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 به‌عنوان عامل مهارکننده پروتاز سیستئین، 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 RT - PCR در ناقل‌های پلاسمید *pUC19* و *pGEX* 2T 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-اس-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 پروتئاز و پایداری نسبی سیستاتین‌های نوترکیب مورد ارزیابی قرار گرفت.

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

مقدمه

به‌منظور جلوگیری از خسارت وارده توسط آفات و بیماری‌ها و به‌دست آوردن محصولی سالم و هم‌چنین اجتناب از آلودگی محیط زیست، به موازات برنامه‌های بهنژادی سنتی، استفاده از دانش مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی به‌عنوان راهکار جدید و جایگزینی، با مزیت آشکار آن در مقایسه با شیوه‌های سنتی، 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). به‌کارگیری تکنیک DNA نوترکیب، جداسازی و کلون کردن ژن‌های مورد نظر از منابع مختلف

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

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.28.5]

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 استراتژی‌هائی در به‌کارگیری ژن(ها)ی بیان کننده بازدارنده‌ها و تنظیم سیستم‌های آنزیمی به‌وسیله آنها، چشم انداز باارزشی را در به‌وجود آوردن گیاهان مقاوم به آفات نشان می‌دهد. دو استراتژی در تولید گیاهان تراریخته مقاوم به حشرات معرفی شده است. در یک استراتژی از پروتئین‌های سمی باسیلوس ترنجینسیس (BT) استفاده می‌شود (۶)، که در آن حشرات تغذیه کننده از بافت‌های گیاهی که این سم در آنها بیان می‌شود، به‌طور مستقیم تحت تأثیر سم هضم شده قرار می‌گیرند. تاکنون تعدادی از این ژن‌ها کلون شده و توسط پلاسمید ناقل به گیاهان منتقل و تراریخته‌های حاصل، تا حد زیادی در مقابل خسارت ناشی از آفات تغذیه کننده مصون مانده‌اند (۲۲ و ۲۷). گرچه گیاهان تجارتی دارنده BT سطح قابل ملاحظه‌ای از مصونیت را در مقابل حشرات از خود نشان داده‌اند، اما محتویات سمی تولید شده توسط باکتری در تحت شرایط مزرعه و به‌خصوص در شدت نور ماورای بنفش پایدار نمی‌ماند. علاوه بر آن تأثیر این سموم بیولوژیکی بر روی آفات به‌دلیل حالت تکاملی مقاومت آنان به سموم در نهایت و به‌طور سریع از بین می‌رود (۲۶)، لذا می‌بایست به‌دنبال 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 پروتئولیتیک موجود در لوله گوارشی حشرات صورت می‌پذیرد که این موضوع باعث رشد، تکامل و زاد و ولد حشرات می‌گردد (۲۳). در صورتی‌که به‌گونه‌ای 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 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 تنباکوی تراریخته با یک ژن مهارکننده تریپسین (*CpTI*) از گیاه Cowpea می‌باشد، که توسط هیلدر و همکاران (۹) معرفی شد. این گروه توانست با بیان پروتئین حاصل از این ژن به‌مقدار یک در صد کل پروتئین در سطح برگ گیاه، باعث صدمه به لارو یک‌نوع هلیوتیس (*Heliothis virescens*) که یک آفت جدی تنباکوست، گردد. این موضوع در رابطه با بازدارنده‌های پروتاز نوع سیستاتین همانند ترانس- اپوکسی سوکسینیل- لئوسیکلامیدو بوتان (Trans – epoxy succynil leocyclamido butane) که به‌طور 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 به‌ذکر است که حشرات راسته‌های سخت بال پوشان و ناجور بالان (Hemiptera) دارای محیط گوارشی با اسیدیته ملایم بوده و به‌طور 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 بازدارندگی سیستاتین‌ها را تعدیل نمایند (۲۱). بنابراین به‌منظور 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 بازدارنده هائی با طیف وسیع عملکرد و پایدار که به‌طور 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

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.28.5]

است. هم‌چنین انتقال ژن‌های بازدارنده آنزیم‌های تریپسین (در کلم تراریخته و سویا)، و نوعی از بازدارنده شماره دو موجود در سیب زمینی، حساسیت‌های متفاوتی را در حشرات مهاجم تغذیه کننده از آنها به‌وجود آورده است. با جستجو و استفاده از بازدارنده‌های با طیف عملکرد وسیع تر و پایدارتر و قرار دادن آنها در ژنوم گیاهان دیگر می‌توان از فعالیت آنزیم‌های پروتاز به‌هنگام 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 دانه‌های این گیاه، تهیه cDNA، کلون سازی و ارزیابی بازدارندگی پروتئین حاصل از آن در قبال آنزیم پروتاز سیستئین در محیط آزمایشگاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

