

همسانه‌سازی و بیان ژن پروتئین پوششی جدایه ایرانی ویروس لکه-
برگی کلروتیک سیب (ACLSV) در باکتری *E. coli*

Cloning and expression of Iranian isolate of Apple
chlorotic leaf spot virus coat protein gene in *E. coli*

دانیال میرزایی^۱، محمد حاجی‌زاده^{۱*}، عبدالباسط عزیزی^۱ و داود کولیوند^۲

Danyal Mirzaei¹, Mohammad Hajizadeh², Abdolbaset Azizi² and Davoud
Koolivand³

۱- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران

¹ Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan,
Sanandaj, Iran

² Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan,
Zanjan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.hajizadeh@uok.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۲۱)

چکیده

ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب (*Apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV*) یکی از ویروس‌های مهم درختان میوه دانه‌دار و هسته‌دار می‌باشد که گسترش جهانی دارد. هدف از این مطالعه، ساخت سازه بیانی و سپس بیان ژن پروتئین پوششی (Coat Protein (CP)) ویروس لکه-برگی کلروتیک سیب در باکتری *Escherichia coli* می‌باشد. بیان پروتئین پوششی در سیستم پروکاریوتی، نیاز به خالص‌سازی ویروس از گیاه میزبان را که مستلزم وجود اولتراسانتریفوژ است، مرتفع می‌سازد. به منظور تولید پروتئین پوششی نوترکیب، جدایه SSa از میزبان سیب جداسازی و با آغازگرهای اختصاصی ACLSV-MF و ACLSV-MR ژن کامل پروتئین پوششی به طول ۵۸۲ جفت باز تکثیر شد. ژن کامل CP به حامل همسانه‌سازی pTG19 متصل و به باکتری *E. coli* سویه DH5 α منتقل شد. باکتری‌های تراریخت شده با پلاسمید نوترکیب روی محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین، X-Gal و IPTG غربال و به روش تجزیه قلیایی استخراج گردیدند. این ژن در پلاسمید استخراج شده با آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I که محل اثر آنها در آغازگرها قرار داده شده بودند، برش و به حامل بیان pET28a(+) که با همین دو آنزیم برش داده شده بودند، اتصال داده شد. pET28a(+) حاوی ژن CP ویروس در باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) ترانسفورم و سپس القاء بیان CP با اضافه نمودن IPTG در غلظت نهایی 1mM پس از چهار ساعت در الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) بررسی شد. نتایج حاصل از SDS-PAGE حاکی از بیان پروتئین حدود ۲۶ کیلودالتونی مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس مذکور بود. بیان این پروتئین می‌تواند برای تولید آنتی‌بادی بر علیه ACLSV مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

آنتی‌بادی،

الکتروفورز،

بیان،

پروتئین نوترکیب،

همسانه‌سازی

مقدمه

تشخیص صحیح و به موقع بیماری های گیاهی به ویژه بیماری های ویروسی، شرط اساسی در سیستم مدیریت خسارت بیمارگرها به محصولات کشاورزی محسوب می شود (Martinelli et al. 2015). در بیماری های ویروسی، تیمار گیاهان بعد از آلودگی به بیمارگرهای ویروسی منجر به کنترل موثر بیماری نمی شود بنابراین، اقدامات کنترلی باید قبل از وقوع آلودگی به کار برده شوند. کاشت مواد تکثیری گیاهی عاری از ویروس از موثرترین روش هایی است که توسط کشاورزان اتخاذ می شود (Stevens 1983). یکی از عوامل مهم برای صدور گواهی سلامت مواد تکثیری گیاهی دسترسی به روش های تشخیصی حساس و دقیق است (Makkouk and Kumari 2006). با توجه به شیوع و گسترش بیماری های ویروسی در جهان، مدیریت کنترل این عامل بیمارگر اهمیت به سزایی یافته است از این رو، تشخیص به موقع، دقیق و ارزان عامل بیماری نیازمند به کارگیری روشی مناسب دارد.

ویروس لکه برگی کلروتیک سیب (*Apple chlorotic leafspot virus*, ACLSV) در جنس *Trichovirus* زیر خانواده *Trivirinae*، خانواده *Betaflexiviridae* و راسته *Tymovirales* قرار دارد (Adams et al. 2016). ژنوم ACLSV از یک مولکول RNA تک رشته ای مثبت با حدود ۷/۵ کیلوباز تشکیل شده است که شامل سه چارچوب ژنی (ORF) است که ORF1 برای پروتئین ۲۱۶ کیلودالتونی در ارتباط با تکثیر ویروس، ORF2 برای پروتئین حرکتی ۵۰ کیلودالتونی و ORF3 برای پروتئین پوششی ۲۲ کیلودالتونی کد می کند (Yoshikawa and Takahashi 1988; Sato et al. 1993). این ویروس در پایه های تجاری سیب بدون علائم بوده و فقط شامل کم رشدی و ضعف عمومی می باشد و بعد از چند سال ممکن است باعث خشکیدگی درخت شود (Park et al. 2006). ACLSV روی میزبان های گلابی و به بدون علائم می باشد (Wu et al. 2010). روی هلو این ویروس بیماری ساقه آبله دروغین با علائم شکاف روی پوست درخت، لکه های جوش مانند و نقوش کلروتیک روی برگ و میوه و جارویی شدن

سرشاخه ها را ایجاد می کند و علاوه بر آن، باعث ناسازگاری بین پایه و پیوندک نیز می شود. در زردآلو این ویروس لکه های جوش مانند روی برگ و میوه (Polak et al. 2008) و در سایر هسته داران علائمی شبیه ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته دارها ایجاد می کند (Rana et al. 2007). ویروس ACLSV در ژاپن به عنوان عامل بیماری سرشاخه کاری سیب شناخته شده است که ویروس ساقه آبله ای سیب نیز در ایجاد آن نقش دارد (Kinard et al. 1996). علائم ناشی از ACLSV ممکن است به واسطه آلودگی مخلوط با سایر ویروس های آلوده کننده درختان دانه دار یا هسته دار تشدید شود (Lister 1970; German-Retana et al. 1997). برای این ویروس ناقل بیولوژیکی شناخته نشده است (Lister et al. 1970) بنابراین، کاربرد مواد تکثیری سالم برای پیشگیری از این بیماری بسیار مهم است.

