

Expression of the recombinant coat protein of *Potato virus X* in *Escherichia coli*

Parissa Hassan Sheikhi

Ph.D student student, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. hassansheikhi2013@gmail.com

Hossain Massumi

* Professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Tel: +989131406300, Email: masoomi@uk.ac.ir

Jafar Zolala

Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. j.zolala@uk.ac.ir

Jahangir Heydarnejad

Professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. jheydarnejad@yahoo.com

Akbar Hosseinipour

Associate professor, Department of Plant Biotechnology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. hosseini@uk.ac.ir

Mohammad Maddahian

Ph.D. in Plant Pathology, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: maddahian91@gmail.com

Abstract

Objective

Potato virus X (PVX) is a member of the genus *Potexvirus* in the family *Alfalexiviridae*. This virus is one of the most common and widespread viruses infecting potato worldwide. Due to the wide distribution and economic damage of the virus in Iran, identification and detection of the virus is necessary using non-expensive methods. Production of polyclonal

antibody through molecular approaches can be a useful method for detection of virus in the nature.

Materials and methods

In this research, an infected potato sample was collected from Zarand (Kerman province) and its PVX infection was confirmed by ELISA test. This sample was inoculated on test plant and the coat protein (CP) gene of this isolate was amplified in RT-PCR test with specific primers comprising *Bgl*III and *Nco*I restriction enzymes. Amplified product was cloned into expression prokaryotic vector (pQE60 plasmid), followed by transformation of the *E. coli* strain M15 competent cells.

Results

Subsequent to induction of CP expression, total protein was extracted and run onto 12.5% SDS-PAGE. An approximate 24 kDa band was observed on the gel corresponded to the PVX coat protein. Furthermore, expression of the PVX CP was confirmed by dot blot technique.

Conclusions

In this study, a recombinant antigen suitable for the detection of potato X virus was prepared which was well identified by antiserum produced by injection of complete virus particles into rabbits in dot blot analysis. The production of monoclonal antibodies by recombinant viral antigen will be an important step in accelerating and facilitating the serological identification process of plants infected with this virus.

Key words: Viral Coat Protein, *E. coli*, Recombinant Protein Expression, *Potato virus X*,

Citation: Hassan-Chachi P, Masoomi H, Zolala J, Hosseinipour A, Maddahian M (2019) Expression of the recombinant coat protein of *Potato virus X* in *Escherichia coli*. *Agricultural Biotechnology Journal* 11 (4), 175-192

Agricultural Biotechnology Journal 11 (4), 175-192.

DOI: 10.22103/jab.2019.14027.1131

Received: July 18, 2019; Accepted: October 8, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بیان پروتئین پوششی نو ترکیب ویروس X سیب زمینی در باکتری Escherichia coli

پریرسا حسن شیخی

دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان،

hassansheikhi2013@gmail.com

حسین معصومی

* نویسنده مسئول: استاد بیماری شناسی گیاهی، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان،

masoomi@uk.ac.ir

جعفر ذوالعلی

استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی، بخش بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، j.zolala@uk.ac.ir

جهانگیر حیدر نژاد

استاد بیماری شناسی گیاهی، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان،

jheydarnejad@yahoo.com

اکبر حسینی پور

دانشیار بیماری شناسی گیاهی، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، hosseini@uk.ac.ir

محمد مداحیان

دکتری بیماری شناسی گیاهی، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان،

maddahian91@gmail.com

تاریخ دریافت: 1398/04/27، تاریخ پذیرش: 1398/07/16

چکیده

اهداف: ویروس X سیب زمینی (PVX) از خانواده *Alphaflexiviridae* و جنس *Potexvirus* یکی از رایج‌ترین و گسترده‌ترین ویروس‌های آلوده‌کننده سیب زمینی در جهان می‌باشد. به دلیل گسترش و خسارت اقتصادی این ویروس در ایران، شناسایی و ردیابی آن با استفاده از روش‌های با صرفه‌تر ضروری می‌باشد. تولید آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای با استفاده از فناوری دی ان ای نوترکیب، یک راهکار مفید برای تسهیل شناسایی این ویروس در طبیعت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: برای اساس، در بررسی‌ها، یک نمونه سیب زمینی آلوده به PVX از مزارع سیب‌زمینی در زرد، استان کرمان جمع‌آوری و آلودگی آن نسبت به ویروس مذکور توسط آزمون DAS-ELISA تایید گردید. جدایه مذکور جهت تکثیر، بر روی توتون (*Nicotiana glutinosa*) مایه‌زنی گردید. پس از استخراج آر ان ای از گیاه آزمون، با استفاده از واکنش RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی حاوی جایگاه برش برای آنزیم‌های برشی، توالی پروتئین پوششی ویروس تکثیر و در ناقل بیان پروکاریوتی (pQE60) همسانه‌سازی گردید. پلاسمید نوترکیب، به باکتری *Escherichia coli* سویه M15 منتقل شد.

نتایج: پس از القای بیان، پروتئین مورد نظر استخراج و با تکنیک SDS-PAGE در ژل پلی‌آکرلامید 12/5% مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل بیانگر آن است که وزن مولکولی باند حاصله در آزمون SDS-PAGE با وزن مولکولی پروتئین پوششی (24 kDa) مطابقت دارد. همچنین بیان پروتئین پوششی ویروس در تکنیک دات بلات نیز تأیید گردید.

