



Cloning of the Matrix Protein (M1) Gene of H9N2 Avian Influenza Virus into the pTZ57R/T Vector

Shirin Mohammadipour¹ , Hadi Tavakkoli² , Saideh Afrisham¹ , Sheyda Sharabiani^{*3} , Masoumeh Abed³ ,
Mohammad Amir Esmaili⁴ , Ghadir Shahbazi⁵

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Rasht Branch, Rasht, Iran
4. DVM, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Urmia Branch, Urmia, Iran
5. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shabestar Branch, Shabestar, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: The matrix protein 1 (M1) is one of the most conserved structural proteins among different influenza virus subtypes and plays a critical role in viral assembly, replication, and pathogenicity. Due to its high degree of conservation, the M1 gene represents an attractive target for molecular studies and diagnostic assay development. The present study aimed to clone a fragment of the M1 gene of the H9N2 avian influenza virus into the pTZ57R/T cloning vector.

Materials and Methods: Following propagation of the H9N2 avian influenza virus in embryonated chicken eggs, viral RNA was extracted from harvested allantoic fluid. The target M1 gene fragment was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The amplified product was purified and subsequently ligated into the pTZ57R/T plasmid vector. Recombinant plasmids were transformed into Escherichia coli XL1-Blue competent cells and propagated for plasmid amplification. Recombinant clones were identified and confirmed using standard molecular techniques.

Results: Successful amplification, cloning, and propagation of the M1 gene fragment were achieved. The pTZ57R/T vector in combination with E. coli XL1-Blue provided an efficient system for cloning and maintenance of the target gene. The recombinant construct remained stable and yielded sufficient quantities of plasmid DNA for subsequent molecular applications.

Conclusion: The successful cloning of the M1 gene of the H9N2 avian influenza virus provides a valuable genetic resource for future molecular investigations. The recombinant construct may serve as a suitable template for the development of diagnostic assays and further studies on the molecular biology and pathogenesis of influenza A viruses.

Keywords: H9N2 subtype, M1 protein, pTZ57R/T plasmid, cloning

Received: 09.05.2026

Accept: 21.05.2026

Final Edit: 11.06.2026

Online Publish: 26.06.2026

Corresponding Information: Sheida Sharabiani, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Rasht Branch, Rasht, Iran. Email: sharabianiis@gmail.com



Cite this article: Mohammadipour, Sh; Tavakkoli, H; Afrisham, S; Sharabiani, Sh; Abed, M; Esmaili, M; Shahbazi, gh (2025). Cloning of the Matrix Protein (M1) Gene of H9N2 Avian Influenza Virus into the pTZ57R/T Vector. *Animal Health and Infectious Diseases*. 1(3), 91-97.

© Author (s) retain the copyright.

DOI: [10.22034/jahid.2026.2092554.1075](https://doi.org/10.22034/jahid.2026.2092554.1075)



کلون سازی ژن پروتئین ماتریکس (M1) ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در ناقل pTZ57R/T

شیرین محمدی پور^۱، هادی توکلی^۲، سعیده افریشم^۳، شیدا شریانی^۴، معصومه عابد^۳، محمد امیر اسمعیلی^۴، قدیر شهبازی^۵

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۲. گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت، ایران
۴. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران
۵. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، شبستر، ایران

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین M1 به عنوان یکی از پروتئین های بسیار حفاظت شده در میان زیرگونه های مختلف ویروس های آنفلوآنزا شناخته می شود و این موضوع اهمیت و جایگاه آن را در حوزه ویروس شناسی برجسته می کند. هدف اصلی این پروژه پژوهشی، کلون سازی دقیق و منظم یک بخش خاص از ژنی است که مسئول کد کردن پروتئین M1 مرتبط با ویروس آنفلوآنزا زیرگونه H9N2 می باشد.

مواد و روش ها: پس از تکثیر ویروس آنفلوآنزا در تخم مرغ های جنین دار مرغ، rRNA از نمونه های ویروسی جمع آوری شده در طی این فرایند آزمایشی استخراج شد. سپس توالی نوکلئوتیدی اختصاصی مربوط به ژن M1 با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز با رونویسی معکوس (RT-PCR) تکثیر شد. پس از تکثیر توالی، یک فرایند خالص سازی کامل برای اطمینان از یکپارچگی و کیفیت آن انجام شد. توالی خالص سازی شده سپس در وکتور پلاسمیدی pTZ57R/T، که به طور ویژه برای چنین کاربردهایی طراحی شده است، کلون شد. پس از کلون سازی، محصول حاصل با استفاده از زیرگونه *Escherichia coli* سویه *xll-blue* که به دلیل کارایی بالا در فرایندهای کلونینگ شناخته می شود، تکثیر و مجدداً خالص سازی گردید.

یافته ها: نتایج این مطالعه به وضوح نشان می دهد که زیرگونه *E. coli* (*xll-blue*) در کنار سیستم پلاسمیدی pTZ57R/T می تواند به طور مؤثر برای جداسازی، کلون سازی و تکثیر موفق ژن های مرتبط با ویروس های آنفلوآنزا به کار گرفته شود؛ همچنین ژن هایی که پروتئین M1 را کد می کنند و به عنوان یک عامل ضروری در پاتوژن ویروس های influenza A شناخته می شوند.

نتیجه گیری: این رویکرد، اطلاعات و پیشرفت های مهمی را در حوزه ژنتیک ویروسی فراهم می کند و در نتیجه، درک ما را از سازوکارهای ژنتیکی کنترل کننده رفتار و پاتولوژی ویروس آنفلوآنزا عمیق تر می سازد.

کلیدواژه ها: تحت تیپ H9N2، پروتئین M1، پلاسمید pTZ57R/T، کلون سازی

دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۱۹ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۳۱ ویرایش نهایی: ۱۴۰۵/۰۳/۲۱ انتشار آنلاین: ۱۴۰۵/۰۴/۰۵

اطلاعات نویسنده مسئول: شیدا شریانی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت، ایران

Email: sharabianiis@gmail.com

استناد: محمدی پور، ش؛ توکلی، ه؛ افریشم، س؛ شریانی، ش؛ عابد، م؛ اسماعیلی، م؛ شهبازی، ق (۱۴۰۵). کلون سازی ژن پروتئین ماتریکس (M1) ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در ناقل pTZ57R/T. *بهداشت و بیماری های عفونی دام*، ۱ (۳)، ۹۷-۹۱.

© نویسنده گان



DOI: 10.22034/jahid.2026.2092554.1075

مقدمه

آنفلوآنزا یک بیماری ویروسی بسیار مسری با پراکندگی جهانی است که جمعیت‌های مختلف را در کشورهای گوناگون درگیر می‌کند (۱،۲). ویروس‌های عامل آنفلوآنزا در خانواده Paramyxoviridae قرار می‌گیرند و به سه جنس متمایز A، B و C تقسیم می‌شوند. هر جنس با پروتئین‌های خاصی از جمله نوکلئوپروتئین (NP) و ماتریکس پروتئین ۱ (M1) شناخته می‌شود. جنس A عمدتاً با عفونت در پستانداران و پرندگان مرتبط است، در حالی که جنس B بیشتر در انسان‌ها بیماری ایجاد می‌کند. جنس C نیز توانایی ایجاد بیماری در انسان و خوک را دارد. علاوه بر این، ویروس‌های آنفلوآنزا بر اساس پروتئین‌های سطحی خود، یعنی هم‌گلوپتینین و نورآمینیداز، به زیرگونه‌های مختلف تقسیم می‌شوند. این طبقه‌بندی با استفاده از آزمون‌های مهار هم‌گلوپتیناسیون و مهار نورآمینیداز انجام می‌شود که درک بهتری از زیرگونه‌های مختلف و پیامدهای بالقوه آن‌ها برای سلامت فراهم می‌کند. تاکنون ۱۶ نوع مختلف پروتئین هم‌گلوپتینین و ۹ نوع پروتئین نورآمینیداز شناسایی شده است که هر دو نقش اساسی در زیست‌شناسی ویروس‌های آنفلوآنزا دارند. یافته‌های Capua و Alexander این اطلاعات را تأیید می‌کنند (۱). ویروس‌های آنفلوآنزا دارای مجموعه‌ای متنوع از پروتئین‌ها هستند که برای ساختار و عملکرد آن‌ها حیاتی‌اند. این پروتئین‌ها شامل هم‌گلوپتینین (HA)، نورآمینیداز (NA)، نوکلئوپروتئین (NP) و پروتئین‌های ماتریکس ۱ و ۲ (M1 و M2) هستند. همچنین این ویروس‌ها پروتئین‌های غیرساختاری ۱ و ۲ (NS1 و NS2) را نیز تولید می‌کنند که نقش مهمی در پاتوژنز و مکانیسم‌های تکثیر آن‌ها دارند، همان‌طور که van den Berg و همکاران گزارش کرده‌اند (۱). پروتئین‌هایی مانند هم‌گلوپتینین و نورآمینیداز به‌طور مداوم تحت تغییرات ناشی از جهش در ژن‌های کدکننده آن‌ها قرار می‌گیرند. این فرایند تکاملی مداوم یکی از ویژگی‌های بارز این پروتئین‌هاست و ماهیت پویای آن‌ها را نشان می‌دهد. در مقابل، سایر انواع پروتئین‌ها از جمله پروتئین‌های ماتریکس، از پایداری قابل‌توجهی برخوردارند و در بیشتر زیرگونه‌های ویروس آنفلوآنزا تغییرات اندکی نشان می‌دهند. این پایداری ذاتی، پروتئین‌های ماتریکس را به ابزارهایی ارزشمند و مؤثر در آزمون‌های تشخیصی و مولکولی تبدیل می‌کند، زیرا اهدافی قابل‌اعتماد و ثابت برای شناسایی فراهم می‌کنند. ویروس‌های آنفلوآنزا توانایی چشمگیری در انتقال سریع میان میزبان‌ها دارند و همین موضوع

ضرورت تشخیص به‌موقع و دقیق را در مدیریت و کنترل شیوع‌های مرتبط برجسته می‌کند. بنابراین، شناسایی سریع موارد آنفلوآنزا در یک جمعیت، برای تدوین و اجرای راهبردهای مؤثر پیشگیری و کنترل، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. هدف اصلی پژوهش حاضر، کلون‌سازی و تکثیر یک بخش مشخص از ماده ژنتیکی مسئول کُد کردن پروتئین M1 در ویروس آنفلوآنزای نوع A است (۳). با توجه به ویژگی‌های بسیار حفاظت‌شده این پروتئین در میان زیرگونه‌های مختلف ویروس‌های Influenza A، محصول حاصل از تکثیر ژن مربوطه می‌تواند به‌طور مؤثر در پژوهش‌های آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد. از آنجا که تهیه مقادیر کافی از ژن و پروتئین‌های ویروسی برای مطالعات مولکولی و توسعه آزمون‌های تشخیصی ضروری است، استفاده از سامانه‌های کلون‌سازی و بیان باکتریایی اهمیت ویژه‌ای دارد. در این میان، *Escherichia coli* به دلیل رشد سریع، هزینه پایین کشت، سهولت دستکاری ژنتیکی و بازده بالای تولید DNA نو ترکیب، یکی از پرکاربردترین میزبان‌ها در فناوری DNA نو ترکیب محسوب می‌شود. بنابراین، کلون‌سازی ژن M1 در این سامانه می‌تواند زمینه لازم را برای مطالعات بعدی و طراحی روش‌های تشخیصی مبتنی بر این ژن فراهم سازد. علاوه بر این، این محصول یک منبع حیاتی در توسعه آزمون‌های تشخیصی ویژه شناسایی این ویروس‌ها محسوب می‌شود. این کارکرد دوگانه، اهمیت این پروتئین را هم در تحقیقات علمی و هم در تشخیص‌های پزشکی عملی برجسته می‌کند. انتخاب سلول میزبان که دستگاه سنتز پروتئین آن پروتئین موردنظر را تولید خواهد کرد، آغازگر چارچوب کلی کل فرایند است. در میان میکروارگانیسم‌ها، سیستم‌های میزبان موجود شامل باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌های رشته‌ای و جلبک‌های تک‌سلولی هستند. هر یک مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند و انتخاب آن‌ها به نوع پروتئین هدف بستگی دارد (۵). *Escherichia coli* یکی از گزینه‌های اصلی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب است. استفاده از آن به‌عنوان یک کارخانه سلولی کاملاً تثبیت‌شده است و به محبوب‌ترین پلتفرم بیان پروتئین تبدیل شده است. به همین دلیل، ابزارهای مولکولی و پروتکل‌های فراوانی برای تولید سطح‌بالای پروتئین‌های هتروئولوگ در دسترس است؛ از جمله مجموعه گسترده‌ای از پلاسمیدهای بیانی، تعداد زیادی سویه مهندسی‌شده و راهبردهای مختلف کشت (۶). به دلیل بالاترین کارایی در تراریخت‌سازی، سویه *XL1-Blue* به‌عنوان سویه انتخابی برای کلون‌سازی ژن اختصاصی M1 مورد استفاده قرار گرفت (۷).

