Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره پانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۸، پیاپی ۳۹: ۷۱-۶۵

بیان پروتئین هماگلوتینین ویروس آنفلوانزای فوق حاد پرندگان H5N1 در سلول Sf9حشره ای توسط یک سیستم غیر وابسته به باکلوویروس

مجید جمشیدیان مجاور*

استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۸

چکیده

آنفلوانزای فوق حاد پرندگان بعنوان بیماری جدی عفونی، توسط یکRNA ویروس سنس منفی متعلق به جنس *آنفلوانزا آلفا* و خانواده *اورتومیکسوویریده* ایجاد می شود. ویروس های نوع A بر اساس آنتی ژنهای گلیکوپروتئینی سطح آنها شامل هماگلوتینین(HA) و نورامینیداز (NA) به زیر گروه هایی طبقه بندی می شوند. ویروس آنفلوانزای پرندگانH5N1 با حدت بالا (HPAI)، از طریق مرغ های خانگی و پرندگان وحشی در بیش از ۶۰ کشور منتشر شده است. در این مقاله به نحوه بیان هماگلوتنین H5 در سلولهای *Spodoptera insect cells (Sf9)* حشره ای پرداخته شده است که متعلق به ویروس A/chicken/Iran/53-3/2008(H5N1) می باشد. توالی نوکلئوتیدی هماگلوتینین، از سویه ایرانی این ویروس که متعلق به clade 2.2 است، از بانک ژنی استخراج شده و پس از بهینه سازی کدون ها برای بیان در سیستم سلول حشره، توسط شرکت GenScript سنتز شد. این توالی در پلاسمید pIEx-3 که حاوی توالی پپتید ترشحی AKH و xHis-Tag۶ می باشد، داخل شد. پروتئین هماگلوتینین در سلول Sf9 حشره ای، بیان شده و H5 ترشحی با وزن مولکولی ۹۵ کیلودالتون تخلیص گردید. با استفاده از این سیستم بیانی غیر وابسته به باکلوویروس، H5 نوترکیب، در مطالعات بعدی مربوط به واکسن های مبتنی بر پروتئین، انتخاب داروها و ساخت کیت تشخیص آنفلوانزای فوق حاد پرندگان، قابل استفاده می باشد.

کلمات کلیدی: آنفلوانزای فوق حاد پرندگان، هماگلوتینین، H5N1، سلول حشره ای Sf9، غیر وابسته به باکلوویروس

*نویسنده مسئول: مجید جمشیدیان مجاور

آدرس: موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، ایران. تلفن: ۳۸۴۰۵۶۶۶-۰۵۱

پست الکترونیک: m.jamshidian@rvsri.ac.ir

مقدمه

آنفلوانزای مرغی (AI) ناشی از سویه های نوع A ویروس آنفلوانزا، ویروس RNA تک رشته منفی است، که متعلق به ویروس نوع آنفلوانزا از خانواده *Orthomyxoviridae* است. ویروس های نوع A بر اساس آنتی‌ژنهای گلیکوپروتئینی سطح آنها شامل هماگلوتینین(HA) و نورامینیداز (NA) به زیر گروه هایی طبقه‌بندی می شوند(۴). هماگلوتینین به شانزده و نورامینیداز به ۹ زیرگروه طبقه بندی می شود.

هماگلوتینین (HA) به اسید سیالیک مونوساکارید متصل می شود که بر روی سطح سلول های میزبان هدف قرار دارد. سپس دیواره سلولی، ویروس را از طریق اندوسیتوز در بر می گیرد و اندوزوم تشکیل می دهد. این سلول پس از آن تلاش می کند تا محتویات اندوزوم را با اسیدی کردن محتویات داخل آن هضم کند و آن را به یک لیزوزوم تبدیل می کند. سپس، غشای اندوزوم در غشای ویروس ادغام شده و باعث می شود که این دو به هم متصل شوند. هنگامی که این اتفاق می افتد، ژنوم ویروسی RNA وارد پروتوپلاسم سلول می شود(۱).

بواسطه علم بیوتکنولوژی، تولید پروتئین های نوترکیب برای انسان و حیوانات امکان پذیر شده است(۲۱). این پروتئین های نوترکیب تولید شده، گروه جدیدی از آزمایشات تشخیصی و داروهایی برای بسیاری از بیماری ها مانند اختلالات ژنتیکی، سرطان، آنفلوانزا و ایدز را شامل می گردد. استفاده از DNA و پروتئین ها در تشخیص بیماری ها و نیاز رو به رشد کاربرد پروتئین های نوترکیب می تواند با سنتز هترولوگ آنها رفع شود(۱۵).

