

یافته های نوین کشاورزی
سال دوم- شماره ۱- پاییز ۱۳۸۶

جداسازی ژن های بتا ۱ و ۳- گلوکاناز از یونجه یکساله، بیان آنها در باکتری *E. coli* BL21 و بررسی خاصیت ضد قارچی پروتئین های بیان شده

نیره نوابی*، کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی
بهرروز نجمی، کارشناس ارشد زراعت و اصلاح نباتات
محمد رسولی، دانشجوی دکتری اصلاح نباتات واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

پروتئین های مرتبط با بیماریزایی (Pathogenesis-related protein) آن دسته از ترکیبات پروتئینی هستند که توسط گیاه میزبان در پاسخ به حمله عوامل بیماری زا یا تنش های محیطی تولید می شوند. تاکنون بتا ۱ و ۳-گلوکانازهای زیادی در گیاهان مختلف شناسایی شده است که خاصیت ضد قارچ آنها در شرایط آزمایشگاه بررسی شده است. هدف این تحقیق جداسازی ژن های بتا ۱ و ۳- گلوکاناز یونجه یکساله، کلون ژن ها، بیان فراوانی و بررسی فعالیت های فیزیولوژیک و خاصیت ضد قارچ پروتئین های به دست آمده در شرایط آزمایشگاه می باشد. در این تحقیق با همردیف سازی ژن های بتا ۱ و ۳-گلوکاناز یونجه چند ساله و نخود روی ژنوم یونجه یکساله سه چارچوب خواندن با شباهت بالای ۵۰٪ و دارا بودن رمز شروع و پایان، شناسایی و جداسازی شده و قطعات به ناقل PET21c منتقل و در باکتری *E. coli* BL21 بیان شد. با تکنیک SDS-PAGE مشخص شد که این پروتئین ها به صورت اجسام نامحلول تولید شده اند. خاصیت ضد قارچی این پروتئین ها پس از تا شدن و به دست آوردن ساختار فضایی صحیح روی قارچ های *Alternaria alternata* و *Fusarium graminearum* آزمایش شد. نتایج آزمون بررسی خاصیت ضد قارچ پروتئین ها پس از تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SAS در سطح ۵٪ معنی دار بود.

واژه های کلیدی: بتا ۱ و ۳- گلوکاناز، یونجه یکساله، پروتئین های PR

* نویسنده رابط: E-mail: navabi86@yahoo.com

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۳/۱۲

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۶/۲۲

مقدمه

پروتئین های PR ترکیبات پروتئینی هستند که توسط گیاه میزبان در پاسخ به حمله عوامل بیماری زا یا تنش های محیطی تولید می شوند (۳۱). این پروتئین ها معمولا به طور سیستمیک در گیاه تولید می شوند و سبب پدیده SAR می شوند در نتیجه آلودگی های بعدی تولید شده توسط قارچ ها، باکتری و ویروس ها کنترل می شود (۴، ۶ و ۲۰). در حال حاضر ۱۷ خانواده از این پروتئین ها شناسایی شده است (۳۱). نوع، میزان و مکان سلولی PR-protein سنتز شده وابسته به نوع تنش و گونه گیاهی مورد مطالعه است (۱۴). ژن های القا کننده PR-Protein و PR-Like Protein را به ترتیب با علائم yprl و ypr و شماره خانواده مربوطه نامگذاری می کنند (۴ و ۳۱). از آن جا که دیواره سلولی بسیاری از قارچ های بیماری زا به طور عمده از کیتین و بتا گلوکان تشکیل شده است (۱) از میان پروتئین ها، پروتئین های گروه ۲ (بتا ۱ و ۳- گلوکاناز) و گروه ۳ (کیتیناز) بیشتر مطالعه شده اند (۳۲). علت این امر این است که بتا ۱ و ۳- گلوکانازها با شکستن باندهای بتا ۱ و ۳- گلوکان و کیتینازها با شکستن باندهای او-۴-N- استیل گلوکزآمین به طور مستقیم دیواره سلولی قارچ ها را هیدرولیز و از رشد قارچ جلوگیری می کنند (۱ و ۲۷). این دو پروتئین یا به طور مستقیم دیواره سلولی قارچ ها را هیدرولیز و از رشد قارچ جلوگیری می کنند و یا الیساتورهایی از دیواره سلولی قارچ به وسیله عمل آنزیمی خود آزاد می کنند که این الیساتورها به نوبه خود پاسخ های دفاعی مختلف از جمله مقاومت اکتسابی عمومی (SAR) را در گیاهان القا و در نتیجه مقاومت گیاهان در برابر حمله قارچ را افزایش می دهند (۴، ۶، ۲۶ و ۳۰). بتا ۱ و ۳- گلوکانازها فراوان ترین آنزیم با قدرت تنظیمی بالا در پاسخ گیاه به عوامل بیماری زا هستند. علاوه بر این، بتا ۱ و ۳- گلوکانازها در فرایندهای تکاملی و فیزیولوژیکی متفاوتی از جمله تقسیم سلولی، میکروسپوروژنز، جوانه زنی دانه گرده، رشد لوله گرده، با روری، جنین زایی، جوانه زنی بذر، خواب بذر، رسیدگی میوه، انتقال ذخیره گیاهی اندوسپرم در دانه غلات و خواب جوانه در گیاهان سالم نقش دارند (۱۵ و ۱۶). چنین بتا گلوکانازها در پاسخ به سرما، گاز ازن و سایر تنش ها نیز نقش دارند (۲، ۵ و ۲۲). البته غالب مطالعات بر روی بتا ۱ و ۳- گلوکانازها بر نقش آنها در پاسخ گیاه به عوامل بیماریزای میکروبی به ویژه قارچ ها متمرکز بوده است (۷ و ۲۲). بتا گلوکانازهای (BGLu) یک گیاه اغلب شامل ایزوفرم های چندگانه هستند که از نظر اندازه، نقطه ایزوالکتریکی، ساختمان اولیه، محل اثر سلولی و الگوی تنظیمی متفاوتند. همچنین ایزوفرم های بتا گلوکاناز از نظر خاصیت قارچ کشی نیز متفاوت می باشند (۴). تاکنون تحقیقات زیادی روی جداسازی و بررسی خاصیت ضد قارچی آن در گیاهان مختلف انجام شده است (۱۸، ۱۹ و ۲۹).

