بسم الله الرحمن الرحیم

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب *فاطمه شهریاری* دانشجوی رشته‌ی *بیماری‌شناسی گیاهی* ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۷ مقطع *دکتری* دانشکده *کشاورزی* متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:

تاریخ:

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت-های علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته **بیماری‌شناسی گیاهی** است که در سال **۱۳۹۱** دانشکده **کشاورزی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی آقای **دکتر مسعود شمس‌بخش** و آقای **دکتر محمدرضا صفرنژاد** و مشاوره‌ی آقای **دکتر ناصر صفائی** از آن دفاع شده است. »

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶- اینجانب *فاطمه شهریاری* دانشجوی رشته‌ی *بیماری‌شناسی گیاهی* مقطع *دکتری* تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: فاطمه شهریاری

تاریخ و امضاء:

دانشکده کشاورزی

رساله دوره دکتری بیماری‌شناسی گیاهی

بیان آنتی‌بادی اختصاصی علیه پروتئین غشایی (Immunodominant membrane protein) عامل جاروک لیموترش در گیاه توتون

نگارنده

فاطمه شهریاری

اساتید راهنما

آقای دکتر مسعود شمس‌بخش

آقای دکتر محمدرضا صفرنژاد

استاد مشاور

آقای دکتر ناصر صفایی

زمستان ۹۱

تقدیم به:

خورشید آسمان زندگی (پدرم)

مهتاب لحظه های بودن (مادرم)

همراهان همیشگی (خواهران و برادرانم)

تقدیر و تشکر

به یاری وجودی همه جود، لایزال و نامتناهی وجود، بی آغازی بی انتها و بی انبازی یکتا:

بر اساس اصل وزین «ان اشکرکم لله، اشکرکم للناس»

مراتب سپاس و تشکر خود را نثار همه عزیزانی می نمایم که مراد انجام این پژوهش یاری نموده اند:

اساتید بزرگوار راهنما جناب آقای دکتر شمس بخش و جناب آقای دکتر صفرنژاد که انجام این پژوهش بدون حمایت های بی دریغ و رهنمودهای ارزنده ایشان ممکن نبود،

استاد مشاور جناب آقای دکتر صفایی و استادان ارجمند گروه جناب آقای دکتر محمدی گل تپه و جناب آقای دکتر پورجم،

اساتید محترم ناظر که متن رساله را موشکافانه مطالعه کردند و با ارائه پیشنهادات ارزشمندشان اینجانب را در بهبود کیفیت نگارش رساله یاری رساندند،

مؤسسه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج، بخصوص ریاست، اعضای هیات علمی و کارشناسان بخش بیوتکنولوژی میکروبی،

مؤسسه سرم سازی رازی، بخصوص جناب آقای دکتر عطایی،

پژوهشکده رویان، بخصوص جناب آقای دکتر حسینی سالک ده و آقای مهندس رسولی،

مؤسسه فرانهافر آلمان، بخصوص جناب آقای پروفسور شیلبرگ و سرکار خانم دکتر نولکه که در طول دوره فرصت مطالعاتی، بسیار از ایشان آموختم،

دوست عزیزم، سرکار خانم باکویی و نیز همه دوستان و عزیزانی که در این مسیر به هر طریقی اینجانب را یاری نموده اند

و خانواده عزیزم که همواره پشتیبان و مایه دلگرمی اینجانب بوده اند.

