Archive of SID

تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه پروتئین حرکتی ویروس پیچیدگی زرد برگ گوجه‌فرنگی و بررسی کارآیی آن در ردیابی ویروس

Production of Polyclonal Antibody Against Movement Protein of Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Assessment of Its Efficacy in Virus Detection

سجاد مرادی[۱]، مسعود شمس‌بخش[۲*] و ناصر صفایی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۸/۱۰

چکیده

بیماری ویروسی پیچیدگی‌زرد برگ گوجه‌فرنگی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و گلخانه‌های مناطق معتدل جهان به‌شمار می‌رود. به‌منظور تولید آنتی‌بادی علیه ویروس عامل بیماری برای استفاده در ردیابی و معرفی کیت تشخیص بیماری، پروتئین حرکتی همسانه‌سازی شده ویروس در ناقل بیانی pET26(b)+، از سویه BL21(DE3) باکتری *Escherichia coli* بیان شد و پروتئین نوترکیب استخراج و به خرگوش تزریق شد. آنتی‌سرم تهیه شده، به‌منظور بررسی کارآیی در ردیابی پروتئین بیان شده در باکتری و تشخیص ویروس در گیاهان آلوده، در آزمون‌های وسترن‌بلات و الایزا مورد استفاده قرار گرفت. در آزمون وسترن‌بلات و رقت ۱ به ۱۵۰۰ آنتی‌سرم، باند ۱۳ کیلودالتونی مربوط به پروتئین حرکتی ویروس را در گیاهان آلوده ردیابی کرد. در آزمون الایزا و رقت ۱ به ۱۰۰۰ آنتی‌سرم، واسرشته کردن پروتئین سبب افزایش جذب نوری در نمونه‌های گیاهان آلوده شد هرچند این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. این نتایج نشان داد که آنتی‌سرم تولید شده علیه پروتئین حرکتی ویروس پیچیدگی زرد برگ گوجه‌فرنگی برای آزمون وسترن‌بلات مناسب بوده و جهت استفاده در آزمون الایزا نیاز به تخلیص آنتی‌بادی دارد.

واژه‌های کلیدی: TYLCV، آنتی‌سرم، الایزا، پروتئین نوترکیب

۱. دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲ و ۳. دانشیاران گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

*: نویسنده مسوول Email: shamsbakhsh@modares.ac.ir

قسمتی از پایان‌نامه نویسنده اول ارایه شده به دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گوجه‌فرنگی *Solanum lycopersicum* L. متعلق به تیره Solanaceae، یکی از مهم‌ترین محصول کشاورزی ایران می‌باشد. در بین عوامل بیماریزا، نقش ویروس‌ها در کاهش عملکرد گوجه‌فرنگی مهم بوده و از این میان ویروس‌های عامل بیماری پیچیدگی زرد برگ گوجه‌فرنگی که گروهی از ویروس‌های جنس بگوموویروس با نام ویروس پیچیدگی زررد برگ گوجه‌فرنگی (Tomato Yellow Leaf Curl Virus, TYLCV) هستند به‌خصوص در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان حائز اهمیت بسیار زیاد می‌باشند. این بیماری در برخی از مناطق به‌صورت عامل محدودکننده مطرح بوده و کشاورزان را مجبور به جایگزینی کشت گوجه‌فرنگی با محصول دیگری همچون بادمجان کرده است *حاجی‌مراد* و همکاران (Hajimorad *et al.*, 1996).

