Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 3 (08-2015)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Secretory expression of hemagglutinin globular domain (HA1) of the influenza A (H5N1) virus in *Bacillus subtilis*

Moein Aliakbari[1], Farida Behzadian[1], Ali-Asghar Deldar[1], Baharak Mahyad [2], Maryam Bidram[1], Maedeh bahreinian[1]

1. Molecular Genetics department, Research Centre for Biosciences and Biotechnology, Malek -Ashtar University, Tehran, Iran
2. Nanobiotechnology Department, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2014/09/01
Accepted: 2015/02/19
Available online:2015/11/29

Article Subject:
Microbial Biotechnology

IJMM 1394; 9(3): 48-53

Corresponding author at:

Dr. Farida Behzadian

Molecular Genetics department, Research Centre for Biosciences and Biotechnology, Malek -Ashtar University, Tehran, Iran

Email:
fbehzadian@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: H5N1 influenza viruses may acquire the ability to transmit between humans. thus, there is the possibility of a pandemic event. HA1 protein has been shown to play a major role in binding the virus to its target cell and the main neutralizing antibody responses elicit against this region. *Bacillus subtilis* has been identified as a free endotoxin host for expression and secretion of heterologous proteins with immunological activity. Although the bacteria is not capable of making glycosylated proteins, it has been shown that glycosylation of HA is not much necessary for its immunogenicity. Here we produced secretory recombinant HA1 protein in B. subtilis.

Materials and Methods: HA1 sequence was cloned into pGEM® 5Zf(–)vector. It was then subcloned into shuttle vector PHT43 and transferred to *E.coli* for replication. The recombinant plasmid was extracted from *E.coli* and used to transform of *B.subtilis* by electroporation. After induction of recombinant *B.subtilis* by IPTG, total cell protein and the protein secreted into media were analysed through a time course using SDS-PAGE.

Results: The accuracy of PHT43-HA1 construct was confirmed by sequencing and enzymatic digestion analysis. SDS-PAGE results showed that the recombinant HA1 protein was successfully expressed and secreted into medium.

Conclusions: *B.subtilis* is a free endotoxin host which could be a favorite prokaryotic platform for production of the recombinant HA1 protein.The HA1 protein produced here could be considered and evaluated as a candidate vaccine which its immunogenicity potential needs to be assessed in animal models along with proper control groups.

Key Words: *Bacillus subtilis*, Secretory expression, Influenza, H5N1

Copyright © 2015 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Aliakbari M, Behzadian F, Deldar A, Mahyad B, Bidram M, bahreinian M. Secretory expression of hemagglutinin globular domain (HA1) of the influenza A (H5N1) virus in Bacillus subtilis. Iran J Med Microbiol. 2015; 9 (3) :48-53

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۹ – شماره ۳ – پاییز ۱۳۹۴

Journal homepage: www.ijmm.ir

بیان ترشحی بخش کروی هماگلوتینین (HA1) ویروس آنفولانزای A (H5N1) در *باسیلوس سوبتیلیس*

معین علی اکبری[۱]، فریدا بهزادیان[۱]، علی اصغر دلدار[۱]، بهارک مهیاد[۲]، مریم بیدرام[۱]، مائده بحرینیان[۱]

۱. گروه ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

۲. گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۳/۰۶/۳۱

پذیرش:۱۳۹۳/۱۱/۳۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۴/۰۹/۰۹

موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM 1394; 9(3): 48-53

نویسنده مسئول:

دکتر فریدا بهزادیان

گروه ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

تلفن: ۹۸۲۱۲۲۹۷۴۶۰۳+

پست الکترونیک:

fbehzadian@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: ویروس H5N1 ممکن است قابلیت انتقال بین انسان ها را بدست آورد؛ بنابراین امکان وقوع یک بیماری همه گیر وجود دارد. پروتئین HA1 نقش اصلی را در اتصال ویروس به سلول هدف بازی می کند و پاسخ های آنتی بادی خنثی کننده عمدتاً علیه این ناحیه است. باسیلوس سوبتیلیس میزبانی بدون اندوتوکسین جهت بیان وترشح پروتئین های هترولوگ واجد فعالیت ایمونولوژیک شناخته شده است. اگر چه این باکتری قادر به تولید پروتئین های گلیکوزیله نیست اما تحقیقات نشان داده است که گلیکوزیلاسیون HA برای ایمنی زایی آن چندان ضروری نمی باشد. در این مطالعه پروتئین نوترکیب HA1 در باسیلوس سوبتیلیس به صورت ترشحی تولید شد.

