

کلون سازی cDNA سیستاتین ذرت (CCs)، و ارزیابی اثر بازدارندگی پروتئین آن در شرایط آزمایشگاهی

قدرت‌اله ریاضی^۱

چکیده

جداسازی و کلون سازی ژن‌های نوترکیب بازدارنده پروتاز (PIs) گیاهی و انتقال آنها به ژنوم گیاهان دیگر، راه را برای مقاومت گیاهان تراریخته در مقابل بعضی آفات مهاجم هموار ساخته است. در پژوهش حاضر با علم به قدرت مهارکنندگی سیستاتین‌ها به عنوان عامل مهارکننده پروتاز سیستین، ژن‌های سیستاتین از ژنوم ذرت جداسازی گردید. cDNA مربوط به این ژن‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در محیط آزمایشگاه ساخته شد و پس از خالص سازی محصول PCR - RT در ناقل‌های پلاسمید *pGEX 2T* و *pUC19* و *pDh5α* کلون گردید. ناقل‌های پلاسمید نوترکیب (حاوی سیستاتین‌های ذرت) با استفاده از دستگاه شوک الکتریکی به سلول‌های مستعد اشرشیاکولی *Dh5α* انتقال داده شدند. سلول‌های مستعد حاوی کلون‌های نوترکیب در محیط کشت مساعد رشد داده شدند و پروتئین‌های سیستاتین متصل به گلوتاتیون-امس-ترانسفراز (GST) با استفاده از فیلتر گلوتاتیون آگاروز بید (Glutation Agarose Bead) خالص سازی گردیدند. در هر مرحله از پیشرفت کار وجود ژن‌های سیستاتین بهوسیله الکتروفورز نمونه‌ها مورد تأیید قرار گرفت. در آزمایش‌های بعدی اثر بازدارندگی پروتاز و پایداری نسبی سیستاتین‌های نوترکیب مورد ارزیابی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: سیستاتین ذرت، بازدارنده پروتازی، ناقل پلاسمید، سلول مستعد *E. coli*, تراریخته، شوک الکتریکی

مقدمه

توجه و اهمیت خاصی را در کشورهای توسعه یافته بخود معطوف داشته است. در این شیوه جدید تنها حشرات تغذیه کننده از مواد گیاهی تراژن در معرض آسیب خواهند بود و می‌توان از غیر سمی بودن محصولات ژن (ها) برای انسان اطمینان حاصل نمود (۶). به کارگیری تکنیک DNA نوترکیب، جداسازی و کلون کردن ژن‌های مورد نظر از منابع مختلف

به منظور جلوگیری از خسارت وارده توسط آفات و بیماری‌ها و به دست آوردن محصولی سالم و هم‌چنین اجتناب از آلودگی محیط زیست، به موازات برنامه‌های بهترادی سنتی، استفاده از دانش مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی به عنوان راهکار جدید و جایگزینی، با مزیت آشکار آن در مقایسه با شیوه‌های سنتی،

۱. عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس

کاهش می‌یابد (۱۰). انتقال کلون‌های نوترکیب حاوی ژن‌های مهار کننده‌های پروتئیناز (PIs) به ژنوم گیاهان، راه را برای مقاومت گیاهان در مقابل بعضی حشرات مهاجم هموار ساخته است (۴).

اولین گزارش مبنی بر کاربرد این روش استفاده از گیاه تباکوی ترازیخته با یک ژن مهارکننده تریپسین (*CpTl*) از گیاه Cowpea می‌باشد، که توسط هیلدر و همکاران (۹) معرفی شد. این گروه توانست با بیان پروتئین حاصل از این ژن به مقدار یک درصد کل پروتئین در سطح برگ گیاه، باعث صدمه به لارو یکنوع هلیوتیس (*Heliothis virescens*) که یک آفت جدی تباکوست، گردد. این موضوع در رابطه با بازدارنده‌های پروتاز نوع سیستاتین همانند ترانس-اپوکسی سوکسینیل-لئوسیکلامیدو بوتان (Trans – epoxy succynil leocyclamido butane) که به طور اختصاری E-64 نامیده می‌شود نیز صادق است. این بازدارنده منشاء قارچی داشته (۸) و بر علیه آنزیم‌های پروتازهای سیستئین گونه‌های سخت بال پوشان (Coleoptera) مؤثر است (۱۹ و ۳۰). لازم به ذکر است که حشرات راسته‌های سخت بال پوشان و ناجور بالان (Hemiptera) دارای محیط گوارشی با اسیدیته ملایم بوده و به طور معمول دارای پروتازهای سیستئین در لوله گوارشی خود می‌باشند (۳ و ۱۱ و ۱۴ و ۲۰). در عین حال حشرات با داشتن پروتازهای جایگزین و غیر حساس ممکن است عمل بازدارنده‌گی سیستاتین‌ها را تعدیل نمایند (۲۱). بنابراین به منظور استفاده از مهارکننده‌های پروتاز در گیاهان می‌بایست ضمن در نظر گرفتن پیچیدگی و خصوصیات فیزیولوژیکی پروتازهای موجود در سیستم گوارشی حشرات در شرایط متفاوت، از بازدارنده‌های نهائی با طیف وسیع عملکرد و پایدار که به طور مؤثر به پروتازهای خود وصل شده و آنها را غیر فعال می‌کنند، استفاده نمود (۱۳).

پژوهش‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نشان می‌دهد که انتقال ژن‌های سیستاتین‌های برنج (OC I & OC II) به ژنوم گیاه سیب زمینی، ضمن افزایش مقاومت نسبی این گیاه در مقابل آفت سوسک کلرادو، از پایداری خوبی برخوردار نبوده

گیاهی و انتقال آنها به گونه‌های دیگر، حتی بدون قرابت خویشاوندی، ویژگی این روش را نسبت به شیوه‌های سنتی اصلاح نباتات نشان می‌دهد.

تهیه و تدوین استراتژی‌های در به کارگیری ژن(ها)ی بیان کننده بازدارنده‌ها و تنظیم سیستم‌های آنزیمی به وسیله آنها، چشم انداز بالارزشی را در به وجود آوردن گیاهان مقاوم به آفات نشان می‌دهد. دو استراتژی در تولید گیاهان ترازیخته مقاوم به حشرات معرفی شده است. در یک استراتژی از پروتئین‌های سمعی باسیلوس ترنجیتیسیس (BT) استفاده می‌شود (۶)، که در آن حشرات تغذیه کننده از بافت‌های گیاهی که این سم در آنها بیان می‌شود، به طور مستقیم تحت تأثیر سم هضم شده قرار می‌گیرند. تاکنون تعدادی از این ژن‌ها کلون شده و توسط پلاسمید ناقل به گیاهان منتقل و ترازیخته‌های حاصل، تا حد زیادی در مقابل خسارت ناشی از آفات تغذیه کننده مصنون مانده‌اند (۲۲ و ۲۷). گرچه گیاهان تجاری دارنده BT سطح قابل ملاحظه‌ای از مصنونیت را در مقابل حشرات از خود نشان داده‌اند، اما محتویات سمعی تولید شده توسط باکتری در تحت شرایط مزرعه و به خصوص در شدت نور ماورای بنفش پایدار نمی‌ماند. علاوه بر آن تأثیر این سموم بیولوژیکی بر روی آفات به دلیل حالت تکاملی مقاومت آنان به سموم در نهایت و به طور سریع از بین می‌رود (۲۶)، لذا می‌بایست به دنبال راه حل‌های جایگزینی دیگری بود.

