

Prokaryotic Expression of the Influenza A (H5N1) Neuraminidase

Zahra Latif^{1,2},
Behrokh Farahmand³,
Maryam Saleh⁴,
Zahra Barghi⁵

¹ MSc in Molecular Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

² Department of Influenza Virus Research and Other Respiratory Viruses, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Influenza Virus Research and Other Respiratory Viruses, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

⁴ PhD in Medical Microbiology, Department of Influenza Virus Research and Other Respiratory Viruses, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

⁵ MSc in Biochemistry, Department of Influenza Virus Research and Other Respiratory Viruses, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

(Received November 15, 2020 ; Accepted February 1, 2021)

Abstract

Background and purpose: Highly Pathogenic Influenza A(H5N1) viruses cause vast economic losses throughout the world. They may circulate in animals and be able to spread from human to human. Therefore, launching diagnostic tests are highly essential to control the influenza infection. Studies on the amino acid sequence of the neuraminidase (NA) protein of influenza viruses revealed that NA is the most immunogenic protein in naïve animals which can simply stimulate the humoral immune system well.

Materials and methods: Influenza virus NA gene (A/Indonesia/5/2005(H5N1)) was cloned into pET21a and expressed in host *E. coli* (BL21) strains. Then, the expression level of NA protein was optimized for different IPTG inductor concentrations and times.

Results: Findings showed the integrity of pET21a-NA construct. Emerging bands with the expected molecular weight (38KDal) on SDS-PAGE and WB analysis confirmed the successful expression of target protein in *E. coli* BL21 strain. In silico analysis showed integrity of major epitopes in the structure of fused version of NA produced in this work.

Conclusion: The new recombinant NA has the potential to be used directly in serological tests. It could be also used in polyclonal antibody preparation which is employed as an essential material in western blot analyses and other immunological and serological studies, such as ELISA, immunocytochemistry, and immunohistochemistry.

Keywords: neuraminidase, prokaryote system, diagnostic tests, Influenza A (H5N1) virus

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (195): 94-102 (Persian).

* Corresponding Author: Behrokh Farahmand - Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran (E-mail: zfoutokian@gmail.com)

بیان پروکاریوتی آنتی ژن نور آمینیداز ویروس آنفلوانزای A (H5N1)

زهرا لطیف^{2,1}

بهرخ فرمند³

مریم صالح⁴

زهرا برقی⁵

چکیده

سابقه و هدف: ویروس آنفلوانزای فوق حاد پرندگان A (H5N1) باعث ایجاد خسارات اقتصادی زیادی در سراسر جهان می شوند و ممکن است در حیوانات در گردش باشد و توانایی انتشار از انسان به انسان پیدا کند. بنابراین راه اندازی تست های تشخیصی برای کنترل عفونت آنفلوانزا ضروری است. مطالعات در مورد توالی اسیدهای آمینه پروتئین نور آمینیداز (NA) ویروس آنفلوانزا نشان داده است که NA ایمنی زاترین پروتئین در حیوانات است و می تواند سیستم ایمنی هومورال را تحریک نماید.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ویروس آنفلوانزا (A/Indonesia/5/2005: H5N1) در pET21a کلون و در میزان E. coli (BL21) بیان شد. سپس میزان بیان NA از نظر متغیرهای غلظت القاگر IPTG و زمان بهینه سازی شد. **یافته ها:** نتایج، صحت ساختار Pet21a-NA را نشان داد. باندهای ظاهر شده با وزن مولکولی مورد انتظار (38KDal) روی SDS-PAGE با وسترن بلات تایید شد که بیانی موفقیت آمیز از پروتئین هدف در سویه E. coli BL21 بود. در تجزیه و تحلیل درون رایانه ای، درستی اپی توپ عمده در ساختار نسخه NA تولید شده در این مطالعه را نشان داد. **استنتاج:** NA نو ترکیب جدید می تواند به طور مستقیم در آزمایشات سرولوژی برای تشخیص استفاده شود. همچنین می تواند در معرض تهیه آنتی بادی پلی کلونال قرار گیرد، که به عنوان ماده اساسی در تجزیه و تحلیل وسترن بلات و سایر مطالعات ایمونولوژیک مانند ELISA، ایمونوسیتوشیمی استفاده شده است.