چکیده

بیماری جاروک لیموترش توسط *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia ایجاد شده و یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های لیموترش در مناطق گرم جنوبی کشور به شمار می‌رود و سالیانه هزاران درخت را نابود می‌کند. روش‌های قدیمی از قبیل حذف درختان آلوده و کنترل حشره ناقل قابلیت محدودی در مدیریت بیماری دارند. امروزه بیوتکنولوژی مولکولی روش‌های جدید و مؤثری برای کنترل بیمارگرها در گیاهان فراهم کرده که امکان تولید گیاهان تراریخت مقاوم به فیتوپلاسما یکی از این موارد می‌باشد. تولید گیاه مقاوم به بیمارگر با کمک آنتی‌بادی، بر اساس بیان آنتی‌بادی‌های نوترکیب متصل شونده به پروتئین‌های ضروری و حیاتی بیمارگر و جلوگیری از گسترش آن در گیاه است. در مطالعه حاضر تولید و تعیین خصوصیات آنتی‌بادی‌های نوترکیب scFv اختصاصی علیه پروتئین غشایی فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش انجام گرفت. پروتئین Immunodominant membrane protein (IMP) در سطح غشاء فیتوپلاسما قرار دارد و نقش ضروری در ایجاد بیماری بیمارگر در گیاه میزبان و حشره ناقل (*Hishimonus phycitis*) دارد. در این تحقیق ژن رمزکننده IMP عامل بیماری جاروک لیموترش با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر گردید. محصول PCR به‌طور مستقیم در ناقل PTZ57R/T همسانه‌سازی شدند. سپس ژن مورد نظر در ناقل بیانی pET28a همسانه‌سازی شد و پروتئین نوترکیب در باکتری *E. coli* سویه BL21 بیان گردید. خالص‌سازی پروتئین در شرایط طبیعی با روش کروماتوگرافی تمایلی انجام شد. بیان موفق و مراحل خالص‌سازی به‌وسیله SDS-PAGE و سپس آنالیز وسترن بلات تأیید گردید. پروتئین نوترکیب برای ایمنی‌زایی خرگوش و تولید آنتی‌بادی چند همسانه‌ای اختصاصی و همچنین غربالگری کتابخانه‌های نمایش فاژی جهت تهیه آنتی‌بادی‌های نوترکیب single-chain variable fragment (scFv) استفاده شد. پس از خالص‌سازی آنتی‌سرم حاصل از خرگوش، آنتی‌بادی با آنزیم آلکالین فسفاتاز نشاندار شد. نتایج آزمایش‌های سرولوژیکی بلاتینگ و DAS-ELISA مؤید کارکرد مؤثر و دقیق آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده برای شناسایی فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیمو ترش بود. تکنیک نمایش فاژی امکان انتخاب آنتی‌بادی‌های نوترکیب ویژه علیه یک آنتی‌ژن خاص را فراهم کرده است. پروتئین IMP نوترکیب جهت پنینگ کتابخانه‌های نمایش فاژیTomlinson I&J استفاده شد و در نهایت ۹۶ کلنی انتخاب و توانایی تولید آنتی‌بادی نوترکیب (scFv) توسط آنها با آزمون‌های الایزا و ایمنوبلات بررسی شد. آنتی‌بادی‌های نوترکیب تولید شده در آزمون الایزا جهت شناسایی نمونه‌های گیاهی آلوده به جاروک لیموترش و پروتئین IMP نوترکیب استفاده گردید و اختصاصی بودن آنتی بادهای نوترکیب منتخب تأیید شد. در نهایت ژن آنتی‌بادی نوترکیب scFvIMP6 که اختصاصیت و قابلیت اتصال بالا به پروتئین IMP داشت، برای بیان موقت در گیاه *Nicotiana benthamiana* انتخاب شد. ژن رمزکننده این آنتی‌بادی در ناقل بیانی گیاهی (pTRA) تحت کنترل پروموتر دائمی *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S یا پروموتر *Coconut foliar decay virus* (CFDV) اختصاصی آوند آبکش در سازه‌های ژنی با یا بدون سیگنال پپتید قرار گرفت و بیان پروتئین در سیتوسول یا آپوپلاست سلول گیاهی بررسی شد. سازه‌های ژنی با agroinfiltration در گیاه *N. benthamiana* به‌صورت موقت بیان شدند. در آنالیزهای ایمونوبلات آنتی‌بادی‌هایی با اندازه پیش‌بینی شده ردیابی شد. آنتی‌بادی‌های بیان شده در گیاه با کروماتوگرافی تمایلی خالص‌سازی شدند و توانایی اتصال آن‌ها به IMP با آزمون الایزا تأیید گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که با کارایی و پایداری مشاهده شده در بیان موقت، به نظر می‌رسد که آنتی‌بادی scFv حاصل می‌تواند پس از انتقال پایدار به گیاه لیموترش به خوبی بیان شود و کاندیدای مناسبی برای ممانعت از بیماری جاروک در گیاه باشد.

کلمات کلیدی: بیماری جاروک لیموترش، *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia، پروتئین نوترکیب، تکنیک نمایش فاژی، آنتی‌بادی نوترکیب، آنتی‌بادی چند همسانه‌ای، بیان موقت، *Nicotiana benthamiana*

