ژنتیک نوین
دوره ششم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰
صفحه ۳۴-۲۷

Downloaded from mg.genetics.ir at 10:30 +0330 on Monday October 26th 2020

بیان پروتئین پوششی و پروتئین غیرساختمانی NS4 ویروس نوارک ایرانی گندم در باکتری *Escherichia coli*

ساره شهدائی[۱]، جهانگیر حیدرنژاد*[۲]، کرامت‌الله ایزدپناه[۳]، حسین معصومی[۴]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲و۴- دانشیاران بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۳- استاد بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jheydarnejad@mail.uk.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱)

چکیده

ویروس نوارک ایرانی گندم (Iranian wheat stripe virus, IWSV) عضو غیر قطعی جنس *Tenuivirus* است. از مهمترین پروتئین‌های کد شونده توسط تنوئی ویروس‌ها، پروتئین پوششی (CP) و پروتئین عمده غیرساختمانی (NS4) می‌باشند و آنتی بادی‌های تهیه شده بر علیه آنها می‌توانند برای ردیابی ویروس در طبیعت و بررسی وظایف این ژن‌ها مورد استفاده قرار گیرند. تهیه آموده خالص این پروتئین‌ها از گیاه مبتلا اغلب با اشکال روبرو است. در این مطالعه به منظور بیان ژن‌های *cp* و *ns4* ویروس فوق، هر کدام از این دو ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و پس از همسانه سازی به ناقل pET 28a انتقال داده شد. پلاسمیدهای نوترکیب در تراریختی باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) استفاده گردید و سلول‌های باکتری نوترکیب در محیط کشت حاوی IPTG جهت القاء بیان ژن‌های هدف کشت شدند. پس از القای بیان، پروتئین‌های سنتز شده به منظور شناسائی، استخراج شدند. نتایج حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE دو نوار را با وزن مولکولی ۴۰/۹ و ۲۳ کیلودالتون نشان داد که منطبق با وزن مولکولی محصولات بالقوه‌ای است که توسط دو ژن مزبور در دیگر تنوئی ویروس‌ها تولید می‌شوند. تجزیه وسترن بلات بیان پروتئین‌های CP و NS4 را با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال اختصاصی تائید نمود. چنین پروتئین‌هائی در مقیاس وسیع و با خلوص زیاد می‌توانند در سیستم میکروبی تولید شوند و برای تهیه آنتی بادی‌های اختصاصی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن،
پروتئین پوششی،
پروتئین غیرساختمانی،
تنوئی ویروس،
ویروس نوارک ایرانی گندم

Downloaded from mg.genetics.ir at 10:30 +0330 on Monday October 26th 2020

مقدمه

اعضای جنس تنوئی ویروس سبب ایجاد بیماری‌های مهم اقتصادی در گیاهان خانواده گندمیان (*Poaceae*) مانند گندم، برنج و ذرت شده و شیوع آنها بیشتر در آسیای جنوب شرقی، امریکای شمالی و جنوبی، آفریقا و استرالیا می باشد. انتقال این ویروس‌ها توسط زنجرک های خانواده *Delphacidae* با رابطه پایا و تکثیری صورت می گیرد (۱۰). باستثنای ویروس کوتولگی چمنی برنج (*Rice grassy stunt virus*, RGSV) که ژنوم آن حاوی شش قطعه آر.ان.ای آمبی سنس (Ambisense) است (۲۶)، ژنوم بقیه تنوئی ویروس‌ها از ۵-۴ قطعه آر.ان.ای آمبی سنس و یا با قطبیت منفی تشکیل شده است. بسته به گونه ویروس، ژنوم آنها بطور بالقوه قادر به تولید ۱۲-۷ پروتئین می‌باشند (۱۳، ۱۰). باستثنای RGSV، در بقیه تنوئی ویروس‌ها ژن‌های مربوط به هر کدام از دو پروتئین پوششی (cp) و غیر ساختمانی (ns4) به ترتیب روی رشته مکمل ویروسی قطعه سوم (vcRNA3) و رشته ویروسی قطعه چهارم (vRNA4) قرار گرفته‌اند (۱۰). در RGSV قطعات RNA5 و RNA6 به ترتیب معادل قطعات RNA3 و RNA4 در سایر تنوئی ویروس‌هاست (۲۶، ۲۵). مطالعات مختلف به ویژه تولید آنتی بادی اختصاصی، تهیه آموده خالص پروتئین ویروس‌ها را ایجاب می‌کند. برای تهیه هر کدام از پروتئین‌های تنوئی ویروس‌ها از روش‌های مختلفی از جمله جدا سازی پروتئین از بافت آلوده یا ویروس خالص سازی شده و یا بیان ژن در باکتری *E. coli* و استخراج آن استفاده شده است (۲۴، ۲۲، ۲۱، ۱۷، ۱۵، ۹-۵، ۱). روش استفاده از بافت آلوده یا ویروس خالص سازی شده گرچه ممکن است برای انجام تحقیقات روزمره کافی باشد، اما پروتئین‌های بدست آمده اغلب از خلوص کافی برخوردار نیستند. در مقایسه، روش بیان پروتئین در باکتری بصورت نوترکیب، بدلیل خلوص بالای پروتئین استخراج شده برای پژوهش‌های دقیق، دارای کارائی بالاتری می‌باشد. بعنوان مثال پروتئین‌های P2 و P5 در RGSV به منظور بررسی وظایف ژن-های مربوطه در باکتری *E. coli* بیان شده و نقش آنها مورد مطالعه قرار گرفته است (۶، ۵).