واژه های کلیدی: نور آمینیداز، سیستم پروکاریوت، تست های تشخیصی، ویروس آنفلوانزای A (H5N1)

مقدمه

می شود (1). اولین پاسخ ایمنی نسبت به ویروس آنفلوانزای نوع A در بدن در پی عفونت آنفلوانزا از طریق تولید آنتی بادی ها بر علیه نور آمینیداز صورت می گیرد (3). نور آمینیداز موجب رها شدن ویروس از سلول های آلوده به عفونت و درگیر شدن سلول های سالم می شود بنابراین

بیماری آنفلوانزا دارای اهمیت جهانی بوده و نه تنها در جمعیت های انسانی بلکه در پرندگان و حیوانات قادر به گسترش می باشد (۲۱). از جمله مهم ترین پروتئین های سطحی ویروس می توان به نور آمینیداز (NA) اشاره نمود که به صورت زوایدی روی پوشش لیپیدی نمایان

E-mail: farahmand.b2@gmail.com

مؤلف مسئول: بهرخ فرمند - تهران: خیابان پاستور، پلاک 69، انستیتو پاستور تهران

1. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی مولکولی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

2. بخش آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران

3. استادیار، بخش آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران

4. دکتری میکروبیولوژی، بخش آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران

5. کارشناسی ارشد بیوشیمی، بخش آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1399/8/25 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/9/3 تاریخ تصویب: 1399/11/13

مطالعه تجربی در بخش آنفلوآنزای انستیتو پاستور ایران بر روی پلاسمید pFastBacIHNM1 که از دانشگاه مالک اشتر گرفته شده بود (10) انجام شد.

فرایند PCR به منظور تکثیر ژن نورآمینیداز که در پلاسمید pFastBacIHNM1 قرار داشت توسط پرایمرهای اختصاصی NA انجام شد (جدول شماره 1). برای طراحی پرایمر از نرم افزار Gene Runner (version 6.5.51) استفاده شد و ویژگی‌های بیوشیمی و فیزیکی این پرایمرها بررسی گردید، سپس برای سنتز به شرکت سینا ژن فرستاده شد.

جدول شماره 1: توالی پرایمرهای دریافت شده توسط شرکت سیناژن

نام پرایمر	توالی پرایمر	%GC	دمای ذوب	اندازه (bp)
F-BamHI	5'-CTAGGATCCATGATCTCAATATG	39/1	57/08	23
R-XhoI	5'-TATCTCGAGCATTTCAAGCC	42/9	55/92	21

یافته ها

برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR و مخلوط واکنش PCR به ترتیب در جداول شماره 2 و 3 آمده است. master mix برای PCR نیز شامل 20 میکرولیتر dNTPs، 100 میکرولیتر بافر PCR (10x)، 30 میکرولیتر MgCl2 (25 میلی مولار)، 350 میکرولیتر آب مقطر استریل بود. واکنش PCR در رقت 1/100 از DNA الگو انجام شد.

جدول شماره 2: برنامه دمایی وزمانی مورد استفاده برای تکثیر ژن NA

مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان	تعداد چرخه
واکنش اولیه	94	5 دقیقه	1
واکنش تکثیر	94	30 ثانیه	35
اتصال	47	30 ثانیه	
گسترش	72	2 دقیقه	1
گسترش نهایی	72	5 دقیقه	

جدول شماره 3: مخلوط واکنش PCR

مواد مورد استفاده	مقادیر مورد نظر (میکرولیتر)
مخلوط کاری (master mix)	12/5
DNA الگو	1
پرایمر پیشرو	1
پرایمر معکوس	1
آب مقطر استریل	4
آنزیم Taq	0/5

