مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۲، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۲
صفحه ۸۰-۶۸

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3

DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023
Volume 12, Number 1, Pages: 68-80

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

تهیه آنتی‌بادی چند همسانه‌ای نوترکیب علیه ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب و بررسی کارایی آن

Preparation of recombinant polyclonal antibody against *Apple chlorotic leaf spot virus* and its efficiency

مریم افراشته[۱]، داود کولیوند*[۲]، محمد حاجی‌زاده[۳] و ناهید مسعودی[۴]

Maryam Afrashteh[1], Davoud Koolivand*[2], Mohammad Hajizadeh[3] and Nahid Masoudi[4]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، ۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۳- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۴- دانش آموخته دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

1. Master Graduated in Plant Pathology, 2. Associate Professor Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture University of Zanjan, Zanjan, Iran
3. Associate Professor in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
4. Ph.D. Graduated in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email
d.koolivand@gmail.com , Koolivand@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۵)

چکیده

یکی از ویروس‌های مهم آلوده‌کننده درختان میوه، ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) است. تهیه آنتی‌بادی و طراحی کیت الایزا و بیوسنسورها یکی از راهبردهای مفید در تشخیص زود هنگام عوامل بیماری‌زا در نمونه‌های با تعداد زیاد است. در همین راستا، تحقیق حاضر با هدف تولید آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای نوترکیب و طراحی کیت الایزا جهت ردیابی سریع ویروس لکه برگی کلروتیک سیب با استفاده از بیان در سیستم پروکاریوتی انجام شد. ابتدا، سازه pTG19-ACLSV-CP به باکتری *Escherichia coli* سویه DH5α منتقل و پس از تکثیر و استخراج پلاسمید نوترکیب، ژن پروتئین پوششی با استفاده از آنزیم‌های برشی خارج و درون پلاسمید بیان pET28(a) همسانه‌سازی گردید. سازه بیان pET28-ACLSV-CP ساخته شده به‌منظور بیان پروتئین، به باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3)منتقل شد. پس از بهینه‌سازی، بیان و استخراج پروتئین پوششی، نوار پروتئینی با اندازه تقریبی ۲۷ کیلودالتون چهار ساعت بعد از القاء مشاهده شد. سپس، پروتئین بیان شده به روش طبیعی با ستون Ni-NTA Agarose، خالص‌سازی شد. پروتئین خالص شده، به‌عنوان آنتی‌ژن به خرگوش ماده نژاد نیوزیلندی طی چهار مرحله تزریق شد. ایمنوگلوبولین‌ها با استفاده از کیت تخلیص IgG مبتنی بر پروتئین A از سرم خون به دست آمده از خرگوش‌های ایمن شده تخلیص شدند. کارایی ایمنوگلوبولین‌های خالص شده، نشان داد که کاربرد غلظت ۱:۱۰۰۰ آنتی‌بادی نوترکیب تهیه شده و نشاندار برای ردیابی آنتی‌ژن‌های موردنظر مناسب هستند. نتایج آزمون‌های مختلف نشان داد، آنتی‌بادی تولید شده جهت ردیابی ویروس لکه برگی کلروتیک سیب دارای اختصاصیت و کارایی مناسب است، و از این آنتی‌بادی‌ها می‌توان برای شناسایی این ویروس به منظور غربال درختان و یا نمونه‌های مشکوک استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

لکه‌برگی کلروتیک سیب،
پلاسمید،
بیان پروتئین،
ژن پروتئین پوششی،
خالص سازی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 1, 2023

Abstract

Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) is one of the most important viruses infecting fruit trees. Preparation antibodies, ELISA kit and, biosensors are one of the applicable strategies to rapid and efficient screen a number of viral samples. To aim, the recent study was conducted to raise recombinant polyclonal antibodies to rapid detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* by expressing coat protein gene in the prokaryotic system. First, the pTG19-ACLSV-CP was transformed to *E. coli* DH5α, the replicated plasmids were extracted and double digested was optimized by restriction enzymes, then the released fragment (Coat protein gene) was cloned into pET28 as an expression vector. Next, the expression construct (pET28a-ACLSV-CP) was transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3) to express the coat protein gene. After optimization of expression the transformed cells, a protein band an approximate size of 27 kDa (22 kDa for coat protein and about 5 kDa for histidine tags) was observed at four hours after induction. The recombinant protein was purified by native methods using Ni-NTA Agarose column, then purified proteins were injected into New Zealand female rabbits in four steps as antigen. IgGs were purified from serums raised from immunized rabbits using an IgG purification kit. The efficiency of purified IgGs was approved that a 1: 1000 concentration of recombinant anti-ACLSV-CP antibodies are efficient to detect the desired antigens. The results showed the raised antibodies have enough specificity to detect *Apple chlorotic leaf spot virus* in gardens and seedlings.

Keywords: ACLSV, Plasmid, Protein Expression, Coat Protein Gene, Purification

مقدمه

بیمارگرهای گیاهی در سراسر جهان اثرات مخربی برکیفیت و کمیت محصولات کشاورزی دارند. به همین دلیل، توسعه و کاربرد روش‌های سریع و موثر برای تشخیص زود هنگام و کنترل عوامل بیماری‌زا یک نیاز اساسی است (Naidu and Hughes, 2003). از مهم‌ترین و اساسی‌ترین شروط در سیستم مدیریت عوامل بیماری‌زای گیاهی، به ویژه بیماری‌های ویروسی، تشخیص سریع و دقیق بیمارگر است (Martelli *et al*., 1994). درختان میوه دانه‌دار و هسته‌دار تحت تاثیر بیمارگرهای ویروسی مختلفی قرار می‌گیرند که ویروس لکه برگی کلروتیک سیب (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) یکی از مهم‌ترین این ویروس‌ها در جهان است. این ویروس گسترش جهانی دارد و از کشورهای چین، ایالات متحده آمریکا، آلمان، ایتالیا، فرانسه، هلند، ترکیه، ژاپن، هندوستان، لهستان، کره جنوبی، ایران و یونان گزارش شده است (Li et al., 2000). میزبان‌های این ویروس شامل درختان سیب، گلابی، زالزالک، به، زردآلو، بادام، گیلاس، آلو، هلو و بسیاری از گونه‌های زینتی خانواده گل‌سرخیان است (Li *et al*., 2000). این ویروس در جنس *Trichovirus*، زیر خانواده *Trivirinae*، خانواده *Betaflexiviridae* و راسته *Tymovirales* قرار دارد (Adam *et al*., 2016). ژنوم ویروس به صورت آرای‌ای تک رشته‌ای مثبت و دارای سه چارچوب ژنی است، که ORF_1 پروتئین ۲۱۶ کیلودالتونی مرتبط با تکثیر ویروس، ORF_2 پروتئین حرکتی ۵۰ کیلودالتونی و ORF_3 پروتئین پوششی حدود ۲۲ کیلودالتونی را رمز می‌کند (Adam *et al*., 2016).