سیستم های پروکاریوتی و یوکاریوتی دو شیوه کلی سیستم های بیان پروتئین هستند. هیچ سیستم بیان کامل و بی نقصی برای پروتئین های هترولوگ وجود ندارد. تمام سیستم های بیان مزایا و معایبی دارند(۶, ۱۵).

استفاده از سلول های حشرات به عنوان یک سیستم متداول برای تولید پروتئین های نوترکیب در سلول های یوکاریوتی، در موارد بسیاری مورد استفاده قرار گرفته است(۱۵). چندین عامل به کاربرد بالای سلول حشرات، کمک کرده اند. در سلول های حشره ای، پردازش پروتئین، تغییر و تبدیل و انتقال داخل سلولی آنها بخوبی صورت می گیرد(۹). سلول های حشره که برای رشد در محیط های کشت معلق، سازگار شده اند، باعث به دست آوردن مقادیر زیادی از پروتئین های نوترکیب می شوند. هماگلوتینین (HA)، پروتئین آنتی ژنی سطحی اصلی ویروس آنفلوانزا است که آنتی بادی های خنثی کننده برعلیه آن تولید می شوند. پروتئین HA در تعدادی زیادی از سیستم ها، بیان شده است. بیان این گلیکوپروتئین در برخی از سیستم های بیان مانند سیستم پروکاریوتی منجر به یک محصول با وضعیت گلیکوزیله شدن متفاوت نسبت به ویروس وحشی شده است. گلیکوزیله شدن مناسب برای پردازش، یکپارچگی عملکردی و آنتی‌ژن بودن محصول ژن هماگلوتینین مهم است(۵, ۷, ۱۰, ۱۱, ۱۶).

در این پژوهش، پروتئین هماگلوتینین ویروس آنفلوانزای فوق حاد H5N1، در سیستم بیان سلول حشره عاری از باکولوویروس به نام سیستم *InsectDirect™* توسعه یافته توسط شرکت آمریکایی نواژن و در سلول های Sf9 بیان گردید.

مواد و روش ها

بیان H5 نوترکیب

توالی ژن هماگلوتینین ویروس H5N1 (AC number: FJ445017.1) متعلق به کلاد۲ بطول ۱۷۰۸ باز ، از پایگاه داده NCBI انتخاب گردیده و برای بیان در سلول حشرات بوسیله شرکت آمریکایی*GenScript* بهینه سازی کدون، سنتز و در وکتور pIEx-3، متعلق به سیستم *InsectDirect™* (نواژن، آمریکا) کلون شد. حامل pIEx-3 یک پپتید سیگنال ترشح هورمون آدیبوکینتیک (AKH) و توالی کدگذاری 6xHis-Tag را در بالادست مکان کلونینگ برای بیان ترکیب پروتئین هماگلوتینین نوترکیب با برچسب های N-terminal کد گذاری می کند. برای بیان HA آنفلوانزا، پلاسمید حاوی توالی هماگلوتینین با استفاده از *Insect GeneJuice®* *Transfection Reagent* (نواژن، آمریکا) به سلول های حشره Sf9 در محیط بدون سرم اضافه شد و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به با نسبت های مورد اشاره در جدول (۱) انکوبه گردید.

خالص سازی H5 نوترکیب

بعد از ۷۲ساعت، سلول های ترانسفکت شده از محیط کشت جمع آوری شد. پروتئین H5-His از محیط کشت سلول های Sf9 و با استفاده از کیت *Purification Bind Ni-NTA ™ Insect RoboPop* (نواژن، آمریکا)، تخلیص گردید. به طور خلاصه، *PopCulture® Reagent* و *Benzonase® Nuclease* به طور مستقیم به هر یک از محیط های کشت اضافه شدند. رزین His Ni-NTA به لیزات اضافه شد. سپس رزین شسته شد و با استفاده از ستون های موجود در کیت، تخلیص پروتئین نوترکیب هماگلوتینین کامل گردید.