کاندید مناسبی برای تست‌های تشخیصی و واکسن‌ها است. شواهد تجربی در مورد ویروس‌های آنفلوآنزا نشان می‌دهد که گلیکوزیلاسیون نورآمینیداز ممکن است برای شکل‌گیری مناسب و شناسایی گیرنده میزبان مهم باشد، اما در ایمنی‌زایی آن اهمیت چندانی ندارد، بنابراین زمانی که در سیستم پروکاریوتی بیان شود، همان خواص آنتی ژنی خود را حفظ می‌کند. بیان قطعات نورآمینیداز در سیستم پروکاریوتی به‌طور بالقوه می‌تواند راهبرد بسیار موثری برای تولید مقادیر زیادی از نورآمینیداز در مدت‌زمانی کوتاه جهت استفاده در کیت‌های تشخیصی و واکسن‌ها به خصوص در ایران (که نقطه داغ این ویروس محسوب می‌شود) باشد (۵،۴). همچنین تزریق نورآمینیداز خالص شده به موش موجب القای تولید آنتی بادی ضد فعالیت هم‌آگلوتیناسیون شده و در نهایت منجر به از بین رفتن توانایی ویروس در ایجاد عفونت می‌شود (۵). ویروس فوق‌حادپرندگان H5N1 علاوه بر بیماری‌زایی در پرندگان باعث بیماری‌زایی در انسان و حیوانات نیز می‌شود و انتقال انسان به انسان هم مشاهده شده است (۶)، بنابراین مطالعه حاضر بر روی این نوع ویروس از انواع آنفلوآنزا صورت گرفت و با هدف تولید پروتئین نوترکیب نورآمینیداز در سیستم پروکاریوتی در مدت زمان کوتاه جهت استفاده در تست‌های تشخیصی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

ابتدا آنالیز بیوانفورماتیکی روی توالی ژنومی و اسیدآمینهای پروتئین NA صورت گرفت و توالی نوکلئوتیدی ژن NA ویروس آنفلوآنزا (A/Indonesia/5/2005:H5N1) باکد دسترسی EU146623.1 از پایگاه داده NCBI به‌دست آمد (۷). توالی نوکلئوتیدی موردنظر از جهت مناطق اثر آنزیم‌های برش دهنده در نرم‌افزار NEBcutter (v2-0) به منظور یافتن آنزیم‌های مناسب جهت کلون کردن ژن مورد نظر در پلاسمید pET21a مورد بررسی قرار گرفت (۹،۸). این

صورت گرفت و اتصال ژن NA به وکتور بیانی pET-21 خطی شده طبق جدول شماره 5 در دو نسبت مولی 1 به 1 و 1 به 3 از قطعه ژن هدف به وکتور انجام شد.

جدول شماره 5: میزان مواد مورد نیاز برای اتصال ژن NA به وکتور بیانی pET-21 خطی شده

مواد	1 به 1	3 به 1
قطعه ی هدف (ژن NA) (نانوگرم)	0/5	0/75
قطعه وکتور (pET21a) (نانوگرم)	6/5	6/5
بافر (10X میکرو لیتر)	1	1
T4DNA Ligase آنزیم (میکرو لیتر)	1	1
اب مقطر (میکرو لیتر)	1	0/75
حجم کل (میکرو لیتر)	10	10

آنگاه pET21-NA به میزبان باکتریایی TOP10f مستعد شده انتقال پیدا کرد و باکتری‌های ترانسفورم شده، روی پلیت‌های حاوی آمپی سیلین و تتراسایکلین کشت داده شدند، جهت شناسایی پلاسمیدهای نو ترکیب از کلنی‌های رشد کرده بر روی پلیت‌های حاوی آمپی سیلین، کلونی PCR و تست rapid miniprep انجام گردید. سپس مانند قبل از کلنی‌هایی که نتایج آن‌ها مثبت بود، استخراج پلاسمید انجام گرفت و سپس با هضم آنزیمی BamHI و XhoI پلاسمید نو ترکیب تایید نهایی شد. جهت بررسی بیان ژن و تولید پروتئین مورد نظر، باید پلاسمید نو ترکیب به داخل میزبان پروکاریوتی E. Coli سویه بیانی BL21 انتقال یابد، بنابراین یک تک کلون از کلنی‌های ایجاد شده در مرحله انتقال پلاسمید به میزبان پروکاریوتیک مستعد شده به وسیله شوک حرارتی را از سطح پلیت‌های کشت رقیق به لوله‌های حاوی 10 میلی لیتر محیط کشت مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین انتقال می‌شود. فاکتورهای در انکوباتور شیکردار 37 درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرند تا زمانی که به 600nm OD بین 0/4 تا 0/6 برسند. سپس 1 میلی لیتر از آن به عنوان نمونه غیرالقا برداشت می‌شود و جهت بهینه‌سازی القای بیان، ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (IPTG) با غلظت‌های 0.1mM، 0.5mM و 1mM مورد آزمایش قرار گرفت و در نهایت برای هر لوله با غلظت مختلف القاگر،