مواد و روش ها

تمام مراحل مربوط به تکثیر ژن اختصاصی پروتئین ماتریکس M1 در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شد.

آماده سازی ویروس آنفلوآنزا

زیرگونه خاص ویروس آنفلوآنزا که برای این مطالعه انتخاب شد H9N2 با شناسه است. این زیرگونه به دلیل اهمیت قابل توجه آن انتخاب شد (۸). برای تکثیر این زیرگونه، ویروس در تخم مرغ های جنین دار ۹ روزه مرغ کشت داده شد که یک روش استاندارد در ویروس شناسی است. فرایند تکثیر با تزریق ۰/۲ میلی لیتر از ویروس به طور مستقیم در حفره آلانتییک تخم مرغ های جنین دار آغاز شد (۹،۱۰). پس از تزریق، تخم مرغ ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند تا شرایط لازم برای تکثیر بهینه ویروس فراهم شود. پس از پایان دوره انکوباسیون، تخم مرغ ها از انکوباتور خارج شده و اجازه داده شد تا به دمای اتاق برسند. پس از خنک شدن، مایع آلانتییک با دقت از هر تخم مرغ استخراج شد. برای تعیین غلظت ویروس موجود در مایع آلانتییک برداشت شده، تیتروسی با استفاده از روش Reed و Muench، که یک تکنیک معتبر برای محاسبه EID₅₀ است، اندازه گیری شد (۱۱،۱۲). نتایج نشان داد که مایع آلانتییک دارای تیتروسی EID₅₀ = 10^{7.5} در هر میلی لیتر است که نشان دهنده حضور قابل توجه ویروس می باشد.

استخراج RNA ویروسی از مایع آلانتییک

برای تسهیل استخراج RNA از مایع آلانتییک، از کیت QIAamp Viral RNA تولید شرکت QIAGEN استفاده شد (۱۱). در ابتدا، مقدار ۱۴۰ میکرولیتر از مایع آلانتییک به طور دقیق اندازه گیری و با ۵۶۰ میکرولیتر از محلول بافری ویژه حاوی Carrier RNA مخلوط شد. این مخلوط به مدت ۱۵ ثانیه به طور کامل ورتکس شد تا یکنواختی آن تضمین شود. با پیروی دقیق از دستورالعمل های سازنده، تمامی مراحل مشخص شده برای استخراج موفق RNA ویروسی انجام شد. پس از استخراج، کیفیت و کمیت RNA ویروسی به روش اسپکتروفتومتری و با اندازه گیری جذب نوری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ارزیابی شد. نسبت جذب A260/A280 به عنوان شاخص خلوص RNA مورد استفاده قرار گرفت. سپس RNA در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری تقسیم بندی شد و برای حفظ

یکپارچگی آن در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید تا در تحلیل ها یا آزمایش های بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