مواد و روش کار: توالی HA1 در وکتور pGEM® 5Zf (–) کلون شد. سپس این توالی در شاتل وکتور PHT43 ساب کلون وجهت تکثیر به اشریشیاکلی منتقل گردید.پلاسمید نوترکیب استخراج شده از *اشریشیاکلی* به منظور ترانسفورم *باسیلوس سوبتیلیس* با روش الکتروپوریشن مورد استفاده قرار گرفت. پس از القای *باسیلوس سوبتیلیس* نوترکیب با IPTG، کل پروتئین‌های سلول و پروتئین ترشح شده درون محیط کشت طی یک بازه زمانی، با استفاده از SDS-PAGE بررسی شد.

یافته‌ها: صحت ساختار PHT43–HA1 با تعیین توالی و هضم آنزیمی تایید شد. نتایج SDS-PAGE نشان داد که پروتئین نوترکیب *HA1* با موفقیت بیان و درون محیط کشت ترشح شده است.

نتیجه‌گیری: *باسیلوس سوبتیلیس میزبانی بدون اندوتوکسین است که می تواند به عنوان یک بستر پروکاریوتی مناسب جهت تولید پروتئین نوترکیب* HA1 *مورد استفاده قرار گیرد.* پروتئین تولید شده در این پژوهش می تواند به عنوان کاندیدی برای واکسن مورد توجه قرار گیرد و لازم است توان ایمنی زایی آن در کنار مدل های حیوانی همراه با گروه های کنترل مناسب ارزیابی شود.

کلمات کلیدی: *باسیلوس سوبتیلیس*، بیان ترشحی، آنفولانزا، H5N1

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

ویروس های آنفولانزای A پاتوژن هایی مشترک بین انسان و حیوان هستند که به طور دائم در چندین میزبان از جمله پرندگان، خوک ها و انسان ها در گردش و تغییر می باشند. به علت ماهیت قطعه ای ژنوم این ویروس ها، ظهور سویه های جدیدی که قادر به ایجاد اپیدمی یا پاندمی های انسانی باشد، یک احتمال جدی است (۱). در این میان پتانسیل پاندمی سویه H5N1 برای انسان به خوبی مستند شده است (۲). این ویروس ها می توانند موجب شماری از بیماری ها به همراه نارسایی اندام ها و مرگ افراد آلوده شوند (۴, ۳). هماگلوتینین، گلیکوپروتئین غالب در سطح ویروس آنفولانزا و یک آنتی ژن کلیدی شناخته شده در پاسخ های میزبان به این ویروس هم در عفونت طبیعی و هم در واکسیناسیون می باشد. این آنتی ژن ابتدا به یک پروتئین

اولیه (HA0) ترجمه شده و سپس به دو زیر واحد (HA1 و HA2) تقسیم می شود که متعاقباً طی گردهمایی تشکیل ساختاری سه قسمتی می دهد. در ساختار فضایی خاصی که HA بالغ تشکیل می دهد تنها زیر واحد HA (ناحیه سر کروی) در معرض قرار می گیرد یعنی جایی که بیشترین شاخص‌های آنتی ژنی یافت می شود (۵). این ناحیه شامل جایگاه های اتصال به گیرنده سلول هدف است (۶). شواهد تجربی در مورد ویروس های آنفولانزا پیشنهاد می دهد که گلیکوزیلاسیون HA ممکن است برای فولدینگ مناسب و شناسایی گیرنده میزبان مهم باشد، اما در ایمنی زایی آن اهمیت چندانی ندارد؛ بنابراین در صورتی که در سیستم پروکاریوتی بیان شود، همان خواص آنتی ژنیک خود را حفظ می نماید. همچنین بیان قطعات هماگلوتینین (HA) در سیستم پروکاریوتی به طور بالقوه می تواند استراتژی بسیار موثری برای تولید مقادیر زیادی از واکسن آنفولانزا در مدت زمانی کوتاه باشد (۷). *باسیلوس سوبتیلیس* به عنوان میزبانی پروکاریوت جهت بیان پروتئین های خارجی با خواص دارویی یا ایمونولوژیک شناخته شده است. بر خلاف *E.coli* این باکتری فاقد اندوتوکسین (LPS) در غشا خارجی خود است. از این رو نیازی به جداسازی اندوتوکسین (یکی از دشوارترین فرآیندهای تخلیص پروتئین) نمی باشد. علاوه بر این دارای ظرفیت ترشحی بالایی در انتقال مستقیم پروتئین به درون محیط کشت دارد که موجب تسهیل فرآیند تخلیص و جلوگیری از تشکیل اجسام اینکلوژن می شود (۸, ۹). لذا هدف از انجام این مطالعه ایجاد بستری مناسب و کم هزینه جهت تولید واکسن نوترکیب آنفولانزا می باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و تکثیر ژن HA1

