JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره چهاردهم، شماره اول، ۱۳۹۷، پیاپی ۳۶: ۸۹-۸۱

کلونینگ و بیان ژن NP ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در *اشریشیا کلی*

امین جایدری [۱*]، مسعودرضا صیفی آباد شاپوری [۲]، مسعود قربانپور نجف‌آبادی [۳]

۱- استادیار بخش میکروبیولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

۲ و ۳- استاد بخش میکروبیولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۹ تاریخ پذیرش:۹۶/۱۱/۱۱

چکیده

آنفلوانزای پرندگان یک بیماری عفونی خطرناک و با اهمیت جهانی است که خسارات مالی قابل توجهی به صنعت طیور تحمیل می‌کند. تشخیص سرمی بر اساس بررسی آنتی‌بادی تولید شده بر ضد نوکلئوپروتئین (NP که در میان همه ویروس‌های A آنفلوانزا حفاظت شده است، می‌تواند برای نشان دادن سطح ایمنی ضد همه تحت تیپ‌های ویروس A آنفلوانزا استفاده گردد. هدف از این مطالعه تولید پروتئین نوترکیب NP بود. بدین منظور ناحیه کدکننده ژن نوکلئوپروتئین جدایه‌ای از ویروس آنفلوانزای پرندگان A/chicken/Iran/AH-1/06(H9N2) با آزمایش RT-PCR تکثیر وبه درون وکتور بیانی- پروکاریوتی (pMal-C2x) کلون شده و به داخل باکتری اشریشیا کلی سویه BL21(DE3) ترانسفورمه گردید. وکتور نوترکیب تخلیص شده جهت بررسی بیان پروتئین نوترکیب MBP-NP مورد استفاده قرار گرفت. پروتئین هدف با وزن حدود ۹۷ کیلو دالتون از طریق SDS-PAGE و متعاقب آن وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت .مشاهده بیان پروتئین با وزن ملکولی قابل انتظار در SDS-PAGE و واکنش مثبت این پروتئین با سرم پرنده آلوده به آنفلوانزا در وسترن بلات نشان دهنده بیان موفق ژن NP در E. coli بود.

کلمات کلیدی: کلونینگ، آنفلوانزای پرندگان، تحت تیپ H9N2، ژن NP

*نویسنده مسئول: امین جایدری

آدرس پستی: خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پاتوبیولوژی، تلفن: ۰۹۱۶۶۶۷۲۲۷۲ و ۰۶۶-۳۳۱۲۰۱۰۹

