

مکان‌یابی سلولی پروتئین‌های سرکوبگر خاموشی در دو ویروس کوتولگی زردی غلات

رضا الماسی^{*۱}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۶)

چکیده

ویروس‌های زردی غلات از مخرب‌ترین ویروس‌های غلات در سراسر دنیا هستند. در این تحقیق پروتئین‌های P0، سرکوبگرهای خاموشی، در دو ویروس کوتولگی زرد غلات، *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV) و *Cereal yellow dwarf virus-RPS* (CYDV-RPS) از نظر محل تجمع و قرارگیری در سلول‌های گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور ترادف ژن‌های P0 پس از تکثیر در آزمون زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، با روش Gateway همسانه‌سازی شدند. سپس سازه‌های این ژن‌ها در اتصال با ژن کد کننده *fluorescent protein* (GFP) وارد باکتری *Agrobacterium tumefaciens* شدند و با تزریق باکتری حامل این سازه‌ها به گیاه به صورت موقتی بیان شدند. پس از ۲۴ ساعت از زمان تزریق، محل قرارگیری این پروتئین‌ها در سلول‌های گیاه توسط میکروسکوپ کانفوکال (confocal) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که محل تجمع پروتئین P0 در هر دو ویروس در هسته و سیتوپلاسم است اما تمایل آنها برای تجمع متفاوت است. به عبارت دیگر پروتئین P0 در ویروس CYDV-RPV در مقایسه با CYDV-RPS تمایل کمتری برای تجمع در هسته دارد در حالی که پروتئین P0 در ویروس CYDV-RPS بیشتر در هسته متمرکز است. در آزمون لکه برداری وسترن با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال GFP، پروتئین‌های GFP:P0 ردیابی شدند ولی پروتئین GFP به تنهایی دیده نشد که نشان می‌دهد محل‌های تجمع دیده شده مربوط به پروتئین‌های GFP:P0 است.

کلیدواژه: *Polerovirus*، پروتئین P0، همسانه‌سازی Gateway، لکه برداری وسترن، محل تجمع در سلول.

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rezaalmasi@ymail.com

۱. گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، همدان، ایران.

Subcellular localization of silencing suppressor proteins encoded by two cereal yellow dwarf viruses

R. Almasi^{1*}

(Received: 28.5.2019; Accepted: 7.7.2019)

Abstract

Cereal yellow dwarf viruses are among the most destructive cereal viruses worldwide. In this study, subcellular localizations of silencing suppressor proteins (P0) from two cereal yellow dwarf viruses, *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV) and *Cereal yellow dwarf virus-RPS* (CYDV-RPS), were examined via confocal microscopy. To do so, P0 genes were synthesized by polymerase chain reaction (PCR) and were cloned through Gateway cloning system. *Agrobacterium tumefaciens* clones harboring GFP:P0 constructs were infiltrated into *Nicotiana benthamiana* plants. Transient expression of P0 proteins with N-terminal GFP fusion enabled us to examine their subcellular localizations in plant cells, 24 hours post infiltration. Results showed that both proteins are nuclear-cytoplasmic but different tendencies were observed in their localizations. In other words, P0 of CYDV-RPS was more nuclear oriented than P0 of CYDV-RPV. In the Western blot analysis using GFP polyclonal antibody only GFP:P0 proteins but no free GFP, were detected indicating that localizations were related to GFP:P0 proteins.

Keywords: *Polerovirus*, P0 protein, Gateway cloning, Western blot, subcellular localization

*Corresponding author's E-mail: rezaalmasi@ymail.com

1. Department of Agronomy, College of Agriculture, Malayer University, Malayer, Hamedan, Iran.

مقدمه

داده شد (Pfeffer et al. 2002). سپس نتایج مشابهی برای پروتئین P0 در ویروس‌های CABYV (P0^{CA}) (Pazhouhandeh et al. 2006)، ویروس برگ زرد نیشکر (*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV) (Mangwende et al. 2009)، ویروس زردی خفیف چغندر (*Beet mild yellowing virus*, BMV) (Kozłowska-Makulska et al. 2010)، ویروس زردی شته زاد خربزه (*Melon aphid-borne yellows virus*, MABYV) (Han et al. 2010) و PLRV به دست آمد (Pfeffer et al. 2002).

