

Kloning, Sikuensing dan Analisis Filogenetik Gen Nukleokapsid Protein Virus Tetelo Isolat Bali-1/07

(*CLONING, SEQUENCING AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF NUCLEOCAPSID PROTEIN GENE OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS BALI-1/07*)

Anak Agung Ayu Mirah Adi¹, I Made Kardena¹, Nyoman Mantik Astawa², Ketut Santhia Adhy Putra³, Yoshihiro Hayashi⁴, Yasunobu Matsumoto⁴

¹Laboratorium Patologi, ²Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jln. P B Sudirman Denpasar Bali
Telepon:(0361) 223791;email:mirah638@yahoo.co.id

³Laboratorium Virologi Balai Besar Veteriner Denpasar, Jl. Raya Sesetan Denpasar.

⁴Laboratory of Global Animal Science, Department of Global Agricultural Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik molekuler fragmen gen NP dari virus tetelo isolat Bali-1/07. Fragmen gen NP diamplifikasi dengan RT-PCR, kemudian dikloning. Proses pengkloningan diawali dengan meligasikan fragmen gen NP kedalam vektor plasmid *pT7blueT* untuk membentuk plasmid rekombinan. Plasmid rekombinan kemudian ditransfeksikan kedalam sel kompeten *E coli* dengan metode *heat shock*. Tiga klon plasmid rekombinan yang membawa gen sisipan yang tepat kemudian dipurifikasi dan diseku. Sikuen nukleotida fragmen gen NP kemudian dijajarkan dengan perwakilan NDV isolat dunia dengan program *Clustal IW* dan analisis filogenetik dengan menggunakan program MEGA 4. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa gen NP isolat NDV/Bali-1/07 berada satu kelompok dengan isolat dunia dari genotipe VII seperti Guangxii-11/03, KBNP-4152 dan Ast 2755/01 dengan prosentase kemiripan sekuen nukleotida berturut- turut 92%, 91,4% dan 91 %. Isolat ini berada dalam kelompok yang berbeda dengan virus ND strain avirulen/vaksin seperti B1/47 dan LaSota/46 dengan prosentase kemiripan sekuen nukleotida sebesar 77%.

Kata kunci: Kloning, vektor, gen nukleokapsid protein, NDV

ABSTRACT

A study was carried out on the molecular characteristics of gene encoding for nucleocapsid protein (NP) of Newcastle disease virus (NDV) Bali-1/07. A portion of the fragment gene was amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The RT-PCR product purified from the gel was treated with Taq polymerase and cloned into plasmid *pT7blueT* vector. The recombinant plasmid was tranfected into Nova blue singles strain of *Escherichia coli*-competent cells and selected using white and blue color selection method. Good white colonies were subcultured and tested for presence of expected gene fragment by polymerase chain reaction (PCR). The correct size PCR product was recloned and sequenced. The PCR product of 540 base pairs were sequenced and aligned with several cognates genes of world NDV isolates.using Cluster IW. The phylogenetic analysis was then performed using MEGA 4. Phylogenetic analysis showed that the NP gene of NDV Bali-1/07 is closely related with virulent NDVs such as Guangxii-11/03, KBNP-4152 and Ast2755/01 with nucleotide sequence homology of 92%, 91.4% and 91% respectively, whereas the nucleotide sequence homology with avirulent NDVs such as LaSota and B1 were 77%.