در تحقیقی که در سال ۲۰۰۴ توسط سان و همکاران انجام گرفت خاصیت ضد قارچ بتا ۱ و ۳- گلوکاناز برگ گندم در آزمایشگاه بررسی گردید. این بتا گلوکاناز فعالیت ضد قارچی در برابر قارچ های

Alternaria longipes و *Rhizoctonia solani* نشان داد و همچنین از رشد لوله و جوانه زدن اسپور *Verticillium dahliae* و *Fusarium oxysporum* جلوگیری کرد (۲۸).

در یک آزمایش دیگر جی و کوک (۱۹۹۵) یک بتا گلوکاناز اسیدی را از خیار استخراج و بررسی کردند. مطالعات نشان داده است که افزایش فعالیت بتا ۱ و ۳-گلوکاناز در خیار با القای مقاومت در برابر *Colletotrichum lagenarium* ارتباط دارد. همچنین گیاهان زیادی از طریق انتقال ژن بتا ۱ و ۳-گلوکاناز به صورت تنها و یا همراه با ژن کیتیناز تراریخت شده اند که اکثر آنها در مقابل آلودگی به برخی از قارچها مقاومت نشان می دهند (۲۳). لورنس و همکاران، cDNA بتا ۱ و ۳-گلوکاناز سیب زمینی را به بذک منتقل کردند. لاین های تراریخت سه برابر بیشتر از گیاهان غیر تراریخت در برابر قارچ های *Fusarium Oxysporum* و *Fusarium culmorum* مقاومت نشان دادند (۳۴). گیاهان توتون تراریخت که ژن بتا ۱ و ۳-گلوکاناز از سویا به آنها انتقال داده شده بود در آلودگی با قارچ های *Phytophthora*، *Alterrnaria alternata* و *Peronospora* علائم خفیف تری را نسبت به گیاهان غیر تراریخته در برابر بیماری نشان دادند (۳۵). مطالعات اخیر نشان داد که تعدادی از بتا ۱ و ۳-گلوکانازهای گیاهی جزء آلرژن ها هستند، برای مثال پروتئین های Ole e 9 و Ole e 10 که جزء آلرژن های اصلی زیتون شناخته می شوند شباهت بالایی (۵۳٪) با بتا ۱ و ۳-گلوکاناز آراییدوپسیس نشان می دهند (۸، ۱۳ و ۲۴). *Medicago truncatula* یا یونجه یکساله گیاهی دیپلوئید با ژنوم کوچک است که درصد بالایی از ژنوم آن توالی یابی شده است و به عنوان گیاه مدل برای تحقیق روی حبوبات به کار می رود (۳ و ۹) ولی تاکنون مطالعه ای برای جداسازی بتا ۱ و ۳-گلوکانازهای این گیاه و بررسی خاصیت ضد قارچی آنها انجام نشده است. در مطالعه ای که واتسون و همکاران روی یونجه یکساله انجام دادند سیصد و چهار پروتئین با تکنیک انگشت نگاری جرمی پپتید (Peptide mass finger printing) شناسایی شد. در بین این پروتئین ها یک بتا ۱ و ۳-گلوکاناز با شماره BF650622 ثبت شد ولی تاکنون فعالیت بیولوژیکی آن بررسی نشده است (۳۳). با توجه به اینکه بیشتر از ۹۰ درصد ژنوم این گیاه توالی یابی شده است فرصت مناسبی بود تا با همردیف سازی ژن های بتا ۱ و ۳-گلوکانازهای سایر گیاهان روی ژنوم یونجه یکساله، توالی های با شباهت بالا با بتا ۱ و ۳-گلوکاناز سایر گیاهان، شناسایی و بررسی شود. هدف از این تحقیق جداسازی توالی های ژن بتا ۱ و ۳-گلوکاناز از یونجه یکساله، کلون ژن ها و انتقال آنها داخل باکتری BL21 برای بیان فراوان پروتئین ها و سپس بررسی خاصیت ضد قارچی پروتئین های حاصل در محیط آزمایشگاه می باشد. در همه تحقیقات ابتدا خاصیت ضد قارچ پروتئین در محیط آزمایشگاهی تست می شود و سپس ژنهای مناسب به گیاهان حساس منتقل می شود این تحقیق زمینه شناسایی ژن های مناسب و انتقال آنها به گیاهان حساس را در تحقیقات آینده فراهم می سازد.

مواد و روش ها

همردیف سازی: تحقیقات نشان می دهد توالی های شناخته شده بتا ۳-۱ و ۳-۱ گلوکاناز گیاهان دیگر که در بانک اطلاعاتی NCBI ثبت شده است. توالی بتا ۳-۱ گلوکانازهای شناخته شده در یونجه چند ساله، نخود، لوبیا، آرابیدوپسیس و... در نرم افزار tblastn موجود در بانک اطلاعاتی NCBI قرار گرفتند تا توالی های مشابه آنها در ژنوم یونجه یکساله مورد جستجو قرار گیرد. سرانجام از بین ۱۰۰ توالی بررسی شده سه توالی انتخاب شدند علت انتخاب این توالی ها این بود که بیشترین شباهت را با بتاگلوکاناز حبوبات داشتند همچنین منطقه اینترون داخل توالی وجود نداشت، دارای رمز شروع و پایان بود. برخی دیگر از این ۱۰۰ توالی نیز دارای شرایط خوب برای بیان بودند ولی به دلیل حجم زیاد کار باید به سه توالی اکتفا می شد.

