Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

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 *Alfaflexiviridae*. 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*II 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 multiclonal 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 worlds: 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 نوترکیب ویروس X سیب زمینی در باکتری Escherichia coli

پریسا 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 حیدرنژاد

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 گسترده ترین ویروس‌های آلوده‌کننده سیب زمینی در جهان می‌باشد. به‌دلیل 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 اِن اِی نوترکیب، یک راهکار مفید برای تسهیل شناسایی این ویروس در طبیعت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: براین ا ساس، در برر سی حا ضر، یک نمونه سیب زمینی آلوده به PVX از مزارع سیب‌زمینی در زرند، ا ستان کرمان جمع آوری و آلودگی آن نسبت به ویروس مذکور تو سط آزمون DAS-ELISA تایید گردید. جدایه مذکور جهت تکثیر، بر روی توتون (*Nicotiana glutinosa*) مایه‌زنی گردید. پس از استخراج آر اِن اِی 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 پلی آکریلامید 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.

نتیجه گیری نهایی: در این تحقیق، یک آنتی‌ژن نوترکیب مناسب جهت تشخیص ویروس X سیب زمینی تهیه گردید که به‌خوبی تو سط آنتی سرم تولید شده از طریق تزریق پیکره‌های کامل ویروس به خرگوش در آزمون دات بلات شنا سایی 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.

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

مقدمه

ویروس X سیب‌زمینی[1] از خانواده *Alphaflexiviridae* و جنس *Potexvirus* می با شد (Bostan & Haliloglu 2004) و در تمام مناطق سیب‌زمینی‌کاری دنیا و ک شور ایران خ سارت ایجاد می‌نماید (Buchen-Osmond, 1987; Yu et al. 2008; Verchot-lubicz et al. 2007). میزان خ سارت آن ب سته 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 زمینی[2]، ویروس جنجغه‌ای توتون[3] 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 endobiuticum* دو گونه ملخ *Melanospora differentialis* و *Tettigonia viridissima* (Koening & Lesemann 1989) و برخی ازگونه‌های سس (*Cuscuta* spp.) نیز گزارش شده‌است (Koening & Lesemann 1989). این ویروس به آسانی از طریق پیوند و غده نیز منتقل می شود. جنس *Potexvirus*، یکی از هشت جنس متعلق به خانواده *Alphaflexiviridae* است. ویریون‌ها 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). ویریون‌ها حاوی یک مولکول خطی تک رشته‌ای مثبت با حدود 5/9 تا 7 کیلو باز می‌باشند که حدود 6 درصد وزن ویریون 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 خواندنی[4] 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 اِن اِی[5] ژنومی و مقاومت گیاه موثر می‌باشد (Feigelstock et al. 1995).

براساس خصوصیات مختلف ویروس، نژادهای متفاوتی از PVX گزارش شده است. براساس رابطه سرولوژیکی (واکنش نسبت به آنتی بادی های مونوکلونال) چهار گروه از PVX شامل PVX^C، PVX^A، PVX^O وPVX^{HB} گزارش شده‌اند. همچنین برمبنای درجه حرارت بی اثر شدن[6] سه گروه و براساس 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 آموده خالص پروتئین ویروس‌ها جهت تهیه آنتی‌بادی‌هایی با خلوص بالا، به منظور مطالعات اپیدمیولوژیکی و یا مطالعه و عملکرد ژن‌های مربوطه، حائز اهمیت می‌با شد. اگرچه ا ستفاده 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, DNA
[6] Thermal inactivation point

بد ست آمده اغلب از درجه خلوص بالایی برخوردار نی ستند. 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 اســـتخراج شـــده و امکان تولید آنها در مقیاس بزرگ، جهت پژوهش‌های دقیق دارای کارایی بالاتری می‌باشد. به همین دلیل امروزه از روش‌هائی نظیر بیان ژن پروتئین پوششی در سلول‌های باکتریایی استفاده می گردد (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 ســیب زمینی درون ناقل بیان پروکاریوتی جاســازی شــد و به میزبان بیان (باکتری *E. coli*) انتقال داده شــد. 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 روش ها

مواد گیاهی آلوده به PVX: نمونه‌های مشـکوک آلوده به PVX از مزارع کشـت سـیب‌زمینی در زرند، اسـتان کرمان جمع آوری گردیدند و پس از انتقال به آزمایشـگاه نسـبت به آلودگی به ویروس فوق، توسـط آزمون الایزای سـاندویچ دو طرفه[7] 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 عصاره گیری 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 اِن اِی ویروس X سیب زمینی از گیاهان توتون آلوده به این ویروس با اســـتفاده 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 پوشـــشـــی PVX، دو آغازگر با اســـتفاده 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 شـده اسـت. سـنتز رشـته مکمل DNA[8] با اسـتفاده از کیت Expand High

[7] Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbant assay, DAS-ELISA
[8] Complementary DNA

Fidelity PCR System (Roche, Germany, Cat. No: 11732641001) و بر ا ساس د ستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

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*

آغازگر	اندازه	ترادف (′3-′5)
Primer	Size	Sequence (3'-'5)
PVXF6	31	GCA*CCATGGCCACAGGGTCAACTACTTCAAC
PVXR5	30	GCAAGATCTTGGTGGGAGGGTAACAACAGC

***جایگاه هدف آنزیم های برشی *Nco*I و *Bgl*II با خط زیرین در توالی آغازگرها نشان داده شده است.**

***Underline: Target sites for restriction endonucleases *Nco*I and *Bgl*II.**

اجزاء واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[9] شـــامل آغازگرهای مســـتقیم و معکوس هرکدام با غلظت یک میکرومولار، مخلوط با dNTPs بـا غلظـت 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 شـــامل 35 ســـیکل 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 DNAدر 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 (QIAGEN, Cat No : 32903) که با اسـتفاده از کیت اسـتخراج پلاسـمید High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche, Germany از باکتری XL1-Blue ا ستخراج گردید، بطور جداگانه با آنزیم های *Bgl* II و *Nco* I برش داده شدند و سپس واکنش اتصال در حضور آنزیمT4 DNA Ligase انجام شد. محصولات واکنش اتصال با استفاده از کیت Ins T/A Clone ™ PCR Product Cloning Kit, Fermentas, Lithuania برای ترانسـفورماسـیون باکتری *E. coli* سـویه XL1-Blue مورد اسـتفاده قرار گرفتند. به منظور تشـخیص کلنی‌های حاوی پلاسـمید نوترکیب از آزمون PCR اسـتفاده گردید. ســـپس جهت تأیید، واکنش برش آنزیمی با آنزیم های *Bgl*II و *Nco*I (که ژن هدف با اندازه 681 جفت بازی را از پلاســـمید جدا سازی می کند) انجام شد. به منظور اطمینان از صحت توالی فوق، پلا سمید نوترکیب تو سط شرکت Bioneer ک شور کره

[9] Deoxyribonucleic acid, DNA

جنوبی تعیین ترادف گردید. سپس با استفاده از محلول های کیت Cloning Kit, Ins T/A Clone ™ PCR Product Fermentas, Lithuania به باکتری *E. coli* سویه M15 به منظور بیان ژن های مورد نظر انتقال داده شد. به منظور تشخیص کلنی‌های 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، کلنی‌های 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 IPTG [10] 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. آشکارسازی پروتئین‌ها در ژل SDS-PAGE با استفاده از محلول رنگ آمیزی آبی کوماسی صورت گرفت (رفرنس).

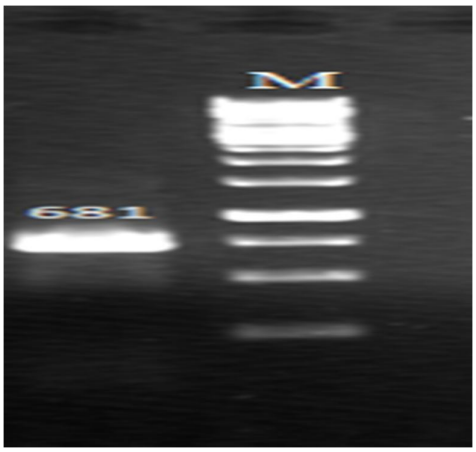
آزمون دات بلات: در این آزمون جهت تشخیص ایمیونولوژیکی CP از آنتی بادی های پلی کلونال تهیه شده از شرکت DSMZ کشور آلمان استفاده شد. جهت انجام این آزمون، نمونه برداری ها قبل از القای بیان و 2، 4، 6 و 8 ساعت بعد از آن انجام شد. لکه‌گذاری نمونه‌ها به میزان 20 میکرولیتر (100mg/ml) بر روی کاغذ نیتروسلولزی که از قبل در بافر انتقال غوطه‌ور و خشک شده بود انجام گرفت. پس از خشک شدن لکه ها، غشا نیترو سلولزی در بافر Blocking buffer به مدت 70 دقیقه در ترموشیکر با دمای $30^{o}C$ و 80 دور در دقیقه قرار داده شد. پس از شستشوی غشاء نیتروسلولزی 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 سانتی‌گراد قرار گرفت.

[10] Isopropyl-beta-thio galactopyranoside

نتایج

جدا سازی 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 الایزا را نشان داد جهت مایه‌زنی بر روی گیاه توتون رقم *N. glutinosa* و مطالعات مولکولی انتخاب گردید.

واکنش زنجیره ای پلی مراز: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به روش نسخه‌برداری معکوس[11] 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).



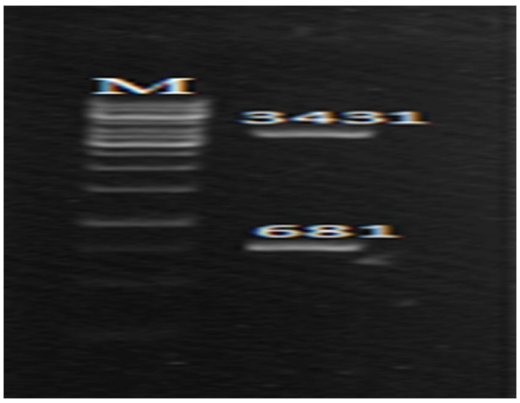
شکل 1. الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن پروتئین پوششی (CP) جدایه ایرانی PVX با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PVXR5 /PVXF6. M: نشانگر اندازه DNA یک کیلو بازی شرکت Thermo Scientific (Cat. No: SM0311)، 1: قطعه 681 جفت بازی تکثیر شده مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس

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 آنزیم های *Bgl*II و *Nco*I تأیید گردید. پس از انجام واکنش هضم، مربوط به ژن CP با اندازه 681 جفت باز از ناقل نوترکیب 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 نوترکیب 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 شمار 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 آنلاین 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.

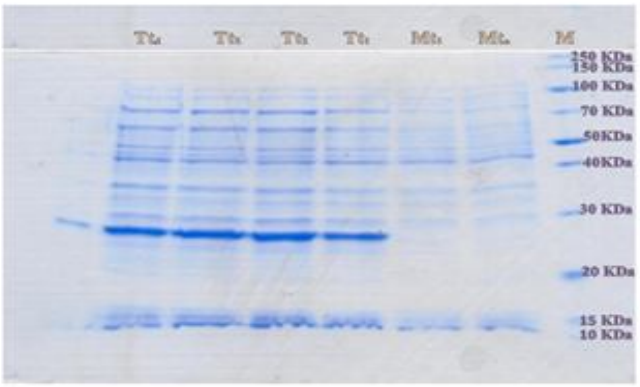


شکل 2. استخراج پلاسمید pQE60-PVX از باکتری *E. coli* و برش آن توسط آنزیم های *Bgl*II و *Nco*I. M: نشانگر اندازه دی اِن ای 1 کیلو بازی شرکت Thermo Scientific (Cat. No: SM0311)، 1: قطعه 681 جفت بازی ژن پرونتین پوششی (CP) و قطعه 3431 جفت بازی پلاسمید pQE60 حاصل از هضم آنزیمی

Figure 2. Extraction of pQE60-PVX plasmid from *E. coli* and digestion it by restriction enzymes *Bgl*II 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 نوترکیب هدف در آزمون دات بلات: بعد از رنگ آمیزی غشا نیتروسلولزی در آزمون دات بلات، رنگ زرد ناشی از واکنش آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین پوششی ویروس PVX با پروتئین نوترکیب هدف در نمونه پروتئین استخراج شده از باکتری *E. coli* نوترکیب 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 آنتی‌بادی اختصاصی بود (شکل 4).



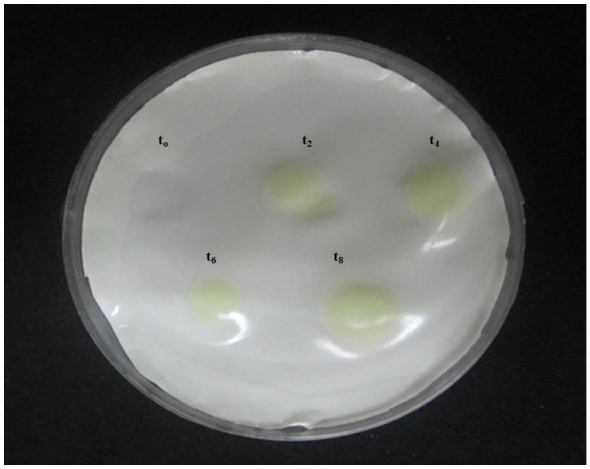
شکل 3. الکتروفورز نمونه‌های پروتئین استخراج شده از باکتری *E. coli* نوترکیب حامل پلاسمید بیانی pQE60-PVX. M: نشانگر وزن مولکولی پروتئین (PageRuler^{TM}, 26630)، Mt_0 نمونه شاهد (M15 فاقد پلاسمید نوترکیب)، Mt_1 نمونه شاهد M15 دارای پلاسمید نوترکیب قبل از القا بیان. چاهک‌های T مربوط به پروتئین‌های استخراج شده در دو (t_1)، چهار (t_2)، شش (t_3) و هشت (t_4) ساعت پس از القا ژن مورد نظر در باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pQE-PVX پروتئین پوشی 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^{TM}, 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 (t_1), four (t_2), six (t_3) and eight (t_4) 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 متداول‌ترین سیستم‌های میزبان برای بیان سطح بالای پروتئین‌های 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 براین، تعدادی از نژادهای جهش یافته *E. coli* در دسترس هستند که می‌توانند بیان پروتئین‌های نوترکیب را بهبود بخشند. به‌عنوان مثال استفاده از نژادهای میزبان با جهش‌هایی در ژن‌های پروتئاز

سیتوپلا سمی، 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 د ستورزی کرد. ضمن آن‌که کنترل پروموتور در این باکتری سخت نبوده و تعداد نسخه‌های پلا سمید را نیز می‌توان به آ سانی تغییر داد. با این حال، سیستم *E. coli* دارای معایبی نیز می‌با شد که می‌توان جهت بیان مؤثر پروتئین‌ها بر آن‌ها غلبه کرد، از جمله تشکیل ا ستات در تراکم سلولی بالا می‌با شد که می‌توان 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 گلیکوزیلا سیون پروتئین در پروکاریوت‌ها قادر به قرار دادن واحدهای گلیکان پیشـــرفته بر روی پروتئین‌های نوترکیب و تولید گلیکوپروتئین‌های پیچیده نیسـت. این نقص سـبب شـده اسـت که این باکتری، میزبان مناسـبی برای تولید آنتی‌بادی‌های اختصـاصـی پروتئین های پسـتانداران نباشـد (Janknecht and Martynoff, 1991). با این حال، به نظر می رسـد که محدودیت‌های سـیسـتم‌بیان پروکاریوتی باکتری *E. coli* مانع چندانی برای تولید موفق پروتئین‌های پو ش شی نوترکیب ب سیاری از ویروس‌های گیاهی نبا شد، زیرا بیان ژن پروتئین پوششی ویروس در باکتری *E. coli* و به دنبال آن، خالص سازی و تولید آنتی بادی پلی‌کلونال برای تعدادی از ویروس‌های 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، آنتی‌بادی پلی کونال تولید شده از قابلیت شنا سایی طیف و سیعی از جدایه‌های ویرو سی برخوردار خواهد بود (Cerovska et al. 2010). واحدهای پروتئین پو ش شی ویرو سی دارای دو نوع اپی‌توپ متفاوت می‌با شند. یک گروه در سطح زیر واحدهای پروتئین پو ش شی قرار دا شته، اما در هنگام تشـکیل پیکره‌های کامل ویروسـی و چرخش‌های ایجاد شـده در سـطح پیکره‌ها واقع نخواهند بود. این گروه تحت نام کریپتوتوپ[12] (cryptotopes) نامگذاری گردیده و آنتی‌بادی تولید شده علیه آنها معمولا قادر به تشخیص ویریون کامل ویرو سی نمی‌باشـد. اما زیر واحدهای پروتئین پوشـشـی دارای اپی‌توپ‌های دیگری تحت نام متاتوپ‌ها[13] (metatopes) نیز هسـتند که در سطح پیکره‌های کامل ویروسی و زیرواحدهای پروتئین پوششی آن واقع گردیده و بنابراین آنتی‌بادی تولید شده علیه آن‌ها، قادر به تشخیص پیکره‌های کامل ویرو سی در گیاهان آلوده می‌با شد. براین ا ساس، این فرض مطرح ا ست که اگر از پروتئین پو ش شی نوترکیب ویروس بصورت غیردناتوره و با حفظ ساختمان فضایی پروتئین برای تولید آنتی‌بادی اختصاصی استفاده شود، آنتی بادی تولیدی از قابلیت چندانی برای تشخیص پیکره های کامل ویرو سی برخوردار نخواهد بود. از اینرو عمدتا ترجیح داده می شود که از فرم دناتوره پروتئین پوشـشـی برای تولید آنتی‌بادی اسـتفاده شـود (Van Regenmortel 1982). البته اسـتفاده از فرم دناتوره پروتئین نوترکیب از مزیت دومی نیز برخوردار اسـت که به قابلیت اسـتخراج مقدار بیشـتری پروتئین نوترکیب از توده باکتری رشـد یافته مربوط می شود.

[12] Cryptotopes
[13] Metatopes



شکل 4. نتایج حاصل از آزمون دات بلات برای شناسایی پروتئین پوششی نوترکیب ویروس PVX در نمونه پروتئین ا ستخراج شده از باکتری *E. coli* نوترکیب حامل پلا سمید 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 و 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 ا ستخراج 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 مولکول‌های پروتئین نوترکیب تولید شده بصورت توده‌هایی نامحلول با پل‌های دی‌سولفیدی فراوان به نام inclusion body در سلول باکتری رسوب می کنند و استحصال آنها از سلول باکتری به فرم غیردناتوره میسر نخواهد بود (Fischer 1993; Baneyx, 1999; Amersham 2000). اغلب تحقیقات مشابه در زمینه تولید آنتی بادی برای پروتئین‌های ویروسی نوترکیب از پپتید علامت His_6 Tag برای خالص سازی آسان پروتئین نوترکیب هدف از طریق کروماتوگرافی تمایلی در ستون شارژ شده با یون نیکل (Ni^{2+}) استفاده کرده‌اند. 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 اســت که اســتفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب[14] برای تولید آنتی بادی اختصــاصــی ویروس های گیاهی موجب رفع مشــکل عدم خلوص نمونه‌های ویروســی در هنگام تزریق به منظور تولید آنتی‌بادی می‌گردد که از جمله می‌توان به رفع مشــکل تشخیص ویروس (GLRaV) *Grapevine leafroll-associated virus* با استفاده از آنتی‌بادی 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 گونه‌های ویروسی بسیار نزدیک از یکدیگر نیز بسیار موثر بوده است. به عنوان مثال، با توجه به همبستگی سرولوژیکی بین بعضی از ویروس‌های خانواده *Potyviridae* همچون ویروس Y سیب زمینی و ویروس A سیب زمینی[15] آنتی سرم تهیه شده از طریق تزریق پیکره‌های ویروسی سالم به حیواناتی همچون خرگوش قادر به تشخیص این گونه از ویروس‌ها از یکدیگر نیســت. این در حالیســت که بیان ژن پروتئین پوشــشــی PVY در باکتری *E. coli* و به دنبال آن، خالص‌سازی و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال برای این ویروس سبب شد که آنتی‌بادی نوترکیب تولید شده به صورت اختصاصی جهت تشــخیص جدایه‌های PVY اســتفاده شــود. زمانی که از آنتی‌بادی نوترکیب در آزمون‌های DBIA[16]، IPTA-ELISA[17] و DAS-ELISA استفاده گردید، ایزوله‌های سیب زمینی آلوده به PVY به‌راحتی تشخیص داده شدند (Abdel-Salam et al. 2014). برخی از محققان در استفاده از روش DAS-ELISA با به‌کار بردن آنتی بادی‌های نوترکیب با مشکلاتی جهت تشخیص آنتی ژن‌های ویروسی مواجه گردیده اند (Cerovska et al. 2003; Soliman et al. 2006; Flowarczna et al. 2008). با این وجود Cerovska et al. (2010) جهت تشــخیص PVX، موفق به اســتفاده از آنتی‌بادی نوترکیب در روش DAS-ELISA گردیدند. در این تحقیق، یک آنتی‌ژن نوترکیب منا سب جهت تشخیص ویروس X سیب زمینی تهیه گردید که به‌خوبی توسط آنتی‌سرم تولید شده از طریق تزریق پیکره‌های کامل ویروس به خرگوش در آزمون دات بلات شناسایی شد. به دلیل گسترش PVX در ایران و با توجه به خســارت اقتصــادی آن در نقاط مختلف، شــناســایی و ردیابی این ویروس با اســتفاده از روش‌های با صرفه‌تر ضروری است. 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. از این‌رو، این تحقیق با خالص‌سازی پروتئین پوششی نوترکیب ویروس PVX از باکتری *E. coli* و تولید آنتی‌بادی 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, EI-Attar AK, Gambley CF (2014) Production of polyclonal antisera to a recombinant coat protein of *Potato viruas Y* expressed in *Escherrichia 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/vide/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 map-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) Immunodiagnostics of *cucumber mosaic virus using* antisera developed against recombinant coat protein. Archives of Phytopathology and Plant Protection 45, 561-59.

Koening 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^{TM} - 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, cll 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.