کاربرد ایمنوگلوبولین G خالص شده پروتئین های پوششی و حرکتی ویروس برگ بادبزنی مو توسط ستون DEAE سلولزی برای شناسایی ویروس برگ بادبزنی مو

داود کولیوند*[۱]، نعمت سخندان بشیر[۲]، سید علی اکبر بهجت نیا[۳]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۲۳
تاریخ تصویب: ۹۵/۱۰/۲۵

چکیده

در تحقیق حاضر از جدایه های بومی ویروس برگ بادبزنی مو (Grapevine fan leaf virus (GFLV) برای تهیه آنتی بادی نوترکیب استفاده شد، بدین ترتیب ژن های پروتئین پوششی و حرکتی ویروس تکثیر و در پلاسمید pET۲۱a همسانه سازی و به باکتری (Escherichia coli (BL۲۱ منتقل شدند. پس از بیان ژن های مذکور پروتئین های بیان شده تخلیص و برای ایمنی زایی خرگوش استفاده شدند. پس از ایمنی زایی توسط پروتیئن-های پوششی و حرکتی، سرم ایمن شده استخراج گردید. خالص سازی ایمنوگلوبولین G با استفاده از ستون DEAE سلولزی صورت گرفت. سپس آزمون الایزای غیر مستقیم توسط IgG های تخلیص شده در رقت های ۱: ۵۰۰، ۱: ۱۰۰۰ و ۱: ۲۰۰۰ انجام شد و نتایج نشان داد IgG پروتئین پوششی در رقت ۱:۵۰۰ و ۱:۱۰۰۰ و IgG پروتئین حرکتی در رقت ۱:۵۰۰ بهترین واکنش را با آنتی ژن مربوطه نشان می دهد. آزمون لکه گذاری نقطه ای در رقت

*۱-استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
(نویسنده مسئول: Koolivanz@znu.ac.ir)
۲-دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳-استاد مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۱:۵۰۰ با استفاده از هر دو IgG با غشا نیتروسلولزی قادر به ردیابی آنتی ژن بود. نتایج نشان داد آنتی بادی های تولید شده بصورت اختصاصی توانایی ردیابی GFLV را داراست.

واژه های کلیدی: آنتی بادی، پروتئین پوششی، پروتئین حرکتی، ویروس برگ بادبزنی مو

که توسط ویروس برگ بادبزنی مو Grapevine fan leaf virus GFLV ایجاد می شود (Martelli, 2012). این ویروس دارای دو قطعه RNA تک رشته ای با قطبیت مثبت است که ژن های پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی از روی آران ای شماره دو با استفاده از استراتژی تولید پلی پروتئین رمز می شوند (Andret-Link et al., 2004). خسارت بیماری برگ بادبزنی مو در برخی از ارقام تا حدود ۸۰% نیز گزارش شده است. دامنه پراکنش این ویروس بسیار گسترده است و در اغلب مناطق انگور کاری دنیا و ایران سبب ایجاد بیماری می شود (Andret-Link et al., 2004). برخی از منابع خاستگاه ویروس عامل این بیماری را با توجه به آنالیز مولکولی انگورهای کشت شده، ایران باستان می دانند. بنابراین مدیریت این بیماری یکی از موارد اجتناب ناپذیر برای مناطق انگور کاری می-باشد. بدون شک یکی از روش های مدیریتی بیماری های ویروسی شناسایی سریع و به هنگام ویروس های عامل بیماری به منظور انجام اقدامات لازم می باشد. علاوه بر این شناسایی دقیق و سریع ویروس برگ بادبزنی مو در مناطق قرنطینه، بررسی پایه های عاری از ویروس و ردیابی ویروس در مناطق آلوده می تواند از اهداف مهم برنامه های مدیریتی این بیمارگر مهم باشد.

سنجش ویروس ها برای انجام بسیاری از مطالعات ویروس شناسی ضروری است چندین روش برای رسیدن به تشخیص دقیق و درست بیماری های گیاهی ایجاد شده توسط ویروس ها وجود دارد (Astier et al., 2001; Lima et al., 2012; Mulholland, 2009; Naidu & Hughes, 2003). تکنیک های مبتنی بر روش های سرولوژی برای شناسایی و تعیین مشخصات ویروس های گیاهی توسعه یافته است و روش های الایزا برای شناسایی ویروس ها در مقیاس خیلی بزرگ مورد استفاده قرار می گیرد (Flint et al., 2009; Hampton et al., 1990; Naidu, Hughes, 2003; Nascimento et al., 2010;). با این حال، محدودیت های عمده در استفاده از روش های سرولوژی برای شناسایی ویروس های گیاهی شامل مشکلات تولید عیار بالای ویروس ها به منظور به دست

آوردن عیار مناسب آنتی سرم اختصاصی ویروس و عدم اختصاصیت در برخی از موارد از آنتی سرم های تولید شده می باشد (Lima et al., 2012).

تولید آنتی سرم برای برخی از ویروس های گیاهی که خالص سازی آن ها از پروتئین های گیاهی و به دست آوردن غلظت مناسب از آن مشکل می باشد یکی از مسائل عمده و مهم در تولید آنتی بادی های اختصاصی علیه ویروس های گیاهی است. به همین منظور روش های مناسبی برای به دست آوردن غلظت مناسب از ویروس های گیاهی و فاقد پروتئین های گیاهی توسعه یافته است که از این روش ها می توان به ترانسفورماسیون سلول های باکتریایی با استفاده از ژن پروتئین پوششی یا پروتئین های غیر ساختاری اشاره نمود و استفاده از چینین پروتئین های در ایمنی زایی و تولید آنتی سرم و آنتی بادی می باشد (Lima et al., 2012).