در استراتژی دیگر از پروتئین‌های بازدارنده با منشاء گیاهی استفاده می‌شود. نشان داده شده است که بازدارنده‌های آلفا آمیلاز، سیستاتین‌ها، پراکسیدازها و یکسری ملکول‌های دیگر در مکانیزم دفاعی گیاهان بر علیه حشرات و پاتوژن‌ها نقش دارند (۶، ۷ و ۱۸). هضم و تجزیه پروتئین‌های جذب شده از گیاهان با آنزیم‌های پروتولیتیک موجود در لوله گوارشی حشرات صورت می‌پذیرد که این موضوع باعث رشد، تکامل و زاد و ولد حشرات می‌گردد (۲۳). در صورتی که به گونه‌ای بتوان از فعالیت این آنزیم‌ها جلوگیری نمود، حشرات با کمبود اسیدهای آمینه مواجه شده و در نتیجه افزایش مرگ و میر، زاد و ولد آنها

سانتی گراد نگه داری شد.
برای استخراج و خالص سازی RNA از کیت شرکت کیاژن کانادا و پروتکل مربوطه (۱۹۹۶) استفاده شد. RNA نمونه در ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد. برای تعیین میزان RNA استخراجی از دانه ذرت، مقدار ۵ میکرولیتر از عصاره استخراج شده در ۴۹۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده حل و غلظت نمونه بوسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر در مقایسه با شاهد (آب DEPC اتوکلاو شده) اندازه گیری شد.

از دیدار cDNA سیستاتین ذرت با روش نسخه برداری معکوس (Reverse Transcription)

برای ساخت cDNA از کیت شرکت فارماسیا بیوتک آمریکا (USA Pharmacia Biotech) استفاده شد. محلول تهیه شده به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۶۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و بلا فاصله به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ سرد شد. سپس برای تولید cDNA، در یکی از لوله ها ۲۰ پیکو مول پرایمر تصادفی $pd(N)_6$ (hexadeoxyribonucleotide mixture) که از ۶ دز کسی ریبونوکلئوتید تصادفی تشکیل و انتهای '۵ آن فسفر پلیزه شده و برای ساخت cDNA از mRNA به کار برده می شود، استفاده شد. ترکیبات چند بار با پیپت خوب بهم زده شد و در حمام آب ۳۷ درجه سانتی گراد خوابانده شد و محصول به دست آمده در منهای ۲۰ درجه سانتی گراد نگه داری گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمراز

چهار میکرو تیوب PCR با محتوای زیر تهیه شد: تیوب اول: ۳۶/۵ میکرولیتر آب اتوکلاو شده، پنج میکرولیتر بافر Taq DNA پلیمراز، پنج میکرولیتر از پرایمرهای L CC1.5 و CC1.3 میلی مولار، یک میکرولیتر از پرایمرهای Taq و یک میکرولیتر از آنزیم پلیمراز Taq. محتویات تیوب دوم شبیه به اولی بوده و تنها نوع پرایمرها به CC1.5L و CC2.3 تغییر یافته، محتویات

است. هم چنین انتقال ژن های بازدارنده آنزیم های تریپسین (در کلم ترا ریخته و سویا)، و نوعی از بازدارنده شماره دو موجود در سیب زمینی، حساسیت های متفاوتی را در حشرات مهاجم تغذیه کننده از آنها به وجود آورده است. با جستجو و استفاده از بازدارنده های با طیف عملکرد وسیع تر و پایدارتر و قرار دادن آنها در ژنوم گیاهان دیگر می توان از فعالیت آنزیم های پروتاز به هنگام تغذیه حشرات از گیاهان مهندسی شده جلوگیری نموده یا فعالیت آنها را کاهش داد و بدین ترتیب با جمعیت آفت مبارزه نمود(۵). در این راستا، هدف این پژوهش جداسازی و کلون سازی ژن سیستاتین ذرت (CCs) موجود در دانه های این گیاه، تهیه cDNA، کلون سازی و ارزیابی بازدارنده گپ پروتئین حاصل از آن در مقابل آنزیم پروتاز سیستاتین در محیط آزمایشگاه می باشد.

مواد و روش ها

استخراج DNA و RNA

برای کاشت ذرت در گلخانه مقداری دانه ذرت در یک فلاسک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر شده که هوا به مدت ۴۸ ساعت در آن جریان داشت، خیسانده شد. سپس دانه ها در کیسه های پلی اتیلن سه لیتری که با ورمی کولیت پر شده بود کاشته شدند. گلدان ها در شرایط کنترل شده حرارت و رطوبت گلخانه با میزان ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند و پس از تغذیه با کود کامل ازت، فسفر و پتاسیم (۱۵-۳۰-۱۵) با دور پنج روز آبیاری شدند. گلدان های کاشت شده تحت این شرایط تا زمانی که نهال های ذرت به غلاف نشستند، نگه داری شدند. تعدادی از غلاف های جوان ذرت برداشت و دانه های ذرت نابالغ و هم چنین دیسک هایی از برگ در شرایط استریل جدا و پس از انجماد در نیتروژن مایع، در 80°C - نگه داری شدند. استخراج DNA ژنومی با استفاده از پروتکل K. Edward (۶) انجام گرفت. غلظت DNA ژنومی با دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری و DNA استخراج شده در چهار درجه

بعدی ذخیره شد. برای اثبات خالص سازی نمونه‌ها یک آزمایش ژل الکتروفورز انجام گرفت و توالی آنها از طریق بانک ژن مشخص گردید.

کلون سازی cDNA سیستاتین ذرت (CCs) در ناقل pGEX 2T و pUC 19

برای کلون سازی محصول RT-PCR خالص شده میباشد آنرا به یک ناقل مناسب متصل نمود. برای این منظور عمل هضم دوگانه توسط آنزیم‌های *Bam HI* و *Sma I* صورت گرفت. در پایان عمل هضم با اضافه نمودن لودینگ بافر (پنج میکرولیتر) به محلول و انتقال آن به آگاروز ژل و الکتروفورز کردن، باندهای *pGEX 2T* و *pUC 19* در زیر نور UV مشاهده شد. پلاسمید *pUC 19* در زیر نور UV مشاهده شد. پلاسمید *pGEX 2T* و نیز به همین ترتیب هضم شد. عمل هضم محصول RT-PCR و پلاسمیدها با آنزیم‌های محدود کننده و با استفاده از کیت استاندارد شرکت BOEHRINGER MANNHEIM آلمان (در حال حاضر با شرکت ROCHE ادغام شده است) انجام گرفت. در پایان هر کدام از رسوب حاوی پلاسمید با سیستاتین‌های ذرت گنجانده شده در ۲۰ میکرو لیتر آب مقطر اتوکلاو شده حل و برای استفاده بعدی در یخچال و در چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تعیین صحت عمل اتصال محصول در پلاسمید، عمل هضم دوگانه با آنزیم‌های *I* و *Sma* بر روی پلاسمید حاوی محصول صورت گرفت و نمونه‌ها الکتروفورز شد.

