بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

جدا سازی، بیان فراوان و بررسی خصوصیات فیزیولوژیک پروتئین شبه تئوماتین از گیاه یونجه یکساله

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

کبری سعیدی

استاد راهنما
دکتر سید رضا زارعی

۱۳۸۵

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی خانم کبری سعیدی
تحت عنوان

جدا سازی، بیان فراوان و بررسی خصوصیات فیزیولوژیک پروتئین شبه تئوماتین از گیاه یونجه یکساله

در تاریخ ۱۳۸۵/۱۲/۲۳ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان نامه	دکترسید رضا زارعی
۲- استاد مشاور پایان نامه	دکتر بهرام شریف نبی
۳- استاد داور	دکتر بدر الدین ابراهیم سید طباطبایی
۴- استاد داور	دکتر نفیسه نیلی
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر بهرام شریف نبی

سپاسگزاری و قدردانی

سپاس و ستایش خداوندی را که از ازل تا ابد قابل اعتمادترین راهنما و بی‌منت‌ترین راهگشاست.

از پدر و مادرم تشکر می‌کنم که از خود دریغ کردند و بی‌منت به من بخشیدند. آنان که تمامی کاستی‌هایم را با شکیبایی تحمل کردند.

از استاد راهنمای گرامیم جناب آقای دکتر زارعی به خاطر راهنمایی‌های صبورانه و تشویق‌هایشان در تمام مراحل اجرایی این تحقیق صمیمانه سپاسگزارم.

از استاد مشاور محترم جناب آقای دکتر شریف نبی که نظرات ارزشمندشان کارگشای انجام این پژوهش بود، قدردانی می‌نمایم.

از اساتید محترم آقای دکتر طباطبایی و خانم دکتر نیلی که زحمت بازخوانی و داوری این پایان‌نامه را بر عهده داشتند، کمال تشکر را دارم.

از اساتید گرامی آقایان دکتر بهار، مهندس قبادی، دکتر میرلوحی و دکتر مساح که در انجام این پایان‌نامه از کمک‌های آنها بهره گرفتم، تشکر می‌کنم.

از کادر محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی و بیماری شناسی گیاهی آقای مهندس محمدی، آقای مهندس اخوان، آقای عزیزی و آقای رحمتی تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از برادران عزیزم که در تمامی لحظات زندگی پشتیبان من بودند سپاسگزارم.

از همکلاسی‌ها و دوستان بسیار خوبم خانم‌ها لیلا مرادی حقگو، غزاله خاکسار، سهیلا موحدی و آقای عرب نژاد تشکر می‌نمایم.

یاد تمامی دوستان دوران تحصیل، خانم‌ها نادیا ریحانی فام، هما عسکریان، سمیه صدر، زهرا موحدی راد، اعظم جعفری، سمیه بختیاری، نفیسه مهدوی عرب، فاطمه سعیدی و سایر دوستان عزیز که همه دوران با هم بودنمان زیبا بود را گرامی می‌دارم.

کبری سعیدی

اسفند ماه ۱۳۸۵

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

با یاد بزرگترین حامی و یاریگرم در زندگی

تقدیم به

همه کسانی که در به ثمر رسیدن این پژوهش موثر بودند

خانواده، اساتید و دوستان عزیزم.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب ..... هشت
فهرست جداول ..... دوازده
فهرست اشکال ..... چهارده
چکیده فارسی ۱

فصل اول: مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- کلیات ۲
۱-۲- پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی ۴
۱-۳- طبقه بندی پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی ۶
۱-۴- پروتئین‌های شبه تئوماتین ۸
۱-۵- مکانیزم عمل پروتئین‌های شبه تئوماتین ۱۰
۱-۶- تنظیم بیان پروتئین‌های شبه تئوماتین ۱۱
۱-۶-۱- آلودگی میکروبی ۱۱
۱-۶-۲- تنش شوری ۱۲
۱-۶-۳- اسید آبسیزیک و اتیلن ۱۲
۱-۶-۴- سالیسیلات، متیل جازمونات و سایر الیسیتورها ۱۴
۱-۶-۵- زخم ۱۵
۱-۷- خصوصیات بیولوژیکی پروتئین‌های شبه تئوماتین ۱۵
۱-۷-۱- مزه ۱۵
۱-۷-۲- فعالیت ضد میکروبی پروتئین‌های شبه تئوماتین ۱۶
۱-۷-۳- سایر نقش‌های پروتئین‌های شبه تئوماتین ۱۹
۱-۷-۳-الف- فعالیت ضد سرمای پروتئین‌های شبه تئوماتین ۱۹
۱-۷-۳-ب- پروتئین‌های شبه تئوماتین به عنوان حساسیت زا ۱۹
۱-۸- تولید پروتئین‌های نوترکیب ۲۰
۱-۸-۱- بیان فراوان پروتئین‌های شبه تئوماتین در گیاه ۲۱
۱-۸-۲- معرفی سیستم بیان در *E. coli* ۲۱
۱-۸-۲-الف- ناقل‌های بیانی ۲۴
۱-۸-۲-ب- میزبان‌های بیانی ۲۵
۱-۸-۳- بیان فراوان پروتئین شبه تئوماتین در باکتری *E. coli* ۲۸
۱-۹- اهداف تحقیق حاضر ۳۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- روش‌های زیست- رایانه ۳۲
۲-۲- طراحی آغازگرها ۳۳
۲-۳- کشت گیاهان یونجه یکساله ۳۳
۲-۳-۱- آماده سازی محیط کشت ۳۳
۲-۳-۲- ضد عفونی بذر یونجه ۳۴
۲-۳-۳- کشت بذور یونجه یکساله در محیط کشت ۳۴
۲-۴- استخراج DNA از برگ‌های یونجه یکساله ۳۵
۲-۴-۱- استخراج DNA ژنومی ۳۵
۲-۴-۲- بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده ۳۶
۲-۴-۲-الف- بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده بوسیله ژل الکتروفورز ۳۶
۲-۴-۲-ب- بررسی کیفی و کمی DNA با روش اسپکتروفتومتری ۳۶
۲-۵- تکثیر قطعات ORF مورد نظر با استفاده از واکنش‌های زنجیره ای پلیمراز ۳۷
۲-۵-۱- مواد لازم جهت انجام واکنش‌های PCR ۳۷
۲-۵-۱-الف- آغازگرها ۳۷
۲-۵-۱-ب- مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs) ۳۷
۲-۵-۱-ج- آنزیم *Pfu* DNA Polymerase ۳۷
۲-۵-۱-د- بافر PCR ۳۷
۲-۵-۲- تنظیم شرایط واکنش PCR ۳۸
۲-۵-۳- الکتروفورز محصول واکنش‌های پلیمراز ۳۹
۲-۵-۴- اضافه کردن پلی T به قطعات ORF ۳۹
۲-۵-۴-الف- خالص سازی محصول واکنش‌های پلیمراز ۳۹
۲-۵-۴-ب- واکنش گسترش ۴۰
۲-۶- همسانه سازی قطعات ORF (محصول PCR) در پلاسمید بیانی pET-۲۱c(+) ۴۱
۲-۶-۱- استخراج پلاسمید از باکتری *E. coli* (استخراج پلاسمید در حجم کوچک) ۴۱
۲-۶-۲- بررسی کیفی و کمی DNA پلاسمیدی استخراج شده بوسیله ژل الکتروفورز ۴۳
۲-۶-۳- هضم آنزیمی پلاسمید بیانی pET-۲۱c(+) ۴۳
۲-۶-۴- تبدیل جایگاه برشی آنزیم *Nde*I به دنباله پلیA ۴۴
۲-۶-۴-الف- واکنش گسترش با استفاده از آنزیم *Taq* DNA polymerase ۴۴
۲-۶-۴-ب- خالص سازی پلاسمید تغییر یافته ۴۵
۲-۶-۵- واکنش اتصال قطعات ORF به پلاسمید ۴۵
۲-۷- تهیه سلول‌های مستعد باکتری MC۱۰۶۱ ..... ۴۶
۲-۸- انتقال پلاسمید به باکتری‌های مستعد شده MC۱۰۶۱ (همسانه سازی) ۴۷

