





دانشکده مهندسی کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه کارشناسی ارشد

بازدارندگی ژن $pthA$ به کمک سازه آپتامری

مریم رضانی اقدام

اساتید راهنما

دکتر ناصر فرخی

دکتر رضا صفرنژاد

اساتید مشاور

دکتر سید مهدی علوی

دکتر شاهرخ قرنچیک




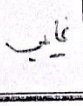
شهریور ۱۳۹۴

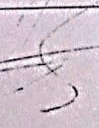


دانشگاه شاهرود

دانشکده: کشاورزی
گروه: زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای/خانم مریم رضانی اقدم به شماره دانشجویی: ۹۱۰۳۳۹۴
تحت عنوان: بازدارندگی ژن *pthA* به کمک سازه آپتامری

در تاریخ ۹۴/۶/۲۴ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی- بیوتکنولوژی در کشاورزی مورد ارزیابی و با درجه
مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	اساتید مشاور	امضاء	اساتید راهنما
	نام و نام خانوادگی: دکتر مهدی علوی		دکتر ناصر فرخی
	نام و نام خانوادگی: دکتر شاهرخ قرنجیک		دکتر رضا صفرنژاد

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
	دکتر مصطفی حیدری		دکتر زیبا قسیمی حق
			دکتر مهدیه پارسائیان
			نام و نام خانوادگی:
			نام و نام خانوادگی:

تقدیم بہ زیبا ترین واژه‌ها

خدایم

روح جاودان پدرم کہ، پھنجان صدایش از راہ دور آرام بخش قلب من است

مادرم، بزرگترین نعمت زندگی من

خواہرم رزیتا، ہمراہ و مشوق، ہمیشگی من

برادرم محمد، فرشتہ کوچک زندگی من

اکنون که به یاری خداوند بزرگ مقطع دیکری از تحصیل خود را به پایان می‌برم شایسته‌تر آن است که از زحمات استادان بزرگوارم جناب آقای دکتر ناصر فرخی و جناب آقای دکتر رضا صفر نژاد که در کمال سعادت و با حسن خلق و فروتنی از هیچ‌کلی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و اساتید مشاور جناب آقای دکتر شاهرخ قرمچیک و جناب آقای دکتر مهدی علوی کمال تشکر و قدردانی را ابراز دارم. صمیمانه‌ترین مراتب قدردانی خود را از اساتید داور خانم دکتر پارسایان و خانم دکتر قسیمی و نیز از نایبانه محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر حدیدی ابراز می‌دارم.

از همدلی و مساعدت دوستان عزیزم دکتر مهدی رنجبر، مهندس محسن یزدانی، بهاره زارع، محبوبه جعفرزاده، مریم خوشنامی، مریم رشیدی فر، سارا کاظم زاده، پردیس ریاحی، آدینا کیانی، صاحبه موسی پور، فهیمه نمودیان، صدیقه قریشی، مریم نوری، علی حدیدی، مرضیه حسنی، نیره اشعار قدیم، وجهه غدیریان، فرشید شیرینیان، محمدپایدارزاده، اعضای پژوهشگاه ملی مهندسی ژئوتکنیک و زیست فناوری و موسسه گیاه پزشکی کشور بسیار سپاسگزارم و برای تمامی این عزیزان سلامتی و توفیق در مسیر زندگی را از خداوند خواهانم.

تعهد نامه

اینجانب **مریم رضانی اقدم** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته . **بیوتکنولوژی کشاورزی** دانشکده **کشاورزی** دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه **بازدارندگی ژن *pthA* به کمک سازه آپتامری** تحت راهنمایی آقایان **دکتر ناصر فرخی و دکتر رضا صفرنژاد** متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه شاهرود » و یا «University of shahrood» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

شانکر مرکبات هر ساله عملکرد و کیفیت محصولات این خانواده گیاهی به‌ویژه لیموترش و پرتقال را کاهش می‌دهد. وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۸۸ به استناد ماده ۱۶ قانون حفظ نباتات، بیماری شانکر را جز بیماری‌های قرنطینه‌ای داخلی اعلام کرد که طبق آن جابه‌جایی اندام‌های آلوده در کل استان‌های کشور غیر از هرمزگان، سیستان و بلوچستان، منطقه جیرفت، کهنوج، قیر و کارزین در استان فارس ممنوع می‌باشد. شانکر را می‌توان از طریق روش‌های سنتی و نوین تحت کنترل درآورد. از روش‌های سنتی می‌توان به استفاده از سموم شیمیایی اشاره کرد که اثرات سو بر اکوسیستم‌ها، سلامت انسان و دام دارد. از روش‌های نوین می‌توان به استفاده از باکتری‌ها و قارچ-های آنتاگونیست و عصاره‌های ترش‌خی آن‌ها، عصاره‌های آنتی باکتریالی گیاهان، آنتی بادی‌ها، باکتریوفاژها و آپتامرها اشاره کرد. آپتامرها الیگونوکلوئوتیدهایی از جنس RNA و ssDNA یا مولکول‌های پپتیدی هستند که می‌توانند با مولکول هدفشان با اختصاصیت بالا جفت شوند. عامل بیماری شانکر مرکبات *Xanthomonas citri* subsp. *citri* است که به ۵ گروه تقسیم می‌شود. از میان آن‌ها شانکر نوع A و ایزوله A* در ایران به مرکبات آسیب می‌رساند. پروتئین pthA از گروه خانواده پروتئینی avrBs3/pthA می‌باشد که اثرات قابل توجهی بر توان عفونت‌زایی سویه‌های زانتوموناس دارد. جهش در مولکول افکتور، بیماری‌زایی باکتری‌های شانکر را متاثر می‌سازد. این پژوهش با هدف کلون و بیان آپتامر YPASYMQ در گیاه مدل توتون جهت مشاهده کاهش تاثیر پروتئین بیماری‌زای pthA انجام شد. نتایج نشان داد برگ گیاهان توتون رقم *Xanthi*، *Benthamiana* و گیاهان *Citrus latifolia*، *Citrus sinensis* و *Citrus aurantifolia* حاوی پروتئین pthA که ۳ روز بعد از بیان آپتامر YPASYMQ تزریق شده بود تفاوت معنی داری را با برگ شاهد (فقط حاوی پروتئین pthA) در پاسخ HR و علائم شانکر داشت. اما در مورد گیاه

Brassica napus تفاوت معنی دار مشاهده نشد. آپتامر توانست عملکرد پروتئین pthA را کاهش دهد و طبق نتایج آزمون وسترن بلات، آپتامر در ۱۱ روز بعد از بیان همچنان در گیاه وجود دارد اما مقدار آن کاهش می یابد.

کلمات کلیدی: آپتامر، شانکر، *pthA*، بیان موقت

کلونینگ آپتامر YPASYMQ

رضانی اقدم م. فرخی ن. علوی م و قرنجیک ش، (۱۳۹۳) " کلونینگ آپتامر YPASYMQ " کنگره بین‌المللی ژنتیک ایران.

بیان موقت آپتامر YPASYMQ جهت کاهش علائم بیماری‌زایی شانکر مرکبات

رضانی اقدم م. فرخی ن. علوی م و قرنجیک ش، (۱۳۹۴) " بیان موقت آپتامر YPASYMQ جهت کاهش علائم بیماری‌زایی شانکر مرکبات " اولین همایش بین‌المللی و نهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.

بررسی برقراری ارتباط بین آپتامر و پروتئین بیماری‌زای pthA

رضانی اقدم م. فرخی ن. علوی م و قرنجیک ش، (۱۳۹۴) " کلونینگ آپتامر YPASYMQ " اولین همایش بین‌المللی و نهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.

فصل اول - کلیات

- ۱-۱ مرکبات ۲
- ۲-۱ بیماری‌های مرکبات. ۲
- ۱-۲-۱ علائم بیماری شانکر ۸
- ۳-۱ برهم‌کنش میزبان و بیمارگر. ۸
- ۴-۱ سیستم‌های ترشحی باکتری ۱۰
- ۱-۴-۱ سیستم ترشحی نوع III (TTSS) .. ۱۰
- ۵-۱ خانواده ژنی *avrBs3/pthA* ۱۴
- ۶-۱ مدیریت بیماری شانکر ۱۵
- ۱-۶-۱ آپتامر ۱۸
- ۲-۶-۱ اساس بیوفیزیکی توانایی شناسایی اختصاصی مولکول‌های هدف توسط آپتامر ۲۱
- ۷-۱ آپتامرهای درمانی ۲۵
- ۸-۱ کاربرد آپتامرها به عنوان عناصر زیستی ۲۷
- ۱-۸-۱ آپتامر برای تشخیص پروتوزوا. ۳۰
- ۲-۸-۱ آپتامر برای تشخیص ویروس ۳۰
- ۳-۸-۱ آپتامر برای تشخیص باکتری ۳۱

فصل دوم - مواد و روش‌ها

- ۱-۲ مواد شیمیایی ۳۴
- ۲-۲ دستگاه‌های آزمایشگاهی ۳۴
- ۳-۲ سویه‌های باکتری و ناقل مورد استفاده ۳۵
- ۴-۲ آنتی‌بیوتیک‌ها ۳۵

۳۵.....	۵-۲ آنزیم‌های محدودگر و بافرها
۳۶.....	۶-۲ سنتز قطعه + c-myc YPASYMQ
۳۶.....	۷-۲ طراحی پرایمر جهت اضافه کردن کدن آغاز و پایان
۴۰.....	۸-۲ غربال کلن‌های واجد Aptamer + c-myc به روش کلنی PCR
۴۰.....	۹-۲ واکنش برش آنزیمی DNA
۴۱.....	۱-۹-۲ واکنش برش تک آنزیمی
۴۱.....	۲-۹-۲ هضم آنزیمی وکتور pBI121
۴۲.....	۱۰-۲ اتصال قطعه Aptamer + c-myc به ناقل بیانی pBI121
	۱۱-۲ غربال کلن‌های <i>E.coli</i> واجد پلاسمید pBI121 حاوی Aptamer + c-myc به روش کلنی
۴۴.....	PCR
	۱-۱۱-۲ غربال کلن‌های اگروباکتریوم واجد پلاسمید pBI121 حاوی Aptamer + c-myc به روش کلنی PCR ۴۴
۴۵.....	۱۲-۲ مایه زنی اگروباکتری به گیاه
۴۶.....	۱۳-۲ استخراج پروتئین‌های برگ
۴۶.....	۱۴-۲ سنجش غلظت پروتئین
۴۷.....	۱۵-۲ بیان پروتئین pthA
۴۸.....	۱۶-۲ تعیین غلظت MIC پروتئین pthA جهت بروز علائم HR
۴۸.....	۱۷-۲ SDS-PAGE
۵۰.....	۱۸-۲ وسترن بلاتینگ
۵۱.....	۱۹-۲ الایزا
۵۴.....	۲۰-۲ مطالعات بیوانفورماتیکی برای درک رفتار لیگاند-گیرنده

فصل سوم - نتایج

۱-۳	غربال کلن‌های <i>E.coli</i> واجد Aptamer + c-myc به روش کلنی PCR واستخراج پلاسمید از آن	۵۸
۲-۳	واکنش هضم دو آنزیمی و تک آنزیمی پلاسمید pGEM-B1	۵۸
۳-۳	واکنش هضم دو آنزیمی پلاسمید pBI121	۶۲
۴-۳	غربال کلن‌های <i>E.coli</i> واجد پلاسمید PBI121 حاوی Aptamer + c-myc به روش کلنی PCR واستخراج پلاسمید از آنها.	۶۲
۵-۳	غربال کلن‌های اگروباکتریوم واجد پلاسمید PBI121 حاوی Aptamer + c-myc به روش کلنی PCR	۶۲
۶-۳	تعیین غلظت MIC پروتئین pthA جهت بروز علائم HR.	۶۲
۷-۳	آزمون وسترن بلات	۶۵
۸-۳	کاهش علائم HR حاصل از پروتئین pthA، توسط Aptamer بیان شده در گیاه	۶۵
۹-۳	آزمون الایزا جهت مشاهده برقراری ارتباط بین Aptamer و پروتئین pthA	۶۵
۱۰-۳	مطالعات بیوانفورماتیکی برای درک رفتار لیگاند-گیرنده	۷۰

فصل چهارم- بحث و پیشنهادات

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مرکبات

گسترش مرکبات^۱ در جهان از ۴۰ درجه عرض شمالی تا ۴۰ درجه عرض جنوبی می‌باشد (جدول ۱-۱). سطح زیرکشت مرکبات در ۱۲۵ کشور ۸/۷ میلیون هکتار و میزان متوسط تولید محصول مرکبات جهان ۱۱۵ میلیون تن گزارش شده است (فائو، ۲۰۱۰). از این میان در حدود ۸۰٪ مربوط به ۱۴ کشور عمده تولیدکننده این محصول می‌باشد. از لحاظ تولید محصول به ترتیب کشورهای چین، نواحی مدیترانه‌ای، امریکا، هند، مکزیک، اسپانیا، مصر، ایتالیا، ترکیه و ایران مقام اول تا دهم را دارند (شکل ۱-۱). در نواحی سواحل دریای خزر، ناحیه مرکزی و جنوبی سطح زیرکشت باغات مرکبات در کشور حدود ۲۹۰ هزار هکتار می‌باشد. متوسط عملکرد کشت مرکبات حدود ۱۹ تن در هکتار است. در این بین ۴۱ درصد باغات مرکبات درجه یک و ۳۱ درصد درجه دو هستند. باغات درجه دو نیاز به اصلاح واحیا دارند، ضمن این‌که ۲۷ درصد از این باغات نیز باید جایگزین شوند (آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی). عوامل مختلفی بر میزان تولید، فرآوری و صادرات مرکبات تاثیرگذار است که در این میان بیماری‌های مختلف باکتریایی، شبه باکتریایی، ویروسی، قارچی و فیتوپلاسمایی نقش ویژه‌ای در کمیت و کیفیت مرکبات ایفا می‌کند که در ادامه به برخی از این عوامل بیماری‌زا اشاره و به‌طور اختصاصی شانکر باکتریایی مرکبات مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد.

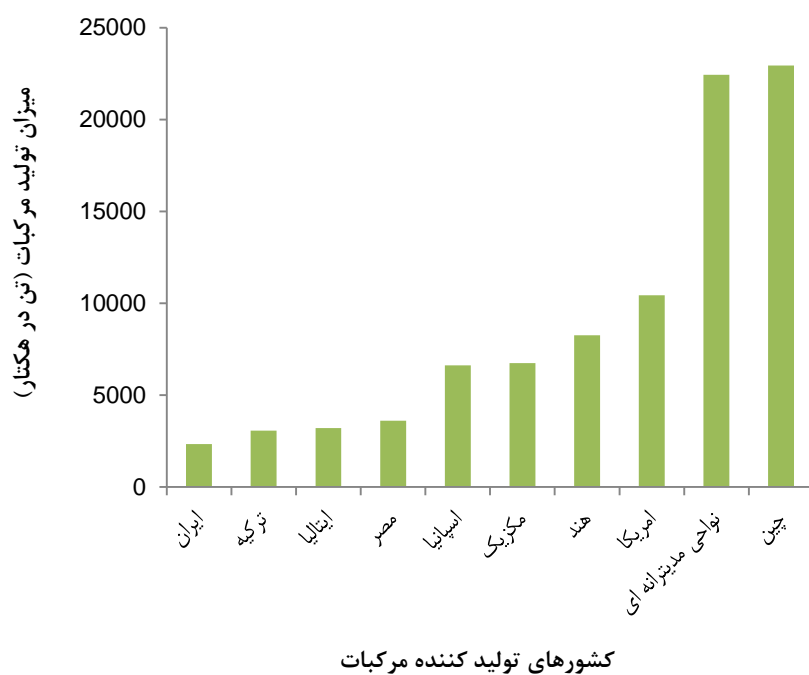
۲-۱ بیماری‌های مرکبات

از بیماری‌های مرکبات می‌توان به پوسیدگی طوقه^۲، زوال شاخه^۳، تریستیزا، بلاست، جاروک

1 - Citrus
2 - Crown
3 - Decay branch

جدول ۱-۱ طبقه بندی مرکبات (فیلوکس، ۲۰۰۴)

<i>Granials</i>	راسته
<i>Rutaceae</i>	خانواده
<i>Aurantioideae</i>	زیر خانواده
<i>Citreae</i>	قبیله
<i>Citrus</i>	جنس



شکل ۱-۱ تولید کنندگان عمده مرکبات جهان (فائو، ۲۰۱۱)

لیموترش^۴ و شانکر^۵ اشاره کرد (الهی نیا، ۱۳۸۳). نظر به اینکه در این پایان نامه بیماری شانکر و کنترل آن مد نظر است صرفاً به معرفی آن می‌پردازیم.

عامل بیماری شانکر مرکبات *Xanthomonas citri* subsp. *citri* است. همه زانتوموناس‌ها گرم منفی^۶، میله‌ای شکل، دارای تاژک قطبی^۷ هستند. زانتوموناس میکروبی هوازی است و از اکسیژن به عنوان گیرنده پایانی الکترون استفاده می‌کند. فعالیت اکسیژنازی تنها در سویه‌های *X.maltophilia* و *X.campestris* اتفاق می‌افتد. زانتوموناس‌ها قادر به رشد در pH = ۴/۵ و کمتر از آن نیستند. در pH = ۶/۵ همه سویه‌ها جز سویه *X. fragaria* رشد می‌کنند. باکتری فاقد گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتارات است و پلی‌هیدروکسی آلکانوات در مقدار کم ممکن است تجمع یابد. سلول‌های باکتری توسط چسب زانتان احاطه شده‌اند (سوینگ و همکاران، ۱۹۹۲۳). کلونی‌های این باکتری به رنگ زرد و لعابی و اندازه‌ی سلول‌ها در ابعاد ۰/۶-۰/۲ در ۰/۸-۰/۹ میکرومتر هستند و حداقل و حداکثر رشد آن در دمای بین ۵ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد است. برای رشد به فاکتورهای رشدی چون متیونین، گلوتامیک اسید و نیکوتینیک اسید و یا ترکیب هر سه نیازمند است (حسن‌زاده، ۱۳۸۴). زانتوموناس‌ها نوعی غشای درونی و بیرونی مختص باکتری‌های گرم منفی دارند (دوس سنتوس و دیانس، ۱۹۸۵). غشای خارجی^۸ از ۶ یا ۸ پروتئین بزرگ و بیشتر از ۵۰ پروتئین کوچک، ۱ یا ۲ مولکول لیپوپلی‌ساکاریدی ناهمگن و چند لیپید تشکیل شده است. پوشش خارجی محافظت در برابر عوامل محیطی، نفوذپذیری انتخابی، صادرات مواد و نقش گیرندگی را به عهده دارد (هانکوک، ۱۹۹۱). لیپوپلی‌ساکارید ۱۷ پاتووار *X. campestris* از اوریک اسید، فسفات، گلوکز، مانوز، رامنوز و ۲-کتوکسی-۳-دئوکسی اوکتونات بدون هیتوز تشکیل شده است (ولک، ۱۹۶۶ و

4 - Witches broom
5 - Canker
6 - Gram negative
7 - Polar flagella
8 - Outer membrane

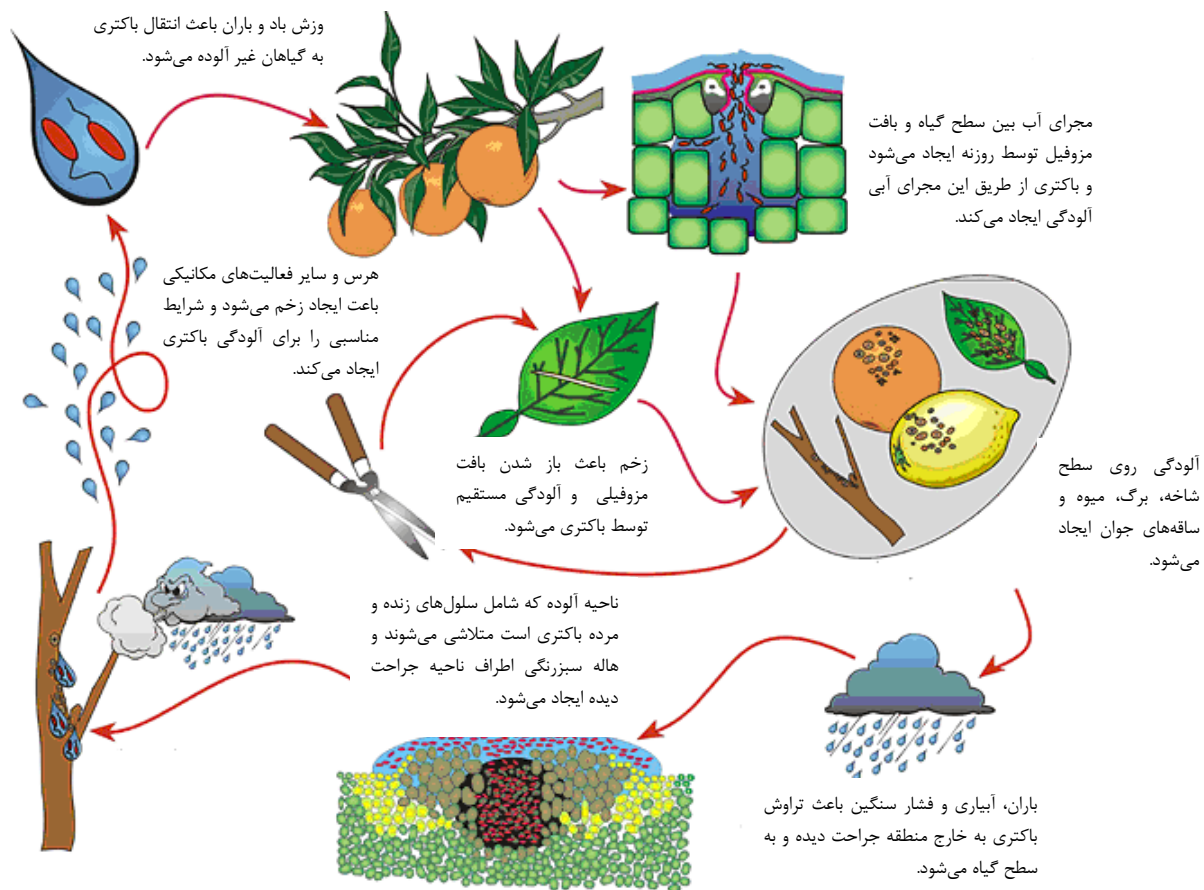
۱۹۶۸). بیشتر سویه‌های زانتوموناس به دلیل حضور رنگدانه زانتان به رنگ زرد دیده می‌شوند. زانتومونادین‌ها رنگدانه غیر قابل حل هستند که در زمان کشت روی محیط GYCA، LPGA و NA تولید می‌شوند و در طیف‌های رنگی زرد کم‌رنگ تا پررنگ دیده می‌شود. زانتومونادین‌ها باکتری‌ها را در برابر آسیب‌های زنده نوری^۹ حفظ می‌کند (جنکینس و استار، ۱۹۸۲).

بیماری شانکر به ۵ فرم دیده می‌شود. تفاوت بین این فرم‌ها بر اساس توزیع جغرافیایی و گستره‌ی میزبانی پاتوژن است (جدول ۱-۲؛ استال و سیمور، ۱۹۸۳). در گروه شانکر نوع A که معروف به شانکر آسیایی است ایزوله‌ای معروف به A* شناسایی شده است (گراهام، ۲۰۰۰). ایزوله A* در عربستان سعودی، ایران و هند مشاهده شده است. بیماری شانکر اولین بار در ایران بر روی لیمو ترش از منطقه کهنوج کرمان به وسیله علیزاده و رحیمیان (۱۹۹۰) و وقوع فرم آسیایی شانکر برای اولین بار در ایران توسط مستوفی‌زاده و رحیمیان گزارش شد (۱۳۷۵). شرایط محیطی مثل بارش باران، وزش باد و زخم‌های روی درختان در گسترش بیماری شانکر موثر است که در ادامه به شرح چگونگی انتقال و گسترش بیماری پرداخته می‌شود.

سلول‌های باکتری از طریق زخم‌های موجود در هنگام آب و هوای بارانی و مرطوب نفوذ می‌کنند که شرایط تلقیح را برای گسترش بیماری فراهم می‌کند. آلودگی این بیماری مانند خیلی دیگر از بیماری‌های باکتریایی اصولاً از طریق روزنه‌ها و خراش‌هایی که توسط بادهای شدید و حشرات به وجود می‌آید اتفاق می‌افتد (شکل ۱-۲). مقاومت برگ‌ها، ساقه‌ها و میوه‌ها با بلوغ بافت‌ها افزایش می‌یابد (گوتو، ۱۹۶۲). حضور رطوبت آزاد روی سطح میزبان به مدت ۲۰ دقیقه برای آلودگی موفق ضروری است (راماگریشان، ۱۹۵۴). تقریباً همه آلودگی‌ها روی برگ‌ها و ساقه‌ها در ۶ هفته‌ی اول بعد از آغاز رشد اتفاق می‌افتد. برگ‌ها بیشترین حساسیت را زمانی دارند که بین ۵۰ تا ۸۰ درصد

جدول ۱-۲ فرم‌های مختلف بیماری شانکر (گوتو و همکاران، ۱۹۹۲)

تیپ شانکر	عامل بیماری	گستره جغرافیایی	نوع محصول
A	<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i>	جنوب شرقی آسیا، چین، ژاپن و افریقا	مرکبات
B	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>	آرژانتین، پاراگوئه و اوروگوئه	لیموهای مکزیکی و پرتقال ترش
C	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>	برزیل و مکزیک	لیموهای مکزیکی
E	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i>	فلوریدا	مرکبات
D		مکزیک	مرکبات



شکل ۱-۲ نحوه پراکندگی باکتری عامل شانکر. باکتری‌های عامل شانکر در جراحات برگ‌ها، میوه و ساقه‌ها حضور دارند و تکثیر می‌شوند. حضور رطوبت آزاد در جراحات باعث تراوش باکتری به بیرون گیاه می‌شود و توسط باد و باران به سمت گیاهان سالم انتشار می‌یابد و باعث آلودگی گیاهان سالم می‌شود (بر گرفته از گاتولد و همکاران با کمی تغییرات، ۲۰۰۲).

