



Designing and evaluation of ELISA kit based on preparing antibodies against *Apple stem grooving virus* coat protein gene expressed in *Escherichia coli*

Mahsa Mohammadlou 

Master Graduated in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail address: mahsamd8@gmail.com

Davoud Koolivand 

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. Tel: 02433052465, E-mail address: Koolivand@znu.ac.ir

Mohammad Hajizadeh 

Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. E-mail address: m.hajizadeh@uok.ac.ir

Omid Eini 

Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail address: omid.eini@znu.ac.ir

Abstract

Objective

The production of antibodies against the coat protein of *Apple stem grooving virus* (ASGV) and their application in diagnostic assays and biosensor design represents a crucial strategy for effective plant virus detection. ASGV is a significant pathogen affecting pome fruit trees and apples. The objective of this study was to express the coat protein gene of ASGV in *E. coli*, generate antibodies against the expressed protein, and assess their effectiveness in diagnostic assays.

Materials and methods

In the PCR, we successfully amplified a 714 bp fragment corresponding to the complete coding region of the ASGV coat protein gene. The amplified fragment was then cloned into the pTG19 vector. Subsequently, the desired fragment was subcloned into the pET28a (+) expression vector using *Bam*HI and *Eco*RI restriction enzymes. The resulting construct was then introduced into *E. coli* BL21(DE3) cells for gene expression. To determine the optimal conditions for protein expression, the transformed cells were induced with one mM IPTG for various durations (3, 4, 6, and 16 hours). The expression of the protein was confirmed through SDS-PAGE electrophoresis and western blot analysis. Following the purification of the expressed protein, it was utilized as an antigen for immunizing rabbits. Immunoglobulins (IgGs) were subsequently purified from the

rabbit serum, and some of them were employed for conjugate production. The efficacy of the conjugates was evaluated in serological assays.

Results

Sequencing analysis of the amplified fragments conclusively verified their correspondence to the ASGV coat protein gene. Moreover, PCR and enzymatic digestion of the resulting clone provided further evidence of the successful construction of pET28-ASGV-CP. Comprehensive sequence analysis of the constructed plasmid in both directions confirmed the accurate insertion of the coat protein gene into the expression vector, while also confirming the absence of any nucleotide mutations. Following optimization, the expression of the ASGV coat protein was successfully achieved, resulting in an approximate size of 27 kDa. This confirmation was attained through SDS-PAGE electrophoresis and subsequent western blotting, conducted four hours after induction. The direct, indirect, and dot-blot assays were performed to assess the efficiency of the conjugate. The results indicated that the optimal concentration of the conjugate was approximately 1:1000.

Conclusions

The generated and conjugated antibodies exhibit suitable titers relative to the antigen concentration and demonstrate specificity and effectiveness in the detection and identification of Apple stem grooving virus (ASGV). These antibodies can be utilized for various serological diagnostic kits, including ELISA, offering valuable applications in virus detection and identification.

Keywords: Antibody, Gene Expression, *Capillovirus*, Western Blot, *Apple stem grooving virus*.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mohammadlou M, Koolivand D, Hajizadeh M, Eini O (2023) Designing and evaluation of ELISA kit based on preparing antibodies against Apple stem grooving virus coat protein gene expressed in *Escherichia coli*. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (3), 1-24.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (3), 1-24.

DOI: 10.22103/jab.2023.21211.1468

Received: April 14, 2023.

Received in revised form: June 05, 2023.

Accepted: June 06, 2023.

Published online: September 30, 2023.



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

© the authors


طراحی و بررسی کارایی کیت الایزا مبتنی بر آنتی بادی تولید شده علیه پروتئین پوششی ویروس ساقه

شیاری سیب در *Escherichia coli*

مهسا محمدلو 


دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران رایانامه:

mahsamd8@gmail.com


داود کولیوند 

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. تلفن: ۰۲۴۳۳۰۵۲۴۶۵ رایانامه:

Koolivand@znu.ac.ir

محمد حاجی زاده 

دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: m.hajizadeh@uok.ac.ir

امید عینی 

دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران، رایانامه: omid.eini@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۶

چکیده

هدف: تولید آنتی بادی و کاربرد آن در آزمون های متنوع و طراحی بیو سنسورها یکی از راهبردهای مهم در تشخیص ویروس های گیاهی است. ویروس ساقه شیاری سیب (*Apple stem grooving virus (ASGV)*) یکی از ویروس های مهم درختان دانه دار و سیب می باشد. هدف از این تحقیق، بیان ژن پروتئین پوششی این ویروس در *E. coli* و تولید آنتی بادی علیه پروتئین بیان شده و ارزیابی آن در آزمون های تشخیصی است.

مواد و روش ها: در واکنش زنجیره ای پلی مرز، قطعه ای به طول ۷۱۴ جفت باز مربوط به ژن کامل پروتئین پوششی ASGV تکثیر و در پلاسمید pTG19 همسانه سازی شد. سپس، قطعه مورد نظر با آنزیم های برشی *BamHI* و *EcoRI* خارج و در حامل بیانی pET28a همسانه سازی شد و سازه مورد نظر به منظور بیان ژن هدف، به باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) منتقل شد. بهینه سازی بیان در غلظت یک میلی مولار IPTG و زمان های سه، چهار، شش و ۱۶ ساعت پس از القا صورت گرفت و تایید بیان پس از الکتروفورز عمودی و آزمون وسترن بلات انجام شد. پروتئین بیان شده تخلیص و به عنوان آنتی ژن به خرگوش تزریق

شد. پس از ایمن سازی سرم، ایمنوگلوبولین‌ها از سرم خون تخلیص و بخشی از آنها برای تولید کاندیگیت استفاده شدند. در نهایت، کارایی آنها در آزمون‌های سرولوژیکی ارزیابی شد.

نتایج: نتایج تعیین توالی یابی نشان داد قطعات تکثیر یافته در پی‌سی‌آر مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب است. نتایج پی‌سی‌آر کلونی و هضم آنزیمی تایید کننده ساخت سازه pET28-ASGV-CP بود. تعیین توالی سازه ساخته شده در دو جهت حاکی از قرار گرفتن ژن پروتئین پوششی در قاب صحیح درون پلاسمید بیان و فقدان جهش نوکلئوتیدی بود. پس از بهینه‌سازی، بیان و استخراج پروتئین پوششی، نوار پروتئینی با اندازه تقریبی ۲۷ کیلودالتون چهار ساعت بعد از القاء در الکتروفورز عمودی و وسترن بلات تایید شد. در الایزی مستقیم، غیر مستقیم و آزمون دیبا، نتایج نشان داد غلظت حدود ۱:۱۰۰۰ آنتی‌بادی تخلیص شده در غلظت مناسب آنتی ژن توانایی واکنش مناسب با آنتی ژن را دارد.

نتیجه‌گیری: آنتی‌بادی تولید شده و کانژوگه شده در رقت مناسب در تناسب با غلظت آنتی ژن توانایی اختصاصیت و کارایی لازم برای ردیابی و شناسایی ویروس ساقه شیاری سیب را بخوبی دارد. یکی از کاربردهای این آنتی‌بادی در طراحی انواع کیت‌های تشخیصی سرولوژیکی مانند الایزا است.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌بادی، بیان ژن، کاپیلوویروس، وسترن بلات، ویروس ساقه شیاری سیب.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: محمدملو مهسا، کولیوند داود، حاجی زاده محمد، عینی امید (۱۴۰۲) طراحی و بررسی کارایی کیت الایزا مبتنی بر آنتی‌بادی تولید شده علیه پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب در *Escherichia coli*. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۳)، ۲۴-۱.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant

Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

تشخیص به موقع و دقیق بیماری‌های ویروسی از شروط مهم در سیستم مدیریت خسارت این بیمارگرها محسوب می‌شود (Martinelli et al. 2015). روش‌های سرولوژیک یکی از روش‌های قدیمی و پرکاربرد برای غربالگری اولیه در بسیاری از بیماری‌های ویروسی است، که امروزه نیز از آن استفاده وسیعی می‌شود. روش‌های سرولوژیکی و همچنین تکنیک‌های جدید که مبتنی بر آنتی‌بادی هستند برای غربالگری تعدادی زیادی نمونه در مبادی ورودی کشورها، استان‌ها و باغ‌ها و پست‌های قرنطینه استفاده می‌شوند. معمولی‌ترین روش تولید آنتی‌بادی‌ها به عنوان معرف اصلی در الایزا و روش‌های سرولوژیکی، خالص سازی از سرم خونی است که در برابر آنتی‌ژن ایمن شده است. شرط اینچنین روش‌هایی به دست آوردن ویروس خالص است، اما خالص سازی

ویروس از گیاه ممکن است یک فرآیند زمان گیر باشد و گاهی اوقات ممکن است نتایج نامطلوبی در خصوصیات و غلظت داشته و ویژگی متفاوتی از آنتی‌سرم ارائه دهد، زیرا ممکن است خلوص ویروس خالص شده متغیر و همراه با پروتئین‌های گیاهی باشد (Fajardo et al. 2007). علاوه بر این تجهیزاتمانند اولتراسانتریفیوژ سرعت بالا ممکن است در برخی آزمایشگاه‌ها به ویژه در کشورهای در حال توسعه در دسترس نباشد.

پیشرفت در تکنولوژی دی‌ان‌ای نو ترکیب، آماده سازی آنتی‌بادی در برابر ژن‌های ویروسی مانند پروتئین پوششی را تسهیل کرده است. بیان ژن‌های خارجی در سیستم *E. coli* نسبتاً ساده، سریع و ارزان برای تولید مقادیر زیادی پروتئین با کیفیت بالاتر حداقل اصلاحات پس از ترجمه است. به طور کلی پروتئین‌های نو ترکیب به عنوان آنتی‌ژن‌های اختصاصی برای ایمن سازی در حیوانات برای بدست آوردن آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروسی با کیفیت مورد استفاده قرار می‌گیرند (Nickel et al. 2004). این آنتی‌بادی‌ها به طور گسترده در روش‌های سرولوژیکی برای تشخیص ویروس‌ها، در مطالعات مختلف و در تکنیک‌های بسیار حساس مانند وسترن بلات کاربرد دارند.