۲-۹- تأیید وجود قطعه ORF در پلاسمید و باکتری ۴۸
۲-۹-۱- PCR به کمک آغازگرهای T۷ promotor و T۷ terminator ۴۸
۲-۹-۱-الف- روش جوشاندن به منظور استخراج DNA پلاسمیدی ۴۸
۲-۱۰- تعیین جهت قطعه DNA همسانه شده ۵۰
۲-۱۰-۱- PCR به کمک آغازگرهای T۷ promotor و آغازگر برگشت ORF ۵۰
۲-۱۰-۲- هضم آنزیمی ۵۱
۲-۱۱- انتقال پلاسمید محتوی ORF به باکتری‌های مستعد شده BL ۲۱ (DE۳) ۵۲
۲-۱۲- بیان فراوان پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ژن پروتئین شبه تئوماتین در باکتری BL ۲۱ (DE۳) ۵۲
۲-۱۳- مشاهده بیان فراوان پلاسمیدهای مورد نظر ۵۳
۲-۱۳-۱- آماده سازی نمونه‌ها ۵۳
۲-۱۳-۲- الکتروفورز روی ژل پلی اکریلامید-سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) ۵۴
۲-۱۳-۳- رنگ آمیزی ژل ۵۵
۲-۱۳-۴- آنالیز وسترن ۵۶
۲-۱۴- تازدن پروتئین‌ها ۵۸
۲-۱۴-۱- روش اوره-pH قلیایی ۵۹
۲-۱۴-۲- روش رقیق کردن گوانیدین-اوره ۶۰
۲-۱۴-۳- روش دیالیز گوانیدین ۶۱
۲-۱۴-۴- روش pH قلیایی ۶۱
۲-۱۵- دیالیز پروتئین‌های تا شده ۶۲
۲-۱۶- آماده سازی نمونه‌های قارچی ۶۲

فصل سوم: بحث و نتیجه گیری

۳-۱- روش‌های زیست- رایانه ۶۴
۳-۲- استخراج DNA ژنومی ۷۵
۳-۳- تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از واکنش‌های زنجیره ای پلیمراز ۷۵
۳-۴- همسانه سازی ORF (محصول PCR) در پلاسمید بیانی pET-۲۱c(+) ۷۶
۳-۴-۱- آماده سازی پلاسمید بیانی pET-۲۱c(+) ۷۶
۳-۴-۲- آماده سازی قطعات ORF و اتصال به پلاسمید ۸۱
۳-۵- انتقال پلاسمید به باکتری‌های مستعد شده MC۱۰۶۱ (همسانه سازی) ۸۳
۳-۶- تأیید وجود قطعه ORF در پلاسمید و باکتری ۸۳
۳-۷- تعیین جهت قطعه ORF همسانه شده ۸۷
۳-۸- توالی یابی قطعات همسانه شده ۹۰
۳-۹- بیان فراوان پروتئین شبه تئوماتین در باکتری BL ۲۱ (DE۳) ۹۲

۳-۱۰- الکتروفورز روی ژل پلی اکریلامید سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) ۹۵
۳-۱۱- وسترن بلات ۹۷
۳-۱۲- بررسی فعالیت ضد قارچی ۹۷
۳-۱۲-۱- بررسی فعالیت ضد قارچی پروتئین‌ها بر روی قارچ آلترناریا ۹۹
۳-۱۲-۲- بررسی فعالیت ضد قارچی پروتئین‌ها بر روی قارچ فوزاریوم ۱۰۱
۳-۱۲-۳- بررسی فعالیت ضد قارچی پروتئین‌های نوترکیب روی قارچ رایزوکتونیا ۱۰۴
۳-۱۲-۴- بررسی فعالیت ضد قارچی پروتئین‌های نوترکیب روی قارچ سفیدک سطحی ۱۰۵