پست الکترونیک: jaydari. a@lu. ac. ir

مقدمه

بیماری‌های ویروسی به عنوان یکی از مهمترین عوامل خسارات اقتصادی در صنعت پرورش طیور به شمار می‌روند. از بین آن‌ها، بیماری آنفلوانزا علاوه بر خسارات اقتصادی، از نظر بهداشت انسانی نیز اهمیت دارد. پاندمی انسانی ایجاد شده توسط تحت تیپ H1N1 در سال ۱۹۱۸ بی‌تردید یکی از مشهورترین پاندمی‌های آنفلوانزا است که آن به عنوان بزرگترین هولوکاست علم پزشکی در تاریخ یاد شده است (آنفلوانزای اسپانیایی) که با ابتلای تقریباً نیمی از جمعیت کره زمین موجب مرگ حدود ۵۰-۴۰ میلیون نفر شد (۴). به اذعان کارشناسان رسمی سازمان بهداشت جهانی، تاکنون جامعه بشری عامل بیماریزایی خطرناک‌تر از ویروس‌های آنفلوانزای فوق حاد پرندگان به خود ندیده است (۱). در سال‌های اخیر علاوه بر تحت تیپ‌های H5 و H7، تحت تیپ H9 نیز از سد بین گونه‌ای عبور نموده و عفونتی شبه آنفلوانزا در افراد انسانی ایجاد نموده است. خصوصاً در طی ده سال گذشته علاوه بر تحت تیپ H5N1، تحت تیپ H9N2 در کشورهای خاورمیانه و خاور دور انتشار بسیار گسترده‌ای پیدا کرده است (۲، ۱). با توجه به بررسی‌های انجام شده به نظر می‌رسد این دو تحت تیپ در حال ایجاد همه‌گیری در بین جمعیت طیور کشورهای آسیایی و برخی کشورهای اروپایی و آفریقایی هستند و حتی بر اساس قرائن و شواهد به - عنوان کاندیدا برای بروز پاندمی در بین جمعیت انسانی مطرح هستند. بررسی توالی قطعات ژنومی سویه‌های ویروسی جدا شده از میزبان‌های مختلف حاکی از آن است که توالی نوکلئوپروتئین ویروس از جمله توالی-هایی است که به خوبی حفظ شده و حداکثر تفاوت اسید آمینه‌ای آن در میان تمام ویروس‌های تیپ A، کمتر از ۱۱ درصد است (۶، ۵). بنابراین می‌توان به سهولت از NP برای نشان دادن ایمنی ایجاد شده متعاقب آلودگی با تمام ویروس‌های تیپ استفاده کرد (۳). با توجه به ثابت بودن توالی ژن NP در میان تحت تیپ‌های مختلف ویروس، می‌توان از آن به عنوان یک آنتی‌ژن جایگزین تشخیصی مناسب جهت طراحی کیت الیزا (NP-ELISA) استفاده کرد. در واقع هدف این مطالعه تولید نوکلئوپروتئین نوترکیب به روش کلونینگ ژن و بیان پروتئین آن در باکتری *E. coli* و به کارگیری پروتئین نوترکیب خالص شده در مطالعات آتی جهت طراحی آزمایش الیزا (*NP-ELISA*) به منظور بررسی حضور آنتی‌بادی‌های اختصاصی تولید شده در طیور بر ضد تمام تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا A از جمله تحت تیپ H9N2 رایج کشور، بود.

مواد و روش کار

ویروس

در این مطالعه از جدایه A/chicken/Iran/AH-1/06(H_9N_2) ویروس آنفلوانزای طیور که از یک گله طیور گوشتی با علائم بیماری تنفسی و تلفات و با جداسازی در تخم‌مرغ جنین‌دار به دست آمده بود. استفاده شد. شناسایی اولیه این ویروس پیش از انجام این مطالعه با روش، RT-PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی H9 صورت گرفته بود

طراحی پرایمر

با استخراج چندین توالی قطعه شماره ۵ ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 از بانک ژن، ناحیه کد کننده پروتئین NP، مشخص گردید. سپس با توجه به توالی این ناحیه و ردیف نوکلئوتیدی ناحیه کلونینگ ناقل پلاسمیدی pMAL-c2X، پرایمرهای لازم برای تکثیر و کلونینگ ژن NP با جایگاه برش برای

آنزیم‌های محدودکننده EcoRI و Hind III طراحی گردید. توالی این پرایمرها به شرح زیر بود:

F 5′-GCCGGAATTCATGGCGTCTCAAGGCAC–3′
R 5′-GCCGAAGCTTTCAATTGTCATATTCCTCTGCATTGT-3′

استخراج RNA

استخراج RNA از مایع آلانتوئیک حاوی با استفاده از محلول تجاری Tripure، (Roche، Germany) طبق دستور العمل شرکت سازنده انجام شد و رسوب RNA بدست آمده از ۰/۱ میلی لیتر مایع آلانتوئیک در ۱۱/۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC (Sigma، USA) محلول گشت .پس از استخراج RNA جهت تکثیر ژن NP، در ابتدا لازم بود که از RNA خالص شده cDNA تهیه گردد. این مرحله طی روند رونوشت برداری معکوس (RT) و بااستفاده از آنزیم ریورس ترانس کریپتاز(Revertaid TMM- MULV) صورت پذیرفت. بر این اساس به ۱۱/۵ میکرولیتر از محلول حاصل از استخراج RNA، ۱ میکرولیتر (۵۰ پیکومول) از پرایمر F اضافه گردید و ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس این مخلوط بلافاصله بر روی یخ منتقل گردید. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ، به مخلوط فوق ۴ میکرولیتر RT buffer 5X، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTPs mix (10 mM) و نیم میکرولیتر RNase inhibitor (20 unit) اضافه گردید . در مرحله بعد پس از ۵ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سپس افزودن یک میکرولیتر (۲۰۰ واحد) آنزیم نسخه بردار معکوس واکنش به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد انجام گردید و با ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد پایان یافت. جهت تکثیر cDNA ساخته شده واکنش PCR به شرح زیر انجام شد: ۵ میکرولیتر cDNA با ۵ میکرولیتر بافر (PCR 10Xسیناژن، ایران) ، ۱ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۱۰ میلی- مولار، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر (۵۰ پیکومول) از پرایمرهای اختصاصی ناحیه کد کننده ژن NP و ۰/۵ میکرولیتر (۲/۵ واحد) آنزیم DNA پلیمراز Taq (سیناژن، ایران) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مخلوط و تکثیر cDNA طی ۳۵ چرخه دمایی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱/۵ دقیقه انجام شد .مراحل دمایی پیش و پس از تکثیر به ترتیب شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

