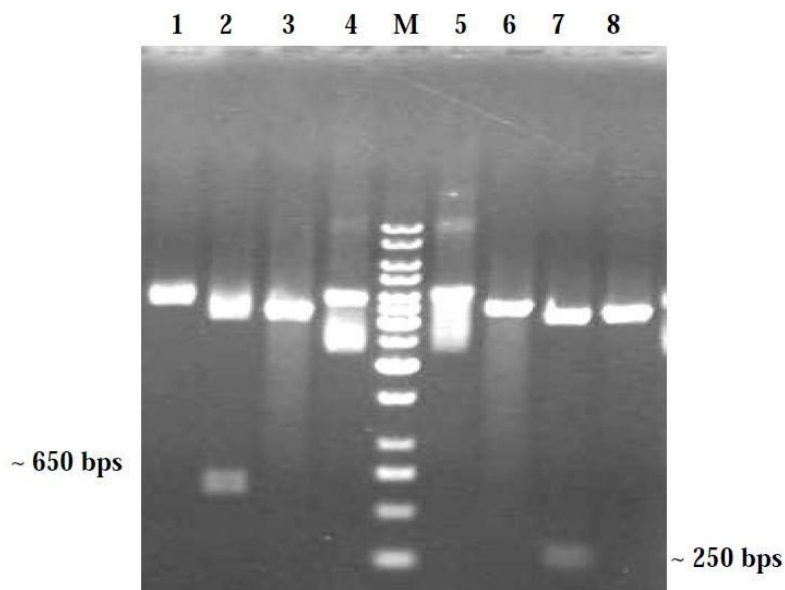


Figure 4: Cloning of virulent genes, aerolysin 1&4 domains genes, of *A. hydrophila* AHMP into *L lactis* NZ9000.

Lane 2: Double digestion of recombinant pNZ8048D4Aer plasmid with *Hind*III and *Pst*I containing the domain 4 of aerolysin gene. Lane 7: Double digestion of recombinant pNZ8048D1Aer plasmid with *Hind*III and *Pst*I containing domain 1 of aerolysin gene. Lanes M: 1 kb DNA Marker, #SM0311.

Discussions

In this study, primers for the amplification of domain 1 and domain 4 of aerolysin gene from *A. hydrophila* were designated and PCR analysis verified to be very specific. The genes of interest were then cloned into pNZ8048, as *L. lactis* expression vector for the first time using electroporation method. Cloning verification was carried out by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. Aerolysin is a well-known pore-forming toxin protein and major virulence factor that was first purified from gram-negative pathogen *A. hydrophila* bacterium, and is capable of killing target cells by forming channels in their membranes. It has been also reported that some domains of aerolysin protein especially domain 1 and 4 have main roles in its pathogenicity (Abrami et al., 2000). In addition, results indicated that this toxin molecule had hemolytic, cytotoxic and enterotoxic activities (Pollard et al., 1990; Chopra et al., 1993). Moreover, recent studies have shown that aerolysin protein is capable of neutralizing human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in a dose-dependent manner with neutralization dependent upon the presence of the Thy 1 proteins in the viral envelope (Nguyen et al., 1999). Furthermore, it has been shown that mutant strains of *A. hydrophila* deficient in aerolysin production were found to be less virulent than the wild type. Additionally, specific neutralizing antibodies to aerolysin have been detected in animals surviving *Aeromonas* infection (Leung et al., 1997; Leung and Stevenson, 1988).

Lactic acid bacteria (LAB) include a large number of gram-positive cocci or bacilli belonging to a

phylogenetically heterogeneous group. Their traditional use in food industry confirms their lack of pathogenicity; as they are considered to be generally regarded as safe (GRAS) organisms. This group of bacteria has some advantages such as production of heterologous proteins in bio-reactors, in fermented food products or directly in the digestive tract of humans and other animals. Besides such natural benefits, a new application for LAB, and probably the most promising, is their use as live delivery vectors for antigenic or therapeutic protein delivery to mucosal surfaces. Such engineered LABs are able to elicit both mucosal and systemic immune responses. Some studies have shown and confirmed the efficiency of *L. lactis* for the presentation of antigens to the mucosal immune system, to elicit a specific response (Raha et al., 2006; Naima et al., 2007).