آنالیز H5 نوترکیب

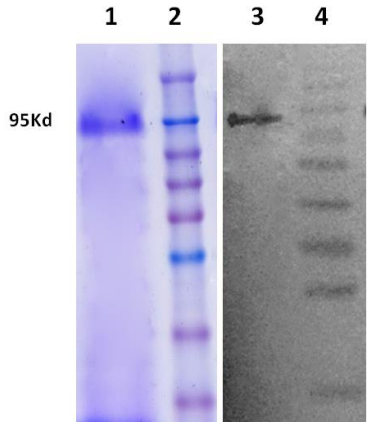
صحت هماگلوتنین تخلیص شده توسط الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ (۱۰٪ SDS-PAGE) بررسی شد و به غشای نیترو سلولز (سیگما) منتقل گردید. بیان H5-His نوترکیب توسط وسترن بلات و با استفاده از کیت وسترن بلات His•Tag AP (نواژن، آمریکا) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به طور خلاصه، غشا در یک ساعت در Tris-buffered saline (TBS) که حاوی ۳٪ آلبومین سرم گاو (BSA) و در دمای اتاق، قرار گرفت. سپس غشاء در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت و با آنتی بادی مونوکلونال آنتیHis موش (نواژن، آمریکا) وبا رقت ۱به۱۰۰۰ در بافر ۳٪ BSA-TBS انکوبه شد. غشاء دو بار با TBS-0.05% Tween 20 شسته شد. بعد از شستشو، غشاء به مدت ۱ ساعت با آنتی بادی IgG بزی ضد موش کنژوگه باAP که به نسبت ۱به۵۰۰۰ رقیق سازی شده بود، انکوبه شد. پس از شستشو، باند مورد نظر توسط بافر AP حاوی BCIP و NBT، طبق دستور سازنده، مشاهده شد.

نتایج

ویروس آنفلوانزای مرغی H5N1 با حدت بالا (HPAI)، از طریق مرغ های خانگی و پرندگان وحشی در بیش از ۶۰ کشور منتشر شده است. اپیدمی HPAI منجر به زیان های هنگفت اقتصادی و همچنین مخاطرات سلامت انسان شده است. از سال ۲۰۰۳، ویروس های کلاد ۲، در پرندگان چین و اندونزی پخش شدند و در طول سال های ۲۰۰۵-۲۰۰۶، به خاورمیانه، اروپا و آفریقا گسترش یافتند(۲, ۳, ۱۴). ویروس های کلاد ۲ از اواخر سال ۲۰۰۵، عامل اصلی عفونت های انسانی بوده اند. روش های کنترل اپیدمی H5N1 شامل واکسیناسیون

موثر، درمان دارویی ضد ویروسی، استفاده از آزمایش های غربالگری و همچنین مدیریت موثر می باشد. همچنین باید اطمینان حاصل شود که واکسن در حال حاضر، در حفاظت از جوجه ها و کاهش بار ویروسی که به محیط منتشر می شود، موثر است. به این ترتیب، با استفاده از پروتئین های نوترکیب، راه های جدیدی برای محققان هموار شده است.

در این مطالعه، توالی ژن کدکننده HA متعلق به H5N1 از کلاد ۲/۲، برای بیان در سلول های حشرات بهینه سازی کدون شده و توسط شرکت *GenScript* بر اساس توالی های پایگاه داده آنفلوانزای NCBI سنتز شد. ژن هماگلوتینین سنتز شده در یک وکتور متعلق به سیستم *InsectDirect™* (نواژن) کلون شد. در ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن، پروتئین نوترکیب H5-His به مایع رویی محیط های کشت Sf9 ترشح شد و توسط کیت *Insect RoboPop™ Ni-NTA His Bind Purification* خالص گردید. ما از نسبت های مختلف ترکیب بین معرف *Transduction GeneJuice* حشره و پلاسمید برای بهینه سازی شرایط ترانسفکشن استفاده کردیم. ترکیب۶ میکرولیتر *Genejuice Transfection Reagent* و ۲ ماکروگرم پلاسمید، شرایط مطلوب برای بیان پروتئین H5 نوترکیب در این سیستم بود. پروتئین خالص تک باند با وزن مولکولی نسبی ۹۵ کیلودالتون در SDS-PAGE (شکل ۱، چاهک اول) و عدم وجود باند پروتئینی دیگر، نشان دهنده خلوص پروتئین تخلیص شده است. در وسترن بلات، H5-His خالص با آنتی بادی مونوکلونال آنتی His (شکل ۱، چاهک سوم) تایید شد.