شیوع غیرمنتظره و سریع این بیماری در نواحی مختلف دنیا و ایران، *فوکوتا* و همکاران؛ بهجت‌نیا و همکاران، ۱۳۸۳ (Fukuta *et al.*, 2003)، ضرورت بهره‌گیری از روش‌های پیشرفته و با دقت بالا را برای تشخیص سریع و دقیق عوامل این بیماری برای کنترل به موقع آن ایجاب می‌کند. روش ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) متداول‌ترین روش سرولوژیکی است که در سطح وسیع برای ردیابی و تشخیص ویروس‌ها استفاده می‌شود، *هال* (Hull, 2009) و این روش در ابتدا نیازمند تأمین منبع آنتی‌ژن ویروسی برای استفاده در فرآیند تولید آنتی‌بادی مورد استفاده می‌باشد. روش‌های سنتی تولید آنتی‌بادی‌ها، شامل استخراج پیکره ویروس از گیاه و استفاده از آن به‌عنوان آنتی‌ژن برای تزریق به حیوانات خونگرم (معمولاً پستانداران) می‌باشد و در این مسیر اولین و بزرگ‌ترین مشکل، خالص‌سازی موفق پیکره ویروس است که برای برخی از ویروس‌ها به دلایلی از قبیل غلظت کم آن در گیاه و وجود مشکلاتی در انتقال به گیاه تکثیری به آسانی امکان‌پذیر نمی‌باشد *ابوجده* و همکاران (Abou-Jawdah *et al.*, 2004). از طرف دیگر گزارش شده است که آنتی‌بادی تهیه شده علیه پیکره کامل بگوموویروس‌ها به‌دلیل ارتباط سرولوژیک نزدیک، قادر به شناسایی و تفکیک آنها نمی‌باشد *ابوزید* و همکاران (Abouzid *et al.*, 2002).

در اوایل دهه ۱۹۷۰ پژوهش‌های زیست‌شناسی مولکولی وارد مرحله نوینی از پیشرفت گردید و ابداع مجموعه‌ای از روش‌ها و فنون جدید به‌نام فناوری DNA نوترکیب سرآغاز پیشرفت‌های جدید در علوم و فناوری زیستی شد *والکر و رپلی* (Walker and Rapley, 2007). بیان ژن‌های ساختمانی و غیر‌ساختمانی ویروس‌ها در سیستم‌های بیان ژن با استفاده از *E. coli* برای تولید منبع آنتی‌ژن به‌منظور تولید آنتی‌بادی علیه اپی‌توپ‌های خطی که براساس تفاوت در توالی آمینواسیدی ساختمان اولیه پروتئین ویروس است تاکنون به‌طور موفقیت‌آمیزی برای ویروس‌های متعددی استفاده شده است *شمس بخش* و *سایمون*؛ *پلکوا* و همکاران (Shams-bakhsh and Symons, 2004; Plchova *et al.*, 2011). با توجه به گسترش ویروس مهم و خسارت‌زای پیچیدگی زرد برگ گوجه‌فرنگی در مناطق مهم تولید این محصول در کشور و فقدان کیت تشخیصی کارآ برای ردیابی سریع و به موقع آن، در پژوهش حاضر آنتی‌سرم علیه پروتئین حرکتی ویروس تهیه شد و کارآیی آن در ردیابی ویروس با روش‌های سرولوژیک وسترن‌بلات و الایزا مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش

سویه ویروسی و همسانه مورد استفاده

سویه ویروس مورد استفاده در این تحقیق TYLCV-IR2 می باشد که توسط *عزیزی* و همکاران (Azizi *et al.*, 2008) از بندرعباس جمع‌آوری و پس از تعیین توالی، با شماره دسترسی EU085423 در پایگاه NCBI ثبت شد عزیزی و همکاران (Azizi *et al.*, 2011). ژن کدکننده پروتئین حرکتی ویروس در حامل بیانی pET-26(b)+ همسانه سازی و به نام pTYLCV-MP نامگذاری، سپس بیان پروتئین آن در باکتری *E. coli* سویه BL21 بهینه‌سازی شد *سلیمی* و همکاران (Salimi *et al.*, 2012). در پژوهش حاضر از سازه pTYLCV-MP برای بیان و استخراج پروتئین و تولید آنتی‌بادی استفاده شد.