ویروس نوارک ایرانی گندم (IWSV) اولین بار در سال ۱۳۶۸ از زنجرک‌های آلوده *Unkanodes tanasijevici* به گندم انتقال داده شد و تاکنون علاوه بر گندم، آلودگی طبیعی برنج نیز به این ویروس گزارش شده است (۱۵، ۴). ژنوم این ویروس حاوی چهار قطعه آر.ان.ای می‌باشد که قطعات دوم، سوم و چهارم آن آمبی سنس و قطعه اول آن دارای قطبیت منفی است (۱۴، ۳). در مطالعات قبلی، چندین پروتئین ویروس نوارک ایرانی گندم مورد مطالعه قرار گرفته است. بعنوان نمونه به منظور اثبات ماهیت آمبی سنس بعضی از قطعات ژنومی آن و یا بررسی پتانسیل تولید پروتئین، ژن‌های موجود برروی قطعات vcRNA3، vRNA4 و vcRNA4 در شرایط *in vitro* به mRNA تبدیل و سپس با استفاده از عناصر علامت گذاری شده، در مقادیر اندک به پروتئین‌های CP، NS4 و PC4 ترجمه شده است (۱۶). علاوه بر این، پروتئین‌های CP و NS4 ویروس فوق نیز از بافت آلوده جدا سازی و خالص گردیده و آنتی بادی پلی کلونال بر علیه آنها تهیه شده است (۱۵، ۱). بیان پروتئین‌های مهم در سیستم‌های میکروبی، امکان تولید آنها در مقیاس بزرگ و عاری از آلودگی با سایر پروتئین‌ها بخصوص برای تولید آنتی بادی را فراهم می‌کند. در این تحقیق پروتئین‌های CP و NS4 ویروس نوارک ایرانی گندم به منظور امکان تهیه پروتئین‌هائی با خلوص بالا در باکتری *E. coli* بیان می‌شوند.

استخراج آر.ان.ای ویروس

زنجرک‌های آلوده به IWSV (جمع آوری شده از مزارع برنج دشتک در ۵۰ کیلومتری شمال شیراز) به عنوان منبع ویروس مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه بافت آلوده، ده عدد بذر گندم رقم روشن درون گلدان‌های پلاستیکی حاوی دو قسمت خاک مزرعه و یک قسمت خاک برگ کشت گردیدند. گلدان‌ها در داخل گلخانه با دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور طبیعی نگهداری شدند. برای انتقال ویروس به بوته‌های سالم گندم و تکثیر بافت آلوده، ۱۵-۱۰ عدد زنجرک آلوده در سنین مختلف به گلدان‌های دارای ۱۰ گیاهچه گندم رقم روشن چهار تا هفت روزه در زیر درپوش‌های پلاستیکی منتقل شدند. بیست تا سی روز پس از مایه زنی برگ‌های با علائم کوتولگی شدید و نوارهای سبز تیره در

Downloaded from mg.genetics.ir at 10:30 +0330 on Monday October 26th 2020

زمینه سبز کم رنگ برداشت شدند و به عنوان منبع ویروس مورد استفاده قرار گرفتند. سپس آر.ان.ای کل بافت آلوده با استفاده از High Pure Viral RNA Kit (Roche, Germany) بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده، استخراج گردید.