توسعه پیدا کردند (فیلو و هوگس، ۲۰۰۰). بحرانی‌ترین زمان برای آلودگی میوه ۹۰ روز اول بعد از ریزش گلبرگ‌ها است. هر آلودگی که بعد از این مدت اتفاق بیفتد نتیجه‌اش تشکیل جوش‌های کوچک و جزئی است. میوه‌ها زمان زیادتری نسبت به برگ‌ها در حساسیت قرار دارند به همین دلیل آلودگی ممکن است بیشتر از یک بار رخ دهد که نتیجه آن این است که زخم‌های با سن‌های متفاوت روی میوه‌های یکسان رخ می‌دهد (گاتوولد و همکاران، ۲۰۰۲).

۱-۲-۱-۱ علائم بیماری شانکر

گیاهان بیمار به وسیله زخم‌های نکروتیک آشکاری که روی برگ‌ها، شاخه‌های کوچک و میوه‌ها گسترش می‌یابد مشخص می‌شود. اولین ظهور روی برگ‌ها نقاط دایره‌ای ۲ تا ۱۰ میلی‌متری روغنی است. روی برگ‌ها، ساقه‌ها، تیغ‌ها و میوه‌ها زخم‌های دایره‌ای ضخیم‌تر می‌شوند و شبیه تاول و آبله می‌شوند و به صورت جوش‌های اسفنجی سفید و زرد رنگ رشد می‌کنند. این جوش‌ها سپس تیره و ضخیم می‌شوند و به صورت قهوه‌ای روشن و چوب پنبه‌ای و زبر در می‌آیند. حاشیه آب‌سوخته اطراف بافت نکروتیک پیشروی می‌کند. ممکن است جوش‌ها روی ساقه‌ها یکی شوند تا بافت اپیدرمی (پوست) را در طول ساقه جدا کنند. نتیجه آلودگی شدید از بین رفتن برگ‌ها، مرگ سرشاخه، بدشکلی میوه و افتادن میوه‌های نارس است (روزتی، ۱۹۷۷؛ چند و پال، ۱۹۸۲؛ استال و سیمور، ۱۹۸۳؛ سیورولو، ۱۹۸۴) که بازار پسندی آن را کاهش می‌دهد.

۱-۳-۱ برهم‌کنش میزبان و بیمارگر

سلول‌های باکتری شانکر در فضای بین سلولی گیاهان استقرار می‌یابند که این فضا متشکل از پلی‌ساکارید تولیدی توسط این باکتری می‌باشد. مولکول‌های پلی‌ساکارید مانع از کاهش جمعیت

باکتری‌ها در هنگام بارش باران می‌شوند و رطوبت مورد نیاز باکتری را در فضای آزاد، حفظ می‌کنند. بعد از ورود باکتری به فضای بین سلولی بافت‌های گیاهی در اثر برهم‌کنش بین مولکول‌های پلی‌ساکاریدی حاصل از باکتری و مواد چسبنده میزبان (اگلوتینین)^{۱۰}، باکتری‌ها به دیواره سلولی میزبان متصل می‌شوند و با تخریب غشای سلول میزبان، موجب رهایی مواد غذایی مورد نیاز باکتری می‌شوند و از این طریق رشد باکتری تحریک می‌شود. در برگ‌های تلقیح شده با باکتری شانکر مرکبات، افزایش میزان تولید اتیلن و ایندول و آسکوربیک‌اسید اکسیداز در بافت‌های آلوده به این باکتری مشاهده می‌شود. میزان رنگیزه‌های کلروفیل a و b، کاروتن و زانتوفیل قبل از تشکیل هاله حاصل از آلودگی گیاه توسط باکتری کاهش می‌یابد. میزان قند و اسید آمینه نیز در ناحیه آلوده کاهش می‌یابد. اما میزان نشاسته در ناحیه تشکیل هاله، ثابت می‌ماند (کوستاکورتا و واندرلیدن، ۱۹۹۵).

تماس باکتری در شروع عفونت‌زایی به سطح سلول میزبان از طریق پروتئین‌های ویژه‌ای به نام ادهسین^{۱۱} صورت می‌گیرد. باکتری‌های جنس زانتوموناس قادر به سنتز و ترشح اگزوپلی ساکاریدی (EPS)^{۱۲} به نام زانتان هستند. EPS در تشکیل بیوفیلم^{۱۳} نقش دارد. بیوفیلم جمعیتی از سلول‌های باکتریایی محصور شده در شبکه‌ی^{۱۴} سنتز شده توسط باکتری و متصل به سطح است. این شبکه از EPS-DNA-Protein و ادهسین تشکیل شده است. EPS توسط خوشه ژنی Gum کد می‌شود. EPS در مرحله آغازین عفونت نقش چندانی ندارد اما در مراحل بعدی مثل افزایش تماس باکتری-باکتری، حفظ باکتری روی گیاه میزبان، فراهم کردن شرایط برای کلونیزه شدن^{۱۵}، کمک به حرکت باکتری و در نتیجه ایجاد شانکرهای بزرگتر نقش دارد (کوستاکورتا و همکاران، ۱۹۹۵؛ شوبرت و

10 - Agglutinin
11 - Adhesin
12 - Extracellular polymeric substance
13 - Biofilm
14 - Matrix
15 - Colonization

همکاران ۲۰۰۱؛ گوتوالد و گراهام، ۲۰۰۲). بعد از وقوع برهم کنش بین میزبان و بیمارگر، باکتری از طریق تولید پروتئین‌های خاص باعث بروز علائم بیماری می‌شود که در ادامه به آن‌ها می‌پردازیم.

۴-۱ سیستم‌های ترشحی باکتری

باکتری برای اینکه بتواند فاکتورهای بیماری‌زایی را به داخل سلول وارد کند از سیستم‌های ترشحی استفاده می‌کند (رابرت و رایان، ۲۰۱۱). در مقایسه با موجودات دیگر، باکتری‌های گرم منفی سیستم‌های مستقل بسیاری برای صدور پروتئین دارند که شامل ۵ سیستم در باکتری زانتوموناس می‌باشد که در یک تقسیم‌بندی می‌توان، آنها را در قالب ۲ گروه بررسی کرد، گروهی که طی یک مرحله وابسته به انرژی پروتئین را از عرض غشای داخلی و خارجی باکتری عبور می‌دهند و آنرا به فضای آپوپلاستی یا حتی درون سلول میزبان تزریق می‌کند که شامل سیستم‌های نوع I، III و IV هستند و همچنین گروهی دیگر که عمل انتقال را طی دو مرحله صورت می‌دهند که شامل سیستم‌های نوع II و V می‌باشند (آشا و همکاران، ۲۰۰۳). آزمایش‌های انجام شده نشان می‌دهد که سیستم‌های ترشحی باکتری زانتوموناس در بیماری‌زایی آن نقش مهمی را ایفا می‌کنند (کانگ و همکاران، ۲۰۰۲). در ادامه به معرفی سیستم ترشحی نوع III که پروتئین مورد نظر در این تحقیق (pthA) از آن ترشح می‌شود می‌پردازیم.

۴-۱-۱ سیستم ترشحی نوع III (TTSS)

سیستم ترشحی نوع III^{۱۶} ابزاری تحت اختیار باکتری جهت جابه‌جایی پروتئین‌های بیماری‌زا به درون سیتوسول سلول‌های میزبان می‌باشد (دانگر و همکاران، ۲۰۰۵). پروتئین‌های سیستم ترشحی تیپ III که توسط خانواده‌ی ژنی *hrp* در باکتری‌های گرم منفی از جمله باکتری زانتوموناس کد

16 - Type three secretion system

می‌شوند را به چهار گروه ساختاری، افکتور، چاپرون و تنظیمی می‌توان تقسیم کرد (زیمارو و همکاران، ۲۰۱۱).

اجزای ساختاری اصلی سیستم ترش‌حی نوع سه یا Injectisom از پایه که در سیتوزول باکتری قرار گرفته تا نوک میله^{۱۷} که از سطح سلولی بیرون زده‌است در واقع نانو ماشینی است که برای انتقال پروتئین‌های باکتریایی تکامل یافته است (شکل ۱-۳؛ بوتر و همکاران، ۲۰۰۲). این ساختار از ساختمان اصلی^{۱۸} (مجموعه بدون میله)، میله یا سوزن^{۱۹} (ساختار لوله مانند متصل به ساختمان)، ساختار استوانه‌ای متشکل از دو جفت حلقه که درون غشای داخلی و بیرونی باکتری قرار گرفته- است و به میله ختم می‌شود و زیرواحد ATPase که مرتبط با کناره‌های سیتوپلاسمی غشای داخلی باکتری است تشکیل شده است.

مکانیسم صادر کننده‌ی TTSS معمولاً متشکل از ۲۰ پروتئین مختلف و شامل پروتئین‌های محلول سیتوپلاسمی، پروتئین‌های غشای خارجی و پروتئین‌های غشای داخلی است (هووک، ۱۹۹۸ و بوختر و بوناس، ۲۰۰۲). TTSS باکتری‌ها را قادر می‌سازد که تنوعی از افکتورها^{۲۰} را مستقیماً به سیتوسول میزبان بفرستند و باعث دستکاری پروسه‌های سلولی میزبان شوند و به نفع باکتری آنها را از درون تخریب کنند (کلمنت، ۱۹۸۳).

تشریح ژنتیکی TTSS برای اولین بار در *P. syringae* با مطالعه موتانت *hrp* در پاتوزن لوبیا آغاز شد که این سویه موتانت توانایی ایجاد پاسخ فوق حساسیت^{۲۱} در گیاهان غیر میزبان مانند توتون و بیماری‌زایی را در لوبیا از دست داده بود (دانگر، ۲۰۰۵). فوق حساسیت نوعی پاسخ دفاعی یا به عبارتی فرآیند سریع مرگ سلولی در موضع عمل بیمارگر در گیاه می‌باشد که توسط استکمن

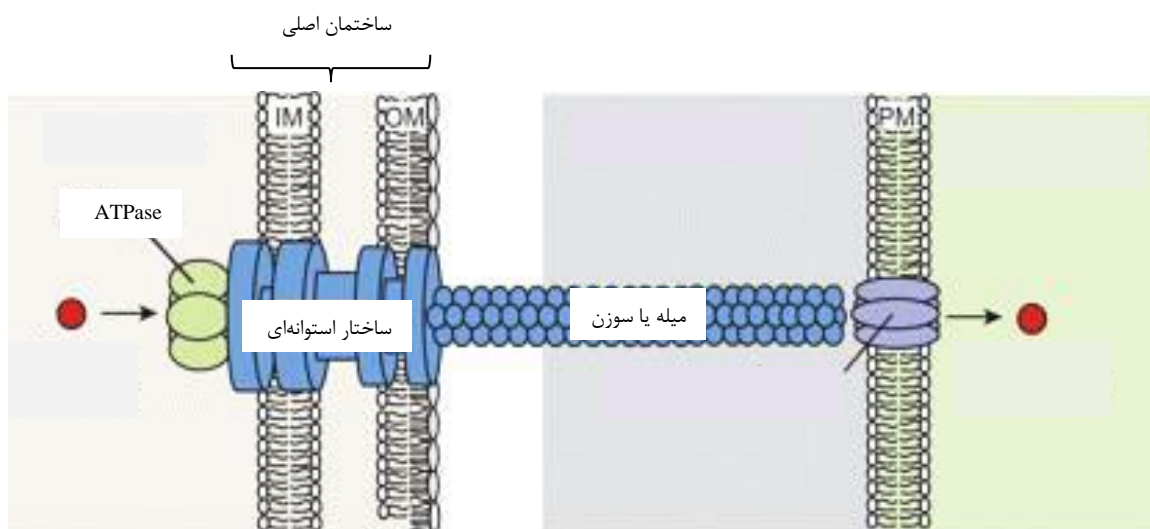
17 - Needle

18 - Basal body

19 - Pilus

20 - Effector

21 - Hypersensitive reaction resistant



شکل ۳-۱ اجزای injectisome. این مجموعه شامل ۴ قسمت است. ساختمان اصلی که مجموعه بدون میله را گویند. میله یا سوزن که ساختار لوله مانندی است که به ساختمان اصلی متصل است. ساختار استوانه‌ای متشکل از دو جفت حلقه که درون غشای داخلی و بیرونی باکتری قرار گرفته است و به میله ختم می‌شود. زیر واحد ATPase که مرتبط با کناره‌های سیتوپلاسمی غشای داخلی باکتری است (برگرفته از بوتر و همکاران با کمی تغییرات، ۲۰۰۲).

(۱۹۱۵) در بیماری‌های قارچی و ۵۰ سال بعد در بیماری‌های باکتریایی توسط گودمن (۱۹۶۵) کشف و مورد مطالعه قرار گرفت (محمدی، ۱۳۸۱). TTSS به‌وسیله ۲۳ کیلوباز از کلاستر ژن‌های *hrp* کروموزومی یعنی از *hrpA* تا *hrpF* کد می‌شود که داخل ۶ اپران سازمان یافته است. ۲۵ ژن در میان خوشه ژنی *hrp* کد می‌شود که این ژن‌ها شامل *hpa2* تا *hpaF* می‌باشد. در بین باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی و جانوری ۹ تا ۱۱ ژن *hrp* حفاظت شده است که به این مجموعه *hrc* گفته می‌شود (بوناس و همکاران، ۱۹۹۱؛ بوتر و همکاران، ۲۰۰۲). این گروه ژنی عموماً در ناحیه‌ی کروموزومی و با اندازه‌ای حد فاصل بین ۳۰-۲۰ کیلوباز قرار دارند (لی، ۲۰۱۲). غیر از *hrc*ها ژن‌های دیگری به نام *hpa* (*hrp*-assosiated) نیز وجود دارد که توالی مشابه با *hrp* و *hrc* هستند، که در تعامل باکتری با گیاه ضروری نیستند، ولی به این امر کمک می‌کنند (دورگر و همکاران، ۲۰۰۵).

نواحی مربوط به ژن‌های *hrc-hrp* در باکتری‌های پاتوژن ناحیه بیماری‌زایی نامیده می‌شوند (تاکور و سوهال، ۲۰۱۳). ژن‌های *hrp* حداقل دو عملکرد تنظیم بیان سایر ژن‌ها و سنتز پروتئین‌های هارپین^{۲۲}، را عهده‌دار هستند و به طور کلی این ژن‌ها با همکاری سایر ژن‌ها مانند ژن‌های *avr*^{۲۳} به‌صورت یک پازل در ایجاد واکنش فوق حساسیت و مقاومت به بیماری عمل می‌کنند (بوخنر و بوناس، ۲۰۰۲). *Avr* یکی از پروتئین‌های افکتور^{۲۴} انتقال یافته از طریق سیستم ترشچی تیپ ۳ است، که دارای دو عملکرد ایجاد بیماری‌زایی در گیاهان مستعد و ایجاد پاسخ فوق حساسیت در گیاهان مقاوم است. ایجاد پاسخ‌های فوق حساسیت (سبب مقاومت به بیماری) در گیاه فقط زمانی رخ می‌دهد که تماس مستقیم بین ژن *R* (ژن مقاومت در گیاه) و ژن *Avr* (*Avirulence*) در پاتوژن رخ دهد (بوتر و همکاران، ۲۰۰۲؛ سوگیو و همکاران، ۲۰۰۵). یکی از پروتئین‌های افکتوری که از

22 - Harpin protein

23 - Avirulence

24 - Effector protein

طریق سیستم TTSS به درون سلول میزبان ترشح می‌شود پروتئین *pthA* است که در ادامه به بررسی خانواده پروتئینی آن می‌پردازیم.

۱-۵ خانواده ژنی *avrBs3/pthA*

یکی از ژن‌هایی که به عنوان تاثیر گزار در شکل‌گیری عامل بیماری شانکر معرفی شده است ژن *pthA* می‌باشد. *pthA* جز خانواده ژنی *avrBs3/pthA* (خانواده عفونت‌زایی و عدم بیماری‌زایی) می‌باشد. این خانواده به‌طور گسترده در گونه‌های زانتوموناس وجود دارند. تعدادی از اعضای خانواده پروتئینی *avrBs3/pthA* اثرات شدیدی در عفونت‌زایی سویه‌های زانتوموناس دارند. در میان آنها پروتئین *pthA* برای عفونت‌زایی کامل بر روی میزبان‌های گیاهی گونه مرکبات، لازم است. موتاسیون در مولکول‌های افکتور (*pth A/B/C*) بیماری‌زایی باکتری‌های شانکر را از بین می‌برد (گابریل و همکاران، ۲۰۰۲). بعضی از زانتوموناس‌ها، دارای چندین همولوگ از اعضای خانواده *avrBs3/pthA* می‌باشند. سویه‌های *Xanthomonas citri* subsp. *citri* نیز دارای سه همولوگ *avrBs3/pthA* می‌باشند. در میان آنها فقط *apl1* عملکرد عفونت‌زایی مشخصی را در تشکیل شانکر دارد، در حالی که عملکرد سایر همولوگ‌ها بسیار ناچیز یا غیر قابل اندازه‌گیری می‌باشد (ووترین و همکاران، ۱۹۹۵؛ شیوتانی و همکاران، ۱۹۹۷). تمامی همولوگ‌های *pthA* طولی در حدود ۳ تا ۴ کیلو باز دارند. در گروه شانکر A، سویه ۳۰۶ به طور کامل توالی‌یابی شده‌است و چهار همولوگ *pthA* برای آن شناسایی شده‌است ولی هیچ اطلاعات عملکردی در ارتباط با این ژن‌ها تاکنون گزارش نشده‌است. طول چهار همولوگ این سویه به صورت *pthA1* ۳/۳۸ kb، *pthA2* ۳/۲۹ kb، *pthA3* ۳/۲۹ kb، *pthA4* ۳/۴۹ kb است (شیوتانی و همکاران، ۲۰۰۷).

زمانی که *pthA* به طور موقت در مرکبات توسط *Agrobacterium tumefaciens* یا تفنگ ژنی بیان

شود، زخم‌های شبه شانکر کوچکی ایجاد می‌شود (دان و همکاران، ۱۹۹۹). بیان موقت *pthA* در برگ‌های گونه‌های مرکبات باعث ایجاد علائمی شامل هیپرتروفی^{۲۵}، تقسیم، و سرانجام مرگ خواهد شد (یانگ و همکاران، ۱۹۹۴؛ پونسیانو و همکاران، ۲۰۰۳؛ شیوتانی و همکاران، ۲۰۰۷).

محصولات خانواده ژنی *avrBs3/pthA* اشکال ساختاری یکسانی دارند. همه آنها دارای تقریباً تکرارهای یکسانی از ۳۴ اسیدآمینو در قسمت مرکزی، توالی‌های سیگنال جایگیری در هسته^{۲۶} و یک دمین دارای فعالیت رونویسی اسیدی^{۲۷} در انتهای کربوکسی می‌باشند (شکل ۱-۴). ناحیه تکراری، غنی از اسیدآمینو لوسین و تکرارهای ۷ تایی زیپ-لوسین است. انتهای کربوکسی مسئول انتقال این پروتئین‌ها به داخل هسته سلول میزبان و فعالیت نسخه‌برداری یوکاریوتی می‌باشد. تعداد و آرایش واحدهای تکراری متفاوت است که این تفاوت باعث ایجاد اختصاصیت در هنگام ایجاد مقاومت و یا عفونت‌زایی در گونه‌های میزبان می‌شود (پونسیانو و همکاران، ۲۰۰۳؛ شیوتانی و همکاران، ۲۰۰۷). حذف تکرارهای پشت‌سرهم ۱ تا ۵ و همچنین ۱۶ تا ۱۷ در توانایی ایجاد بیماری شانکر تأثیری نمی‌گذارد. این نشان می‌دهد که تعداد تکرارها از اهمیت کمتری نسبت به جایگاه نسبی تکرارهای خاص در درون ژن برخوردار باشند (سعدی و همکاران، ۲۰۰۷).

طبق آنچه گفته شد این بیماری تحت شرایط مساعد محیطی قابل پخش است. به همین دلیل برای جلوگیری از گسترش بیماری می‌توان از روش‌های سنتی و برای مبارزه با این بیماری از روش‌های نوین استفاده کرد که در ادامه به معرفی این روش‌ها پرداخته می‌شود.

۱-۶ مدیریت بیماری شانکر

25 - Hypertrophy
26 - Nuclear localization signal
27 - Acidic activation domain



الف

```

1 mdpirsrtps parellpgpq pdgvqptadr gvspaggpl dglparrtms rtrlpsspap
61 spafsagsfs dllrqfdpsl fntslfdislp pfgahhtea tgewdevqsg lraadapppt
121 mrvavtaarp prakpaprrr aaqpsdaspa aqvdlrtlgy sqqqqekikp kvrstvaqhh
181 ealvghgfth ahivalsqhp aalgtvavky qdmiaalpea theaivgvvk qwsgaralea
241 lltvagelrg pplqldtgql lkiakrggvt aveavhawrn altgaplnlt peqvvaian
301 iggkqaletv qrllpvloqa hgltpqvva iasnggkqal etvqrllpvl cqahgltpq
361 vvaianigg kqaletvqrl lpvlcqahgl tpeqvvaian niggkqalet vqrllpvloq
421 ahgltpaqvv aianiggkq aletvqrllp vlcqahgltp eqvvaianng ggkqaletvq
481 rllpvloqah gltpdqvvai ashggkqal etvqrllpvl cqahgltpqq vvaianngg
541 kqaletvqrl lpvlcqahgl tpeqvvaian hdggkqalet vqrllpvloq ahgltpqv
601 aiannggkq aletvqrllp vlcqahgltp eqvvaianng ggkqaletvq rllpvloqah
661 gltpqvvaian asnggkqal etvqrllpvl cqahgltdq vvaianngg kqaletvqrl
721 lpvlcqahgl tpeqvvaian nsggkqalet vqrllpvloq ahgltpdqvv aiashggkq
781 aletvqrllp vlcqahgltp eqvvaianhd ggkqaletvq rllpvloqah gltpqvva
841 acnggkqal etvqrllpvl cqahgltpq vvaianngg rpalesivaq lsrpdalaa
901 ltnhdlvala clggrpalda vkkglphapa likrtxrip ertshrvadh aqvrvlgff
961 qchshpaqaf ddamtqfms rhgllqlfir vgvtelears glppasqw drilqasgm
1021 raksptstq tpdqaslhaf adslerdda pspthegdq rassikrsrs dravtgsaq
1081 qsfevrpeq rdahlplsw rvkxprtsig gglpdpgtpt aadlaastv mreqedpfa
1141 gaaddfpafn eeelawlmel lpq

```

ب

شکل ۱-۴ پروتئین pthA (الف) عکس شماتیکی دومین‌های عملکردی pthA. این پروتئین در قسمت مرکزی ۱۷/۵ ناحیه تکراری ۳۴ اسیدآمینوای دارد. در ناحیه کربوکسی دارای توالی‌های سیگنال جایگیری در هسته و یک دومین دارای فعالیت رونویسی می‌باشد. (ب) توالی آمینو اسیدی پروتئین pthA. نواحی پرنگ شده نواحی تکراری مرکزی است (برگرفته از لاهایه و همکاران با کمی تغییرات، ۲۰۰۱).

استراتژی اساسی متوقف کردن یا ریشه کنی پاتوژن است تا مقدار تلقیح برای آلودگی کاهش یابد و مقدار پخش پاتوژن را کم کند و بافت‌های حساس را از آلودگی حفظ کند (سیورولو، ۱۹۸۱). برای جلوگیری از گسترش و مبارزه با این بیماری می‌توان از روش‌های سنتی یا نوین استفاده کرد. روش‌های سنتی شامل اسپری دوره‌ای باکتری‌کش‌ها مثل پرنوکس (چادهوری، ۱۹۵۱)، سولفات استرپتومایسین به همراه یک درصد گلیسیرین (رنگاسومی و همکاران، ۱۹۵۹)، اولترا سولفور (نیروان، ۱۹۶۱)، مخلوط سدیم آرسنات و سولفات مس (پادل و پادهیا، ۱۹۶۴)، مخلوط بوردیاکس (پاتل و دسای، ۱۹۷۰)، کلرید نیکل و بلیتوکس (رام و همکاران، ۱۹۷۱)، اگری‌مایسین و استرپتوسیکلین (ماتار و همکاران، ۱۹۷۳)، اکسی کلرید مس (کیشون و چند، ۱۹۸۷)، هرس کردن همه شاخه‌های آلوده قبل از باد موسمی و سوزاندن آن‌ها (پاتل و دسای، ۱۹۷۰)، استفاده از بادشکن (گاتوولد و تایمر، ۱۹۹۵)، استفاده از پایه‌های گلخانه‌ای عاری از شانکر و استفاده از وارپته-های مقاوم به شانکر (داس، ۲۰۰۳) اقدامات حیاتی برای کاهش ریسک پخش بیماری در باغ میوه و گلخانه می‌باشد.