روش های مختلفی مانند گیاهان محک چوبی (EPPO 1999)، روش های سورلوژیکی (Paduch-Cichal and Tomala 2007) و مولکولی (Menzel et al. 2002) برای ردیابی ویروس های درختان میوه از جمله ACLSV استفاده شده است اما، جهت غربالگری در سطح وسیع روش سورلوژیک الیزا روشی معمول، معتبر و ارزان به حساب می آید (Spiegel et al. 1993). این روش مانند سایر روش های سورلوژیکی نیازمند تامین منبع آنتی ژن ویروسی برای استفاده در فرآیند تولید آنتی بادی است. در بسیاری از ویروس های گیاهی از ذرات ویروسی خالص شده از بافت های گیاه آلوده به عنوان آنتی ژن استفاده شده است اما، در برخی از ویروس های گیاهی تولید آنتی ژن فراوان و با کیفیت به علت غلظت پایین ویروس در بافت های گیاهی، مشکلات خالص سازی ذرات ویروسی با کیفیت بالا به دلیل حضور ترکیبات بازدارنده مانند پلی فنل ها، تانن ها و آلودگی با آنتی ژن های میزبان (Ling et al. 2000) به سهولت امکان پذیر نیست. بنابراین، به دست آوردن مقادیر کافی آنتی ژن خالص نیازمند روش های جایگزین می باشد که می توان از پروتئین های نو ترکیب بیان شده در سیستم باکتریایی به عنوان آنتی ژن در فرآیند تولید آنتی بادی استفاده نمود. برای مثال، بیان ژن پروتئین پوششی ویروس کوتولگی آلو (Abou-Jawdah et al. 2004)، ویروس وای سیب زمینی (Folwarczna et al. 2008)، ویروس ناهنجاری کوتولگی زرد

مواد و روش‌ها

منبع ویروسی: از نمونه سیب جمع‌آوری شده از اطراف سنندج و آلوده به ACLSV که بافت برگ‌های آن در فریزر -40°C برای مدت حدود یک سال نگهداری می‌شد، برای بیان ژن پروتئین پوششی نوترکیب آن در *E. coli* استفاده شد. این نمونه از میزبان سیب اطراف سنندج در سال ۱۳۹۶ نمونه‌برداری و علائم کلروپیک و بدشکلی در برگ را نشان می‌داد.

استخراج RNA و ساخت DNA مکمل: استخراج اسید نوکلئیک کل (TNA) با استفاده از روش سلیکا (Foissac et al. 2000) انجام شد. DNA مکمل با استفاده از کیت شرکت (GeneAll, South Korea) در حجم نهایی ده میکرولیتر با استفاده از آغازگرهای شش‌تایی تصادفی ساخته شد.

طراحی آغازگرها و تکثیر ژن کامل پروتئین پوششی: آغازگرها برای تکثیر ژن کامل پروتئین پوششی ACLSV براساس توالی های در دسترس در بانک ژن از جمله توالی مرجع این ویروس (NC_001409)، طراحی گردیدند. در قسمت 5' آغازگر مستقیم (ACLSV-MF:5'-AGGATCCATGGCGGCAGTTCT-3') محل اثر آنزیم *Bam*HI و در آغازگر معکوس (ACLSV-MR:5'-ACTCGAGGTAATGCAAAGATCAGTT-3') محل اثر آنزیم *Xho*I که این اثر روی پلاسمید بیان pET28a(+) هم قرار داشتند و از این طریق امکان اتصال ژن CP در پلاسمید بیان فراهم می‌شد، قرار داده شد. واکنش PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر با استفاده از آغازگرهای ذکر شده و سیکل‌های حرارتی، 94°C به مدت ۲ دقیقه (یک سیکل)، 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، 54°C به مدت ۴۵ ثانیه و 72°C به مدت ۱ دقیقه (۳۵ سیکل) و 72°C به مدت ۱۰ دقیقه (یک سیکل) انجام شد. سپس، برای مشاهده قطعه کامل ژن پروتئین پوششی که طی واکنش PCR تکثیر شد از ژل آگارز ۱/۲ درصد استفاده شد.

خالص‌سازی قطعه DNA از ژل و اتصال به ناقل کلون pTG19: خالص‌سازی DNA ژن پروتئین پوششی ACLSV با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA از ژل (پیشگامان انتقال ژن، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای کلون

کدوئیان (Livieratos et al. 1999) ویروس موزایک خفیف گل مریم (Chen et al., 2002) ویروس خراشک توتون (Voloudakis et al. 2004) ویروس موزایک مخطط نیشکر (Hamadayanty et al. 2016) ویروس پسروروز مرکبات (Salem et al., 2018)، ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (Honnesht et al. 2018) و ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (Salimi et al. 2010) در سیستم پروکاریوتی انجام شده است. در مطالعاتی که در ایران انجام گرفته است می‌توان به بیان ژن پروتئین پوششی ویروس موزایک زرد کدو (Gharibi et al. 2012) ویروس سیب‌زمینی (Sokhandan-Bashir et al. 2015b) ویروس موزایک خیار (Koolivand et al. 2016) اشاره کرد. با این وجود، در مورد بیان پروتئین پوششی جدایه ایرانی ویروس لکه‌برگی کلروپیک سیب در *E. coli* علی‌رغم گسترش وسیع این ویروس در ایران (Keshavarz and Shams-Bakhsh, 2015; Alemzadeh et al., 2016; Abtahi et al., 2019) مطالعه‌ای انجام نشده است. هر چند، بیان ژن پروتئین پوششی جدایه هندی ویروس لکه‌برگی کلروپیک سیب انجام و با استفاده از آن آنتی‌بادی چند همسانه‌ای تهیه و با آزمون‌های DAS-ELISA و DTBIA کارایی اختصاصی آنتی‌بادی تهیه شده در ردیابی این ویروس در سیب و درختان هسته‌دار به اثبات رسید (Rana et al. 2011).

با بهینه‌سازی تولید پروتئین پوششی این ویروس در باکتری، تخلیص آن، تزریق به حیوان مناسب و تهیه آنتی‌بادی، می‌توان کیت تشخیص این ویروس را تهیه نمود تا امکان غربالگری ارزان و وسیع برای موسسات مختلف تهیه نهال و پیوندک در داخل کشور فراهم شود. بنابراین هدف از این پژوهش، بیان ژن پروتئین پوششی به عنوان قدم اول و اساسی در نیل به اهداف ذکر شده، ژن کامل پروتئین پوششی ACLSV تکثیر و به حامل همسانه‌سازی pTG19 متصل و در سویه DH5 α باکتری *E. coli* به وکتور بیان pET28a(+) سویه Bl21(DE3) از همان باکتری انتقال، تا با بکارگیری فناوری دی‌ان‌ای نوترکیب برای تولید آنتی‌ژن در راستای تولید آنتی‌بادی استفاده کرد.

آنگاه از هر نمونه شامل نمونه‌ی زمان صفر پروتئین استخراج و در ۲۰°C- برای بررسی‌های بعدی با الکتروفورز و لکه گذاری و سترن ذخیره گردید.

