ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):15-21

Expression, Purification and Immunogenicity Evaluation of Recombinant Fusion Protein (F) from Newcastle Virus in Animal Model

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Takrim S.[1] *MSc*,
Motamedi M.[1] *PhD*,
Jafari M.[1] *MSc*,
Amani J.[2] *PhD*,
Salmanian A.H.*[1] *PhD*

How to cite this article
Takrim S, Motamedi M, Jafari M, Amani J, Salmanian A H. Expression, Purification and Immunogenicity Evaluation of Recombinant Fusion Protein (F) from Newcastle Virus in Animal Model. Modares Jou-rnal of Biotechnology. 2019; 10(1):15-21.

[1]National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
[2]Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

***Correspondence**
Address: Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Pajoohesh Boulevard, Shahrak-e Pajoohesh, 15 Kilometer Tehran-Karaj Highway, Tehran, Iran, Postal Code: 1497716316
Phone: +98 (21) 44787365
Fax: +98 (21) 44580395
salman@nigeb.ac.ir

Article History
Received: November 14, 2016
Accepted: June 13, 2017
ePublished: March 16, 2019

ABSTRACT

Newcastle disease virus (NDV) is an infectious agent of a large variety of birds, including chickens, which poses a real threat to the poultry industry. This virus is a member of the avian Paramyxoviridae. NDV is enveloped with membrane-embedded spikes consisting of glycosylated hemagglutinin (HN) and fusion (F) proteins. The mean death time after vNDV infection is 2-6 days, hence, the presence of preexisting antibodies prior to infection appears to be the most critical protection from this disease. Antibodies produced against the HN and F transmembrane surface glycoproteins are able to neutralize NDV upon subsequent infection and inhibition of viral fusion with the host cell membrane, respectively. In this experimental study, the immunogenic epitopes of the F protein of NDV were designed artificially and were expressed in the heterologous system (Escherichia coli), using the appropriate vector (pET32a). In order to evaluate the immunogenicity of the recombinant f fragment, the protein was injected into the animal model. Immune response and the rise of specific antibodies titers were determined in immune sera. The results showed that immunization of mice with this recombinant protein could elicit significant serum IgG antibody up to 1/204800 titer. We show that the recombinant F protein was recognized by the mice sera immunized with the commercial vaccine. Moreover, the reactivity of vaccine strain virus with sera from F protein immunized mice suggested that the F protein is able to present similar epitopes with viral vaccine strain and hopefully could stimulate the immune system of the animal against the infectious viruses.

Keywords Newcastle disease virus; Fusion protein epitopes; Escherichia coli; Immunogenicity

CITATION LINKS

[1] Molecular characterization of Newcastle disease virus ... [2] A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus ... [3] Alteration in lymphocyte responses, cytokine and chemokine ... [4] The long view: A selective review ... [5] Beta-chitosan extracted from Loligo Japonica for ... [6] Newcastle disease virus: Current status ... [7] Genomic characterisation of two virulent ... [8] Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies ... [9] Pathotyping of local isolates Newcastle disease virus ... [10] Isolation and identification of Newcastle disease ... [11] Complete nucleotide sequence of Newcastle ... [12] Generation by reverse genetics of an ... [13] Human tumor cell modification by virus infection: An ... [14] Newcastle disease ... [15] Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of ... [16] Protection of chickens against overt clinical disease and ... [17] A recombinant fowlpox virus expressing the ... [18] Protection of chickens with a recombinant fowlpox ... [19] Generation by reverse genetics of an effective ... [20] Economic benefits and costs associated with ... [21] Current status of veterinary ... [22] Newcastle disease virus fusion protein expressed in ... [23] NNewcastle disease virus f glycoprotein ... [24] In silico design of multimeric HN-F antigen as a ... [25] Newcastle disease and other avian ... [26] The avian response to Newcastle disease ... [27] Expression systems for production of heterologous ... [28] Bacterial expression systems for recombinant ... [29] Engineering of therapeutic proteins production in ... [30] Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia ... [31] Cloning and expression of the nucleoprotein gene (NP) of Newcastle Disease Virus (NDV) in Escherichia coli for immunodiagnosis ... [32] Heterologous expression, characterization and evaluation of the matrix protein ... [33] Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is ... [34] Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

بیان، خالص‌سازی و بررسی ایمنی‌زایی پروتئین مصنوعی فیوژن (F) ویروس نیوکاسل در مدل حیوانی

سمیه تکریم MSc
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
محمدجواد معتمدی PhD
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
محیات جعفری MSc
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
جعفر امانی PhD
مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
علی‌هاتف* سلمانیان PhD
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

چکیده
ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) عامل عفونی طیف وسیعی از پرندگان به‌ویژه جوجه‌ها است که همواره یک خطر جدی برای صنعت مرغداری است. این ویروس جزء خانواده پارامیکسوویریده بوده و بر سطح غشای ویروس گلیکوپروتئین‌های فیوژن (F) و هماگلوتینین نورآمینیداز (HN) ساختارهای زائده‌مانندی را تشکیل می‌دهد. از آنجا که در حالت‌های حاد بیماری، زمان مرگ پس از ابتلا تنها حدود ۶-۲ روز است بنابراین ایجاد حفاظت و حضور آنتی‌بادی‌های محافظت‌کننده در بدن پرنده به‌منظور پیشگیری از بیماری بسیار حائز اهمیت است. مشخص شده است که آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه گلیکوپروتئین‌های سطحی هماگلوتینین و پروتئین فیوژن، قادر به خنثی‌سازی NDV و جلوگیری از گسترش و فعالیت آن می‌شوند. در این پژوهش تجربی، اپی‌توپ‌های ایمونوژن پروتئین F ویروس نیوکاسل به‌طور مصنوعی ساخته شده و در میزبان پروکاریوتی *اشریشیا کلی* با استفاده از ناقل مناسب (pET32a) بیان و به‌منظور بررسی ایمنی‌زایی در حیوان مدل (موش) از طریق تزریق، استفاده شدند. ایجاد ایمنی و افزایش تیتر آنتی‌بادی‌های ویژه پروتئین F در سرم موش‌های ایمن‌شده اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که ایمنی‌زایی موش‌ها با این پروتئین نوترکیب منجر به افزایش تیتر آنتی‌بادی از کلاس IgG شده و آنتی‌بادی‌های سرمی تا رقت ۱/۲۰۴۸۰۰ نیز قادر به شناسایی پروتئین نوترکیب بودند. علاوه بر این تشخیص پروتئین نوترکیب F توسط سرم موش ایمن‌شده با واکسن تجاری و همچنین شناسایی ویروس سویه واکسن توسط سرم حیوان ایمن‌شده با پروتئین F نوترکیب توسط روش الایزا نشان داد که این پروتئین نوترکیب ضمن توانایی تحریک سیستم ایمنی حیوان مدل علیه ویروس‌های عفونی محیطی، قادر است اپی‌توپ‌های مشابه با سویه واکسن را نیز ارایه دهد.