انتقال کلون‌ها به سلول‌های مستعد اشرشیاکولی

۴۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد α *DH 5* در محیط اتاق با دو میکرولیتر از پلاسمیدهای حاوی cDNA مورد نظر در cuvette برای چندین بار بآرامی پیپت و با استفاده از دستگاه شوک الکتریکی با تنظیم مقاومت Ω ۲۰۰ و ولتاژ دو و نیم ولت، پالس ایجاد و عمل انتقال صورت گرفت. سلول‌های انتقال یافته بالفاصله در یک میلی لیتر محلول تازه LB فاقد آمپسی سیلین حل شده و پس از ازدیاد، ۱۰۰ میکرو لیتر از سلول‌های ازدیاد

تیوب سوم شبیه به دومی بوده و تنها نوع پرایمرها به CC1.5S و CC2.3 تغییر یافت و محتويات تیوب چهارم شبیه به تیوب سوم بوده و تنها نوع پرایمرها به CC2.5S و CC2.3 تغییر یافت (پرایمرهای مورد استفاده در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه لالو کانادا ساخته شده است). فرایند PCR با مختصات ۴۵ ثانیه ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، و ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ دور چرخش انجام شد. سپس نمونه‌ای از هرکدام از محصول به دست آمده و مارکر استاندارد (1 kb) با اضافه نمودن محلول اتیدیوم بروماید (Etidium Bromide) به ژل آگاروز یک درصد منتقل و الکتروفورز شد و باندهای حاصله با استفاده از نور UV مشاهده گردید. طراحی پرایمرها بر مبنای توالی سیستاتین‌های کوتاه و بلند ذرت و جایگاه آنزیم‌های برش دهنده آنها از جمله *I* و *HI* در جدول زیر آمده است. ویژگی این پرایمرها آنست که به دلیل اختصاصی بودن، در فرایند PCR تنها توالی ژن‌های مورد نظر را ازدیاد می‌نمایند.

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
CC1.5L	AGGATCCAATCCAGATGCGAAACATCGAACATC
CC1.5S	AGGATCCGTGGCTGAGAACGCCGGATGTTG
CC1.3	TCCC GG GTGCATGCTCTGGCATGTTCCGA
CC2.5S	AGGAT CCC ATGGCCGACAAC ACCGGGACG
CC2.3	ACCCGGGAGAAGGAGAGATCCTTAGCGCCT

ترادف نوکلئوتید و خالص سازی cDNA سیستاتین ذرت

برای خالص سازی محصول cDNA از کیت سفالگاس باند پرپ (Pharmacia Biotech, 1995) (Sephalgas Bond prep kit) استفاده شد. نمونه‌هایی از هر محصول RT-PCR به ژل آگاروز یک درصد منتقل و در حضور مارکر استاندارد، الکتروفورز شد. باندهای مشاهده شده در ناحیه سیستاتین‌های ذرت I و II که به دلیل نوع پرایمرهای استفاده شده و وجود سیستاتین‌های کوتاه و بلند به صورت دو باند با وزن ملکولی متفاوت و پشت سر هم در هر ستون دیده می‌شدند، بریده شده و به طور جداگانه در لوله‌های یک میلی لیتری ذخیره شدند. محصول خالص RT-PCR به دست آمده در ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای مصارف

لیزوزیم اضافه و دوباره برای مدت پنج دقیقه در يخ نگهداری شد. سپس محلول حاصل از عمل لیزوزیم برای ۱۰ دقیقه با سرعت g ۶۰۰۰ و در ۴ °C سانتریفیوژ و هر دو مایع روئی و رسوب برای آزمایش تعیین پروتئین نگهداری شدند.

به نیم میلی لیتر از عصاره، ۵۰ میلی لیتر محلول ۵۰ درصد گلوتاتیون آگاروز بید (Glutathione agarose beads) (چهار میلی لیتر Tris ۵۰ میلی مولار با PH مساوی هشت + ۱۵۰ میلی گرم گلوتاتیون آگاروز بید) اضافه شد. حجم نهائی برای GST مدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان داده شد تا پروتئین متصل به جذب bead شود و سپس برای ۱۰ دقیقه با سرعت g ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع روئی با پیپت پاستور به آرامی جدا و با اضافه نمودن سه میلی لیتر Tris ۵۰ میلی مولار، ترکیب همانند حالت قبل سانتریفیوژ شد. این عمل برای سه بار تکرار تا تمام پروتئین جذب شده و در نهایت پروتئین جذب شده به bead با نیم میلی مولار Tris ۵۰ میلی مولار حاوی ۱۰ میلی مولار گلوتاتیون ترکیب و با استفاده از سانتریفیوژ به مدت پنج دقیقه در سرعت ۱۰ هزار دور، مایع روئی حاوی پروتئین خالص برداشت شد. این عمل برای به دست آوردن حداقل پروتئین، یکبار دیگر تکرار و پروتئین خالص در ۲۰ °C-۲۰ °C-برای مصارف بعدی نگهداری شد.

تخمین غلظت پروتئین سیستاتین ذرت با استفاده از آزمایش برادفورد (Broadford Test)

به منظور تخمین میزان پروتئین تولیدی، از آزمایش سریع برادفورد(۲) و از BSA (Bovine Serum Albumin) به عنوان استاندارد استفاده شد. برای تخمین غلظت پروتئین حاصله مقدار ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، و ۲۵ میکرولیتر از غلظت نهایی ۴۰۰ میکروگرم محلول تهیه شده BSA که غلظت هر کدام به ترتیب دو، چهار، شش، هشت و ده میکروگرم در میلی لیتر برادفورد شد، برداشت و با اضافه نمودن ۲۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد و آب مقطر دو بار تقطیر شده حجم تمام لوله های آزمایش به هزار میکرولیتر رسانده شد و با اسپکتروفتومتر غلظت ها در دو

شده بر روی محیط استریل FastMedia™ LB Agar Amp Phermentas (Company) به مدت یک شب در درجه حرارت ۳۷ °C نگهداری شدند. کلونی های به دست آمده در روی پلیت های حاوی LB و آمپی سیلین مخلوط شدند و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب نگهداری شدند. برای جداسازی و خالص سازی پلاسمید های حاوی سیستاتین های ذرت انتقال یافته به سلول های مستعد از کیت فلکسی پرپ شرکت فارماسیا بیوتک (Pharmacia Biotech, Flexi prep kit) و مطابق پروتکل مربوطه عمل شد. برای جداسازی گنجانده از پلاسمید، پنج میکرو لیتر از پلاسمید های خالص شده تحت تأثیر آنزیم های Bam HI و Sma I به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد برای تأیید وجود فرایند کلون سازی نگهداری و نمونه ها ژل الکتروفورز شدند.

