آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۲، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۳

تولید فاژهای نوترکیب حاوی ژن‌های آنتی‌بادی اختصاصی ویروس تریستزای مرکبات

فاطمه سمیعی[۱]✉، محمدرضا صفرنژاد[۲]، قاسم حسینی سالکده[۳]، مسعود شمس بخش[۴] و فرشاد رخشنده‌رو[۵]

۱- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران؛ ۲- بخش ویروس شناسی موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور؛۳- بخش ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران؛ ۴- گروه بیماری شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس؛ ۵- گروه بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

(تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۲؛ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۲)

چکیده

ویروس تریستزا یکی از عوامل بیماریزای مرکبات در دنیا به شمار می‌رود. امروزه روش‌های نوین مبتنی بر مهندسی آنتی بادی به عنوان راهکاری جدید در شناسایی گیاهان آلوده و همچنین تولید گیاهان مقاوم به بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از ابزارهای مهم در تولید آنتی بادی‌های نوترکیب استفاده از تکنولوژی نمایش فاژی می‌باشد. در این تحقیق قابلیت استفاده از کتابخانه فاژی حاوی ژن‌های آنتی بادی انسانی به منظور تولید فاژهای نوترکیب حاوی قطعات آنتی بادی اختصاصی بر علیه ویروس تریستزای مرکبات با روش نمایش فاژی بررسی شد. برای این منظور، تولید و خالص سازی پروتئین پوششی ویروس تریستزا به صورت نوترکیب انجام شد. غنی سازی کتابخانه فاژی با انجام مراحل غربال گری صورت گرفت و قابلیت اتصال جمعیت‌های اختصاصی فاژها با استفاده از آزمون‌های سرولوژیک بررسی شد. نتایج حاصله نشان داد که در دورهای متوالی بیوپنینگ کتابخانه، اختصاصیت فاژها افزوده شد و فاژهای جدا شده اختصاصیت بالایی در اتصال به پروتئین پوششی ویروس داشتند. بر اساس اطلاعات موجود این اولین گزارش از تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه ویروس تریستزای مرکبات با روش نمایش فاژی می باشد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین پوششی، نمایش فاژی، ویروس تریستزای مرکبات.

Production of recombinant phages containing specific antibody genes against *Citrus tristeza virus*

F. SAMIEE[1]✉, M. R. SAFARNEJAD[2], GH. HOSEINI SALEKDEH[3], M. SHAMSBAKHSH[4] and F. RAKHSHANDEHRO[5]

1- PhD student, Islamic Azad University, Science and research branch, Tehran; 2- Iranina research institute of plant protection, Tehran; 3- Agricultural biotechnology research institute of Iran, Karaj; 4- Tarbiat moadarres University, Tehran; 5- Islamic Azad University, Science and research branch, Tehran

Abstract

Tristeza is one of the most destructive citrus diseases in the world. The disease is widely distributed throughout the major citrus growing area of Iran. Nowadays, new technologies are being applied for development of diagnosis tools against plant viruses. Among them, phage display has a major role in production of specific monoclonal antibodies. Present research is done due to gain specific recombinant phages against *Citrus tristeza virus* (CTV). For this aim, a major component of CTV coat protein was selected as an antigen and was produced in recombinant form in bacteria. Naïve phage display libraries containing single chain variable fragments (scFv) were applied for the selection of specific phages. Three rounds of biopanning were applied by using purified coat protein as a binder in immunotubes followed by the selection of specific recombinant phages by indirect ELISA. The selected phages can be used for generation of specific monoclonal antibodies. Based on our knowledge this is the first report for production of specific antibody against CTV by phage display technology.

Key words: *Citrus tristeza virus*, Phage display.

✉ **Corresponding author: fa_samiee@yahoo.com**

مقدمه

مرکبات از مهم‌ترین محصولات باغی کشور می‌باشند. بیماری‌های گیاهی همواره خسارات زیادی به این محصول وارد می‌کنند. از جمله مهمترین عوامل بیماری‌زای مرکبات در مناطق شمالی و جنوبی کشور، ویروس تریستزای مرکبات می باشد. اولین گزارش مستند از وجود بیماری تریستزا در باغ مهدشت ساری توسط ابراهیم نسبت و نینهاوس منتشر گردید (Ebrahim-Nesbeat and Nienhaus, 1978) این بیماری بعداً در مناطق جنوبی کشور نیز گزارش شد (Shafiee and Izadpanah, 1996). ویروس تریستزای مرکبات (*Citrus tristeza virus*, CTV) به شکل رشته‌ای طویل است و ژنوم آن به صورت RNA تک رشته‌ای مثبت به طول ۲۰Kb می‌باشد (Karasev *et al.*, 1995). براساس خصوصیات مولکولی، بیولوژیکی و مورفولوژیکی و همچنین آنالیز فیلوژنیکی، CTV در جنس کلسترووویروس (*Closterovirus*) از خانواده *Closteroviridae* و جزء ویروس‌های گیاهی RNA دار تک رشته‌ای مثبت طبقه بندی می‌شود (Koonin and Dolja, 1993).