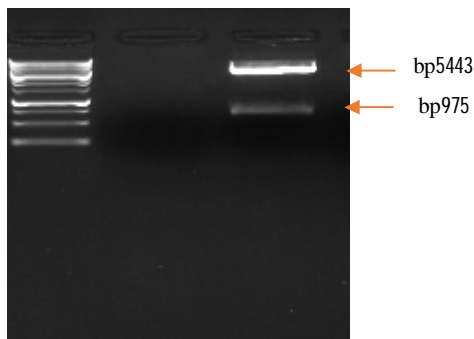
خالص‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت QIAquick® PCR Purification Kit انجام شد. برای انجام همسانه‌سازی در وکتور PGEM-TEasy، واکنش لیگاسیون بین محصول PCR آماده شده و وکتور تکثیر PGEM-TEasy (PGEM-TEasy Promega) (Lot.No.0000287313 REF.A137A) با توجه به این که اندازه وکتور 3000 کیلوباز می‌باشد و معمولاً برای هر واکنش ligation حداقل 50 نانوگرم از T وکتور لازم می‌باشد و در بیش تر مطالعات نسبت مولی قطعه ژن هدف به وکتور نسبت 3 به 1 بوده است، طبق جدول شماره 4 انجام گرفت. جهت اتصال آن‌ها به یکدیگر از آنزیم T4DNA Ligase شرکت Fermentase استفاده شد.

جدول شماره 4: مواد و مقادیر مورد نیاز از آن‌ها برای تهیه مخلوط واکنش اتصال ژن به T وکتور

مواد مورد نیاز	مقدار (میکرو لیتر)
D.W	4
PGEM-T-easy Vector(50ng)	0/5
T4 DNA ligase	1
Sample (PCR product)	0/5
2x rapid ligation buffer	4

سپس Tvector-NA به میزبان باکتریایی TOP10f مستعد شده انتقال پیدا کرد و در پلیت‌های LB-Agar دارای آمپی سیلین، X-Gal و IPTG کشت داده شد، برای شناسایی پلاسمیدهای نو ترکیب از کلنی‌های رشد کرده بر روی پلیت‌ها تست rapid miniprep انجام شد. سپس از کلنی‌هایی که نتایج آن‌ها مثبت بود، استخراج پلاسمید صورت گرفت و سپس با هضم آنزیمی BamHI و XhoI پلاسمید نو ترکیب تایید شد. برای همسانه‌سازی ژن NA در وکتور بیانی pET-21 قطعه ژنی با استفاده از آنزیم‌های گفته شده از وکتور اولیه جدا و وارد وکتور بیانی شد، همچنین هضم آنزیمی وکتور pET-21 نیز انجام شد. هضم آنزیمی pET21 و برش قطعه ژنی Tvector-NA توسط آنزیم‌های BamHI و XhoI صورت گرفت. سپس تخلیص وکتور pET21 خطی شده انجام شد. تخلیص ژن NA به روش Gel extraction با کیت QIA quick

در تصویر شماره 2 نتایج حاصل از هضم آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب pET21-NA به وسیله آنزیم‌های BamHI و XhoI را مشاهده می‌کنید که در تصویر خروج قطعه 975 bp نشان‌دهنده صحت همسانه‌سازی می‌باشد. تصویر شماره 3 نقشه pET21 به کار رفته در این پژوهش را نشان می‌دهد.