تولید پروتئین سیستاتین ذرت در *E. coli* و خالص سازی
سلول های مستعد DH5 α حامل پلاسمید های نوترکیب و خالص سازی شده pGEX 2T و pUC 19 جهت تشخیص تولید پروتئین توسط ژن های گنجانده شده، به شرح زیر مورد آزمایش قرار گرفتند:

برای تحریک به تولید پروتئین نوترکیب، سلول های برداشت شده حامل پلاسمید ها در ۲۰ میلی لیتر محیط LB و یک میلی مول (SIGMA, USA) به غلظت دو میلی مولار IPTG به مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. محصول به دست آمده در سرعت g ۶۰۰۰ و در درجه حرارت چهار درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع روئی دور ریخته شد و رسوب حاصل برای مدت یک ساعت در ۲۰ °C-نگهداری شد. آنگاه یک میلی لیتر لیسیس بافر (۵۰ میلی مولار Tris با اسیدیته ۸ ۲۰ میلی مولار EDTA ۵ درصد حجمی Triton X-100 و گلیسرول) اضافه و محلول به مدت پنج دقیقه در يخ نگهداری شد. به این محلول ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر (غلظت نهایی ۲۵٪ در صد)

سیستاتین قرار داده شد. نمونه‌ها در معرض ۲۰۰ ولت جریان الکتریسته الکتروفورز گردیدند. در پایان فعالیت پایداری مهارکننده‌های آزمایش شده که به‌وسیله کوماسی بریلیانت بلو (Commase Brilliant Blue) رنگ آمیزی شده بودند به صورت باندهای آبی رنگی مشاهده گردید.

تکرار و در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و معدل آنها محاسبه گردید. برای نمونه‌های پروتئین‌های نوترکیب سیستاتین ذرت نیز چگالی نوری به همین ترتیب محاسبه و از نرم افزار گراف کریکر (Cricker graph Software) و OD به‌دست آمده برای غلظت‌های شناخته شده BSA استفاده و با داشتن معادله رگرسیون حاصل از گراف غلظت پروتئین‌های مورد نظر محاسبه شد.

نتایج

اندازه‌گیری DNA و RNA استخراج شده

تخمین غلظت DNA ژنومی استخراج شده از برگ ذرت با استفاده از اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر (هر واحد OD معادل ۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر DNA ژنومی است) و با انجام محاسبات، ۴۶۰ میکرو گرم در میلی لیتر به‌دست آمد. میزان RNA استخراج شده از دانه ذرت، با استفاده از اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر در مقایسه با شاهد (آب خالص دو بار تقطیر شده) خوانده شد. مقدار RNA نیز شبیه به DNA محاسبه گردید، تنها با این تفاوت که هر واحد معادل ۴۰ میکرو گرم در میلی لیتر RNA می‌باشد. میزان RNA محاسبه شده ۴۲۴ نانو گرم در میلی لیتر به‌دست آمد.

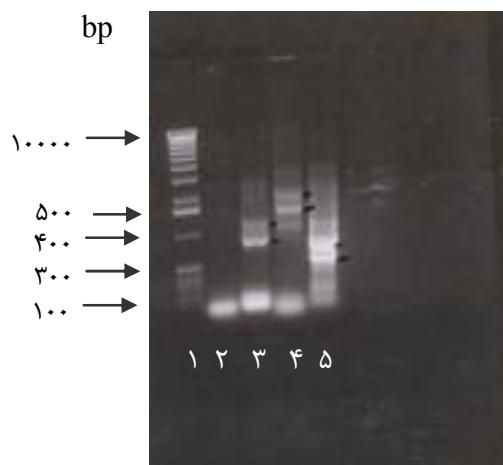
توالی و مشاهده باندهای مربوط به سیستاتین نوترکیب ذرت بر روی ژل الکتروفورز

توالی cDNA سیستاتین‌های ذرت I و II کوتاه و بلند با استفاده از بانک ژن مشخص شد. سیستاتین ذرت با کد دسترنسی D10622, D90549 از نظر آنالیز آنزیمی دارای ۹ جایگاه آنزیمی (شش برش دهنده از جمله *EcoRI*, *BamHI*, *SmaI* و *EcoRI*) بوده و سیستاتین ذرت II با کد دسترنسی D38130 دارای ۷ جایگاه آنزیمی برش دهنده می‌باشد.

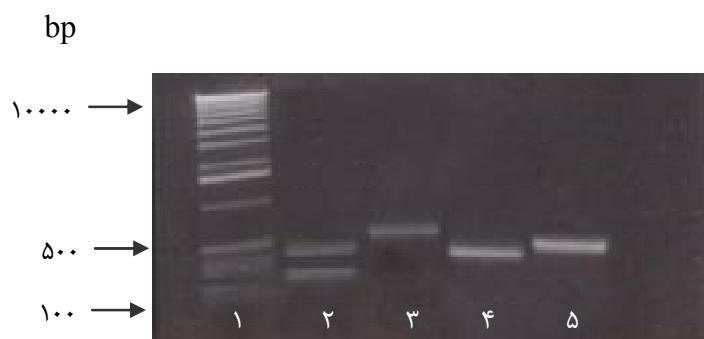
محصول هر کدام از سیستاتین‌های حاصل DNA ژنومی که تحت تأثیر آنزیم‌های برشی قرار گرفته و توسط PCR تکثیر شده بود به ژل الکتروفورز منتقل که نتایج آن در شکل ۱ مشاهده می‌شود. از آنجا که واکنش PCR مربوط به DNA ژنومی یک واکنش غیر اختصاصی بوده و نمی‌توان صد درصد

آزمایش فعالیت و پایداری سیستاتین‌های نوترکیب بازدارنده پروتاز سیستئین

برای این منظور دو آزمایش ترتیب داده شد که در یکی از پروپاپین (PP) با وزن ملکولی ۳۹ کیلو دالتون و در دیگری از پرو پروتئیناز پاپایا (*Carica papaya*) (PP IV) با وزن ملکولی ۱۳ کیلو دالتون به عنوان سوبسترا و از عصاره لوله گوارشی لارو سوسک کلرادو (تهیه شده توسط گروه تحقیقات آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه لاوال) به عنوان منبع سیستئین پروتئاز استفاده شد. در هر کدام از این آزمایش‌ها مقدار هفت و نیم میکرو گرم از عصاره حاوی پروتاز به حجم ۵۰ میکرو لیتر رسانده شد. سپس مقدار پنج میکرولیتر از مهارکننده‌های سیستاتین (10 mg/ml) به‌طور جداگانه با هر نمونه ترکیب و آنگاه با اضافه نمودن ۴۵ میکرولیتر بافر فعال کننده (Activated Buffer) (100 mM Cit-Po4, pH=6; 0/1 Triton X-100 & 5 mM L-Cysteine) حجم کل هر نمونه به ۱۰۰ میکرو لیتر رسانده شد. برای تعیین فعالیت و مدت پایداری مهارکننده‌ها، ترکیب‌های تهیه شده به نمونه‌های ۱۰ میکرولیتری تقسیم و در مدت زمان‌های مختلف صفر، ۲۰، ۴۰ ثانیه و ۱، ۵، ۱۰ و ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگهداری و در پایان هر وقت فعالیت مهارکنندگی با TCA همانند قبل متوقف شد. برای تشخیص فعالیت و میزان پایداری مهارکننده سیستاتین بر علیه پروتاز سیستئین موجود در عصاره از تکنیک Gelatin-PAGE استفاده شد (۱۸ و ۲۴). نمونه‌های تهیه شده در هر آزمایش را به‌طور جداگانه در چاهک‌های ژل پلی آکریلامید ریخته و در هر کدام عصاره لوله گوارش لارو حشره سوسک کلرادو حاوی پروتاز سیستئین و مهارکننده