ویروس تریستزای مرکبات و سایر اعضای این خانواده بر اساس شکل، ژنوم یک قسمتی بزرگ، حضور در بافت آبکش میزبان، انتقال به صورت نیمه پایا و تولید ذرات اینکلوژن (Inclusion bodies) در سلول‌های آلوده متمایز می‌گردند (Bar-Joseph *et al.*, 1979). ژنوم ویروس توسط دونوع پروتئین پوشیده می‌شود. پروتئین پوششی عمده ۲۵ کیلودالتونی (major coat protein, CP25) حدود ۹۵ درصد ژنوم را پوشانده و قسمت باقیمانده ژنوم توسط پروتئین ۲۷ کیلو دالتونی (minor coat protein, CP27) احاطه می‌گردد (Febres *et al.*, 1996).

نمایش فاژی اولین بار در سال ۱۹۸۵ توصیف شد که شامل بیان و تظاهر توالی‌های الیگوپپتیدی به صورت متصل با پروتئین پوششی باکتریوفاژ می‌باشد. فاژهای نوترکیب حاوی چندین نسخه از الیگوپپتید روی سطح پارتیکل ویروسی می‌باشد. کتابخانه‌های فاژی حاوی قطعات آنتی‌بادی از جمله مهم‌ترین انواع کتابخانه‌های فاژی است. تکنولوژی نمایش فاژی به صورت گسترده به منظور انجام مطالعات تعامل پروتئینی، مهندسی پروتئین، تولید دارو و همچنین تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب مونوکلونال مورد استفاده قرار گرفته است (Whaley *et al.*, 2000, Safarnejad *et al.*, 2011). جداسازی پروتئین‌های اختصاصی از کتابخانه‌های پپتیدی، از قبیل کتابخانه‌های آنتی‌بادی‌ها، توسط فرایند غربال‌گری (BioPanning) صورت می‌پذیرد (Smith *et al.*, 1985). کتابخانه‌های آنتی‌بادی فاژ با آنتی‌ژن‌ها غربال‌گری می‌شوند. در این روش آنتی بادی‌ها با میل ترکیبی بیشتر به آنتی‌ژن‌های مرتبط متصل می‌شوند و ژن‌های آنتی‌بادی مورد نظر را می‌توان از ژنوم فاژی بدست آورد. هدف از اجرای تحقیق حاضر بررسی قابلیت جداسازی فاژهای نوترکیب حاوی ژن‌های آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروس تریستزای مرکبات بود. فاژهای جدا شده می‌تواند در تولید کیت‌های تشخیصی، پلانتی بادی‌ها و ایجاد مقاومت بر علیه این بیماری مورد استفاده قرار گیرد (Safarnejad *et al.*, 2011).

روش بررسی

در این تحقیق از پروتئین پوششی عمده، CP25، ویروس تریستزا به عنوان آنتی‌ژن برای جدا سازی فاژهای اختصاصی نوترکیب استفاده گردید. برای تولید پروتئین از سازه بیانی باکتریایی حاوی ژن پروتئین پوششی، pET28a-TCP، استفاده گردید (Bordbar *et al.*, 2008). در این سازه به منظور تسهیل در فرایند تشخیص و خالص سازی، ژن پروتئین پوششی به صورت متصل با توالی شش‌تایی اسید آمینه هیستیدین وجود دارد. جهت تأیید حضور ژن مورد نظر در سازه بیانی، علاوه بر تعیین توالی ژن پروتئین پوششی، آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی توالی هیستیدین انجام شد.

تولید پروتئین پوششی نوترکیب: به منظور بیان ژن پروتئین پوششی از سویه BL21-de3 باکتری *E. coli* استفاده

گردید. بیان ژن تحت شرایط طبیعی طبق دستورالعمل شرکت کیاژن بصورت ذکر شده در ذیل انجام پذیرفت. به منظور تولید انبوه پروتئین نوترکیب، یک کلنی حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط کشت LB broth حاوی کانامایسین (۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر)قرار داده شد تا OD_{600} آن به ۰/٦ برسد. برای القاء باکتری از IPTG یک میلی‌مولار در حجم نهایی به مدت چهار ساعت و از شیکر با دمای ۲۸درجه سلسیوس استفاده شد. جهت خالص سازی پروتئین نوترکیب ابتدا جداسازی سلول‌های باکتریایی با انجام سانتریفیوژ در ٤۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه صورت پذیرفت. ته نشین به مدت یک شب در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. تخریب دیواره سلولی باکتری با استفاده از روش‌های مبتنی بر امواج صوتی و آنزیم لیزوزیم با توجه به دستورالعمل‌های موجود صورت پذیرفت. جهت استخراج پروتئین، ابتدا سلول‌ها با کمک ورتکس در ۵ میلی‌لیتر بافر لیز کننده حل و سپس دیواره آن‌ها با روش سونی کیت با قدرت رزونانس ۷۵ درصد و تقویت ۰/۵ در شش سیکل یک دقیقه‌ای (با فواصل استراحت ۳۰ ثانیه ایی) تخریب شدند. سلول‌های تخریب شده به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار با دمای چهار درجه سلسیوس و با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی جهت خالص‌سازی جدا سازی شد. خالص سازی با روش کروماتوگرافی با استفاده از ستون نیکل انجام پذیرفت. تأیید مرحله بیان و خالص سازی پروتئین توسط ژل پلی اکریل آمید حاوی دودسیل سولفات (SDS-PAGE) ۱۲ درصد انجام گرفت (Ausubel *et al*., 1995). تعیین غلظت پروتئین به وسیله غلظت‌های مشخص پروتئین استاندارد سرم آلبومین گاوی (BSA) انجام شد. غلظت‌های $mg.ml^{-1}$ ۳/۵، ۱/۷۵، ۰/۸۷۵ از BSA و رقت‌های پروتئین نوترکیب تهیه شد و با استفاده از ژل پلی اکریل آمید (مرکب از ژل متراکم کننده چهار درصد (pH ٦/۸) و ژل متمایز کننده دوازده درصد (pH ۸/۸) تعیین غلظت شد. جهت جداسازی پروتئین از روش کروماتوگرافی با استفاده از ستون نیکل و با بافر فروشویی انجام گرفت. به منظور تأیید بیان پروتئین نوترکیب CP در سیستم باکتریایی، ابتدا نمونه‌های حاصل از مراحل مختلف خالص‌سازی روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز و سپس به غشاء نیتروسلولز منتقل شد. برای ردیابی پروتئین CP متصل به His-tag از آنتی‌بادی اولیه anti His-tag و سپس آنتی‌بادی ثانویه GAR^{AP} استفاده گردید.