استخراج پروتئین از باکتری: به منظور رسوب باکتری‌ها، نمونه‌های باکتریایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۴ درجه سلیوس در ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند و فاز رویی دور ریخته شد. پلت باکتریایی ایجاد شده با آب دیونیزه شستشو داده شد و سپس مقدار ۸۰ میکرولیتر از بافر TE و هم حجم آن بافر استخراج پروتئین (Tris-CL 50mM, glycerol 10%, SDS2%, Bromophenol blue 0.1%, Mercaptoethanol 100mM) به هر نمونه اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلیوس در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ و به روی یخ منتقل شدند. سپس، با روش SDS-PAGE، بیان ژن مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت.

الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید حاوی سدیم دو دسیل سولفات: برای بررسی وزن مولکولی پروتئین‌های استخراج شده و بررسی وجود و یا عدم وجود پروتئین نو ترکیب، پروتئین‌های استخراج شده با روش SDS-PAGE (Green and Sambrook 2012) الکتروفورز شدند. غلظت پنج درصد برای Stacking Gel (ژل متراکم کننده) و غلظت ۱۳/۵ درصد برای Running Gel (ژل جداکننده) استفاده گردید و رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی آبی استفاده شد. وزن مولکولی پروتئین بیان شده با استفاده از نشانگر پروتئین ExcelBand™ All Blue Regular Range Protein Marker 9-180 kDa (تهیه شده از شرکت SMOBIO تابوان) تعیین شد.

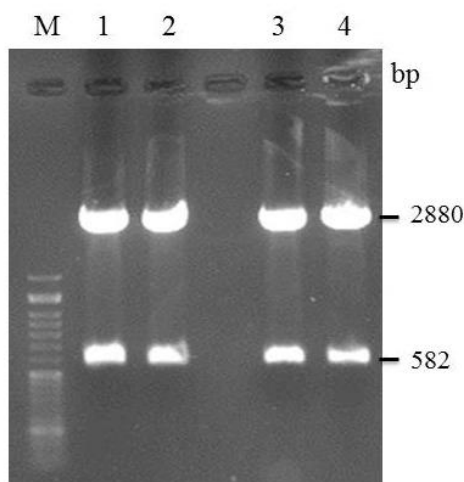
نتایج و بحث

نتایج حاصل از تکثیر ژن پروتئین پوششی ACLSV تکثیر شده در PCR: بعد از استخراج TNA از میزبان سبب جمع آوری شده و تبدیل آن به cDNA، از یک جفت آغازگر اختصاصی (ACLSV-MF, ACLSV-MR) برای تکثیر قطعه‌ی مربوط به ژن کامل پروتئین پوششی (۵۸۲bp) استفاده شد که طی

کردن قطعات DNA تکثیر شده در PCR، از حامل pTG19-T (شرکت ویوانتیس، مالزی) استفاده شد. جهت اتصال قطعه مورد نیاز از آنزیم T4 DNA Ligase استفاده شد. پلاسمید نو ترکیب در سلول‌های مستعد ساخته شده با روش کلرید کلسیم (Panja et al. 2007; Shali et al. 2006) ترانسفورم و سوسپانسیون باکتری روی محیط کشت جامد LB حاوی (۵۰ mg/ml) X-Gal، (۰/۱ M) IPTG و آنتی‌بیوتیک (۱۰۰ mg/ml) به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷°C انکوبه شد. سپس، استخراج پلاسمید pTG-ACLSV-CP با روش لیز قلیایی (Green and Sambrook 2012) انجام شد.

تهیه سازه برای بیان ژن پروتئین پوششی ACLSV: با استخراج پلاسمید نو ترکیب pTG-ACLSV-CP و همچنین وجود محل اثر آنزیم‌های BamHI و XhoI به ترتیب در آغازگرهای رو به جلو و معکوس، پلاسمید نو ترکیب pTG-ACLSV-CP و پلاسمید pET28a(+) با دو آنزیم مذکور برش و خالص سازی قطعات مورد نظر با استفاده از کیت خالص سازی DNA خالص شدند. در نهایت، دو قطعه خالص شده شامل ژن CP و پلاسمید pET28a(+) به هم متصل و سازه بیان pET 28a-ACLSV-CP به دست آمد. سازه بیان به دست آمده با استفاده از مراحل توضیح داده در میزبان باکتریایی *E. coli* سویه BL21(DE3) ترانسفورم شد.

القا کلون‌های نو ترکیب برای تولید پروتئین پوششی ACLSV: کلون‌های باکتریایی حاوی پلاسمید نو ترکیب بیان ژن pET28a-ACLSV-CP، به طور جداگانه در پنج میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی کانامایسین (با غلظت نهایی ۱۰۰ mg/ml) به مدت شبانه کشت داده شدند. روز بعد، ۵۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی در شرایط استریل در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه مشابه حاوی آنتی‌بیوتیک درون ارلن تجدید کشت شد. زمانی که جذب نوری OD600 این محیط به ۰/۶ رسید ۱/۵ میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی به عنوان نمونه زمان صفر (درست قبل از القاء) برداشته و در یخچال نگهداری شد. سپس عمل القاء، با افزودن IPTG در غلظت یک میلی‌مولار صورت گرفت و رشد باکتری‌ها برای ۴ ساعت دیگر ادامه یافت.



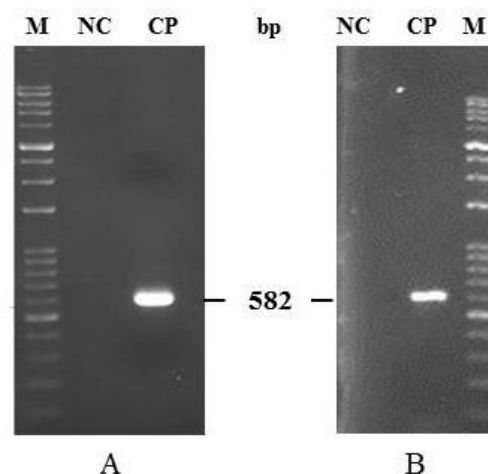
شکل ۲- الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد مربوط به برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pTG-ACLSV-CP استخراج شده از کلنی های مختلف باکتری با دو آنزیم *Bam*HI و *Xho*I؛ چاهک M: نشانگر 50 bp DNA ExcelBand™. Ladder: چاهک های ۱ تا ۴: پلاسمیدهای نو ترکیب همسانه سازی pTG-ACLSV-CP استخراج شده از کلنی های مختلف باکتری برش یافته با دو آنزیم *Bam*HI و *Xho*I.

Figure 2- Agarose gel electrophoresis of pTG-ACLSV-CP double digested by *Bam*HI and *Xho*I. M: DNA ExcelBand™ 50 bp Ladder, 1-4: Recombinant plasmids extracted from different clones and double digested by *Bam*HI and *Xho*I.