از آنجاکه هدف نهایی تحقیق بیان ژن های شناسایی شده در باکتری *E.coli* است و به دلیل این که باکتری *E.coli* فاقد مکانیزم لازم جهت حذف اینترون از mRNA و سیگنال پپتید از پروتئین ها می باشد و احتمالاً وجود این دو منطقه در تاخوردن و عملکرد طبیعی پروتئین ها تداخل ایجاد می کند به همین دلیل لازم بود تا توالی هایی انتخاب شود که فاقد منطقه اینترون باشند که با استفاده از برنامه های Genescan و Genscan توالی هایی انتخاب شد که منطقه اینترون ندارد. همچنین به دلیل اینکه باکتری مکانیزمی برای حذف سیگنال پپتید ابتدای پروتئین ندارد باید پرایمرها به گونه ای طراحی شود که منطقه مربوط به توالی سیگنال پپتید اصلاً رونویسی نشود برای این منظور توالی ها در برنامه Signal P در بانک Expasy قرار داده شد و بعد از مشخص شدن تعداد نوکلئوتیدهای Signal پرایمرها از منطقه بعد از سیگنال پپتید طراحی شد و چون کدون آغاز هم در منطقه سیگنال قرار دارد و بدون در نظر گرفتن این ناحیه کدون شروع نیز حذف می شود ابتدای پرایمرهای رفت طراحی شده کدون ATG اضافه شد.

جدول ۱: برخی از مشخصات توالی های انتخاب شده

نام انتخاب شده	مکان توالی روی ژنوم	طول نوکلئوتیدی
Med-32	mth2-46o19	۱۵۱۴
Med-23	mth2-108o17	۱۲۶۱
Med-6	mth2-14d10	۱۲۳۳

طراحی آغازگر: جهت شناسایی و حذف سیگنال پپتید در توالی ها ابتدا توالی ها با کمک نرم افزار Translate در پایگاه اطلاعاتی Expasy به توالی پروتئین تبدیل گردیدند. توالی های پروتئین سپس با نرم افزار Signal p در پایگاه اطلاعاتی Expasy مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت و نواحی سیگنال پپتید در آنها شناسایی و حذف شد و به دلیل این که کدون آغاز هم در بخش سیگنال پپتید حذف می شود به ابتدای پرایمرهای طراحی شده کدون ATG اضافه شد. سایر مشخصات پروتئین از جمله وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک پروتئین ها با کمک نرم افزار Prot param در پایگاه اطلاعاتی Expasy مشخص شد. به منظور بررسی محل های برشی و استفاده از آن در طراحی آغازگرها از نرم افزارهای NEB cutter ver 0.2 و MAPdraw ver 3.044 استفاده گردید.

Med-32-F 5' - ATgCAAATAggTgTTTgTTATggCATgATgg -3'

Med-32-R 5'-gCAGTgTTgggAATTgAAAAAgTgggTg -3'

Med-23-F 5' -ATgATTggTgTTAACTATggCACAAATAgCA -3'

Med-23-R 5'-CAATTCACCCACTCCgCgC -3'

Med-6-F 5'--ATg ggCAGCCATACCTAATCCTA -3'

Med-6-R 5'-TCCACCATgACATCAAACAC -3'

T7 Pet 5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3'

تکثیر قطعات: به منظور استخراج DNA ژنومی گیاه از روش CTAB بافر استفاده شد (۲۵). تکثیر قطعات با استفاده از آنزیم تک پلی مرز انجام شد. قطعات تکثیر شده با آنزیم تک پلی مرز در انتهای ۳' یک نوکوتید دزوکسی آدنین تری فسفات دارند که موجب اتصال قطعات با T-vector می شود. قطعات تکثیر شده از روی ژل جدا و سپس خالص شدند. برای خالص سازی قطعات از روی ژل، از کیت DNA Extraction kit # K0513 شرکت Fermentas استفاده شد.

تهیه T-vector: برای تهیه وکتور مناسب برای بیان ژن های تکثیر شده در باکتری *E. coli* از پلاسمید PET21c استفاده شد. استخراج پلاسمید PET21c از باکتری *E. coli* به روش Mini preparation (استخراج پلاسمید در حجم کوچک) انجام شد (۲۵). برش پلاسمید از سایت برشی NdeI به وسیله آنزیم NdeI انجام شد. بعد از انجام واکنش، پلاسمید مورد نظر با استفاده از کیت DNA Extraction kit # K0513 شرکت Fermentas خالص شد. برای ایجاد انتهای صاف (حذف Over hang) در انتهای پلاسمید برش یافته، از آنزیم Mung bean nuclease استفاده شد. بعد از انجام واکنش به منظور زدودن مواد اضافی، پلاسمید با کیت خالص سازی خالص گردید.

