

بیان هترولوگ ژن پروتئین پوششی ویروس موزائیک گل کلم در *E. coli* و تشکیل ذرات شبه

ویروسی

مهین پوراسمعیل^۱، مقصود پژوهنده^۱، اکبر شیرزاد^۲ و احمد یاری خسروشاهی^۳

^۱گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. ^۲گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. ^۳گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم نوین پزشکی، مرکز تحقیقات علوم کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران. pazhouhandeh@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۱۴ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۶/۱۶ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۶

چکیده

ویروس موزائیک گل کلم (*Cauliflower Mosaic Virus = CaMV*) نخستین ویروس گیاهی شناسایی شده دارای ژنوم DNA است که خسارت اقتصادی زیادی به گیاهان خانواده *Brassicaceae* وارد می‌کند. تولید موفق کپسیدهای این ویروس هم در تشخیص سرولوژیکی آن و هم در تشکیل ذرات شبه ویروسی *Virus-Like Particles = VLPs* مفید است. در این تحقیق، DNA نمونه‌های گل کلم دارای علائم مشکوک به ویروس، استخراج و ژن پروتئین پوششی (*Coat protein = CP*) ویروس توسط آغازگرهای اختصاصی در PCR تکثیر شد. سپس توسط آنزیم‌های برشی *BamHI* و *SmaI* در وکتور بیانی pGEX2TK در پایین دست GST وارد و بعد از تایید وکتور نوترکیب، توالی‌یابی انجام شد و توالی بدست آمده در پایگاه داده NCBI با برنامه BLASTn با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد و مشخص گردید که این توالی مربوط به ویروس CaMV با شماره دسترسی KF357590.1 در پایگاه NCBI است. بیان پروتئین CP در باکتری *E. coli* سویه Rosetta القاء و بهینه‌سازی شد. بیان بسیار بالای این پروتئین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شش ساعت پس از القا به کمک IPTG با غلظت نهایی 1mM بدست آمد. سپس این پروتئین با نانوذرات سفاروز که توانایی اتصال به GST را دارند خالص‌سازی و در SDS-PAGE مشاهده شد. پروتئین‌های خالص شده CP با میکروسکوپ الکترونی بررسی شد و ذرات شبه ویروسی (VLPs) مشاهده گردید. تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی تولید VLPs این ویروس را بدون ایجاد اینکلوزن بادی و با مونتاژ صحیح تأیید می‌کند که می‌تواند در حمل دارو در پزشکی مورد آزمایش قرار گیرد.

کلمات کلیدی: بیان پروتئین، ژن پوشش پروتئینی، ذرات شبه ویروس، ویروس موزائیک گل کلم، همسانه سازی

Heterologous expression of *Cauliflower Mosaic Virus* coat protein gene in *E. coli* and formation of virus-like particles

Mahin Pouresmaeil¹, Maghsoud Pazhouhandeh¹, Akbar Shirzad², Ahmad Yari Khosroushahi³

¹Department of Biotechnology, Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. ² Department of Plant Protection, Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. ³ Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

pazhouhandeh@gmail.com

Received: 5 August 2022

Revised: 7 September 2022

Accepted: 7 September 2022

Abstract

Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) is the first identified plant virus with a DNA genome and causes great economic damage to *Brassicaceae* plants. The successful production of capsids of this virus is useful both in its serological diagnosis and in the formation of virus-like particles (VLPs). In this research, DNA from cauliflower samples with suspected virus symptoms was extracted and the coat protein (CP) gene of the virus was amplified using specific primers in PCR. Then it was inserted into the expression vector pGEX2TK downstream of GST by digestion endonuclease enzymes *BamHI* and *SmaI* and after confirmation of the recombinant vector, its sequencing was carried out. Sequencing was performed and the sequence obtained in the NCBI database was compared with the sequences in the gene bank with the BLASTn program. It was found that this sequence is related to the CaMV virus with accession number KF357590.1 in the NCBI database. The expression of the CP was induced and optimized in *E. coli* (Rosetta strain). A very high expression of this protein was obtained at 37°C and 6 hours after induction using IPTG with a final concentration of 1 mM. Then, this protein was purified with sepharose nanoparticles which have an affinity to GST, and observed in SDS-PAGE. The related electron microscope images confirm the production of VLPs of this virus with correct assembly without creating inclusion bodies that can be tested in drug delivery in medicine.

Keywords: Cauliflower Mosaic Virus, Cloning, Coat protein gene, protein expression, Virus like particles (VLPs)

How to cite:

Pouresmaeil M, Pazhouhandeh M, Shirzad A, Yari Khosroushahi A, 2023. Heterologous expression of *Cauliflower Mosaic Virus* coat protein gene in *E. coli* and formation of virus-like particles. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 12 (1): 111-121.

مقدمه

ویروس موزائیک گل کلم (*Cauliflower Mosaic Virus*= CaMV) از خانواده *Caulimoviridae* و متعلق به زیرگروه *Pararetrovirus* است. پیکره‌های این ویروس ایزومتریک، دارای قطری به طول ۵۰ نانومتر بوده و دارای تقارن بیست‌وجهی است (Haas et al. 2002). این ویروس اصلی‌ترین بیمارگر ویروسی در بین گیاهان خانواده *Brassicaceae* شناخته شده (Nooh 2012) و میزان آلودگی آن در این خانواده گیاهی تا ۶۰ درصد گزارش شده است (Spence et al. 2007). دامنه میزبانی این ویروس، محدود به گیاهان خانواده شببو بوده اما برخی جدایه‌های این ویروس قادر به آلوده کردن گیاهانی از خانواده بادنجانیان نیز هستند (Yasaka et al. 2014). ویروس موزائیک گل کلم دارای علائم مختلفی مانند موزائیک، رگبرگ روشنی، رگبرگ نواری، بدشکلی برگ و اختلال در تشکیل غلاف بذر و کاهش رشد در گیاهان میزبان است که این علائم در درجه حرارت بالا بصورت مزمن در گیاهان آلوده ظاهر می‌شوند. در ایران ویروس موزائیک گل کلم برای اولین بار در سال ۱۹۸۶ از اصفهان و بعد از آن از ورامین، شیراز و ساری گزارش شد (Ebrahim-Ghomi 2014). در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ نیز شیوع و توزیع CaMV در کلم، گل کلم، شلغم، کلم قمری و ترب و تربچه در ۱۰ استان ایران مورد مطالعه قرار گرفت (Farzadfar et al. 2007)، و امروزه گزارش‌های متعددی از ردیابی این ویروس از مناطق مختلف ایران در دست می‌باشد که نشانگر شیوع این ویروس در کشور است (Shams-bakhsh & Ghasemzadeh 2016).

تشخیص به‌موقع، دقیق و سریع ویروس‌ها یکی از روش‌های مبارزه با این گونه عوامل بیماری‌زا می‌باشد (Rubio et al. 2020). از جمله روش‌های دقیق برای تشخیص ویروس‌ها، استفاده از روش الیزا است که در این روش، تولید مداوم آنتی‌بادی ویروس، مورد نیاز است و برای تولید آنتی‌بادی نیز تولید مداوم آنتی‌ژن ویروس ضروری است. رایج‌ترین و بهترین آنتی‌ژن‌های ویروسی هم متعلق به CP ویروسها هستند. امروزه تولید پروتئین‌های نوترکیب در میزبان‌های مختلفی مثل باکتری‌ها (Rosano et al. 2019)، سلول‌های پستانداران (Hunter et al. 2019)، قارچ‌ها (Karbalaei et al. 2020)، حشرات (McKenzie & Abbott 2018) و گیاهان (Chawla 2011) انجام می‌گیرد. هر یک از این سیستم‌ها مزایا و معایب خاص خود را دارند. در سال‌های اخیر بحث تولید پروتئین‌های

یوکاریوتی در سیستم باکتریای مطرح شده و در طی این مدت تحول شگرفی در این زمینه ایجاد شده است (Demain & Vaishnav 2009). اما باکتری *E. coli* محبوبترین میزبان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب است. در این مطالعه همسانه سازی ژن CP ویروس CaMV در وکتور بیان در باکتری *E. coli* با موفقیت انجام شد و پروتئین مربوطه بیان و خالص‌سازی گردید که به عنوان منبعی برای تولید آنتی‌ژن می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

دارورسانی هدفمند به‌وسیله نانوحامل‌ها می‌تواند سبب رساندن غلظت مناسب دارو به بافت‌های هدف، افزایش کارایی و کاهش سمیت و عوارض جانبی دارو شود. به این منظور از نانوحامل‌های مختلفی از جمله دندریمر، مایسل، نانولوله‌ی کربنی، نانوذرات غیرآلی، پلیمرها، ویروس‌ها و غیره استفاده می‌شود (Shahgolzari et al. 2020) تا دارو به طور هدفمند به بافت هدف منتقل شود. کپسید ویروس‌های گیاهی یک گروه منحصربه‌فرد از نانومواد بیولوژیک هستند که کاربردهای پزشکی و غیرپزشکی دارند. کپسیدها ساختارهای تکراری ماکرومولکولی هستند که توانایی مونتاژ دوباره خود را دارند که این حالت باعث می‌شود تا قالب یکنواخت توخالی با سطوح داخلی و خارجی فعال ایجاد شود. این سطوح به‌طور کلی حاوی گروه‌های شیمیایی بوده و تراکم بالایی از بارهای الکترواستاتیک دارند (Yuste-Calvo et al. 2019). از طرفی، استفاده از مواد همراه یا ادجوانت‌ها در تهیه واکسن‌ها می‌تواند به بهبود ایمنی‌زایی آنتی‌ژن و القای ایمنی‌زایی طولانی مدت کمک کند (Cao et al. 2020). استفاده از ذرات ویروسی گیاهی به‌عنوان ادجوانت در تهیه واکسن‌ها گزارش شده است (Bastola et al. 2017; Lebel et al. 2015). پتانسیل ذرات ویروسی CaMV هم به عنوان ادجوانت در مطالعات قبلی اثبات شده است (Evtushenko et al. 2020). در ژنوم ویروس CaMV راه‌انداز CaMV 35S وجود دارد که حتی قابلیت فعال بودن در سلول‌های انسانی را دارد (Myhre et al. 2006) و می‌تواند خطرات احتمالی را برای بدن انسان ایجاد کند که با تولید هتروولوگ VLPs این ویروس این مشکل برطرف می‌شود. در این تحقیق، تولید ذرات شبه ویروسی (VLPs) که ماده‌ی ژنتیک ویروس CaMV را دارا نبوده و عفونی نیستند انجام گرفت و توانایی مونتاژ خودبخودی کپسیدهای نوترکیب و عدم تشکیل اینکلوزن بادی آن‌ها زیر میکروسکوپ الکترونی بررسی شد که تایید این ویژگی می‌تواند مطالعات بیشتر روی این کپسیدها به عنوان حامل دارو را هموارتر کند.

مواد و روش‌ها

جداسازی ویروس *CaMV* از گیاهان آلوده به ویروس و تکثیر ژن CP

به منظور جداسازی ویروس *CaMV* از میزبان گل کلم آلوده به ویروس، نمونه برداری از گیاهان گل کلم دارای علائم مشخص این بیماری مثل موزائیک، نکروز، چین خوردگی، بدشکلی برگ و رگبرگ نوری صورت گرفت. این نمونه‌های گیاهی از میداین میوه و تره‌بار شهرستان تبریز تهیه شدند. استخراج DNA به روش CTAB انجام شد (Dellaporta *et al.* 1983) و برای تکثیر ژن CP از DNA استخراج شده از روش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن CP استفاده گردید (جدول ۱).

همسانه‌سازی و توالی‌یابی ژن CP

برای همسانه‌سازی ژن CP از پلاسمید بیانی pGEX2TK استفاده گردید (شکل ۱a). در انتهای ۵' آغازگر مستقیم جایگاه برشی آنزیم *BamHI* و در انتهای ۵' آغازگر معکوس جایگاه برشی آنزیم *SmaI* قرار داده شدند (جدول ۱). در جدول ۱، آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق.

Table 1. Primers used in this research.

Primer name	Sequence
CaMV-CP-F (cloning)	aaGGATCCATGGCCGAATCAATTTTAGACAGG
CaMV-CP-R (cloning)	aaCCCGGGTCAATCTGAGTCTGAGTCTTCAGAAG
CaMV-CP F800	GCTCTGCGACATCTGCTACC
CaMV-CP R780	CTTGGCCTTCTCTTGCTCTTCG
CaMV-CP F900	TTTAGGCATGAAGCCAACGG
CaMV-CP R320	GGAATCTCCGTTCCCTCTG
pGEX2TK F870	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEX2TK R1020	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTT

قسمت ۵' هر دو نوع آغازگر، دو نوکلئوتید آدنین (aa) به عنوان نشیمنگاه آنزیم‌های برشی اضافه شد. جایگاه‌های برشی آنزیم‌های اندونوکلاز مذکور روی پلاسمید pGEX2TK در محل MCS آن قرار دارد (شکل ۱) که از این طریق امکان همسانه‌سازی ژن CP به پلاسمید بیانی فراهم است. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر مطابق با برنامه ۹۴°C به مدت چهار دقیقه، ۳۰ چرخه شامل ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت برای بسط نهایی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای مشاهده قطعات DNA از ژل آگارز یک درصد استفاده شد. برای انجام همسانه‌سازی، قطعه CP و وکتور بیانی با آنزیم‌های ذکر شده (شرکت NEB) برش داده شدند برای برش از بافر Smart Cut استفاده شد و ابتدا با آنزیم *SmaI* به مدت یک ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برش انجام و سپس آنزیم *BamHI* اضافه گردید و یک ساعت دیگر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از جداسازی قطعات برش‌یافته مدنظر از ژل، این قطعات خالص‌سازی شده و اتصال آن‌ها با استفاده از آنزیم *T4 DNA* لیگاز (شرکت فرمنتاز) انجام گرفت.