کلونینگ و بیان ژن NP

محصول RT-PCR، پس از تهیه، با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل شرکت کیاژن (آلمان) خالص گشت و سپس بوسیله آنزیم‌های محدود کننده EcoRI و Hind III مورد هضم قرار گرفت. پلاسمید بیانی انتخاب شده برای این مطالعه (pMal-C_2x) نیزبا همان آنزیم‌ها هضم گردید .پس از واکنش هضم محصول RT-PCRو پلاسمید هر دو مجدداً با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل خالص شده و با آنزیم لیگاز T4 DNA به یکدیگرپیوند داده شدند. در مرحله بعد محصول واکنش لیگاسیون جهت ترانسفورماسیون با استفاده از پلی اتیلن گلیکول (polyethylen glycol) به سویه BL باکتری *Ecoli* انتقال داده شد .باکتری‌های ترانسفورم شده جهت تکثیر بر روی محیط آگار LB حاوی آمپی سیلین (۱۰۰µg/ml) کشت داده شدند .در مرحله بعد تعدادی از پرگنه- های رشد یافته در حضور آمپی سیلین در محیط LB مایع تکثیر گردیدند و حضور پلاسمید نوترکیب در آنها با روش لیز آلکالاین و هضم آنزیمی بررسی گردید. پس ازدستیابی به پرگنه‌های حاوی پلاسمیدهای نوترکیب، بیان پروتئین درسه پرگنه بررسی گردید. لذا پرگنه‌های انتخاب شده

در محیط LB حاوی آمپی سیلین(۱۰۰ µg/ml) و گلوکز تا OD_{600} ۰/۵ کشت داده شدند و سپس بیان پروتئین با افزودن IPTG(ایزوپروپیل بتا دی گالاکتو پیرانوزید (با غلظت نهائی ۱Mm القاء گردید .کشت باکتریها در حضور IPTG به مدت ۳ ساعت ادامه یافت .سپس نمونه‌های تهیه شده قبل و بعد از افزودن IPTGاز طریق ژل SDS-PAGE و رنگ آمیزی با رنگ آبی کوماسی جهت بررسی تولید پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفتند. این پلاسمید پروتئین NP را به صورت متصل به پروتئین متصل شونده به مالتوز (Maltose Binding Protein) که توالی آن در پلاسمید موجود است بیان خواهد کرد.