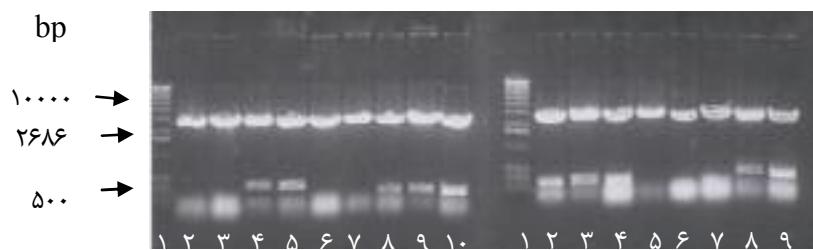
شکل ۱. نتایج حاصل از PCR محصول DNA ژنومیک سیستاتین‌های ذرت (CC1 & CCII) پس از عمل هضم آنزیمی در ژل آگاروز را نشان می‌دهد. ستون ۱ مارکر استاندارد با وزن مولکولی ۱ kb می‌باشد. ستون ۲ فاقد عمل هضم آنزیمی و ستون ۳ باندهای مربوط به سیستاتین ذرت (CC1) کوتاه، ستون ۴ باندهای مربوط به سیستاتین ذرت (CC1) بلند و ستون ۵ قطعه کروموزوم مربوط به سیستاتین ذرت (CCII) را نشان می‌دهد. وجود باندهای اضافی در هر ستون نشان‌دهنده وجود احتمالی ژن‌های همتای سیستاتین ذرت می‌باشد.



شکل ۲. نمونه‌های خالص شده cDNA مربوط به هر کدام از سیستاتین‌های ذرت در محصول RT - PCR را نشان می‌دهد. ستون ۱ مربوط به مارکر استاندارد با وزن مولکولی ۱۰۰ bp می‌باشد. ستون‌های ۲ (باند بالاتری) و ستون ۳ مربوط به CC1 کوتاه و بلند و ستون‌های ۴ و ۵ به ترتیب مربوط به CCII کوتاه و بلند می‌باشد. باند اضافی پائینی موجود در ستون دو می‌تواند مربوط به محصول مشابه باشد.

پلاسمیدهای نوترکیب *pUC* مقاوم به آمپی سیلین بر روی محیط کشت با رنگ سفید و آبی ظاهر شدند. برای تشخیص پلاسمیدهای حاوی cDNA گنجانده، چند کلونی نوترکیب سفید به طور جداگانه جدا و هر کدام پس از رشد در محیط LB دارای آمپی سیلین و به مدت یک شب قرار گرفتن بر روی شیکر در ۳۷ درجه سانتی گراد برداشت و نمونه‌ای از پلاسمیدهای استحصالی از هر کدام و با عمل هضم و انجام الکتروفورز cDNA، گنجانده تأیید شد. در کلونی‌هایی که تحت

به محصولات آن و باندهای مشاهده شده استناد کرد، لذا برای اطمینان لازم از محصولات RT-PCR استفاده شد. مزیت استفاده از روش نسخه برداری معکوس استفاده از RNA به مثابه قالب برای تولید cDNA که فاقد ایتررون (قطعه DNA) که هیچ نوع ژنی را بیان نمی‌کند) است، می‌باشد. محصول cDNA به دست آمده از mRNA توسط PCR تکثیر که پس از خالص سازی و ژل الکتروفورز کردن، نتایج در شکل ۲ آمده است.



شکل ۳. پلاسمیدهای نوترکیب *pUC* را نشان می‌دهد (۲۶۸۶ جفت باز) که تحت تاثیر عمل هضم قرار گرفته و *cDNA* سیستاتین‌های ذرت از آنها جدا و در وزن ملکولی خود قرار گرفته‌اند.

ردیف‌های ۱ در هر قسمت تصویر، مارکر استاندارد با وزن ملکولی bp ۱۰۰ است. ردیف‌های ۲ و ۳ و ۶ و ۷ از تصویر سمت چپ و ردیف‌های ۵ و ۶ و ۷ از تصویر سمت راست پلاسمیدهایی هستند که تحت تاثیر آنزیم‌های برش دهنده قرار گرفته ولی قادر قطعه مورد نظر می‌باشند. ردیف‌های ۴ و ۵ و ۸ تا ۱۰ از تصویر سمت چپ به ترتیب کلونی‌های دارای سیستاتین‌های ذرت *CCII* و *CCI* کوتاه ۳۹۵ و ۳۵۰ جفت باز) و ردیف‌های ۲ تا ۴ و ۸ و ۹ از تصویر سمت راست به ترتیب کلونی‌های دارای سیستاتین‌های ذرت *CCII* و *CCI* بلند (۴۵۰ و ۵۰۰ جفت باز) هستند که به وسیله آنزیم‌های مناسب برش دو گانه داده شده‌اند و باقی‌مانده پلاسمیدهای *pUC* در ردیف‌های بالا مشاهده می‌شود.

جدول ۱. چگالی نوری و تعیین غلظت پروتئین برای نوترکیب سیستاتین‌های ذرت

نمونه	چگالی نوری تکرار اول	چگالی نوری تکرار دوم	معدل چگالی نوری	غلظت پروتئین $\mu\text{g}/5\text{ ml}$
CC I بلند	۰/۲۴۴	۰/۲۴۰	۰/۲۴۲	۳/۵۹
CCI کوتاه	۰/۳۸۷	۰/۳۵۰	۰/۳۶۸	۶/۰
CCII بلند	۰/۷۴۵	۰/۶۸۲	۰/۷۱۳	۱۱/۹۶
CCII کوتاه	۰/۷۰۷	۰/۶۴۴	۰/۶۷۵	۱۱/۰۶

تأثیر این آنزیم‌ها قرار گرفتند باندهای مطابق با وزن ملکولی سیستاتین‌های ذرت شماره I (به ترتیب بلند و کوتاه) و ۱۱/۹۶ و ۱۱/۰۶ میکروگرم در پنج میکرولیتر برای سیستاتین ذرت شماره II (به ترتیب بلند و کوتاه) بود که بیان بهتر سیستاتین شماره II را در پلاسمید نوترکیب نشان می‌دهد (جدول ۱).

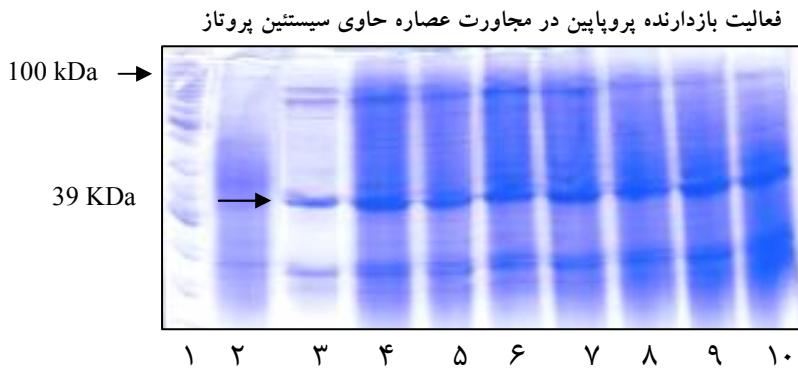
تاثیر این آنزیم‌ها قرار گرفتند باندهای مطابق با وزن ملکولی سیستاتین‌های ذرت I و II مشاهده شد (شکل ۳).

تعیین غلظت پروتئین سیستاتین‌های ذرت

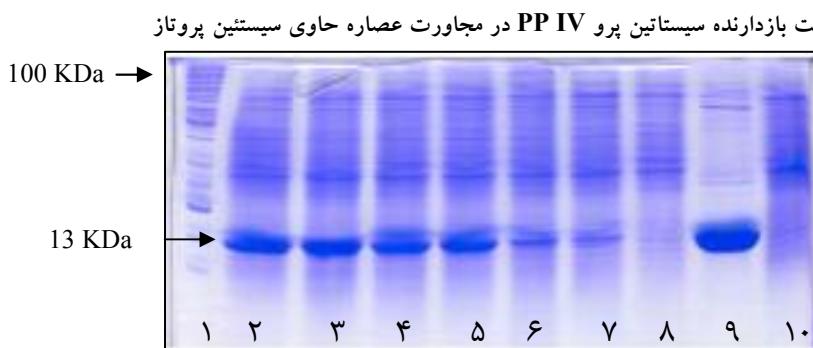
شدت رنگ آبی در رابطه با سیستاتین ذرت II در آزمایش سریع برادرافورد نشان دهنده بیان خوب این مهارکننده و رنگ آبی بسیار کمرنگ نشان دهنده حضور کم پروتئین سیستاتین ذرت بلند بود. برای تعیین دقیق غلظت این پروتئین‌ها با استفاده از اسپکتروفوتومتر چگالی نوری (OD) هر کدام از محلول برادرافورد و نمونه‌های پروتئین در دو تکرار در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و معدل آنها محاسبه گردید. غلظت پروتئین نمونه‌ها

فعالیت و پایداری مهارکننده‌های سیستاتین

شکل ۴ نشانگر میزان فعالیت مهارکننده سیستاتین و پایداری آن در برابر عصاره گوارشی لارو سوسک کلرادو حاوی سیستاتین پروتاز می‌باشد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود شدت تظاهر باندهای موجود در ستون‌های ۳ الی ۱۰ حتی ۳۰ دقیقه پس از



شکل ۴. ستون ۱ مارکر با وزن ملکولی ۱۰۰ kDa ، ستون ۲ عصاره حاوی پروتاز، ستون ۳ بازدارنده پروپاپین (PP) (۳۹ کیلو دالتون)، و ستون های ۴ الی ۱۰ ترکیب بازدارنده و سوبسترا که به ترتیب در مدت زمان های صفر، ۲۰، ۴۰ ثانیه و ۱، ۵، ۱۰، ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار داده شده است را نشان می دهد. شدت ظاهر باند در ناحیه ۳۹ کیلو دالتون تا مدت ۳۰ دقیقه پس از مجاورت با سوبسترا (ستون ۱۰) نشانگر پایداری بازدارنده پروپاپین و هیدرولیز نشدن آن می باشد.



شکل ۵. ستون ۱ مارکر، ستون ۹ مهار کننده پرو پروتاز پاپایا (۱۳ کیلو دالتون)، ستون ۱۰ عصاره حاوی سیستین پروتاز، و ستون های ۲ الی ۸ ترکیب مهار کننده و سوبسترا را که در مدت زمان های صفر، ۲۰، ۴۰ ثانیه و ۱، ۵، ۱۰ و ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار داده شده و الکتروفورز گردیده اند را نشان می دهد. شدت ظاهر باندها از ستون ۲ تا ۵ کاهش بسیار کم داشته و از ستون ۶ تا ۸ کاهش آن شدید به طوری که در ستون ۸ تقریبا ناپدید شده است که خود نشانگر قدرت چسبندگی و فعالیت بازدارنده سیستین بر علیه پروتاز پاپایا ولی هیدرولیز تدریجی آن در طول زمان می باشد.

نسبتاً خوبی را در مقابل سوبستراتی خود یعنی عصاره حاوی پروتاز سیستین نشان داده است، اما پایداری این مهار کننده باند از پاپین نمی باشد، به گونه ای که شدت ظاهر باند مهار کننده مربوطه از ستون ۲ تا ۸ که مربوط به زمان های مختلف مجاور کردن آن با سوبسترا می باشد به تدریج کم شده و بعد از ۳۰ دقیقه تنها اثر ناچیزی از آن باقی مانده است. این موضوع گواه بر فعالیت نسبی مهار کننده در مقابل سوبستراتی حاوی سیستین پروتاز مورد آزمایش می باشد.

مجاور نمودن مهار کننده با سوبسترا بدون تغییر چندانی باقی مانده است که این موضوع نشانگر فعالیت مهار کننده ای مهار کننده در مقابل منبع سیستین پروتاز یعنی عصاره روده سوسک کلرادو و عدم تجزیه سوبسترا و هیدرولیز نشدن آن می باشد. وجود باند مربوط به این مهار کننده حتی ۳۰ دقیقه پس از مجاور کردن آن با سوبسترا در محیط آزمایشگاه نشان از پایداری خوب این بازدارنده می باشد. در شکل ۵ موضوع ۵ حدودی متفاوت است. در این تصویر مشاهده می شود که مهار کننده پرو PP IV فعالیت

بحث

شده است (۲۹). در این پژوهش موفق شدیم تا cDNA سیستاتین ذرت را به روش Reverse transcription به دست آورده و پروتئین های فعال سیستاتین را هر چند به مقدار کم در باکتری اشرشیاکوکی تولید نماییم. چنانچه در تعیین غلظت محصول پروتئین سیستاتین ها در جدول ۱ مشاهده می شود بیان ژن حاکی از مقادیر متفاوت و نسبتاً کم سیستاتین های ذرت بلند و کوتاه می باشد. این اختلاف در میزان تظاهر پروتئین نوترکیب می تواند به نوع ساخت نوترکیبها (نوع پلاسمید و سلول های مستعد استفاده شده) مربوط شود. همچنین عدم پایداری بعضی از پروتئین های نوترکیب در سلول های مستعد نیز می تواند در تظاهر پروتئین نوترکیب دخالت داشته باشد که احتیاج به تحقیق بیشتر دارد. چنانچه گزارش شده است شرایط مختلف از جمله نوع باکتری میزان همراه با تعداد پلاسمید حمل کننده نشانگر آتنی بیوتیک در بهینه سازی تولید انبوه پروتئین در اشرشیاکوکی متفاوت و تأثیر گذار می باشد. قوی و یا ضعیف بودن و همچنین خاصیت تنظیم کنندگی و جهت نسبی و قدرت پروموتور تأثیر اساسی بر روی پلاسمید دارد (۱۵). Kane (۱۲) معتقد است که پایداری mRNA بر روی تولید اثر می گذارد، در حالی که ساختمندان دوم، به خصوص انتهای ۵' آن، اغلب یک نقش بحرانی را بازی می کند که همچنین می تواند بر روی دسترسی به ناحیه اتصال ریبوزوم اثر بگذارد، و این نهایتاً بر روی سطح بیان پروتئین مؤثر می باشد. سایر شرایط رشد همانند درجه حرارت پائین، سطح اکسیژن، منبع کربن، سرعت رشد و غیره نیز می تواند بر میزان تولید پروتئین تأثیر گذار باشد (۱۲). آبه و همکاران (۱) در یافته های خود پیرامون ویژگی های فیزیولوژیکی سیستاتین I ذرت اظهار می دارند که در گیاه ذرت میزان mRNA این سیستاتین دو هفتھ بعد از گل دهی به حداقل رسیده و بیان آن در طول بالغ شدن دانه ذرت ادامه می یابد. در پژوهش حاضر نیز برای به دست آوردن حداقل RNA و DNA این سیستاتین زمان برداشت غلاف های ذرت دوهفته بعد از گل دهی صورت گرفت. با وجودی که تلاش زیادی صورت گرفت تا مطابق پروتکل ها و

عدم پایداری و از بین رفتن تأثیر سم BT در طول زمان و پایداری پاره ای از حشرات در مقابل آن، محققان را بر آن داشته است تا به دنبال راه کارهای ژنتیکی دیگری باشند. در این رابطه اقدام به شناسایی و انتقال ژن های تولید کننده پروتئین های بازدارنده پروتازها با دامنه وسیع فعالیت بازدارندگی، می تواند نتایج رضایت بخشی را در سیستم دفاعی گیاهان در مقابل آفات حمله کننده ایجاد نماید. سیستاتین ها با داشتن مزیت نسبی در مقابل تغییرات اسیدیته لوله گوارشی حشرات در کترول و مهار پروتازهای موجود در لوله گوارشی حشرات خانواده کلئوپترا مؤثر می باشند. از بین محصولات مهندسی شده ژنتیکی می توان به سبب زمینی تراژن حاوی ژن بازدارنده اریزا سیستاتین (OCI) از محصول برنج اشاره کرد که تا حدی در مقابل آفت سوسک کلرادو (CPB) مقاومت نشان داده است ولی این سیستاتین قادر به اتصال و غیر فعال کردن پروتازهای کاتپسین نوع B و L نبوده و در محیط آزمایشگاه تنها ۳۰ درصد از فعالیت های پروتازی موجود در لوله گوارشی CPB را مهار می کند (۱۶). سیستاتین های ذرت به عنوان یک جایگزین و مدل جدید که دامنه فعالیت بیشتری را در مقابل پروتازها از خود نشان می دهد، معرفی شده اند (۱). با وجودی که ۷۱ درصد از اسیدهای آمینه موجود در سیستاتین های ذرت همانند آن در سیستاتین برنج در فاصله بین اسید آمینه های ۳۶ و ۱۳۵ می باشد، اما سیستاتین های ذرت دارای قدرت بازدارندگی قوی تری در مقابل پاپین، کاتپسین H و L و قدرت بازدارندگی ضعیف تری در مقابل کاتپسین B می باشند. اختلاف سیستاتین های ذرت با سیستاتین های برنج در این می باشد که سیستاتین های ذرت می توانند دارای پیتیدهای سیگنالی باشند و لذا در یکی از اجزای سلولی نظیر واکوئل، شبکه های آندوپلاسمی و یا دستگاه گلژی ذخیره شوند (۱). بر خلاف پروتئینازهای سرین و پروتئیناز آسپارتیک کاتپسین D که به مقدار زیاد در *E. coli* بیان شده است، مثال های محدودی از بیان پروتئینازهای سیستاتین حتی به مقدار کم در *E. coli* گزارش

می باشد را تغییر دادند، موفق به بیان پروتئین متصل ۱۲۰ اسید آمینه ای فاقد سیگنال پپتید در سطح مطلوبی شدند. میشاد و همکاران (۱۶) از سلول های مستعد JM-109 به عنوان یک گونه با ارزش برای بیان GST-OC I استفاده نموده اند. چنانچه از نتایج این پژوهش به دست آمد I CC II و CC I در مقایسه توالي اسیدهای آمینه و تعداد جفت بازشان و در نتیجه خصوصیات بیوشیمیابی آنها در مقابل پروتازها با هم تفاوت دارند که این موضوع با نتایج به دست آمده توسط آبه و همکاران (۱) مطابقت دارد. از طرف دیگر خصوصیات سیستاتین های ذرت با سیستاتین های برنج (OCs) به دلیل داشتن یک نشان پیتیدی که باعث هدایت تجمع این نوع سیستاتین ها در محل بخصوصی از اجزا درون سلولی می شود (نیاز به تحقیق دارد)، متفاوت است. در مجموع قدرت بازدارندگی سیستاتین های ذرت (CCs) نسبت به سیستاتین های برنج (OCs) به دلیل میل ترکیبی آنها با پروتازها، بیشتر می باشد. هر دوی سیستاتین ذرت دارای قدرت بازدارندگی قوی تری در مقابل پاپین می باشند (به ترتیب $K_i = 3.7 \times 10^{-8}$ و 6.6×10^{-8} برای OCI و CCI و CCII در مقایسه با 3.64×10^{-8} و 1.14×10^{-6} برای OCI و OCII). همچنین CCI دارای قدرت بازدارندگی قوی تری در مجاورت کاتاپسین H ($K_i = 5.7 \times 10^{-9}$) در مقایسه با 7.8×10^{-8} و 2.5×10^{-7} برای OCII (K_i) می باشد (۱ و ۲۱).

سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولین محترم وزارت جهاد سازندگی وقت که فرصت انجام این پژوهش را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می نمایم. همچنین از آقایان دکتر دومنیک میشاد و دکتر بین کوک استاد بخش فیزیولوژی دانشگاه لاوال کانادا که در انجام مراحل آزمایش ها با طرح مباحث علمی و فراهم نمودن تجهیزات آزمایشگاهی مرا یاری نمودند، صمیمانه قدردانی می نمایم.

دستورالعمل های موجود شرایط مناسبی برای تولید و بیان حداکثری پروتئین نوترکیب به وجود آید، لیکن نوع ناقل پلاسمید و سلول های مستعد مورد استفاده و سایر عوامل ناشناخته موانعی را در راه به دست آوردن این سطح مطلوب از پروتئین فعال نوترکیب را ایجاد نمود. در عین حال بیان و تولید پروتئین های نوترکیب سیستاتین ذرت هر چند به مقدار کم در این آزمایش بیانگر این مطلب است که با استفاده از سلول های مستعد بهتر و کلون سازی موثرتر قطعه ژن در پلاسمید می توان به این مهم دست یافت. آبه و همکاران (۱) معتقدند که بیان کم این پروتئین در سلول مستعد *E. coli* می تواند ناشی از وجود سیگنال پپتید نسبتاً طولانی همراه این پروتئین باشد که از نفوذ آن در غشای سیتوپلاسمی اشرشیاکولی می کاهد. علت استفاده از پلاسمید *pGEX* به عنوان ناقل در این آزمایشات به دلیل نقش هدایتی آن در قرار دادن نوترکیب در اشرشیاکولی و اتصال آن به انتهای کربوکسیل ملکول ۲۶ کیلو دالتونی GST بوده که اغلب پروتئین متصل شده را قادر می سازد که در محیط آبی محلول بوده و بر احتیتی بتواند از ماده خام باکتریایی جدا شود (۲۵). ناقل *pGEX 3x* قبلًا توسط میشاد و همکاران (۱۷)، به صورت موفقیت آمیز برای بیان سیستاتین برنج (OCs) استفاده شده بود. در پژوهش حاضر از ناقل *pUC 19* به عنوان ناقل اصلی برای کلون سازی، و قدرت افزایش دهنی میزان بیان در باکتری اشرشیاکولی استفاده شد (۲۸ و ۳۱). همچنین دلیل استفاده از ناقل *pGEX 2T* که انتهای *NH2* اسید آمینه از آن منشاء می گیرد، امکان تولید پروتئینی با اسید آمینه های سیستاتین ذرت با و یا بدون سیگنال پپتید بوده است. آبه و همکاران (۱) با استفاده از ناقل *pCC7S* در سلول های مستعد *E. coli* موفق به بیان پروتئین سیستاتین ذرت با وزن ملکولی ۱۷ کیلو دالتون به مقدار کم شدند، اما زمانی که آنها نوع پلاسمید نوترکیب *pCC7H* که بنا به گفته ایشان یک پلاسمید ساخته شده قوی در افزایش مقدار بیان پروتئین نوترکیب سیستاتین ذرت