تکثیر کتابخانه فاژی و تهیه فاژ: به منظور تولید فاژ از کتابخانه‌های Tomlinson I & J (Source BioScience, UK) استفاده گردید. در این کتابخانه‌های فاژی، قطعات متغیر آنتی‌بادی (single _ chain fragment variable (SCFv))به صورت متصل به پروتئین پوششی شماره ۳ فاژ M13 قرار دارد. جهت تکثیر ابتدا یک میلی‌لیتر از کتابخانه باکتریایی را در ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط 2xTY (حاوی $۱۰۰\mu g.ml^{-1}$ آمپی سیلین و ۱٪ گلوکز) اضافه نموده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. به ۵۰ میلی‌لیتر از این محیط ۲×۱۰^{۱۱} فاژ کمکی اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بدون شیکر قرار داده شد. محیط حاصل در ۳۰۰۰ ×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، ته‌نشین در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت 2xTY (حاوی ۱۰۰ $\mu g.ml^{-1}$ آمپی‌سیلین، $۵۰\mu g.ml^{-1}$ کانامایسین و ۰/۱٪ گلوکز) حل و سپس در شیکر با دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱٦ ساعت قرار داده شد. محیط کشت فوق در ۳۳۰۰×*g* به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به ۸۰ میلی‌لیتر از رونشین، ۲۰ میلی‌لیتر از (PEG/NaCl (20% Polyethylene glycol 6000, 2/5M NaCl) اضافه شد و پس از مخلوط کردن، به مدت یک ساعت روی یخ قرار گرفت. محلول فوق برای حذف PEG/NaCl در ۳۳۰۰×*g* به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. ته‌نشین در ۴ میلی‌لیتر PBS (NaCl 137mM, KCl2.7mM, Na_2HPO_4 8.1mM, KH_2PO_4 1.5mM) استریل حل شد و جهت حذف کامل بقایای باکتریایی در ۱۱٦۰۰×*g* به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاژها در ٤ درجه سلسیوس برای کوتاه مدت و یا در محیط حاوی ۱۵٪ گلیسرول و در دمای ۷۰- درجه سلسیوس

برای طولانی مدت نگهداری شدند.

غربالگری کتابخانه‌های فاژی: غربالگری با استفاده از پروتئین پوششی نوترکیب ویروس تریستزای مرکبات خالص انجام شد. ایمونوتیوب (Nunc, Denmark) با پروتئین خالص CP با غلظت $۱۰۰ \mu g.ml^{-1}$ به مدت یک شب پوشش داده شد. پس از ۳ بار شستشو با PBS، فضاهای خالی ایمنوتیوب توسط ۵ میلی‌لیتر PBS حاوی شیر بدون چربی ۲٪ طی دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس پر شد. پس از ۳ بار شستشو با PBS، چهار میلی‌لیتر شیر بدون چربی ۲٪ حاوی $cfu10^{13}$-10^{12} فاژ به ایمونوتیوب اضافه شد. ایمنوتیوب به مدت یک ساعت روی دستگاه Rotary به صورت دورانی شیکر و سپس به مدت یک ساعت در دمای اتاق به صورت ایستاده قرار گرفت. شستشو با PBS و سپس با PBST (PBS حاوی ۰/۱٪Tween20) به ترتیب هر کدام ۲۰ مرتبه انجام شد. سپس ۱ میلی‌لیتر محلول ۱۰۰ میلی مولار تری اتیل آمین به ایمونوتیوب اضافه و به صورت دورانی به مدت ۱۰ دقیقه شیکر شد. ۷۰۰ میکرولیتر از محلول تریس با غلظت ۱ مولار (pH=7/5) اضافه و بلافاصله بعد از اتمام مرحله قبلی محلول به یک ویال ۲ میلی‌لیتری منتقل شد. به ۱۳ میلی‌لیتر از محیط کشت 2xTY حاوی TG1 که در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به $OD_{600} = 0/4$ رسیده بود، ۱۷۰۰ میکرولیتر از فاژهای شسته شده اضافه شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس جهت انجام آلودگی قرار گرفت. محلول حاصل در ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و ته نشین در ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت سوسپانسیون شد و در سطح پلیت TYE حاوی گلوکز ۱٪ و آمپی سیلین با غلظت $\mu g.ml^{-1}$ ۱۰۰ به صورت شبانه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت شد. کلنی‌های باکتری با ۷ میلی‌لیتر از محیط کشت 2xTY حاوی ۱۵٪ گلیسرول از سطح پلیت‌ها شسته و جمع آوری شد. جهت تکثیر فاژهای جمع آوری شده از سطح پلیت، ۳۰۰ میکرولیتر از باکتری حاوی فاژ با ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت 2xTY (به علاوه $\mu g.ml^{-1}$ ۱۰۰ آمپی سیلین و ۱٪ گلوکز) مخلوط و سپس جهت رسیدن به OD_{600}=0/4 در دمای ۳۷ درجه شیکر شد. به ۱۰ میلی‌لیتر از این محیط کشت ۲×۱۰^{۱۱} فاژ کمکی اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بدون شیکر قرار گرفت. محیط حاصل در g ×۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ، ته نشین در ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت 2xTY (به علاوه ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین و ۰/۱٪ گلوکز) حل و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به صورت شبانه شیکر شد. محیط کشت فوق در g× ۳۳۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به ٤۰ میلی‌لیتر از رونشین، ۱۰ میلی‌لیتر از (PEG/NaCl 20% Polyethylene glycol 6000, 2.5M NaCl) اضافه شد و پس از مخلوط کردن به مدت یک ساعت روی یخ قرار گرفت. محلول فوق درg×۳۳۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و PEG/NaCl حذف گردید. ته نشین در دو میلی‌لیتر PBS سترون حل شد و جهت حذف کامل بقایای باکتریایی در g×۱۱٦۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. یک میلی‌لیتر از فاژ تهیه شده جهت استفاده در دور بعدی غربالگری برداشته شد. به یک میلی‌لیتر باقی‌مانده تا حجم نهایی ۱۵٪ گلیسرول اضافه و پس از مخلوط شدن در دمای ۲۰- نگهداری شد. پس از هر دور غربالگری تیتر فاژهای بدست آمده با روش تعیین رقت تخمین زده شد.

