



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 Journal of Biotechnology. 2019; 10(1):15-21.

¹National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

²Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Pajooheh Boulevard, Shahrak-e Pajooheh, 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] Newcastle 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 ...

بیان، خالص سازی و بررسی ایمنی زایی پروتئین مصنوعی فیوژن (F) ویروس نیوکاسل در مدل حیوانی

سمیه تکریم MSc

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

محمدجواد معتمدی PhD

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

محیات جعفری MSc

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

جعفر امانی PhD

مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

علی هاتف* سلمانان PhD

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

چکیده

ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) عامل عفونی طیف وسیعی از پرندگان به ویژه جوجه‌ها است که همواره یک خطر جدی برای صنعت مرغداری است. این ویروس جزء خانواده پارامیکسوپویریده بوده و بر سطح غشای ویروس گلیکوپروتئین‌های فیوژن (F) و هم‌گلوتنینین 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 هم‌گلوتنینین 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 میزان پروکاریوتی /شریشیا 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 تیترا آنتی‌بادی‌های ویژه پروتئین F در سرم موش‌های ایمن‌شده اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که ایمنی‌زایی موش‌ها با این پروتئین نوترکیب منجر به افزایش تیترا 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، /شریشیا 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 پارامیکسوپویریده 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 (گانگلوژید) 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 هم‌گلوتنینین (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 کارایی 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 سویه‌های بسیار بیماری‌زا (ولوژنیک) به‌صورت NDV بومی وجود دارند، بسیار حایز اهمیت است^[5]. استفاده از رویکرد جدید تکنولوژی ژن

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

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

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده و پلاسمید حاوی ژن دو قسمتی (به عنوان الگو) انجام شد. واکنش با استفاده از آنزیم *pfu* پلی مرز، ۲/۵ میلی مولار Mg^{2+} و دمای $60^{\circ}C$ برای اتصال پرایمرها و ۳۵ سیکل صورت گرفت.

همسانه سازی ژن در ناقل (pET-32a) و بیان ژن: پس از خالص سازی قطعه تکثیر شده از روی ژل آگارز و هضم آنزیمی با آنزیم های *BamHI/I Xho*، DNA مورد نظر در ناقل بیانی pET-32a ایی که با همین آنزیم ها هضم شده بود کلون شد. پلاسمیدهای نو ترکیب با روش شوک حرارتی وارد باکتری مستعد */شریشیا کلی* سویه $\alpha DH5$ شده و کلنی های نو ترکیب روی محیط لوریا برتانی (LB) حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین انتخاب و پس از تایید کلون های نو ترکیب با روش PCR و هضم آنزیمی، ناقل نو ترکیب خالص و با روش های مرسوم به باکتری *E. coli* مستعد شده سویه Rosetta-gami (DE3) منتقل شد. تعدادی از کلنی های حاوی سازه نو ترکیب در محیط کشت مایع حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) کشت شده ($37^{\circ}C$ ؛ ۱۸۰ rpm) و پس از رسیدن به غلظت مناسب ($OD_{600} = 0.6$) با یک میلی مولار ماده القا کننده (IPTG) تحریک صورت گرفت. در زمان های ۲، ۴، ۶ و ۱۶ ساعت پس از القا، نمونه برداری از باکتری ها انجام و پس از تخریب سلول ها، نمونه ها روی ژل پلی آکریل آمید دنا توره (SDS-PAGE) و پس از رنگ آمیزی با کوماسی بلو آنالیز شد. به منظور تایید پروتئین تولید شده از روش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی علیه دنباله هیستیدینی ($6 \times His$ tag) استفاده شد.

تخلیص و دیالیز پروتئین F: پس از القا، باکتری ها با سانتریفوژ از محیط کشت جدا شده (8000 rpm ؛ ۱۵ دقیقه) و رسوب در بافر دنا توره (دی سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار، اوریک اسید ۸ میلی مولار، تریس-HCl ۱۰ میلی مولار و میزان pH برابر ۸) حل شد (۳۰ دقیقه دمای اتاق/حرکات دورانی). بعد از مخلوط کردن محلول سانتریفوژ شده (8000 rpm ، ۲۰ دقیقه، دمای اتاق) و محلول رویی به ستون Ni-NTA برده شد. مراحل شست و شو طبق روش استاندارد انجام و نمونه های خارج شده از ستون روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲% الکتروفورز شد.