علایم ایجاد شده توسط ACLSV به استرین ویروس و نوع میزبان بستگی دارد، بطوریکه این ویروس در پایه‌های تجاری سیب بدون علایم بوده و علایم ایجاد شده شامل کم رشدی و ضعف عمومی است و بعد از چند سال ممکن است باعث خشکیدگی درخت شود (Park *et al*., 2006). در رقم‌های حساس سیب، علایم این ویروس به صورت لکه‌های کلروتیک، نقش حلقوی، بدشکلی برگ‌ها و میوه‌ها، کم رشدی و خزان زودرس مشاهده می‌شود. در فصل بهار لکه‌های نکروتیک در حاشیه شکوفه‌های آلوده مشاهده می‌شود (Rana *et al*., 2008) و روی گلابی و به کاملاً بدون علایم است (Salem *et al*., 2005). علایم ناشی از ویروس ممکن است به واسطه آلودگی مخلوط با سایر ویروس‌های آلوده‌کننده درختان دانه‌دار یا هسته‌دار تشدید شود که در این صورت علایم بصورت نکروز مشاهده می‌شود. این ویروس روی گیاه آلو بیماری *Pseudo plum pox* با علایم

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3]

شکاف روی پوست درخت، لکه‌های کلروتیک روی برگ و میوه را ایجاد می‌کند (Polark *et al*., 2008). همچنین این ویروس باعث ایجاد لکه‌های جوش مانند روی برگ و میوه زردآلو و ناسازگاری بین پایه و پیوندک در هلو می‌شود. در سایر هسته‌داران علایمی شبیه ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها *spot Prunus necrotic ring virus* (PNRSV) ایجاد می‌کند (Rana *et al*., 2008). از این رو تشخیص این ویروس به واسطه علایم و بدون بررسی‌های دقیق، بسیار دشوار و گمراه کننده است. برای این ویروس ناقل زیستی شناخته نشده است و به روش مکانیکی با پیوند انتقال می‌یابد. بنابراین، استفاده از مواد تکثیری سالم برای جلوگیری از شیوع و گسترش این بیماری بسیار مهم است (Park *et al*., 2006).

در دهه‌های گذشته به طور گسترده چندین روش سرولوژیکی همراه با روش‌های مولکولی برای شناسایی ویروس‌های گیاهی و غربال اولیه نمونه‌ها در حجم زیاد انجام شده است. از جمله این آزمون‌ها، آزمون الایزا است (Koolivand *et al*., 2016). اساس همه روش‌های سرولوژیکی متکی بر خصوصیات پوشش پروتئینی است. ذرات ویروس به‌دلیل داشتن شکل سه بعدی و اندازه‌ی خاص خود، آنتی‌ژن مناسبی را تشکیل می‌دهند که تزریق آن‌ها به سیستم گردش خون یک جانور خونگرم، تولید پادتن را در خون آن جانور تحریک می‌کند. از اختصاصی بودن واکنش‌های ویروس گیاهی و پادتن در بسیاری از آزمون‌ها به منظور نشان دادن وجود ویروس گیاهی و تعیین مشخصات آن‌ها می‌توان استفاده کرد (Hull, 2001). پروتئین‌های نوترکیب ویروسی بیان شده در سلول‌های باکتریایی دارای پتانسیل بالایی هستند که به عنوان منبع آنتی‌ژن برای تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی مورد استفاده قرار گیرند (Koolivand *et al*., 2016).

برای بسیاری از ویروس‌ها، آنتی‌بادی اختصاصی نوترکیب تولید شده است که از جمله ویروس‌هایی که اخیراً برای آن‌ها آنتی‌بادی تولید شده است می‌توان به ویروس چروکیدگی سیب زمینی شیرین (Thangaraj and Jayakrishnan, 2021)، ویروس کوتوله زرد پیاز (Kumar *et al*., 2021)، ویروس ساقه شیاری سیب (Bhardwaj *et al*., 2020) و ویروس تریستزا مرکبات (Kokane *et al*., 2020) در دنیا اشاره کرد. از جمله مطالعات صورت گرفته در ایران می‌توان به تولید آنتی‌بادی برای ویروس *Potato virus S* (Masoudi *et al*., 2019). ویروس *Chickpea chlorotic dwarf virus* (CpCDV) (Safarnejad *et al*., 2019)، ویروس *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) (Shibaei *et al*., 2018) ویروس موزاییک خیار (Koolivand *et al*., 2017) و ویروس برگ بادبزنی مو (Sokhandan-Bashir *et al*., 2015; Koolivand *et al*., 2016) اشاره نمود.

با توجه به اهمیت درختان سیب در ایران و غربال درختان و پایه‌ها و نشاهای آلوده تشخیص دقیق، سریع و در حجم زیاد و قابلیت انجام توسط کاربران از اهمیت بسزایی برخوردار است. در همین راستا، هدف از این پژوهش تهیه آنتی‌بادی اختصاصی چندهمسانه‌ای برای ویروس لکه برگی کلروتیک سیب با استفاده از بیان ژن پروتئین پوششی در یک سیستم حد واسط و طراحی کیت اختصاصی الایزا و تائید عملکرد اختصاصی آنتی‌بادی تولید شده است.

مواد و روش‌ها

منبع ویروس

به منظور تکثیر پلاسمید، سازه‌ی pTG19-ACLSV-CP (Mirzaei *et al*., 2019)، حاوی ژن کامل پروتئین پوششی ACLSV، در میزبان باکتریایی *E. coli* سویه DH5α با روش شوک حرارتی منتقل شد. به منظور استخراج پلاسمید از دو روش، استخراج به روش لیز قلیایی و کیت استخراج پلاسمید (GeneAll®, South Korea) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای تعیین کمیت و کیفیت پلاسمیدهای استخراج شده، نمونه‌ها در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. جهت اطمینان از وجود قطعه درون پلاسمید از PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس (جدول ۱) منطبق بر ژن کامل پروتئین پوششی انجام شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3]

جدول ۱– مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق منطبق بر ژن پروتئین پوششی کامل ویروس ACLSV

Table 1. the primer properties that used in this research corresponded to the complete coat protein gene of ACLSV

Primers name	Sequences	Reference
ACLSV-MF	5'-AGGATCCATGGCGGCAGTTCT-3'	Mirzaei *et al.*, 2019
ACLSV-MR	5'-ACTCGAGGTAAATGCAAAGATCAGTT-3'	

تهیه‌ی سازه برای بیان ژن پروتئین پوششی

پس از استخراج پلاسمید به دلیل وجود محل اثر آنزیم‌های *Bam*Hl و *Xho*I به ترتیب در آغازگرهای مستقیم و معکوس، سازه pTG19-ACLSV-CP و پلاسمید pET28a(+) با آنزیم‌های مذکور برش داده شدند. سپس، ژن کامل پروتئین پوششی ویروس ACLSV در پلاسمید pET28a(+) برش خورده و در چارچوب ژنی صحیح قرار داده شد. به منظور همسانه‌سازی ژن پروتئین پوششی در حامل بیان، مخلوطی از واکنش حامل بیان ژن و قطعه ژن پروتئین پوششی در حضور آنزیم T_4 DNA Ligase و بافر اتصال در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر تهیه شد. واکنش اتصال به مدت یک ساعت در دمای ۲۲ درجه سلسیوس در ترموسایکلر انجام و به مدت یک شب در دمای چهار درجه سلسیوس یخچال قرار داده شد و محصول به‌دست آمده جهت انتقال به سلول‌های باکتریایی *E. coli* سویه BL21(DE3) مورد استفاده قرار گرفت.