جدول ۲: توالی های تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت

توالی ژن Med-6

acctaatacct	aatgtggagg	cctcggccct	aaggatgtgt	aacctatta	ggcagccat
caaaatatta	tttctcta	gacttacaat	agttcattat	tatatgcagc	ggacaaggtc
ataggagttt	gctatgggat	gattggaaat	aatctaccat	ctaggcaaga	tgatggatcc
ttatatagat	caagggcat	taaccaaatg	cgcttttact	tcccagatga	acaagccctc
caagccctta	gaggttccaa	catagagttg	atccttgatg	tggctaggga	aacccctaat
tctcttagaa	atgccaatga	agccacaat	tgggtcaata	gatatgtgaa	accctatgct
cgagatgta	aaatcaagta	catcactgtc	ggaaatgaaa	ttaaacctta	cgacagtga
gcacaatcca	ttctccctgc	catgcaaaac	attcaaaatg	ctatttcagc	agccaattta
cagggacaaa	tcaaggcttc	aatagcaatt	gacatgactt	tgattggtaa	ttcatatcca
cccataatg	gtgttttcac	tgaccaagca	aaaccataca	tacaaccaat	aataaacctc
ctaaagaaca	atggagcacc	acttcttgcc	aatgtgtatc	cgactctcgc	ttatatcaat
aataaacaaa	gcatttctct	tgattatgct	ctttttagac	aacaaggaaa	caatcaagtt
ggttaccgaa	acctttttga	tgcccagtta	gattcagtat	acgctgctct	tgagaaagtt
ggcgcttcg	gtgtgaagat	agtgtgttcc	gagagtgggt	ggccatctct	aggtggaat
agtgcctcaa	cggacaacgc	tgccacatat	tatcgtaat	tgatcaatca	cgctcaggaat
gggactccta	agagaccg	agctattgag	acttacttgt	ttgccattgt	tgatgaaat
cagaagactg	gtgcaaac	tgaaacaat	tttggctctc	ttaatcctaa	cagaacacct
aaatatcaaa	taagtttcaa	ttgataatct	aaaaaagcta	tgtagctaac	taaatagttt
actacgaata	attgtgtcat	gtgtgcacat	gttgtttcca	tctttctatg	tctgtaatga
atataaataa	tgaatatca	tatatcttgt	ttacttatgt	aattccccca	ttatatttta
gttgtgtttt	gatgtcatgg	tgga			

توالی ژن Med-23

aatagcaaac	aaccttccac	caccatctca	agttgcaaaa	attgggtgta	actatggcac
aattaacaag	gtgagaatct	ttgatgctaa	ccaagaaatc	ttacaagcat	ttgaaaatc
agaattgag	ataacataa	caatacctaa	tgaccaata	cccaacataa	ccaattaac
cttagtcaa	caatgggtca	aaaccaatgt	ccaacccttc	attccttcaa	tcaacatcat
aagaatctta	gtaggtaatg	aagttttatc	aacagctaac	aagcttttta	ttaccaacct
tgctccctgc	atgcaaac	tacacactgc	ccttataaca	acttcattag	acaaccttat
aaaagtgc	acaccacatt	ctttaggtat	ttgtctaat	tcaagctcac	catctagttg
taggtttaga	gaaggctatg	atatacatat	aatcaaacca	atgcttaggt	ttcttaaaga
tacaattca	ctttctcag	taaaccctta	tccttttttt	gcttgcactt	caagcaacct
agattacgca	cttttccgtg	caaattcagg	ggttttggat	gataataacta	aattacatta
cactaatatg	tttgatgcac	aacttgatgc	tgtttatfca	gctatgaaag	ttttgggctt
tgaggatggt	gagattgta	ttggcgaaac	gggttggcct	acgataggcg	actcggccca
aattgggtgc	gatgggaaca	gtgcttctga	ctataatggg	aatcttataa	gacatgttac
ttctgggttt	ggaacacctc	tcatacga	ccggactttt	gagacatata	ttttgtcttt
gtttgatgaa	aatctaaagc	ccggtccaat	atgtgaaagg	aattttgggt	gttcccgacc
caacatgact	cttgtctatg	atgacgtccc	aataatgaga	aaaaatgtag	ctgttctaa
cagtcattct	aaagcaaat	tgctattcat	gacagccttg	agcttcttga	ttggttgggtg
gacttaaat	ttgttggctc	attgttcatt	tctagcagcc	tcaaaaatcg	cgcgacaat
catttcagat	tttgcacatt	cggagaaaat	atagtttttg	tttcgtttga	aatttgaatg
tgactttgc	gacaaatcaa	gagtgtttgt	gccgtccgga	tttatatttt	ggaaatcatg
tgtgtgtttt	cagaaatgcg	cggagtgggt	gaaattg		

توالی ژن Med-32

atgatgggaa	ataatctacc	atcacaacgt	gaagcaatag	caaatagggt	ttgttatggc
atcaaaagaa	tgaggctata	tgatccaaac	caagctgctc	atcctttgca	atcaaaacac
ggcattgagc	ttatgttagg	tggtccaaat	tctgatcttc	ttgaagcact	tagaaattct
gacattgcaa	ttcaatgggt	acaaaaaaat	gtactaaact	aaaacattgc	taccaacat
aaatacatcg	cggttggtaa	tgaagttaac	ccagttgggtg	tctaccttag	tgcaaaatc
tttgttcttc	cggcaatcca	aaacatata	caagcaataa	gctcttctca	attcgcaaaa
caaatcaagg	tttcaacggc	tattgacatg	accatgatag	gagcgaaaaa	ctctgcagat
aaaggttcat	ttgaaagcga	gtgagggtca	tatttggatc	gaacttcgta	cccgccgtct
tatgcaaatg	cacctttatt	tgcaaatatt	tactcttatt	caattatagg	ctacttagta
aaagacatct	cacttcaata	tgctttattc	acttctccta	ttagctataa	agataaccctc
tcaaggggat	accaaaatct	atttgatgct	ttgttggatt	atggttgggt	ttgggatgggt
aatactggaa	ttggttttgt	taaggttgtt	gtgtctgaga	cattacatgc	tgcaattgat
ggatttgc	ctacttatga	taatgcaaga	gtttatcttg	gtggttggcc	ttcagatgggt
aaaggtggga	caccaatgag	gtctggacct	attgagactt	ataattttag	taggcattggt
gagaatcaga	agaatcctga	gttagagaaa	cattttggag	atataattgg	attgtttgat
aaaaagatc	catttggatt	tcaggggaaa	attgatggta	tgttttatcc	taataaacag
tttctctta	agatgtgcat	ttaattttgt	tttaagaaag	ctaatttgg	taagtgtct
ttaaaggtgc	tctctttatg	tatatctgaa	ataaaatgg	gggtgacact	aatttatata
accacaactc	atataatata	ttccaccac	ataattgtca	tgctctgttt	tgatcttgta
tcgcatatga	ccatttaaca	catattaaga	taaatgtgta	cattttcttt	taaaaaaatg
tattatatta	tatcattatt	tttaaatatt	ctagttttga	tataaaaaga	aaataattga
ttaaaaagat	aatgtgactc	acaatgggtg	tcaaagtcga	tatttttttag	tatttttttc
ttggcttctt	gtatccaaag	tcttctagaa	aggtgttaag	tgggtcgcca	agggtttgaa
gcgcaatgac	cgtacaagtg	caagtgtatg	tggataaaag	gcggaagctt	ttgttgagca
aaaccattca	acaacattca	acaccactt	tttcaattcc	agcttctggt	gtaaggggta
				caactctgc	

