مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۷
صفحه ۱۰۲-۹۱

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 1

مقایسه بیان ژن نوکلئوکپسید ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی در دو سویه باکتری *E. coli*

Comparison of Tomato spotted wilt virus nucleocapsid gene expression in two different strains of *E. coli*

زهرا زائر، داود کولیوند*، امید عینی

Zahra Zaer, Davoud Koolivand, Omid Eini

گروه گیاهپزشکی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: koolivand@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۷ – تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۲)

چکیده

از آنجایی که روش‌های تولید آنتی بادی برای کاربرد در ویروس‌ها دارای محدودیت‌هایی می‌باشد، بیان پروتئین پوششی در سیستم پروکاریوتی به منظور تولید آنتی‌ژن انجام می‌شود. در پژوهش حاضر ژن نوکلئوکپسید ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی از یک جدایه بومی در ایران تکثیر شده و پس از همسانه‌سازی، قطعه مربوط به ژن نوکلئوکپسید در سازه pTG19TSWV-N با آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I خارج شد و در حامل بیانی pET32a(+) برش یافته با آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I همسانه‌سازی شد. سپس، سازه pET32TSWV-N به سویه‌های BL21(DE3) و BL21(DE3) pLysS از باکتری *E. coli* انتقال یافت. بیان ژن نوکلئوکپسید با استفاده از القای پیشبر با غلظت یک میلی‌مولار IPTG در هر دو سویه صورت گرفت. چهار ساعت پس از القا، محیط‌های کشت باکتریایی جمع‌آوری شدند و محتوای پروتئینی استخراج شده از دو سویه مذکور در الکتروفورز عمودی بررسی شدند. با توجه به وزن مولکولی پروتئین بیان شده به همراه برچسب‌هایی که از پلاسمید به پروتئین اضافه شده بود، پروتئینی به اندازه حدود ۴۸ کیلودالتون در الکتروفورز عمودی مشاهده شد. نتایج این تحقیق حاکی از بیان ژن نوکلئوکپسید در دو سویه مذکور بود در حالیکه بیان پروتئین در سویه باکتریایی BL21(DE3) pLysS نسبت به BL21(DE3) بیشتر بود.

واژه‌های کلیدی

بیان،
بیان پروکاریوتی،
پروتئین نوترکیب،
ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.10.9]

مقدمه

بیماری پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی برای اولین بار در سال ۱۹۱۹ در استرالیا توسط بریتل بلنک گزارش شد (Shoshtari *et al.* 2011). ویروسی بودن بیماری در سال ۱۹۳۰ توسط ساموئل و همکاران مشخص شد (Nascimento *et al.* 2006). اولین گزارش علمی مبنی بر وجود ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی ((*Tomato spotted wilt virus* (TSWV) در ایران توسط بنانج و همکاران در سال ۱۳۷۵ ارائه شد (Shoshtari *et al.* 2011). ویروس TSWV با استفاده از روش‌های مولکولی توسط آغازگرهای مبنی بر ژن نوکلئوکپسید در سال ۱۳۹۵ از مناطق غربی ایران شناسایی شد (Abadkhah *et al.* 2017). در طبیعت این ویروس توسط تعدادی از گونه‌های تریپس به شیوه پایا و به روش گردشی- تکثیری انتقال می‌یابد (Kim *et al.* 2004). موثرترین ناقل این ویروس تریپس گل غربی (*Frankliniella occidentalis*) و تریپس پیاز (*Thrips tabaci*) است. (Angle *et al.* 2005) که باعث گسترش جهانی این ویروس می‌شوند. پژوهش‌ها نشان داده است که این ویروس بوسیله بذر و دانه گرده قابلیت انتقال ندارد (Broughton *et al.* 2007; Dougall and Tesoriero 2007). ویروس TSWV باعث آسیب جدی به طیف وسیعی از گیاهان مهم اقتصادی به ویژه سبزیجاتی مانند گوجه فرنگی و سیب زمینی می‌شود. علائم ناشی از این ویروس متنوع است و شامل لکه حلقوی، رگه‌های سیاه روی برگچه‌ها و ساقه، لکه برگی نکروتیک و سرخشیدگی انتهایی هستند (Lian *et al.* 2013).

این ویروس عضوی از خانواده *Tospoviridae* از راسته *Bunyavirales* است (Anonymous. 2017). پیکره ویروسی در سایز ۱۲۰-۸۰ نانومتر بوده و دارای ساختار کروی متصل به غشا لیپیدی هستند. ژنوم TSWV شامل سه بخش آرائی تک رشته‌ای (ssRNA) است که شامل قطعات L-RNA (8/9 kb)، M-RNA (4/8kb) و S-RNA (2/9 kb) هستند. (Lian *et al.* 2013). L-RNA یک رشته منفی است که آنزیم RNA depended RNA polymerase (RdRp) را کد کرده و نقش مهمی در تکثیر ویروس دارد (De Hann *et al.* 1991). در مقابل هر دو قطعه M و S، آمبی سنس با دو چهار چوب خوانش هستند، که باعث کد گذاری رشته ویروسی و یک رشته مکمل ویروسی می‌شوند (De.Hann *et al.* 1990; Kormeling *et al.* 1992) قطعه M-RNA، گلیکوپروتئین Gn و Gc که در انتقال ویروس با ناقل و یک پروتئین غیر ساختمانی بنام NSm که در حرکت سلول به سلول ویروسی نقش دارد را کد می‌کند (Soellick *et al.* 2000; Snipp *et al.*) 2007. در مقابل بخش S-RNA یک پروتئین غیر ساختمانی بنام NSs که در سرکوبی خاموشی ژن نقش دارد و یک پروتئین دیگر بنام نوکلئوکپسید N را کد می‌کند (Bucher *et al.* 2003). این پروتئین چند نقش داشته و در تنظیم نسخه برداری، همانند سازی، در ساختمان ذره و پوشش دار کردن آرائی ژنومی نقش دارد.

در میان روش‌های مختلف تشخیصی که برای شناسایی ویروس‌ها به کار می‌روند، روش‌های سرولوژیکی یکی از روش‌های پرکاربرد است (Hull 2002). روش‌های سرولوژیکی مانند آزمون الایزا به طور معمول برای غربالگری تعدادی زیادی از نمونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. آنتی‌بادی‌ها معرف اصلی در الایزا هستند که از آنتی-سرم خالص سازی شده در برابر آنتی‌ژن ویروسی بدست می‌آیند. اما خالص سازی ویروس از گیاه ممکن است یک فرآیند زمان‌گیر باشد و گاهی اوقات ممکن است نتایج نامطلوبی در خصوصیات و غلظت داشته و ویژگی متفاوتی از آنتی‌سرم ارائه دهد، زیرا ممکن است خلوص ویروس خالص شده متغیر و همراه با پروتئین‌های گیاهی است (Fajardo *et al.* 2007). علاوه بر این تجهیزاتی مانند اولتراسانتریفوژ سرعت بالا ممکن است در برخی آزمایشگاه‌ها به ویژه در کشورهای در حال توسعه در دسترس نباشد. پیشرفت در تکنولوژی دی‌ان‌ای نوترکیب، آماده سازی آنتی‌بادی در برابر ژن‌های ویروسی مانند پروتئین پوششی را تسهیل‌تر کرده است. بیان ژن‌های خارجی در سیستم *E. coli* نسبتاً ساده، سریع و ارزان برای تولید مقادیر زیادی پروتئین با کیفیت‌تر بالاتر حداقل اصلاحات پس از ترجمه است (Hartley 2006). به طور کلی پروتئین‌های نوترکیب به عنوان آنتی‌ژن‌های اختصاصی برای ایمن سازی در حیوانات برای بدست آوردن آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروسی با کیفیت مورد استفاده قرار می‌گیرند (Nickel *et al.* 2004). این آنتی‌بادی‌ها به طور گسترده در روش‌های سرولوژیکی برای تشخیص ویروس‌ها، در