بیان ژن پروتئین پوششیACLSV در سیستم پروکاریوتی

برای بیان ژن پروتئین پوششیACLSV، پلاسمید نوترکیب pET28-ACLSV-CP در میزبان باکتریایی *E.coli* سویه BL21(DE3) با روش شوک حرارتی در حضور آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۰/۱ g/L) منتقل شد. استخراج پلاسمید نوترکیب pET28-ACLSV-CP به روش لیز قلیایی صورت گرفت و برای تایید سازه صحیح آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی منطبق بر ژن پروتئین پوششی ویروس انجام شد. به منظور اطلاع از صحت درج قطعه و حفظ قاب خواندنی تعیین توالی توسط T7 Promoter و T7 Terminator انجام شد.

پرگنه باکتریایی مربوط به سویه BL21(DE3)، حاوی پلاسمید نوترکیب pET28-ACLSV-CP در پنج میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت ۱۰۰ µg/ml به مدت یک شب در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس با دور ۲۰۰ دور در دقیقه (rpm) کشت داده شد. سپس به نسبت ۱:۱۰ در محیط کشت LB مایع رقیق شده و به منظور رسیدن به غلظت مناسب (OD_{600nm} 0.5) روی شیکر انکوباتور قرار داده شد. ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی به عنوان نمونه‌ی زمان صفر (قبل از القاء IPTG) برداشته شد، سپس القاء با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر IPTG (غلظت نهایی یک میلی‌مولار) به ارلن حاوی محیط باکتریایی انجام شد و جهت بیان پروتئین نوترکیب روی انکوباتور لرزان و دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از چهار ساعت، باکتری با سانتریفوژ استحصال شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

استخراج پروتئین از باکتری

رسوب باکتریایی در ۱۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج پروتئین (NaH_2PO_4 50mM, NaCl 300mM, Tris-Hcl 20mM, Imidazole 10mM) به حالت سوسپانسیون درآورده شد و بر اساس روش Green and Sambrook (2012) استخراج پروتئین بصورت Native انجام شد. این نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در آب جوش و ۱۵ دقیقه در فریزر ۷۰- قرار داده شدند. سپس ۴۰-۲۰ میکرولیتر از آن در SDS-PAGE بررسی شد. برای بررسی وزن مولکولی پروتئین نوترکیب، پروتئین‌های استخراجی به روش الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) الکتروفورز شدند (Green and Sambrook, 2012). 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 فرمانتاس Unstained protein marker تعیین شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3]

خالص‌سازی پروتئین بیان شده

برای خالص‌سازی پروتئین از ستون‌های حاوی رزین- نیکل (Ni-NTA) استفاده شد. بدین صورت که از همسانه‌ی مورد نظر یک پرگنه باکتری *E. coli* حاوی پلاسمیدهای نوترکیب pET28-ACLSV-CP در پنج میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد. سپس، رقیق‌سازی کشت شبانه در ۱۰۰میلی‌لیتر محیط LB مایع انجام شد. چهار ساعت پس از تلقیح توسط IPTG، رسوب باکتریایی پس از سانتریفوژ در ۶۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری شد. سپس مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت به ازای رسوب حاصل از هر ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی دو میلی‌لیتر بافر اتصال به رسوب ته‌نشین اضافه شد و سوسپانسیون تهیه شد. سپس لیزوزیم با غلظت نهایی یک میکروگرم در میلی‌لیتر به سوسپانسیون حاصل اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از سپری شدن مدت زمان مذکور سوسپانسیون تهیه شده درون لوله‌های دو میلی‌لیتری ریخته شده و در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و فاز رویی برای استفاده در ستون Ni-NTA به کار برده شدند. در مرحله آخر بافر رهاسازی طی چهار مرحله درون ستون ریخته شد و فاز محلول خارج شده از قسمت پایینی ستون در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری جمع‌آوری شدند. پس از تعیین غلظت پروتئین‌های تخلیص شده در مراحل قبل، غلظت مناسب از پروتئین تخلیص شده به عنوان آنتی‌ژن برای ایمنی‌زایی استفاده شدند.

ایمنی‌زایی خرگوش با استفاده از پروتئین خالص شده

جهت انجام تزریق از دو عدد خرگوش ماده نیوزیلندی با وزن تقریبی دو کیلوگرم که از انستیتو پاستور 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 و 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 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 از قلب خرگوش 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 آن یک شب در یخچال قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان مورد نظر سانتریفوژ در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه انجام و سرم خون جدا شد و برای بررسی ایمنی‌زایی از سرم تهیه شده رقت‌های مختلف در بافر فسفات سالین (PBS) (۱:۵۱۲ تا ۱:۶۵۵۳۶) آماده شد و آزمون PTA-ELISA با رقت‌های مختلف انجام گرفت. پس از بررسی سرم‌های حاصل از خرگوش‌های ایمن شده، خالص‌سازی ایمنوگلوبولین G با استفاده از کیت Protein A IgG Purification Kit مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Thermo scientific, USA) انجام شد. برای بررسی IgGهای تخلیص شده از الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید استفاده شد. جهت نشان‌دار کردن IgGهای تخلیص شده با استفاده از آنزیم آلکالین فسفاتاز (EasyLink Alkaline phosphatase Conjugation Kit) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Abcam, USA) عمل شد. در همین راستا، ابتدا پنج میکرولیتر محلول EL-Modifier به ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی خالص شده اضافه شد و سپس محلول تهیه شده درون میکروتیوپ حاوی آنزیم آلکالین فسفاتاز (EL-AP) ریخته شد و به خوبی مخلوط و سوسپانسیون تهیه شد. پس از آن، سوسپانسیون تهیه شده به مدت یک شب در دمای اتاق (دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس) قرارداده شد. سپس، به ازای هر ۱۰ میکرولیتر از محلول سوسپانسیون شده یک میکرولیتر از EL-quencher اضافه شد. پس از انجام این مرحله، آنتی‌بادی نشاندار شده تهیه شده پس از نیم ساعت قابل استفاده است. در نهایت آنتی‌بادی‌های نشان‌دار شده در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند .پس از تهیه آنتی‌بادی اختصاصی نشان‌دارشده، به منظور بررسی کارایی کانجوگیت‌های تهیه شده از سنجش الایزای مستقیم و غیر مستقیم استفاده شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3]

بررسی کارایی آنتی بادی‌ها

الایزای غیر مستقیم

به منظور بررسی کارایی ایمنوگلوبولین‌های تخلیص شده الایزای غیر مستقیم مطابق روش زیر انجام شد: ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن مناسب هر آزمون در سه چاهک به عنوان سه تکرار ریخته شدند. در این آزمون نیز از شاهد مثبت (نمونه آلوده بهACLSV)، منفی (نمونه برگ گیاه سالم)، پروتئین بیان شده در باکتری و سه چاهک خالی برای بررسی کیفیت سوبسترا استفاده شد. تشتک الایزا بعد از پوشانیده شدن با پارافیلم، به مدت یک شب درون یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد. روز بعد، آنتی‌ژن‌ها دور ریخته شدند و چاهک‌ها سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه با استفاده از بافر PBST شستشو داده شدند. سپس هر یک از چاهک‌های واکنش با استفاده از بافر مسدود کننده پر شدند. سطح تشتک با پارافیلم پوشانیده شده و به مدت ۲٤ ساعت در دمای چهار درجه سلسیوس (درون یخچال) قرار داده شد. سپس مسدود کننده دور ریخته شده و چاهک‌ها مثل قبل شستشو داده شدند. ۱۰۰ µl از آنتی‌بادی تخلیص شده به نسبت ۱:۱۰۰۰ در بافر پوششی رقیق شده و در هر چاهک ریخته شد و تشتک الایزا بعد از پوشانیده شدن با پارافیلم، به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شد. بدنبال آن، محلول ایمنوگلوبولین رقیق شده جمع‌آوری گردید و چاهک‌ها مثل قبل مورد شستشو قرارگرفتند. سپس ۱۰۰ µl کانجوگیت عمومی (AP-conjugated) به هر چاهک افزوده شد و تشتک الایزا پس از پوشانیده شدن با پارافیلم در دمای ۳۷°C به مدت چهار ساعت نگهداری شد. پس از جمع‌آوری کانجوگیت چاهک‌ها با بافر شستشو، شستشو داده شدند و سوبسترای p–نیتروفنیل 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.