ایمونوگلوبولین ها براساس تفاوت در ساختمان نواحی ثابت (C) زنجیره سنگین به کلاس ها و زیر کلاس-های مختلفی دسته بندی میشوند. کلاس های مولکول های آنتی بادی عبارتند از IgM، IgG، IgE، IgD، IgA. سرم خون ایمن شده معمولاً دارای انواع مختلفی از ایمنوگلوبولین می باشد که ایمنوگلوبولین G یا IgG فراوانترین و مهم ترین کلاس ایمنوگلوبولین ها در پاسخ های ثانویه ایمنی سرم است. در حقیقت، ایمنوگلوبولین G معمولترین نوع از ایمنوگلوبولین های تولیدی می باشد که غالباً در آزمون های سرولوژیکی برای شناسایی ویروس های گیاهی و اهداف مختلفی استفاده می شوند. این نوع آنتی بادی ها از چهار زنجیره ی پپتیدی متصل به هم تشکیل شده اند که دارای دو زنجیره سنگین و دو زنجیره سبک پلی پپتیدی مشابه می باشند و تقریباً ۱۵۰ کیلودالتون وزن دارند (Lima et al., 2012).

معمولاً اولین قدم برای خالص سازی پروتئین، رسوب دهی با نمک ها می باشد. نمک هایی که عموماً برای این منظور استفاده می شوند سولفات آمونیوم و سولفات سدیم می باشند.

انتخاب روش خالص کردن به موارد مصرف آنتی بادی، حیوانی که آنتی بادی از آن حاصل شده و کلاس و زیر کلاس آنتی بادی بستگی دارد. روش های مختلف خالص سازی آنتی بادی عبارتند از کروماتوگرافی تمایلی با پروتئین A و یا پروتئین G، HPLC، رسوب با استفاده از سولفات آمونیوم، PEG ، اسید کاپریلیک و غیره.

یکی از ساده ترین روش های تخلیص IgG استفاده از کروماتوگرافی با ستون DEAE می باشد که همه ناخالصی های مهم به جز ترانسفرین را از محلول حاوی آنتی بادی جدا می کند و اگر با شستشوی شیبی عمل شود درجه خلوص حتی بیشتر از ۹۰%

خواهد شد. خالص کردن آنتی بادی با HPLC نیز بسیار سریع است اما دستگاه HPLC و ستون های آن بسیار گران قیمت هستند. برای تخلیص بهتر است ابتدا از ساده ترین روش ها شروع کرد بنابراین، اولین مرحله رسوب ایمنوگلوبولین ها استفاده از سولفات آمونیوم است (Abbas et al., 2005).

این روش برای خالص سازی با درصد زیاد کافی نیست و باید همراه تکنیک های دیگر به کار رود. پروتئین ها در حالت محلول به علت داشتن گروه های آزاد قطبی و باردار، با آب اتصالات هیدروژنی می دهند. وقتی غلظت زیاد مولکول های کوچک باردار مثل آمونیوم سولفات به محلول پروتئینی اضافه شود این مولکول های کوچک برای اتصال به آب با پروتئین رقابت می کنند. در نتیجه وقتی مولکول های آب از مولکول پروتئین جدا شوند، حلالیت پروتئین ها کم شده و باعث رسوب آنها می شود. رسوب پروتئین به تعداد و محل گروه های قطبی، وزن مولکولی پروتئین، pH و حرارت محلول بستگی دارد. برای رسوب ایمنوگلوبولین سرم خون خرگوش از محلول ۳۳ درصد اشباع آمونیوم سولفات استفاده می شود (Abbas et al., 2005).

در تحقیق حاضر از ستون DEAE سلولزی برای خالص سازی ایمنوگلوبولین G از سرم های تهیه شده علیه پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی ویروس برگ بادبزنی مو استفاده شد و سپس کارایی ایمنوگلوبولین های تخلیص شده در آزمون های سرولوژیک به منظور غربالگری آلودگی به ویروس برگ بادبزنی انجام شد.

مواد و روش ها

تهیه سازه و آنتی سرم حیوان ایمن شده

برای جداسازی و تکثیر ژن پروتئین پوششی از جدایه KH-٤-٥-٣ (Sokhandan-Bashir et al., 2011) و ژن پروتئین حرکتی از جدایه Kh4 (Sokhandan-Bashir et al., 2009) استفاده شد. سپس، پلاسمیدهای نوترکیب pET21aGFLVCP و pET21aGFLVMP دارای ژن پروتئین پوششی و حرکتی ویروس برگ بادبزنی مو (کولیوند ۱۳۹۲) به باکتری E.coli سویه BL21 (DE3) منتقل شدند.

خالص سازی پروتئین های بیان شده در باکتری

از هر همسانه یک پرگنه باکتری (E. koulivand2014) حاوی پلاسمیدهای نوترکیب pET21aGFLVCP و pET21aGFLVMP در ٥ میلی لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین بصورت جداگانه به منظور بیان کشت داده شد و رقیق سازی کشت شبانه در ۱۰۰میلی لیتر محیط LB مایع انجام شد و سپس چهار ساعت پس از

تلقیح توسط IPTG ، رسوب باکتریایی پس از سانتریفوژ در g ۶۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری شد. سپس مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت به ازای رسوب حاصل از هر ۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتریایی دو میلی لیتر بافر اتصال به رسوب ته نشین اضافه شد و بخوبی سوسپانسیون شد. سپس لیزوزیم با غلظت نهایی یک میکرو گرم در میلی لیتر به سوسپانسیون حاصل اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از سپری شدن مدت زمان مذکور سوسپانسیون تهیه شده درون لوله های دو میلی لیتری ریخته شده و در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و فاز رویی برای استفاده در ستون His.bind (Novagen, Madison, WI, USA) شارژ شده توسط بافر شارژ کننده Charge Buffer به کار برده شدند. سپس بافر رهاسازی طی پنج مرحله درون ستون ریخته شد و فاز محلول خارج شده از قسمت پایینی ستون در اندازه های ۵۰۰ میکرولیتری جمع آوری شدند.