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 به‌مدت ۴۸ ساعت در آن جریان داشت، خیسانده شد. سپس دانه‌ها در کیسه‌های پلی اتیلن سه لیتری که با ورمی کولیت پر شده بود کاشته شدند. گلدان‌ها 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.گلدان‌های کشت شده تحت این شرایط تا زمانی‌که نهال‌های ذرت به غلاف نشستند، نگه‌داری شدند. تعدادی از غلاف‌های جوان ذرت برداشت و دانه‌های ذرت نابالغ و هم‌چنین دیسک‌هایی از برگ در شرایط استریل جدا و پس از انجماد در نیتروژن مایع، در ۸۰°C – نگه‌داری شدند. استخراج DNA ژنومی با استفاده از پروتکل K. Edward (۴) انجام گرفت. غلظت DNA ژنومی با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و DNA استخراج شده در چهار درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

برای استخراج و خالص سازی RNA از کیت شرکت کیاژن کانادا و پروتکل مربوطه (۱۹۹۶) استفاده شد. RNA نمونه در ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگه‌داری 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 اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر در مقایسه با شاهد (آب DEPC اتوکلاو شده) اندازه‌گیری شد.

ازدیاد 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 به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۶۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و بلافاصله به‌مدت ۵ دقیقه بر روی یخ سرد شد. سپس برای تولید cDNA، در یکی از لوله‌ها ۲۰ پیکو مول پرایمر تصادفی *pd*(N)6 (hexadeoxyribonucleotide mixture) که از ۶ دزکسی ریبونوکلئوتید تصادفی تشکیل و انتهای '۵ آن فسفریلیزه شده و برای ساخت cDNA از mRNA به‌کار برده می‌شود، استفاده شد. ترکیبات چند بار با پیپت خوب به‌هم زده شد و در حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد خوابانده شد و محصول به‌دست آمده در منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

واکنش زنجیره‌ای 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 dNTP به غلظت دو میلی‌مولار، یک میکرولیتر از پرایمرهای CC1.5 L و CC1.3، نیم میکرولیتر از آنزیم پلیمراز Taq و یک میکرولیتر از DNA استخراج شده. محتویات تیوب دوم شبیه به اولی بوده و تنها نوع پرایمرها به CC1.5L و CC2.3 تغییر یافت، محتویات

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.28.5]

تیوب سوم شبیه به دومی بوده و تنها نوع پرایمرها بـه CC1.5S وCC2.3 تغییر یافت و محتویات تیوب چهارم شـبیه بـه تیـوب سوم بوده و تنها نوع پرایمرها به CC2.5S و CC2.3 تغییر یافت (پرایمرهای مـورد اسـتفاده در آزمایـشگاه فیزیولـوژی دانـشگاه لاوال کانادا ساخته شده است). فرایندPCR با مختصات ۴۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گـراد، و ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سـانتی‌گـراد و ۳۰ دور چـرخش انجـام شـد. سپس نمونه‌ای از هرکدام از محـصول بـه‌دسـت آمـده و مـارکر اسـتاندارد (1 kb) بـا اضـافه نمـودن محلـول اتیـدیوم بروماید (Etidium Bromide) بـه ژل آگـاروز یـک درصـد منتقـل و الکتروفورز شد و باندهای حاصله با استفاده از نور UV مشاهده گردید. طراحی پرایمرها بر مبنای توالی سیستاتین‌هـای کوتـاه و بلند ذرت و جایگاه آنزیم‌های برش دهنده آنها از جملـه *Sma I* و *Bam HI* در جدول زیر آمـده اسـت. ویژگـی ایـن پرایمرهـا آنست که به‌دلیل اختصاصی بودن، در فراینـد PCR تنهـا تـوالی ژن‌های مورد نظر را ازدیاد می‌نمایند.

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
CC1.5L	AGGATCCAATCCAGATGCGCAAACATCGAATC
CC1.5S	AGGATCCGTGGCTGAGAACGCCGGGATGTTG
CC1.3	TCCCGGGTGCATGCTCTGGCATGTTCCGA
CC2.5S	AGGATCCCATGGCCGACAACACCGGGACG
CC2.3	ACCCGGGAGAAGGAGAGATCCTTAGGCGCT

ترادف نوکلئوتید و خالص سازی cDNA سیستاتین ذرت

برای خالص سازی محصول cDNA از کیت سفالگاس باند پـرپ (Sephalgas Bond prep kit) (Pharmacia Biotech, 1995) استفاده شد. نمونه‌هایی از هر محصول RT-PCR به ژل آگـاروز یک درصد منتقل و در حضور مارکر استاندارد، الکتروفورز شد. باندهای مشاهده شده در ناحیه سیـستاتین‌هـای ذرت I و II کـه به‌دلیل نوع پرایمرهای استفاده شده و وجود سیستاتین‌های کوتاه و بلند به‌صورت دو باند با وزن ملکولی متفاوت و پشت سر هم در هر ستون دیده می‌شدند، بریده شـده و بـه‌طـور جداگانـه در لوله‌هـای یـک میلـی لیتـری ذخیـره شـدند. محـصول خـالص RT-PCR به‌دست آمده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مصارف بعدی ذخیره شد. بـرای اثبـات خـالص سـازی نمونـه‌هـا یـک آزمایش ژل الکتروفورز انجام گرفت و توالی آنها از طریق بانک ژن مشخص گردید.