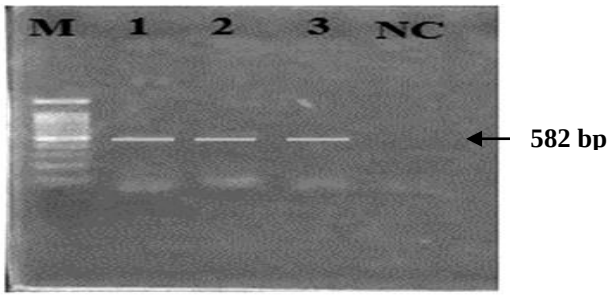
الایزای مستقیم

به منظور بررسی کارایی ایمنوگلوبولین‌های تخلیص شده الایزای مستقیم مطابق روش زیر انجام شد: ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی رقیق شده تهیه شده در بافر پوششی به نسبت ۱:۱۰۰۰ در چاهک‌ها در سه تکرار ریخته شد. سپس، تشتک الایزا بعد از پوشانیده شدن با پارافیلم، به مدت دو ساعت در دمای ۳۷°C نگهداری شد. پس از جمع‌آوری آنتی‌بادی‌ها، چاهک‌ها سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه با استفاده از بافر PBST شستشو داده شدند. سپس درون هر یک از چاهک‌ها آنتی‌ژن مورد نظر به میزان ۱۰۰ میکرولیتر ریخته شد و تشتک به مدت یک شب در دمای چهار درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از شستشو مانند مرحله قبل، ۱۰۰ µl کانجوگیت عمومی (Sigma-(AP-conjugated Aldrich, USA)به نسبت ۱:۱۰۰۰ به هر چاهک افزوده شد و تشتک الایزا پس از پوشانیده شدن با پارافیلم در دمای ۳۷°C به مدت چهار ساعت نگهداری شد. پس از جمع‌آوری کانجوگیت چاهک‌ها با بافر شستشو، شستشو داده شدند و سوبسترای p–نیتروفنیل فسفات مورد استفاده قرار گرفت و پس از توقف واکنش با اضافه کردن محلول توقف (NaOH) سه مولار میزان تغییر رنگ چاهک‌ها (جذب نوری در طول موج ٤۰۵ نانومتر) مورد سنجش قرار گرفت. بعد از حداکثر ۱۵ دقیقه غشاء نیتروسلولزی 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

نتایج ترانسفورماسیون همسانه pTG19-ACLSV-CP در باکتری *E.coli* سویه DH5α حاکی از رشد پرگنه‌های سفید روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین بود. در آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس لکه برگی کلروتیک سیب، منطبق بر ژن پروتئین پوششی، و پلاسمید استخراج شده از پرگنه‌های رشد کرده در مرحله قبل، یک قطعه DNA به طول حدود ۵۸۲ جفت باز تکثیر شد. که این اندازه مطابق با طول ژن کامل پروتئین پوششی ویروس لکه برگی کلروتیک سیب است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3]



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR با جفت آغازگرهای ACLSV-MF و ACLSV-MR. چاهک M: مارکر Lambda DNA. چاهک NC: کنترل منفی. چاهک ۱، ۲ و ۳: محصول PCR تکثیر یافته از پلاسمید استخراج شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی ACLSV.

Fig 1. Electrophoresis of PCR products with ACLSV-MF and ACLSV-MR primers. M: Lambda DNA marker. NC: Negative control. 1, 2 and 3: PCR products amplified from plasmid extracted using specific primers of ACLSV protein gene.

برش آنزیمی حامل بیانی pET32a(+) و سازه‌ی pTG19-ACLSV-CP

جهت اتصال قطعه ژن پروتئین پوششی به حامل بیانی pET28a(+)، نیاز به خطی شدن پلاسمید بیانی و جداسازی قطعه ژن پروتئین پوششی از پلاسمید pTG19 بود. پس از برش آنزیمی توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I قطعه‌ای به طول ۵۳۷۰ bp مربوط به حامل بیانی که حاکی از خطی شدن این پلاسمید بود در نمونه پلاسمید.pET28a (+) مشاهده شد. همچنین در برش سازه‌ی pTG19-ACLSV-CP ، پس از برش با آنزیم‌های مذکور قطعه‌ای به طول ۲۸۸۰ bp مربوطه به پلاسمید pTG19 و قطعه دیگری به اندازه حدود ۵۹۰ bp که نشان دهنده جداسازی ژن پروتئین پوششی بود مشاهده شد. نتایج الکتروفورز پلاسمیدهای برش یافته حاکی از خطی شدن پلاسمید بیانی pET28a(+) و رها سازی ژن پروتئین پوششی ACLSV-CP از حامل pTG19 بود.

همسانه‌سازی ژن نوکلئوکپسید ACLSV-CP به حامل بیانی pET28a(+)

پس از استخراج قطعه مورد نظر و حامل بیانی از ژل آگارز، همسانه‌سازی قطعه مورد نظر طی واکنش اتصال به حامل بیانی pET28a(+) صورت گرفت. سپس محصول نوترکیب جهت بررسی اتصال صحیح قطعه به حامل بیانی، به سلول مستعد *E.coli* سویه DH5α انتقال یافت. با توجه به اینکه پلاسمید بیان pET28a (+)دارای نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین است، پس از کشت سلول‌های باکتریایی تراریزش شده با پلاسمید بیانی نوترکیب روی محیط LB جامد حاوی کانامایسین، سلول‌های پذیرنده پلاسمید نوترکیب به صورت پرگنه‌های سفید روی این محیط کشت رشد یافتند.

تایید همسانه سازی قطعه در حامل بیان با آزمون پی‌سی‌آر کلونی

صحت همسانه‌سازی قطعه ژن نوکلئوکپسید ACLSV-CP در حامل بیانی pET28a(+)، و تشخیص پرگنه‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب جهت بررسی نتیجه تراریزش در آزمون کلونی پی‌سی‌آر تایید شد. الکتروفورز محصول نوترکیب روی ژل آگارز، پرگنه صحیح همسانه‌سازی ژن ACLSV-CP را در حامل بیانی pET28a(+) و تکثیر قطعه ژن پروتئین پوششی به اندازه حدود bp ۵۹۰ را نشان داد.