بیان و استخراج پروتئین

مقداری از منبع باکتری BL21 حاوی سازه pTYLCV-MP بیان‌کننده پروتئین هدف، بر روی محیط‌کشت LB جامد حاوی کانامایسین به غلظت نهایی ۵۰µg/ml کشت داده شد. یک کلنی از باکتری در محیط‌کشت مایع LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت یاد شده کشت داده شد و از کشت یک شبه آن با نسبت پنج درصد به‌عنوان مایه تلقیح برای کشت یک لیتر محیط‌کشت جدید حاوی آنتی‌بیوتیک استفاده شد. القای بیان با استفاده از IsoPropyl-β-D ThioGalactopyranoside (IPTG) در غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار به‌مدت پنج ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد. استخراج پروتئین با استفاده از ژل اکریل‌آمید انجام شد. به این

www.SID.ir

Archive of SID

منظور پس از الکتروفورز پروتئین تام (Total protein) باکتری در SDS-PAGE ۱۳ درصد ناپیوسته، باند موردنظر از ژل جداسازی و پس از قرار دادن در کیسه دیالیز حاوی بافر تانک الکتروفورز، به‌منظور خروج پروتئین از ژل به داخل کیسه دیالیز به‌مدت پنج ساعت در میدان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ قرار گرفت. پس از خارج ساختن قطعات ژل، برای خارج کردن ناخالصی-های ناشی از بافر، به‌مدت ۲۴ ساعت علیه آب مقطر دیالیز انجام گرفت. در نهایت به‌منظور تغلیظ و سهولت در نگهداری، پروتئین خالص شده فریزدرای شد و نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سلسیوس قرار گرفتند.

ایمنی‌زایی و تهیه آنتی‌سرم

یک هفته قبل از شروع تزریقات، دو عدد خرگوش سفید نیوزلندی دوماهه به وزن تقریبی دو کیلوگرم از انستیتو پاستور ایران تهیه و در شرایط استریل نگهداری شد. چهار تزریق زیر جلدی، هر بار ۲۰۰ میکروگرم از پروتئین خالص شامل تزریق اول به‌همراه حجم مساوی از ماده همراه کامل فروند (Complete Freund's Adjuvant) و تزریق‌های بعدی به همراه حجم مساوی ماده همراه ناکامل فروند (Incomplete Freund's Adjuvant) و با فواصل ۱۲ روز انجام شد.

دو هفته پس از آخرین تزریق، خونگیری از حیوانات انجام و خون به آزمایشگاه منتقل گردید. خون به‌دست آمده به‌منظور جداسازی سرم، ابتدا به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و سپس ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سلسیوس قرار داده شد. سرم شفاف به آرامی جداسازی و برای حذف لاشه‌های سلولی و دیگر ذرات درشت، به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید، و پس از اضافه کردن ۰/۰۲٪ سدیم آزاید تا زمان استفاده در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد.

بررسی اختصاصیت آنتی‌سرم در ردیابی پروتئین هدف در باکتری و گیاه

عیارسنجی آنتی‌سرم برای ردیابی پروتئین هدف در باکتری با استفاده از آزمون وسترن بلات با رقت‌های مختلف آنتی‌سرم (۱ به ۵۰۰، ۱ به ۱۰۰۰، ۱ به۵۰۰۰، ۱ به ۱۰۰۰۰، ۱ به ۲۰۰۰۰، ۱ به ۳۰۰۰۰ و ۱ به ۴۰۰۰۰) انجام شد. برای انجام آزمون وسترن بلات نمونه‌ها در سیستم SDS-PAGE ۱۲درصد تفکیک و سپس پروتئین با استفاده از دستگاه انتقال Mini Trans-Blot® Electrophoretic transfer cell (Bio-Rad, USA) بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده با ولتاژ ۱۰۰ و به‌مدت یک ساعت به غشاء نیتروسولزی منتقل شد. از Goat anti-rabbit IgG متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز شرکت پرومگا (امریکا) با رقت ۱ به ۲۵۰۰ به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شد (*شمس‌بخش* و *سایمون*، 2004).