بررسی اختصاصیت فاژهای نوترکیب: جهت بررسی قابلیت باند شوندگی فاژهای جدا شده از آزمون الایزای غیر مستقیم استفاده گردید. برای این منظور ابتدا پلیت الیزای ۹٦ چاهکی با آنتی ژن نوترکیب با غلظت $\mu g.ml^{-1}$ ۱۰۰ پوشش داده شد و در چهار درجه سلسیوس به مدت یک شب قرار گرفت. پس از ۳ بار شستشو با PBS، چاهک‌ها توسط µlit ۲۰۰ PBS حاوی شیر بدون چربی ۲٪ پر شد و دو ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. شستشوی چاهک‌ها سه مرتبه با PBS انجام شد. در هر چاهک ده میکرولیتر از فاژهای انتهای هر دور از غربالگری کتابخانه به همراه ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت.

محلول فاژی را دور ریخته و چاهک‌ها سه بار با (PBS PBSTحاوی ۰/۱٪ Tween 20) شسته شد. آنتی بادی HRP-anti-M13 به غلظت ۱:۵۰۰۰ به چاهک‌ها افزوده شد و یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. محلول آنتی‌بادی را از چاهک‌ها جمع آوری نموده و چاهک‌ها سه بار با PBST (PBS حاوی ۰/۱٪ Tween20 شسته شد. سوبسترای ABTS در شرایط تاریکی به چاهک‌ها اضافه گردید و جذب نوری چاهک‌ها در ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد. در این مرحله فاژهای دور اول، دوم و سوم بیوپنینگ کتابخانه Tomlinson I & J در الایزا وارد شدند و فاژ $1f_2$ که فاژ اختصاصی متصل شونده به پروتئین GST بود به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

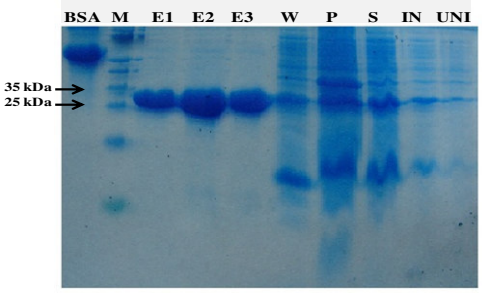
واکنش فاژهای منتخب با گیاهان سالم و آلوده به تریستزای مرکبات: فاژهای پلی کلونال اختصاصی پروتئین نوترکیب جهت سنجش واکنش به گیاه سالم و آلوده در آزمون TAS-ELISA و PTA-ELISA استفاده شدند، فاژهایی که در مرحله الیزای فاژ بیشترین جذب نوری را نشان دادند، در این مرحله استفاده شد، برای این منظور در آزمون TAS-ELISA ابتدا چاهک‌ها را با آنتی‌بادی پلی‌کلونال ویروس تریستزا پوشش داده سپس از گیاهان سالم و آلوده به ویروس، در حضور بافر، عصاره‌گیری شد، عصاره‌ها در چاهک‌ها ریخته شد و یک شب در چهار درجه سلسیوس قرار گرفت، پس از شستشوی چاهک‌ها، فاژهای منتخب به چاهک‌ها افزوده شد و با استفاده از آنتی‌بادی anti- M13 متصل به HRP و در حضور سوبسترای ABTS جذب نوری چاهک‌ها اندازه‌گیری شد. در آزمون PTA-ELISA چاهک‌ها به طور مستقیم با عصاره‌های گیاهان سالم و آلوده پوشش داده شد، سپس فاژها در چاهک‌ها قرار گرفت و با استفاده از آنتی‌بادی anti-M13 متصل به HRP و در حضور سوبسترای ABTS جذب نوری چاهک‌ها اندازه گیری شد.