از روش‌های نوین برای مبارزه با بیماری شانکر می‌توان به کنترل بیولوژیکی اشاره کرد. بعضی از سویه‌های باکتری‌های *Bacillus subtilis*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae* و *Pseudomonas fluorescenc*^{۲۸} که از مرکبات ایزوله شده به عنوان آنتاگونیست این ویتروی بیماری شانکر گزارش شده است (گوتو و همکاران، ۱۹۷۹؛ اوتا، ۱۹۸۳؛ کالیتا و همکاران، ۱۹۹۶). استفاده از باکتری‌های اپی‌فیت آنتاگونیست سطح برگ مرکبات (منتخبی و همکاران، ۱۳۸۹)، اثر ضد باکتریایی اسانس و عصاره آبی گیاهی روی *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (محمودی و همکاران، ۱۳۸۹)، عصاره خام قارچ‌های ساپروفیت (کاظم‌زاده و همکاران، ۱۳۹۱)، اثر آنتی‌باکتریالی اسانس‌های گیاهی مثل آنگوزه و رزماری روی *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (خدایگان و

همکاران، ۱۳۹۱)، استفاده از باکتریوفاژ (شیرچیان و همکاران، ۱۳۹۲)، استفاده از نانوذرات آهن (ریاحی و همکاران، ۱۳۹۲؛ رشیدی فر و همکاران، ۱۳۹۳) و اثر آنتی‌باکتریالی عصاره گیاهان چوب مسواک، آویشن و شیرین بیان روی *Xanthomonas citri* pv. *citri* (نصیری نژاد و همکاران، ۱۳۹۳) در جهت جلوگیری از رشد باکتری شانکر مفید گزارش شدند. بیان ژن *Xa21* برنج در مرکبات می‌تواند در کنترل بیماری مفید باشد (مندس و همکاران، ۲۰۱۰). تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه *pthA*-NLS نو ترکیب و ژن‌های *ScFV* می‌تواند برای تولید گیاهان مقاوم به شانکر مورد استفاده قرار گیرد (لی و همکاران، ۲۰۱۰). تولید پرتقال شیرین مهندسی شده با قطعه سنس^{۲۹} و آنتی سنس^{۳۰} انتهای ژن *pthA* (توالی سیگنالی هسته‌ای) یکی از روش‌های موفق برای کاهش علائم حاصل از شانکر است (یانگ و همکاران، ۲۰۱۱). جی‌ژاو (۲۰۰۱) آپتامرهایی را شناسایی کرد که به پروتئین *pthA* متصل می‌شود و پیش بینی کرد که می‌توان از آنها در کاهش بیماری شانکر استفاده کرد.

۱-۶-۱ آپتامر

آپتامرها الیگو نوکلئوتیدهایی از جنس RNA و ssDNA یا مولکول‌های پپتیدی هستند که می‌توانند با مولکول هدفشان با خاصیت چسبندگی و اختصاصیت بالا از طریق ساختار ۳ بعدی خاص جفت شوند (سانگ و همکاران، ۲۰۱۲). آپتامرها به عنوان مواد زیستی در تحقیقات بسیاری برای توسعه داروهای جدید (کفه و همکاران، ۲۰۱۰)، سیستم‌های انتقال دارو و کشف میکروارگانیسم‌های پاتوژن (زیان و همکاران، ۲۰۱۲)، ابزار تشخیصی و درمانی و پروب‌های بیوسنسور (جرمر و همکاران، ۲۰۱۳) مورد مطالعه قرار گرفته است.

29 - Sense
30 - Antisense

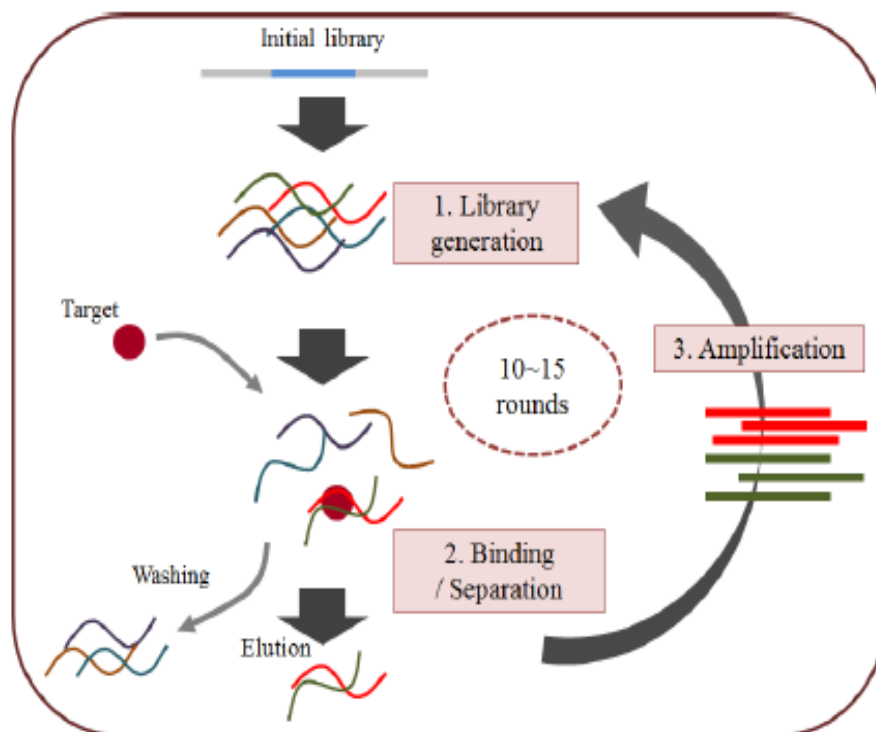
آپتامرها به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بادی‌ها شناخته شده‌اند. از مزیت‌های آپتامرها نسبت به آنتی‌بادی‌ها می‌توان به پایداری بالا (جایاسنا، ۱۹۹۹؛ فریرا و میسیلیدیس، ۲۰۰۷)، سهولت ساخت (بیرچ و راچر، ۲۰۰۶)، ارزانی، میزان حساسیت‌زایی پایین (ایرسون و کلاند، ۲۰۰۶) و پتانسیل اتصال به اهداف مختلف به طور اختصاصی (گروه مطالعه چشم، ۲۰۰۲؛ ۲۰۰۳) اشاره کرد. آپتامرها توسط روش SELEX^{۳۱} و بیوپنینگ^{۳۲} تولید می‌شوند (سید و همکاران، ۲۰۱۰).

در روش SELEX قدم اول انتخاب کتابخانه‌های الیگونوکلئوتیدی از جنس DNA یا RNA است. این کتابخانه شامل ۱۰^{۱۲} تا ۱۰^{۱۵} الیگونوکلئوتید به طول ۴۰ تا ۱۰۰ جفت باز است که در طرفین این الیگونوکلئوتیدها دو بخش ثابت جهت تکثیر از طریق واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز قرار دارد (سامپسون، ۲۰۰۳). در مرحله دوم مولکول‌های هدف که می‌توانند پروتئین، DNA، RNA، میکروارگانیزم‌ها، گیرنده‌های سطح سلولی و مولکول‌های کوچک باشند، در معرض این کتابخانه الیگونوکلئوتیدی قرار می‌گیرند و سپس با شست و شو، الیگونوکلئوتیدهای اتصال نیافته حذف می‌شوند. بعد از آن الیگونوکلئوتیدهای اتصال یافته خالص و دوباره مرحله دوم ۶ تا ۱۰ بار تکرار می‌شود تا نهایتاً الیگونوکلئوتیدهای اتصال یافته به صورت اختصاصی بدست آید. این مولکول‌ها از طریق PCR تکثیر و سپس کلون می‌شوند. بعد از آن تخلیص شده و مورد توالی‌یابی قرار می‌گیرند و برای اهداف مختلف استفاده می‌شوند (شکل ۱-۵؛ استولتنبرگ، ۲۰۰۷).

در روش بیوپنینگ آپتامرهای پپتیدی باند شده به مولکول هدف گزینش می‌شوند (ارلیچ و همکاران، ۲۰۰۰). مرحله اول داشتن کتابخانه تظاهر فازی است. برای تولید این کتابخانه قطعات ژن خارجی را وارد ژن *g3* باکتریوفاز M₁₃ می‌کنند و این قطعات کوتاه ژنی به صورت توالی‌های

31 - Systematic evolution of ligand by exponential enrichment

32 - Biopanning



شکل ۱-۵ تصویر شماتیکی مراحل SELEX. ابتدا کتابخانه‌های الیگونوکلئوتیدی از جنس DNA یا RNA انتخاب می‌شوند. در مرحله بعد مولکول‌های هدف، در معرض این کتابخانه قرار می‌گیرند و سپس با شست‌وشو، الیگونوکلئوتیدهای اتصال نیافته حذف می‌شوند. الیگونوکلئوتیدهای اتصال یافته را خالص می‌کنند و دوباره مرحله قبل ۶ تا ۱۰ بار تکرار می‌شود تا الیگونوکلئوتیدهای اتصال یافته به صورت اختصاصی بدست آیند. این مولکول‌ها از طریق PCR تکثیر و سپس کلن می‌شوند (سانگ و همکاران، ۲۰۱۲).

پپتیدی در پوشش پروتئینی فاژ ظاهر می‌شود (شکل ۱-۶؛ هواوگنیووام، ۲۰۰۲). در نتیجه کتابخانه‌ای از فاژ با توالی‌های مختلف پپتیدی به وجود می‌آید. کتابخانه فاژی را در معرض مولکول هدف قرار می‌دهند در نتیجه فقط پپتیدهای خاصی با مولکول هدف جفت می‌شوند. در مرحله بعد، شست و شو برای شستن فاژهایی که به هدف جفت نشده‌اند انجام می‌شود. بعد از آن فاژهایی باند شده خالص می‌شوند. توالی پپتید آن توالی یابی و از آن توالی برای اهداف مورد نظر استفاده می‌شود (شکل ۱-۷).

۱-۶-۲ اساس بیوفیزیکی توانایی شناسایی اختصاصی مولکول‌های هدف توسط آبتامر

اساس بیوفیزیکی این توانایی ناشی از چند عامل است. آبتامرها می‌توانند به صورت ساختارهای سه بعدی خاصی نظیر ساقه حلقه^{۳۳}، سنجاق سری^{۳۴}، شبه گره^{۳۵}، ساختار چهاربعدی پیچیده^{۳۶} و نظایر آن‌ها تا بخورند که امکان مکمل بودن شکلی^{۳۷} و اتصال به اهداف مولکولی را فراهم می‌آورد (شکل ۱-۸؛ استرلیز، ۲۰۰۸).

یکی از این ساختارها که بسیار مورد توجه و مطالعه قرار گرفته‌است ساختار چهارتایی پیچیده است. وجود بازهای گوانین با توالی خاصی در الیگو نوکلئوتیدها و ایجاد پیوند هیدروژنی بین آنها باعث ایجاد صفحاتی به نام quadruplet می‌شود که متعاقباً ایجاد پیوند هیدروژنی بین چند quadruplet و ایجاد صفحات موازی باعث شکل‌گیری quadruplex می‌گردد. همچنین وجود یک یون فلزی نظیر سدیم و پتاسیم می‌تواند باعث پایداری quadruplex گردد. بازهایی که در بین بازهای گوانین

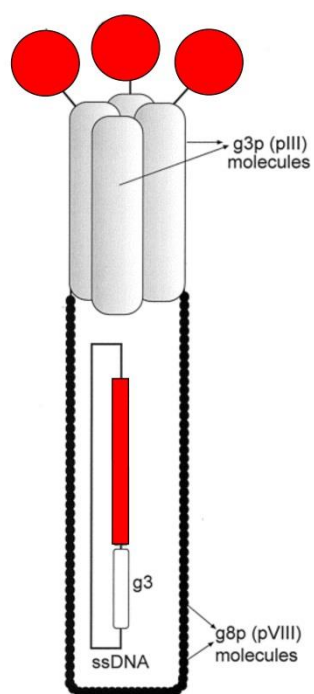
33 - Stem loop

34 - Hairpin

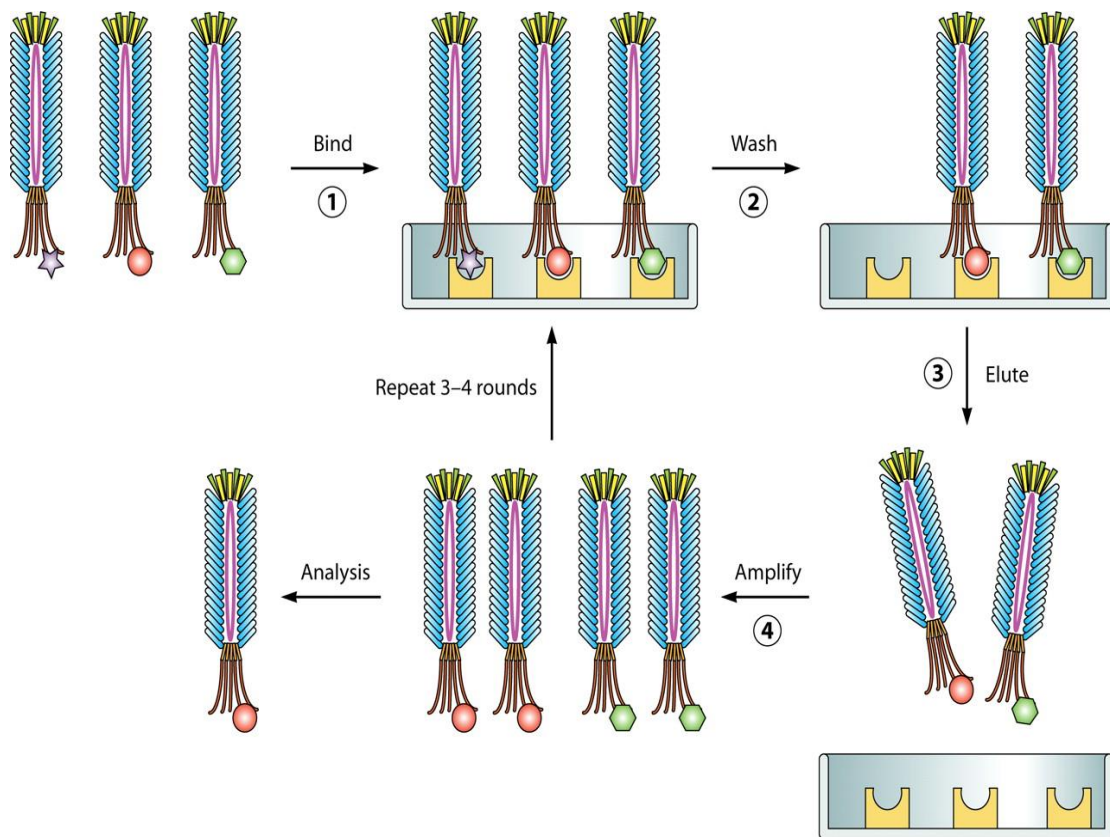
35 - Pseudoknot

36 - Quadruplex

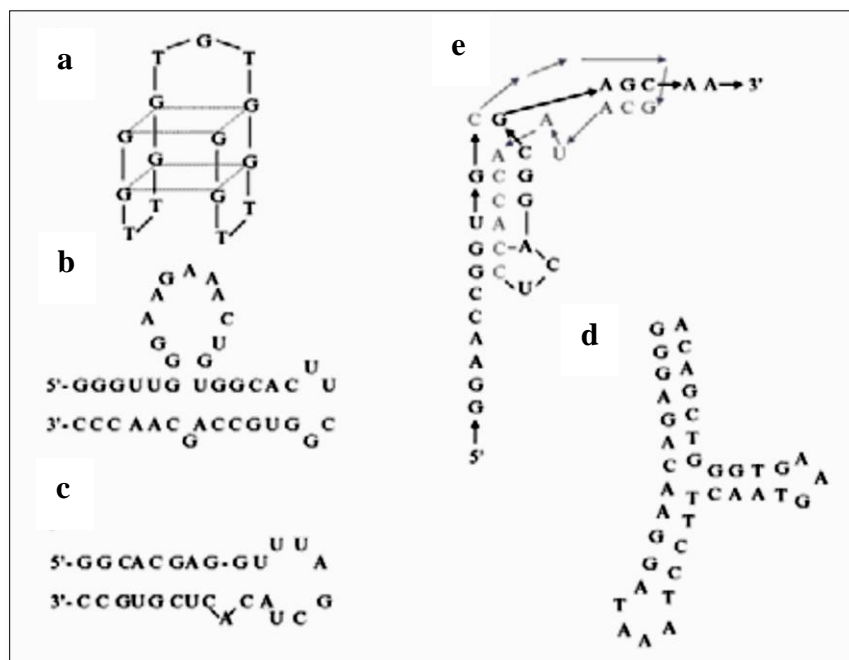
37 - Shape complementarity



شکل ۱-۶ باکتریوفاژ M_{13} جهت تولید کتابخانه فازئی. برای تولید کتابخانه فازئی قطعات ژن خارجی را وارد ژن $g3$ باکتریوفاژ M_{13} می‌کنند و این قطعات کوتاه ژنی به صورت توالی‌های پپتیدی در پوشش پروتئینی فاژ ظاهر می‌شود (هواوگنبووام، ۲۰۰۲).



شکل ۱-۷ تصویر شماتیکی روش بیوپنینگ. کتابخانه فازی را در معرض مولکول هدف قرار می‌دهند در نتیجه فقط پپتیدهای خاصی در ناحیه پوشش پروتئینی فاز با مولکول هدف جفت می‌شوند. در مرحله بعد، شست و شو برای شستن فازهایی که به هدف جفت نشده‌اند انجام می‌شود. بعد از آن فازهای باند شده خالص می‌شوند. توالی پپتید آن توالی یابی و از آن توالی برای اهداف مورد نظر استفاده می‌شود (هانگ و همکاران، ۲۰۱۲).



شکل ۱-۸ انواع تاخوردگی آپتامرها. a: ساختار چهارتابی پیچیده، b: ساقه حلقه، c: سنجاق سری، d: شبه گره، e: اتصال ۳ ریشه‌ای (استرلیز، ۲۰۰۸)

قرار می‌گیرند به صورت لوپ در اطراف صفحات موازی ساختار quadruplex قرار می‌گیرد (شکل ۹-۱؛ لیو و همکاران، ۲۰۱۲).

تصور اتصال نوکلئویک اسید با پروتئین در دهه ۱۹۸۰ طی تحقیق روی ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) و آدنووایروس‌ها شکل گرفت. این ویروس‌ها تعدادی RNA کوچک ساختمانی تولید می‌کنند که با پروتئین‌های سلول‌های ویروسی با چسبندگی و اختصاصیت بالا باند می‌شوند (دولینز و سلینگر، ۲۰۰۸). در HIV، این RNA های کوچک TAR^{۳۸} (عناصر پاسخ فعال سازی ترانس) نامیده می‌شود که به همراه پروتئین Tat ویروسی در تکثیر ویروس نقش دارند (سولنگر و همکاران، ۱۹۹۰). این موضوع محققان را بر آن داشت تا آپتامرهای اختصاصی برای مولکول‌های هدف درگیر در بیماری‌های مختلف مثل سرطان و آلودگی‌های ویروسی را گزینش کنند. در حوضه کشاورزی گزارشی در خصوص کاربرد آپتامرها وجود ندارد. در ادامه به بررسی آپتامرهایی که با اهداف درمانی تولید شده‌اند پرداخته می‌شود.

۷-۱ آپتامرهای درمانی

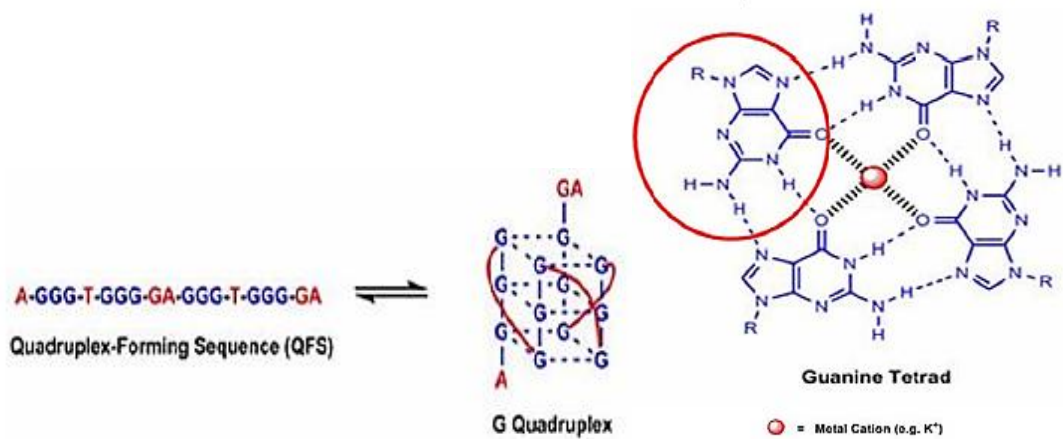
در سال ۲۰۰۴ با تایید سازمان غذا و دارو (FDA)^{۳۹} آپتامر اختصاصی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)^{۴۰} برای درمان بیماری تخریب وابسته به سن (AMD)^{۴۱} به عنوان داروی تجاری (ماکوژن) شناخته شد (بونکا و استوکلی، ۲۰۰۶). این آپتامر به خاطر داشتن عمر زیاد درون چشم بسیار مورد توجه قرار گرفته است. آپتامرها برای موارد سیستمیک همچون شناسایی پروتئین‌های موجود در جریان خون مانند ترومبین مناسب هستند. تعدادی از آپتامرهایی که اهداف دارویی

38 - Trans-activation response element

39 - Food and Drug Administration

40 - Vascular endothelial growth factor

41 - Age-related macular degeneration



شکل ۹-۱ ساختار quadruplex. ایجاد پیوند هیدروژنی بین ۴ باز گوانین باعث ایجاد صفحاتی به نام quadruplet می‌شود که متعاقباً ایجاد پیوند هیدروژنی بین چند quadruplet باعث شکل‌گیری ساختار quadruplex می‌گردد. وجود یک یون فلزی می‌تواند باعث پایداری ساختار quadruplex گردد (لیو و همکاران، ۲۰۱۲).

دارند در جدول (۳-۱) آمده است. تا سال ۲۰۱۰ تنها یک آپتامر به عنوان ترکیب دارویی رسماً وارد بازار شده است و هشت آپتامر دیگر نیز در مراحل کسب مجوزهای کلینیکی هستند (جدول ۴-۱).

۸-۱ کاربرد آپتامرها به عنوان عناصر زیستی

پرتوزوا، ویروس و باکتری میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند که باعث ایجاد بیماری‌های مختلف گیاهی، حیوانی و انسانی می‌شود. از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مهم می‌توان به پلاسمودیوم، ویروس ایمنی انسانی (HIV)، اشرشیاکلی (*E.coli*) و *Salmonella* اشاره کرد که هر ساله صدمات بزرگی به سلامتی انسان، حیوان و گیاه وارد می‌کند (نایاک، ۲۰۰۹). بنابراین باید دنبال روشی کم‌هزینه با حساسیت بالا و سرعت بالا بود تا حضور و گسترش میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را در محیط و غذا گزارش و کنترل کند. راه‌های سنتی برای کشف میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جداسازی، کشت و تست‌های بیوشیمیایی پیچیده است. این روش‌ها حساس و اختصاصی هستند ولی مشکل اصلی آن‌ها زمان طولانی است (معمولاً ۵ تا ۷ روز). در سال‌های اخیر بیوسنسورها به عنوان تکنیکی سریع، حساس، با اختصاصیت بالا و هزینه کم به طور گسترده برای ردیابی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به کار می‌رود (یانگ و بشیر، ۲۰۰۸). بین عناصر تشخیصی زیستی و موجودات بیماری‌زا پیوندهای اختصاصی تشکیل می‌شود و بیوسنسورها اطلاعات بیولوژیکی تولیدی حاصل از این پیوندها را به سیگنال‌های خروجی تبدیل می‌کنند این سیگنال‌ها می‌توانند الکتریکی یا نوری باشند و توسط این سیگنال‌ها هدف ردیابی شود (الرت و همکاران، ۲۰۱۱). یکی از این عناصر تشخیصی زیستی آنتی‌بادی‌ها هستند. مزیت استفاده از آنتی‌بادی‌ها در بیوسنسورها ایجاد اتصال‌های اختصاصی است. اما تجهیزات زیاد و پرهزینه برای ردیابی و هم‌چنین از بین رفتن آنتی‌بادی‌ها از مشکلات استفاده آن‌ها در بیوسنسورها است. بنابراین عناصر تشخیصی زیستی جدید مثل آپتامرها که مشکلات آنتی‌بادی‌ها را ندارند برای ردیابی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مفید است.