Key words: Cloning, vector, nucleocapsid protein gene, NDV

PENDAHULUAN

Virus tetelo/Newcastle disease (ND) adalah virus RNA (*ribonucleic acid*) beramplop yang memiliki polaritas negatif dengan asam inti berserat tunggal dan tidak bersegmen. Panjang genomnya 15.186 nukleotida serta menyandi enam polipeptida yakni nukleokapsid protein (NP), fosfoprotein (P), *matrix* (M), fusion (F), hemagglutinin- neuraminidase (HN) dan RNA polymerase (L) dengan susunan 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' (de Leeuw dan Peeters,1999). Adanya kemajuan yang pesat pada teknik kloning cDNA dan analisis sikuen, telah banyak memberikan informasi pada struktur gen dari paramyxovirus (Sato *et al.*, 1987). Sikuen dari keenam gen penyandi genome virus tetelo dari berbagai negara sudah banyak dilaporkan, namun sangat terbatas informasi tentang sikuen gen dari isolat asal Indonesia dan kalaupun ada masih terbatas pada gen HN dan F. Mengingat gen NP merupakan gen yang terlibat dalam transkripsi dan replikasi dari viral *genome* (Kho *et al.*,2004) Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik molekuler fragmen gen NP virus tetelo isolat Bali-1/07. Dalam penelitian ini dilakukan pengkloningan dan sikuensing fragmen gen NP dari virus tetelo isolat Bali-1/07. Sikuen nukleotida yang didapat kemudian diujarkan dengan sikuen nuklotida berbagai virus ND isolat dunia dengan program Clustal IW.

METODE PENELITIAN

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RNA virus tetelo diisolasi dari cairan allantois telur berembryo bertunas yang telah diinokulasikan dengan isolat Bali-1/07 (Adi *et al.*, 2010), kemudian dilanjutkan dengan reaksi transkripsi balik yakni RNA virus tetelo diubah menjadi cDNA (*complementary DNA*) menggunakan enzim *reverse transcriptase* dan campuran 5 jenis primer depan (Adi *et al.*, 2008). Reaksi PCR untuk mengamplifikasi gen NP sepanjang 540 bp digunakan sepasang primer depan dan belakang yakni: 5'ATGAAGCA-GCTCATGCGTTT*3 dan 5'AGTCGGTGTCGT-TATCTTGG*3. Susunan nukelotida sepasang primer ini dirancang dengan mengacu sikuen nukleotida virus tetelo Lasota (No acesion AF 0077761), kondisi PCR dan siklus pada mesin *thermocycler* sepenuhnya seperti yang dilakukan pada *first round* PCR oleh Adi *et al.*,

(2008). Produk PCR yang didapat kemudian dicampur dengan 2 µl *loading dye* 6x kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1% selama 25 menit dengan *running buffer* TAE (Tris Asetic EDTA) 1x, kemudian divisualisasikan dengan larutan *ethidium bromide* (0.5 mg/ml). Pita sasaran yang didapat kemudian dipotong dan ditimbang untuk selanjutnya dimurnikan

Pemurnian DNA dan reaksi PCR A overhang

Pemurnian DNA. Potongan gel yang berisi pita sasaran 540 bps dimurnikan dengan mempergunakan *wizard SV gel and PCR clean up system* (Promega KK, Tokyo, Japan), sesuai dengan prosedur yang direkomendasikan oleh produsen sebagai berikut: Kedalam tabung ditambahkan *membran binding solution* dengan perbandingan 1µl *binding solution* untuk melarutkan 1 mg gel. Setelah gel larut kemudian campuran ini dituang ke *minicolumn* dan disentrifugasi dengan kecepatan 16 000 xg selama 1 menit. Setelah cairan yang terpisahkan dibuang *minicolumn* diset kembali. Selanjutnya dilakukan pencucian sebanyak dua kali masing-masing dengan cara: 1) Kedalam *minicolumn* ditambahkan 700µl *membran washing solution*, dilanjutkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 16 000 xg selama 1 menit setelah cairan yang lolos dari filter dibuang kemudian *minicolumn* diset kembali 2) Kedalam *minicolumn* ditambahkan 500 µl *membran washing solution*, serta disentrifugasi pada kecepatan 16 000 xg selama 5 menit. Akhirnya, DNA yang menempel pada filter diekusi dengan cara memindahkan *minicolumn* kedalam tabung 1,5 ml kemudian 50 µl *nuclease free water* dimasukkan kedalam *minicolumn* diikuti dengan inkubasi selama 1 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 16 000 xg selama 1 menit. DNA dari hasil pemurnian yang didapat sebanyak 50 µl dan 5µl di electrophoresis untuk memastikan pita DNA.