به منظور حذف اوره موجود در محلول پروتئین، مقدار هم حجم از بافر واسرشتگی حاوی تثبیت کننده گلیسرول (سدیم کلرید ۱۰۰ میلی مولار، گلیسین ۱۰۰ میلی مولار، تریس ۱۰۰ میلی مولار، ۲- مرکاپتواتانول ۱۴۰ میلی مولار، گلیسرول ۲/۵% و میزان pH برابر با ۸/۵) به محلول پروتئین در حال مخلوط شدن به صورت تدریجی اضافه شد. سپس با هم حجم آن محلول بافر فسفات سالبین (PBS) به مدت ۱۲ ساعت (با دو بار تعویض) دیالیز شدند. در نهایت محلول پروتئین در دمای $70^{\circ}C$ - نگهداری شد. پروتئین حاصل برای مصارف ایمن سازی قابل استفاده است.

ایمن سازی حیوان آزمایشگاهی با پروتئین نو ترکیب: تعداد ۱۳ سر

نو ترکیب در صنعت واکسن سازی از طریق تشخیص اپی توپ های مهم و ایمونولوژیک آنتی ژن (به جای استفاده از کل ویروس که احتمال پراکنده شدن از حیوان واکسینه و شیوع سویه های جدید، ناشی از نو ترکیبی با سویه های وحشی) را دارد، منجر به ظهور واکسن های زیر واحدی موثر و قوی شده است که اثرات جانبی کمتری (در مقایسه با واکسن های موجود) دارند [20, 21].

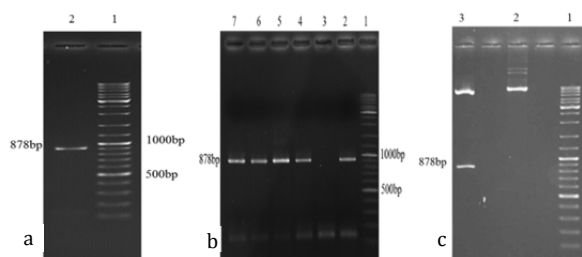
گزارش ها نشان داده است که عامل اصلی عفونت زایی و انتشار ویروس نیوکاسل از یک سلول به سلول دیگر پروتئین فیوژن (F) است [5]. همچنین براساس مطالعات صورت گرفته مولکول F به تنهایی به عنوان یک ایمونوژن قوی و موثر شناخته شده است که قادر به ایجاد پاسخ ایمنی مخاطی و خونی مناسب و حفاظت بخش در مدل حیوانی است [22, 23]. بنابراین انتظار می رود با ایجاد اختلال در عملکرد این مولکول در بدن پرنده با روش های مختلف از جمله ایجاد ایمنی هومورال (تولید آنتی بادی) اختصاصی بر علیه این آنتی ژن، بتوان از بروز بیماری، شیوع آن و همچنین عواقب بعدی احتمالی آن که می تواند مرگ و میر وسیع در بین طیور باشد، پیشگیری نمود. استفاده از بخش های ایمنی زایی که حاصل مقایسه توالی سویه مرجع با توالی بیش از صد سویه در حال گردش ویروس NDV است، به جای به کارگیری پروتئین کامل یا کل ویروس ضعیف شده می تواند سیستم ایمنی را به صورت هدفمند تحریک نموده و مهم تر از آن، نگرانی های حاصل از شیوع ژنوتیپ های جدید بیماری (در واکسیناسیون سنتی) در محیط را نیز کاهش دهد. هدف این تحقیق، انتخاب، بیان اپی توپ های اصلی این آنتی ژن دو قسمتی (F2-F1) در سیستم پروکاریوتی و بررسی ایمنی زایی پروتئین نو ترکیب در حیوان مدل (موش) آزمایشگاهی و مقایسه ایمنی زایی آن با ویروس سویه واکسن است.