تکثیر ژن‌های *cp* و *ns4*

برای تکثیر ژن‌های *cp* و*ns4* چهار آغازگر با استفاده از نرم افزار Fast-PCR طراحی گردیدند (۱۸). برای این منظور از ترادف نوکلئوتیدی قطعات سوم و چهارم ویروس فوق، موجود در بانک جهانی ژن استفاده شد (AY 312435 and AY 312436). در جدول ۱ اسامی آغازگرها به همراه ترادف نوکلئوتیدی آنها آورده شده است.

برای ساخت cDNA و استفاده از آن در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) از روش حیدرنژاد و همکاران (۲۰۰۶) استفاده گردید. برنامه PCR برای تکثیر cDNA شامل ۳۰ سیکل از مراحل واسرشته سازی در دمای ۹۴ سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۰ سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، بسط ساخته شدن دی.ان.ای در دمای ۷۲ سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه بود. در نهایت برای تکمیل ساخت قطعات دی.ان.ای در دمای ۷۲ سانتی-گراد، پنج دقیقه در نظر گرفته شد. اجزاء واکنش PCR شامل آغازگرهای مستقیم و معکوس هر کدام با غلظت یک میکرومولار، مخلوط dNTPs با غلظت ۲۰۰ میکرومولار، MgCl2 با غلظت ۱/۵ میلی مولار، پنج میکرولیتر cDNA و ۳/۳ واحد آنزیم Expand High Fidelity Enzyme Mix (Roche, Germany) به همراه بافر (10X) آنزیم فوق بود. محصولات PCR بدست آمده در ژل آگاروز یک در صد الکتروفورز شد. سپس قطعات مورد نظر از ژل برداشته شد و بازیابی آنها با استفاده از کیت QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده انجام گردید.

همسانه سازی و تعیین ترادف

محصولات تکثیر شده بعد از برش با آنزیم‌های *Sal*I و *Bam*HI، توسط آنزیم T4 DNA ligase و با استفاده از کیت Ins T/A Clone PCR Product Cloning Kit بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت، درون پلاسمید pTZ57R/T قرار داده شدند. سپس پلاسمیدهای نوترکیب بدست آمده به باکتری *E. coli* سویه XL1-blue منتقل گردیدند. کیت و تمامی آنزیم‌های فوق از کمپانی Fermentas (Lithuania) تهیه گردید. به منظور اطمینان از صحت ترادف‌های دو ژن فوق، پلاسمیدهای نوترکیب از هر دو طرف تعیین ترادف گردیدند. سپس پلاسمیدهای فوق توسط آنزیم‌های *Sal*I و *Bam*HI برش داده شدند و پس از الکتروفورز محصول حاصل از برش آنزیمی، بازیابی قطعات ژنی *cp* و *ns4* از ژل انجام گردید. قطعات ژنی، مشابه روش قبل در درون پلاسمید pET 28a همسانه سازی شدند و پلاسمیدهای نوترکیب حاصل با روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) به منظور بیان ژن‌های مورد نظر انتقال داده شدند (۲۳). در طی مراحل انتقال پلاسمیدهای نوترکیب به باکتری سویه های XL1-blue و BL21(DE3)، به منظور تشخیص کلنی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب، از آزمون PCR مطابق قبل استفاده گردید با این تفاوت که بجای رشته دی.ان.ای الگو از کلنی‌های سفید باکتری استفاده شد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده به منظور تکثیر ژن های *cp* و*ns4* ویروس نوارک ایرانی گندم.

نام آغازگر	اندازه (نوکلئوتید)	ترادف (5′-3′)
IWSV3-F	۲۴	TC**GGATCC**ATGTCGATGTCTGTTG[a]
IWSV3-R	۲۶	TCT**GTCGAC**AACATCCTCGGGAGCGA[b]
IWSV4-F	۲۵	GC**GGATCC**ATGGACTTTCTGAAAAC[a]
IWSV4-R	۲۸	TGG**GTCGAC**CTTGTGCAGCATCTGCATC[b]

[a]ترادف **GGATCC** جایگاه شناسائی آنزیم برشی *Bam*HI می باشد که در درون ترادف آغازگر قرار داده شده است.

