تخلیص و بررسی ویژگی‌های آنتی‌ژنیک پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار بیان شده در باکتری *Escherichia coli*

داود کولیوند[۱*]، نعمت سخندان بشیر[۲]، افشین رستمی[۱] و پرویز پیر نیاکان[۳]

۱- استادیار و دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان.

۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز .

* مسئول مکاتبه E-mail: koolivand@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۳

چکیده

تخلیص انواع پروتئین‌های بیان شده‌ی ویروسی با اهداف مختلف از جمله تولید آنتی‌بادی‌های چند همسانه‌ای و تک همسانه‌ای، مطالعه‌ی ساختاری آنها، شناسایی توالی آمینو اسیدی و توالی پپتیدی با استفاده از انواع روش‌های کروماتوگرافی، صورت می‌پذیرد که عموماً کاربرد چنین روش‌هایی مستلزم صرف هزینه‌ی زیاد می‌باشد. در این تحقیق سعی شد پس از بیان ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار، تخلیص و خالص سازی پروتئین بیان شده مورد نظر از ژل پلی آکریل آمید انجام پذیرد. در همین راستا، پس از بیان ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار در باکتری *Escherichia coli*، الکترفورز پروتئین‌های استخراج شده از باکتری در ژل پلی آکریل آمید صورت گرفت که نتایج بدست آمده حاکی از تولید مطلوب پروتئین برای استخراج از ژل بود. پس از بیان ژن مورد نظر در حجم زیاد، پروتئین بیان شده در باکتری روی ژل پلی آکریل آمید الکترفورز گردید. پس از الکترفورز و تعیین محل نوار پروتئین بیان شده، محل مورد نظر از ژل بریده و تخلیص گردید. سپس، پروتئین تخلیص شده از ژل به منظور ایمنی زایی به خرگوش تزریق شد و سرم ایمن شده پس از سپری شدن زمان مناسب استحصال شد و عیار آن مشخص گردید. این روش با توجه به هزینه و امکانات قابل دسترس، در مقایسه با سایر روش‌های تخلیص از جمله کروماتوگرافی، کم هزینه و کارا می باشد. همچنین نتایج دیبا و وسترن بلات با استفاده از پروتئین تخلیص شده و ایمن‌زایی خرگوش نشان داد که از این پروتئین میتوان به منظور تولیدآنتی سرم و آنتی بادی برای ردیابی ویروس موزاییک خیار استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بادی، تخلیص، پروتئین پوششی، نوترکیب، ویروس موزاییک خیار.

مقدمه

شناسایی سریع و به موقع در جلوگیری از گسترش بیشتر ویروس‌های گیاهی یک امر غیر قابل اجتناب می‌باشد و استفاده از پادتن‌های مناسب و کارا این امر را تسهیل می‌نماید. روش‌هایی که مبتنی بر واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی بادی هستند از جمله روش‌های آسان و معمول در ردیابی ویروس‌های گیاهی می باشند. ولی تولید آنتی سرم برای برخی از ویروس‌های گیاهی که خالص‌سازی آن‌ها از پروتئین‌های گیاهی و به دست آوردن غلظت مناسب از آن مشکل می‌باشد یکی از مسائل عمده در تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه ویروس‌های گیاهی است (لیما و همکاران ۲۰۱۲). بر همین اساس تهیه‌ی میزان مناسب از پروتئین پوششی ویروس برای تولید پادتن‌های تک‌همسانه‌ای و چندهمسانه‌ای می‌تواند امری مفید باشد، که امروزه با

بیان ژن‌های پروتئین پوششی ویروسی در سیستم‌های مختلف از جمله سیستم پروکاریوتی، امکان‌پذیر می‌باشد. بایستی در نظر داشت که برای هر آنتی‌ژن محدوده‌ای از نظر مقدار وجود دارد که در این محدوده باعث تحریک سیستم ایمنی میزبان به بهترین حالت می‌شود که به آن پنجره ایمنی زایی[1] اطلاق می‌شود. محدوده‌ی پنجره ایمنی زایی به عوامل زیادی وابسته است (استروبر ۲۰۰۱) که از بین آنها استحصال و استخراج میزان مناسب از پروتئین پوششی بیان شده ویروسی به عنوان آنتی‌ژن از اهمیت برخوردار است.