پس از تعیین غلظت با استفاده از روش برادفورد پروتئین های تخلیص شده در مراحل قبل غلظت مناسب از پروتئین تخلیص شده (۱۰۰میکروگرم در میلی لیتر) به عنوان آنتی ژن برای ایمنی زایی استفاده شدند. در همین راستا برای هر پروتئین تخلیص شده از دو عدد خرگوش ماده برای ایمنی زایی استفاده شد. تزریق به فواصل دو هفته و بصورت زیر جلدی انجام شد. در تزریق اول ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر از پروتئین نوترکیب تخلیص شده همراه با ادجوانت کامل (Sigma-Aldrich, USA) برابر حجم پروتئین نوترکیب تخلیص شده استفاده شد و در دو تزریق بعدی از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پروتئین نوترکیب همراه با هم حجم آن ادجوانت ناقص استفاده شد. دو هفته پس از آخرین تزریق مقدار کمی خونگیری از گوش خرگوش انجام گرفت و پس از اطمینان از ایمن شدن حیوان، خونگیری کامل از قلب خرگوش انجام شد. برای جدا سازی سرم، خون خرگوش ایمن شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد و پس از آن یک شب در دمای یخچال قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان مورد نظر سانتریفوژ در دورg ۳۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه انجام و سرم خون جدا شد و برای بررسی ایمنی زایی از سرم تهیه شده رقت های مختلف در بافر فسفات سالین (PBS) (۱:۵۱۲ تا ۱:۶۵۵۳۶) آماده شد و آزمون PTA-ELISA با رقت های مختلف انجام گرفت سپس سرم جداسازی شده در دمای ۲۰- همراه با گلیسرول نگهداری شد.

خالص سازی IgG با استفاده از ستون سلولز

پس از تهیه سرم از حیوانات ایمن شده با استفاده از پروتئین های پوششی و حرکتی

به منظور خالص سازی ایمنوگلوبولین G از سرم ها، مطابق روش زیر عمل شد:
ابتدا هشت میلی لیتر سولفات آمونیوم اشباع شده را به آرامی به ۱۰ میلی لیتر سرم های جدا شده اضافه شد و محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد روی همزن در دمای اتاق به هم زده شد. محلول اشباع یک شب (حدود ۱۲ ساعت) در دمای ٤ درجه سانتیگراد قرار داده شد.
به منظور آماده سازی ستون سلولزی، در یک ستون شیشه ای، محلول DEAE سلولز ریخته شد و پس از فشرده شدن، ستون با استفاده از بافر فسفات (۰/۰۷ مولار و ٦/۳ pH) متعادل شد (ظرفیت ستون سلولز استفاده شده ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود). سپس محلول اشباع شده سرم که در دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت یک شب (حدود ۱۲ ساعت) نگهداری شده بود، به مدت ۳۰ دقیقه در ٤۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. رسوب تشکیل شده در ٥ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۷ مولار و pH= ٦/۳ به خوبی سوسپانسیون شد. سوسپانسیون تهیه شده درون کیسه دیالیز ریخته شد و دو سر کیسه دیالیز به خوبی مسدود شد و در بافر فسفات همراه با چرخش در دمای ٤ درجه قرار داده شد و به تناوب بافر تعویض گردید (کیسه دیالیز قبل از استفاده به مدت ۱۰ دقیقه در %0/01 EDTA جوشانده شد). برای بررسی کارایی دیالیز از معرف نسلر(Hgl2, KI, NaOH) استفاده شد.
پس از انجام عمل دیالیز، محلول داخل کیسه دیالیز به مدت ۱٥ دقیقه در ٤۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفوژ گردید. سپس با توجه به غلظت پروتئین اندازه گیری شده، پروتئین در بافر فسفات بحالت سوسپانسیون در آورده شد و در ستون DEAE به کار برده شد. مایع خارج شده از ستون جمع آوری شد (٥۰ قطره در ۳ دقیقه).
نهایتاً با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر OD محلول پروتئین (IgG) اندازه گیری شد برای تایید از الکترفورز روی ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) ۱۲% استفاده شد.

بررسی کارایی ایمنوگلوبولین های تخلیص شده

الایزای غیر مستقیم

به منظور بررسی کارایی ایمنوگلوبولین های تخلیص شده الایزای غیر مستقیم مطابق روش زیر انجام شد: ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی ژن مناسب هر آزمون در سه چاهک به عنوان سه تکرار ریخته شدند. در این آزمون نیز از شاهد مثبت (نمونه آلوده به ویروس برگ بادبزنی مو)، منفی (نمونه برگ گیاه سالم) و سه چاهک خالی برای