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۱

فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام گرفته ۷

۲-۱- گیاه‌شناسی لیموترش ۸

۲-۲-اهمیت مرکبات در دنیا و ایران ۱۰

۲-۳- بیماری‌های مهم مرکبات در دنیا و ایران ۱۳

۲-۴- بیماری جاروک لیموترش ۱۴

۲-۴-۱- تاریخچه ۱۴

۲-۴-۲- علایم بیماری ۱۴

۲-۴-۳- عامل بیماری ۱۶

۲-۴-۴- انتقال بیماری ۱۷

۲-۴-۵- دامنه میزبانی عامل بیماری ۱۸

۲-۴-۶- مدیریت بیماری ۲۰

۲-۵- روش‌های شناسایی بیمارگر ۲۱

۲-۵-۱- مشاهده میکروسکوپی ۲۱

۲-۵-۲- روش‌های مولکولی ۲۱

۲-۵-۳- روش‌های سرولوژیکی ۲۲

۲-۶- پروتئین‌های غشایی فیتوپلاسماها ۲۴

۲-۷– ایمنوگلوبولین و آنتی‌ژن ۲۶

۲-۸- آنتی‌بادی مونوکلونال و نوترکیب ۲۸

۲-۹- تکنولوژی نمایش فاژی ۳۰

۲-۹-۱- اصول نمایش فاژی ۳۲

۲-۱۰- ایجاد مقاومت در گیاهان علیه بیمارگر با استفاده از آنتی‌بادی‌ها ۳۴

فصل سوم: مواد و روش‌ها ۴۰

۳-۱- مواد ۴۱

۳-۱-۱- بافر، محیط کشت و محلول‌ها ۴۱

۳-۱-۲- ستون خالص‌سازی و غشا ۴۱

۳-۱-۳- آنزیم‌ها وکیت‌ها..... ۴۱
۳-۱-۴- آنتی‌بادی‌های اولیه، آنتی‌بادی‌های ثانویه اتصال یافته به آنزیم و پیش‌ماده‌ها.....۴۲
۳-۱-۵- آغازگرها.....۴۳
۳-۱-۶- سویه‌های باکتریایی.....۴۳
۳-۱-۷- پلاسمیدها و فاژمیدها.....۴۴
۳-۲- روش‌ها.....۴۴
۳-۲-۱- کشت و نگه‌داری باکتری‌ها.....۴۴
۳-۲-۱-۱-کشت و نگهداری باکتری *E. coli* ۴۴
۳-۲-۱-۲- کشت و نگهداری باکتری *Agrobacterium* ۴۵
۳-۲-۲- تراریخت‌سازی سلول‌های باکتریایی.....۴۵
۳-۲-۲-۱- تهیه سلول‌های مستعد *E. coli* جهت تراریخت‌سازی به روش شوک حرارتی.....۴۵
۳-۲-۲-۲- تهیه سلول‌های مستعد *E. coli* جهت تراریخت‌سازی به روش الکتروپوریشن.....۴۶
۳-۲-۲-۳- تهیه سلول‌های مستعد *Agrobacterium* جهت الکتروپوریشن.....۴۷
۳-۲-۲-۴- تراریخت‌سازی *E. coli* به روش شوک حرارتی.....۴۷
۳-۲-۲-۵- تراریخت‌سازی *E. coli* به روش الکتروپوریشن.....۴۸
۳-۲-۲-۶- تراریخت‌سازی *Agrobacterium* به روش الکتروپوریشن..... ۴۸
۳-۲-۳- تکثیر ژن رمزکننده IMP با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز.....۴۹
۳-۲-۴- خالص‌سازی قطعات DNA از ژل الکتروفورز.....۴۹
۳-۲-۵- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از کلنی‌ها.....۵۰
۳-۲-۶- استخراج DNA ژنومی از گیاه به روش CTAB.....۵۰
۳-۲-۷- استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی.....۵۱
۳-۲-۸- همسانه‌سازی ژن رمزکننده IMP در ناقل pTZ57R/T.....۵۲
۳-۲-۹- تعیین توالی کلنی‌های منتخب حاوی ژن رمزکننده IMP.....۵۳
۳-۲-۱۰- همسانه‌سازی ژن رمزکننده IMP در ناقل بیانی pET28a..... ۵۳
۳-۲-۱۱- بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب IMP در شرایط طبیعی.....۵۳
۳-۲-۱۱-۱- بیان پروتئین نوترکیب در مقیاس آزمایشگاهی.....۵۳
۳-۲-۱۱-۲- تهیه lysate باکتری *E. coli* تحت شرایط طبیعی.....۵۴
۳-۲-۱۱-۳- تخلیص پروتئین‌های نوترکیب به‌کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی.....۵۴
۳-۲-۱۲- عصاره‌گیری از گیاهان آلوده و سالم.....۵۵
۳-۲-۱۳- آنالیز پروتئین.....۵۵
۳-۲-۱۳-۱- تعیین غلظت پروتئین‌های محلول.....۵۵