اغلب روش‌های استخراج و خالص سازی پروتئین‌ها بر اساس کروماتوگرافی به ویژه کروماتوگرافی تمایلی[2] استوار هستند که معمولاً چنین سیستم‌هایی علاوه بر زمان‌بر بودن مستلزم صرف هزینه‌ی زیاد می‌باشند (عباس و همکاران ۲۰۰۵، کورین و اسکوفیلد ۲۰۱۲).

از طرفی استخراج پروتئین‌ها از ژل پلی آکریل آمید به اهداف مختلفی مانند شناسایی شیمی پروتئین‌ها، شکست‌های پروتئولیتیکی، تعیین ترکیبات آمینو اسیدی آنها و شناسایی پلی پپتیدها با استفاده از هضم توسط تریپسین انجام میگیرد. علاوه بر موارد ذکر شده تحقیقات نشان داده‌اند که از پروتئین خالص سازی شده از ژل پلی آکریل آمید می‌توان به عنوان ماده‌ی ایمنی‌زا نیز استفاده کرد. هر چند که امروزه خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب از سیستم‌های پروکاریوتی به منظور تولید آنتی بادی در صورت وجود برچسب‌های هیستیدین و سایر برچسب‌ها با کارایی بالایی امکان پذیر می‌باشد ولی ممکن است وجود اینکلوژن بادی‌ها، وجود سایر پروتئین‌های آنتی‌ژنیک باکتریایی، شکسته شدن پروتئین‌ها و یا بیان پروتئین‌هایی که بصورت ناقص صورت گرفته است ار مشکلات خالص سازی چنین روش‌هایی باشد (کورین و اسکوفیلد ۲۰۱۲).

هدف از این تحقیق بررسی روشی مناسب برای استخراج وخالص سازی پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار بیان شده در باکتری *E.coli* از ژل پلی آکریل آمید به منظور تامین ماده‌ی ایمنی زا برای تولید آنتی بادی نوترکیب می باشد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی پروتئین نوترکیب بیان شده

پلاسمید نوترکیب pET21aCMVCP دارای ژن پروتئین پوششی جدایه B13 ویروس موزاییک خیار (رستمی ۲۰۱۱) به باکتری های مستعد بیان ژن مانند سویه Rossetta از باکتری *E. coli* منتقل شدند. سپس یک کلونی از باکتریهای خالص حاوی پلاسمید نوترکیب دربردارندهٔ ژن پوشش پروتئینی بصورت شبانه کشت داده شد. روز بعد رقیق سازی کشت شبانه در ۱۰۰میلی لیتر محیط LB مایع (۱۰ گرم نمک طعام، ۱۰ گرم عصارهٔ مخمر، پنج گرم تریپتون در لیتر با pH 7.4) حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم در لیتر انجام شد و آنگاه رسوب باکتری چهار ساعت پس از القاء با IPTG ازطریق سانتریفوژ در 6000g به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری شد.

رسوب باکتریایی ایجاد شده در بافر TE و هم حجم آن بافر استخراج پروتئین (Tris-HCl 50mM, glycerol 10%, SDS2%, Bromophenol blue 0.1%, Mercapto ethanol) به حالت سوسپانسیون در آورده شد و نمونه ها به مدت پنج دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سانتیگراد و دور g ۱۰۰۰ سانتریفوژ شدند وفاز بالایی مورد الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید حاوی سدیم دو

[1]Window of immunogenicity
[2]Affinity chromatogarphy

دسیل (لاریل) سولفات[1] واقع شد و رنگ آمیزی ژل با استفاده از کوماسی بلو انجام گرفت (گرین و سمبروک ۲۰۱۲).