فصل چهارم: نتیجه گیری کلی و پیشنهادها

۴-۱- جمع بندی کلی نتایج ۱۰۶
۴-۲- پیشنهادها ۱۰۷
پیوست ۱۰۸
منابع ۱۱۲
چکیده انگلیسی ۱۲۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- طبقه بندی پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی ۶
جدول ۱-۲- مکانیزم عمل تعدادی از پروتئین‌های شبه تئوماتین ۱۱
جدول ۱-۳- برخی مشخصات فیزیکی و فیزیولوژیکی پروتئین‌های شبه تئوماتین در شرایط آزمایشگاهی ۱۷
جدول ۲-۱- نام و توالی آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در این تحقیق ۳۳
جدول ۲-۲- نام و غلظت مواد مصرفی در واکنش PCR ۳۸
جدول ۲-۳- برنامه مورد استفاده در واکنش PCR ۳۸
جدول ۲-۴- نام و غلظت مواد مصرفی در واکنش گسترش محصول واکنش‌های پلیمراز ۴۱
جدول ۲-۵- ترکیب محلول I مورد استفاده در استخراج پلاسمید ۴۲
جدول ۲-۶- ترکیب محلول II مورد استفاده در استخراج پلاسمید ۴۲
جدول ۲-۷- نام و غلظت مواد مصرفی در واکنش هضم آنزیمی پلاسمید بیانی pET-۲۱c(+) ۴۴
جدول ۲-۸- نام و غلظت مواد مصرفی در واکنش گسترش پلاسمید هضم شده ۴۴
جدول ۲-۹- نام و غلظت مواد مصرفی در واکنش اتصال قطعات به پلاسمید خطی ۴۵
جدول ۲-۱۰- مواد لازم برای تهیه یک لیتر بافر SOC (لیتر) ۴۷
جدول ۲-۱۱- مواد لازم برای تهیه محیط LB در واکنش همسانه سازی ۴۸
جدول ۲-۱۲- نام و غلظت مواد مصرفی در واکنش PCR به منظور شناسایی باکتری‌های واجد قطعه ۴۹
جدول ۲-۱۳- برنامه استفاده شده در واکنش PCR به منظور شناسایی باکتری‌های واجد قطعه ۴۹
جدول ۲-۱۴- نام و غلظت مواد مصرفی در واکنش PCR به منظور تعیین جهت قطعه ORF ۵۰
جدول ۲-۱۵- برنامه استفاده شده در واکنش PCR به منظور تعیین جهت قطعه ۵۰
جدول ۲-۱۶- نام و غلظت مواد مصرفی در واکنش هضم آنزیمی *Hin*dIII به منظور تعیین جهت قطعه ۵۱
جدول ۲-۱۷- نام و غلظت مواد مصرفی در واکنش هضم آنزیمی *Pst*I به منظور تعیین جهت قطعه ۵۱
جدول ۲-۱۸- مواد لازم جهت تهیه محیط TB به مقدار یک لیتر ۵۲
جدول ۲-۱۹- مواد و مقادیر مصرفی به کار رفته در بافر بارگذاری (۲X) ۵۳
جدول ۲-۲۰- مواد و مقادیر مصرفی به کار رفته در ژل پایینی ۵۴
جدول ۲-۲۱- مواد و مقادیر مصرفی به کار رفته در ژل بالا ۵۵
جدول ۲-۲۲- مواد و مقادیر مصرفی به کار رفته در بافر الکتروفورز تریس-گلیسین برای یک لیتر (۵X) ۵۵
جدول ۲-۲۳- مواد و مقادیر مصرفی به کار رفته در محلول رنگ آمیزی ژل برای ۵۰۰ میلی لیتر ۵۶
جدول۲-۲۴- مواد و مقادیر مصرفی به کار رفته در محلول رنگ بری ژل برای ۱۰۰ میلی لیتر ۵۶
جدول ۲-۲۵- مواد و مقادیر مصرفی به کار رفته در بافر انتقال برای ۱۰۰ میلی لیتر ۵۷
جدول ۲-۲۶- مواد و مقادیر مصرفی به کار رفته در محلول رنگ آمیزی صفحه برای ۱۰۰ میلی لیتر ۵۸
جدول ۲-۲۷- مواد و مقادیر مصرفی به کار رفته در محلول PBS برای یک لیتر ۵۸

جدول ۲-۲۸- نام و غلظت ترکیبات مصرفی در بافر I روش اوره-pH قلیایی ۵۹
جدول ۲-۲۹- نام و غلظت ترکیبات مصرفی در بافر II روش اوره-pH قلیایی ۵۹
جدول ۲-۳۰- نام و مقادیر مصرفی در بافر I روش گوانیدین ۶۰
جدول ۲-۳۱- نام و مقادیر مصرفی در بافر II روش تاخوردگی ۶۱
جدول ۲-۳۲- نام و مقادیر مصرفی در بافر گوانیدین- ساکارز ۶۱
جدول ۳-۱- نتایج همردیف شدن توالی پروتئین‌های شبه تئوماتین تعدادی از گیاهان با ژنوم یونجه یکساله با استفاده از نرم افزار tblastn ۶۵
جدول ۳-۲- همردیف شدن توالی‌های انتخاب شده یونجه یکساله با پروتئین‌های شبه تئوماتین آرابیدوپسیس ۶۷
جدول ۳-۳- توالی نوکلئوتیدی سه توالی انتخاب شده (رشته '۵ به '۳) ۶۸
جدول ۳-۴- ORF متعلق به دو توالی TC۷۷۱۰۶ و TC۸۶۸۴۷ در بانک اطلاعاتی Tigr ۶۹
جدول ۳-۵- نتایج همردیف شدن توالی‌های انتخاب شده با پروتئین‌های شبه تئوماتین گوجه فرنگی، انگور و نخود ۷۰
جدول ۳-۶- نتایج بدست آمده در نرم افزار GenScan ۷۱
جدول ۳-۷- پپتیدهای پیش بینی شده با نرم افزار GenScan ۷۲
جدول ۳-۸- نتایج بدست آمده در نرم افزار GeneSeqer ۷۲
جدول ۳-۹- جایگاه سیگنال پپتید در توالی‌های انتخاب شده با استفاده از برنامه Signalp ۷۳
جدول ۳-۱۰- نام و خصوصیات پروتئین‌های انتخابی در این تحقیق ۷۴
جدول ۳-۱۱- نتایج همردیف شدن پنج ORF انتخابی در این تحقیق ۷۴
جدول ۳-۱۲- راندمان همسانه سازی ۸۶
جدول ۳-۱۳- آنزیم‌ها و جایگاه‌های برشی مورد استفاده برای هر کدام از ORFها ۸۹
جدول ۳-۱۴- زمان، ضریب جذب نوری و pH محیط در زمان افزودن IPTG ۹۴
جدول ۳-۱۵- زمان، ضریب جذب نوری و pH محیط در پایان عمل بیان پروتئین ۹۵
جدول ۳-۱۶- اثر تیمارهای تازدن ۱ و ۲، DTT و pH در جلوگیری از جوانه زنی قارچ آلترناریا ۱۰۱
جدول ۳-۱۷- اثر تیمارهای تازدن ۳ و ۴، DTT و pH در جلوگیری از جوانه زنی قارچ آلترناریا ۱۰۱
جدول ۳-۱۸- نسبت پرگنه رشد یافته در روز سوم و هفتم آزمایش ۱۰۳
جدول ۳-۱۹- نسبت پرگنه رشدیافته در روز سوم و هفتم آزمایش ۱۰۵