[b]ترادف **GTCGAC** جایگاه شناسائی آنزیم برشی *Sal*I می باشد که در درون ترادف آغازگر قرار داده شده است.

Downloaded from mg.genetics.ir at 10:30 +0330 on Monday October 26th 2020

القای بیان پروتئین در باکتری *E. coli*

کلنی‌های حاوی پلاسمیدهای نوترکیب در محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین به مدت یک شب در دستگاه شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۱۳۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. کشت مجدد باکتری جهت بیان پروتئین-های مورد نظر در محیط حاوی یک میلی مولار IPTG (Isopropyl-beta-thio galactopyranoside) به مدت ۲ الی ۳ ساعت در شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۳۰ دور در دقیقه انجام گردید. در مرحله رشد لگاریتمی (OD600=۰/۶) پروتئین‌های بیان شده در محلول رونشین حاصل از میان گریزی، بر اساس روش شهدائی (۲۰۰۸) استخراج شدند. علاوه بر این، ته‌نشین‌های بدست آمده نیز برای بررسی وجود پروتئین با همین روش استخراج شدند. پروتئین‌های استخراج شده جهت نگهداری کوتاه مدت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به منظور نگهداری بلند مدت در ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) بر اساس روش اصلاح شده لاملی و همکاران (۱۹۷۰) با غلظت ۶/۱۲ درصد با ولتاژ ۱۵۰ ولت انجام شد (۱۹). برای تخمین وزن مولکولی از نشانگر پروتئینی PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, Lithuania) استفاده گردید. آشکارسازی پروتئین‌ها در ژل SDS-PAGE با استفاده از محلول رنگ آمیزی حاوی آبی کوماسی صورت گرفت.

تجزیه لکه گذاری وسترن بلات[1]

برای انجام این آزمون، از دستگاه وسترن Uniform electro transfer مدل ETU-7305 استفاده گردید و تشخیص ایمیونولوژیکی پروتئین‌های CP و NS4 با استفاده از آنتی بادی-های پلی کلونال که قبلا بر علیه این دو پروتئین تهیه شده بودند (۱۵، ۱)، انجام شد. الکتروفورز نمونه‌ها به همراه نمونه پروتئینی از باکتری غیر تراریخته بعنوان کنترل منفی، مشابه قبل در ژل SDS-PAGE صورت گرفت و پروتئین‌ها از ژل به غشاء نیتروسلولز با ولتاژ ثابت ۷۵ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. سپس غشاء حاوی پروتئین در محلول حاوی آنتی بادی ضد پروتئین‌های هدف با رقت ۱:۱۰۰۰ به مدت یک ساعت بر روی شیکر قرار داده شدند. پس از شستشو، غشاها به مدت یک ساعت در محلول حاوی آنتی بادی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (IgG-AP) با رقت ۱:۱۰۰۰ به مدت یک ساعت روی شیکر قرار داده شدند و شستشوی آنها توسط بافر PBS-Tween انجام گردید. رنگ آمیزی غشاها با محلول رنگ آمیزی Fast Red TR salt (Roche, Germany) در شرایط تاریکی صورت گرفت (۲).

نتایج و بحث

الکتروفورز محصولات RT-PCR با استفاده از آغازگرهای IWSV3-R/IWSV3-F و IWSV4-R/IWSV4-F بترتیب منجر به تشکیل یک نوار ۹۵۴ جفت بازی برای ژن *cp* و یک نوار ۵۲۵ جفت بازی برای ژن *ns4* گردید. پس از همسانه سازی، عمل برش آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده با استفاده از آنزیم‌های *Sal*I و *Bam*HI منجر به تشکیل نوارهای مورد نظر برای تعدادی از کلنی‌های سفید شد (شکل ۱). بررسی ترادف ژن-های *cp* و *ns4* به منظور تشخیص موتاسیون‌های ناخواسته، هیچ تغییری را در ترادف کدون‌ها نشان نداد.