استخراج پروتئین بیان شده از ژل

الکتروفورز نمونه‌های پروتئینی در ژل SDS-PAGE ۱۲/۵٪ انجام شد (گرین و سمبروک ۲۰۱۲). پس از اتمام الکترفورز و قبل از رنگ آمیزی ، ژل به مدت پنج دقیقه در بافر شماره یک (Na_2CO_3 0.1M) همراه با تکان آهسته روی شیکر قرارگرفت. سپس ژل به مدت ۱۵ دقیقه در بافر شماره دو (Imidazol 0.2M, SDS 0.1%) همراه با تکان آهسته روی شیکر قرار داده شد. آنگاه، ژل با آب مقطر شستشو داده شد و به مدت ۳۰ ثانیه در بافر شماره سه ($ZnSO_4.7H_2O$ 0.1M) قرار گرفت تا باندهای پروتئینی شفاف در زمینه کدر ژل ظاهر گردد. در مرحله بعد، ژل با آب مقطر شستشو داده شد و باند مورد نظر به وسیله تیغ جدا گردید. سپس، ژل به همراه بافر استخراج پروتئین در هاون شیشه ای کاملاً خرد و همگن گردید و سوسپانسیون حاصل در لولهٔ فالکون ۵۰ ml به مدت یک شب روی شیکر قرار داده شد. سوسپانسیون فوق به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سانتیگراد با دور ۳۸۰۰ rpm سانتریفوژ شد. فاز رویی که حاوی پروتئین بود، جمع آوری شده و مجدداً مقداری بافر استخراج به ژل اضافه گردید و به مدت یک ساعت روی شیکر قرار داده شد و مرحله‌ی سانتریفوژ تکرار گردید. مرحله قبل برای جمع آوری مایع رویی، پنج تا شش بار تکرار گردید و در نهایت پروتئین استخراج شده جمع آوری شد. سپس، با استفاده از پیکودراپ (Eppendorf, *Bio* photometer, Germany) غلظت پروتئین‌های تخلیص شده اندازه گیری شد. پس از تعیین غلظت پروتئین استخراج شده، به منظور بررسی خواص آنتی‌ژنی پروتئین استخراج شده آزمون دیبا[2] و وسترن بلات[3] روی کاغذ نیتروسلولزی با استفاده از آنتی بادی تجاری ویروس موزاییک خیار انجام گرفت.

برای انجام دیبا، پس از استخراج، ۳۰ میکرولیتر از پروتئین تخلیص شده روی کاغذ نیتروسلولزی بصورت لکه قرار داده شد و پس از خشک شدن، مراحل بعدی مطابق روش هامپتون و همکاران (۱۹۹۰) با اندکی تغییرات انجام شد. در مرحله پایانی و پس از اضافه کردن آنتی بادی‌های اختصاصی، مرحله آشکارسازی لکه-ها با استفاده از BCIP/NBT انجام وتغییر رنگ لکه-ها ثبت گردید.

برای آزمون وسترن، پس الکتروفورز پروتئین خالص شده از ژل پلی آکریل آمید، سه عدد کاغذ صافی یک میلی‌متری و یک غشاء نیتروسلولزی به اندازه ژل بریده شد. کاغذ صافی و غشاء نیتروسلولزی به مدت دو دقیقه در آب مقطر استریل قرار داده شدند تا بخوبی خیس شوند. سپس غشاء نیتروسلولزی به مدت دو دقیقه درون بافر انتقال قرار داده شد و سیستم انتقال به ترتیب از بالا به پایین شامل دو عدد کاغذ صافی، ژل، غشاء نیتروسلولزی، دوعدد کاغذ صافی آماده شد. سیستم آماده شده را بین صفحات بالا و پایین بخوبی محکم کرده و ساندویچ ایجاد شده درون تانک مخصوص قرار داده شد، به‌طوری که غشاء نیتروسلولزی به سمت الکترود مثبت و ژل به سمت الکترود منفی باشد. سپس، بافر انتقال سرد درون تانک ریخته شد و کل مجموعه (تانک) درون یخ یا یخچال قرار داده شد. سپس در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت حدوداً سه ساعت انتقال باندها از ژل به غشاء نیتروسلولزی صورت گرفت. بعد از سپری

[1]Dodecyl sulfate sodium

[2]Dot-immunobinding assay

[3]Western Blot

شدن مدت زمان مذکور، کاغذ به دقت جدا شد و مرحله‌ی مسدود سازی طبق مراحل زیر انجام شد. ابتدا غشاء نیتروسلولزی به مدت دو ساعت در PBS حاوی دو درصد BSA قرار داده شد. سپس شستشو با PBS+ 0.2% Tween 20 سه بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. آنتی بادی اختصاصی(Agdia,USA) CMV به نسبت ۱:۱۰۰۰ درون PBS رقیق و روی غشاء ریخته شد و غشاء نیتروسلولزی به مدت حدوداً دو ساعت در دمای اتاق روی انکوباتور لرزان قرار داده شد.