نتیجه و بحث

تولید پروتئین پوششی: در این تحقیق برای تولید پروتئین پوششی ویروس تریستزا از سازه بیانی pET28a-TCP، استفاده گردید. سازه مذکور حاوی ژن پروتئین پوششی ویروس تریستزا به صورت متصل به توالی شش تایی هیستیدین می باشد. در ابتدا به منظور اطمینان از صحت سازه مورد نظر، توالی یابی ناحیه وارد شده در ناقل صورت پذیرفت. نتایج توالی یابی نشان داد ژن مورد نظر، با تشابه توالی صد درصد مربوط به پروتئین پوششی سویه Ir.n.2 ویروس تریستزای مرکبات جدا شده از باغات مرکبات شمال کشور می‌باشد (Alavi *et al*., 2005). تولید پروتئین نوترکیب، با وارد نمودن سازه بیانی pET28a-TCP به سلول باکتری میزبان انجام شد. با توجه به وجود دنباله شش تایی اسید آمینه هیستیدین در پروتئین نوترکیب، از ستون کروماتوگرافی حاوی یون نیکل برای خالص سازی پروتئین پوششی ویروس استفاده گردید. نتایج مراحل بیان و خالص سازی نشان دهنده تولید پروتئین خالص با وزن مولکولی در حدود ۳۰ کیلو دالتون می‌باشد (شکل ۱). اختلاف وزن پروتئین حاصله با پروتئین اصلی ویروس که ۲۵ کیلو دالتون بود، بدلیل وجود دنباله هیستیدین و سایر قسمت های افزوده شده توسط ناقل بیانی به انتهای آمینی پروتئین پوششی بود. غلظت پروتئین خالص با انجام مقایسه با سری غلظت پروتئین BSA به عنوان پروتئین استاندارد در حدود یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر تخمین زده شد (شکل ۲). جهت تائید ماهیت پروتئین نوترکیب تولید شده و صحت انجام آزمایشات، آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی اختصاصی دنباله هیستیدین انجام شد که نتایج تایید کننده حضور باند پروتئین مورد نظر در محدوده ۳۰ کیلو دالتون می‌باشد (شکل ۳).

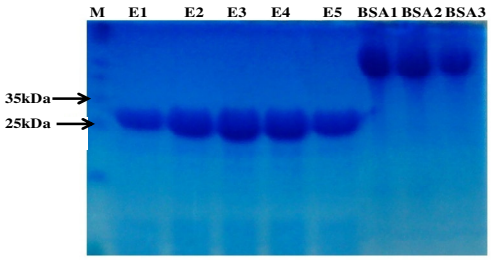
تهیه، تکثیر و غربالگری کتابخانه فاژی: جهت بدست آوردن فاژهای اختصاصی علیه پروتئین CP، کتابخانه‌های فاژی Tomlinson I & J حاوی ژن های آنتی بادی انسانی مورد

استفاده قرار گرفتند. کتابخانه های فاژی به صورت متداول برای تولید آنتی بادی های اختصاصی نوترکیب بر علیه انواع مختلف آنتی ژن ها مورد استفاده قرار می گیرند (Winter *et al*., 1994; Vaughan *et al*., 1996).به منظور استفاده از کتابخانه های مذکور، ابتدا تکثیر فاژ ها در میزبان باکتریایی صورت پذیرفت و پس از جدا سازی و خالص سازی، جمعیت فاژ در محیط با استفاده از روش تیتراسیون به حدود $۱۰^{۱۳}$ cfu/ml رسانده شد. این جمعیت فاژ در ابتدای تمامی مراحل بیوپانینگ مورد استفاده قرار گرفت.



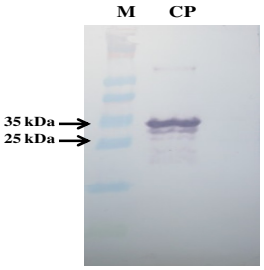
شکل ۱- بررسی بیان و خالص سازی پروتئین پوششی نوترکیب در ژل پلی اکریل آمید. BSA:Bovin Serom Albumin، M: مارکر پروتئینی SM0671 (فرمنتاس)، E1-E3: مراحل شستن پروتئین نوترکیب از ستون کروماتوگرافی، W: شستشو،P: رسوب، S: محلول رویی، IN: القاء، UNI: قبل از القاء

Fig. 1. Confirmation of the presence of proteins in polyacrylamide gels. M: protein marker SM0671 (Fermentas, Vilnius,Lithuania), E: washing steps recombinant proteins from columns, W: Wash, P: precipitated, S: supernatant, IN: induction, UNI: before induction



شکل ۲- تعیین غلظت پروتئین نوترکیب CP با استفاده از رقت‌های مختلف BSA. پروتئین نوترکیب CP در پنج رقت E1-E5، BSA1-3 پروتئین BSA در سه رقت ۳/۵ ، ۱/۷۵ ، ۰/۸۷۵ $mg.ml^{-1}$.

Fig. 2. Determination of protein concentration using serial dilutions of recombinant CP & BSA. CP recombinant protein at a dilution of E1-E5, BSA1-3, BSA protein at serial dilutions of 0.875, 1.75 and 3.5 $mg.ml^{-1}$.