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

برای کلون سازی محصول RT-PCR خالص شده میبایست آنرا به یک ناقل مناسب متصل نمود. برای این منظـور عمـل هـضم دوگانه توسط آنزیم‌های *SmaI* و *Bam HI* صـورت گرفـت. در پایان عمل هضم با اضافه نمودن لودینگ بافر (پـنج میکرولیتـر) به محلول و انتقال آن به آگاروز ژل و الکتروفورز کردن، بانـدها در زیر نور UV مـشاهده شـد. پلاسـمید *pUC 19* و *pGEX 2T* نیز به‌همین ترتیب هضم شد. عمل هضم محـصول RT-PCR و پلاسمیدها با آنزیم‌هـای محـدود کننـده و بـا اسـتفاده از کیـت استاندارد شرکت BOEHRINGER MANNHEIM آلمـان (در حال حاضر با شرکت ROCHE ادغام شده است) انجام گرفـت. در پایان هر کدام از رسوب حاوی پلاسـمید بـا سیـستاتین‌هـای ذرت گنجانده شده در ۲۰ میکرو لیتر آب مقطـر اتـوکلاو شـده حـل و بـرای اسـتفاده بعـدی در یخچـال و در چهـار درجـه سانتی‌گراد نگـه‌داری شـد. بـرای تعیـین صـحت عمـل اتـصال محصول در پلاسمید، عمل هضم دوگانه با آنزیم‌هـای *Sma I* و *Bam HI* بر روی پلاسمید حـاوی محـصول صـورت گرفـت و نمونه‌ها الکتروفورز شد.

انتقال کلون‌ها به سلول‌های مستعد اشرشیاکولی

۴۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد *DH 5 α* در محیط اتاق با دو میکرولیتر از پلاسمیدهای حاوی cDNA مورد نظـر در cuvette برای چندین بار بـآرامی پیپـت و بـا اسـتفاده از دسـتگاه شـوک الکتریکی با تنظیم مقاومت ۲۰۰ Ω و ولتاژ دو و نیم ولت، پالس ایجاد و عمل انتقال صـورت گرفـت. سـلول‌هـای انتقـال یافتـه بلافاصله در یک میلی لیتر محلول تـازه LB فاقـد آمپـی سـیلین حل شده و پس از ازدیاد، ۱۰۰ میکرو لیتر از سلول‌هـای ازدیـاد

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.28.5]

شده بر روی محیط استریل FastMedia™ LB Agar Amp IPTG/X-Gal تهیه شده از شرکت فرمنتاس (Phermentas Company) به‌مدت یک شب در درجه حرارت ۳۷ °C نگه‌داری شدند. کلونی‌های به‌دست آمده در روی پلیت‌های حاوی محیط LB و آمپی سیلین مخلوط شدند و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب نگه‌داری شدند. برای جداسازی و خالص سازی پلاسمیدهای حاوی سیستاتین‌های ذرت انتقال یافته به سلول‌های 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 پلاسمیدهای خالص شده تحت تأثیر آنزیم‌های *Sma I* و *Bam HI* به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای تأیید وجود فرایند کلون سازی نگه‌داری و نمونه‌ها ژل الکتروفورز شدند.

تولید پروتئین سیستاتین ذرت در *E. coli* و خالص سازی

سلول‌های مستعد *DH5 α* حامل پلاسمیدهای نوترکیب و خالص سازی شده *pUC* 19 و *pGEX 2T*، جهت تشخیص تولید پروتئین توسط ژن‌های گنجانده شده، به‌شرح زیر مورد آزمایش قرار گرفتند:

برای تحریک به تولید پروتئین نوترکیب، سلول‌های برداشت شده حامل پلاسمیدها در ۲۰ میلی لیتر محیط LB و یک میلی‌مول IPTG (SIGMA, USA) به غلظت دو میلی مولار برای مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. محصول به‌دست آمده در سرعت g ۶۰۰۰ و در درجه حرارت چهار درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع روئی دور ریخته شد و رسوب حاصل برای مدت یک‌ساعت در °C ۲۰- نگه‌داری شد. آنگاه یک میلی لیتر لیسیس بافر (۵۰ میلی مولار Tris با اسیدیته ۸، ۲۰ میلی مولار EDTA، ۵ در صد حجمی Triton X-100و گلیسرول) اضافه و محلول به‌مدت پنج دقیقه در یخ نگه‌داری شد. به این محلول ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر (غلظت نهایی ۰/۰۲۵ در صد) لیزوزیم اضافه و دوباره برای مدت پنج دقیقه در یخ نگه‌داری شد. سپس محلول حاصل از عمل لیزوزیم برای ۱۰ دقیقه با سرعت g ۶۰۰۰ و در °C ۴ سانتریفیوژ و هر دو مایع روئی و رسوب برای آزمایش تعیین پروتئین نگه‌داری شدند.