بررسی کیفیت سوبسترا استفاده شد. تشتک الایزا بعد از پوشانیده شدن با پارافیلم، به مدت یک شب درون یخچال (4°C) نگهداری شد. روز بعد، آنتی ژن ها دور ریخته شدند و چاهک ها سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه با استفاده از بافر PBST شستشو داده شدند. سپس هر یک از چاهک های واکنش با استفاده از بافر مسدود کننده پرگردیدند. سطح تشتک با پارافیلم پوشانیده شده و به مدت ۲٤ ساعت در دمای 4°C (درون یخچال) قرار داده شد. سپس مسدود کننده دور ریخته شده و چاهک ها مثل قبل شستشو داده شدند. آنگاه ۱۰۰µl از آنتی بادی تخلیص شده به نسبت ۱:۵۰۰، ۱:۱۰۰۰ و ۱:۲۰۰۰ در بافر پوششی رقیق شده بود و در هر چاهک ریخته شد و تشتک الایزا بعد از پوشانیده شدن با پارافیلم، به مدت چهار ساعت در دمای 73°C قرار داده شد. بدنبال آن، محلول ایمنوگلوبولین رقیق شده جمع آوری گردید و چاهک ها مثل قبل مورد شستشو قرارگرفتند. سپس ۱۰۰µl کانجوگیت عمومی (detagujnoC-PRH یا AP-conjugated) (Sigma-AldrichUSA) به هر چاهک افزوده شد و تشتک الایزا پس از پوشانیده شدن با پارافیلم در دمای 73°C به مدت چهار ساعت نگهداری شد. پس از جمع آوری کانجوگیت چاهک ها با بافر شوینده، شستشو داده شدند و بسته به نوع کانجوگیت استفاده شده سوبسترای آن که شامل ٤-نیتروفنیل فسفات و یا TMB[1] (Roche Applied Science, Germany) بود مورد استفاده قرار گرفت و پس از توقف واکنش یا اضافه کردن محلول توقف (NaOH سه مولار) میزان تغییر رنگ چاهک ها مورد سنجش قرار گرفت.

آزمون لکه گذاری نقطه ای (دیبا) Dot immunobinding assay (DIBA)

از آزمون لکه گذاری با استفاده از غشاء نیتروسلولزی برای بررسی کارایی ایمنوگلوبولین های تخلیص شده نیز استفاده شد. در این آزمون از نمونه های آلوده به ویروس برگ بادبزنی مو و شاهد مثبت و منفی (گیاه سالم) استفاده شد. با توجه به آنتی بادی های استفاده شده در این آزمون، از نتایج آزمون مذکور می توان در برخی از موارد علاوه بر بررسی خالص سازی پروتئین بیان شده می توان به قدرت ایمنی زایی و حفظ حالت ایمنی سازی پروتئین تخلیص شده نیز پی برد. این آزمون مطابق مراحل زیر انجام پذیرفت:

ابتدا غشاء نیترو سلولزی را در اندازه مناسب با توجه به تعداد نمونه های مورد آزمایش در هر بار آزمون بریده شد، سپس کاغذ بریده شده به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در داخل آب مقطر دو بار استریل درون یک پتری یا یک ظرف در ابعاد کاغذ بریده شده

۱-۱- ۳،۳›،۵،۵›-Tetramethylbenzidine (TMB)

قرار داده شد. غشاء نیتروسلولزی در زیر هود و روی دستمال کاغذی تمیز قرار داده شد تا بخوبی خشک شود.

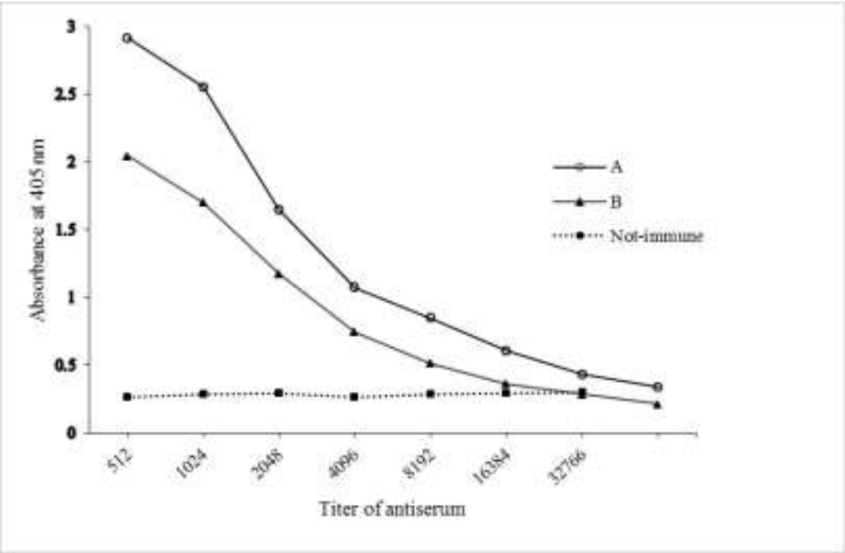
پس از استخراج پروتئین از نمونه های باکتریایی و پروتئین خالص سازی شده و شاهد منفی از هر نمونه به اندازه یک قطره به ترتیب روی غشاء نیتروسلولزی بریده شده ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا محلول ریخته شده روی غشاء خشک شود. غشاء نیتروسلولزی به مدت دو ساعت در ۱۰ سی سی بافر مسدود کننده ۲% درون یک پتری استریل قرار داده شد.