۳-۲-۱۳-۲- تهیه ژل اکریل آمید (SDS-PAGE) و رنگ‌آمیزی ژل به‌وسیله‌ی کوماسی بلو ۵۶
۳-۲-۱۴- روش‌های سرولوژیکی ۵۷
۳-۲-۱۴-۱- آنالیز وسترن بلات (Western blot analysis) ۵۷
۳-۲-۱۴-۲- آنالیز دات بلات ۵۹
۳-۲-۱۴-۳- الایزا (ELISA) ۵۹
۳-۲-۱۵- ایمنی‌زایی خرگوش با پروتئین IMP نوترکیب ۶۲
۳-۲-۱۵-۱- تهیه آنتی‌سرم از خرگوش‌های ایمن شده و خالص‌سازی IgG ۶۲
۳-۲-۱۵-۲- نشاندار کردن آنتی‌بادی پلی‌کلونال با آنزیم آلکالین فسفاتاز ۶۳
۳-۲-۱۶- تهیه آنتی‌بادی‌های نوترکیب scFv علیه پروتئین IMP نوترکیب ۶۳
۳-۲-۱۶-۱- تکثیر فاژ کمکی M13K017 ۶۳
۳-۲-۱۶-۲- تکثیر کتابخانه‌های فاژی و تهیه فاژ ۶۴
۳-۲-۱۶-۳- غربالگری کتابخانه‌های نمایش فاژی (پنینگ) ۶۵
۳-۲-۱۶-۴- تولید قطعات آنتی‌بادی scFv محلول ۶۷
۳-۲-۱۷- تکثیر ژن رمزکننده آنتی‌بادی‌های نوترکیب scFv موردنظر با آغازگرهای pHEN ۶۸
۳-۲-۱۸- انگشت‌نگاری به‌وسیله آنزیم *Bst*N1 ۶۸
۳-۲-۱۹- توالی‌یابی ژن رمزکننده آنتی‌بادی‌های نوترکیب scFv ۶۹
۳-۲-۲۰- بیان و خالص‌سازی آنتی‌بادی‌های scFv محلول ۶۹
۳-۲-۲۰-۱- بیان آنتی‌بادی‌های scFv محلول توسط فاژمید pIT2 در مقیاس کم ۶۹
۳-۲-۲۰-۲- بیان و خالص‌سازی آنتی‌بادی‌های نوترکیب scFv در مقیاس زیاد ۶۹
۳-۲-۲۱- تولید و آنالیز پلانتی‌بادی ۷۱
۳-۲-۲۱-۱- همسانه‌سازی ژن رمزکننده آنتی‌بادی نوترکیب scFvIMP6 در ناقل بیانی گیاهی ۷۱
۳-۲-۲۱-۲- رشد و نگهداری گیاه *Nicotiana benthamiana* ۷۲
۳-۲-۲۱-۳- تهیه *Agrobacterium tumefaciens* نوترکیب جهت تزریق به گیاه ۷۲
۳-۲-۲۱-۴- تراریخت‌سازی موقت برگ‌های گیاه با *Agrobacterium tumefaciens* ۷۳
۳-۲-۲۱-۵- استخراج کل پروتئین‌های محلول از برگ‌های گیاه ۷۳
۳-۲-۲۱-۶- خالص‌سازی آنتی‌بادی‌های scFv تولید شده در برگ‌های تراریخت شده گیاهان ۷۴
فصل چهارم: نتایج ۷۶
۴-۱- استخراج DNA ژنومی و تکثیر ژن رمزکننده IMP با آغازگرهای اختصاصی ۷۷
۴-۲- همسانه‌سازی و انتقال پلاسمید نوترکیب حاوی ژن رمزکننده IMP به باکتری ۷۸
۴-۳- انتخاب کلنی‌های حاوی ژن رمزکننده IMP ۷۸

۴-۴- تعیین توالی ۷۹
۴-۵- تولید و خالص‌سازی پروتئین IMP نوترکیب ۸۲
۴-۶- تعیین غلظت پروتئین نوترکیب ۸۵
۴-۷- تهیه آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه عامل فیتوپلاسمای جاروک لیموترش ۸۵
۴-۷-۱- ایمنی‌زایی و بررسی کمیت آنتی‌سرم حاصل از خرگوش ۸۵
۴-۷-۲- خالص‌سازی و نشاندار کردن آنتی‌بادی ۸۶
۴-۷-۳- آنالیز تکمیلی ۸۷
۴-۷-۳-۱- آنالیز وسترن بلات و دیبا ۸۷
۴-۷-۳-۲- آزمون DAS-ELISA ۸۸
۴-۸- تهیه آنتی‌بادی‌های scFv علیه پروتئین IMP نوترکیب عامل جاروک لیموترش ۹۰
۴-۸-۱- تکثیر فاژ کمکی M13K017 ..... ۹۰
۴-۸-۲- تهیه، تکثیر و غربالگری کتابخانه فاژی ۹۱
۴-۸-۳- لکه گذاری و وسترن‌بلات به‌منظور تأیید بیان آنتی‌بادی‌های scFv محلول ۹۲
۴-۸-۴- الایزای غیرمستقیم جهت شناسایی آنتی‌بادی‌های نوترکیبscFv محلول علیه IMP ۹۲
۴-۸-۵- تکثیر ژن رمزکننده آنتی‌بادی‌های نوترکیب scFv مورد نظر با آغازگرهای pHEN ۹۳
۴-۸-۶- انگشت نگاری به‌وسیله آنزیم *Bst*NI ۹۴
۴-۸-۷- توالی‌یابی ژن‌های رمزکننده آنتی‌بادی‌های scFv ۹۵
۴-۸-۸-بررسی اختصاصیت آنتی‌بادی‌های نوترکیب scFv علیه IMP در آزمون وسترن بلات ۹۷
۴-۸-۹- آزمون الایزا جهت بررسی کارایی آنتی‌بادی‌های نوترکیب scFv در تفکیک نمونه‌ها ۹۸
۴-۹- بیان و خالص‌سازی آنتی‌بادی نوترکیب scFvIMP6 در مقیاس زیاد ۹۹
۴-۹-۱- بیان و خالص‌سازی آنتی‌بادی نوترکیب scFvIMP6 با استفاده ازIMAC ۹۹
۴-۹-۲- بررسی کارایی آنتی‌بادی نوترکیب scFvIMP6 خالص‌شده علیه IMP در آزمون الایزا ۱۰۰
۴-۱۰- بیان موقت ژن آنتی‌بادی در گیاه ۱۰۱
۴-۱۰-۱- همسانه‌سازی ژن رمزکننده آنتی‌بادی نوترکیب scFvIMP6 در ناقل بیانی گیاهی pTRA ۱۰۱
۴-۱۰-۱-۱- همسانه‌سازی ژن رمزکننده آنتی‌بادی scFvIMP6 در ناقل‌های pTRA و ۱۰۱
۴-۱۰-۱-۲- همسانه‌سازی ژن رمزکننده آنتی‌بادی scFvIMP6 در وکتور pTRA تحت ۱۰۳
۴-۱۰-۱-۳- همسانه‌سازی ژن رمزکننده آنتی‌بادی scFvIMP6 در وکتور تحت کنترل ۱۰۵
۴-۱۰-۲- بیان موقت در برگ‌های گیاه *Nicotiana benthamiana* ۱۰۷
۴-۱۰-۳- خالص‌سازی آنتی‌بادی‌های scFv تولید شده در برگ‌های تراریخت گیاه ۱۰۷
۴-۱۰-۴- آنالیزهای سرولوژیکی با آنتی‌بادی نوترکیب scFv تولید شده در گیاه ۱۰۸
۴-۱۰-۵- بررسی کارایی آنتی‌بادی‌های نوترکیب تولید شده در گیاه علیه پروتئین IMP نوترکیب ۱۱۲