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- روش‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب در *E. coli* ۲۲
شکل ۱-۲- ساختار ناقل بیانی pET ۲۵
شکل ۱-۳- ساختار کروموزومی میزبان بیانی (DE۳) BL۲۱ ..... ۲۷
شکل ۳-۱- رشدگیاه یونجه یکساله در شرایط کشت بافت ۷۵
شکل ۳-۲- الکتروفورز DNA استخراج شده (۱) همراه با نشانگر III (M) ۷۵
شکل ۳-۳- تکثیر قطعات با استفاده از آنزیم *Pfu* پلیمراز ۷۶
شکل ۳-۴- ساختار ناقل بیانی pET-۲۱ ..... ۷۷
شکل ۳-۵- نتیجه هضم آنزیمی ناقل pET-۲۱ با آنزیم *Nde*I ۷۸
شکل ۳-۶- نقشه آنزیمی پلاسمید pBluescript II SK(+/-) ۷۹
شکل ۳-۷- نتیجه همسانه سازی قطعات در ناقل pBluescript II SK(+/-) ۸۰
شکل ۳-۸- مراحل تغییر محصول PCR و پلاسمید به منظور انجام واکنش اتصال ۸۰
شکل ۳-۹- پلاسمید خالص شده با کیت خالص سازی فرمنتاز ۸۱
شکل ۳-۱۰- الکتروفورز محصول حاصل از PCR بر روی TAE ۸۲
شکل ۳-۱۱- قطعات خالص شده از روی ژل ۸۲
شکل ۳-۱۲- پرگنه‌های تولید شده توسط باکتری MC۱۰۶۱ ..... ۸۳
شکل ۳-۱۳- نتایج PCR برای tlp-۱ ..... ۸۴
شکل ۳-۱۴- نتایج PCR برای tlp-۲ ..... ۸۴
شکل ۳-۱۵- نتایج PCR برای tlp-۳ ..... ۸۵
شکل ۳-۱۶- نتایج PCR برای tlp-۴ ..... ۸۵
شکل ۳-۱۷- نتایج غربال سازی سریع برای tlp-۵ ..... ۸۶
شکل ۳-۱۸- نتایج استخراج پلاسمید قطعات همسانه شده ۸۷
شکل ۳-۱۹- تعیین جهت قطعات با استفاده از تکنیک PCR ۸۸
شکل ۳-۲۰- تعیین جهت قطعات tlp-۴ با استفاده از تکنیک PCR ۸۸
شکل ۳-۲۱- تعیین جهت قطعات tlp-۴ با استفاده از تکنیک PCR با کمک آغازگرهای برگشت pET و رفت قطعه ۸۹
شکل ۳-۲۲- نتایج برش قطعات همسانه شده با آنزیم‌های مربوطه ۹۰
شکل ۳-۲۳- نتایج توالی یابی قطعه tlp-۱ ..... ۹۱
شکل ۳-۲۴- نتایج توالی یابی قطعه tlp-۲ ..... ۹۱
شکل ۳-۲۵- نتایج توالی یابی قطعه tlp-۳ ..... ۹۲
شکل ۳-۲۶- نتایج توالی یابی قطعه tlp-۵ ..... ۹۲
شکل ۳-۲۷- پرگنه‌های تولید شده توسط باکتری BL۲۱ ..... ۹۳

