آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۵، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۶

تولید فاژهای پلی‌کلونال حاوی قطعات ژنی آنتی‌بادی اختصاصی باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* با استفاده از فن‌آوری نمایش فاژی

حمیده رئیسی[۱]، محمدرضا صفرنژاد[۲]✉، سید مهدی علوی[۳]، سید علی الهی‌نیا[۴] و ناصر فرخی[۵]

۱ و ۴- دانش آموخته دکتری و استاد، بخش گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت؛ ۲- دانشیار پژوهش، بخش ویروس شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران؛ ۳- استادیار پژوهش، بخش بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، تهران؛ ۵- دانشیار، گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

(تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۶)

چکیده

شانکر باکتریایی مرکبات از بیماری‌های باغات لیمو در جنوب کشور با عامل *Xanthomonas citri* subsp. *citri* می‌باشد. تکنیک فاژنمایی از راهکارهای تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی به منظور شناسایی گیاهان آلوده و همچنین تولید گیاهان مقاوم به بیماری است. در این تحقیق قابلیت استفاده از این سیستم برای تولید فاژهای نوترکیب حاوی قطعات آنتی‌بادی اختصاصی برعلیه باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات بررسی شد. برای این منظور، پروتئین تاثیرکننده (pthA) و پیلوس (HrpE) که از اجزای اساسی سیستم ترشحی نوع سه باکتری هستند و نقش ضروری در بیماری‌زایی پاتوژن دارند، به عنوان آنتی‌ژن انتخاب شدند. ابتدا پروتئین‌های pthA و HrpE به صورت نوترکیب در میزبان باکتریایی تولید شدند و با روش کروموتوگرافی خالص گردیدند. از کتابخانه های فاژی حاوی قطعات ژنی نواحی متغیر آنتی‌بادی برای جداسازی فاژهای اختصاصی استفاده شد. غنی‌سازی جمعیت فاژهای اختصاصی با انجام سه مرحله غربالگری بر علیه پروتئین های خالص شده pthA و HrpE انجام شد و اختصاصیت فاژهای حاصله بر علیه آنتی‌ژن توسط آزمون الیزا بررسی شد. فاژهای نوترکیب قابلیت اتصال به پروتئین‌های pthA و HrpE را داشته و قادر به ردیابی گیاهان آلوده به بیماری شانکر باکتریایی مرکبات نیز بودند. از فاژهای جداسازی شده می‌توان به منظور تولید آنتی‌بادی اختصاصی مونوکلونال استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: افکتور پروتئین pthA، پروتئین HrpE، شانکر باکتریایی مرکبات، غربالگری، نمایش فاژی.

Production of polyclonal phages harbouring antibody fragment genes against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* using phage display technology

H. Raeisi[1], M. R. Safarnejad[2]✉, S. M. Alavi[3], S. A. Elahinia[4] and N. Farokhi[5]

1 and 4. PhD student and Professor, Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences, Guilan University, Rasht; 2- Associate Professor, Department of Plant Viruses, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; 3- Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran; 5- Associate Professor, Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Life Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract

Citrus bacterial canker, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), is amongst the important diseases of lime orchards in southern parts of Iran. Phage display has been used to produce specific antibodies for detection of pathogen-infected plants as well as development of resistant varieties. An effector, namely pthA and a pilus protein, HrpE, the major critical components of type III secretion (T3S) system with roles in pathogenesis, were chosen as antigens. Recombinant forms of the proteins (pthA and HrpE) were expressed in a bacterial host and purified via affinity chromatography. Tomlinson phage display libraries including single chain variable fragments were used for isolation of the specific antibodies. Biopanning, 3 rounds against pthA and HrpE proteins, allowed enriching antigen-specific phages. The specificity of phages was tested using ELISA. Moreover, the phages were able to detect the plants infected with citrus bacterial canker.

Key words: Biopanning, citrus bacterial canker, effector protein pthA, HrpE protein, phage display.

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

مقدمه

ایران به دلیل شرایط جغرافیایی مناسب مقام هفتم تولید مرکبات را دارد (Ebrahimi, 2009). بیماری شانکر مرکبات، از جمله مهم‌ترین بیماری‌های است که اولین بار توسط Alizadeh and Rahimian (1990) در کهنوج دیده شد. باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات *Xanthomonas citri* subsp. *citri* می‌باشد (Schaad *et al*., 2006). این بیمارگر باعث آسیب به میوه‌ها، شاخه‌ها و برگ‌های گیاه شده و در صورت تشدید بیماری خشک شدن گیاه از نوک شاخه به سمت ریشه اتفاق می‌افتد (Duan *et al*., 1999; Pruvost *et al*., 2002; Gottwald *et al*., 2002; Jalan *et al*., 2013). سویه‌های این باکتری از نظر دامنه میزبانی متنوع هستند. ولی در دهه اخیر دو گروه با دامنه میزبانی محدود کشف شده‌اند که به عنوان A* و A^w نامگذاری شده‌اند (Sun *et al*., 2004; Verniere *et al*., 1998). فرم آسیایی (A*) این بیماری در ایران و روی میوه لیموترش گزارش شده است (Mostofizadeh-Ghalamfarsa and Rahimian., 1996) که منجر به افت بازارپسندی محصول علاوه بر افت عملکرد می‌گردد.