پس از سپری شدن زمان ذکرشده کاغذ نیتروسلولزی سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه در بافر مسدود کننده شستشو داده شد. کاغذ نیتروسلولزی در داخل یک پتری تمیز قرار داده شد و به مقدار ۲ سی سی از ایمنوگلوبولین های رقیق شده (۱:۱۰۰۰) در داخل پتری ریخته شد، و به مدت دو ساعت در دمای اتاق روی انکوباتور لرزان قرار داده شد. بعد از ۲ ساعت، آنتی بادی درون پتری به دقت جمع آوری شد و کاغذ نیتروسلولزی ٤ بار و هر بار به مدت ٥ دقیقه در بافر مسدود کننده شستشو داده شد. بعد از شستشو، مجدداً غشاء در داخل پتری تمیز قرار داده شد و پس از اضافه نمودن ۲ سی سی کانجوگیت عمومی تهیه شده در بز علیه بخش ثابت پادتن های خرگوش رقیق شده به نسبت ۱:۱۰۰۰ به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از یک ساعت آنتی بادی درون کیسه پلاستیکی جمع آوری شد و غشاء ٤ بار، هر بار به مدت پنج دقیقه در بافر مسدود کننده شستشو داده شد. پنج سی سی از بافر آلکالین فسفات به همراه ۳۳ میکرولیتر NBT و ۱٦/٥ میکرولیتر BCIP روی کاغذ در داخل کیسه پلاستیکی تمیز ریخته شد و تغییر رنگ های ایجاد شده بر روی لکه های حاصل ثبت شد.

بعد از حداکثر ۱۵ دقیقه غشاء نیتروسلولزی با آب استریل شستشو داده شد برای توقف واکنش و نگهداری کاغذ از محلول ۰/٥ مولار NaOH استفاده شد و غشاء با استفاده از آب مقطر شسته شد تا واکنش متوقف شود.

نتایج و بحث

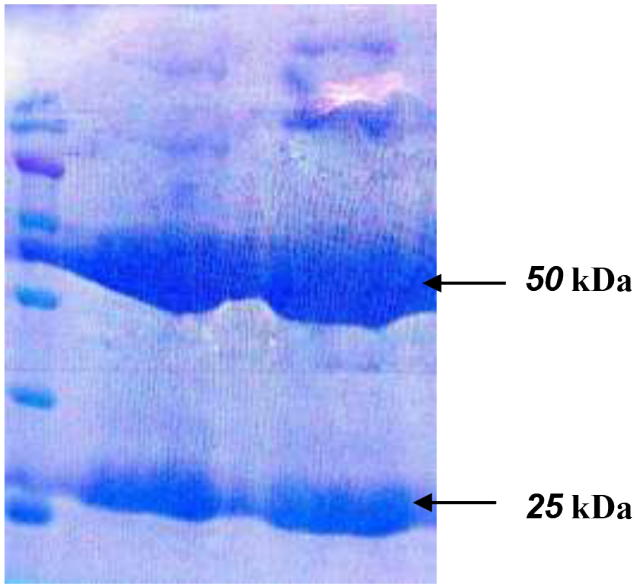
نتایج حاصل از تست ایمنی زایی و بررسی تیتراسیون آنتی سرم ها حاکی از ایمن شدن و آزاد شدن آنتی بادی علیه آنتی ژن های استفاده شده در خون استحصال شده بود (شکل ۱).



شکل ۱: نمودار تعین تیتر آنتی سرم های تهیه شده از خرگوش های ایمن شده علیه پروتئین پوششی (A) و پروتئین حرکتی (B) ویروس برگ بادبزنی مو، Not-immune سرم تهیه شده از خرگوش قبل از تزریق

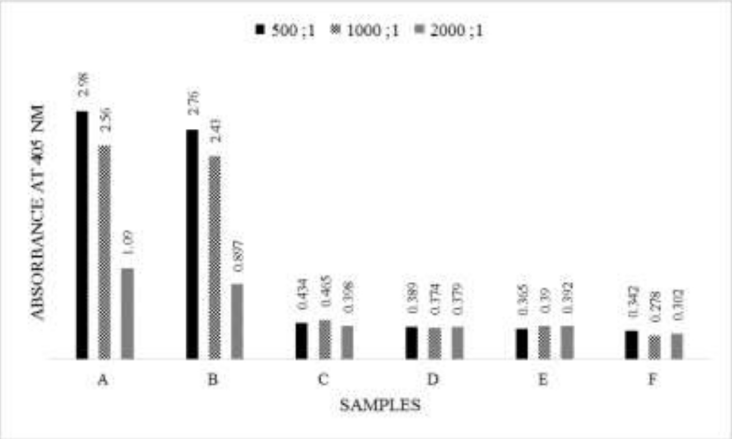
الکتروفورز ایمنوگلوبولین های خالص سازی شده روی ژل پلی آکریل آمید مشخص نمود که دو باند پروتئینی بزرگ و کوچک در اندازه های حدود ۷۵ کیلو دالتون و ۲۵ کیلو دالتون قابل مشاهده است. که باند بزرگتر مربوط به زنجیره سنگین ایمنوگلوبولین و باند کوچکتر مربوط به زنجیره سبک ایمنوگلوبولین تخلیص شده بود (شکل ۲). همچنین شدت و غلظت باندها نشان داد که غلظت ایمنوگلوبولین های تخلیص شده مناسب و رضایت بخش می باشد.نتایج مربوط به الایزای غیر مستقیم با رقت های مختلف مشخص نمود که ایمنوگلوبولین تخلیص شده در هر سه رقت ۱:۵۰۰، ۱:۱۰۰۰ و ۱:۲۰۰۰ با آنتی ژن مربوطه واکنش می دهد هر چند که شدت واکنش در غلظت های مختلف متفاوت است. شدت واکنش بر اساس میزان جذب نوری در ٤٠٥ نانومتر اندازه گیری شد که نتایج نشان داد ایمنوگلوبولین های تخلیص شده علیه پروتئین پوششی در رقت ۱:۵۰۰ و ۱:۱۰۰۰ قابلیت بهتری در تشخیص آنتی ژن های مربوطه دارد (شکل ۳ و ٤) و اما در مورد پروتئین حرکتی رقت ۱:۵۰۰ بهترین واکنش را برای تشخیص آنتی ژن پس از بررسی جذب نوری در ٤٠٥ نانومتر دارد (شکل ۳ و ٤). میزان جذب نوری در ٤٠٥ نانومتر در مقایسه با نمونه گیاهی سالم انجام شد که جذب نوری در مورد هر دو آنتی ژن (پروتئین حرکتی و پروتئین پوششی) میزان جذب نوری حدود دو برابر نمونه گیاهی سالم بود. همانطور که در نتایج دیده می شود رقت های واکنش در مورد ایمنوگلوبولین تهیه شده علیه پروتئین پوششی واکنش بهتری نسبت به ایمنوگلوبولین تهیه شده علیه پروتئین حرکتی نشان داد که این امر ممکن است به خاصیت آنتی