نتایج حاصل از ساخت سازه pET28a-ACLSV-CP: پس از اطمینان از وجود ژن پروتئین پوششی در پلاسمید نو ترکیب pTG-ACLSV-CP، این پلاسمید و پلاسمید بیان pET28a(+) با دو آنزیم مشابه *Bam*HI و *Xho*I مورد برش آنزیمی قرار گرفتند و پس از الکتروفورز در ژل آگارز، قطعات دیانای مدنظر شامل ژن پروتئین پوششی ACLSV به اندازه ۵۸۲ جفت باز (شکل ۳- A) و پلاسمید بیان pET28a(+) به اندازه ۵۶۳۹ جفت باز (شکل ۳- B) با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل خالص سازی شدند و اتصال این قطعات منجر به ساخت سازه pET28a-ACLSV-CP شد که با برش آنزیم های *Bam*HI و *Xho*I مورد تایید قرار گرفت (شکل ۳- C).

تعیین توالی سازه بیان ساخته شده: تعیین توالی قطعات قرار داده شده در پلاسمید بیان، برای بررسی صحت قرار گرفتن ژن مورد نظر در قاب مناسب، عدم جهش اساسی مانند حذف یا اضافه شدن نوکلئوتید که قاب و در نتیجه محصول پروتئینی را به طور کامل تغییر می دهد انجام گرفت.

واکنش زنجیره ای پلیمر از قطعه مورد نظر با اندازه ذکر شده پس از الکتروفورز در ژل آگارز قابل مشاهده بود ولی از نمونه ی منفی قطعه ای تکثیر نشد (شکل ۱- A). به دلیل اطمینان از عدم وجود قطعات غیر اختصاصی همراه با قطعه هدف، ژن CP از ژل خالص شد (شکل ۱- B).

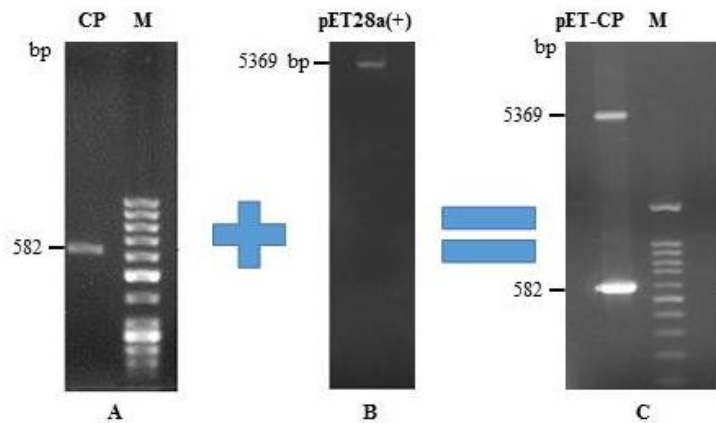


شکل ۱- الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد تکثیر ژن پروتئین پوششی ACLSV با آغازگرهای اختصاصی ACLSV-MF و ACLSV-MR (شکل A) و تصویر آن پس از خالص سازی با کیت خالص سازی DNA (شکل B). چاهک M: نشانگر DNA Ladder Mix 1Kb Gene Ruler™، تهیه شده از شرکت فرمتاس). چاهک NC: کنترل منفی و چاهک CP.

Figure 1- Electrophoresis of PCR product amplified by ACLSV-MF and ACLSV-MR primers. M: Marker (Gene Ruler™ DNA Ladder Mix 1Kb), NC: Negative control, CP: Coat protein gene of ACLSV. A: PCR product amplified by ACLSV-MF and ACLSV-MR primers. B: PCR product purified by DNA gel Recovery Kit.

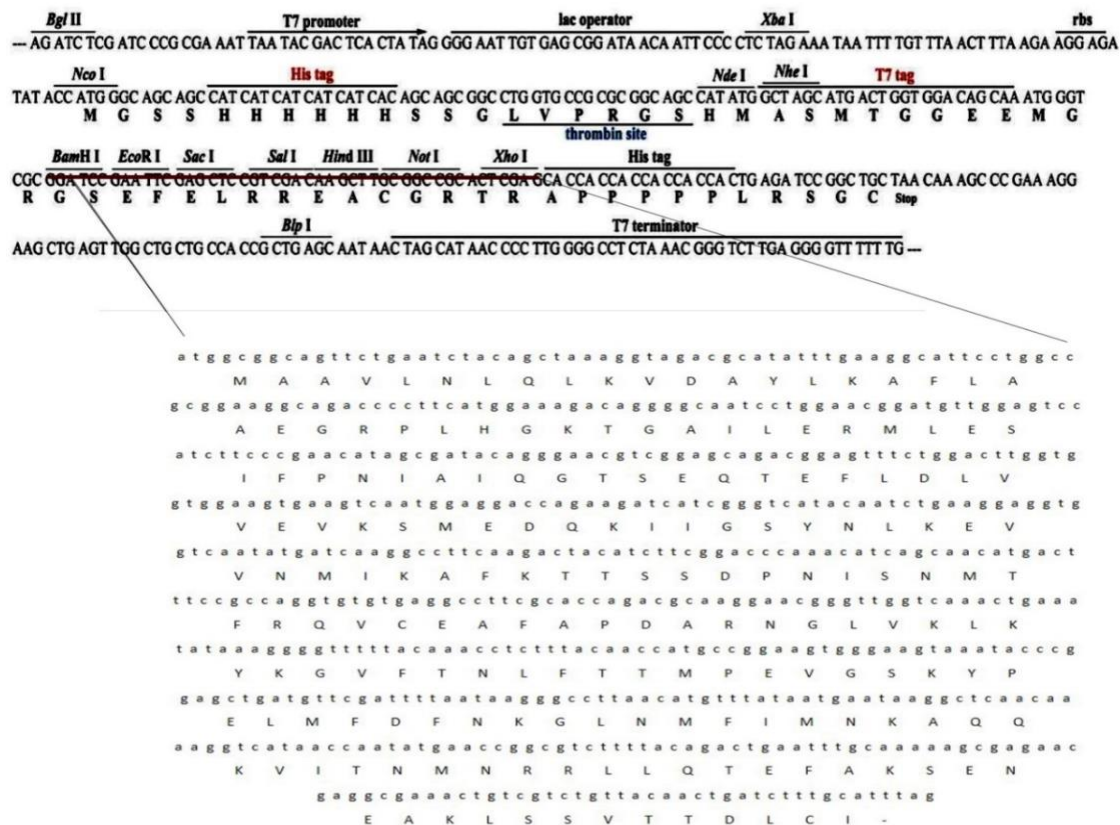
همسانه سازی ژن پروتئین پوششی ACLSV در ناقل pTG-19

پس از همسانه سازی قطعه ژن پروتئین پوششی ACLSV و با توجه به اندازه ی حامل pTG19-T (۲۸۸۰bp) و قطعه دیانای (۵۸۲bp) در سازه pTG-ACLSV-CP و همچنین محل اثر دو آنزیم *Bam*HI و *Xho*I که در دو انتهای دیانای خارجی قرار گرفته است، انتظار می رفت که پس از برش سازه pTG-ACLSV-CP با دو آنزیم مذکور، دو قطعه به اندازه های ۲۸۸۰bp (ناقل) و ۵۸۲bp (پروتئین پوششی ACLSV) مشاهده شود. بنابراین، از پلاسمیدهای نو ترکیب مطلوب، مطابق انتظار دو قطعه به اندازه های تقریبی ۲۸۸۰bp و ۵۸۲bp مشاهده شدند (شکل ۲).