تایید وجود ژن در حامل بیانی از طریق برش آنزیمی

برای تایید بیشتر وجود ژن پروتئین پوششی در حامل بیانی استخراج پلاسمید از پرگنه‌های مثبت صورت گرفت و با آنزیم-های *Bam*HI و*Xho*I برش داده شدند. پس از انجام الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد، قطعه‌ای حدود bp ۵۹۰ مربوط به ژن پروتئین پوششی که از حامل بیانی pET28a (+) رها گردید، مشاهده شد (شکل۱).

تایید توالی سازه بیانی ساخته شده

پس از اتصال قطعه ژن پروتئین پوششی به حامل بیان pET28a (+) و تایید وجود ژن از طریق برش آنزیمی، برای بررسی صحت قرار گرفتن ژن مورد نظر در قاب خوانش صحیح، از توالی‌یابی استفاده شد. نتیجه توالی‌یابی نشان داد که که ژن موردنظر به درستی در قاب خواندنی پلاسمید قرار گرفته و قابل بیان است.

تراریزش حامل بیانی اتصال یافته با قطعه دی‌ان‌ای مورد نظر در باکتری *E.coli* سویه بیانی BL21(DE3)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3]

با توجه به اینکه حامل بیانی (+) pET28a، دارای نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین است، پس از کشت سلول‌های باکتریایی BL21(DE3) تراریزش شده با پلاسمید نوترکیب pET28-ACLSV-CP روی محیط کشت جامد LB، آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۱۰۰µg/ml) استفاده شد. سلول‌های پذیرنده پلاسمید نوترکیب pET28-ACLSV-CP روی محیط کشت به صورت پرگنه‌های سفید مشاهده شدند.

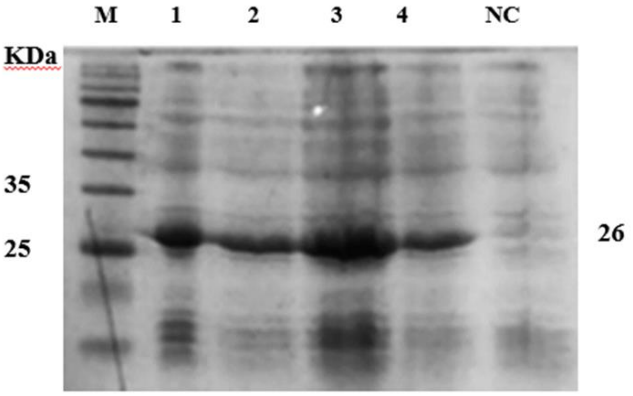
واکنش کلونی پی‌سی‌آر، درج صحیح قطعه ژن پروتئین پوششی را در حامل بیانی، در باکتری را تایید کرد و نتایج در ژل آگارز حاکی از همسانه‌سازی صحیح قطعه bp ۵۹۰ ژن پروتئین پوششی در حامل بیانی بود. همچنین شاهد منفی (کنترل منفی)، پلاسمید بیانی (+) pET28a، بدون قطعه ژن پروتئین پوششی، در نظر گرفته شد که نشان داد حامل بیانی (+) pET28a بدون قطعه ژن پروتئین پوششی، به عنوان شاهد منفی، بدون باند است.

نتایج حاصل از بیان ژن پروتئین پوششی ACLSV

به منظور بررسی بیان پروتئین پوششی ACLSV، پروتئین‌های بیان شده در ژل پلی آکریل آمید الکتروفورز شدند. در الگوهای پروتئینی به دست آمده از باکتری‌های ترانسفورم شده با pET28-ACLSV-CP، پروتئین پوششی نوترکیب مورد انتظار با اندازه تقریبی ۲۷ کیلودالتون (۲۲ کیلو دالتون مربوط به پروتئین پوششیACLSV و حدود ۵ کیلودالتون مربوط به برچسب‌های هیستیدینی tag-6X His) چهار ساعت بعد از القاء IPTG مشاهده شد در حالی‌که در نمونه باکتری دارای پلاسمید pET28-ACLSV-CP در زمان صفر (قبل از القا با IPTG) این باند پروتئینی مشاهده نشد. اندازه پروتئین به دست آمده حدود ۲۷ کیلو دالتون نشان‌دهنده بیان پروتئین مورد نظر می‌باشد (شکل ۲).

نتایج حاصل از آزمون ELISA برای تایید بیان پروتئین پوششیACLSV

نتایج این آزمون نشان داد، پروتئین پوششی این ویروس با غلظت زیادی در باکتری بیان شده است و آنتی‌بادی اختصاصی ویروس ACLSV می‌تواند آن را در محلول پروتئین استخراج شده از باکتری تراریخت ردیابی کند. در حالی که در چاهک‌های حاوی پروتئین استخراج شده از باکتری *E.coli* فاقد حامل pET و نیز باکتری*E.coli* دارای حامل pET28a و فاقد قطعه خارجی، تغییر رنگی مشاهده نشده است و جذب نوری آن‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر تفاوت معنی‌داری با چاهک حاوی پروتئین بیان شده دارد.

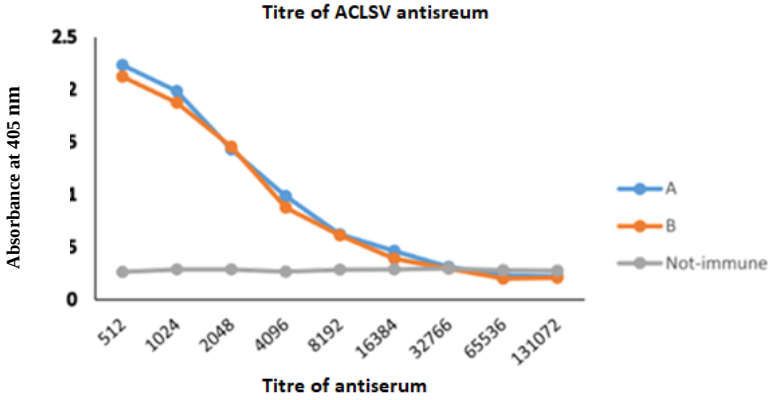


شکل۲- نتایج بررسی بیان ژن پروتئین پوششی ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب در ژل SDS-PAGE. چاهک M : مارکر پروتئین(فرمانتاس Unstained protein marker). چاهک‌های ۱تا ٤: پروتئین‌های استخراج شده از کلنی‌های مختلف باکتری *E. coli* استرین Bl21(DE3) ترنسفورم شده باpET28a+ حاوی ACLSV-CPچهار ساعت پس ازالقاء با IPTG، NC: شاهد منفی (نمونه صفر قبل از القاء با IPTG).

Fig 2 . Results of the expression of the coat protein gene of *Apple chlorotic leaf spot virus* in SDS-PAGE gel well: M protein Unstained protein marker. Wells 1 to 4: Extracted proteins from different colonies of *E. coli* strain Bl21 (DE3) transformed with pET28a + containing ACLSV-CP four hours after IPTG induction: NC negative control (sample zero before IPTG induction).