کلیدواژه‌ها: ویروس بیماری نیوکاسل، اپی‌توپ‌های F، *اشریشیا کلی*، ایمنی‌زایی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۲۳
*نویسنده مسئول: salman@nigeb.ac.ir

مقدمه

بیماری نیوکاسل (ND) یک بیماری خطرناک در پرندگان خانگی و وحشی در سراسر دنیا محسوب می‌شود[1]. این بیماری پس از آنفولانزای طیور به‌عنوان دومین بیماری مهم طیور و دیگر پرندگان در سراسر دنیا در نظر گرفته شده و به‌دلیل طبیعت سخت بیماری، در لیست A سازمان بین‌المللی بهداشت حیوانات (OIE) قرار دارد. بیماری نیوکاسل در بعضی از مناطق انزوتیک (بیماری غالب و بومی در آن منطقه) است و یک تهدید ثابت برای بسیاری از پرندگان به شمار می‌آید[2, 3]. با توجه به رشد پرورش طیور طی ۴۰ سال اخیر، بیماری نیوکاسل در بسیاری از کشورها به یک مشکل جدی برای صنعت مرغداری تبدیل شده است و از همین‌رو تلاش‌های زیادی در جهت کنترل این بیماری و شناخت ویروس مولد آن صورت گرفته است[4, 5]. سویه‌های NDV براساس علایم کلینیکی و قدرت بیماری‌زایی به سه گروه تقسیم می‌شوند: ۱) ولوژنیک (خیلی خطرناک)؛ با مرگ‌ومیر بالا، ۲) مزوژنیک (ملایم)؛ با علایم تنفسی و عصبی همراه با مرگ‌ومیر کمتر، ۳) لنتوژنیک (غیرپاتوژنیک)؛ با عفونت کم یا نامعلوم مجاری تنفسی[6, 7]. ابتلای پرندگان به سویه‌های خطرناک ویروس بیماری نیوکاسل باعث مرگ‌ومیر ۱۰۰% جوجه‌های مستعد می‌شود[4, 8].

عامل اصلی این بیماری، ویروس نیوکاسل (NDV) است که به سروتیپ یک تعلق دارد[9, 10]. ویروس نیوکاسل تنها عضو خانواده پارامیکسوویریده بوده که میزبان اصلی آن پرندگان است و در پستانداران بیماری‌زایی خاصی را ایجاد نمی‌کند[11]. از نظر ساختاری دو گلیکوپروتئین F و HN جزء آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس هستند که در بدن حیوان نقش حفاظتی را نیز بر عهده دارند[12]. اولین مرحله در بروز عفونت، اتصال ویروس به سطح سلول میزبان است. این آلوده‌سازی با واسطه مولکول HN شروع می‌شود که به گیرنده‌های سیالیک‌اسیدی (گانگلوزید) سطحی میزبان متصل می‌شوند. اتصال نهایی و عفونت از طریق الحاق ویروس به غشای سلولی توسط پروتئین فیوژن (F) صورت می‌گیرد[13]. از میان پروتئین‌های ویروس نیوکاسل، پروتئین F برای شروع عفونت نقش اساسی ایفا می‌کند. پروتئین F به شکل پیش‌ساز F0 ساخته می‌شود که از طریق شکست توسط پروتئازهای سلول‌های میزبان به قطعات F1 و F2 (HR-A، HR-B) تقسیم می‌شود. این شکست پروتئولیتیکی برای فعالیت الحاقی و عفونی ویروس لازم است[12, 14]. انتهای آمینی قطعه F1 به‌شدت هیدروفوب است و به‌عنوان پپتید ورودی عمل می‌کند و در واقع وظیفه الحاق ویروس با غشاهای سلولی را بر عهده دارد[14, 15].

ایمنی هومورال و ایمنی سلولی (CMI) هر دو در حفاظت و پاک‌سازی NDV نقش دارند. به‌دلیل اینکه زمان مرگ بعد از ابتلا به عفونت توسط سویه‌های ولوژنیک (vNDV) به‌مدت ۶-۲ روز است، ایجاد حفاظت و حضور آنتی‌بادی‌ها قبل از بروز عفونت، برای حفاظت از بیماری‌های کلینیکی حائز اهمیت است[10, 16]. آنتی‌بادی‌های تولیدشده بر علیه گلیکوپروتئین‌های درون‌غشایی هماگلوتینین (HN) و فیوژن (F) نقش حفاظتی داشته و قادر به خنثی‌سازی NDV هستند[17, 18].

سویه‌های لنتوژنیک NDV مانند Hitcher B1 و LaSota در سراسر دنیا به‌عنوان واکسن‌های زنده بر علیه بیماری نیوکاسل استفاده می‌شوند. با اینکه واکسن‌های موجود حفاظت مناسبی نسبت به بیماری را در پرندگان ایجاد می‌کنند ولی به‌طور کامل نمی‌توانند از عفونت با سویه‌های بسیار بیماری‌زا یا مساله بسیار مهم‌تر، آزادسازی ویروسی جلوگیری به عمل آورند و به همین دلایل بیماری می‌تواند در پرندگان واکسینه‌شده مجدداً مشاهده شود. شیوع‌های اخیر ND در بخش‌های مختلف دنیا به‌علت عدم کارآیی کامل واکسن‌های استفاده‌شده و ظهور سویه‌های جدید این مساله را ثابت کرده است[7, 19]. از طرف دیگر توجه ویژه نسبت به کاهش میزان آزادسازی ویروس از یک پرنده به پرنده دیگر در پرندگان واکسینه‌شده از شاخصه‌های مهم و تاثیرگذار در تولید یک واکسن است. این مساله به‌ویژه در کشورهایی که در آنها سویه های بسیار بیماری‌زا (ولوژنیک) به‌صورت NDV بومی وجود دارند، بسیار حایز اهمیت است[5]. استفاده از رویکرد جدید تکنولوژی ژن

Archive of SID
www.SID.ir

نوترکیب در صنعت واکسن‌سازی از طریق تشخیص اپی‌توپ‌های مهم و ایمونولوژیک آنتی‌ژن (به‌جای استفاده از کل ویروس که احتمال پراکنده‌شدن از حیوان واکسینه و شیوع سویه‌های جدید، ناشی از نوترکیبی با سویه‌های وحشی) را دارد، منجر به ظهور واکسن‌های زیرواحدی موثر و قوی شده است که اثرات جانبی کمتری (در مقایسه با واکسن‌های موجود) دارند[20, 21].