به نیم میلی لیتر از عصاره، ۰/۷۵ میلی لیتر محلول ۵۰ در صد گلوتاتیون آگاروز بید (Glutathione agarose beads) (چهار میلی‌لیتر Tris ۵۰ میلی مولار با PH مساوی هشت + ۱۵۰ میلی‌گرم گلوتاتیون آگاروز بید) اضافه شد. حجم نهائی برای مدت ۳۰ ثانیه به‌آرامی تکان داده شد تا پروتئین متصل به GST جذب bead شود و سپس برای ۱۰ دقیقه با سرعت g ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع روئی با پیپت پاستور به‌آرامی 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 به‌مدت پنج دقیقه در سرعت ۱۰ هزار دور، مایع روئی حاوی پروتئین خالص برداشت شد. این عمل برای به‌دست آوردن حداکثر پروتئین، یکبار دیگر تکرار و پروتئین خالص در °C ۲۰- برای مصارف بعدی نگه‌داری شد.

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

به‌منظور تخمین میزان پروتئین تولیدی، از آزمایش سریع برادفورد(۲) و از BSA (Bovine Serum Albumin) به‌عنوان 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 به‌ترتیب دو، چهار، شش، هشت و ده میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد، برداشت و با اضافه نمودن ۲۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد و آب مقطر دو بار تقطیر شده حجم تمام لوله‌های آزمایش به هزار میکرولیتر رسانده شد و با اسپکتروفتومتر غلظت‌ها در دو

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.28.5]

تکرار و در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و معدل آنها محاسبه گردید. برای نمونه‌های پروتئین‌های نوترکیب سیستاتین ذرت نیز چگالی نوری به‌همین 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 رگراسیون حاصل از گراف غلظت پروتئین‌های مورد نظر محاسبه شد.

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 به‌عنوان سوبسترا و از عصاره لوله گوارشی لارو سوسک کلرادو (تهیه شده توسط گروه تحقیقات آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه لاوال) به‌عنوان منبع سیستئین پروتئاز استفاده شد. در هر کدام از این آزمایش‌ها مقدار هفت ونیم میکروگرم 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 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 به‌صورت باندهای آبی رنگی مشاهده گردید.

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 OD معادل ۴۰ میکروگرم در میلی لیترRNA می‌باشد. میزان RNA محاسبه شده ۴۲۴ نانو گرم در میلی لیتر به‌دست آمد.

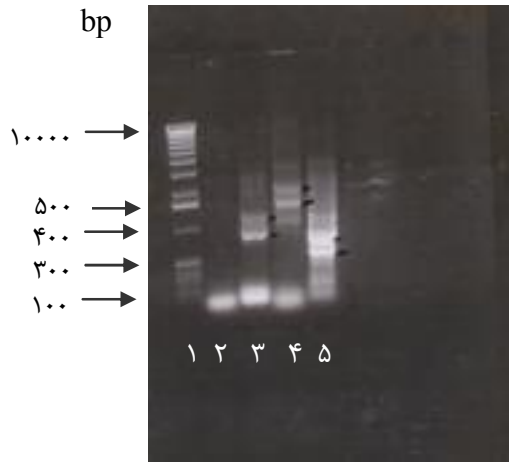
توالی و مشاهده باندهای مربوط به سیستاتین نوترکیب ذرت بر روی ژل الکتروفورز

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

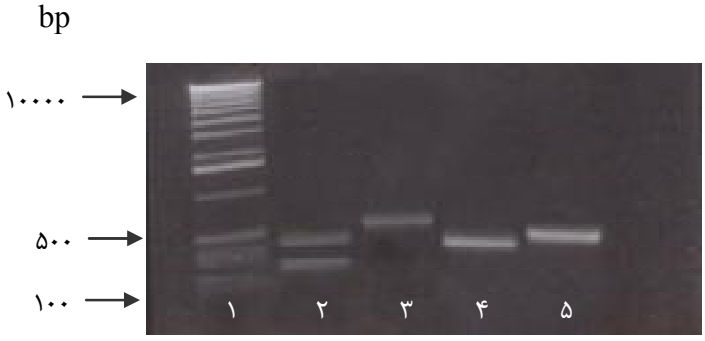
محصول هر کدام از سیستاتین‌های حاصل DNA ژنومی که تحت تأثیر آنزیم‌های برشی قرار گرفته و توسط PCR تکثیر شده بود به ژل الکتروفورز منتقل که نتایج آن در شکل ۱ مشاهده می‌شود. از آنجا که واکنش PCR مربوط به DNA ژنومی یک واکنش غیر اختصاصی بوده و نمی‌توان صد در صد

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.28.5]



شکل ۱. نتایج حاصل از PCR محصول DNA ژنومیک سیستاتین‌های ذرت (CCI & CCII) پس از عمل هضم آنزیمی در ژل آگاروز را نشان می‌دهد. ستون ۱ مارکر استاندارد با وزن مولکولی 1 kb می‌باشد. ستون ۲ فاقد عمل هضم آنزیمی و ستون ۳ باندهای مربوط به سیستاتین ذرت (CCI) کوتاه، ستون ۴ باندهای مربوط به سیستاتین ذرت (CCI) 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.