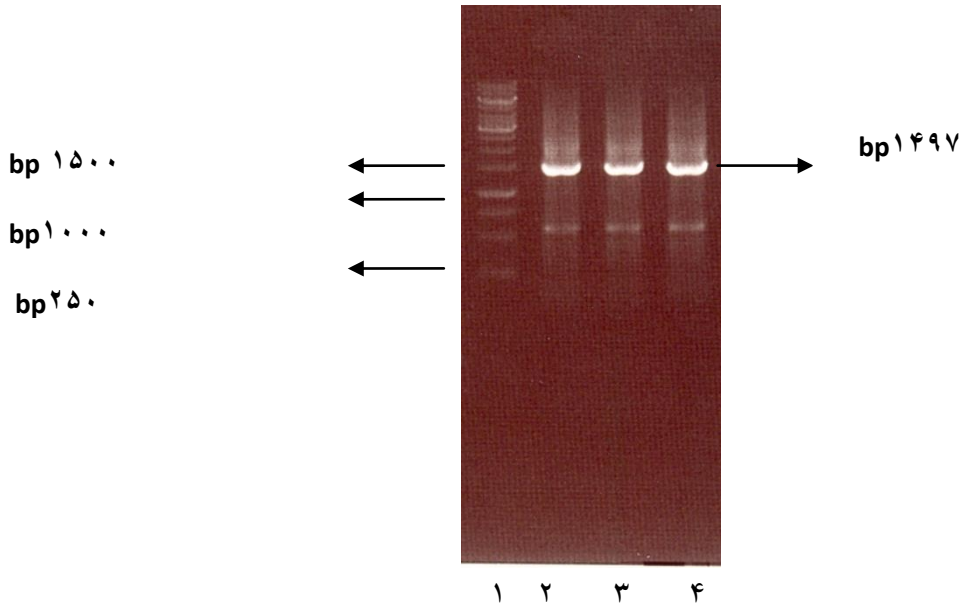
وسترن بلاتینگ

پس از بررسی بیان پرو تئینها با SDS-PAGE پروتئین‌های تولیدی به غشاء PVDF (پلی وینیلین دی فلوراید) انتقال داده شدند و به منظور بلوکینگ، غشاء به مدت یک شب در بافرPBS حاوی5% شیر پس چرخ در یخچال (4درجه سانتیگراد) انکوبه گردید .در طی این مرحله سطوحی از غشاء که عاری از پروتئین بودند با پروتئین کازئین شیر پوشانده شدند .پس از شستشو غشا ء باPBS حاوی ۰/۰۵ درصد Tween و سپس با PBS، سرم مثبت مرغی به نسبت **۱/۱۰۰** در PBS حاوی Tween و 2% شیر خشک رقیق شد و بر روی غشا ء اضافه گشت. انکوباسیون با این محلول به مدت **۱/۵** ساعت و بر روی شیکر انجام شد .بعد از این مرحله شستشو همانند مرحله قبل انجام شد و سپس غشاء به مدت 1 ساعت با آنتی- بادی ضد آنتی بادی مرغ که در بز تهیه و با پراکسیدازنشاندار شده بود (سیگما) در دمای اتاق انکوبه گردید. جهت ظهور واکنش از کلرونفتول (سیگما) استفاده شد . محلول ظهو ر از مخلوط کردن دو محلول **A** (حاوی ۳۰ میلی گرم کروموژن آلفا کلرونفتول در ۱۰ میلی لیتر متانول سرد) و محلول B (حاوی ۱۰۰ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد در ۵۰ میلی لیتر PBS)، بلافاصله قبل از مصرف تهیه گردید .کاغذ PVDF جهت ظهور به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در این محلول قرار داده شد و سپس با آب شسته شد.