فصل پنجم: بحث و جمع‌بندی..... ۱۱۴
۵-۱- بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب..... ۱۱۵
۵-۲- تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه IMP فیتوپلاسمای جاروک لیموترش..... ۱۱۷
۵-۳- انتخاب آنتی‌بادی‌های scFv از کتابخانه‌های نمایش فاژی..... ۱۱۹
۵-۴- بیان و خالص‌سازی آنتی‌بادی scFv در مقیاس زیاد..... ۱۲۱
۵-۵- بیان موقت و آنالیز آنتی‌بادی نوترکیب در گیاه..... ۱۲۲
پیشنهادات..... ۱۲۷
منابع..... ۱۲۸

فهرست جدول‌ها

جدول۲-۱: سطح زیرکشت و متوسط عملکرد مرکبات در کشورهای عمده جهان..... ۱۱
جدول۲-۴: سطح زیرکشت، میزان تولید و عملکرد محصول لیموترش به تفکیک استان در سال ۱۳۸۷ ..... ۱۲
جدول ۲-۳: بیماری‌های مهم مرکبات در دنیا و ایران.....۱۳
جدول ۲-۴ : مقاومت بر پایه آنتی‌بادی نوترکیب علیه بیماری‌های گیاهی..... ۳۶
جدول ۳-۱: میزان و غلظت اجزای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر ژن رمزکننده IMP.....۴۹
جدول ۴-۱: غنی‌سازی آنتی‌بادی‌های scFv اختصاصی IMP با انجام چندین دور غربالگری.....۹۱