تعیین عیار آنتی‌سرم: به منظور تعیین عیار آنتی‌سرم‌های تهیه شده آزمون الایزای غیرمستقیم انجام شد. نتایج در این آزمون نشان داد غلظت ۱:۳۲۷٦٦ در مورد پروتئین پوششی ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب مطابق نتایج جذب نوری در مقایسه با سرم تهیه شده از خرگوش بدون تزریق آنتی‌ژن حاصل شد. نتایج حاصل از جذب نوری در آزمون الایزای غیر مستقیم با استفاده از سرم تهیه شده علیه پروتئین نوترکیب بیان شده در باکتری در مقایسه با نمونه سرم غیر ایمن در نمودار۱ قابل مشاهده هست.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3]



شکل ۳- تعیین عیار آنتی‌سرم با آزمون الایزای غیر مستقیم تهیه شده در خرگوش در برابر پروتئین پوششی نوترکیب (غلظت پروتئین استفاده شده در هر چاهک ۱ میکرو گرم بر میلی لیتر).A : خرگوش ۱، B: خرگوش ۲، Not-immune: خرگوش سالم بدون تزریق آنتی‌ژن

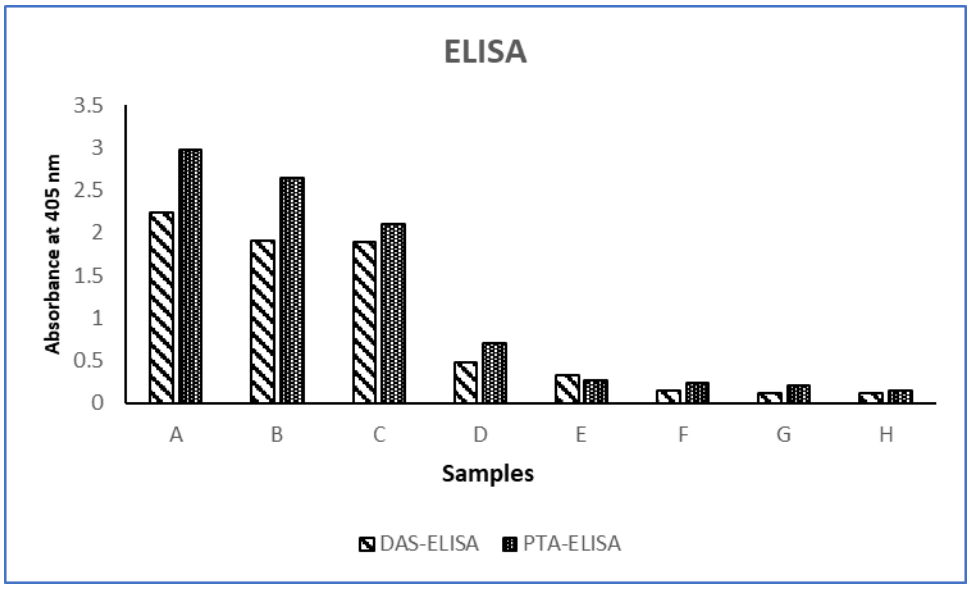
Fig 3. Determination of titration of antiserum by indirect ELISA test prepared in rabbits against recombinant coating protein (Protein concentration used in each well is 1 microgram per milliliter). A: Rabbit 1, B: Rabbit 2, Not-immune: without immunization by antigen.

نتایج بررسی IgGهای خالص شده روی ژل پلی آکریل آمید: پس از حصول اطمینان از عملکرد آنتی‌سرم در برابر پروتئین پوششی نوترکیب ویروس ACLSV و خالص‌سازیIgG، غلظت آنتی‌بادی تخلیص شده با استفاده از پروتئین استاندارد BSA و روش برادفورد تعیین شد. به همین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از پروتئین تخلیص شده همراه با ۹۰۰ میکرولیتر ترکیب برادفورد مخلوط شد. سپس مخلوط تهیه شده به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و جذب نوری مخلوط تهیه شده در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری شد و با جذب نوری محلول BSA به عنوان محلول استاندارد مقایسه شد. پس از بررسی کمی و کیفی ایمنوگلوبولین‌های خالص شده نتایج نشان می‌دهد خالص‌سازی IgG به خوبی انجام شده است و باندهای غیراختصاصی حذف شده‌اند. پس از نشان‌دارکردن آنتی‌بادی‌ها با استفاده از کیت و انجام الکتروفورز دو باند مورد انتظار مشاهده شد که یک باند به وزن ۷۵ کیلو دالتون مربوط به زنجیره سنگین آنتی‌بادی و یک باند به وزن ۲۵ کیلو دالتونی مربوط به زنجیره سبک آنتی‌بادی مشاهده شد.

نتایج حاصل از الایزای غیرمستقیم و مستقیم با آنتی‌بادی‌های نوترکیب تهیه شده: جهت بررسی کارایی ایمنوگلوبولین‌های خالص شده از سرم خون و آنتی‌بادی‌های نشاندار شده آزمون الایزای غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌ژن‌های مربوطه مورد استفاده قرار گرفت. آنتی‌ژن‌های مورد استفاده در این آزمون شامل پروتئین خالص شده، پروتئین بیان شده در باکتری و نمونه آلوده به ACLSV بود. با توجه به میزان جذب نوری حدود دو برابری با نمونه آلوده (نمونه گیاهی آلوده و پروتئین بیان شده) در مقایسه با نمونه سالم در غلظت ۱:۱۰۰۰، نتایج نشان داد که کاربرد غلظت ۱:۱۰۰۰ آنتی بادی نوترکیب anit-ACLSV-CP برای ردیابی آنتی‌ژن‌های موردنظر مناسب هستند. نتایج حاصل از جذب نوری نمونه‌ها در شکل ٤ نشان شده است. لازم به ذکر است در کاربرد آنتی‌بادی‌های نوترکیب از آنتی‌بادی نشاندار با استفاده ازآلکالین فسفاتاز برای ظاهرسازی و تغییر رنگ استفاده شد و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ٤٠٥ نانومتر محاسبه شد.

آزمون الایزای غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌بادی‌های نوترکیب نشاندار شده با استفاده از آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه‌های پروتئین خالص شده، پروتئین بیان شده در باکتری و نمونه آلوده به ویروس موردنظر انجام شد و نتایج حاصل از جذب نوری نمونه‌ها در نمودار۱ نشان داده شده است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3]



شکل ٤- ضرایب جذب نوری در الایزای غیرمستقیم 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 برگی آلوده به ACLSV)، D (پروتئین بیان شده در زمان صفر)، E (نمونه برگی سالم)، F (پروتئین استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید فاقد ژن پروتئین پوششی)، G (بافر استخراج پروتئین)، H (سوبسترا).

Fig 4. Absorbance coefficients in ELISA to evaluate the efficiency of recombinant antibodies prepared against ACLSV-CP. A (purified coat protein), B (protein expressed in bacteria), C (leaf sample infected with ACLSV), 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).