تصویر شماره 2: الکتروفورز مربوط به نتیجه هضم آنزیمی pET21-NA روی ژل آگارز 1 درصد چاهک 1- 1 kb DNA ladder (Cinnagen Cat.NO. PR901644) و چاهک 2- محصول هضم با دو آنزیم BamHI و XhoI و خروج قطعه 975 bp ژن NA و قطعه 5443bp و کتور pET21

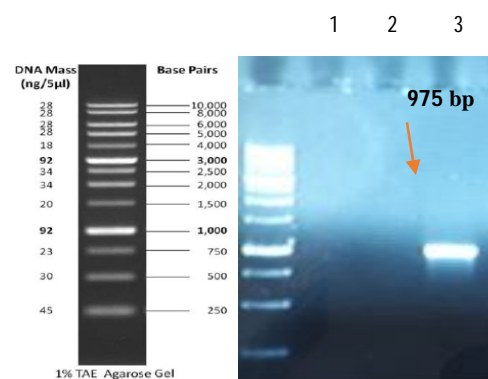
نتایج حاصل از تایید بیان پروتئین مورد نظر توسط SDS-PAGE در تصویر شماره 4 ارائه شده است، با توجه به این که وزن تقریبی پروتئین نو ترکیب نور آمینیداز حدودا 38 کیلودالتون است، باند مشخصی در آن ناحیه از ژل مشاهده شد و پروتئین حاصل از غلظت 0/5 میلی مولاز از IPTG و مدت زمان 16 ساعت بعد از افزودن القاگر، به عنوان بهترین بیان پروتئین مربوطه انتخاب گردید.

در تصویر شماره 5 نتایج حاصل از وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی علیه توالی His که در ابتدای توالی NA فیوژن شده است را ملاحظه می‌نمایید که باند مربوط به پروتئین NA با وزن مورد انتظار 38 KD نمایان است.

میکروتیوب‌هایی حاوی رسوب باکتری از زمان 0 تا 5 و یک نمونه 16 ساعته (Over night) خواهیم داشت. سپس نمونه‌ها روی ژل اکریل آمید برده و از سدیم دو سولفات (SDS-PAGE) 12 درصد استفاده شد بعد از نرمالیزاسیون و آماده‌سازی، 15 میکرولیتر از هر نمونه جهت تایید بیان پروتئین مورد نظر در SDS-PAGE استفاده شده است و وسترن بلات جهت تایید پروتئین مدنظر که دارای دم پلی هیستیدینی است با استفاده از آنتی‌هیس کتوزوگه با HRP با رقت 1/6000 علیه دم پلی هیستیدینی پروتئین و با استفاده از سوبسترای تترامیل بنزیدین (TMB) از شرکت SIGMA (110M1427) انجام شد. مارکر مورد نظر Prestained Protein Ladder شرکت سیناکلون بود.

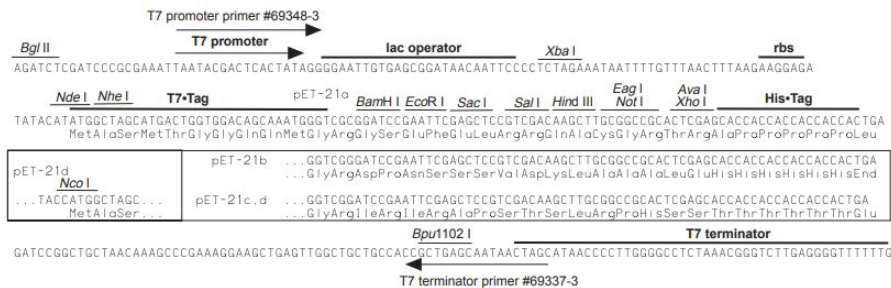
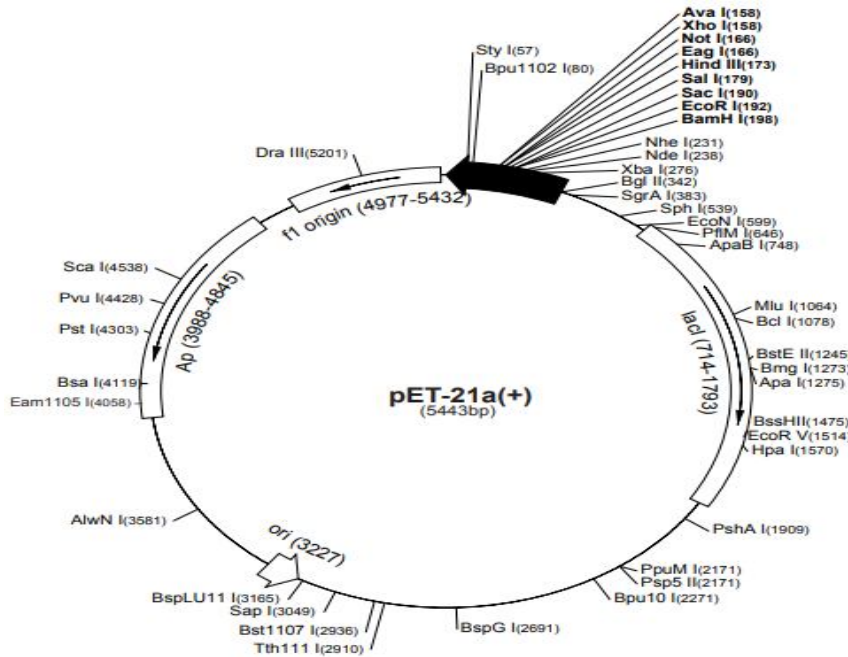
یافته‌ها و بحث