ژنیکی بیشتر پروتئین پوششی و همچنین غلظت بیشتر پروتئین استخراج شده برای تزریق باشد.



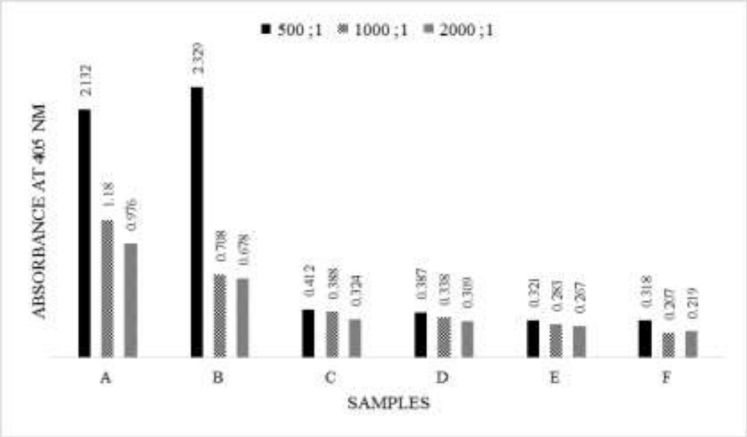
شکل ۲ : الکترفورز ایمنوگلوبولین های تخلیص شده در ژل پلی اکریل آمید ۱۲% ۱: ایمنوگلوبولین تخلیص شده علیه پروتئین پوششی (۱) و پروتئین حرکتی (۲)

در آزمون دیبا با استفاده از غلظت ۱:۵۰۰ ایمنوگلوبولین های خالص شده در مورد هر دو پروتئین پوششی و حرکتی پس از اضافه نمودن سوبسترا تغییر رنگ در محل اضافه کردن آنتی ژن با شدت های مختلف مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۳ : نتایج الایزای غیر مستقیم با استفاده از ایمنوگلوبولین تخلیص شده علیه پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو در رقت های ۱:۵۰۰، ۱:۱۰۰۰ و ۱:۲۰۰۰ (A: نمونه برگی آلوده (شاهد مثبت)، B: نمونه برگی دارای علائم GFLV، C: شاهد منفی (گیاه سالم)، D: بافر استخراج شیره گیاهی، E: بافر پوششی، F: سوبسترا

در تحقیق مذکور امکان ایمنی سازی و تخلیص ایمنوگلوبولین G علیه دو پروتئین اصلی ویروسی از جمله پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی به عنوان ماده ایمنی زا در شرایط آزمایشگاهی برای تولید آنتی-بادی های مناسب جهت کاربردهای متفاوت از جمله ردیابی مورد بررسی قرار گرفت. مشابه تحقیق انجام شده از IgG به عنوان آنتی بادی در شناسایی ویروس های متفاوتی استفاده شده است (Abou-Jawdah, et al. 2004; Cerovska et al., 2006; Cerovska et al., 2003; Korimbocus et al., 2002; Ling et al., 2000).

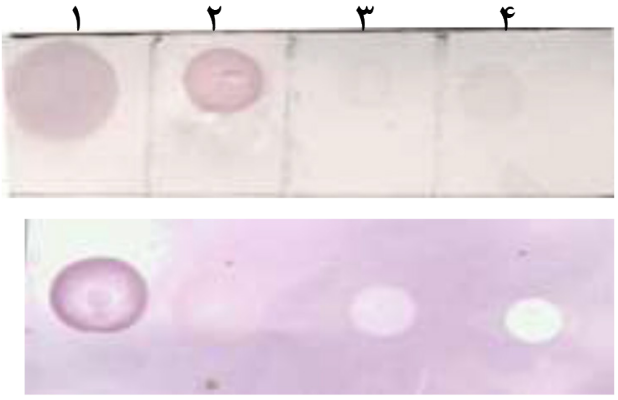


شکل ٤ : نتایج الایزای غیر مستقیم با استفاده از ایمنوگلوبولین تخلیص شده علیه پروتئین حرکتی ویروس برگ بادبزنی مو در رقت های ۱:۵۰۰، ۱:۱۰۰۰ و ۱:۲۰۰۰ (A: نمونه برگی آلوده (شاهد مثبت)، B: نمونه برگی دارای علائم GFLV، C: شاهد منفی (گیاه سالم)، D: بافر استخراج شیره گیاهی، E: بافر پوششی، F: سوبسترا