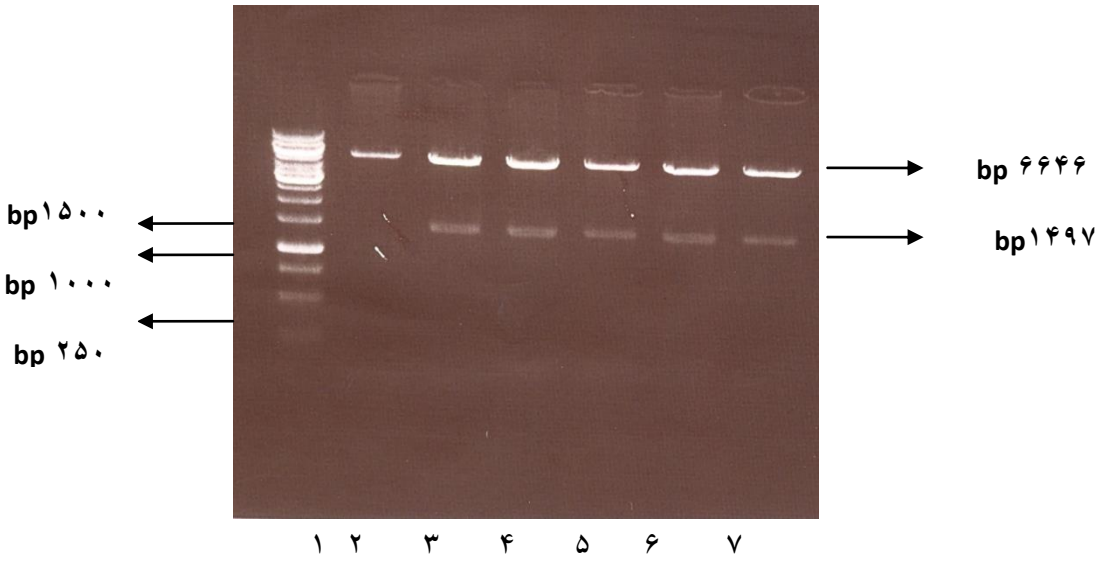
نتایج

پس از انجام RT- PCR محصول آزمایش در ژل آگارز ۱ درصد و در کنار یک نردبان ژنی (ladder) 1kb به عنوان استاندارد الکتروفورز شد .براساس نتایج الکتروفورز مشخص گردید که آزمایش RT- PCR با استفاده ازپرایمرهای طراحی شده منجر به ساخت یک قطعه DNA به طول ۱۴۹۷ bp شده است که با نتایج قابل انتظار همخوانی داشت. بنابراین ژن سازنده NP با موفقیت تکثیر داده شده بود. (تصویر ۱)

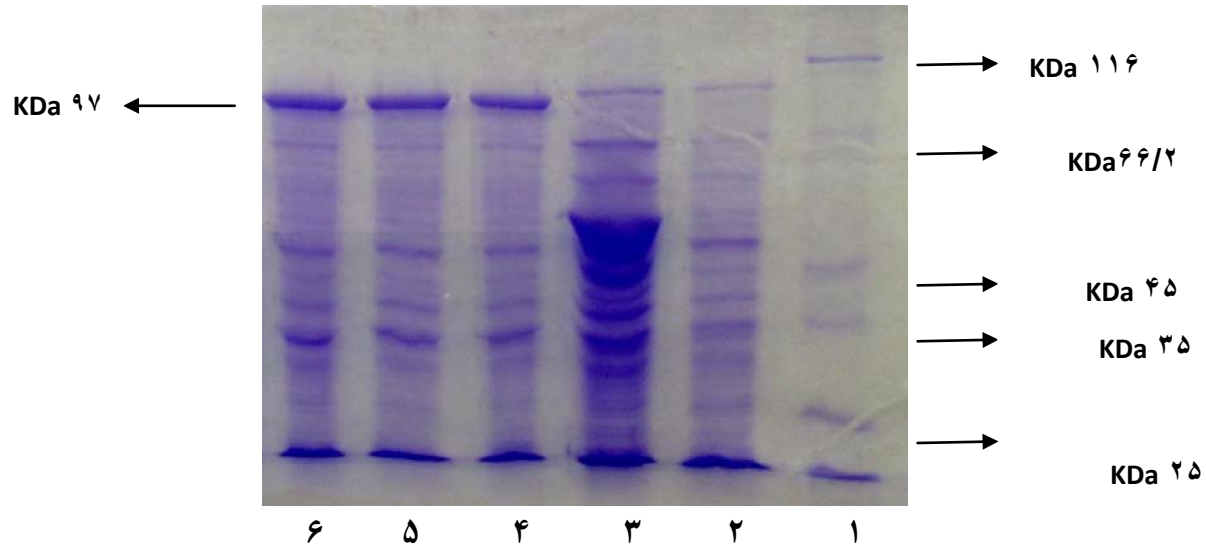
پس از تکثیر موفق ژن NP در PCR و انجام مراحل هضم آنزیمی، لیگاسیون و ترانسفورماسیون، ظهور پرگنه‌های باکتریایی بر روی محیط LB حاوی آمپی سیلین نشان دهنده ورود موفق پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین در این باکتری‌ها بود .با این حال وجود پلاسمید و نیز ژن**NP** با استخراج پلاسمید از پرگنه‌های رشد کرده و انجام مراحل هضم آنزیمی تائید شد (تصویر ۲). پس از اطمینان از کلونینگ موفق ژن در پلاسمید pMAL-C2 در باکتری *Ecoli* تعدادی از پرگنه‌های، حاوی پلاسمید جهت بیان پروتئین با آزمایش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این بررسی برروی تعدادی از پرگنه‌های مورد آزمایش در تصاویر ۳ و ۴ نشان داده شده است.