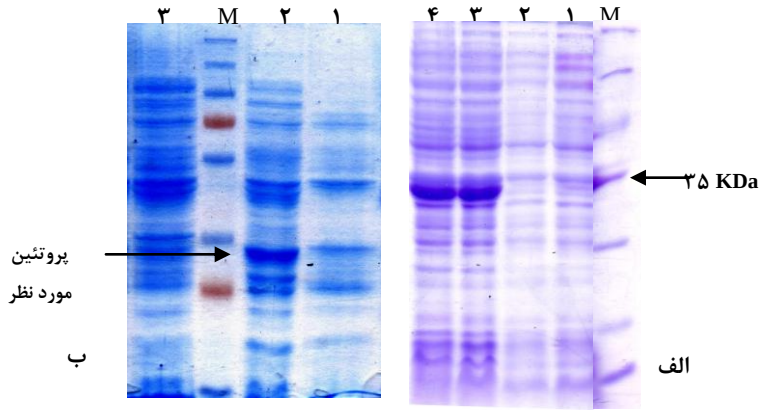
سپس غشاء در محلول کانجوگیت عمومی (Alkalin (Phophsphatase-Conjugated (Goat anti-Rabbit) تهیه شده به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ در PBS رقیق شده و به مدت ۱ ساعت همانند مرحله قبل در دمای اتاق و روی شیکر قرار گرفت. سپس شستشو چهار بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBST انجام شد. در نهایت ردیابی با BCIP \NBT انجام گرفت. محلول آماده شده روی غشاء نیتروسلولزی ریخته شد و حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از آن تغییر رنگ ثبت شد. جهت توقف در تغییر رنگ PBS+20mM EDTA روی غشاء ریخته شد.

آزمون ایمنی زایی و تولید آنتی سرم

پس از استخراج و خالص سازی پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار از ژل پلی آکریل آمید از پروتئین تخلیص شده به عنوان آنتی‌ژن برای ایمنی زایی استفاده گردید. در همین راستا پروتئین تخلیص شده (با غلظت۱۰۰میکروگرم در میلی لیتر) به دو عدد خرگوش ماده برای ایمنی زایی تزریق شد. تزریق به فواصل دو هفته و بصورت زیر جلدی انجام شد. در تزریق اول ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر از پروتئین نوترکیب تخلیص شده همراه با ادجوانت کامل (Sigma-Aldrich, USA) برابر حجم پروتئین نوترکیب تخلیص شده استفاده گردید و در دو تزریق بعدی از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر 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 درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد و پس از آن یک شب در دمای یخچال قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان مورد نظر، سانتریفوژ در دور ۳۵۰۰ g در لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری به مدت ۲۰ دقیقه انجام و سرم خون جدا شد و برای تعیین عیار آنتی سرم تولید شده از آزمون الایزای غیر مستقیم با استفاده از آنتی ژن تزریق شده استفاده گردید. به همین منظور، از سرم تهیه شده رقت‌های مختلف در بافر فسفات سالین (PBS) (۱:۵۱۲ تا ۱:۳۲۷۶۶) آماده شده و آزمون PTA-ELISA انجام گردید و رقت نهایی از سرم تهیه شده مشخص شد. سرم جداسازی شده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتیگراد همراه با گلیسرول نگهداری شد.

نتایج

نتایج الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) نشان دهنده‌ی بیان ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار در سیستم پروکاریوتی بود (شکل ۱). در استخراج پروتئین از سوسپانسیون باکتریایی، چهار ساعت پس از القا پروموتور با استفاده از غلظت یک میلی مولار از IPTG بهترین نتایج از لحاظ میزان بیان ژن حاصل شد (شکل ۱). طبق انتظار، پلاسمید حاوی ژن مورد نظر، در زمان صفر (قبل از القا پروموتور) و همچنین نمونه شاهد (پلاسمید فاقد قطعه) بیان نشدند.



شکل ۱- الکتروفورز پروتئین کل استخراج شده از باکتریهای نوترکیب روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو (الف) M: مارکر Unstained Protein Molecular Weight Marker ۱: پروتئین باکتری حاوی پلاسمید بیان فاقد ژن پروتئین پوششی CMV، ۲: پروتئین باکتری حاوی پلاسمید بیان دارای ژن پروتئین پوششی قبل از القا، ۳ و ٤: پروتئین باکتری حاوی پلاسمید بیان دارای ژن پروتئین پس از القا (ب)، M: مارکر PageRuler Plus Prestained Protein Ladder ۱: پروتئین باکتری حاوی پلاسمید بیان دارای ژن پروتئین پوششی قبل از القا ۲: پروتئین باکتری حاوی پلاسمید بیان دارای ژن پروتئین پس از القا ۳: پروتئین باکتری حاوی پلاسمید بیان فاقد ژن پروتئین پوششی CMV.

