Archive of SID

همسانه‌سازی و بیان ژن پروتئین حرکتی جدایه ایرانی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی در *Escherichia coli*

معین خجسته پشتیری[۱]، ابوذر قربانی[۱] و سید علی اکبر بهجت‌نیا[۲]

۱.دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۲.دانشیار، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
moeinkhojaste91@ut.ac.ir

جدایه ایرانی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV-[Ab])، از خسارت‌زاترین ویروس‌های گوجه‌فرنگی در ایران محسوب می‌شود. TYLCV با ژنوم DNA تک حلقوی عضو جنس *Begomovirus* و خانواده *Geminiviridae* می‌باشد. ژنوم ویروس TYLCV-[Ab] دارای دو چارچوب خوانش باز شامل V1 و V2 روی رشته ویروسی و چهار چارچوب خوانش باز شامل، C1، C2، C3 و C4 روی رشته مکمل می‌باشد. چارچوب خوانش باز V2 در حرکت ویروس در گیاه نقش دارد. در تحقیق حاضر، پس از استخراج DNA از گیاهان آلوده، ژن پروتئین حرکتی TYLCV-[Ab] در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) توسط آغازگرهای اختصاصی حاوی محل‌های برشی BamHI و HindIII به ترتیب در انتهای ´۵ آغازگرهای ویروسی و مکمل تکثیر شد. نتیجه PCR تکثیر یک قطعه DNA مورد انتظار به اندازه حدود ۳۵۰ جفت باز بود که پس از جداسازی و خالص سازی از ژل در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T همسانه‌سازی شد. پلاسمید نوترکیب حاصل (pTZ57TYLCV-V2)، جهت تکثیر به باکتری *Escherishia coli* سویه DH5α انتقال داده شد. صحت همسانه نوترکیب حاصل (pTZ57TYLCV-V2) از طریق تعیین ترادف ژن وارد شده توسط شرکت Macrogen کره جنوبی مورد تایید قرار گرفت. اندازه دقیق ژن V2، ۳۵۱ جفت باز تعیین شد که با ترادف قطعه مورد نظر ژن پروتئین حرکتی (V2) ویروس TYLCV-[Ab] شباهت ۹۹/۹۹ درصدی نشان داد. ژن مربوطه پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی BamHI و HindIII از pTZTYLCV-V2 بازیابی و به ناقل بیان pET28 انتقال یافت. پلاسمید نوترکیب بدست آمده (pET28TYLCV-V2) با روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* سویه‌ی BL21 (DE3) وارد گردید و به مدت یک شب در محیط LB جامد حاوی ۱۰۰ µg/ml آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین و ۲۵ µg/ml آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد. DNA پلاسمیدهای نوترکیب pET28TYLCV-V2 پس از کشت مجدد باکتری در محیط LB مایع استخراج و وجود قطعه‌ی مورد نظر در آن توسط هضم آنزیمی و انجام PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مورد تأئید قرار گرفت. در نهایت بیان پروتئین حرکتی (V2) با استفاده از غلظت‌های مختلف IPTG القا گردید. نمونه‌برداری از پروتئین در غلظت‌ها و ساعات مختلف پس از القا انجام شد. بررسی نمونه‌های پروتئینی باکتری ترانسفورم شده با pET28TYLCV-V2 در آزمون الکتروفورز پروتئین با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید و سدیم دودسیل سولفات نشان داد که پروتئین مورد نظر پس از گذشت ۳ ساعت از زمان القاء با غلظت ۱ میلی‌مولار از ترکیب IPTG با تشکیل یک باند قوی با وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلودالتون که با وزن تخمین زده شده برای محصول ژن V2 تطابق داشت، از بقیه پروتئین‌ها قابل تفکیک است. نتیجه این تحقیق نشان داد که پروتئین حرکتی TYLCV-[Ab] در سیستم باکتریایی بیان می‌شود. پروتئین بیان شده می‌تواند برای تولید انبوه آنتی‌ژن و نهایتاً تولید آنتی‌بادی، شناسایی جدایه‌های بومی TYLCVو مطالعات برهمکنش ویروس- میزبان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی، پروتئین حرکتی TYLCV-[Ab]، باکتری *E. coli*.

www.SID.ir

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop