BRIEF REPORT

Prokaryotic Expression of the Influenza A (H5N1) Neuraminidase

Zahra Latif[1,2],
Behrokh Farahmand[3],
Maryam Saleh[4],
Zahra Barghi[5]

[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: zfotoukian@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و یکم شماره 195 فروردین سال 1400 (102-94)

بیان پروکاریوتی آنتی ژن نورآمینیداز ویروس آنفلوانزای A (H5N1)

زهرا لطیف[1,2]
بهرخ فرهمند[3]
مریم صالح[4]
زهرا برقی[5]

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 درگردش باشد وتوانایی انتشار از انسان به انسان پیدا کند. بنابراین راه‌اندازی تست‌های تشخیصی برای کنترل عفونت آنفلوانزا ضروری است. مطالعات در مورد توالی اسیدهای آمینه پروتئین نورآمینیداز (NA) ویروس آنفلوانزا نشان داده است که NA ایمنی زاترین پروتئین در حیوانات است و می‌تواند سیستم ایمنی هومورال را تحریک نماید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ویروس آنفلوانزا (A/Indonesia/5/2005: H5N1) در pET21a کلون و در میزبان (BL21) E. coli بیان شد. سپس میزان بیان NA از نظر متغیرهای غلظت القاگر IPTG و زمان بهینه‌سازی شد.

یافته‌ها: نتایج، صحت ساختار Pet21a-NA را نشان داد. باندهای ظاهرشده با وزن مولکولی موردانتظار (38KDal) روی SDS-PAGE با وسترن بلات تایید شد که بیانی موفقیت‌آمیز از پروتئین هدف درسویه E. coli BL21 بود. درتجزیه و تحلیل درون رایانه‌ای، درستی اپی‌توپ عمده در ساختار نسخه NAتولید شده دراین مطالعه را نشان داد.

استنتاج: NAنوترکیب جدید می‌تواند به‌طور مستقیم در آزمایشات سرولوژی برای تشخیص استفاده شود. همچنین می‌تواند در معرض تهیه آنتی‌بادی پلی کلونال قرارگیرد، که به عنوان ماده اساسی در تجزیه و تحلیل وسترن بلات و سایر مطالعات ایمونولوژیک مانند ELISA، ایمونوسیتوشیمی استفاده شده است.

واژه های کلیدی: نورآمینیداز، سیستم پروکاریوت، تست‌های تشخیصی، ویروس آنفلوانزای A (H5N1)

مقدمه

بیماری آنفلوانزا دارای اهمیت جهانی بوده و نه تنها در جمعیت‌های انسانی بلکه در پرندگان و حیوانات قادر به‌گسترش می‌باشد(۱،۲). ازجمله مهم‌ترین پروتئین‌های سطحی ویروس می‌توان به نورآمینیداز (NA) اشاره نمود که به صورت زوایدی روی پوشش لیپیدی نمایان می‌شود(1). اولین پاسخ ایمنی نسبت به ویروس آنفلوانزای نوع A در بدن درپی عفونت آنفلوانزا از طریق تولید آنتی‌بادی‌ها برعلیه نورآمینیداز صورت می‌گیرد(3). نورآمینیداز موجب رها شدن ویروس از سلول‌های آلوده به عفونت و درگیرشدن سلول‌های سالم می‌شود بنابراین

مولف مسئول: بهرخ فرهمند - تهران: خیابان پاستور، پلاک 69 ، انیستیتو پاستور تهران E-mail: farahmand.b2@gmail.com
1. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی مولکولی، پژوهشکده علوم وفناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
2. بخش آنفولانزا وسایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران
3. استادیار، بخش آنفولانزا وسایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران
4. دکتری میکروبیولوژی، بخش آنفولانزا وسایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران
5. کارشناسی ارشد بیوشیمی، بخش آنفولانزا وسایر 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