شدت بیماریزایی ویروس‌ها اغلب با پروتئین‌های سرکوبگر خاموشی مرتبط است (Voinnet et al. 1999). در پژوهش پیشین، ما نشان دادیم که پروتئین P0 در دو ویروس CYDV-RPV و CYDV-RPS، سرکوبگرهای خاموشی هستند و این دو پروتئین از نظر برخی صفات مرتبط با میزبان، متفاوت هستند و در واقع تفاوت دیده شده در شدت بیماری زایی ناشی از تنوع در پتانسیل سرکوبگری دو پروتئین بود (Almasi et al. 2015). حال در پژوهش پیش رو دو پروتئین P0 را از نظر محل قرار گیری آنها در سلول گیاه توسط میکروسکوپ کانفوکال (confocal) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت تا درک بیشتری از ویژگی‌های این پروتئین‌ها و جنبه دیگری از تفاوت آنها را نشان دهیم.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های ویروس

همسازهای عفونت زای دو ویروس CYDV-RPV جدایه نیویورک (NC_004751) و CYDV-RPS (Krueger et al. 2013) به عنوان الگو برای تکثیر ژن P0 مورد استفاده قرار گرفتند.

کوتولگی‌های زردی غلات از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های غلات در سراسر دنیا هستند که توسط ویروس‌های متعلق به دو جنس *Luteovirus* و *Polerovirus* در خانواده *Luteoviridae* ایجاد می‌شوند (Miller & Rasochova 1997). ویروس *Cereal yellow virus* (CYDV-RPV) (*dwarf virus-RPV*) در جنس *Polerovirus* قرار می‌گیرد. این ویروس تا حدودی خفیف (در یولاف و گندم)، پراکنش جهانی دارد (Lapierre et al. 2004) حال آن که خویشاوند نزدیکش CYDV-RPS تنها از مکزیک و غرب آمریکا گزارش شده است (Henry et al. 2004) و در گندم ایجاد کوتولگی شدید و پیچیدگی برگ می‌کند (Miller et al. 2002).

پروتئین P0 در ویروس‌های *Polerovirus* با وزن مولکولی ۲۸ کیلودالتون، توسط اولین ORF در انتهای پنج پرایم ژنوم کد می‌شود. این پروتئین ابتدا به عنوان عامل بهبود دهنده تکثیر ویروس معرفی شد (van der Wilk et al. 1997). P0 برای ایجاد آلودگی توسط ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی (*Potato leafroll virus*, PLRV) لازم است (Sadowy et al. 2001). اما برای ایجاد آلودگی در ویروس‌های زردی شلغم (*Turnip yellows virus*, TuYV) (Ziegler-Graff et al. 1996) و زردی شته زاد کدویان (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV) (Pazhouhandeh et al. 2006) لازم نیست و در این ویروس‌ها پروتئین P0 در تکثیر بهتر ویروس کمک می‌کند.

فعالیت سرکوبگری پروتئین P0 در ویروس TuYV (P0^{Tu}) با تزریق اگروباکتریوم حامل ترانسژن GFP:P0 به گیاهان توتون *Nicotiana benthamiana* لاین 16c نشان

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن P0 در ویروس‌های کوتولگی زرد غلات (CYDV-RPV و CYDV-RPS). اندازه ژن‌های مورد نظر ۷۵۰ جفت باز است.

Table 1. Primer sequences used to amplify P0 gene of cereal yellow dwarf viruses (CYDV-RPV and CYDV-RPS). The size of target genes are 750 bp

Virus	Orientation	Sequence (5'→3')	Annealing(°C)
CYDV-RPV	Forward	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTTTCATCGCCCAACCTTG	66
	Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCATTGAAGAATCTTTTGAATG	
CYDV-RPS	Forward	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTTTCGTCGCCACACTTAG	67
	Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTATTGAAGAATCTTTTGAAGG	

واکنش BP برای ایجاد همسانه ورودی (entry clone)

انجام شد. این واکنش منجر به نوترکیبی بین ترادف attB در دو سر محصول PCR و ترادف attP در پلاسמיד pDONRTM و تشکیل همسانه ورودی می‌شود. حجم واکنش نوترکیبی ۵ میکرولیتر و حاوی ۱۰۰ نانوگرم پلاسמיד pDONRTM، ۱۰۰ نانوگرم محصول PCR، ۱ میکرولیتر آنزیم BP clonase و تا حجم نهایی ۵ میکرولیتر بافر TE (pH=۸) اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