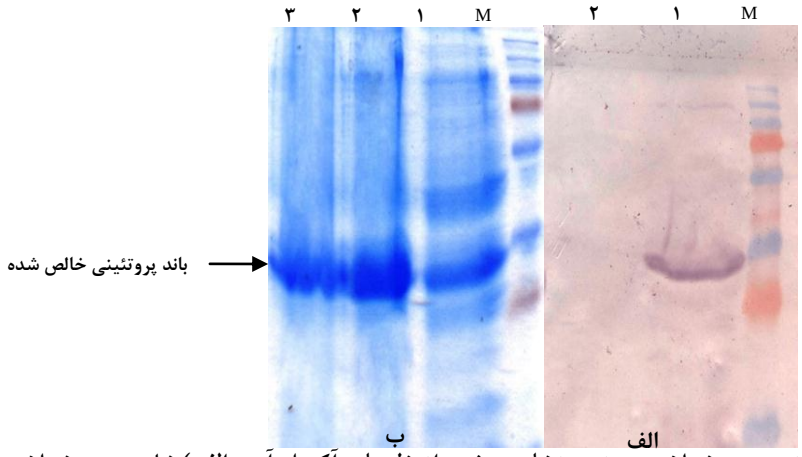
پس ازالکتروفورز پروتئین‌های استخراج شده از ژل پلی آکریل آمید، نتایج حاکی از ظهور باندهای مربوط به پروتئین استخراج شده از ژل بر روی ژل پلی آکریل آمید بود. همچنین نتایج نشان داد که پروتئین بدون حضور باندهای اضافی از ژل قابل جدا سازی است و با توجه به میزان استفاده شده از پروتئین به منظور الکتروفورز غلظت مناسب از پروتئین حاصل شد (شکل ۲).

آزمون دیبا با استفاده از آنتی‌بادی‌های تجارتی (Agdia, U.S.A) ویروس موزاییک خیار روی نمونه‌های تخلیص شده از ژل نشان داد که پروتئین بیان شده و خالص شده ویروس موزاییک خیار از ژل، قابل ردیابی و شناسایی است. بطوریکه پس از اضافه کردن سوبسترای مربوط به آنزیم متصل به آنتی‌بادی (BCIP/NBT) تغییر رنگ انجام شد. در آزمون سرولوژیک، از کاغذ نیتروسلولزی استفاده گردید و با توجه به پادتن‌های استفاده شده، در نمونه‌هایی که مثبت بودند و توانایی ایمنی‌زایی داشتند، تغییر رنگ در محل قراردادن پروتئین استخراج شده از ژل پلی آکریل آمید به‌وجود آمد.

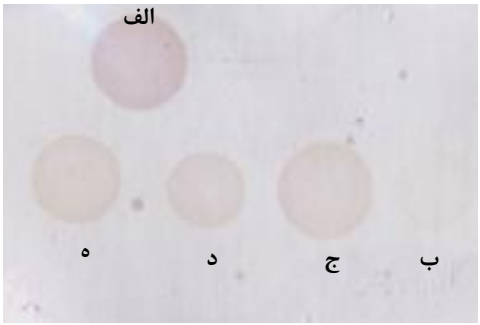
نتایج این آزمون در مقایسه با نمونه مثبت و منفی و بر مبنای تغییر رنگ لکه‌های ایجاد شده روی کاغذ نیتروسلولزی، ارزیابی و تفسیر گردید (شکل ۳).

نتایج حاصل از ایمنی‌زایی توسط پروتئین تخلیص شده حاکی از ایمن شدن خرگوش توسط آنتی ژن مربوط بوده که نشان دهنده‌ی قدرت ایمنی زایی پروتئین تخلیص شده می‌باشد (شکل ٤).