پژوهش حاضر طی سال‌های 1398-1399 در بخش آنفلوآنزای انیستیتو پاستور تهران انجام شده است. در تصویر شماره 1 باند به دست آمده توسط الکتروفورز از محصول PCR که شامل ژن NA به همراه جایگاه‌های برش دو آنزیم BamHI/XhoI که توسط پرایمرها طراحی شده است، به خوبی نمایان می‌باشد. اندازه این توالی 975bp است.



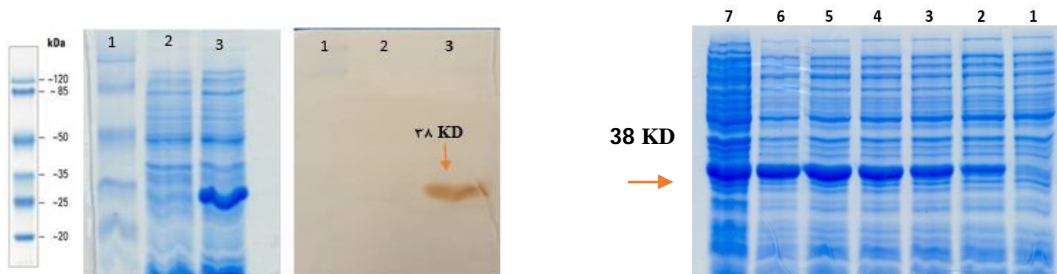
تصویر شماره 1: الکتروفورز روی ژل آگارز 1 درصد از محصول PCR برای ژن NA.

چاهک 1- 1 kb DNA ladder (Cinnagen Cat.NO.PR901644)، چاهک 2- کنترل منفی (انجام PCR بدون الگو)، چاهک 3- واکنش PCR برای قطعه NA با اندازه 975bp می‌باشد.



pET-21a-d(+) cloning/expression region

تصویر شماره 3: نقشه و کتوریابی pET21



تصویر شماره 5: وسترن بلات پروتئین نوترکیب نورآمینیداز است. 1- مارکر وزن مولکولی تهیه شده از شرکت سیناکلون، 2- کنترل منفی (باکتری فاقد پلاسمید بیانی)، 3- نمونه حاوی پروتئین نوترکیب NA

تصویر شماره 4: SDS-PAGE نمونه های رسوب باکتری BL21 پیش و پس از القای بیان پروتئین نوترکیب NA با غلظت 0/5 میلی مولار القاگر IPTG در دمای 37 °C، ستون 1- نمونه پروتئین پیش از القا، ستون 2 تا 6- نمونه های پروتئینی ساعات 1 تا 5 پس از القا بیان، ستون 7- نمونه ی پروتئینی 16 ساعت (Over night) پس از القا بیان می باشد. وزن مولکولی پروتئین نوترکیب موردنظر 38 کیلو دالتون است.