شکل ۱) آنالیز بیان پروتئین نوترکیب هماگلوتینین مربوط به ویروس آنفلوانزای فوق حاد ((A/chicken/Iran/53-3/2008(H5N1)) در مایع رویی سلولهای SF9 ترانسفکت شده با پلاسمید H5-pIEx-3 توسط SDS-PAGE و وسترن بلات.

چاهک شماره ۱: پروتئین نوترکیب هماگلوتینین تخلیص شده از مایع رویی کشت سلول ترانسفکت شده SF9 بر روی ژل ۱۰درصد SDS PAGE به وزن ۹۵ کیلودالتون
چاهک شماره ۲: مارکر مولکولی پروتئینی
چاهک شماره ۳: باند وسترن بلات پروتئین نوترکیب هماگلوتنین تخلیص شده
چاهک شماره ۴: مارکر مولکولی پروتئینی

جدول ۱) نسبت **Insect GeneJuice Transfection Reagent (µl)/ Plasmid (µg)** استفاده شده در این پژوهش جهت بهینه کردن شرایط ترانسفکشن

Insect GeneJuice Transfection Reagent (µl)	4	6	8	4	6	8	4	6	8
Plasmid (µg)	1	1	1	2	2	2	3	3	3

بحث

بیماری آنفلوانزای فوق حاد H5N1 در سالیان اخیر علاوه بر مرگ و میر انسانی، خسارات فراوانی را در صنعت طیور ایجاد نموده است. مطالعات و تجربیات موجود نشان داده است که حرکت پرندگان، حضور پرندگان وحشی، تجارت قانونی یا غیر قانونی پرنده زنده و تولیدات طیور، تراکم مزارع و بازار پرندگان زنده عواملی هستند که خطر ورود آنفلوانزای طیور به کشور و گسترش متعاقب آن را تحت تاثیر قرار می دهد.

جهت بیان پروتئین نوترکیب هماگلوتینین، در این پژوهش از سیستم بیان در سلول های حشره (SF9) استفاده شد. نکته قابل توجه در این پروژه codon optimization متناسب با codon های ویژه حشرات می باشد. فرض بر این است که این عمل بر روی میزان بیان، فولدینگ و عملکرد پروتئین موثر واقع شده است.

تهیه واکسن های ویروسی نوترکیب به وسیله ی مهندسی ژنتیک ژن هماگلوتینین در وکتورهای بیان کننده، روشی بی خطر، سریع و بدون خطر مواجهه با پاتوژن کامل و یا با غیرفعال سازی ناکامل و آزادسازی تصادفی ویروس طی تولید واکسن می باشد. واکسن های نوترکیب با پایه ی نیوکاسل که ژن هماگلوتینین را بیان می کنند، فایده دیگری دارند که حمایت دوگانه‌ای علیه بیماری نیوکاسل و آنفلوانزا در جوجه ها ایجاد می کنند.

به هر حال، با هر دو واکسن H5 آبله مرغی و ویروس نیوکاسل نوترکیب که HA مربوط به H5 را بیان می کند، مشکل اصلی زمانی است که جمعیت هدف قبلا با این ویروس ها برخورد داشته باشد. هردوی ایمنی غیر فعال مادری و ایمنی فعال در پرندگانی که با ویروس وکتور برخورد دارند از کارایی این واکسن ها بشدت خواهد کاست و یا از آن ممانعت خواهند کرد. به علاوه واکسن ویروس آبله مرغی برای کاربرد در جوجه طراحی شده و در اردک موثر نخواهد بود(۸, ۱۳, ۱۷-۲۰).

تکنولوژی نوترکیب همچنین اجازه می دهد ژن هماگلوتینین ویروسی بدون خطر در سلول های حشره بیان گردد. HA محل آنتی ژنی اولیه برای آنتی بادی های خنثی کننده است و به این ترتیب واکسیناسیون با واکسن پروتئینی HA قادر به ایجاد ایمنی حمایتی می باشد. چنین واکسن های زیر واحدی که در in vitro بیان می شوند، برخلاف واکسن های بیان شده در in vivo، دارای محدودیت های کاربردی، نمی باشد. مطالعات قبلی نشان داده است که پروتئین های بیان شده توسط باکولوویروس زمانی که به جوجه های یک روزه با دوز بالا در ادجوانت روغنی داده شدند، پاسخ آنتی بادی anti H5 پایدار و حمایت بالینی ایجاد کرده و انتشار ویروس از کلواک را کم نمود(۸, ۱۳, ۱۷-۲۰).