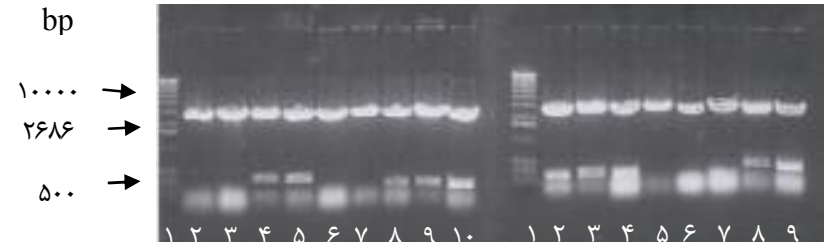
شکل ۲ . نمونه‌های خالص شده cDNA مربوط به هر کدام از سیستاتین‌های ذرت در محصول RT - PCR را نشان می‌دهد. ستون ۱ مربوط به مارکر استاندارد با وزن ملکولی ۱۰۰bp می باشد. ستون‌های ۲ (باند بالائی) و ستون ۳ مربوط به CC1 کوتاه و بلند و ستون‌های ۴ و ۵ به‌ترتیب مربوط به CCII کوتاه و بلند می‌باشد. باند اضافی پائینی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

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 به‌مثابه قالب برای تولید cDNA که فاقد اینترون (قطعه DNAئی که هیچ نوع ژنی را بیان نمی‌کند) است، می‌باشد. محصول cDNA به‌دست آمده از mRNA توسط PCR تکثیر که پس ازخالص سازی و ژل الکتروفورز کردن، نتایج در شکل ۲ آمده است.

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 به‌طور جداگانه جدا و هر کدام پس از رشد در محیط LB دارای آمپی سیلین و به‌مدت یک شب قرار گرفتن بر روی شیکر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برداشت و نمونه‌ای از پلاسمیدهای استحصالی از هر کدام و با عمل هضم و انجام الکتروفورز cDNA، گنجانده تأیید شد. در کلونی‌هایی که تحت

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.28.5]



شکل ۳ . پلاسمیدهای نوترکیب *pUC 19* 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 100 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 فاقد قطعه مورد نظر می‌باشند. ردیف‌های ۴ و ۵ و ۸ تا ۱۰ از تصویر سمت چپ به‌ترتیب کلونی‌های دارای سیستاتین‌های ذرت CCI و CCII کوتاه (۳۹۵ و ۳۵۰ جفت باز) و ردیف‌های ۲ تا ۴ و ۸ و ۹ از تصویر سمت راست به‌ترتیب کلونی‌های دارای سیستاتین‌های ذرت CCII و CCI بلند (۴۵۰ و ۵۰۰ جفت باز) هستند که به‌وسیله آنزیم‌های مناسب برش دو گانه داده شده‌اند و باقی‌مانده پلاسمید های pUC در ردیف‌های بالا مشاهده می‌شود.

جدول۱ . چگالی نوری و تعیین غلظت پروتئین برای نوترکیب سیستاتین‌های ذرت

نمونه	چگالی نوری تکرار اول	چگالی نوری تکرار دوم	معدل چگالی نوری	غلظت پروتئین µg/ 5 µl
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 I و II مشاهده شد (شکل ۳).

تعیین غلظت پروتئین سیستاتین‌های ذرت

شدت رنگ آبی در رابطه با سیستاتین ذرت II در آزمایش سریع برادفورد 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 اسپکتروفتومتر چگالی نوری (OD) هرکدام از محلول برادفورد و نمونه‌های پروتئین در دو تکرار در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و معدل آنها محاسبه گردید. غلظت پروتئین نمونه‌ها ۳/۵۹ و ۶ میکروگرم در پنج میکرو لیتر برای سیستاتین ذرت شماره I (به‌ترتیب بلند و کوتاه) و ۱۱/۹۶ و ۱۱/۰۶ میکروگرم در پنج میکرولیتر برای سیستاتین ذرت شماره II (به‌ترتیب بلند و کوتاه) بود که بیان بهتر سیستاتین شماره II را در پلاسمید نوترکیب نشان می‌دهد (جدول ۱).