در الکتروفورز پروتئین‌ها نوارهائی با وزن مولکولی تقریبی ۴۲-۴۱ و ۲۵-۲۴ کیلو دالتون بترتیب برای پروتئین پوششی و پروتئین عمده غیرساختمانی مشاهده گردید (شکل‌های ۲ و ۳) که این اعداد با وزن مولکولی دو پروتئین (بترتیب ۴۰۹۰۸ و ۲۳۱۰۶ دالتون) که بطور بالقوه توسط ژن‌های *cp* و *ns4* رمز می‌گردند، مطابقت دارد (۱۴). علاوه بر این، وزن این پروتئین‌ها در محدوده وزن مولکولی پروتئین‌های مشابه، در سایر تنوئی ویروس‌ها نیز می‌باشند (۲۵، ۱۰). بالاتر بودن نسبی وزن ملکولی دو پروتئین بیان شده در این تحقیق در مقایسه با وزن مولکولی پروتئین‌های بالقوه را می‌توان به اضافه شدن چندین اسید آمینه هیستیدین موسوم به HisTag نسبت داد که به منظور سهولت استخراج پروتئین در هنگام خالص سازی جذبی با استفاده از رزین و کیت-های مناسب، در داخل پلاسمید pET 28a قرار داده شده است. این ترادف که طول آن شش اسید آمینه است، هیچ گونه اثری در ساختار و عملکرد پروتئین ندارد. علاوه بر این، قدرت ایمونوژنی

[1] Western blotting

Downloaded from mg.genetics.ir at 10:30 +0330 on Monday October 26th 2020

بالائی نداشته و پروتئین خالص شده بدون حذف این اسیدآمینه می‌تواند برای تولید آنتی بادی خالص بکار گرفته شود. بنابراین پروتئین بدست آمده یک پروتئین هیبرید است و ترادف موسوم به HisTag در انتهای پروتئین بیان شده CP یا NS4 قرار داده شده است. استفاده از این سیستم (affinity tag)، خالص سازی پروتئین هیبرید را از طریق بکار گرفتن روش‌های کروماتوگرافی آسان و سهل الوصول می کند.

تشخیص پروتئین‌های هدف با استفاده از تکنیک وسترن بلات

بعد از رنگ آمیزی غشاء نیتروسلولزی، در محل‌هایی که باندهای پروتئینی مورد نظر لکه برداری شده بودند یعنی تیمارهای مربوط به ته‌نشین‌های حاصل از استخراج پروتئین‌های NS4 و CP، رنگ غیرمحلول رسوب کرده و هاله‌ای صورتی رنگ در این محل‌ها ظاهر شد. در محل مربوط به نمونه‌های منفی (باکتری تراریخته‌ای که محیط کشت آن بدون IPTG است) این رنگ ظاهر نشد (شکل ۴). نتایج حاصل از وسترن بلات نیز تائید کننده ماهیت پروتئین-های بیان شده می‌باشد.

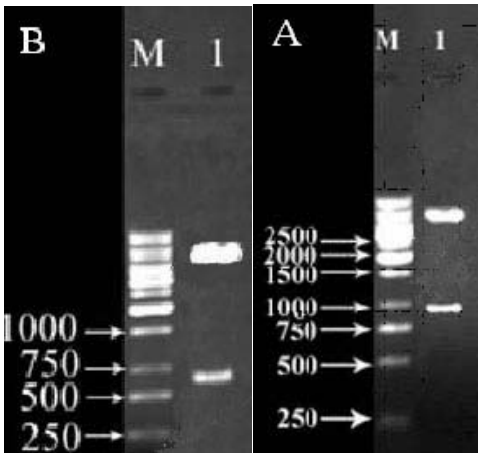
از شناخته شده ترین پروتئین‌های تنوئی ویروس‌ها، پروتئین پوششی و پروتئین عمده غیرساختمانی می‌باشند. تاکنون هر دو پروتئین فوق به روش‌های مختلف از گیاهان آلوده به تنوئی ویروس‌ها از جمله IWSV خالص گردیده و بر علیه آنها آنتی بادی تولید شده است (۲۱، ۱۷، ۱۵، ۱۲، ۱۱، ۹–۵، ۱). روش مرسوم برای خالص کردن پروتئین پوششی، خالص کردن پیکره-های ویروس است. به دلیل ظریف بودن پیکره‌های تنوئی ویروس‌ها، نمونه‌های استخراج شده می‌بایست تحت میان گریزی افتراقی با سرعت‌های بالا (۷۰۰۰۰–۸۰۰۰۰*g*) و در نهایت برای خلوص بهتر، تحت میان گریزی در شیب چگالی ساکاروز قرار گیرند (۲۲، ۱۵، ۱۲). پروتئین عمده غیر ساختمانی (NS4 یا NS6) به میزان زیادی در بافت گیاه میزبان تجمع پیدا می‌کند (۱۰). این پروتئین در تنوئی ویروس‌های عامل برگ سفید برنج و علف هرز دژگال (*Echinochloa* spp.) با استفاده از روش میان گریزی افتراقی و سپس استخراج از ژل، خالص شده‌اند (۹، ۸). پیچیدگی روش‌های فوق باعث گردیده که در مطالعات جدیدتر چندین پروتئین تنوئی ویروس‌ها با خلوص بالا، در باکتری *E. coli* بیان وسپس استخراج گردند (۲۰، ۶، ۵). از میان ۱۲–۷ پروتئینی که ژنوم تنوئی ویروس‌ها بطور بالقوه قادر به تولید آنهاست، پروتئین‌های CP و NS4 از درجه ایمونوژنی بالایی برخوردار بوده (۲۴، ۲۲، ۱۷، ۱۵، ۱۲، ۱۱) و می‌توان با تولید آنتی بادی بر علیه آنها، ویروس مورد نظر را در گیاهان و مناطق مختلف ردیابی نمود و علاوه بر این، از آنتی بادی‌های بدست آمده برای تعیین وظایف ژن‌ها استفاده کرد (۲۰، ۹، ۷، ۶، ۵).