نتیجه‌گیری نهایی: در این تحقیق، یک آنتی‌ژن نوترکیب مناسب جهت تشخیص ویروس X سیب زمینی تهیه گردید که به خوبی توسط آنتی‌سرم تولید شده از طریق تزریق پیکره‌های کامل ویروس به خرگوش در آزمون دات بلات شناسایی شد. تولید آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای با استفاده از آنتی‌ژن ویروسی نوترکیب، گامی موثر در زمینه تسریع و تسهیل فرآیند شناسایی سرولوژیکی نمونه‌های آلوده به این ویروس مهم خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: باکتری *E. coli*، بیان پروتئین نوترکیب، پروتئین پوششی ویروس، ویروس X سیب زمینی

مقدمه

ویروس X سیب‌زمینی¹ از خانواده *Alphaflexiviridae* و جنس *Potexvirus* می‌باشد (Bostan & Haliloglu 2004) و در تمام مناطق سیب‌زمینی‌کاری دنیا و کشور ایران خسارت ایجاد می‌نماید (Buchen-Osmond, 1987; Yu et al. 2007; Verchot-lubicz et al. 2008). میزان خسارت آن بسته به نژاد ویروس و رقم سیب‌زمینی از 10 تا بیش از 50 درصد و پراکنش آن در ایران حدود 18 درصد گزارش شده‌است (Beemster & Rozendaal 1972; Shamsadden- (Saeed et al. 2014). این ویروس، معمولاً علائم خفیفی در گیاه سیب زمینی ایجاد می‌نماید ولی در صورت آلودگی مخلوط با

¹ *Potato virus X, PVX*

سایر پوتی ویروس‌ها از قبیل ویروس Y سیب زمینی²، ویروس جغنه‌ای توتون³ و *Tobacco vein mottling virus* خسارت بیشتری را وارد می‌کند (Yu et al. 2008). PVX معمولا به طریق مکانیکی منتقل می‌شود، با این حال انتقال آن از طریق قارچ *Synchytrium endobioticum* دو گونه ملخ *Melanospora differentialis* و *Tettigonia viridissima* (Koenig & Lesemann 1989) و برخی از گونه‌های سس (*Cuscuta spp.*) نیز گزارش شده‌است (Koenig & Lesemann 1989). این ویروس به آسانی از طریق پیوند و غده نیز منتقل می‌شود. جنس *Potexvirus*، یکی از هشت جنس متعلق به خانواده *Alphaflexiviridae* است. ویرونها رشته‌ای خمش‌پذیر به طول 470 تا 580 نانومتر و قطر 13 نانومتر می‌باشند که دارای تقارن مارپیچی بوده و طول هر مارپیچ حدود 3/3 تا 3/7 نانومتر است (Adams et al. 2005). ویرونها حاوی یک مولکول خطی تک رشته‌ای مثبت با حدود 5/9 تا 7 کیلو باز می‌باشند که حدود 6 درصد وزن ویرونها را تشکیل می‌دهد. PVX دارای پیکره‌های رشته‌ای خمش‌پذیر به طول 515 و عرض 13 نانومتر می‌باشد (Beemster & Rozendaal 1972). ژنوم تک لا و مثبت به طول 6432 kb تا 6435 kb (به استثنای polyA) بوده که شامل پنج قاب باز خواندنی⁴ و polyA در انتهای 3' می‌باشد (Yu et al. 2008). پروتئین پوششی PVX بر روی عوامل مختلف از قبیل تقابل ویروس با گیاه، علائم ایجاد شده در گیاه، قدرت بیماری‌زایی، تجمع آر این ای⁵ ژنومی و مقاومت گیاه موثر می‌باشد (Feiglstock et al. 1995).

بر اساس خصوصیات مختلف ویروس، نژادهای متفاوتی از PVX گزارش شده است. بر اساس رابطه سرولوژیکی (واکنش نسبت به آنتی بادی های مونوکلونال) چهار گروه از PVX شامل PVX^C، PVX^A، PVX^O و PVX^{HB} گزارش شده‌اند. همچنین بر مبنای درجه حرارت بی اثر شدن⁶ سه گروه و بر اساس عکس العمل آن‌ها در برابر ژن های غالب فوق حساسیت Nx و Nb در ارقام مختلف سیب‌زمینی به چهار گروه طبقه‌بندی می‌شوند. بر این اساس جدایه‌های گروه یک، در حضور هر دو ژن واکنش فوق حساسیت گیاه را تحریک می‌کند، جدایه‌های گروه دو تنها در حضور ژن Nb و جدایه‌های گروه سه در حضور ژن Nx واکنش فوق حساسیت گیاه را تحریک می‌کند. جدایه‌های گروه چهار در تقابل با هیچ یک از این ژن‌ها واکنش فوق حساسیت گیاه را تحریک نمی‌کنند و آلودگی در ارقام حاوی Nx و Nb به طور سیستمیک در گیاه پخش می‌شوند (Cocherham 1955). ژن پروتئین پوششی در تقابل با ژن های Nx و Rx (ژن های عامل واکنش فوق حساسیت) می‌باشد (Cox & Jones 2010).

تهیه آماده خالص پروتئین ویروس‌ها جهت تهیه آنتی‌بادی‌هایی با خلوص بالا، به منظور مطالعات اپیدمیولوژیکی و یا مطالعه و عملکرد ژن‌های مربوطه، حائز اهمیت می‌باشد. اگرچه استفاده از بافت آلوده یا ویروس خالص سازی شده برای مطالعات روزمره کافی است، اما به دلیل مشکل بودن خالص‌سازی پیکره‌های ویروس و همراه بودن ذرات گیاهی با آن‌ها، پروتئین‌های