از جمله سازوکارهای بیماری‌زایی این باکتری می‌توان به سیستم ترشحی نوع سه اشاره نمود. نقص در سیستم ترشحی نوع سوم منجر به از دست رفتن توان بیماری‌زایی باکتری می‌شود (Cornelis and Van Gijsegem, 2000). بخش خارج سلولی سیستم ترشحی نوع سوم باکتری‌های پاتوژن گیاهی پیلوس Hrp است. در پاتوژن گیاهی این پیلوس به صورت نازک و طویل تکامل یافته است تا قادر به نفوذ در دیواره سلولی منفذدار گیاه شود (Koebnik, 2005). از طریق پیلوس، پروتئین‌های تاثیرکننده (Effector proteins) که نقش در بیماری‌زایی بیمارگر دارند، مانند پروتئین pthA وارد سلول میزبان می‌شوند. برای ایجاد علائم شانکر باکتریایی روی مرکبات وجود ژن *pthA* ضروری است (Swarup *et al*., 1992). انتقال این ژن به سایر زانتوموناده‌ها، توانایی القاء شانکرهای ناهنجار روی مرکبات و القاء واکنش فوق حساسیت (HR) در سایر میزبان‌ها را به آن‌ها می‌بخشد (Fujikawa *et al*., 2006; Jalan *et al*., 2013; Swarup *et al*., 1992).

در میان راهبردهای مورد استفاده در جهت مدیریت بیماری، تولید رقم مقاوم موثرترین روش پیش‌گیری بیماری می‌باشد. یک روش برای ایجاد گیاهان مقاوم در برابر عوامل بیماری‌زا، بیان آنتی‌بادی یا قطعات آنتی‌بادی در گیاه و تولید پلانتی بادی‌ها است که می‌توانند به اجزای پاتوژن که در بیماری‌زایی نقش دارند متصل شوند و در نتیجه از ایجاد بیماری جلوگیری شود (Tavladoraki *et al*., 1993). یکی از روش‌های تولید آنتی‌بادی، تکنیک نمایش فاژ است. نمایش فاژی در واقع تکنیک قدرتمندی جهت گزینش از میان میلیون‌ها پروتئین یا پپتید می‌باشد (Rakonjac *et al*., 2011). به عنوان یکی از کاربردهای موفقیت آمیز سیستم نمایش فاژی می‌توان به استفاده از آن در جداسازی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تحت عنوان آنتی‌بادی نوترکیب تک زنجیره‌ای متشکل از قطعات متغییر (scFv) از کتابخانه‌های بزرگ آنتی‌بادی‌های متصل به فاژ اشاره کرد (Hoogenboom and Chames, 2000; Weisser and Hall, 2009). یکی از فاژهای مناسب مورد استفاده در سیستم نمایش فاژی، فاژ M13 می‌باشد. کتابخانه scFv معمولاً بر اساس scFv متصل به PIII پروتئین پوششی فاژ رشته ای M13 ساخته می‌شوند و در نهایت قطعه scfv همراه با این پروتئین در سطح فاژ ظاهر می‌گردد (Sheets *et al*., 1998; Vaughan *et al*., 1996).

با توجه به نقش سیستم ترشحی سه در بیماریزایی بیمارگر، این تحقیق با هدف استفاده از پروتئین نوترکیب pthA و HrpE به عنوان آنتی‌ژن جهت تولید آنتی‌بادی نوترکیب علیه اجزای سیستم ترشحی سه طراحی شد.

روش بررسی

سویه‌های باکتری و سازه‌های بیانی: کتابخانه فاژی Tomlinson I&J (Source BioScience. UK) که حاوی قطعات ژنی نواحی متغیر آنتی‌بادی است، برای جداسازی فاژهای

اختصاصی مورد استفاده قرار گرفت. باکتری مورد استفاده در تحقیق حاضر جهت تکثیر کتابخانه فاژی، *Escherichia coli* سویه TG1 بود. در این تحقیق به منظور بیان ژن *pthA* از سازه بیانی pET28a-pthA که در تحقیقات قبلی تهیه شده بود استفاده گردید (Mokhtari *et al*., 2015). سازه pET28a-pthA حاوی قسمت انتهایی ژن تولید کننده افکتور پروتئین pthA است، که شامل ۶۰۶ جفت باز بوده و برای بیماری‌زایی پاتوژن ضروری است. سازه بیانی pET28a-HrpE به منظور تولید زیر واحدهای تشکیل پیلوس (HrpE) استفاده شد. این سازه حاوی ژن کد کننده پیلوس می‌باشد که در انتقال مستقیم افکتورهای بیمارگر به داخل سلول میزبان نقش دارد. پلاسمید pET28a(+) حاوی توالی شش‌تایی هیستیدین در قسمت N-ترمینال قطعه ژنی pthA وHrpE می‌باشند که با توجه به میل ترکیبی توالی شش‌تایی هیستیدین به ستون رزین نیکل سفارز شرایط تخلیص را بسیار تسهیل می‌نماید. سویه Rosetta باکتری *E. coli* به منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده شد.

تولید پروتئین نوترکیب: به منظور تولید پروتئین نوترکیب، کلنی‌های نوترکیب سویه Rosetta حاوی سازه‌های بیانی pET28a-pthA و pET28a-HrpE به صورت شبانه در محیط کشت LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامیسین (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) کشت داده شدند. پس از انجام کشت شبانه، تجدید کشت به نسبت ۱:۱۰۰ در ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامیسین (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) صورت گرفته و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری گردید. پس از ورود فاز رشدی باکتری به مرحله لگاریتمی (میزان جذب نوری محیط کشت در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ برسد) تحریک سلول‌های باکتری جهت تولید پروتئین نوترکیب با افزودن IPTG[1] در غلظت نهایی یک میلی‌مولار صورت گرفت. کشت باکتری به مدت یک شب در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد ادامه یافته و سپس جداسازی و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با روش کروماتوگرافی و با استفاده از ستون رزین نیکل سفارز (Ni^{2+}) انجام شد (Shahryari *et al*., 2013a). تایید بیان و خالص سازی پروتئین توسط ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد (SDS-PAGE) انجام شد (Ausubel *et al*., 1995).

تکثیر فاژ کمکی M13k017: به منظور تکثیر کتابخانه فاژی Tomlinson I&J از فاژ کمکی (Helper phage)، M13k017 استفاده گردید. برای تکثیر فاژ کمکی M13k017 از سویه TG1 باکتری *E. coli* استفاده شد. ابتدا فاژ کمکی به پنج میلی لیتر از کشت تازه باکتری در جذب نوری ۰/۴ در OD_{600nm} اضافه و به مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس تکان داده شد. سپس باکتری رسوب داده شده و در ۵۰۰ میلی لیتر محیط جدید حاوی کانامیسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حل گردیده و به صورت شبانه در شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس نگهداری گردید. با انجام سانتریفوژ سلول‌های باکتری حذف و از محلول رونشین برای جداسازی فاژ استفاده شد. خالص سازی فاژکمکی با روش مبتنی بر استفاده از PEG6000 انجام شد (Clackson *et al*., 1991).

تکثیر کتابخانه فاژی و تهیه فاژ: برای این منظور یک میلی‌لیتر از کتابخانه مورد نظر به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت 2YT حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین و گلوکز یک درصد اضافه شد و پس از رسیدن به جذب نوری ۰/۴ در OD_{600nm} فاژ کمکی با غلظت 2×10^{11} به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلیسیوس به حالت سکون قرار گرفت. محیط حاصل در دور ۳۰۰۰ به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شده و ته‌نشین حاصله به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط تازه حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی‌سیلین در میلی‌لیتر، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیترکانامیسین و گلوکز یک درصد منتقل و به مدت ۱۶ ساعت در دمایی ۳۰ درجه سلیسیوس و با دور ۲۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس، کشت شبانه باکتری در ۳۳۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و به ۸۰ میلی‌لیتر از رونشین،

۱-Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

۲۰ میلی‌لیتر PEG/NaCl (20% polyethylene glycol 6000, 2.5M NaCl) اضافه شد و در ۳۳۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل که حاوی فاژهای جداسازی شده است، در PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na_2HPO_4 1.8mM, KH_2PO_4 1.5mM) با pH ۷/۲ حل و سانتریفیوژ با دور ۱۱۶۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. رونشین حاوی فاژها جداسازی و برای کوتاه مدت در ۴ درجه سلیسیوس نگهداری شد (Barbas *et al*., 2001).

غربالگری کتابخانه فاژی (بیوپنینگ): پس از اطمینان از وجود جمعیت مورد نظر (10^{13}) در کتابخانه فاژی، فرایند غربالگری فاژ نوترکیب با استفاده از پروتئین نوترکیب انجام شد. برای انجام این کار ایمینوتیوپ (Nunc Inc, Denmark) به مدت ۱۶ ساعت با پروتئین نوترکیب با غلظت ۵۰μg/ml پوشش داده شد و بعد از سه بار شستشو با PBS، فضاهای خالی ایمینوتیوپ توسط شیر خشک بدون چربی ۲٪ (تهیه شده در PBS) طی دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس پوشش داده شد. پس از گذشت زمان مورد نظر، شستشو ایمینوتیوپ سه بار با PBS انجام شد. کتابخانه فاژی Tomlinson I&J با غلظت نهایی 10^{13} کلنی در هر میلی‌لیتر (cfu/ml) آماده و به ایمینوتیوپ اضافه شد. پس از گذشت دو ساعت، ۲۰ مرتبه ایمینوتیوپ به ترتیب با بافرهای PBS و PBS حاوی توئین ۰/۱ درصد (TWEEN 20) شستشو داده شد. در ادامه از محلول ۱۰۰ میلی مولار تری‌اتیل‌آمین در ایمینوتیوپ استفاده شد و به مدت ده دقیقه تکان داده شد و پس از گذشت زمان مورد نظر حذف شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر از محلول تریس یک میلی مولار به ایمینوتیوپ اضافه شد. بلافاصله محلول تریس اضافه شده به ایمینوتیوپ جمع‌آوری و به تیوپ استریل منتقل شد. محلول تریس جداسازی شده از ایمینوتیوپ حاوی فاژهای متصل شده به پروتئین نوترکیب استفاده شده در ایمینوتیوپ بود. برای تکثیر فاژ جداسازی شده، ۵۰۰ میکرولیتر از فاژ به ۱۲ میلی‌لیتر از سویه TG1 باکتری *E. coli* با جمعیت ۰/۴ در جذب نوری (OD_{600}) منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس جهت ایجاد آلودگی قرار گرفت. پس از گذشت زمان ذکر شده محلول باکتریای در ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب در ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع حل شد و روی محیط کشت جامد حاوی گلوکز ۱٪ و آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰میکروگرم در میلی لیتر کشت و ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس قرار گرفت. کلنی‌های رشد کرده روی محیط کشت، جمع آوری و جهت تکثیر فاژهای منتقل شده به باکتری استفاده شدند (Krebber *et al*., 1997). از فاژ تکثیر شده در این مرحله در دور بعدی غربالگری استفاده شد (Barbas *et al*., 2001). با تکرار فرایند غربال‌گری فاژهایی که به طور غیر اختصاصی به ایمینوتیوپ متصل شده بودند حذف گردیدند و فاژهای با اختصاصیت اتصال بالا باقی ماندند. پس از هر دور غربالگری، مرحله تیتراسیون جهت تخمین تعداد فاژهای حاصله انجام شد (Ausubel *et al*., 1995).