در واکنش LR ژن مورد نظر از همسانه ورودی به ناقل مقصد (destination vector) برای بیان منتقل شد. از پلاسמיד pB7WGF2 (Karimi *et al.* 2002) به عنوان ناقل مقصد برای بیان پروتئین P0 در اتصال با پروتئین GFP تحت پروموتور ۳۵S استفاده شد. واکنش در حضور ۱۰۰ نانوگرم پلاسמיד ورودی، ۱۰۰ نانوگرم پلاسמיד مقصد، ۱ میکرولیتر آنزیم LR clonase و تا حجم نهایی ۵ میکرولیتر بافر TE (pH=۸) به مدت یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

ترانسفورماسیون باکتری

ترانسفورماسیون به روش الکتروپوراسیون انجام شد. ۱۰۰ نانوگرم پلاسמיד به ۴۰ میکرولیتر مخلوط باکتری

تکثیر ژن P0 در آزمون PCR

ترادف آغازگرهای مورد استفاده در آزمون PCR برای تکثیر ژن‌های P0 در جدول ۱ آمده است (جدول ۱). برای طراحی آغازگرها از نرم‌افزار 3 PRIMER Gateway[®] (www.primer3.ut.ee) طبق دستور کار کیت Gateway[®] cloning (Invitrogen) استفاده شد.

مخلوط PCR شامل ۵۰ نانوگرم از DNA پلاسמיד همسانه عفونت زای ویروس، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۲۵ میکرولیتر Master Mix Fidelity[™] (USB[®]) و تا حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد. در نهایت به منظور تکثیر، مخلوط PCR در دستگاه Eppendorf[®] Mastercycler قرار داده شد.

سپس محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد رویت شد و قطعه مورد نظر با روش فنول/کلروفرم از ژل استخراج شد (Downey 2003).

همسانه‌سازی به روش Gateway[®]

همسانه‌سازی به این روش با استفاده از مزیت نوترکیبی مکان-اختصاصی باکتریوفاژ لامبدا است (Landy 1989) که ژن مورد نظر به چندین ناقل پلاسמידی منتقل می‌شود (Hartley *et al.* 2000). آنزیم‌های کلوناز (clonase) توسط شرکت Invitrogen[®] فراهم شد.

۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت، از محل‌های تزریق شده در برگ‌ها به منظور بررسی با میکروسکوپ کانفوکال و آزمون لکه برداری و سترن نمونه برداری شد.

بررسی با میکروسکوپ کانفوکال

برای مشاهده بافت گیاه زیر میکروسکوپ، به دیسک‌های برگ، با قطر تقریبی نیم سانتی متر، در روی لام و لامل آب اضافه شد تا در زیر پمپ خلا، آب به داخل دیسک برگ نفوذ کند و حباب‌های هوا خارج شوند (Dunoyer et al. 2002). سپس نمونه‌ها زیر میکروسکوپ Zeiss® مدل LSM700 مورد بررسی قرار گرفتند. طول موج‌های انگیزش (excitation) و ارسال (emission) به ترتیب ۴۸۸ و ۵۰۵ نانومتر برای GFP بودند.

استخراج پروتئین و آزمون لکه برداری و سترن

به منظور اطمینان از بیان پروتئین GFP:P0 در بافت‌های مورد بررسی و همچنین اینکه موقعیت سلولی دیده شده تنها مربوط به پروتئین GFP نیست، از آزمون لکه برداری و سترن استفاده شد.