کاندید مناسبی برای تست‌های تشخیصی و واکسن‌ها است. شواهد تجربی در مورد ویروس‌های آنفلوانزا 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 نورآمینیدازدر سیستم پروکاریوتی به‌طور بالقوه می‌تواند راهبرد بسیار موثری برای تولید مقادیر زیادی از نورآمینیدازدر مدت‌زمانی‌کوتاه 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 هماگلوتیناسیون شده و در نهایت منجر به از بین رفتن توانایی ویروس در ایجاد عفونت می‌شود(5). ویروس فوق حادپرندگان H5N1 علاوه بر بیماری‌زایی در پرندگان باعث بیماری‌زایی در انسان وحیوانات نیز می‌شود و انتقال انسان به انسان هم مشاهده شده است(6)، بنابراین مطالعه حاضر بر روی این نوع ویروس از انواع آنفلوانزا صورت گرفت و با هدف تولید پروتئین نوترکیب نورآمینیداز در سیستم پروکاریوتی درمدت زمان کوتاه جهت استفاده درتست‌های تشخیصی انجام گردید.

مواد و روش ها

ابتدا آنالیز بیوانفورماتیکی روی توالی ژنومی و اسیدآمینه‌ای پروتئین NA صورت گرفت و توالی نوکلئوتیدی ژن NA ویروس آنفلوانزا (A/Indonesia/5/2005:H5N1) باکد دسترسی EU146623.1 از پایگاه داده NCBI به‌دست آمد(7). توالی نوکلئوتیدی موردنظر ازجهت 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 مطالعه تجربی در بخش آنفلوانزای 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 شماره1). برای طراحی پرایمر از نرم‌افزار 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-BamH1	5′- CTAGGATCCATGATCTCAATATG	39/1	57/08	23
R-Xho1	5′- TATCTCGAGCATTTCAAAGCC	42/9	55/92	21

یافته ها

برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR و مخلوط واکنش PCR به ترتیب در جداول شماره 2و3 آمده است. master mix برای PCR نیز شامل 20 میکرولیتر dNTPs، 100میکرولیتر بافر PCR(10x)،30 میکرولیتر Mgcl2 (25میلی 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 در واکنش PCR

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

جدول شماره 3: مخلوط واکنش PCR

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

خالص‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت PCR Purification Kit QIAquick® انجام شد. برای انجام همسانه‌سازی در وکتور PGEM-TEasy، واکنش لیگاسیون بین محصول PCR آماده شده و وکتور تکثیری PGEM-Teasy (PGEM-TEasy Promega Lot.No.0000287313 REF.A137A) با توجه به این‌که اندازه وکتور 3000 کیلوباز می‌باشد و معمولا برای هر واکنش ligation حداقل 50 نانوگرم از T وکتور لازم می‌باشد و در بیش‌تر 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 شماره4: مواد و مقادیر موردنیاز از آن ها برای تهیه مخلوط واکنش اتصال ژن به T وکتور

مواد مورد نیاز	مقدار (میکرولیتر)
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 کردو در پلیت‌های LB-Agar دارای آمپی‌سیلین، X-Gal و IPTG کشت داده شد، برای شناسایی پلاسمیدهای نوترکیب از کلنی‌های رشد کرده بر روی پلیت‌ها تست rapid minipreb انجام شد. سپس از کلنی‌هایی که نتایج آن‌ها مثبت بود، استخراج پلاسمید صورت گرفت و سپس با هضم آنزیمی BamH1 و Xho1 پلاسمید نوترکیب 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 BamH1 و Xho1 صورت گرفت. سپس تخلیص وکتور pET21 خطی شده انجام شد. تخلیص ژن NA به روش Gel extraction با کیت QIA quick 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 به1	1 به3
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 (میکرولیتر)	1	1
اب مقطر(میکرولیتر)	1	0/75
حجم کل(میکرولیتر)	10	10