واکنش PCR توسط Pfu پلیمراز (Fermentas, Lithuania) به انجام رسید. پرایمرF با جایگاه برش آنزیم BamHI و پرایمرR با جایگاه برش آنزیم SmaI، کدون پایان و برچسب هیستیدینی، به ترتیب زیر جهت تکثیر ناحیه HA1 از پلاسمید pFastBacIHNM1 (۱۰) و براساس استراتژی کلونینگ طراحی شد.F:5́GTTGGATCCGATCAGATTTGCATTGGTTAC3́ R:5́TATCCCGGGTTAGTGATGGTGATGGTGATGTC TCTTTTTTCTTCTGCTCTC3’ برای واکنش تکثیر شرایط دمایی زیر اعمال شد: یک مرحله در C ° ۹۳ به مدت ۳ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه در C ° ۹۳ برای ۱ دقیقه، C ° ۵۵ برای ۳۰ ثانیه، C ° ۷۲ برای ۹۰ ثانیه و یک مرحله در C ° ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه. پس از آن محصول PCR به وسیله الکتروفورز و ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت.

کلون کردن توالی HA1 در وکتورهای pGEM و PHT43 و انتقال آن به *E.coli* و *B.subtilis*

محصول PCR ابتدا در وکتور pGEM (Promega, USA) کلون و سپس با استفاده از پرایمر های عمومی M13 تعیین توالی (Macrogen, Korea) شد. پلاسمید pGEM-HA1 تخلیص شده ازکیت استخراج پلاسمید (Bioneer, Korea) با برش همزمان دو آنزیم BamHI و SmaI مورد هضم آنزیمی قرار گرفته و توالی HA1 به وسیله کیت استخراج از ژل (Invitrogen, USA) جداسازی شد. فرآیند اتصال توالی HA1 با شاتل وکتور PHT43 (MoBiTec, Germany)MoBiTec, Germany توسط آنزیم T4 DNA ligase (Fermentas, Lithuania) به انجام رسید. محصول واکنش اتصال به *E.coli* (DH5α) منتقل و میزبان روی محیط LB agar حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. به دنبال تایید کلونی های نوترکیب طی Colony PCR، ساختار PHT43-HA1 با برش همزمان دو آنزیم BamHI و SmaI و تک برش آنزیم های BamHI و HindIII (Fermentas, Lithuania) مورد بررسی هضم آنزیمی قرار گرفت. پلاسمید نوترکیب استخراج شده از یک کلونی نوترکیب *E.coli* به منظور ترانسفورم *باسیلوس سوبتیلیس* (WB600) با روش الکتروپوریشن (Bio-Rad, USA) استفاده شد. پس از الکتروپوریشن، برای اطمینان بیشتر از صحت انتقال پلاسمید، کلونی های *B.subtilis* تکثیر یافته روی محیط LB agar حاوی کلرامفنیکل، توسط Colony PCR بررسی شدند.

