مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۲، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۲
صفحه ۲۶۱-۲۵۱

10.61186/gebsj.12.2.251

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2024
Volume 12, Number 2, Pages: 251-261

http://gebsj.ir/

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

همسانه سازی و بیان ژن پروتئین پوششی ویروس PVX در باکتری به منظور تولید حامل داروهای ضد سرطان

Cloning and expression of PVX coat protein in bacterium in order to produce carrier of anticancer drugs

لیلا پورهنگ[۱]، مقصود پژوهنده [۱*] و اکبر شیرزاد[۲]

Leila Pourhang[1], Maghsoud Pazhouhandeh[*1], Akbar Shirzad[2]

۱- گروه بیوتکنولوژی، ۲- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
1. Biotechnology Department, 2. Department of plant protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email
pazhouhandeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۱)
Received: 2023/09/6 | Accepted: 2024/01/11 | Published: 2024/03/10

چکیده

استفاده از ویروسهای گیاهی به عنوان حاملهای داروهای ضد سرطان در پزشکی روز به روز درحال افزایش است. تشخیص ویروس‌ها با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی نیز اهمیت ویژه-ای برای کنترل بیماری‌های گیاهی خصوصا در برنامه تولید بذر سیب‌زمینی دارد. یکی از مهمترین ویروس‌های سیب زمینی (PVX) *Potato X Potexvirus* با گستره جهانی و جزو اولین ویروسهای گیاهی مورد استفاده به عنوان حامل داروهای ضد سرطانی می‌باشد. در این تحقیق به منظور تولید پیکره‌های PVX، ژن Coat protein (CP) آن بصورت نوترکیب تولید گردید. ابتدا، واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی حاوی سایت برشی برای تکثیر CP انجام گرفت. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز، قطعه تکثیر شده به طول ۷۱٤ bp را تایید کرد. ژن CP و پلاسمید pGBKT7 توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI برش داده شدند و پس از خالص‌سازی لیگاسیون بین آنها صورت گرفت. پلاسمید نوترکیب pGBKT7 -CP^{PVX} با الکتروپوراسیون به باکتری *E. coli* منتقل و در آن تکثیر گردید. پس از گزینش باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب به کمک PCR و استخراج پلاسمید از آنها، توالی‌یابی درست بودن توالی ژن کلون شده را تایید کرد. در ادامه ژن CP در پلاسمید بیانیpET-21a به روش برش و لیگاسیون همسانه سازی شد. پلاسمید نوترکیب به سویه BL21 باکتری *E. coli* منتقل و کشت گردید. با اضافه کردن IPTG در محیط کشت باکتری تولید پروتئین CP از روی پلاسمید انجام و پروتئین-های باکتری استخراج شد. الکتروفورز پروتئین، بیان شدن CP را نشان داد. این پروتئین پس از خالص‌سازی میتواند به عنوان حامل داروهای ضد سرطان کاربرد داشته باشد.

واژه‌های کلیدی

PVX،
Coat protein،
بیان پروتئین،
همسانه سازی،
حامل دارو

Pourhang L, Pazhouhandeh M, Shirzad A. Cloning and expression of PVX coat protein in bacterium in order to produce carrier of anticancer drugs. Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023; 12 (2) :251-261. Doi: 10.61186/gebsj.12.2.251
URL: http://gebsj.ir/article-1-502-fa.html

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.251]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 2, 2024

Abstract

The use of plant viruses as carriers of anti-cancer drugs in medicine is increasing day after day. One of the most important potato viruses is *Potato X Potexvirus* (PVX) which is globally expanded and is one of the first plant viruses used as a carrier of anticancer drugs. In this research, in order to produce PVX particles, its Coat protein (CP) gene was expressed. First, the RT-PCR reaction was performed for CP amplification using specific primers containing the endonuclease digestion sites. Electrophoresis of the PCR product on agarose gel confirmed the amplified fragment with a length of 714 bp. Then the CP gene and pGBKT7 plasmid were digested by *Bam*HI and *Eco*RI enzymes and after purification, ligation was done between them. Recombinant plasmid pGBKT7-CP^{PVX} was transferred to *E. coli* bacteria by electroporation. After selecting the bacteria containing the recombinant plasmid by PCR and extracting the plasmids from them, sequencing confirmed the correctness of the cloned gene sequence. Then, the CP gene was cloned into pET-21a expression plasmid by digestion and ligation method. The recombinant plasmid was transferred to BL21 strain of *E. coli* and cultured. By adding IPTG in the bacterial culture medium, CP protein was expressed from the plasmid and bacterial proteins were extracted. Protein electrophoresis showed the expression of CP. After purification, this protein can be used as a carrier of anti-cancer drugs.

Keywords: Cloning, Coat protein, drug carrier, PVX, protein expression

مقدمه

در بین گیاهان دولپه‌ای، سیب زمینی مهمترین محصول زراعی است که پس از گندم، برنج و ذرت، در رتبه چهارم جهانی قرار دارد. متوسط عملکرد این محصول در کل کشورهای جهان، 18/5 تن و در ایران ۳٤ تن در هکتار بوده که رتبه ی ۲۱ را در عملکرد در دنیا دارد(وجدانی ۱٤۰۱). آفات و بیماری‌ها از عمده مشکلات تولید در سیب‌زمینی هستند. ویروس‌ها در سیب‌زمینی بسیار شایع هستند و باعث فساد سیب زمینی و کاهش عملکرد شدید می-شوند (Yonghui 2010). اولین گزارشات از وجود بیماری ویروسی سیب‌زمینی در ایران به سال ۱۳۳۰ برمی‌گردد (Masoudi *et al.* 2018). به دلیل تکثیر رویشی سیب زمینی، ویروس‌ها به خاطر انتقال و انباشت از سالی به سال دیگر، عملکرد محصول را به طور چشمگیری کاهش می‌دهند از جمله ویروس‌های بیماریزای مهم سیب زمینی، ویروس *Potato* X *Potexvirus* (PVX) می‌باشد که دارای گسترش جهانی بوده و در تمام مناطق کشت سیب زمینی در دنیا ایجاد خسارت می کند (Yu et al. 2008; Jellis 1992) و باعث ایجاد آلودگی‌های سیستمیک در گیاهان خانواده Solanaceae از جمله سیب‌زمینی، توتون، گوجه و فلفل می‌شود (Callaway *et al.* 2001). میزان خسارت این ویروس بسته به نژاد و رقم سیب زمینی بین ۱۰ تا ۵۰ درصد و پراکنش آن در ایران حدود ۱۸ درصد گزارش شده است(Shamsadden-Saeed *et al.* 2014). این ویروس علایم خفیفی در گیاه سیب زمینی ایجاد می کند ولی در صورت آلودگی مخلوط با سایر ویروسها مثل ویروس Y سیب زمینی آسیب شدیدتر و خسارت اقتصادی بیشتری را وارد می‌کند Kutnjak *et al.*, 2014; Prins *et al.* 2008). در اثر این ویروس، غده‌ها کوچک شده و تعداد آنها کمتر می‌شود. ویروس X سیب زمینی به آسانی به وسیله عصاره آلوده از غده‌ها یا برگ‌ها منتقل می شود. یکی از رایج‌ترین روش‌های انتقال آلودگی این ویروس در مزارع سیب زمینی، انتقال از غده‌های آلوده به غده‌های سالم در زمان برش غده‌های بذری به منظور کشت است (Jeevalatha *et al.* 2016). این ویروس همچنین به وسیله بذرپاش‌های مکانیکی، وسایل زراعی و سمپاشی، جانوران، قطعات دهانی حشره جونده، تماس جوانه‌ها، برگ‌ها و ریشه منتقل می‌شود. در سیستم‌های تولید بذر عاری از ویروس سیب‌زمینی لازم است ویروس‌هایی موردنظر قرار گیرند که با توجه به شرایط محیطی و نوع ارقام کاشته شده، خسارت بیشتری را موجب می‌شوند و انتشار بیشتری دارند. ژنوم این ویروس بطول ٦٤۳۵ نوکلئوتید بوده و تک رشته-ای و انعطاف‌پذیر به طول ۵۱۵ و عرض ۱۳ نانومتر است (Yonghui 2010) و ۹٤ درصد پیکره‌ی آن شامل پوشش پروتئینی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.251]