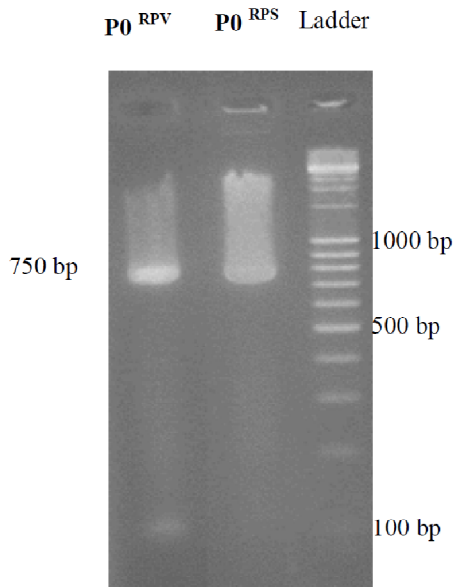
۱۰۰ میلی گرم از بافت گیاهی در بخشی که تزریق انجام شده بود همراه با دانه‌های شیشه‌ای (glass beads) در لوله‌های ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شد. سپس لوله‌ها در نیتروژن مایع گذاشته شدند و توسط دستگاه مخلوط کننده Silamat® به هم زده شدند. ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۶۲/۵ میلی مولار تریس با پی اچ ۶/۸، ۴ مولار اوره، اس دی اس ۳ درصد، گلیسرول ۱۰ درصد، ۱۰۰ میلی مولار دی تی تی و ۰/۱ درصد بروموفنل بلو) اضافه شد و در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه واسرشت شد. سپس مخلوط در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه

مستعد اضافه شد. سپس مخلوط در دستگاه الکتروپوراتور (BioRad®) با تنظیمات مقاومت 200Ω برای *Agrobacterium tumefaciens* و ولتاژ ۲/۵ ولت قرار داده شد. پس از الکتروپوراسیون، ۱ میلی لیتر محیط کشت Luria-Bertani (LB) به سلول‌های باکتری اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای *E. coli* و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد برای *A. tumefaciens* قرار داده شدند. در نهایت مخلوط باکتری ترانسفورم شده روی محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین (Spectinomycin) (Sigma-Aldrich) با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کشت داده شد. استخراج پلاسمید از باکتری *E. coli* با استفاده از کیت Sigma-Aldrich® plasmid prep طبق دستور شرکت سازنده انجام شد.

اگرواینفیلتریشن (Agroinfiltration)

یک کلونی باکتری *A. tumefaciens* (استرین GV301) از روی محیط LB جامد برداشته شد و برای تلقیح ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین (Sigma-Aldrich) با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در دمای ۲۸ درجه استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت سلول‌های باکتری رسوب داده شد و رسوب در ۱ میلی لیتر آب استریل حل شد. سپس جذب نوری محلول باکتری در ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. مقدار جذب نوری در این طول موج برای اگرواینفیلتریشن ۰/۲۵ در نظر گرفته شد.

به منظور بیان موقتی پروتئین GFP:P0 در گیاهان *Nicotiana benthamiana*، باکتری به برگ این گیاهان در مرحله شش برگی تزریق شد. گیاهان در دمای ۲۸ درجه،



شکل ۱- الکتروفورز محصول واکنش PCR برای تکثیر ژن‌های P0 روی ژل آگاروز یک درصد. قطعه‌های ۷۵۰ جفت بازی تکثیر شده مربوط به ژن‌های P0 در دو ویروس CYDV-RPV (P0) و (RPV) CYDV-RPS (P0^{RPS}) است.

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis (%1) to detect amplified P0 genes in PCR. The length of amplified genes were about 750 bp.

رنگ آمیزی شد و در محلول ۱۰ درصد اسید استیک رنگ بری شد.

نتایج و بحث

در آزمون PCR دو قطعه به اندازه ۷۵۰ جفت باز تکثیر شدند (شکل ۱). و با تعیین ترادف محصول PCR مشخص شد دو قطعه مربوط به ژن P0 در دو ویروس مورد نظر هستند. درصد تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی دو ژن به ترتیب ۶۱ درصد و ۴۱ درصد است.