بررسی اختصاصیت فاژهای نوترکیب: جهت بررسی اختصاصیت فاژهای جداسازی شده از آزمون الیزا غیر مستقیم (PTA-ELISA) استفاده شد. برای این منظور ابتدا بشقابک الیزای ۹۶ چاهکی با آنتی‌ژن نوترکیب با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پوشش داده شد. سپس، پلیت الیزا به مدت یک شب در چهار درجه سلیسیوس قرار گرفت. در ادامه پلیت الیزا با بافر PBS سه بار شستشو شد و سپس چاهک‌ها با شیر خشک بدون چربی ۲٪ به مدت دو ساعت پوشش داده شدند و مجدداً شستشوی چاهک‌ها با PBS انجام شد. پس از شستشو، در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت 10^{-1} از فاژهای حاصل از هر دور غربالگری کتابخانه فاژی، ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای محیط قرار گرفت. سپس پلیت الیزا سه بار با PBS حاوی توئین ۰/۱ شسته و چاهک‌ها با آنتی‌بادی anti-M13 متصل به HRP (Abcam, UK) به غلظت ۱:۵۰۰۰ پوشش داده شدند و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. در مرحله بعد مجدداً چاهک‌ها با PBS

حاوی توئین ۰/۱ شستشو و در نهایت سوبسترا ABTS[۲] (Fermentase, Lithuania) به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی قرار گرفت. جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری و ثبت شد.

توانایی فاژهای نوترکیب در ردیابی گیاهان آلوده به بیماری شانکر مرکبات: فاژهای جداسازی شده از مراحل مختلف غربالگری کتابخانه فاژی (بیوپنینگ) جهت سنجش واکنش با گیاه سالم و آلوده در آزمون الیزای غیر مستقیم PTA-ELISA استفاده شدند. به این صورت که ابتدا چاهک‌های پلیت الیزا به طور مستقیم با عصاره گیاه سالم لیموترش و گیاه لیموترش آلوده به باکتری XCC سویه ۸۸ (*Xanthomonas citri* subsp *citri*) (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) پوشش داده شد و پلیت به مدت ۱۶ ساعت در چهار درجه سلیسیوس قرار گرفت. پس از شستشو، در هر چاهک غلظت 10^{-1} از فاژهای حاصل از هر دور غربالگری کتابخانه فاژی، ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای محیط قرار گرفت و با استفاده از آنتی‌بادی anti-M13 متصل به HRP و در حضور سوبسترا ABTS جذب نوری چاهک‌ها در ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد.

پس از انجام تجزیه واریانس داده‌ها، مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۹۵٪ ($P\leq0.05$) انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتیجه و بحث

تولید پروتئین نوترکیب: در این تحقیق جهت تولید پروتئین نوترکیب از سازه‌های pET28a- pthA و pET28a-HrpE استفاده شد. بیان ژن در سازه‌های مورد نظر در سویه Rosseta باکتری *E. coli* صورت پذیرفت. این سویه دارای tRNA های برای کدون‌های نادر بوده که باعث بیان انواع پروتئین‌ها در باکتری می‌شود و در نتیجه دارای توانایی تولید پروتئین نوترکیب با کارایی بالاتر نسبت به سایر سویه های بیانی است. از جمله مزایایی این سیستم بیانی می‌توان به میزان بالای بیان پروتئین نوترکیب، قدرت بالا جهت پذیرش ژن‌های بیگانه و همچنین بهبود عملکرد پروتئین اشاره نمود (Fu *et al*., 2007; Rosano and Ceccarelli, 2014). همچین پروتئین بیان شده در سویه Rosetta نسبت به سایر سویه‌های بیانی مانند سویه BL21 دارای خلوص بیشتری است (Tegel *et al*., 2010).

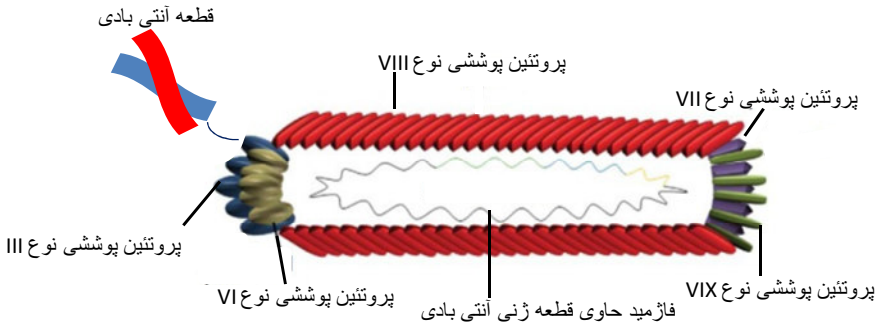
خالص سازی پروتئین نوترکیب بر روی ستون حاوی یون نیکل صورت پذیرفت و نتایج حاصله حاکی از خلوص مناسب پروتئین های نوترکیب می‌باشد. غلظت پروتئین‌های نوترکیب حاصله با روش مقایسه با پروتئین استاندارد در حدود ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تخمین زده شد.

از پروتئین های نوترکیب خالص HrpE و pthA، به صورت جداگانه به عنوان آنتی‌ژن جهت جداسازی فاژهای اختصاصی ازکتابخانه فاژی استفاده شد.

تهیه، تکثیر و غربالگری کتابخانه فاژی: کتابخانه‌های فاژی حاوی قطعات ژنی نواحی متغیر آنتی‌بادی به صورت متداول برای تولید آنتی‌بادی اختصاصی نوترکیب علیه انواع مختلف آنتی‌ژن‌ها استفاده می‌شود. در این کتابخانه، فاژ نوترکیب حاوی قطعه آنتی‌بادی نوترکیب متصل به پروتئین پوششی فاژ بوده که همراه با پروتئین پوششی در سطح فاژ ظاهر می‌شود (شکل ۱).