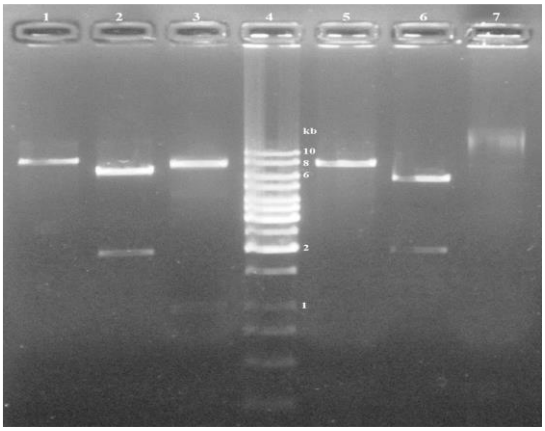
بیان ژن در *باسیلوس سوبتیلیس* (WB600)

یک کلونی از *باسیلوس سوبتیلیس* (WB600) واجد پلاسمید PHT43-HA1 در ۵ میلی لیتر محیط LB broth حاوی ۵μg/ml کلرامفنیکل به مدت یک شب در C° ۳۷ گرماگذاری گردید. مجددا ۰/۵ میلی لیتر از آن به ۱۵ میلی لیتر محیط کشت جدید منتقل شد. هنگامی که جذب نوری محیط کشت در طول موج nm ۶۰۰ به حدود ۰/۷ رسید ۰/۱ میلی مولار IPTG جهت القا بیان به آن افزوده شد. نمونه برداری از محیط کشت با برداشت ۱ میلی لیتر قبل از القا و ۴ میلی لیتر (هر ساعت یک

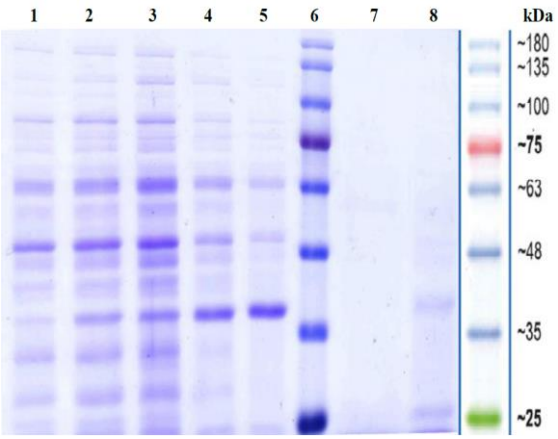
میلی لیتر) پس از آن ادامه یافت. رسوب سلولی نمونه ها توسط سانتریفیوژ (با دورg× ۱۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه) از مایع رویی جدا شد و روند آماده سازی پروتئین برای هر بخش به طور جداگانه صورت پذیرفت. فرآیند ترسیب پروتئین از مایع رویی طی اشباع سازی آن با NaCl و به دنبال آن سانتریفیوژ (با دور g× ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) به انجام رسید. متعاقباً بیان پروتئین با بررسی نمونه ها در SDS-PAGE و وسترن بلات مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها

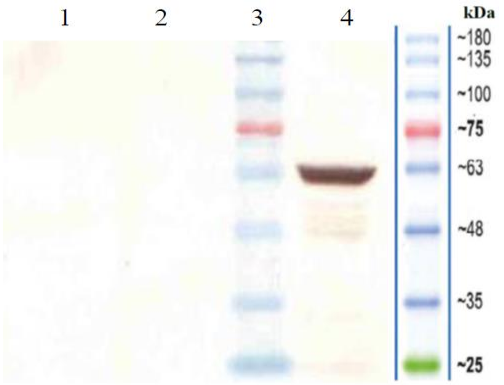
پس از الکتروفورز محصول PCR برای پلاسمید pFastBacIHNM1 باند ۱ kb (معادل اندازه توالی HA) مشاهده شد. مقایسه داده های حاصل از تعیین توالی، همخوانی کامل سکانس HA1 را با توالی کلون شده در وکتور pGEM تاییدکرد. صحت وکتور نوترکیب با انجام Colony PCR و بررسی الگوهای برش حاصل از هضم آنزیمی مشخص شد. پس از هضم همزمان ساختار PHT43-HA1 با آنزیم های BamHI و SmaI دو باند ۸ kb (معادل PHT43) و ۱ kb (معادل HA1) حاصل شد. همچنین با تک برش این ساختار توسط آنزیم BamHI یک باند ۹ kb و با تک برش آن توسط HindIII (دارای دو جایگاه برش در PHT43) دو باند ۲ kb و ۷ kb مشاهده گردید (شکل ۱). نتایج حاصل از SDS-PAGE برای نمونه های پس از القا (تا ۴ ساعت) نشان دهنده افزایشی تدریجی در شدت باند ۴۰ کیلودالتونی (معادل وزن پروتئین HA1) است. وجود همین باند در نمونه پروتئینی ترسیب یافته از محیط کشت، بیان ترشحی پروتئین HA1 را تایید می‌کند (شکل ۲). بررسی های وسترن بلات در این پژوهش علی رغم نتیجه مثبت برای نمونه کنترل حاوی His- Tag، حاصلی در بر نداشت. HA1 پروتئینی غشایی، آبگریز و کروی است (۷). احتمال می رفت این ویژگی ها موجب شده است تا برچسب هیستیدینی متصل به C-ترمینال پروتئین، درون ساختار فضایی آن مخفی شده و از دسترس آنتی هیستیدین خارج شده باشد؛ اما نتیجه به دست آمده از انجام پروتکل پیشنهادی Kaur و Bachhawat که یک پروتکل وسترن بلات تغییر یافته برای افزایش حساسیت در تشخیص پروتئین های غشایی می باشد (۱۱) این فرضیه را تایید نکرد (شکل ۳).