استخراج پروتئین از گیاه با استفاده از فنول و روش *ساراوانا* و همکاران (Saravana, *et al*., 2004) انجام و پس از تغلیظ با اتانول، به‌منظور بررسی کارآیی آنتی‌سرم در ردیابی پروتئین ویروسی هدف در گیاهان آلوده، از غلظت ۱ به۱۵۰۰ آنتی‌سرم در آزمون وسترن‌بلات استفاده شد. در نهایت بررسی کارآیی آنتی‌سرم در تفکیک گیاهان آلوده از گیاهان سالم با استفاده از آزمون الایزا غیرمستقیم و در سه حالت مختلف به شرح ذیل انجام گرفت:

۱- مقدار ۸۰µl از هر نمونه خرد شده در بافر استخراج [بافر PBS (حاوی ۱۳۷ میلی‌مولار NaCl، ۲/۷ میلی‌مولار KCl، ۸/۱ میلی‌مولار Na_2HPO_4، ۱/۵ میلی‌مولار KH_2PO_4 و PH=۷/۵) به‌همراه توئین۲۰ (Tween 20) به غلظت نهایی ۰/۰۵٪ و PVP به غلظت نهایی ۲٪] با ۲۰ µl بافر پوششی (بافر PBS به همراه توئین۲۰ به غلظت نهایی ۰/۰۵٪ و شیر بدون چربی به غلظت نهایی ۳٪) مخلوط و به داخل چاهک بارگذاری شد.

۲- مقدار ۴۰۰ µl از هر نمونه با ۲۰۰ µl اوره ۱۰ مولار مخلوط و ۸۰µl از آن به‌همراه ۲۰ µl بافر پوششی به داخل چاهک بارگذاری شد.

۳- نمونه‌ها مستقیماً در بافر پوششی خرد شده و به داخل چاهک بارگذاری شدند.

آزمون الایزای غیرمستقیم به روش *کلارک و آدامز* (Clark and Adams, 1977) و با استفاده از آنتی‌بادی نشان‌دار شده با آلکالین فسفاتاز شرکت پرومگا (امریکا) با رقت‌های ۱ به ۱۰۰۰، ۱ به ۳۰۰۰ و ۱ به ۷۰۰۰ آنتی‌سرم و ۱ به ۷۰۰۰ آنتی‌بادی انجام شد.

نتایج و بحث

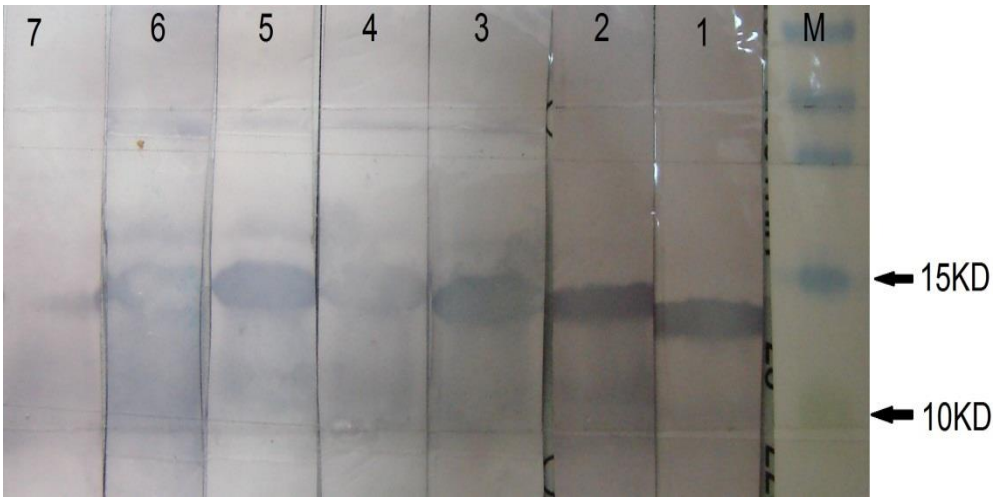
در پژوهش حاضر برای اولین‌بار در کشور آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه پروتئین حرکتی ویروس مهم و خسارت‌زای پیچیدگی زرد برگ گوجه‌فرنگی با تزریق پروتئین نوترکیب تولید شده در سلول باکتریایی به خرگوش تولید شد.