گزارش‌ها نشان داده است که عامل اصلی عفونت‌زایی و انتشار ویروس نیوکاسل از یک سلول به سلول دیگر پروتئین فیوژن (F) است[5]. همچنین براساس مطالعات صورت گرفته مولکول F به‌تنهایی به‌عنوان یک ایمونوژن قوی و موثر شناخته شده است که قادر به ایجاد پاسخ ایمنی مخاطی و خونی مناسب و حفاظت بخش در مدل حیوانی است[22, 23]. بنابراین انتظار می‌رود با ایجاد اختلال در عملکرد این مولکول در بدن پرنده با روش‌های مختلف از جمله ایجاد ایمنی هومورال (تولید آنتی‌بادی) اختصاصی بر علیه این آنتی‌ژن، بتوان از بروز بیماری، شیوع آن و همچنین عواقب بعدی احتمالی آن که می‌تواند مرگ‌ومیر وسیع در بین طیور باشد، پیشگیری نمود. استفاده از بخش‌های ایمنی‌زایی که حاصل مقایسه توالی سویه مرجع با توالی بیش از صد سویه در حال گردش ویروس NDV است، به‌جای به‌کارگیری پروتئین کامل یا کل ویروس ضعیف‌شده می‌تواند سیستم ایمنی را به‌صورت هدفمند تحریک نموده و مهم‌تر از آن، نگرانی‌های حاصل از شیوع ژنوتیپ‌های جدید بیماری (در واکسیناسیون سنتی) در محیط را نیز کاهش دهد. هدف این تحقیق، انتخاب، بیان اپی‌توپ‌های اصلی این آنتی‌ژن دوقسمتی (F2-F1) در سیستم پروکاریوتی و بررسی ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب در حیوان مدل (موش آزمایشگاهی) و مقایسه ایمنی‌زایی آن با ویروس سویه واکسن است.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر توالی کامل پروتئین مصنوعی F و سویه مرجع NDV LaSota (به‌ترتیب شماره دسترسی: P35743 و P33614) از پایگاه داده‌های پروتئینی NCBI استخراج شد. برای مراحل همسانه‌سازی و بیان ژن، سویه‌های باکتری *اشریشیا کلی* سویه DH5α و سویه Rosetta-gami (DE3) از شرکت (اینویتروژن؛ ایالات متحده) تهیه شدند. پلاسمید pUC57 به‌عنوان یک ناقل همسانه‌سازی و تکثیر (فرمنتاز؛ ایالات متحده) و پلاسمید pET-32a به‌عنوان ناقل بیانی باکتری *اشریشیا کلی* برای بیان قطعه کلون‌شده در سیستم پروکاریوتی (نوآژن؛ ایران) تهیه شد. به‌منظور دست‌ورزی ژن مصنوعی و وکتورهای موردنظر از آنزیم‌های محدودکننده *Bam*H I و *Xho* I و آنزیم‌های T4 لیگاز، *pfu*پلی‌مراز (فرمنتاز؛ ایالات متحده) و *Taq*پلی‌مراز (فرادید دانش؛ ایران) استفاده شد. کیت استخراج محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)، کیت استخراج پلاسمید (روچ؛ سوئیس) و واکسن زنده ضعیف‌شده ویروس نیوکاسل (موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی؛ کرج؛ ایران) تهیه شدند.

تکثیر ژن *F* با استفاده از PCR: به‌منظور تکثیر سازه مصنوعی و دوقسمتی F واجد دو قطعه HR-A و HR-B که توسط یک لینکر پپتیدی کوتاه به همدیگر متصل شده‌اند از ساختار از پیش طراحی‌شده استفاده شد[24]. برای تکثیر ژن و تاییدهای مولکولی، پرایمرهای رفت (حاوی جایگاه BamH I برای کلونینگ) و پرایمر برگشت (دارای جایگاه Xho I و کدون خاتمه) طراحی شد. ترادف پرایمرها در جدول ۱ ارایه شده و جایگاه شناسایی آنزیم‌ها نیز به‌صورت زیرخط‌دار مشخص شده است.

جدول ۱) ترادف پرایمرهای رفت و برگشتی برای تکثیر قطعه F از ساختار اصلی

نام آغازگر	توالی	جایگاه آنزیمی	طول پرایمر (باز)
pETFF	5'TGTTCGGATCCAAAAAC ATCTCCATCCAAGA	G↓GATCC	۳۱
pETFR	5'CTATTGCTCGAGTTATG AATCGTACAGGATTGGGT	C↓TCGAG	۳۵

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده و پلاسمید حاوی ژن دوقسمتی (به‌عنوان الگو) انجام شد. واکنش با استفاده از آنزیم *pfu* پلی‌مراز، ۲/۵میلی‌مولار Mg^{+2} و دمای ۶۰°C برای اتصال پرایمرها و ۳۵ سیکل صورت گرفت.