شکل ۱: بررسی هضم آنزیمی ساختار PHT43-HA1 (ستون های ۱ تا ۳) و پلاسمید PHT43 (ستون های ۵ و ۶) در ژل آگارز ۱ درصد. ستون ۱: باند حاصل ازتک برش وکتور نوترکیب با آنزیم BamHI. ستون ۲: تک برش آن با آنزیم HindIII. ستون ۳: دو باند بدست آمده از برش همزمان PHT43-HA1 با BamHI و SmaI. ستون ۴: نشانگر مولکولی (Fermentas). ستون ۵: تک باند حاصل از هضم همزمان پلاسمید غیر نوترکیب با BamHI و SmaI. ستون ۶: تک برش آن با HindIII و ستون ۷ پلاسمید PHT43 هضم نشده را نشان می دهد.



شکل ۲: بررسی بیان و ترشح پروتئین نوترکیب HA1 (۴۰kDa) در نمونه های رسوب سلولی و محیط کشت با ژل آکریل آمید ۱۲ درصد. ستون ۱: بیان قبل از القا. ستون های ۲ تا ۵: افزایش تدریجی بیان به ترتیب از ۱ تا ۴ ساعت پس از القا. ستون ۶: نشانگر وزن مولکولی (SinaClon) ستون ۷: عدم ترشح پروتئین در محیط کشت قبل از القا. ستون ۸: ترشح پروتئین نوترکیب در محیط کشت ۴ ساعت پس از القا.



شکل ۳: نتیجه حاصل از انجام وسترن بلات تغییر یافته برای افزایش حساسیت در تشخیص پروتئین های غشایی

ستون ۱: نمونه مربوط به بیان قبل از القا. ستون ۲: نمونه مربوط به بیان ۴ ساعت پس از القا. ستون ۳: نشانگر وزن مولکولی (SinaClon) ستون ۴: پاسخ مثبت وسترن بلات به نمونه پروتئینی واجد His-Tag با وزن ۵۷KD.

بحث

انواع گوناگونی از ساب تیپ‌های HA در سیستم بیانی پروکاریوتی (۱۲) و یوکاریوتی از جمله سلول های حشرات (۱۳) بیان شده است. ژن HA در تهیه انواع واکسن های مدرن علیه آنفولانزا نظیر واکسن‌های زیر واحدی (۱۴)، واکسن‌های ویروسی (۱۵)، واکسن های بر پایه DNA (۱۶) و ذرات شبه ویروسی (۱۷) استفاده شده است. با تحلیل نتایج بدست آمده از وسترن بلات در این پژوهش و تحقیقاتی که تقسیم هماگلوتینین اولیه (HA0) را به دو زیر واحد HA1 و HA2 توسط پروتئاز های برخی باکتری ها به اثبات رسانده است، می توان علت پاسخ منفی وسترن بلات به پروتئین بیان شده را توصیف نمود. پس از شروع فعالیت یک پروتئاز شبه تریپسین با جایگاه برش R-X-R/K-R (X اسید آمینه پایه محسوب نمی شود) و مشتقات آن که درسویه‌های مشخصی نظیر ویروس‌های H5 یافت می شود، یک رزیدوی آرژینین (R329) در HA0 از دست رفته است (۱۸، ۱۹) از طرفی حداقل دو پروتئاز مهم درون سلولی در *باسیلوس سوبتیلیس* شناخته شده است: سرین پروتئاز اصلی نوع سوبتیلیسین (پروتئاز I) و پروتئاز شبه تریپسین (پروتئاز II)

