

بیان پروتئین پوششی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند در باکتری

Escherichia coli

آمنه عنابستانی^۱، سید علی اکبر بهجت‌نیا^۲، سعید تابعین^{۳*}، کرامت‌اله ایزدپناه^۴

۱- دانش‌آموخته دوره دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲- استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۳- *نویسنده مسوول: استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران (S.Tabein@scu.ac.ir)

۴- استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۴/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۱۱

چکیده

بیماری پیچیدگی بوته چغندر قند در ایران با دو گونه ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند (*Beet curly top*) و *Iran virus*, BCTIV و ویروس پیچیدگی بوته چغندر قند (*Beet curly top virus*, BCTV) ایجاد می‌شود. به منظور بیان پروتئین پوششی BCTIV، قطعه کامل چارچوب خوانش V1 این ویروس، با تعبیه محل‌های برشی دو آنزیم *Bam* HI و *Hind* III به ترتیب در انتهای 'ه آغازگرهای اختصاصی رو به جلو و معکوس چارچوب خوانش V1، تکثیر شد. قطعه ۷۵۱ جفت بازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، خالص شده و در ناقل همسانه‌سازی pTZ57R/T جای داده شد. توالی چارچوب خوانش V1 با واکنش هضم آنزیمی از ناقل همسانه‌سازی جدا و در ناقل بیان باکتریایی pQE30 همراه با یک دنباله هیستیدینی در انتهای آمینی، جای داده شد. پلاسمیدهای نو ترکیب حاوی توالی 6×His-V1، با استفاده از روش شوک الکتریکی به سلول‌های سویه M15 باکتری *Escherichia coli* انتقال داده شدند. القای بیان توالی چارچوب خوانش V1 با استفاده از افزودن ایزوپروپیلتیو-دی-گالاکتوزید به محیط کشت LB مایع حاوی سلول‌های تراریخت باکتری صورت پذیرفت. الکتروفورز عمودی در ژل پلی‌آکریل آمید حاوی SDS، نشان‌دهنده وجود یک باند پروتئینی قوی به اندازه تقریبی ۳۰ کیلودالتون بود که با وزن مولکولی مورد انتظار برای پروتئین پوششی BCTIV همخوانی داشت. آزمون لکه‌گذاری پروتئین با استفاده از آنتی‌بادی آنتی-هیستدین، صحت پروتئین بیان شده را به اثبات رساند. با توجه به میزان بالای خسارت حاصل از این ویروس‌ها در کشت چغندر قند، استفاده از پروتئین پوششی بیان شده BCTIV در تولید آنتی‌بادی اختصاصی می‌تواند روشی سریع، ارزان و ساده را برای شناسایی ویروس‌های پیچیدگی بوته چغندر قند در آزمون‌های سرولوژیکی از جمله الیزا فراهم آورد.

کلیدواژه‌ها: ویروس پیچیدگی بوته چغندر قند، ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند، پروتئین پوششی، بیان پروتئین

مقدمه

حاضر بزرگ‌ترین تیره ویروس‌های گیاهی است. این ویروس‌ها با داشتن پیکره‌های جورترای دوقلو، همانندسازی ژنوم خود را که از نوع دی‌ان‌ای تک‌لای حلقوی است، به شیوه دایره غلتان^۱ و همانندسازی وابسته

تیره Geminiviridae با نه جنس پذیرفته شده (*Curtovirus*, *Begomovirus*, *Becurtovirus*)، *Mastrevirus*, *Eragrovirus*, *Capulavirus* و *Grabovirus*, *Topocovirus*, *Turncurtovirus* و تعداد زیادی گونه (Zerbini et al., 2017)، در حال

1- Rolling circle replication (RCR)

ترانوشته به همچسبان^۸ از دو ژن C1 و C2 بر روی رشته مکمل بیان می‌شود (Bolok-Yazdi et al., 2008). تمامی این شواهد منجر به پیشنهاد جنس جدید *Becurtovirus* برای گونه BCTIV گردید (Varsani et al., 2014). علی‌رغم وجود تفاوت‌های ژنومی، دو گونه BCTIV و BCTV از نظر ویژگی‌های زیست‌شناختی و علائم ایجاد شده بر روی میزبان‌های مختلف، شبیه به هم هستند (Jahanbin et al., 2016). هر دو ویروس در طبیعت به وسیله زنجریک *Circulifer haematoceps* انتقال می‌یابند (Soleimani et al., 2012). علاوه بر این، قابلیت انتقال هر دو گونه BCTIV و BCTV توسط بذر در یک رقم محلی گیاه اطلسی نیز به اثبات رسیده است که خود می‌تواند یکی از دلایل گسترده‌گی پراکنش این دو ویروس باشد (Anabestani et al., 2017). هر دو ویروس در گیاهان میزبان باعث ایجاد علائمی از قبیل کوتولگی، پیچیدگی برگ، زردی، بافت‌مردگی در آوندها و ایجاد حالت توت‌ای^۹ در سطح پشتی برگ‌ها می‌شوند (Anabestani et al., 2016; Bennett, 1971).

با توجه به گسترش بالای بیماری در استان‌های مختلف کشور و نیاز به تعیین سطح خسارت آلودگی، استفاده از روش‌های مولکولی از جمله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز^{۱۰} جهت شناسایی این ویروس‌ها می‌تواند زمان‌بر و پرهزینه باشد. از سوی دیگر، به واسطه حضور ویروس‌های تیره *Geminiviridae* در بافت آبکشی، فرآیند خالص‌سازی آنها و تهیه آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای از این طریق نیز دشوار خواهد بود. با در نظر گرفتن این نکته که پروتئین پوششی این ویروس‌ها از حفاظت‌شدگی بالایی برخوردار است (Brown et al., 2012)، بیان پروتئین پوششی BCTIV در سیستم باکتریایی، خالص‌سازی و استفاده از آن به منظور تولید آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای و

به نوترکیبی^۱ در هسته سلول‌های آلوده به انجام می‌رسانند (Hanley-Bowdoin et al., 1990). این شیوه همانندسازی، نرخ بالایی از نوترکیبی و بازآرایی ژنوم را برای این گروه از ویروس‌ها به ارمغان آورده است (Lima et al., 2012). علاوه بر این، همانندسازی در هسته، ژنوم جمینی ویروس‌ها را در برابر مسیرهای خاموشی ژن پس از ترانویسی^۲ تا زمان ورود ترانوشته‌های ژنوم آنها به درون سیتوپلاسم محافظت می‌کند. ژنوم جمینی ویروس‌ها با اندازه‌ای در حدود ۲/۸ تا ۳/۷ کیلو باز، تمامی پروتئین‌های مورد نیاز چرخه ویروسی را بر روی رشته‌های ویروسی^۳ و مکمل^۴ خود کدگذاری می‌کند. توالی نونانوکلئوتیدی^۵ محافظت‌شده شروع همانندسازی در تمام اعضای این تیره در ناحیه بین ژنی^۶ و در یک ساختار ساقه-حلقه قرار دارد (Brown et al., 2012).

بیماری پیچیدگی بوته چغندر قند در ایران توسط گونه‌هایی از دو جنس *Becurtovirus* (BCTIV) و *Curtovirus* (BCTV) متعلق به تیره *Geminiviridae* ایجاد می‌شود (Anabestani et al., 2016). مطالعات مولکولی، درصد پایین تشابه توالی ژنوم BCTIV با BCTV را نشان داد و ویژگی‌های مولکولی متفاوت ژنوم BCTIV در مقایسه با سایر گونه‌های جنس *Curtovirus* را نیز به اثبات رساند (Heydarnejad et al., 2007). در ژنوم BCTIV توالی نونانوکلئوتید موجود در ساختار ساقه-حلقه عبارتست از TAAGATT/C، که از توالی‌های موجود در ژنوم اکثر اعضای این تیره متفاوت است. علاوه بر این، برخلاف ژنوم BCTV، در ژنوم این ویروس بیان پروتئین همراه با همانندسازی^۷ مانند ویروس‌های جنس *Mastrevirus*، از طریق ایجاد یک

- 1- Recombination-dependent replication (RDR)
- 2- Post-transcriptional gene silencing (PTGS)
- 3- Virion-sense strand
- 4- Complementary-sense strand
- 5- Nonanucleotide
- 6- Intergenic region (IR)
- 7- Replication-associated protein (Rep)

8- Spliced transcript

9- Enation

10- Polymerase chain reaction (PCR)

بود. سیکل دمایی مورد استفاده عبارت بود از نگهداری مخلوط به دست آمده به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و سپس ۳۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی گراد، ۶۵ درجه سانتی گراد و ۷۲ درجه سانتی گراد هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه و به دنبال آن به منظور تکمیل قطعات در حال تکثیر، ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. محصول واکنش پی سی آر در ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری شده و با رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت.

همسانه سازی ژن پروتئین پوششی BCTIV

محصول پی سی آر با استفاده از کیت خالص سازی پی سی آر (Qiagen, Germany) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده خالص شده و در ناقل همسانه سازی pTZ57R/T (Fermentas, Lithuania) وارد شد. پلاسمیدهای نو ترکیب pTZ57R/T-BCTIV V1 با استفاده از کیت تراریخت سازی (Fermentas, Lithuania) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به سلول های سویه DH5 α باکتری *E. coli* انتقال داده شدند. سلول های تراریخت به مدت یک شب در محیط کشت LB مایع حاوی ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ آنتی بیوتیک آمپی سیلین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت شدند. پلاسمید سلول های رشد یافته با استفاده از کیت خالص سازی پلاسمید (Qiagen, Germany) استخراج و جهت تعیین توالی قطعه همسانه شده به شرکت تک دراگون هنگ کنگ (TechDraon, Hong Kong) ارسال شد. صحت جهت گیری قطعه همسانه شده نیز با استفاده از واکنش هضم آنزیمی توسط *Hind* III / *Bam* HI و سپس الکتروفورز در ژل آگاروز یک درصد مورد تأیید قرار گرفت.

بیان ژن پروتئین پوششی BCTIV

الکتروفورز محصول واکنش هضم آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب pTZ57R/ BCTIV V1 توسط دو آنزیم برشی *Hind* III / *Bam* HI در ژل آگاروز یک درصد انجام شد.

استفاده از آن در آزمون های سرولوژیکی مانند الیزا می تواند جایگزینی مناسب در ردیابی ویروس باشد. در این مطالعه، همسانه سازی و بیان پروتئین پوششی BCTIV در سیستم باکتریایی *E. coli* مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جدایه ویروس

بوته های چغندر قند دارای علائم تیبیک بیماری پیچیدگی بوته از جمله کوتولگی، راست ایستادن برگ ها و لوله ای شدن برگ ها به سمت داخل و حالت توت های در سطح پشت برگ ها از مزارع کشت چغندر قند استان خراسان رضوی در فصل زراعی ۹۲-۱۳۹۱ جمع آوری شد. توالی ویروس به دست آمده از یک بوته آلوده به عنوان جدایه مورد استفاده در تحقیق حاضر مورد ارزیابی قرار گرفت.

استخراج دی ان ا و واکنش زنجیره ای پلی مراز

دی ان ای کل از بافت برگ نمونه های جمع آوری شده با استفاده از نمک CTAB و بر اساس روش توصیف شده توسط بهجت نیا و همکاران (Anabestani et al., 2016) استخراج شد. دی ان ای استخراج شده به عنوان الگو در پی سی آر مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از نرم افزار Primer3 (Untergasser et al., 2012) جفت آغازگرهای اختصاصی BCTIV489^V / BCTIV1238^C (جدول ۱) به منظور تکثیر توالی کامل ژن پروتئین پوششی BCTIV طراحی شدند به نحوی که محل های برشی دو آنزیم *Bam* HI و *Hind* III در انتهای ۵' آنها تعیین گردید.

واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم ۲۵ میکرولیتری انجام شد. هر واکنش پی سی آر حاوی ۱۵-۱۰ نانوگرم دی ان ای استخراج شده از بافت برگ های جمع آوری شده، ۰/۴ میلی مولار از هر کدام از آغازگرها، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۱/۵ میلی مولار MgCl_2 و ۱/۵ واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase Max (Vivantis, Iran)

جدول ۱- مشخصات جفت آغازگرهای طراحی شده در این مطالعه

Table 1. Properties of designed primers in this study

| Primer | Size (nt) | Nucleotide position ^a | Sequence (5' to 3') | Amplified fragment |
|-------------------------|-----------|----------------------------------|--|--------------------|
| BCTIRV489 ^V | 30 | 498-518 | <u>GGATCCGCGGTTCAAAGTCAGAAGAGAA</u> AG | 751 |
| BCTIRV1238 ^C | 33 | 1206-1238 | <u>AAGCTT</u> TCAATAGAAATAAGCCCTACAATTACC | |

^a Nucleotide position of beet curly top Iran virus as in the GenBank database under accession number of JQ707939

^V Virion-sense-strand primer

^C Complementary-sense strand primer

شدند. رسوب سلول‌ها در بافر بارگذاری ژل آکریل آمید (۶۵ میلی‌مولار Tris-HCl، ۲ درصد SDS، ۲/۵ درصد ۲-مرکاپتواتانول با پی‌اچ ۶/۸) حل شده، به مدت ۲ دقیقه در آب جوش قرار گرفت و سپس الکتروفورز نمونه‌ها در ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد حاوی SDS^۲ انجام شد (Behjatnia et al., 1998). رنگ‌آمیزی محصول الکتروفورز با استفاده از کوماسی بلو R-250^۳ صورت گرفت و وزن مولکولی پروتئین‌ها نیز از طریق مقایسه با نشانگرهای مولکولی وزنی (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas, Lithuania) تخمین زده شد.

آزمون لکه‌گذاری پروتئین^۴

باند‌های پروتئین تفکیک شده در الکتروفورز عمودی، در یک سیستم نیمه‌خشک و با استفاده از جریان الکتربیکی (Trans-Blot SD, Bio-Rad) و منطبق با روش هیرانو (Hirano and Watanabe, 1990) به غشای نایلونی (Roche, Germany) انتقال داده شدند. غشا به مدت یک ساعت در دمای اتاق و در بافر حائل^۵ (۰/۰۲ مولار Tris-HCl، ۰/۱۵ مولار NaCl، ۰/۵ میلی‌لیتر/لیتر Tween 20، ۰/۵ درصد آلبومین سرم گاوی^۶ و ۲/۵ درصد شیر چرخ‌شده^۷ در پی‌اچ ۷/۵) قرار گرفت. پس از دو بار شستشو با بافر TBS (۰/۰۲ مولار

خالص‌سازی قطعه برش خورده با استفاده از کیت خالص‌سازی از ژل (Qiagen, Germany) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به انجام رسید. همسانه‌سازی قطعه برش خورده در ناقل بیان pQE30 که با آنزیم‌های مشابه برش داده شده بود، انجام شد و در نهایت انتقال پلاسمید نو ترکیب pQE30-BCTIV V1 به سلول‌های سویه M15 باکتری *E. coli* با استفاده از روش الکتروپوریشن^۱ (Multiporator, Eppendorf) انجام گرفت.

سلول‌های تراریخت به مدت یک شب بر روی محیط کشت جامد LB حاوی ۱۰۰ µg/ml آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و ۲۵ µg/ml آنتی‌بیوتیک کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همسانه‌های باکتریایی رشد کرده بر روی محیط کشت جامد، به محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مشابه انتقال داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شدند. زمانی که چگالی نوری توده سلول‌های باکتریایی رشد کرده در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD₆₀₀) بین ۰/۷-۰/۹ اندازه‌گیری شد، القای بیان ژن همسانه شده با استفاده از افزودن ۱ میلی‌مولار IPTG و نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت انجام پذیرفت. سلول‌ها در محیط کشت القاشده نیز در شرایط مشابهی نگهداری شدند.

سلول‌های رشد کرده با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه رسوب داده

2- SDS PAGE

3-Coomassie brilliant blue

4- Western blot analysis

5- Blocking buffer

6- Bovine serum albumin

7- Skimmed milk

1- Electroporation

آمینواسیدی ترجمه شد. هم‌ردیف‌سازی توالی پروتئینی به دست آمده با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن نشان‌دهنده تشابه صددرصدی با سایر توالی‌های به دست آمده در این تحقیق شامل رس‌شمارهای AJE27190.1 و AJE27188.1 (Anabestani et al., 2016) و نیز تشابه ۹۸ درصدی با جدایه سبزوار (با رس‌شمار JX966233.1) بود. تمامی این نتایج تأییدکننده حفاظت‌شدگی بالای توالی کدکننده پروتئین پوششی در بین جدایه‌های مختلف BCTIV و سایر جمینی‌ویروس‌ها است (Zhang et al., 2018) و این چارچوب خوانش را به‌گونه مناسبی برای تولید آنتی‌بادی جهت شناسایی جدایه‌های مختلف ویروس در آزمون‌های سرولوژیکی از جمله الیزا تبدیل می‌کند.