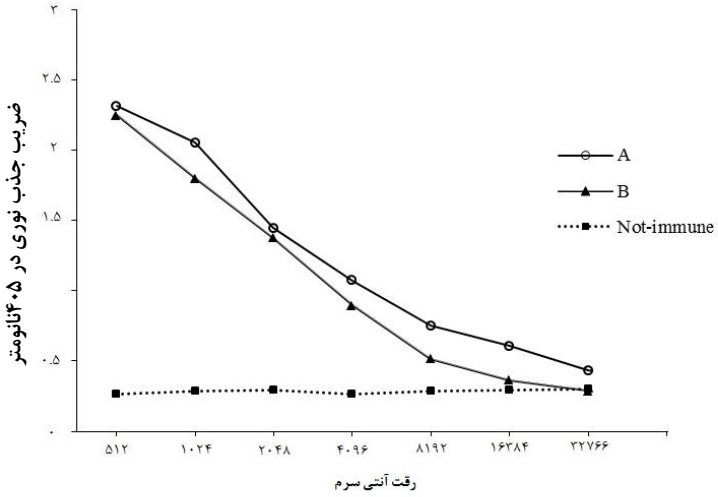
نتایج الایزای غیر مستقیم با استفاد از آنتی‌ژن تزریق شده نشان داد که عیار آنتی سرم تولید شده در حدود ۱:۸۰۰۰ می‌باشد. در این آزمون ضریب جذب حدود دو برابر نمونه سرم ایمن نشده در طول موج ٤٠٥ نانومتر به عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شد (شکل ٤).



شکل ۲- تصویر الکتروفورز و وسترن بلات پروتئین تخلیص شده از ژل پلی آکریل آمید الف) نتایج وسترن بلات (M): مارکر PageRuler Plus Prestained Protein Ladder ۱: پروتئین تخلیص شده از ژل ۲: پروتئین استخراج شده از pET بدون قطعه ب) (M): مارکر PageRuler Plus Prestained Protein Ladder ۱: پروتئین باکتری حاوی پلاسمید بیان دارای ژن پروتئین پس از القا قبل از تخلیص، ۲ و ۳: پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار تخلیص شده از ژل پلی آکریل آمید.



شکل ۳- نتایج دیبا با استفاده از پروتئین پوششی بیان شده و تخلیص شده ویروس موزاییک خیار از ژل با آنتی بادی‌های تجارتی الف)پروتئین تخلیص شده از ژل ، ب) نمونه شاهد منفی (پروتئین از باکتری دارای پلاسمید بیان فاقد ژن پروتئین پوششی) ج ،د، ه) پروتئین‌های استخراج شده از باکتری دارای پلاسمید بیان حاوی ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار (تکرار).



شکل ٤- نتایج تعیین عیار آنتی سرم تهیه شده علیه پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار تخلیص شده از ژل A) خرگوش ایمن شده شماره ۱ B) خرگوش ایمن شده شماره ۲ Not-immune) خرگوش ایمن نشده.

بحث

امکان تهیه و آماده سازی پروتئین‌های ویروسی از جمله پروتئین پوششی و سایر پروتئین‌ها به عنوان ماده‌ی ایمنی‌زا در شرایط آزمایشگاهی برای تولید آنتی‌بادی‌های مناسب و موثر یکی از روش‌های مناسب و کارا می‌باشد که در تحقیقات متعدد مورد بررسی قرار گرفته است. بسیاری از محققین از این روش برای تولید آنتی‌بادی در برابر برخی از ویروس‌های گیاهی نیز استفاده کرده اند (لی و چانگ ۲۰۰۸، سرووسکا و همکاران ۲۰۰۳، ۲۰۰٦، جین و همکاران ۲۰۰۵، ابوجداح و همکاران ۲۰۰٤، هورانی و ابوجداح ۲۰۰۳، کورومبیکوس و همکاران ۲۰۰۲، کوماری و همکاران ۲۰۰۱، لینگ و همکاران ۲۰۰۰). در تحقیق مذکور امکان سنجی فرآوری مناسب این ماده ایمنی زا مورد بررسی قرار گرفت.

مشکلات عمده در بیان ژن های ویروس‌های گیاهی با استفاده از سیستم پروکاریوتی، تشکیل اینکلوژن بادی ها می‌باشد، که محلول کردن این نوع پروتئین دشوار می‌باشد، ولی با این وجود، بسیاری از محققین با استفاده از سیستم پروکاریوتی و با تشکیل اینکلوژن بادی نیز موفق به خالص سازی پروتئین و استفاده از آن به عنوان ماده ایمنی‌زا شده‌اند (سرووسکا و همکاران ۲۰۰۳، ۲۰۰٦، کورومبیکوس و همکاران ۲۰۰۲، کوماری و همکاران ۲۰۰۱).