مواد و روش ها

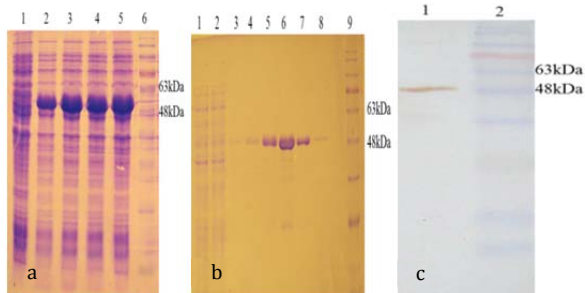
در پژوهش تجربی حاضر توالی کامل پروتئین مصنوعی F و سویه مرجع NDV LaSota (به ترتیب شماره دسترسی: P35743 و P33614) از پایگاه داده های پروتئینی NCBI استخراج شد. برای مراحل همسانه سازی و بیان ژن، سویه های باکتری */شریشیا کلی* سویه DH5 α و سویه Rosetta-gami (DE3) از شرکت (اینویترژن؛ ایالات متحده) تهیه شدند. پلاسمید pUC57 به عنوان یک ناقل همسانه سازی و تکثیر (فرمنتاز؛ ایالات متحده) و پلاسمید pET-32a به عنوان ناقل بیانی باکتری */شریشیا کلی* برای بیان قطعه کلون شده در سیستم پروکاریوتی (نواژن؛ ایران) تهیه شد. به منظور دست ورزی ژن مصنوعی و وکتورهای مورد نظر از آنزیم های محدود کننده *BamH I* و *Xho I* و آنزیم های T4 لیگاز، *pfu* پلی مرز (فرمنتاز؛ ایالات متحده) و *Taq* پلی مرز (فرادید دانش؛ ایران) استفاده شد. کیت استخراج محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)، کیت استخراج پلاسمید (روچ؛ سوئیس) و واکسن زنده ضعیف شده ویروس نیوکاسل (موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی؛ کرج؛ ایران) تهیه شدند.

تکثیر ژن F با استفاده از PCR: به منظور تکثیر سازه مصنوعی و دو قسمتی F واجد دو قطعه HR-A و HR-B که توسط یک لینکر پپتیدی کوتاه به همدیگر متصل شده اند از ساختار از پیش طراحی شده 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 آنزیم ها نیز

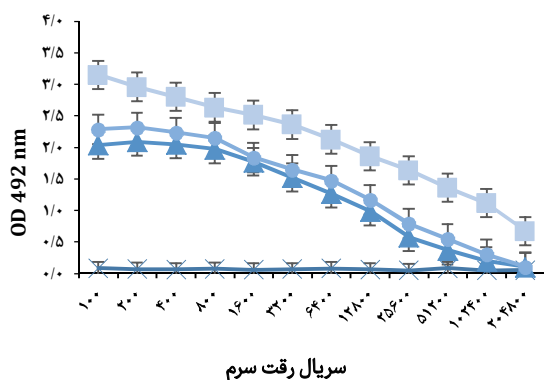
چنانچه در شکل مشخص است پس از تزریق اول و دوم تفاوت قابل توجه در سطح آنتی بادی IgG مشاهده نمی‌شود.



شکل ۱ همسانه‌سازی قطعه *f* در ناقل پلاسمیدی pET-32a و تایید آن: (a) تکثیر ژن مصنوعی *f* (ستون ۲) محصول تکثیر ژن، (b) الگوی الکتروفورز محصول PCR از کلون‌های حاوی قطعه *f* در ناقل pET-32a روی ژل آگارز ۱٪: ستون ۲: پلاسمید pUC57 حاوی سازه *f* (کنترل مثبت)، ستون ۳: *E. coli* α DH5 تراریخت‌نشده (کنترل منفی)، ستون‌های ۴ تا ۷ کلون‌های 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 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 (۱۰۰ جفت‌بازی) 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: کلنی‌های مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب بعد از بیان، ستون ۶: نشانگر وزن مولکولی پروتئین (۱۰ تا ۱۷۰ کیلو دالتون)، (b) ارزیابی تخلیص پروتئین *f* از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA (روش دنا توره) به وسیله SDS-PAGE: ستون ۱: خروجی ستون کروماتوگرافی، ستون‌های ۲ و ۳: خروجی ستون با بافر شست‌شو، 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 تیتراژ 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.

موش بالب/سی ماده (یک گروه ۵ تایی تزریق‌شده با سویه واکسن به‌عنوان کنترل مثبت، یک گروه ۵ تایی تزریق‌شده با آنتی‌ژن F به همراه ۳ سرم‌موش کنترل منفی) با سن ۶ تا ۷ هفته‌ای 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 ۸ میکروگرم 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 (۴ میکروگرم) 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 ۱۰۰ میکرولیتر از واکسن ضعیف‌شده ویروس در چهار دوره تزریق شدند. خونگیری از موش‌ها یک هفته بعد از هر تزریق انجام شد.