جدول ۱-۳ تعدادی از آپتامرها با اهداف دارویی (کفه و همکاران، ۲۰۱۰)

هدف	کاربرد درمانی
α -thrombin	جلوگیری از لخته‌گی خون
HIV-1 reverse transcriptase	جلوگیری از تکثیر ویروسی
HIV-1 Rev	جلوگیری از تکثیر ویروسی
Fibroblast growth Fctor 2, basic	جلوگیری از آنژیوژنز
Respiratory syncytical virus	جلوگیری از آلودگی
HIV-1 integrase	جلوگیری از تکثیر ویروسی
Vascular endothelial growth factor	جلوگیری از تخریب وابسته به سن
Platelet-derived growth factor	جلوگیری از گسترش تومور
Immunoglobulin E	جلوگیری از آلرژی
L-Selectin	تعدیل کردن التهاب
D-Adenosine	ناشناخته
Acetylcholine-specific auto-antibodies	درمان ضعف عضلانی گراویس
Interferon- γ	تعدیل التهاب و پاسخ ایمنی
Keratinocyte growth factor	درمان بیماری اپی‌تلیال توسعه یافته
Neutrophil elastase	تعدیل کردن التهاب
P-selectin	جلوگیری از چسبندگی ویروسی
Acetylcholine receptor	درمان انتقال‌های عصبی
Protein tyrosin phosphatase	درمان ARDS، شوک‌های عفونی
Activated protein C	جلوگیری آنکوژن، تنظیم ویروسی
CD4	جلوگیری از لخته‌گی خون
Nuclear factor-kB	تعدیل پاسخ ایمنی

جدول ۱-۴ آپتامرهایی که تاکنون به محصول تجاری تبدیل شده‌اند و یا در مراحل کسب مجوز کلینیکی هستند (کفه و همکاران، ۲۰۱۰)

نام (کمپانی)	هدف	فاز
Pegaptanib sodium/Macugen (Pfizer/Eyetech)	فاکتور رشد اندوتلیال عروقی	در آمریکا و انگلستان آزمایش شده است
AS1411/AGRO001 (Antisoma)	نوکلئولین	فاز ۲
REG1/RB006 plus RB007 (Bioscience)	فاکتور انعقاد IXa	فاز ۲
ARC1779 (Archemix)	فاکتور ویلبرند دومین A1	فاز ۲
NU172 (ARCA biopharma)	ترومبین	فاز ۲
ARC1905 (Ophthotech)	تکمیل ترکیب ۵	فاز ۱
E10030 (Ophthotech)	گرده خون مشتق شده از فاکتور رشد	فاز ۱
NOX-A12 (NOXXON Pharma)	CXCL12	فاز ۱
NOX-E36 (NOXXON Pharma)	CCL12	فاز ۱

۱-۸-۱ آپتامر برای تشخیص پروتوزوا

Trypanosoma cruzi یکی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مهم محسوب می‌شود که صدمات زیادی را به انسان و حیوان وارد می‌کند. Trypanosome اولین آپتامری است که برای تشخیص *Trypanosoma brucei* گزارش شده است. هومان و گورینگر (۱۹۹۹) از کل سلول *Trypanosoma brucei* به عنوان هدف استفاده کردند تا آپتامر آن را شناسایی کنند. این آپتامر پروتئین‌های تاژک-دار سطح سلول *Trypanosoma brucei* را تشخیص می‌دهد و با آن اتصال برقرار می‌کند. اولریچ و همکاران (۲۰۰۲) آپتامر دیگری را برای *Trypanosoma brucei* شناسایی کردند که به طور اختصاصی به سطح سلول این میکروارگانیسم جفت می‌شود.

۱-۸-۲ آپتامر برای تشخیص ویروس

آپتامرهای اختصاصی برای ویروس‌های هپاتیت C (بیروسیو و همکاران، ۲۰۰۲)، ویروس آنفلوانزا (گوپیناس، ۲۰۰۶)، ویروس HIV (یاماموتو، ۲۰۰۰؛ خطس و همکاران، ۲۰۰۳؛ دستفانو، ۲۰۰۶)، و سندرم تنفسی شدید (SARS)^{۴۲} (جنگ و همکاران، ۲۰۰۸) شناسایی شده‌اند. در ادامه به بررسی بافت‌های هدفی که برای گزینش این آپتامرها استفاده شده پرداخته می‌شود.

فوکودا و بیروسیو پروتئین‌های غیر ساختاری NS3 (فوکودا و همکاران، ۲۰۰۰) و NS5 (بیروسیو، ۲۰۰۱) ویروس هپاتیت C را به عنوان هدف برای گزینش آپتامر انتخاب کردند. گوپینا و همکاران آپتامری علیه ویروس آنفلوانزا A گزارش کردند. آن‌ها از کل سلول H3N2 به عنوان هدف برای اتصال آپتامر استفاده کردند. این آپتامر به طور اختصاصی با پروتئین HA روی سطح سلول H3N2 جفت می‌شود. اتصال بین آپتامرهایی که با پروتئین‌های HA برقرار می‌شود ۱۵ برابر قوی‌تر از

42 - Severe acute respiratory syndrome

اتصال بین آنتی‌بادی مونوکلونال و پروتئین HA است. برای ویروس HIV سه نوع آپتامر اختصاصی شناسایی شده است. این آپتامرها توانایی شناسایی پروتئین‌های ساختمانی RT (ترانس کریپتاز معکوس P50) (دسافانو، ۲۰۰۶)، پروتئین‌های ساختاری gp120 (خطی و همکاران، ۲۰۰۳) و پروتئین‌های تنظیمی Tat (یاماموتو و همکاران، ۲۰۰۰) را دارند.

۱-۸-۳ آپتامر برای تشخیص باکتری

برای باکتری‌هایی آپتامرهایی از جمله *E. coli* (پارک و همکاران، ۲۰۰۸)، اسپوره‌های *Bacillus anthracis* (برونو و همکاران، ۱۹۹۹)، *Salmonella*، *Staphylococcus aureus* (زلادا و همکاران، ۲۰۰۹)، *Mycobacterium tuberculosis* و *Campylobacter jejuni* (دیودی و همکاران، ۲۰۱۰) آپتامر شناسایی شده است.

E. coli باکتری اصلی در روده انسان و حیوان است که چند نوع خونی آن پاتوژن انسان و حیوان مخصوصاً کودکان و حیوانات جوان است. در سال‌های اخیر آپتامرهای بسیاری برای *E. coli* گزارش شده است. برونو (۲۰۰۸) از LPS اندوتوکسین *E. coli* 0111:B4 به عنوان هدف برای گزینش آپتامرهای خاص علیه *E. coli* 0111:B4 استفاده کرده است. برونو و همکاران (۲۰۱۰) پروتئین غشای خارجی *E. coli* 8739 را به عنوان هدف برای گزینش آپتامر انتخاب کردند و به ۲۵ توالی آپتامری رسیدند. به علاوه آپتامرهای دیگری برای سایر انواع *E. coli* شامل DH5 α و *E. coli* k88 (سو و همکاران، ۲۰۰۸) گزارش شده‌اند. ژن و همکاران (۲۰۰۲) از اسپوره‌های *Bacillus anthracis* به عنوان هدف برای گزینش آپتامر استفاده کردند و طی ۱۸ سیکل به ۷۹ توالی آپتامری که به این اسپور متصل می‌شود دست یافتند.

در این فصل به بررسی باکتری عامل شانکر مرکبات، پروتئین بیماری‌زای pthA، نحوه بیماری‌زایی، خصوصیات آپتامر و به جهت فقدان مطالب قدری به اختصار به مرور منابع در سایر حوزه‌های غیر گیاهی و کشاورزی پرداخته شد. در فصل بعدی به توضیح روش‌های آزمایشگاهی جهت کلون و بیان آپتامر در گیاه در جهت بازدارندگی پروتئین pthA پرداخته می‌شود.

فصل دوم

مواد و روش ها

۲-۱ مواد شیمیایی

اسید استیک، آگارز، آگار، گلیسرول، اتانول، متانول، گلوکوز، گلیسین، نیترات نقره، تریس باز، اکریل آمید، بیس آکریل آمید، بروموفنول بلو، فرمالدئید، رنگ کوماسی بلو، آمونیوم پر سولفات، مرکاپتواتانول، استون، ساکارز، دی اتانول آمین، نیترو فنول فسفات، NaCl، Skimmed milk، CaCl₂، NaOH، NaH₂PO₄، Na₂HPO₄، NP-40، Tween 20، MES، SDS، TCA، TEMED، MgCl₂، Na₂CO₃، Na₂S₂O₃، NaHCO₃، NaN₃، KCl از Merck (دارمشتاد، آلمان) تهیه گردید. استو سرینگان، قرص BCIP/NBT و اتیدیوم بروماید از Sigma (نیویورک، آمریکا) خریداری شد. BSA، PMSF، نشانگرهای وزن مولکولی ۱kb، نشانگر وزن مولکولی پروتئین، آنزیمهای برشی SacI و XbaI، آنزیم T₄ DNA Ligase، آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم آلکالاین فسفاتاز Goat pAb (Ap) Ms IgG، آنتی بیوتیکهای کانامایسین و آمپی سیلین و ریفامپسین از Fermentas (ماساچوست، آمریکا) اکتیاع گردید. PCR Buffer، dNTP، MgCl₂ و Taq DNA polymerase از سیناژن (تهران، ایران) تهیه شد. کیت خالص سازی محصول PCR، کیت خالص سازی از روی ژل از Bioneer (داجون، کره) تهیه گردید. کیت استخراج پلاسمید، Anti-c-myc از شرکت Roche (پنزرگ، آلمان) خریداری شد.

۲-۲ دستگاه‌های آزمایشگاهی

در این پژوهش از دستگاه شیکر انکوباتور (Innova 4000، آلمان)، دستگاه PCR (Peq lab، آلمان)، سانتریفیوژ یخچال دار (Ependorf، آلمان)، میکروپیوژ یخچال دار (Beckman، آمریکا)، انکوباتور (Memert، آلمان)، دستگاه ورتکس (Heidolph، آلمان)، دستگاه Power supply (پدیده نوژن

پارس، ایران)، تانک الکتروفورز (پدیده نوژن پارس، ایران)، دستگاه (Hot block (Biotechnology، آلمان)، اسپکتروفتومتر و دستگاه وسترن بلاتینگ (Biorad، آمریکا)، سیستم عکس برداری از ژل (Vilber، فرانسه)، فیلترهای غشایی با اندازه منافذ ۰/۲ میکرون (شرکت Millipore، آمریکا) استفاده شد.

۳-۲ سوبه‌های باکتری و ناقل مورد استفاده

از باکتری *E. coli* سویه DH5a برای تهیه‌ی سلول‌های مستعد^{۴۳} و کلون کردن پلاسمیدها و از آگروباکتریوم^{۴۴} سویه GV3101 به منظور انتقال سازه مورد نظر به گیاه استفاده شد. پلاسمید مورد استفاده، پلاسمید pBI121 بود. این سویه‌ها و ناقل‌ها از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شد.

۴-۲ آنتی‌بیوتیک‌ها

محلول‌های ذخیره آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، کانامایسین و ریفامپسین با غلظت‌های ۱۰۰ mg/ml در آب دوبار تقطیر تهیه و از فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. این آنتی‌بیوتیک‌ها به ترتیب با غلظت‌های نهایی ۳۰ و ۵۰ µg/ml در محیط کشت استفاده شدند.

۵-۲ آنزیم‌های محدودگر و بافرها

دو آنزیم *XbaI* و *SacI* در این پژوهش استفاده شدند. در بافر Tango، آنزیم *XbaI* صد درصد فعالیت و آنزیم *SacI* ۵۰ تا ۱۰۰ درصد فعالیت دارد به همین دلیل برای فعالیت کامل آنزیم *SacI* در واکنش‌ها، به مقدار ۲ برابر از آن استفاده شد.

⁴³ - Competent cell

⁴⁴ - *Agrobacterium tumefaciens*

۲-۶ سنتز قطعه c-myc + YPASYMQ

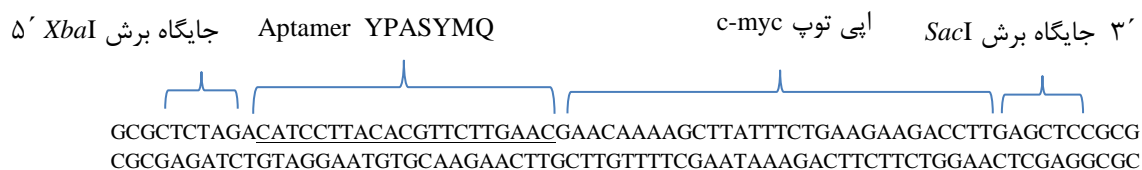
نقشه آپتامر پپتیدی HPYTFLN به همراه اپی توپ c-myc و دو جایگاه برشی *Xba I* در ابتدای ۵' و *SacI* در انتهای ۳' و چهار باز *GCGC* در انتها و ابتدای دو قطعه تهیه و جهت سنتز به شرکت Bioneer کره فرستاده شد (شکل ۳-۱). این شرکت ابتدا قطعه سفارش داده شده را سنتز و سپس توسط دو جایگاه برشی *EcoRI* در ناقل pGEM-B1 کلون کرد.

این وکتور شامل ۳۰۰۳ bp، حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین، ژن گزارشگر *LacZ*، پرایمرهای M13F، T7، SP6 و M13R است (شکل ۳-۲). توالی سفارش داده شده ابتدا توسط این شرکت سنتز شد و از طریق جایگاه برشی *EcoRI* درون این وکتور کلون و در نهایت به صورت اتوماتیک سکانس شد.

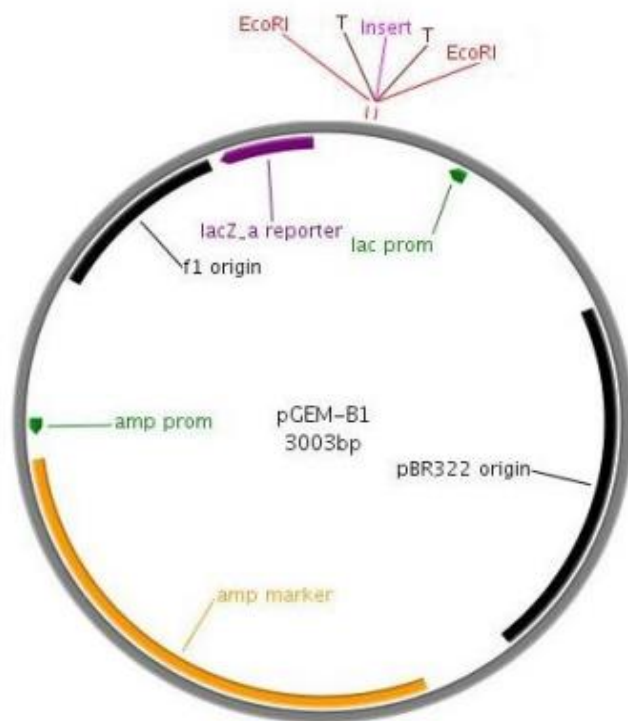
هر ساختاری که توسط یک آنتی بادی مورد شناسایی قرار گیرد، اپی توپ (عامل آنتی ژنی) نامیده می شود. یکی از این اپی توپ ها، اپی توپ c-myc است که تنها ده اسید آمینه طول دارد و توالی این پلی پپتید EQKLISEEDL می باشد. این اپی توپ از ناحیه ترمینال (residues 408 through 432) پروتئین انسانی c-myc تهیه شده است (اوان و همکاران، ۱۹۸۵). انواع اپی توپ های چسبنده و توالی آن ها در جدول ۳-۱ آورده شده است.

۲-۷ طراحی پرایمر جهت اضافه کردن کدن آغاز و پایان

جهت اضافه کردن کدون آغاز قبل از توالی آپتامر و کدن پایان بعد از اپی توپ c-myc طراحی پرایمر با توجه به توالی سنتز شده صورت گرفت (جدول ۳-۲) و توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شد. ناقل pGEM-B1 حاوی سازه سنتز شده مورد نظر که به صورت پودر سفید رنگ بود طبق



شکل ۱-۳ توالی سفارش داده شده به شرکت Bioneer جهت سنتز. این توالی از قسمت ۵' شامل جایگاه برش *Xba*I، آپتامر YPASYMQ، ایپی توپ c-myc و جایگاه برش *Sac*I



شکل ۲-۳ وکتور pGEM-B1 (bioneer.co.kr)

جدول ۱-۳ انواع اپی توپها و توالی آنها

نام	تعداد اسید آمینه	توالی
α -tubulin	۳	C-terminal equence of yeast protein. Sequence: EEF
B-tag	۶	VP7 protein of blue-tongue virus. Sequence: QYPALT
E-tag	۱۳	Sequence: GAPVPYDPLEPR
c-myc	۱۰	Human c-myc gene protein. Sequence: EQKLISEEDL
FLAG epitope	۸	Synthetic peptide. Sequence: DYKDDDDK
HA	۹	Peptide from human influenza hemagglutinin protein. Sequence: YPYDVPDYA
His6 or His10	۶ یا ۱۰	Polyhistidine bind metal ligand (affinity chromatography)
HSV	۱۱	Peptide from herpes simplex virs glycoprotein D. Sequence: QPELAPEDPED
Pk-tag	۹ یا ۱۴	P/V protein of paramyxovirus SV5. Sequence: GKPIPPLLGLDST
Protein C	۱۲	Sequence: EDQVDPRLIDGK
T7	۱۱	Major capsid protein of the T7 phage. Sequence: ASMTGGQQMG
VSV-G	۱۱	Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein. Sequence: YTDIEMNRLGK

جدول ۲-۳ پرایمرهای طراحی شده جهت اضافه کردن کدن آغاز و پایان

نام پرایمر	توالی (5'→3')	Tm
F Aptamer	GCGCTCTAGAATGCATCCTTACAC	۶۴/۴ °C
R Aptamer	GCGGAGCTCCTAAAGGTCTTCTTC	۶۵ °C

پروتکل با آب دوبار تقطیر استریل رقیق و به سلول‌های مستعد *E. coli*^{۴۵} سویه DH5 α ترانسفورم شد.

جهت تهیه سلول‌های مستعد یک تک کلون از کشت جامد باکتری *E. coli* سویه DH5 α را در ۱۰-۵ میلی‌لیتر LB مایع حل کرده و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب قرار داده شد. صبح روز بعد ۱ ml از آن برداشته و در ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر LB ریخته و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا میزان جذب در OD₆₀₀ به حدود ۰/۳ - ۰/۵ برسد. سپس این محیط در دو فالكون تقسیم شده و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه شد. دو فالكون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۳۳۰۰ ×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی خالی شد. رسوب تشکیل شده در ۲۵ میلی‌لیتر محلول CaCl₂ با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار به همراه ۱۵ درصد گلیسرول حل شد و ۴۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد. در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۳۳۰۰ ×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی خالی شد. رسوب تشکیل شده در ۱ میلی‌لیتر محلول CaCl₂ تهیه شده حل شد. سوسپانسیون حاصل به صورت ۱۰۰ میکرولیتر در ویال‌ها تقسیم شد و سریعاً به فریزر ۷۰- منتقل شد.

جهت تراریختی سلول‌های مستعد *E. coli* از روش شوک حرارتی به شرح زیر برای انتقال پلاسمید به درون باکتری استفاده شد. به ویال حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد، ۵ میکرولیتر پلاسمید مورد نظر یا ۲۰ میکرولیتر محصول لیگاسیون اضافه شد. DNA و سلول‌های باکتری به آرامی مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. به مخلوط فوق، شوک حرارتی به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد داده شد. بلافاصله نمونه روی یخ منتقل شد و ۳ دقیقه در این حالت باقی ماند. ۹۰۰ میکرولیتر محیط LB بدون آنتی‌بیوتیک به مخلوط فوق اضافه و به مدت

⁴⁵ - Competent cell

یک ساعت در انکوباتور شیکردار دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. بعد از این مدت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور $3300 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب باقی مانده در ۱۰۰ میکرولیتر محیط LB رویی حل شد. سپس کل آن بر روی پلیت LB واجد آنتی‌بیوتیک مناسب برده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد.

کلونی‌های باکتری واجد این پلاسمید، بعد از ۱۶ ساعت قرارگیری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین رشد کردند.

۲-۸ غربال کلون‌های واجد Aptamer + c-myc به روش کلنی PCR

کلونی‌های واجد Aptamer + c-myc به همراه دو جایگاه برشی، با روش کلنی PCR انتخاب شدند. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مواد استفاده شده در این واکنش شامل ۲ ماکرولیتتر PCR Buffer (۱۰×)، ۱ ماکرولیتتر از هر یک از آغازگرهای پیشرو و پس رو (۱۰ پیکومول)، ۱ ماکرولیتتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ ماکرولیتتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) و Taq DNA polymerase (۱ Unit) است. برنامه PCR با واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۱۰ دقیقه) شروع شد و شامل ۳۰ سیکل [۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه؛ ۶۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه؛ ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه] بود. در نتیجه این PCR، کدن آغاز و پایان هم به محصول PCR اضافه شد.

۲-۹ واکنش برش آنزیمی DNA

پس از استخراج پلاسمید (روش استخراج پلاسمید در پیوست آمده است) از کلون‌های تاییدی واجد Aptamer + c-myc، جهت اطمینان از سالم بودن جایگاه‌های برشی طی سنتز، واکنش برش آنزیمی با پلاسمید pGEM-B1 (۲۶۶ نانوگرم)، Tango Buffer (۱×) و آنزیم‌های *SacI* و *XbaI* در حجم ۲۰ میکرولیتر به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس کل محصول

هضم شده جهت مشاهده قطعه برش خورده مورد نظر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد برده شد. برای الکتروفورز DND از بافر TBE استفاده می‌شود. ترکیبات بافر TBE (5x) شامل ۳/۷۵ گرم EDTA، ۲۷/۵ گرم Boric acide و ۵۴ گرم Tris-base است. pH بافر بایستی قبل از اتوکلاو روی ۸ تنظیم گردد. پس از تهیه، بافر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو می‌شود. این بافر در دمای اتاق نگهداری و در زمان مصرف با آب مقطر به میزان 0.5 x رقیق شد. برای تهیه بافر لودینگ DNA (6x) ۲۵۰ میلی‌گرم بروموفنل بلو و یا ۲۵۰ میلی‌گرم زایلن سیانول در ۳۳ میلی‌لیتر تریس اسیدی ۱۵۰ میلی‌مولار (pH = ۷/۶) حل شده و ۶۰ میلی‌لیتر گلیسرول و ۷ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. این بافر در دمای اتاق نگهداری شد. برای رنگ‌آمیزی ژل الکتروفورز محلول ذخیره اتیدیوم برماید با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب مقطر حل شد. این محلول باید در تاریکی نگهداری شود

۲-۹-۱ واکنش برش تک آنزیمی

جهت اطمینان از سالم بودن جایگاه‌های برشی طی سنتز، واکنش برش تک آنزیمی با آنزیم‌های *SacI*، *XbaI* و *EcoRI* به صورت جداگانه در حجم ۲۰ میکرولیتر و با پلاسمید pGEM-B1 (۲۵۱ نانوگرم) و Tango Buffer (1x) انجام شد. این واکنش‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ ساعت صورت گرفت. سپس کل محصول هضم شده جهت تایید برش روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد.

۲-۹-۲ هضم آنزیمی وکتور pBI121

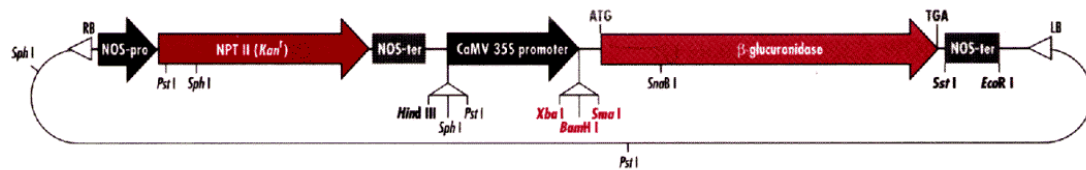
ناقل pBI121 به طور گسترده در انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم به کار می‌رود. توالی کامل آن شامل ۱۴۷۵۸ bp است. ناحیه T-DNA شامل ۶۱۹۳ bp، حاوی مرز راست، کاست بیانی مارکر

گزینشی نئومایسین فسفوترانسفراز II (*NPTII*)، ژن گزارشگر B-گلوکوزیداز (*GUS*) و مرز چپ است. قبل از ژن *GUS* جایگاه برشی *XbaI* و بعد از آن جایگاه برشی *SacI* قرار دارد (شکل ۳-۳) (چن و همکاران، ۲۰۰۳).

وکتور pBI121 توسط دو آنزیم برشی *XbaI* و *SacI* که جایگاه‌های برشی آنها در قطعه سنتز شده تعبیه شده بود، مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. واکنش برش آنزیمی در حجم ۲۰ میکرولیتر با پلاسمید pBI121 (۲۶۶ نانوگرم)، Tango Buffer (۱×) و آنزیم‌های *XbaI* و *SacI* به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس الکتروفورز ژل آگارز انجام شد تا وکتور برش خورده از روی ژل خالص شود (روش تخلیص باند از روی ژل در پیوست آمده است).

۲-۱۰ اتصال قطعه Aptamer + c-myc به ناقل بیانی pBI121

محصول PCR خالص (روش خالص سازی محصول PCR در پیوست آمده است) و توسط دو آنزیم *XbaI* و *SacI* برش داده شد و با وکتور pBI121 برش خورده با همین آنزیم‌ها، وارد واکنش اتصال شد. این واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر با ۱/۵ ماکرولیتتر پلاسمید pBI121 (۲۰۰ نانوگرم)، ۳/۵ ماکرولیتتر قطعه Insert (Aptamer + c-myc)، ۰/۵ ماکرولیتتر آنزیم T4 DNA Ligase و ۲ ماکرولیتتر Buffer T4 DNA Ligase (۱۰×) به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصول حاصل از این واکنش به باکتری‌های مستعد *E. coli* ترانسفورم شد و باکتری‌ها بعد از ۱۶ ساعت قرار گیری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین رشد کردند.



pBI121

Sma I
TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG
Xba I BamH I

from Clontech
catalogue 1996 / 97

شکل ۳-۳ نقشه ژنتیکی ناقل دوگانه گیاهی pBI121 (k.com eywordpicture). توالی کامل این وکتور ۱۴۷۵۸ bp است. ناحیه T-DNA شامل ۶۱۹۳ bp، شامل مرز راست، کاست بیانی مارکر گزینشی نئومایسین فسفوترانسفراز II (*NPTII*)، ژن گزارشگر B-گلوکوزیداز (*GUS*) و مرز چپ است. قبل از ژن *GUS* جایگاه برشی *XbaI* و بعد از آن جایگاه برشی *SacI* قرار دارد.

۲-۱۱ غربال کلون‌های *E. coli* واجد پلاسمید pBI121 حاوی Aptamer + c-myc به روش کلنی PCR

کلون‌های رشد یافته روی محیط LB دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین، از طریق کلنی PCR بررسی شدند. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مواد استفاده شده در این واکنش شامل ۲ ماکرولیتر PCR Buffer (۱۰×)، ۱ ماکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیشرو و پس رو (۱۰ پیکومول)، ۱ ماکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۶ ماکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) و ۰/۵ ماکرولیتر Taq DNA polymerase (۱ Unit) است. وجود Aptamer + c-myc در وکتور pBI121 با کمک پرایمرهای اختصاصی تایید شد. پس از تعیین کلنی‌های واجد سازه مورد نظر، پلاسمید آن‌ها توسط کیت Roche جهت تعیین توالی استخراج و به شرکت ژن فناوریان فرستاده شد.