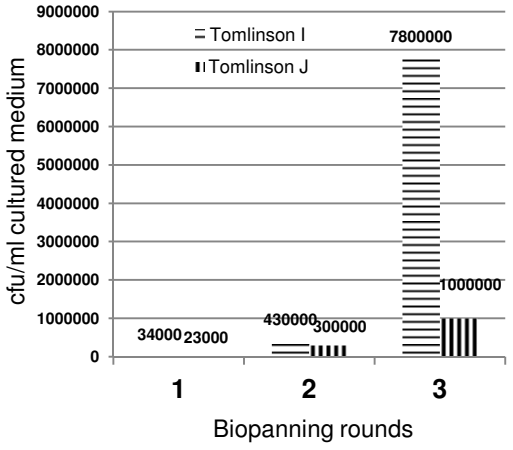
شکل ۳- آنالیز وسترن بلات پروتئین نوترکیب با استفاده از آنتی بادی اختصاصی دنباله هیستیدین.

Fig. 3. Western blot analysis of recombinant protein using of anti His-tag antibody

پس از اطمینان از وجود جمعیت مورد نظر در کتابخانه فاژی، پروسه غربالگری فاژهای متصل شونده به پروتئین نوترکیب CP طی سه دور در مراحل متوالی انجام گردید. بررسی جمعیت فاژهای جدا شده پس از انجام هر مرحله غربالگری نشان دهنده افزایش قابل توجه آنها می باشد (شکل٤). این افزایش جمعیت نشان دهنده صحت اجرای فرایند غربال گری می باشد زیرا با تکرار مراحل بیوپانینگ می باستی جمعیت فاژ های اختصاصی افزایش پیدا کند که با تکثیر آنها در انتهای هر مرحله منجر به افزایش آنها در طی مرحله بعدی خواهد شد.

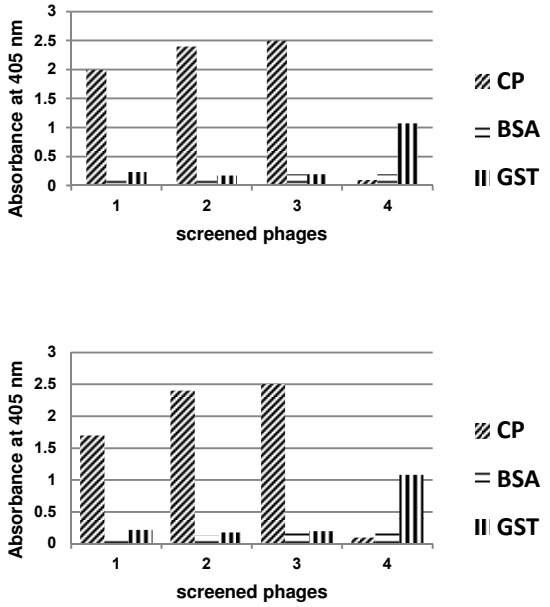
فاژهای حاصله از دورهای اول، دوم و سوم بیوپنینگ کتابخانه های I&J، جهت بررسی اختصاصیت در اتصال به آنتی ژن پروتئین پوششی ویروس تریستزای مرکبات با آزمون الیزا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پس از هر دور بیوپنینگ اختصاصیت فاژها افزایش می یابد و فاژهای بدست آمده بخوبی قادر به اتصال به آنتی ژن مورد نظر می باشند. مقایسه نتایج بدست آمده از غربالگری کتابخانه های I و J نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی دار در اختصاصیت اتصال فاژهای حاصله از کتابخانه I و J به پروتئین آنتی ژن می‌باشد (شکل ٥).

در مقایسه با روش‌های سنتی تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، از قبیل تکنولوژی هیبریدوما، استفاده از روش نمایش فاژی باعث تسهیل در انتخاب و تولید آنتی بادی‌های اختصاصی بر علیه طیف متنوعی از آنتی ژن‌ها می‌گردد.



شکل ٤- جمعیت فاژهای بدست آمده از کتابخانه‌های I & J پس از انجام مراحل بیوپنینگ

Fig. 4- Titers of phage libraries I & J eluted after biopanning processes. cfu, colony-forming units



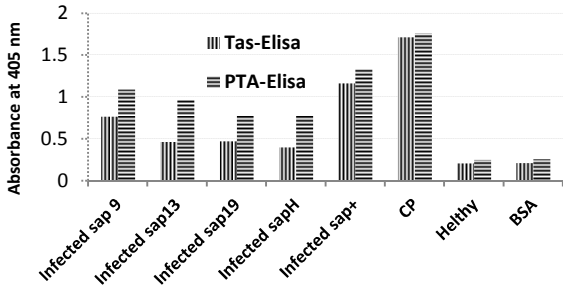
شکل ٥- مقایسه ضریب جذب نوری در ٤٠٥ نانومتر فاژهای حاصل از بیوپنینگ کتابخانهTomlinson I (الف) و Tomlinson J (ب). محور افقی شامل فاژهای حاصل از دور اول (١)، دوم (٢) و سوم (٣) بیوپنینگ و فاژاختصاصی پروتئین GST به عنوان کنترل منفی (٤)، CP: پروتئین پوششی تریستزا، BSA: بوین سرم آلبومین، GST: آنتی ژن فاژ کنترل مثبت

Fig. 5. Comparison of optical density in 405 nm from phages obtained in biopanning processes of Tomlinson I (A) and J (B) libraries. The horizontal axis contains the phages from the first round (1), second (2nd) and third (3) and GST specific phage used as a negative control (4). CP: Tristeza coat protein, BSA: Bowen serum albumin, GST: antigen positive control phage.