تعیین تیتراژ آنتی‌بادی به روش الایزا (ELISA): بعد از اندازه‌گیری میزان پروتئین نوترکیب محلول با روش برادفورد، میزان ۵۰۰ نانوگرم از پروتئین خالص‌شده (F) در بافر پوشاننده (سدیم‌بی‌کربنات ۰/۲ مولار، سدیم‌کربنات ۰/۲ مولار 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 ضد موش کونژوگ با HRP به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شد. آزمایش با سه تکرار انجام و نتایج در نمودار استاندارد قرار داده شدند. براساس آنالیزها میزان تیتراژ 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 (۸۷۸ جفت‌بازی) 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* (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 دنا توره 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 ۳۶ میلی‌گرم به ازای هر لیتر محیط کشت برآورد شد.

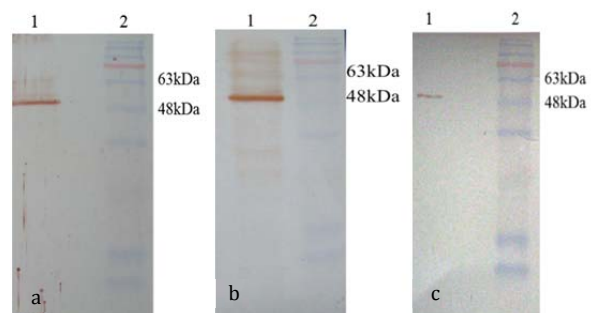
ارزیابی تولید آنتی‌بادی به روش الایزا: به‌منظور تعیین تیتراژ آنتی‌بادی علیه پروتئین نوترکیب و همچنین تعیین تیتراژ خنثی‌سازی در سرم حیوانات ایمن‌شده از روش الایزا استفاده شد. نتایج حاصل از آزمایش الایزا با پروتئین نوترکیب نشان می‌دهد که پس از هر مرحله از تزریق افزایش تیتراژ آنتی‌بادی و افزایش OD در مقایسه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

نوترکیب مطرح است. اگرچه این سیستم بیانی قادر به اجرای اصلاحات پس از ترجمه پروتئین های یوکاریوتی نیست [27, 28]، اما از آنجایی که بسیاری از پروتئین های یوکاریوتی، ساختار سه بعدی و فعالیت کامل زیستی خود را در شکل غیرگلیکوزیله نیز حفظ می کنند، می تواند در *E. coli* بیان شوند [29]. در خصوص پروتئین F از ویروس نیوکاسل نیز این مساله صدق نموده و علی رغم عدم وجود تغییرات پس از ترجمه (نظیر اضافه شدن مولکول های قندی) هنوز هم ویژگی های آنتی ژنیک خود را حفظ کرده و قادر است سیستم ایمنی را به نحو مناسبی تحریک نماید [8]. به منظور بیان پروتئین های نوترکیب در *E. coli* سویه های متعددی با ویژگی های مختلف و متناسب با احتیاجات تولیدی طراحی شده اند. در این میان سویه های ویژه *E. coli* که دارای ژن کدکننده RNA پلی مرز از باکتریوفاژ T7 هستند برای بیان پروتئین هدف استفاده می شوند. ناقل های سیستم pET، (دارای پروموتور قوی با منشا فاژ T7) مناسب برای بیان در این سویه ها هستند. در مواردی که بهینه سازی کدون های ژن به خوبی بر کدون های میزبان *E. coli* منطبق نباشد از سویه های خاصی برای بیان ژن مورد نظر استفاده می شود. سویه Rosetta-gami (DE3) حاوی tRNA های مربوط به کدون های نادری است که به ندرت در *E. coli* مورد استفاده قرار می گیرند [30]. طبق مطالعات صورت گرفته، تحقیق حاضر اولین گزارش در خصوص بیان اپی توپ های ایمنی زای پروتئین F ویروس ND در سیستم *E. coli* بوده است. در تحقیقی مشابه بیان ژن نوکلئوکسپید (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 بهینه سازی صورت گرفته روی ژن F، انتظار می رفت 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 ۳/۶۱ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت محاسبه شد. در تحقیقی مشابه میزان بیان پروتئین نوکلئوکسپید (NP) همین ویروس در سیستم *E. coli* برابر با ۵/۴ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت بوده است [31]. نتایج به دست آمده میزان بیان قابل قبول پروتئین نوترکیب F را در این سیستم بیانی تایید نمود. پروتئین هایی که توسط *E. coli* به فرم نامحلول بیان می شوند در صورت دیالیز با دترجنت ها به فرم طبیعی و محلول خود تبدیل می شوند [32-34]. با انجام دیالیز و حذف اوره پروتئین F بازآرایی شده و با فلدینگ طبیعی پیش بینی شده توسط آنالیزهای بیوانفورماتیکی به حیوان تزریق شد.