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.10.9]

مطالعات مختلف و در تکنیک‌های بسیار حساس مانند وسترن بلات کاربرد دارند (Iima *et al*. 2005; Lima *et al*. 2012).

با توجه به محدودیت‌هایی که در تهیه آنتی‌بادی به روش‌های سنتی وجود دارد و همچنین استفاده از یک جدایه بومی به منظور تولید آنتی‌بادی گام اول در این راستا تهیه پروتئین به عنوان آنتی‌ژن برای تولید آنتی‌بادی است. در این تحقیق ژن نوکلئوکپسید ویروس TSWV پس از همسانه‌سازی در پلاسمید بیانی در دو استرین از سیستم باکتریایی *E.coli* بنام BL21(DE3) و BL21(DE3) pLysS بیان شد، سپس محتوای پروتئینی بیانی، در هر دو استرین با یکدیگر مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

منبع ویروسی و سویه‌های باکتریایی

از برخی مزارع گوجه‌فرنگی استان زنجان بازدید به عمل آمد و با توجه به مشاهده علایم مشکوک به آلودگی ویروسی نمونه‌های گیاهی مشکوک جمع‌آوری شدند. استخراج آرانای از حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بافت نمونه‌های آلوده، مطابق با روش چهارم روحانی (Rowhani *et al.* 1993) انجام شد. برای ساخت دی‌انای مکمل از یکی از آغازگرهای اختصاصی و کیت ساخت سنتز cDNA (HyperScriptTM) ساخت شرکت GeneAll در واکنشی با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگرهای اختصاصی ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (جدول ۱) در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Master mix ساخت شرکت Ampliqon، ۰/۲۵ میکرولیتر از آغازگرهای مستقیم و معکوس اختصاصی با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر دی‌انای مکمل الگو و ۳/۷۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. برنامه پی‌سی‌آر به صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C برای ۲ دقیقه، واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۰ °C و بسط ۳۰ ثانیه در ۷۲ °C برای ۳۵ سیکل و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C انجام گردید. محصولات پی‌سی‌آر تکثیر شده درون پلاسمید pTG19 همسانه سازی شد و جهت تعیین توالی و اطمنیان از قطعه تکثیر شده به شرکت بیونیر Bioneer کره جنوبی ارسال شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده ژن نوکلئوکپسید N ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی

Table 1- Specific primers for nucleocpaside genes (N) of Tomato spotted wilt virus

Primer	sequence
TSWVNF	5′ATCGGATCCATGTCTAAGGTTAAGCTCAC3′
TSWVNR	5′ATCCTCGAGTTAAGCAAGTTCTGTGAGTTTTGC3′

برای ادامه کار از سازه pTG19TSWVN که حاوی ژن کامل نوکلئوکپسید TSWV بود استفاده شد.با توجه به آغازگرهای اختصاصی (TSWV-F-TSWV-R) که دارای محل اثر *Bam*HI و *Xho*I بودند، ژن نوکلئوکپسید با آنزیم‌های مذکور از پلاسمید خارج شد. به منظور بیان پروتئین در سیستم *E.coli* سویه‌های BL21(DE3) و BL21(DE3) pLysS انتخاب شدند. هر دو سویه BL21(DE3) pLysS دارای ژن آرانا پلیمراز T7 قابل القا با IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) می‌باشند. سویه دارای پلاسمید pLysS، لیزوزیم T7 را کد می‌کند که مهار کننده طبیعی آر-انای پلیمراز T7 بوده و بیان پایه‌ای ژن‌های هدف تحت کنترل پیشبر T7 را سرکوب می‌کند. سلول‌های مستعد باکتریایی *E.coli* سویه‌های مختلف مورد استفاده در این تحقیق طبق دستورالعمل (Chung *et al*. 1989) تهیه شدند.

ساخت سازه بیانی pET32a-TSWV-N

به منظور به دست آوردن حجم مناسب برای برش آنزیمی، سازه ساخته شده و پلاسمید بیان با استفاده از روش شوک حرارتی (Chung *et al*. 1989) به باکتری *E.coli* سویه DH5α منتقل شدند. پس از حصول پرگنه‌ها روی محیط کشت جامد، به منظور استخراج پلاسمید کشت شبانه در محیط LB مایع صورت گرفت. استخراج پلاسمید با روش لیز قلیایی از پرگنه‌های رشد کرده در محیط کشت مایع صورت گرفت. برش آنزیمی در حجم ۴۰ میکرولیتر برای pTG19-TSWVN و پلاسمید pET32a(+) با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Xho*I به مدت ۳ ساعت در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. سپس محصول پی‌سی‌آر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. قطعه خارج شده از سازه

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.10.9]

pTG19TSWVN به عنوان ژن کامل نوکلئوکپسید و پلاسمید خطی شده (+)pET32a، از ژل آگارز طبق دستورالعمل کیت TM Gel SV Gene All® Expre ساخت شرکت کرهء جنوبی خالص سازی شدند. پس از استخراج قطعه مورد نظر و پلاسمید بیان pET32 برش یافته با آنزیم‌های مذکور از ژل آگارز، با توجه به غلظت قطعه ژن مورد نظر و دی‌انای پلاسمیدی واکنش اتصال در حضور آنزیم T_4DNA لیگاز در حجم نهایی ده میکرولیتر انجام شد. لوله‌های حاوی واکنش اتصال پس از قرار گرفتن حدود دو ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد به صورت شبانه در دمای چهار درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