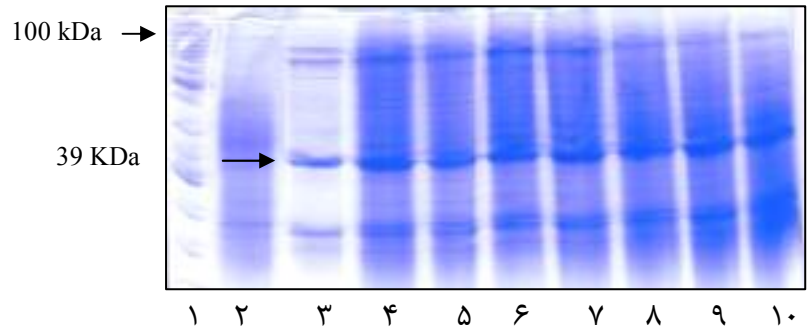
فعالیت و پایداری مهارکننده‌های سیستاتین

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

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

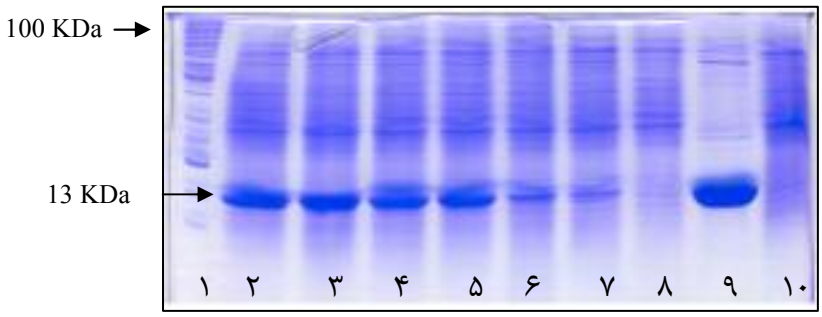
[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.28.5]

فعالیت بازدارنده پروپاپین در مجاورت عصاره حاوی سیستئین پروتاز



شکل ۴. ستون ۱ مارکر با وزن ملکولی KDa ۱۰۰ ، ستون ۲ عصاره حاوی پروتاز، ستون ۳ بازدارنده پروپاپین (PP) (۳۹ کیلـو دالتـون)، و ستون‌های ۴ الی ۱۰ ترکیب بازدارنده و سوبسترا که به‌ترتیب در مدت زمان‌هـای صـفر، ۲۰، ۴۰ ثانیـه و ۱، ۵، ۱۰ و ۳۰ دقیقـه در محـیط آزمایشگاه قرار داده شده است را نشان می‌دهد. شدت تظاهر باند در ناحیه ۳۹ کیلو دالتون تا مدت ۳۰ دقیقه پس از مجاورت بـا سوبـسترا (ستون ۱۰) نشانگر پایداری بازدارنده پروپاپین و هیدرولیز نشدن آن می‌باشد.

فعالیت بازدارنده سیستاتین پرو PP IV در مجاورت عصاره حاوی سیستئین پروتاز



شکل ۵. ستون ۱ مارکر، ستون ۹ مهار کننده پرو پروتاز پاپایا (۱۳ کیلو دالتون)، ستون ۱۰ عصاره حاوی سیستئین پروتاز، و ستون هـای ۲ الی ۸ ترکیب مهارکننده 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 گردیده‌اند را نشان می‌دهد. شدت تظاهر باندها از ستون ۲ تا ۵ کاهش بسیار کم داشته و از ستون ۶ تـا ۸ کـاهش آن شـدید به‌طوری‌که در ستون ۸ تقریبا ناپدید شده است که خود نشانگر قدرت چسبندگی و فعالیت بازدارنده سیستاتین بر علیه پروتاز پاپایـا ولـی هیدرولیز تدریجی آن در طول زمان می‌باشد.

مجاور نمودن مهارکننده با سوبسترا بدون تغییر چندانی باقی مانده است که این موضوع نشانگر فعالیت مهارکنندگی ایـن مهارکننـده در مقابل منبع سیستئین پروتاز یعنی عصاره روده سوسک کلـرادو و عدم تجزیه سوبسترا و هیدرولیز نشدن آن می‌باشد. وجود بانـد مربوط به این مهارکننده حتی ۳۰ دقیقه پـس از مجـاور کـردن آن با سوبسترا در محـیط آزمایـشگاه نـشان از پایـداری خـوب ایـن بازدارنده می‌باشد. در شکل ۵ موضوع تا حدودی متفاوت اسـت. در این تصویر مشاهده می‌شود که مهارکننده پـرو PP IV فعالیـت نسبتا خوبی را در مقابل سوبـسترای خـود یعنـی عـصاره حـاوی پروتاز سیستئین نشان داده است، اما پایداری این مهارکننده باندازه پاپین نمی‌باشد، به‌گونه‌ای که شدت تظاهر باند مهارکننده مربوطـه از ستون ۲ تا ۸ که مربوط به زمان‌های مختلـف مجـاور کـردن آن با سوبسترا می‌باشد به‌تدریج کم شده و بعد از ۳۰ دقیقـه تنهـا اثـر ناچیزی از آن باقی مانده است. این موضوع گواه بر فعالیت نـسبی مهارکنندگی در مقابل سوبسترای حـاوی سیـستئین پروتـاز مـورد آزمایش می‌باشد.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.28.5]