برای بررسی بیان ژن CP، وکتور نوترکیب تائید شده به باکتری *E. coli* سویه Rosetta به کمک الکتروپوریشن تراریزش شد. در این مطالعه، برای حصول میزان بالایی از بیان ژن CP و بهینه‌سازی بیان آن در میزبان باکتری از دو دمای ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های مختلف (۳، ۶، و ۹ ساعت) پس از القا با غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG (-IPTG Isopropyl) استفاده گردید. در این آزمایش OD₆₀₀ باکتری در زمان القا ۰/۶ بود. برای تخلیص پروتئین CP، پس از پایان زمان القای بیان، سانتریفیوژ ۵۰۰۰g در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام و محلول رویی دور ریخته شد. به ازای هر میلی‌لیتر از کشت باکتری ۴۰ میکرولیتر PBS سرد با pH= ۷/۴ روی نمونه‌ها اضافه گردید و برای تخریب دیواره باکتری از امواج فراصوت

محصول واکنش اتصال پس از خالص‌سازی به سلول‌های مستعد *E. coli* سویه Top10 به روش الکتروپوریشن (۲/۵ کیلوولت به مدت پنج هزارم ثانیه) انتقال یافت. استخراج پلاسمیدهای نوترکیب به روش مینی‌پِرب انجام شد (Bimboim & Doly 1979). تایید وکتورهای نوترکیب همزمان با PCR و برش آنزیمی انجام گرفت. وکتورهای نوترکیب (۱۵ عدد) برای تایید توالی قطعه‌ی CP درج شده به دانشگاه Lille فرانسه برای توالی‌یابی ارسال شدند. برای توالی‌یابی کامل ژن و پوشش دادن همه توالی و همچنین بالادست و پایین دست ژن از آغازگرهای اختصاصی داخل ژن CP و همچنین دو طرف محل ورود ژن در روی وکتور استفاده شد (جدول ۱).

بیان ژن CP و خالص‌سازی پروتئین آن

Protein-Sol برای پیش‌گویی حلالیت پروتئین CP در باکتری *E. coli* استفاده شد.

مشاهده CP با میکروسکوپ الکترونی (TEM)

برای مشاهده بازآرایی صحیح پروتئین CP تخلیص شده از میکروسکوپ الکترونی (TEM-Mega View II) متعلق به دانشگاه Bologna ایتالیا استفاده شد.

نتایج

همسازسازی ژن CP

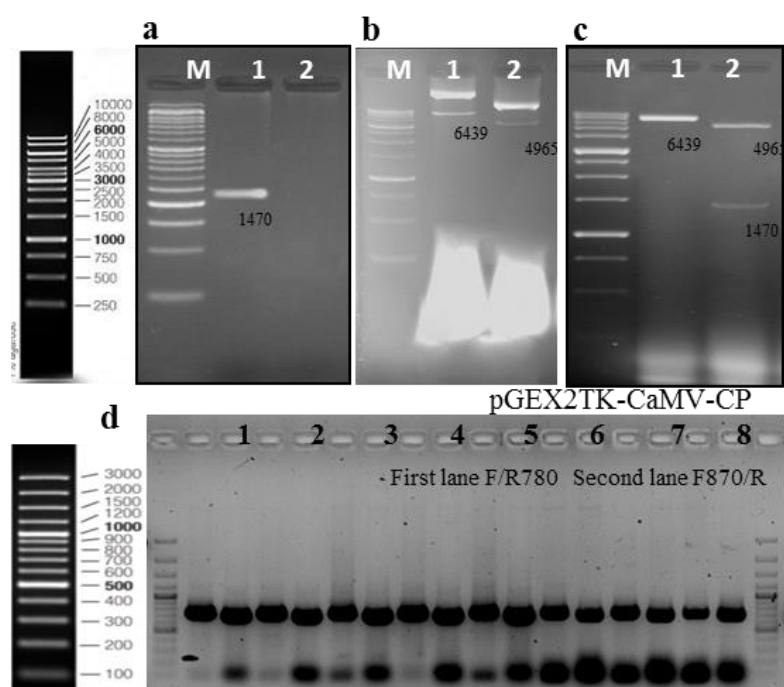
استخراج DNA از برگ‌های که مشکوک به آلودگی ویروسی بودند صورت گرفت. برای شناسایی ویروس، پی‌سی‌آر با آغازگرهای اختصاصی ژن CP انجام شد و جهت وجود قطعه مورد نظر در محصول PCR و تخمین کیفیت و کمیت آن از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود ژن CP با اندازه مورد نظر (۱۴۷۰bp) قابل مشاهده است (شکل ۱b). محصول پی‌سی‌آر ۱۴۷۰bp به پلاسمید pGEX2TK متصل و در باکتری *E. coli* سویه TOP10 کلون شد سپس این قطعه و پلاسمید pGEX2TK با استفاده از آنزیم‌های اندونوکلاز *BamHI* و *SmaI* برش داده شدند. در نهایت ژن CP به داخل وکتور بیانی pGEX2TK وارد گردید و این وکتور بیانی نوترکیب با آنزیم‌های برشی مربوطه برش داده شده که منجر به رهایی قطعات مورد نظر گردید همچنین PCR با آغازگرهای داخلی ژن و آغازگرهای وکتور بیانی انجام شد تا صحت کار تائید گردد (شکل ۱). برای بررسی توالی DNAهای کلون شده، نمونه DNA پلاسمید نوترکیب pGEX2TK-CP در دانشگاه Lille فرانسه توالی یابی شد. نتایج توالی یابی نشان داد که ژن CP بصورت صحیح در وکتور بیانی درج شده است و چارچوب خوانش آن و همچنین توالی GST موجود در انتهای N ترمینال آن دست نخورده باقی مانده است. توالی ژن CP درج شده در وکتور بیانی در پایگاه داده NCBI با برنامه BLASTn با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد و مشخص گردید که این توالی مربوط به ژن CP ویروس CaMV با شماره دسترسی KF357590 در پایگاه NCBI است که قبلاً از ایران گزارش شده است (Farzadfar et al. 2014).

(سونیفیکاسیون ۴۰٪ با پالس ۳۰ به مدت ۳-۵ دقیقه) استفاده شد سپس عصاره باکتری با ۱۵۰۰۰ g به مدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در نهایت محلول رویی به تیوب جدید انتقال داده شد. تخلیص پروتئین-GST CP به کمک روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از سوسپانسیون نانوذرات سفاروز (شرکت سیگما آلمان: CAS N: 9012-36-6) انجام شد (Harper & Speicher 2011). تمامی مراحل کار روی یخ انجام شد. به منظور مشاهده پروتئین CP و تایید خلوص آن در تیمارهای مختلف بیان از الکتروفورز ژل SDS-PAGE ۱۰٪ استفاده شد. ژل حاوی باندهای پروتئینی به مدت چهار ساعت در محلول رنگ آمیزی کوماسی بلو (متانول ۴۵٪، اسید استیک ۱۰٪ و کوماسی بلو ۱٪ در آب) بر روی شیکر به آرامی تکان داده شد. سپس با استفاده از محلول متانول ۴۵٪ و اسید استیک ۱۰٪ رنگبری شد و تصویر ژل اسکن گردید. بررسی شدت باندها در ژل SDS-PAGE با نرم افزار ImageJ صورت گرفت. به عنوان شاهد، وکتور خالی pGEX2TK برای مقایسه نتایج به باکتری منتقل و از ابتدا در موازات، مورد استفاده قرار گرفت که فقط GST خالی را با القاء بیان می‌کند.