سنتز cDNA

برای سنتز DNA مکمل (cDNA)، از کیت AccuPowder RT (Bioneer, Korea) استفاده شد (۱۱،۱۲). توالی پرایمرهای به کاررفته در این فرایند در جدول ۱ ارائه شده است. برای انجام واکنش، ۱۰ میکرولیتر RNA استخراج شده با ۱ میکرولیتر پرایمر Random Hexamer، ۱ میکرولیتر پرایمر اختصاصی و آب تیمار شده با DEPC تا حجم نهایی موردنظر مخلوط شد. پس از آماده سازی، مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس بلافاصله روی یخ قرار داده شد. در ادامه، مخلوط واکنش به لوله های حاوی RT PreMix منتقل شد و سنتز cDNA مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برنامه حرارتی شامل انکوباسیون در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه و سپس غیرفعال سازی آنزیم در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود. cDNA سنتز شده تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

name	Primer	Sequences
cDNA	Forward	5' ACC CGA GAT CGA GGC CTA 3'
PCR	Forward	5' GGT ACG ACA CGT CTT CAG G 3'
	Reverse	5' ACC CGA CTA GCA CTT TTC TG 3'

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

واکنش PCR

برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، از کیت AccuPower RT PreMix تولید شرکت Bioneer استفاده شد (۱۱،۱۳). جفت پرایمرهای به کاررفته در این مطالعه در جدول ۱ ارائه شده اند. برای اجرای موفق واکنش، مقدار ۵ میکرولیتر از DNA مکمل (cDNA) با ۱ میکرولیتر محلول پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول و ۸ میکرولیتر آب مقطر تیمار شده با DEPC برای حذف آلودگی های احتمالی مخلوط شد. واکنش با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BioRad و طبق برنامه ای دقیق شامل ۳۵ چرخه انجام شد. هر چرخه با یک مرحله دناتوراسیون اولیه در ۹۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه آغاز شد.

آمی سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر، کشت داده شد. پس از طی دوره رشد مناسب، سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه (RPM) انجام شد. پس از سانتریفیوژ، خالص سازی پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید AccuPrep شرکت Bioneer انجام گرفت. لازم به تأکید است که تمامی مراحل مطابق با دستورالعمل سازنده و با دقت کامل اجرا شد تا نتایج بهینه و قابل اعتماد حاصل شود (۱۴، ۱۵).

نتایج و بحث

در جامعه امروزی، ویروس آنفلوآنزا به عنوان یک پاتوژن بسیار مسری شناخته می شود که توانایی انتقال نه تنها میان جمعیت های انسانی، بلکه میان گونه های مختلف حیوانات و پرندگان را نیز دارد. این مسئله موجب ایجاد توجه و نگرانی قابل توجهی در میان جامعه پژوهشی و همچنین مسئولان بهداشت عمومی شده است؛ افرادی که وظیفه پایش و کنترل بیماری های عفونی را بر عهده دارند. در نتیجه، طیف گسترده ای از پژوهش ها با هدف اصلی دستیابی به درکی جامع تر از ویژگی های پاتوژنی این ویروس و الگوهای رفتاری آن در محیط های مختلف انجام شده است. همان طور که در مطالعات پژوهشگرانی همچون Lee و همکاران (۶، ۱۳)، Plague و Aviaire (۱۰)، و Yendell و همکاران (۱۱) گزارش شده است، این ویروس توجه گسترده ای را به خود جلب کرده است. در پژوهش حاضر نیز تمرکز و منابع قابل توجهی به فرایندهای پیچیده جداسازی، کلون سازی و تکثیر یک بخش مشخص از ژن کدکننده پروتئین M1 اختصاص یافته است؛ پروتئینی که به طور مستقیم با ویروس آنفلوآنزای نوع A، یکی از پاتوژن های مهم و مورد نگرانی، مرتبط است. پروتئین M1 به عنوان یکی از پروتئین های حفاظت شده ساختار ویروس شناخته می شود و حضور آن برای حفظ یکپارچگی ساختاری ویروس ضروری است (۱۴). افزون بر این، این پروتئین برای انجام مؤثر بسیاری از عملکردهای حیاتی ویروس لازم است و همین موضوع اهمیت آن را در زیست شناسی و پاتوژن ویروس آنفلوآنزا برجسته می کند (۱۷، ۱۸). نتایج به دست آمده از این پژوهش جامع نشان می دهد که سویه *Escherichia coli* XL1-Blue می تواند همراه با پلاسمید pTZ57R/T به طور مؤثر برای کلون سازی و تکثیر بخش های اختصاصی از ماده ژنتیکی ویروس آنفلوآنزا مورد استفاده قرار گیرد (۱۹، ۴). این یافته مهم نشان دهنده یک راهبرد امیدبخش است که می

سپس مرحله اتصال پرایمر در ۴۳ درجه سانتی گراد انجام شد و پس از آن مرحله گسترش در ۹۱ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه صورت گرفت. واکنش با یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه پایان یافت.