همانطور که بیان شد اغلب روش‌هایی که برای تخلیص پروتئین‌هاو همچنین پروتئین‌های بیان شده از سیستم‌های مختلف از جمله سیستم‌های پروکاریوتی استفاده می‌شود بر مبنای انواع مختلف کروماتوگرافی می‌باشد که اغلب کاربرد چنین روش‌هایی مستلزم صرف هزینه و زمان زیاد می‌باشد که از معایب عمده چنین روش‌هایی می‌باشد. از طرفی محققین مختلف نیز از بیان پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های متنوع از جمله سیستم پروکاریوتی استفاده کرده‌اند و بر اساس برچسب‌های مختلف، هم‌چون برچسب هیستیدین متصل به پروتئین بیان شده، با استفاده از "کروماتوگرافی تمایلی" اقدام به تخلیص پروتئین‌های نوترکیب نموده‌اند. ولی چنان‌چه هدف از خالص سازی پروتئین مطالعه ساختار و ساختمان پروتئین، بررسی فعالیت آنزیمی و تولید آنتی‌بادی‌های تک همسانه‌ای و یا چند همسانه‌ای باشد، وجود سایر پروتئین‌های آنتی‌ژنیک، پروتئین‌های شکسته شده و پروتئین‌هایی که به صورت کامل در سیستم مورد نظر بیان نشده‌اند، سبب بروز مشکلات فراوانی خواهد شد. به عبارتی، در صورت بیان پروتئین نوترکیب به میزان مناسب، جداسازی و خالص سازی باند پروتئین از ژل پلی آکریل آمید می‌تواند به عنوان یک روش مناسب برای تهیه ماده‌ی ایمنی‌زا استفاده شود.

از طرفی با توجه به مشکلات تولید و تشکیل اینکلوژن بادی در بیان ژن‌های ویروسی که می‌تواند یک مشکل مضاعف در خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از روش‌های مبنی بر کروماتوگرافی تمایلی باشد، روش مذکور و خالص‌سازی از ژل پلی آکریل آمید می‌تواند برای خالص‌سازی و به دست آوردن ماده ایمنی زا روشی مناسب و کارا پیشنهاد گردد. در ضمن ماده‌ی ایمنی‌زای خالص‌سازی شده می‌تواند به منظور تولید آنتی بادی به هدف ردیابی و شناسایی ویروس مورد نظر مورد استفاده قرار گیرد.

از طرفی پیچوا و همکاران (۲۰۱۰) پروتئین‌های ساختاری (CP) و غیر ساختاری (RdRp) ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی را که به صورت نو ترکیب در باکتری *E.coli* بیان شده بودند، قبل از خالص سازی و پس از خالص‌سازی به روش کروماتوگرافی با استفاده از تکنیک‌های لکه‌گذاری ایمنی (immunoblot) از قبیل الایزا و دیبا و لکه برداری وسترن بررسی نمودند. بر این

اساس نامبردگان بیان نمودند که با توجه به ردیابی شدن پروتئین‌های تخلیص شده در آزمون‌های مذکور، پروتئین‌های تخلیص شده خاصیت آنتی‌ژنیک خود را به منظور تولید آنتی‌بادی حفظ می‌نمایند. علاوه بر این نیکولاوا و همکاران (۱۹۹۵) پروتئین پوششی ویروس تریستزای مرکبات را در باکتری تولید و در لکه برداری وسترن توان پادگنی آنرا همچون ذرّات ویروسی تریستزای مرکبات تعیین نمودند. با توجه به نتیجه محققین و ردیابی پروتئین خالص سازی شده از ژل در آزمون لکه گذاری نقطه‌ای با استفاده از آنتی‌بادی‌های تجاری (شکل ۳) می‌توان چنین بیان نمود که پروتئین‌های تخلیص شده خاصیت آنتی‌ژنی خود را حفظ نموده‌اند و قابلیت ایمنی‌زایی در بدن حیوان و در نهایت ردیابی ویروس را خواهند داشت و می‌توان از آنها به منظور تولید آنتی‌بادی استفاده نمود.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله مولفین مراتب تشکر خود را از خانم دکتر مریم ابوالحسنی عضو هیئت علمی انستیتوپاستور ایران اعلام می دارند.

منابع

رستمی ا، ۱۳۹۱. بررسی تشکیل کپسید ویروس موزاییک خیار پس از بیان ژن پروتئین پوششی در باکتری Escherichia coli. پایاننامه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S, 2005. Cellular and Molecular Immunology. Vol 2. Saunders Philadelphia.