بعد از بیان پلاسمید نوترکیب و تائید آن با SDS-PAGE خالص‌سازی انجام شد. خالص‌سازی پروتئین شامل یک سری مراحل می‌باشد که برای مجزا کردن یک نوع پروتئین از پروتئین‌های مختلط استفاده می‌شود. خالص‌سازی امری حیاتی برای توصیف وظیفه، ساختار و فعل و انفعالات پروتئین مورد نظر می‌باشد. پروتئین‌های فیورژن محلول GST به راحتی با استفاده از گلوپاتایون سفاروز تثبیت شده خالص می‌شوند. برای خالص‌سازی پروتئین از سفارز Sepharose 4B شرکت سیگما و L-Glutathione reduced (Sigma G4251) استفاده شد (Pazhouhandeh et al. 2006) و در نهایت برای حذف GST متصل به پروتئین از آنزیم ترومبین استفاده گردید و پروتئین خالص شده توسط SDS-PAGE آنالیز شد.

بررسی بیوانفورماتیکی میزان حلالیت پروتئین CP در باکتری *E. coli*

استفاده از نرم‌افزارهای مختلف برای پیش‌گویی حلالیت پروتئین‌های نوترکیب در میزبان هترولوگ، می‌تواند به اتخاذ استراتژی‌های لازم و مناسب برای افزایش پروتئین نوترکیب در میزبان هترولوگ کمک کند. در این تحقیق از الگوریتم



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR برای ژن CP، الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری *E. coli* ترانسفورم شده با pGEX2TK-CP و برش آن‌ها با آنزیم‌های محدودگر در ژل آگارز ۱٪. (a) تکثیر ژن CP (۱۴۷۰ bp) و ویروس CaMV به کمک PCR از گیاهان گل‌کلم آلوده به ویروس. (b) مقایسه‌ی اندازه‌ی پلاسمید خالی (چاهک ۲) و پلاسمید حاوی ژن CP (چاهک ۱) پس از همسانه سازی. (c) تایید پلاسمید نوترکیب با برش همزمان با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sma*I (چاهک ۲) و برش خطی آن با آنزیم *Bam*HI (چاهک ۱). M= مارکر DNA 1kb. (d) تایید پلاسمیدهای نوترکیب با PCR با آغازگرهای اختصاصی میانی ژن CP.

Figure 1. Electrophoresis of PCR product for CP gene, electrophoresis of plasmids extracted from *E. coli* bacteria transformed with pGEX2TK-CP and cutting them with restriction enzymes in 1% agarose gel. a) CaMV's CP gene amplified by PCR on infected cauliflower plants. b) The comparison of empty plasmid (lane 2) with plasmid containing CP gene (lane 1). c) confirming of the recombinant plasmid by digestion with both *Bam*HI and *Sma*I (lane 2) and with *Bam*HI (lane 1). M=DNA Ladder. d) confirming of recombinant plasmids by PCR using internal CP primers.

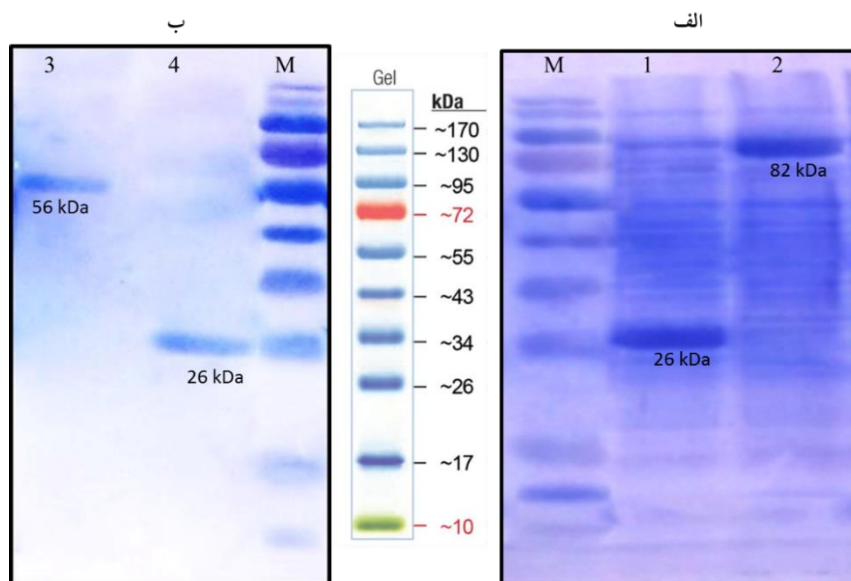
بیان ژن CP

برای بیان ژن CP در وکتور بیانی نوترکیب (-pGEX2TK-CP^{CaMV}) از سویه Rosetta استفاده شد و بیشترین مقدار بیان ژن CP در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شش ساعت بعد از القا با IPTG در غلظت یک میلی‌مولار به دست آمد (شکل ۲ الف). اندازه پروتئین نوترکیب (GST-CP) در SDS-PAGE در حدود ۸۲ کیلودالتون بدست آمد. از لحاظ تئوری وزن مولکولی پروتئین CP در حدود ۵۶ کیلودالتون است که این اختلاف اندازه به دلیل فیوژن شدن ژن CP در قسمت انتهایی آمینی با ژن GST (۲۶ کیلودالتون) است (شکل ۲ الف). برای بررسی میزان پروتئین موردنظر نسبت به کل پروتئین موجود در عصاره باکتری *E. coli* از نرم‌افزار ImageJ استفاده شد و مشخص گردید که پروتئین موردنظر در حدود ۲۵ درصد کل پروتئین این میزبان باکتری را تشکیل می‌دهد که مقدار قابل توجهی می‌باشد. تخلیص پروتئین‌های GST و GST-CP با استفاده از سفارز انجام شد. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود

خالص‌سازی این پروتئین‌ها (CP و GST) به کمک ذرات سفارز با کیفیت بالا انجام شده است و باندهای اضافی در ژل SDS-PAGE مشاهده نمی‌شود و قطعات با اندازه موردنظر قابل رویت هستند (شکل ۲ ب).

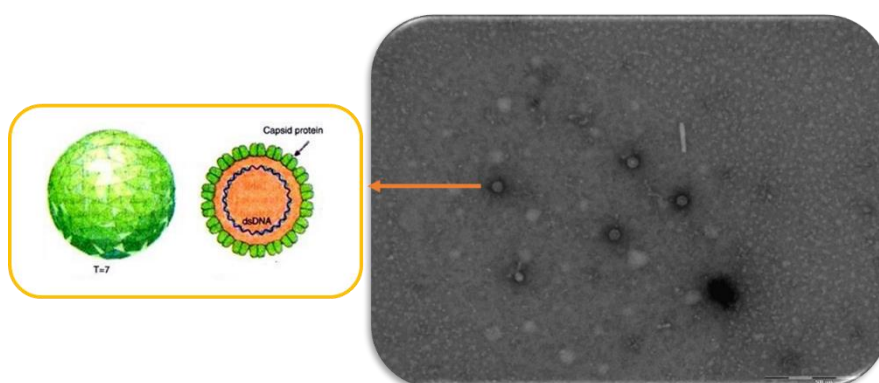
بررسی موتائز صحیح پروتئین نوترکیب CP و ایجاد VLPs در زیر میکروسکوپ الکترونی

پروتئین‌های CP در ویروس‌ها توانایی تعامل و چسبیدن به همدیگر دارند تا با معماری خاص هر ویروس کپسید آن را تشکیل دهند. انبوه پروتئین‌های CP تولید و خالص‌سازی شده از باکتری مورد بررسی ساختاری زیر میکروسکوپ الکترونی قرار گرفتند. بررسی پروتئین‌های تولید شده CP در زیر میکروسکوپ الکترونی صحت بهم چسبیدن درست و ایجاد ذرات شبه ویروسی یا VLPs را تأیید کرد. VLPs به‌درستی موتائز شده و با ذرات ویروسی CaMV طبیعی تفاوت بارزی را نشان ندادند که در شکل ۳ دیده می‌شود.