ویروس ساقه شیاری سیب متعلق به خانواده Betaflexiviridae و جنس *Capillovirus* است (Cieslinska, 2000). طول رشته‌ها در این ویروس ۴۷۰ تا ۱۰۰۰ و عرض آنها ۱۲-۱۳ نانومتر است. ژنوم ویروس آر‌ان‌ای تک رشته‌ای^۱ با قطبیت مثبت است. در این ویروس سه قاب خواندنی^۲ که از ۵' به ۳' وجود دارد. قاب خواندنی شماره یک (ORF1) یک پروتئین چند بخشی را رمز می‌کند، این پروتئین حاوی موتیف‌های متیل ترانسفراز، هلیکاز و موتیف‌های RNA dependent RNA polymerase است. قاب خواندنی دوم (ORF2) که بخش زیادی از آن بصورت همپوشان با قاب خواندنی اول است، پروتئین حرکتی را رمز می‌کند. قاب خواندنی سوم (ORF3) در ادامه انتهای کربوکسیلی قاب خواندنی اول قرار گرفته است که پروتئین پوششی ویروس را تولید می‌کند. هر دو قاب خواندنی دوم و سوم از طریق استراتژی آر‌ان‌ای زیرژنومی بیان می‌شوند. این ویروس دارای ناقل ناشناخته است و انتقال و انتشار در این خانواده ویروسی عمدتاً از طریق پیوند و نشاهای آلوده صورت می‌گیرد (Adams et al. 2004; Chen et al. 2011). به دلیل گستردگی و تاثیر مهمی که ویروس ساقه شیاری سیب روی محصول مهم و اقتصادی سیب می‌گذارد و سبب کاهش کیفیت و کمیت آن می‌شود، ردیابی و کنترل ویروس مذکور مهم و ضروری است (Cieślinska et al. 2007). از جمله ویروس‌هایی که اخیراً برای آن‌ها با استفاده از بیان در سیستم‌های حد واسط آنتی‌بادی تولید شده است می‌توان به ویروس چروکیدگی سیب زمینی شیرین^۳ (Thangaraj and Jayakrishnan, 2021) و ویروس کوتوله زرد پیاز^۴ (Kumar et al. 2021)، ویروس تریستزا مرکبات^۵ (Kokane et al. 2020) در دنیا اشاره کرد. در مطالعاتی که در ایران انجام گرفته است می‌توان به تولید

1. Single Strand RNA (ssRNA)
2. Open Reading Frame (ORF)
 1. Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV)
 2. Onion yellow dwarf virus (OYDV)
 3. Citrus tristeza virus (CTV)

آنتی‌بادی برای ویروس اس سیب زمینی^۱ (Masoudi et al. 2018)، ویروس کوتولگی زرد لوبیا چشم بلبلی^۲ (Safarnejad et al. 2019) و ویروس برگ بادبزنی مو^۳ (Koolivand et al. 2014; Bashir et al. 2015; Koolivand et al. 2016) و ویروس موزاییک خیار^۴ (Koolivand et al. 2017) اشاره نمود. با توجه به اهمیت باغات درختان دانه‌دار به ویژه سیب که یک محصول صادراتی است و خسارات بیماری‌های ویروسی شناسایی ویروس‌ها از اهمیت بسزایی برخوردار است. از طرفی با توجه به محدودیت‌هایی که در تهیه آنتی‌بادی به روش‌های سنتی وجود دارد و همچنین استفاده از یک جدایه بومی به منظور تولید آنتی‌بادی گام اول در این راستا شناسایی جدایه‌های بومی و ساخت سازه ژنومی مناسب در این راستا است. هدف از این تحقیق، تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب و ارزیابی کارایی آن است.

مواد و روش‌ها

برای تهیه منبع ویروسی از یک جدایه شناخته شده این ویروس که قبلاً از روی سیب جداسازی شده بود استفاده شد. بدین منظور، دی‌ان‌ای مکمل از آر‌ان‌ای استخراج شده جدایه مورد نظر توسط کیت سنتز cDNA (Synthesis Kit Easy™ cDNA) (پارس توس، ایران) در واکنشی با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر سنتز شد. به منظور تکثیر ژن کامل پروتئین پوششی از آغازگرهایی استفاده شد که محل اثر آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI به ترتیب در آغازگر مستقیم و معکوس داشتند (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده ویروس ساقه شیاری سیب در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon, Denmark)، ۰/۲۵ میکرولیتر از آغازگرهای مستقیم و معکوس اختصاصی با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، دو میکرولیتر دی‌ان‌ای مکمل الگو و ۳/۷۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. برنامه پی‌سی‌آر به صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C برای ۳ دقیقه، واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۶°C و بسط ۳۰ ثانیه در ۷۲°C برای ۳۵ سیکل و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام گردید.

همسانه سازی قطعات تکثیر شده درون پلاسمید pTG19: پس از خالص سازی محصول پی‌سی‌آر، محصول پی‌سی‌آر خالص شده درون پلاسمید pTG19 همسانه سازی شد. به این منظور از پلاسمید pTG19 (ویوانتیس، مالزی) و آنزیم *Escherichia* T4 DNA Ligase استفاده شد. سه میکرولیتر از محصول واکنش درون سلول‌های مستعد تهیه شده از باکتری *coli* استرین DH5α با استفاده از روش شوک حرارتی انتقال داده شد. برای کشت باکتری از محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ μg/ml) استفاده شد. پس از تایید قرار گرفتن قطعه درون پلاسمید با استفاده از کلونی پی‌سی‌آر توسط

4. *Potato virus S* (PVS)
5. *Chickpea chlorotic dwarf virus* (CpCDV)
6. *Grapevine fanleaf virus* (GFLV)
7. *Cucumber mosaic virus* (CMV)

آغازگرهای اختصاصی ویروس ساقه شیاری سیب، استخراج پلاسمید توسط کیت (GeneAll, South Korea) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده به منظور تعیین توالی همسانه‌های pTG19-ASGV-CP انجام شد. تعیین توالی همسانه جهت اطمینان از قرار گرفتن قطعه و جهت وارد شدن قطعه و حفظ قاب خواندنی، با استفاده از آغازگرهای عمومی پلاسمید pTG19 توسط شرکت پیشگام انجام شد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مستقیم و معکوس منطبق بر ژن پروتئین پوششی ASGV

Table 1. The sequence of forward and reverse primers based on ASGV CP gene

Primer	آغازگر	Primer Sequence	توالی نوکلئوتیدی آغازگرها	Amplicon size	اندازه قطعه
Forward		5' –TGGGATCCATGAGTTTGAAGACG –3'			
Reverse		5' –CGAATTCCAACCCTCCAGTTCCA –3'		714 bp	

تهیه سازه بیان ژن پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب: با توجه به طراحی جایگاه اثر آنزیم‌های *BamHI* و *EcoRI* در آغازگرهای معکوس و مستقیم ژن پروتئین پوششی، واکنش هضم آنزیمی سازه‌ی pTG19-ASGV-CP توسط آنزیم‌های مذکور برای آزاد سازی قطعه ژن پروتئین پوششی از پلاسمید pTG19 تهیه شد. همچنین به منظور قرار دادن ژن مورد نظر (ژن پروتئین پوششی) در پلاسمید بیانی pET28a(+) پلاسمید مذکور نیز با همان آنزیم‌های برشی (*EcoRI* و *BamHI*) برای ایجاد انتهای چسبنده برش داده شد. واکنش برش هضم در حجم نهایی ۴۰ میکرولیتر برای پلاسمید pTG19-ASGV-CP و pET28a(+) صورت گرفت. آنگاه برای بررسی نتایج برش با آنزیم‌ها، محصول این واکنش در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. قطعات مورد نظر و برش یافته با آنزیم‌های مذکور، با استفاده از کیت استخراج دی‌ان‌ای از ژل (GeneAll, South Korea) طبق دستورالعمل کیت استخراج و خالص‌سازی شد. پس از استخراج قطعه مورد نظر و پلاسمید بیانی pET28a از ژل آگارز، همسانه‌سازی قطعات مورد نظر در پلاسمید بیانی با استفاده از آنزیم *T4 DNA Ligase* انجام شد. مخلوط واکنش اتصال، به روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد تکثیر *E. coli* سویه DH5 α منتقل شد. به منظور تشخیص پرگنه‌های باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب و جهت بررسی نتیجه تراریزش و وارد شدن صحیح قطعه در حامل، از آزمون کلونی - پی‌سی‌آر استفاده شد. همچنین برای غربال پرگنه‌های مثبت حاوی پلاسمید بیان و ژن پروتئین پوششی پس از استخراج پلاسمید از پرگنه‌ها برش آنزیمی صورت گرفت و محصول برش در ژل آگارز الکتروفورز شد. بعد از غربال سازه تهیه شده با روش کلونی‌پی‌سی‌آر و برش آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده سازه تهیه شده به منظور بررسی حفظ قاب صحیح ژن و اطمینان از توالی قطعه مورد نظر از هر دو طرف تعیین توالی شد.

بیان ژن پروتئین پوششی ASGV در سیستم پروکاریوتی: پرگنه باکتریایی سویه BL21(DE3) حاوی

پلاسمید نو ترکیب pET28a-ASGV-CP، در محیط کشت پنج میلی لیتری مایع LB که یک محیط حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین بود، به مدت یک شب در انکوباتور لرزان ۳۷ درجه سلسیوس با دور ۲۰۰ (rpm)، کشت داده شد. روز بعد، یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت تازه، حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین تجدید کشت شد. سپس به منظور رسیدن به جذب نوری (OD₆₀₀ nm) مناسب روی انکوباتور لرزان قرار گرفت و زمانیکه جذب نوری سلول‌های این محیط به ۰/۵-۰/۶ رسید، یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی به عنوان نمونه‌ی زمان به اصطلاح صفر (قبل القاء) برداشته شد. سپس عمل القا با افزودن IPTG در غلظت نهایی یک مولار در ارلن‌های حاوی محیط باکتریایی صورت گرفت. طی زمان‌های سه، چهار، شش و ۱۶ ساعت پس از القا نمونه برداری صورت گرفت.

مراحل انجام لکه گذاری وسترن بلات: برای انجام لکه گذاری وسترن، پس از اتمام الکتروفورز عمودی و قبل از رنگ

آمیزی، غشاء نیتروسولوزی، ژل الکتروفورز شده و کاغذهای صافی برای انتقال باندهای پروتئینی به ترتیب روی همدیگر قرار گرفتند و این مجموعه به تانک وسترن بلات حاوی بافر انتقال منتقل شدند و انتقال باندها از ژل به غشاء نیتروسولوزی، در طول زمان حدود سه ساعت و با ولتاژ ۸۰ ولت انجام شد. بعد از سپری شدن مدت زمان مذکور کاغذ به دقت جدا شد و مرحله مسدود سازی انجام شد. برای ردیابی پروتئین بیان شده در آزمون لکه گذاری وسترن بلات از آنتی‌بادی اختصاصی اولیه Anti-His Tag (تهیه شده در خرگوش) با رقت ۱:۲۰۰۰ (رقیق شده در PBS) استفاده شد و غشاء نیتروسولوزی به مدت حدوداً دو ساعت در دمای اتاق روی انکوباتور لرزان قرار داده شد. پس از جمع آوری آنتی‌بادی اختصاصی، غشاء چهار با PBST شستشو داده شد. در مرحله بعد، غشاء در محلول کانجوگیت عمومی (Alkaline Phosphatase-Conjugated) (GAM (mouse anti rabbit که به نسبت ۱ به ۵۰۰۰ در PBS رقیق شده به مدت یک ساعت در دمای اتاق، روی شیکر لرزان قرار داده شد. پس از شستشو، ردیابی کانجوگیت نشان دار با آنزیم آلکالین فسفاتاز همراه با BCIP/NBT انجام شد. بدین صورت که، ۱۰۰ میکرولیتر از NBT و ۵۰ میکرولیتر BCIP به ۱۵ میلی لیتر بافر آلکالین فسفاتاز اضافه شده و این محلول روی غشاء نیتروسولوزی ریخته شد تا تغییر رنگ حاصل شود.

استخراج پروتئین از باکتری: رسوب باکتریایی در ۱۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج پروتئین^۱ به حالت سوسپانسیون

درآورده شد. این نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در آب جوش و ۱۵ دقیقه در فریزر -۷۰ قرار داده شدند. سپس ۲۰-۴۰ میکرولیتر از آن در الکتروفورز عمودی بررسی شد. غلظت ۱۲ درصد برای ژل تحتانی به عنوان ژل جدا کننده و غلظت پنج درصد برای ژل فوقانی به عنوان ژل متراکم کننده استفاده شد. به منظور رنگ‌آمیزی ژل از کوماسی بلو استفاده شد. وزن مولکولی پروتئین بیان شده با نشانگر Unstained protein marker (فرمانتاس) تعیین شد. به منظور تعیین محلول و یا نامحلول بودن پروتئین بیان شده در سیستم

1. NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, Tris-HCl 20mM, Imidazole 10mM

باکتریایی BL21(DE3) سویه *E. coli*، یک و نیم میلی‌لیتر از محیط کشت القا شده با IPTG، چهار ساعت پس از القا برداشته شد و در دور ۱۳۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس فاز رویی دور ریخته شد و به رسوب تشکیل شده در سویه مذکور، ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده^۱ اضافه و مخلوط شد، بدین منظور پس از افزودن بافر لیز کننده به رسوب سلولی، سلول‌ها به ترتیب در نیتروژن مایع فریز و در حمام سلولی ۴۲ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس سوسپانسیون حاصله در دور ۱۳۰۰۰ (rpm) به مدت ده دقیقه در دمای چهاردرجه سلسیوس سانتریفوژ شدند، سپس محلول رویی به تیوب جدید منتقل شد و به میزان برابر فاز رویی، بافر نمونه^۲ به آن اضافه شد. به فاز زیری که نیز حاوی محتوای پروئینی باکتری بود ۵۰۰ میکرولیتر بافر نمونه اضافه شد. این نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در آب جوش جوشانیده شدند، سپس ۲۰-۴۰ میکرولیتر از آن در ژل پلی آکرلامید حاوی سدیم دو دسیل سولفات الکتروفورز شدند.

خالص‌سازی پروتئین بیان شده: جهت لیز سلول‌های باکتریایی، ابتدا سلول‌های باکتریایی، از ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط

کشت شبانه مربوط به پرگنه BL21(DE3) در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه برداشت شدند. سپس به این سلول‌ها هشت میلی‌لیتر بافر Native binding buffer اضافه شد. سپس هشت میلی‌گرم بافر لیزوژن جهت لیز سلول‌های باکتریایی و آزاد سازی مواد داخل سلولی اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در یخ انکوبه شدند. در صورت چسبناک بودن سلول‌های لیز شده، RNase (10 µg/ml) و DNase (5 µg/ml) به آنها اضافه شد و سپس نمونه‌ها روی یخ به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه انکوبه شدند. در ادامه نمونه‌ها با دور ۳۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه برای حذف ذرات سلولی تشکیل شده سانتریفوژ شدند. فاز رویی به لوله های جدید منتقل شد. محلول جمع آوری شده در ۲۰- درجه سلسیوس نگه داری شد. برای خالص سازی پروتئین از ستون‌های حاوی رزین- نیکل (Ni-NTA) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. در مرحله بعد تعیین غلظت محلول پروتئینی بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفت. پس از استخراج و خالص سازی پروتئین، الکتروفورز در ژل پلی آکرلیمید انجام شد.

ایمنی‌زایی خرگوش با استفاده از پروتئین خالص شده: جهت انجام تزریق از دو عدد خرگوش ماده نیوزیلندی با

وزن تقریبی دو کیلوگرم که از انستیتوپاستور ایران- تهران تهیه شده بود، استفاده شد. برای تزریق، غلظت ۴۰۰ میکروگرم از پروتئین تخلیص شده مورد استفاده قرار گرفت و از پروتئین خالص شده در تزریق اول به صورت زیرجلدی و تزریق‌های دوم، سوم، چهارم به صورت عضلانی با فواصل ده روزه انجام شد. در تزریق اول ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پروتئین نوترکیب تخلیص شده همراه با ادجوانت کامل (Sigma-Aldrich, USA) برابر حجم پروتئین نوترکیب تخلیص شده استفاده شد و در تزریق‌های بعدی از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئین نوترکیب همراه با هم حجم آن ادجوانت ناقص (Sigma-Aldrich, USA) استفاده شد. دو هفته پس از آخرین تزریق مقدار کمی خونگیری از گوش خرگوش انجام گرفت و پس از اطمینان از ایمن شدن حیوان، خونگیری کامل انجام شد. برای جدا سازی سرم، خون خرگوش ایمن شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد و پس از

2. Lysis buffer
3. Sample Buffer

آن یک شب در دمای یخچال قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان مورد نظر سانتیفرود در دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه انجام و سرم خون جدا شد و برای بررسی ایمنی زایی از سرم تهیه شده رقت‌های مختلف (۱:۵۱۲ تا ۱:۶۵۵۳۶) در بافر فسفات سالین (PBS) آماده شد و آزمون PTA-ELISA با رقت‌های مختلف انجام گرفت. پس از بررسی سرم‌های حاصل از خرگوش‌های ایمن شده، خالص سازی ایمنوگلوبولین G با استفاده از کیت Protein A IgG Purification مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Thermo scientific, U.S.A) انجام شد. جهت نشان‌دار کردن IgG های تخلیص شده با استفاده از آنزیم آلکالین فسفاتاز (EasyLink Alkaline phosphatase Conjugation Kit) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده عمل شد. پس از تهیه آنتی‌بادی اختصاصی نشان‌دار شده، به منظور بررسی کارایی کاندجوگیت‌های تهیه شده از سنجش الی‌ایزای مستقیم و غیر مستقیم استفاده شد.

بررسی کارایی آنتی‌بادی‌ها-الی‌ایزای غیر مستقیم Plate Trapped Antigen- ELISA: به منظور بررسی

کارایی ایمنوگلوبولین‌های تخلیص شده الی‌ایزای غیر مستقیم با استفاده از آنتی‌بادی تخلیص شده به نسبت‌های، ۱:۱۰۰۰، ۱:۲۰۰۰، ۱:۳۰۰۰ رقیق شده در بافر پوششی انجام شد. پس از اتمام مراحل اولیه، سپس ۱۰۰ μ l کاندجوگیت عمومی (AP-conjugated) (Sigma-AldrichUSA) به هر چاهک افزوده شد و تشتک الی‌ایزای در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت نگهداری شد. پس از جمع‌آوری کاندجوگیت چاهک‌ها با بافر شستشو، شستشو داده شدند و سوبسترای پی-نیتروفیل فسفات مورد استفاده قرار گرفت و پس از توقف واکنش یا اضافه کردن محلول توقف (NaOH) سه مولار میزان تغییر رنگ چاهک‌ها مورد سنجش قرار گرفت.

الی‌ایزای مستقیم Double Antibody Sandwich-ELISA: به منظور انجام الی‌ایزای مستقیم، ابتدا ۲۰۰

میکرولیتر از آنتی‌بادی رقیق شده تهیه شده در بافر پوششی به نسبت ۱:۱۰۰۰ و ۱:۲۰۰۰ در چاهک‌ها در سه تکرار ریخته شد. سپس، تشتک به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد و پس از جمع‌آوری آنتی‌بادی‌ها، شستشو انجام شد. سپس درون هر یک از چاهک‌ها آنتی‌ژن مورد نظر به میزان ۱۰۰ میکرولیتر ریخته شد و تشتک به مدت شبانه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از شستشو مانند مرحله قبل، ۱۰۰ μ l کاندجوگیت اختصاصی تهیه شده به نسبت ۱:۱۰۰۰ به هر چاهک افزوده شد و تشتک الی‌ایزای پس از پوشانیده شدن با پارافیلیم در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت سه ساعت نگهداری شد. پس از جمع‌آوری کاندجوگیت چاهک‌ها با بافر شستشو، شستشو داده شدند و سوبسترای پی-نیتروفیل فسفات مورد استفاده قرار گرفت و پس از توقف واکنش یا اضافه کردن محلول توقف (NaOH) سه مولار میزان تغییر رنگ چاهک‌ها مورد سنجش قرار گرفت.

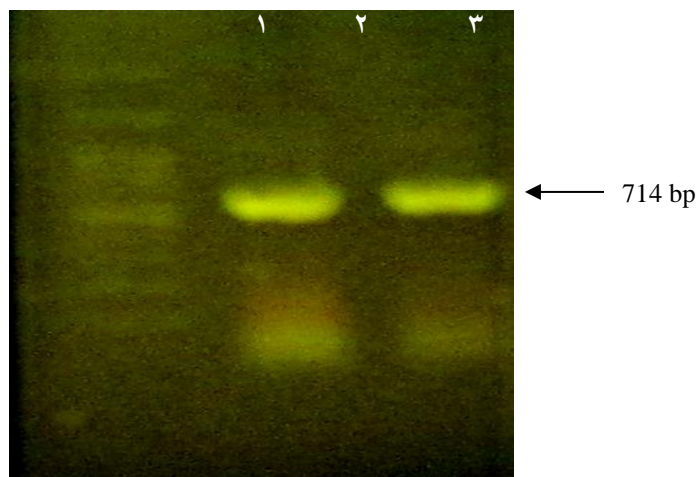
آزمون لکه گذاری نقطه‌ای (دیبا) Dot immunobinding assay (DIBA): در این آزمون، ابتدا غشاء نیترو

سلولزی به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در داخل آب مقطر دو بار استریل درون یک پتری یا یک ظرف در ابعاد کاغذ بریده شده قرار داده شد. پس از استخراج پروتئین از نمونه‌های باکتریایی و پروتئین خالص سازی شده و شاهد منفی از هر نمونه به اندازه یک قطره به ترتیب روی غشاء نیتروسولولزی ریخت شو و پس از خشک شدن، غشاء نیتروسولولزی به مدت دو ساعت در ۱۰ سی‌سی بافر مسدود

کننده ۲٪ درون یک پتری استریل قرار داده شد، سپس کاغذ نیتروسولوزی شستشو داده شد. به مقدار دو سی سی از ایمنوگلوبولین‌های رقیق شده (۱:۱۰۰۰) روی کاغذ ریخته شد، و به مدت دو ساعت در دمای اتاق روی انکوباتور لرزان قرار داده شد. بعد از دو ساعت، آنتی بادی جمع‌آوری شد و کاغذ نیتروسولوزی شستشو داده شد. بعد از شستشو، پس از اضافه نمودن دو سی سی کانجوگیت عمومی تهیه شده در بز علیه بخش ثابت پادتن‌های خرگوش رقیق شده به نسبت ۱:۱۰۰۰ به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از یک ساعت غشاء شستشو داده شد. پنج سی سی از بافر آلکالین فسفات به همراه ۳۳ میکرولیتر NBT و ۱۶/۵ میکرولیتر BCIP روی کاغذ ریخته شد و تغییر رنگ‌های ایجاد شده روی لکه‌های حاصل ثبت شد. بعد از حداکثر ۱۵ دقیقه غشاء نیتروسولوزی با آب استریل شستشو داده شد برای توقف واکنش و نگهداری کاغذ از محلول ۰/۵ مولار NaOH استفاده شد و غشاء با استفاده از آب مقطر شسته شد تا واکنش متوقف شود.

نتایج و بحث

منبع ویروسی: پس از ساخت cDNA و طراحی جفت آغازگرهایی که برای تکثیر قطعه مربوط به ژن کامل پروتئین پوششی استفاده شد، نتایج الکتروفورز آزمون پی‌سی‌آر حاکی از تکثیر قطعه مورد انتظار به طول ۷۱۴ جفت باز در نمونه مورد نظر بود (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر با جفت آغازگرهای ASGVF و ASGVR. چاهک ۱: مارکر ۱۰۰ bp، چاهک ۲ و ۳: محصول پی‌سی‌آر تکثیر یافته

Figure 1. Electrophoresis of PCR Products amplified by ASGVF/ASGVR primers .1: DNA Ladder 100 bp, 2 and 3: PCR Products

نتایج همسانه‌سازی محصول پی‌سی‌آر: پس از همسانه سازی محصول پی‌سی‌آر که یک قطعه دی‌ان‌ای با اندازه

حدود ۷۱۴ bp بود به پلاسمید همسانه‌سازی pTG19، پلاسمید نوترکیب به باکتری *E. coli* DH5α انتقال داده شد. پس از انتقال باکتری‌ها به محیط LB جامد، کلونی‌های سفید ظاهر شدند. نتایج بررسی کلونی‌های موجود در روی پتری با استفاده از پی‌سی‌آر کلونی نشان داد که یک قطعه دی‌ان‌ای با اندازه ۷۱۴ bp تکثیر شد (شکل ۲) که این امر نشان دهنده قرار گرفتن قطعه مورد نظر درون پلاسمید بود.



شکل ۲. کلونی پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب برای (M. pTG19-ASGV-CP) مارکر 100bp DNA Ladder، (۱ تا ۶) کلونی‌های مختلف بررسی شده

Figure 2. Colony PCR by specific primers of ASGV Coat Protein. M. DNA Ladder 100bp, 1-6: Different Colonies

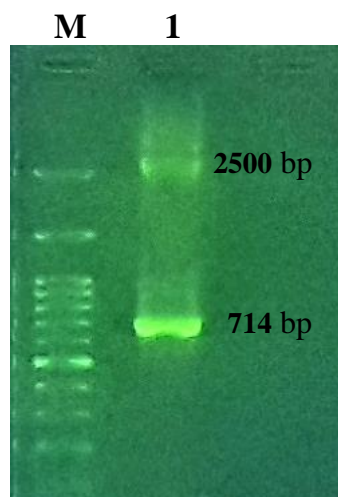
با توجه به اندازه‌ی حامل pTG19 (۲۵۰۰ bp) و قطعه دی‌ان‌ای (۷۱۴bp) در سازه pTG19-ASGV-CP، و همچنین محل اثر دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI که در دو انتهای دی‌ان‌ای خارجی قرار گرفته است، انتظار می‌رفت که پس از برش سازه pTG19-ASGV-CP با دو آنزیم مذکور، دو قطعه به اندازه‌های ۲۵۰۰bp (حامل) و ۷۱۴bp (پروتئین پوششی ASGV) مشاهده گردد. بنابراین، از پلاسمیدهای نوترکیب مطلوب، مطابق انتظار دو قطعه به اندازه‌های تقریبی ۲۵۰۰bp و ۷۱۴ bp مشاهده شدند (شکل ۳). علاوه بر این نتایج تعیین توالی قطعه مورد نظر حاکی از قرار گرفتن قطعه در جهت مناسب یکی از کلون‌ها درون پلاسمید با حفظ قاب مناسب بود.

بررسی ساخت حامل بیان: نتیجه برش پلاسمید نوترکیب pTG-ASGV-CP و پلاسمید بیان pET28a(+)

استفاده از آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI حاکی از خارج شدن قطعه از سازه pTG-ASGV-CP و خطی شدن پلاسمید pET28a(+) بود. نتایج الکتروفورز استخراج از ژل محصولات برش یافته حاکی از تخلیص قطعات برش یافته با آنزیم‌های مذکور از ژل آگارز بود. به دلیل وجود نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین در حامل بیان pET28a(+)

سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شده با پلاسمیدهای بیان نوترکیب بر روی محیط کشت انتخابی LB حاوی کانامایسین منتقل شدند که از نظر تئوری فقط سلول‌های پذیرنده‌ی پلاسمید نوترکیب روی این محیط کشت رشد یافتند. برای اطمینان از انتقال ژن پروتئین پوششی ASGV به حامل بیان،

کلونی پی‌سی‌آر روی کلونی‌های رشد کرده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب انجام شد و نتایج حاکی از تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۷۱۴ جفت‌باز مربوط به قطعه‌ی ژن پروتئین پوششی بود که در ژل الکتروفورز مشاهده شد (شکل ۴).

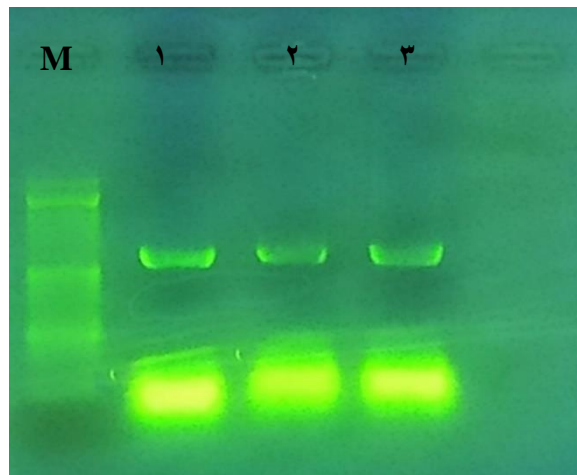


شکل ۳. الکتروفورز محصول واکنش برش pTG19-ASGV-CP با *Bam*HI و *Eco*RI (M مارکر 100 bp DNA Ladder، ۱ محصول واکنش برش pTG19-ASGV-CP)

Figure 3. Electrophoresis of double digestion products by *Bam*HI and *Eco*RI. M: DNA Ladder 100 bp, 1: Product of double digestion of pTG19-ASGV-CP

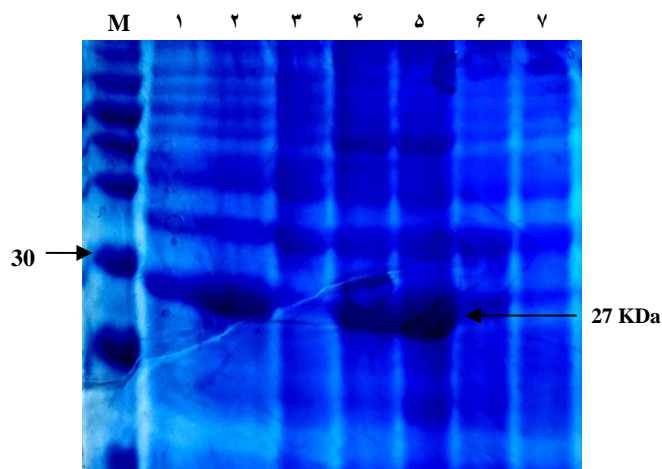
تعیین توالی قطعه قرار داده شده در پلاسمید بیان انجام گرفت. پس از بررسی توالی‌های مربوطه مشخص شد که ژن مورد نظر به درستی در قاب خواندنی پلاسمید قرار گرفته و قابل بیان بود این امر به منظور بررسی صحت قرار گرفتن ژن مورد نظر در قاب مناسب و عدم جهش اساسی مانند اضافه یا حذف شدن نوکلئوتید که سبب تغییر در قاب و محصول پروتئینی می‌شود ضروری است.

نتایج حاصل از بیان پروتئین پوششی ASGV: در الگوهای پروتئینی به دست آمده از باکتری‌های نوترکیب با pET28-ASGV-CP باندی در حدود ۲۷ کیلو دالتون مشاهده شد که این اندازه براساس ترکیب آمینواسیدی پروتئین پوششی ASGV و با توجه به وزن مولکولی هر کدام از آمینواسیدها بدست آمده بود. تمامی مقادیر پروتئین در زمان‌های مختلف با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی مولار یک بار قبل سانتریفیوژ و بار دیگر بعد سانتریفیوژ الکتروفورز شدند. زمان‌های به صفر، ۴ و ۱۶ ساعت پس از القاء با IPTG نشان داد میزان بیان پروتئین قبل و بعد سانتریفیوژ در زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۱۶ ساعت پس از القا و غلظت یک میلیمولار IPTG، تفاوت محسوسی نداشت به همین جهت برای بررسی در آزمون‌های بعدی از سوسپانسیون باکتری‌هایی استفاده شد که با چهار ساعت پس از القا با استفاده از غلظت یک میلی مولار IPTG القا شده باشند (شکل ۵).



شکل ۴. کلونی پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب برای pET28-ASGV-CP (M . مارکر 100bp DNA Ladder، ۱، ۲ و ۳) کلونی‌های مختلف بررسی رشد کرده در محیط کشت

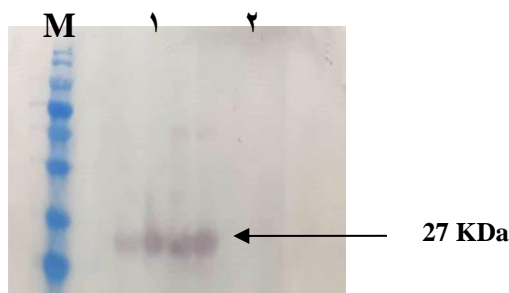
Figure 4. Colony PCR by specific primers of ASGV Coat Protein for pET28-ASGV-CP, M. DNA Ladder 100bp, 1-3: Different Colonies



شکل ۵. نتایج بیان پروتئین‌های در زمان‌های مختلف بعد از القا. M: مارکر پروتئینی ۱، ۲، ۴ و ۵: به ترتیب سه، چهار، شش و ۱۶ ساعت بعد از القا با IPTG، ۳ و ۶: به ترتیب ۴ و ۶ ساعت بعد از زمان صفر بدون القا ۷: زمان صفر قبل از القا با IPTG.

Figure 5. The result of protein expression in different time after induction. M: Protein Marker, 1, 2, 4, and 5: 3, 4, 6, and 16 hours after induction by IPTG, respectively. 3 and 6: 4 and 6 hours without induction (non-induced), 7: non induced

نتایج مربوط به لکه گذاری وسترن: از آنتی بادی تجاری اختصاصی ویروس موردنظر به عنوان آنتی بادی اولیه برای بررسی بیان ژن پروتئین پوششی با غلظت ۱:۲۰۰۰ استفاده شد. پس از اضافه نمودن کانجوگیت متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز با غلظت ۱:۵۰۰۰ و بافر سوبسترای دارای NBT و BCIP، باند مربوط به پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب در کاغذ نیتروسولوزی مشاهده شد. در طی این آزمون برای پروتئین استخراج شده در زمان صفر (قبل از اضافه نمودن IPTG) باندی مشاهده نشد (شکل ۶)



شکل ۶. وسترن بلات پروتئین بیان شده سازه pET28-ASGV-CP، M: مارکر پروتئینی ۱: پروتئین بیان شده ۴ ساعت پس از القا با IPTG ۲: پروتئین استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید بدون قطعه

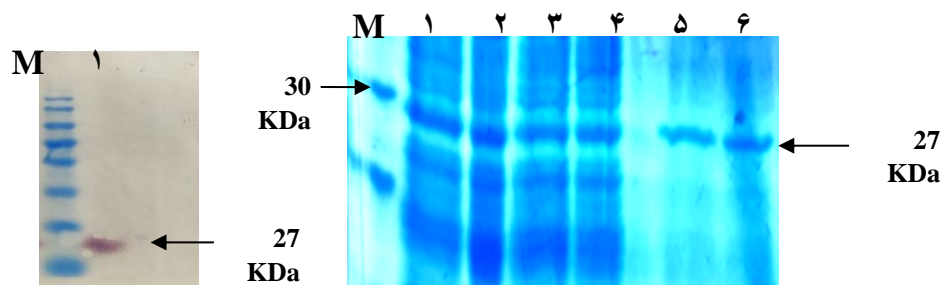
Figure 6. Western Blotting of expressed protein of pET28-ASGV-CP construct in E. coli, M: Protein Marker, 1: Expressed protein 4 hours after induction by IPTG, 2: Extracted protein from pET2 without ASGV-CP insert

تخلیص پروتئین به روش طبیعی: در این روش بافرهای مورد استفاده فاقد اوره بوده و جهت لیز کردن و شکستن دیواره‌های باکتری از بافر لیز کننده و ازت مایع استفاده شد که منجر به حفظ ساختار طبیعی پروتئین‌ها گردید. شکل ۷ باندهای مربوط به پروتئین نو ترکیب متصل به دنباله هیستیدینی با اندازه حدودی ۲۷ کیلودالتونی را در مراحل مختلف نشان می‌دهد. همچنین غلظت پروتئین‌های حاصل با نانودراپ اندازه گیری شد که نتایج حاکی از تخلیص پروتئین با غلظت مناسب بود.

تعیین عیار آنتی سرم: به منظور تعیین عیار آنتی سرم‌های تهیه شده آزمون الایزای غیرمستقیم انجام شد. نتایج در این آزمون نشان داد غلظت ۱:۳۲۷۶۶ در مورد پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب مطابق نتایج جذب نوری در مقایسه با سرم غیرایمن حاصل شد. نتایج حاصل از جذب نوری در آزمون الایزای غیر مستقیم با استفاده از سرم تهیه شده علیه پروتئین نو ترکیب بیان شده در باکتری در مقایسه با نمونه سرم غیر ایمن در شکل ۸ قابل مشاهده هست.

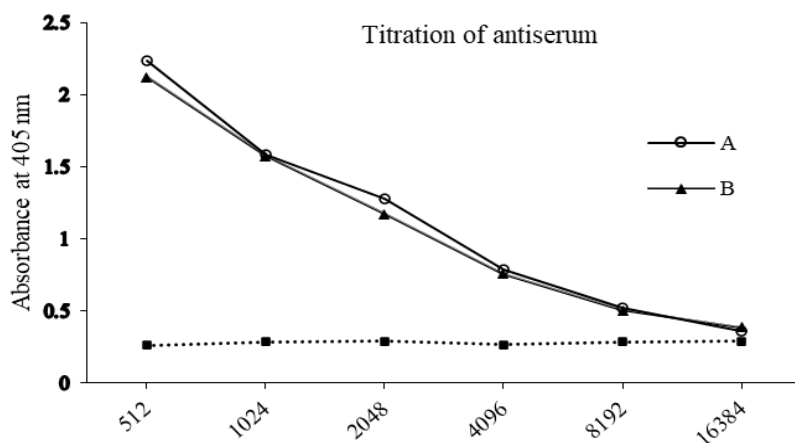
نتایج حاصل از الایزای غیرمستقیم و مستقیم با آنتی بادی‌های نو ترکیب تهیه شده: نتایج مربوط به الایزای غیر مستقیم با رقت‌های مختلف مشخص نمود که ایمنوگلوبولین تخلیص شده در هر سه رقت ۱:۱۰۰۰، ۱:۲۰۰۰ و ۱:۳۰۰۰ با آنتی ژن مربوطه واکنش می‌دهد هر چند که شدت واکنش در رقت‌های مختلف متفاوت است. شدت واکنش بر اساس میزان جذب نوری در

۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد که نتایج نشان داد ایمنوگلوبولین‌های تخلیص شده علیه پروتئین پوششی در رقت ۱:۱۰۰۰ قابلیت بهتری در تشخیص آنتی‌ژن‌های مربوطه دارد (شکل ۹) و اما در مورد الی‌زای مستقیم دو رقت ۱:۱۰۰۰ و ۱:۲۰۰۰ استفاده شد که رقت ۱:۱۰۰۰ واکنش بهتری برای تشخیص آنتی‌ژن پس از بررسی جذب نوری در ۴۰۵ نانومتر داشت (شکل ۹).



شکل ۷. (A) الکتروفورز مراحل خالص سازی و پروتئین تخلیص شده ASGV-CP ۴-۱: پروتئین بیان شده موجود در ستون قبل از شستشو، ۵ و ۶: پروتئین تخلیص شده (B) وسترن بلات پروتئین تخلیص شده ASGV-CP، M: مارکر پروتئینی ۱: پروتئین تخلیص شده

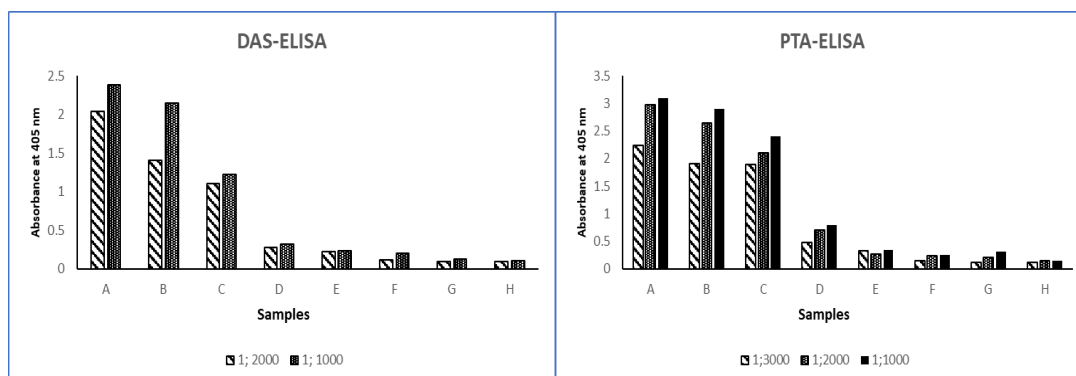
Figure 7. (A) Electrophoresis of purified protein of ASGV-CP, 1-4: Expressed protein before washing, 5 and 6: Purified protein of ASGV-CP, (B) Western Blotting of purified protein of ASGV-CP. M: Protein Marker, 1: Purified protein



شکل ۸. تیتراسیون آنتی سرم تولید شده علیه پروتئین پوششی ASGV در الی‌زای غیر مستقیم A و B دو تکرار خرگوش ایمن شده

Figure 8. Titration of antiserum prepared against coat protein of ASGV by the use of indirect ELISA. A and B represent two rabbits as replicates. The purified protein was used as antigens

هر چند که کارایی آن نسبت به الایزای غیر مستقیم کمتر بود. میزان جذب نوری در ۴۰۵ نانومتر در مقایسه با نمونه گیاهی سالم انجام شد که جذب نوری در مورد هر دو نوع الایزا میزان جذب نوری حدود دو برابر نمونه گیاهی سالم بود. همانطور که در نتایج دیده می‌شود رقت‌های واکنش در مورد ایمونوگلوبولین تهیه شده علیه پروتئین پوششی ASGV واکنش قابل قبولی دارند. در آزمون دیبا با استفاده از غلظت ۱:۱۰۰۰ ایمونوگلوبولین‌های خالص شده پس از اضافه نمودن سوبسترا تغییر رنگ در محل اضافه کردن آنتی‌ژن با شدت‌های مختلف مشاهده شد.



شکل ۹. ضرایب جذب نوری در PTA-ELISA (A) و DAS-ELISA (B) به منظور بررسی کارایی آنتی‌بادی‌های نوترکیب تهیه شده علیه پروتئین پوششی نوترکیب. A (پروتئین پوششی تخلیص شده)، B (پروتئین بیان شده در باکتری)، C (نمونه برگ آلوده به ASGV)، D (پروتئین بیان شده در زمان صفر)، E (نمونه برگ سالم)، F (پروتئین استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید فاقد ژن پروتئین پوششی)، G (بافر استخراج پروتئین)، H (سوبسترا)

Figure 9. Absorbance coefficients in PTA-ELISA (A) and DAS-ELISA (B) to evaluate the efficiency of recombinant antibodies prepared against ASGV-CP. A (purified coat protein), B (protein expressed in bacteria), C (leaf sample infected with ASGV), D (protein expressed before induction), E (healthy leaf sample), F (protein extracted from bacteria containing plasmid without CP insert), G (protein extraction buffer), H (substrate)

با گسترش تکنیک‌های بیولوژی مولکولی، همسانه‌سازی و بیان ژن‌های ویروسی که پروتئین‌های ساختاری (Ling et al. 2000) و غیر ساختاری را رمز می‌کنند، به عنوان یک روش مهم جهت به دست آوردن حجم زیادی از آنتی‌ژن مربوطه است (Barbieri et al. 2004; Nickel et al. 2004). در بسیاری از ویروس‌های گیاهی از ذرات ویروسی خالص شده از بافت‌های گیاهی آلوده به عنوان آنتی‌ژن استفاده شده است. اما در برخی از ویروس‌های گیاهی مشکلاتی از جمله عدم توانایی تولید آنتی‌ژن با حجم و کیفیت بالا به علت غلظت پایین ویروس در بافت‌های گیاهی، پایین بودن کیفیت خالص سازی ذرات ویروسی (Ling et

2000 al.)، عدم وجود مقادیر کافی آنتی‌ژن خالص با استفاده از خالص سازی ذرات ویروسی و آلودگی با آنتی‌ژن‌های میزبان وجود دارد که سبب استفاده از بیان ژن پروتئین پوششی ویروس در سیستم پروکاریوتی جهت به دست آوردن آنتی‌ژن در تهیه آنتی‌بادی استفاده می‌شود. در بسیاری از موارد تکنولوژی نوترکیب در مقایسه با روش‌هایی مانند خالص سازی ویروس‌ها که اغلب مشکل می‌باشد راحت‌تر است (Tatineni et al. 2013). این مشکلات را با بیان پروتئین‌های نوترکیب در سیستم باکتریایی *E.coli* می‌توان برطرف کرد این پروتئین‌ها برای تولید آنتی‌بادی چند همسانه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند. در تحقیق حاضر از تکنیک مذکور برای به دست آوردن آنتی‌ژن مناسب جهت تولید آنتی‌بادی استفاده شد.

در این تحقیق به جهت تولید پروتئین‌های پوششی نوترکیب از پلاسمید بیان pET28a استفاده شد که از پروتئین بیان شده در این نوع وکتور بعنوان ماده ایمنی‌زا برای تولید آنتی‌بادی به منظور ردیابی آنتی‌ژن استفاده می‌کنند، این پلاسمید دارای برجسب هیستیدین دو طرفه در بالا دست و پایین دست ژن درج شده است (Gulati-Sakhuja et al. 2009)، به همین علت در الکتروفورز پروتئین‌های استخراج شده از باکتری‌های حاوی حامل بیان دارای ژن پروتئین پوششی ASGV وزن مولکولی پروتئین‌ها مقداری بیشتر از وزن واقعی پروتئین پوششی ASGV نمایش داده شده است. ممکن است نگرانی‌هایی در مورد احتمال تاثیر برجسب‌های فیوز شده به پروتئین‌های بیانی ایجاد شود، نکته قابل توجه این است که این برجسب‌ها که در بخش انتهایی آمینی و کربوکسیلی حضور دارند، اثراتی در ایمن زایی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی تولیدی ندارد. بنابراین می‌توان گفت هیچ تفاوت قابل توجهی در ایمن‌زایی آنتی‌ژن‌های نوترکیب در مقایسه با آنتی‌ژن‌های تجاری وجود ندارد (Mutasa-Gottgens et al. 2000; Kumari et al. 2009; Gulati-Sakhuja et al. 2001).

با توجه به آزمایشات انجام شده در طی این تحقیق، مشاهده شد که القاء باکتری‌ها به مدت چهار ساعت با غلظت ۱ میلی‌مولار برای تولید پروتئین نوترکیب مورد نظر کافی است، زیرا پس از این مدت با غلظت ذکر شده، باکتری وارد مرحله ایستایی می‌شود که در این مرحله تعداد سلول‌های رشد کرده در محیط برابر با تعداد سلول‌های از بین رفته است. بنابراین، افزایش غلظت و مدت زمان القاء تأثیری در افزایش میزان پروتئین تولید شده نخواهد داشت. این نتایج مشابه نتایج بدست آمده برای تولید پروتئین پوششی ویروس کوتولگی هسته دارن^۱ بود. آنها بهترین زمان را برای استخراج پروتئین نوترکیب سه ساعت پس از القاء دانستند و نتایج بررسی‌های آنها نشان داد که افزایش مدت زمان القاء به مدت ۱۶ ساعت هم تاثیر چندانی بر میزان افزایش پروتئین تولید شده نخواهد داشت. همچنین بررسی غلظت‌های مختلف IPTG نیز نشان داد که افزایش غلظت بیش از یک میلی‌مولار تأثیری در بیان ژن مورد نظر ندارد (Abou-Jawdah et al. 2004)، در همین راستا مشخص شد افزایش غلظت IPTG از نیم میلی‌مولار به دو میلی‌مولار اثر معنی داری در میزان بیان پروتئین ندارد. همچنین برای تولید آنتی‌بادی علیه ویروس موزاییک خفیف گل

1. *Prunus dwarf virus* (PPV)

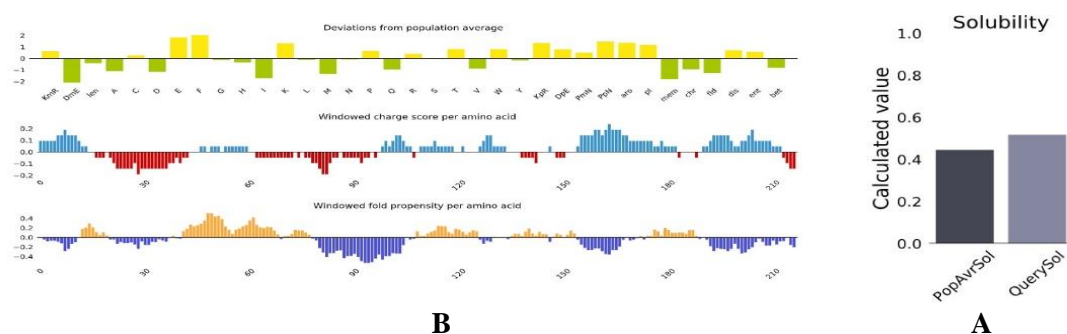
تکمه‌ای^۱ از بیان ژن در باکتری استفاده شد. آنها چهار ساعت پس از القاء سلول‌های باکتری با IPTG را بهترین زمان برای استخراج پروتئین نوترکیب را اعلام داشته‌اند (Chu et al. 2014). در مطالعه‌ی دیگر با هدف تولید و ارزیابی واکنش پروتئین پوششی نوترکیب ویروس باسیلی تانگروی برنج^۲ و ویروس کروی تانگروی برنج^۳ بعنوان آنتی‌ژن جهت تولید آنتی‌بادی برای مقاصد تشخیصی استفاده شد (Yee et al. 2017) همچنین در سال ۲۰۱۶، بیان ژن رمز کننده پروتئین پوششی ویروس موزائیک کاهو^۴ در سیستم باکتریایی *E. coli* BL21 (DE3) توسط حامل بیانی pET28، به منظور خالص‌سازی پروتئین و تولید آنتی‌بادی چند همسانه‌ای نوترکیب صورت گرفت (Sharma et al. 2016).

کاربرد سیستم‌های باکتریایی، در بیان پروتئین‌های نوترکیب مقرون به صرفه و موثرتر می‌باشد و سبب تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس وسیع می‌شوند. از طرفی تولید پروتئین در سیستم پروکاریوتی دارای معایبی از جمله فقدان مکانیسم ترشحی موثر به محیط کشت، اختلاف فرآورده‌های حاصل با فرآورده‌های طبیعی انسانی به دلیل فقدان امکانات سلول‌های یوکاریوتی جهت انجام اصطلاحات پس از ترجمه می‌باشد (Yusibov et al. 2011). همچنین ممکن است عدم بیان پروتئین و بیان به میزان کم به دلیل سمیت پروتئین یا ارجحیت کدونی یا عدم شکل‌گیری صحیح باندهای دی‌سولفیدی در این سیستم رخ دهد. از طرفی شکل‌گیری اینکلوزن بادی نیز باعث تا شدن نادرست و حلالیت پایین پروتئین‌ها می‌شود که نیاز به تجهیزاتی می‌باشد تا بتوان آن‌ها را به صورت محلول درآورد. به همین دلیل برای برخی پروتئین‌های یوکاریوتی که در آن‌ها تغییرات پس از ترجمه نیاز می‌باشد، استفاده از سیستم بیانی *E. coli* مناسب نخواهد بود، در همین راستا از سیستم‌های دیگر مانند بیان در مخمر و یا سلول‌های پستاندارن استفاده می‌شود، اما همانطور که ذکر شد با توجه به رشد سریع باکتری، هزینه کم و بیان قابل قبول در مدت زمان کوتاه، بیان در سیستم پروکاریوتی در اغلب موارد مناسب است، بخصوص زمانی که هدف از بیان پروتئین نوترکیب تولید آنتی‌بادی باشد (Abou-Jawdah et al. 2004).

در تحقیق حاضر برای خالص‌سازی پروتئین از روشی تحت عنوان روش طبیعی استفاده شد که دارای بافرهای بدون اوره بوده و سبب حفظ ساختار طبیعی پروتئین گردید که پس از انجام نانودراپ غلظت مناسبی از پروتئین مشاهده شد که نشان از عملکرد ایمنی‌زایی مناسب برای تولید آنتی‌بادی بود. در این تحقیق پروتئین تخلیص شده به عنوان ماده ایمنی‌زا برای تهیه آنتی‌سرم استفاده خواهد شد که در تحقیق‌های دیگر نیز از پروتئین نوترکیب تخلیص شده در بسیاری از موارد به منظور تولید آنتی‌بادی استفاده شده است (Fitchen et al. 1995; Verch et al. 1998; Liu et al. 2001; Cervoska et al. 2006; Folwarczna et al. 2008; Plchova et al. 2011; Cerovska et al. 2012; Sivaprasad et al. 2015; Hamdayanty et al. 2016; Hamdayanty et al. 2016; Yee et al. 2017; Thangaraj and Jayakrishnan, 2021)

2. *Tuberosa mild mosaic virus* (TMMV)
3. *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV)
4. *Rice tungro spherical virus* (RTSV)
5. *Lettuce mosaic virus* (LMV)

تحقیق نشان داد پروتئین بیان شده بیشتر در فاز محلول قرار داشت و در خالص سازی نیز از روش طبیعی استفاده شد، حلالیت پروتئین بیان شده بصورت بیوانفورماتیکی (<https://www.expasy.org>) نشان داد که پروتئین بیان شده بصورت محلول است (شکل ۱۰).



شکل ۱۰. (A) میزان حلالیت پروتئین بیان شده (میزان حلالیت پروتئین بیان شده با رنگ روشن نشان داده شده) (B) خصوصیات جمعیت اسیدآمینه‌ای، بار اسیدآمینه‌ای و شکل آمینو اسیدها.

Figure 10. (A) Solubility of expressed protein (the expressed protein solubility showed by grey color) (B) Amino acid Population Average, Amino acid charge, and Amino acid Fold

لازم به ذکر است میزان حلالیت پروتئین بیان شده بستگی به ترکیب و جمعیت اسیدآمینه‌ای^۱، بار اسیدآمینه‌ای^۲ و نقطه ایزوالکتریکی و همچنین شکل اسیدآمینه‌ها متفاوت است. با توجه به بررسی که در مورد این سه ویژگی پروتئین بیان شده انجام شد نتایج نشان داد ترکیب سه مورد مذکور منتج به حلالیت بیشتر پروتئین خواهد شد. نتایج این بررسی در شکل ۱۰ نشان داده شده است. آنتی‌بادی نوترکیب تهیه شده توانست ویروس لکه ساقه شیاری سیب را به طور اختصاصی در آزمون ELISA شناسایی کند. با توجه به اینکه در این نوع از آزمون الایزا، آنتی‌ژن در چاهک‌های تستک الایزا پوشش داده می‌شود و به کف چاهک متصل می‌شود، این اتصال تا حدی باعث تغییر شکل در ساختار ظاهری آنتی‌ژن شده که منجر به شناسایی آنتی‌ژن توسط می‌شود. استفاده از آنتی‌بادی‌های نوترکیب تولید شده به عنوان آنتی‌بادی پوششی در آزمون ELISA برخلاف بسیاری از تحقیقات پیشین که گزارشی از عملکرد ناموفق آنتی‌بادی‌های نوترکیب در آزمون DAS-ELISA را داشت (Cerovska et al. 2006)، عملکرد نسبتاً خوبی در ردیابی این ویروس داشت. نتایج تحقیق حاضر با این امر که آنتی‌بادی‌های نوترکیب در آزمون ELISA عملکرد خوبی ندارند، مطابقت نداشت؛ همانطور که بسیاری از پژوهش‌ها قبلاً همین امر را به اثبات شده است و از آنتی‌بادی‌های نوترکیب تهیه شده در برابر بسیاری از ویروس‌های گیاهی به منظور ردیابی ویروس در عصاره گیاه آلوده طی این آزمون به طور موفقیت‌آمیزی بهره برده‌اند

1. Amino acid Population Average
2. Amino acid charge

(Nickel et al. 2004; Koolivand et al. 2017; Safarnejad et al. 2019) پژوهشگران از جمله دلایل عدم ردیابی ویروس در داس‌الایزا با آنتی‌بادی‌های نوترکیب شبیه نبودن ساختار پروتئین دنانوره تزریق شده به جاندار خون گرم با ویروس موجود در عصاره گیاهی آلوده و کم بودن غلظت ویروس در عصاره گیاهی را دلیل این امر و کاهش عملکرد آنتی‌بادی در داس‌الایزا بیان کردند (Folwarczna et al. 2008). تیتراژ ۱:۸۱۹۲ را برای آنتی‌بادی تهیه شده در برابر پروتئین پوششی ویروس برگ باد بونی مو بر اساس آزمون PTA-ELISA گزارش شده است (Bashir et al. 2015). در تحقیق دیگری که از پروتئین پوششی نوترکیب ویروس موزائیک خیار برای تهیه آنتی‌بادی اختصاصی استفاده شده بود نیز، تیتراژ ۱:۴۰۹۶ آنتی‌بادی در آزمون PTA-ELISA گزارش شد. در همین پژوهش از تیتراژ ۱:۱۰۰۰ آنتی‌بادی در جهت ردیابی ویروس در عصاره گیاهی آلوده به ویروس موزائیک خیار طی آزمون DAS-ELISA نتیجه مثبت به دست آمد (Koolivand et al. 2017). از کاربردهای تولید پروتئین پوششی نوترکیب و تهیه آنتی‌بادی می‌توان به اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات اشاره کرد که علاوه بر افزایش حساسیت، زمان آزمون ردیابی را نیز به طور چشمگیری کاهش می‌دهد. تولید آنتی‌بادی توسط پروتئین نوترکیب تهیه شده در این تحقیق و اتصال آن به نانو ذرات می‌تواند علاوه بر فوائد ذکر شده، مقدمه خوبی برای طراحی و ارائه یک نانوبیوسنسور برای ردیابی برخی ویروس‌ها در کشور باشد. امروزه مشخص شده است که اتصال آنتی‌بادی و آنتی‌ژن به سطح نانوذرات طلا می‌تواند در طیف جذبی آن‌ها تغییر ایجاد کرده و به علت افزایش سایز پیک جذبی به سمت طول موج‌های بیشتر پیش می‌رود که این پدیده با طیف سنجی قابل اندازه‌گیری است (Petryayeva and Krull, 2011)، از این ویژگی به منظور شناسایی سریع آنتی‌ژن استفاده می‌شود (Davatgaran, 2018).