۲-۱۱-۱ غربال کلون‌های آگروباکتریوم واجد پلاسمید pBI121 حاوی Aptamer + c-myc به روش کلنی PCR

از کلنی‌های تایید شده *E. coli* استخراج پلاسمید صورت گرفت و پلاسمید حاصل به سلول‌های آگروباکتریوم مستعد ترانسفورم شد.

جهت تهیه آگروباکتریوم‌های مستعد سویه GV3101 و تراریخت کردن آن‌ها یک تک کلون از کشت جامد آگروباکتریوم سویه GV3101 در ۱۰-۵ میلی‌لیتر LB به صورت مایع کشت داده و در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب قرار داده شد. صبح روز بعد ۱ میلی‌لیتر از آن را برداشته و در ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر LB سوسپانسیون شد و در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ تا ۳ ساعت قرار داده شد تا میزان جذب در OD_{600} به حدود ۰/۵-۱ رسید. سپس این محیط در فالكون ریخته شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور $3300 \times g$ برای مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی خالی شد. رسوب

تشکیل شده در ۱ میلی‌لیتر محلول CaCl_2 با غلظت ۲۰ میلی‌مولار روی یخ حل شد. ۱۰۰ میکرولیتر از آن را درون ویال از قبل سرد شده ریخته روی یخ قرار داده شد. ۵ میکرولیتر از پلاسمید مورد نظر به درون ویال منتقل شد. ۱ دقیقه در نیتروژن مایع قرار داده و به سرعت به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه منتقل شد. ۱ میلی‌لیتر LB تازه به آن اضافه کرده و به مدت ۲-۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از این مدت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور $\times g$ ۳۳۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب در ۱۰۰ میکرولیتر LB رویی حل شد و روی محیط جامد حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین و ریفامپسین کشت داده شد. کلنی‌های آگروباکتریوم بعد از دو روز قرار گرفتن در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ریفامپسین ظاهر شدند. جهت تایید کلونی‌هایی که واجد Aptamer + c-myc بودند کلونی PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از مواد PCR Buffer (۱×)، پرایمرهای Forward و Reverse (۰/۱ پیکومول)، dNTP (۰/۲ میلی‌مولار)، MgCl_2 (۱/۵ میلی‌مولار) و Taq DNA polymerase (۱ Unit) انجام شد.

۲-۱۲ مایه زنی آگروباکتری به گیاه

آگروباکتری حاوی Aptamer + c-myc در محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین و ریفامپسین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شیک ۱۸۰ دور در دقیقه رشد داده شد تا زمانی که میزان جذب در OD_{600}^{46} به یک رسید. باکتری توسط سانتریفیوژ با دور $\times g$ ۴۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رسوب داده شد. پس از حذف مایع رویی، رسوب باکتری در محیط MS با ساکارز ۲ درصد و اسیدیته ۵/۸ (حاوی بافر MES با غلظت ۱۰ میلی‌مولار و اسیدیته ۵/۶، MgCl_2 با غلظت ۱۰ میلی‌مولار و استوسرینگان با غلظت ۱۵۰ میکرومولار) حل و به مدت ۳ ساعت بدون

⁴⁶ - Optical density

شیک در دمای محیط نگهداری شد. پس از گذشت ۳ ساعت محلول فوق به پشت برگ گیاهان با استفاده از سرنگ ۵ میلی لیتری بدون سوزن تزریق شد.

۲-۱۳ استخراج پروتئین‌های برگ

بعد از تزریق آگروباکتری به گیاه و بیان قطعه مورد نظر به منظور آنالیز آن، استخراج پروتئین از برگ انجام شد. برگ‌ها ۳ روز بعد از مایه‌زنی برداشت شدند و بلافاصله در ازت مایع منجمد شدند و تا زمان استخراج پروتئین در فریزر ۷۰- قرار گرفت. هنگام استخراج پروتئین، برگ‌ها در هاون چینی به کمک ازت مایع به خوبی پودر شدند و از پودر بدست آمده برای استخراج پروتئین استفاده شد. برای این منظور ۱۰۰ میلی گرم پودر بدست آمده از برگ با ۱ میلی لیتر بافر استخراج (حاوی تریس ۵۰ میلی مولار با $\text{pH} = 8/5$ ، EDTA ۱ میلی مولار، PMSF^{47} ۱ میلی مولار، MgCl_2 ۲۰ میلی مولار، NP-40^{48} ۰/۲٪، ۲٪ مرکاپتو اتانول) مخلوط گردید و ۲ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس به مقدار ۱ میلی لیتر استن حاوی ده درصد TCA^{49} اضافه گردید و یک ساعت در دمای ۲۰- نگهداری شد. بعد از این مرحله به مدت ۱۰ دقیقه در دور $\times g$ ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. به رسوب باقی مانده ۱ میلی لیتر استن سرد اضافه شد و نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به مدت ۱۰ دقیقه با دور $\times g$ ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد و از پودر سفید آن جهت الکتروفورز استفاده شد.

۲-۱۴ سنجش غلظت پروتئین

به منظور تعیین غلظت کل پروتئین موجود در برگ از روش برادفورد (۱۹۷۶) استفاده شد. این روش به خاطر حساسیت و سادگی معمول ترین روش اندازه گیری کمی پروتئین است که بر مبنای

⁴⁷ - Phenyl methyl sulfonyl fluoride (protease inhibitor)

⁴⁸ - Nonyl phenoxy polyethoxy ethanol (detergent)

⁴⁹ - Trichloro acetic acid

توانایی باند شدن رنگ کوماسی بلو به پروتئین در pH اسیدی کار می‌کند. جهت تهیه معرف ابتدا ۰/۰۱ گرم G-250 در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد در تاریکی به خوبی حل گردید. ۱۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد قطره قطره به محلول فوق اضافه شد. سپس حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای غلظت سنجی ابتدا محلول BSA⁵⁰ (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در رقت‌های مختلف تهیه شد. به هر کدام از ویال‌ها ۱ میلی‌لیتر محلول برادفورد اضافه و بعد از چند دقیقه تغییر رنگ در ویال‌ها مشاهده شد. سپس مقدار جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. مقدار جذب پروتئین مورد نظر نیز در ۱ میلی‌لیتر محلول برادفورد خوانده شد و منحنی رسم گردید تا غلظت پروتئین مورد نظر محاسبه شود.

۲-۱۵ بیان پروتئین pthA

این ژن در ناقل بیانی pET28 و سویه بیانی (BL21/ DE3) توسط مختاری و همکاران (۱۳۹۲) کلون شد. در نتیجه به منظور القاء بیان پروتئین نوترکیب از روش القاء شیمیایی استفاده شد. برای بیان پروتئین به ترتیب زیر عمل شد. ابتدا یک کلنی مربوط به سویه بیانی تراریخت شده با پلاسمیدهای نوترکیب در ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB به همراه میزان مناسب آنتی‌بیوتیک کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. صبح روز بعد ۱ میلی‌لیتر از کشت شبانه به ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط LB به همراه آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح شد و تا رسیدن به جذب $OD_{600} = 0.6 - 0.8$ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شیک شد. برای القاء بیان پروتئین، IPTG به محتویات ارلن اضافه شد و ارلن در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد شیک شد. برای لیز سلول‌های باکتریایی و خروج محتوای پروتئینی آن‌ها از روش سونیکاسیون استفاده شد. برای این منظور محتویات ارلن بعد از ۶ ساعت القا، در $1670 \times g$ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

⁵⁰ - Buvin serum albumin

سانتریفیوژ شد و سپس رسوب در ۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده کاملاً حل شد. به مدت ۲۰ دقیقه محلول ایجاد شده در یخ انکوبه شد. سپس سونیکاسیون با توان ۷۰ Amplitude Microns و به تعداد ۵ دوره ۳۰ ثانیه ای انجام شد که بین هر دوره ۳۰ ثانیه استراحت وجود داشت. تمام مراحل فوق بر روی یخ انجام گرفت. بعد از سونیکیت کردن این مخلوط در $1670 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در نهایت محلول شفاف رویی برای مراحل بعدی تلقیح به گیاه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۱۶ تعیین غلظت MIC^{۵۱} پروتئین pthA جهت بروز علائم HR

MIC کمترین غلظت از آنتی بیوتیک است که جلوی رشد میکروارگانیسم را می‌گیرد اما در این پروژه با هدف تعیین حداقل غلظت عامل بیماری‌زایی (پروتئین pthA) جهت ایجاد علائم HR روی توتون است. پس از سنجش میزان پروتئین کل بیان شده توسط باکتری BL21/ DE3 با روش برادفورد، از محلول حاوی پروتئین‌های بیان شده BL21 (که حاوی پروتئین pthA نیز هست) نسبت‌های مختلف ۱:۱، ۱:۲، ۱:۳، ۱:۴، ۱:۵ و ۱:۶ با آب دوبار تقطیر استریل تهیه و با ۲ تکرار به پشت برگ گیاهان توتون تزریق شد.

۲-۱۷ SDS-PAGE^{۵۲}

روش SDS-PAGE جهت مشاهده پروتئین‌های برگ انجام شد. این ژل برای آزمایش وسترن بلات نیاز است. برای تهیه این ژل صفحات شیشه‌ای شسته و با استون سطح آن‌ها کاملاً پاک شد. پس از نصب فاصله اندازه‌ها در سه طرف، شیشه‌ها بر روی هم سوار و با گیره محکم شدند و به صورت عمودی روی سطح صاف قرار گرفتند. به منظور جلوگیری از نشت، حد فاصل شیشه با استفاده از

⁵¹ - Minimum Inhibitory Concentration

⁵² - Sodium dodecyl sulphate polyacrylamid gel electrophoresis

آگاروز مذاب مسدود شد. محلول ژل پایین که ۱۲ درصد بود (بافر ژل پایین دارای غلظت ۱/۵ مولار تریس با $\text{pH} = ۸/۸$ است. برای تهیه این بافر ۱۸/۲ گرم تریس باز و ۰/۴ گرم SDS را در حدود ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس pH آن را تا ۸/۸ پایین آورده و حجم نهایی را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) (تهیه محلول ژل پایین در پیوست آمده است) در قاب شیشه‌ای تا جایی ریخته شد که حدود دو سانتی‌متر فضا برای ژل بالا باقی ماند. نیم میلی‌لیتر آب مقطر از کناره شیشه روی سطح ژل ریخته شد. بعد از انعقاد ژل پایین، آب روی آن کاملاً تخلیه شد. محلول ژل بالا که ۵٪ بود (بافر ژل بالا دارای غلظت ۰/۵ مولار تریس با $\text{pH} = ۶/۸$ است. برای تهیه آن ۶/۱ گرم تریس باز و ۰/۴ گرم SDS در حدود ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس pH آن به ۶/۸ تنظیم و حجم نهایی را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) (تهیه محلول ژل بالا در پیوست آمده است) تا ارتفاع یک سانتی‌متری بر روی ژل پایین ریخته و شانه به سرعت درون آن قرار گرفت. پس از انعقاد ژل شانه به آرامی خارج شد. شیشه‌ها به وسیله گیره‌ها بر روی تانک الکتروفورز سوار شد و بافر مخزن (این بافر دارای غلظت ۲۵ مولار تریس باز و ۱۹۲ میلی‌مولار گلیسین است. برای تهیه آن ۳ گرم تریس باز، ۱۴/۴ گرم گلیسین و ۱ گرم SDS در یک لیتر آب مقطر حل شد. pH این بافر حدود ۸/۳ است و نیازی به تنظیم ندارد) ریخته شد. نمونه‌های پروتئینی با مقدار مناسب بافر نمونه (۵ میلی‌لیتر گلیسرول، ۱ گرم SDS، ۰/۵ میلی‌لیتر برومو فنول بلو و ۱ میلی‌لیتر ۲-مرکاپتواتانول را با ۱۰ میلی‌لیتر بافر ژل بالا حل کرده و به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) ترکیب و جوشانده و در شانه‌ها ریخته شد. الکتروفورز حدود ۲ ساعت با ولتاژ ثابت ۹۰ انجام شد. طرز تهیه محلول استوک اکریل آمید، پرسولفات آمونیوم ۱۰ درصد و TEMED ۱۰ درصد در پیوست آمده است.

۱۸-۲ وسترن بلاتینگ^{۵۳}

نمونه‌های پروتئینی بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل تا حد ممکن بریده و کوچک شد. برای تشکیل ساندویچ وسترن بلات، ابتدا چهار قطعه کاغذ صافی به اندازه ژل بریده شد و در داخل بافر انتقال‌دهنده^{۵۴} (برای تهیه محلول انتقال $1 \times$ ، $2/9$ گرم گلیسین، $5/8$ گرم تریس و $0/37$ گرم SDS در 200 میلی‌لیتر اتانول حل شد. حجم نهایی محلول با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد) قرار داده شد. دو اسفنج مربوط به عمل وسترن بلات نیز در این بافر، کاملاً خیس شد. سپس دو قطعه کاغذ صافی مرطوب را روی اسفنج قرار داده و ژل به آرامی روی آن منتقل شد، به طوری که هیچ‌گونه حبابی زیر آن باقی نماند. کاغذ PVDF^{۵۵} به مدت 1 دقیقه در داخل متانول 100% برای فعال شدن قرار گرفت و روی ژل گذاشته شد. سپس دو کاغذ صافی دیگر روی کاغذ PVDF قرار داده شد. ساندویچ بسته و در داخل تانک وسترن بلات که از بافر انتقال پر شده بود، قرار گرفت. تانک وسترن بلات به منبع جریان برق وصل شد و انتقال پروتئین‌ها از ژل به کاغذ PVDF با ولتاژ ثابت 20 ولت به مدت 16 ساعت انجام گرفت. بعد از اتمام پروسه انتقال پروتئین، بقیه مراحل به ترتیب زیر صورت گرفت:

کاغذ PVDF در داخل بافر مسدودکننده^{۵۶} (برای تهیه بافر مسدود کننده $2/5$ تا 5 درصد Skimmed milk در بافر TBS حل شد. این بافر باید به صورت تازه تهیه و استفاده گردد. برای تهیه بافر TBS $1 \times$ ، $6/05$ گرم تریس (50 میلی‌مولار) و $8/76$ گرم NaCl (150 میلی‌مولار) در 800 میلی‌لیتر آب حل شد. pH آن توسط HCl 1 مولار (حدود $9/5$ میلی‌لیتر) تنظیم و حجم نهایی با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. این محلول در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 ماه

⁵³ - Western blotting

⁵⁴ - Transfer buffer

⁵⁵ - Polyvinylidene fluoride

⁵⁶ - Blocking buffer

پایدار است). شناور و به مدت ۱ تا ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار داده شد. پس از این زمان، کاغذ سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر TBST^{۵۷} (برای تهیه TBST ۱×، یک میلی‌لیتر توپین ۲۰ در یک لیتر بافر TBS حل شد این بافر باید به صورت تازه تهیه گردد) شستشو داده شد. سپس آنتی‌بادی اولیه یعنی Anti c-myc که با رقت ۱:۱۰۰۰ در بافر TBST به همراه Skim milk تهیه شده بود، بر روی کاغذ PVDF ریخته و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده شد. بعد از این زمان کاغذ PVDF دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با TBST شستشو داده شد. بعد از شستشو، آنتی‌بادی ثانویه (این آنزیم با برداشتن عامل فسفات از سوبسترا باعث تغییر رنگ و آزاد کردن طول موج می‌شود) که با رقت ۱:۱۰۰۰ در بافر TBS تهیه شده بود، بر روی کاغذ PVDF ریخته و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده شد. بعد از این زمان کاغذ PVDF سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه، با TBST شستشو داده شد. قرص سوبسترای آنزیم آلکالاین فسفاتاز در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و به غشا اضافه شد و تا ظاهر شدن باندها بر روی کاغذ باقی ماند. بعد از ظهور باندها بلافاصله با آب شستشو داده شد و بعد از خشک شدن در بین دو طلق پلاستیکی قرار داده و در شرایط تاریک نگهداری شد.

۲-۱۹ تست الایزا

انواع مختلفی تست الایزا وجود دارد که شامل: ۱- الایزای مستقیم^{۵۸} ۲- الایزای غیر مستقیم^{۵۹} ۳- ساندویچ الایزا^{۶۰} ۴- الایزای رقابتی^{۶۱} می‌باشد. در این پژوهش از روش الایزای غیر مستقیم استفاده

⁵⁷ - Tris buffer SDS tween

⁵⁸ - Direct ELISA

⁵⁹ - Indirect ELISA

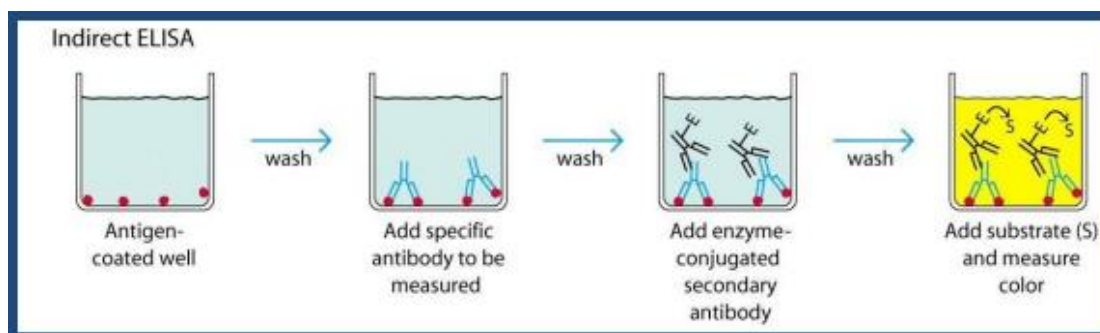
⁶⁰ - Sandwich ELISA

⁶¹ - Competition ELISA

شد. در الایزای غیر مستقیم ابتدا آنتی ژن به ته چاهک‌ها پوشش داده می‌شود در مرحله بعدی آنتی بادی اختصاصی (آنتی بادی اولیه) به آنتی ژن اضافه می‌شود و پس از آن هم آنتی بادی متصل شده با آنزیم (آنتی بادی ثانویه) اضافه می‌شود (شکل ۳-۴).

پروتئین استخراجی از برگ گیاهان تراریخت و غیر تراریخت به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر و همچنین ۱۰۰ میکرولیتر از پروتئین pthA را با ۱۰۰ میکرولیتر بافر پوشش دهنده^{۶۲} (۱۰/۶ گرم کربنات سدیم، ۸/۴ گرم بی کربنات سدیم و ۰/۲ گرم سدیم ازاید در یک لیتر آب مقطر و $\text{pH} = ۹/۶$) مخلوط و ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در پلیت الایزا پوشش داده شد. پلیت با بافر توئین کازئین (۶۰/۵۵ گرم Tris-HCl، ۸۷/۸ گرم NaCl، ۳/۷ گرم EDTA، ۲۰ گرم Casein و ۴/۴ گرم Tween به حجم یک لیتر آب رسانده شد) سه مرتبه شست و شو داده شد. در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از پروتئین pthA به همراه ۵۰ میکرولیتر بافر توئین کازئین ریخته شد (به جز چاهکی که در آن pthA وجود داشت). ۲ ساعت در دمای محیط ماند و با بافر توئین کازئین سه مرتبه شست و شو داده شد. آنتی بادی Anti His-tag به نسبت ۱/۵۰۰ در بافر توئین کازئین تهیه شد و درون چاهک‌ها به مقدار ۵۰ میکرولیتر ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. شست و شو سه مرتبه انجام شد. بعد از آن آنتی بادی ثانویه حاوی آنزیم آلکالین فسفاتاز را به نسبت ۱/۵۰۰ با بافر توئین کازئین رقیق کرده و ۵۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد این مرحله هم به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت و شست و شو انجام شد. در مرحله نهایی سوبسترای آنزیم آلکالین فسفاتاز (نیترو فنول فسفات) با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی-لیتر در دی اتانول آمین ۲۵ درصد ($\text{pH} = ۹/۸$) حل و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. در زمان‌های ۵، ۱۰، ۲۰ دقیقه بعد از اضافه کردن سوبسترا، در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

⁶² - Coating buffer



شکل ۳-۵ الایزای غیر مستقیم (wordpress.com). در این نوع الایزا ابتدا آنتی ژن به ته چاهک‌ها پوشش داده می‌شود. در مرحله بعدی آنتی‌بادی اختصاصی با آنتی ژن اضافه می‌شود و در مرحله آخر آنتی-بادی متصل شده با آنزیم اضافه می‌شود. با افزودن سوبسترای آنزیم واکنشی رخ می‌دهد که باعث ایجاد رنگ و آزاد شدن طول موج می‌شود

۲-۲۰ مطالعات بیوانفورماتیکی برای درک رفتار لیگاند-گیرنده

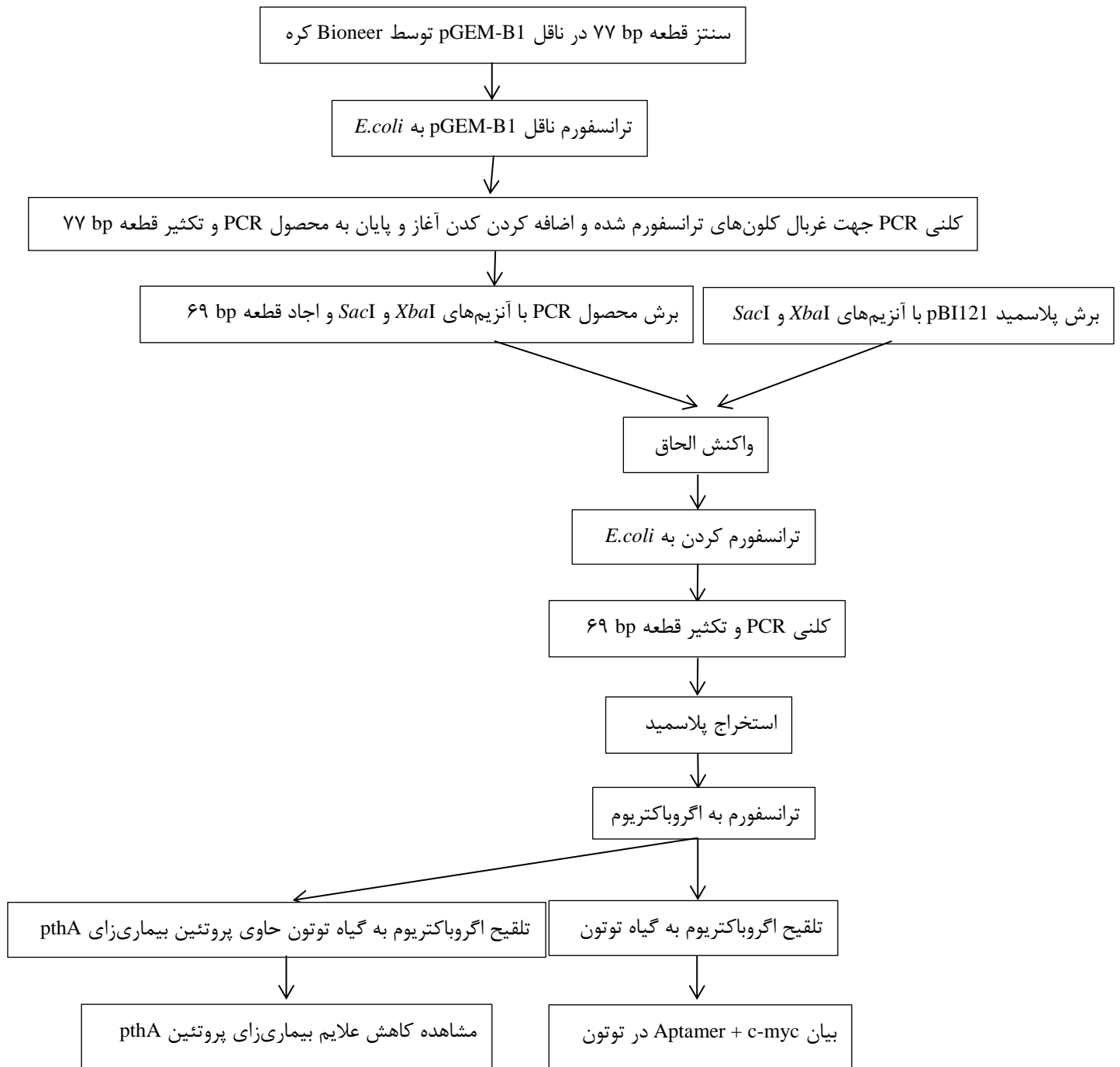
برهم کنش پروتئین‌ها با لیگاندهای مختلف نقش اساسی در فرایندهای زیستی دارند. روش‌های آزمایشگاهی مطالعه این برهم‌کنش‌ها، روش‌های بیوفیزیکی همچون کالریمتری، اسپکتروسکوپی و ساختاری است. بهبود قدرت کامپیوترها این امکان را فراهم کرده است که برهم‌کنش پروتئین-لیگاند با استفاده از کامپیوتر نیز مورد مطالعه قرار گیرد. در نتیجه استفاده از روش‌های کامپیوتری، می‌توان پیش از انجام آزمایش تجربی، برهم‌کنش ترکیبات لیگاند را با پروتئین جستجو کرد و پس از انتخاب ترکیباتی که با احتمال بیشتری به هدف متصل می‌شوند آنها را در آزمایشگاه و یا در سیستم‌های زنده مورد بررسی قرار داد. برای بررسی دقیق محل اتصال آپتامر YPASYMQ (لیگاند) با ۲۰۲ آمینواسید انتهایی پروتئین pthA (رسپتور) و شناسایی محل پیوندها باید از روش‌های پیشگویی و بیوانفورماتیکی استفاده کرد. داکینگ روشی است که یک مولکول کوچک (لیگاند) را در جایگاه اتصال مولکول هدف (گیرنده) قرار داده و تمایل به اتصال را تخمین می‌زند.