شکل ۲. الف) ژل آکریل آمید مربوط به SDS-PAGE بیان ژن GST-CP (چاهک ۲) و GST (چاهک ۱) (ب) ژل مربوط به باندهای پروتئین‌های CP (چاهک ۳) و GST (چاهک ۴) (M) لدر پروتئینی.

Figure 2. Right) Acrilamid gel of SDS-PAGE related to GST-CP expression (lane 2) and GST (lane 1). Left) gel related to CP protein band (lane 3) and GST (lane 4) both after purification. M) Protein Ladder.



شکل ۳. مشاهده VLPs ویروس CaMV از بهم چسبیدن پروتئین‌های CP تولید شده در زیر میکروسکوپ الکترونی. ذرات شبه ویروس خالی از ژنوم یا VLPs به صورت صحیح مونتاژ شده (شکل سمت راست) و با ذرات ویروسی CaMV طبیعی (شکل سمت چپ برگرفته از <https://viralzone.expasy.org>) تفاوتی ندارند.

Figure 3. Observation of CaMV's VLPs under TEM formed from auto-stick of expressed CP proteins with together. Genome-free VLPs have been formed correctly (Right) and do not have difference with natural CaMV particles (left, adapted from <https://viralzone.expasy.org>).

بحث

درصد موجب کاهش عملکرد آنها می‌شود (Sutic *et al.* 1999). یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای مقابله با بیماری‌های ویروسی تشخیص زود هنگام آنها می‌باشد. روش‌های مولکولی و سرولوژیکی دو روش رایج برای تشخیص بیماری‌های ویروسی می‌باشند. بطور کلی، روش‌های مولکولی برای تشخیص ویروس‌های گیاهی به عنوان تست‌های معمول برای حجم وسیعی از نمونه‌ها به دلیل هزینه‌ها و پیچیدگی مراحل اجرا، مناسب نیستند در نتیجه، بطور رایج، روش سرولوژیکی،

ویروس موزاییک گل کلم یکی از مهم‌ترین ویروس‌های خانواده Brassicaceae است که این خانواده را تحت تأثیر قرار داده و باعث کاهش کمیت و کیفیت محصولات می‌شود (Spence *et al.* 2007). در کشور ایران ویروس موزاییک گل-کلم برای اولین بار در سال ۱۹۸۶ از اصفهان و بعد از آن در ورامین، شیراز و ساری گزارش شده است (Ebrahim-Ghomi 2014). آلودگی به ویروس CaMV در دانه‌های روغنی تا ۵۰

استفاده شده است (Habibi et al. 2014)، که از جمله آن‌ها می‌توان به الگوریتم Protein-Sol اشاره کرد (Hebditch et al. 2017). در حالت کلی، حلالیت پروتئین‌ها در بیان هترولوگ بستگی به توالی اسیدآمینه آنها دارد. بنابراین پیش‌بینی حلالیت از روی توالی بسیار ارزشمند است. زمانیکه عدد مربوط به حلالیت پروتئین طبق این سرور ۰/۴۵ باشد یعنی پروتئین مورد نظر حلال است و زمانیکه بیشتر از این مقدار باشد حلالیت بالایی دارد و زمانیکه این عدد کمتر از ۰/۴۵ باشد نشان دهنده حلالیت کم پروتئین نوترکیب در میزبان هترولوگ خواهد بود (Hebditch et al. 2017). در بررسی میزان حلالیت پروتئین CP ویروس موزائیک گل‌کلم در میزبان هترولوگ *E. coli* عدد ۰/۴۵۱ بدست آمد که نشان می‌دهد پروتئین مزبور جزو پروتئین‌های محلول محسوب می‌شود. حلالیت مربوط به پروتئین GST که به پروتئین CP ویروس فیوژن شده است معادل ۰/۴۷۱ بدست آمد. بنابراین انتظار می‌رود استفاده از فیوژن پروتئین GST، علاوه بر کمک به خالص‌سازی پروتئین CP به افزایش حلالیت آن کمک کرده باشد. نتایج این مطالعات بیوانفورماتیکی مطابق با نتایج عملی بود بطوریکه بیان بسیار بالا، خلوص بهتر و حلالیت کامل پروتئین هدف با این استراتژی حاصل شد. در بررسی VLPs در زیر میکروسکوپ الکترونی بعد از خالص‌سازی، نوبازآرایی دقیق ذرات ویروسی و عدم تشکیل اینکلوزن بادی در زیر میکروسکوپ الکترونی به وضوح قابل مشاهده بود. تولید پروتئین‌های نوترکیب فرآیندی مهم در علم بیوتکنولوژی می‌باشد و حلالیت کم پروتئین باعث مشکلات جدی در علم و صنعت پروتئین می‌شود (Chan et al. 2010; Harper & Speicher 2011)، حتی اگر استراتژی‌های منطقی مهندسی ژنتیک، مانند پروموتورهای قوی و بهینه‌سازی کدون، به خوبی انجام شده باشد، بیان بیش از حد پروتئین اغلب یک هنر است (Hebditch et al. 2017)، که در این تحقیق بیان بسیار بالای پروتئین CP در میزبان هترولوگ *E. coli* بدست آمد.

امروزه از سیستم‌های بیان کننده متعددی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود، نوع سیستم بیان کننده که برای هر آزمایش به کار می‌رود، بیشتر به هدف آزمایش بستگی دارد. از جمله سیستم‌های پروکاریوتی مورد استفاده در بیان پروتئین نوترکیب مانند *E. coli*، *Pseudomonas* و *Bacillus subtilis* است (Rosano & Ceccarelli 2014; Schumann 2007; Zhang et al. 2018). در بین سیستم‌های یوکاریوتی هم می‌توان به قارچ‌ها، مخمرها