Interestingly, several homologous and heterologous genes, a few antigens (bacterial and viral) and cytokines have been successfully expressed in *L. lactis* (Enouf et al., 2001; Chatel et al., 2003). Some of them include several lysozyme genes, the *B. subtilis* neutral protease (van de Guchte et al., 1989, 1990, 1992) tetanus toxin fragments C protein (Wells et al., 1993) protease (Sasan, 2010), manganese superoxide dismutase gene from *E. coli* (Roy et al., 1993), xylanase gene of *B. subtilis* (Raha et al., 2006) and genes encoding for pyruvate carboxylase and alcohol dehydrogenase of *Zymomonasmobilis* (Gold et al., 1996). A growing number of studies reported the implication of lactic acid bacteria in fish diseases, while vaccination is not yet fully

operational. One of the most promising and urgent applications of lactic acid bacteria is therefore to investigate their use both as probiotics against bacterial pathogens, and as sources of immunostimulants (Ringo et al., 1998; Mohammed et al., 2008).

The potential of *L. lactis* acid bacteria as vaccine vectors has been demonstrated in several recent publications, such as *Lactococcus lactis* prototype vaccines against *Brucella abortus*, and *Helicobacter pylori* (Joes and seegers, 2002). Furthermore, *L. lactis* has been extensively engineered for the production of heterologous therapeutic proteins. It has already been used as an antigen delivery vehicle for vaccination against tetanus, virus and more recently, for the treatment of murine colitis (Chatel et al., 2003). For this, construction of such genetically engineered safe microorganisms which are made by current work may result in protecting living things against pathogens. Future work should include immunological study of fish response and introduction of multiple epitope recombinant vaccine.

of a *Lactococcus lactis* strain that secretes a major epitope of bovine beta-lactoglobulin and evaluation of its immunogenicity in mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6620-27.

Chopra, A. K., Houston, C. W., Peterson, J. W. and Jin, G. F., 1993. Cloning, expression, and

sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from

Aeromonas hydrophila. *Canadian Journal of Microbiology*, 39, 513-523.

Enouf, V., Langella, P., Commissaire, J., Cohen, J. and Corthier, G., 2001.

Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1423-1428.

Gold, R. S., Tovell, D. R., Kay, C. M. and Conway, T., 1996. Cloning and Expression of the

Zymomonas mobilis

“production of ethanol” genes in *Lactococcus casei*. *Current Microbiology*, 33, 256-60.

Holo, H. and Nes, I. F., 1989. High-frequency transformation by electroporation of

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Applied & Environmental Microbiology*, 55, 3119-23.

Jos, F. M. and Seegers, L., 2002. Lactobacillias live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends in Biotechnology*, 20(12), 508-515.

References

- Abrami, L., Fivaz, M. and van der Goot, F. K., 2000.** Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends in Microbiology*, 8(4), 168-172.
- Chopra, A. K., Houston, C. W., Peterson, J. W., and Jin, G. F., 1993.** Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Canadian Journal of Microbiology*, 39, 513-523.
- Enouf, V., Langella, P., Commissaire, J., Cohen, J. and Corthier, G., 2001.** Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1423-1428.
- Gold, R. S., Tovell, D. R., Kay, C. M. and Conway, T., 1996.** Cloning and Expression of the *Zymomonas mobilis* “production of ethanol” genes in *Lactococcus casei*. *Current Microbiology*, 33, 256-60.
- Holo, H. and Nes, I. F., 1989.** High-frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Applied & Environmental Microbiology*, 55, 3119-23.
- Jos, F. M. and Seegers, L., 2002.** Lactobacillias live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends in Biotechnology*, 20(12), 508-515.
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G., Kleerebezem, M. and de Vos, M. D., 1998.** Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 64, 15-21.
- Lee, M. H., Roussel, Y., Wilks, M. and Tabaqchali, S., 2001.** Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. *Vaccine*, 19(28-29), 3927-3935.
- Leenhouts, K. J. and Venema, G., 1993.** Lactococcal plasmid vectors, p.66-94. *In*
- Chatel, J. M., Sebastien, N., Karine, A., Yves, L., Herman, B., Alexandra, G., Jean, M. W. and Philippe, L., 2003.** Characterization