ابتدا به‌منظور بررسی کارآیی آنتی‌سرم نوترکیب تولید شده در تشخیص پروتئین هدف در باکتری و گیاه از آزمون وسترن بلات استفاده شد. در رقت‌های بالاتر از یک به بیست هزار آنتی-سرم، تعدادی باند غیراختصاصی در غشاء مشاهده شد که می‌تواند به‌علت وجود قطعات شکسته شده پروتئین‌های دیگر در باند پروتئین هدف و یا وجود اپی‌توپ‌های مشترک در پروتئین‌های باکتریایی هم اندازه با پروتئین مورد نظر باشد که به همراه پروتئین نوترکیب استخراج شده‌اند. در رقت‌های

www.SID.ir

Archive of SID

پایین‌تر از یک به بیست هزار هیچ باند غیراختصاصی مشاهده نشد (شکل ۱). در بررسی کارآیی آنتی‌سرم تولید شده در ردیابی پروتئین ویروسی هدف در گیاهان آلوده، در رقت یک به ۱۵۰۰ آنتی‌سرم، باند ۱۳ کیلودالتونی مربوط به پروتئین هدف مشاهده شد (شکل ۲). عدم ظهور باند هدف در نمونه گیاهان سالم نشان‌دهنده قابلیت آنتی‌سرم تولید شده در ردیابی ویروس در گیاهان آلوده با استفاده از آزمون وسترن‌بلات می‌باشد.



شکل ۱: بررسی کارآیی آنتی‌سرم تولید شده علیه پروتئین نوترکیب حرکتی ویروس پیچیدگی زرد برگ گوجه فرنگی در وسترن بلات و تیتراسیون آن در باکتری. راهک M نشانگر مولکولی. راهک ۱ تا ۷ به‌ترتیب: رقت‌های ۱:۵۰۰، ۱:۱۰۰۰، ۱:۵۰۰۰، ۱:۱۰۰۰۰، ۱:۲۰۰۰۰، ۱:۳۰۰۰۰، و باکتری بدون پلازمید به‌عنوان کنترل منفی

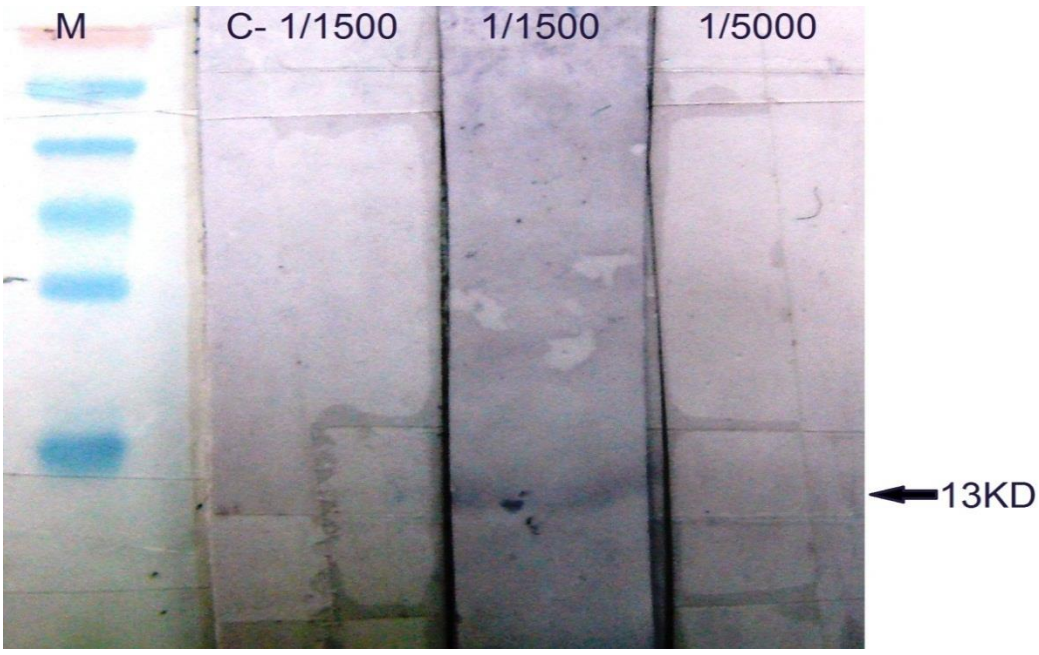
Fig. 1: Assessment efficacy of antiserum against Tomato yellow leaf curl virus- movement protein in western blot analysis. Line M; molecular weight. Lines 1-7 dilutions of 1: 500, 1: 1000, 1: 5000, 1: 10000, 1: 20000, 1: 30000, and negative control respectively