از پرکاربردترین روش‌ها برای تشخیص ویروس‌های گیاهی بوده که از جمله این روش‌ها می‌توان به روش ELISA اشاره کرد. روش الایزا در مقایسه با سایر روش‌های سرولوژیکی روشی ساده، نسبتاً ارزان و استفاده از آن برای تست نمونه‌های زیادی در مدت زمان کمتر، راحت‌تر می‌باشد (Lee & Chang 2006). برای تولید کیت‌های تشخیص الایزا تولید مداوم آنتی-بادی‌های ویروس ضروری می‌باشد. ذرات ویروسی به عنوان یک آنتی‌ژن برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی‌کلونال استفاده می‌شوند. تهیه ذرات ویروسی برای تولید آنتی‌بادی در گیاهان میزبان دارای معایبی از قبیل، نداشتن خلوص کافی ویروس‌ها، غلظت کم ویروس‌های استخراج شده و طولانی بودن مراحل انجام کار می‌باشد (Hourani & Abou-Jawdah 2003; Hull 2013). همچنین احتمال فرار ویروس وجود دارد که می‌تواند مزارع را آلوده کند و مشکلات زیادی را به بار بیاورد. یکی از روش‌های جدید برای تولید ذرات ویروسی، تولید نوترکیب آن‌ها در میزبان‌های هترولوگ مختلف می‌باشد. یکی از این میزبان‌های هترولوگ باکتری *E. coli* می‌باشد (Ahmad et al. 2018; Rosano et al. 2019). سیستم بیان برای باکتری *E. coli* سیستمی ساده، سریع و ارزان قیمت برای تولید مقدار زیادی از پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد (Nuc & Nuc 2006). همچنین استفاده از برجسب یا تگ‌های مختلف در سیستم بیانی باکتریایی به افزایش بیان، عدم تشکیل اینکلوزن بادی، افزایش پایداری و تسهیل در استخراج پروتئین نوترکیب کمک می‌کند (Sørensen & Mortensen 2005). در این مطالعه تولید موفق پروتئین نوترکیب CP ویروس CaMV بصورت هترولوگ در میزبان *E. coli* تایید شد. این نتیجه مطابق با مطالعات دیگری بود که تولید نوترکیب کپسید ویروس‌های مختلف گیاهی را با هدف کاربرد در تهیه کیت الایزا انجام داده بودند (Bhardwaj et al. 2018; Darsono 2018; Salem et al. 2020). در این پژوهش، از برجسب یا تگ GST (گلوپروتئین S- ترانسفراز) برای خالص‌سازی پروتئین نوترکیب CP استفاده شد. استفاده از این پروتئین کوچک در مطالعات مختلفی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مختلف در باکتری *E. coli* استفاده شده است (Rabhi-Essafi et al. 2007). این پروتئین GST به خالص‌سازی راحت، افزایش بیان و حلالیت پروتئین فیوژن شده کمک می‌کند (Harper & Speicher 2011).

تا به امروز الگوریتم‌های زیادی برای پیشگویی انحلال پذیری پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در باکتری *E. coli*

دمای اتاق، عدم وجود گیاه محک برای برخی ویروس‌ها، عدم خلوص کافی ذرات ویروس استخراج و خالص شده، عدم وجود امکانات لازم بویژه دستگاه اولتراسانتریفوژ برای خالص‌سازی ویروس، زمان‌بر بودن اغلب روش‌های سنتی و پرهزینه بودن آن‌ها، بازده پایین آن‌ها و عدم کارایی آنها در سطح وسیع اشاره کرد. در این تحقیق تولید VLPs ویروس موزائیک گل-کلم با بیان در باکتری *E. coli* سویه Rosetta بدست آمد که هیچ کدام از مشکلات مرتبط با تولید ذرات ویروسی در گیاهان را ندارد و می‌تواند به عنوان ادجوانت در تهیهی واکسن‌های مختلف استفاده شود. نانوذرات نقش فزاینده‌ای به عنوان وکتور در انتقال داروها به بافت‌ها و سلول‌های خاص برای مبارزه با بیماری‌هایی مثل سرطان سینه و گلیوبلاستوما دارند (Gamper et al. 2019). استفاده از ذرات ویروسی گیاهی به عنوان نانوحامل دارو در حال پیشرفت است که در همه‌ی این موارد تولید مدام ذرات ویروسی مورد نیاز می‌باشد که در این تحقیق این مورد محقق شده است.

در این تحقیق از دماها و زمان‌های مختلف القا با IPTG برای بهینه‌سازی و افزایش بیان ژن CP استفاده شد. بیشترین بیان در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های ۶ و ۹ ساعت بعد از القا بدست آمد. بین این دو زمان، تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژن CP مشاهده نشد. باتوجه‌به نتایج این تحقیق چنین استنباط می‌شود که القا باکتری‌ها به مدت ۶ ساعت برای بیان ژن CP کافی است و زمان‌های بالاتر از این، تأثیری در افزایش بیان ندارد. دلیل این پدیده، شاید ورود باکتری بعد از ۶ ساعت، به فاز ایستایی است که در این فاز تعداد سلول‌های جدید در محیط برابر با تعداد سلول‌های از بین رفته است؛ بنابراین، افزایش مدت‌زمان القا تأثیری در افزایش میزان پروتئین تولید شده نخواهد داشت. نتایج بررسی در خصوص بیان ژن CP ویروس *Prune dwarf virus* نشان داد که افزایش مدت زمان القا حتی به میزان یک شب تأثیر چندانی بر میزان افزایش پروتئین تولید شده نداشت (Abou-Jawdah et al. 2004) که مطابق با نتایج تحقیق ما است. در این آزمایش از $OD_{600} = 0.16$ و IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار برای القای بیان استفاده شد که مطابق با کارهای قبلی بود (Hamdayanty et al. 2016). در ایران مطالعات مختلفی در خصوص بیان ژن پروتئین پوششی برخی ویروس‌های گیاهی انجام شده است که از آن جمله می‌توان به ویروس موزائیک خیار (Kolivand et al. 2016)، ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقد (Anabestani et al. 2019)، ویروس وای سیب

و سلول‌های حشرات، سلول‌های پستانداران و سلول‌های گیاهی اشاره کرد که هر یک از این سیستم‌ها مزایا و معایب خاص خود را دارند (Yasukawa et al. 1995).

در سال ۱۹۸۲ برای بیان ژن پروتئین پوششی ویروس موزائیک گل کلم (قطعه ۷۷۲ bp از قاب خواندنی شماره چهار ویروس موزائیک گل کلم سویه CM1841) از باکتری *E. coli* سویه K12 استفاده شد (Daubert et al. 1982). در مطالعه دیگر برای بررسی بیان ژن پروتئین پوششی ویروس در باکتری *E. coli* از وکتور بیانی pTG908 حاوی پروموتور PL القایی با دما و سویه باکتریایی TGE 6150 استفاده شد و مشخص شد در این سیستم قابلیت بیان دارد (Albrecht & Lebeurier 1988). پروتئین تولید شده توسط ORF V ویروس موزائیک گل کلم خاصیت رونویسی معکوس و ریبونوکلیئاز H دارد. در سال ۱۹۸۶ برای بررسی بیان این ژن از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* استفاده شد و مشخص گردید سطح قابل قبولی از این ژن در مخمر قابلیت بیان دارد (Takatsuji et al. 1986). قاب خواندنی شماره یک ویروس موزائیک گل کلم یک پروتئین ۴۰ کیلو دالتون به نام P1 را کد می‌کند که در حرکت سلول به سلول ویروس نقش دارد. به منظور بررسی عملکرد آن، P1 در مخمر *S. cerevisiae* بیان شد (Kirchherr et al. 1991). در ویروس موزائیک گل کلم ORF II که عامل انتقال با شته را بیان می‌کند در یک سیستم *baculovirus* و در سلولهای *Spodoptera frugiperda* (SF21) بیان شد (Espinoza et al. 1992).