در گذشته بیشترین مطالعات برای تعیین وظایف بعضی از پروتئین‌های تنوئی ویروس‌ها روی RGSV متمرکز گردیده است. در این تحقیقات از سه روش متفاوت برای تهیه پروتئین‌هائی با خلوص بالا به منظور تولید آنتی بادی‌های پلی کلونال استفاده شده است. برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ پروتئین CP توسط روش میان گریزی در شیب چگالی ساکاروز (۱۷) و سپس ده سال بعد پروتئین NS4 با استفاده از روش میان گریزی افتراقی و سپس خالص سازی با کمک SDS-PAGE تهیه گردید (۲۱). در نهایت در سال ۲۰۰۲ برای تهیه پروتئین‌های P2 و P5 از روش بیان ژن‌های مربوطه در باکتری *E. coli* استفاده گردید (۶). در این روند، تغییراتی که در روش بکار گرفته شده، مد نظر قرار گرفته است، خلوص بهتر پروتئین‌های استخراج شده است. بطور مشابه در مورد IWSV همین روند نیز برای تهیه پروتئین‌های CP و NS4 بکار گرفته شده است و پروتئین CP ابتدا به روش میان گریزی در شیب چگالی ساکاروز (۱۵) و سپس پروتئین دوم با روش میان گریزی افتراقی و سپس تغییرات pH (۱) خالص شده-اند. در این تحقیق نیز بدلیل اهمیت این دو پروتئین، تهیه آموده خالص آنها از طریق بیان ژن‌های مربوطه مد نظر قرار گرفت. پروتئین‌های تولید شده از طریق سیستم میکروبی (*E. coli*) می-توانند برای تهیه آنتی بادی‌هائی با خلوص بالا به منظور مطالعات اپیدمیولوژیکی و یا مطالعه و عملکرد ژن‌های مربوطه مورد استفاده قرار گیرند.

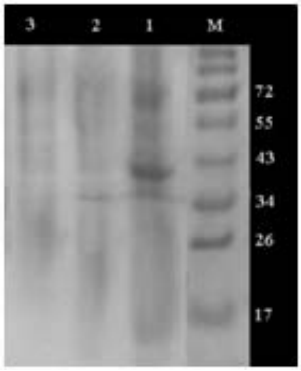
سپاسگزاری

بدینوسیله از دانشگاه شهید با هنر کرمان بخاطر تامین هزینه‌های انجام این تحقیق، سپاسگزاری می‌گردد.

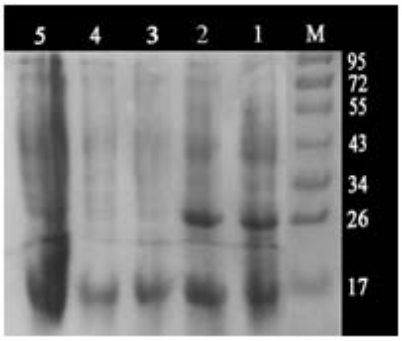
Downloaded from mg.genetics.ir at 10:30 +0330 on Monday October 26th 2020



شکل ۱- تجزیه برش پلاسمید نوترکیب pET 28a حاوی ژن پروتئین پوششی (A) و ژن پروتئین عمده غیرساختمانی (B) ویروس نوارک ایرانی گندم. ستون ۱) پلاسمید برش یافته با آنزیم‌های *Sal*I و *Bam*HI. ستون M) نشانگر 1 kb DNA ladder (Fermentas. Lithuania).