با وزن ۲۵۰۸۰ دالتون است که از ۱۲۷۰ زیرواحد تشکیل شده است (Soliman *et al.* 2008) و دارای پنج قاب خواندنی باز (ORF) می‌باشد (Alhoot *et al.* ;Verchot-Lubicz *et al.* 2007 2012). ژن (ORF) شماره یک که شامل نوکلئوتیدهای ۳۹ تا ۵۹ است، پروتئینی بزرگ به وزن ۱٦٦ کیلو دالتون را تولید می‌کند که به عنوان رپلیکاز عمل می‌کند(Fedorkin *et al.* 2001). ناحیه مرکزی ژنوم ویروس شامل سه ORF است که با هم تداخل دارند و بعنوان بلوک ژن سه‌گانه شناخته شده (Verchot-lubicz 2005) و پروتئین‌هایی که محصول این بلوک ژن سه‌گانه هستند (MP1, MP2, MP3)، به ترتیب وزن مولکولی ۲۵، ۱۲ و ۸ کیلو دالتون دارند(Hefferron *et al.* 1997). و در تنظیم ترجمه ویروس، ممانعت کنندگی از خاموشی RNA و حرکت ویروس نقش دارند (Verchot-Lubicz, 2005). ژن شماره پنج مسئول کد کردن پروتئین پوششی(coat protein: CP) ویروس می‌باشد که اندازه آن ۲۵ کیلو دالتون است و حدود ۹٤ درصد پیکره ویروس را تشکیل می‌دهد(Verchot-Lubicz 2005). ژن CP از ویروسPVX دارای ۷۱٤ نوکلئوتید است و ۲۳۷ اسیدآمینه را کد می‌کند(Yonghui 2010). این ژن برای مونتاژ پیکره‌های ویروس و حرکت سلول به سلول مورد نیاز می‌باشد (Leshchiner 2008 ; 1988 et al Huisman). پروتئین پوششی در ایجاد بدشکلی برگ‌ها و در توسعه آلودگی در کل گیاه نقش مهمی را ایفا می‌کند (Abel et al.1986). از آنجایی که بیماری‌های ویروسی از جمله PVX بر خلاف عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی، علائم خاصی روی غده‌ها ندارند، به آسانی از نسلی به نسل دیگر منتقل شده و باعث افزایش شدت بیماری و کاهش عملکرد از سالی به سال دیگر می‌شوند. روش‌های موثر کنترل ویروس‌ها فقط به مبارزه با ناقلین، کاشت ارقام مقاوم و استفاده از بذور سالم سیب زمینی محدود می‌گردد. استفاده از بذر سالم از جمله مهمترین عوامل موثر در افزایش عملکرد سیب زمینی در واحد سطح می‌باشد. تولید هسته-های بذری باعث صرفه جویی در خروج ارز از کشور و افزایش تولید محصول می‌گردد. تشخیص سریع ویروسهای سیب زمینی یکی از ارکان مهم این فرایند تولید بذر است. دستیابی عملی به تکنولوژی شناسایی ویروس‌ها و گسترش تستهای سرولوژیکی در مراکز تولید بذر سیب‌زمینی هدف عمده این تحقیق است. بطور کلی روش‌های مولکولی شناسایی ویروس‌ها یا مبتنی بر پروتئین آنها و یا بر اساس اسیدنوکلئیک آنهاست. روش سرولوژیکی از گروه اول و تکنیک PCR متعلق به گروه دوم هستند. از بین روش‌های سرولوژیکی به خاطر دقت و سرعت بالا در تشخیص ویروس‌ها، انواع ELISA مرسوم تر هستند. ممکن است غلظت ویروس در بافت گیاهی به اندازه‌ای کم باشد که نتوان با استفاده از ELISA آن را شناسایی کرد اما به کمک PCR با وجود حتی یک پیکره ویروس در بافت می‌توان به تکثیر آن پرداخته و موفق به شناسایی آن شد. تکنیک ELISA بر مبنای تعامل میان مولکول-های آنتی‌بادی با آنتی‌ژن، استوار است و نیاز به آنتی‌بادی دارد و چون PVX یکی از مهمترین ویروس‌های خسارت‌زای سیب زمینی است، در برنامه تولید غده‌های عاری از ویروس جزو ویروس‌هایی است که باید تست شود. لذا کیت‌های شناسایی ELISA آن باید راه اندازی شوند. برای این منظور در نظر داریم تا با بیان پروتئین پوششی PVX در باکتری، مقدمات تولید آنتی‌بادی اختصاصی PVX را فراهم کنیم تا در ادامه کیت‌های ELISA شناسایی PVX تولید و گسترش یابند. استفاده از بافت آلوده به ویروس و یا ویروس خالص سازی شده برای مطالعات پژوهشی مناسب است اما به دلیل مشکل بودن خالص سازی پیکره‌های ویروس و همراه بودن ذرات گیاهی با آنها، پروتئین‌های بدست آمده درجه خلوص بالایی ندارند. مقاومت مهندسی شده ژنتیکی گونه‌های مختلف گیاهی به آلودگی‌های ویروسی به وسیله بیان *CP* ویروس، برای چند ویروس گیاهی اثبات شده است (Matthews 1993). نقش اولیه پروتئین پوششی، پوشیدن اسید-نوکلئیک ژنوم ویروسی است که اطلاعات ژنتیکی را از تخریب محافظت می‌کند. همچنین نقشی مهم در گسترش ویروس در سراسر گیاه آلوده، هم از طریق انتقال در فواصل طولانی از طریق آوندها و هم حرکت سلول به سلول دارد (Carrington *et al.* 1996, Fedorkin *et al.* 2001). بعلاوه *CP* ممکن است در دیگر مراحل چرخه زندگی ویروس مثل همانندسازی و سرکوب خاموشی شرکت کند(Callaway *et al.* 2001; Thomas et *al.* 2003) در یک پژوهش توسط نوح شهرآیین ژن پوشش پروتئینی ویروس x سیب زمینی تحت کنترل پروموتور PCMV35 و توالی‌های افزایش دهنده در داخل ناقل خاص از گروه BINARY

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.251]

VECTOR کلون شد و سپس با استفاده از باکتری آگروباکتریوم تومه فاسینس به داخل دو رقم گیاه سیب‌زمینی منتقل گردید که پس از رشد و تکثیر گیاهان، گیاهان ترانس ژنیک مقاوم به کانامایسین در خاک کشت شده و پس از یک ماه وجود transcript ژن پوشش پروتئینی ویروس X در آنها با روش RT-PCR تائید شد (irandoc). در سال ۱۳۸۰ ویروس‌های PVY و PVX از بوته های آلوده مزارع سیب زمینی استان خوزستان جدا و در شرایط گلخانه در گیاه توتون سامسون *Nicotiana tabacum* L.cv. Samsun بطور جداگانه تکثیر شدند. پس از خالص سازی ویروسها، با تزریق آموده های (پرپاراسیون ها) خالص ویروس به خرگوش، آنتی سرم تهیه شد. علاوه بر کاربرد آنتی سرم های تهیه شده در آزمون های مختلف نشت در آگار، آنتی‌سرمهای بدست آمده نیز خالص شده و در آزمون های الایزا (ELISA) و دیبا (DIBA) به طریق غیرمستقیم بکار برده شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که سیستم های سرولوژیکی الایزا (ELISA) و دیبا (DIBA) تهیه شده در این تحقیق آلودگی به دو ویروس PVY و PVX را به خوبی در گیاهان سیب زمینی تشخیص می دهند(شمس بخش و همکاران ۱۳۸۰). در پژوهشی دیگر در سال ۱۳۹۰ در استان مرکزی با استفاده از طراحی آغازگر برای پروتئین پوششی PVX و انجام آزمون ELISA، وجود این ویروس در مزارع سیب زمینی این استان تایید شد (فراهانی و همکاران ۱۳۹۱). در سال ۱۳۹۸ ویروس PVX جدا شده از بوته های آلوده مزارع سیب زمینی استان کرمان، تکثیر شد و ژن پوشش پروتئینی ویروس در ناقل بیانی pQE60 کلون شد و سپس پلاسمید نوترکیب به باکتری *E.coli* منتقل و بیان ژن در آن صورت گرفت. نهایتا بیان پروتئین پوششی ویروس با ژل SDS-PAGE تایید شد. در ادامه، آنتی ژن نوترکیب بدست آمده، از طریق تزریق به خرگوش در تکنیک دات بلات شناسایی شد (Hasan-Sheikhi *et al*. 2000).

مواد و روش‌ها

در ابتدا واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با یک جفت آغازگر اختصاصی، برای تکثیر ژن پروتئین پوششی (Gene Bank: DQ315386) از cDNA ویروس PVX انجام شد. برای انجام PCR از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. این آغازگرها توسط نرم افزار oligo طراحی و در شرکت Sigma سنتز شدند و قطعه ای به طول ۷۱٤ نوکلئوتید حاوی ژن پروتئین پوششی را تکثیر می‌کنند. سایت‌های برشی مربوط به آنزیم‌های مورد استفاده نیز در این آغازگرها تعبیه شد. اجزای واکنش PCR شامل آغازگرهای مستقیم و معکوس هرکدام با غلظت یک میکرومولار، dNTPs با غلظت 10 میکرومولار، cDNA 500 ng ، 0.5 میکرولیتر آنزیم Mag *Taq* DNA polymerase و بافر 2x می‌باشد. آزمون PCR با استفاده از برنامه ای شامل دمای ۹۲ °C به مدت ۳ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه و ۳۰ سیکل که هر یک شامل ۹۲ °C به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۵ °C به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ٤٥ ثانیه و یک دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه برای ساخت نهایی قطعه مورد نظر استفاده شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ و با استفاده از بافر TAE 1X الکتروفورز شد. قطعه DNA تکثیر شده در واکنش PCR و نیز پلاسمید pGBKT7 بطور جداگانه توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Eco*RI (Fermentas) برش داده شدند و پس از خالص‌سازی، الکتروفورز آنها روی ژل آگارز ۱٪ با نقطه ذوب پایین انجام شد و باندهای مورد نظر مربوط به ژن و پلاسمید، از روی ژل برش داده شده و خالص‌سازی آنها انجام شد. در مرحله ی بعد، واکنش اتصال در حضور آنزیم DNA T4 Ligase صورت گرفت و این پلاسمید نوترکیب، پس از خالص‌سازی، به روش الکتروپوراسیون به سلول‌های شایسته *Escherichia coli* نژادTOP10 منتقل شد. باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، روی محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین رشد داده شدند. در مرحله بعد، با انجام PCR با آغازگرهای اختصاصی CP کلونی‌هایی که پلاسمید آنها حاوی ژن پروتئین پوششی بود، تعیین شدند و کشت مایع برای این کلونی‌ها انجام و پس از استخراج پلاسمید، عمل هضم آنزیمی (Digestion) بر اساس آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Eco*RI، وجود ژن CP را درون پلاسمید pGBKT7 تایید کرد. محصول بدست آمده روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد و باندهای مربوط به پلاسمید و ژن مورد نظر در آن مشاهده گردید. در ادامه، قطعه مورد نظر برای تعیین توالی به انستیتو IBMP استراسبورگ فرانسه ارسال گردید. پس از اطمینان از توالی درست پلاسمید حاصل، با استفاده

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.251]

از آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Eco*RI، ژن CP از پلاسمید نوترکیب جدا شد و همزمان پلاسمید pET-21a نیز با این آنزیم-ها برش داده شد. پس از خالص‌سازی محصولات حاصل از برش آنزیمی، واکنش لیگاسیون بین قطعه‌ی جدا شده‌ی ژن CP و پلاسمید pET ، صورت گرفت. پس از انجام واکنش لیگاسیون به مدت یک شبانه‌روز در دمای C °۱۶و خالص‌سازی آن، به ازاء هر بار ترانسفورماسیون *E. coli* به روش الکتروپوراسیون یک میکرو-لیتر از محصول واکنش لیگاسیون مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله بعد برای تایید نوترکیب بودن کلنی‌های رشد کرده در محیط، واکنش PCR بر روی این کلنی‌ها انجام شد. انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن CP روی کلنی‌های رشد یافته در محیط کشت آمپی‌سیلین دار، وجود ژن CP را در این کلنی‌ها تایید کرد. این بار ژن CP در پلاسمید بیانی pET-21a همسانه سازی شد. در ادامه یک کلونی نوترکیب انتخاب و کشت خطی از آن تهیه شدو این کلونی در فالکن محتوی محتوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، کشت و به مدت یک شب در دمای ^{o}C ۳۷ با سرعت rpm ۱۸۰ درون انکوباتور قرار گرفت. . تهیه ی کشت مایع از روی کلونی برای پلاسمید فاقد ژن موردنظر نیز صورت گرفت. در مرحله بعد، ٤ میلی‌لیتر از این کشت‌های حاوی پلاسمید نوترکیب به فلاسک‌های ۵۰۰ میلی-لیتری حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع، منتقل شد. با قرار گرفتن این فلاسک‌ها در انکوباتور با سرعت rpm ۱۸۰ شیک شده و پس از رسیدن تراکم باکتری‌ها به OD = 0.6 – 0.8 (پس از ٤ ساعت) با برداشتن مقداری از کشت درون فلاسک‌های حاوی پلاسمید نوترکیب به عنوان نمونه شاهد قبل از القا، IPTG با غلظت نهایی ۱ mM به دو فلاسک افزوده شد و برای بررسی بیان در ساعات مختلف، نمونه‌برداری شد. به منظور استخراج پروتئین از کشت مورد نظر، پس از پایان یافتن زمان القا با IPTG محیط مورد نظر درون فالکن‌های ۵۰ میلی‌لیتری تقسیم و به مدت ۵ دقیقه با سرعت rpm ۵۰۰۰ در دمای ^{o}C ٤ سانتریفیوژ شد. سپس با دور ریختن فاز رویی فالکن‌ها، رسوب موجود در ته فالکن‌ها توسط Tris-Hcl 20mM جمع آوری شد. با تقسیم این سوسپانسیون درون تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری و افزودن بافر لیز به هر تیوب، عملیات سونیکاسیون بر روی محلول موجود صورت گرفت. همزمان با سونیکاسیون روی نمونه‌های القا شده، این عملیات بر روی پلاسمید فاقد ژن که به همین روش القا شده بود و نیز محلول برداشته شده قبل از القا نیز صورت گرفت. جهت جلوگیری از تخریب گرمایی، تمامی مراحل سونیکاسیون بر روی یخ انجام گرفت. محلول حاوی پروتئین‌های استخراج شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت rpm ۱٤۰۰۰ در دمای ^{o}C ٤ سانتریفیوژ شد و فاز رویی آن بین سه تیوب ۲ میلی‌لیتری تقسیم و به هر کدام از این تیوب‌ها 1.5 ml استون ۱۰۰٪ اضافه کرده و پس از چند بار وارونه کردن تیوب، به مدت ۲ ساعت در ^{o}C ۷۰- نگهداری شدند. پس از گذشت این زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت rpm ۱٤۰۰۰ و دمای ^{o}C ٤ انجام شد. فاز رویی دور ریخته شد و به رسوبات ته تیوب، ۳۰۰ میکرولیتر استون ۸۰٪ اضافه شو و سانتریفیوژ این بار به مدت ۵ دقیقه با سرعت rpm ۱٤۰۰۰ و دمای ^{o}C ٤ انجام شد. سپس فاز مایع رویی دور ریخته شد و رسوب ته تیوب پس از حدود ۵ دقیقه عاری از استون شده و به حالت خشک در آمده بود که در این صورت به هر یک از تیوب‌ها ۳۰ میکرولیتر بافر PAGE افزوده شد. قبل از الکتروفورز پروتئین، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ^{o}C ۹۵ حرارت داده و آماده برای الکتروفورز شدند. استخراج باند مورد نظر پروتئین از ژل انجام و برای تولید آنتی‌بادی اختصاصی به مراکز مربوطه جهت تزریق به خرگوش ارسال شد.

نتایج و بحث

هدف نهایی این تحقیق تولید آنتی‌بادی اختصاصی PVX می‌باشد که برای این منظور ژن CP ابتدا در پلاسمید pGBKT7 و پس از بررسی نتایج توالی یابی، در پلاسمید بیانی pET-21a همسانه-سازی شد تا بصورت نوترکیب تولید گردد و به عنوان آنتی ژن مورد استفاده قرار گیرد. در این راستا، ابتدا به کمک آغازگرهای اختصاصی حاوی سایت‌های برشی آنزیم، ناحیه ژنی پروتئین پوششی ویروس (CP) از روی RNA ویروس با واکنش RT-PCR تکثیر گردید. این آغازگرها قطعه ای به طول ۷۱٤ نوکلئوتید حاوی ژن پروتئین پوششی را تکثیر کردند. در جدول ۱ اسامی آغازگرها به همراه ترادف نوکلئوتیدی آنها آمده است.

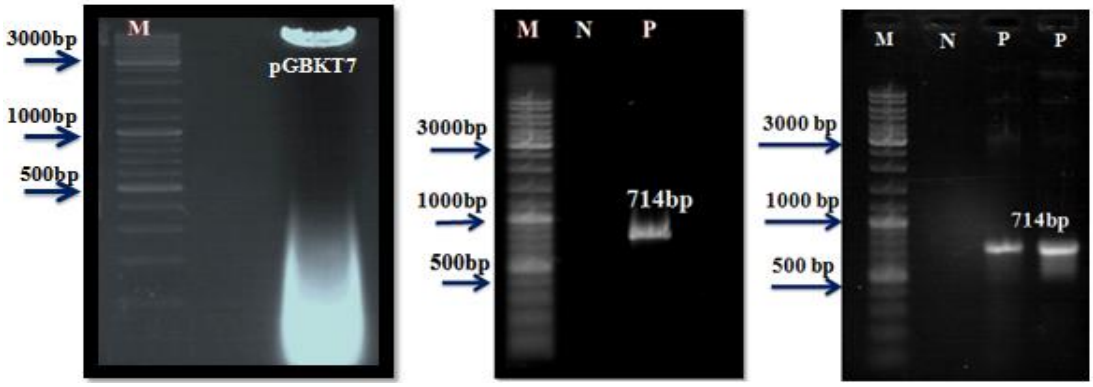
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.251]

جدول۱- آغازگرهای مورد استفاده به منظور تکثیر ژن پروتئین پوششی(CP) ویروس PVX

Table 1. The primers used for amplification of the coat protein (CP) gene of PVX virus

Primer	Sequence
CP PVX F (*Bam*HI)	aaGGATCCatgtcagcaccagctagcaca
CP PVX R (*Eco*RI)	aaGAATTCttatggtggtgggagagtgac

محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ و با استفاده از بافر TAE الکتروفورز شد (شکل ۱، الف). ژن مورد نظر توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Eco*RI برش داده شده و پس از خالص‌سازی در روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین باند به طول ۷۱٤ نوکلئوتید جداسازی و خالص‌سازی شد (شکل ۱، ب). هم چنین پلاسمید pGBKT7 بطور همزمان با این آنزیم‌های برشی برش داده شد(شکل ۱، ج). همسانه‌سازی در پلاسمید انجام شد.



الف ب ج

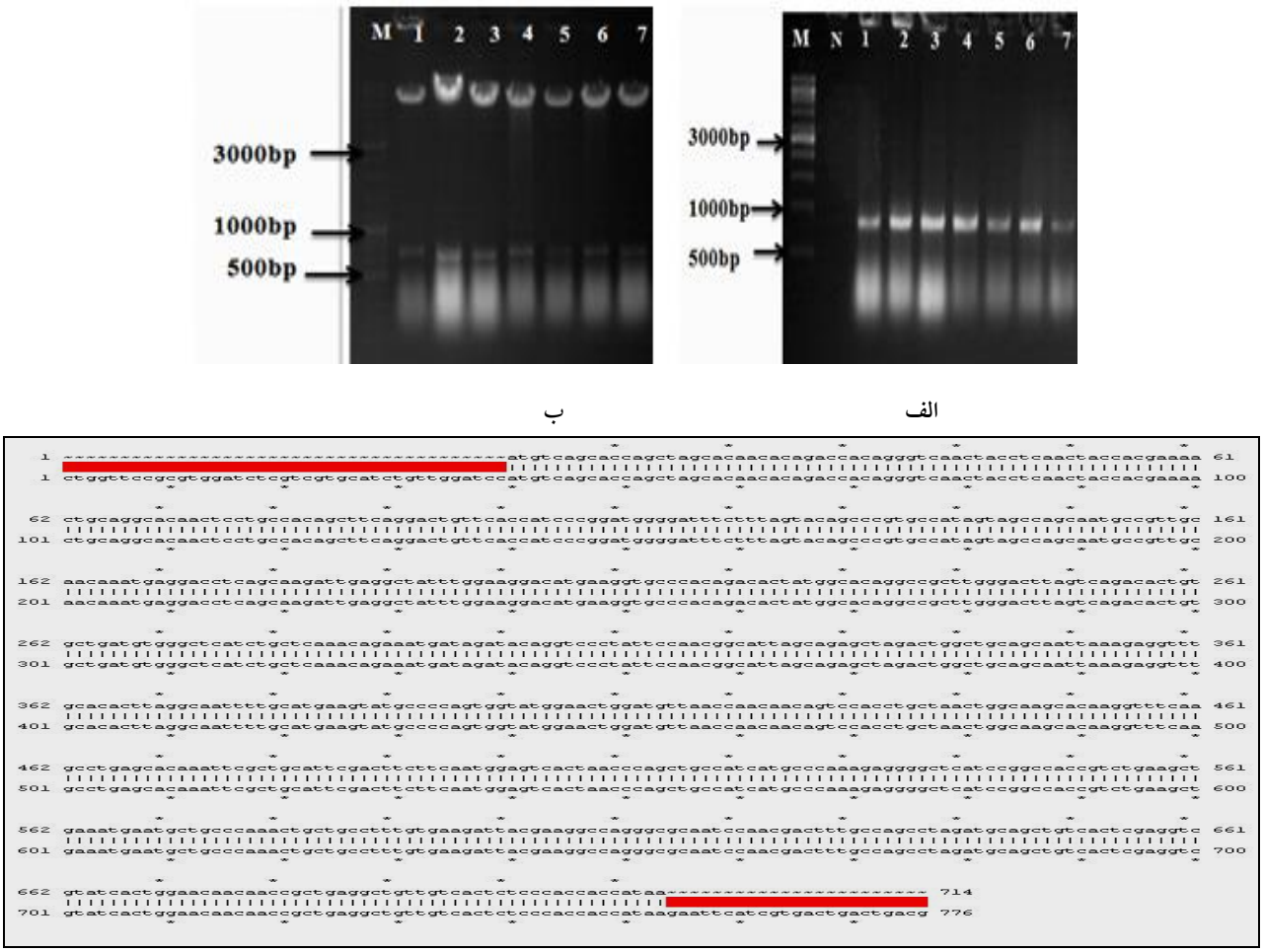
شکل۱- الف) الکتروفورز قطعات تکثیر شده طی واکنش PCR مربوط به ناحیه ژن پروتئین پوششی(CP) ویروس PVX با آغازگرهای اختصاصی آن. ب) الکتروفورز ژن CP خالص‌سازی شده بعد از هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Bam*H و *Eco*RI روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین. ج) الکتروفورز پلاسمید pGBKT7 بعد از هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین با آغازگرهای اختصاصی CP. M: مارکر، N:کنترل منفی، P: کنترل مثبت.

Figure 1. a. Electrophoresis of PCR amplified fragments related to the region of the coat protein (CP) gene of PVX virus with its specific primers. b. Electrophoresis of purified CP gene after enzymatic digestion using *Bam*HI and *Eco*RI enzymes on low melting point agarose gel. c) Electrophoresis of pGBKT7 plasmid after enzymatic digestion using *Bam*HI and *Eco*RI enzymes on low melting point agarose gel using specific primers CP. M: marker, N: negative control, P: positive control.

واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی CP روی کلونی‌های بدست آمده نوترکیب بودن تعدادی از کلونی‌ها را تایید کرد (شکل ۲، الف). همچنین برش با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Eco*RI وجود قطعه ژنی مربوط به CP در این پلاسمیدها را تایید کرد(شکل ۲، ب). جهت تعیین توالی ژن مذکور، پلاسمید نوترکیب به انستیتو IBMP استراسبورگ فرانسه ارسال گردید. پس از تعیین توالی قطعه درج شده، مقایسه توالی نوکلئوتیدی بدست آمده با توالی نوکلئوتیدی موجود در NCBI (FJ461343) توسط برنامه BLAST، صحت ترادف مورد نظر را اثبات نمود. پلاسمیدهای نوترکیب پس از تعیین توالی با توالی منتشر شده مقایسه شدند (شکل ۲، ج).

سپس به منظور بیان پروتئین موردنظر، جداسازی ژن CP از پلاسمید pGBKT7 طی واکنش برش آنزیمی انجام شد (شکل ۳، الف) و این بار همسانه‌سازی این قطعه ژنی در پلاسمید بیانی - pET21a صورت گرفت . این پلاسمیدها به سویه‌ی بیانی BL21 منتقل شدند و کلونی‌های رشد یافته با واکنش PCR تایید شدند(شکل ۳، ب). سپس بیان ژن پروتئین پوششی PVX در باکتری با استفاده از تکنیک SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. در الکتروفورز پروتئین‌هاقطعاتی با وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون برای پروتئین پوششی مشاهده گردید(شکل ۳، ج).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.251]

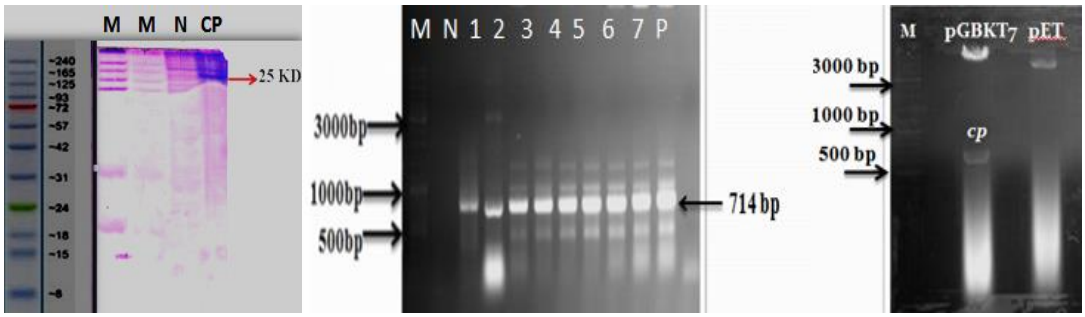


ب الف

ج

شکل۲- الف) الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن CP بر روی کلنی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب. ب) الکتروفورز محصول هضم پلاسمید نوترکیب pGBKT7-CP با آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI روی ژل آگارز ۱درصد. M: مارکر، N: کنترل منفی. ج) ردیف چینی توالی پلاسمید نوترکیب pGBKT7-CPPVX شماره ۱ با توالی CPPVX منتشر شده در NCBI (FJ461343).

Figure 2. a. Electrophoresis of PCR product with CP gene specific primers on bacterial colonies containing recombinant plasmid. b. Electrophoresis of the digestion product of recombinant plasmid pGBKT7-CP with BamHI and EcoRI enzymes on 1% agarose gel. M: marker, N: negative control. C. alignment of pGBKT7-CPPVX recombinant plasmid number 1 with CPPVX sequence published in NCBI (FJ461343).



ج ب الف

شکل۳- الف) الکتروفورز محصول هضم پلاسمید نوترکیب pGBKT7-CP و نیز وکتور pET با آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI روی ژل آگارز ۱درصد. ب) الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن CP بر روی کلنی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب. ج) تصویر الکتروفورز پروتئین روی ژل آکریل‌آمید ۱۲/۵٪ که باند مربوط به پروتئین CP به اندازه ۲۵ KD در چاهک CP قابل مشاهده است. چاهک N پلاسمید pET-21a خالی القا شده می‌باشد. P: کنترل مثبت.M : مارکر.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.251]

Figure 3. a. Electrophoresis of the digestion product of recombinant plasmid pGBKT7-CP and pET vector with *Bam*HI and *Eco*RI enzymes on 1% agarose gel. b. Electrophoresis of PCR product with CP gene specific primers on bacterial colonies containing recombinant plasmid. C. The image of protein electrophoresis on 12.5% acrylamide gel, where the CP protein band with a KD of 25 can be seen in the CP well. The N well is the induced empty pET-21a plasmid. M : Marker.

سالانه در سراسر جهان ویروس‌ها خسارات قابل توجهی به محصولات کشاورزی و از جمله سیب‌زمینی وارد می‌کنند و باعث کاهش کمیت و کیفیت محصولات می‌شوند. گیاه سیب‌زمینی از جمله محصولات غده‌ای است که نقش مهمی در تغذیه مردم جهان دارد (Rezaee and Soltani 1996). از جمله مهمترین ویروس‌های سیب‌زمینی، *Potato X Potexvirus* (PVX) است که اولین بار در انگلستان تشخیص داده شد (Smith 1931). از آنجایی که روش‌های موثر کنترل ویروس‌ها فقط به مبارزه با ناقلین، کاشت ارقام مقاوم و استفاده از بذور سالم محدود می‌شود، دستیابی عملی به تکنولوژی شناسایی عوامل بیماریزای ویروسی، هدف عمده این تحقیق است. تشخیص آسان، سریع و دقیق ویروس‌ها با کاربرد حداقل مواد گیاهی یکی از ارکان اصلی فرایند تولید هسته‌های اولیه عاری از ویروس در سیستم تولید بذر سیب‌زمینی می‌باشد. بسیاری از ویژگی‌های اساسی ویروس‌ها و عوامل عفونت‌زای دیگر با مطالعه روی گیاهان کشف شده‌اند. پروتئین‌های ساختمانی ویروس‌ها دارای اعمال متعددی هستند. پوشش پروتئینی ویروس برای مونتاژ ویروس و نیز حرکت سلول به سلول مورد نیاز است. همچنین این پروتئین باعث محافظت اسیدنوکلئیک ویروس در برابر تجزیه شدن بوسیله نوکلئازها می‌شود. با توجه به اینکه در اکثر موارد ویژگی های ساختاری و فعالیت پروتئین‌های نوترکیب مشابه انواع طبیعی آنهاست، تولید پروتئین با کمک تکنولوژی DNA نوترکیب کاری مقرون به صرفه است. امروزه روش (Enzyme Linked Immunosorbant Assay ELISA) روشی معمول، معتبر، سریع و ارزان برای تشخیص ویروس در سطوح وسیع است. به منظور استفاده از این روش نیاز به تامین منبع آنتی‌ژن ویروسی می‌باشد. باکتری *E. coli* یکی از متداولترین سیستم‌های میزبان برای بیان سطح بالای پروتئین‌های نوترکیب است چرا که علاوه بر دارا بودن امتیازات باکتری‌ها از جهت تکثیر سریع، بیان سریع، مصرف کم مواد اولیه و سهولت کشت و کنترل آسان، میزان بالایی از بیان پروتئین نوترکیب و قدرت بالایی برای پذیرش ژن‌های بیگانه دارد (Makrides 1996). همچنین وجود دانش زیاد در مورد ویژگی‌های ژنتیکی و مولکولی این باکتری و در دسترس بودن تعداد زیادی از پلاسمید-های همسانه سازی (cloning vectors)، آن را به موجودی بی‌نظیر و کارا برای تحقیقات مهندسی ژنتیک و دست‌ورزی‌های ژنتیکی مبدل کرده است. بیان پروتئین در باکتری *E. coli* بسیار ساده، کم-هزینه و سریع‌تر از سایر روش‌ها صورت می‌گیرد. علاوه بر این تعدادی از نژادهای جهش یافته *E. coli* در دسترس هستند که می‌توانند بیان پروتئین‌های نوترکیب را بهبود بخشند. به عنوان مثال استفاده از نژادهای میزبان با جهش‌هایی در ژن‌های پروتئاز سیتوپلاسمی، تخریب پروتئین نوترکیب بیان شده را کاهش داده و موجب افزایش بازده تولید می‌شود (Fischer *et al*. 1993). پروتئین‌های بزرگ معمولا در سیستم‌های یوکاریوتی بیان می-شوند، در حالیکه پروتئین‌های کوچکتر در سیستم‌های پروکاریوتی بیشتر بیان می‌شوند. در حقیقت نقص ذاتی سیستم گلیکوزیلاسیون پروتئین در پروکاریوتها آنها را در بیان پروتئین‌ها ی بزرگ ناتوان کرده است و در نتیجه باکتری میزبان مناسبی برای تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی پستانداران نمی‌باشد (Janknecht and Martynoff 1991). محدودیت‌های سیستم بیان پروکاریوتی باکتری *E. coli* مانع چندانی برای تولید موفق پروتئین‌های پوششی نوترکیب بسیاری از ویروس‌های گیاهی نبوده است، زیرا بیان ژن پروتئین پوششی ویروس در باکتری*E. coli* و به دنبال آن، خالص سازی و تولید آنتی بادی پلی کلونال برای تعدادی از ویروسهای گیاهی گزارش شده است (Sadeghan *et al*. 2013; Koohapitagtam and Nualsri 2013). پس از بیان و خالص سازی پروتئین پوششی نوترکیب ویروس و تزریق آن به خرگوش، آنتی بادی پلی‌کلونال تولید شده از قابلیت شناسایی طیف وسیعی از جدایه‌های ویروسی برخوردار خواهد بود (Cerovska et al 2010). واحدهای پروتئین پوششی ویروسی دارای دو نوع اپیتوپ متفاوت می‌باشند. یک گروه در سطح زیر واحدهای پروتئین پوششی قرار داشته، اما در هنگام تشکیل پیکره‌های کامل ویروسی و چرخش‌های ایجاد شده در سطح پیکره‌ها واقع نخواهند بود. این

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.251]

گروه تحت نام کریپتوتوپ نامگذاری گردیده و آنتی‌بادی تولید شده علیه آنها معمولا قادر به تشخیص ویریون کامل ویروسی نمی-باشد. اما زیر واحدهای پروتئین پوششی دارای اپیتوپهای دیگری تحت نام متاتوپها نیز هستند که در سطح پیکره‌های کامل ویروسی و زیرواحدهای پروتئین پوششی آن واقع گردیده و بنابراین آنتی بادی تولید شده علیه آنها، قادر به تشخیص پیکره‌های کامل ویروسی در گیاهان آلوده می‌با شد. بر این اساس، این فرض مطرح است که اگر از پروتئین پوششی نوترکیب ویروس بصورت غیردناتوره و با حفظ ساختمان فضایی پروتئین برای تولید آنتی-بادی اختصاصی استفاده شود، آنتی بادی تولیدی از قابلیت چندانی برای تشخیص پیکره‌های کامل ویروسی برخوردار نخواهد بود. از اینرو عمدتا ترجیح داده می‌شود که از فرم دناتوره پروتئین پوششی برای تولید آنتی بادی استفاده شود (Van Regenmortel 1982). البته استفاده از فرم دناتوره پروتئین نوترکیب از مزیت دومی نیز برخوردار است که به قابلیت استخراج مقدار بیشتری پروتئین نوترکیب از توده باکتری رشد یافته مربوط می شود. اغلب تحقیقات مشابه در زمینه تولید آنتی بادی برای پروتئینهای ویروسی نوترکیب از پپتید دارای His6 Tag برای خالص سازی آسان پروتئین نوترکیب هدف از طریق کروماتوگرافی تمایلی در ستون شارژ شده با یون نیکل (Ni^{+2}) استفاده کرده اند. در این قطعه پپتیدی، شش هیستیدین به انتهایN پروتئین نوترکیب اضافه شده و عملکرد بسیار مناسبی برای خالص سازی بسیاری از پروتئین های نوترکیب داراست (Qiagen 2003). گزارش‌ها بیانگر آن است که استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب برای تولید آنتی بادی اختصاصی ویروس‌های گیاهی موجب رفع مشکل عدم خلوص نمونه‌های ویروسی در هنگام تزریق به منظور تولید آنتی بادی می‌گردد که از جمله میتوان به رفع مشکل تشخیص ویروس GLRaV با استفاده از آنتی بادی‌های نوترکیب اشاره کرد (2012 Beuve *et al*. 2007; Fajardo *et al*. 2007; Khan *et al*.). به دلیل مشکلات موجود در خالص‌سازی ویروس کوتولگی زرد جو که ناشی از محدود بودن این ویروس به آوند آبکشی، عدم انتقال مکانیکی و غلظت بسیار پایین آن در گیاه میزبان است، پروتئین پوششی این ویروس به منظور تهیه آنتی‌بادی و استفاده از آن برای مطالعه ویروس، در باکتری *E. coli* بیان شد (Shamsbakhsh and Symons 2004). پس از گزارش ویروس Tuberose mild mosaic virus: (TMMV) از گل مریم (Chen and Chang 1998) با توجه به اهمیت اقتصادی این گیاه در کشور تایوان، محققان بر آن شدند که تمامی گیاهان آلوده به این ویروس را در مزارع شناسایی و از بین ببرند. برای رسیدن به این هدف نیاز به تولید مقدار زیادی آنتی‌بادی اختصاصی با کیفیت بالا بود. بنا بر این پس از تعیین توالی ژن پروتئین پوششی ویروس، آن را در باکتری *E. coli* بیان و آنتی‌بادی برای آن تهیه شد (Chen *et al*. 2002). ویروس کوتولگی آلو یکی از مهمترین ویروس‌های درختان میوه هسته‌دار بوده و غلظت آن در عصاره گیاهی تهیه شده معمولا پایین است. این ویروس در طی چند ساعت و در دمای اتاق نیمی از توان بیماری‌زایی خود را از دست می‌دهد. برای تهیه آنتی‌بادی علیه این ویروس نیاز به وجود غلظت مناسبی از ذرات ویروسی خالص می‌باشد. با استفاده از تکنیک بیان ژن در باکتری آنتی بادی پلی کلونال علیه این ویروس تهیه شد (Abou- *et al*. 2004 javad). این روش برای تشخیص گونه‌های ویروسی بسیار نزدیک از یکدیگر نیز بسیار موثر بوده است. به عنوان مثال، با توجه به همبستگی سرولوژیکی بین بعضی از ویروس‌های خانواده پوتی ویروس، همچون ویروس Y سیب زمینی و ویروس A سیب زمینی، آنتی سرم تهیه شده از طریق تزریق پیکره‌های ویروسی سالم به حیواناتی همچون خرگوش قادر به تشخیص این گونه از ویروسها از یکدیگر نیست. این در حالیست که بیان ژن پروتئین پوششی PVY در باکتری *E.coli* و به دنبال آن خالص‌سازی و تولید آنتی بادی پلی کلونال برای این ویروس سبب شد که آنتی بادی نوترکیب تولید شده به صورت اختصاصی جهت تشخیص جدایه‌های PVY استفاده شود. زمانی که از آنتی بادی نوترکیب در آزمون های DBIA، IPTA-ELISA وDAS-ELISA استفاده گردید، ایزوله‌های سیب زمینی آلوده به PVY به راحتی تشخیص داده شدند (Abdel-Salam et al, 2014). در سال ۲۰۰۵ با در دسترس بودن توالی پروتئین پوششی ویروس PVX ایزوله مصری، ژن پروتئین پوششی برای تامین منبع آنتی‌ژن جهت تولید آنتی‌بادی در باکتری *E. coli* بیان شد (Soliman *et al*. 2006). برای این منظور این ژن در پلاسمید بیانی pBAD-TOPO همسانه‌سازی شد. این پلاسمید دارای 6XHis-tag می‌باشد که

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.251]

برای خالص‌سازی پروتئین نوترکیب توسط ستون‌های کروماتوگرافی مناسب می‌باشد. در این پروژه نیز از ژن پروتئین پوششی PVX و پلاسمید بیانی pET21a استفاده و برای خالص-سازی دنباله His که در انتهای کربوکسیلی قرار دارد، در نظر گرفته شده است.

این تحقیق مقدمه اصلی و ضروری را برای تولید آنتی‌بادی ویروس PVX فراهم آورد تا در ادامه در قالب یک شرکت دانش بنیان خط تولید آنتی‌بادی PVX و تهیه کیت‌های تشخیص آن فراهم گردد. این کیت‌ها در سیستم تولید بذر عاری از ویروس سیب‌زمینی و همچنین در مزارع سیب‌زمینی و توتون مورد استفاده قرار خواهند گرفت و با در دسترس بودن کیت‌های تشخیص PVX سیستم تولید بذر سیب‌زمینی دقیق‌تر خواهد شد. در کار-های قبلی تولید آنتی‌بادی ویروس‌ها، معمولا از ویروس خالص-سازی شده از گیاه برای تزریق به خرگوش و تولید آنتی‌بادی استفاده می‌شد که متاسفانه به خاطر وجود پروتئین‌های گیاهی به همراه ویروس، آنتی‌بادی تولید شده غیر اختصاصی عمل می‌کرد. در این تحقیق تنها یک ژن PVX و آن هم CP که در دسترس-ترین پروتئین ویروس و در واقع پروتئین پوششی پیکره آن است بصورت خالص در باکتری تولید شد تا به خرگوش تزریق گردد و زمینه تولید آنتی‌بادی خالص‌تر با اثر غیر اختصاصیت کاهش یافته، فراهم گردد.