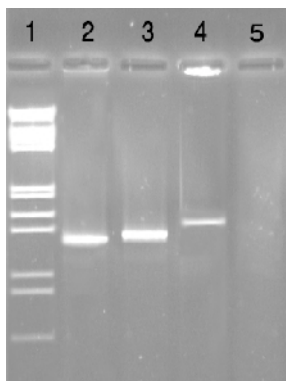
برای افزایش نوکلئوتید تیمیدین تری فسفات به انتهای ۳' پلاسمید و تهیه ناقل مناسب برای همسانه سازی قطعات تکثیر شده به وسیله آنزیم Taq پلی مراز این واکنش (نمونه DNA پلاسمیدی ۶۰۰ نانوگرم، آنزیم Taq پلیمرز (۵ واحد/میکرولیتر): ۵ واحد، بافر PCR (10X): یک برابر، dTTPs ۱۰۰ پیکومول و حجم کل واکنش با آب مقطر سترون به ۲۰ رسانده شد) در دمای ۷۲°C به مدت دو ساعت انجام شد (۱۷ و ۱۲).

حذف گروه فسفات انتهایی برش یافته pET21c: برای حذف گروه فسفات دو انتهای ۵' پلاسمید برش یافته pET21c، از آنزیم calf intestinal alkaline phosphatase (CIP) استفاده شد. محلول این واکنش (DNA برش یافته پلاسمید: ۲ میکروگرم، بافر CIP (۱۰X): ۱ برابر، آنزیم CIP (۱ واحد/میکرولیتر): ۱ واحد و حجم کل واکنش با آب مقطر سترون به ۳۰ میکرولیتر رسانده شد) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در مرحله بعد برای غیر فعال کردن آنزیم، محتوی لوله اپندورف به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از غیر فعال کردن آنزیم، محلول واکنش در دمای محیط قرار گرفت تا سرد شود. سپس جهت خالص سازی DNA از کیت خالص سازی استفاده شد.

واکنش اتصال قطعات DNA هدف به T-vector: واکنش همسانه سازی T-vector با قطعات تکثیر شده PCR با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase بر اساس این واکنش (DNA پلاسمید T-vector: ۱۰۰ نانوگرم، DNA هدف: ۳۰۰ نانوگرم، آنزیم T4 DNA ligase: ۲ واحد، بافر آنزیم ligase (10x): ۱ برابر، حجم کل واکنش ۲۰ میکرولیتر) در دمای ۲۲°C به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. به منظور غیر فعال کردن آنزیم، لوله ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۵°C قرار داده شد. سپس محتوی واکنش روی ژل ۱/۲٪ TBE در ولتاژ ثابت ۷۰ ولت الکتروفورز گردید.

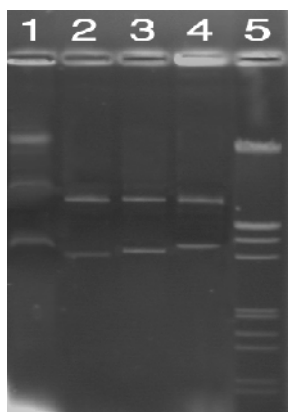
تهیه سلول های مستعد باکتری *E. coli* MC1061 به منظور انتقال و تکثیر پلاسمید محتوی قطعات DNA مورد نظر به آن انجام شد (Transformation).

تأیید وجود قطعات Med-23 و Med-6 در پلاسمید و باکتری E. coli: استخراج پلاسمید pET21c از باکتری *E. coli* (استخراج پلاسمید در حجم کوچک) انجام شد و سپس برای تایید وجود قطعه مورد نظر از PCR و برش آنزیمی با دو آنزیم EcoRI و XbaI استفاده شد و پرگنه هایی که حاوی قطعه مورد نظر بود جدا شدند. از آن جا که قطعات همسانه شده در وکتور می توانند به دو صورت مستقیم و معکوس قرار گیرند باید قطعاتی که در جهت درست (۵' به ۳') قرار گرفته است جدا شوند. برای تعیین جهت قطعات همسانه شده از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی رفت قطعات و آغازگر T7 که از پلاسمید pET21c طراحی شده بود، استفاده می شد.



شکل ۱: تکثیر قطعات با آغازگرهای رفت و برگشت قطعات

۱- نشانگر مولکولی III شرکت Fermentase ۲- ژن Med -6 ۳- ژن Med-23 ۴- ژن Med-32 ۵- شاهد



شکل ۲: برش پلاسمیدهای نو ترکیب با دو آنزیم XbaI و EcoRI

۱- شاهد ۲-ژن Med -6 ۳-ژن Med-23 ۴-ژن Med-32 ۵- نشانگر مولکولی III

انتقال پلاسمید حاوی قطعه DNA به باکتری آماده شده *E. coli* BL 21(DE3):

برای بیان ژن از باکتری *E. coli* BL21 استفاده شد. BL21 جدایه باکتریایی برگزیده برای بیان زیاد ژن و تولید پروتئین نو ترکیب در سیستم باکتری *E. coli* است. استرین BL21 فاقد پروتئینهای Ompt و Ion است و بنابراین باعث ثبات پروتئینهای نو ترکیب می شود. استرین BL21 (DE3) همچنین یک کپی از T7 RNA پلیمراز را حمل میکند که تحت کنترل IPTG موجب القاء و راه اندازی پروموتور Lacuv5 می شود (۱۱). بعد از استخراج پلاسمیدهای حاوی قطعات و تهیه سلول های مستعد BL21

انتقال پلاسمید به ناقل BL21 انجام شد.