ضعیف بودن باند می‌تواند ناشی از غلظت پایین ویروس و در نتیجه پروتئین هدف در گیاه و یا غلظت پایین پروتئین کل استخراج شده از گیاه باشد به‌طوری‌که این باند در SDS-PAGE رنگ‌آمیزی شده با کوماسی‌بلو مشاهده نشد. نتایج الایزا در همه رقت‌های آنتی‌سرم مشابه بود هرچند در رقت یک به ۱۰۰۰ آنتی‌سرم، نتایج سریع‌تر به‌دست آمدند. استفاده از بافر پوششی به‌جای بافر استخراج که به نظر می‌رسد به‌علت پی اچ قلیایی (pH= ۹/۶) موجب بازشدن ساختار پروتئین و خطی‌شدن آن می‌شود *سرواسکا* و همکاران (Cerovska *et al.*, 2006) و نیز استفاده از اوره برای خطی‌کردن ساختار پروتئین و در نتیجه در دسترس قرارگرفتن اپی‌توپ‌های خطی آن، اختلاف جذب نوری بین گیاهان آلوده و شاهد سالم در آزمون الایزا مشاهده شد، این نتایج تائیدکننده صحت آزمون وسترن‌بلات باشد، اما با توجه به کمتر بودن حساسیت الایزا نسبت به وسترن‌بلات و پایین بودن بیش ازحد اختلافات جذب گیاهان سالم و آلوده، و از طرف دیگر معیار اختلاف جذب چند برابر در الایزا، نمی‌توان از این نتایج به‌عنوان نتایجی قابل‌قبول استفاده کرد.

استفاده از ژل اکریل‌آمید برای استخراج پروتئین منجر به استخراج پروتئین به‌صورت ناخالص و واسرشته می‌شود. شباهت برخی اپی‌توپ‌های خطی و نیز تشکیل اپی‌توپ‌های بیگانه به علت تاخوردگی‌های اتفاقی، امری اجتناب‌ناپذیر بوده *شولز و شیمر* (Schulz and Shirmer, 1979) و می‌تواند دلیلی بر واکنش آنتی‌بادی حاضر با پروتئین‌های گیاهان سالم باشد. این واقعیت به همراه غلظت پایین ویروس در گیاه می‌تواند موجب پس‌زمینه مثبت بالا شده و میزان اختلاف جذب را کم و غیرقابل‌قبول نشان دهد. از طرف دیگر در بسیاری از این دست گزارش‌ها *نیکل* و همکاران؛ *فلوارکزنا* و همکاران (Nickel *et al.*, 2004; Folwarczna *et al.*, 2008)، کارآیی قابل قبول آنتی‌بادی در ردیابی ویروس، پس از خالص‌سازی آنتی‌بادی از سرم حاصل مورد بررسی قرار گرفتـه است. با توجه به این یافته‌ها و نتایج تحقیق حاضر لازم است نسبت به خالص‌سازی آنتی‌بادی از آنتی‌سرم، اقدام شود و توانایی آن در ردیابی ویروس مجدداً مورد بررسی قرار گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: وسترن‌بلات برای ردیابی پروتئین حرکتی ویروس در گیاه. راهک M نشانگر مولکولی. راهک‌های بعد به‌ترتیب؛ رقت ۱:۱۵۰۰ آنتی‌سرم در گیاه سالم (کنترل منفی) و آلوده، رقت ۱:۵۰۰۰ در گیاه آلوده