برای بررسی محل اتصال آپتامر YPASYMQ (لیگاند) با ۲۰۲ آمینواسید انتهایی پروتئین pthA (رسپتور) از نرم افزار Hex استفاده شد. این نرم افزار برای انجام عمل داکینگ نیاز به مدل پیشگویی شده لیگاند و رسپتور به فرمت PDB دارد. برای پیش‌گویی مدل ۲۰۲ آمینواسید انتهایی پروتئین pthA (رسپتور) با فرمت FASTA از سرور I-TASSER استفاده شد. در نتیجه این ۲۰۲ آمینواسید در NCBI بلاست شد و صد درصد شباهت با پروتئین Hypothetical protein (*Xanthomonas citri*) (شماره دسترسی WP-040234216) حاصل شد. توسط سرور I-TASSER مدل سه بعدی hypothetical protein پیش‌گویی شد. این پروتئین ۲۹۳ آمینواسید دارد که فقط ۲۰۲ آمینواسید انتهایی آن با ۲۰۲ آمینواسید انتهایی پروتئین pthA هم‌ردیف است در نتیجه توسط نرم افزار Chimera ۹۱ آمینواسید از ابتدای مدل پیش‌گویی شده hypothetical

protein حذف شد و مدل سه بعدی ۲۰۲ آمینواسید انتهایی پروتئین pthA بدست آمد. با برنامه Swiss-Pdb Viewer 4.0 انژی کل مولکول ۲۰۲ آمینواسید انتهایی پروتئین pthA تخمین زده شد تا مقدار پایداری مولکول سنجیده شود. توسط برنامه Chimera 1.8 پیوندهای هیدروژنی و بار اضافه شد تا برای انجام عمل داکینگ آماده شود.

برای پیش‌گویی مدل لیگاند YPASYMQ، این پپتید در NCBI بلاست شد و این توالی در-T- box- containing protein TBXT-like (Alligator mississippiensis) با شماره دسترسی XP-۰۰۶۲۶۸۵۸۸ پیدا شد. توسط سرور I-TASSER مدل سه بعدی این پروتئین آماده گردید. توسط برنامه Chimera همه آمینواسیدهای مدل پیش بینی شده این پروتئین به جز YPASYMQ حذف شدند و در نهایت مدل لیگاند YPASYMQ با فرمت PDB برای انجام داکینگ در دسترس قرار گرفت. با نرم افزار Hex مولکول لیگاند (آپتامر YPASYMQ) درون رسپتور (۲۰۲ آمینواسید انتهایی پروتئین pthA) داک شد.

در این فصل به شرح مواد استفاده شده و روش‌های آزمایشگاهی برای کلون قطعه c- + Aptamer myc و بیان آن در گیاه پرداخته شد. در فصل بعد به نتایج حاصل از کلون و بیان این قطعه در گیاه و تاثیر بازدارندگی آن روی پروتئین بیماری‌زای pthA پرداخته خواهد شد.



شکل ۳-۶ شمای کلی مراحل انجام کار

فصل سوم

نتیج

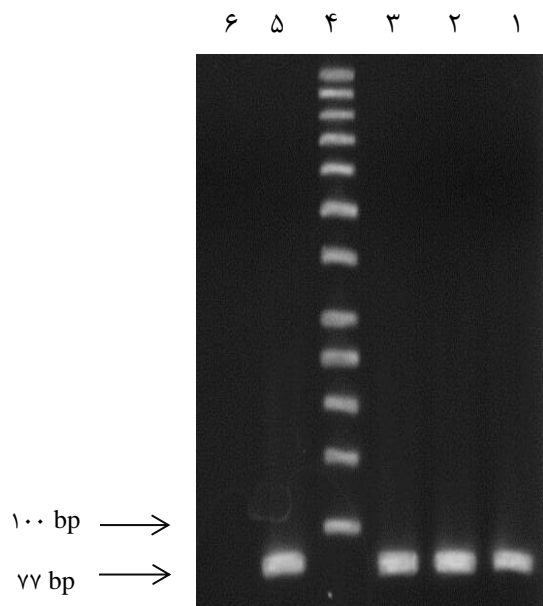
آپتامرها الیگونوکلوئوتیدها یا مولکول‌های پپتیدی هستند که می‌توانند با مولکول هدفشان با خاصیت چسبندگی و اختصاصیت بالا از طریق ساختار ۳ بعدی خاص جفت شوند. آپتامر YPASMQ به پروتئین pthA متصل می‌شود (جی ژاو، ۲۰۰۱) و پیش بینی شده است که می‌توان از آن در کاهش علائم بیماری شانکر استفاده کرد. آپتامر پپتیدی YPASMQ به همراه اپی-توپ c-myc و دو جایگاه برشی XbaI در ابتدای ۵' و SacI در انتهای ۳' و چهار باز GCGC در انتها و ابتدای دو قطعه توسط شرکت Bioneer در کره سنتز شد. در این فصل به نتایج حاصل از کلون و بیان قطعه Aptamer + c-myc در گیاه و مشاهده اثر بازدارندگی آن روی پروتئین بیماری-زای pthA پرداخته می‌شود.

۳-۱ غربال کلون‌های *E.coli* واجد Aptamer + c-myc به روش کلنی PCR و استخراج پلاسمید از آن

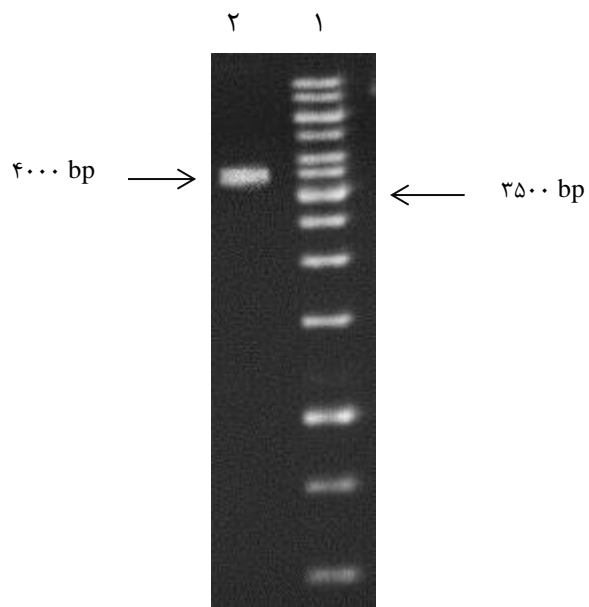
کلونی‌های واجد پلاسمید pGEM-B1 حاوی Aptamer + c-myc، با روش کلنی PCR انتخاب شدند. باند حاصل از تکثیر ۷۷ bp است که در تصویر (۳-۱) آورده شده است. استخراج پلاسمید توسط کیت MBST انجام گرفت و باند ۴۰۰۰ bp مشاهده شد (شکل ۳-۲).

۳-۲ واکنش هضم دو آنزیمی و تک آنزیمی پلاسمید pGEM-B1

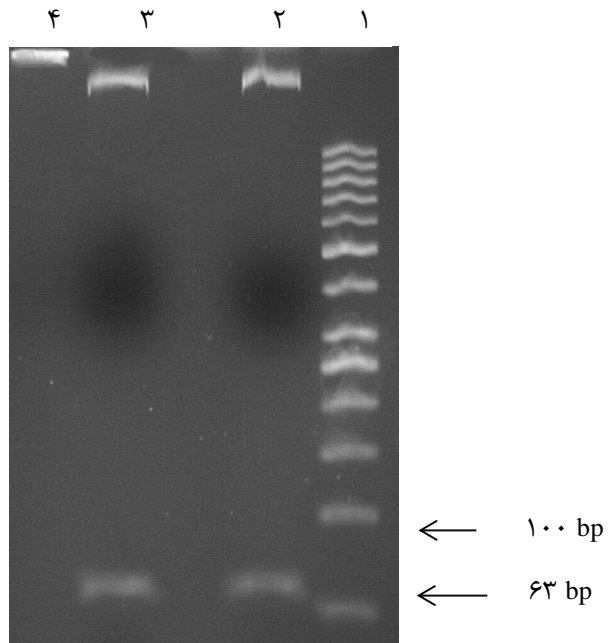
واکنش هضم پلاسمید pGEM-B1 توسط دو آنزیم XbaI و SacI انجام گرفت و قطعه ۶۳ bp مشاهده شد (شکل ۳-۳). وکتور pGEM-B1 خطی شده حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم‌های XbaI و SacI در شکل (۳-۴) و وکتور خطی شده حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم EcoRI در شکل (۳-۵) آورده شده است.



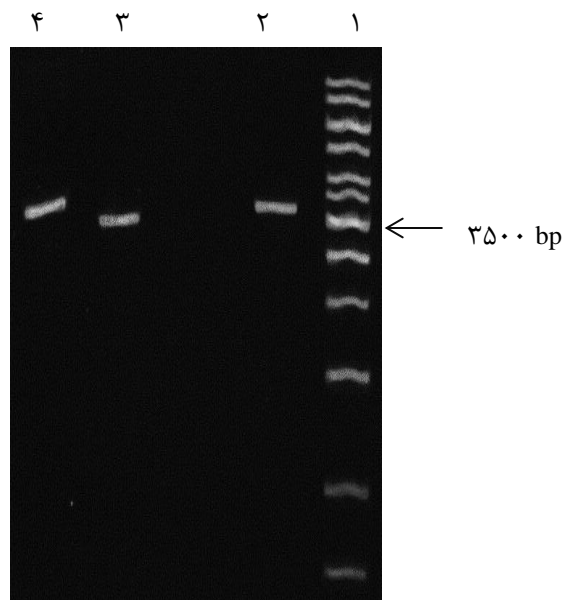
شکل ۱-۳ کلنی PCR جهت تست کلنی‌های واجد پلاسمید pGEM-B1 حاوی Aptamer + c-myc و اضافه کردن کدن آغاز و پایان. چاهک ۶: کنترل منفی. چاهک ۵: کنترل مثبت: استوک اولیه pGEM-B1 ارسال از Bioneer (کره). چاهک ۴: مارکر ۵۰ bp. چاهک ۳، ۲ و ۱: تکثیر توالی ۷۷ bp



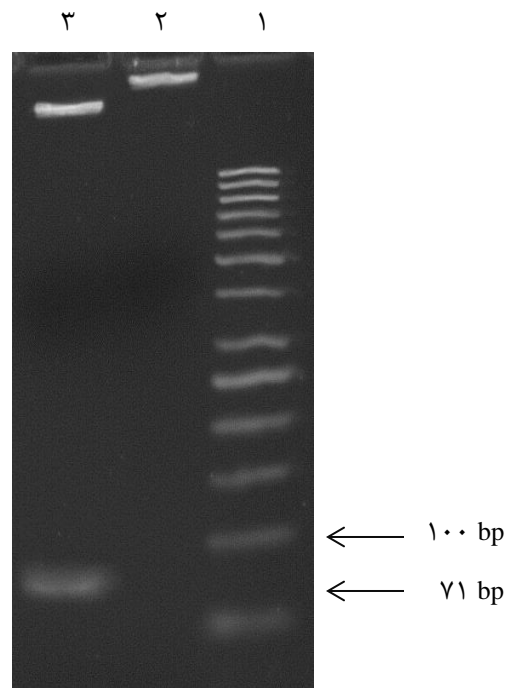
شکل ۲-۳ استخراج پلاسمید از کلون واجد پلاسمید pGEM-B1 حاوی Aptamer + c-myc. چاهک ۱: مارکر ۱ kb. چاهک ۲: توالی پلاسمید pGEM-B1 حاوی Aptamer + c-myc ۴۰۰۰ bp



شکل ۳-۳ هضم دو آنزیمی پلاسمید pGEM-B1 با آنزیم‌های *SacI* و *XbaI*. چاهک ۱: مارکر ۵۰ bp. چاهک ۲ و ۳: باند پایین قطعه ۶۳ bp خارج شده از پلاسمید و باند بالا پلاسمید برش خورده. چاهک ۴: کنترل منفی (پلاسمید بدون برش).



شکل ۳-۴ هضم تک آنزیمی وکتور pGEM-B1 چاهک ۱: مارکر ۱ kb. چاهک ۲: پلاسمید pGEM-B1 خطی شده با آنزیم *XbaI*. چاهک ۳: کنترل (پلاسمید pGEM-B1 برش نخورده). چاهک ۴: پلاسمید pGEM-B1 خطی شده با آنزیم *SacI*.



شکل ۳-۵ هضم تک آنزیمی وکتور pGEM-B1 با *EcoRI*. چاهک ۱: مارکر ۱ kb. چاهک ۲: کنترل (پلاسمید pGEM-B1 برش نخورده). چاهک ۳: پلاسمید pGEM-B1 خطی شده با آنزیم *EcoRI*.

۳-۳ واکنش هضم دو آنزیمی پلاسمید pBI121

پلاسمید pBI121 مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و قطعه ۱۸۹۰ bp مربوط به ژن *GUS* از آن جدا شد (شکل ۳-۶). پلاسمید برش خورده از روی ژل جدا شد و با محصول PCR وارد واکنش الحاق شد. محصول واکنش الحاق به باکتری *E. coli* سویه DH5 α ترانسفورم شد.

۳-۴ غربال کلون‌های *E. coli* واجد پلاسمید PBI121 حاوی Aptamer + c-myc به روش کلنی PCR و استخراج پلاسمید از آن‌ها

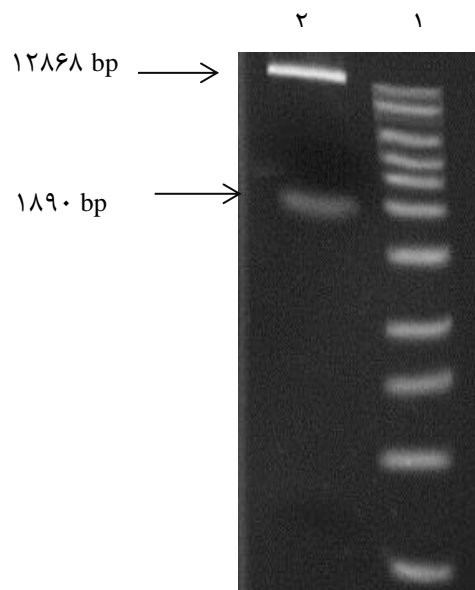
کلنی‌های *E. coli* روی محیط حاوی آنتی‌بوتیک کانامایسین رشد کردند. برای کلنی‌ها PCR انجام شد و قطعه ۶۹ bp حاصل شد (شکل ۳-۷). بعد از تأیید وجود قطعه Aptamer+c-myc، از آن کلون استخراج پلاسمید صورت گرفت. پلاسمید استخراجی بر روی ژل آگارز مشاهده شد. این پلاسمید جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوریان فرستاده شد و حضور قطعه Aptamer + c-myc تأیید شد.

۳-۵ غربال کلون‌های اگروباکتریوم واجد پلاسمید pBI121 حاوی Aptamer + c-myc به روش کلنی PCR

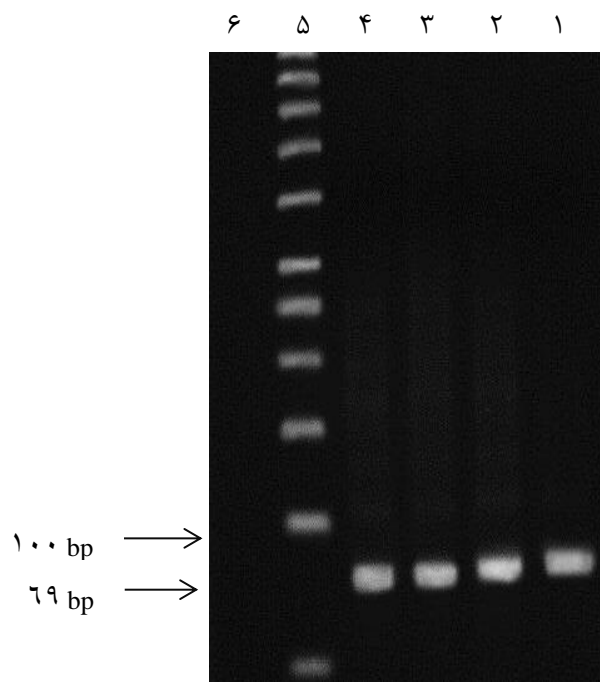
پلاسمید استخراج شده از *E. coli* به اگروباکتریوم ترانسفورم شد. برای کلونی‌های اگروباکتریوم، کلنی PCR انجام و قطعه ۶۹ bp تأیید شد (شکل ۳-۸).

۳-۶ تعیین غلظت MIC پروتئین pthA جهت بروز علائم HR

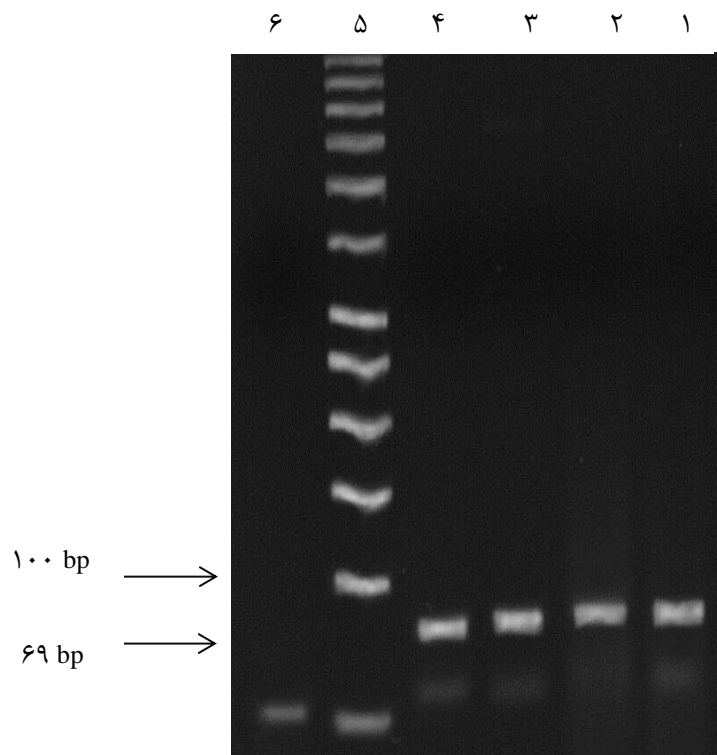
میزان کل پروتئین‌های بیان شده باکتری BL21 توسط آزمون برادفورد محاسبه شد. این مقدار حدود ۰/۶۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. سپس محلول حاوی کل پروتئین‌های بیان شده، با نسبت‌های رقیق شده مختلف به پشت برگ گیاهان تزریق شد و در نهایت نسبت ۱:۶ به عنوان



شکل ۳-۶ هضم پلاسمید pBI121 توسط آنزیم‌های *XbaI* و *SacI*. چاهک ۱: مارکر kb ۱. چاهک ۲: قطعه ۱۲۸۶۸ bp پلاسمید pBI121 هضم شده که ژن GUS از آن جدا شده است.



شکل ۳-۷ کلونی PCR جهت تأیید کلون واجد پلاسمید PBI121 حاوی Aptamer + c-myc. چاهک ۶: کنترل منفی. چاهک ۵: مارکر ۵۰ bp. چاهک ۴، ۳ و ۲: تکثیر قطعه ۶۹ bp. چاهک ۱: کنترل مثبت (استوک اولیه pGEM-B1 فرستاده شده توسط شرکت Bioneer).



شکل ۳-۸ کلونی PCR جهت تأیید کلون واجد پلاسمید PBI121 حاوی c-myc + Aptamer. چاهک ۶: کنترل منفی. چاهک ۵: مارکر ۵۰ bp. چاهک ۴: کنترل مثبت. چاهک ۳، ۲ و ۱: تکثیر قطعه ۶۹ bp.

غلظت MIC برای مراحل بعدی استفاده شد (شکل ۳-۹).

۳-۷ آزمون وسترن بلات

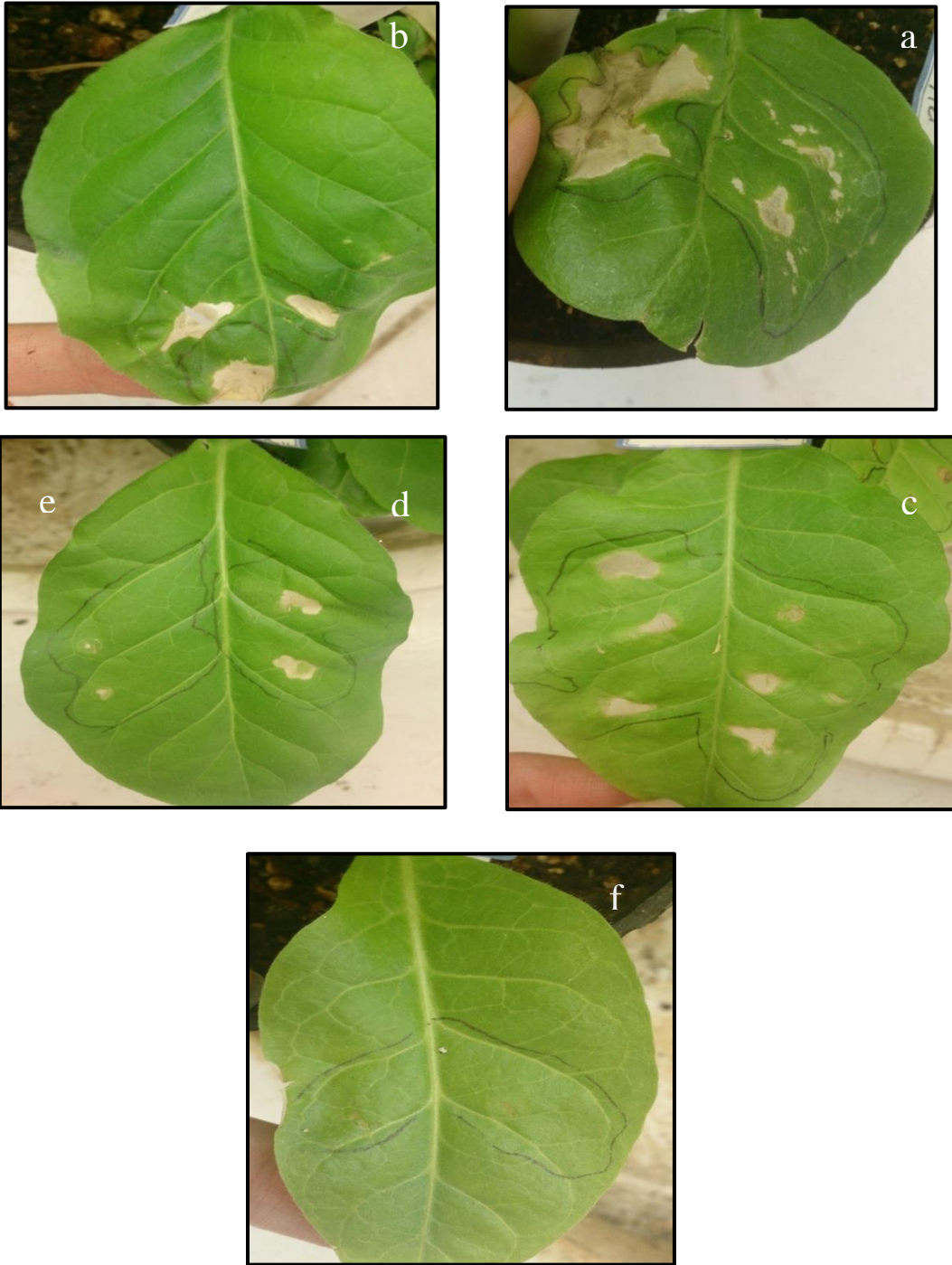
غلظت پروتئین کل برگ با استفاده از روش برادفورد سنجیده شد. این میزان ۴/۸ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. برگ‌ها ۳ و ۵ روز بعد از تزریق آگروباکتریوم برداشت و پروتئین آن‌ها استخراج شد. ژل SDS PAGE با پروتئین‌های استخراجی انجام شد و از این ژل برای وسترن بلات استفاده شد. از برگ‌های بدون تزریق آگروباکتریوم و برگ‌های حاوی pBI121 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در نهایت باند پروتئینی آپتامر بیان شده، طی شست‌وشوی کاغذ PVDF با آنتی بادی اختصاصی c-myc رویت شدند (شکل ۳-۱۰).

۳-۸ کاهش علائم HR حاصل از پروتئین pthA توسط Aptamer بیان شده در گیاه

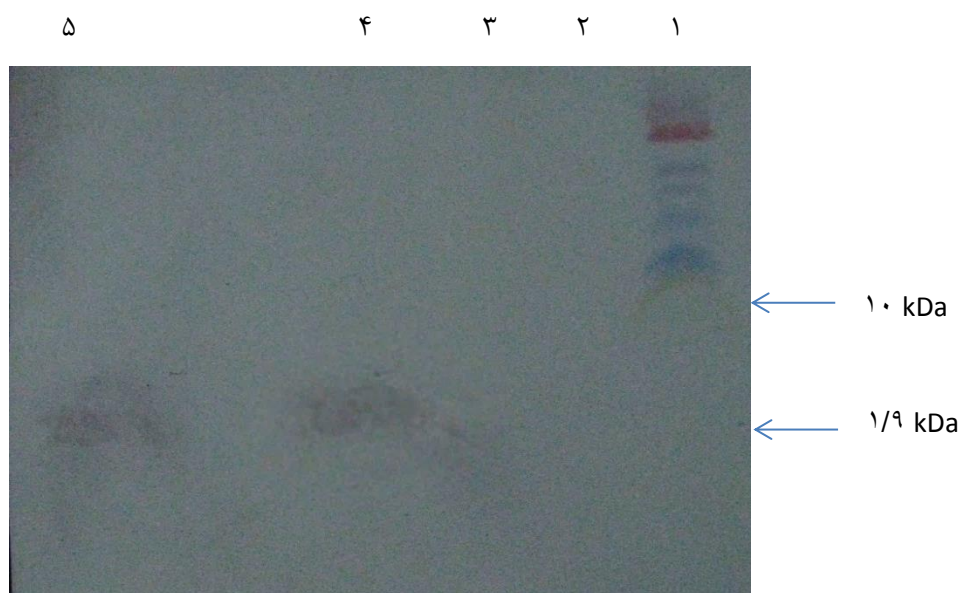
بعد از تزریق آگروباکتری به پشت برگ‌های توتون، در سومین روز از بیان Aptamer + c-myc، پروتئین pthA به همان نقاط تزریق شد. برگ‌گی که ۳ روز از تزریق پروتئین pthA در نقاط بیان شده آپتامر گذشته بود با برگ شاهد که فقط پروتئین pthA تزریق شده بود مقایسه شد. تفاوت کاملاً معنی‌دار بود و کاهش علائم HR مشاهده شد. این برگ با گیاه شاهد ۹ روز بعد مقایسه شد. پایداری آپتامرهای پپتیدی بعد از ۷ روز از زمان بیان، کاهش می‌یابد. به همین دلیل ۹ روز بعد از تزریق پروتئین pthA در نقاط بیان شده آپتامر، علائم HR حاصل از pthA کم‌کم ظاهر می‌شود اما باز هم نسبت به گیاه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد (شکل ۳-۱۱).