تصویر ۱- نتایج الکتروفورز محصول RT-PCR ژن NP
۱- مارکر یک کیلو باز
۲، ۳، ۴- ژن NP به طول ۱۴۹۷ bp



تصویر ۲ -نتایج هضم آنزیمی بر روی پلاسمیدهای نوترکیب
۱- مارکر یک کیلو باز
۲- پلاسمید فاقد ژن NP (کنترل منفی)
۳ تا ۷- پلاسمیدهای حاوی ژن NP به طول ۱۴۹۷bp



تصویر ۳- SDS-PAGE: القاء بیان پروتئین نوترکیب در باکتری BL ترانسفورمه شده بصورت متصل به پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP) با وزن مولکولی حدود ۹۷ کیلو دالتون. ستون‌های نمایش داده شده ۳ کلونی باکتری بعد از مجاور شدن با IPTG را نشان می‌دهند.

ستون ۱: مارکر وزنی مولکولی

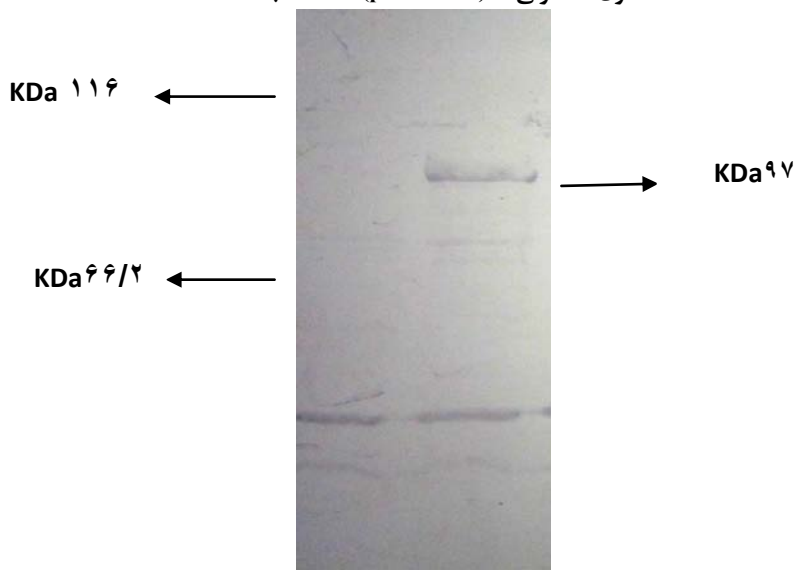
ستون ۲: شاهد منفی ((pMAL-c2X القاء نشده با IPTG

ستون ۳: شاهد منفی (pMAL-c2X) القاء شده با IPTG

ستون ۴: کلونی ۱ (pMAL-NP) القاء شده با IPTG

ستون ۵: کلونی ۲ (pMAL-NP) القاء شده با IPTG

ستون ۶: کلونی ۳ (pMAL-NP)القاء شده با IPTG



تصویر -4 وسترن بلات: چگونگی واکنش پروتئین NP بیانی با سرم مثبت دارای پادتن انفلوانزا

ستون ۱: باکتری حاوی pMAL-c2X، القاء شده با IPTG

ستون ۲: باکتری حاوی پرگنه‌های بیان کننده پروتئین NP، القاء شده با IPTG

بحث

روش‌های مختلفی جهت تشخیص آلودگی با ویروس آنفلوانزا وجود دارد که یا از طریق بررسی حضور پارتیکل‌های ویروسی، آنتی‌ژن‌های ویروسی و اسیدنوکلئیک آن می‌باشد و یا از طریق جستجوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی تولید شده و انجام آزمایشات سرولوژیکی است. از میان این روش‌ها، روش‌های سرولوژیکی در برنامه‌های کنترلی و مراقبتی هم در