بحث

عدم پایداری و از بین رفتن تأثیر سم BT در طول زمان و پایداری پاره‌ای از حشرات در مقابل آن، محققان را بر آن داشته است تا به‌دنبال راه‌کارهای ژنتیکی دیگری باشند. در این رابطه اقدام به شناسایی و انتقال ژن‌های تولید کننده پروتئین‌های بازدارنده پروتازها با دامنه وسیع فعالیت بازدارندگی، می‌تواند نتایج رضایت بخشی را در سیستم دفاعی گیاهان در مقابل آفات حمله کننده ایجاد نماید. سیستاتین‌ها با داشتن مزیت نسبی در مقابل تغییرات اسیدیته لوله گوارشی حشرات در کنترل و مهار پروتازهای موجود در لوله گوارشی حشرات خانواده کلئوپترا مؤثر می‌باشند. از بین محصولات مهندسی شده ژنتیکی می‌توان به سیب 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 فعالیت‌های پروتازی موجود در لوله گوارشی CPB را مهار می‌کند (۱۶). سیستاتین‌های ذرت به‌عنوان یک جایگزین و مدل جدید که دامنه فعالیت بیشتری را در مقابل پروتازها از خود نشان می‌دهند، معرفی شده‌اند (۱). با وجودی که ۷۱ در صد از اسیدهای آمینه موجود در سیستاتین‌های ذرت همانند آن در سیستاتین برنج در فاصله بین اسید آمینه‌های ۳۶ و ۱۳۵ می‌باشد، اما سیستاتین‌های ذرت دارای قدرت بازدارندگی قوی تری در مقابل پاپین، کاتپسین Hو L و قدرت بازدارندگی ضعیف تری در مقابل کاتپسین B می‌باشند. اختلاف سیستاتین‌های ذرت با سیستاتین‌های برنج در این می‌باشد که سیستاتین‌های ذرت می‌توانند دارای پپتیدهای سیگنالی باشند و لذا در یکی از اجزای سلولی نظیر واکوئل، شبکه‌های آندوپلاسمی و یا دستگاه گلژی ذخیره شوند (۱). بر خلاف پروتئینازهای سرین و پروتئیناز آسپارتیک کاتاپسینD که به‌مقدار زیاد در *E. coli* بیان شده است، مثال‌های محدودی از بیان پروتئینازهای سیستئین حتی به‌مقدار کم در *E.coli* گزارش شده است (۲۹). در این پژوهش موفق شدیم تا cDNA سیستاتین ذرت را به روش Reverse transcription به‌دست آورده و پروتئین‌های فعال سیستاتین را هر چند به‌مقدار کم در باکتری اشرشیاکولی تولید نماییم. چنانچه در تعیین غلظت محصول پروتئین سیستاتین‌ها در جدول ۱ مشاهده می‌شود بیان ژن حاکی از مقادیر متفاوت و نسبتاً کم سیستاتین‌های ذرت بلند و کوتاه می‌باشد. این اختلاف در میزان تظاهر پروتئین نوترکیب می‌تواند به نوع ساخت نوترکیب‌ها (نوع پلاسمید و سلول‌های مستعد استفاده شده) مربوط شود. هم‌چنین عدم پایداری بعضی از پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های مستعد نیز می‌تواند در تظاهر پروتئین نوترکیب دخالت داشته باشد که احتیاج به تحقیق بیشتر دارد. چنانچه گزارش شده است شرایط مختلف از جمله نوع باکتری میزبان همراه با تعداد پلاسمید حمل کننده نشانگر آنتی بیوتیک در بهینه سازی تولید انبوه پروتئین در اشرشیاکولی متفاوت و تأثیر گذار می‌باشد. 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 می‌گذارد، در حالی‌که ساختمان دوم، به‌خصوص انتهای ´۵ آن، اغلب یک نقش بحرانی را بازی می‌کند که هم‌چنین می‌تواند بر روی دسترسی به ناحیه اتصال ریبوزوم اثر بگذارد، و این نهایتاً بر روی سطح بیان پروتئین مؤثر می‌باشد. سایر شرایط رشد همانند درجه حرارت پائین، سطح اکسیژن، منبع کربن، سرعت رشد و غیره نیز می‌تواند بر میزان تولید پروتئین تأثیر گذار باشد (۱۲). آبه و همکاران (۱) در یافته‌های خود پیرامون ویژگی‌های فیزیولوژیکی سیستاتین I ذرت اظهار می‌دارند که در گیاه ذرت میزان mRNA این سیستاتین دو هفته بعد از گل‌دهی به حداکثر رسیده و بیان آن در طول بالغ شدن دانه ذرت ادامه می‌یابد. در پژوهش حاضر نیز برای به‌دست آوردن حداکثر DNA و mRNA این سیستاتین زمان برداشت غلاف‌های ذرت دوهفته بعد از گل‌دهی صورت گرفت. با وجودی که تلاش زیادی صورت گرفت تا مطابق پروتکل‌ها و

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.28.5]