بیان چارچوب خوانش پروتئین پوششی BCTIV

پس از تعیین توالی و اطمینان از صحت توالی همسانه‌سازی شده در ناقل pTZ57R/T، الکتروفورز محصول به دست آمده از واکنش هضم آنزیمی توسط دو آنزیم Hind III/Bam HI آزاد شدن یک قطعه ۷۵۱ جفت بازی مطابق با اندازه توالی چارچوب خوانش مورد نظر را نشان داد (شکل ۲ الف). قطعه آزاد شده، پس از خالص‌سازی از ژل به ناقل بیان pQE30 که با آنزیم‌های مشابه برش داده شده بود وارد شد. تکرار واکنش هضم آنزیمی، صحت ورود قطعه مورد نظر را در ناقل بیان به اثبات رساند.

در همسانه‌سازی توالی چارچوب خوانش BCTIV در ناقل بیان pQE30، توالی مورد نظر در ادامه یک دنباله متشکل از ۶ آمینواسید هیستدین که توسط خود ناقل بیان می‌شوند، قرار می‌گیرد (شکل ۲ ب). بنابراین انتظار می‌رود پس از بیان قطعه مورد نظر یک دنباله هیستدینی در انتهای آمینی پروتئین بیان شده وجود داشته باشد. وجود این دنباله هیستدینی امکان خالص‌سازی پروتئین بیان شده در سیستم باکتریایی را بر اساس استفاده از رزین‌های دارای بار الکتریکی مثبت فراهم می‌آورد. از طرفی قطعه همسانه‌شده در این ناقل بیان، تحت کنترل

Tris-HCl، ۰/۱۵ مولار NaCl، ۰/۵ میلی‌لیتر/لیتر Tween 20 در پی‌اچ ۷/۵ از آنتی‌بادی آنتی‌هیستدین^۱ (Qiagen, Germany) به منظور شناسایی باند پروتئین بیان‌شده استفاده شد. ردیابی این آنتی‌بادی با استفاده از ایمونوگلوبولین ضد موش^۲ (Sigma-Aldrich) و به دنبال آن رنگ‌آمیزی غشا با رنگ‌های BCIP/NBT^۳ (Roche, Germany) انجام پذیرفت.

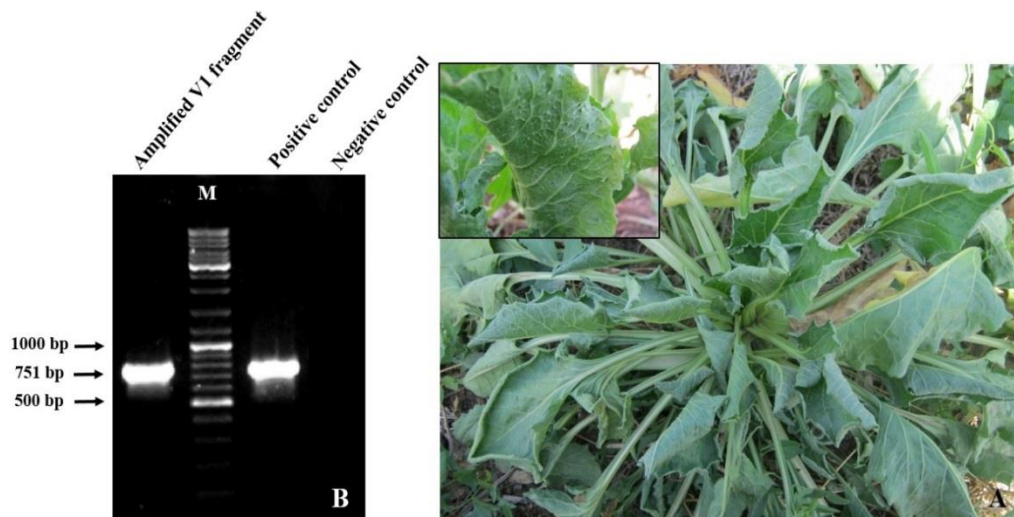
نتایج و بحث

تکثیر و تعیین توالی ژن کامل پروتئین پوششی جدایه خراسان رضوی BCTIV

دی‌ان‌ای استخراج شده از بافت برگ بوته‌های چغندرقد دارای علائم بیماری پیچیدگی بوته (شکل ۱ الف)، به عنوان رشته الگو در پی‌سی‌آر مورد استفاده قرار گرفت. استفاده از جفت آغازگر اختصاصی BCTIV^۴ 489^v/1238^c منجر به تکثیر قطعه ۷۵۱ جفت بازی در برگ‌گیرنده توالی چارچوب خوانش کامل V1 از ژنوم ویروس گردید (شکل ۱ ب). این چارچوب خوانش که از حفاظت‌شدگی بالایی در بین جدایه‌های مختلف ویروس برخوردار است، پروتئین پوششی ویروس را بیان می‌کند (Brown et al., 2012).

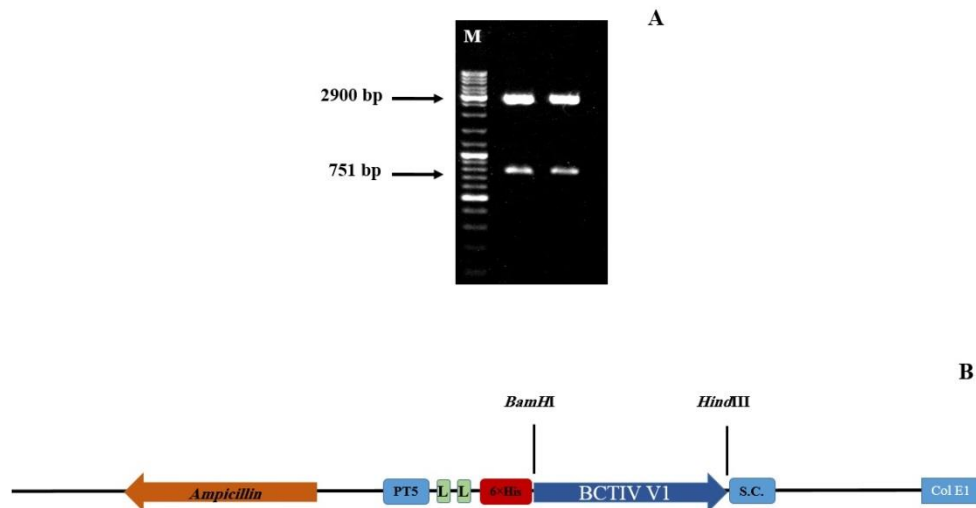
پس از همسانه‌سازی و تعیین توالی قطعه تکثیر یافته در پی‌سی‌آر، مقایسه ترادف به دست آمده با سایر ترادف‌های مشابه موجود در بانک ژن با استفاده از برنامه BLAST، نشان‌دهنده حداکثر تشابه ۹۱ درصدی بین ترادف نوکلئوتیدی به دست آمده و توالی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های کرمان (با رس‌شمار NC_010417) و شیراز (با رس‌شمار JQ707939) BCTIV در بانک ژن بود. توالی نوکلئوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار blastx (blast.ncbi.nlm.nih.gov) به توالی