سپس مخلوط واکنش اتصال، به روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد تکثیری *E.coli* سویه DH5α منتقل شد (Chung *et al.* 1989). به منظور تشخیص کلنی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب و جهت بررسی نتیجه تراریزش و وارد شدن صحیح قطعه در حامل، از آزمون کلنی- پی‌سی‌آر استفاده شد با این تفاوت که به جای دی‌انا الگو از کلنی‌های سفید باکتریایی استفاده شد. اجزای واکنش پی‌سی‌آر، شامل آب به مقدار ۳/۷۵ میکرولیتر، محتوی مسترمیکس ۶/۲۵ میکرولیتر که مخلوط (dNTPs، Mgcl2، آنزیم *Taq* DNA polymerase و بافر ۱۰X) آغازگرهای مستقیم و معکوس ژن نوکلئوکپسید ویروسی، به مقدار ۰/۲۵ میکرولیتر، در غلظت ۱۰ پیکومول و یک پرگنه سفید از کلنی باکتریایی اضافه شد. برنامه پی‌سی‌آر شامل یک سیکل در دمای ۹۴ °C به مدت ۶ دقیقه به منظور واسرشت سازی، ۳۵ سیکل در دمای ۹۴ دقیقه به مدت ۲۵ ثانیه و دمای اتصال در ۵۰ °C درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه و ۷۲درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه انجام شد. اتصالات و بسط نهایی واکنش به ترتیب در ۷۲ °C و ۱۲ به مدت زمان ۷ و ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در نهایت محصولات روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و مشاهده شد. همچنین برای غربال کلونی‌های مثبت حاوی پلاسمید بیان و ژن نوکلئوکپسید پس از استخراج پلاسمید از کلونی‌ها برش آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I صورت گرفت و محصول برش در ژل آگارز الکتروفورز شد.

به منظور تعیین توالی قطعه همسانه سازی شده در پلاسمید بیان، استخراج پلاسمید از کلنی‌های سفید مثبت روی محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ µg/ml به روش کیت (Gene All® Expre 50p TM Plasmid mini) ساخت شرکت کره جنوبی صورت گرفت. در نهایت مقدار و غلظت مناسب از پلاسمید استخراج شده برای تعیین توالی با استفاده از آغازگرهای پیشبر T7 و خاتمه دهنده T7 به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد.

بیان در دو سویه باکتریایی BL21(DE3) و BL21(DE3) pLysS

پس از بررسی صحت درج قطعه در پلاسمید حامل، عمل تراریزش پلاسمید نوترکیب pET-TSWV-N به سلول‌های مستعد *E.coli* سویه‌های بیانی BL21 (DE3) و BL21(DE3) pLysS به وسیله شوک حرارتی صورت گرفت (Chung *et al.* 1989). سه میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب pET32a-TSWV-N به ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد *E.coli* سویه BL21(DE3) و BL21(DE3) pLysS تراریزش شد. سپس به منظور غربالگری، عمل کشت روی محیط LB جامد که برای سویه BL1(DE3) حاوی آمپی‌سیلین با غلظت و µg/ml ۱۰۰ و برای سویه BL21(DE3) pLysS حاوی آمپی‌سیلین با غلظت مذکور و همچنین کلرامفنیکل با غلظت µg/ml ۳۴ استفاده شد. سپس پرگنه‌های سفید از هر دو پتری به طور تصادفی انتخاب وپس از تایید وجود قطعه برای بیان استفاده شد.

القای بیان پروتئین در دو سویه BL21(DE3) و BL21 (DE3) pLysS

پرگنه‌های سفید حاوی پلاسمید نوترکیب مربوط به دو سویه BL21(DE3) و BL21 (DE3) pLysS به طور جداگانه در دو محیط کشت LB مایع به ترتیب حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین، و آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل، به مدت یک شب در دستگاه شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور(rpm) ۲۰۰ در دقیقه، به منظور رشد نگهداری شدند. سپس کشت مجدد دو سویه باکتری در دو محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مذکور، جهت رسیدن OD سلول‌های باکتریایی به ۰/۵-۰/۶ به مدت دو الی سه ساعت در شیکر انکوباتور با دور(rpm) ۲۰۰ در دقیقه صورت گرفت. پس از رسیدن سلول‌های باکتریایی به OD مورد نظر، از هر دو محیط یک و نیم میلی‌لیتر به عنوان زمان صفر گرفته شد. جهت بیان پروتئین در شرایط بهینه، به هر دو محیط IPTG با غلظت نهایی نیم، یک و یک و نیم میلی مولار به منظور القای پیشبرT7 در دمای ۳۷ درجه

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.10.9]

سانتی‌گراد به مدت زمان های سه، چهار، شش و شانزده ساعت در شیکر انکوباتور، اضافه شد. پس از اتمام مدت زمان بیان، رسوب سلول‌های باکتریایی به مدت ۱۵ دقیقه در دور (rpm) ۱۳۰۰۰ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد جمع آوری شد و در فریزرC° ۲۰- نگه داری شدند. سپس به منظور بررسی بهترین زمان بیان پروتئین، رسوب‌های باکتریایی مربوط به زمان‌های مختلف، در ۱۶۰ میکرولیتر بافر نمونه سوسپانسیون شد و حجم ۲۰ میکرولیتر از پروتئین استخراج شده در SDS-PAGE بررسی شد.

تخمین پروتئین در فاز محلول و نامحلول

کل محتوای پروتئینی محلول و رسوب دو سویه مذکور، در نهایت توسط افزودن ۸۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده استخراج شد، بدین منظور پس از افزودن بافر لیز کننده به رسوب سلولی، سلول‌ها به ترتیب در نیتروژن مایع فریز و در حمام سلولی ۳۷ تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس سوسپانسیون حاصله در دور (rpm) ۱۳۰۰۰به مدت ده دقیقه در دمای چهاردرجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد، محلول رویی و فاز زیری که حاوی محتوای پروتئینی باکتری است برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی در فریزرC° ۲۰- نگهداری شدند.

بررسی بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از الکتروفورز عمودی SDS-PAGE

حدود ۲۰ تا ۴۰ میکرولیتر از نمونه‌های پروتئینی استخراج شده به روش (Laemmli 1970) در ژل ۱۲٪ پلی آکریل آمید به مدت ۴ ساعت با ولتاژ V ۱۰۰ الکتروفورز شد. رنگ آمیزی با محلول کوماسی بلو (متانول، اسید استیک و آب مقطر استریل که حاوی آبی کوماسی با غلظت نهایی ۰/۱ درصد بود) به صورت شبانه صورت گرفت. سپس شستشو با محلول رنگ بری (متانول، اسید استیک و آب مقطر استریل) به فاصله سه بار، هر یک ساعت، بر روی شیکر انکوباتور لرزان به منظور آشکار سازی پروتئین‌های بیانی صورت گرفت.

نتایج و بحث

پس از چند مرحله بهینه‌سازی دمایی در دمای اتصال آغازگرها، بهترین دمای هیبرید شدن (اتصال آغازگرها به الگو) برای ژن نوکلئوکپسید ۵۲ درجه‌سانتی‌گراد تنظیم گردید در نتیجه انتقال قطعات DNA ژن نوکلئوکپسید، اتصال قطعه DNA تکثیر شده مربوط به جدایه‌هایی از ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی به وکتور pTG19-T مربوطه را نشان داد.

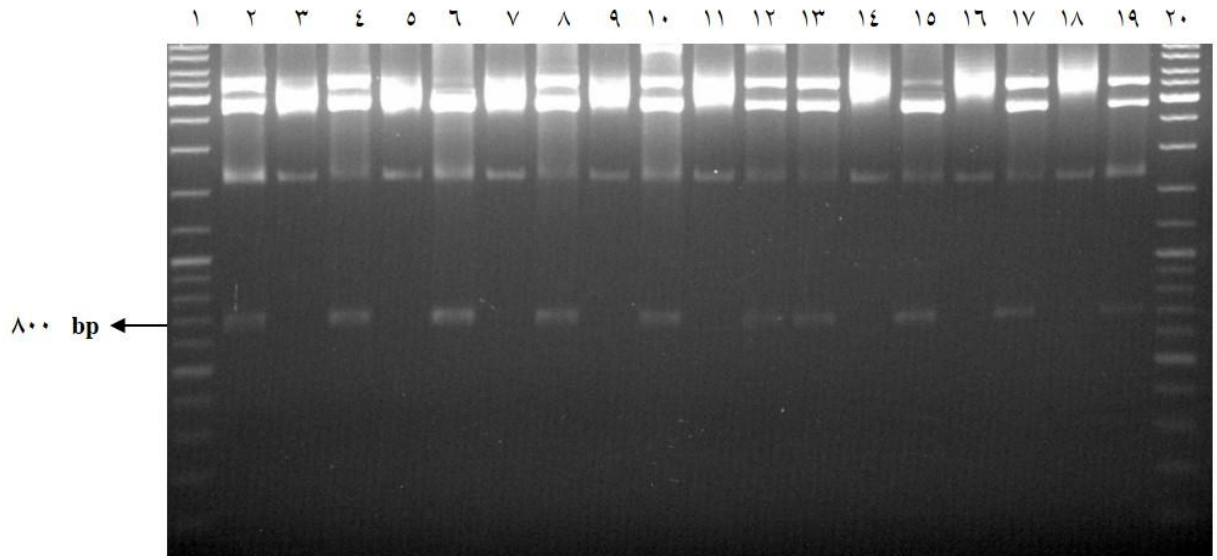
برش آنزیمی حامل بیانی pET32a(+) و سازه‌ی pTG19-TSWV-N

جهت اتصال قطعه ژن نوکلئوکپسید به حامل بیانی pET32a(+)، نیاز به خطی شدن پلاسمید بیانی و جداسازی قطعه ژن نوکلئوکپسید از پلاسمید pTG19 بود. پس از برش آنزیمی توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I قطعه‌ای به طول ۵۹۰۰ bp مربوط به حامل بیانی که حاکی از خطی شدن این پلاسمید بود در نمونه پلاسمید.(+) pET32a مشاهده شد. همچنین در برش سازهء pTG19-TSWV-N، پس از برش با آنزیم‌های مذکور قطعه‌ای به طول ۲۸۸۰ bp مربوطه به پلاسمید pTG19 و قطعه دیگری به اندازه ۸۰۰ bp که نشان دهنده جداسازی ژن نوکلئوکپسید بود مشاهده شد. نتایج الکتروفورز پلاسمیدهای برش یافته حاکی از خطی شدن پلاسمید بیانی pET32a(+) و رها سازی ژن نوکلئوکپسید TSWV-N از حامل pTG19 بود.

همسانه سازی ژن نوکلئوکپسید TSWV-N به حامل بیانی pET32a(+)

پس از استخراج قطعه مورد نظر و حامل بیانی از ژل آگارز، همسانه سازی قطعه مورد نظر طی واکنش اتصال به حامل بیانی pET32a(+) 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 pET32a (+) دارای نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین است، پس از کشت سلول‌های باکتریایی تراریزش شده با پلاسمید بیانی نوترکیب روی محیط LB جامد حاوی آمپی‌سیلین، سلول‌های پذیرنده پلاسمید نوترکیب به صورت پرگنه‌های سفید بر روی این محیط کشت رشد یافتند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.10.9]



شکل ۱- تایید وجود ژن نوکلئوکپسید TSWV-N در حامل بیانی pET32a(+) توسط برش آنزیمی. چاهک‌های ۱ تا ۲۰ : ۱، نشانگر ۱۰۰bp ، چاهک های زوج : برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET32a-TSWV-N با دو آنزیم *Bam*HI و *Xho*I و رها شدن ژن نوکلئوکپسید به اندازه ۸۰۰ bp . چاهک های فرد : پلاسمید نوترکیب pET32a-TSWV-N بدون هضم آنزیمی، به عنوان شاهد.

Figure 1- Nucleocapsid gene in Expression vector by enzyme digestion. 1: 100 bp DNA ladder. Even numbers are pET32a-TSWV-N double digested by *Xho*I and *Bam*HI that a 800bp fragment was released. Odd numbers are pET32a-TSWV-N without double digestion.

تایید همسانه سازی قطعه در حامل بیان با آزمون پی‌سی‌آر کلونی صحت همسانه سازی قطعه ژن نوکلئوکپسید TSWV-N در حامل بیانی pET32a(+)، و تشخیص کلنی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب جهت بررسی نتیجه تراریزش در آزمون کلنی پی‌سی‌آر تایید شد. الکتروفورز محصول نوترکیب روی ژل آگارز، کلونی صحیح همسانه سازی ژن TSWV-N را در حامل بیانی pET32a (+) و تکثیر قطعه ژن نوکلئوکپسید به اندازه ۸۰۰ bp را نشان داد.

تایید وجود ژن در حامل بیانی از طریق برش آنزیمی

برای تایید بیشتر وجود ژن نوکلئوکپسید در حامل بیانی استخراج پلاسمید از پرگنه‌های مثبت صورت گرفت و با آنزیم‌های *Bam*HI و*Xho*I برش داده شدند. پس از انجام الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد، قطعه‌ای حدود ۸۰۰ bp مربوط به ژن نوکلئوکپسید TSWV-N که از حامل بیانی pET32a(+) رها گردید، مشاهده شد (شکل ۱).

تایید توالی سازه بیانی ساخته شده

پس از اتصال قطعه ژن نوکلئوکپسید به حامل بیان pET32a(+) و تایید وجود ژن از طریق برش آنزیمی، برای بررسی صحت قرار گرفتن ژن مورد نظر در قاب خوانش صحیح، از روش توالی یابی استفاده شد. نتیجه توالی یابی نشان داد که که ژن مورد نظر به درستی در قاب خواندنی پلاسمید قرار گرفته و قابل بیان می‌باشد.