Fig. 2: Western blot analysis for detecting of movement protein in plant. Line M: molecular weight marker. Other lines 1: 1500 dilutions of antiserum in infected and healthy plants and 1: 5000 in infected plant respectively

تاکنون برای چندین ویروس مختلف گیاهی آنتی‌بادی علیه پروتئین پوششی یا پروتئین‌های غیرساختاری مانند پلیمرازهای ویروسی یا پروتئین‌های حرکتی تولید شده و کارآیی آنها در روش‌های مختلف سرولوژیکی مانند وسترن‌بلات یا الایزا مورد ارزیابی قرار گرفته است. مقایسه آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه پروتئین ساختاری (پوششی) و غیرساختاری (حرکتی) ویروس برگ قاشقی سیب‌زمینی نشان داد که هر دو آنتی‌بادی قادر به شناسایی ویروس هم در آزمون الایزا و هم وسترن‌بلات می‌باشند. هرچند میزان جذب نوری هنگام استفاده از آنتی‌بادی تولید شده علیه پروتئین حرکتی نسبتاً ضعیف گزارش شده است (*پلکوا* و همکاران، 2011). آنتی بادی ساخته شده علیه پروتئین پوششی ویروس ام سیب‌زمینی، در هردو آزمون وسترن‌بلات و الایزا قادر به تشخیص ویروس می‌باشد ولی آنتی‌بادی ساخته شده علیه پروتئین حرکتی فقط در آزمون وسترن‌بلات گیاهان آلوده را از گیاه سالم تشخیص داده است *سرواسکا* و همکاران (Cerovska *et al.*, 2012). از طرفی در تحقیق دیگری آنتی‌بادی تولید شده علیه پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب پس از خالص‌سازی آنتی‌بادی گیاهان آلوده و سالم را به‌خوبی در آزمون الایزا تفکیک کرد. در این تحقیق همچنین در برخی نمونه‌ها ویروس به‌خوبی ردیابی نشد که علت آن پایین بودن غلظت ویروس در گیاه عنوان شده است (*نیکل* و همکاران، 2004). در تحقیق حاضر، آنتی‌سرم تولید شده توانست در غلظت یک به ۱۵۰۰، پروتئین ویروس در گیاه آلوده را در آزمون وسترن‌بلات تشخیص دهد. در آزمون الایزا نیز در غلظت ۱ به ۱۰۰۰ در حالت استفاده از مواد واسرشته‌کننده برای خطی‌کردن پروتئین‌ها، مقادیر جذب نوری بیشتری در نمونه‌های کلیه گیاهان آلوده مشاهده شد که امید می‌رود با خالص‌سازی آنتی‌بادی حساسیت و اختصاصیت آزمون الایزا را تا حد قابل‌توجهی بالا برده و بتوان اختلاف جذب نوری بیشتر و معنی‌داری به‌دست آورد و از آن در ردیابی ویروس در مزارع کشور استفاده کرد.

سپاسگزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری به سبب حمایت مالی از این پژوهش در قالب طرح شماره ۸۹۰۰۱۶۹۳ قدردانی و تشکر می‌شود.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۹-۱۰ متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir