مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۸
صفحه ۶۲-۵۱

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

همسانه‌سازی و بیان ژن پروتئین پوششی جدایه ایرانی ویروس لکه-برگی کلروتیک سیب (ACLSV) در باکتری *E. coli*

Cloning and expression of Iranian isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus* coat protein gene in *E. coli*

دانیال میرزایی[۱]، محمد حاجی‌زاده[۱*]، عبدالباسط عزیزی[۱] و داود کولیوند[۲]

Danyal Mirzaei[1], Mohammad Hajizadeh[2], Abdolbaset Azizi[2] and Davoud Koolivand[3]

۱-گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران

[1] Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

[2] Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.hajizadeh@uok.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۲۱)

چکیده

ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب (*Apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV*) یکی از ویروس‌های مهم درختان میوه دانه‌دار و هسته‌دار می‌باشد که گسترش جهانی دارد. هدف از این مطالعه، ساخت سازه بیانی و سپس بیان ژن پروتئین پوششی ((Coat Protein (CP)) ویروس لکه-برگی کلروتیک سیب در باکتری *Escherichia coli* می‌باشد. بیان پروتئین پوششی در سیستم پروکاریوتی، نیاز به خالص‌سازی ویروس از گیاه میزبان را که مستلزم وجود اولتراسانتریفوژ است، مرتفع می‌سازد. به منظور تولید پروتئین پوششی نوترکیب، جدایه SSa از میزبان سیب جداسازی و با آغازگرهای اختصاصیACLSV-MF وACLSV-MR ژن کامل پروتئین پوششی به طول ۵۸۲ جفت باز تکثیر شد. ژن کامل CP به حامل همسانه‌سازی pTG19 متصل و به باکتری *E. coli* سویه DH5α منتقل شد. باکتری‌های تراریخت شده با پلاسمید نوترکیب روی محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین، X-Gal و IPTG غربال و به روش تجزیه قلیایی استخراج گردیدند. این ژن در پلاسمید استخراج شده با آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I که محل اثر آنها در آغازگرها قرار داده شده بودند، برش و به حامل بیان(+)pET28a که با همین دو آنزیم برش داده شده بودند، اتصال داده شد. (+) pET28a حاوی ژن CP ویروس در باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) ترانسفورم و سپس القاء بیان CP با اضافه نمودن IPTG در غلظت نهایی 1mM پس از چهار ساعت در الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) بررسی شد. نتایج حاصل از SDS-PAGE حاکی از بیان پروتئین حدود ۲۶ کیلودالتونی مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس مذکور بود. بیان این پروتئین می‌تواند برای تولید آنتی‌بادی بر علیه ACLSV مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

آنتی‌بادی،
الکتروفورز،
بیان،
پروتئین نوترکیب،
همسانه‌سازی

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.6.2]

مقدمه

تشخیص صحیح و به‌موقع بیماری‌های گیاهی به ویژه بیماری‌های ویروسی، شرط اساسی در سیستم مدیریت خسارت بیمارگرها به محصولات کشاورزی محسوب می‌شود (Martinelli *et al.* 2015). در بیماری‌های ویروسی، تیمار گیاهان بعد از آلودگی به بیمارگرهای ویروسی منجر به کنترل موثر بیماری نمی‌شود بنابراین، اقدامات کنترلی باید قبل از وقوع آلودگی به کار برده شوند. کاشت مواد تکثیری گیاهی عاری از ویروس از موثرترین روش‌هایی است که توسط کشاورزان اتخاذ می‌شود (Stevens 1983). یکی از عوامل مهم برای صدور گواهی سلامت مواد تکثیری گیاهی دسترسی به روش‌های تشخیصی حساس و دقیق است (Makkouk and Kumari 2006). با توجه به شیوع و گسترش بیماری‌های ویروسی در جهان، مدیریت کنترل این عامل بیمارگر اهمیت به‌سزایی یافته است از این رو، تشخیص به موقع، دقیق و ارزان عامل بیماری نیازمند به‌کارگیری روشی مناسب دارد.

ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب (*Apple chlorotic leafspot virus*, ACLSV) در جنس *Trichovirus*، زیر خانواده *Trivirinae*، خانواده *Betaflexiviridae* و راسته *Tymovirales* قرار دارد (Adams *et al.* 2016). ژنوم ACLSV از یک مولکول RNA تک‌رشته‌ای مثبت با حدود ۷/۵ کیلوباز تشکیل شده است که شامل سه چارچوب ژنی (ORF) است که ORF1 برای پروتئین ۲۱۶ کیلودالتونی در ارتباط با تکثیر ویروس، ORF2 برای پروتئین حرکتی ۵۰ کیلودالتونی و ORF3 برای پروتئین پوششی ۲۲ کیلودالتونی کد می‌کند (Yoshikawa and Takahashi 1988; Sato *et al.* 1993). این ویروس در پایه‌های تجاری سیب بدون علائم بوده و فقط شامل کم رشدی و ضعف عمومی می‌باشد و بعد از چند سال ممکن است باعث خشکیدگی درخت شود (Park *et al.* 2006). ACLSV روی میزبان‌های گلابی و به بدون علائم می‌باشد (Wu *et al.* 2010). روی هلو این ویروس بیماری ساقه آبله دروغین با علائم شکاف روی پوست درخت، لکه‌های جوش مانند و نقوش کلروتیک روی برگ و میوه و جارویی شدن سرشاخه‌ها را ایجاد می‌کند و علاوه بر آن، باعث ناسازگاری بین پایه و پیوندک نیز می‌شود. در زردآلو این ویروس لکه‌های جوش مانند روی برگ و میوه (Polak *et al.* 2008) و در سایر هسته‌داران علائمی شبیه ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها ایجاد می‌کند (Rana *et al.* 2007). ویروس ACLSV در ژاپن به عنوان عامل بیماری سرشاخه‌کاری سیب شناخته شده است که ویروس ساقه آبله‌ای سیب نیز در ایجاد آن نقش دارد (Kinard *et al.* 1996). علائم ناشی از ACLSV ممکن است به واسطه آلودگی مخلوط با سایر ویروس‌های آلوده کننده درختان دانه‌دار یا هسته‌دار تشدید شود (Lister 1970; German-Retana *et al.* 1997). برای این ویروس ناقل بیولوژیکی شناخته نشده است (Lister *et al.* 1970) بنابراین، کاربرد مواد تکثیری سالم برای پیشگیری از این بیماری بسیار مهم است.

روش‌های مختلفی مانند گیاهان محک چوبی (EPPO 1999)، روش‌های سورلوژیکی (Paduch-Cichal and Tomala 2007) و مولکولی (Menzel *et al.* 2002) برای ردیابی ویروس‌های درختان میوه از جمله ACLSV استفاده شده است اما، جهت غربال‌گری در سطح وسیع روش سرولوژیک الایزا روشی معمول، معتبر و ارزان به حساب می‌آید (Spiegel *et al.* 1993). این روش مانند سایر روش‌های سرولوژیکی نیازمند تامین منبع آنتی‌ژن ویروسی برای استفاده در فرآیند تولید آنتی‌بادی است. در بسیاری از ویروس‌های گیاهی از ذرات ویروسی خالص شده از بافت‌های گیاه آلوده به عنوان آنتی‌ژن استفاده شده است اما، در برخی از ویروس‌های گیاهی تولید آنتی‌ژن فراوان و با کیفیت به علت غلظت پایین ویروس در بافت‌های گیاهی، مشکلات خالص سازی ذرات ویروسی با کیفیت بالا به دلیل حضور ترکیبات بازدارنده مانند پلی‌فنل‌ها، تانن‌ها و آلودگی با آنتی‌ژن‌های میزبان (Ling *et al.* 2000) به سهولت امکانپذیر نیست. بنابراین، به‌دست آوردن مقادیر کافی آنتی‌ژن خالص نیازمند روش‌های جایگزین می‌باشد که می‌توان از پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در سیستم باکتریایی به عنوان آنتی‌ژن در فرآیند تولید آنتی‌بادی استفاده نمود. برای مثال، بیان ژن پروتئین پوششی ویروس کوتولگی آلو (Abou-Jawdah *et al.* 2004)، ویروس وای سیب‌زمینی (Folwarczna *et al.* 2008)، ویروس ناهنجاری کوتولگی زرد

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.6.2]

کدوئیان (Livieratos *et al.* 1999) ویروس موزاییک خفیف گل مریم (Chen *et al.*, 2002) ویروس خراشک توتون (Voloudakis *et al.* 2004) ویروس موزاییک مخطط نیشکر (Hamadayanty *et al.* 2016)، ویروس پسوروز مرکبات (Salem *et al.*, 2018)، ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (Honnesh *et al.* 2018) و ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (Salimi *et al.* 2010) در سیستم پروکاریوتی انجام شده است. در مطالعاتی که در ایران انجام گرفته است می‌توان به بیان ژن پروتئین پوششی ویروس موزائیک زرد کدو (Gharibi *et al.* 2012) ویروس وای سیب‌زمینی (Sokhandan-Bashir *et al.* 2015b) ویروس موزائیک خیار (Koolivand *et al.* 2016) اشاره کرد. با این وجود، در مورد بیان پروتئین پوششی جدایه ایرانی ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب در *E. coli* علی‌رغم گسترش وسیع این ویروس در ایران (Keshavarz and Shams-Bakhsh, 2015; Alemzadeh *et al.*, 2016; Abtahi *et al.*, 2019) مطالعه‌ای انجام نشده است. هر چند، بیان ژن پروتئین پوششی جدایه هندی ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب انجام و با استفاده از آن آنتی‌بادی چند همسانه‌ای تهیه و با آزمون‌های DAS-ELISA و DTBIA کارایی اختصاصی آنتی‌بادی تهیه شده در ردیابی این ویروس در سیب و درختان هسته‌دار به اثبات رسید (Rana *et al.* 2011).

با بهینه‌سازی تولید پروتئین پوششی این ویروس در باکتری، تخلیص آن، تزریق به حیوان مناسب و تهیه آنتی‌بادی، می‌توان کیت تشخیص این ویروس را تهیه نمود تا امکان غربالگری ارزان و وسیع برای موسسات مختلف تهیه نهال و پیوندک در داخل کشور فراهم شود. بنابراین هدف از این پژوهش، بیان ژن پروتئین پوششی به عنوان قدم اول و اساسی در نیل به اهداف ذکر شده، ژن کامل پروتئین پوششی ACLSV تکثیر و به حامل همسانه‌سازی pTG19 متصل و در سویه DH5α باکتری *E. coli* به وکتور بیان pET28a(+) سویه Bl21(DE3) از همان باکتری انتقال، تا با بکارگیری فناوری دی‌ان‌ای نوترکیب برای تولید آنتی‌ژن در راستای تولید آنتی‌بادی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

منبع ویروسی: از نمونه سیب جمع‌آوری شده از اطراف سنندج و آلوده به ACLSV که بافت برگی آن در فریزر 40°C- برای مدت حدود یک سال نگهداری می‌شد، برای بیان ژن پروتئین پوششی نوترکیب آن در *E. coli* استفاده شد. این نمونه از میزبان سیب اطراف سنندج در سال ۱۳۹۶ نمونه‌برداری و علایم کلروتیک و بدشکلی در برگ را نشان می‌داد.

استخراج RNA و ساخت DNA مکمل: استخراج اسید نوکلئیک کل (TNA) با استفاده از روش سلیکا (Foissac *et al.* 2000) انجام شد. DNA مکمل با استفاده از کیت شرکت (GeneAll, South Korea) در حجم نهایی ده میکرولیتر با استفاده از آغازگرهای شش‌تایی تصادفی ساخته شد.

طراحی آغازگرها و تکثیر ژن کامل پروتئین پوششی: آغازگرها برای تکثیر ژن کامل پروتئین پوششی ACLSV براساس توالی های در دسترس در بانک ژن از جمله توالی مرجع این ویروس (NC_001409)، طراحی گردیدند. در قسمت '5 آغازگر مستقیم (ACLSV-MF:5'-A**GGATCC**ATGGCGGCAGTTCT-3') محل اثر آنزیم *Bam*HI و در آغازگر معکوس (ACLSV-MR:5'-A**CTCGAG**GTAAATGCAAAGATCAGTT-3') محل اثر آنزیم *Xho*I که این اثر روی پلاسمید بیان pET28a(+) هم قرار داشتند و از این طریق امکان اتصال ژن CP در پلاسمید بیان فراهم می‌شد، قرار داده شد. واکنش PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر با استفاده از آغازگرهای ذکر شده و سیکل‌های حرارتی، ۹٤°C به مدت ۲ دقیقه (یک سیکل)، ۹٤°C به مدت ۳۰ ثانیه، ٥٤°C به مدت ٤٥ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۱دقیقه (۳۵ سیکل) و ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه (یک سیکل) انجام شد. سپس، برای مشاهده قطعه‌کامل ژن پروتئین پوششی که طی واکنش PCR تکثیر شد از ژل آگارز ۱/۲ درصد استفاده شد.

خالص‌سازی قطعه DNA از ژل و اتصال به ناقل کلون pTG19: خالص سازی DNA ژن پروتئین پوششی ACLSV با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA از ژل (پیشگامان انتقال ژن، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای کلون

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.6.2]

کردن قطعات DNA تکثیر شده در PCR ، از حامل pTG19-T (شرکت ویوانتیس، مالزی) استفاده شد. جهت اتصال قطعه مورد نیاز از آنزیم T4 DNA Ligase استفاده شد. پلاسمید نوترکیب در سلول‌های مستعد ساخته شده با روش کلرید کلسیم (Panja *et al.* 2006; Shali *et al.* 2007) ترانسفورم و سوسپانسیون باکتری روی محیط کشت جامد LB حاوی (۵۰ mg/ml) X-Gal، (۰/۱ M) IPTG و آنتی‌بیوتیک (۱۰۰ mg/ml) به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷°C انکوبه شد. سپس، استخراج پلاسمید pTG-ACLSV-CP با روش لیز قلیایی (Green and Sambrook 2012) انجام شد.

تهیه سازه برای بیان ژن پروتئین پوششی ACLSV: با استخراج پلاسمید نوترکیب pTG-ACLSV-CP و همچنین وجود محل اثر آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I به ترتیب در آغازگرهای رو به جلو و معکوس، پلاسمید نوترکیب pTG-ACLSV-CP و پلاسمید pET28a(+) با دو آنزیم مذکور برش و خالص‌سازی قطعات مورد نظر با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA خالص شدند. در نهایت، دو قطعه خالص شده شامل ژن CP و پلاسمید pET28a(+) به هم متصل و سازه بیان pET 28a-ACLSV-CP به دست آمد. سازه بیان به دست آمده با استفاده از مراحل توضیح داده در میزبان باکتریایی *E. coli* سویه BL21(DE3) ترانسفورم شد.

القا کلون‌های نوترکیب برای تولید پروتئین پوششی ACLSV: کلون‌های باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب بیان ژن(pET28a-ACLSV-CP)، به طور جداگانه در پنج میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی کانامایسین(با غلظت نهایی ۱۰۰ mg/ml) به مدت شبانه کشت داده شدند. روز بعد، ۵۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی در شرایط استریل در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه مشابه حاوی آنتی‌بیوتیک درون ارلن تجدید کشت شد. زمانی که جذب نوریOD600 این محیط به ۰/۶ رسید ۱/۵ میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی به عنوان نمونه زمان صفر(درست قبل از القاء) برداشته و در یخچال نگهداری شد. سپس عمل القاء، با افزودن IPTG در غلظت یک میلی‌مولار صورت گرفت و رشد باکتری‌ها برای ٤ ساعت دیگر ادامه یافت. آنگاه از هر نمونه شامل نمونه‌ی زمان صفر پروتئین استخراج و در ۲۰°C- برای بررسی‌های بعدی با الکتروفورز و لکه گذاری وسترن ذخیره گردید.

استخراج پروتئین از باکتری: به منظور رسوب باکتری‌ها، نمونه-های باکتریایی به مدت پنج دقیقه در دمای ٤ درجه سلیوس در g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند و فاز رویی دور ریخته شد. پلت باکتریایی ایجاد شده با آب دیونیزه شستشو داده شد و سپس مقدار ۸۰ میکرولیتر از بافر TE و هم حجم آن بافر استخراج پروتئین (Tris-CL 50mM, glycerol 10%, SDS2%, Bromophenol blue 0.1%, Mercaptoethanol 100mM) به هر نمونه اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سلیوس در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ و به روی یخ منتقل شدند. سپس، با روش SDS-PAGE، بیان ژن مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت.

الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید حاوی سدیم دو دسیل سولفات: برای بررسی وزن مولکولی پروتئین‌های استخراج شده و بررسی وجود و یا عدم وجود پروتئین نوترکیب، پروتئین‌های استخراج شده با روش SDS-PAGE (Green and Sambrook 2012) الکتروفورز شدند. غلظت پنج درصد برای Stacking Gel (ژل متراکم کننده) و غلظت ۱۳/۵ درصد برای Running Gel (ژل جداکننده) استفاده گردید و رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی آبی استفاده شد. وزن مولکولی پروتئین بیان شده با استفاده از نشانگر پروتئین ExcelBand™ All Blue Regular Range Protein Marker 9-180 kDa (تهیه شده از شرکت SMOBIO تایوان) تعیین شد.

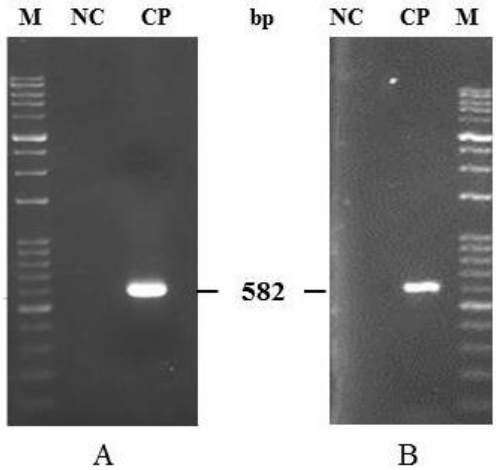
نتایج و بحث

نتایج حاصل از تکثیر ژن پروتئین پوششی ACLSV تکثیر شده در PCR: بعد از استخراج TNA از میزبان سیب جمع آوری شده و تبدیل آن به cDNA ، از یک جفت آغازگر اختصاصی(ACLSV-MF, ACLSV-MR) برای تکثیر قطعه‌ی مربوط به ژن کامل پروتئین پوششی (۵۸۲bp) استفاده شد که طی

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.6.2]

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطعه مورد نظر با اندازه ذکر شده پس از الکتروفورز در ژل آگارز قابل مشاهده بود ولی از نمونه‌ی منفی قطعه‌ای تکثیر نشد (شکل ۱- A). به دلیل اطمینان از عدم وجود قطعات غیر اختصاصی همراه با قطعه هدف، ژن CP از ژل خالص شد (شکل ۱- B).

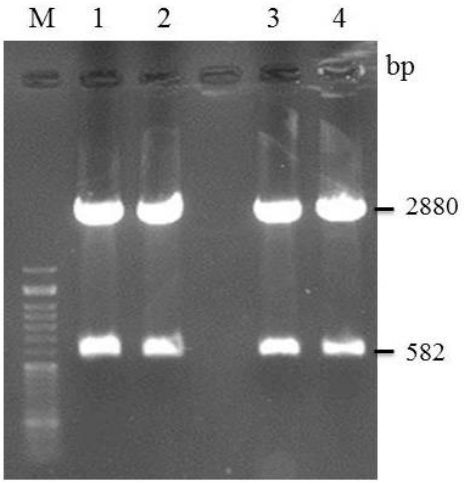


شکل۱- الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد تکثیر ژن پروتئین پوششی ACLSV با آغازگرهای اختصاصی ACLSV-MF و ACLSV-MR (شکل A) و تصویر آن پس از خالص‌سازی با کیت خالص‌سازی DNA. (شکل B). چاهک M: نشانگر DNA (Gene RulerTM DNA Ladder Mix 1Kb)، تهیه شده از شرکت فرمنتاس). چاهکNC: کنترل منفی و چاهک CP.

Figure 1- Electrophoresis of PCR product amplified by ACLSV-MF and ACLSV-MR primers. M: Marker (Gene Ruler^{TM} DNA Ladder Mix 1Kb), NC: Negative control, CP: Coat protein gene of ACLSV. A: PCR product amplified by ACLSV-MF and ACLSV-MR primers. B: PCR product purified by DNA gel Recovery Kit.

همسانه‌سازی ژن پروتئین پوششی ACLSV در ناقل pTG-19

پس از همسانه‌سازی قطعه ژن پروتئین پوششی ACLSV و با توجه به اندازه‌ی حامل pTG19-T (۲۸۸۰bp) و قطعه دی‌ان‌ای (۵۸۲bp) در سازه pTG-ACLSV-CP و همچنین محل اثر دو آنزیم *Bam*HI و *Xho*I که در دو انتهای دی‌ان‌ای خارجی قرار گرفته است، انتظار می‌رفت که پس از برش سازه pTG-ACLSV-CP با دو آنزیم مذکور، دو قطعه به اندازه‌های ۲۸۸۰bp (ناقل) و ۵۸۲bp (پروتئین پوششی ACLSV) مشاهده شود. بنابراین، از پلاسمیدهای نوترکیب مطلوب، مطابق انتظار دو قطعه به اندازه‌های تقریبی ۲۸۸۰bp و ۵۸۲ bp مشاهده شدند (شکل ۲).



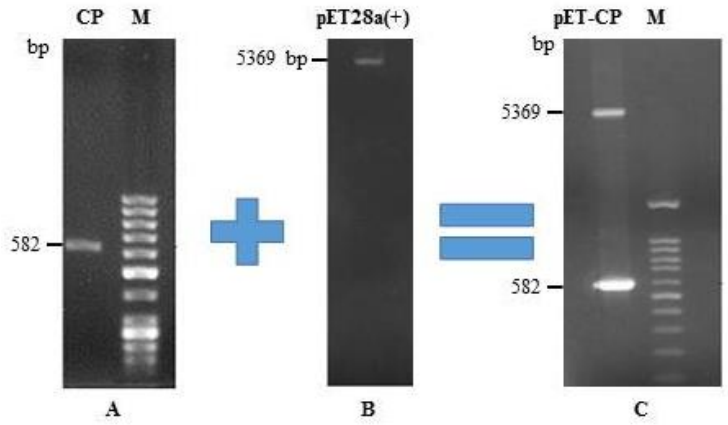
شکل ۲- الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد مربوط به برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTG-ACLSV-CP استخراج شده از کلنی‌های مختلف باکتری با دو آنزیم*Bam*H1 و *Xho*I ؛ چاهک M: نشانگر DNA ExcelBand™ 50 bp Ladder. چاهک‌های ۱ تا ٤: پلاسمیدهای نوترکیب همسانه‌سازی pTG-ACLSV-CP استخراج شده از کلنی‌های مختلف باکتری برش یافته با دو آنزیم *Bam*Hl و *Xho*I .

Figure 2- Agarose gel electrophoresis of pTG-ACLSV-CP double digested by *Bam*HI and *Xho*I. M: DNA ExcelBand^{TM} 50 bp Ladder, 1-4: Recombinant plasmids extracted from different clones and double digested by *Bam*HI and *Xho*I.

نتایج حاصل از ساخت سازه pET28a-ACLSV-CP: پس از اطمینان از وجود ژن پروتیئن پوششی در پلاسمید نوترکیب pTG-ACLSV-CP، این پلاسمید و پلاسمید بیان pET28a(+) با دو آنزیم مشابه *Bam*HI و *Xho*I مورد برش آنزیمی قرار گرفتند و پس از الکتروفورز در ژل آگارز، قطعات دی‌ان‌ای مدنظر شامل ژن پروتئین پوششی ACLSV به اندازه‌ی ۵۸۲ جفت باز (شکل ۳- A) و پلاسمید بیان pET28a(+) به اندازه‌ی ٥٦٣٩ جفت باز (شکل ۳- B) با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل خالص‌سازی شدند و اتصال این قطعات منجر به ساخت سازه pET28a-ACLSV-CP شد که با برش آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I مورد تایید قرار گرفت (شکل ۳- C).

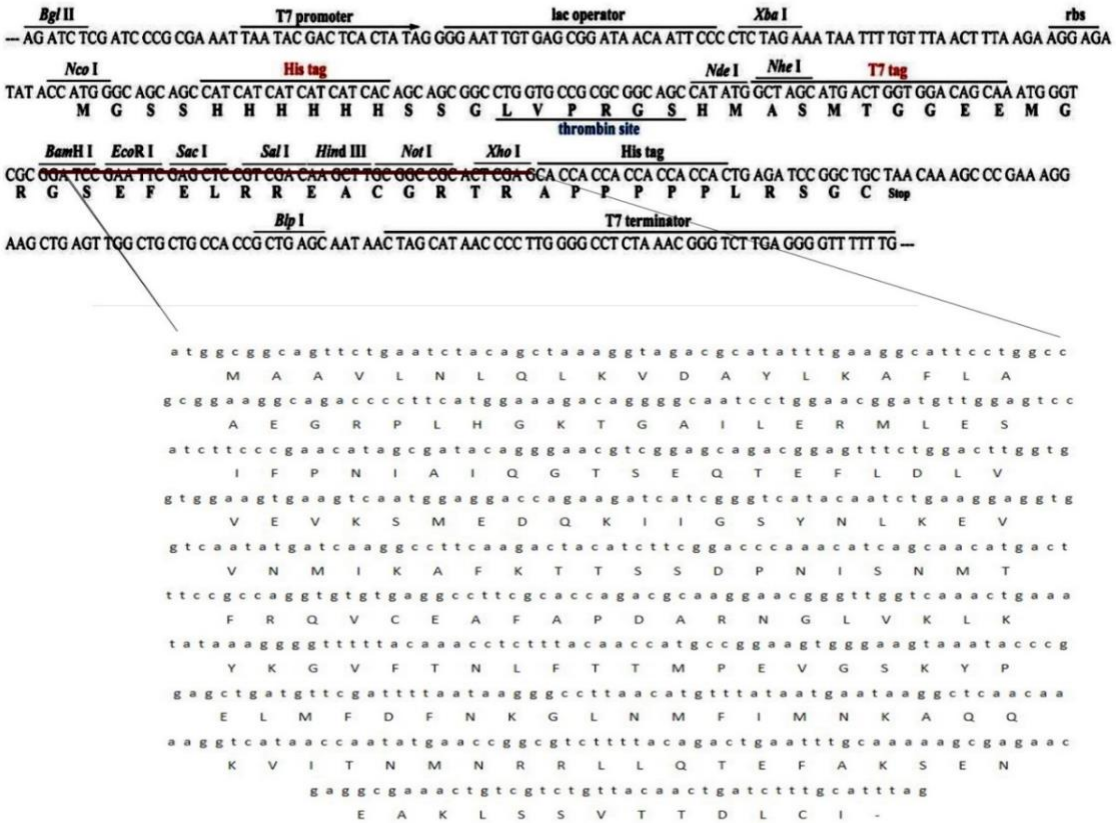
تعیین توالی سازه بیان ساخته شده: تعیین توالی قطعات قرار داده شده در پلاسمید بیان، برای بررسی صحت قرار گرفتن ژن مورد نظر در قاب مناسب، عدم جهش اساسی مانند حذف یا اضافه‌شدن نوکلئوتید که قاب و در نتیجه محصول پروتئینی را به طور کامل تغییر می‌دهد انجام گرفت.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.6.2]



شکل ۳- الکتروفورز دی‌ان‌ای‌های خالص‌سازی شده از ژل آگارز۱/۲ درصد ؛ چاهک‌های M: نشانگر ExcelBand™ 50 bp DNA Ladder. A: ژن پروتئین پوششی ACLSV خالص شده از ژل بعد از برش با دو آنزیم *Bam*HI و *Xho*I ، B: پلاسمید (+) pET28a خالص شده از ژل پس از برش با دو آنزیم *BamH*I و *Xho*I ، C: پلاسمید pET28a(+) حاوی ACLSV-CP.

Figure 3- Electrophoresis of purified DNA in 1.2% agarose gel. M: ExcelBandTM 50 bp DNA Ladder, pET: pET28a(+). A: Purified coat protein gene after digesting with *Bam*HI and *Xho*I, B: Purified pET28a(+) after digesting with *Bam*HI and *Xho*I, C: pET28a(+) with coat protein gene of ACLSV.



شکل ٤- محل‌های همسانه‌سازی چندگانه مربوط به پلاسمید (+) pET28a در قسمت بالا و توالی نوکلئوتیدی به دست آمده از ژن پروتئین پوششی ویروس لکه برگی کلروتیک سیب جدایه SSa در قسمت پایین، که توالی ژن با قسمت مشخص شده در MCS جایگزین گردید.

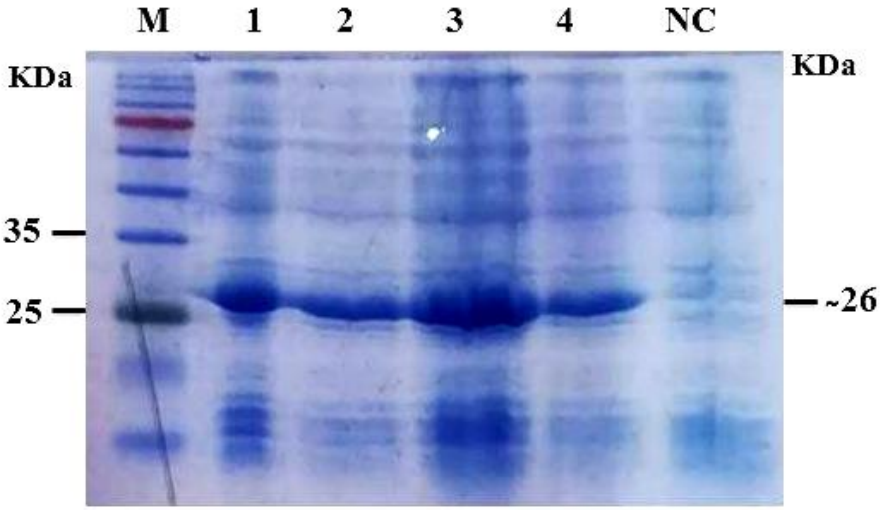
Figure 4- Multiple cloning site (MSC) of pET28a(+) (above) and coat protein (CP) gene sequences of ACLSV isolate SSa (below) which CP gene sequences replaced with the defined location in the MSC.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.6.2]

پس از بررسی توالی‌های مربوطه مشخص شد که ژن مورد نظر به درستی در قاب خواندنی پلاسمید قرار گرفته و قابلیت بیان را دارد (شکل ٤). مقایسه توالی آمینواسیدی ژن پروتئین پوششی جدایه SSa با توالی جدایه‌های ایرانی ٩٦/٣ تا ٩٩/٤ درصد و با سایر جدایه‌های مختلف این ویروس در بانک ژن ٨٩/٩ تا ٩٩/٤ درصد تشابه نشان داد. همچنین، در مقایسه با توالی آمینواسید سایر جدایه‌های این ویروس، جهش منحصر بفردی در پروتئین پوششی SSa که می‌توانست ناشی از مراحل کار بیان این پروتئین باشد، مشاهده نشد. توالی مربوط به ژن پروتئین پوششی جدایه SSa با شماره دسترسی MK354026 در بانک‌ژن ثبت شد.

نتایج حاصل از بیان پروتئین پوششی ACLSV با استفاده از SDS-PAGE: به منظور بررسی بیان پروتئین پوششی ACLSV، پروتئین‌های استخراج شده از کشت باکتری حاوی پلاسمیدهای بیان در SDS-PAGE الکتروفورز شدند. در الگوهای پروتئینی به دست آمده از باکتری‌های تراریخت شده با pET28a-ACLSV-CP ، پروتئین پوششی نوترکیب مورد انتظار با اندازه تقریبی ٢٦ کیلودالتون (٢١ کیلودالتون مربوط به پروتئین پوششی ACLSV و حدود ٥ کیلودالتون مربوط به برچسب‌های هیستیدینی 6X His-tag) چهار ساعت بعد از القاء مشاهده شد در حالی‌که در حالت قبل از القاء (نمونه شاهد) این باند پروتئینی مشاهده نشد (شکل ٥).



شکل ٥- نتایج بررسی بیان ژن پروتئین پوششی ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب در ژل SDS-PAGE. چاهک M : نشانگر پروتئین ExcelBand™ PM 2500 (تهیه شده از شرکت SMOBIO تایوان). چاهک‌های ١ تا ٤: پروتئین‌های استخراج شده از کلنی‌های مختلف باکتری *E. coli* سویه Bl21(DE3) تراریخت شده با pET28a(+) حاوی ACLSV-CP چهار ساعت پس ازالقاء با IPTG، NC: شاهد منفی (نمونه قبل از القاء با IPTG).

Figure 5- SDS-PAGE of extracted proteins from *E. coli* BL (DE3). M: Protein marker (ExcelBand™ PM 2500), 1-4: Extracted proteins from transformed cells by pET28a-ACLSV-CP 4 hour after induction by 1mM IPTG and NC: Extracted proteins from transformed cells by pET 28a-ACLSV-CP before IPTG induction.

با توجه به اینکه ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب باعث آلودگی‌های مهم در درختان دانه‌دار می‌شوند لذا، شناسایی سریع و به موقع آن به خصوص در نهال‌ستان‌ها برای جلوگیری از گسترش بیماری بسیار مهم است. روش‌های سرولوژیک برای شناسایی ویروس‌ها در مقیاس وسیع بسیار پرکاربرد است به ویژه در مورد ویروس‌های سیب که غنی از موارد بازدارنده است و کاربرد روش‌های مولکولی بدلیل اختلال در کار آنزیم‌ها با محدودیت‌هایی مواجه است (Rana *et al.* 2011). اساس آزمون‌های سرولوژیک برهمکنش بین آنتی‌بادی و آنتی ژن است (Emtiazi 2010) و تهیه آنتی‌بادی مناسب برای انجام این آزمون‌ها بسیار مهم است. تهیه آنتی‌بادی مناسب مستلزم در اختیار داشتن آنتی‌ژن خالص (پروتئین پوششی ویروس) است.

در بسیاری از ویروس‌های گیاهی از ذرات ویروسی خالص شده از بافت‌های گیاه آلوده به عنوان آنتی‌ژن استفاده شده است (Emtiazi 2010) اما، در برخی از ویروس‌های گیاهی تولید آنتی‌ژن فراوان و با کیفیت به علت غلظت پایین ویروس در

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.6.2]

بافت‌های گیاهی، مشکلات خالص سازی ذرات ویروسی با کیفیت بالا به دلیل حضور ترکیبات بازدارنده مانند پلی‌فنل‌ها، تانن‌ها و آلودگی با آنتی‌ژن‌های میزبان (Ling *et al*. 2000)، به‌دست آوردن مقادیر کافی آنتی‌ژن خالص با استفاده از خالص سازی ذرات ویروسی مشکل است و از تولید پروتئین پوششی نوترکیب در سیستم پروکاریوتی استفاده می‌شود. بنابراین، در این پژوهش امکان بیان پروتئین پوششی نوترکیب ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، برای تکثیر ژن کامل پروتئین پوششی آغازگرهایی طراحی شد که حاوی سایت برشی آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I بود که امکان اتصال به وکتور بیان را پیدا کند پس از انجام پی‌سی‌آر استاندارد، برای به دست آوردن دی‌ان‌ای خالص از ژن، استخراج DNA از ژل با استفاده از کیت صورت گرفت.

با توجه به برتری نسبی میزان بیان در میزبان باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3) نسبت به سایر سویه‌های مرسوم دیگرRosetta ، در این پژوهش از سویه BL21(DE3) استفاده شد. برای مثال، بیان پروتئین حرکتی ویروس برگ بادبزنی مو (*Gravevine fan leaf virus*) در سیستم پروکاریوتی توسط دو این دو سویه نشان داد که میزان بیان پروتئین حرکتی در سویهBL21 مقداری بیشتر از میزان بیان در سویه ی Rosetta بود (Koolivand *et al*. 2016) و در مطالعه دیگر، بیان ژن پروتئین پوششی ویروس تریستیزای مرکبات (*Citrus tristeza virus*) در سویه BL21(DE3) بیشتر از میزان بیان آن در Rosetta بود (Amiri Sadaghan *et al*. 2013). در بعضی مواقع اگر پروتئین بیش از حد بیان شود، برای میزبان سمی بوده و از آستانه تحمل میزبان عبورکرده و باعث از بین رفتن سلول میزبان می‌شود (Gupta *et al*. 1999) ولی چنین موردی برای بیان در سویه BL21(DE3) گزارش نشده است. همچنین در این پژوهش از پلاسمید بیان pET28a(+) استفاده شد که در عمده پژوهش‌ها برای تولید پروتئین نوترکیب در میزبان باکتری *E. coli* استفاده می‌شود. این پلاسمید بیان دارای برچسب‌های هیستیدینی 6X His-tag دربخش پایین دست و بالادست بوده که به تشخیص بهتر بیان پروتئین، خالص‌سازی و استخراج کمک می‌کند (Gulati-Sakhuja *et al*. 2009) و به همین علت در الکتروفورز پروتئینی اندازه پروتئین بیان شده بیشتر از اندازه واقعی پروتئین است. در این پژوهش با توجه به اندازه حدود ۲۱ کیلودالتونی پروتئین پوششی ACLSV و حدود ۵ کیلودالتون در ارتباط با دو برچسب هیستیدینی که به ابتدا و انتهای پروتئین اضافه می‌شوند، اندازه پروتئین به دست آمده حدود ۲۶ کیلو دالتون بود که نشان‌دهنده بیان صحیح پروتئین مورد نظر می‌باشد. ترسیم ساختار سه بعدی پروتئین پوششی ACLSV با استفاده از نرم افزار Phyre2 (Kelley *et al*. 2015) به صورت آنلاین انجام شد که بیانگر حضور ساختارهای آنتی‌ژنیک در سطح پروتئین مذکور بود. همچنین آنالیز این پروتئین به منظور پیش‌بینی اپی‌توپ‌های آن در پایگاه داده IEDB (https://www.iedb.org/)، حاکی از وجود اپی‌توپ‌های خطی و فضایی متعدد در ساختار پروتئین پوششی بود که نتایج این بررسی‌ها نشان دهنده خاصیت آنتی‌ژنیک و ایمنی‌زا بودن پروتئین پوششی ویروس بود.

عمده مشکلات در مورد بیان ژن های ویروس‌های گیاهی در سیستم پروکاریوتی مربوط به تشکیل اینکلوژن بادی‌ها پس از بیان می‌باشد که امکان محلول کردن و شکستن این نوع پروتئین دشوار و مستلزم به کار بردن مواد و تجهیزات می‌باشد تا بتوان آن‌ها را به صورت محلول در آورد، اما با وجود این مشکلات، بسیاری از محققین با بیان ژن‌های مورد نظر در سیستم پروکاریوتی حتی در صورت تشکیل اینکلوژن بادی نیز موفق به خالص سازی پروتئین و استفاده از پروتئین مذکور به عنوان ماده ایمنی‌زا شده‌اند (Kumari *et al*. 2001; Korimbocus *et al*. 2002; Čeřovská *et al*. 2006). در این تحقیق، با توجه به تشکیل و شدت باند پروتئینی مورد نظر در ژل (شکل ۵)، به نظر می‌رسد که اینکلوژن بادی تشکیل نشده و حداقل بخش عمده پروتئین پروششی ACLSV به صورت محلول بوده است. مثال‌های متعددی از محلول بودن کامل یا بخشی از پروتئین پوششی ویروس‌ها در سیستم بیانی *E. coli* گزارش شده است (Raikhy *et al*. 2007; Lee and Chang, 2008; Gulati-Sakhuja *et al*. 2009).

بر اساس نتایج حاصل از مطالعات پیشین، در این پژوهش از غلظت یک میلی‌مولار برای القاء پیشبر T7promoter در پلاسمید نوترکیب pET28a-ACLSV-CP و زمان انکوباسیون چهار ساعت بعد از القاء برای بیان استفاده شد. در گزارشی مبنی بر بی‌تاثیری

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.6.2]

افزایش غلظت IPTG برای تحریک بیان ژن در تهیه پروتئین پوششی نوترکیب ویروس موزاییک خیار(CMV)، غلظت۲-۰/۵ میلی‌مولار را مورد آزمایش قرار دادند که تاثیر معنی‌داری بر میزان بیان نداشت (Rostami *et al*. 2015). در پژوهش دیگر، برای تولید پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو از غلظت‌های مختلف ۱، ۲ و ٦ میلی‌مولارIPTG برای القاء استفاده شد که نتایج حاکی از عدم معنی‌داری در بین غلظت‌های مورد استفاده بود (Sokhandan-Bashir *et al*. 2015a). همچنین، طول مدت انکوباسیون برای بیان را در زمان‌های ٤، ٦ و ١٦ ساعت بعد از القاء مورد مطالعه قرار دادند که تفاوت معنی‌داری بین میزان پروتئین در زمان‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. در پژوهش دیگر، سه غلظت ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌مولار برای تلقیح و زمان انکوباسیون سوسپانسیون باکتریایی پس از القا را ۱، ۲، ۳ و ٤ ساعت در باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) مورد آزمایش قرار دادند که نتایج SDS-PAGE نشان داد که بهترین غلظت IPTG برای القاء یک میلی‌مولار و بهترین زمان انکوباسیون سوسپانسیون باکتریایی پس از القاء ۳ ساعت می‌باشد (Hamdayanty *et al*. 2016).

بنابراین، در این پژوهش سازه بیانی برای تولید پروتئین پوششی نوترکیب ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب ساخته شد و کارایی آن در تولید این پروتئین با روش SDS-PAGE مورد آزمون قرار گرفت که نشان‌دهنده بیان آن با غلظت مناسب بود. با استفاده از این سازه می‌توان پروتئین نوترکیب مذکور را در مقیاس وسیع و خلوص زیاد تولید و برای تولید آنتی‌بادی چند همسانه‌ای و تک-همسانه‌ای در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار داد. هرچند در مطالعات پیشین میزان حساسیت روش PCR در مقایسه با الایزا در ردیابی ACLSV، حدود هفتاد (Malan, 2014) تا صد برابر (Candresse *et al*. 1995) گزارش شده است اما هنوز الایزا در ردیابی ویروس‌ها و از جمله این ویروس در مقیاس زیاد به دلیل صرفه‌جویی در زمان و هزینه بسیار کاربرد دارد. علی‌رغم تنوع ژنتیکی نسبتا زیاد ویروس ACLSV، الایزا قادر به ردیابی جدایه-های این ویروس در تمام گروه‌های تبارزایی بود (Malan, 2014) که ممکن است به دلیل حفاظت شدگی نسبتا زیاد قسمت انتهای کربوکسیلی پروتئین پوششی باشد (Al Rwahnih *et al*. 2004).

منابع

Amiri Sadeghan A, Shams-Bakhsh M, Yakhchali B. 2013. Expression of *Citrus tristeza virus* coat protein gene in Escherichia coli. Journal of Crop Protection 2(4):387–393.

Candresse T, Lanneau M, Revers F, Grasseau N, Macquaire G, German S, Dunez J, Grasseau N, Malinowski T, Barba M, Hadidi A. 1995. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of Apple chlorotic leaf spot virus. Acta Horticulturae 386:136–147.

Čeřovská N, Filigarová M, Pečenková T. 2006. Production of polyclonal antibodies to a recombinant potato mop-top virus non-structural triple gene block protein 1. Journal of Phytopathology 154:422–427.

Chen YK, Goldbach R, Prins M. 2002. Inter- and intramolecular recombinations in the cucumber mosaic virus genome related to adaptation to alstroemeria. Virology 76:4119–4124.

Emtiazi G. 2010. Principles of molecular biology and genetic Engineering. Mani publishers. Iran.

EPPO. 1999. Certification schemes-Pathogen-tested material of Malus, Pyrus and Cydonia. EPPO Bulletin 29:239–252.

Foissac X, Savalle-Dumas L, Gentit P, Dulucq MJ, Candresse T. 2000. Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Faveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and

Abou-Jawdah Y, Sobh H, Cordahi N, Kawtharani H, Nemer G, Maxwell DP, Nakhla MK. 2004. Immunodiagnosis of *Prune dwarf virus* using antiserum produced to its recombinant coat protein. Journal of Virological Methods 121:31–38.

Abtahi F, Shams-Bakhsh M, Safaie N, Azizi A, Autonell CR, Ratti C. 2019. Incidence and genetic diversity of apple chlorotic leaf spot virus in Iran. Journal of Plant Pathology, in press.

Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ. 2016. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology 161:2921–2949.

Alemzadeh E, Katsiani AT, Efthimiou K, Katis NI. 2016. Occurrence of apple chlorotic leaf spot virus in apple and quince in Southern Iran. Journal of Plant Pathology 98(1):177.

Al Rwahnih M, Turturo, Minafra A, Saldarelli P, Myrta A, Pallas V, Savino V. 2004. Molecular variability of *Apple chlorotic leaf spot virus* in different hosts and geographical regions. Journal of Plant Pathology 86(2):117-122.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.6.2]

inosine containing primers (PDO RT-PCR). Acta Horticulture 357:52–59.

Folwarczna J, Plchova H, Moravec T, Hoffmeisterova H, Dědič P, Čeřovská N. 2008. Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of potato virus Y. Folia Microbiologica 53(5):438–442.

German-Retana S, Bergey B, Delbos RP, Candresse T, Dunez J. 1997. Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of *Apple chlorotic leaf spot trichovirus* (ACLSV). Archives of virology 142(4):833–841.

Green MR, Sambrook J. 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th edition, 1885 P.

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. Journal of Virological Methods 160: 29–37.

Gupta JC. Jaisani M. Pandey G. Mukherjee KJ. 1999. Enhancing recombinant protein yields in *Escherichia coli* using the T7 system under the control of heat inducible λPL promoter. Journal of Biotechnology 68:125–134.

Hamadayanty H, Hidayat SH, Damayanti TA. 2016. Expression of Recombinant *Sugarcane Streak Mosaic Virus* Coat Protein Gene in *Escherichia coli*. Hayati Journal of Biosiences 23:111–116.

Honnesh SH, Patil MS, Moger N, Savalgi VP, Rashmi LS, Bergi R. 2018. Cloning and expression of *Tomato leaf curl virus* coat protein gene in *E. coli*. International Journal of Current Microbiology Applied Science 7(4):141–151.

Gharibi Z, Ardakani M, Memari H, Safara S. 2012. Expression of recombinant *Zucchini yellow mosaic virus* coat protein gene in *Escherichia coli*. 3rd Iranian Agriculture Biotechnology Conference, 680. Iran, Ferdowsi University of Mashhad. (In Farsi with English abstract)

Kelley LA, Stefans Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nature Protocols 10:845–858.

Keshavarz T, Shams-Bakhsh M. 2015. Incidence and distribution of *Apple chlorotic leaf spot virus* in the main fruit growing areas of Iran. Archives of Phytopathology and Plant Protectection 48:306–312.

Kinard GR, Scott SW, Barnett OW. 1996. Detection of apple chlorotic leaf spot and apple stem grooving viruses using RT-PCR. Plant Disease 80(6):616–621.

Koolivand D, Sokhandan-Bashir N, Behjatnia SA, Jafari-Joozani R. 2016. Production of polyclonal antibody against *Grapevine fanleaf virus* movement protein expressed in *Escherichia coli*. Plant Pathology 32(5): 452–459.

Koolivand D, Sokhandan Bashir N, Rostami A, Pirniakan P. 2016. Purification and analysis of the antigenic properties of the expressed *Cucumber mosaic virus* coat protein in *Escher*ichia coli. Applied Plant Protection Research 5(1):93–102. (In Farsi with English abstract)

Korimbocus J, Preston S, Danks C, Barker I, Coates D, Boonham N. 2002. Production of monoclonal antibodies to *Sugarcane yellow leaf virus* using recombinant readthrough protein. Journal of Phytopathology 150:488–494.

Kumari S, Makkouk K, Katul L, Vetten H. 2001. Polyclonal antibodies to the bacterially expressed coat protein of *Faba bean necrotic yellows virus*. Journal of Phytopathology 149:543–550.

Lee SC, Chang YC. 2008. Performances and application of antisera produced by recombinant capsid proteins of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. European Journal of Plant Pathology 122:297–306.

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 Journal of Plant Pathology 106(4):301–309.

Lister RM. 1970. *Apple chlorotic leaf spot virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 30. Kew, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux.

Livieratos IC, Avgelis AD, Coutts RH. 1999. Molecular characterization of the cucurbit yellow stunting disorder virus coat protein gene. Phytopathology 89:1050–1055.

Makkouk K, Kumari S. 2006. Molecular diagnosis of plant viruses. Arab Journal of Plant Protection 24(2):135–138.

Malan SS. 2014. ELISA detection of *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) and *Apple mosaic virus* (ApMV) in comparison to RT-PCR detection and the determination of genetic variation of these virus species in South Africa. Master of Science Thesis, Stellenbosch, South Africa, 19–31.

Martinelli F, Scalenghe R, Davino S, Panno S, Scuderi G, Ruisi P, Villa P, Stroppiana D, Boschetti M, Goulart LR, Davis CE, Dandekar AM. 2015. Advanced methods of plant disease detection. Agronomy for Sustainable Development. 35:1–25.

Menzel W, Jelkmann W, Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods 99:81–92.

Paduch-Cichal E, Tomala K. 2007. Detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) and *Apple stem grooving virus* (ASGV) in different tissues of 'mutsu' apple cultivar trees by ELISA. Phytopathology 43:53–59.

Panja S, Saha S, Jana B, Basu T. 2006. Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. Journal of Biotechnology 127(1):14–20.

Park HL, Yoon JS, Kim HR, Baek KH. 2006. Multiplex RT-PCR assay for the detection of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* in infected Korean apple cultivars. The Plant Pathology Journal 22(2):168–173.

Polák J, Ravelonandro M, Kumar-Kundu J, Pívalová J, Scorza R. 2008. Interactions of *Plum pox virus* strain Rec with *Apple chlorotic leafspot virus* and *Prune dwarf virus* in field-grown transgenic plum Prunus domestica L., clone C5. Journal of Plant Protection Science 44:1–5.

Rana T, Chandel V, Hallan V, Zaidi AA. 2011. Expression of recombinant *Apple chlorotic leaf spot virus* coat protein in heterologous system: production and use in

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.6.2]

immunodiagnosis. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 20(1):138–141.

Raikhy G, Hallan V, Kulshrestha S, Zaidi A. 2007. Polyclonal antibodies to the coat protein of carnation etched ring virus expressed in bacterial system: production and use in immunodiagnosis. Journal of Phytopathology 155:616–622.

Rostami A, Sokhandan-Bashir N, Koolivand D, Hajizadeh M. 2015. Serological methods to confirm expression of coat protein gene from an Iranian isolate of *Cucumber mosaic virus* in *Escherichia coli*. Biotechnology and Health Sciences 2(2):e28253.

Salem R, Arif IA, Salama M, Osman GE. 2018. Polyclonal antibodies against the recombinantly expressed coat protein of the *Citrus psorosis virus*. Saudi journal of biological sciences 25(4):733–738.

Salimi M, Amini M, Shams-Bakhsh M, Safaei N. 2010. Expression of the movement and coat protein genes of tomato yellow leaf curl iran2 virus in *E. coli*. Journal of Biotechnology 150:480–480.

Sato K, Yoshikawa N, Takahashi T. 1993. Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus*. Journal of General Virology 74:1927–1931.

Sokhandan-Bashir N, Koolivand D, Behjatnia AA. 2015a. Preparation of polyclonal antibodies to *Grapevine fanleaf virus* coat protein expressed in *Escherichia coli*. Biotechnology 14(4):173–180.

Sokhandan-Bashir S, Poorsmaile M, Hajizadeh M. 2015b. Heterologous expression of potato virus Y coat protein, isolate Pot187. Iranian Journal of Biotechnology 13(4):48.

Spiegel S, Frison EA, Converse RH, 1993. Recent developments in therapy and virus-detection procedures for international movement of clonal germ plasm. Plant Disease 77:1176–1180.

Stevens WA. 1983. Plant Virus Disease Control. In: Virology of Flowering Plants. Tertiary Level Biology. Springer, Boston, MA.

Wu ZB. Ku HM. Chen YK. Chang CJ. Jan FJ. 2010. Biological and molecular characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus* causing chlorotic leaf spot on pear (*Pyrus pyrifolia*) in Taiwan. HortScience 45(7): 1073-1078.

Voloudakis A, Malpica C, Aleman-Verdaguer ME, Stark D, Fauquet C, Beachy R. 2004. Structural characterization of *Tobacco etch virus* coat protein mutants. Archives of Virology 149:699–712.

Yoshikawa N, Takahashi T. 1988. Properties of RNAs and proteins of Apple stem grooving and Apple chlorotic leaf spot viruses. Journal of General Virology 69:241–245.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.6.2]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

Cloning and expression of Iranian isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus* coat protein gene in *Escherichia coli*

Danyal Mirzaei[1], Mohammad Hajizadeh[1*], Abdolbaset Azizi[1] and Davoud Koolivand[2]

[1] Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
[2] Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
*Corresponding Author, Email:m.hajizadeh@uok.ac.ir

ABSTRACT

The *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) is among of the most common virus infecting pome and stone fruit trees around the world. The virus has spread throughout the world and has been reported in many hosts such as; apples, pears, peaches and cherries. The purpose of this study is to express the coat protein (CP) of ACLSV in *E. coli*. CP expression in *E. coli* has been developed to prepare antigen for antibody production without needs to purify the virus from infected plant. In this study, complete CP gene (582 bp) from an isolate of ACLSV (SSa) was amplified by specific primers, MF and MR. The amplified CP gene was ligated to TA cloning vector (pTG19-ACLSV CP) and transformed into *E. coli* strain DH5α. Transformed cells were selected on LB containing ampicillin, X-Gal and IPTG, and recombinant plasmids were confirmed by restriction analysis. Then, the pTG-ACLSV CP was sub-cloned into pET28a (+) as expression vector that digested by *Bam*Hl and *Xho*I restriction enzymes. Finally, the pET28a-ACLSV CP was transformed into *E. coli* strain BL21 by heat shock method. For ACLSV CP expression, the cells containing pET28a-ACLSV CP were induced by 1 mM of IPTG and the protein was extracted two and four hours after induction and analyzed in SDS-PAGE. The SDS-PAGE result showed that ACLSV CP have been expressed that is expected based on additional tags from plasmid.

Keywords: Antibody, Cloning, Expression, Recombinant protein, SDS-PAGE

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.6.2]