شکل ۳- الکتروفورز دی‌ان‌ای‌های خالص‌سازی شده از ژل آگارز ۱/۲ درصد؛ چاهک‌های M: نشانگر ExcelBand™ 50 bp DNA Ladder. A: ژن پروتئین پوششی ACLSV خالص شده از ژل بعد از برش با دو آنزیم *Bam*HI و *Xho*I. B: پلاسمید pET28a (+) خالص شده از ژل پس از برش با دو آنزیم *Bam*HI و *Xho*I. C: پلاسمید pET28a(+) حاوی pET-CP.

Figure 3- Electrophoresis of purified DNA in 1.2% agarose gel. M: ExcelBand™ 50 bp DNA Ladder, pET: pET28a(+). A: Purified coat protein gene after digesting with *Bam*HI and *Xho*I, B: Purified pET28a(+) after digesting with *Bam*HI and *Xho*I, C: pET28a(+) with coat protein gene of ACLSV.

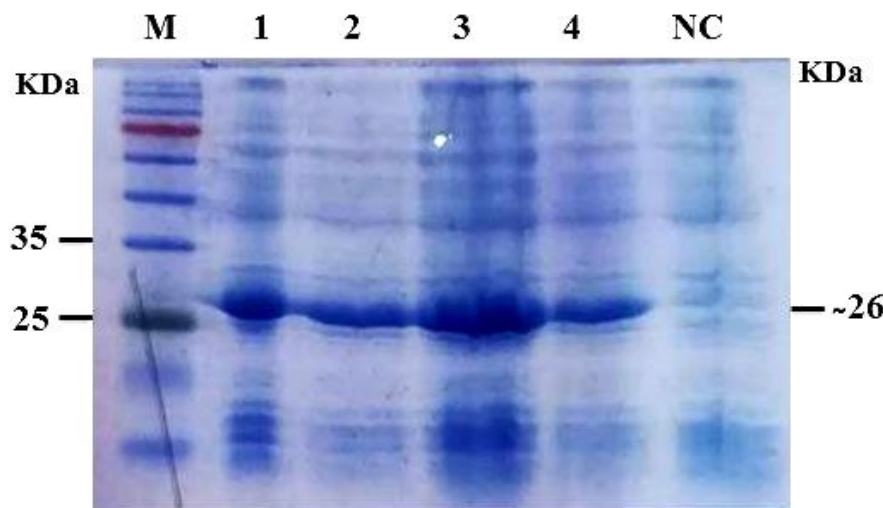


شکل ۴- محل‌های همسازگی چندگانه مربوط به پلاسمید pET28a (+) در قسمت بالا و توالی نوکلئوتیدی به دست آمده از ژن پروتئین پوششی ویروس لکه برگی کروتیک سیب جدایه SSa در قسمت پایین، که توالی ژن با قسمت مشخص شده در MCS جایگزین گردید.

Figure 4- Multiple cloning site (MSC) of pET28a(+) (above) and coat protein (CP) gene sequences of ACLSV isolate SSa (below) which CP gene sequences replaced with the defined location in the MSC.

نتایج حاصل از بیان پروتئین پوششی ACLSV با استفاده از SDS-PAGE: به منظور بررسی بیان پروتئین پوششی ACLSV، پروتئین‌های استخراج شده از کشت باکتری حاوی پلاسمیدهای بیان در SDS-PAGE الکتروفورز شدند. در الگوهای پروتئینی به دست آمده از باکتری‌های تراریخت شده با pET28a-ACLSV-CP، پروتئین پوششی نو ترکیب مورد انتظار با اندازه تقریبی ۲۶ کیلودالتون (۲۱ کیلودالتون مربوط به پروتئین پوششی ACLSV و حدود ۵ کیلودالتون مربوط به برچسب‌های هیستیدینی 6X His-tag) چهار ساعت بعد از القاء مشاهده شد در حالی که در حالت قبل از القاء (نمونه شاهد) این باند پروتئینی مشاهده نشد (شکل ۵).

پس از بررسی توالی‌های مربوطه مشخص شد که ژن مورد نظر به درستی در قاب خواندنی پلاسمید قرار گرفته و قابلیت بیان را دارد (شکل ۴). مقایسه توالی آمینواسیدی ژن پروتئین پوششی جدایه SSa با توالی جدایه‌های ایرانی ۹۶/۳ تا ۹۹/۴ درصد و با سایر جدایه‌های مختلف این ویروس در بانک ژن ۸۹/۹ تا ۹۹/۴ درصد تشابه نشان داد. همچنین، در مقایسه با توالی آمینواسید سایر جدایه‌های این ویروس، جهش منحصر بفردی در پروتئین پوششی SSa که می‌توانست ناشی از مراحل کار بیان این پروتئین باشد، مشاهده نشد. توالی مربوط به ژن پروتئین پوششی جدایه SSa با شماره دسترسی MK354026 در بانک ژن ثبت شد.



شکل ۵- نتایج بررسی بیان ژن پروتئین پوششی ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب در ژل SDS-PAGE. چاهک M: نشانگر پروتئین ExcelBand™ PM 2500 (تهیه شده از شرکت SMOBIO تایوان). چاهک‌های ۱ تا ۴: پروتئین‌های استخراج شده از کلنی‌های مختلف باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) تراریخت شده با pET28a(+) حاوی ACLSV-CP چهار ساعت پس از القاء با IPTG. NC: شاهد منفی (نمونه قبل از القاء با IPTG).

Figure 5- SDS-PAGE of extracted proteins from *E. coli* BL (DE3). M: Protein marker (ExcelBand™ PM 2500), 1-4: Extracted proteins from transformed cells by pET28a-ACLSV-CP 4 hour after induction by 1mM IPTG and NC: Extracted proteins from transformed cells by pET 28a-ACLSV-CP before IPTG induction.

سرولوژیک برهمکنش بین آنتی‌بادی و آنتی ژن است (Emtiazi 2010) و تهیه آنتی‌بادی مناسب برای انجام این آزمون‌ها بسیار مهم است. تهیه آنتی‌بادی مناسب مستلزم در اختیار داشتن آنتی‌ژن خالص (پروتئین پوششی ویروس) است.