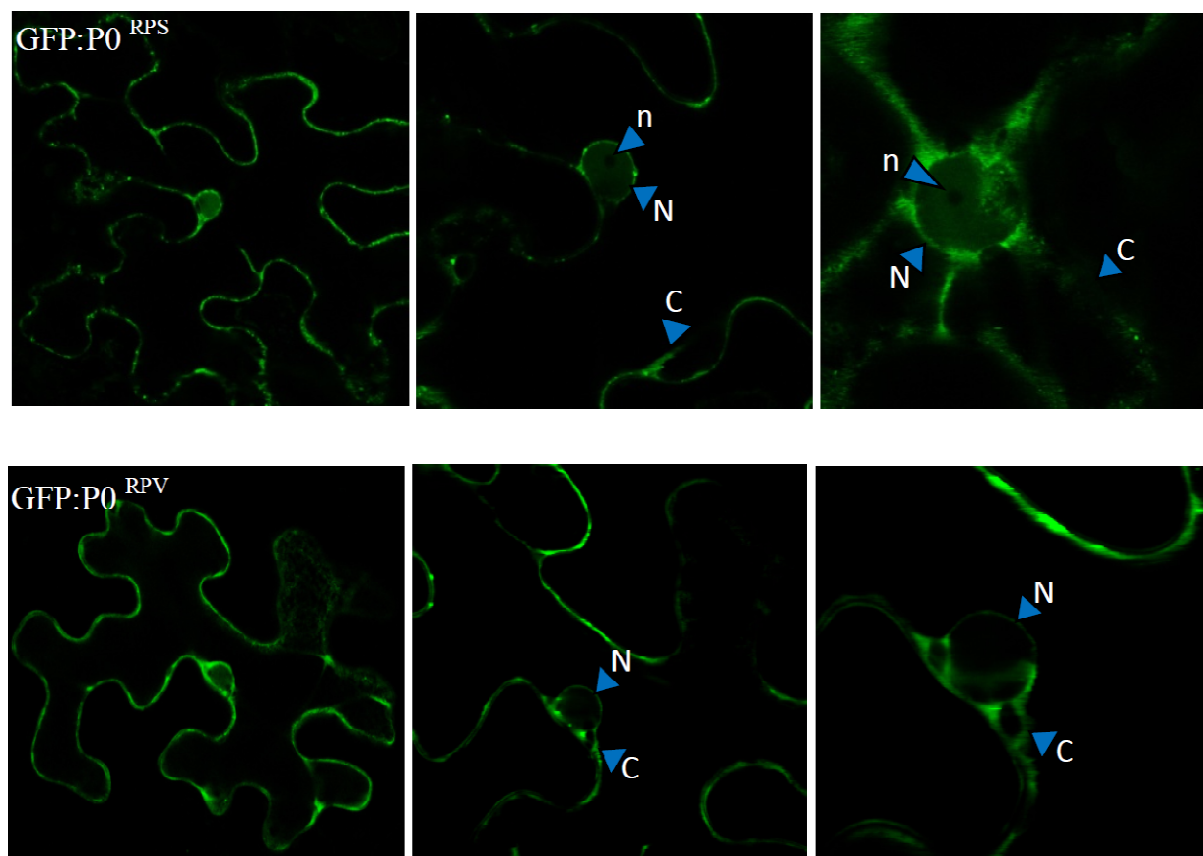
بررسی‌ها با میکروسکوپ کانفوکال نشان داد پروتئین‌های P0 در دو ویروس CYDV-RPV (P0^{RPV}) و CYDV-RPS (P0^{RPS})، پروتئین‌های هسته‌ای - سیتوپلاسمی هستند (شکل ۲). به عبارت دیگر محل

سانتیفریوژ شد و مایع روشن‌ترین جمع آوری شد (Pfeffer et al. 2002).

غلظت ژل پلی اکریل آمید به صورت ۴ درصد stacking و ۱۲/۵ درصد resolving بود. بافر الکتروفورز شامل ۲۵ میلی مولار تریس-چ سی ال، ۰/۲ مولار گلیسین و ۰/۱ درصد اس دی اس با پی اچ ۸/۶ بود. انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشا PVDF (AmershamTM PVDF) Hybond[®]-P) توسط دستگاه Electroblot از شرکت BioRad[®] انجام شد. قبل از انتقال، غشا ابتدا در اتانول ۱۰۰ درصد و سپس در آب دیونیزه شسته و در بافر انتقال (۲۵ میلی مولار تریس-چ سی ال، ۰/۲ میلی مولار گلیسین با پی اچ ۸/۶) به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. انتقال در دمای محیطی ۴ درجه سانتی گراد و شدت جریان ۵۰۰ میلی آمپر و ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد.