شکل ۳-۲۸- بیان پروتئین‌های نوترکیب در باکتری *E. coli* ۹۶
شکل ۳-۲۹- جداسازی بخش اجسام متراکم و قسمت محلول پروتئین..... ۹۶
شکل ۳-۳۰- نتایج آزمون وسترن..... ۹۷
شکل ۳-۳۱- نمونه شاهد..... ۱۰۰
شکل ۳-۳۲- اثر TLP-۱ بر جوانه زنی اسپور آلترناریا..... ۱۰۰
شکل ۳-۳۳- اثر TLP-۲ بر جوانه زنی اسپور آلترناریا..... ۱۰۰
شکل ۳-۳۴- اثر TLP-۳ بر جوانه زنی اسپور آلترناریا..... ۱۰۰
شکل ۳-۳۵- اثر TLP-۴ بر جوانه زنی اسپور آلترناریا..... ۱۰۰
شکل ۳-۳۶- اثر TLP-۵ بر جوانه زنی اسپور آلترناریا..... ۱۰۰
شکل ۳-۳۷- شاهد فوزاریوم..... ۱۰۲
شکل ۳-۳۸- اثر TLP-۱ بر هیف قارچ فوزاریوم..... ۱۰۲
شکل ۳-۳۹- اثر TLP-۲ بر روی هیف فوزاریوم..... ۱۰۲
شکل ۳-۴۰- اثر TLP-۳ بر روی هیف فوزاریوم..... ۱۰۲
شکل ۳-۴۱- اثر TLP- ۵ بر روی هیف فوزاریوم..... ۱۰۲
شکل ۳-۴۲- شاهد رایزوکتونیا..... ۱۰۴
شکل ۳-۴۳- اثر TLP-۱ بر قارچ رایزوکتونیا..... ۱۰۴
شکل ۳-۴۴- اثر TLP-۲ بر قارچ رایزوکتونیا..... ۱۰۴
شکل ۳-۴۵- اثر TLP-۳ بر قارچ رایزوکتونیا..... ۱۰۴
شکل ۳-۴۶- اثر TLP-۴ بر قارچ رایزوکتونیا..... ۱۰۴
شکل ۳-۴۷- اثر TLP-۵ بر قارچ رایزوکتونیا..... ۱۰۴
شکل ۱-پیوست- نحوه جستجو در بانک اطلاعاتی NCBI..... ۱۰۸
شکل ۲-پیوست- نحوه استفاده از نرم افزار Signalp بانک اطلاعاتی Expasy..... ۱۰۸
شکل ۳-پیوست- نحوه استفاده از نرم افزار tblastn..... ۱۰۹
شکل ۴- پیوست- نتایج همردیف شدن پروتئین آرابیدوپسیس با ژنوم گیاه یونجه یکساله..... ۱۰۹
شکل ۵-پیوست- نحوه استفاده از برنامه GeneSeqer..... ۱۱۰
شکل ۶-پیوست- نحوه استفاده از برنامه GENSCAN..... ۱۱۰
شکل ۷-پیوست- نحوه استفاده از نرم افزار ProtParam..... ۱۱۱