القای پروتئین: یک پرگنه از باکتری BL21 حاوی پلاسمید نو ترکیب PET21c در ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت شبانه داده شد. باکتری کشت داده شده به ۱۰۰ میلی لیتر محیط LB جدید حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ میلی گرم/لیتر) اضافه شد و در دمای 37°C و با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه بهم زده شد. زمانی که OD باکتری به 0.6 رسید به محیط IPTG سترون اضافه شد (مقدار نهایی IPTG در محیط 1 M mol بود). بعد از اضافه کردن IPTG باکتری ها دوباره در دمای 37°C درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه مخلوط شدند. پنج ساعت بعد از اضافه کردن IPTG باکتری ها در 4000 دور در دقیقه با سانتیفریوژ رسوب داده شدند و فاز بالائی دور ریخته شد. به رسوب باکتری ۵ میلی لیتر بافر TE با اسیدیته $7/4$ اضافه شد و بخوبی مخلوط شد و دوباره سانتیفریوژ انجام شد و سپس فاز بالا دور ریخته شد. رسوب باکتری ها تا انجام مراحل بعدی در $20-$ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۱).

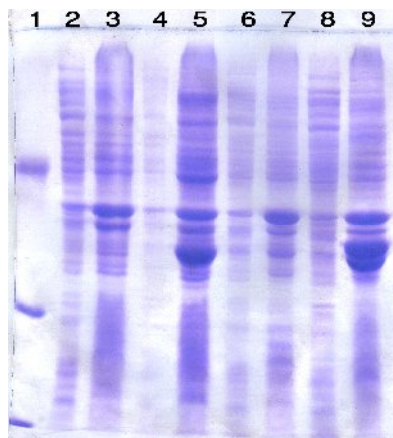
الکتروفورز SDS-PAGE: رسوب باکتریایی معادل ۵ میلی لیتر از کشت مایع تولید شده با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از بافر بار گذاری تهیه شده (SDS (۱۰٪) ۴۰ میلی لیتر، Tris-HCL (۱ مولار) ۱۰ میلی لیتر، گلیسرول ۲۰ میلی لیتر، بروموفنول بلو ۲۰ میلی گرم، بتامرکاپتواتانول $1/39$ میلی لیتر، آب مقطر $8/61$ میلی لیتر) به نمونه ها اضافه شد و دوباره به مدت پنج دقیقه در دمای 94°C درجه سانتیگراد قرار گرفت. نمونه های آماده شده به میزان پنج میکرولیتر روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ با ولتاژ ۱۵۰ ولت به مدت چهار ساعت الکتروفورز شدند.

رنگ آمیزی ژل SDS-PAGE: ژل در محلول رنگ آمیزی به مدت یک ساعت روی شیکر با سرعت ۵۶ دور در دقیقه قرار داده شد. محلول رنگ آمیزی شامل 0.45% متانول، 0.45% آب مقطر، 0.1% اسید استیک و پنج میلی گرم کوماسی بلو بود.

رنگ زدایی ژل: ژل رنگ آمیزی شده تا زمان ظهور بندهای پروتئین و پاک شدن پس زمینه در محلول رنگ زدایی بر روی شیکر با سرعت ۵۶ دور در دقیقه قرار گرفت. محلول رنگ زدایی شامل 0.45% متانول، 0.45% آب مقطر و 0.1% اسید استیک بود.

شکستن دیواره باکتریایی با کمک اولترا سوند: رسوب باکتریایی بدست آمده از ۵ میلی لیتر از کشت مایع تولید شده در یک میلی لیتر TE بافر مخلوط شد و سپس در 13000 دور در دقیقه سانتیفریوژ شد. فاز بالا دور ریخته شد و دوباره یک میلی لیتر TE بافر به رسوب اضافه شد و به خوبی هم زده شد. سوسپانسیون باکتریایی در لوله های اپندورف روی یخ قرار داده شد و با دستگاه اولتراسوند با سیکل 20% به مدت هشت دقیقه تیمار شد. مخلوط به دست آمده در دمای چهار درجه سانتیگراد در 13000 دور در

دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد سپس فاز بالا به طور کامل از رسوب جدا و در لوله جدیدی ریخته شد.



شکل ۳: الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین های بیان شده (۱- مارکر پروتئینی با اندازه ۱۰، ۲۰ و ۴۵ کیلودالتون ۲-سوپ بالای شاهد ۳- اجسام نامحلول شاهد ۴- سوپ بالای شاهد ۵- اجسام نامحلول Med-6 ۶- سوپ بالای Med-23 ۷- اجسام نامحلول Med-23 ۸- سوپ بالای Med-32 ۹- اجسام نامحلول Med-32)

تا کردن پروتئین ترا ریخت از اجسام نامحلول: بعد از این که پروتئین های فاز جامد و فاز مایع به وسیله اولتراسوند از هم جدا شدند به طور جداگانه روی ژل SDS-PAGE رانده شدند. نتایج نشان داد که درصد بالایی از پروتئین در فاز جامد به فرم اجسام نامحلول و درصد پائینی از پروتئین در فاز محلول قرار دارد. مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون پروتئینی اجسام نامحلول در یک میلی لیتر بافر گوانیدین- ساکارز (Guanidine-HCL): ۶M، ۱mM: Tris-HCL (pH8)، ۵۰mM: DTT، ۱mM: Glutathione، ۱ mM: Sucrose: ۵٪ حل شد و برای ۱۵ دقیقه با سرعت مینیمم مخلوط گردید. بافر گوانیدین- ساکارز دقیقاً قبل از مصرف تهیه شد. محلول پروتئینی آماده شده به دو قسمت مساوی تقسیم شده و هر قسمت در مقابل ۲۰۰ حجم از یکی از دو بافر زیر داخل کیسه دیالیز برای مدت ۲۴ ساعت دیالیز گردید. بافرهای دیالیز هر هشت ساعت یک بار تعویض شدند.