² Potato virus Y, PVY

³ Tobacco etch virus

⁴ Open reading frame, ORF

⁵ Ribonucleic acid, RNA

⁶ Thermal inactivation point

بدست آمده اغلب از درجه خلوص بالایی برخوردار نیستند. از روش فوق جهت تهیه آنتی بادی چند هم سانه‌ای بر علیه PVX در استان خوزستان استفاده شده است (Shams-bakhsh et al. 2001). در مقابل، روش بیان پروتئین به صورت نوترکیب، به دلیل خلوص بالای پروتئین‌های استخراج شده و امکان تولید آنها در مقیاس بزرگ، جهت پژوهش‌های دقیق دارای کارایی بالاتری می‌باشد. به همین دلیل امروزه از روش‌هایی نظیر بیان ژن پروتئین پوششی در سلول‌های باکتریایی استفاده می‌گردد (Abouzid et al. 2002). با توجه به شیوع گسترده PVX در مزارع سیب زمینی کشور، این تحقیق با هدف تولید پروتئین پوششی بسیار خالص ویروس، در راستای تولید آنتی بادی با کیفیت در تحقیقات آتی انجام شد. بدین منظور، ابتدا ژن رمز کننده پروتئین پوششی ویروس X سیب زمینی درون ناقل بیان پروکاریوتی جاسازی شد و به میزبان بیان (باکتری *E. coli*) انتقال داده شد. پس از شناسایی مولکولی کلنی باکتری نوترکیب و القای بیان در آن، پروتئین پوششی نوترکیب ویروس با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی خالص سازی گردید و مورد شناسایی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی آلوده به PVX: نمونه‌های مشکوک آلوده به PVX از مزارع کشت سیب‌زمینی در زرنده، استان کرمان جمع‌آوری گردیدند و پس از انتقال به آزمایشگاه نسبت به آلودگی به ویروس فوق، توسط آزمون الایزای ساندویچ دو طرفه⁷ و براساس روش کلارک و آدامز (Clark & Adamas 1977)، آزمایش شدند. با استفاده از بافر فسفات PBS با pH= 7/4 به نسبت حجمی / وزنی 1:1 از برگ هر یک از نمونه‌های آلوده به ویروس X سیب‌زمینی عصاره‌گیری به عمل آمد. به منظور حفظ و افزایش غلظت نمونه ویروسی، عصاره گیاهان آلوده با استفاده از پودر کاربراندوم روی گیاه آزمون *Nicotiana glutinosa* L. به صورت مکانیکی مایه‌زنی شدند (Massumi et al. 2014).

جداسازی ژن رمز کننده پروتئین پوششی ویروس PVX: آر این ای ویروس X سیب زمینی از گیاهان توتون

آلوده به این ویروس با استفاده از کیت: High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Germany, Cat. No: 11858874001) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد. برای تکثیر 681 نوکلئوتید از توالی 714 نوکلئوتیدی رمز کننده پروتئین پوششی PVX، دو آغازگر با استفاده از نرم افزار Fast-PCR طراحی گردید (Kalendal 2005). برای این منظور از ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی این ویروس (رس شمار بانک ژن KF568906) استفاده شد. در جدول 1 اسامی آغازگرها به همراه ترادف نوکلئوتیدی آنها بیان شده است. سنتر رشته مکمل DNA⁸ با استفاده از کیت Expand High

⁷ Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbant assay, DAS-ELISA

⁸ Complementary DNA

انجام شد. Fidelity PCR System (Roche, Germany, Cat. No: 11732641001) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده

جدول 1. آغازگرهای مورد استفاده به منظور تکثیر ژن پروتئین پوششی (CP) ویروس X سیب زمینی

Table 1. The primer sequences used to amplify CP gene of *Potato virus X*

Primer	Size	Sequence (3'-5')
PVXF6	31	GCA [*] <u>CCATGGCCACAGGGTCAACTACTTCAAC</u>
PVXR5	30	GCA <u>AGATCTTGGTGGGAGGGTAACAACAGC</u>

* جایگاه هدف آنزیم های برشی *NcoI* و *BgIII* با خط زیرین در توالی آغازگرها نشان داده شده است.

*Underline: Target sites for restriction endonucleases *NcoI* and *BgIII*.

اجزاء واکنش زنجیره‌ای پلیمرز⁹ شامل آغازگرهای مستقیم و معکوس هر کدام با غلظت یک میکرومولار، مخلوط با dNTPs با غلظت 10 میکرومولار، cDNA 600 ng و 0/5 میکرولیتر آنزیم *Phusion*[®] *High-Fidelity DNA Polymerase* به همراه بافر (5X) آنزیم فوق بود. برنامه PCR جهت تکثیر قطعه ژن مورد نظر شامل 35 سیکل از مراحل واسرشته سازی در دمای 94 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای 56 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، بسط ساخته شدن DNA در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه بود. در نهایت برای تکمیل ساخت قطعات DNA در دمای 72 درجه سانتی گراد، 10 دقیقه در نظر گرفته شد. محصولات PCR بدست آمده در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. همسانه سازی و تعیین ترادف: قطعه DNA تکثیر شده در واکنش PCR و نمونه خالص پلاسمید بیان pQE-60

Isolation Kit, High Pure Plasmid (QIAGEN, Cat No : 32903) که با استفاده از کیت استخراج پلاسمید *Roche, Germany* از باکتری XL1-Blue استخراج گردید، بطور جداگانه با آنزیم های *Bgl II* و *Nco I* برش داده شدند و سپس واکنش اتصال در حضور آنزیم T4 DNA Ligase انجام شد. محصولات واکنش اتصال با استفاده از کیت *Ins T/A PCR Product Cloning Kit, Fermentas, Lithuania* برای ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* سویه XL1-Blue مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور تشخیص کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب از آزمون PCR استفاده گردید. سپس جهت تأیید، واکنش برش آنزیمی با آنزیم های *BgIII* و *NcoI* (که ژن هدف با اندازه 681 جفت بازی را از پلاسمید جدا سازی می کند) انجام شد. به منظور اطمینان از صحت توالی فوق، پلاسمید نوترکیب توسط شرکت *Bioneer* کشور کره

⁹ Deoxyribonucleic acid, DNA

جنوبی تعیین ترادف گردید. سپس با استفاده از محلول های کیت Cloning Kit, Ins T/A Clone™ PCR Product به باکتری *E. coli* سویه M15 به منظور بیان ژن های مورد نظر انتقال داده شد. به منظور تشخیص کلنی های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب، از آزمون PCR و هضم آنزیمی ذکر شده در بالا استفاده گردید.

القای بیان پروتئین نوترکیب در باکتری *E. coli*: جهت القاء بیان توسط pQE-PVX از روش القاء ارائه شده

توسط (Joseph Roland 2008) استفاده شد. برای این منظور، کلنی های حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین و پنی سیلین به مدت یک شب در دمای 37 درجه سانتی گراد با دور 120 دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از آن کشت مجدد باکتری جهت بیان پروتئین ها مورد نظر در محیط حاوی یک میلی مولار IPTG¹⁰ در شیکر انکوباتور در دمای 37 درجه سانتی گراد و 150 دور در دقیقه انجام گردید. قبل از القای بیان (عدم حضور IPTG)، دو نمونه M15 فاقد پلاسمید نوترکیب و M15 حاوی پلاسمید نوترکیب به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. نمونه برداری ها 2، 4، 6 و 8 ساعت پس از القای بیان (اضافه کردن IPTG) انجام گردید. سپس به منظور خالص سازی باکتری از محیط کشت، بافر نمونه 5X به ته نشین بدست آمده از سانتریفیوژ نمونه ها اضافه گردید. نمونه های پروتئین جهت نگهداری کوتاه مدت در دمای چهار درجه سانتی گراد و به منظور نگهداری بلند مدت در دمای 20- درجه سانتی گراد قرار داده شدند (Qiagen 2003). جهت ادامه فرآیند استخراج پس از ذوب شدن کامل یخ، نمونه ها به مدت 5 تا 7 دقیقه در دمای 90 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. برای تخمین وزن مولکولی از نشانگر پروتئینی Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA) استفاده گردید. آشکار سازی پروتئین ها در ژل SDS-PAGE با استفاده از محلول رنگ آمیزی آبی کوماسی صورت گرفت (رفرنس).

آزمون دات بلات: در این آزمون جهت تشخیص ایمونولوژیکی CP از آنتی بادی های پلی کلونال تهیه شده از شرکت

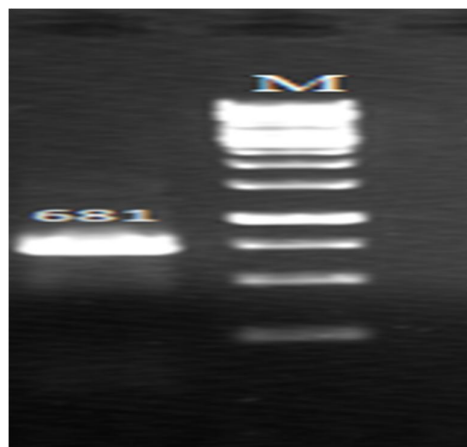
DSMZ کشور آلمان استفاده شد. جهت انجام این آزمون، نمونه برداری ها قبل از القای بیان و 2، 4، 6 و 8 ساعت بعد از آن انجام شد. لکه گذاری نمونه ها به میزان 20 میکرولیتر (100mg/ml) بر روی کاغذ نیتروسلولوزی که از قبل در بافر انتقال غوطه ور و خشک شده بود انجام گرفت. پس از خشک شدن لکه ها، غشا نیتروسلولوزی در بافر Blocking buffer به مدت 70 دقیقه در ترموشیکر با دمای 30°C و 80 دور در دقیقه قرار داده شد. پس از شستشوی غشاء نیتروسلولوزی با بافر TBS-T، در بافر آنتی بادی اول (IgG-PVX) و سپس در بافر آنتی بادی دوم (IgG-AP, 1/1500) غوطه ور گردید. در نهایت این غشاء در 20 میکرولیتر بافر سوبسترا حاوی 2 عدد قرص پی نیتروفنیل فسفات غوطه ور گردید و به مدت 20 دقیقه در انکوباتور با دمای 30 درجه سانتی گراد قرار گرفت.

¹⁰ Isopropyl-beta-thio galactopyranoside

نتایج

جداسازی ویروس از گیاهان سیب زمینی آلوده: بعد از نمونه برداری از مزارع کشت سیب زمینی در منطقه لاله زار کرمان و انجام آزمون DAS-ELISA، از میان نمونه‌های جمع‌آوری شده یک نمونه که بیشترین میزان جذب در الیزا را نشان داد جهت مایه‌زنی بر روی گیاه توتون رقم *N. glutinosa* و مطالعات مولکولی انتخاب گردید.

واکنش زنجیره ای پلی مرآز: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرآز به روش نسخه‌برداری معکوس¹¹ با استفاده از آغازگرهای PVXR5/PVXF6 منجر به تشکیل یک قطعه 681 جفت بازی برای ژن CP، در ژل آگارز 1 درصد گردید که از لحاظ اندازه معادل قطعه مورد انتظار می‌باشد (شکل 1).



شکل 1. الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن پروتئین پوششی (CP) جدایه ایرانی PVX با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PVXF6/ PVXR5. M: نشانگر اندازه DNA یک کیلو بازی شرکت Thermo Scientific (Cat. No: SM0311) 1، قطعه 681 جفت بازی تکثیر شده مربوط به ژن پروتئین پوششی

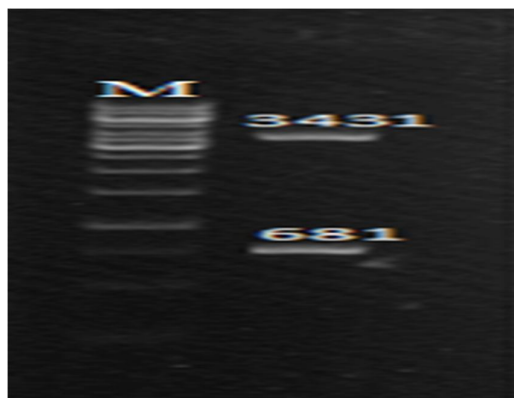
ویروس

Figure 1. Electrophoresis of the RT-PCR products related to coat protein gene of Iranian PVX isolates using specific primers of PVXF6/ PVXR5: M, 1-kb DNA ladder Thermo Scientific (Cat. No: SM0311) 1, amplified 681 bp products of the coat protein of PVX

هم‌سانه سازی: هم‌سانه سازی در ناقل بیانی pQE60-PVX به وسیله برش آنزیمی با آنزیم‌های *NcoI* و *BglIII* تأیید گردید. پس از انجام واکنش هضم، مربوط به ژن CP با اندازه 681 جفت باز از ناقل نو ترکیب pQE60-PVX جدا و ناقل خطی pQE60 با اندازه 3400 جفت باز باقی ماند (شکل 2).