منابع مورد استفاده

- Abe, M., K. Abe, M. Kuroda and S. Arai. 1992. Corn kernel cysteine protease inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. *Eurp. J. Biochem.* 209:933-937.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Chen, M. S., B. Johnson, L. Wen, S. Muthukrishnan, K.J. Kramer, T. D. Morgan and G. R. Reeck. 1992. Rice Cystatin Bacterial Expression, Purification, Cysteine Proteinase Inhibitory Activity, and Insect Growth Suppressing Activity of a Truncated Form of the protein. *Protein Express Purif* 3:41-49.
- Edward, K., C. Johnston and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR Analysis. *Nucleic Acids Res.* 19:1349.
- Felton, G. W, C. B. Summers and A. J. Mueller. 1994. Oxidative responses in soybean foliage to herbivory by bean leaf beetle and three-cornered alfalfa hopper. *J. Chem. Ecol.* 20(3): 639-650.
- Gatehouse, A. M. R., Y. Shi, K. S. Powell, C. Brough, V. A. Hider, W. D. Hmilton, C. Newwell, A. Merryweather, D. Butler and J. A. Gatehouse. 1991. Approaches to insect resistance using transgenic plants. *Phylosophical Transactions of the Royal Society, London.*
- Gatehouse A. M. R., Down R. E, K. S Powell, N. Sauvion, Y. Rahbe, C. A. Newell, A. Merryweather, W. D. O. Hamilton and J. A Gatehouse. 1996. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol. Exp. Appl.* 79: 295-307.
- Hanada, K., M. Tamai, M. Yamagishi, S. Ohmura, J. Sawada and I. Tanaka. 1978. Isolation and Characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* 42:523-528.
- Hilder, V. A., A. M. R. Gatehouse, S. E. Sheerman, R. F. Barker and D. Boulter. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330:160-163.
- Hilder, V. A., A. M. R. Gatehouse and D. Boulter. 1993. Proteinase Inhibitor Approach, PP. 317-338. In: Kung S-D and R. Wu (Eds.), *Transgenic Plants: Engineering and Utilization*, Vol. 1. Academic Press, New York.
- Hines, M. E., C. I. Osuala and S. S. Nielsen. 1991. Isolation and partial characterization of a soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of coleoptera digestive proteolytic activity. *J. Agric. Food Chem.* 39:1515-1520.
- Kane, J. F. 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 6: 494-500
- Lawrence, P. K. and K. R. Koundal. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. Review Article. *EJB Electronic J. Biotechnol.* 5(1): 93-109.
- Liang, C., G. Brookhart, G.H. Feng, G.R. Reeck and K. J. Kramer. 1991. Inhibition of digestive proteinase of stored grain coleoptera by oryzacystatin, A cysteine proteinase inhibitor from rice seeds. *FEBS Lett.* 278:139-142.
- Mertens, S., M. Craxton and M. Goedert. 1996. SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 383: 273-276
- Michaud, D., B. Nguyen-Quoc and S. Yelle. 1994. Production of oryzacystatins I and II in *E. coli* using the glutathione S-Transferase gene fusion system. *Bioteclol. Prog.* 10:155-159.
- Michaud, D., L. Cantin and T. C. Vrain. 1995. Carboxy-Terminated Truncation of Oryza cystatin II by Oryzacystatin-Insensitive Insect Digestive Proteinases. *Archieves of Biochem. Biophys.* 322:469-474.
- Michaud, D. and A. Asselin. 1995. Review, Application to plant proteins of gel electrophoretic methods. *J. Chromatogr. A.* 696:263-279.
- Murdock, L. L., R. E. Shad and M. A. Pomeroy. 1988. Effects of E-64, a cysteine proteinase inhibitor, on cowpea weevil growth, development and fecundity. *Environ. Entomol.* 17:467-469.
- Murdock, L. L., G. Brookhart, P. E. Dunn, D. E. Foard, S. Kelly, L. Kitch, R. E. Shade, R. H. Shuckle and J. L. Wolfson. 1987. Cysteine digestive proteinases in coleoptera. *Comp. Bioch. Physiol.* 87:783-787.
- Michaud, D., B. Nguyen-Quoc. T. C. Vrain. D. Fong. and S. Yelle. 1996. Response of Digestive Cysteine Proteinases from the Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) and the Black Vine Weevil (*Otiorynchus sulcatus*) to a Recombinant form of Human Stefin A. *Archieves of Insect Biochemistry and Physiol.* 31: 451-464.
- Perlak, F.J., T.B Stone, Y.M. Muskopf, L. J. Petersen, G. B. Parker, S. A. McPherson, J. Wyman, S. Love and G. Reed. 1993. Genetically improved potatoes: Protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant. Mol. Biol.* 22: 313-321.
- Ryan, C. A. 1989. Proteinase inhibitor gene families: Strategies for transformation to improve plant defense against herbivores. *Bio Essays* 10:20-24.
- Smith, B. J. 1984. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. PP.41-55. In: J.M Walker (Ed.), *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1. Proteins. Humana Press, Clifton, New Jersey.

25. Smith. D. B. and K. S. Johnson. 1988. Single step purification of polypeptides expressed in *E. coli* as fusions with GST. Gene. 6:31-40.
26. Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of Resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. of Entomol. 39:47-79.
27. Vaech, M., A. Reynaerts, H. Hofte, S. Jansens, M. D. De Beucketeer, C. Dean, M. Zebean, M. V. Van Montagu and J. Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. Nature 328:33-37.
28. Vieira, J. and J. Messing. 1982. The pUC Plasmids, an M13mp7-Derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene. 19:259-268.
29. Willetts. N. and B. M. Wilkins. 1984. Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. Microbiol. Rev. 48:24-41.
30. Wolfson, J. L. and L.L. Murdock. 1987. Suppression of larval Colorado potato beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. Entomol. Exp. Appl. 44:235-240.
31. Yanisch-Perron, C., J. Viera and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUc19 vectors. Gene. 33:103-119.