در بسیاری از ویروس‌های گیاهی از ذرات ویروسی خالص شده از بافت‌های گیاه آلوده به عنوان آنتی‌ژن استفاده شده است (Emtiazi 2010) اما، در برخی از ویروس‌های گیاهی تولید آنتی‌ژن فراوان و با کیفیت به علت غلظت پایین ویروس در

با توجه به اینکه ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب باعث آلودگی‌های مهم در درختان دانه‌دار می‌شوند لذا، شناسایی سریع و به موقع آن به خصوص در نهالستان‌ها برای جلوگیری از گسترش بیماری بسیار مهم است. روش‌های سرولوژیک برای شناسایی ویروس‌ها در مقیاس وسیع بسیار پرکاربرد است به ویژه در مورد ویروس‌های سیب که غنی از موارد بازدارنده است و کاربرد روش‌های مولکولی بدلیل اختلال در کار آنزیم‌ها با محدودیت‌هایی مواجه است (Rana et al. 2011). اساس آزمون‌های

بافت‌های گیاهی، مشکلات خالص سازی ذرات ویروسی با کیفیت بالا به دلیل حضور ترکیبات بازدارنده مانند پلی‌فل‌ها، تانن‌ها و آلودگی با آنتی‌ژن‌های میزبان (Ling et al. 2000)، به دست آوردن مقادیر کافی آنتی‌ژن خالص با استفاده از خالص سازی ذرات ویروسی مشکل است و از تولید پروتئین پوششی نوترکیب در سیستم پروکاریوتی استفاده می‌شود. بنابراین، در این پژوهش امکان بیان پروتئین پوششی نوترکیب ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، برای تکثیر ژن کامل پروتئین پوششی آغازگرهایی طراحی شد که حاوی سایت برشی آنزیم‌های *BamHI* و *XhoI* بود که امکان اتصال به وکتور بیان را پیدا کند پس از انجام پی‌سی‌آر استاندارد، برای به دست آوردن دی‌ان‌ای خالص از ژن، استخراج DNA از ژل با استفاده از کیت صورت گرفت.

با توجه به برتری نسبی میزان بیان در میزبان باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3) نسبت به سایر سویه‌های مرسوم دیگر Rosetta، در این پژوهش از سویه BL21(DE3) استفاده شد. برای مثال، بیان پروتئین حرکتی ویروس برگ بادبزی مو (*Gravevine fan leaf virus*) در سیستم پروکاریوتی توسط دو این دو سویه نشان داد که میزان بیان پروتئین حرکتی در سویه BL21 مقدار بیشتری از میزان بیان در سویه Rosetta بود (Koolivand et al. 2016) و در مطالعه دیگر، بیان ژن پروتئین پوششی ویروس تریستیزی مرکبات (*Citrus tristeza virus*) در سویه BL21(DE3) بیشتر از میزان بیان آن در Rosetta بود (Amiri Sadaghan et al. 2013). در بعضی مواقع اگر پروتئین بیش از حد بیان شود، برای میزبان سمی بوده و از آستانه تحمل میزبان عبور کرده و باعث از بین رفتن سلول میزبان می‌شود (Gupta et al. 1999) ولی چنین موردی برای بیان در سویه BL21(DE3) گزارش نشده است. همچنین در این پژوهش از پلاسمید بیان pET28a(+) استفاده شد که در عمده پژوهش‌ها برای تولید پروتئین نوترکیب در میزبان باکتری *E. coli* استفاده می‌شود. این پلاسمید بیان دارای برجسب‌های هیستیدینی 6X His-tag در بخش پایین دست و بالادست بوده که به تشخیص بهتر بیان پروتئین، خالص‌سازی و استخراج کمک می‌کند (Gulati-Sakhuja et al. 2009) و به همین علت در الکتروفورز پروتئینی اندازه پروتئین بیان شده بیشتر از اندازه

واقعی پروتئین است. در این پژوهش با توجه به اندازه حدود ۲۱ کیلودالتونی پروتئین پوششی ACLSV و حدود ۵ کیلودالتون در ارتباط با دو برجسب هیستیدینی که به ابتدا و انتهای پروتئین اضافه می‌شوند، اندازه پروتئین به دست آمده حدود ۲۶ کیلو دالتون بود که نشان‌دهنده بیان صحیح پروتئین مورد نظر می‌باشد. ترسیم ساختار سه بعدی پروتئین پوششی ACLSV با استفاده از نرم افزار Phyre2 (Kelley et al. 2015) به صورت آنلاین انجام شد که بیانگر حضور ساختارهای آنتی‌ژنیک در سطح پروتئین مذکور بود. همچنین آنالیز این پروتئین به منظور پیش‌بینی اپی-توپ‌های آن در پایگاه داده IEDB (<https://www.iedb.org/>)، حاکی از وجود اپی‌توپ‌های خطی و فضایی متعدد در ساختار پروتئین پوششی بود که نتایج این بررسی‌ها نشان دهنده خاصیت آنتی‌ژنیک و ایمنی‌زا بودن پروتئین پوششی ویروس بود.

عمده مشکلات در مورد بیان ژن‌های ویروس‌های گیاهی در سیستم پروکاریوتی مربوط به تشکیل اینکلوزن بادی‌ها پس از بیان می‌باشد که امکان محلول کردن و شکستن این نوع پروتئین دشوار و مستلزم به کار بردن مواد و تجهیزات می‌باشد تا بتوان آن‌ها را به صورت محلول در آورد، اما با وجود این مشکلات، بسیاری از محققین با بیان ژن‌های مورد نظر در سیستم پروکاریوتی حتی در صورت تشکیل اینکلوزن بادی نیز موفق به خالص سازی پروتئین و استفاده از پروتئین مذکور به عنوان ماده ایمنی‌زا شده‌اند (Kumari et al. 2001; Korimbocus et al. 2002; Čeřovská et al. 2006). در این تحقیق، با توجه به تشکیل و شدت باند پروتئینی مورد نظر در ژل (شکل ۵)، به نظر می‌رسد که اینکلوزن بادی تشکیل نشده و حداقل بخش عمده پروتئین پوششی ACLSV به صورت محلول بوده است. مثال‌های متعددی از محلول بودن کامل یا بخشی از پروتئین پوششی ویروس‌ها در سیستم بیانی *E. coli* گزارش شده است (Raikhy et al. 2007; Lee and Chang, 2008; Gulati-Sakhuja et al. 2009).