و توالی موردنظر به دلیل داشتن A Overhang در انتهای خود که توسط آنزیم Taq polymerase ایجاد می‌شود به نوکلئوتیدهای T در وکتور متصل شده و کلونینگ به راحتی انجام می‌شود. سیستم pET یکی از قوی‌ترین سیستم‌های شناخته شده برای کلونینگ و بیان پروتئین‌های نو ترکیب در باکتری اشرشیاکلی می‌باشد، بنابراین در این مطالعه ما از سیستم پروکاریوتی pET21 جهت کلون زن NA استفاده کردیم (6). از آنجایی که باکتری میزبان برای این وکتور باکتری E.coli مهندسی شده با نام BL21 است، بنابراین پس از تکثیر در سویه TOP10^f به سویه بیانی BL21 به خوبی منتقل شد و بیان قابل توجه پروتئین در زمان 16 ساعت و میزان 0/5 میلی‌مولار از القاگر IPTG مناسب بودن این سیستم بیانی را برای تولید نو ترکیب این پروتئین تایید می‌کند. با توجه به نتایج به دست آمده از SDS-PAGE و آنالیز غلظت پروتئین باندها توسط Image، بهترین بیان در غلظت 0/5 میلی‌مولار و در مدت زمان یک شبانه روز (16 ساعت) پس از القا انتخاب شد و جهت تایید پروتئین نو ترکیب دارای دنباله هیستیدینی بیان شده از روش وسترن بلات استفاده شد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه با عنوان "همسانه سازی و بیان آنتی ژن نو ترکیب نور آمینیداز ویروس آنفلوانزا A به منظور استفاده در تست‌های تشخیصی" مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه مالک اشتر می‌باشد که تمام پروژه در بخش آنفلوانزا و سایر ویروس‌های تنفسی انستیتو پاستور ایران و با حمایت مالی آن با کد اخلاق IR.pll.REC.1395.82 انجام شد.

References

1. Najafi S, Behzadian F, Fotuhi F, Fallah Mehrabadi J. Construction of a recombinant bacmid DNA in order to express Neuraminidase gene of influenza virus H1N1. J Arak Univ Med Sci 2012; 15(5): 58-65 (Persian).
2. Farahmand B, Khodabandeh M, Mahboudi F, Fotuhi F, Barkhordari F, Saleh M, et al. Isolation, cloning, and sequencing of influenza A (H1N1) hemagglutinin for production of hemagglutinin gene bank. J Arak Univ Med

در سال 2020 میلادی عبداللهی و همکارانش با بررسی 28 نوع ژنوم ویروس H5NX در حال گردش در ایران، اذعان داشتند که شواهدی از انتشار این ویروس از ایران به خاورمیانه وجود دارد، بنابراین ایران ممکن است یک نقطه داغ برای انتشار ویروس فوق حاد پرندگان و ایجاد تنوع ژنتیکی جدید باشد (5). ژن مورد بررسی در این مطالعه ژن NA ویروس بود که آنتی‌ژن‌های ساختاری آن قادر است پاسخ ایمنی هم‌مورال را تحریک کند (۱۰،۷،۱). محققان بسیاری بر این باورند که روش‌های تشخیصی آنفلوانزای مرغی (H5N1) بر پایه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی کلونال بسیار مفیدتر بوده و مشکلات روش‌های سنتی از قبیل روش مهار هم‌گلوتیناسیون (HI) و روش‌های ایمونوفلورسانس را ندارند (۱۲،۱۱). محققان دریافتند که واکنش‌های آنفلوانزا بر پایه آنتی ژن NA ویروس، می‌تواند بسیار مفید بوده و عقیده دارند که باید واکنش‌های فعلی را با NA بهبود بخشند و یا باید از آن به عنوان یک واکنش بالقوه برای جایگزینی واکنش‌های غیرفعال فعلی برای جلوگیری از بروز AI استفاده کرد (13-17). به دنبال تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی اولیه روی ژن NA از نظر شاخص‌های مختلف، مشاهده کردیم که مولکول NA می‌تواند به خوبی و به صورت پایدار در یک میزبان پروکاریوتیک بیان شود و بر اساس مکان‌های اپی‌توبی پیش‌بینی شده، به‌طور بالقوه قادر به تحریک سیستم ایمنی بدن علیه ویروس است و می‌تواند به‌طور مستقیم در آزمایشات سرولوژی برای تشخیص استفاده شود. دلایل استفاده از TA و وکتور قبل از استفاده از وکتور اصلی این است که کلونینگ با این روش به سرعت انجام می‌شود