پس از انتقال، غشا در محلول شیر ۲/۵ درصد و پی بی اس یک برابر که دارای ۰/۵ درصد توین ۲۰ بوده مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس غشا در محلول نام برده به اضافه آنتی بادی پلی کلونال GFP به مدت ۳ تا ۴ ساعت در دمای اتاق به آرامی به هم زده شد. در مرحله بعد غشا سه بار در محلول پی بی اس-توین در دمای اتاق شسته شد و بعد در محلول شیر-پی بی اس-توین به همراه آنتی ریت متصل به آنزیم HRP (horseradish peroxidase) به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق به هم زده شد. پس از سه مرحله شستشو در محلول پی بی اس-توین، پروتئین‌ها با استفاده از کیت Lumi-^{Plus} Western Blotting Kit (Roche[®]) ردیابی شدند.

برای اطمینان از انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشا، غشا با کوماسی بلو (Brilliant Blue RTM Sigma-Aldrich[®])



شکل ۲- محل قرارگیری پروتئین‌های $GFP:P0^{RPS}$ (ردیف بالا) و $GFP:P0^{RPV}$ (ردیف پایین) در سلول گیاهان *N. benthamiana* تزریق شده با سازه‌های بیان‌کننده $GFP:P0$. به ترتیب از چپ به راست بزرگنمایی ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۳۰ برابر است. C: سیتوپلاسم، N: هسته و n: هستک. هر دو پروتئین در هسته و سیتوپلاسم وجود دارند اما از نظر میزان تجمع متفاوت هستند. $P0^{RPS}$ بیشتر در هسته و $P0^{RPV}$ بیشتر در سیتوپلاسم دیده شد. هیچ یک از دو پروتئین در هستک وجود ندارند.

Fig. 2. Subcellular localizations of $GFP:P0^{RPS}$ (top row) and $GFP:P0^{RPV}$ (bottom row) in *N. benthamiana* plants which were infiltrated by constructs expressing $GFP:P0$ s. From left to right magnitudes are 200, 400 and 630 times, respectively. C: cytoplasm; N: nucleus; n: nucleolus. Both $P0$ s were nuclear-cytoplasmic proteins but different tendencies were observed in their localizations. $P0$ of CYDV-RPS was more nuclear oriented than $P0$ of CYDV-RPV and none of them were observed in nucleolus.

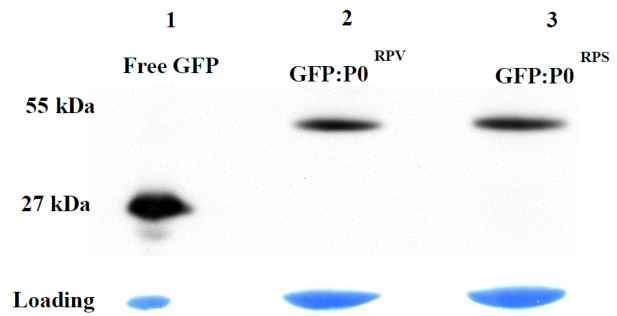
تجمع مشاهده شده در این دو پروتئین با یافته‌های پیشین در مورد پروتئین‌های $P0$ در دو ویروس TuYV و CABYV (DeCillia et al. 2010) مطابقت دارد. آنها نشان دادند این دو پروتئین، هسته‌ای - سیتوپلاسمی هستند اما تمایل‌های متفاوتی از نظر میزان تجمع در این دو محل دارند.

در آزمون لکه برداری وسترن پروتئین‌های $GFP:P0$ با اندازه تقریبی ۵۵ کیلو دالتون ردیابی شدند (شکل ۳). وزن

قرارگیری آنها هسته و سیتوپلاسم است. اما از نظر میزان تجمع، پروتئین $P0^{RPS}$ در مقایسه با پروتئین $P0^{RPV}$ تمایل بیشتری برای قرارگیری در هسته دارد. هیچ یک از دو پروتئین در هستک دیده نشدند (شکل ۲). در بررسی نمونه‌های تزریق شده با سازه GFP بدون حضور ژن‌های $P0$ (کنترل منفی)، سیگنال مشخصی دیده نشد (نتایج نشان داده نشده است). اهمیت این تفاوت در میزان تجمع پروتئین‌ها نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد. محل‌های

مورد تزریق، پروتئین GFP آزاد (free GFP) وجود ندارد (شکل ۳).