به منظور تشخیص و اندازه گیری آنتی بادی های پلی کلونال تولید شده توسط لنفوسیت های B مختلف و علیه اپی توپ های F در سرم موش از روش الایزای نیمه کمی و وسترن بلات استفاده شد. گرچه در این روش اپی توپ های 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 پاسخ های ایمنی و تولید تیترا بالای آنتی بادی از کلاس IgG سرمی از همان تزریق اول شده است که نشان می دهد این پروتئین یک ایمونوژن بسیار خوب با قابلیت بالای تحریک سیستم ایمنی تا رقت های بالا (۱/۲۰۴۸۰۰) به منظور تولید آنتی بادی بوده است. این پروتئین توانسته از اولین تزریق، موجب تولید میزان بالایی از

تایید آنتی بادی تولید شده علیه پروتئین F با تکنیک وسترن بلاتینگ: به منظور اثبات ایمنی زایی پروتئین نوترکیب F و مقایسه عملکرد آن با سویه واکسن، از واکنش وسترن بلات استفاده شد. برای این منظور پروتئین نوترکیب F با سرم موش های ایمن شده با پروتئین F و سرم موش های ایمن شده سویه واکسن تجاری مجاور شد. در ادامه مجاورت ویروس واکسن تجاری پس از الکتروفورز روی ژل الکتروفورز با سرم موش ایمن شده با پروتئین نوترکیب F صورت گرفت. نتایج وسترن بلات نشان داد که آنتی بادی ایجاد شده توسط پروتئین نوترکیب قادر به شناسایی سویه واکسن بوده و برعکس، آنتی بادی های تولید شده توسط سویه واکسن هم قادر است پروتئین نوترکیب را مورد شناسایی قرار دهد (شکل ۳- a, b, c).



شکل ۳) تایید واکنش آنتی بادی تولید شده علیه پروتئین F با تکنیک وسترن بلاتینگ: (a) وسترن بلاتینگ آنتی بادی سرمی موش های ایمن شده با پروتئین F علیه پروتئین نوترکیب F: ستون ۱: پروتئین نوترکیب تخلیص شده F؛ وسترن بلاتینگ آنتی بادی سرمی موش های ایمن شده با پروتئین F علیه سویه واکسن ویروس نیوکاسل: ستون ۱: نمونه پروتئینی واکسن ویروس نیوکاسل، (c) وسترن بلاتینگ آنتی بادی سرمی موش های ایمن شده با نمونه پروتئینی واکسن نیوکاسل علیه پروتئین نوترکیب F: ستون ۱: پروتئین نوترکیب تخلیص شده F؛ در همه شکل ها 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 تلاش های بسیاری در جهت کنترل این بیماری و شناخت آن از نظر همه گیرشناسی و ویروس شناسی صورت گرفته است [4].

گلیکوپروتئین F در کنار پروتئین سطحی HN (هماگلوتنین نورآمینیداز) به عنوان یکی از اصلی ترین پروتئین های سطحی ویروس، موجب نفوذ ویروس به داخل سلول میزبان، الحاق ویروس با غشای سلول و در نهایت تخریب آن می شود. در صورت مقابله با مرحله اول بیماری زایی ویروس (یعنی ممانعت از اتصال و ورود به داخل سلول) می توان سد محکمی در برابر بیماری و مراحل بعدی آن ایجاد نمود. به عبارت دیگر این پروتئین سطحی می تواند هدف مهمی برای ایجاد پاسخ ایمنی میزبان برای مقابله با ویروس باشد [25]. اگرچه هر دو آنتی ژن (HN و F) قادر به تولید آنتی بادی های خنثی کننده در بدن حیوان هستند اما تنها پروتئین F می تواند تولید آنتی بادی هایی 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 واکسن های زیرواحدی حائز اهمیت است. میزبان *E. coli* به عنوان یکی از رایج ترین و کم هزینه ترین میزبان ها برای تولید پروتئین های

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- Schirmacher 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 F₁ or HA₂ viral polypeptides. *Virology*. 1980;105(1):205-22.

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 کارایی 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 ۴۹/۷ کیلودالتون) 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 همورال، 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.

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

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

سهم نویسندگان: سمیه تکریم (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۴۵٪)؛ 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 III-۴۴۷)، تحت حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری بوده است.

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- Bournsnel 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-Senelongue 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-Senelongue 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*.