استفاده از روش هیبریدوما علاوه بر نیاز به آزمایشگاه‌های پیشرفته، بسیار زمانبر بوده و مستلزم غربال‌گری تعداد زیادی از سلول‌های هیبریدوما می‌باشد. تولید آنتی‌بادی با این روش گران و نیاز به امکانات کشت سلول‌های جانوری دارد. همچنین در روش نمایش فاژی امکان تولید آنتی‌بادی بدون نیاز به ایمنی‌زایی در حیوان قابل انجام می‌باشد (Willats, 2002).

واکنش فاژهای منتخب با گیاه آلوده و سالم: جهت بررسی قابلیت استفاده از فاژهای حاصله برای تشخیص نمونه‌های گیاهی آلوده، آزمون الیزا به روش‌های TAS-ELISA و PTA-ELISA انجام شد. در روش اول چاهک‌های بشقابک الیزا ابتدا توسط آنتی بادی پلی کلونال اختصاصی CP پوشش داده شد و سپس عصاره اضافه گردید، ولی در حالت PTA-ELISA عصاره‌ها مستقیم به چاهک‌ها اضافه شدند. نتایج بدست آمده از دو روش فوق نشان داد که فاژهای حاصله به خوبی قادر به تشخیص نمونه‌های گیاهی آلوده می‌باشند و ضریب جذب نوری چاهک‌های حاوی عصاره گیاه آلوده نسبت به کنترل منفی دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد (شکل ٦). نتایج حاصل از مقایسه این دو روش نشان داد که روش PTA-ELISA کارایی بهتری نسبت به TAS-ELISA دارد (شکل ٦). این تفاوت در نتایج حاصله به علت پوشش اپی توپ‌های اختصاصی آنتی‌بادی نوترکیب توسط پاراتوپ‌های موجود در آنتی بادی پلی کلونال در حال TAS-ELISA می‌باشد. نتایج تحقیقات قبلی با استفاده آنتی بادی‌های اختصاصی پروتئین NIb پوتی ویروس‌ها، نیز حاکی از کارآیی بالاتر روشPTA-ELISA نسبت به DAS-ELISA می‌باشد (Liu *et al*., 1999).

پس از استخراج فاژهای اختصاصی از کتابخانه فاژی و تعیین اختصاصیت اتصال آنها می‌توان از آنها برای تولید آنتی‌بادی منوکلونال علیه پروتئین پوششی ویروس تریستزای مرکبات و استفاده از ژن مربوطه جهت بیان در گیاه به منظور ایجاد مقاومت بر علیه بیماری تریستزا استفاده نمود.



شکل ٦- مقایسه واکنش فاژهای منتخب با گیاهان سالم و آلوده به روش TAS- ELISA و PTA- ELISA

Fig. 6- Comparison of selected phages reaction with healthy and infected plants by TAS-ELISA and PTA-ELISA

بیان ژن آنتی بادی در سلول‌های گیاهی می‌تواند به عنوان منبع ایجاد مقاومت بر علیه بیماری های گیاهی مورد استفاده قرار گیرد(Fischer *et al.*, 2001; Hiatt *et al.*, 1989). تولید آنتی بادی‌های اختصاصی در گیاه، پلانتی‌بادی، با قابلیت اتصال به اجزاء فعال و مؤثر بیمارگر از قبیل توکسین‌ها، آنزیم‌ها و پروتئین‌های حرکتی می‌تواند منجر به غیر فعال نمودن آنها در گیاه و در نهایت ممانعت از تکثیر پاتوژنها شوند که تحت عنوان مقاومت وابسته به آنتی بادی شناخته می‌شود. این روش می‌تواند به عنوان روش جایگزین جهت کنترل بیماری‌های گیاهی در نظر گرفته شود. اولین بار این راهبرد جهت تولید گیاه مقاوم به ویروس استفاده شد (Tavladoraki *et al.*, 1993). سپس این راهکار به صورت گسترده برای ایجاد مقاومت بر علیه انواع پاتوژن‌های گیاهی از قبیل *Tobacco mosaic virus*، *Beet necrotic yellow vein virus*, *Citrus tristesa virus*، *Potato virus Y*، *Tomato yellow leaf curl virus* و همچنین قارچ‌ها و فیتوپلاسماهای گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (Malembic-Maher *et al.*, 2005; Voss *et al.*, 1995; Fecker *et al.*, 1997; Safarnejad *et al.*, 2009; Cervera *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2000; Peschen *et al.*, 2004).

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از همکاری صمیمانه کارشناسان بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی و ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تشکر و قدردانی نمایند. این مقاله در چهار چوب حمایت مالی صورت گرفته توسط صندوق حمایت از پژوهشگران کشور صورت پذیرفته است.

References

ALAVI, V., B. KHATABI and G. H. SALEKDEH, 2005. Comparison of biologically distinct isolates of *Citrus tristeza virus* from Iran using major coat protein seq uences. Australian Plant Pathology 34(4): 577- 582.

AUSUBEL F. M., R. BRENT, R. E. KINGSTON, D. D. MOORE, J. G. SEIDMAN, J. A. SMITH and K. STRUHL (eds.) 1995. Current Protocols in Molecular Biology. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc, 3.1.1–3.1.21

BAR-JOSEPH M., S. M. GARNSEY and D. GONSALVES, 1979. The closterovirus, a distinct group of elongated plant viruses. Advances in Virus Research1979, 25: 93-168.