¹¹ Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR

تعیین ترادف ژن پروتئین پوششی PVX: جهت تعیین توالی ژن مذکور، پلاسمید نو ترکیب به شرکت Bioneer، کشور کره جنوبی ارسال گردید. پس از تعیین توالی قطعه درج شده، مقایسه توالی نوکلئوتیدی به دست آمده با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن توسط برنامه Blast، صحت ترادف مورد نظر را اثبات نمود (رس شماره بانک ژن: KER.LA.2: KF575175). سپس بیان ژن پروتئین پوششی PVX در میزبان *E. coli* (M15) با استفاده از تکنیک SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. در الکتروفورز پروتئین‌ها، قطعاتی با وزن مولکولی حدود 24 کیلو دالتون برای پروتئین پوششی مشاهده گردید (شکل 3). بر اساس نرم افزار آنالین ExPASy وزن مولکولی پروتئین پوششی 24/09 کیلو دالتون تعیین گردید که با وزن مولکولی باند مشاهده شده در آزمون SDS-PAGE نیز مطابقت داشت.

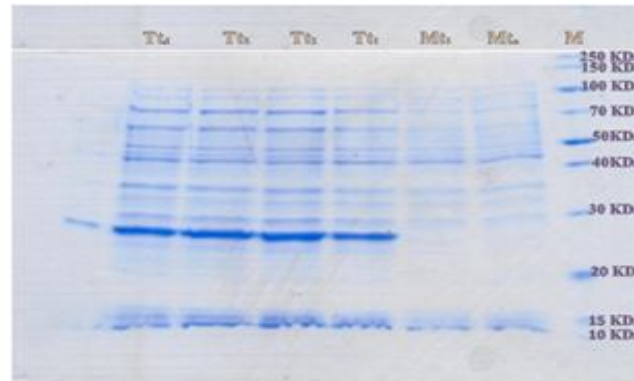


شکل 2. استخراج پلاسمید pQE60-PVX از باکتری *E. coli* و برش آن توسط آنزیم های *Bgl*III و *Nco*I: نشانگر اندازه دی ان ای 1 کیلو بازی شرکت Thermo Scientific (Cat. No: SM0311)،
1: قطعه 681 جفت بازی ژن پروتئین پوششی (CP) و قطعه 3431 جفت بازی پلاسمید pQE60 حاصل از هضم آنزیمی

Figure 2. Extraction of pQE60-PVX plasmid from *E. coli* and digestion it by restriction enzymes *Bgl*III and *Nco*I. M: DNA ladder 1kb the company of Thermo Scientific (Cat. No: SM0311), 1: fragment 681 bp of the coat protein and fragment 3431 bp related to pQE60 plasmid from diges

شنا سایی پروتئین نو ترکیب هدف در آزمون دات بلات: بعد از رنگ آمیزی غشا نیتروسولوزی در آزمون دات بلات، رنگ زرد ناشی از واکنش آنتی بادی اختصاصی پروتئین پوششی ویروس PVX با پروتئین نو ترکیب هدف در نمونه پروتئین استخراج شده از باکتری *E. coli* نو ترکیب حاوی پلاسمید pQE60-PVX قبل از القای بیان ژن هدف مشاهده نشد. با این حال

توسعه واضح رنگ زرد مورد انتظار در نمونه های پروتئین استخراج شده در زمان های مختلف پس از القای بیان ژن در باکتری نوترکیب مبین بیان موفق پروتئین پوششی نوترکیب ویروس PVX و شناسایی آن توسط آنتی بادی اختصاصی بود (شکل 4).



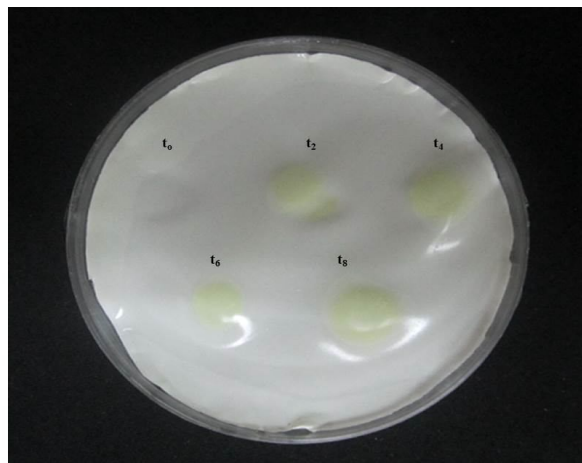
شکل 3. الکتروفورز نمونه های پروتئین استخراج شده از باکتری *E. coli* نوترکیب حامل پلاسمید بیانی M.pQE60-PVX: نشانگر وزن مولکولی پروتئین (PageRuler™, 26630)، نمونه شاهد (M15) فاقد پلاسمید نوترکیب)، Mt1 نمونه شاهد M15 دارای پلاسمید نوترکیب قبل از القا بیان. چاهک های T مربوط به پروتئین های استخراج شده در دو (t1)، چهار (t2)، شش (t3) و هشت (t4) ساعت پس از القا ژن مورد نظر در باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pQE-PVX پروتئین پوششی ویروس تولید شده توسط سیستم پروکاریوتی دارای وزن 24/9 کیلو دالتون می باشد

Figure 3. Electrophoresis of extracted protein samples from the recombination *E. coli* contains expression plasmid pQE60-PVX: M, protein molecular weight (PageRuler™, 26630), Mto control sample (M15 without recombinant plasmid), Mt1 control sample (M15 contains recombinant plasmid before the expression induction). T-plate related to extracted proteins at two (t₁), four (t₂), six (t₃) and eight (t₄) hours after the induction of target gene in bacteria containing of the pQE-PVX plasmid. The coat protein produced by prokaryotic system has 24.9 kDa weight.