همسانه‌سازی ژن در ناقل (pET-32a) و بیان ژن: پس از خالص‌سازی قطعه تکثیرشده از روی ژل آگارز و هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Xho* I/*Bam*HI، DNA مورد نظر در ناقل بیانی pET-32aیی که با همین آنزیم‌ها هضم شده بود کلون شد. پلاسمیدهای نوترکیب با روش شوک حرارتی وارد باکتری مستعد *اشریشیا کلی* سویه αDH5 شده و کلنی‌های نوترکیب روی محیط لوریا برتانی (LB) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتخاب و پس از تایید کلون‌های نوترکیب با روش PCR و هضم آنزیمی، ناقل نوترکیب خالص و با روش‌های مرسوم به باکتری *E. coli* مستعدشده سویه Rosetta-gami (DE3) منتقل شد. تعدادی از کلنی‌های حاوی سازه نوترکیب در محیط کشت مایع حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) کشت شده (۳۷°C؛ ۱۸۰rpm) و پس از رسیدن به غلظت مناسب (OD_{600}=۰/۶) با یک‌میلی‌مولار ماده القاکننده (IPTG) تحریک صورت گرفت. در زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۱۶ساعت پس از القا، نمونه‌برداری از باکتری‌ها انجام و پس از تخریب سلول‌ها، نمونه‌ها روی ژل پلی‌آکریل‌آمید دناتوره (SDS-PAGE) و پس از رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو آنالیز شد. به‌منظور تایید پروتئین تولیدشده از روش وسترن‌بلات با استفاده از آنتی‌بادی علیه دنباله هیستیدینی (6×His tag) استفاده شد.

تخلیص و دیالیز پروتئین F: پس از القا، باکتری‌ها با سانتریفوژ از محیط کشت جدا شده (۸۰۰۰rpm؛ ۱۵دقیقه) و رسوب در بافر دناتوره (دی‌سدیم‌فسفات ۱۰۰میلی‌مولار، اوریک‌اسید ۸مولار، تریس-HCL ۱۰میلی‌مولار و میزان pH برابر ۸) حل شد (۳۰دقیقه دمای اتاق/حرکات دورانی). بعد از مخلوط‌کردن محلول سانتریفوژ شده (۸۰۰۰rpm، ۲۰دقیقه، دمای اتاق) و محلول رویی به ستون Ni-NTA برده شد. مراحل شست‌وشو طبق روش استاندارد انجام و نمونه‌های خارج‌شده از ستون روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲% الکتروفورز شد.

به‌منظور حذف اوره موجود در محلول پروتئین، مقدار هم‌حجم از بافر واسرشتگی حاوی تثبیت‌کننده گلیسرول (سدیم‌کلرید ۱۰۰میلی‌مولار، گلیسین ۱۰۰میلی‌مولار، تریس ۱۰۰میلی‌مولار، ۲-مرکاپتواتانول ۱۴۰میلی‌مولار، گلیسرول ۲/۵% و میزان pH برابر با ۸/۵) به محلول پروتئین در حال مخلوط‌شدن به‌صورت تدریجی اضافه شد. سپس با هم حجم آن محلول بافر فسفات سالین (PBS) به‌مدت ۱۲ساعت (با دو بار تعویض) دیالیز شدند. در نهایت محلول پروتئین در دمای ۷۰°C- نگهداری شد. پروتئین حاصل برای مصارف ایمن‌سازی قابل استفاده است.

ایمن‌سازی حیوان آزمایشگاهی با پروتئین نوترکیب: تعداد ۱۳ سر

Archive of SID
www.SID.ir

موش بالب/سی ماده (یک گروه ۵تایی تزریق‌شده با سویه واکسن به‌عنوان کنترل مثبت، یک گروه ۵تایی تزریق‌شده با آنتی‌ژن F به همراه ۳ سرموش کنترل منفی) با سن ۶ تا ۷هفته‌ای به شکل سه گروه مجزا انتخاب شدند. گروه‌ها با آنتی‌ژن تخلیص‌شده F، واکسن ویروس نیوکاسل (کنترل مثبت) و بافر PBS (کنترل منفی) تزریق شدند. در تزریق اول ۸میکروگرم آنتی‌ژن مورد نظر به همراه ادجوانت کامل فروند به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. تزریقات دوم و سوم با همان مقدار آنتی‌ژن و با استفاده از ادجوانت ناقص فروند و به همان صورت تزریق شد. تزریق انتهایی بدون ادجوانت (۴میکروگرم) و به‌صورت صفاقی انجام شد. گروه کنترل منفی، بافر PBS و ادجوانت کامل را برای تزریق اول و برای تزریقات دوم و سوم بافر PBS را به همراه ادجوانت ناقص دریافت کردند. در مورد موش‌های کنترل مثبت پنج سر موش با ۱۰۰میکرولیتر از واکسن ضعیف‌شده ویروس در چهار دوره تزریق شدند. خونگیری از موش‌ها یک هفته بعد از هر تزریق انجام شد.

تعیین تیتر آنتی‌بادی به روش الایزا (ELISA): بعد از اندازه‌گیری میزان پروتئین نوترکیب محلول با روش برادفورد، میزان ۵۰۰نانوگرم از پروتئین خالص‌شده (F) در بافر پوشاننده (سدیم‌بی‌کربنات ۰/۲مولار، سدیم‌کربنات ۰/۲مولار و میزان pH برابر ۹/۸) حل و در هر چاهک از میکروپلیت قرار گرفت. سرم موش‌های ایمن‌شده با پروتئین باکتریایی F به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی ضدموش کونژوگه با HRP به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شد. آزمایش با سه تکرار انجام و نتایج در نمودار استاندارد قرار داده شدند. براساس آنالیزها میزان تیتر سرم و قدرت واکنش آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن نوترکیب به دست آمد.

یافته‌ها

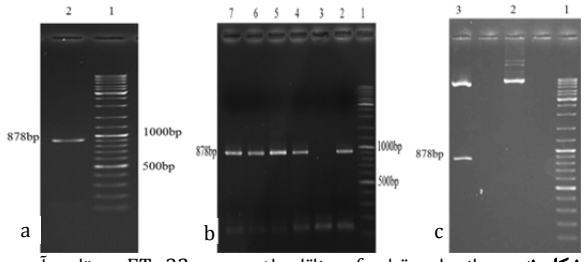
همسانه‌سازی قطعه *f* در ناقل پلاسمیدی pET- 32a و تایید آن: قطعه ژن *f* با پرایمرهای اختصاصی و با استفاده از ناقل پلاسمیدی اصلی تکثیر و قطعه مورد نظر (۸۷۸جفت‌بازی) روی ژل آگارز آنالیز شد (شکل ۱- a). قطعه تکثیرشده با آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I هضم و در ناقل pET-32a که با همین آنزیم‌ها هضم شده بود کلون شد. صحت کلون‌شدن با روش PCR (شکل ۱- b) و سپس با هضم آنزیمی (با آنزیم‌های مورد استفاده در کلونینگ) مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱- c).