دستورالعمل‌های موجود شرایط مناسبی برای تولید و بیان حداکثری پروتئین نوترکیب به‌وجود آید، لیکن نوع ناقل پلاسمید و سلول‌های مستعد مورد استفاده و سایر عوامل ناشناخته موانعی را در راه به‌دست آوردن این سطح مطلوب از پروتئین فعال نوترکیب را ایجاد نمود. در عین حال بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب سیستاتین ذرت هر چند به‌مقدار کم در این آزمایش بیانگر این مطلب است که با استفاده از سلول‌های مستعد بهتر و کلون سازی موثرتر قطعه ژن در پلاسمید می‌توان به این مهم دست یافت. آبه و همکاران (۱) معتقدند که بیان کم این پروتئین در سلول مستعد *E. coli* می‌تواند ناشی از وجود سیگنال پپتید نسبتاً طولانی همراه این پروتئین باشد که از نفوذ آن در غشای سیتوپلاسمی اشرشیاکولی می‌کاهد. علت استفاده از پلاسمید *pGEX* به‌عنوان ناقل در این آزمایشات به‌دلیل 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 می‌سازد که در محیط آبی محلول بوده و براحتی بتواند از ماده خام باکتریایی جدا شود (۲۵). ناقل *pGEX 3x*، قبلاً توسط میشاد و همکاران (۱۷)، به‌صورت موفقیت آمیز برای بیان سیستاتین برنج (OCs) استفاده شده بود. در پژوهش حاضر از ناقل *pUC 19* به‌عنوان ناقل اصلی برای کلون سازی، و قدرت افزایش دهی 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 می‌گیرد، امکان تولید پروتئینی با اسید آمینه‌های سیستاتین ذرت با و یا بدون سیگنال پپتید بوده است. آبه و همکاران (۱) با استفاده از ناقل *pCC7S* در سلول‌های مستعد *E. coli* موفق به بیان پروتئین سیستاتین ذرت با وزن ملکولی ۱۷ کیلو دالتون به‌مقدار 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 می‌باشد را تغییر دادند، موفق به بیان پروتئین متصل ۱۲۰ اسید آمینه‌ای فاقد سیگنال پپتید در سطح مطلوبی شدند. میشاد و همکاران (۱۶) از سلول‌های مستعد JM-109 به‌عنوان یک گونه با ارزش برای بیان GST-OC I استفاده نموده‌اند.

چنانچه از نتایج این پژوهش به‌دست آمد CC I و CC II در مقایسه توالی اسیدهای آمینه و تعداد جفت بازشان و در نتیجه خصوصیات بیوشیمیایی آنها در مقابل پروتازها با هم تفاوت دارند که این موضوع با نتایج به‌دست آمده توسط آبه و همکاران (۱) مطابقت دارد. از طرف دیگر خصوصیات سیستاتین‌های ذرت با سیستاتین‌های برنج (OCs) به دلیل داشتن یک نشان پپتیدی که باعث هدایت تجمع این نوع سیستاتین‌ها در محل به‌خصوصی از اجزا درون سلولی می‌شود (نیاز به تحقیق دارد)، متفاوت است. در مجموع قدرت بازدارندگی سیستاتین‌های ذرت (CCs) نسبت به سیستاتین‌های برنج (OCs) به دلیل میل ترکیبی آنها با پروتازها، بیشتر می‌باشد. هر دوی سیستاتین ذرت دارای قدرت بازدارندگی قوی تری در مقابل پاپین می‌باشند (به‌ترتیب K_i $3.7x10^{-8}$ و $6.6x10^{-8}$ برای CCI و CCII در مقایسه با $3.64x10^{-8}$ و $1.14x10^{-6}$ برای OCI و OCII). همچنین CCI دارای قدرت بازدارندگی قوی تری در مجاورت کاتاپسین H (K_i, $5.7x10^{-9}$)، در مقایسه با OCI (K_i, $7.8x10^{-8}$) و OCII (K_i, $2.5x10^{-7}$) می‌باشد (۱ و ۲۱).

سپاسگزاری

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

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.28.5]

منابع مورد استفاده

1. Abe, M., K. Abe, M. Kuroda and S. Arai. 1992. Corn kernel cysteine protease inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origion. Eurp. J. Biochem. 209:933-937.
2. 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.
3. 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 Supressing Activity of a Truncated Form of the protein. Protein Express Purif 3:41-49.
4. 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.
5. 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.
6. Gatehouse, A. M. R., Y. Shi, K. S. Powell, C. Brough, V .A. Hider, W. D. Hmilton, C. Newwell, A. Merryweather, D. Bulter and J. A. Gatehouse. 1991. Approaches to insect resistance using transgenic plants. Phylosophical Transactions of the Royal Society, London.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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
13. 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.
14. 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.
15. 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
16. 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. Biotecnol. Prog. 10:155-159.
17. 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.
18. Michaud, D. and A. Asselin.1995. Review, Application to plant proteins of gel electrophoretic methods. J. Chromatogr. A. 696:263-279.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Ryan. C. A.1989. Proteinase inhibitor gene families: Strategies for transformation to improve plant defense against herbivores. Bio Essays 10:20-24.
24. Smith, B. J. 1984. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteinsi. PP.41-55. *In:* J.M Walker (Ed.), Methods in Molecular Biology. Vol. 1. Proteins. Humana Press, Clifton, New Jersey.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.28.5]

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. Vaeck, 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. Supperssion of larval clorado 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.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.1.28.5]