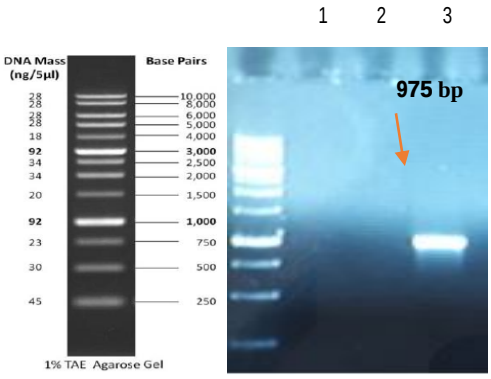
آنگاه pET21-NA به میزبان باکتریایی TOP10f' مستعد شده انتقال پیدا کرد و باکتری‌های ترانسفورم شده، روی پلیت‌های حاوی آمپی‌سیلین و تتراسایکلین کشت داده شدند، جهت شناسایی پلاسمیدهای نوترکیب از کلنی‌های رشد کرده بر روی پلیت‌های حاوی آمپی‌سیلین، کلونی PCR و تست rapid minipreb انجام گردید. سپس مانند قبل از کلنی‌هایی که نتایج آن‌ها مثبت بود، استخراج پلاسمید انجام گرفت و سپس با هضم آنزیمی BamH1 و Xho1 پلاسمید نوترکیب تایید نهایی شد. جهت بررسی بیان ژن و تولید پروتئین موردنظر، باید پلاسمید نوترکیب به داخل میزبان پروکاریوتی E. Coli سویه بیانی BL21 انتقال یابد، بنابراین یک تک کلون از کلنی های 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 میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتقال می‌شود. فالکون‌ها در انکوباتور شیکردار 37 درجه سانتی‌گراد قرار می گیرند تا زمانی که به 600nm OD بین 0/4 تا 0/6 برسند. سپس 1 میلی‌لیتر از آن به عنوان نمونه غیرالقا برداشت می‌شود و جهت بهینه‌سازی القای بیان، ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (IPTG) با غلظت‌های 1mM، 0.5mM و 0.1mM مورد آزمایش قرار گرفت و در نهایت برای هر لوله با غلظت مختلف القاگر،

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

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 دسیل سولفات (SDS-PAGE) 12درصد 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 ازآنتی‌هیس کنژوگه باHRP با رقت 1/6000علیه دم پلی‌هیستیدینی پروتئین وبا استفاده از سوبسترای تترامتیل بنزیدین (TMB) از شرکت SIGMA(110M1427) انجام شد. مارکر مورد نظر Prestained Protein Ladder شرکت سیناکلون بود.

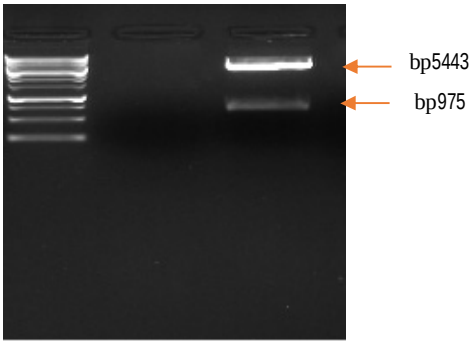
یافته ها و بحث

پژوهش حاضر طی سال‌های 1399-1398 در بخش آنفلوانزای انیستیتوپاستور تهران انجام شده است. در تصویر شماره 1 باند به‌دست آمده توسط الکتروفورز از محصول PCR که شامل ژن NA به همراه جایگاه‌های برش دو آنزیم BamH1/Xho1 که توسط پرایمرها طراحی شده است، به خوبی نمایان می‌باشد. اندازه این توالی 975bp است.



تصویر شماره 1: الکتروفورز روی ژل اگارز 1درصد ازمحصولPCR 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 می باشد.

در تصویر شماره 2 نتایج حاصل از هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pET21-NA به وسیله آنزیم‌های BamH1 و Xho1 را مشاهده می‌کنید که در تصویر خروج قطعه 975 bp نشان‌دهنده صحت همسانه‌سازی می‌باشد. تصویر شماره 3 نقشه pET21 به‌کار رفته دراین پژوهش را نشان می‌دهد.