BORDBAR, M. S. T. and G. H. SALEKDEH, 2008. Production of polyclonal antibodies against *Citrus tristeza virus* by using recombinant protein technology. MSc dissertation. Tehran University.

CERVERA M., ESTEBAN O., M. GIL, M. T. GORRIS, M. C. MARTÍNEZ and L. PEÑA, 2010. Transgenic expression in citrus of single-chain antibody fragments specific to *Citrus tristeza virus* confers virus resistance. Transgenic Res; 19: 1001–15.

EBRAHIM-NESBEAT F. and F. NIENHAUS, 1978. Occurence of *Citrus tristeza virus* in Iran. Phytopathology, 85: 308–312.

FEBRES V. J., L. ASHOULIN, M. MAWASSI, A. FRANK, M. BAR-JOSEPH, K. L. MANJUNATH, R. F. LEE and C. L. NIBLETT, 1996. The p27 protein is present at the end of *Citrus tristeza virus* particles. Phytopathology, 86: 1331-1335.

FECKER, L. F., R. KOENIG and C. OBERMEIER, 1997. *Nicotiana benthamiana* plants expressing *beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) coat protein-specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection. Archive Virology

142: 1857-1863.

FISCHER R., N. EMANS and S. SCHILLBERG, 2001. Achieving plant disease resistance by antibody expression. Canadian Journal Plant Pathology; 23: 236–45.

HIATT, A., R. CAFFERKEY and K. BOWDISH, 1989. Production of antibodies in transgenic plants. Nature; 342:76–8.

KARASEV A. V., V. P. BOYKO, S. GOWDA, A. V.NIKOLAEVA, M. E. HILF, E. V. KOONIN, C. L. NIBLETT, K. CLINE, D. J. GUMPF, R. F. LEE, S. M. GARNSEY, D. J. LEWANDOWSKI and W.O. DAWSON. 1995. Complete sequence of *Citrus tristeza virus* RNA genome. Virology, 208:51-520.

KOONIN E. V. and V. V. DOLJA . 1993. Evolution and taxonomy of positive-strand viruses: Implications of comparative analysis of amino acid sequences. Critical Review of Biochemistry and Molecular Biology, 28: 375-430.

LIU, F., H. Jeske, J. Schubert and T. Frischmuth. 1999. Monoclonal and Recombinant Antibodies to Potyviral Proteins and Their Application. PhD thesis.Stuttgar university. 132 pp.

PESCHEN, D., H. P. LI, R. FISCHER, F. KREUZALER, and Y. C. LIAO, 2004. Fusion proteins comprising a Fusarium-specific antibody linked to antifungal peptides protect plants against a fungal pathogen. Nature Biotechnology, 22:732–738.

MALEMBIC-MAHER, S., F. LE GALL, J. L. DANET, F. D. BORNE, J. M. BOVE and M. GARNIER-SEMANCIK, 2005. Transformation of tobacco plants for single-chain antibody expression via apoplastic and symplasmic routes, and analysis of their susceptibility to stolbur phytoplasma infection. Plant Science, 168: 349-358.

SAFARNEJAD M. R., R. FISCHER and U. COMMANDEUR 2009. Recombinant-antibody-mediated resistance against *Tomato yellow leaf curl virus* in *Nicotiana benthamiana.* Archive Virology;154: 457–67.

SAFARNEJAD, M. R., G. S. JOUZANI, M. TABATABAIE, R. M. TWYMAN and S. SCHILLBERG, 2011. Antibody-mediated resistance against plant pathogens. Biotechnology Advances, 29: 961-971.

SHAFIEE V. and K. IZADPANAH. 1996. Report of *Citrus tristeza virus* in southern Iran. Iranian Journal of Plant Pathology, 32: 191.

SMITH G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science; 228:1315–7.

TAVLADORAKI, P., E. BENVENUTO, S. TRINCA, D. D. MARTINIS, A. CATTANEO and P. GALEFFI, 1993. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. Nature 366, 469-472.

VAUGHAN, T. J., A. J. WILLIAMS, K. PRITCHARD, J. K. OSBOURN, A. R. POPE, J. C. EARNSHAW, J. MCCAFFERTY, R. A. HODITS, J. WILTON and K. S. JOHNSON, 1996. Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. Nature. Biotechnology., 14 : 309- 314.

VOSS A, M. NIERSBACH, R. HAIN, H. HIRSCH, Y. LIAO and F. KREUZALER, 1995. Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full size antibody. Molecular Breeding; 1: 39–50.

WHALEY, S. R., D. S. ENGLISH, E. L. HU, P. F. BARBARA and A. M. BELCHER, 2000. "Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly." Nature 405: 665–668.

WILLATS, W. G. 2002. Phage display: practicalities and prospects. Plant Molecular Biology, 50837-854.

WINTER, G., A. D. GRIFFITHS, R. E. HAWKINS and H. R. HOOGENBOOM, 1994. Making antibodies by phage display technology. Annual Review of Immunology, 12: 433-455.

XIAO, X. W., P. W. G. CHU, M. J. FRENKEL, L. M. TABE, D. D. SHUKLA, P. J. HANNA, T. J. V. HIGGINS, W. J. MULLER and C. W. WARD, 2000. Antibody-mediated improved resistance to ClYVV and PVY infections in transgenic tobacco plants expressing a single-chain variable region antibody. Molecular. Breeding, 6: 421-431.