سطح گله و هم برای موارد انفرادی نقش مهمی دارند. AGPT، HI و اشکال مختلف ELISA به طور متداول برای بررسی آنتی‌بادی‌های تولید شده استفاده می‌شوند. ELISA آزمایشی سریع و حساس بوده که قادر به شناسایی آنتی‌بادی‌های اختصاصی تولید شده بر ضد تمام تحت تیپ‌های ویروسی است. معمولاً برای ساخت کیت‌های تجاری الیزا نیاز به تغلیظ و خالص نمودن ویروس زنده به‌عنوان آنتی‌ژن است که این امر ممکن است موجب پخش ویروس زنده و آلودگی محیط گردد (۹). با توجه به ثابت بودن توالی ژن NP در میان تحت تیپ‌های مختلف ویروس، می‌توان از آن به عنوان یک آنتی‌ژن جایگزین تشخیصی مناسب جهت طراحی کیت الیزا و نشان دادن ایمنی ایجاد شده متعاقب آلودگی با تمام ویروس‌های تیپ A استفاده کرد (۳). در واقع هدف این مطالعه تولید نوکلئوپروتئین نوترکیب به روش کلونینگ ژن و بیان پروتئین آن در باکتری *E. coli* و به کارگیری پروتئین نوترکیب خالص شده در مطالعه دیگری جهت طراحی آزمایش الیزا (*NP-ELISA*) به منظور بررسی حضور آنتی‌بادی‌های اختصاصی تولید شده در طیور بر ضد تمام تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا A از جمله تحت تیپ H9N2 رایج کشور بود. تاکنون مطالعات مختلفی جهت کلون کردن ژن NP انجام شده است. در این مطالعات مولکولی، کل ژن NP یا قطعاتی از آن هم توسط وکتورهای پروکاریوتی و هم وکتورهای یوکاریوتی در هر دو سیستم پروکاریوتی و یوکاریوتی کلون و بیان شده است.

Starick و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از یک باکولوویروس نوترکیب حاوی ژن NP ویروس آنفلوانزای پرندگان موفق به بیان این پروتئین توسط سلول‌های SF9 گردیده‌اند (۷).

Yang و همکاران (۲۰۰۸) کل قطعه NP ویروس آنفلوانزای (H5N9) A/TK/ON/7732/66 وارد شده به درون وکتور Pet 30 را با موفقیت به درون باکتری BL21 ترانسفورمه کردند و اقدام به بیان این پروتئین نموده‌اند (۱۰)

Watcharatanyatip و همکاران (۲۰۱۰) نیز از وکتور بیانی pMAL-c2X برای کلون کردن کل قطعه ژن NP ویروس آنفلوانزای H5N1 استفاده نموده‌اند و پلاسمید نوترکیب را به داخل باکتری BL21 وارد کرده و موفق به بیان آزمایشگاهی پروتئین نوترکیب MBP-NP گردیده‌اند (۸).

در زمینه کلون کردن ژن NP و بیان NP نوترکیب چه در سیستم‌های پروکاریوتی (*E. coli*) و چه در سیستم‌های یوکاریوتی تاکنون هیچ مطالعه‌ای در ایران انجام نشده است و به نظر می‌رسد مطالعه حاضر اولین تحقیق در این زمینه باشد. در این مطالعه بر خلاف اکثر مطالعات انجام شده توسط محققین دیگر کل طول NP ویروس آنفلوانزای H9N2 (۱۴۹۷ bp) با موفقیت در سیستم بیانی پروکاریوتی باکتری *E. coli*، سویه BL21 بیان گردید. از سوی دیگر با انتخاب پلاسمید pMAL-c2X این پروتئین به شکل محلول تولید شد. در اغلب مطالعات انجام شده به منظور محلول نمودن NP از درمان‌های شیمیایی استفاده گردیده است ولی در این تحقیق حضور MBP در انتهای آمینی پروتئین NP باعث حلالیت آن گردید. تفاوت تحقیق حاضر با تحقیق سایر محققین در تحت تیپ ویروس، نوع وکتور و سیستم بیان کننده می‌باشد .در نتیجه می‌توان گفت در این مطالعه پروتئین هدف با وزن حدود ۹۷ کیلودالتون از طریق SDS-PAGE و متعاقب آن وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده بیان پروتئین با وزن ملکولی قابل انتظار در SDS-PAGE واکنش مثبت این

پروتئین با سرم پرنده آلوده به آنفلوانزا در وسترن بلات نشان دهنده بیان موفق ژن NP ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در *اشریشیاکلی* می‌باشد. با تولید نوکلئوپروتئین نوترکیب می‌توان یک نوع الیزای غیرمستقیم طراحی نمود که بدونآلودگی محیط، به عنوان یک ابزار مراقبتی جهت بررسی‌های سرو اپیدمیولوژیکی درگله‌های طیور کشور از آن استفاده گردد.