PCR A overhang. Reaksi ini bertujuan untuk menambahkan ujung adenin dilakukan pada mesin *thermocycler* pada suhu 72°C selama 10 menit dengan komposisi reaksinya adalah sebagai berikut: 2µl 10xPCR Buffer–MgCl₂, 2µl 2mM dNTP, 0,6µl 50mM MgCl₂ kemudian ditambah 0,1µl Taq DNA Polymerase, dan ditambahkan *distilled water* (DW) sampai volume total menjadi 5µl terakhir ditambahkan DNA hasil pemurnian sebanyak 1.5µl. Hasil reaksi ini dinamai dengan DNA A⁺

Kloning. Prosedur kloning mengacu pada prosedur standar dari Sambrook dan Russell (2001) dengan beberapa modifikasi. Secara singkat proses pengkloningan terdiri dari dua tahap yakni proses ligasi (*ligation*) yaitu penempelan DNA ke dalam vektor (plasmid) untuk membuat plasmid rekombinan, dan proses transformasi yaitu proses transfeksi vektor ke dalam sel kompeten.

Ligasi. Fragmen DNA A⁺ ditempelkan kedalam vektor pT7BlueT (Novagen, Madison, WI). Vektor yang berbentuk sirkuler dilinearakan terlebih dahulu dengan bantuan enzim *DNA ligase* dan pada saat proses inkubasi DNA akan menempel pada vektor. Proses ini menggunakan *DNA ligation kit* (Takara Bio Inc) yang komposisinya terdiri dari: 1 µl vektor, 4 µl DNA A⁺ dan 5 µl enzim *ligase*. Campuran kemudian diinkubasi pada *water cooling* dengan suhu 16°C, selama 1 jam.

Transformasi. Vektor plasmid yang telah diligasi dengan DNA *insert* (sisipan) kemudian ditransfeksikan ke dalam sel kompeten *E coli* (*Nova Blues singles*-Novagen) dengan metode *Heat shock* (Chung *et al.*, 1989) dengan kondisi dan komposisi reaksi sbb: 2,5 µl *ligation mixture* ditambahkan kedalam tabung yang sudah berisi 50 µl sel kompeten, kemudian didinginkan pada es selama 5 menit, serta dipanaskan pada heater 42°C selama 2 menit, diikuti dengan pendinginan pada es selama 5 menit. Setelah ditambahkan 500 µl media LB (Luria-Bertani) kemudian diinkubasikan di dalam *waterbath* bersuhu 37°C, selama 20 menit. Dilanjutkan dengan sentrifugasi pada suhu 20°C, dengan kecepatan 3500 rpm selama 5 menit. Dengan cara dipipet 450 µl medium dibuang dan pelet yang terbentuk dihomogenkan kembali dengan sisa medium. Sel kompeten yang sudah ditransformasikan ini kemudian dikultur pada cawan petri agar LB yang mengandung antibiotik ampicilin 100 µg/ml yang permukaan lempengan agarnya sudah dilapisi dengan larutan 0,1 M IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) 20% w/v dan 250 µg/ml substrat Xgal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 2% w/v, kemudian diinkubasikan semalam pada inkubator bersuhu 37°C.

PCR *E coli* dan Pembuatan Replika

Untuk memastikan bahwa proses kloning telah menghasilkan koloni bakteri yang mengandung plasmid rekombinan yang berisi gen sisipan yang tepat maka dipilih delapan

koloni bakteri yang berwarna putih. Koloni bakteri berwarna putih ini kemudian masing-masing disubkultur untuk membuat replika (duplikat) pada lempengan agar LB. Setiap selesai mensubkultur satu koloni, *ose* yang digunakan untuk mensubkultur dicelupkan kedalam PCR *mixture* yang komposisinya sbb: 2 µl 10 xPCR buffer-MgCl₂, 2 µl 2mM dNTP, 0,6 µl 50mM MgCl₂, 0,1 µl Taq DNA *polymerase*, masing-masing 1 µl primer depan dan belakang serta 13,3 µl DW sehingga volume total menjadi 20 ml. Tahapan ini dikerjakan satu persatu sampai kedelapan koloni yang dipilih selesai disubkultur dan *ose* dicelupkan ke PCR *mixture*. PCR *mixture* ini kemudian dihomogenkan dan reaksi PCR dengan kondisi PCR sama seperti PCR *first round* (Adi *et al.*, 2008) dilakukan pada mesin *thermocycler*. Setelah itu produk PCR dielektroforesis dan diwarnai dengan *ethidium bromide* (konsentrasi akhir 500 µg/L) selama 20 menit. Sementara itu lempengan agar replika kemudian disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C *overnight* (*o/n*; semalam; 12-16 jam)