فهرست شکل‌ها

شکل ۲-۱- گیاه سالم لیموترش (راست) و درخت آلوده به جاروک لیموترش (چپ)..... ۱۵
شکل ۲-۲- زنجرک *Hishimonus phycitis* ۱۸
شکل ۲-۳: سه نوع مختلف Immunodominant membrane proteins (IDPs) در فیتوپلاسماها.....۲۵
شکل ۲-۴: مولکول آنتی‌بادی IgG و قطعات کوچک آنتی‌بادی..... ۲۷
شکل ۲-۵: ساختار و ژنتیک فاژ M13..... ۳۲
شکل ۳-۱: نقشه ناقل‌های بیانی گیاهی pTRA.....۷۵
شکل۴-۱: محصول PCR حاصل از سنتز ژن رمزکننده IMP باکتری.....۷۷
شکل۴-۲: محصول PCR تکثیر ژن رمزکننده پروتئین غشایی.....۷۸
شکل ۴-۳: واکنش برش آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T دارای ژن.....۷۹
شکل ۴-۴: همردیفی توالی نوکلئوتیدی ژن رمزکننده پروتئین غشایی.....۸۰
شکل ۴-۵: درخت فیلوژنی به روش Neighbor joining با ترسیم Boot strap.....۸۱
شکل ۴-۶: مقایسه توالی آمینواسیدی IMP عامل جاروک لیموترش.....۸۲
شکل ۴-۷: مراحل مختلف خالص‌سازی پروتئین IMP نوترکیب.....۸۴
شکل ۴-۸: تعیین غلظت پروتئین IMP نوترکیب در مقایسه با.....۸۵
شکل ۴-۹: تعیین عیار آنتی‌سرم پلی‌کلونال حاصل از تزریق پروتئین نوترکیب.....۸۶
شکل۴-۱۰ : IgG خالص شده توسط ستون پروتئین A.....۸۷
شکل ۴-۱۱: آنالیز ایمونوبلات IMP خالص شده با استفاده از آنتی‌بادی.....۸۸
شکل ۴-۱۲: ردیابی فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در نمونه‌های آلوده با استفاده.....۸۸
شکل ۴-۱۳: شناسایی نمونه‌های گیاهی آلوده به فیتوپلاسما در آزمون DAS-ELISA.....۸۹
شکل ۴-۱۴: تشکیل پلاک‌های فاژ کمکی M13K017 سطح محیط کشت TYE.....۹۰
شکل ۴-۱۵: بررسی تولید آنتی‌بادی scFv محلول در کلنی‌های منتخب.....۹۲
شکل ۴-۱۶: بررسی اختصاصیت آنتی‌بادی‌های scFv علیه IMP نوترکیب در الایزای غیر مستقیم. ۹۳
شکل ۴-۱۷: آنالیز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز حاصل از تکثیر ژن رمزکننده آنتی‌بادی.....۹۴
شکل ۴-۱۸: الکتروفورز قطعات برش یافته با آنزیم *Bst*NI.....۹۴
شکل ۴-۱۹: تعیین نواحی framwork، CDRs قلمروهای VH و VL و linker ژن رمزکننده..... ۹۶
شکل ۴-۲۰: همردیفی توالی آمینواسیدی دو نوع آنتی‌بادی scFv اختصاصی.....۹۷
شکل ۴-۲۱: آزمون وسترن بلات جهت بررسی واکنش آنتی‌بادی.....۹۸
شکل ۴-۲۲: شناسایی نمونه‌های آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش با استفاده از ۹۹

شکل ۴-۲۳: آنالیز مراحل خالص‌سازی آنتی‌بادی نوترکیب scFvIMP6..... ۱۰۰
شکل۴-۲۴: آزمون الایزای غیر مستقیم جهت بررسی واکنش آنتی‌بادی scFvIMP6..... ۱۰۱
شکل ۴-۲۵: محصول واکنش هضم آنزیمی ناقل pIT2 حاوی ژن..... ۱۰۲
شکل ۴-۲۶: تکثیر ژن رمزکننده scFvIMP6 موجود در ناقل‌های pTRA..... ۱۰۳
شکل ۴-۲۷: A: محصول واکنش برش آنزیمی ناقل pTRA-35S-LPH:scFvIMP6 و..... ۱۰۴
شکل ۴-۲۸: محصول واکنش برش آنزیمی ناقل pTRA-35S-LPH:scFvIMP6..... ۱۰۴
شکل ۴-۲۹: محصول واکنش برش آنزیمی ناقل‌های pTRAkt-GFPperox و..... ۱۰۵
شکل ۴-۳۰ : همسانه‌سازی ژن رمزکننده scFvIMP6 در وکتور pTRA برای بیان موقت در گیاه..... ۱۰۶
شکل ۴-۳۱: تزریق اگروباکتریوم‌های حاوی پلاسمید نوترکیب به اپیدرم زیرین برگ..... ۱۰۷
شکل ۴-۳۲: خالص‌سازی آنتی‌بادی‌های نوترکیب تولید شده به‌صورت موقت در برگ‌های..... ۱۱۱
شکل ۴-۳۳: آزمون الایزای آنتی‌بادی نوترکیب scFvIMP6 بیان شده به‌طور موقت..... ۱۱۲
شکل ۴-۳۴: بررسی کارایی آنتی‌بادی نوترکیب scFvIMP6-Fc خالص شده از برگ‌های..... ۱۱۳
شکل ۵-۱: نقشه ناقل‌های فاژمیدی pIT2 و pHENHI..... ۱۲۸

فصل اول

مقدمه

لیموترش (*Citrus aurantifolia*) با نام‌های لایم، لیموعمانی، West Indian Lime یا Key Lime، از خانواده مرکبات (Rutaceae) است و به گروه اسیدی لیموترش‌ها تعلق دارد. در ایران این رقم در استان های فارس، هرمزگان، کرمان و سیستان و بلوچستان کشت می‌شود (ابراهیمی، ۱۳۵۹). ایران در بین کشورهای جهان رتبه چهارم تولید لیموترش را دارا می‌باشد که علاوه بر کمیت تولید، کیفیت لیموترش ایرانی از ویژگی‌های منحصر به فرد این محصول محسوب می‌شود.