جهت تکثیر کتابخانه فاژی از سویه TG1 باکتری *E. coli* استفاده شد و پس از تکثیر، جداسازی و خالص‌سازی فاژ انجام شد. جمعیت فاژ در تمام مراحل غربالگری 10^{13} کلنی در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. غربالگری فاژهای متصل به پروتئین نوترکیب طی سه دور انجام شد و فاژ خالص شده از هردور برای دور بعدی غربالگری مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی صحت مراحل غربالگری پس از هر دور غربالگری، جمعیت فاژ به دست مده با استفاده از روش تیتراسیون مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).

۲- 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)



شکل ۱- فاژ نوترکیب حاوی قطعه آنتی‌بادی نوترکیب متصل به انتهای N-ترمینال پروتئین پوششی نوع III؛ (Kierny *et al*., 2012)

Fig. 1. recombinant phage contains recombinant antibody fragment fused to the N-terminus of coat protein III; (Kierny *et al*., 2012)

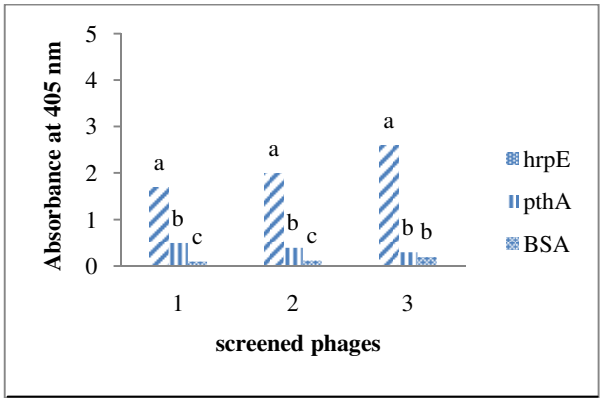
جدول ۱- جمعیت فاژهای به دست آمده از کتابخانه I* پس از انجام مراحل بیوپنینگ بر علیه آنتی‌ژن‌های PTHA و HRPE

Table 1. Titers of phage libraries I eluted after biopanning processes against pthA and hrpE

Output phage	Input phage	Panning rounds	Phage dislay library (Tomlinson I)
$2.4*10^4$	10^{13}	1	
$3.8*10^5$	10^{13}	2	pthA
$7.4*10^6$	10^{13}	3	
$2.6*10^4$	10^{13}	1	
$4*10^5$	10^{13}	2	HrpE
$7.9*10^6$	10^{13}	3	

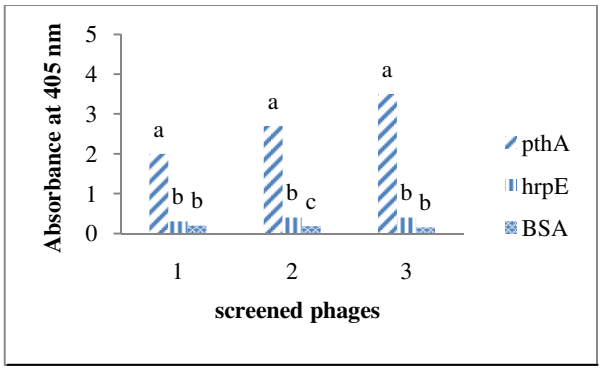
افزایش جمعیت فاژهای اختصاصی متصل شده به پروتئین نوترکیب پس از هر دور غربالگری موید انجام تکثیر و افزایش تعداد کلون‌های اختصاصی مثبت متصل شونده به آنتی‌ژن و صحت اجرای مراحل غربالگری می‌باشد. این تکنیک بسیار سریع و کارآمد است و به طور معمول با استفاده از آنتی‌ژن هدف که بر روی ایمنوتیوب پوشش داده شده است، به راحتی و در مدت زمان کم می‌توان آنتی‌بادی اختصاصی را بدست آورد (Coomber, 2002).

بررسی اختصاصیت فاژهای نوترکیب: اختصاصی بودن اتصال فاژهای حاصل از دور اول تا سوم غربالگری به پروتئین نوترکیب توسط آزمون الیزا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پس از هر دور غربالگری اختصاصیت فاژها افزایش یافت و میزان جذب در آزمون الیزا در دور سوم غربالگری بالاتر از دو دور قبلی بود. این بدین معناست که فاژهای حاصله به خوبی قادر به اتصال با پروتئین نوترکیب هستند (شکل ۲ و شکل ۳). با توجه به شکل ۲ در مراحل غربالگری، آنتی‌بادی‌های با تمایل بالا نسبت آنتی‌ژن HrpE از میان مجموعه وسیعی از آنتی‌بادی‌ها انتخاب و تکثیر شدند. روند افزایشی مشاهده شده در دور سوم نشان دهنده افزایش اختصاصیت جمعیت فاژهای جداسازی شده می‌باشد.در اینجا از BSA و پروتئین PthA به عنوان کنترل منفی استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد فاژهای جداسازی شده میل ترکیبی پایینی با BSA و پروتئین pthA دارند، که این موضوع نیز اختصاصیت فاژها در اتصال به پروتئین HrpE را تایید می‌کند (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه ضریب جذب نوری در ۴۰۵ نانومتر فاژهای حاصل از بیوپنینگ کتابخانه Tomlinson I بر ضد پروتئین نوترکیب HrpE. محور افقی شامل فاژهای حاصل از دور اول(۱)، دوم(۲) و سوم(۳). BSA (سرم آلبومین گاوی) و pthA به عنوان کنترل منفی استفاده شدند. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین نمونه‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).

Fig. 2. Comparison of optical density in 405 nm from phages obtained in biopanning processes of Tomlinson I against HrpE. x axis: phages from the 1st, 2nd and 3rd rounds of biopanning. BSA and pthA protein used as a negative control. Different letters indicate significant differences between samples ($P < 0.05$).