بحث: باکتری *E. coli* یکی از متداول ترین سیستم های میزبان برای بیان سطح بالای پروتئین های نوترکیب است. استفاده از این باکتری به دلیل هزینه کم محیط کشت، سرعت بالای رشد، امکان کنترل بیان ژن هدف و سهولت افزایش حجم تولید، بسیار معمول است (Schwarz et al. 1978). علاوه بر این، تعدادی از نژادهای جهش یافته *E. coli* در دسترس هستند که می توانند بیان پروتئین های نوترکیب را بهبود بخشند. به عنوان مثال استفاده از نژادهای میزبان با جهش هایی در ژن های پروتئاز

سیتوپلاسمی، تخریب پروتئین نوترکیب بیان شده را کاهش داده و موجب افزایش بازده تولید می شود (Fischer 1993). ژنوم این باکتری را می توان با سرعت، دقت و سهولت بالا دستوری کرد. ضمن آن که کنترل پرموتور در این باکتری سخت نبوده و تعداد نسخه های پلاسمید را نیز می توان به آسانی تغییر داد. با این حال، سیستم *E. coli* دارای معایبی نیز می باشد که می توان جهت بیان مؤثر پروتئین ها بر آن ها غلبه کرد، از جمله تشکیل استات در تراکم سلولی بالا می باشد که می توان با تحت کنترل در آوردن سطح اکسیژن و نیز از طریق تغذیه کشت با گلوکز و حفظ نرخ رشد، به ویژه قبل از وارد شدن به مرحله تولید استات، سمیت ایجاد شده را تا حد زیادی تحت کنترل در آورد (Fischer 1993). باکتری *E. coli* به دلیل نقص ذاتی سیستم گلیکوزیلاسیون پروتئین در پروکاریوت ها قادر به قرار دادن واحدهای گلیکان پیشرفته بر روی پروتئین های نوترکیب و تولید گلیکوپروتئین های پیچیده نیست. این نقص سبب شده است که این باکتری، میزبان مناسبی برای تولید آنتی بادی های اختصاصی پروتئین های پستانداران نباشد (Janknecht and Martynoff, 1991). با این حال، به نظر می رسد که محدودیت های سیستم بیان پروکاریوتی باکتری *E. coli* مانع چندانی برای تولید موفق پروتئین های پوششی نوترکیب بسیاری از ویروس های گیاهی نباشد، زیرا بیان ژن پروتئین پوششی ویروس در باکتری *E. coli* و به دنبال آن، خالص سازی و تولید آنتی بادی پلی کلونال برای تعدادی از ویروس های گیاهی گزارش شده است (Sadeghan et al. 2013; Koohapitagtam & Nualsri 2013; Cerovska et al. 2010). پس از بیان و خالص سازی پروتئین پوششی نوترکیب ویروس و تزریق آن به خرگوش، آنتی بادی پلی کونال تولید شده از قابلیت شناسایی طیف وسیعی از جدایه های ویروسی برخوردار خواهد بود (Cerovska et al. 2010). واحدهای پروتئین پوششی ویروس دارای دو نوع اپی توپ متفاوت می باشند. یک گروه در سطح زیر واحدهای پروتئین پوششی قرار داشته، اما در هنگام تشکیل پیکره های کامل ویروسی و چرخش های ایجاد شده در سطح پیکره ها واقع نخواهند بود. این گروه تحت نام کریپتوتوپ¹² (cryptotopes) نامگذاری گردیده و آنتی بادی تولید شده علیه آنها معمولاً قادر به تشخیص ویرون کامل ویروسی نمی باشد. اما زیر واحدهای پروتئین پوششی دارای اپی توپ های دیگری تحت نام متاتوپ¹³ (metatopes) نیز هستند که در سطح پیکره های کامل ویروسی و زیر واحدهای پروتئین پوششی آن واقع گردیده و بنابراین آنتی بادی تولید شده علیه آن ها، قادر به تشخیص پیکره های کامل ویروسی در گیاهان آلوده می باشد. برای اساس، این فرض مطرح است که اگر از پروتئین پوششی نوترکیب ویروس بصورت غیردنا توره و با حفظ ساختمان فضایی پروتئین برای تولید آنتی بادی اختصاصی استفاده شود، آنتی بادی تولیدی از قابلیت چندانی برای تشخیص پیکره های کامل ویروسی برخوردار نخواهد بود. از اینرو عمدتاً ترجیح داده می شود که از فرم دنا توره پروتئین پوششی برای تولید آنتی بادی استفاده شود (Van Regenmortel 1982). البته استفاده از فرم دنا توره پروتئین نوترکیب از مزیت دومی نیز برخوردار است که به قابلیت استخراج مقدار بیشتری پروتئین نوترکیب از توده باکتری رشد یافته مربوط می شود.

¹² Cryptotopes¹³ Metatopes



شکل 4. نتایج حاصل از آزمون دات بلات برای شناسایی پروتئین پوششی ویروس PVX در نمونه پروتئین 1 استخراج شده از باکتری *E. coli* نوترکیب حامل پلاسمید بیان pQE60-PVX. t_0 (زمان صفر): عدم حضور پروتئین نوترکیب مورد نظر قبل از القای بیان ژن پروتئین پوششی ویروس PVX در باکتری نوترکیب، t_2 ، t_4 ، t_6 ، t_8 : توسعه رنگ سبز مبین حضور پروتئین نوترکیب مورد نظر و واکنش آن با آنتی بادی اختصاصی پروتئین پوششی ویروس PVX در نمونه های پروتئین 1 استخراج شده از باکتری نوترکیب به ترتیب 2، 4، 6 و 8 ساعت بعد از القای بیان ژن