Perbanyakan dan Purifikasi Plasmid

Rekombinan. Klon plasmid rekombinan yang mengandung pita DNA dengan ukuran yang tepat, dipilih dari koloni pada *plate* agar LB replika, untuk dikultur pada tabung (*falcon tube* 50 ml) yang berisi 5 ml media LB dan diinkubasikan pada *shaker incubator o/n*. Kemudian plasmid rekombinan dipurifikasi menggunakan *Wizard Plus SV minipreps DNA purification system* (Promega KK). Plasmid rekombinan yang didapat diukur konsentrasinya dengan spektrofotometer kemudian disimpan pada -20°C.

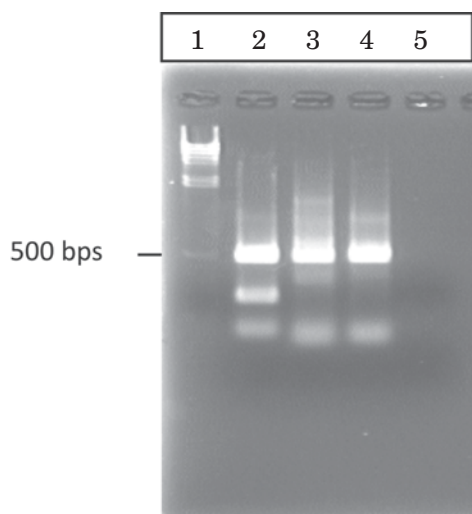
Sikuensing dan Analisis Filogenetik

Untuk sikuensing, dipilih tiga klon plasmid rekombinan, dilabel dengan *CEQTM DTCS-Quick Start Kit* (Beckmann Coulter Inc Fullerton, CA) sesuai dengan yang direkomendasikan oleh produsen, dan disikuensing dengan *CEQ-2000 XL DNA Analysis system* (Beckmann Coulter Inc.). Sikuen nukleotida yang diperoleh kemudian diujarkan dengan sikuens nukleotida gen NP representasi NDV strain virulen dan avirulen yang diakses dari *gene Bank* dengan program Clustal IW. *Accession number* dari isolat yang dianalisis yang diakses dari *gene Bank* ditampilkan pada Tabel 1. Analisis filogenetik dilakukan dengan program MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

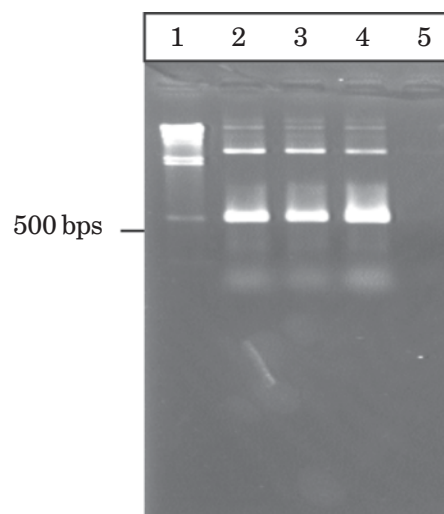
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi fragmen gen NP sepanjang 540 bp (Gambar 1), setelah dipurifikasi kemudian diligasi (disisipkan) pada vektor *pT7BlueT* (Gambar 3). Vektor ini mengandung plasmid pUC19. Pemilihan vektor yang digunakan didasarkan pada pertimbangan panjang gen yang akan diligasi serta *host* yang akan digunakan. Dari beberapa laporan penelitian vektor plasmid puC19 memberikan hasil yang memuaskan pada pembuatan