بیماری جارویی (جاروک) لیموترش [1] اولین بار در سال ۱۹۸۶ از کشور عمان (Bove, 1986) و در سال ۱۹۸۹ از امارات متحده عربی (Garnier *et al.*, 1991b) گزارش شده است. اما به دلیل وجود درختان بسیار آلوده احتمالاً این بیماری در عمان از مدت‌ها پیش‌تر وجود داشته است (Bove *et al.*, 1988). بیش از ۹۸ درصد درختان لیموترش در این کشور به این بیماری آلوده می‌باشند (Chung *et al.*, 2006). در ایران این بیماری اولین بار از استان سیستان و بلوچستان (Salehi *et al.*, 1997) و متعاقب آن از استان های هرمزگان، کرمان و فارس و برخی دیگر از مناطق جنوبی ایران گزارش شده است (صالحی و همکاران، ۱۳۸۷).

علایم بارز بیماری به شکل جاروک ظاهر می‌شود. نحوه آلودگی به این صورت است که ابتدا در یک شاخه رشد طولی ایجاد شده، برگ‌ها کوچکتر می‌شوند. با ایجاد انشعابات بیش از حد، فاصله میان‌گره‌ها کم شده، گیاه آلوده حالت رزت و جارویی می‌یابد و به تدریج خشک می‌شود. رنگ برگ از سبز کم‌رنگ تا

1- Witches' broom disease of lime (WBDL)

زرد و اندازه آنها از کوچک تا بسیار کوچک متغیر است. شاخه آلوده گل و میوه‌ای تولید نمی‌کند و فاقد تیغ است. آلودگی به تدریج به شاخه‌های دیگر هم سرایت می‌کند، برگ‌ها خشک و ریزش کرده و محصول کاهش می‌یابد. گسترش بیماری بسیار سریع بوده و پس از مدت کوتاهی با آلوده شدن چند درخت، تمام باغ آلوده می‌شود. درختان آلوده در مدت ۴ تا ۱۰ سال از بین می‌روند (Garnier and Bove, 2000).

عامل بیماری جاروک لیموترش فیتوپلاسمای *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia می‌باشد (Zreik *et al.*, 1995). فیتوپلاسماهای بیمارگر گیاهی، پروکاریوت‌های بدون دیواره و غیرقابل کشت متعلق به رده مالیکوت‌ها با ژنوم کوچکی شامل ۵۳۰ تا ۱۳۵۰ کیلو جفت باز هستند (Marcone *et al.*, 1999). در گیاهان بیمار، فیتوپلاسماها محدود به عناصر آوند آبکش می‌باشند که توسط حشرات جوربالان تغذیه کننده از آوند آبکش مخصوصاً زنجره‌های برگی Leaf hoppers (Cicadellidae) و زنجره‌های گیاهی Plant hoppers (Fulgoromorpha) و به مقدار کمتری هم توسط تریپس‌ها منتقل می‌شوند (Weintraub and Beanland, 2006). بیماری‌های ناشی از فیتوپلاسماها از مخرب‌ترین بیماری‌های گیاهان زراعی هستند. بیش از ۷۰۰ بیماری فیتوپلاسمایی به صدها گونه گیاهی خسارت می‌زنند و برخی از این بیماری ها، مخصوصاً بیماری‌های گیاهان چوبی کشنده هستند. هر ساله به لیست بیماری‌های فیتوپلاسمایی افزوده می‌شود که بسیاری از آن‌ها در دهه‌های اخیر شناخته شده‌اند (Lee *et al.*, 2000). آلودگی به فیتوپلاسماها اولین و مهم‌ترین عوامل محدود کننده برای بسیاری از گیاهان مهم زراعی بوده و به همین دلیل و بر اساس قوانین قرنطینه‌ای، حمل و نقل بسیاری از محموله‌های گیاهی محدود شده است (Lee *et al.*, 2000). در بین عوامل فیتوپلاسمایی، بیماری جاروک لیموترش از مهم‌ترین و خسارت‌زاترین بیماری-های لیموترش در دنیا است (Garnier *et al.*, 1991b).

گسترش روز افزون این بیماری در نواحی مرکبات‌خیز جنوب کشور تهدیدی جدی برای اقتصاد کشاورزی و درآمد کشاورزان این نواحی محسوب می‌شود. پیدایش و شناسایی بیماری در سال ۱۳۷۶ در

استان سیستان و بلوچستان به اقدامات قرنطینه‌ای و امحای تعداد فراوانی از درخت آلوده منجر شده است (Salehi *et al.*, 1997). طی سال‌های ۱۳۷۸ و ۱۳۷۹ بیماری در استان هرمزگان گسترش یافت. در سال ۱۳۸۱ این بیماری از منطقه جیرفت و کهنوج گزارش شد (صالحی و همکاران، ۱۳۸۷). طی سالیان گذشته تعداد درختان آلوده به نحو چشمگیری افزایش یافته است. به‌طوری‌که از تعداد ۵۱ اصله در سال ۱۳۷۷ به ۱۱۷۲۲۲ اصله در سال ۱۳۸۴ رسیده است. پیش‌بینی می‌شود که حداکثر تا یک دهه آینده میزان تولید لیموترش در استان هرمزگان به صفر نزدیک خواهد شد و این بدان معناست که عملاً اقتصاد روستایی در بسیاری از نقاط استان هرمزگان و پیرو آن اشتغال‌زایی روستانشینان این منطقه با خطر جدی مواجه شود (www.iwbdln.ir). از سال ۱۳۷۹ تا ۱۳۹۰، ۳۰ درصد درختان لیموترش (بیش از ۵۰۰۰۰۰ درخت شامل ۷۰۰۰ هکتار) توسط این بیماری نابود شده است. متأسفانه بیماری در مکان‌های آلوده به گیاهان دیگری از قبیل گریپ‌فروت سرایت کرده و پیش‌بینی می‌شود که بیماری تهدیدی جدی برای دیگر محصولات باغی در ایران و سایر نقاط دنیا باشد. اگر چه در حال حاضر مناطق محدودی در جهان به بیماری آلوده هستند ولی با توجه به انتقال عامل بیماری توسط حشرات درصورتی‌که این بیماری به‌صورت جدی و مستمر مدیریت نشود، احتمال وقوع اپیدمی جهانی وجود دارد (Mardi *et al.*, 2011).