Figure 4. Dot-blot test for identification of recombinant coat protein of PVX in protein samples isolated from recombinant *E. coli* harboring pQE60-PVX. t_0 : the target protein is absent before induction of gene expression in recombinant bacterium. t_2 , t_4 , t_6 and t_8 : The green color showing the presence and interaction of the target protein with PVX-CP specific antibody in protein samples isolated from recombinant bacterium 2, 4, 6 and 8 hours after induction of gene expression, respectively

چنانچه پروتئین پوششی ویروس گیاهی به عنوان یک پروتئین خارجی از محلولیت مناسبی در pH سیتوپلاسمی باکتری برخوردار نباشد، بخش مهمی از مولکول های پروتئین نوترکیب تولید شده بصورت توده هایی نامحلول با پل های دی سولفیدی فراوان به نام inclusion body در سلول باکتری رسوب می کنند و استحصال آنها از سلول باکتری به فرم غیردنا توره میسر نخواهد بود (Fischer 1993; Baneyx, 1999; Amersham 2000). اغلب تحقیقات مشابه در زمینه تولید آنتی بادی برای پروتئین های ویروسی نوترکیب از پپتید علامت His₆ Tag برای خالص سازی آسان پروتئین نوترکیب هدف از طریق کروماتوگرافی تمایلی در ستون شارژ شده با یون نیکل (Ni^{2+}) استفاده کرده اند. قطعه پپتیدی شش هیستیدین اضافه شده به انتهای N پروتئین نوترکیب از عملکرد بسیار مناسبی برای خالص سازی بسیاری از پروتئین های نوترکیب برخوردار بوده است (Qiagen 2003). گزارش ها

بیانگر آن است که استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب¹⁴ برای تولید آنتی بادی اختصاصی ویروس های گیاهی موجب رفع مشکل عدم خلوص نمونه های ویروسی در هنگام تزریق به منظور تولید آنتی بادی می گردد که از جمله می توان به رفع مشکل تشخیص ویروس *Grapevine leafroll-associated virus (GLRaV)* با استفاده از آنتی بادی های نوترکیب اشاره کرد (Ling et al. 2000; Abdel-Salam et al. 2004, 2005; Beuve et al. 2007; Fajardo et al. 2007; Khan et al. 2012). این روش برای تشخیص و تمیز گونه های ویروسی بسیار نزدیک از یکدیگر نیز بسیار موثر بوده است. به عنوان مثال، با توجه به همبستگی سرولوژیکی بین بعضی از ویروس های خانواده *Potyviridae* همچون ویروس Y سیب زمینی و ویروس A سیب زمینی¹⁵ آنتی سرم تهیه شده از طریق تزریق پیکره های ویروسی سالم به حیواناتی همچون خرگوش قادر به تشخیص این گونه از ویروس ها از یکدیگر نیست. این در حالیست که بیان ژن پروتئین پوششی PVY در باکتری *E. coli* و به دنبال آن، خالص سازی و تولید آنتی بادی پلی کلونال برای این ویروس سبب شد که آنتی بادی نوترکیب تولید شده به صورت اختصاصی جهت تشخیص جدایه های PVY استفاده شود. زمانی که از آنتی بادی نوترکیب در آزمون های DBIA¹⁶، IPTA-ELISA¹⁷ و DAS-ELISA استفاده گردید، ایزوله های سیب زمینی آلوده به PVY به راحتی تشخیص داده شدند (Abdel-Salam et al. 2014). برخی از محققان در استفاده از روش DAS-ELISA با به کار بردن آنتی بادی های نوترکیب با مشکلاتی جهت تشخیص آنتی ژن های ویروسی مواجه گردیده اند (Cerovska et al. 2003; Soliman et al. 2006; Flowarczna et al. 2008). با این وجود Cerovska et al. (2010) جهت تشخیص PVX، موفق به استفاده از آنتی بادی نوترکیب در روش DAS-ELISA گردیدند. در این تحقیق، یک آنتی ژن نوترکیب مناسب جهت تشخیص ویروس X سیب زمینی تهیه گردید که به خوبی توسط آنتی سرم تولید شده از طریق تزریق پیکره های کامل ویروس به خرگوش در آزمون دات بلات شناسایی شد. به دلیل گسترش PVX در ایران و با توجه به خسارت اقتصادی آن در نقاط مختلف، شناسایی و ردیابی این ویروس با استفاده از روش های با صرفه تر ضروری است. تولید آنتی بادی چندهمسانه ای با استفاده از آنتی ژن ویروسی نوترکیب، گامی موثر در زمینه تسریع و تسهیل فرآیند شناسایی سرولوژیکی نمونه های آلوده به این ویروس مهم خواهد بود. از این رو، این تحقیق با خالص سازی پروتئین پوششی نوترکیب ویروس PVX از باکتری *E. coli* و تولید آنتی بادی اختصاصی آن از طریق تزریق به خرگوش ادامه خواهد یافت.