منابع

1- Fouchier, R. A., Schneeberger, P. M., Rozendaal, F. W., Broekman, J. M., and Osterhaun A. D. (2004). Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, **101**: 1356-1361.

2- Guo, Y. (2002). Influenza activity in China: 1998- 1999. *Vaccine*, 20: S28-S35.

3- Jin, M., Wang, G., Zhang, R., Zhao, S., Li, H., Tan, Y., Chen, H. (2004). Development of enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection of antibodies to avian influenza virus. *Avian Diseases*, **48**: 870-878.

4- Palese, P. and Shaw, M. Orthomyxoviridae. In: Knipe, D. and Howley, P. (2007*). Fields Virology*. 5th ed. Lippin cott Williams Wilkins, pp: 1868-1689.

5- Protela, A., and Digard, P. (2002). The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *Journal of General Virology*, **83**: 723–734.

6- Shu, L. L., Bean, W. J., Webstet, R. G. (1993). Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990. *Journal of Virology,* **67**: 2723-9.

7- Starick, E., Werner, O., Schirrmeier, H., Kollner, B., Riebe, R., Mundt, E. (2006). Establishment of a competitive ELISA (cELISA) system for the detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies and its application for field sera from differentr species. *Journal of Veterinary Medicine B*, **53**: 370-375.

8- Watcharatanyatip, K., Boonmoh, S., Chaickhoun, k., Songserm, T., Woratanti, M., Dharakul, T. (2010). Multispecies detection of antibodies to influenza A viruses by a double-antigen sandwich ELISA. *Journal of virological Methods*, **163**: 238-243.

9- Wu, R., Hu, S., Xiao, Y., Li, Z., Shi, D., Bi, D. (2007). Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection and quantification of antibodies against avian influenza virus. *Veterinary Research Communications*, **31**: 631-641.

10- Ye, Q., Krug, R. M., Tao, Y. J. (2006). The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature,* **444**: 1078-1082.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 14, Issue1, 2018

Cloning and expression of the NP gene of H9N2 avian influenza virus in *Escherchia coli*

Jaydari, A.*[*1],Seyfi Abad Shapouri, S.R.[2], GhourbanpourNajafabadi, M.[3]

1. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2, 3. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, ShahidChamran University, Ahwaz, Iran

Received Date: 18June2016 *Accepted Date: 2March2018*

Abstract:*Avian influenza (AI) is a serious infectious disease with world-wide significance causing considerable financial losses in poultry industry.Serodiagnosis based on detection of antibody to the nucleoprotein (NP) that is conserved among all influenza A virus, can be used to demonstrate immunity against all subtypes of influenza A virus. The aim of this study was to produce recombinant nucleoprotein (NP). For this purpose, the coding region of nucleoprotein (NP) gene of A/chicken/Iran/AH-1/06(H_9N_2) AI isolate was amplified by RT-PCR and cloned into a prokaryotic expression vector (pMal-C_2x) and transformed into E. coli BL21(DE_3). The purified recombinant vector for the expression of recombinant MBP-NP was used.Target protein with a weight of about 97 kDa by SDS-PAGE and subsequent Western blotting was evaluated. Observationthe expressed protein with expected molecular weight in SDS-PAGE and positive reaction ofthis protein with bird'serum infected avian influenza In western blot showed that the expression of NP gene in E.coli was successful.*

Keywords: cloning, avian influenza, H9N2 sub type, NP gene

**Corresponding author: Jaydari, A.*
Address: Khorramabad, Lorestan University, School ofVeterinary Medicine, Department of pathobiology Sciences. Khorramabad, Iran. Tel: 066- 33120109
Email:jaydari.a@lu.ac.ir