ادجوانت‌ها موادی هستند که در تهیه واکسن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند و به افزایش کارایی واکسن و همچنین به طولانی‌تر کردن مدت‌زمان ایمنی‌زایی بدن علیه بیماری منجر می‌شوند (Bowen et al. 2018; Cao et al. 2020). استفاده از ویروس‌های گیاهی به عنوان ادجوانت در مطالعات مختلفی به اثبات رسیده است (Acosta-Ramírez et al. 2014; Rioux et al. 2008). ویروس CaMV یکی از ویروس‌های گیاهی است که خاصیت ادجوانت بودن آن به اثبات رسیده است (Evtushenko et al. 2020)، که برای بکارگیری این ویروس به عنوان ادجوانت و همچنین مطالعات پیش‌تر روی آن، نیاز است که تولید مداوم ذرات ویروسی انجام گیرد. تولید ذرات ویروسی در گیاهان میزبان و محک مشکلات متعددی دارد که از جمله می‌توان به غلظت کم ویروس‌ها در شیره گیاهی، ناپایداری آن‌ها در حین مراحل خالص‌سازی، از دست دادن نیمی از قدرت عفونی در مدت زمان کوتاه در

استخراج شده از میزبان گیاهی هیچ گونه تفاوتی را نشان نداد و مشخص گردید که کپسید نوترکیب این ویروس قابلیت صحیح مونتاژ خودبخودی و ایجاد ذرات ویروسی را دارد که می‌تواند در حمل دارو در پزشکی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از حمایت مالی و معنوی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و حمایت صندوق زیست فناوری (شماره ۱۰۶۶۸-۹۹) معاونت علمی فناوری ریاست جمهوری و همچنین از کمک‌ها و مشاوره‌های صمیمانه دکتر مسعود شمس بخش و دکتر جعفر رازقی تشکر و قدردانی می‌نمایند. از سیستم توالی‌یابی دانشگاه لیل فرانسه و از سیستم میکروسکوپ الکترونی دانشگاه بلونیا ایتالیا سپاسگزاریم.

References

- Abou-Jawdah Y, Sobh H, Cordahi N, Kawtharani H, Nemer G, Maxwell DP, Nakhla MK. 2004. Immunodiagnosis of Prune dwarf virus using antiserum produced to its recombinant coat protein. *Journal of Virological Methods* 121: 31–38.
- Acosta-Ramírez E, Pérez-Flores R, Majeau N, Pastelin-Palacios R, Gil-Cruz C, Ramírez-Saldaña M, Manjarrez-Orduño N, Cervantes-Barragán L, Santos-Argumedeo L, Flores-Romo L. 2008. Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus. *Immunology* 124:186–197.
- Ahmad I, Nawaz N, Darwesh NM, ur Rahman S, Mustafa MZ, Khan SB, Patching SG. 2018. Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* 144:12–18.
- Albrecht H, Lebourier G. 1988. Expression of CaMV ORF IV in *Escherichia coli*. Pages 263–276. *Annales de l'Institut Pasteur/Virologie*: Elsevier.
- Anabestani A, Bhejatnia S, Tabein S, Izadpanah K. 2019. Bacterial expression of Beet curly top Iran virus coat protein in *Escherichia coli*. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)* 42:73–83.
- Bashir NS, Poorsmaile M, Hajizadeh M. 2015. Heterologous expression of potato virus Y coat

زمینی (Bashir *et al.* 2015)، ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب (Mirzaei *et al.* 2019) و ویروس X سیب زمینی (Massumi *et al.* 2020) در باکتری *E. coli* اشاره کرد. اما علی‌رغم گسترش وسیع ویروس موزائیک گل‌کلم در ایران، در خصوص بیان پروتئین پوششی سویه‌های ایرانی ویروس موزائیک گل‌کلم این تحقیق برای اولین بار در این پژوهش در ایران مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج این تحقیق و مطالعات مشابه انجام شده توسط سایر محققین در سال‌های قبل گویای این است که بیان هتروولوگ ژن CP ویروس‌های مختلف یک روش جایگزین برای خالص‌سازی ذرات ویروسی برای تهیه‌ی آنتی‌سرم است. مونتاژ خودبخودی پروتئین نوترکیب پوشش پروتئینی ویروس‌های گیاهی و ایجاد VLPs در آزمایشات مختلفی گزارش شده است (Wi *et al.* 2020). در این تحقیق مونتاژ خودبخودی VLPs نوترکیب ویروس CaMV و مقایسه آن با ذرات ویروسی

protein, isolate Pot187. *Iranian Journal of Biotechnology* 13: 48.

- Bastola R, Noh G, Keum T, Bashyal S, Seo J-E, Choi J, Oh Y, Cho Y, Lee S. 2017. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Archives of pharmacal research* 40:1238–1248.
- Bhardwaj P, Negi A, Sukapaka M, Hallan V. 2020. Production of polyclonal antibodies to the coat protein gene of Indian isolate of Apple stem grooving virus expressed through heterologous expression and its use in immunodiagnosis. *Indian Phytopathology* 73:165–173.
- Bimboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7:1513–1523.
- Bowen WS, Srivastava AK, Batra L, Barsoumian H, Shirwan H. 2018. Current challenges for cancer vaccine adjuvant development. *Expert review of vaccines* 17:207–215.
- Cao W, He L, Cao W, Huang X, Jia K, Dai J. 2020. Recent progress of graphene oxide as a potential vaccine carrier and adjuvant. *Acta biomaterialia* 112:14–28.
- Chan W-C, Liang P-H, Shih Y-P, Yang U-C, Lin W-c, Hsu C-N. 2010. Learning to predict expression efficacy of vectors in recombinant protein production. *BMC bioinformatics* 11:1–12.
- Chawla HS. 2011. Introduction to plant biotechnology. CRC Press.
- Darsono N, Azizah NN, Putrantly KM, Astuti NT, Addy