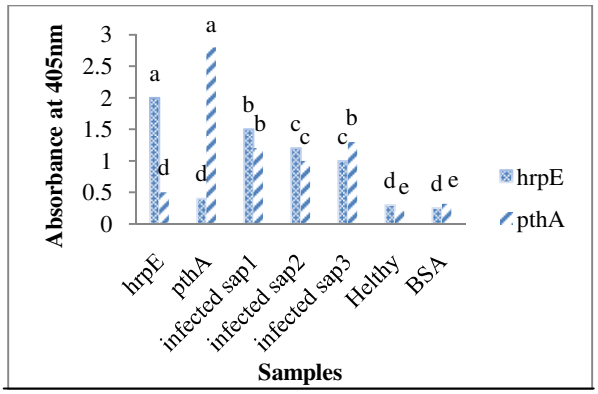


شکل ۳- مقایسه ضریب جذب نوری در ۴۰۵ نانومتر فاژهای حاصل از بیوپنینگ کتابخانه Tomlinson I&J بر ضد پروتئین نوترکیب PthA. محور افقی شامل فاژهای حاصل از دور اول (۱)، دوم (۲) و سوم (۳). BSA (سرم آلبومین گاوی) و HrpE به عنوان کنترل منفی استفاده شدند. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین نمونه‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).

Fig. 3. Comparison of optical density in 405 nm from phages obtained in biopanning processes of Tomlinson I against pthA. The horizontal axis contains the phages from the 1st , 2nd and 3rd round of biopanning. BSA and HrpE protein used as a negative control. Different letters indicate significant differences between samples ($P < 0.05$).

بررسی مراحل مختلف غربالگری برای ارزیابی توان اتصال آنتی‌ژن pthA به فاژهای جداسازی شده از کتابخانه فاژی نیز، نشان دهنده روند افزایشی جمعیت فاژ در هر دور غربالگری بود. روند افزایشی جمعیت فاژ در هر دور غربالگری و میل ترکیبی پایین فاژهای جداسازی شده در اتصال به BSA و پروتئین HrpE، نیز اختصاصیت فاژها در اتصال به پروتئین pthA را تایید کرد (شکل ۳).

توانایی فاژهایی نوترکیب **در ردیابی گیاهان آلوده به بیماری شانکر مرکبات:** جهت بررسی توانایی فاژهای حاصل برای تشخیص گیاهان آلوده آزمون الیزا به روش PTA-ELISA انجام شد. جهت انجام این آزمون از فاژهای که قابلیت اتصال بالا با آنتی‌ژن HrpE و pthA را داشتند، به طور جدا گانه استفاده شدند و توانایی فاژهای جداسازی شده بر ضد HrpE و pthA در ردیابی مستقیم گیاهان آلوده سنجیده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که فاژهای اختصاصی جدا شده بر ضد هر دو پروتئین HrpE و pthA به خوبی قادر به ردیابی نمونه‌های آلوده گیاهی می‌باشند و ضریب جذب نوری چاهک‌های حاوی عصاره گیاهی آلوده نسبت به کنترل منفی دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴- بررسی فاژهای پلی کلونال حاوی قطعات آنتی‌بادی اختصاصی جهت شناسایی گیاهان آلوده به روش PTA-ELISA. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین نمونه‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).

Fig. 4. Specificity of selected polyclonal phages for detection of infected plants by PTA-ELISA. Different letters indicate significant differences between samples ($P < 0.05$).

در دهه‌های گذشته، گزارش‌های مختلفی از شناسایی و ردیابی گونه‌های مختلف *Xanthomonas* sp. به وسیله روش‌های سرولوژیک و یا روش‌های مبتنی بر PCR صورت گرفته است (Fang and Ramasamy, 2015). استفاده از روش‌های مختلف PCR بر اساس قطعات مختلف از ژنوم باکتری (Gottwald *et al*., 2001; Coletta-Filho *et al*., 2006; Rigano *et al*., 2010) و همچنین توسعه روش Real-time-PCR به ردیابی سریع پاتوژن در گیاه آلوده کمک می‌کند. این روش‌ها با وجود حساسیت بسیار و دقت بالا، نیازمند تجهیزات آزمایشگاهی می‌باشند و قابل استفاده در همه شرایط و آزمایشگاه‌ها نمی‌باشند (Cubero and Graham, 2005; Mavrodieva *et al*., 2004). در میان روش‌های شناسایی سرولوژیک، تکنیک الیزا از روش‌های معمول برای ردیابی پاتوژن در گیاهان است. این روش قابل اعتماد و کارآمد بوده و بر پایه کاربرد آنتی‌بادی‌های اختصاصی در تشخیص پاتوژن می‌باشد (Fang and Ramasamy, 2015). جهت تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی می‌توان از تکنیک نمایش فاژی استفاده نمود. با استفاده از سیستم نمایش فاژی می‌توان آنتی‌بادی‌هایی با تمایل بالا نسبت به آنتی‌ژن مورد نظر را از میان مجموعه وسیعی از آنتی بادی‌ها انتخاب و تکثیر کرد. آنتی‌بادی‌های scFv دارای مزیت‌هایی می‌باشند. از جمله، غلبه بر مشکل تفکیک VH و VL که اغلب در قطعات FV با آن مواجه می‌شویم. با استفاده از آنتی‌بادی‌های scFv امکان تهیه ملکول‌های فعال ایمونولوژیک با اندازه کوچک به میزان فراوان و با خلوص بالا و هزینه کم فراهم می‌شود که به آسانی از نظر ژنتیکی قابل دستکاری می‌باشد (Safarnejad *et al*., 2011). درکتابخانه‌های آنتی‌بادی‌های نوترکیب امکان بیان کتابخانه‌های اختصاصی برای انواع آنتی‌ژن وجود دارد. همچنین می‌توان کتابخانه‌های نوترکیب را به شکل cDNA نگهداری کرد و در آینده مجددا آن را غربال نمود و در تهیه آنتی‌بادی‌های منوکلونال از آن استفاده نمود (Berry, 2005).

با توجه به توانایی بالای که فاژهای جدا شده در اتصال و ردیابی پروتئین نوترکیب دارند می‌توان از این فاژها برای تولید آنتی‌بادی منوکلونال علیه پروتئین‌های مرتبط با سیستم ترشحی نوع سوم باکتری استفاده کرد و با انتقال ژن کد کننده آنتی‌بادی به سلول گیاه و بیان در سلول‌های گیاهی از ایجاد و پیشرفت بیماری جلوگیری کرد (Shahryari *et al*., 2013b; Fischer *et al*., 2001). همچنین می‌توان با اتصال قطعات آنتی‌بادی به پروتئین‌های موثر در بیماریزایی پاتوژن‌ها، باعث غیر فعال کردن عوامل بیماریزا در گیاهان شد. اثربخشی این استراتژی مرتبط با میل ترکیبی آنتی‌بادی با پروتئین هدف است (Huang *et al*., 2011; Le Gall *et al*., 1998). از آنجایی‌که تکنولوژی نمایش فاژی دارای قدرت غربالگری و آنالیز قوی می‌باشد، جایگزین روش‌های دیگری مانند تکنولوژی هیبریدوما برای تولید آنتی‌بادی مونوکلونال شده است (Schirrmann *et al*., 2011; Hu *et al*., 2012).

References

ALIZADEH, A. and H. RAHIMIAN, 1990. Citrus canker in Kerman province. Iran Journal. Plant Pathology, 26: 42. (in persian with english summary)

AUSUBEL, F., R. BRENT, R. KINGSTONE, D. MOORE, J. G. SEIDMAN, J. A. SMITH and K. STRUHL, 1995. Current Protocols in Molecular Biology. 4648 Pp. New York, Wiley Interscience.

BARBAS, C. F., D. R. BURTON, J. K. SCOTT and G. J. SILVERMAN, 2001. Phage Display: A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

BERRY, J. D. 2005. Rational monoclonal antibody development to emerging pathogens, biothreat agents and agents of foreign animal disease: The antigen scale. The Veterinary Journal, 170: 193–211.

CLACKSON, T., H. R. HOOGENBOOM, A. D. GRIFFITHS and G. WINTER, 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. Nature, 352 (6336): 624-628.

COLETTA-FILHO, H. D., M. A. TAKITA, A. A. SOUZA,

J. R. NETO, S. A. DESTEFANO, J. S. HARTUNG and M. A. MACHADO, 2006. Primers based on the rpf gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. Journal Application Microbiology, 100:279-285.

CORNELIS, G. R. and F. VAN GIJSEGEM, 2000. Assembly and function of type III secretory systems. Annual Review of Microbiology, 54: 735-774.

COOMBER, D. W. J. 2002. Panning of Antibody Phage-Display Libraries. In: O'Brien, P.M., R. Aitken, (eds) Antibody Phage Display. Methods in Molecular Biology, 178:133-45.

CUBERO, J. and J. H. GRAHAM, 2005. Quantitative real-time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate xanthomonas strains on citrus. Phytopathology, 95:1333-1340.

DUAN, Y. P., A. L. CASTANEDA, G. ZHAO, G. ERDOS, and D. W. GABRIEL, 1999. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. Molecular. Plant Microbe Interaction, 12: 556 – 560

EBRAHIMI, Y. 2009. Citrus situation in Iran. Ministry of Jihad e Agriculture. pP39, (In Farsi)

FANG, Y. and R. P. RAMASAMY, 2015. Current and prospective methods for plant disease detection. Biosensors, 4: 537–561.

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

FU, W., J. LIN and P. CEN, 2007. 5-Aminolevulinate production with recombinant Escherichia coli using a rare codon optimizer host strain. Applied Microbiology and Biotechnology, 75:777-782.

FUJIKAWA, T., H. ISHIHARA, J. E., LEACH and S. TSUYUMU, 2006. Suppression of defense response in plants by the *avrBs3/PthA* gene family of *Xanthomonas* spp. Molecular. Plant Microbe Interaction. 19: 342–349.

GOTTWALD, T. R., G. HUGHES, J. H. GRAHAM, X. SUN and T. RILEY, 2001. The citrus canker epidemic in Florida: the scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. Phytopathology, 91:30-34.

GOTTWALD, T. R., J. H. GRAHAM and T. S. SCHUBERT, 2002. Citrus Canker: The pathogen and its impact. Plant Health Progress, DOI:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.

HOOGENBOOM, H. R. and P. CHAMES, 2000. Natural and designer binding sites made by phage display technology. Immunology Today, 21: 371–378.

HU, Z. Q., J. L. LIU, H. P. LI, S. XING, S. XUE, J. B. ZHANG, J. H. WANG, G. NoLKE and Y. C. LIAO, 2012. Generation of a highly reactive chicken-derived single-chain variable fragment against *Fusarium verticillioides* by phage display. International Journal of Molecular Sciences, 13(6): 7038–7056.

HUANG, J., B. RU and P. DAI, 2011. Bioinformatics resources and tools for phage display. Molecules, 16: 694–709.

JALAN, N., D. KUMAR, M. O. ANDRADE, F. YU, J. B. JONES, J. H. GRAHAM, F. F. WHITE, J. C. SETUBAL and N. WANG, 2013. Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. BMC Genomics, 14:551.