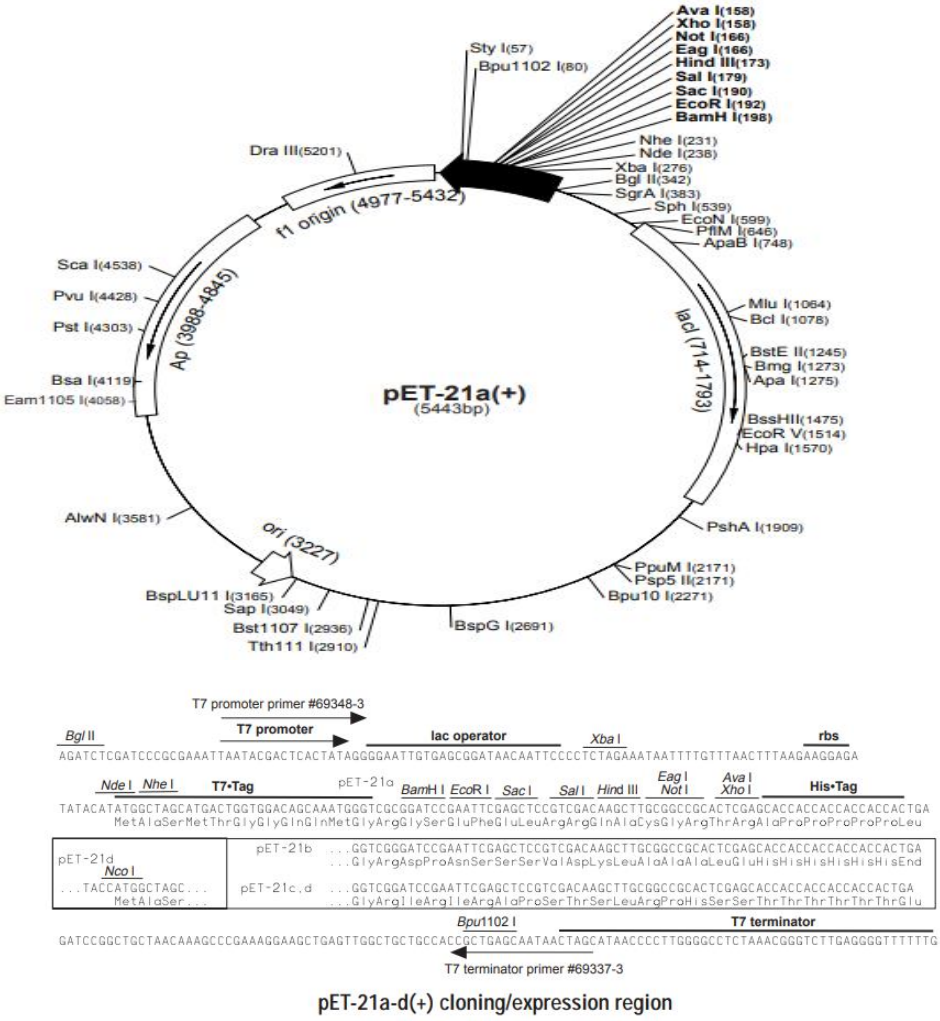


تصویر شماره2: الکتروفورز مربوط به نتیجه هضم آنزیمی PET21-NA روی ژل آگارز 1 درصد چاهک 1-1 kb DNA ladder (Cinnagen Cat.NO. PR901644) و چاهک 2- محصول هضم با دو آنزیم BamH1 و Xho1 و خروج قطعه 975 bp ژن NA و قطعه‌ی 5443bp وکتور PET21

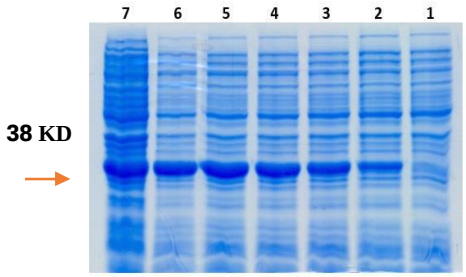
نتایج حاصل از تایید بیان پروتئین موردنظرتوسط SDS-PAGE در تصویر شماره 4 ارائه شده است، با توجه به این‌که وزن تقریبی پروتئین نوترکیب نورآمینیداز حدودا 38 کیلودالتون است، باند مشخصی در آن ناحیه از ژل مشاهده شد و پروتئین حاصل از غلظت 0/5 میلی‌مولاز از IPTG و مدت زمان 16ساعت بعداز افزودن القاگر، به عنوان 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 می نمایید که باند مربوط به پروتئین NA با وزن مورد انتظار 38 KD نمایان است.