- Sci 2011; 13(53): 59-67 (Persian).
3. Behzadian F, Goodarzi Z, Saberfar E. Construction of a new recombinant baculovirus encoding HA, NA, and M1 proteins of swine influenza (H1N1) virus and its expression in insect cells. *J Arak Univ Med Sci* 2013; 15(8): 16-25 (Persian).
 4. Aliakbari M, Behzadian F, Deldar AA, Mahyad B, Bidram M, Bahreinian M. Secretory expression of hemagglutinin globular domain (HA1) of the influenza A (H5N1) virus in *Bacillus subtilis*. *Iran J Med Microbiol* 2015; 9(3): 48-53 (Persian).
 5. Abdollahi H, Ali ASM, Monne I, Milani A, Habibi M, Zamperin G, et al. Spatial spread and emergence of reassortant H5 highly pathogenic avian influenza viruses in Iran reassortant H5 highly pathogenic avian influenza virus in Iran. *Infect Genet Evol* 2020; 83: 104342.
 6. Fiebig L, Soyka J, Buda S, Buchholz U, Dehnert M, Haas W. Avian influenza A (H5N1) in humans: new insights from a line list of World Health Organization confirmed cases, September 2006 to August 2010. *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Lesmaladies Transmissibles=European Communicable Disease Bulletin* 2011; 16(32).
 7. Subathra M, Santhakumar P, Satyam Naidu S, Lakshmi Narasu M, Senthilkumar TMA, Lal SK. Expression of Avian Influenza Virus (H5N1) Hemagglutinin and Matrix Protein 1 in *Pichia pastoris* and Evaluation of their Immunogenicity in Mice. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; 172: 3635-3645.
 8. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(13): 3688-3691.
 9. NEBcutter V2.0. 2020. Available from: <http://www.labtools.us/nebcutter-v2-0>.
 10. Behzadian, F, Goodarzi Z, Fotouhi F, Saberfar E. Baculoviral Co-Expression of HA, NA and M1 Proteins of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Insect Cells. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2013; 6(9): e7665 (Persian).
 11. Shoman SA, Khodier MH. Rapid detection of the avian influenza virus H5N1 subtype in Egypt. *African Journal of Biotechnology* 2013; 12(19).
 12. Khurana S, Sasono P, Fox A, Van Kinh N, Thai PQ, Hien NT, Liem NT, Horby P, Golding H. H5N1-SeroDetect EIA and rapid test: a novel differential diagnostic assay for serodiagnosis of H5N1 infections and surveillance. *Journal of Virology* 2011; 85(23): 12455-12463.
 13. Eichelberger MC, Monto AS. Neuraminidase, the forgotten surface antigen, emerges as an influenza vaccine target for broadened protection. *The Journal of Infectious Diseases* 2019; 219(Supplement_1): S75-S80.
 14. Chen P, Ding L, Jiang Y, Zeng X, Deng G, Shi J, Li Y, Liu L, Zhao Y, Hu Y, Liu J. Protective efficacy in farmed ducks of a duck enteritis virus-vectored vaccine against H5N1, H5N6, and H5N8 avian influenza viruses. *Vaccine* 2019; 37(40): 5925-5929.
 15. Schön J, Ran W, Gorka M, Schwemmle M, Beer M, Hoffmann D. A modified live bat influenza A virus-based vaccine prototype provides full protection against HPAIV H5N1. *Npj Vaccines* 2020; 5(1): 1-12.
 16. Gomaa MR, Khalil AA, Kandeil A, Sabir JS, Kayed A, Moatasim Y, El-safty MM, Kayali G, Ali, MA. Development of an effective contemporary trivalent avian

- influenza vaccine against circulating H5N1, H5N8, and H9N2 in Egypt. Poultry science 2019; 98(12): 6289-6295.
17. Giurgea LT, Morens DM, Taubenberger JK, Memoli MJ. Influenza Neuraminidase: A Neglected Protein and Its Potential for a Better Influenza Vaccine. Vaccines 2020; 8(3): 409.