در پژوهش پیشین ما نشان دادیم که دو پروتئین $P0^{RPS}$ و $P0^{RPV}$ سرکوبگرهای خاموشی هستند و از طریق تخریب پروتئین ARGONAUTE-1 (AGO1)، سیستم دفاعی گیاه را مورد حمله قرار می‌دهند (Almasi et al. 2015). پژوهش‌ها نشان داده است که پروتئین‌های AGO در گیاهان شامل ده پروتئین مختلف هستند (AGO1-AGO10) که مهم‌ترین پروتئین در کمپلکس RISC (RNA-induced silencing complex) در مسیر خاموشی RNA هستند. محل تجمع و فعالیت پروتئین‌های AGO در هسته و سیتوپلاسم است (Ma & Zhang 2018) که با محل تجمع پروتئین‌های $P0$ در این پژوهش هم‌خوانی دارد. همچنین نشان داده شد که این دو پروتئین از نظر کارایی خاموشی متفاوت هستند به عبارت دیگر، پروتئین $P0^{RPS}$ سرکوبگر قوی‌تری نسبت به $P0^{RPV}$ ، در میزان تخریب رونوشت‌های GFP، تخریب پروتئین AGO1 و پایداری سرکوبگری در طول زمان است (Almasi et al. 2015). در پژوهش حاضر نیز ما جنبه دیگری از تفاوت این دو پروتئین از نظر تمایل و میزان تجمع در سیتوپلاسم و هسته را نشان دادیم. حضور بیشتر پروتئین $P0^{RPS}$ در هسته می‌تواند دلیلی بر قدرت تخریب بیشتر پروتئین AGO1 باشد. البته ممکن است این تمایل در میزان تجمع، ارتباطی به کارایی فعالیت سرکوبگری نیز نداشته باشد. بنابراین پژوهش‌های بیشتری نیاز است تا اهمیت این تفاوت را آشکار سازد.



شکل ۳- آزمون لکه برداری وسترن برای ردیابی بیان پروتئین‌های GFP:P0 با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال GFP در نمونه‌های مشاهده شده با میکروسکوپ کانفوکال تا از عدم حضور پروتئین GFP آزاد (free GFP) اطمینان حاصل شود. در چاهک شماره ۱ پروتئین ۲۷ کیلو دالتون GFP در گیاهانی که فقط با سازه GFP تزریق شده بودند ردیابی شد اما در چاهک‌های ۲ و ۳ پروتئین‌های ۵۵ کیلودالتونی GFP:P0 در گیاهانی که با سازه‌های بیان کننده GFP:P0 تزریق شده بودند ردیابی شد و پروتئین GFP آزاد در این گیاهان ردیابی نشد. در پایین شکل، باندهای آبی، رنگ آمیزی غشا با کوماسی بلو را به منظور حصول اطمینان از انتقال پروتئین‌ها به غشا نشان می‌دهد.

Fig. 3. Western blot analysis to detect GFP:P0 proteins using GFP polyclonal antibody. Lane 1: a 27 KDa GFP protein was detected in plants infiltrated by GFP construct; Lane 2 and 3: 55 KDa GFP:P0 proteins were detected in plants infiltrated by construct expressing GFP:P0 proteins and no free GFP were expressed in these plants. At the bottom of figure, loadings were shown by Coomassie Blue staining of membrane to ensure protein transfer.

پروتئین $P0$ حدود ۲۸ کیلو دالتون است که در اتصال با پروتئین GFP (۲۷ کیلو دالتون)، یک پروتئین مرکب ۵۵ کیلو دالتونی حاصل می‌شود. این آزمون نشان می‌دهد پروتئین GFP:P0 در بافت‌های مورد تزریق، بیان شده و تصویرهای تجمع پروتئین‌ها در میکروسکوپ کانفوکال، مربوط به این پروتئین می‌باشد و همچنین در بافت‌های

منابع

Almasi R., Miller W.A., and Ziegler-Graff V. 2015. Mild and severe yellow dwarf viruses differ in silencing suppression activity. *Virus Research* 208: 199-206.