در توالی پروتئین HA1 از منشأ ویروس آنفولانزا نوع A/Indonesia/5/2005(H5N1) جایگاه برش حاوی یک اسید آمینه آرژینین (R330) است و پرایمر پایین دست طراحی شده در این پژوهش توالی His-Tag را دقیقاً پس از این اسید آمینه به پروتئین HA1 حاصل اضافه می کند. توالی این پروتئین که در زیر آمده است، موقعیت آرژینین ۳۳۰ را نشان می دهد.

HA1 protein sequence

DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLDGVKPLILRDCSVAGW 60

LLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKS 120

SWSDHEASSGVSSACPYLGSPSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKKSYNNTNQEDLLVLWGIHH 180

PNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAIN 240

FESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIG 300

ECPKYVKSNRLVLATGLRNSPQRESRRKK R HHHHHH 336

R330 His-Tag

شکل ۴: توالی پروتئین HA1 ازمنشا ویروس آنفولانزای نوع A/Indonesia/5/2005(H5N1) به همراه برچسب هیستیدین. دراین توالی موقعیت ناحیه برش، اسید آمینه آرژنین (R330) وهمچنین برچسب هیستیدینی که ممکن است توسط پروتئازهای شبه تریپسین میزبان حذف شده باشد نشان داده شده است.

بنابراین به نظر می رسد برچسب هیستیدینی متصل به C– ترمینال پروتئین توسط پروتئازهای شبه تریپسین میزبان حذف شده است.

واکسن های سنتی آنفولانزا برای پاسخ گویی سریع به این بیماری به ویژه در حوادث پاندمی بیش از حد کند است (۲۱) از طرفی پروتئین نوترکیب HA نیز اغلب به شکل اجسام اینکلوژن یافت می‌شود و بدست آوردن پروتئین فعال طی فرآیند تاخوردگی مجدد، چالشی بزرگ محسوب می شود (۲۲). سیستم بیانی *باسیلوس سوبتیلیس* (WB600) که واجد ویژگی های مطلوبی از جمله: عدم تمایل کدونی (۲۳) نداشتن اکثر پروتئاز های برون سلولی (۲۴) و اندوتوکسین، ظرفیت بالا در ترشح شکل محلول و فعال پروتئین به درون محیط کشت و جلوگیری از تشکیل اجسام اینکلوژن است (۸، ۲۵) بستر مناسبی برای تولید پروتئین ایمونوژنیک HA1 در پاسخ گویی سریع به پاندمی احتمالی ویروس آنفولانزای H5N1 فراهم می‌آورد؛ بنابراین پروتئین تولید شده در این پژوهش می تواند به عنوان کاندیدی برای تولید آسان و کم هزینه واکسن آنفولانزا مورد توجه قرار گیرد و لازم است توان ایمنی زایی آن در کنار مدل های حیوانی همراه با گروه های کنترل مناسب ارزیابی شود.