- 1- Anti-Histidine antibody
- 2- Anti-mouse immunoglobulin
- 3- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium



شکل ۱- الف. علائم تیپیک بیماری پیچیدگی بوته چغندر قند شامل لوله‌ای شدن و راست ایستادن برگ‌ها و ایجاد حالت توت‌های شدید در سطح پشتی برگ‌ها در مزارع کشت این محصول در استان خراسان رضوی. ب. نقوش الکتروفورزی حاصل از تکثیر قطعه ۷۵۱ جفت بازی چارچوب خوانش BCTIV V1 در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز. کنترل مثبت: ناقل همسانه‌سازی حاوی توالی ژنوم کامل BCTIV. کنترل منفی: دی‌ان‌ا استخراج شده از بوته‌های چغندر قند سالم فاقد علائم. M: Gen Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, 10000 bp)

Figure 1. A. Sugarbeet plants showing typical symptoms of beet curly top disease including leaf rolling and severe enation on veins in the fields of Khurasan-Razavi province, North-East Iran. B. Electrophoresis pattern of amplified 751 bp fragment of BCTIV V1 sequence on 1% agarose gel. Extracted cloning vector containing whole genome of BCTIV and extracted DNA of symptomless sugarbeet plant were used as positive and negative control in PCR, respectively. M: Gen Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, 10000 bp).



شکل ۲- الف. الکتروفورز محصول واکنش هضم آنزیمی pTZ57R/T-BCTIV V1 با دو آنزیم *Hind III/Bam HI* در ژل آگارز یک درصد که نشان‌دهنده آزاد شدن قطعه ۷۵۱ جفت بازی توالی چارچوب خوانش V1 از ناقل مورد استفاده است. M: Gen Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, 10000 bp). ب. نمای شماتیک همسانه‌سازی توالی چارچوب خوانش V1 در ناقل بیان pQE30 تحت کنترل پیش‌بر T5 (PT5) و عوامل تنظیم‌کننده بیان *lac* (L). 6xHis: دنباله متشکل از ۶ آمینواسید هیستیدین، S.C.: کدون خاتمه، Ampicillin: توالی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین. Col E1: محل شروع همانندسازی.

Figure 2. A. Analysis of digestion reaction of pTZ57R/T-BCTIV V1 by *Bam HI/Hind III* enzymes on 1% agarose gel revealed release of expected BCTIV V1 751 bp fragments. M: Gen Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, 10000 bp). B. Schematic representation of cloned BCTIV V1 sequence into pQE30 expression vector under control of PT5 promoter. *lac*: lac operator signals, 6xHis: 6 histidin residue, S.C.: termination codon, Ampicillin: sequence of antibiotic resistance gene, Col E1: origin of replication.

به وزن تقریبی ۱ کیلودالتون توسط ناقل بیان باشد. این حالت در مورد بیان پروتئین AC2 ویروس موزاییک طلائی گوجه‌فرنگی (Thommes and Buck, 1994) و پروتئین C1 ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی-استرالیا (Behjatnia et al., 1998) نیز گزارش شده است.

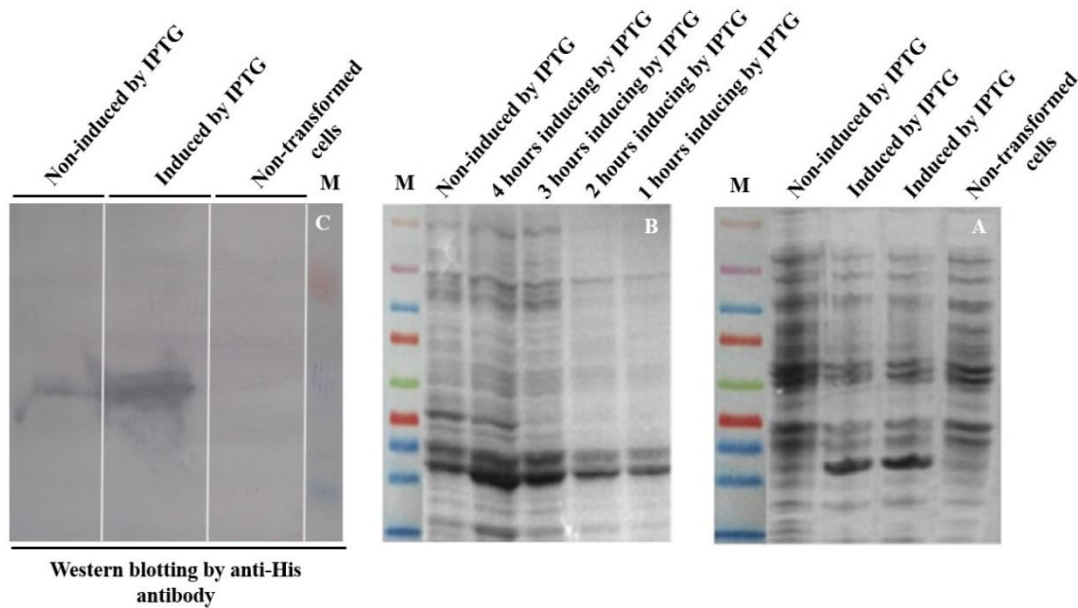
مدت زمان نگهداری کشت باکتریایی و رشد باکتری حاوی سازه پروتئین نو ترکیب بعد از القای بیان، یکی از عوامل اصلی تعیین‌کننده میزان بیان پروتئین مورد نظر است (Behjatnia et al., 1998). بر همین اساس، دوره‌های زمانی مختلفی از ۱ الی ۴ ساعت برای نگهداری کشت‌های باکتریایی و رشد سلول‌های باکتری بعد از القای بیان پروتئین توسط IPTG در نظر گرفته شد. مقایسه سطح بیان در هر کدام از این تیمارها با استفاده از الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل‌آمید حاوی SDS، نشان‌دهنده بیشترین میزان بیان پروتئین نو ترکیب His- BCTIV CP در مدت زمان ۴ ساعت بعد از القا توسط IPTG بود (شکل ۳ ب، چاهک ۴). در تیمارهای ۱ و ۲ ساعت بعد از القای بیان (شکل ۳ ب، چاهک‌های ۱ و ۲)، تفاوت قابل تشخیصی در سطح بیان پروتئین نو ترکیب وجود نداشت. میزان بیان این پروتئین در مدت زمان ۳ ساعت بعد از القای بیان (شکل ۳ ب، چاهک ۳)، از تیمارهای ۱ و ۲ ساعت بیشتر و از مدت زمان ۴ ساعت نگهداری تحت تأثیر القای IPTG کمتر بود.