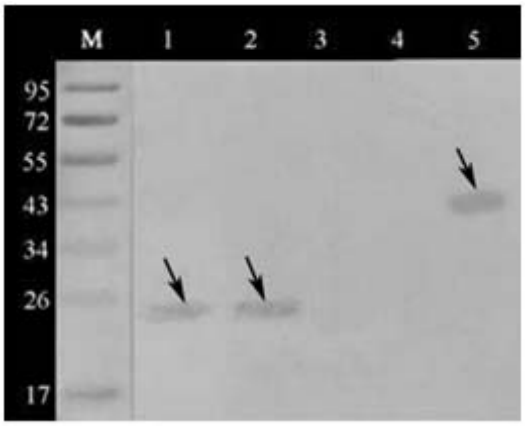


شکل ۲- الکتروفورز پروتئین پوششی (CP) بر روی ژل پلی آکریلامید ۱۲ درصد بعد از بیان پروتئین فوق در باکتری *E. coli*. ستون ۱) ته-نشین حاصل از استخراج پروتئین؛ ستون ۲) رونشین حاصل از استخراج پروتئین؛ ستون ۳) تیمار شاهد (باکتری تراریخته‌ای که محیط کشت آن بدون IPTG است). M) نشانگر پروتئینی PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, Lithuania).



شکل ۳- نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئین عمده غیرساختمانی (NS4) بر روی ژل پلی آکریلامید ۱۲ درصد بعد از بیان پروتئین فوق در باکتری *E. coli*. ستون‌های ۱ و ۲) ته‌نشین حاصل از استخراج پروتئین؛ ستون‌های ۳ و ۴) رو نشین حاصل از استخراج پروتئین؛ ستون ۵، تیمار شاهد (باکتری تراریخته‌ای که محیط کشت آن بدون IPTG است). M) نشانگر پروتئینی PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, Lithuania).

Downloaded from mg.genetics.ir at 10:30 +0330 on Monday October 26th 2020



شکل ۴- تجزیه وسترن بلات برای تشخیص پروتئین‌های پوششی (CP) و عمده غیرساختمانی (NS4) ویروس نوارک ایرانی گندم بیان شده در باکتری *E. coli* نوترکیب. ستون‌های ۱ و ۲) ته نشین حاصل از استخراج پروتئین NS4؛ ستون ۳) رونشین حاصل از استخراج پروتئین CP؛ ستون ۴) رو نشین حاصل از استخراج پروتئین NS4؛ ستون ۵) ته نشین حاصل از استخراج پروتئین CP. M) نشانگر پروتئینی PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, Lithuania). پیکان‌ها نوارهای تشخیص داده شده توسط آنتی بادی را نشان می‌دهد.

منابع

۱. شرزه ای، ع و ایزدپناه، ک (۱۳۷۷) خالص سازی، سرولوژی و تعیین وزن مولکولی قطعات آر. ان. ای و پروتئین های عمده ویروس نوارک ایرانی گندم. مجله بیماریهای گیاهی. جلد ۳۴. صفحات ۱۸۵-۱۷۰.

۲. شهدائی س (۱۳۸۷) بیان ژنهای پروتئین پوششی و پروتئین غیر ساختمانی NS4 و تعیین ترادف انتهای ۳ قطعه شماره یک ژنوم ویروس نوارک ایرانی گندم. پایان نامه کارشناسی ارشد، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید با هنر کرمان.

۳. شهدائی س، حیدرنژاد ج، ایزدپناه ک، معصومی ح و شعبانیان م (۱۳۸۷) تعیین ترادف ناحیه ۳ قطعه شماره یک ژنوم ویروس نوارک ایرانی گندم. خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، همدان، صفحه ۵۰۶.

۴. یاسائی م، افشاریفر ع ر، معصومی م، حیدرنژاد ج، صادقی م ص و ایزدپناه ک (۱۳۸۳) وقوع بیماری های ویروسی در برنجکاری های فارس. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، تبریز، صفحه ۹۱.