بافر فسفات ۲۵ میلی مول pH ۵ حاوی ۵٪ ساکارز

بافر فسفات ۲۵ میلی مول pH ۷ حاوی ۵٪ ساکارز

بررسی خاصیت ضد قارچی پروتئین های تولید شده:

بررسی میزان جوانه زنی اسپور

قارچ های *Fusarium* و *Alternaria* روی محیط PDA استریل کشت داده شدند. چهار روز بعد از کشت، اسپورهای تولید شده با استفاده از اسکالپل از سطح محیط جدا و به طور جداگانه داخل ویالهای حاوی آب مقطر استریل ریخته شدند. برای به دست آوردن غلظت مناسبی از اسپورها، تعداد اسپورهای

موجود دریک قطره از هر کدام از ویال ها، روی لام هموسایتومتر زیر میکروسکوپ شمارش شد. به میزان مساوی (۱۰۰ میکرولیتر) از پروتئین های نمونه Med-6، Med-23، و Med-32 هر کدام به طور جداگانه داخل ویال های حاوی اسپور ریخته و سپس روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. درصد جوانه زنی اسپورها بعد از ۲۴ ساعت زیر میکروسکوپ اندازه گیری شد. آزمایش هر کدام از نمونه ها در سه تکرار انجام شد و نتایج آزمایش در هر تکرار برای ۲۰۰ اسپور شمارش گردید.

تاثیر پروتئین ها بر رشد هیف قارچ های *Fusarium* و *Alternara* :

داخل یک پتری حاوی محیط PDA یک قطعه از قارچ های ذکر شده به شکل دایره برش زده و وسط پتری قرار داده شد. به فاصله مساوی از مرکز، چهار عدد دیسک از جنس نیتروسولوز، رنگ سفید و دارای منافذی به اندازه $0.25/0 \mu m$ با شماره شناسایی VSWP200 از شرکت MILLI PORE قرار داده شد. این دیسک ها خاصیت نگه داشتن پروتئین را دارند. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های پروتئینی نمونه Med-6، Med-23، Med-32 و پروتئین های شاهد منفی به ترتیب روی دیسک های شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ ریخته شد. دو روز بعد دوباره ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه ها روی دیسک ها ریخته شد. پنج روز بعد رشد قارچ ها در نزدیک دیسک ها بررسی شد.



شکل ۴- رشد هیف قارچ *Fusarium* و *Alternara* تحت تاثیر پروتئین های نو ترکیب

نتایج و بحث

سه توالی کدکننده با شباهت بالای ۵۰٪ به پروتئین های بتا ۱ و ۳-گلوکاناز شناخته شده در سایر گیاهان، در ژنوم یونجه یکساله شناسایی شد. با تکثیر قطعات از طریق واکنش های پلیمرز، همسانه سازی آنها در ناقل PET21c انجام شد. به منظور تولید انبوه پروتئین های نو ترکیب، پلاسمیدهای همسانه شده به باکتری E.coli سویه BL21 منتقل شدند و تحت تاثیر IPTG القاء گردیدند. تولید پروتئین های نو ترکیب با تکنیک SDS-PAGE مورد تایید قرار گرفت. همچنین مشخص شد پروتئین های تولید شده به صورت اجسام نامحلول و محلول تولید می شوند. پروتئین های تولید شده در اجسام نامحلول با روش حل کردن ساده تا زده شدند. فعالیت ضد قارچی پروتئین ها در سه تکرار روی جوانه زنی اسپور قارچ ها

و در دو تکرار روی رشد هیف قارچ ها، مورد بررسی قرار گرفت. جوانه زنی قارچ *Alternaria* و هیف آن تحت تاثیر هر سه نوع پروتئین کنترل شد. اما جوانه زنی اسپور قارچ *Fusarium* و رشد هیف های آن تحت تاثیر دو پروتئین Med-23 و Med-32 کنترل شد در حالی که پروتئین Med-6 هیچ تاثیری روی قارچ *Fusarium* نداشت. با توجه به این که سه قطعه مورد بررسی در این تحقیق با استفاده از روش های زیست-رایانه انتخاب شدند و فعالیت آنها در گیاه یونجه یکساله مورد بررسی قرار نگرفته است، پیشنهاد می شود بیان پروتئین های مذکور در سطح رونویسی و ترجمه مورد بررسی قرار گیرد. همچنین به منظور بررسی دقیق تر فعالیت ضد قارچی پروتئین های نو ترکیب تولید شده در این تحقیق، پروتئین ها ابتدا خالص شوند و سپس با اندازه گیری آنها با روش Bradford خاصیت ضد میکروبی آنها در غلظت های مختلف آزمایش شود. به منظور بررسی دقیق تر فعالیت ضد قارچی پروتئین های نو ترکیب و استفاده از نتایج آن در ایجاد گیاهان تراریخت، پیشنهاد می شود فعالیت این پروتئین ها در شرایط گلخانه ای نیز مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