پس از خالص سازی ایمنوگلوبولین های تولید شده نیز قادر به ردیابی آنتی ژن ها از جمله پروتئین های بیان شده و تخلیص شده بودند. میزان ضریب جذب نوری در استفاده از آنتی بادی های نوترکیب علیه پروتئین پوششی نسبت به آنتی بادی تولید شده علیه پروتئین حرکتی بیشتر بود که این اختلاف ممکن است به مربوط به میزان پروتئین های تولید شده در ویروس گیاهی باشد. از طرفی عیار آنتی سرم تهیه شده علیه پروتئین حرکتی کمتر از پروتئین پوششی بود که این امر ممکن است در خالص سازی ایمونوگلوبولین ها تاثیر گذار باشد. پس از خالص سازی آنتی بادی های نوترکیب تولید شده علیه پروتئین پوششی در رقت ۱ به ۱۰۰۰ و آنتی بادی های تهیه شده علیه

پروتئین حرکتی در رقت ۱:۵۰۰ کارایی مناسبی داشتند. مشابه با همین نتایج سایر محققین نیز از آنتی بادی ها نوترکیب تخلیص شده برای ردیابی و شناسایی ویروس ها استفاده نموده اند (Afolabi et al., 2009; Alonso-Padilla et al., 2010; Aparicio et al., 2009; Bang et al., 2009; Cerovska et al., 2010;)

با توجه به اینکه پروتئین پوششی و حرکتی ویروس برگ بادبزنی مو از روی آران ای شماره این دو ویروس بصورت پلی پروتئین رمز می شود معمولاً میزان تولید این دو پروتئین یکسان می باشد اما توانایی خاصیت آنتی ژنیک پروتئین پوششی بسیار بالاتر از پوتئین حرکتی می باشد (Andret-Link et al., 2004) و این خاصیت سبب می شود که پروتئین پوششی توانایی بیشتری در واکنش با آنتی بادی های مربوطه داشته باشد و تفاوت واکنش در تست های انجام شده با دو پروتئین حرکتی و پوششی ممکن است به این نکته مرتبط باشد. از طرف دیگر با توجه به نقش پروتئین حرکتی که عموماً در حرکت سلول به سلول ویروس نقش دارد، این پروتئین با سایر پروتئین های گیاهی و حتی برخی از ساختارهای گیاهی برای تسهیل حرکت ویروس ارتباط برقرار می کند این نکته ممکن است سبب تغییر برخی از ساختارهای پروتئینی در سیستم گیاهی شود و از طرف دیگر در واکنش با آنتی بادی های تولید شده در سیستم پروکاریوتی تاثیر گذار باشد.



شکل ۵ : نتایج آزمون دیبا با استفاده از ایمنوگلوبولین های تخلیص شده پروتئین پوششی (الف) و پروتئین حرکتی (ب) ۱: پروتئین خالص شده، ۲: پروتئین بیان شده ۳: پروتیئن استخراج شده در زمان صفر ٤: پروتئین استخراج شده از باکتری دارای پلاسمید بدون قطعه

خالص سازی ایمنوگلوبولین سرم های ایمن شده به منظور تولید آنتی بادی معمولاً با تجهیزات زیاد و با استفاده از انواع روش ها و کیت های متنوعی انجام میگیرد که

مستلزم صرف هزینه و زمان زیاد می باشد. در تحقیق حاضر با استفاده از امکانات موجود امکان خالص سازی ایمنوگلوبولین ها از سرم خون با ستون DEAE سلولزی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد روش مذکور می تواند به صورت کاربردی و در حجم زیاد برای خالص سازی ایمنوگلوبولین مورد استفاده قرار بگیرد. علاوه بر این نتایج حاصل از تست های سرولوژیکی با استفاده از ایمنوگلوبولین های تخلیص شده حاکی از کارایی مناسب آن ها بود که قابلیت کاربرد برای ردیابی آنتی ژن های مربوطه و طراحی انواع کیت های تشخیصی را دارا می باشند.

رسوب دهی با استفاده از سولفات آمونیوم روشی ارزان و در دسترس می باشد که به منظور تخلیص ایمنوگلوبولین مورد استفاده قرار گرفت که با توجه به وجود ناخالصی در رسوب دهی با سولفات آمونیوم استفاده از ستون سلولزی DEAE می تواند باعث جذف ناخالصی ها و در عین حال افزایش کیفیت ایمنوگلوبولین های تخلیص شده شود. استفاده از روش های کروماتوگرافی پس از رسوب دهی در سولفات آمونیوم سبب حذف سایر ایمنوگلوبولین ها از سرم و خالص شدن ایمنوگلوبولین گاما با درجه خلوص بالا می-شود. این روش با وجود چند مرحله ای بودن روشی ساده و ارزان می باشد که معمولاً نسبت به کاربرد سایر کیت ها از نظر هزینه و زمان مقرون به صرفه می باشد.

کروماتوگرافی با ستون های پروتئین A یا G منجر به خالص سازی ایمنوگلوبولین G با خلوص زیادی می-شود اما معمولاً هزینه بالایی دارد. از طرف دیگر معمولاً برای جداکردن آنتی بادی ها از ستون از بافرهای با pH اسیدی یا قلیایی نسبتاً بالایی استفاده می شود که این امر ممکن است بر فعالیت آنتی بادی ها تاثیر گذاشته و سبب کاهش فعالیت ایمنوگلوبولین G در واکنش های اختصاصی از جمله ردیابی آنتی ژن مربوطه شوند.