در حال حاضر، احتیاجات و انتظارات بیشتری به منظور تولید پروتئین های بیشتر و در زمان کوتاه تر ایجاد شده اند. بدین منظور پس از مطالعات تئوری و بیوانفورماتیکی

لازم، توالی ژنی H5 مورد نظر از توالی های گزارش شده تا زمان انجام مطالعات اولیه انتخاب گردید. توالی این ژن به شرکت *GeneScript* ارسال و بهینه سازی و سنتز شد. مستندات ارائه شده توسط این شرکت معتبر، نشان دهنده صحت سنتز ژن های مورد نظر می باشد. توالی برشی موجود در ژن H5 حذف گردید تا از خطرات زیستی احتمالی اجتناب گردد.وکتور pIEx3^{TM} و معرف *GeneJuice Transfection* باعث تسریع در بیان پروتئین نوترکیب هماگلوتینین در سلول حشرات شد، و نتایج بیان در ۴۸-۷۲ ساعت بدست آمد. علاوه بر این، عملکرد پروتئین هدف، زمانی که مقیاس از ۱۰ میلی لیتر تا یک لیتر افزایش یافت، تأثیر منفی نداشت (۱۲). در نهایت، این مطالعه توانایی بیان سریع هماگلوتینین در سلول های SF9 را به عنوان جایگزینی برای روش باکولویروس نشان می دهد. هماگلوتینین H5 نوترکیب می تواند در توسعه تست های تشخیصی و همچنین به عنوان یک واکسن بالقوه مبتنی بر پروتئین استفاده شود.

منابع

1. Abdelwhab EM, Hafez HM (2011), An overview of the epidemic of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in Egypt: epidemiology and control challenges, *Epidemiology and infection*, **139:**647-657.
2. Ahmed SS, Themudo GE, Christensen JP, Biswas PK, Giasuddin M, Samad MA, Toft N, Ersboll AK (2012), Molecular epidemiology of circulating highly pathogenic avian influenza (H5N1) virus in chickens, in Bangladesh, 2007-2010, *Vaccine*, **30:**7381-7390.
3. Arafa A, Suarez D, Kholosy SG, Hassan MK, Nasef S, Selim A, Dauphin G, Kim M, Yilma J, Swayne D, Aly MM (2012), Evolution of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in Egypt indicating progressive adaptation, *Archives of virology* , **157:**1931-1947.
4. Capua I, Cattoli G (2013), Prevention and control of highly pathogenic avian influenza with particular reference to H5N1. Virus research
5. Cline TD, Karlsson EA, Seufzer BJ, Schultz-Cherry S (2012), The Hemagglutinin Protein of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Viruses Overcomes an Early Block in the Replication Cycle to Promote Productive Replication in Macrophages, *Journal of virology*, **187:**191-197.
6. Hunt I (2005), From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression, *Protein expression and purification*, **40:**1-22.
7. Jones LV, Compans RW, Davis AR, Bos TJ, Nayak DP (1985), Surface expression of influenza virus neuraminidase, an amino-terminally anchored viral membrane glycoprotein, in polarized epithelial cells, *Molecular and cellular biology*, **5:**2181-2189.
8. Jonkers AR, Sharkey KJ, Christley RM (2010), Preventable H5N1 avian influenza epidemics in the British poultry industry network exhibit characteristic scales, *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, **7:**695-701.
9. Katz JM, Lu X, Tumpey TM, Smith CB, Shaw MW, Subbarao K (2000), Molecular correlates of influenza A H5N1 virus pathogenesis in mice, *Journal of virology* , **74:**10807-10810.
10. Kretzschmar E, Kuroda K, Klenk HD (1995), Expression of the hemagglutinin protein of influenza virus. Analysis of protein modifications, *Methods in Molecular Biology* ,**39:**317-336.
11. Liu G, Song L, Reiserova L, Trivedi U, Li H, Liu X, Noah D, Hou F, Weaver B, Tussey L (2012), Flagellin-HA vaccines protect ferrets and mice against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) infections, *Vaccine*, **30:**6833-6838.
12. Loomis KH, Yaeger KW, Batenjany MM, Mehler MM, Grabski AC, Wong SC, Novy RE (2005), InsectDirect System: rapid, high-level protein expression and purification from insect cells, *Journal of structural and functional genomics*, **6:**189-194.
13. Milne G, Kelso J, Kelly H (2010), Strategies