5. Chomchan P, Li S F and Shirako Y (2003) Rice grassy stunt tenuivirus nonstructural protein p5 interact with itself to form oligomeric complex in vitro and in vivo. Journal of Virology, 77: 769-775.

6. Chomchan P, Miranda G J and Shirako Y (2002) Detection of rice grassy stunt tenuivirus nonstructural protein p2, p5 and p6 from infected rice plant and from viruliferous brown planthoppers. Archives of Virology 147: 2291-2300.

7. Espinoza-Esquivel A M, Hernandez M, Pereira R, Falk B W and Medina V (1992) In situ immunogold labelling analysis of the rice hoja blanca virus nucleoprotein and major noncapsid protein. Virology, 191: 619–27.

8. Falk B W, Morales F J, Tsai J H and Niessen A I (1987) Serological and biochemical properties of the capsid and major noncapsid proteins of maize stripe virus, rice hoja blanca virus and *Echinochloa* hoja blanca virus. Phytopathology, 77: 196–201.

9. Falk B W and Tsai J H (1983) Assay for maize stripe virus-infected plants by antiserum produced to a purified noncapsid protein. Phytopathology, 73: 1259-62.

10. Falk B W and Tsai J H (1998) Biology and molecular biology of viruses in the genus *Tenuivirus*. Annual Review of Phytopathology, 36: 139-63.

11. Gingery R E (1985) Maize stripe virus. CMI/ABB. Description of plant virus, No 300 5p.

12. Gingery R E (1988) The rice stripe virus group. pp 297-339. In: Milne R G (ed). The plant viruses. Vol IV. Plenum Press.

13. Haenni A L, De Miranda J R, Falk B W, Goldbach R, Mayo M A, Shirako Y and Toriyama S (2005) Genus *Tenuivirus*. p: 717-723. In: Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, and Ball L A (eds). Virus taxonomy: The eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. NewYork, Academic press.

14. Heydarnejad J, Barley W S, Izadpanah K, Hunter F R. and Gooding M J (2006) Molecular characterization of Iranian wheat stripe virus shows its taxonomic position

Downloaded from mg.genetics.ir at 10:30 +0330 on Monday October 26th 2020

as a distinct species in the genus *Tenuivirus*. Archives of Virology 151: 217-227.

15. Heydarnejad J and Izadpanah K (1992) Isolation and partial characterization of a tenuivirus from wheat in Iran. Journal of Phytopathology, 136: 279-287.

16. Heydarnejad J, Izadpanah K, and Barclay W S (2008) *In vitro* expression studies of three proteins of Iranian wheat stripe virus. Iranian Journal of Biotechnology, 6: 6-10.

17. Hibino H, Usugi T, Omura T and Tsuchizaki T (1985) Rice grassy stunt virus: a planthopper-borne circular filament. Phytopathology, 75: 894-899.

18. Kalendar R Fast PCR: a PCR primer design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein.http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm. Accessed 2007

19. Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bactriophage. Nature, 227: 680-689.

20. Liang D, Qu Z, Ma X, and Hull R (2005) Detection and Localization of Rice stripe virus Gene Products in vivo. Virus Genes, 31: 211–221.

21. Miranda G J and Koganezawa H (1995) Identification, purification and serological detection of the major noncapsid protein of rice grassy stunt virus. Phytopathology, 85: 1530-1533.

22. Morales F J, Niessen A I (1985) Rice hoja blanca virus. CMI/ABB. Description of plant virus, No 299, 5p.

23. Sambrook J., MacCallum P and Russell D (2001) Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2344 p.

24. Toriyama S (2000) Rice stripe virus. CMI/ABB. Description of plant virus, No 375, 7p.

25. Toriyama S, Kimishima T and Takahashi M (1997) The proteins encoded by rice grassy stunt virus RNA5 and RNA6 are only distantly related to the corresponding proteins of other members of the genus *Tenuivirus*. Journal of General Virology, 78: 2355-2363.

26. Toriyama S, Kimishima T, Takahashi M, Shimizu T, Minaka N and Akutsu K (1998) The complete nucleotide sequence of the rice grassy stunt virus genome and genomic comparisons with viruses of the genus *Tenuivirus*. Journal of General Virology, 79: 2051-2058.