pustaka DNA dengan panjang gen < 2000bps serta menggunakan *host E coli* (Hanahan, 1983; Yanisch-Perron *et al.*, 1985; Liu dan Niu, 2008). Plasmid pUC19, berbentuk sirkuler dan memiliki panjang 2686 bps dan memiliki *multiple cloning site* (MCS), yaitu tempat menyisipkan DNA, *origin of replication* (ORI) dan gen resistensi terhadap antibiotik yakni gen tahan terhadap ampisilin serta mengandung gen penghasil beta-galaktosidase (Sambrook dan Russel, 2001). Plasmid ini sangat mudah ditransfeksikan kedalam *E coli* dengan metode



Gambar 1. Hasil amplifikasi fragmen gen NP sepanjang 540 bp pada reaksi *first round* PCR dielektroforesis pada agarose 1%, divisualisasikan dengan ethidium bromida (baris ke 4). Keterangan Baris 1 Marker λ Hind III ,2 dan 3. Fragmen gen lain 5. Kontrol negatif.



Gambar 3..Hasil PCR *E Coli*. Tiga klon plasmid yang berisi sisipan fragmen gen NP , pita DNA sisipan sepanjang 540 bp.(A) dan pita DNA plasmid (B). Keterangan : Baris 1 Marker λ Hind III , 2-4 plasmid yang berisi fragmen DNA sisipan, 5.Kontrol negatif.

Tabel 1. Isolat virus tetelo yang diakses dari *GeneBank* yang digunakan untuk analisis filogenetik

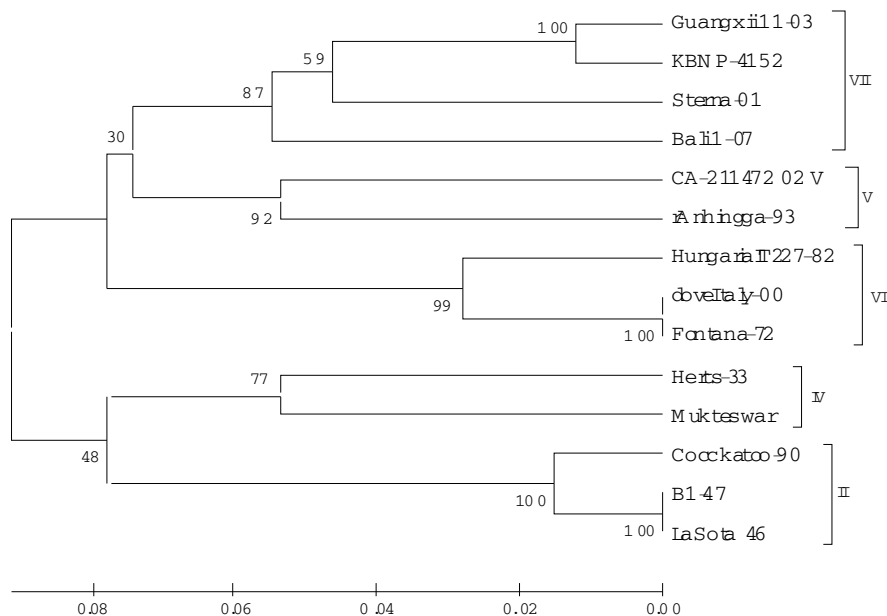
Strains Virus Tetelo	Asal	Pathotype / genotype	No akses
LaSota/46	USA /ayam	avirulen/II	AF077761
B1/47	USA /ayam	avirulen/II	NC002617
Hertz/33	Inggris/ayam	virulen/IV	AY935491
Mukteswar	India/ayam	virulen/IV	AY935492
CA-211471-02	USA/ayam	virulen/V	AY562987
rAnhingga/93	USA/ayam	virulen/V	EF065682
CA-1083/Fontana/72	USA/ ayam	virulen/VI	AY 562988
IT-227/82	Hungaria/pigeon	virulen/VI	AJ880277
Italy 2737-00	Italy/dove	virulen/VI	AY288995
Bali-1/07*	Indonesia/ ayam	virulen/VII	dalam proses
Ast 2755/01	Russia/ <i>Sterna albifrons</i>	virulen/VII	AY865652
Guangxi 11/03	China/ayam	virulen/VII	DQ482231
KBNP-4152	Korea Selatan/ayam	virulen/VII	DQ839397
Cockatoo/90	Indonesia/burung	virulen/VII	AY562989