تقدیر و تشکر

از کلیه کارکنان مرکز تحقیقات ویروس شناسی بیمارستان بقیه الله که با مساعدت خود در پیشبرد این پژوهش همکاری داشته اند، صمیمانه سپاسگزاری می نمایم.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. Nat Rev Microbiol. 2011;9(8):590-603.
2. Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, Kitphati R, Auwanit W, Puthavathana P, et al. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). N ENGL J MED. 2005;352(4):333-40.
3. To K-F, Chan PK, Chan K-F, Lee W-K, Lam W-Y, Wong K-F, et al. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. J Med Virol. 2001;63(3):242-6.
4. Hien TT, Liem NT, Dung NT, San LT, Mai PP, Chau NvV, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. N ENGL J MED. 2004;350(12):1179-88.
5. Sguazza GH, Fuentealba NA, Tizzano MA, Galosi CM, Pecoraro MR. Expression of the hemagglutinin HA1 subunit of the equine influenza virus using a baculovirus expression system. Rev Argent Microbiol. 2013;45(4):222-8.
6. Sriwilaijaroen N, Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2012;88(6):226.
7. Aguilar-Yáñez JM, Portillo-Lara R, Mendoza-Ochoa GI, García-Echauri SA, López-Pacheco F, Bulnes-Abundis D, et al. An influenza A/H1N1/2009 hemagglutinin vaccine produced in Escherichia coli. PLoS One. 2010;5(7):e11694.
8. Luan C, Zhang HW, Song DG, Xie YG, Feng J, Wang YZ. Expressing antimicrobial peptide cathelicidin-BF in Bacillus subtilis using SUMO technology. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98(8):3651-8.
9. Ferreira L, Ferreira RC, Schumann W. Bacillus subtilis as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. An Acad Bras Ciênc. 2005;77(1):113-24.
10. Behzadian F, Goodarzi Z, Fotouhi F, Saberfar E. Baculoviral Co-Expression of HA, NA and M1 Proteins of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Insect Cells. Jundishapur J Microbiol. 2013;6.(۹)
11. Kaur J, Bachhawat AK. A modified Western blot protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein. Anal Chem. 2009;384(2):348-9.

12. Khurana S, Verma S, Verma N, Crevar CJ, Carter DM, Manischewitz J, et al. Properly folded bacterially expressed H1N1 hemagglutinin globular head and ectodomain vaccines protect ferrets against H1N1 pandemic influenza virus. PLoS One. 2010;5(7):e11548.

13. King Jr JC, Cox MM, Reisinger K, Hedrick J, Graham I, Patriarca P. Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok< sup>®</sup> trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy children aged 6–59 months. Vaccine. 2009;27(47):6589-94.

14. Wood J, Schild G, Newman R, Seagroatt V. Application of an improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of haemagglutinin antigen content of whole virus and subunit influenza vaccines. Dev Biol Stand. 1976;39:193-200.

15. Crawford J, Wilkinson B, Vosnesensky A, Smith G, Garcia M, Stone H, et al. Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. Vaccine. 1999;17(18):2265-74.

16. Wang S, Taaffe J, Parker C, Solórzano A, Cao H, García-Sastre A, et al. Hemagglutinin (HA) proteins from H1 and H3 serotypes of influenza A viruses require different antigen designs for the induction of optimal protective antibody responses as studied by codon-optimized HA DNA vaccines. J Virol. 2006;80(23):11628-37.

17. Pushko P, Tumpey TM, Bu F, Knell J, Robinson R, Smith G. Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. Vaccine. 2005;23(50):5751-9.

18. Sriwilaijaroen N, Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2012;88(6):226.

19. Lamb RA, Choppin PW. The gene structure and replication of influenza virus. Annu Rev Biochem. 1983;52(1):467-506.

20. Sastry K, Srivastava O, Millet J, FitzJames P, Aronson A. Characterization of Bacillus subtilis mutants with a temperature-sensitive intracellular protease. J Bacteriol. 1983;153(1):511-9.

21. Khurana S, Verma S, Verma N, Crevar CJ, Carter DM, Manischewitz J, et al. Bacterial HA1 vaccine against pandemic H5N1 influenza virus: evidence of oligomerization, hemagglutination, and cross-protective immunity in ferrets. J Virol. 2011;85(3):1246-56.

22. Chiu F-F, Venkatesan N, Wu C-R, Chou A-H, Chen H-W, Lian S-P, et al. Immunological study of HA1 domain of hemagglutinin of influenza H5N1 virus. Biochem Biophys Res Commun. 2009;383(1):27-31.

23. Naotake O. Markedly unbiased codon usage in< i> Bacillus subtilis</i>. Gene. 1985;40(1):145-50.

24. Wu X-C, Lee W, Tran L, Wong S. Engineering a Bacillus subtilis expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. J. Bacteriol. 1991;173(16):4952-8.

25. Westers L, Westers H, Quax WJ. Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. BBA-Mol Cell Res. 2004;1694(1):299-310.