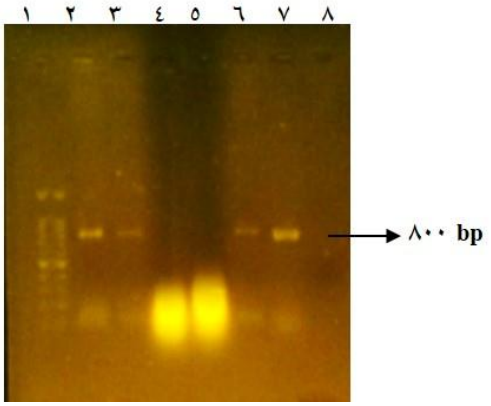
تراریزش حامل بیانی اتصال یافته با قطعه دی‌ان‌ای مورد نظر در باکتری *E.coli* سویه‌های بیانی BL21(DE3) و BL21(DE3) pLysS و تایید همسانه سازی با آزمون کلنی پی‌سی‌آر

با توجه به اینکه حامل بیانی pET32a(+)، دارای نشانگر انتخابی مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد، پس از کشت سلول‌های باکتریایی BL21(DE3) و BL21(DE3) pLysS تراریزش شده با پلاسمید نوترکیب pET32a-TSWV-N روی محیط کشت جامد LB، آنتی-بیوتیک آمپی‌سیلین (100 µg/ml) برای سویه اول و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل برای سویه دوم (34 µg/ml) استفاده شد. سلول‌های پذیرنده پلاسمید نوترکیب pET32a-TSWV-N روی محیط کشت به صورت پرگنه‌های سفید مشاهده شدند.

واکنش کلنی پی‌سی‌آر، درج صحیح قطعه ژن نوکلئوکپسید را در حامل بیانی، در دو سویه باکتریایی را تایید کرد و نتایج در ژل آگارز حاکی از کلونینگ صحیح قطعه ۸۰۰ bp ژن نوکلئوکپسید در حامل

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.10.9]

بیانی در هر دو سویه باکتریایی بود. همچنین شاهد منفی (کنترل منفی)، پلاسمید بیانی pET32a(+)، بدون قطعه ژن نوکلئوکپسید TSWV-N، در نظر گرفته شد که نشان داد حامل بیانی pET32a(+) بدون قطعه ژن نوکلئوکپسید، به عنوان شاهد منفی، بدون باند می-باشد (شکل ۲).



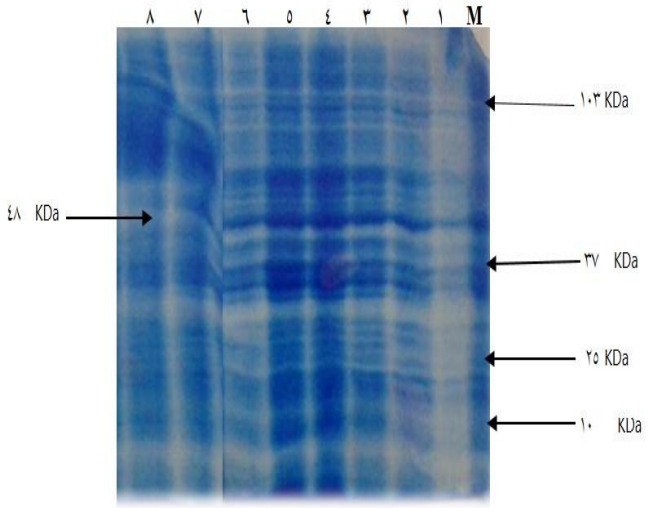
شکل ۲- الکتروفورز محصولات کلنی پی‌سی آر پلاسمید نوترکیب در دو سویه بیانی BL21(DE3) وBL21(DE3) pLysS چاهک ۱ از سمت چپ: نشانگر، bp ۱۵۰۰، شرکت سیناژن. چاهک۲: محصول پی‌سی‌آر پلاسمید نوترکیب pET32a-TSWV-N استخراج شده از سویه BL21(DE3) pLysS، چاهک ۳: محصول پی‌سی‌آر پلاسمید نوترکیب استخراج شده pET32a-TSWV-N از سویه‌های BL21(DE3)، چاهک۴ و ۵: محصول پی‌سی‌آر پلاسمید pET32a(+) بدون قطعه TSWV-N به عنوان کنترل منفی، چاهک۶ و ۷: نمونه‌های کنترل مثبت از پلاسمیدهای نوترکیب pET32a-TSWV-N، چاهک ۸: کنترل منفی، آب

Figure 2- Electrophoresis of colony PCR product in BL21(DE3)pLysS and BL21(DE3). 1: 1500 DNA Ladder. 2: PCR-product of pET32a-TSWV-N in BL21(DE3) pLysS. 3: PCR-product of pET32a-TSWV-N in BL21(DE3). 4 and 5: PCR-product of pET32a as negative control. 6 and 7: positive controls of pET32a-TSWV-N. 8: Negative control, H_2O.

تایید پروتئین‌های بیان شده

در الگوی پروتئینی بدست آمده از دو سویه باکتری‌های تراریزش شده با pET32a-TSWV-N، باندی حدود ۴۸ کیلو دالتون مشاهده شد، که اندازه این قطعه منهای اسید آمینه‌های مربوط به حامل بیان، همتراز قطعه مورد انتظار حاصل از بیان پروتئین پوششی TSWV-N یعنی ۲۹ کیلودالتون بود. باند ۴۸ کیلودالتونی در الگوی pET32a(+) (فاقد ژن پروتئین پوششی TSWV) و همچنین در باکتری دارای پلاسمید نوترکیب همراه با قطعه در زمان به اصطلاح صفر (قبل از القا با IPTG) مشاهده نگردید (شکل۳ و ۴).

میزان بیان پروتئین در سه، چهار، شش و شانزده ساعت پس از القا با IPTG در غلظت یک میلی‌مولار، تفاوت مشهودی نداشت به همین دلیل برای بررسی در آزمون‌های بعدی از سوسپانسیون باکتریایی استفاده شد که با چهار ساعت پس از القا با استفاده از غلظت یک میلی‌مولار IPTG القا شده باشد.



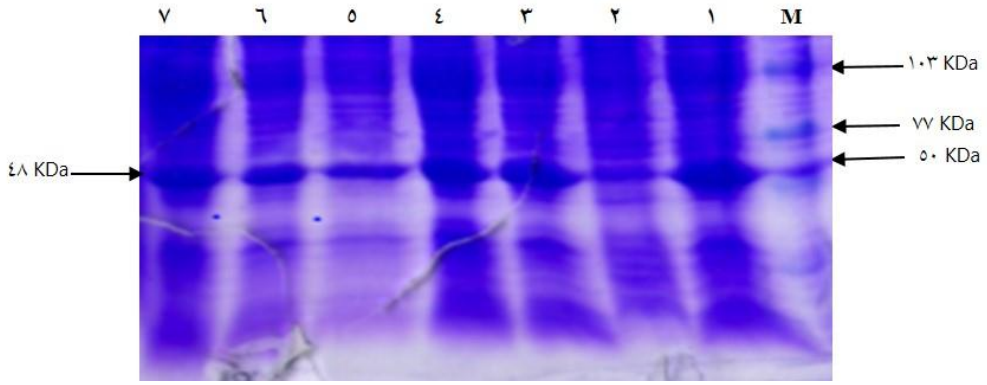
شکل ۳- نتایج SDS-PAGE پروتئین‌های استخراج شده از باکتری‌های نوترکیب *E.coli* سویه BL21(DE3). M به عنوان نشانگر پروتئین (Low Range Protein marker- Biorad). چاهک ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ : پروتئین-های استخراج شده از باکتری تراریزش شده با pET32a-TSWV-N، زمان دو، سه، چهار، شش و ۱۶ ساعت پس از القا با غلظت نهایی یک میلی مولار IPTG . چاهک ۷ و ۸ : پروتئین استخراج شده از باکتری تراریزش شده با pET32a- بدون قطعه نوکلئوکپسید و pET32a-TSWV-N ، قبل از القا با IPTG به عنوان شاهد زمان صفر

Figure 3- SDS-PAGE of extracted proteins from E. coli BL21(DE3) strain. M: Protein marker (Low Range Protein marker- Biorad) 1,2, 3, 4, 5 and 6: Extracted proteins from transformed cells by pET32a-TSWV-N 2, 4, 6 and 6 hours after induction by 1mM IPTG. 7 and 8: Extracted proteins from transformed cells by pET32a and pET32a-TSWV-N before induction.

حضور پروتئین ژنی در فاز محلول

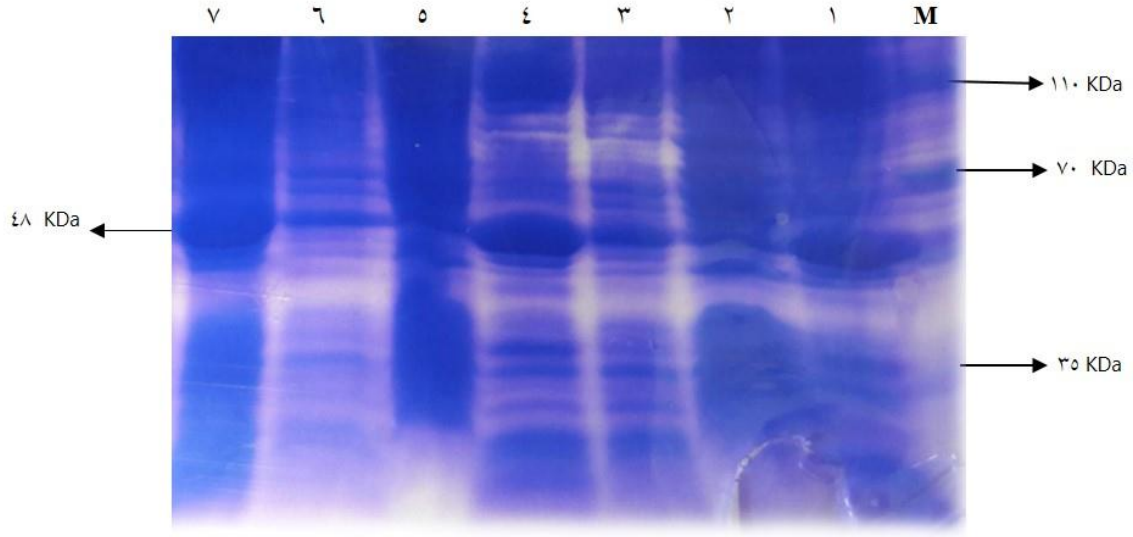
نتایج حاکی از حضور پروتئین‌های بیان شده در فاز محلول بود و در مقایسه با میزان پروتئین‌های موجود در فاز نامحلول، پروتئین‌های بیانی در فاز محلول بیشتر بود (شکل۵).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.10.9]



شکل ۴- نتایج SDS-PAGE پروتئین‌های استخراج شده از باکتری‌های نوترکیب *E.coli* سویهBL21 (DE3) pLysS در زمان‌های مختلف، قبل از القا با IPTG (زمان صفر) و بعد از القا با IPTG (زمان‌های سه، چهار و ۱۶ ساعت). از سمت راست چاهک M به عنوان نشانگر پروتئینی Low Range Protein marker-) Biorad). چاهک ۱، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ : پروتئین استخراج شده از باکتری تراریزش شده با pET32a-TSWV-N، زمان سه، چهار (چاهک سه و چهار)، شش و شانزده ساعت (چاهک شش و هفت) پس از القا با غلظت نهایی یک میلی مولار IPTG . چاهک ۲ : پروتئین استخراج شده از باکتری تراریزش شده باpET32a-TSWV-N، قبل از القا با IPTG .

Figure 4- SDS-PAGE of extracted proteins from E. coli BL21(DE3) pLysS strain. M: Protein marker (Low Range Protein marker- Biorad) 1, 3, 4, 5, 6 and 7: Extracted proteins from transformed cells by pET32a-TSWV-N 3, 4, 6 and 6 hours after induction by 1mM IPTG. 7 and 8: Extracted proteins from transformed cells by pET32a-TSWV-N before induction.



شکل ۵- تخمین میزان پروتئین بیان پروتئین بیان شده در فاز محلول و نامحلول در سویه BL21(DE3)plysS پس از القا با IPTG در زمان چهار ساعت. از سمت راست چاهک M به عنوان نشانگر پروتئینی (Low Range Protein marker- Biorad). چاهک های ۲، ۳، ۵ و ۶ : میزان پروتئین بیان شده در فاز نامحلول. چاهک های ۱، ۴ و ۷ : میزان پروتئین بیان شده در فاز محلول

Figure 5- Solubility and insolubility of expressed protein in BL21(DE3)plysS Strain after 4 hours induction by IPTG. M: Protein marker (Low Range Protein marker- Biorad). 2, 3, 5, 6: Expressed protein as insoluble fraction. 1, 4 and 7: Expressed protein as soluble fraction

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.10.9]

بررسی بیان پروتئین نوترکیب در میزبان‌های BL21(DE3) و BL21(DE3) pLysS پس از القا با غلظت یک میلی مولار IPTG با استفاده از SDS-PAGE

در الکتروفورز پروتئین‌ها، الگوهایی پروتئینی بدست آمده از دو باکتری ترانسفورم شده با pET32a-TSWV-N، باندی در حدود ۴۸ کیلو دالتون برای ژن نوکلئوکپسید مشاهده شد، که این عدد با وزن مولکولی ژن نوکلئوکپسید (kd ۲۹) که به طور بالقوه توسط ژن پروتئین پوششی رمز می‌گردد مطابقت دارد. بالاتر بودن وزن مولکولی پروتئین بیان شده در مقایسه با وزن مولکولی پروتئین بالقوه را می‌توان به چندین اسید آمینه هیستیدین مربوط به حامل بیانی pET32a(+) نسبت داد. البته این باند در الگوی پروتئینی باکتری شاهد pET32a(+) فاقد نوکلئوکپسید TSWV و همچنین در باکتری دارای پلاسمید در زمان به اصطلاح صفر (قبل از القا با IPTG) مشاهده نگردید. همانطور که در شکل ۳ و ۵ مشاهده می‌شود، بین نمونه‌های بیان و نمونه‌های کنترل (پروتئین بیان شده با القاگر، نمونه حامل به عنوان کنترل بدون القاگر و نمونه به اصطلاح زمان صفر بدون القاگر) در دو سویه BL21(DE3) و BL21(DE3) pLysS تفاوت خاصی در بیان پروتئین وجود دارد. نوار پروتئینی بیان شده مربوط به محتوای پروتئینی استخراج شده از کلنی های مربوط به سویه BL21(DE3) pLysS بسیار قوی‌تر از نوارهای پروتئینی مربوط به سویه BL21(DE3) بود. مقایسه این نتایج نشان دهنده میزان بالای بیان در باکتری BL21(DE3) pLysS در مقایسه با باکتری BL21(DE3) می‌باشد.

فناوری دی‌ان‌ای نوترکیب به طور بالقوه، پتانسیل بالایی برای تولید آنتی‌ژن‌های ویروسی که برای تولید آنتی‌بادی مورد استفاده قرار می‌گیرند را دارد. در بسیاری از موارد تکنولوژی نوترکیب در مقایسه با روش‌هایی مانند خالص سازی ویروس‌ها که اغلب مشکل می‌باشد راحت‌تر است(Tatineni *et al*. 2013). این مشکلات را با بیان پروتئین‌های نوترکیب در سیستم باکتریایی *E.coli* می‌توان برطرف کرد این پروتئین‌ها برای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در این مطالعه از سیستم بیانی pET32a(+) که یکی از پرکاربردترین سیستم‌های حامل برای بیان پروتئین در سیستم باکتریایی مانند *E.coli* می‌باشد، استفاده شد. این پلاسمید دارای توالی برچسب اسید آمینه هیستیدینی 6x His-tag در بخش پایین دست و بالادست خود می‌باشد، که سبب می‌شود پروتئین‌های بیانی دارای برچسب در بخش انتهایی آمینی و کربوکسیلی بشوند، که کمک به تسهیل تشخیص، استخراج و خالص‌سازی پروتئین بیانی می‌کند (Amiri sadeghan *et al*. 2013). ممکن است نگرانی‌هایی در مورد احتمال تاثیر برچسب‌های فیوز شده به پروتئین‌های بیانی ایجاد شود، نکته قابل توجه این است که این برچسب‌ها که در بخش انتهایی آمینی و کربوکسیلی حضور دارند، اثرهایی در ایمن زایی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی تولیدی ندارد. بنابراین می‌توان گفت هیچ تفاوت قابل توجهی در ایمنی‌زایی آنتی‌ژن‌های نوترکیب در مقایسه با آنتی‌ژن‌های تجاری وجود ندارد Gulati *et al*. 2009; Kumari *et al*. 2000; Mutasa-Gottagena *et al*. (2000).

در این مطالعه بیان ژن نوکلئوکپسید ویروس TSWV در سیستم یاکتریایی *E.coli* در دو سویه BL21(DE3) و BL21(DE3)plysS صورت گرفت. در بررسی پروتئین بیانی توسط آزمون الکتروفورز عمودی SDS-PAGE باندی با وزن مولکولی ۴۸ کیلودالتون مشاهده گردید. تفاوت، بین وزن مولکولی ژن نوکلئوکپسید بیانی در مقایسه با وزن اصلی ژن نوکلئوکپسید که حدود ۲۹ کیلو دالتون بود وجود داشت، بالاتر بودن نسبی وزن مولکولی پروتئین بیانی را می‌توان وجود خود ژن، اضافه شدن چند اسید آمینه هیستیدینی His-tag و تیرودوکسین به پلاسمید بیانی، که به منظور سهولت در استخراج پروتئین در هنگام خالص‌سازی بکار می‌رود ارتباط داد. این وزن با حذف توالی برچسب هیستیدینی و تیرودوکسین حدود ۲۹ کیلودالتون خواهد بود. بیان پروتئین در هر دو سویه مشاهده شد، اما شدت بیان پروتئین در سویه BL21(DE3)plysS نسبت به سویه BL21(DE3) قوی‌تر بود. سویه BL21(DE3)plysS دارای پلاسمید plysS است که این پلاسمید حاوی ژن T7 Lysogen می‌باشد، این پلاسمید باعث می‌شود، سطح بیان توسط T7RNA پلیمراز، تحت پیشبر Lac UV5 کنترل شود. این پلاسمید دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل است. در مورد میزان بیان پروتئین در این دو سویه می‌توان گفت که در سویه دوم BL21(DE3)plysS مقدار بیان

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.10.9]

پروتئین در مقایسه با سویه BL21(DE3) بیشتر بود. برای القا پیشبر به منظور بیان پروتئین در سیستم pET از غلظت‌های مختلف IPTG استفاده می‌شود در تحقیق حاضر نیز بیان پروتئین در غلظت‌های متفاوتی از IPTG صورت گرفته است. در پژوهش‌ها دیگر از غلظت‌های یک، دو و شش میلی مولار IPTG برای القا در مدت زمان‌های سه، چهار، شش و ۱۶ ساعت استفاده شده است، که نتایج نشان داده است تفاوتی مشهودی بین غلظت یک میلی مولار تا شش میلی‌مولار در زمان‌های مختلف بیان پروتئین نوترکیب پس از القا با IPTG وجود ندارد، به همین دلیل از غلظت یک میلی‌مولار برای القا پیشبر در بیشتر پژوهش‌ها استفاده شده است (Hema *et al*. 2003; Hourani and AbouJawdah 2003; Lee and Chang 2008; Raikhy *et al*. 2007; Koolivand *et al*. 2016). این نکته قابل توجه است که بیشتر پروتئین‌های بیانی در هر دو سویه بطور عمده در فاز محلول قرار دارد که مشابه گزارش سایر پژوهشگران می‌باشد (Hema *et al*. 2003; Hourani and AbouJawdah 2003; Lee and Chang 2008; Raikhy *et al*. 2007; Koolivand *et al*. 2016). پس از بررسی حضور پروتئین در فاز محلول، فاز نامحلول نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد نسبت به فاز محلول، پروتئین کمتری در فاز نامحلول وجود دارد. بنابراین با توجه به میزان بیان بیشتر پروتئین در سویه BL21(DE3)plysS، این سویه برای تولید بیشتر پروتئین در مقیاس بالاتر می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد و بیان در سیستم باکتریایی، تسهیل در خالص سازی برای ویروس‌هایی که غلظت آن‌ها در در بافت آلوده گیاهی پایین و یا مشکل است را فراهم می‌کند، تشخیص سریع تر و ردیابی بیمارگرهای ویروسی را در آزمایشات سرولوژیکی و ایمونوبلاتینگ امکان پذیرتر و آسان تر می‌سازد. بنابراین پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس وسیع و با خلوص زیاد می‌توانند در سیستم باکتریایی تولید شوند و برای تهیه آنتی بادی-های اختصاصی مورد استفاده قرار گیرند. در پژوهش‌های آتی، می‌توان از این منبع آنتی‌ژنی برای تولید آنتی‌بادی‌های تک همسانه‌ای و چند همسانه‌ای علیه پروتئین‌های نوترکیب بیانی استفاده کرد.

منابع

Abadkhah M. Kashiha M. Koolivand D. Eini O. 2017. Simultaneous identification of Cucumber mosaic virus and Tomato spotted wilt virus from tomato fields and their phylogenetic analysis. Plant Protection 40:1-14.

Alkowni R. Zhang Y. P. Rowhani A. Uyemoto J. K. Minafra A. 2011. Biological molecular and serological studies of a novel strain of *grapevine leafroll-associated virus 2*. Virus Genes 43: 102-110.

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: 387-393.

Angle J.S. Bridges C.D. Cherry J. 2005. *Tospoviruses* in *solanaceae* and others crops in the coastal plain of Georgia. The university of Georgia collage of agricultral and environmental sciences report number. 704. ISSN 0072128 .40.

Anonymous. 2017. International Committee on Taxonomy of Viruses 10 Th Report Avaible online. Avaible at : https://talk.ictvonline.org.

Broughton S. Spafford H. 2007. Lettuce leaf national vegetable industry center newsletter. Department of agriculture and food. Avaiable at: www.agric.nsw.gov.au.

Bucher E. Sijen T. De. Haan P. Goldbach R. Prins M. 2003. Negative-strand *tospoviruses* and *tenuiviruses* carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. Journal of Virology 77: 1329–1336.

Chung CT. Niemela SL. Miller RH. 1989. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proceedings of the National Academy of Sciences: 86: 2172-2175.

De Haan P. Kormelink R. de Oliveira Resende R. Van Poelwijk F. Peters D. Goldbach R. 1991. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. Journal of General Virology 72:2207-2216.

Dougall SMc. Tesoriero L. 2007. Western flower thrips and Tomato spotted wilt virus. www.dpi.nsw.gov.au

Fajardo TV. Barros DR. Nickel O. Kuhn GB. Zerbini FM. 2007. Expression of *Grapevine leafroll-associated virus* 3 coat protein gene in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibodies. Fitopatologia Brasileira 32: 496-500.

Gulati-Sakhuja A. Sears JL. Nunez A. Liu HY. 2009. Production of polyclonal antibodies against

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.10.9]

Pelargonium zonate spot virus coat protein expressed in *Escherichia coli* and application for immunodiagnosis. Journal of Virological Methods 160: 29-37.

Hartley JL. 2006. Cloning technologies for protein expression and purification. Current opinion in biotechnology 17: 359-366.

Hema M. Kirthi N. Sreenivasulu P. Savithri HS. 2003. Development of recombinant coat protein antibody based IC-RT-PCR for detection and discrimination of *sugarcane streak mosaic virus* isolates from Southern India. Archives of Virology 148: 1185-1193.

Hourani H. Abou-Jawdah Y. 2003. Immunodiagnosis of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* using polyclonal antibodies developed against recombinant coat protein. Journal of Plant Pathology 197-204.

Hull R. 2002. Matthews. Plant Virology 4th edR Academic Press. New York. 277.

Kim JH. Choi GS. 2004. Characterization of *Tomato Spotted Wilt Virus* from Paprika in Korea. Journal of Plant Pathology 20: 297-301.

Koolivand D. Sokhandan-Bashir N. Behjatnia SA. Joozani RJ. 2016. Production of Polyclonal Antibody against *Grapevine fanleaf virus* Movement Protein Expressed in *Escherichia coli*. The Plant Pathology Journal 32: 452-460.

Kormelink R. De Haan P. Meurs C. Peters D. Goldbach R. 1992. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus a bunyavirus with two ambisense RNA segments. Journal of General Virology 73: 2795-2804.

Kumari SG. Makkouk KM. Katul L. Vetten HJ. 2001. Polyclonal antibodies to the bacterially expressed coat protein of *Faba bean necrotic yellows virus*. Journal of Phytopathology 149: 543-550.

Laemmli UK. Beguin F. Gujer-Kellenberger G. 1970. A factor preventig the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. Journal of Molecular Biology 47:69-85.

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.

Lian S. Lee JS. Cho WK. Yu J. Kim MK. Choi HS. Kim KH. 2013. Phylogenetic and recombination analysis of *Tomato spotted wilt virus*. PloS One. 8(5): e63380.

Lima JA. Nascimento AKQ. Radaelli P. Purcifull DE. 2012. Serology Applied to plant virology. Serological diagnosis of certain human animal and plant disease. Rijeka Croacia In Tech: 71-94.

Lima JAA. Sittolin IM. Lima RCA. Freire Filho FR. Lima JAA. 2005. Diagnose e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. Feijão caupi: avanços tecnológicos. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica 404-459.

Mutasa-Gottgens ES. Chwarszczynska DM. Halsey K. an Asher MJC. 2000. Specific polyclonal antibodies for the obligate plant parasite Polymyxa a targeted recombinant DNA approach. Plant Pathology 49: 276-287.

Nascimento LCD. Pensuk V. Costa NPD. Assis Filho FMD. Pio-Ribeiro G. Deom CM. Sherwood J. 2006. Evaluation of peanut genotypes for resistance to *Tomato spotted wilt virus* by mechanical and thrips inoculation. Pesquisa Agropecuária Brasileira 41: 937-942.

Nickel O. Targon ML. Fajardo TV. Machado MA. Trivilin AP. 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.

Raikhy G. Hallan V. Kulshrestha S. Zaidi AA. 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.

Rowhani A. Chay C. Golino DA. Falk BW. 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of Grapevine fan leaf virus in grapevines. Phytopathology 83: 749-753.

Shoshtari S. Jafarpour B. Falahati-Rastegar M. 2011. Molecular and serological detection of Tomato spotted wilt virus from Khorasan-Razavi. Plant Protection 26:348-356. (In Farsi With English abstract)

Snipp M. Willem Borst J. Goldbach R. Kormelink R. 2007. *Tomato spotted wilt virus* Gc and N proteins interact *in vivo*. Virology 357: 115–123.

Soellick T. Uhrig J. Bucher G. Kellmann J. Schreier P. 2000. The movement protein NSm of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV): RNA binding interaction with the TSWV N protein and identification of interacting plant proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 2373–2378.

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: 196-203.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.10.9]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 1

Comparison of Tomato spotted wilt virus nucleocapsid gene expression in two different strains of *E. coli*

Zahra Zaer, Davoud Koolivand*, Omid Eini

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran

Corresponding Author Email: koolivand@znu.ac.ir

Abstract

Because of limitations in antibody production against plant viruses, coat protein expression has been developed to prepare antigen for antibody production. In the recent research, Nucleocapsid gene of *Tomato spotted wilt virus* was amplified from a local strain in Iran. Cloned segment in TA vector (pTG19TSWV-N) was sub-cloned into pET32a as expression vector that digested by *Xho*I and *Bam*HI. Then, pET32TSWV-N was transformed in two different strains of *E. coli* BL21(DE3) and BL21(DE3) pLysS by heat shock method. For protein expression, the transformed cells were induced by 1mM of IPTG in both strains. The protein was extracted four hours after induction and analyzed in SDS-PAGE. The SDS-PAGE result showed that a 48 kDa protein have been expressed that is expected based on additional tags from plasmid. The result revealed that nucleocapsid had been expressed in both strains whereas protein expression was little more in BL21(DE3) pLysS.

Keywords: Expression, Prokaryotic expression, Recombinant protein. *Tomato spotted wilt virus*

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.10.9]