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

Cerovska N, Filigarova M and Pecenkova T, 2006. Production of polyclonal antibodies to a recombinant potato mop-top virus non-structural triple gene block protein 1. Journal of Phytopathology 154:422-427.

Cerovska N, Moravec T, Rosecka P, Dedic P and Filigarova M, 2003. Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of potato mop-top virus. Journal of Phytopathology 151:195-200.

Green MR and Sambrook J, 2012. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hampton R, Ball E and Boer SD, 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A Laboratory Manual. APS press.

Hourani, H and Abou-Jawdah Y, 2003. Immunodiagnosis of Cucurbit yellow stunting disorder virus using polyclonal antibodies developed against recombinant coat protein. Journal of Plant pathology 85:197-204

Jain RK, Pandey AN, Krishnareddy M and Mandal B, 2005. Immunodiagnosis of Groundnut and watermelon bud necrosis viruses using polyclonal antiserum to recombinant nucleocapsid protein of Groundnut bud necrosis virus. Journal of Virological Methods 130:162-164.

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

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

Kurien BT and Scofield RH, 2012. Extraction of proteins from gels: a brief review. Methods in Molecular Biology 869:403-405.

Lee, SC and 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

Lima JAA, Nascimento AKQ, Radaelli P and Purcifull DE, 2012. Serology Applied to Plant Virology. Serological Diagnosis of Certain Human, Animal and Plant Diseases. InTech Open Press.

Ling, K-S, Zhu, H-Y, Jiang Z-Y and Gonsalves D, 2000. Effective application of DAS-ELISA for detection of Grapevine leafroll associated closterovirus-3 using a polyclonal antiserum developed from recombinant coat protein. European Journal of Plant Pathology 106:301-309.

Nikolaeva OV, Karasev AV, Gumpf DJ, Lee RF and Garnsey SM, 1995.Production of polyclonal antisera to the coat protein of Citrus tristeza virus expressed in *Escherichia coli*, application for immunodiagnosis. Phytopathology 85:691-694.

Plchova H, Moravec T, Dedic P and Cerovska1 N, 2011. Expression of recombinant potato leafroll virus structural and non-structural proteins for antibody production. Journal of Phytopathology 159:130-132.

Rostami A, 2011. Analysis of formation of the Cucumber mosaic virus capsid protein after expression of the viral coat protein in *Escherichia coli*. MSc thesis. University of Tabriz.

Sambrook J and Russel DW, 2001. Molecular clonig: A laboratory manual (vol3). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Strober W, 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. Current Protocols in Immunology 11:21-23.

Purification and Analysis of the Antigenic Properties of the Expressed *Cucumber mosaic virus* Coat Protein in *Escherichia coli*

D Koolivand[1*], N Sokhandan Bashir[2], A Rostami[1] and P Pirniakan[3]

[1]Assistant Prof., and Ph. D. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
[2]Associate Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[3]MSc Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
*Corresponding author: E-mail: koolivand@znu.ac.ir

Received: 23 Nov 2014 Accepted: 25 Oct 2015

Abstract

Purification of expressed proteins is done to pursue different goals such as preparation of mono- and polyclonal antibodies, structural studies of the expressed proteins, identification of the amino acids and polypeptide sequences by chromatography which are generally costly and time- consuming. In this research, after expression of the coat protein (CP) gene of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in *Escherichia coli*, purification of the expressed protein was done from polyacrylamide gel. To this aim, recombinant plasmid containing the CP gene was transformed into *E. coli*, induced by Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and followed by polyacrylamide gel electrophoresis of the extracted protein. The result showed that the yield of the recombinant protein was optimized to purification. After express the recombinant plasmid in large volume of LB, extracted protein was electrophoresed on the polyacrylamide gel. The location of the expressed protein was determined, and then the expected protein band was separated from the polyacrylamide gel before subjecting to protein purification. Next, the recombinant purified protein was injected to two rabbits to raise the antiserum. Titration of the prepared antiserum was performed by the use of an indirect ELISA. It appeared that the method applied in this study to purify the expressed protein was more efficient than other purification methods such as chromatography. Also, results of DIBA and rabbit immunization showed that the purified protein could be used as the antigen to prepare the antiserum and antibody for detection of the CMV isolates.

Keywords: *Cucumber mosaic virus*, Coat Protein, Polyacrylamide gel, Recombinant antibody.