چکیده

پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در اثر تنش‌های محیطی مانند تنش شوری و خشکی، زخم شدن مکانیکی، آلودگی میکروبی و کاربرد تعدادی از هورمون‌های گیاهی و الیسیتورها تولید می‌شوند. بر اساس توالی آمینو اسیدی و فعالیت بیوشیمیایی، این پروتئین‌ها تاکنون به ۱۷ گروه (PR-۱ تا PR-۱۷) طبقه بندی شده‌اند. هدف تحقیق حاضر نیز شناسایی، بیان فراوان و بررسی فعالیت فیزیولوژیک پروتئین شبه تئوماتین (گروه ۵ پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی) در گیاه یونجه یکساله می‌باشد. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی گروه ۵ با دارا بودن تشابه بالا در سطح آمینو اسیدی با پروتئین شیرین مزه تئوماتین در بسیاری گیاهان در اثر حمله بیمارگرهای گیاهی تولید می‌شوند. با این وجود، شناسایی کامل اعضای این گروه در گیاه یونجه یکساله تاکنون تنها برای دو ژن و تنها در سطح mRNA صورت گرفته است. با این وجود به دلیل توالی یابی در حال تکمیل ژنوم یونجه یکساله و در دسترس بودن بخش قابل توجهی از ژنوم آن، شناسایی اعضای جدید خانواده پروتئین‌های شبه تئوماتین در این گیاه امکان پذیر گردید. در این تحقیق سه چارچوب خواندن (*tlp*-۱، ۲ و ۵) در کنار دو cDNA (*tlp*-۳ و *tlp*-۴) مربوط به پروتئین‌های شبه تئوماتین در گیاه یونجه یکساله ردیابی گردیدند. بالاترین شباهت بین توالی‌های مذکور و توالی پروتئین‌های PR-۵ که پیش از این مطالعه شده‌اند عبارت است از: ۸۷٪ شباهت بین TLP-۱ و aad02499 (در *Arabidopsis thaliana*)، ۶۳٪ بین TLP-۲ و aad02499، ۷۸٪ بین TLP-۳ و NP_173261 (*A.thaliana*)، ۶۸٪ بین TLP-۴ و L76632 (گوجه فرنگی) و ۵۶٪ بین TLP-۵ و AJ010501 (نخود). قطعات مورد نظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی از گیاه یونجه یکساله جدا سازی و سپس در ناقل بیانی pET-۲۱c(+) وارد شدند. پس از توالی یابی قطعات، ناقلین نوترکیب به باکتری بیانی *E.coli* BL۲۱(DE۳) منتقل و بیان شدند. کلیه پروتئین‌ها بصورت اجسام سخت غیر محلول بیان گردیدند که وزن مولکولی آن‌ها، بر اساس الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE، برابر با مقادیر پیش بینی شده بود. به دلیل این‌که کلیه پروتئین‌ها بصورت اجسام سخت و بدون ساختار سه بعدی صحیح بیان شده بودند، هیچ یک در این حالت دارای فعالیت ضد میکروب بر علیه قارچ‌های مورد مطالعه، شامل *Rhizoctonia solani*، *Alternaria alternate* و *Fusarium graminearum* نبودند. پروتئین‌ها، سپس با ۴ روش تازده شدند که این بار همگی دارای فعالیت کم و بیش مشابهی بر علیه قارچ‌های گفته شده بودند. بررسی منابع علمی نشان داد که تا پیش از این تحقیق مطالعه مشابهی بر روی پروتئین‌های شبه تئوماتین یونجه یکساله انجام نشده است.

فصل اول
مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- کلیات

یکی از مشکلات بزرگ تولید محصولات کشاورزی بیماری‌های گیاهی می‌باشند که از گذشته دور همواره بر کمیت و کیفیت تغذیه انسان‌ها اثر گذار بوده و باعث خسارت اقتصادی، زیست- محیطی و سیاسی– اجتماعی فراوانی شده‌اند. در کتاب مقدس انجیل با بیشینه ای بیش از ۲۰۰۰ سال به زنگ‌ها، سفیدک‌ها و سوختگی‌ها در گیاهان اشاره شده است. بی‌گمان تأثیر منفی بیماری‌های گیاهی دارای دامنه‌ای وسیع می‌باشد، برای نمونه بیماری سفیدک دروغی سیب زمینی[۱] را می‌توان نام برد که در دهه ۱۸٤۰ میلادی باعث مرگ نزدیک به یک میلیون انسان در ایرلند گردید [۱]. در حال حاضر هم حدود ۲۵ درصد محصولات کشاورزی سراسر جهان در اثر حمله آفات و بیماری‌های گیاهی از بین می‌روند. در دهه‌های اخیر کنترل بیماری‌های گیاهی وابستگی زیادی به کاربرد سموم شیمیایی داشته که البته کاربرد این ترکیبات سمی برای محیط زیست نیز خطرات و زیان‌هایی را در پی داشته است. امروزه تصور می‌رود که یکی از بهترین راه‌های حل برای این مشکلات استفاده از مهندسی ژنتیک و اصلاح نباتات، به منظور تولید گیاهان مقاوم به بیماری باشد [۵۹].