در نهایت تحقیق حاضر نشان داد پروتئین های پوششی و حرکتی تهیه شده به صورت بیان در سیستم پروکاریوتی توانایی ایمنی زایی در بدن یک حیوان خونگرم را دارند و توانایی تولید آنتی سرم با رقت مناسب به منظور تخلیص را فراهم می نمایند. همچنین، با استفاده از ستون سلولوزی به خوبی می توان ایمنوگلوبولین G سرم های ایمن شده را استخراج و تخلیص نمود. نتایج کارایی ایمنوگلوبولین تخلیص شده در تست های سرولوژیک نشان داد ایمنوگلوبولین تخلیص شده به خوبی توانایی تشخیص نمونه های آلوده به ویروس برگ بادبزنی مو را دارند هر چند که میزان پاسخ در ایمنوگلوبولین

تهیه شده علیه پروتئین پوششی نسبت به پروتئین حرکتی بهتر است که این امر کی تواند به علت برخی خصوصیات آنتی ژنیک پروتئین پوششی ویروس ها باشد. تولید این پروتئین ها در سیستم پروکاریوتی و تخلیص و ارزیابی آنها در مورد ویروس برگ بادبزنی مو برای اولین بار است صورت میگیرد و آنتی بادی های تولید شده می تواند در موسسات و مراکزی که برای تشخیص این ویروس تحقیقات انجام می دهند مفید باشد زیرا آنتی بادی تولید شده علیه یک ایزله بومی از ایران تهیه شده است.

منابع

کولیوند، د. (۱۳۹۲) تهیهٔ آنتی بادی نوترکیب در برابر ویروس برگ بادبزنی مو و بررسی کارایی آن در آزمون های سرولوژیک و سرومولکولی. پایان نامه دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریزی

Abou-Jawdah, Y. Sobh, H. Cordahi, N. Kawtharani, H. Nemer, G. Maxwell, D.P. and Nakhla, M.K. (2004) Immunodiagnosis of Prune dwarf virus using antiserum produced to its recombinant coat protein. Journal of Virological Methods 121: 31-38.

Abbas, A.K. Lichtman, A.H. and Pillai, S. (2005) Cellular and molecular immunology, 2nd ed., Saunders Philadelphia. 448pp., USA

Afolabi, S. Akator, S. Abo, E. Onasanya, A. and Séré, Y. (2009) Production of polyclonal antibodies to various strains of rice yellow mottle virus (RYMV) obtained across different agro-ecological zones in West Africa. African Journal Biotechnology 4: 306-309.

Aparicio, F. Aramburu, J. Soler, S. Galipienso, L. Nuez, F. Pallás, V. and López, C. (2009) Immunodiagnosis of Parietaria mottle virus in tomato crops using a polyclonal antiserum against its coat protein expressed in a bacterial system. Journal of Plant Pathology 157: 511-513.

Alonso-Padilla, J. Jimenez, N. Blazquez, A.B. Loza-Rubio, E. Escribano, J.M. Saiz, J.C. and Escribano-Romero, E. (2010) Evaluation of an enzyme-linked immunosor-

bent assay for detection of west nile virus infection based on a recombinant envelope protein produced in Trichoplusia ni larvae. Journal of Virological Methods 166: 37-41.

Andret-Link, P. Laporte, C. Valat, L. Ritzenthaler, C. Demangeat, G. Vigne, E. Laval, V. Pfeiffer, P. Stussi-Garaud, C. and Fuchs, M. (2004) Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. Journal of Plant Pathology 86: 183-195.

Astier, S. Albouy, J. Maury, Y. and Lecoq, H. (2008) Principles of plant virology: genome, pathogenicity, virus ecology. Plant Pathology 57 : 989-989.

Bang, S.N. Jung, Y.S. Eom, S.J. Kim, G.B. Chung, K.H. Lee, G.P. Son, D.Y. Park, K.W. Hong, J.S. Ryu, K.H. and Lee, C. (2012) Assessment of the cucumber mosaic virus coat protein by expression evaluation in a genetically modified pepper and Escherichia coli BL21. Journal of Food Biochimistry 36: 432-440.

Cerovska, N. Filigarová, M. and 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.

Cerovska, N. Moravec, T. Plchova, H. Hoffmeisterova, H. Folwarczna, J. and Dedic, P. (2010) Production of Polyclonal Antibodies to Potato virus X Using Recombinant Coat Protein. Journal of Phytopathology 158: 66-68.

Cerovska, N. Moravec, T. Rosecka, P. Dědič, P. and Filigarova, M. (2003) Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of potato mop-top virus. Journal of Phytopathology 151: 195-200.

Flint, S.J. Enquist, L.W. Racaniello, V.R. and Skalka, A.M) .2009) Principles of virology. ASM Press; 2nd edition, 850 pp., USA

Hampton, R. Ball, E. and Boer, S. (1990) Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual APS press, 389pp. USA

Koolivand, D. (2014) Preparation of polyclonal antibody to Grapevine fan leaf virus and analysis of its effeciency in seroogical and seromolecular test. University of Tabriz

Korimbocus, J. Preston, S. Danks, C. Barker, I. Coates, D. and Boonham, N. (2002) Production of monoclonal antibodies to Sugarcane yellow leaf virus using recombinant readthrough protein. Journal of Phytopathology 150: 488-494.

Lima, J.A.A. Nascimento, A.K.Q. Radaelli, P. and Purcifull, D.E. (2012) Serology applied to plant virology. Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases Rijeka Croácia InTech: 71-94

Mulholland, V. (2009) Immunocapture-PCR for plant virus detection Plant Pathology. Springer, p 183-192.

Naidu, R. Hughes, J.D.A. (2003) Methods for the detection of plant virus diseases. Plant Virology in Sub Saharan Africa 233-253.

Sokhandan-Bashir, N. Pashaee, A. and Doulati-Baneh, H. (2011) Characterization of the full length coat protein gene of Iranian Grapevine fanleaf virus isolates, genetic variation and phylogenetic analysis. Iranian Journal of Biotechnology 9: 213–221.