- 1- Adams, D. J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiol.* 150 : 2029-2035.
- 2- Akiyama, T. and Pillai, M. A. 2001. Molecular cloning, characterization and in vitro expression of a novel endo-1,3- β -glucanase up-regulated by ABA and drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 161: 1089-1098.
- 3- Choi, H. K., Kim, D., Uhm, T., Limpens, E., Lim, H., Mun, J. H., Kalo, P., Penmetza, R. V., Seres, A., Kulikova, O., Roe, B. A., Bisseling, T., Kiss, G. B. and Cook, D. R. 2004. A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics.* 166: 1463-1502.
- 4 - Datta, S. k. and Muthukrishnan, S. 1999. Pathogenesis-related protein in plant, led., CRC Press.
- 5- Ding, C. K., Wang, C., Gross, K. C. and Smith, D. 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta.* 214: 895-901.
- 6-Funnell, D., Lawrence, C., Pedersen, J. and Schardl, C. 2005. Expression of the tobacco b-1,3-glucanase gene, PR-2d, following induction of SAR with *Peronospora tabacina*. *physiol Mol Plant Pathol.* 65 (6) 285-296.
- 7- Hell, M. and Bostock, R. M. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defence. *Annals of Botany.* 89: 503-512.
- 8- Huecas, S., Villalba, M. and Rodríguez, R. 2001. Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3- β -glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence and tissue specificity. *Biol chem.* 276(30): 27959-27966.
- 9-Huguet, T. and Prospéri, J. M. 1998. *Medicago truncatula* : A legume model plant. *Plant physiol.* 110: 1167-1169.
- 10-Ji, C. and Kuc, J. 1995. purification and characterization of an acidic beta-1,3-glucanase from cucumber and its relation ship to systemic disease resistance induced by *colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. *Plant Microbe.* 8(6): 899-905.
- 11-Kleber-Janke, T. and Becker, W. M. 2000. Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein express and purification.* 19 (3): 419-424.
- 12 Knoche, K. and Kephart, D. 1999. Cloning blunt-end pfu DNA polymerase generated PCR fragments into PGEM – T vector systems. *Promega notes.* No.71, p.10.
- 13-Koffmann-Sommergruber, K. 2001. Pathogenesis-related (PR) proteins identified as allergens. *Biochem.Soc.Trans.* 30: 930-935.
- 14- Krishnaveni, S., Muthukrishnan, S., Liang, G. H., Wilde, G. and Manickan, A. 1999. Induction of chitinases and b-1,3-glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection and wounding. *Plant Sci.* 144: 9-16.

- 15- Leubner-Metzger, G. 2005.** β -1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *the plant journal*. 41:(1) 133-134
- 16-Leubner- Metzger, G. 2003.** Functions and regulation of of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Science Research*.13(1): 17-34.
- 17- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. and Collins, F. 1990.** Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Research*. 19(5): 1.
- 18- Muthukrishnan, S., Liang, G. H., Trick, H. N. and Gill, B. S. 2001.** Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant cell*. 64(2):93-114.
- 19- Ng, T. B. 2004.** Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. *Peptides*. 25: 1215–1222.
- 20- Odjakova, M. and Hadjiivanova, C. 2001.** The complexity of pathogen defense in plants. *Plant Physiol*. 27:101-109.
- 21- Pan, Sh. and Malcolm, Ba. 2000.** Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21(DE3). *Biotech*. 29(6): 1234-1238.
- 22- Peumans, W. J., Barre, A., Derycke, V., Rouge, P., Zhang, W., May, G., Delcour, J. A., Leuven, F. and Van Damme, E. J. M. 2000.** Purification , characterization and structural analysis of an abundant B-1,3-glucanase from banana fruit .*Biochem* . 267: 1188- 1195.
- 23- punja, z. k. 2001.** genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens- a review of progress and future prospects. *plant pathol*. 23: 216-235.
- 24- Receveur-Bre´chot, V., Czjzek, M., Barre, A., Rouse, A., Peumans, W. J., Van Damme, E. J .M. and Rouge, P. 2006.** Crystal structure at 1.45-Å resolution of the major allergen endo- β -1,3-glucanase of banana as a molecular basis for the latex-fruit syndrome. *Proteins*. 63:235–242 .
- 25- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001.** Molecular cloning: A laboratory manual. Third Edition. CSHL press.
- 26- Sticher, L., Mauch-Mani, B. and Metraux, J. P. 1997.** Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol*. 35:235-270.
- 27- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. and Fritig, B. 1993.** Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. *Biochim*. 75(8): 687-706.
- 28- Sun . B., Dc.Li, Xy.Ci, Rf. Guo and Wang, Y. 2004.** Induction ,purification and antifungal activity of beta-1,3-glucanase from wheat leaves. *Plant Pathol*. 30(4): 399-404.
- 29- Thatcher, L. F., Anderson, J. P. and Singh, K. 2005.** Plant defence responses: what have we learnt from Arabidopsis. *Plant Biol*. 32: 1-19.
- 30- Van Loon, L. C. 1997.** Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Plant Pathol*. 103: 753-765.
- 31- Van loon, L. C. and Van strien, E. A. 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol and mol plant pathol*. 55: 85-97.
- 32- Wang, Y., Kausch, A. P., Chandlee, J. M., Luo, H., Ruemmele, B. A., Browning, M., Jackson, N. and Goldsmith, M. R. 2003.** Co-transfer and expression of chitinase, glucanase, and bar genes in creeping bentgrass for conferring fungal disease resistance. *Plant Sci*. 165(3): 497-506.
- 33-Watson, B. S., Asirvatham, V. S., Wang, L. and Sumner, L. W. 2003.** Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). *Plant physiol*. 131: 1104-1123.
- 34-Wrobel-Kwiatkowska, M., Lorenc-Kukula, K., Starzycki, M., Oszmianski, J., Kepczynska, E. and Szopa, J. 2004.** Expression of β -1,3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi. *Physiol and Mol Plant Pathol*. 65(5):245-256.
- 35- Yoshikawa, M., Tsuda, M. and Takeuchi, Y. 1993.** Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor β -1,3-endo glucanase, from soybean. *Naturwiss*. 80: 417-428.