Gambar 2. *White and blue color selection.* Fragmen gen NP diligasi kedalam vektor plasmid kemudian ditransfeksikan kedalam sel kompeten bakteri *E. coli.* (*Novablue single-Novagen*). Koloni bakteri yang mengandung plasmid rekombinan dengan DNA sisipan berwarna putih (a) yang mengandung plasmid yang tidak berisi DNA sisipan berwarna biru (b). Keterangan lempengan agar LB mengandung antibiotik ampicilin 100 mg/ml serta permukaannya dilapisi dengan substrat X gal dan 0.1 M IPTG

yang sederhana dan relatif murah seperti *heat shock* serta dapat dengan cepat bereplikasi dan amat mudah diseleksi dengan metode *white/blue color selection* (Yanisch-Perron, 1985; Chung, *et al.*, 1989). Plasmid rekombinan yang memiliki gen tahan antibiotik, mengakibatkan *E. coli* yang awalnya peka terhadap antibiotik akan menjadi tahan antibiotik, sehingga mudah diseleksi dengan media yang mengandung antibiotika ampicilin. Adanya enzim galaktosidase dapat mengubah substrat X-gal menjadi biru, sehingga koloni bakteri yang berisi plasmid yang tidak membawa DNA sisipan akan berwarna biru sementara yang ada DNA sisipannya akan berwarna putih (Gambar.2) bakteri yang tidak berisi plasmid tidak tumbuh pada lempengan agar LB yang mengandung antibiotik serta dilapisi 0,1 M IPTG and X gal (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

Adanya 3 klon plasmid yang disikuen akan memperbaiki validitas dari sikuen nukelotida mengingat hasil sikuen yang didapat sering tidak sempurna karena adanya beberapa nukleotida yang meragukan sehingga diperlukan pembandingan dari sikuen 2 klon yang lain. Adanya stok plasmid berupa pustaka DNA (*cDNA library*) juga memudahkan dalam sikuensing ulang mengingat plasmid sangat mudah disubkultur dan memerlukan waktu



Gambar 4. Pohon filogenetik dari virus ND Bali-1/07 berdasarkan sekuen parsial dari gen NP pada posisi nukleotida 1021-1560. Posisi nukleotida mengacu pada sekuen nukleotida dari virus ND LaSota/46. Pohon filogenetik dibuat dengan *unweighed pair group method with arithmetic mean* (UPGMA) pada program *molecular evolutionary genetic analysis 4* (MEGA.4) selanjutnya dievaluasi dengan menggunakan test bootstrap 1000 replikasi.

relatif lebih singkat jika dibandingkan dengan pelaksanaan ulang PCR.

Berdasarkan analisis filogenetik tampak bahwa gen NP isolat Bali-1/07, berada dalam satu *cluster* dengan isolat virulen dari genotipe VII seperti: Guangxii, KBNP dan Sterna dengan prosentase kemiripan sikuen nukleotida berturut-turut sbb; 92%, 91,4% dan 91%. Gen NP isolat Bali berada dalam *cluster* yang berbeda dengan isolat vaksin seperti LaSota dan B1, yang mana prosentase kemiripan sikuen nukleotida dengan kedua isolat vaksin ini adalah 77%. Hal yang menarik dalam penelitian ini adalah prosentase kemiripan sikuen nukleotida gen NP isolat Bali-1/07 dengan isolat Cocckatoo/90 adalah 81,2%, walaupun berdasarkan *phylogenetic analysis* dari gen F kedua isolat ini berada dalam satu kelompok genotipe VII (Adi *et al.*, 2010) namun pohon filogenetik yang disusun dengan sikuen nukleotida gen NP menunjukkan bahwa isolat ini tidak dalam satu kelompok percabangan dengan Cocckatoo/90, melainkan dalam analisis gen NP isolat Cocckatoo/90 satu kelompok dengan isolat vaksin. Cho *et al.*, (2010) melaporkan bahwa dari hasil analisis *full genome* ternyata isolat Cocckatoo/90, memiliki rekombinasi dengan genotipe II pada gen NP.