کلنی‌های تاییدشده به درون میزبان مستعدشده *E.coli* سویه Rosetta-gami (DE3) منتقل و بیان پروتئین در کلنی‌های حاوی ژن، مورد ارزیابی قرار گرفت.

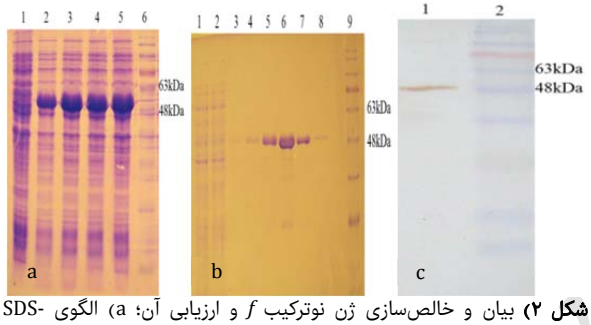
بیان ژن نوترکیب: باکتری‌های نوترکیب حاوی پلاسمید بیانی به همراه نمونه قبل از القا روی ژل آکریل‌آمید آنالیز شد (شکل ۲- a). پس از خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون Ni-NTA، با به‌کارگیری شرایط دناتوره و استفاده از گرادیان pH (شکل ۲، b) واکنش وسترن‌بلاتینگ با کمک آنتی‌بادی علیه دنباله هیستیدینی انجام شد (شکل ۲- c). پس از خالص‌سازی از ستون، میزان تولید پروتئین نوترکیب ۳۶میلی‌گرم به ازای هر لیتر محیط کشت برآورد شد.

ارزیابی تولید آنتی‌بادی به روش الایزا: به‌منظور تعیین تیتر آنتی‌بادی علیه پروتئین نوترکیب و همچنین تعیین تیتر خنثی‌سازی در سرم حیوانات ایمن‌شده از روش الایزا استفاده شد. نتایج حاصل از آزمایش الایزا با پروتئین نوترکیب نشان می‌دهد که پس از هر مرحله از تزریق افزایش تیتر آنتی‌بادی و افزایش OD در مقایسه با نمونه‌های کنترل وجود داشته است (نمودار ۱).

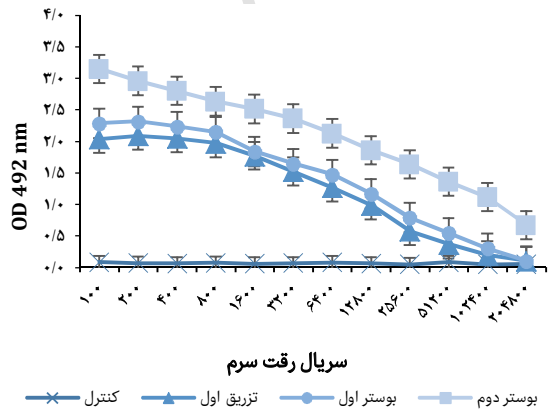
چنانچه در شکل مشخص است پس از تزریق اول و دوم تفاوت قابل توجه در سطح آنتی بادی IgG مشاهده نمی‌شود.



شکل ۱) همسانه‌سازی قطعه *f* در ناقل پلاسمیدی pET- 32a و تایید آن؛ a) تکثیر ژن مصنوعی *f*: ستون۲) محصول تکثیر ژن، b) الگوی الکتروفورز محصول PCR از کلون‌های حاوی قطعه *f* در ناقل pET-32a روی ژل آگارز ۱/۰%: ستون ۲: پلاسمید pUC57 حاوی سازه *f* (کنترل مثبت)، ستون ۳: *E.coli* αDH5 تاریخت‌نشده (کنترل منفی)، ستون‌های ۴ تا ۷ کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب (pET32a)، c) تایید کلونینگ ژن موردنظر، با استفاده از روش هضم آنزیمی روی یک کلونی pET-32a نوترکیب حاوی ژن *f*: ستون ۲: ناقل pET-32a حاوی قطعه *f* قبل از هضم آنزیمی؛ ستون ۳: ناقل pET-32a حاوی قطعه *f* برش‌خورده با آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I؛ در همه شکل‌ها ستون یک نشانگر اندازه DNA (۱۰۰جفت‌بازی) است.



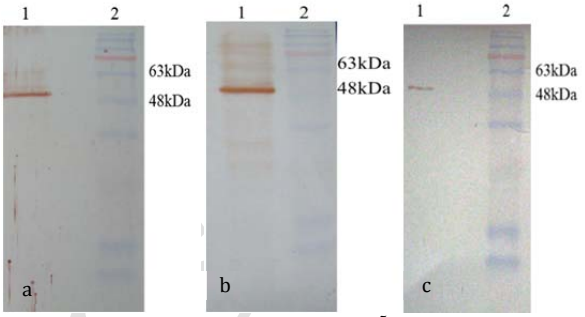
شکل ۲) بیان و خالص‌سازی ژن نوترکیب *f* و ارزیابی آن؛ a) الگوی SDS-PAGE بیان پروتئین نوترکیب F در شرایط بهینه در کلنی‌های مختلف (DE3) Rosetta-gami؛ ستون ۱: کلنی حاوی پلاسمید قبل از بیان، ستون ۲ تا ۵: کلنی های مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب بعد از بیان، ستون ۶: نشانگر وزن مولکولی پروتئین (۱۰ تا ۱۷۰کیلودالتون)، b) ارزیابی تخلیص پروتئین F از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA (روش دناتوره) به‌وسیله SDS-PAGE؛ ستون ۱: خروجی ستون کروماتوگرافی، ستون‌های ۲ و ۳: خروجی ستون با بافر شست‌وشو، ستون ۴ تا ۷: خروجی ستون با بافر استخراج، ستون ۸: خروجی ستون با بافر احیاکننده، ستون ۹: نشانگر وزن مولکولی پروتئین، c) بررسی واکنش وسترن‌بلاتینگ پروتئین تخلیص‌شده در مقابل آنتی‌بادی علیه دنباله هیستیدینی (6His-tag)؛ ستون ۱: پروتئین نوترکیب تخلیص‌شده F، ستون ۲: نشانگر وزن مولکولی پروتئین