یکی دیگر از عوامل اثرگذار در تعیین سطح بیان پروتئین‌های نو ترکیب در سیستم باکتریایی، سمیت پروتئین بیان شده برای سلول‌های باکتری است. سمیت برخی از توالی‌های آمینواسیدی برای خود سلول بیان‌کننده می‌تواند عاملی محدودکننده در تولید پروتئین‌های نو ترکیب در این سیستم باشد به نحوی که سطح بیان پروتئین را کاهش داده و یا به طور کلی از بیان پروتئین به واسطه مرگ سلول‌های باکتریایی جلوگیری به عمل می‌آورد (Saida et al., 2006). در مطالعه حاضر، میزان بیان قابل توجه پروتئین مورد نظر، نشان‌دهنده عدم سمیت پروتئین بیان‌شده برای سلول‌های باکتریایی میزبان بود.

پیش‌بر T5 باکتریوفاژ^۱ و عوامل کنترل‌کننده بیان *lac*^۲ قرار دارد. در این حالت عوامل *lac* با استقرار در مسیر ریپوزوم‌ها از ایجاد کارایی بالای بیان توسط پیش‌بر تعبیه شده جلوگیری به عمل می‌آورند. بنابراین، اضافه نمودن یک ترکیب رقابت‌کننده که منجر به جدا شدن عوامل *lac* از محل پیش‌بر و القای بیان ژن مورد نظر شود، لازم و ضروری است. اضافه نمودن IPTG به محیط کشت سلول‌های تراریخت می‌تواند به عنوان یک ترکیب القاکننده بیان، باعث جدا شدن عوامل *lac* شده و موجب شروع بیان شود. این گروه از سیستم‌های بیان باکتریایی، به عنوان سیستم‌های بیان القاشونده توسط IPTG شناخته می‌شوند (Cheong et al., 2013).

پس از تراریخت‌سازی سلول‌های باکتریایی و القای بیان ژن توسط IPTG در سلول‌های سویه M15 باکتری *E. coli*، الکتروفورز نمونه‌های القا شده در ژل پلی‌آکریل‌آمید حاوی SDS منجر به ظهور یک باند پروتئین با شدت بالا در محدوده ۳۰ کیلودالتون شد، که نشان‌دهنده میزان قابل توجهی از بیان پروتئین نو ترکیب His- BCTIV CP بود (شکل ۳ الف، چاهک‌های ۲ و ۳). این در حالی است که در سلول‌های باکتریایی القاشده توسط IPTG (شکل ۳ الف، چاهک ۴) و نیز در سلول‌های غیرتراریخت سویه M15 باکتری *E. coli* (شکل ۳ الف، چاهک ۱)، باند پروتئین مشابه با شدت بسیار کمتر قابل مشاهده بود. بر اساس اطلاعات بانک ژن وزن تقریبی پروتئین پوششی BCTIV، ۲۸۴۸۹ دالتون تخمین زده شد. الکتروفورز محصول بیان ژن در ژل پلی‌آکریل‌آمید حاوی SDS نیز با استفاده از نشانگرهای مولکولی وزنی، وزن تقریبی حدود ۳۰ کیلودالتون را برای باند پروتئین نو ترکیب بیان شده نشان داد که با وزن پیش‌بینی شده برای این پروتئین همخوانی داشت. تفاوت موجود در وزن مولکولی پروتئین‌های بیان شده در این سیستم می‌تواند ناشی از اضافه شدن یک دنباله هیستدینی

1- Bacteriophage T5 promoter
2- *lac* operator



شکل ۳- الف. نقوش الکتروفورز محصول بیان پروتئین BCTIV CP توسط سلول‌های سویه M15 باکتری *E. coli* در ژل پلی‌آکریل‌آمید حاوی SDS. در نمونه‌های القاشده توسط IPTG، باند پروتئین قابل تشخیصی در محدوده ۳۰ کیلودالتون مشاهده شد (چاهک‌های ۲ و ۳). این در حالی است که در نمونه‌های تراریخت شده توسط پلاسمید نو ترکیب pQE30/BCTIV V1 ولی القاشده (چاهک ۴) و نیز در سلول‌های باکتریایی تراریخت نشده (چاهک ۱)، باندی با شدت مشابه رؤیت نشد. ب. نقوش الکتروفورزی بیان پروتئین پوششی نو ترکیب BCTIV در دوره‌های زمانی مختلف القا توسط IPTG. چهار ساعت القا توسط IPTG (چاهک ۴) سبب تشکیل بیشترین میزان پروتئین نو ترکیب در سلول‌های تراریخت باکتری گردید. ج. ردیابی پروتئین نو ترکیب His-BCTIV CP در عصاره حاصل از سلول‌های باکتری تراریخت توسط آنتی‌بادی آنتی‌هیستدین. علاوه بر نمونه القاشده (چاهک ۲)، سطح پایینی از بیان پروتئین نو ترکیب در سلول‌های القاشده نیز مشاهده شد (چاهک ۱) که نشان از اثر گذاری IPTG در افزایش سطح بیان پروتئین در سیستم باکتریایی القاشونده توسط IPTG دارد. M: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas).