نتیجه‌گیری: در نهایت تحقیق حاضر نشان داد پروتئین پوششی قابلیت بیان در سیستم پروکاریوتی به مقدار مناسب دارد و از طرفی این پروتئین توانایی ایمنی زایی در بدن یک حیوان خونگرم را دارد. در همین راستا، آنتی‌سرم با رقت مناسب به منظور تخلیص را فراهم نمود. نتایج کارایی ایمنوگلوبولین تخلیص شده و کانتروگه شده در تست‌های سرولوژیک نشان داد که به خوبی توانایی تشخیص نمونه‌های آلوده به ویروس ساقه شیاری سبب را دارد هر چند که میزان پاسخ در ایمنوگلوبولین تهیه شده علیه پروتئین پوششی در نوع آزمون سرولوژی ممکن است متفاوت باشد. بطوریکه الایزای غیر مستقیم میزان کارایی بالاتری دارد. تولید این پروتئین در سیستم پروکاریوتی و تخلیص و ارزیابی آنها در مورد ویروس ساقه شیاری سبب می‌تواند در موسسات و مراکزی که برای تشخیص این ویروس تحقیقات انجام می‌دهند مفید باشد زیرا آنتی‌بادی تولید شده علیه یک جدایه بومی از ایران تهیه شده است.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زنجان به خاطر حمایت مالی پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

- Abou-Jawdah Y, Sobh H, Cordahi N, et al. (2004) Immunodiagnosis of Prune dwarf virus using antiserum produced to its recombinant coat protein. *J Virol Methods* 121, 31-38.
- Adams M, Antoniw J, Bar-Joseph M, et al. (2004) Virology Division News: The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Arch Virol* 149, 1045-1060.
- Barbieri MR, Carvalho MGD, Zambolim EM, Zerbini FM (2004) Expressão em *Escherichia coli* da proteína capsidial do Watermelon mosaic virus e produção de anti-soro. *Fitopatol Bras* 29, 215-219.
- Cerovska N, Filigarova M, Pečenkova T (2006) Production of polyclonal antibodies to a recombinant potato mop-top virus non-structural triple gene block protein 1. *J Phytopathol* 154, 422-427.
- Cerovska N, Moravec T, Plchova H, et al. (2012) Production of polyclonal antibodies to the recombinant potato virus m (pvm) non-structural triple gene block protein 1 and coat protein. *J Phytopathol* 160, 251-254.
- Chen J, Xiong J, Yang J, et al. (2011) Nucleotide sequences of four RNA segments of a reovirus isolated from the mud crab *Scylla serrata* provide evidence that this virus belongs to a new genus in the family Reoviridae. *Arch Virol* 156, 523-528.
- Cieślinska M, Borisova A, Komorowska B (2007) Some molecular properties of several isolates of Apple chlorotic leaf spot virus from Bulgaria. *J Fruit Ornament Plant Res* 15, 125-131.
- Davatgaran TY, Kharrazi S, Amini S (2018) Antibody conjugated gold nanoparticles for detection of small amounts of antigen based on surface plasmon resonance (spr) spectra. *Nanomed Res J* 3, 102-108.
- Fajardo TV, 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.
- Fitchen J, Beachy RN, Hein MB (1995) Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. *Vaccine* 13, 1051-1057.
- Folwarczna J, Plchova H, Moravec T, et al. (2008) Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of potato virus y. *Folia Microbiol* 53, 438-442.
- Hamdayanty H, Hidayat SH, Damayanti TA (2016) Expression of recombinant sugarcane streak mosaic virus coat protein gene in *Escherichia coli*. *J Bio* 23, 111-116.

- Gulati-Sakhuja A, Sears JL, Nunez A, Liu HY (2009) Production of polyclonal antibodies against Pelargonium zonate spot virus coat protein expressed in Escherichia coli and application for immunodiagnosis. *J Virol Methods* 160, 29-37.
- Kokane A, Lawrence K, Surwase D, et al. (2020) Development of reverse transcription duplex pcr (rt-d-pcr) for simultaneous detection of the citrus tristeza virus and indian citrus ringspot virus. *Agron Sustain Dev* 9(2), 131-138.
- Koolivand D, Sokhandan Bashir N, et al. (2016) Production of polyclonal antibody against grapevine fanleaf virus movement protein expressed in escherichia coli. *Plant Pathol J* 32, 452-461.
- Koolivand D, Sokhandan-Bashir N, Behjatnia SAA, Jafari-Joozani R (2016) Detection of grapevine fanleaf virus by immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction (ic-rt-pcr) with recombinant antibody. *Arch Plant Pathol Protec* 47, 2070-2077.
- Koolivand D, Sokhandan Bashir N, Rostami A (2017) Preparation of polyclonal antibody against recombinant coat protein of cucumber mosaic virus isolate b13. *J Crop Protec* 6, 25-34.
- Kumari S, Makkouk K, Katul L, Vetten H (2001) Polyclonal antibodies to the bacterially expressed coat protein of Faba bean necrotic yellows virus. *J Phytopathol* 149, 543-550.
- Ling KS, Zhu HY, Jiang ZY, Gonsalves D (2000) Effective application of DAS-ELISA for detection of grapevine leafroll associated closterovirus-3 using a polyclonal antiserum developed from recombinant coat protein. *European J Plant Pathol* 106, 301-309.
- Liu W, He R, Xue ZJP, Letters P (2001) Expression of the n-terminal segment of qbrn-2 in e. Coli and tips on preparation of a recombinant protein. *Protein Pept Lett* 8, 27-32.
- Martinelli F, Scalenghe R, Davino S, et al. (2015) Advanced methods of plant disease detection- A review. *Agron Sustain Dev* 35, 1-25.
- Masoudi N, Rouhibakhsh A, Asareh MH, et al. (2018) Identification of dominant isolate of potato virus s in iran and heterologous expression of its coat protein. *J Genetic Eng Biotechnol* 7, 153-162.
- Mutasa-Gottgens E, Chwarszczynska D, Halsey K, Asher M (2000) Specific polyclonal antibodies for the obligate plant parasite Polymyxa—a targeted recombinant DNA approach. *Plant Pathol* 49, 276-287.
- Nickel O, Targon M L, Fajardo T V, et al. (2004) Polyclonal antibodies to the coat protein of Apple stem grooving virus expressed in Escherichia coli, production and use in immunodiagnosis. *Fitopatol Bras* 29, 558-562.
- Petryayeva E, Krull U (2011) Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—a review. *Anal Chim Acta* 706, 8-24.

- Plchova H, Moravec T, Dedic P, Cerovska N (2011) Expression of recombinant potato leafroll virus structural and non-structural proteins for antibody production. *J Phytopathol* 159, 130-132.
- Safarnejad MR, Bananej K, Sokhansanj Y (2019) Developing of specific antibody against chickpea chlorotic dwarf virus (cpcdv) through recombinant coat protein. *J Crop Protec* 8, 179-190.
- Sharma P, Sharma S, Singh J, et al. (2016) Incidence of lettuce mosaic virus in lettuce and its detection by polyclonal antibodies produced against recombinant coat protein expressed in *Escherichia coli*. *J Virological Methods* 230, 53-58.
- Sivaprasad Y, Bhaskara Reddy B, Sujitha A, Sai Gopal D (2015) Expression and production of polyclonal antibodies against recombinant coat protein of peanut bud necrosis virus. *J Plant Pathol Microbiol* S1, e2.
- Sokhandan-Bahir S, Koolivand D, Behjatnia SAA (2015) Preparation of polyclonal antibodies to grapevine fanleaf virus coat protein expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol* 14, 173-180.
- Thangaraj M, Jayakrishnan J (2021) Expression of recombinant protein of coat protein gene of sweet potato feathery mottle virus in bacterial expression system and production of polyclonal antiserum for its diagnosis. *Res Squ* 1, 1-32.
- Tatineni S, Sarath G, Seifers D, French R (2013) Immunodetection of Triticum mosaic virus by DAS-and DAC-ELISA using antibodies produced against coat protein expressed in *Escherichia coli*: potential for high-throughput diagnostic methods. *J Virol Methods* 189, 196-203.
- Verch T, Yusibov V, Koprowski H (1998) Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *J Immunol Methods* 220, 69-75.
- Yee SF, Chu CH, Poili E, Sum M (2017) Expression and the antigenicity of recombinant coat proteins of tungro viruses expressed in *Escherichia coli*. *J Virol Methods* 240, 69-72.
- Yusibov V, Streatfield SJ, Kushnir N (2011) Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: Vaccines, antibodies and beyond. *Hum Vaccines* 7, 313-321.