نمودار ۱) منحنی الایزا برای تعیین تیتر آنتی‌بادی (از کلاس IgG) علیه پروتئین نوترکیب؛ چنانچه در شکل مشخص است پس از تزریق اول و دوم تفاوت قابل توجه در سطح آنتی‌بادی IgG مشاهده نمی‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

تایید آنتی‌بادی تولیدشده علیه پروتئین F با تکنیک وسترن‌بلاتینگ: به‌منظور اثبات ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب F و مقایسه عملکرد آن با سویه واکسن، از واکنش وسترن‌بلات استفاده شد. برای این منظور پروتئین نوترکیب F با سرم موش‌های ایمن‌شده با پروتئین F و سرم موش‌های ایمن‌شده سویه واکسن تجاری مجاور شد. در ادامه مجاورت ویروس واکسن تجاری پس از الکتروفورز روی ژل الکتروفورز با سرم موش ایمن‌شده با پروتئین نوترکیب F صورت گرفت. نتایج وسترن‌بلات نشان داد که آنتی‌بادی ایجادشده توسط پروتئین نوترکیب قادر به شناسایی سویه واکسن بوده و برعکس، آنتی‌بادی‌های تولیدشده توسط سویه واکسن هم قادر است پروتئین نوترکیب را مورد شناسایی قرار دهد (شکل ۳- a، b و c).



شکل ۳) تایید واکنش آنتی‌بادی تولیدشده علیه پروتئین F با تکنیک وسترن‌بلاتینگ؛ a) وسترن‌بلاتینگ آنتی‌بادی سرمی موش‌های ایمن‌شده با پروتئین F علیه پروتئین نوترکیب F: ستون ۱: پروتئین نوترکیب تخلیص‌شده F؛ b) وسترن بلاتینگ آنتی‌بادی سرمی موش‌های ایمن‌شده با پروتئین F علیه سویه واکسن ویروس نیوکاسل: ستون ۱: نمونه پروتئینی واکسن ویروس نیوکاسل، c) وسترن‌بلاتینگ آنتی‌بادی سرمی موش‌های ایمن‌شده با نمونه پروتئینی واکسن نیوکاسل علیه پروتئین نوترکیب F: ستون ۱: پروتئین نوترکیب تخلیص‌شده F؛ در همه شکل‌ها ستون ۲ نشانگر وزن مولکولی پروتئین است.

بحث

ویروس بیماری نیوکاسل دامنه وسیعی از پرندگان خانگی و وحشی را در بسیاری از کشورها آلوده کرده است و اثر مخربی بر تولید تجاری طیور داشته است[25, 26]. بنابراین تلاش‌های بسیاری در جهت کنترل این بیماری و شناخت آن از نظر همه‌گیرشناسی و ویروس‌شناسی صورت گرفته است[4].

گلیکوپروتئین F در کنار پروتئین سطحی HN (هماگلوتینین نورآمینیداز) به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین پروتئین‌های سطحی ویروس، موجب نفوذ ویروس به داخل سلول میزبان، الحاق ویروس با غشای سلول و در نهایت تخریب آن می‌شود. در صورت مقابله با مرحله اول بیماری‌زایی ویروس (یعنی ممانعت از اتصال و ورود به داخل سلول) می‌توان سد محکمی در برابر بیماری و مراحل بعدی آن ایجاد نمود. به عبارت دیگر این پروتئین سطحی می‌تواند هدف مهمی برای ایجاد پاسخ ایمنی میزبان برای مقابله با ویروس باشد[25]. اگرچه هر دو آنتی‌ژن (HN و F) قادر به تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده در بدن حیوان هستند اما تنها پروتئین F می‌تواند تولید آنتی‌بادی‌هایی را تحریک کند که انتشار سلول به سلول ویروس را کاهش دهد[8].

انتخاب یک میزبان مناسب برای بیان و تولید پروتئین کایمریک، یکی از مسایلی است که در تحقیقات در زمینه واکسن‌های زیرواحدی حائز اهمیت است. میزبان *E.coli* به‌عنوان یکی از رایج‌ترین و کم‌هزینه‌ترین میزبان‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مطرح است. اگرچه این سیستم بیانی قادر به اجرای اصلاحات پس از ترجمه پروتئین‌های یوکاریوتی نیست[27, 28]، اما از آنجایی که بسیاری از پروتئین‌های یوکاریوتی، ساختار سه‌بعدی و فعالیت کامل زیستی خود را در شکل غیرگلیکوزیله نیز حفظ می‌کنند، می‌توانند در *E.coli* بیان شوند[29]. در خصوص پروتئین F از ویروس نیوکاسل نیز این مساله صدق نموده و علی‌رغم عدم وجود تغییرات پس از ترجمه (نظیر اضافه‌شدن مولکول‌های قندی) هنوز هم ویژگی‌های آنتی‌ژنیک خود را حفظ کرده و قادر است سیستم ایمنی را به نحو مناسبی تحریک نماید[8]. به‌منظور بیان پروتئین‌های نوترکیب در *E.coli* سویه‌های متعددی با ویژگی‌های مختلف و متناسب با احتیاجات تولیدی طراحی شده‌اند. در این میان سویه‌های ویژه *E.coli* که دارای ژن کدکننده RNAپلی‌مراز از باکتریوفاژ T7 هستند برای بیان پروتئین هدف استفاده می‌شوند. ناقل‌های سیستم pET، (دارای پروموتر قوی با منشا فاژ T7) مناسب برای بیان در این سویه‌ها هستند. در مواردی که بهینه‌سازی کدون‌های ژن به‌خوبی بر کدون‌های میزبان *E.coli* منطبق نباشد از سویه‌های خاصی برای بیان ژن مورد نظر استفاده می‌شود. سویه Rosetta-gami (DE3) حاوی tRNAهای مربوط به کدون‌های نادری است که به‌ندرت در *E.coli* مورد استفاده قرار می‌گیرند[30]. طبق مطالعات صورت‌گرفته، تحقیق حاضر اولین گزارش در خصوص بیان اپی‌توپ‌های ایمنی‌زای پروتئین F ویروس ND در سیستم *E.coli* بوده است. در تحقیقی مشابه بیان ژن نوکلئوکپسید (N) ویروس نیوکاسل در باکتری *E.coli* و با استفاده از ناقل pET SUMO، در سویه TOP10F باکتری *E.coli* انجام شده است[31]. در تحقیقی دیگر بیان پروتئین ماتریکس (MP) ویروس در میزبان *E.coli*، سویه Rosetta (DE3) با استفاده از ناقل pET28a صورت گرفته است[32].

با توجه به بهینه‌سازی صورت‌گرفته روی ژن F، انتظار می‌رفت که میزان بیان در میزبان پروکاریوتی افزایش یابد. میزان بیان پروتئین در سویه Rosetta-gami (DE3) پس از تخلیص پروتئین با ستون نیکل برابر با ۳/۶۱میلی‌گرم در ۱۰۰میلی‌لیتر از محیط کشت محاسبه شد. در تحقیقی مشابه میزان بیان پروتئین نوکلئوکپسید (NP) همین ویروس در سیستم *E.coli* برابر با ۵/۴میلی‌گرم در ۱۰۰میلی‌لیتر از محیط کشت بوده است[31]. نتایج به‌دست‌آمده میزان بیان قابل قبول پروتئین نوترکیب F را در این سیستم بیانی تایید نمود. پروتئین‌هایی که توسط *E.coli* به فرم نامحلول بیان می‌شوند در صورت دیالیز با دترجنت‌ها به فرم طبیعی و محلول خود تبدیل می‌شوند[32-34]. با انجام دیالیز و حذف اوره پروتئین F بازآرایی شده و با فلدینگ طبیعی پیش‌بینی‌شده توسط آنالیزهای بیوانفورماتیکی به حیوان تزریق شد.

به‌منظور تشخیص و اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولیدشده توسط لنفوسیت‌های B مختلف و علیه اپی‌توپ‌های F در سرم موش از روش الایزای نیمه‌کمی و وسترن‌بلات استفاده شد. گرچه در این روش اپی‌توپ‌های غالب در تحریک سیستم ایمنی مورد شناسایی قرار نگرفت اما نتایج حاصل از چهار دوره تجویز با پروتئین F خالص نشان داد که پروتئین مورد نظر موجب تحریک پاسخ‌های ایمنی و تولید تیتر بالای آنتی‌بادی از کلاس IgG سرمی از همان تزریق اول شده است که نشان می‌دهد این پروتئین یک ایمونوژن بسیار خوب با قابلیت بالای تحریک سیستم ایمنی تا رقت‌های بالا (۱/۲۰۴۸۰۰) به‌منظور تولید آنتی‌بادی بوده است. این پروتئین توانسته از اولین تزریق، موجب تولید میزان بالایی از

Archive of SID
www.SID.ir

آنتی‌بادی اختصاصی شود. بنابراین احتمال می‌رود که در مدل اصلی نیز در برخورد اول با آنتی‌ژن، میزان مناسبی از آنتی‌بادی برای مقابله با ویروس تولید شود. این مساله به‌ویژه در ایمن‌سازی حیوان در شرایط مزرعه‌ای حائز اهمیت است.

در نهایت به‌منظور بررسی حضور اپی‌توپ‌های مناسب در پروتئین نوترکیب تولیدشده در سیستم پروکاریوتی و همچنین کارآیی این پروتئین برای ایجاد ایمنی متقاطع با ویروس NDV از روش وسترن‌بلات استفاده شد. نتایج نشان داد که آنتی‌بادی تولیدشده در بدن حیوان مورد آزمایش به‌خوبی قادر به شناسایی پروتئین نوترکیب F (حدود ۴۹/۷کیلودالتون) و همچنین پروتئین متناظر ویروس زنده ضعیف‌شده واکسن (تجاری) بوده است. علاوه بر آن، انجام وسترن‌بلاتینگ با استفاده از سرم حیوان ایمن‌شده با سویه واکسن و بر علیه پروتئین نوترکیب F نشان داد که این آنتی‌بادی به‌خوبی پروتئین نوترکیب را نیز مورد شناسایی قرار می‌دهد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، انتظار می‌رود این پروتئین قادر به ارایه اپی‌توپ‌های مناسب به سیستم ایمنی و تحریک آن به‌منظور ایجاد ایمنی مناسب و در صورت تکمیل مطالعات، ایمنی حفاظت‌بخش علیه ویروس و خنثی‌سازی آن در مدل حیوانی اصلی (طیور) باشد.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم فراهم‌شدن امکانات و تجهیزات لازم برای انجام آزمایش ایمنی‌زایی روی مدل حیوانی اصلی بیماری نیوکاسل، جوجه‌های SPF (عاری از پاتوژن) و همچنین انجام آزمون چالش با ویروس استاندارد نیوکاسل اشاره کرد.

پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی علاوه بر ایمنی هومورال، ایمنی سلولی نیز در موش‌های ایمن‌شده با پروتئین نوترکیب F، مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین، می‌توان با بهره‌گیری از نانوذرات در کپسوله‌کردن و تحویل پروتئین نوترکیب F به سیستم ایمنی حیوان مدل، پتانسیل این روش را به‌منظور ساختن یک کاندیدای واکسن علیه بیماری نیوکاسل مورد بررسی قرار داد.

نتیجه‌گیری

پروتئین نوترکیب F می‌تواند سطح آنتی‌بادی‌های اختصاصی را به‌طور قابل ملاحظه‌ای در سرم موش‌های ایمن‌شده افزایش دهد به‌طوری که می‌تواند در طراحی یک کیت تجاری برای شناسایی ویروس نیوکاسل در طیور کاربرد داشته باشد.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری برای تامین منابع مالی این تحقیق (پروژه شماره ۴۴۷) تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تاییدیه‌اخلاقی: گواهی می‌شود که طی مراحل ایمنی‌زایی روی حیوان مدل (موش بالب/سی) کلیه نکات اخلاقی رفتار با حیوانات رعایت شده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سمیه تکریم (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (٤٥%)؛ محمدجواد معتمدی (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۲۵%)؛ محیات جعفری (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰%)؛ جعفر امانی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۱۰%)؛ علی‌هاتف سلمانیان (نویسنده پنجم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۱۰%)

منابع مالی: پژوهش حاضر (پروژه شماره ۴۴۷-III)، تحت حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری بوده است.

منابع

1- Nath B, Barman NN, Kumar S. Molecular characterization of Newcastle disease virus strains isolated from different outbreaks in Northeast India during 2014-15. Microb Pathog. 2016;91:85-91.
2- Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. Avian Pathol. 2003;32(3):237-55.
3- Rasoli M, Yeap SK, Tan SW, Moeini H, Ideris A, Bejo MH, et al. Alteration in lymphocyte responses, cytokine and chemokine profiles in chickens infected with genotype VII and VIII velogenic Newcastle disease virus. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2014;37(1):11-21.
4- Alexander DJ, Aldous EW, Fuller CM. The long view: A selective review of 40 years of Newcastle disease research. Avian Pathol. 2012;41(4):329-35.
5- He X, Xing R, Li K, Qin Y, Zou P, Liu S, et al. Beta-chitosan extracted from Loligo Japonica for a potential use to inhibit Newcastle disease. Int J Biol Macromol. 2016;82:614-20.
6- Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S. Newcastle disease virus: Current status and our understanding. Virus Res. 2014;184:71-81.
7- Hao H, Chen Sh, Wu P, Wang J, Duan X, Du E, et al. Genomic characterisation of two virulent Newcastle disease viruses isolated from crested ibis (Nipponia nippon) in China. Gene. 2014;553(2):84-9.
8- Miller PJ, Afonso CL, El Attrache J, Dorsey KM, Courtney SC, Guo Z, et al. Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. Dev Comp Immunol. 2013;41(4):505-13.
9- Haryanto A, Purwaningrum M, Verawati S, Irianingsih SH, Wijayanti N. Pathotyping of local isolates Newcastle disease virus from field specimens by RT-PCR and restriction endonuclease analysis. Procedia Chem. 2015;14:85-90.
10- Getachew B, Kyule MN, Balcha M, Dawo F. Isolation and identification of Newcastle disease virus from outbreak cases and apparently healthy local chickens in South West Shewa, Ethiopia. Int J Microbiol Res. 2015;6(1):5-8.
11- De Leeuw O, Peeters B. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: Evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. J Gen Virol. 1999;80(Pt 1):131-6.
12- Liu MM, Cheng JL, Yu XH, Qin ZM, Tian FL, Zhang GZ. Generation by reverse genetics of an effective attenuated Newcastle disease virus vaccine based on a prevalent highly virulent Chinese strain. Biotechnol Lett. 2015;37(6):1287-96.
13- Schirrmacher V, Haas C, Bonifer R, Ahlert T, Gerhards R, Ertel C. Human tumor cell modification by virus infection: An efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle disease virus. Gene Ther. 1999;6(1):63-73.
14- Miller PJ, Afonso CL. Newcastle disease virus. In: Wiley. Encyclopedia of Life Sciences. Hoboken: Wiley; 2001.
15- Richardson CD, Scheid A, Choppin PW. Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F_1 or HA_2 viral polypeptides. Virology. 1980;105(1):205-22.

Archive of SID
www.SID.ir

1988;17(4):821-7.
24- Motamedi MJ, Amani J, Shahsavandi Sh, Salmanian AH. In silico design of multimeric HN-F antigen as a highly immunogenic peptide vaccine against Newcastle disease virus. Int J Pept Res Ther. 2014;20(2):179-94.
25- Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. Rev Sci Tech. 2000;19(2):443-55.
26- Seal BS, King DJ, Sellers HS. The avian response to Newcastle disease virus. Dev Comp Immunol. 2000;24(2-3):257-68.
27- Rai M, Padh H. Expression systems for production of heterologous proteins. Curr Sci. 2001;80(9):1121-8.
28- Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. Biotechnol Adv. 2012;30(5):1102-7.
29- Kamionka M. Engineering of therapeutic proteins production in Escherichia coli. Curr Pharm Biotechnol. 2011;12(2):268-74.
30- Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. J Biotechnol. 2005;115(2):113-28.
31- Silva KR, Goncalves MCM, De Oliveira ES, Fernando FS, Montassier MDFS, Fernandes CC, et al. Cloning and expression of the nucleoprotein gene (NP) of Newcastle Disease Virus (NDV) in Escherichia coli for immunodiagnosis application. Int J Poult Sci. 2014;13(8):473-9.
32- Iram N, Salahuddin Shah M, Ismat F, Habib M, Iqbal M, Hasnain SS, et al. Heterologous expression, characterization and evaluation of the matrix protein from Newcastle disease virus as a target for antiviral therapies. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98(4):1691-701.
33- Carrió MM, Villaverde A. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. FEBS Lett. 2001;489(1):29-33.
34- Vallejo LF, Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. Microb Cell Fact. 2004;3(1):11.
16- Kapczynski DR, King DJ. Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. Vaccine. 2005;23(26):3424-33.
17- Boursnell MEG, Green PF, Samson ACR, Campbell JIA, Deuter A, Peters RW, et al. A recombinant fowlpox virus expressing the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against challenge NDV. Virology. 1990;178(1):297-300.
18- Edbauer Ch, Weinberg R, Taylor J, Rey-Senelonge A, Bouquet JF, Desmettre P, et al. Protection of chickens with a recombinant fowlpox virus expressing the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene. Virology. 1990;179(2):901-4.
19- Xiao S, Nayak B, Samuel A, Paldurai A, Kanabagattebasavarajappa M, Prajitno TY, et al. Generation by reverse genetics of an effective, stable, live-attenuated Newcastle disease virus vaccine based on a currently circulating, highly virulent Indonesian strain. PloS one. 2012;7(12):e52751.
20- Armstrong EP. Economic benefits and costs associated with target vaccinations. J Manag Care Pharm. 2007;13(7 Supp B):S12-5.
21- Meeusen EN, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G. Current status of veterinary vaccines. Clin Microbiol Rev. 2007;20(3):489-510.
22- Taylor J, Edbauer C, Rey-Senelonge A, Bouquet JF, Norton E, Goebel S, et al. Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. J Virol. 1990;64(4):1441-50.
23- Meulemans G, Letellier C, Gonze M, Carlier MC, Burny A. Newcastle disease virus f glycoprotein expressed from a recombinant vaccinia virus vector protects chickens against live-virus challenge. Avian Pathol.

Archive of SID

www.SID.ir