Figure 3. A. SDS-polyacrylamide electrophoresis analysis of expressed BCTIV coat protein in M15 strain of *E. coli*. Intensity of expressed protein band in IPTG induced samples (lanes 2 and 3) was obviously higher than non- IPTG induced (lane 4) bacterial cell cultures. B. Time course induction of transformed bacterial cell cultures by IPTG. C. Detection of recombinant His-BCTIV CP in transformed bacterial cell extracts by anti-His antibody. M: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas).

لکه‌گذاری پروتئین

سلول‌های باکتریایی است که آزادسازی پیش‌بر مورد استفاده بسیار کمتر از زمانی است که آزادسازی پیش‌بر توسط یک ترکیب القاکننده نظیر IPTG انجام شود (Behjatnia et al., 1998). در چاهک‌های مربوط به نمونه‌های باکتریایی تراریخت نشده با پلاسمید نو ترکیب، استفاده از آنتی‌بادی آنتی‌هیستدین در آزمون لکه‌گذاری پروتئین منجر به ردیابی باند پروتئینی مشخصی نشد که نشان‌دهنده صحت پروتئین بیان شده در سلول‌های باکتریایی تراریخت بود.

به منظور تأیید ماهیت پروتئین نو ترکیب بیان شده، از آزمون لکه‌گذاری پروتئین با استفاده از آنتی‌بادی آنتی‌هیستدین (شکل ۳ ج) استفاده شد. نتایج به دست آمده شناسایی تک باند پروتئینی مطابق با پروتئین ۳۰ کیلودالتونی را در نمونه‌های القاشده توسط IPTG به نمایش گذاشت (شکل ۳ ج، چاهک ۲). همچنین، در نمونه القاشده نیز شناسایی باند ضعیفی در موقعیت مشابه انجام پذیرفت (شکل ۳ ج، چاهک ۱). این موضوع نشان‌دهنده کارایی پایین بیان پروتئین خارجی در

بیان شده با استفاده از الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید حاوی SDS و آزمون لکه گذاری پروتئین به انجام رسید. در مطالعات بعدی امکان تهیه آنتی بادی اختصاصی توسط این پروتئین وجود خواهد داشت. به واسطه ماهیت چندکاره بودن پروتئین پوششی BCTIV، علاوه بر شیوه های ردیابی می توان از پروتئین بیان شده در سایر آزمون های زیست شناسی مانند انتقال با ناقل حشره ای و در روش های مولکولی مانند محل اتصال این پروتئین با ژنوم ویروس و غیره نیز بهره برد.

سپاس گذاری

نویسندگان، سپاس گذاری خود را از حمایت مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی دانشگاه شیراز در انجام این طرح اعلام می نمایند.

هر دو گونه ویروسی BCTIV و BCTV از پراکنش گسترده ای در مناطق مختلف کشور برخوردار هستند (Anabestani et al., 2016; Gharouni-Kardani et al., 2013). استقرار جبینی ویروس ها در بافت آبکشی و نیز غلظت پایین آنها در بافت گیاهی، باعث دشواری خالص سازی پیکره های این گروه از ویروس ها به منظور تهیه آنتی سرم اختصاصی شده است. بر همین اساس، بیان پروتئین های جبینی ویروس ها در سیستم باکتریایی، خالص سازی و استفاده از آنها به منظور تولید آنتی بادی اختصاصی می تواند روش جایگزین مناسبی برای تسریع روند ردیابی این گروه از ویروس ها در مزارع کشاورزی کشور، تعیین میزان خسارت و گسترش شیوه های مدیریت آنها باشد. در این مطالعه، ژن پروتئین پوششی BCTIV در سیستم باکتریایی *E. coli* بیان شد. تأیید صحت پروتئین

REFERENCES

- Anabestani, A., Izadpanah, K., Tabein, S., Hamzeh-Zarghani, H., and Behjatnia, S. A. A. 2016. Beet curly top viruses in Iran: Diversity and incidence in plants and geographical regions. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 51: 493-504.
- Anabestani, A., Behjatnia, S. A. A., Izadpanah, K., Tabein, S., and Accotto, G. P. 2017. Seed transmission of beet curly top virus and beet curly top Iran virus in a local cultivar of petunia in Iran. *Viruses*, 9: 299.
- Behjatnia, S. A. A., Dry, I. B., Rezaian, M. A. 1998. Identification of the replication-associated protein binding domain within the intergenic region of tomato leaf curl geminivirus. *Nucleic Acids Research*, 26: 925-931.
- Bennett, C. W. 1971. The curly top disease of sugarbeet and other plants. *American Phytopathological Society*, 7: 26-28.
- Bolok Yazdi, H. R., Heydarnejad, J., and Massumi, H. 2008. Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes*, 36: 539-545.
- Brown, J. K., Fauquet, C. M., Briddon, R. W., Zerbini, M., Moriones, E., and Navas-Castillo, J. 2012. *Geminiviridae*. In: *Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press. pp. 351-373.

Cheong, D. E., Choi, J. H., Song, J. J., Kim, G. J. 2013. Construction of non-invasively constitutive expression vectors using a metagenome-derived promoter for soluble expression of proteins. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36: 667-676.