- HS, Darmanto W, Sugiharto B. Production of a Polyclonal Antibody against the Recombinant Coat Protein of the Sugarcane Mosaic Virus and Its Application in the Immunodiagnostic of Sugarcane. *Agronomy*. 2018; 8(6):93.
- Daubert S, Richins R, Shepherd R, Gardner RC. 1982. Mapping of the coat protein gene of cauliflower mosaic virus by its expression in a prokaryotic system. *Virology* 122:444–449.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter* 1:19–21.
- Demain AL, Vaishnav P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances* 27:297–306.
- Ebrahim-Ghomi M. 2014. Study on distribution and detection of cauliflower mosaic virus (CaMV) in Dezful region of Iran. *International Journal of Biosciences* 4:271–275.
- Espinoza A, Usmany M, Pirone T, Harvey M, Woolston C, Medina V, Vlaskin J, Hull R. 1992. Expression of cauliflower mosaic virus ORFII in a baculovirus system. *Intervirology* 34:1–12.
- Evtushenko EA, Ryabchevskaya EM, Nikitin NA, Atabekov JG, Karpova OV. 2020. Plant virus particles with various shapes as potential adjuvants. *Scientific reports* 10:1–10.
- Farzadfar S, Ahoonmanesh A, Mosahebi G, Ohshima K, Koochi-Habibi M, Pourrahim R, Golnaraghi A. 2007. Partial Biological and Molecular Characterization of Cauliflower mosaic virus Isolates in Iran. *Plant Pathology Journal* 6:291–298.
- Farzadfar S, Pourrahim R. 2013. Biological and molecular variation of Iranian Cauliflower mosaic virus (CaMV) isolates. *Virus genes* 47:347–356.
- Gamper C, Spelé C, Boscá S, van der Heyden M, Erhardt M, Orend G, Bagnard D, Heinlein M. 2019. Functionalized tobacco mosaic virus coat protein monomers and oligomers as nanocarriers for anti-cancer peptides. *Cancers* 11:1609.
- Haas M, Bureau M, Geldreich A, Yot P, Keller M. 2002. Cauliflower mosaic virus: still in the news. *Molecular Plant Pathology* 3:419–429.
- Habibi N, Hashim SZM, Norouzi A, Samian MR. 2014. A review of machine learning methods to predict the solubility of overexpressed recombinant proteins in Escherichia coli. *BMC bioinformatics* 15:1–16.
- Hamdayanty H, Hidayat SH, Damayanti TA. 2016. Expression of recombinant Sugarcane streak mosaic virus coat protein gene in Escherichia coli. *HAYATI Journal of Biosciences* 23:111–116.
- Harper S, Speicher DW. 2011. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. Pages 259–280. Protein chromatography, Springer.
- Hebditch M, Carballo-Amador MA, Charonis S, Curtis R, Warwicker J. 2017. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics* 33:3098–3100.
- 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. 2013. Plant virology. Academic press.
- Hunter M, Yuan P, Vavilala D, Fox M. 2019. Optimization of protein expression in mammalian cells. *Current protocols in protein science* 95:e77.
- Karbalaei M, Rezaee SA, Farsiani H. 2020. Pichia pastoris: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of cellular physiology* 235:5867–5881.
- Kirchherr D, Wurch T, Mesnard J-M, Lebeurier G. 1991. Expression of cauliflower mosaic virus gene I in Saccharomyces cerevisiae. *Research in virology* 142:297–302.
- Kolivand D, Sokhandan Bashir N, Rostami A, Pirniakan P. 2016. Purification and Analysis of the Antigenic Properties of the Expressed Cucumber mosaic virus Coat Protein in Escherichia coli. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 5:93–102.
- Lebel M-È, Chartrand K, Leclerc D, Lamarre A. 2015. Plant viruses as nanoparticle-based vaccines and adjuvants. *Vaccines* 3:620–637.
- Lee S-C, Chang Y-C. 2006. Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant nad5 mRNA. *Plant Pathology Bulletin* 15:187–196.
- Massumi H, Hassan Chachi P, Heydarnejad J, Hosseini-pour A, Maddahian M. 2020. Expression of the recombinant coat protein of Potato virus X in Escherichia coli. *Agricultural Biotechnology Journal* 11:175–192.
- McKenzie EA, Abbott WM. 2018. Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells. *Methods* 147:40–49.
- Mirzaei D, Hajizadeh M, Azizi A, Koolivand D. 2019. Cloning and expression of Iranian isolate of Apple chlorotic leaf spot virus coat protein gene in Escherichia coli. *Genetic Engineering and Biosafety Journal* 8:51–62.

- Myhre MR, Fenton KA, Eggert J, Nielsen KM, Traavik T. 2006. The 35S CaMV plant virus promoter is active in human enterocyte-like cells. *European Food Research and Technology* 222:185–193.
- Nooh S. 2012. An overview of oilseed rape (canola) virus diseases in Iran. *Int Res J Microbiol* 3:24–28.
- Nuc P, Nuc K. 2006. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Postepy Biochemii* 52:448–456.
- Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, Lechner E, Berry B, Brault V, Hemmer O, Kretsch T, Richards KE, Genschik P. 2006. F-box-like domain in the poliovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 103:1994–1999.
- Rabhi-Essafi I, Sadok A, Khalaf N, Fathallah DM. 2007. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon α as a GST-fusion protein in *E. coli*. *Protein Engineering, Design & Selection* 20:201–209.
- Rioux G, Mathieu C, Russell A, Bolduc M, Laliberté-Gagné M-E, Savard P, Leclerc D. 2014. PapMV nanoparticles improve mucosal immune responses to the trivalent inactivated flu vaccine. *Journal of nanobiotechnology* 12:1–6.
- Rosano GL, Ceccarelli EA. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology* 5:172.
- Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. 2019. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein science* 28:1412–1422.
- Rubio L, Galipienso L, Ferriol I. 2020. Detection of plant viruses and disease management: relevance of genetic diversity and evolution. *Frontiers in plant science*:1092.
- Salem R, Arif IA, Salama M, Osman GE. 2018. Polyclonal antibodies against the recombinantly expressed coat protein of the Citrus psorosis virus. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25:733–738.
- Schumann W. 2007. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Advances in applied microbiology* 62:137–189.
- Shahgolzari M, Pazhouhandeh M, Milani M, Yari Khosroushahi A, Fiering S. 2020. Plant viral nanoparticles for packaging and in vivo delivery of bioactive cargos. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 12:e1629.
- Shams-bakhsh M, Ghasemzadeh A. 2016. Reaction of canola cultivars to Cauliflower mosaic virus and co-infection of Turnip mosaic virus and Cauliflower mosaic virus under greenhouse condition. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)* 39:71–82.
- Sørensen HP, Mortensen KK. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology* 115:113–128.
- Spence N, Phiri N, Hughes S, Mwaniki A, Simons S, Oduor G, Chacha D, Kuria A, Ndirangu S, Kibata G. 2007. Economic impact of Turnip mosaic virus, Cauliflower mosaic virus and Beet mosaic virus in three Kenyan vegetables. *Plant pathology* 56:317–323.
- Sutic DD, Ford RE, Tosic MT. 1999. Handbook of plant virus diseases. CRC Press.
- Takatsuji H, Hirochika H, Fukushi T, Ikeda J-E. 1986. Expression of cauliflower mosaic virus reverse transcriptase in yeast. *Nature* 319:240–243.
- Wada KT, Tëmkin I. 2008. Taxonomy and phylogeny. The pearl oyster:37–75.
- Wi S, Hwang IS, Jo BH. 2020. Engineering a plant viral coat protein for in vitro hybrid self-assembly of CO₂-capturing catalytic nanofilaments. *Biomacromolecules* 21:3847–3856.
- Yasaka R, Nguyen HD, Ho SY, Duchêne S, Korkmaz S, Katis N, Takahashi H, Gibbs AJ, Ohshima K. 2014. The temporal evolution and global spread of Cauliflower mosaic virus, a plant pararetrovirus. *PLoS One* 9:e85641.
- Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Maekawa T, Fujimoto J, Yamamoto T, Ishii S. 1995. Increase of Solubility of Foreign Proteins in *Escherichia coli* by Coproduction of the Bacterial Thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* 270:25328–25331.
- Yuste-Calvo C, González-Gamboa I, Pacios LF, Sánchez F, Ponz F. 2019. Structure-based multifunctionalization of flexuous elongated viral nanoparticles. *ACS Omega* 4:5019–5028.
- Zhang W, Lu J, Zhang S, Liu L, Pang X, Lv J. 2018. Development an effective system to expression recombinant protein in *E. coli* via comparison and optimization of signal peptides: expression of *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 thermostable lipase as case study. *Microbial cell factories* 17:1–12.