بر اساس نتایج حاصل از مطالعات پیشین، در این پژوهش از غلظت یک میلی‌مولار برای القاء پیشبر T7promoter در پلاسمید نوترکیب pET28a-ACLSV-CP و زمان انکوباسیون چهار ساعت بعد از القاء برای بیان استفاده شد. در گزارشی مبنی بر بی‌تاثیری

بنابراین، در این پژوهش سازه بیانی برای تولید پروتئین پوششی نوترکیب ویروس لکه‌برگی کلروتیک سیب ساخته شد و کارایی آن در تولید این پروتئین با روش SDS-PAGE مورد آزمون قرار گرفت که نشان‌دهنده بیان آن با غلظت مناسب بود. با استفاده از این سازه می‌توان پروتئین نوترکیب مذکور را در مقیاس وسیع و خلوص زیاد تولید و برای تولید آنتی‌بادی چند همسانه‌ای و تک-همسانه‌ای در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار داد. هرچند در مطالعات پیشین میزان حساسیت روش PCR در مقایسه با الایزا در ردیابی ACLSV، حدود هفتاد (Malan, 2014) تا صد برابر (Candresse et al. 1995) گزارش شده است اما هنوز الایزا در ردیابی ویروس‌ها و از جمله این ویروس در مقیاس زیاد به دلیل صرفه‌جویی در زمان و هزینه بسیار کاربرد دارد. علی‌رغم تنوع ژنتیکی نسبتاً زیاد ویروس ACLSV، الایزا قادر به ردیابی جدایه‌های این ویروس در تمام گروه‌های تبارزایی بود (Malan, 2014) که ممکن است به دلیل حفاظت شدگی نسبتاً زیاد قسمت انتهای کربوکسیلی پروتئین پوششی باشد (Al Rwahnih et al. 2004).

افزایش غلظت IPTG برای تحریک بیان ژن در تهیه پروتئین پوششی نوترکیب ویروس موزاییک خیار (CMV)، غلظت ۰/۵-۲ میلی‌مولار را مورد آزمایش قرار دادند که تاثیر معنی‌داری بر میزان بیان نداشت (Rostami et al. 2015). در پژوهش دیگر، برای تولید پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزی مو از غلظت‌های مختلف ۱، ۲ و ۶ میلی‌مولار IPTG برای القاء استفاده شد که نتایج حاکی از عدم معنی‌داری در بین غلظت‌های مورد استفاده بود (Sokhandan-Bashir et al. 2015a). همچنین، طول مدت انکوباسیون برای بیان را در زمان‌های ۴، ۶ و ۱۶ ساعت بعد از القاء مورد مطالعه قرار دادند که تفاوت معنی‌داری بین میزان پروتئین در زمان‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. در پژوهش دیگر، سه غلظت ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌مولار برای تلقیح و زمان انکوباسیون سوسپانسیون باکتریایی پس از القا را ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت در باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) مورد آزمایش قرار دادند که نتایج SDS-PAGE نشان داد که بهترین غلظت IPTG برای القاء یک میلی‌مولار و بهترین زمان انکوباسیون سوسپانسیون باکتریایی پس از القاء ۳ ساعت می‌باشد (Hamdayanty et al. 2016).

منابع

- Amiri Sadeghan A, Shams-Bakhsh M, Yakhchali B. 2013. Expression of *Citrus tristeza virus* coat protein gene in *Escherichia coli*. Journal of Crop Protection 2(4):387-393.
- Candresse T, Lanneau M, Revers F, Grasseau N, Macquaire G, German S, Dunez J, Grasseau N, Malinowski T, Barba M, Hadidi A. 1995. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of Apple chlorotic leaf spot virus. Acta Horticulturae 386:136-147.
- Čerovská N, Filigarová M, Pečenková 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.
- Chen YK, Goldbach R, Prins M. 2002. Inter- and intramolecular recombinations in the cucumber mosaic virus genome related to adaptation to alstroemeria. Virology 76:4119-4124.
- Emtiaz G. 2010. Principles of molecular biology and genetic Engineering. Mani publishers. Iran.
- EPPO. 1999. Certification schemes-Pathogen-tested material of Malus, Pyrus and Cydonia. EPPO Bulletin 29:239-252.
- Foissac X, Savalle-Dumas L, Gentit P, Dulucq MJ, Candresse T. 2000. Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Faveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and
- 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.
- Abtahi F, Shams-Bakhsh M, Safaie N, Azizi A, Autonell CR, Ratti C. 2019. Incidence and genetic diversity of apple chlorotic leaf spot virus in Iran. Journal of Plant Pathology, in press.
- Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ. 2016. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology 161:2921-2949.
- Alemzadeh E, Katsiani AT, Efthimiou K, Katis NI. 2016. Occurrence of apple chlorotic leaf spot virus in apple and quince in Southern Iran. Journal of Plant Pathology 98(1):177.
- Al Rwahnih M, Turturo, Minafra A, Saldarelli P, Myrta A, Pallas V, Savino V. 2004. Molecular variability of Apple chlorotic leaf spot virus in different hosts and geographical regions. Journal of Plant Pathology 86(2):117-122.

- inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulture* 357:52–59.
- Folwarczna J, Plchova H, Moravec T, Hoffmeisterova H, Dědič P, Čerovská N. 2008. Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of potato virus Y. *Folia Microbiologica* 53(5):438–442.
- German-Retana S, Bergey B, Delbos RP, Candresse T, Dunez J. 1997. Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of *Apple chlorotic leaf spot trichovirus* (ACLSV). *Archives of virology* 142(4):833–841.
- Green MR, Sambrook J. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th edition, 1885 P.
- Gulati-Sakhuja A, Sears JL, Nunez A, Liu HY. 2009. Production of polyclonal antibodies against *Pelargonium zonate spot virus* coat protein expressed in *Escherichia coli* and application for immunodiagnosis. *Journal of Virological Methods* 160: 29–37.
- Gupta JC, Jaisani M, Pandey G, Mukherjee KJ. 1999. Enhancing recombinant protein yields in *Escherichia coli* using the T7 system under the control of heat inducible λ PL promoter. *Journal of Biotechnology* 68:125–134.
- Hamadayanty 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.
- Honnesh SH, Patil MS, Moger N, Savalgi VP, Rashmi LS, Bergi R. 2018. Cloning and expression of *Tomato leaf curl virus* coat protein gene in *E. coli*. *International Journal of Current Microbiology Applied Science* 7(4):141–151.
- Gharibi Z, Ardakani M, Memari H, Safara S. 2012. Expression of recombinant *Zucchini yellow mosaic virus* coat protein gene in *Escherichia coli*. 3rd Iranian Agriculture Biotechnology Conference, 680. Iran, Ferdowsi University of Mashhad. (In Farsi with English abstract)
- Kelley LA, Stefans Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10:845–858.
- Keshavarz T, Shams-Bakhsh M. 2015. Incidence and distribution of *Apple chlorotic leaf spot virus* in the main fruit growing areas of Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 48:306–312.
- Kinard GR, Scott SW, Barnett OW. 1996. Detection of apple chlorotic leaf spot and apple stem grooving viruses using RT-PCR. *Plant Disease* 80(6):616–621.
- Koolivand D, Sokhandan-Bashir N, Behjatnia SA, Jafari-Joozani R. 2016. Production of polyclonal antibody against *Grapevine fanleaf virus* movement protein expressed in *Escherichia coli*. *Plant Pathology* 32(5): 452–459.
- Koolivand 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*. *Applied Plant Protection Research* 5(1):93–102. (In Farsi with English abstract)
- Korimbocus J, Preston S, Danks C, Barker I, Coates D, 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, Vetten H. 2001. Polyclonal antibodies to the bacterially expressed coat protein of *Faba bean necrotic yellows virus*. *Journal of Phytopathology* 149:543–550.
- Lee SC, Chang YC. 2008. Performances and application of antisera produced by recombinant capsid proteins of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. *European Journal of Plant Pathology* 122:297–306.
- Ling KS, Zhu HY, Jiang ZY, 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(4):301–309.
- Lister RM. 1970. *Apple chlorotic leaf spot virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 30. Kew, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Livieratos IC, Avgelis AD, Coutts RH. 1999. Molecular characterization of the cucurbit yellow stunting disorder virus coat protein gene. *Phytopathology* 89:1050–1055.
- Makkouk K, Kumari S. 2006. Molecular diagnosis of plant viruses. *Arab Journal of Plant Protection* 24(2):135–138.
- Malan SS. 2014. ELISA detection of *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) and *Apple mosaic virus* (ApMV) in comparison to RT-PCR detection and the determination of genetic variation of these virus species in South Africa. Master of Science Thesis, Stellenbosch, South Africa, 19–31.
- Martinelli F, Scalenghe R, Davino S, Panno S, Scuderi G, Ruisi P, Villa P, Stroppiana D, Boschetti M, Goulart LR, Davis CE, Dandekar AM. 2015. Advanced methods of plant disease detection. *Agronomy for Sustainable Development*. 35:1–25.
- Menzel W, Jelkmann W, Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99:81–92.
- Paduch-Cichal E, Tomala K. 2007. Detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) and *Apple stem grooving virus* (ASGV) in different tissues of 'mutsu' apple cultivar trees by ELISA. *Phytopathology* 43:53–59.
- Panja S, Saha S, Jana B, Basu T. 2006. Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *Journal of Biotechnology* 127(1):14–20.
- Park HL, Yoon JS, Kim HR, Baek KH. 2006. Multiplex RT-PCR assay for the detection of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* in infected Korean apple cultivars. *The Plant Pathology Journal* 22(2):168–173.
- Polák J, Ravelonandro M, Kumar-Kundu J, Pívalová J, Scorza R. 2008. Interactions of *Plum pox virus* strain Rec with *Apple chlorotic leafspot virus* and *Prune dwarf virus* in field-grown transgenic plum *Prunus domestica* L., clone C5. *Journal of Plant Protection Science* 44:1–5.
- Rana T, Chandel V, Hallan V, Zaidi AA. 2011. Expression of recombinant *Apple chlorotic leaf spot virus* coat protein in heterologous system: production and use in

- immunodiagnosis. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 20(1):138–141.
- Raikhy G, Hallan V, Kulshrestha S, Zaidi A. 2007.** Polyclonal antibodies to the coat protein of carnation etched ring virus expressed in bacterial system: production and use in immunodiagnosis. Journal of Phytopathology 155:616–622.
- Rostami A, Sokhandan-Bashir N, Koolivand D, Hajizadeh M. 2015.** Serological methods to confirm expression of coat protein gene from an Iranian isolate of *Cucumber mosaic virus* in *Escherichia coli*. Biotechnology and Health Sciences 2(2):e28253.
- 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(4):733–738.
- Salimi M, Amini M, Shams-Bakhsh M, Safaei N. 2010.** Expression of the movement and coat protein genes of tomato yellow leaf curl iran2 virus in *E. coli*. Journal of Biotechnology 150:480–480.
- Sato K, Yoshikawa N, Takahashi T. 1993.** Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus*. Journal of General Virology 74:1927–1931.
- Sokhandan-Bashir N, Koolivand D, Behjatnia AA. 2015a.** Preparation of polyclonal antibodies to *Grapevine fanleaf virus* coat protein expressed in *Escherichia coli*. Biotechnology 14(4):173–180.
- Sokhandan-Bashir S, Poorsmaile M, Hajizadeh M. 2015b.** Heterologous expression of potato virus Y coat protein, isolate Pot187. Iranian Journal of Biotechnology 13(4):48.
- Spiegel S, Frison EA, Converse RH. 1993.** Recent developments in therapy and virus-detection procedures for international movement of clonal germ plasm. Plant Disease 77:1176–1180.
- Stevens WA. 1983.** Plant Virus Disease Control. In: Virology of Flowering Plants. Tertiary Level Biology. Springer, Boston, MA.
- Wu ZB, Ku HM, Chen YK, Chang CJ, Jan FJ. 2010.** Biological and molecular characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus* causing chlorotic leaf spot on pear (*Pyrus pyrifolia*) in Taiwan. HortScience 45(7): 1073-1078.
- Voloudakis A, Malpica C, Aleman-Verdaguer ME, Stark D, Fauquet C, Beachy R. 2004.** Structural characterization of *Tobacco etch virus* coat protein mutants. Archives of Virology 149:699–712.
- Yoshikawa N, Takahashi T. 1988.** Properties of RNAs and proteins of Apple stem grooving and Apple chlorotic leaf spot viruses. Journal of General Virology 69:241–245.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

**Cloning and expression of Iranian isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus*
coat protein gene in *Escherichia coli***

Danyal Mirzaei¹, Mohammad Hajizadeh^{1*}, Abdolbaset Azizi¹ and Davoud Koolivand²

¹ Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

² Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

*Corresponding Author, Email: m.hajizadeh@uok.ac.ir

ABSTRACT

The *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) is among of the most common virus infecting pome and stone fruit trees around the world. The virus has spread throughout the world and has been reported in many hosts such as; apples, pears, peaches and cherries. The purpose of this study is to express the coat protein (CP) of ACLSV in *E. coli*. CP expression in *E. coli* has been developed to prepare antigen for antibody production without needs to purify the virus from infected plant. In this study, complete CP gene (582 bp) from an isolate of ACLSV (SSa) was amplified by specific primers, MF and MR. The amplified CP gene was ligated to TA cloning vector (pTG19-ACLSV CP) and transformed into *E. coli* strain DH5a. Transformed cells were selected on LB containing ampicillin, X-Gal and IPTG, and recombinant plasmids were confirmed by restriction analysis. Then, the pTG-ACLSV CP was sub-cloned into pET28a (+) as expression vector that digested by *Bam*HI and *Xho*I restriction enzymes. Finally, the pET28a-ACLSV CP was transformed into *E. coli* strain BL21 by heat shock method. For ACLSV CP expression, the cells containing pET28a-ACLSV CP were induced by 1 mM of IPTG and the protein was extracted two and four hours after induction and analyzed in SDS-PAGE. The SDS-PAGE result showed that ACLSV CP have been expressed that is expected based on additional tags from plasmid.

Keywords: Antibody, Cloning, Expression, Recombinant protein, SDS-PAGE