Gharouni-Kardani, S., Heydarnejad, J., and Zakiaghl, M. 2013. Diversity of Beet curly top Iran virus isolated from different hosts in Iran. *Virus Genes*, 46: 571-575.

Hanley-Bowdoin, L., Elmer, J. S., and Rogers, S. G. 1990. Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 1446-1450.

Heydarnejad, J., Hosseini Abhari, E., Bolok Yazdi, H. R., and Massumi, H. 2007. Curly top of cultivated plants and weeds and report of a unique curtovirus from Iran. *Journal of Phytopathology*, 155: 321-325.

Hirano, H., and Watanabe, T. 1990. Microsequencing of proteins electrotransferred onto immobilizing matrices from polyacrylamide gel electrophoresis: application to an insoluble protein. *Electrophoresis*, 11: 573-580.

Lima, A. T., Sorbinho, R. R., Gonzales-Aguilera, J., Roch, C. S., Silva, S. J., Xavier, C. A., Silva, F. N., Duffy, S., and Zerbini, F. M. 2012. Synonymous site variation due to recombination explains higher variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. *Journal of General Virology* 94: 418-431.

Jahanbin, D., Izadpanah, K., and Behjatnia, S. A. A. 2016. Comparison of natural and experimental host range of Beet severe curly top, Beet curly top Iran and tomato yellow leaf curl viruses. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 51: 505-521.

Saida, F., Uzan, M., Odaert, B., and Bontems, F. 2006. Expression of Highly Toxic Genes in *E. coli*: Special Strategies and Genetic Tools. *Current Protein & Peptide Science*, 7: 47-56.

Soleimani, R., Matic, S., Taheri, H., Behjatnia, S. A. A., Vechiatti, M., Izadpanah, K., and Accotto, G. P. 2012. The unconventional geminivirus Beet curly top Iran virus: Satisfying Koch's postulates and determining vector and host range. *Annals of Applied Biology*, 162: 174-181.

Thommes, P.A., and Buck, K. W. 1994. Synthesis of the tomato golden mosaic virus AL1, AL2, AL3 and AL4 proteins *in vitro*. *Journal of General Virology*, 75: 1827-1834.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., and Rozen, S. G. 2012. Primer3: new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40: e115.

Varsani, A., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Hernandez-Zepeda, C., Idris, A., Brown, J. K., Murilo Zerbini, F., and Martin, D. P. 2014. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. *Archives of Virology*, 159: 2193-2203.

Zerbini, F.M., Briddon, R. W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Rivera-Bustamante, R., Roumagnac, P., Varsani, A., and ICTV Report Consortium. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae*, *Journal of General Virology*, 98: 131-133.

Zhang, M., Chen, R., Zhou, X., and Wu, J. 2018. Monoclonal antibody-based serological detection methods for wheat dwarf virus. *Virologica Sinica*, 33: 173-180.



© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Bacterial expression of *Beet curly top Iran virus* coat protein in *Escherichia coli*

A. Anabestani¹ and S. A. A. Bhejatnia² and S. Tabein^{3*} and K. Izadpanah⁴

1. Ph.D. of Plant Pathology, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Professor, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
3. *Corresponding author: Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (S.Tabein@scu.ac.ir)
4. Professor, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

DOI: 10.22055/ppr.2019.14753

Received: 1 January 2019

Accepted: 6 July 2019

Abstract

Background and Objectives

Beet curly top Iran virus (BCTIV) and *Beet curly top virus* (BCTV) are the causal agents of beet curly top disease in Iran. It has been reported that both viruses are distributed in different geographical regions and host plants in Iran. Development of a simple, fast and low cost serological method such as ELISA for detection of these viruses, is a necessary demand. To do serological tests such as ELISA, an antibody is needed. Production of polyclonal antibodies against geminiviruses is a hard candidate because of low concentration and localization of their particles in the phloem tissue of their hosts. Therefore, expression and production of geminiviral recombinant proteins in bacterial system is an alternative method to obtain polyclonal antibodies.

Material and Methods

Specific forward and reverse primers containing *Bam* HI/*Hind* III digestion sites at the 5' end of each primer, respectively, were designed to amplify the full-length fragment of BCTIV V1 open reading frame encoding the viral coat protein (CP). The amplified 751 bp fragment was cloned into the pTZ57R/T cloning vector. V1 gene was released from pTZ57R/T by enzymatic digestion and cloned into the expression vector pQE30. The recombinant pQE30-BCTIV V1 was transformed into *Escherichia coli* strain M15. The expression of protein was induced by adding 1 mM of isopropylthio-d-galactoside (IPTG) to the transformed bacterial cells and grown at 37 °C in liquid LB medium. Expression of recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis and Western blot hybridization.

Results

Analysis of the expressed proteins by SDS-PAGE electrophoresis, revealed a protein band with a position corresponding to molecular weight of approximately 30 kDa that was consistent with the predicted molecular weight of BCTIV CP. Time course of induction by IPTG influenced on level of the new recombinant protein expression, thus four hours induction had the highest level of expression. Western blot analysis confirmed the identity of expressed protein via using anti-His antibody to detect expressed recombinant His-BCTIV CP.

Discussion

One of the most popular bacterial protein expression system is IPTG inducible system wherein IPTG regulate level of new recombinant protein expression. Our results by SDS-PAGE electrophoresis and Western blot analysis revealed a high level of expression of the fusion protein in IPTG-induced bacterial cells. However, a negligible rate of expression of recombinant protein was also observed in non-induced bacterial cells. This suggests low appearance and activity of responsible promotor even without inducing protein expression with IPTG. Expression of conserved plant viral proteins in bacterial systems following purification of the resulted recombinant proteins would facilitate production of specific polyclonal antibodies.

Keywords: Beet curly top virus, Beet curly top Iran virus, Coat protein, Protein expression