Walaupun kelompok genotipe dari virus tetelo ditentukan berdasarkan analisis filogenetik gen F namun seharusnya hasil analisis filogenetik gen selain gen F pun semestinya tetap menempatkan isolat tersebut dalam kelompok genotipe yang sama (Ujvari, 2006). Berdasarkan hasil analisis gen NP, isolat Bali-1/07 tetap berada dalam satu kelompok genotipe VII, hal ini memperkuat bahwa isolat Bali-1/07 merupakan isolat virulen yang bukan merupakan revertan dari isolat vaksin.

SIMPULAN

Proses pengkloningan gen NP dengan panjang 540 bps dapat dilakukan dengan metode standar dengan menggunakan vektor plasmid *pT7BlueT* dan plasmid rekombinan ditransfeksikan ke dalam *E coli* dengan metode *heat shock*. Analisis filogenetik dari gen NP isolat Bali-1/07 menunjukkan bahwa isolat ini berada dalam satu kelompok dengan isolat virulen dari genotipe VII seperti: Guangxii-11/03, KBNP-4152 dan Sterna/01 dengan prosentase kemiripan sikuen nukleotida berturut-turut sbb; 92%, 91,4% dan 91%. Dan

isolat ini berada dalam kelompok yang berbeda dengan virus ND strain avirulen/vaksin seperti B1/47 dan LaSota/46.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih penulis ucapkan kepada Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) – Ronpaku (PhD dissertation) program, yang telah mendanai penelitian ini. Penelitian ini sebagian dilaksanakan di laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan-Unud, untuk itu penulis mengucapkan terimakasih kepada kepala laboratorium Prof.Dr.drh IG N K Mahardika, serta sejawat yang telah membantu dalam penelitian ini yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu.

DAFTAR PUSTAKA

- Adi AAAM, Astawa NM, Putra KSA, Hayashi Y. dan Matsumoto Y. 2008. Deteksi virus penyakit tetelo isolat lapangan dengan metode nested RT-PCR. *J. Vet.* 9 (3):128-134.
- Adi AAAM, Astawa NM, Putra KSA, Hayashi Y, Matsumoto Y. 2010. Isolation and characterization of a pathogenic Newcastle disease virus from a natural case in Indonesia. *J.Vet.Med. Sci.* 72 (3): 313-319.
- Cho SH, Kwon HJ, Kim TE, Kim JH, Yoo HS, Park MH, Park YH, Kim SJ. 2008. Characterization of a recombinant Newcastle disease virus vaccine strain. *Clin and Vacc.Immunol* 15:1572-1579.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2172-2175.
- De Leeuw, Ben Peeters.1999.Complete sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J. of Gen. Virol.*80:131-136.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Kho CL, Tan WS, Tey BT, Yusoff K. 2004.Regions on nucleocapsid protein of Newcastle disease virus that interact with its phosphoprotein. *Arch.Virol.* 149:997-1005.

- Liu D and Niu Z-X. 2008. Cloning of a gene fragment encoding chicken complement component C3d with expression and immunogenicity of Newcastle disease virus F gene_C3d fusion protein. *Avian Pathol.* 37: 477-485.
- Sambrook and Russell .2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato H, Ohhira M, Ishida N, Imamura Y, Hattori S, Kawakita M.1987. Molecular cloning and nucleotide sequence of P,M and F genes of Newcastle Disease virus avirulent strain D26. *Virus Res.* 7 :241-255.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Ujvari D. 2006. Complete nucleotide sequence of IT-227/82, an avian paramyxovirus type-1 strains of pigeons (*Columba livia*). *Virus Genes* 32:49-57.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.