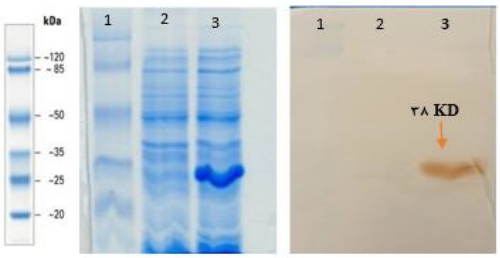
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]



تصویر شماره3: نقشه وکتوربیانی pET21



تصویر شماره4: SDS-PAGE نمونه های رسوب باکتری BL21 پیش و پس از القای بیان پروتئین نوترکیب NA با غلظت 0/5میلی مولار القاگر IPTG در دمای 37 ℃، ستون1-نمونه پروتئین پیش از القا، ستون 2تا 6-نمونه های پروتئینی ساعات 1تا 5 پس از القا بیان، ستون7-نمونه ی پروتئینی 16ساعت(Over night) پس از القا بیان می باشد. وزن مولکولی پروتئین نوترکیب موردنظر38 کیلودالتون است.



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 پروتیین نوترکیب NA

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

در سال 2020میلادی عبداللهی و همکارانش با بررسی 28نوع ژنوم ویروس H5NX درحال گردش درایران، 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 هومورال را تحریک کند(۱۰،۷،۱). محققان بسیاری بر این باورند که روش‌های تشخیصی آنفلوانزای مرغی(H5N1) برپایه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال وپلی کلونال بسیار مفیدتر بوده و مشکلات روش‌های سنتی از قبیل روش مهار هماگلوتیناسیون (HI) و روش‌های ایمونوفلورسانس را ندارند(۱۲،۱۱). محققان دریافتند که واکسن‌های آنفلوانزا برپایه آنتی ژن NA ویروس، می‌تواند بسیار مفید بوده و عقیده دارند که باید واکسن‌های فعلی را با NA بهبود ببخشند و یا باید از آن به عنوان یک واکسن بالقوه برای جایگزینی واکسن‌های غیرفعال فعلی برای جلوگیری از بروز AI استفاده کرد(17-13). به‌دنبال 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 براساس مکان‌های اپی‌توپی 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 وکتور قبل از استفاده از وکتور اصلی این است که کلونینگ با این روش به سرعت انجام می‌شود 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 نوترکیب درباکتری اشرشیاکلی می‌باشد، بنابراین دراین مطالعه ما از سیستم پروکاریوتی pET21 جهت کلون ژن NA استفاده کردیم(6). ازآن‌جایی که باکتری میزبان برای این وکتور باکتری E.coli مهندسی شده با نام BL21 است، بنابراین پس از تکثیر در سویه TOP10f' به سویه بیانی BL21 به خوبی منتقل شد و بیان قابل توجه پروتئین در زمان 16ساعت و میزان 0/5 میلی‌مولار از القاگر IPTG مناسب بودن این سیستم بیانی را برای تولید نوترکیب این پروتئین تایید می کند. با توجه به نتایج به دست آمده از SDS-PAGE وآنالیز غلظت پروتئین باندها توسط Image، بهترین بیان در غلظت 0/5 میلی‌مولار ودرمدت زمان یک شبانه روز (16ساعت) پس از القا انتخاب شد وجهت تایید پروتئین نوترکیب 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 نوترکیب نورآمینیداز 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 کداخلاق 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, Fotouhi 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

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 influenzaA (H5N1) in humans: new insights from a line list of World Health OrganizaIon confirmedcases, September 2006 to August 2010. Euro Surveillance: BulleIn Europeen Sur Lesmaladies Transmissibles=European Communicable Disease BulleIn 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]