- De Cillia J., Mutterer J., Bortolamoi D., and Ziegler-Graff V. 2010. The *Polerovirus*: vascular movement and suppression of RNA silencing. *Virologie* 14: 377-392.
- Downey N. 2003 Extraction of DNA from agarose gels, pp.137-139. In: N. Casali., A. Preston, (Eds). *E. coli Plasmid Vectors*. Methods in Molecular Biology vol 235. Humana Press.
- Dunoyer P., Pfeffer S., Fritsch C., Hemmer O., Voinnet O., and Richards K.E. 2002. Identification, subcellular localization and some properties of cystein-rich suppressor of gene silencing encoded by *peanut clump virus*. *The Plant Journal* 29: 555-567.
- Han Y.H., Xiang H.Y., Wang Q., Li Y.Y., Wu W.Q., Han C.G., Li D.W., and Yu J.L. 2010. Ring structure amino acids affect the suppressor activity of *melon aphid-borne yellows virus* P0 protein. *Virology* 406: 21-27.
- Hartley J.L., Temple G.F., and Brasch M.A. 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research* 10: 1788-95.
- Henry M., Beckett R., and Miller, W.A. 2004. Cereal yellow dwarf associated with CYDV-RPS, pp. 561-562. In: H. Lapiere, P. A. Signoret, (Eds). *Viruses and Virus Diseases of Poaceae (Graminae)*. INRA Press, Paris.
- Karimi M., Inze D., and Depicker A. 2002. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7: 193-195.
- Kozłowska-Makulska A., Guilley H., Szyndel M.S., Beuve M., Lemaire O., Herrbach E., and Bouzouba S. 2010. P0 proteins of European beet-infecting poleroviruses display variable RNA silencing suppression activity. *Journal of General Virology* 91: 1082-1091.
- Krueger E.N., Beckett R.J., Gray S.M., and Miller W.A., 2013. The complete nucleotide sequence of the genome of *Barley yellow dwarf virus-RMV* reveals it to be a new *Polerovirus* distantly related to other yellow dwarf viruses. *Frontiers in Microbiology* 4: 205-210.
- Landy A. 1989. Dynamic, structural, and regulatory aspects of Lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry* 58: 913-949
- Lapierre H., Henry M., Beckett R., and Miller W.A. 2004. Cereal yellow dwarf associated with CYDV-RPV, pp. 563-565. In: H. Lapiere, P. A. Signoret (Eds). *Viruses and Virus Diseases of Poaceae (Graminae)*. INRA Press, Paris.
- Ma Z., and Zhang X. 2018. Actions of plant Argonautes: predictable or unpredictable? *Current Opinion in Plant Biology* 45: 59-67.
- Mangwende T., Wang M.L., Borth W., Hu J., Moore P.H., Mirkov T.E., and Albert H.H. 2009. The P0 gene of *sugarcane yellow leaf virus* encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. *Virology* 384: 38-50.
- Miller W.A. and Rasochova L. 1997. Barley yellow dwarf viruses. *Annual Review of Phytopathology* 35: 167-190.
- Miller W.A., Beckett R. and Liu, S. 2002. *Barley yellow dwarf virus: Luteoviridae or Tombusviridae?* *Molecular Plant Pathology* 3:177-183.
- Pazhouhandeh M., Dieterle M., Marrocco K., Lechner E., Berry B., Brault V., Hemmer O., Kretsch T., Richards K.E., Genschik P. and Ziegler-Graff V. 2006. F-box-like domain in the *polerovirus* protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of National Academy of Science USA* 103: 1994-9.
- Pfeffer S., Dunoyer P., Hei F., Richards K.E., Jonard G., and Ziegler-Graff V. 2002. P0 of *Beet Western yellows virus* is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 76: 6815-6824.
- Sadowy E., Maasen A., Juszczuk M., David C., Zagorski-Ostojka W., Gronenborn B. and Hulanicka, M.D. 2001. The ORF0 product of *potato leafroll virus* is indispensable for virus accumulation. *Journal of General Virology* 82: 1529-32.
- van der Wilk F., Verbeek M., Dulleman A.M., and van den Heuvel J.F. 1997. The genome-linked protein of *potato leafroll virus* is located downstream of the putative protease domain of the ORF1 product. *Virology* 234: 300-303.
- Voinnet O., Pinto Y.M., and Baulcombe, D.C. 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of National Academy of Science USA* 96: 14147-14152.
- Ziegler-Graff V., Brault V., Mutterer J.D., Simonis M.T., Herrbach E., Guilley H., Richards K.E. and Jonard G. 1996. The coat protein of *beet western yellows luteovirus* is essential for systemic infection but the viral gene product P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Molecular Plant Microbe Interaction* 9: 501-10.