در بیماری‌های ویروسی باید راهکارهایی جهت کنترل ویروس قبل از وقوع آلودگی به کار برده شوند. مهم‌ترین راهکار برای کنترل ویروس‌های گیاهی از جمله ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب، پیشگیری از وقوع و گسترش بیماری است. کاشت مواد تکثیری گیاهی سالم از موثرترین روش‌هایی است که توسط کشاورزان انجام می‌شود. یکی از عوامل مهم برای صدور گواهی سلامت مواد تکثیری گیاهی عاری از بیمارگرها دسترسی به روش‌های تشخیصی حساس و دقیق است. با توجه به شیوع گسترده ویروس ACLSV ، مدیریت و کنترل آن دارای اهمیت زیادی است. یکی از روش‌های رایج برای شناسایی این ویروس آزمون‌های سرولوژیک است (Rana *et al.*, 2008). از جمله آزمون‌های سرولوژیکی می‌توان به آزمون ELISA اشاره نمود، که روشی متداول، معتبر و ارزان جهت تشخیص ویروس مخصوصا در تعداد نمونه‌های خیلی زیاد است. یکی از اجزای مهم برای آزمون‌های سرولوژیک و الایزا آنتی‌بادی است. برهمکنش بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن اساس روش‌های سرولوژیک است. این آزمون‌ها نیازمند تامین آنتی‌ژن ویروسی کافی جهت تولید آنتی‌بادی می‌باشند و تهیه آنتی‌بادی مناسب برای انجام این آزمون‌ها بسیار مهم و مستلزم در اختیار داشتن آنتی‌ژن خالص (پروتئین پوششی ویروس) است (Emtiazi, 2010). تولید آنتی-بادی چند همسانه‌ای علیه ویروس لکه برگی کلروتیک سیب دارای اهمیت زیادی است و قادر است کمک قابل توجهی از لحاظ اقتصادی و مدیریت زمان به پژوهشگران در این در زمینه کند. فناوری DNA نوترکیب دارای پتانسیل قوی برای تولید آنتی‌ژن جهت تولید آنتی‌بادی است. در اکثر موارد تولید DNAنوترکیب ویروس بسیار سریع‌تر از تکثیر ویروس در گیاه است (Tatineni *et al.*, 2013). با تهیه آنتی‌بادی نوترکیب علاوه بر محیا کردن شرایط جهت تولید داخلی این ماده تشخیصی، بومی‌سازی تولید این ماده تشخیصی گران‌قیمت، برآورد و سنجش سلامت مواد تکثیری با هزینه کمتر و سرعت بیشتر انجام می‌شود. علاوه بر این با همسانه‌سازی ژن CP در سیستم پروکاریوتی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3]

مناسب، تولید آنتی‌بادی نوترکیب در هر زمان که مورد نیاز باشد ممکن است.

در این پژوهش از باکتری *E.coli* سویه DH5α برای تکثیر بالا پلاسمید و سویه BL21 (DE3) برای بیان بالای پروتئین نوترکیب ویروس لکه برگی کلروتیک سیب استفاده شد. از دلایل استفاده از باکتری *E.coli* سویه BL21(DE3) افزایش میزان بیان ژن، قابل حل بودن، پایداری بیشتر و خالص‌سازی راحت پروتئین تولید شده است. این سویه در پژوهش‌های مختلف برای بیان پروتئین نوترکیب ویروس‌های گیاهی درج شده در وکتورهای pET مورد استفاده قرار گرفته است (Sharma *et al.*, Nickel *et al.*, 2004 Koolivand *et al.*, Amiri Sadeghan *et al.*, 2013; 2016; 2016;).

در این پژوهش امکان تهیه و آماده‌سازی پروتئین پوششی ویروس ACLSV به عنوان یکی از اصلی‌ترین پروتئین‌های ویروسی به عنوان ماده ایمنی‌زا در شرایط آزمایشگاهی برای تولید آنتی‌بادی مناسب و موثر مورد بررسی قرار گرفت که از آن جهت تولید آنتی‌بادی در برابر تعدادی از ویروس‌های گیاهی در پژوهش‌های در خارج از کشور (Tahangaraj and Jayakrishman 20201: Kumar et al., 2021: Astuti et al., 2019; Reda Salem et al., 2018; Darsono et al., 2018; Haokip et al., 2018; Dalia et al., 2017;) و پژوهش‌هایی در داخل کشور (Sokhandan-Bashir *et al.*, 2015 ؛ Koolivand *et al.*, 2017 ؛ Koolivand *et al.*, 2014؛ Koolivand *et al.*, 2016 ؛ Masoudi *et al.*, 2019) نیز استفاده شده است.

استفاده از حامل‌های pET جهت بیان ژن‌های مختلف خصوصا ژن‌های مختلف ویروسی، توسعه یافته است که از لحاظ تعداد کپی در سلول میزبان در گروه متوسط دسته بندی شده است و نسبت به سایر حامل‌های بیان ژن دارای تعداد کپی بیشتری است. معمولا در عمده تحقیقات جهت تولید پروتئین‌های پوششی ویروسی در آزمایشگاه از پلاسمید بیان pET28 استفاده می‌شود. پروتئین بیان شده در این نوع وکتور که به‌عنوان آنتی‌ژن جهت تولید آنتی‌بادی برای ردیابی سریع ویروس استفاده می‌کنند، دارای برچسب هیستیدینی در انتهای آمینی و کربوکسیلی است. برای تولید پروتئین‌های پوششی ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب در شرایط آزمایشگاهی پلاسمید بیان pET28 مورد استفاده قرار گرفت، زیرا تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از پلاسمید مذکور سبب برچسب‌دار شدن پروتئین‌های بیان شده در انتهای آمینی و کربوکسیلی می‌شود و این امر سبب بیان بهینه پروتئین پوششی ویروس می‌شود.

در این پژوهش از غلظت و مدت زمان بهینه استفاده شد. بیان ژن ویروس ACLSV، به عنوان یک پروتئین نوترکیب در استرین BL21(DE3) که حاوی برچسب اسیدآمینی هیستیدینی است به طور موفقیت‌آمیز با القای یک میلی مولار IPTG در مدت زمان چهار ساعت، در OD ۰/۵ در ۳۷ درجه سلسیوس بدست آمد. پس از انجام الکتروفورز پروتئین‌های نوترکیب استخراج شده از باکتری‌های حاوی حامل بیان القاء شده با IPTG، در SDS-PAGE قطعه حدودا ۲۷ کیلودالتونی مشاهده شد که این قطعه در شاهد منفی وجود نداشت. با توجه به اینکه پروتئین پوششی ACLSV به اندازه‌ی ۲۲ کیلو دالتون گزارش شده است، این افزایش وزن به علت اتصال بخشی از توالی حامل بیان و بیان آن به صورت یک توالی اسیدآمینه‌ای متصل به پروتئین پوششی نوترکیب می‌باشد (حدود ۵ کیلودالتون مربوط به tag-6X Hisاست). این افزایش اندازه در تحقیقات مشابه دیگر که وکتور pET استفاده کرده‌اند نیز گزارش شده است (Koolivand *et al.*, 2017; Masoudi *et al.*, 2019).

آنتی‌بادی نوترکیب تهیه شده توانست ویروس لکه برگی کلروتیک سیب را به طور اختصاصی در آزمون ELISA شناسایی کند. با توجه به اینکه در این نوع از آزمون الایزا، آنتی‌ژن در چاهک‌های تشتک 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 آنتی-بادی‌های 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 بسیار خوبی در ردیابی این ویروس داشت. نتایج تحقیق حاضر با این امر که آنتی‌بادی‌های نوترکیب درآزمون ELISA عملکرد خوبی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3]

ندارند، مطابقت نداشت؛ همانطور که بسیاری از پژوهش‌ها قبلا 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 موفقیت آمیزی بهره برده‌اند (Safarnejhad *et al*., 2019; Koolivand *et al*., 2017; Abdel-Salam *et al*., 2014; Iracheta-cardenas *et al*., 2008). پژوهشگران از جمله دلایل عدم ردیابی ویروس در DAS-ELISA با آنتی‌بادی‌های نوترکیب شبیه نبودن ساختار پروتئین دناتوره 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 داس-الایزا بیان کردند (Folwarczna *et al*., 2008).