با توجه به اینکه در طبیعت فیتوپلاسماها معمولاً توسط حشرات منتشر می‌شوند و ایجاد آلودگی دائمی خسارت‌های شدید اقتصادی در گیاهان چند ساله به خصوص درختان و درختچه‌ها را سبب می‌شود، چرخه زندگی فیتوپلاسماها به این حقیقت دلالت دارد که مدیریت بیماری‌های ایجاد شده توسط آن ها مشکل است. روش‌های عنوان شده از قبیل بهداشت زراعی، روش‌های پیشگیرانهٔ دیگر و کنترل حشرات ناقل قابلیت محدودی در مدیریت بیماری دارند. در میان راهبردهای موجود برای مدیریت بیماری تولید ارقام مقاوم مشخص‌ترین و مؤثرترین روش پیشگیری از بیماری است. با توجه به عدم معرفی منابع ژنتیکی طبیعی مقاومت علیه این بیماری، استفاده از روش‌های جدید برای تولید گیاهان مقاوم تراریخت

ضروری می‌باشد. امکان ایجاد مقاومت بر پایه آنتی‌بادی به عنوان یک روش جدید و موثر علیه چندین عامل بیماری‌زای ویروسی، قارچی و یک عامل فیتوپلاسمایی گیاهی به اثبات رسیده است. تاکنون انواع مختلف آنتی‌بادی‌های نوترکیب در اشکال مولکول کامل ایمونوگلوبولین یا زنجیره تک رشته‌ای نواحی متغیر (scFvs[1]) به طور موفقیت‌آمیزی در گیاه بیان شده‌اند (Safarnejad *et al.,* 2011). هدف این مطالعه نیز تولید آنتی‌بادی‌های scFv اختصاصی علیه فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش و بررسی ویژگی آنتی‌بادی‌ها می‌باشد. اساس این روش بر بیان آنتی‌بادی‌های نوترکیب اختصاصی در گیاه است که قابلیت اتصال به پروتئین‌های مؤثر بیمارگر را دارند. این آنتی بادی‌ها پس از بیان در گیاه، به اجزای اختصاصی بیمارگر که در تماس مستقیم با میزبان هستند، متصل می‌گردند و چون وجود این پروتئین‌ها جهت تکمیل سیکل آلودگی لازم و ضروری است توقیف آن‌ها توسط آنتی‌بادی‌ها در نهایت سبب غیرفعال شدن بیمارگر در گیاه و جلوگیری از گسترش بیماری خواهد شد. بنابراین موفقیت در این روش به انتخاب آنتی‌بادی‌هایی بستگی دارد که بتوانند یک مرحله مهم و حیاتی در سیکل حرکت، تکثیر یا انتقال بیمارگر را متوقف کنند که لازمه آن انتخاب دقیق و هوشمندانه ملکول هدف می‌باشد. انتخاب نوع مناسبی از انواع مختلف آنتی‌بادی‌های نوترکیب و انتخاب روش مناسب نیز مهم می‌باشد. این راهبرد همزمان با افزایش درک مکانیسم بیماری‌های گیاهی و تشخیص پروتئین‌های اختصاصی و مؤثر بیمارگر که در بیماری‌زایی، انتقال و تکثیر دخیل هستند، قابلیت کاربرد بیشتری پیدا می‌کند (Schillberg *et al.*, 2000). چون فیتوپلاسماها پروکاریوت‌های فاقد دیواره سلولی هستند و به صورت داخل سلولی در سلول میزبان اقامت دارند، به نظر می‌رسد که پروتئین‌های غشایی یا پروتئین‌های ترشحی فیتوپلاسماها به طور مستقیم در سیتوپلاسم گیاه میزبان و سلول‌های حشره نقش مؤثری را ایفا می‌کنند (Hogenhout *et al.*, 2008). در اکثر فیتوپلاسماها مجموعه‌ای از پروتئین‌های غشایی تحت عنوان Immunodominant membrane

1- single-chain variable fragments (scFvs)