- K. G. Hardy (ed.), Plasmids. A practical approach. Oxford University Press New York.
- Leung, K. Y. and Stevenson, R. M. W., 1988.** Tn5-induced protease-deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. *Infection Immunology*, 56, 2639-2644.
- Leung, K. Y., Wong, L. S., Low, K. W. and Sin, Y. M., 1997.** Mini-Tn 5 induced growth- and protease-deficient mutants of *Aeromonas hydrophila* as live vaccines for blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas). *Aquaculture*, 158, 11-22.
- Liljeqvist, S. and Stahle, S., 1999.** Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *Journal of Biotechnology*, 73:1-33.
- Mohammed, B., Casey, P. C., Brendan, T. G. and Cormac, G. M. G., 2008.** *Lactococcus lactis*-expressing listeriolysin O (LLO) provides protection and specific CD8⁺ T cells against *Listeria monocytogenes* in the murine infection model. *Vaccine*, 26(41), 5304-5314.
- Naima, G. C. P., Luis, F. C. M., Francois, L., Philippe, L. and Luis, G. B. H., 2007.** Production of biologically active CXC chemokines by *Lactococcus lactis*: Evaluation of its potential as a novel mucosal vaccine adjuvant. *Vaccine*, 26(46), 5778-5783.
- Nguyen, D. H., Liao, Z., Buckley, J. T., and Hildreth, J. E. K., 1999.** Neutralization of HIV-1 by a pore-forming bacterial toxin, aerolysin. *Molecular Microbiology*, 33, 659-666.
- Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D. and Rozee, K. R., 1990.** Detection of the Aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 2477-81.
- Raha, A. R., Varma, N. R. S., Yusoff, K., Ross, E. and Foo, H. L., 2005.** Cell Surface Display System for *Lactococcus lactis*: A Novel Development for Oral Vaccine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 253(4), 1851-8.
- Raha, A. R., Chang, L. Y., Sipat, A., Youseff, K. and Haryanti, T., 2006.** Expression of a thermostable xylanase gene from *Bacillus coagulans* ST-6 in *Lactococcus lactis*. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 21-214.
- Rahman, M. H., Kusuda, R. and Kawai, K., 1997.** Virulence of starved *Aeromonas hydrophila* to cyprinid fish. *Fish Pathogens*, 32, 163-168.
- Ringo, E. and Gatesoupe, F. J., 1998.** Lactic acid bacteria in fish. A review. *Aquaculture*, 160, 177-203.
- Robinson, K., Chamberlain, M., Schofield, M., Wells, J., and Le, P. R. F., 1997.** Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Natural Biotechnology*, 15, 653-657.
- Rossjohn, J., Buckley, T. M., Hazes, B., Murzin, A. G., Read, R. J. and Michael, W. P., 1997.** Aerolysin and pertussis toxin share a common receptor-binding domain. *The EMBO Journal*, 16(12), 3426-3434.
- Roy, D. G., Klaenhammer, T. R. and Hassan, H. M., 1993.** Cloning and expression of the manganese superoxide dismutase gene of *Escherichia coli* in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus*. *Molecular and General Genetics*, 239, (1-2), 33-40.
- Sasan, H., 2010.** Cloning of *EprA1* gene from *Aeromonas hydrophila* in *Lactococcus lactis*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 8(3), 192-197.
- Sasan, H., 2007.** Cloning and Expression of Aerolysin and Protease Genes from *Aeromonas hydrophila* in *E. coli* and *Lactococcus lactis* and Effects of Genetically Engineered Cells on Survival Rates of Tilapia Fish. PhD. UPM, Malaysia.
- Van de Guchte, M., Kodde, J., van der Vossen, J. M., Kok, J. and Venema, G., 1990.** Heterologous gene expression in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: synthesis, secretion, and processing of the *Bacillus subtilis* neutral protease. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2606-2611.
- Van de Guchte, M., van der Vossen, J. M., Kok, J. and Venema, G., 1989.** Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp.

lactis. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), 224–228.

Van de Guchte, M., Van der Wal, F. J., Kok, J. and Venema, G., 1992.

Lysozyme expression in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 216-224.

Vaughan, L. M., Smith, P. R. and Foster, T. J., 1993. An aromatic-dependent mutant of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* is attenuated in fish and is effective as a live vaccine against the salmonid disease furunculosis. *Infection Immunology*, 61, 2172-2181.

Wang, G., Clifford, G., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C. K., Kruk, T. M. A. C., Caldeira, R. et al., 2003. Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *A. hydrophila* and *A. sobria* by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), 1048-1054.

Wells, J. M., Norton, P. W., Gasson, M. J. and Lepage, R. W. F., 1993.

Lactococcus lactis high-level gene expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge.

Molecular Microbiology, 8, 1155–1162.

Vijai, S., Pallavi, S., Gaurav, R., Kapoor, D. and Mishra, B. N., 2009. Gene cloning, expression and homology modeling of hemolysin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Protein Expression and Purification*, 65, 1–7.

Zhu, D., Li, A., Wang, J., Li, M. and Cai, T., 2007. Cloning, expression and characterization of aerolysin from *Aeromonas hydrophila* in *Escherichia*

coli. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 44(4), 204-208.