منابع

Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., & Davison, A. J. (2017). 50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects. Archives of virology, 162(5), 1441-1446. **doi: 10.1007/s00705-016-3215-y. Epub 2017 Jan 11.**

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. **doi: 20.1001.1.22519041.2013.2.4.12.6**.

Astuti, N. T., Darsono, N., Widyaningrum, S., Sawitri, W. D., Astuti, S. P., & Darmanto, W. (2019). Expression and purification of recombinant coat protein of *sugarcane mosaic virus* from Indonesian isolate as an antigen for antibody production. Indonesian Journal of Biotechnology, 24(1), 57-64 **doi: 10.22146/ijbiotech.45551.**

Bashir, N. S., Koolivand, D., & Behjatnia, S. A. A. (2015). Preparation of polyclonal antibodies to *Grapevine fanleaf Virus* Coat Protein expressed in *Escherichia coli*. Biotechnology, 14(4), 173-180. **doi: 10.3923/biotech.2015.173.180.**

Bhardwaj, P., Negi, A., Sukapaka, M., & Hallan, V. (2020). Production of polyclonal antibodies to the coat protein gene of Indian isolate of *Apple stem grooving virus* expressed through heterologous expression and its use in immunodiagnosis. Indian Phytopathology, 73, 165-173**. doi.org/10.1007/s42360-019-00190-1.**

Cerovska, N., Filigarova, M., & Pecenkova, T. (2006). Production of polyclonal antibodies to a recombinant *potato mop-top virus* non-structural triple gene block protein 1. Journal of phytopathology (1986), 154(7-8), 422-427. **doi: 10.1111/j.1439-0434.2006.01121.x.**

Darsono, N., Azizah, N. N., Putranty, K. M., Astuti, N. T., Addy, H. S., Darmanto, W., & Sugiharto, B. (2018). Production of a polyclonal antibody against the recombinant coat protein of the *Sugarcane mosaic virus* and its application in the immunodiagnostic of sugarcane. Agronomy, 8(6), 93. **doi.org/10.3390/agronomy8060093.**

Haokip, B. D., Alice, D., Selvarajan, R., Nagendran, K., Rajendran, L., Manoranjitham, S. K., & Karthikeyan, G. (2018). Production of polyclonal antibodies for *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) infecting chilli in India through recombinant nucleocapsid protein expression and its application. Journal of virological methods, 258, 1-6. **doi :org/10.1016/j.jviromet.2018.05.004.**

Hull, R. (2001). Classifying reverse transcribing elements: a proposal and a challenge to the ICTV. Archives of Virology, 146, 2255-2261. **doi.org/10.1007/s007050170036.**

Kokane, S. B., Kokane, A. D., Misra, P., Warghane, A. J., Kumar, P., Gubyad, M. G., & Ghosh, D. K. (2020). In-silico characterization and RNA-binding protein based polyclonal antibodies production for detection of *citrus tristeza virus*. Molecular and cellular probes, 54, 101654. **doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101654.**

Koolivand, D., Bashir, N. S., Behjatnia, S. A., & Joozani, R. J. (2016). Production of polyclonal antibody against *grapevine fanleaf virus* movement protein expressed in Escherichia coli. The plant pathology journal, 32(5), 452. **doi: 10.5423/PPJ.OA.01.2016.0031.**

Koolivand, D., Sokhandan Bashir, N., & Rostami, A. (2017). Preparation of polyclonal antibody against recombinant coat protein of *Cucumber mosaic virus* isolate B13. Journal of Crop Protection, 6(1), 25-34. **doi: 20.1001.1.22519041.2017.6.1.8.4.**

Koolivand, D., Sokhandan-Bashir, N., Behjatnia, S. A. A., & Jafari Joozani, R. A. (2014). Detection of *Grapevine fanleaf virus* by immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) with recombinant antibody. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(17), 2070-2077. **doi.org/10.1080/03235408.2013.868697.**

Kumar, R., Pant, R. P., Kapoor, S., Khar, A., & Baranwal, V. K. (2021). Development of polyclonal antibodies using bacterially expressed recombinant coat protein for the detection of *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) and identification of virus free onion genotypes. 3 Biotech, 11, 1-10. **doi.org/10.1007/s13205-021-02921-6.**

Li, C., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T., Yoshida, K., & Koganezawa, H. (2000). Nucleotide sequence and genome organization of *Apple latent spherical virus*: a new virus classified into the family *Comoviridae*. Journal of General Virology, 81(2), 541-547. **doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-541.**

Martelli, G. P., Candresse, T., & Namba, S. (1994). Trichovirus, a new genus of plant viruses. **doi.org/10.1007/BF01310583**.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3]

Masoudi, N ., Assareh, MH., Rouhibakhsh, A., Madani, R., Naderpour, M., Emami, T., & Koolivand, D. (2019). Rapid detection of *Potato virus S* using antibody-coated gold nanoparticles. Iranian Journal of Plant Pathology, 55: 105-114. In Farsi with English abstract. **doi: 10.22034/ijpp.2019.37318.**

Mirzaei, D., Hajizadeh, M., Azizi, A., & Kolivand, D. (2019). Cloning and expression of Iranian isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus* coat protein gene in E. coli. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 8(1), 51-62. **doi: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.6.2.**

Nickel, O., Targon, M. L., Fajardo, T. V., Machado, M. A., & Trivilin, A. P. (2004). Polyclonal antibodies to the coat protein of *Apple stem grooving virus* expressed in *Escherichia coli*: production and use in immunodiagnosis. Fitopatologia Brasileira, 29, 558-562**. https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000500017.**

Polak, J., Ravelonandro, M., Kumar-Kundu, J., Pivalova, 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. Plant Protect. Sci, 44, 1-5. **doi:10.17221/535-PPS.**

Rana, T., Chandel, V., Hallan, V., & Zaidi, A. A. (2008). Himalayan wild cherry (Prunus cerasoides D. Don): a new host of *Apple chlorotic leaf spot virus*. Forest Pathology, 38(2), 73-77. **doi.org/10.1111/j.1439-0329.2007.00531.x.**

Safarnejad, M. R., Bananej, K., & Sokhansanj, Y. (2019). Developing of specific antibody against *chickpea chlorotic dwarf virus* (CpCDV) through recombinant coat protein. Journal of Crop Protection, 8(2), 179-190. **doi: 20.1001.1.22519041.2019.8.2.8.0.**

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(9), 1927-1931. **doi.org/10.1099/0022-1317-74-9-1927.**

Sharma, P., Sharma, S., Singh, J., Saha, S., & Baranwal, V. K. (2016). Incidence of *Lettuce mosaic virus* in lettuce and its detection by polyclonal antibodies produced against recombinant coat protein expressed in *Escherichia coli*. Journal of virological methods, 230, 53-58. **doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.01.014.**

Shibaei, N., Majidi, J., Bashir, N. S., Karkhaneh, A., & Razavi, K. (2018). Production and partial purification of the *Grapevine fanleaf virus* coat protein 42 polyclonal antibody against inclusion body expressed in *Escherichia coli*. Iranian Journal of Biotechnology, 16(4). **doi: 10.21859/ijb.1525.**

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. Journal of Virological Methods, 189(1), 196-203. **doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.01.023.**

Thangaraj, M., & Jayakrishnan, J. T. (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. **doi.org/10.21203/rs.3.rs-344406/v1.**

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.9.3]