¹⁴ Recombinant DNA

¹⁵ *Potato virus A, PVA*

¹⁶ Dot blotting immune binding assay

¹⁷ Indirect Plate Trapped Antigen-ELISA

References

- Abdel-Salam AM, Abdel-Kader HS, El-Saghir SM (2005) Biological, serological, and molecular detection of *banana streak badnavirus* in vegetatively propagated banana plants in Egypt. *Egypt J Virol* 2, 255-268.
- Abdel-Salam AM, Abdel-Kader HS, El-Saghir SM, Hussein MH (2004) Purification, serology, and molecular detection of Egyptian isolates of *banana bunchy top babuvirus* and *faba bean necrotic yellows nanovirus*. *Arab J Biotechnol* 7, 141-155.
- Abdel-Salam AM, El-Attar AK, Gambley CF (2014) Production of polyclonal antisera to a recombinant coat protein of *Potato virus Y* expressed in *Escherichia coli* and its application for immunodiagnosis. *Int J Virol* 10, 1-16.
- Abouzid AM, Freitas-Astua J, Purcifull DE et al. (2002) Serological studies using polyclonal antisera prepared against the viral coat protein of four begomoviruses expressed in *Escherichia coli*. *Plant Dis* 86, 1109-1114.
- Adamas MJ, Accotto GP, Agranovsky AA, Bar-Joseph M, Brunt AA (2005) Family *Flexiviridae*, In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball La (eds), *Virus taxonomy: the eighth report of the ICTV*. Academic press, New York, p. 1089-1124.
- Amersham Pharmacia Biotech (2000) *The Recombinant Protein Handbook – Protein amplification and simple purification*. Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden.e.
- Baneyx F (1999) Recombinant proteins expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10, 411-421.
- Beemster ABR, Rozendaal A (1972) Potato viruses: Properties and symptoms, In: J.A. de Bokx (ed.), *Viruses of potatoes and seed-potato production*. PUDOC, Wageningen, p. 115-143.
- Beuve M, Sempé L, Lemaire O (2007) A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine. *J Virol Methods* 141, 117-124.
- Bostan H, Haliloglu K (2004) Distribution of PLRV, PVS, PVX and PVY (PVY^N, PVY^O, and PVY^C) in the seed potato tubers in Turkey. *PJBS* 7, 1140-1143.
- Buchen-Osmond C (1987) Potato X *Potexvirus*. Description and lists from the VIDE database. From <http://bio-mirror.im.ac.cn/mirrors/pvo/vidе/descr651.htm>.
- Cerovska N, Moravec T, Plchova H et al. (2010) Production of polyclonal antibodies to *Potato virus X* using recombinant coat protein. *J Phytopathol* 158,66-68.
- Cerovska N, Moravec T, Rosecka P et al. (2003) Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of *Potato mop-top Virus*. *J Phytopathol* 151, 195-200.
- Clark MF, Adams SAN (1997) Characteristics of microplates method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34, 475-483.

- Cockerham G (1955) Strains of *potato virus X*, In: Streutgers E, Beemster ABR, van der Want JPH (eds.), Proceeding of 2nd conference on potato virus diseases. Lisse-Wageningen p. 89-92.
- Cox AB, Jones RAC (2010) Genetic variability in the coat protein gene of *Potato virus X* and the current relationship between phylogenetic placement and resistance groupings. Arch 155, 1349-1356
- Fajardo TVM, Barros DR, Nickel O, et al. (2007) Expression of *Grapevine leafroll-associated virus-3* coat protein gene in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibodies. Fitopatol. Bras 32, 496-500.
- Feigelstock DA, Tozzini AC, Hopp HE (1995) Coat protein sequence of a resistance-breaking strain of *Potato virus X* isolated in Argentina. Virus Genes 10, 289-292.
- Fischer B, Sumer I, Goodenough P (1993) Isolation, renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. Biotechnol Bioeng 41, 3-13.
- Folwarczna J, Plchová H, Moravec T et al. (2008) Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of *Potato virus Y*. Folia Microbiologica 53, 438-442.
- Janknecht R, de Martynoff G, Lou J et al. (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. PNAS 88, 8972-8976.
- Kalendal R (2005) Fast PCR primer design and report sequence searching program with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. From <http://www.Biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastPCR.html>
- Khan S, Jan AT, Mandal B et al. (2012) Immunodiagnosics of *cucumber mosaic virus* using antisera developed against recombinant coat protein. Archives of Phytopathology and Plant Protection 45, 561-59.
- Koenig R, Lesemann DE (1989) Potato virus X, potexvirus group. AAB 345, 1-5.
- Koohapitagtam M, Nualsri C (2013) Production of polyclonal antibodies specific to the recombinant coat protein of *Blackeye cowpea mosaic virus* and its use in disease detection. Kasetsart J (Natural Science) 47, 603-613.
- Ling KS, Zhu HY, Jiang ZY, Gonsalves D (2000) Effective application of DAS-ELISA for detection of *grapevine leaf roll associated closterovirus-3* using a polyclonal antiserum developed from recombinant coat protein. Eur 106, 301-309.
- Massumi H, Poormohammadi S, Pishyar S et al. (2014) Molecular characterization and field survey of Iranian potato virus X isolates. Virusdisease 25, 338-344.
- Qiagen (2003) The QIAexpressionist™ - A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Qiagen, Hilden, Germany.

- Roland, J (2008) Bacterial protein expression – test induction. From: <http://josephroland.com/lab/protocols/induction.html> Last accessed 30 August 2019.
- Sadeghan A, Shams-bakhsh M, Yakhchali B (2013) Expression of *Citrus tristeza virus* coat protein gene in *Escherichia coli*. Prot 2, 387-393.
- Schwarz E, Scherrer G, Hobom G, Kossel H (1978) Nucleotide sequence of cro, cII and part of the 0 gene in phage lambda DNA. Nature 272, 410-414.
- Shamsadden-Saeed F, Massumi H, Moradi S, et al. (2014) Incidence and characterization of Potato virus V infections in Iran. Virusdisease 25,78-84
- Shams-bakhsh M, Khakvar R, Poor-Rahim R (2001) Purification, preparation of antiserum and serological diagnosis of potato virus X and Y isolated from Khuzestan province farms. J Agric Sci 24, 47-53.
- Soliman AM, Barsoum BN, Mohamed GG et al. (2006) Expression of coat protein gene of the Egyptian isolate of *Potato virus X* in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibodies against it. Arab J Biotechnol 9, 115-128.
- Van Regenmortel MHV (1982) Serology and immunochemistry of Plant Viruses. Academic Press, INC. New York.e.
- Verchot-Lubicz J, Ye CM, Bamunusinghe D (2007) Molecular biology of potexviruses: recent advances. J Virol 88,1643-1655.
- Yu XQ, Wang HY, Lan YF (2008) Complete genome sequence of a Chinese isolate of *Potato virus X* and analysis of genetic diversity. Phytopathol 156, 346–351.