۳-۹ آزمون الیزا جهت مشاهده برقراری ارتباط بین Aptamer و پروتئین pthA

این تست جهت تایید برقراری اتصال بین آپتامرهای بیان شده در گیاه و پروتئین pthA انجام شد.



شکل ۳-۹ تعیین غلظت MIC پروتئین pthA جهت بروز علائم HR. a: رقت ۱:۱. b: رقت ۱:۲. c: رقت ۱:۴. d: رقت ۱:۵. e: رقت ۱:۶. f: شاهد (بافر لیز کننده). برای تهیه رقت ۱:۲ یک میلی لیتر آب دوبار تقطیر استریل با یک میلی لیتر پروتئین‌های بیان شده باکتری BL21 مخلوط شد.

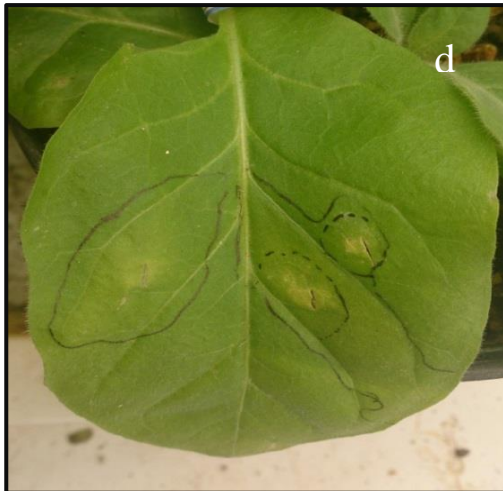
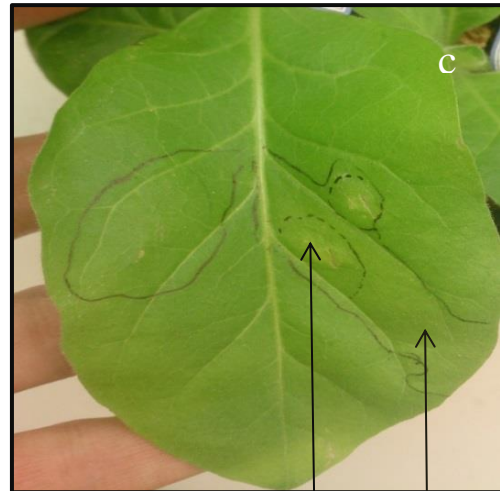
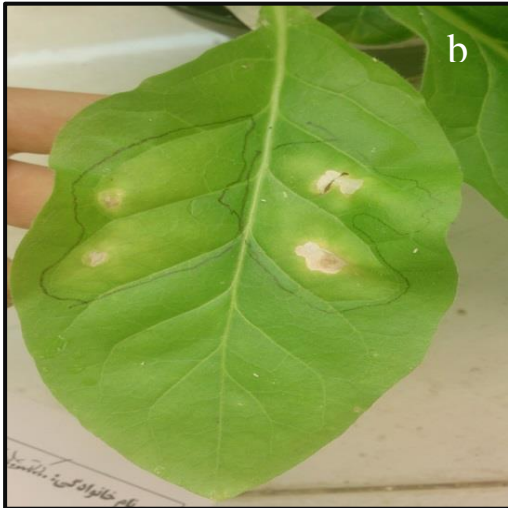


شکل ۳-۱۰ وسترن بلات. چاهک ۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین. چاهک ۲: کنترل منفی (گیاه بدون تزریق آگروباکتریوم). چاهک ۳: کنترل منفی (گیاه حاوی PBI121 خالی). چاهک ۴: قطعه Aptamer+c-myc ۳ روز بعد از بیان. چاهک ۵: قطعه Aptamer+c-myc ۵ روز بعد از بیان

روز ۳



روز ۹



تزریق پروتئین
pthA

تزریق
اگروباکتری و
بیان آپتامر

شکل ۳-۱۱ مشاهده اثر آپتامر بر بازدارندگی پروتئین pthA. a: شاهد (۳ روز بعد از تزریق پروتئین pthA). b: ۹ روز بعد از تزریق پروتئین pthA. c: ۳ روز بعد از تزریق پروتئین pthA در محل آپتامر. d: ۹ روز بعد از تزریق پروتئین pthA در محل آپتامر

نتایج داده‌های حاصل از آزمون الایزا در طول موج ۴۰۵ نانومتر در جدول (۳-۱) آورده شده است. چسبندگی پروتئین بیماری‌زای pthA با آپتامر بعد از ۳، ۷ و ۱۱ روز بعد از بیان آپتامر بررسی شد. در طول موج ۴۰۵ نانومتر، کنترل مثبت عدد ۰/۷ را نشان داد. چسبندگی پروتئین بیماری‌زای pthA با آپتامر بعد از ۳ روز از بیان آپتامر عدد ۰/۴۴، چسبندگی پروتئین بیماری‌زای pthA با آپتامر بعد از ۷ روز از بیان آپتامر عدد ۰/۳۱ و چسبندگی پروتئین بیماری‌زای pthA با آپتامر بعد از ۱۱ روز از بیان آپتامر عدد ۰/۱۶ را نشان داد. این اعداد نشان می‌دهند که بیان آپتامر در ۳ روز اول در بیشترین مقدار خود قرار دارد و تا ۱۱ روز بعد از بیان به تدریج کاهش می‌یابد اما همچنان حضور دارد.

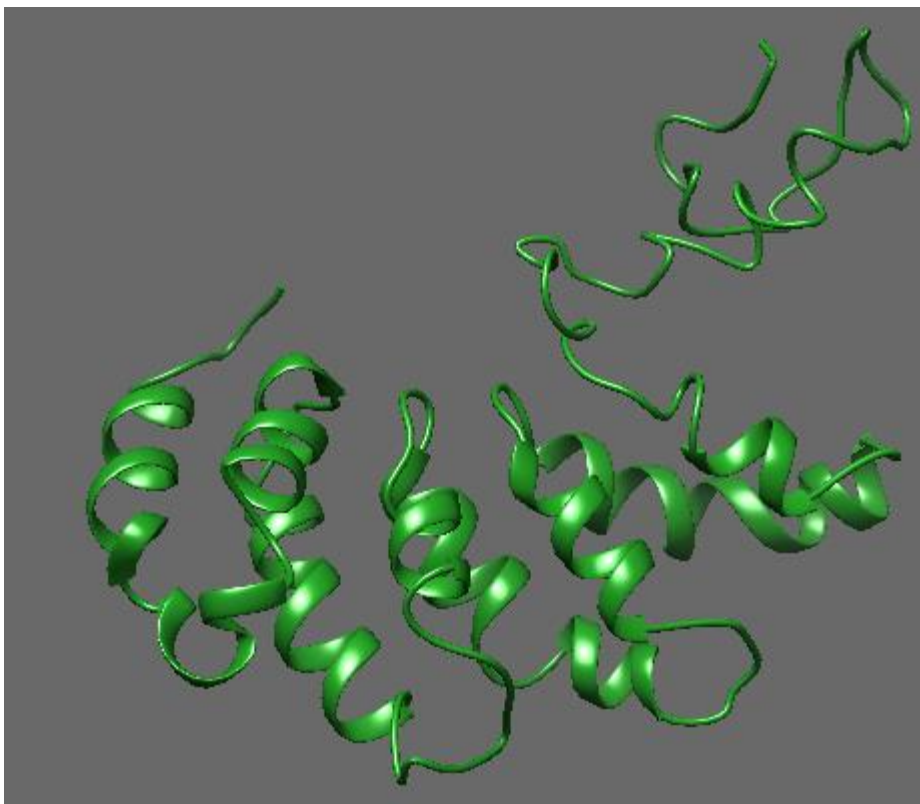
جدول ۳-۱ داده‌های حاصل از الایزا

کنترل منفی (عصاره پروتئینی برگ بدون آپتامر)	کنترل مثبت (pthA)	چسبندگی آپتامر (بعد از ۳ روز بیان) با pthA	چسبندگی آپتامر (بعد از ۷ روز بیان) با pthA	چسبندگی آپتامر (بعد از ۱۱ روز بیان) با pthA
۰/۰۳	۰/۷	۰/۴۴	۰/۳۱	۰/۱۶

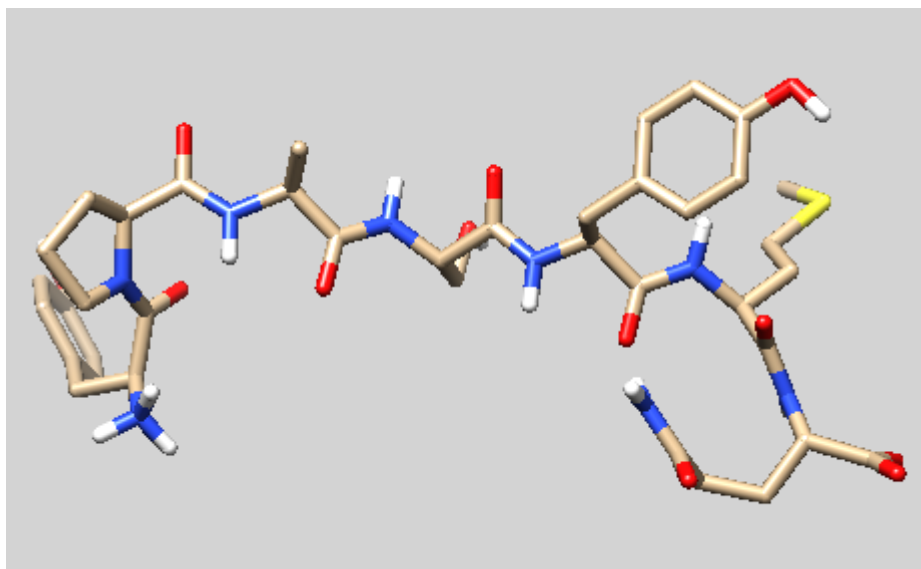
جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر

۳-۱۰ مطالعات بیوانفورماتیکی برای درک رفتار لیگاند-گیرنده

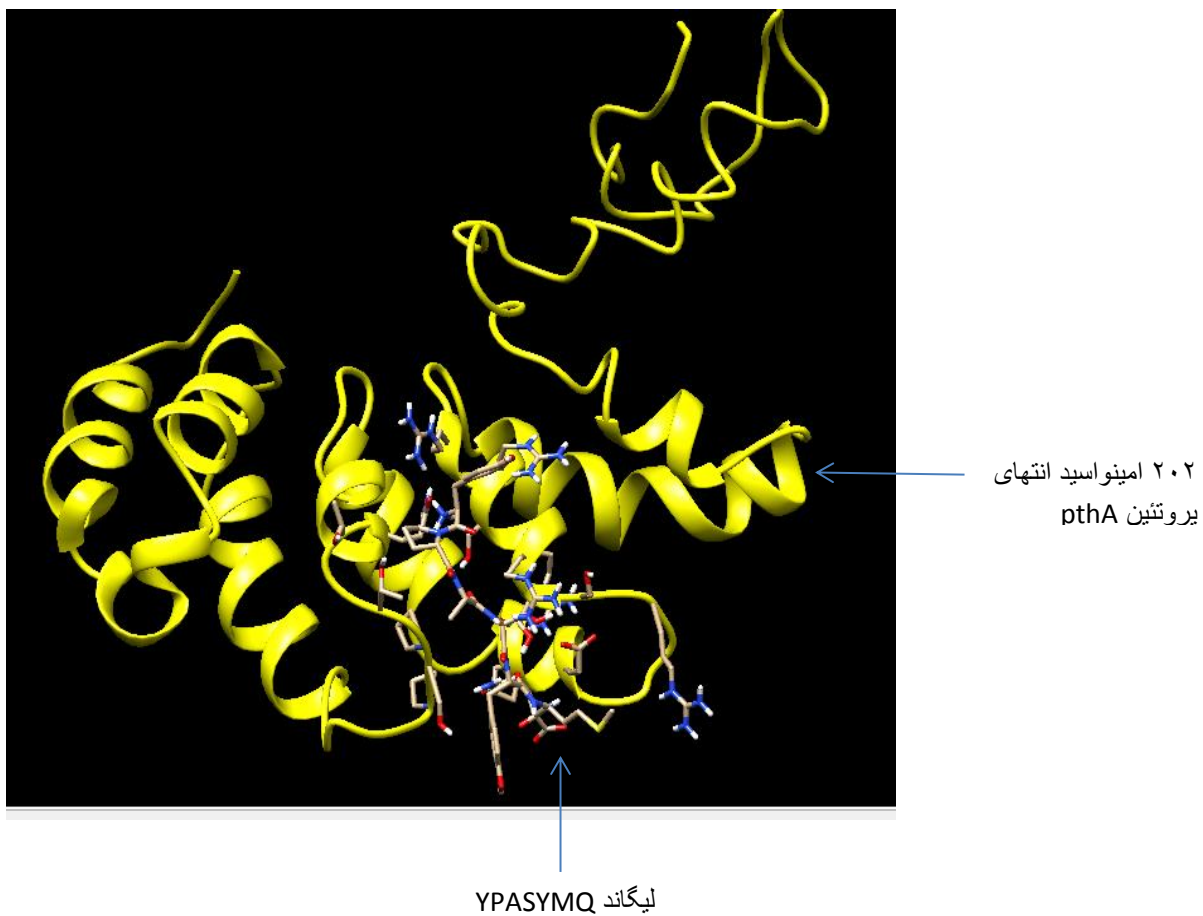
برای بررسی دقیق محل اتصال آپتامر YPASYMQ (لیگاند) با ۲۰۲ آمینواسید انتهای پروتئین pthA (رسپتور) و شناسایی محل پیوندها از روش‌های پیشگویی و بیوانفورماتیکی استفاده شد. توسط سرور I-TASSER مدل سه بعدی ۲۰۲ آمینواسید انتهایی پروتئین pthA و آپتامر YPASYMQ بدست آمد (شکل ۳-۱۲ و ۳-۱۳). انرژی کل دو مولکول توسط برنامه Swiss-pdb Viewer تخمین زده شد و مقدار $-7191/241$ و $-69/752$ $\frac{kJ}{mol}$ بدست آمد. این عدد نشان دهنده پایداری مولکول است و هرچه کمتر باشد مولکول از پایداری بیشتری برخوردار است. دو مولکول رسپتور و لیگاند بعد از اضافه شدن هیدروژن و بار الکتریکی توسط برنامه Chimera وارد برنامه HEX شدند و داکینگ انجام گرفت و دو مولکول به هم متصل شدند (شکل ۳-۱۴). با برنامه Lig plot پیوندهای ایجاد شده بررسی شد (شکل ۳-۱۵).



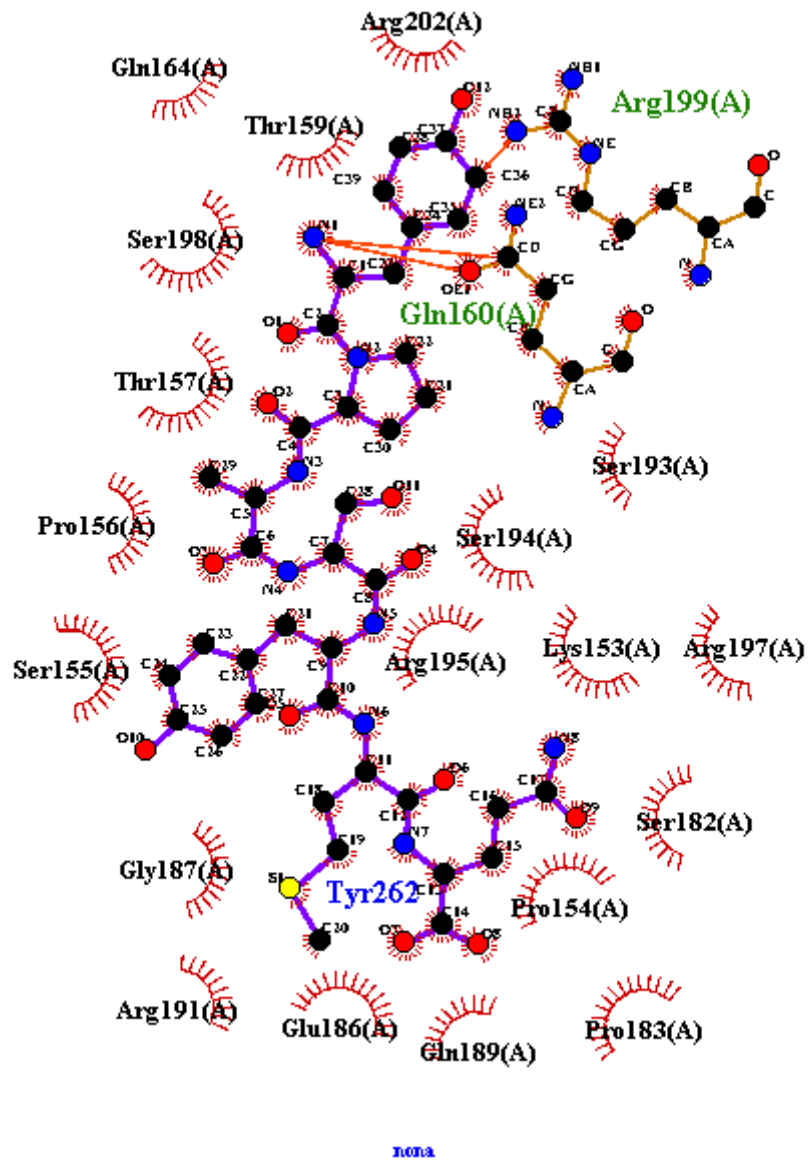
شکل ۳-۱۲ مدل پیش‌گویی شده ۲۰۲ آمینو اسید انتهای پروتئین pthA توسط سرور I-TASSER ۲۰۲ آمینو اسید انتهای پروتئین pthA دارای ۹ مارپیچ آلفا است و صفحات بتا ندارد. فرمت FASTA ۲۰۲ آمینو اسید انتهای پروتئین pthA در دسترس نیست در نتیجه این ۲۰۲ آمینو اسید در NCBI بلاست شد و صد درصد شباهت با پروتئین Hypothetical protein (*Xanthomonas citri*) حاصل شد. با سرور I-TASSER مدل سه بعدی hypothetical protein پیش‌گویی شد. نرم افزار Chimera ۹۱ آمینو اسید از ابتدای مدل پیش‌گویی شده hypothetical protein حذف شد و مدل سه بعدی ۲۰۲ آمینو اسید انتهای پروتئین pthA حاصل شد.



شکل ۳-۱۳ مدل پیش‌گویی شده لیگاند YPASYMQ توسط سرور I-TASSER. برای پیش‌گویی مدل لیگاند YPASYMQ، این پپتید در NCBI بلاست شد و این توالی در T-box-containing protein TBXT-like (Alligator mississippiensis) پیدا شد. سرور I-TASSER مدل سه بعدی پروتئین T-box-containing protein TBXT-like پیش‌گویی شد. برنامه Chimera همه آمینواسیدهای مدل پیش‌بینی شده پروتئین T-box-containing protein TBXT-like به جز YPASYMQ حذف شدند و در نهایت مدل لیگاند YPASYMQ با فرمت PDB برای انجام داکینگ در دسترس قرار گرفت.



شکل ۳-۱۴ داکینگ مولکول لیگاند (آپتامر YPASYMQ) و رسپتور (۲۰۲ آمینو اسید انتهای پروتئین pthA) با نرم افزار Hex. مولکول زرد رنگ ۲۰۲ آمینواسید انتهای پروتئین pthA و مولکول داخلی لیگاند مورد نظر است.



شکل ۳-۱۵. پیوندهای الکترواستاتیکی ایجاد شده بین ۲۰۲ امینواسید پروتین pthA و لیگاند YPASYMQ

فصل چہارم

بحث و پیشہ اداات

ایران از نظر سطح زیرکشت مرکبات دارای رتبه دهم در بین تولیدکنندگان عمده مرکبات جهان است (فائو، ۲۰۱۱). بر اساس گزارش آمار مرکبات وزارت کشاورزی در سال ۱۳۹۲، سطح زیر کشت مرکبات کشور در قالب سه ناحیه‌ی مرکزی، شمالی و جنوبی به میزان ۲۸۸۱۰۸ هکتار و میزان تولید ۴۲۹۹۲۴۷ تن بوده که این آمار نشان دهنده اهمیت کشت این محصول جهت تامین نیازهای غذایی جمعیت رو به افزایش کشور است. علی‌رغم وجود پتانسیل لازم برای کشت مرکبات در کشور، وجود عوامل محدودکننده و عدم مدیریت صحیح باعث شده ایران تنها ۰/۴ درصد از سهم تجارت جهانی مرکبات را داشته باشد، که این موضوع اهمیت نیاز به مطالعات بیشتر پیرامون عوامل محدودکننده‌ی زیستی و غیر زیستی مدیریت آن‌ها در راستای کاهش اثرگذاری بر کشت، تولید و صادرات این محصول را نشان می‌دهد.

پوسیدگی طوقه، زوال شاخه، تریستیزا، بلاست، جاروک لیموترش و شانکر از جمله‌ی بیماری‌های مهم مرکبات در ایران و جهان به شمار می‌روند. شانکر مرکبات که توسط باکتری *Xanthomonas citri* pv. *Citri* ایجاد می‌شود از جمله بیماری‌های باکتریایی است که در درختان میوه ایجاد می‌گردد. در سال‌های اخیر میزان خسارت این بیماری در اغلب کشورهای مرکبات‌خیز جهان از جمله ایران قابل توجه بوده است (گتوالد و سوون، ۲۰۰۲). این بیماری دامنه میزبانی وسیعی در گونه‌های گیاهی خانواده‌ی روتاسه دارد که در بین آنها برخی از ارقام مهم تجاری نظیر پرتقال و لیموترش خسارت شدیدی می‌بینند. شدت آلودگی بسته به نوع گونه، رقم و شرایط آب و هوایی مختلف متفاوت است (روزتی، ۱۹۷۷ و سیورولو، ۱۹۸۱ و ۱۹۹۹). شانکر باکتریایی به دلیل انتشار و گسترش سریع، ریزش برگ و میوه، سرخشیدگی و در نهایت کاهش کمی و کیفی محصول یکی از بیماری‌های آسیب‌رسان مرکبات محسوب می‌شود (داس، ۲۰۰۳). عامل این بیماری دارای دو تیپ متفاوت A و A* است. اگرچه سویه‌های تیپ A در اغلب مناطق کشت و تولید مرکبات دیده می‌-

شود ولی سویه‌های تیپ A* تنها در هند، تایلند و کشورهای حوضه خلیج فارس از جمله ایران شناسایی شده‌اند و دامنه میزبانی آن‌ها تنها محدود به درخت لیمو ترش است. بیماری شانکر اولین بار در ایران بر روی لیمو ترش از منطقه کهنوج کرمان به وسیله علیزاده و رحیمیان (۱۹۹۰) و وقوع فرم آسیایی شانکر برای اولین بار در ایران توسط مستوفی‌زاده و رحیمیان گزارش شد (۱۳۷۵). آلودگی این بیماری مانند خیلی دیگر از بیماری‌های باکتریایی اصولاً از طریق روزنه‌ها و خراش‌هایی که توسط بادهای شدید و حشرات به وجود می‌آید اتفاق می‌افتد (گاتوولد و همکاران، ۲۰۰۲). بیماری شانکر مرکبات در سال ۱۸۹۹ برای اولین بار در ژاپن روی برگ‌های واشنگتن ناول مشاهده شد ولی نامی برای آن مشخص نشد (سیورولو، ۱۹۸۱). برگر و همکاران (۱۹۱۴) شانکر را به‌عنوان بیماری جدید معرفی کردند (کویزومی، ۱۹۸۵). اما قدیمی‌ترین آثار این بیماری مربوط به نمونه‌هایی از بالنگ در هرباریومی در انگلستان است که بین سال‌های ۱۸۲۷ تا ۱۸۳۱ از هندوستان جمع‌آوری شدند (داس و همکاران، ۲۰۰۳). فاوست و جنکینز (۱۹۳۳) این بیماری را منشأ گرفته از هند و جاوا دانسته‌اند.

ژن‌های زیادی در ایجاد بیماری شانکر دخیل هستند. یکی از ژن‌های مهم در ایجاد این بیماری ژن *pthA* است که جز خانواده ژنی *avrBs3/pthA* می‌باشد. محصول این ژن از طریق سیستم ترشحی نوع III وارد سلول میزبان می‌شود (رابرت و رایان، ۲۰۱۱).