KIERNY, R. M., T. D CUNNINGHAM and B. K. KAY, 2012. Detection of Biomarkers Using Recombinant Antibodies Coupled to Nanostructured Platforms. Nano Reviews, 3: 17240.

KOEBNIK, R. 2005. The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria* with pepper host plants. Journal of Bacteriology, 187: 24587

KREBBER, A., S. BORNHAUSER, J. BURMESTER, A. HONEGGER, J. WILLUDA, H. R. BOSSHARD, 1997. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. Journal of Immunological Methods, 201: 35-55.

LE GALL, F., J. M. BOVE and M. GARNIER, 1998.

SCHILLBERG, 2011. Antibody-mediated resistance against plant pathogens. Biotechnology Advances, 29 (6): 961–971.

SCHAAD, N. W., E. POSTNIKOVA, G. LACY, A. SECHLER, I. AGARKOVA, P. E. STORMBERG, V. K. STORMBERG and A. K. VIDAVER, 2006. Emended classification of Xanthomonad pathogens on citrus. Systemaic and Applied Microbiology, 29: 690–695.

SCHIRRMANN, T., T. MEYER, M. SCHUTTE, A. FRENZEL and M. HUST, 2011. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. Molecules, 16: 412-426.

SHAHRYARI, F., M. SHAMS-BAKHSH, M. R. SAFARNEJAD, N. SAFAIEE and S. ATAIE KACHOIEE, 2013a. Preparation of polyclonal antibody against Immunodominant membrane protein (IMP) of Candidatus Phytoplasma aurantifolia. Iranian Journal of Biotechnology, 11: 14-21.

SHAHRYARI, F., M. R. SAFARNEJAD, M. SHAMS-BAKHSH, G. NOLKE and S. SCHILLBERG, 2013b. Generation and expression on plants of a single-chain variable fragment antibody against the immunodominant membrane protein of Candidatus Phytoplasma aurantifolia. Journal of Microbiology and Biotechnology, 23(8): 1047-1054.

SHEETS, M. D., P. AMERSDORFER, R. FINNERN, P. SARGENT, E. LINDQUIST, R. SCHIER, G. HEMINGSEN, C. WONG, J. C. GERHART, J. D. MARKS and E. LINDQUIST, 1998. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. Proceedings of the National Acadamy of Science, 95: 6157-6162.

SWARUP, S., Y. YANG, M. T. KINGSLEY and D. W. GABRIEL, 1992. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, PthA, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. Molecular. Plant Microbe Interaction, 5: 204–213.

SUN, X., R. E. STALL, J. B. JONES, J. CUBERO, T. R. GOTTWALD, J. H. GRAHAM, W. N. DIXON, T. S. SCHUBERT, P. H. CHALOUX, V. K. STROMBERG, Engineering of a single-chain variable-fragment (scfv) antibody specific for the stolbur phytoplasma (mollicute) and its expression in *Escherichia coli* and tobacco plants. applied and environmental microbiology, 64: 4566–72.

MAVRODIEVA, V., L. LEVY and D. W. GABRIEL, 2004: Improved sampling methods for realtime polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. Phytopathology, 94:61-68.

MOKHTARI, M., M. R. SAFARNEJAD, S. M. ALAVI and A. TORKAMANZEHI, 2015. Isolation, gene expression and PthA effector protein production of Xanthomonas citri subsp citri causal agent of citrus bacterial canker. Journal of Agricultural Biotechnology, 7(2): 155-170. (In persian with english summary)

MOSTOFIZADEH-GHALAMFARSA, R. and H. RAHIMIAN, 1996. Incidence of the Asiatic form of citrus canker in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology, 32: 189 (short report).

PRUVOST, O., B. BOHER, C. BROCHERIEUX, M. NICOLE and F. CHIROLEU, 2002. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in leaf lesions under tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculums. Phytopathology, 92: 336–346.

RAKONJAC, J., N. J. BENNETT, J. SPAGNUOLO, D. GAGIC and M. RUSSEL, 2011. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. Current Issues in Molecular Biology, 13: 51–57.

RIGANO, L. A., M. R. MARANO, A. P. CASTAGNARO, A. M. D. AMARAL and A. A. VOJNOV, 2010. Rapid and sensitive detection of citrus bacterial canker by loop-mediated isothermal amplification combined with simple visual evaluation methods. BMC Microbiology, 10: 176.

ROSANO, G. L. and E. A. CECCARELLI, 2014. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Frontiers in Microbiology, 5: 172.

SAFARNEJAD, M. R., G. R. SALEHI JOUZANI, M. TABATABAIE, R. M. TWYMAN and S.

G. H. LACY and B. D. SUTTON, 2004. Detection and character ization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. Plant Diseases, 88: 1179–1188.

TAVLADORAKI, P., E. BENVENUTO, S. TRINCA, D. DE MARTINIS, A. CATTANEO and P. GALEFFI, 1993. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. Nature, 366: 469–72.

TEGEL, H., S. TOURLE, J. OTTOSSON and A. PERSSON, 2010. Increased levels of recombinant human proteins with the Escherichia coli strain Rosetta (DE3). Protein Expression and Purification, 69:159-167.

WEISSER, N. E. and J. C. HALL, 2009. Applications of single-chain variable fragment antibodies intherapeutics and diagnostics. Biotechnology Advances, 27: 502-20

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 sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. Nature Biotechnology. 14: 309-314.

VERNIERE, C., J. S. HARTUNG, O. P. PRUVOST, E. L. CIVEROLO, A. M. ALVAREZ, P. MAESTRI and J. LUISETTI, 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. European Journal of Plant Pathology, 104: 477–487.