خالص سازی محصولات PCR

برای خالص سازی آمپلیکون های به دست آمده، محصول PCR در ژل آگاروز با نقطه ذوب پایین (LMA) با غلظت ۰/۸٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد (۸). پس از الکتروفورز، باند DNA زیر نور فرابنفش (UV) مشاهده شد تا ناحیه مورد نظر DNA شناسایی شود. قطعات ژل سپس به میکروویوب های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شده و وزن آن ها با دقت ثبت شد. خالص سازی DNA با استفاده از کیت AccuPower Gel Purification شرکت Bioneer انجام گرفت. غلظت محصول PCR با روش اسپکتروفتومتری تعیین شد؛ به این صورت که چگالی نوری (OD) نمونه پس از رقیق سازی مناسب در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. این اندازه گیری امکان محاسبه غلظت DNA موجود در هر سانتی متر مکعب از محلول را فراهم کرد.

آماده سازی پلاسمیدهای نو ترکیب

به منظور ساخت پلاسمید نو ترکیب، از ناقل pTZ57R/T و کیت InstA™ Clone PCR Cloning تولید شرکت Fermentas استفاده شد. نسبت مولی قطعه PCR و ناقل بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده محاسبه و واکنش اتصال (Ligation) انجام گردید. مخلوط اتصال در شرایط توصیه شده توسط شرکت سازنده انکوبه شد تا پلاسمید نو ترکیب حاوی قطعه ژن M1 تشکیل شود. تمامی مراحل مطابق دستورالعمل کیت انجام . (۱۴).

تراریخت سازی و خالص سازی پلاسمید نو ترکیب

کلنی های تراریخت *Escherichia coli* سویه *xl1-blue* بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، IPTG (۰/۵ میلی مولار) و (۴۰X-Gal) میکروگرم بر میلی لیتر کشت داده شدند. پس از انکوباسیون، کلنی های سفید به عنوان کلنی های احتمالی حاوی پلاسمید نو ترکیب انتخاب شدند. حضور کلونی های سفید به طور قطعی نشان دهنده وجود پلاسمیدی است که توانی نوکلئوتیدی تکثیر شده حاصل از واکنش PCR را در خود دارد. برای آغاز فرایند خالص سازی پلاسمید نو ترکیب، یک کلونی مجزا با دقت از پلیت کشت انتخاب شد. این کلونی سپس در محیط مایع LB حاوی

6. Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein science*. 2019 Aug;28(8):1412-22.
7. Liu J, Chang W, Pan L, Liu X, Su L, Zhang W, Li Q, Zheng Y. An improved method of preparing high efficiency transformation *Escherichia coli* with both plasmids and larger DNA fragments. *Indian journal of microbiology*. 2018 Dec;58(4):448-56.
8. Krammer F, Palese P. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nature reviews Drug discovery*. 2015 Mar;14(3):167-82.
9. Gashaw M. A review on avian influenza and its economic and public health impact. *Int J Vet Sci Technol*. 2020;4(1):15-27.
10. Simancas-Racines A, Reytor-Gonzalez C, Toral M, Simancas-Racines D. H5N1 Avian Influenza: A narrative review of scientific advances and global policy challenges. *Viruses*. 2025 Jun 29;17(7):927.
11. Kash JC, Taubenberger JK. The role of viral, host, and secondary bacterial factors in influenza pathogenesis. *The American journal of pathology*. 2015 Jun 1;185(6):1528-36.
12. Lj R. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg*. 1938;27:493-5.
13. Sang Y, Nahashon SN, Webby RJ. Microbiome-immune interaction and harnessing for next-generation vaccines against highly pathogenic avian influenza in poultry. *Vaccines*. 2025 Aug 6;13(8):837.
14. Zhu Y, Sun Y, Deng X, Cao P, Li S, Yu H, Sheng S, Cong Y. Matrix protein 1 (M1) of influenza A virus: structural and functional insights. *Emerging Microbes & Infections*. 2025 Dec 31;14(1):2558881.
15. Dashti F, Raisi A, Pourali G, Razavi ZS, Ravaei F, Sadri Nahand J, Kourkinejad-Gharai F, Mirazimi SM, Zamani J, Tarrahimofrad H, Hashemian SM. A computational approach to design a multiepitope vaccine against H5N1 virus. *Virology Journal*. 2024 Mar 20;21(1):67.
16. Imai M, Watanabe T, Hatta M, Das SC, Ozawa M, Shinya K, Zhong G, Hanson A, Katsura H, Watanabe S, Li C. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*. 2012 Jun 21;486(7403):420-8.
17. Bauer L, Leijten L, Iervolino M, Chopra V, van Dijk L, Power M, Spronken M, Rijnsink W, Funk M, de Vries RD, Richard M. A 2022 avian H5N1 influenza A virus from clade 2.3. 4.4 b attaches to and replicates better in human respiratory epithelium than a 2005 H5N1 virus from clade 2.3. 2.1. *bioRxiv*. 2024 Nov 27:2024-11.
18. Zhang Y, Gao J, Xu W, Huo X, Wang J, Xu Y, Ding W, Guo Z, Liu R. Advances in protein subunit vaccines

تواند مطالعات و کاربردهای آینده را در حوزه‌های ویروس‌شناسی و مهندسی ژنتیک تقویت کند.

نتیجه‌گیری

ژن M1 ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H9N2 با موفقیت تکثیر، کلون‌سازی و در ناقل pTZ57R/T پایدارسازی شد. نتایج نشان داد که استفاده از ناقل pTZ57R/T همراه با سویه *XL1-Blue* باکتری *Escherichia coli* روشی کارآمد و قابل‌اعتماد برای کلون‌سازی و تکثیر این ژن فراهم می‌کند. با توجه به حفاظت‌شدگی بالای ژن M1 در میان ویروس‌های آنفلوآنزای نوع A، سازه نوترکیب حاصل می‌تواند به‌عنوان منبعی ارزشمند در مطالعات مولکولی، تعیین توالی، بیان پروتئین نوترکیب و طراحی آزمون‌های تشخیصی مبتنی بر ژن M1 مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، نتایج این پژوهش می‌تواند زمینه را برای مطالعات بیشتر در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و پاتوژن ویروس‌های آنفلوآنزا فراهم سازد.

تقدیر و تشکر

از تمامی افرادی که در انجام این مطالعه ما را یاری کردند، سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافع وجود ندارد.

منابع

1. Alexander DJ, Capua I. Avian influenza in poultry. *World's Poultry Science Journal*. 2008 Dec;64(4):513-32.
2. Zhang Y, Xu C, Zhang H, Liu GD, Xue C, Cao Y. Targeting hemagglutinin: approaches for broad protection against the influenza A virus. *Viruses*. 2019 Apr 30;11(5):405.
3. Yin R, Zhang Y, Zhou X, Kwok CK. Time series computational prediction of vaccines for influenza A H3N2 with recurrent neural networks. *Journal of bioinformatics and computational biology*. 2020 Feb 9;18(01):2040002.
4. Balannik V, Carnevale V, Fiorin G, Levine BG, Lamb RA, Klein ML, DeGrado WF, Pinto LH. Functional studies and modeling of pore-lining residue mutants of the influenza A virus M2 ion channel. *Biochemistry*. 2010 Feb 2;49(4):696-708.
5. Adrio JL, Demain AL. Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered bugs*. 2010 Mar 1;1(2):116-31.

against H1N1/09 influenza. *Frontiers in Immunology*. 2024 Nov 22;15:1499754.

19. Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*. 1999 May 25;258(1):1-20.