تمام همولوگ‌های *pthA* در پنج گروه شانکر ۱۷،۵ تکرار پشت‌سرهم را حمل می‌کنند، که هر کدام از این تکرارها ۱۰۲ جفت باز می‌باشد و در قسمت مرکزی ژن وجود دارند. بیان موقت *pthA* توسط تنفگ ژنی یا آگروباکتری در مرکبات زخم‌های شبه شانکر کوچکی ایجاد می‌کند. *pthA* و همولوگ‌هایش افکتورهایی را کد می‌کنند که سبب ایجاد فنوتیپ بیماری شانکر می‌شود. تمام

pthA های مختلف و همولوگ‌هایشان طولی در حدود ۳ تا ۴ کیلو باز دارند. نواحی C ترمینال بسیاری از اعضای خانواده *avrBs3/pthA* اختصاصیت بیماری‌زایی و عفونت‌زایی را ایجاد می‌کنند. در مناطق جنوبی ایران، میزان خسارت بیماری به حدود شصت درصد محصولات مرکبات می‌رسد، به همین دلیل توجه به این بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تاکنون اقدامات زیادی در جهت مبارزه با بیماری شانکر انجام شده است. این اقدامات شامل روش‌های سنتی و نوین می‌باشد. روش‌های سنتی شامل اسپری باکتری‌کش‌ها مثل پرنوکس (چادهوری، ۱۹۵۱)، سولفات استرپتومایسین به همراه یک درصد گلیسرین (رنگاسوامی و همکاران، ۱۹۵۹)، اولترا سولفور (نیروان، ۱۹۶۱)، مخلوط سدیم آرسنات و سولفات مس (پادل و پادهیا، ۱۹۶۴)، مخلوط بوردیاکس (پاتل و دسای، ۱۹۷۰)، کلرید نیکل و بلیتوکس (رام و همکاران، ۱۹۷۱)، آگری‌مایسین و استرپتوسیکلین (ماتار و همکاران، ۱۹۷۳)، اکسی کلرید مس (کیشون و چند، ۱۹۸۷)، هرس کردن همه شاخه‌های آلوده قبل از باد موسمی و سوزاندن آن‌ها (پاتل و دسای، ۱۹۷۰)، استفاده از بادشکن (گاتوولد و تایمر، ۱۹۹۵)، استفاده از پایه‌های گلخانه‌ای عاری از شانکر و استفاده از وارپته-های مقاوم به شانکر (داس، ۲۰۰۳) می‌باشد. روش‌های سنتی جز آسان‌ترین راه‌های مبارزه با بیماری شانکر می‌باشد، اما احتمال بازگشت مجدد بیماری و ایجاد مقاومت در باکتری در اثر استفاده مداوم از سموم شیمیایی جز معایب آنها به شمار می‌رود.

از روش‌های نوین برای مبارزه با بیماری شانکر می‌توان به کنترل بیولوژیکی (گوتو و همکاران، ۱۹۷۹؛ اوتا، ۱۹۸۳؛ کالیتا و همکاران، ۱۹۹۶). استفاده از باکتری‌های اپی‌فیت آنتاگونیست سطح برگ مرکبات (منتخبی و همکاران، ۱۳۸۹)، اثر ضد باکتریایی اسانس و عصاره آبی گیاهی روی *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (محمودی و همکاران، ۱۳۸۹)، عصاره خام قارچ‌های ساپروفیت (کاظم‌زاده و همکاران، ۱۳۹۱)، اثر آنتی‌باکتریالی اسانس‌های گیاهی مثل آنغوزه و

رزماری روی *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (خدایگان و همکاران، ۱۳۹۱)، استفاده از باکتریوفاژ (شیرچیان و همکاران، ۱۳۹۲)، استفاده از نانوذرات آهن (ریاحی و همکاران، ۱۳۹۲؛ رشیدی فر و همکاران، ۱۳۹۳) و اثر آنتی‌باکتریالی عصاره گیاهان چوب مسواک، آویشن و شیرین- بیان روی *Xanthomonas citri* pv. *citri* (نصیری‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۳) در جهت جلوگیری از رشد باکتری شانکر مفید گزارش شدند. کنترل بیماری از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک شامل بیان ژن *Xa21* برنج در مرکبات (مهندس و همکاران، ۲۰۱۰) تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه *pthA*-NLS نوترکیب و ژن‌های *ScFV* (لی و همکاران، ۲۰۱۰) تولید پرتقال شیرین مهندسی شده با قطعه سنس و آنتی سنس انتهای ژن *pthA* (توالی سیگنالی هسته‌ای) (یانگ و همکاران، ۲۰۱۱) و آپتامرها (جی‌ژاو، ۲۰۰۱) می‌باشند.

جی‌ژاو آپتامرهایی را شناسایی کرد که به پروتئین *pthA* متصل می‌شود و پیش بینی کرد که می‌توان از آنها در کاهش بیماری شانکر استفاده کرد. آپتامرها الیگو نوکلئوتیدهایی از جنس RNA و ssDNA یا مولکول‌های پپتیدی هستند که می‌توانند با مولکول هدفشان با خاصیت چسبندگی و اختصاصیت بالا از طریق ساختار ۳ بعدی خاص جفت شوند (سانگ و همکاران، ۲۰۱۲). آپتامرها به عنوان مواد زیستی در تحقیقات بسیاری برای توسعه داروهای جدید (کفه و همکاران، ۲۰۱۰)، سیستم‌های انتقال دارو و کشف میکروارگانیزم‌های پاتوژن (زیان و همکاران، ۲۰۱۲)، ابزار تشخیصی و درمانی و پروب‌های بیوسنسور (جرمر و همکاران، ۲۰۱۳) مورد مطالعه قرار گرفته است. آپتامر-هایی که با اهداف درمانی تولید شده‌اند شامل آپتامر اختصاصی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) برای درمان بیماری تخریب وابسته به سن (AMD) به عنوان داروی تجاری تولید شدند (کفه و همکاران، ۲۰۱۰).

هر ساختاری که توسط یک آنتی بادی مورد شناسایی قرار گیرد، اپی توپ (عامل آنتی ژنی) نامیده می‌شود. استفاده از آنتی بادی‌های تهیه شده علیه اپی توپ‌های پروتئینی جهت بررسی عملکرد، جابجایی و تغییرات پروتئین‌ها در شرایط *in vivo* و *in vitro* سال هاست که بکار گرفته می‌شود. این تکنیک همچنین برای تخلیص پروتئین‌های حاوی اپی توپ مورد نظر کاربرد دارد. از مزایای کاربرد اپی توپ‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد. ۱- یک اپی توپ خاص می‌تواند به پروتئین‌های مختلف اضافه شده و همه این پروتئین‌ها توسط آنتی بادی آن شناسایی شوند و لذا از تهیه آنتی بادی برای همه پروتئین‌ها که کاری وقت گیر است بی‌نیاز می‌شویم. ۲- از آنجاییکه توالی‌های اپی توپ معمولاً بیش از ۳ تا ۱۴ اسید آمینه طول ندارد، اضافه شدن آنها ساختار و عملکرد پروتئین را دستخوش تغییر نمی‌کند. ۳- شناسایی و مطالعه پروتئین‌هایی که تخلیص و جداسازی آنها مشکل است با استفاده از این تکنیک، تسهیل می‌شود. ۴- تأثیر کم روی ساختمان سوم و فعالیت بیولوژیکی. موقعیت و جایگاه پروتئین‌ها را در سلول به کمک این روش می‌توان تعیین کرد. بر هم کنش یک پروتئین با سایر پروتئین‌ها و یا شناسایی ساختار زیر واحدهای پروتئینی با استفاده از این روش قابل بررسی است (بوشر و همکاران، ۲۰۰۲). یکی از این اپی توپ‌ها، اپی توپ c-myc است که تنها ده اسید آمینه طول دارد و توالی این پلی‌پپتید EQKLISEEDL می‌باشد. این اپی توپ از قسمتی از پروتئین انسانی c-myc تهیه شده است (اوان و همکاران، ۱۹۸۵).

وکتوری که برای انتقال ژن‌ها درون سلول‌های گیاهی به کار می‌رود پلاسمیدی است که از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* که باکتری خاکزی و گرم منفی است استخراج می‌شود. در طبیعت این باکتری گیاهان را آلوده می‌کند. پلاسمیدی که مسول ایجاد تومور است پلاسمید Ti نامیده می‌شود. پلاسمید Ti قسمتی از DNA خود را که T-DNA نامیده می‌شود به و بین دو توالی تکراری کوتاه به نام‌های RB و LB قرار گرفته اند درون DNA کروموزومی سلول گیاه میزبان وارد

می‌کند. بیان موقت به واسطه آگروباکتریوم ابزاری مفید برای بیان سازه‌های ژنی در گیاه است. سیستم بیانی موقت روشی پرسرعت است و معمولاً ۲ تا ۳ روز بعد از تزریق نتیجه قابل مشاهده است. فعالیت این سیستم در تمام بافت‌های و در گیاهان توتون، سیب زمینی و آرابیدوپسیس به خوبی سیستم‌های کشت سلولی است (لارس، ۲۰۰۲).

نتایج این پژوهش نشان داد ۲۰۰ آمینو اسید انتهایی پروتئین pthA روی برگ گیاهان توتون رقم *Xanthi* و *Benthamiana* و برگ گیاهان *Citrus latifolia*، *Citrus sinensis*، *Citrus aurantifolia* و *Brassica napus* ایجاد HR و شانکر می‌کند. نتایج وسترن نشان می‌دهد بعد از تزریق آگروباکتریوم حاوی آپتامر به گیاه، ۳ و ۵ روز بعد از بیان، آپتامر در گیاه وجود دارد اما مقدار آن به تدریج کاهش می‌یابد. ۲۰۰ آمینو اسید انتهایی پروتئین pthA ۳ روز بعد از بیان آپتامر در گیاهان توتون رقم *Xanthi* و *Benthamiana* و گیاهان *Citrus latifolia*، *Citrus sinensis*، *Citrus aurantifolia* و *Brassica napus* تزریق شد و ۳ روز بعد از تزریق این پروتئین کاهش علائم HR در گیاهان *Xanthi* و *Benthamiana* و کاهش علائم شانکر در گیاهان *Citrus latifolia*، *Citrus sinensis*، *Citrus aurantifolia* و *Brassica napus* مشاهده شد و چون همه آپتامرها به همه pthA های موجود در برگ متصل نمی‌شود و همچنان pthA آزاد در برگ وجود دارد، مقداری علائم بروز می‌کند. در ۹ روز بعد از تزریق ۲۰۰ آمینو اسید انتهایی پروتئین pthA علائم HR و شانکر بیشتر شد و این به دلیل از بین رفتن آپتامر و دوباره ظاهر شدن عملکرد پروتئین است.

آزمون الایزا جهت تایید برقراری اتصال بین آپتامر و ۲۰۰ آمینو اسید انتهایی پروتئین pthA در شرایط آزمایشگاهی انجام شد و این آزمون صحت اتصال را تایید کرد.

نتایج بیوانفورماتیکی تاییدی بر اتصال بین آپتامر و ۲۰۰ آمینو اسید انتهای پروتئین pthA بود. این نتایج نشان داد دو پیوند الکترواستاتیکی بین لیگاند (آپتامر) و رسپتور (پروتئین) وجود دارد و این پیوندها بین اسید آمینه گلوتامین ۱۶۰ از رسپتور با اسیده آمینه پرولین از لیگاند برقرار است.

پیشنهادات

۱. مطالعه برهم کنش بین آپتامر و pthA در شرایط آزمایشگاهی به کمک NMR و XRD
۲. تولید واریه مقاوم لیمو و مرکبات از طریق انتقال دائم سازه آپتامری به این گیاهان
۳. بررسی اثراتی که بیان دائم آپتامر روی سایر صفات گیاه در سطح میکرو و ماکرو می گذارد.
۴. داکینگ پروتئین pthA با لیگاند آپتامری و بررسی نواحی اتصال

الهی نیا س، (۱۳۸۳) "بیماری‌های درختان میوه و برخی از گیاهان باغی و روش‌های مبارزه با آن‌ها". انتشارات دانشگاه گیلان، ص ۵۶۹.

رشیدی فر م. فرخی ن. عسگری ح. علوی م و برادران م، (۱۳۹۳) "بررسی تنش اکسیداتیو سوختگی باکتریایی معمولی در لوبیا" پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهرود.

ریاحی پ. فرخی ن. ترکمن زهی ا. علوی م و قلمبران م، (۱۳۹۲) "بررسی تنش اکسیداتیو نانوذرات آهن در گیاه لوبیا" پایان نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان.

شیرچیان م ج. فرخی ن. علوی م و ابراهیمی م ع، (۱۳۹۲) "جداسازی و شناسایی باکتریوفاج کنترل کننده عامل بیماری شانکر مرکبات" دانشگاه پیام نور کرج.

عزتی ر. فرخی ن و علوی م، (۱۳۹۲) "تعیین ویژگی آنزیم فنل اکسیداز و پپتیدهای ضد میکروبی در همولنف شب پره هندی *Plodia interpunctella* تیمار شده با قارچ *Beauveria bassiana* و باکتری *Pseudomonas sp*" پایان نامه دکتری حشره شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

کاظم‌زاده س. فرخی ن. ممرآبادی م. امین‌زاده س و قرنجیک ش، (۱۳۹۱)، پایان نامه ارشد "بررسی برهم کنش قارچ‌ها بر باکتری‌های پاتوژن گیاهی به منظور کنترل زیستی باکتری‌های پاتوژن گیاهی" پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهرود.

مستوفی زاده ر و رحیمیان ح، (۱۳۷۵) "وقوع آلودگی نوع آسیایی شانکر باکتریایی مرکبات در ایران" بیماری‌های گیاهی. جلد ۳۲، صفحه ۲۹۰.

محمودی ه. رهنما ک و عرب خانی م ع، (۱۳۸۹) "بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس و عصاره آبی گیاهان دارویی بر باکتری‌های عامل شانکر و لکه برگی درختان میوه هسته دار" نشریه گیاهان دارویی، شماره ۳۶، دوره ۹، صفحه ۳۴ تا ۴۲.

نصیری نژاد ا. بهادر ن و نوروزنژاد م، (۱۳۹۳) "ارزیابی اثر ضد باکتریایی چوب مسواک، آویشن و شیرین بیان بر مهار رشد *Xanthomonas axonopodis* جداسازی شده از شهرستان جهرم" دومین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار.

Ahangarzadeh, S., Daneshvar, M.H., Rajabi-Memari, H., Galehdari, H., and Alamisaied, K. (2012). Cloning, Transformation and expression of human interferon $\alpha 2b$ gene in tobacco plant (*Nicotiana tabacum* cv. *xanthi*). *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 7, 111.

Al-Saadi, A., Reddy, J.D., Duan, Y.P., Brunings, A.M., Yuan, Q., and Gabriel, D.W. (2007). All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one pthA homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 934-943.

Arlett, J., Myers, E., and Roukes, M. (2011). Comparative advantages of mechanical biosensors. *Nature Nanotechnology* 6, 203-215.

Bergamin Filho, A., and Hughes, G. (2000). Citrus canker epidemiology-methodologies and approaches: a moderated discussion session. 24-25.

Biroccio, A., Hamm, J., Incitti, I., De Francesco, R., and Tomei, L. (2002). Selection of RNA aptamers that are specific and high-affinity ligands of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology* 76, 3688-3696.

Büttner, D., Nennstiel, D., Klüsener, B., and Bonas, U. (2002). Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of bacteriology* 184, 2389-2398

Bruno, J., Carrillo, M., and Phillips, T. (2008). In vitro antibacterial effects of antilipopolysaccharide DNA aptamer-C1qrs complexes. *Folia Microbiologica* 53.295-302

Bruno, J.G., Carrillo, M.P., Phillips, T., and Andrews, C.J. (2010). A novel screening method for competitive FRET-aptamers applied to *E. coli* assay development. *Journal of Fluorescence* 20, 1211-1223.

Bruno, J.G., and Kiel, J.L. (1999). In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. *Biosensors and Bioelectronics* 14, 457-464.

Bunka, D.H., and Stockley, P.G. (2006). Aptamers come of age—at last. *Nature Reviews Microbiology* 4, 588-596.

Chand, J., and Pal, V. (1982). Citrus canker in India and its management. *Problems of citrus diseases in india*/edited by SP Raychaudhuri, YS Ahlawat.

Chen, P.-Y., C.-K. Wang, et al. (2003). Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular Breeding* 4, 287-293

Chichester, J. A., K. Musiychuk, et al. (2007). Immunogenicity of a subunit vaccine against *Bacillus anthracis*. *Vaccine* 16,3111-3114.

- Civerolo, E. (1984). Bacterial canker disease of citrus [*Xanthomonas campestris*]. Journal of The Rio Grande Valley Horticultural Society.
- Das, A. (2003). Citrus canker-A review. Journal of Applied Horticulture 5, 52-60.
- Dewoody, R.S., Merritt, P.M., and Marketon, M.M. (2013). Regulation of the Yersinia type III secretion system: traffic control. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 3.
- Dollins, C.M., Nair, S., and Sullenger, B.A. (2008). Aptamers in immunotherapy. Human Gene Therapy 19, 443-450.
- Dos Santos, R., and Dianese, J. (1985). Comparative membrane characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *cassavae* and *X. campestris* pv. *manihotis*. Phytopathology 75, 581-587.
- Duan, Y., Castaneda, A., Zhao, G., Erdos, G., and Gabriel, D. (1999). Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. Molecular Plant-Microbe Interactions 12, 556-560.
- Fukuda, K., Vishnuvardhan, D., Sekiya, S., Hwang, J., Kakiuchi, N., Taira, K., Shimotohno, K., Kumar, P.K., and Nishikawa, S. (2000). Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease. European Journal of Biochemistry 267, 3685-3694.
- Germer, K., Leonard, M., and Zhang, X. (2013). RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology 4, 27.
- Gopinath, S.C., Sakamaki, Y., Kawasaki, K., and Kumar, P.K. (2006). An efficient RNA aptamer against human influenza B virus hemagglutinin. Journal of Biochemistry 139, 837-846.
- Goto, M. (1962). Studies on citrus canker. I Bull Fac Agric Shizuoka Univ Itwada, Japan, 12, 3-72.
- Goto, M. (1992). Citrus canker. Plant Diseases of International Importance 3, 170-208.
- Goto, M., Tadauchi, Y., and Okabe, N. (1979). Interaction between *Xanthomonas citri* and *Erwinia herbicola* in vitro and in vivo. Annals of the Phytopathological Society of Japan 45, 618-624.

Gottwald, T.R., Graham, J.H., and Schubert, T.S. (2002). Citrus canker: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress* 10.

Graham, J., Gottwald, T., Riley, T., Cubero, J., and Drouillard, D. (2002). Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Xcc) on various surfaces and chemical control of Asiatic citrus canker (ACC). Paper presented at Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop, Ft Pierce FL.

Hancock, R. (1991). Bacterial outer membranes: Evolving concepts. *ASM American Society for Microbiology News* 57, 175-182.

Homann, M., and Göringer, H.U. (1999). Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acids Research* 27, 2006-2014.

Hoogenboom, H.R. (2002). Overview of antibody phage-display technology and its applications. In *Antibody Phage Display* (Springer), pp. 1-37.

Huang, J.X., Bishop-Hurley, S.L., and Cooper, M.A. (2012). Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 4569-4582.

Ireson, C.R., and Kelland, L.R. (2006). Discovery and development of anticancer aptamers. *Molecular Cancer Therapeutics* 5, 2957-2962.

Jang, K.J., Lee, N.-R., Yeo, W.-S., Jeong, Y.-J., and Kim, D.-E. (2008). Isolation of inhibitory RNA aptamers against severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus NTPase/Helicase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366, 738-744.

Kalita, P., Bora, L., and Bhagabati, K. (1996). Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. *Indian Phytopathology* 49, 234-237.

Keefe, A.D., Pai, S., and Ellington, A. (2010). Aptamers as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 537-550.

Lahaye, T., and Bonas, U. (2001). Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends in Plant Science* 6, 479-485.

Liu, W., Zheng, B., Cheng, S., Fu, Y., Li, W., Lau, T.-C., and Liang, H. (2012). G-quadruplex formation and sequence effect on the assembly of G-rich oligonucleotides induced by Pb²⁺ ions. *Soft Matter* 8, 7017-7023.

Mendes, B., Cardoso, S., Boscariol-Camargo, R., Cruz, R., Mourão Filho, F., and Bergamin Filho, A. (2010). Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic Citrus sinensis expressing the rice *Xa21* gene. *Plant Pathology* 59, 68-75.

Na, L., Hu, C.-H., Long, G.-Y., Dai, S.-M., XIE, Y.-m., and DENG, Z.-n. (2010). Preparation of monoclonal antibody against PthA-NLS and cloning of the relative *ScFv* Gene. *Agricultural Sciences in China* 9, 85-92.

Nayak, M., Kotian, A., Marathe, S., and Chakravorty, D. (2009). Detection of microorganisms using biosensors-A smarter way towards detection techniques. *Biosensors and Bioelectronics* 25, 661-667.

Ota, T. (1983). Interactions in vitro and in vivo between *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and antagonistic *Pseudomonas* sp. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*.

Ramakrishnan, T. (1954). Common diseases of citrus in Madras state. Govt of Madras publication.

Rossetti, V. (1977). Citrus canker in Latin America: a review. Paper presented at: Proceedings of the International Society of Citriculture.

Sampson, T. (2003). Aptamers and SELEX: the technology. *World Patent Information* 25, 123-129.

Schubert, T.S., Rizvi, S.A., Sun, X., Gottwald, T.R., Graham, J.H., and Dixon, W.N. (2001). Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida-Again. *Plant Disease* 85, 340-356.

Shiotani, H., Fujikawa, T., Ishihara, H., Tsuyumu, S., and Ozaki, K. (2007). A pthA homolog from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* responsible for host-specific suppression of virulence. *Journal of Bacteriology* 189, 3271-3279.

Song, K.-M., Lee, S., and Ban, C. (2012). Aptamers and their biological applications. *Sensors* 12, 612-631.

Sooter, L.J., Riedel, T., Davidson, E.A., Levy, M., Cox, J.C., and Ellington, A.D. (2001). Toward automated nucleic acid enzyme selection. *Biological Chemistry* 382, 1327-1334.

Stall, R.E., and Seymour, C.P. (1983). Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast states. *Plant Disease* 67, 581-585.

Starr, J. (1982). The brominated aryl-polyen pigments of *Xanthomonas juglandis* protect against photobiological damage. *Current Microbiology* 7, 323-326.

Syed, M.A., and Pervaiz, S. (2010). Advances in aptamers. *Oligonucleotides* 20, 215-224.

Volk, W.A. (1966). Cell wall lipopolysaccharides from *Xanthomonas* species. *Journal of Bacteriology* 91, 39-42.

Volk, W.A. (1968). Quantitative assay of polysaccharide components obtained from cell wall lipopolysaccharides of *Xanthomonas* species. *Journal of Bacteriology* 95, 980-982.

Yamamoto, R., Katahira, M., Nishikawa, S., Baba, T., Taira, K., and Kumar, P.K. (2000). A novel RNA motif that binds efficiently and specifically to the Tat protein of HIV and inhibits the trans-activation by Tat of transcription in vitro and in vivo. *Genes to Cells* 5, 371-388.

Yang, L., and Bashir, R. (2008). Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances* 26, 135-150.

Yang, L., Hu, C., Li, N., Zhang, J., Yan, J., and Deng, Z. (2011). Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with pthA-nls for acquiring resistance to citrus canker disease. *Plant Molecular Biology* 75, 11-23.

Yi-Xian, W., Zun-Zhong, Y., Cheng-Yan, S., and Yi-Bin, Y. (2012). Application of aptamer based biosensors for detection of pathogenic microorganisms. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 40, 634-642.

Zelada-Guillén, G.A., Riu, J., Düzgün, A., and Rius, F.X. (2009). Immediate detection of living bacteria at ultralow concentrations using a carbon nanotube based potentiometric aptasensor. *Angewandte Chemie International Edition* 48, 7334-7337.

Abstract

Citrus canker, decreases performance and quality of citrus produce mainly in lime and orange. On the basis of article 16 of plant protection developed by Iranian ministry of agriculture on 2004, citrus canker was considered a quarantine disease. In which the movement of infected plant parts are not allowed to be transferred out of following provinces, namely Hormozgan, Sistan and Baluchestan, Jiroft and Kahnooj in kerman, Ghir and Karzyn in Fars. Canker can be controled under conventional and new techniques. Chemical pesticides do have adverse effects on ecosystems, human health and livestock. New methods include bacteriocins, antibodies, bacteriophage and aptamer. Aptamers are oligonucleotides, consisting of DNA, single stranded RNA or peptide molecules. They can bind to a target molecule with high affinity and specificity. Citrus canker cause by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, which is divided into 5 groups. Among which type A and A* damage citrus in Iran. PthA is avrBs3/pthA family that has significant effect on the bacteria. Mutations in the effector molecules, affects pathogenicity. This study aimed to clone and express the aptamer YPASYMQ in tobacco plant to reduce the impact of pthA. The results showed the leaf tobacco cultivar *Xanthi*, *Benthamiana* and *Citrus latifolia*, *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia* 3 days after expressing aptamer YPASYMQ was injected with pthA have significant difference compare with control (only protein pthA) in response HR and symptoms the canker. But there was no significant difference in *Brassica napus*. Aptamer could reduce pthA protein and Western blot test results, aptamer in 11 days after the expression is exist but its value is reduced.

Key word: Aptamer, canker, *pthA*, Transient expression



University of Shahrood

Faculty of agriculture

Suppression of *pthA* with an construct beanig of an aptameric sequence

Maryam Ramezani Aghdam

**Supervisors:
Naser Farokhi
Reza Safarnejad**

**Cosupervisors:
Mehdi Alavi
Shahrokh Gharanjik**

September 2015