منابع

Abel, PP., Nelson, RS., De, B., Hoffmann, N., Rogers, SG., Fraley, RT., Beachy, RN. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science, 232, 738-743. https://doi.org/10.1126/science.3457472

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. https://doi.org/10.3923/ijv.2014.1.16

Abou-Javad, Y., Sobh, H., Cordahi, N., Kawtharani, H., Nemer, G., Maxwell, DP., Nakhla, MK. (2004). Immunodiagnosis of prune dwarf virus using antiserum production to its recombinant coat protein. Journal of virological Methods, 121, 31-38. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.05.013

Alhoot, MA., Wang, SM., Sekaran, SD. (2012). RNA interference mediated inhibition of dengue virus multiplication and entry in HepG2 cells. PLoS One, 7,34060. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034060

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. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.042

Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, ET., Sit, TL., Lommel, SA. (2001). The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. Annu. Rev. Phytopathol, 39, 419-460. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.419

Carrington, JC., Kasschau, KD., Mahajan, SK., Schaad, MC. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. Plant Physiol, 8,1669-1681. https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1669 or https://doi.org/10.2307/3870221

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. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01580.x

Chen, CC., Chang, CA. (1998). Characterization of a potyvirus causing mild mosaic on tuberose. Plant Disease, 82, 45-49. https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.1.45

Chen, CC., Hsiang, T., Chiang, FL., Chang, CA. (2002). Molecular characterization of Tuberose mild mosaic virus and preparation of its antiserum to the coat protein expression in bacteria. Botanical Bulletin of Academia Science, 43, 13-20.

Demain, AL., Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv, 27, 297-306. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008

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. https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000400008

Fedorkin, ON., Solovyev, AG., Yelina, NE., Zamyatnin, AA., Zinovkin, RA., Makinen, K., Schiemann, J., Morozov, SY. (2001). Cell-to-cell movement of Potato virus X involves distinct functions of the coat protein. J Gen Virol, 82, 449-458. https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-2-449

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. https://doi.org/10.1002/bit.260410103

Hasan-Sheikhi, P., Massumi, H., Zolala, J., Heydarnejad, J., Hosseinipour, A., Maddahian, M. (2020). Expression of the recombinant coat protein of Potato virus X in Escherichia coli. Journal of Agricultural Biotechnology, 11(4), 175-192.

Hefferon, KL., Khalilian, H., AbouHaidar, MG. (1997). Expression of the PVYo coat protein (CP) under the control of the PVX CP gene leader sequence: Protection under greenhouse and field conditions against PVYo and PVYN infection in three potato cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 94, 287-292. https://doi.org/10.1007/s001220050412

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.251]

Huisman, MJ., Linthorst, HJM., Bol, JF., Cornelissen, BJC. (1988). The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus stranded RNA viruses. Journal of General Virology, 69, 1789-1798. https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-8-1789

Janknecht, R., 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. https://doi.org/10.1073/pnas.88.20.8972

Jeevalatha, A., Kaundal, P,. Kumar, R., Raigond, B., Gupta, M., Kumar, A., Sharma, S., Sagar, V., Nagesh, M., Singh, BP. (2016). Analysis of the coat protein gene of Indian Potato virus X isolates for identification of strain groups and determination of the complete genome sequence of two isolates. Springer. https://doi.org/10.1007/s10658-016-0858-1

Jellis, S. (1992). Multiple resistance to diseases and pests in potatoes, Cambridge. Plant Breeding International, 63, 51-58. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0954-5_4

Khan, S., Jan, AT., Mandal, B. et al. (2012). Immuno-diagnostics of cucumber mosaic virus using antisera developed against recombinant coat protein. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 45, 561-59. https://doi.org/10.1080/03235408.2011.588043

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.

Kutnjak, D., Silvestre, R., Cuellarb, W., Perezb, W., Mullerb, G., Ravnikara, QM., Kreuze, J. (2014). Complete genome sequences of new divergent potato virus X isolatesand discrimination between strains in a mixed infection using smallRNAs sequencing approach. Journal of ELSEVIER. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.07.012

Leshchiner, A., Minina, E., Rakitina, D., Vishnichenko, V., Solovyev, A., Morozo, S., et al. (2008). Oligomerization of the potato virus X 25-kD movement protein. Biochemistry (Mosc), 73, 50-55. https://doi.org/10.1134/S0006297908010070

Makrides, SC. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. Microbiol Rev, 60, 512-538. https://doi.org/10.1128/mr.60.3.512-538.1996

Masoudi, N., Rouhibakhsh, A., Asareh, MH., Naderpour, M., Koolivand, D., (2018). Identification of dominant isolate of Potato virus S in Iran and heterologous expression of its coat protein. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 7 (2), 153-162. Dor:20.1001.1.25885073.1397.7.2.5.6

Matthews, REF. (1993). Diagnoses of Plant Virus Diseases. CRC Press. Boca Raton, 374.

Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M., Tepfer, M. (2008). Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. Mol Plant Path, 9(1), 73-83. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00447.x

Qiagen. (2003). The QIA expression istTM - A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Qiagen, Hilden, Germany.

Rezaee, A., Soltani, A. (1996). Potato Farming. Mashhad, Jahad Daneshgahi Publication, Iran (In Persian).

Sadeghan, A., Shams-bakhsh, M., Yakhchali, B. (2013). Expression of Citrus tristeza virus coat protein gene in Escherichia coli. Prot, 2, 387-393.

Shamsadden-Saeed, F., Massumi, H., Moradi, S., Maddahian, M., Heydarnejad, J., Hosseini Pour, A., Varsani, A. (2014). Incidence and characterization of Potato virus V infections in Iran. Virus disease, 25, 78-84. https://doi.org/10.1007/s13337-013-0178-4

Smith, KM. (1931). On the composite nature of certain potato virus diseases of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators and selective method of transmission. 109, 251-267. https://doi.org/10.1098/rspb.1931.0080

Soliman, AM., Barsoum, BN., Mohamed, GG., El-Attar, AK., Mazyad, HM. (2006). Expression of the coat protein gene of the Egyptian isolate of Potato virus X in Escherichia coli and production of polyclonal antibodies against it. Arab J. Biotech, 9, 115-128.

Soliman, AM., Barsoum, BN., Mohamed, GG., Rezk, AA., Aboul-Ata, AE., Mazyad, HM. (2008). siRNA Silencing of PVX Coat Protein Gene Affects Accumulation of Viral RNA in Potato and Tobacco Plants. International Journal of Virology. 4(1). 14-25. https://doi.org/10.3923/ijv.2008.14.25

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol, 72, 22-211. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8

Van Regenmortel, MHV. (1982). Serology and immunochemistry of Plant Viruses. Academic Press, INC. New York. https://doi.org/10.3109/08820138209050747

Verchot-Lubicz, J. (2005). A new model for cell-to-cell transport of potexviruses. Molecular Plant Microbe Interaction, 18, 283-290. https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0283

Verchot-Lubicz, J., Ye, CM., Bamunusinghe, D. (2007). Molecular biology of Potexviruses: recent advances. J Gen Virol, 88, 1643-1655. https://doi.org/10.1099/vir.0.82667-0

Yonghui, H. (2010). Transient expression of potato virus x coat protein gene in Nicotiana benthamiana Suranaree. Master of Science Biotechnology thesis. Suranaree University of Technology.

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. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01365.x

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.251]