technique, **28:**275-291.
18. Sasaki T, Isoda N, Soda K, Sakamoto R, Saijo K, Hagiwara J, Kokumai N, Ohgitani T, Imamura T, Sawata A, Lin Z, Sakoda Y, Kida H (2009), Evaluation of the potency, optimal antigen level and lasting immunity of inactivated avian influenza vaccine prepared from H5N1 virus, *The Japanese journal of veterinary research*, **56:**189-198.
19. Steel J (2011), New strategies for the development of H5N1 subtype influenza vaccines: progress and challenges, *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. **25:**285-298.
20. Yee KS, Carpenter TE, Cardona CJ (2009), Epidemiology of H5N1 avian influenza, *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, **32:**325-340.
21. Young CL, Britton ZT, Robinson AS (2012), Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications, *Biotechnology journal*, **7:**620-634

for mitigating an influenza pandemic with pre-pandemic H5N1 vaccines, *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, **7:**573-586.
14. Nguyen T, Rivailler P, Davis CT, Hoa do T, Balish A, Dang NH, Jones J, Vui DT, Simpson N, Huong NT, Shu B, Loughlin R, Ferdinand K, Lindstrom SE, York IA, Klimov A, Donis RO (2012), Evolution of highly pathogenic avian influenza (H5N1), virus populations in Vietnam between 2007 and 2010, *Virology*, **432:**405-416.
15. Paakkonen V, Tjaderhane L (2010), High-throughput gene and protein expression analysis in pulp biologic research: review, *Journal of endodontics*. **36:**179-189.
16. Pahl HL, Baeuerle PA (1995), Expression of influenza virus hemagglutinin activates transcription factor NF-kappa B, *Journal of virology*, **69:**1480-1484.
17. Rudolf M, Poppel M, Frohlich A, Mettenleiter T, Beer M, Harder T (2009), Efficacy of a commercial inactivated H5 influenza vaccine against highly pathogenic avian influenza H5N1 in waterfowl evaluated under field conditions, *Revue scientifique et*

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 15, Issue 2, 2019

Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 Hemagglutinin expressed in Sf9 Insect cells with a Baculovirus Free System

Majid Jamshidian-Mojaver
Assistant professor of Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.
Received: 27 November 2018 *Accepted: 27 February 2019*

Abstract
Highly Pathogenic Avian influenza (AI) is a serious infectious disease caused by negative sense single stranded RNA viruses that belong to the genus Alphainfluenzavirus in the family Orthomyxoviridae. The type A viruses are classified into subtypes based on their surface glycoprotein antigens including hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). Highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus of the H5N1 subtype has spread through domestic poultry or wild birds in more than 60 countries. This article reports heterologous expression in Sf9 insect cells of H5-Hemagglutinin derived from avian influenza virus A/chicken/Iran/53-3/2008(H5N1). The HA nucleotide sequence of an Iranian strain of H5N1 virus from clade 2.2, (A/chicken/Iran/53-3/2008), was obtained from Genbank. The nucleotide sequence data was codon optimized for insect cells. Using pIEx-3 vector a molecular construct, encoding a secretion signal peptide of adipokinetic hormone (AKH) and 6xHis-Tag coding sequence, upstream of the cloning site for expressing fusion recombinant HA protein with N-terminal tags, were designed and ordered for synthesis by GenScript, Recombinant H5-Hemagglutinin was expressed in Sf9 insect cells as a 95kDa secreted protein. This insect-based Baculovirus-Free heterologous expression system provided functionally recombinant H5-Hemagglutinin that should be useful in anti-influenza drug screening, detection, and diagnostic tests and also as a potential protein-based vaccine.

Keywords: Highly Pathogenic Avian influenza, Hemagglutinin (HA), H5N1, Heterologous expression, Sf9 insect cells, Baculovirus-Free

** Corresponding author*: *Majid Jamshidian-Mojaver*
Address: Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran. Tel: 051-38405666
E-mail: m.jamshidian@rvsri.ac.ir