هر گیاه مورد حمله تقریباً یکصد نوع بیمارگر مختلف اعم از قارچ، باکتری، فایتوپلاسما، ویروس و نماتد قرار می‌گیرد و اغلب یک گیاه توسط هزاران واحد از یک گونه[۲] بیمارگر آلوده می‌شود. از زمان

۱- Late blight

۲- Propagule

ورود بیمارگر تا ظهور علائم در گیاه واکنش‌هایی بین بیمارگر و میزبان رخ می‌دهد که گاهی این واکنش‌ها به نفع میزبان و گاهی به سود بیمارگر می‌باشد که این تعامل به ظرفیت هر کدام برای غلبه بر دیگری بستگی دارد. دفاع گیاهان در برابر بیمارگرها ترکیب پیچیده‌ای از خصوصیات ساختاری گیاه و واکنش‌های بیوشیمیایی القا شده می‌باشد. خصوصیات ساختاری میزبان (دفاع ساختاری از پیش ساخته شده) شامل کوتیکول و دیواره سلولی میزبان، به عنوان موانع فیزیکی مانع ورود عامل بیماری و انتشار آن در گیاه می‌شوند. در بسیاری برهم کنش‌های میزبان- بیمارگر نفوذ بیمارگر از طریق دیواره سلولی انجام می‌گیرد وسپس پاسخ‌های دفاعی گیاه رخ می‌دهد [۵]. پاسخ‌های شیمیایی گیاه شامل تولید موادی نظیر اسید سالیسیلیک[۱]، اتیلن و جاسمونات[۲]هاست که بیان ژن‌های مقاومت[۳] و تولید مولکول‌های دفاعی نظیر گونه‌های اکسیژن فعال[۴]، فیتوالکسین‌ها[۵] و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی[۶] را کنترل می‌کنند. همه این واکنش‌های بیوشیمیایی موجب محدود شدن رشد و تهاجم بیمارگر در بافت‌های میزبان می‌شوند. نتیجه نهایی واکنش بیمارگر- میزبان، بیمار شدن گیاه (سازگاری) یا مقاومت (ناسازگاری) می‌باشد [۵۹ و ۶۵].

مقاومت به بیماری در گیاهان به معنی جلوگیری از رشد، تکثیر و گسترش بیمارگر می‌باشد که در موارد بسیاری در شکل واکنش‌های فوق حساسیت دیده می‌شود که در آن حرکت عامل بیماری‌زا از طریق بروز نکروز در محل آلودگی متوقف می‌شود [۸۴]. در واکنش فوق حساسیت، معمولاً نفوذ عامل بیماری‌زا از طریق دیواره سلولی انجام می‌گیرد اما به محض برقراری تماس با سلول زنده، هسته سلول به سوی محل نفوذ عامل بیماری‌زا حرکت کرده و در مراحل بعدی هم به سرعت تجزیه می‌شود. در پی این مرحله معمولاً مواد صمغ مانندی در سیتوپلاسم سلول میزبان بوجود می‌آید که ابتدا در اطراف محل نفوذ عامل بیماری ظاهر شده و بعد تمام سیتوپلاسم را در بر می‌گیرد. در همان حال که واکنش فوق حساسیت در سیتوپلاسم سلول گیاهی ادامه دارد و مرگ آن نزدیک می‌شود، سلول مهاجم نیز شروع به تجزیه شدن می‌کند. در چنین شرایطی عامل بیماری‌زا هم دیگر قادر به ادامه رشد و خروج از چنین سلول‌هایی نبوده و تهاجم بیشتر آن نیز متوقف می‌شود [۵].

در مراحل اولیه حمله عوامل بیماری‌زا به گیاهان، غالباً تفاوت مشهودی در نحوه رخنه عامل بیماری‌زا به بشره گیاه حساس و مقاوم دیده نمی‌شود. با وجود این در بسیاری از ارقام مقاوم، سلول‌های آلوده بعد از آلودگی به سرعت آب خود را از دست داده، قهوه‌ای شده و می‌میرند در حالی‌که سلول‌های

۱- Salicylic acid
۲- Jasmonate
۳- R genes
۴- Active oxygene
۵- Phytoalexin
۶- Pathogenesis related proteins

ارقام حساس مدت زمان بیشتری زنده می‌مانند. در ارقام مقاوم، تغییرات فیزیولوژیکی متعددی در سلول‌های آلوده و سلول‌های مجاور آن‌ها بروز می‌کند در حالی‌که چنین تغییراتی در سلول‌های ارقام حساس بوجود نیامده و یا با تأخیر رخ می‌دهد. این تغییرات، در واکنش فوق حساسیت عبارتند از: تغییر در نفوذ پذیری غشاء سلولی، افزایش تنفس، تولید پراکسیدازها[۱]، تجمع و اکسایش ترکیبات فنولی[۲] و بالاخره تولید فیتوالکسین‌ها و پروتئین‌هایی موسوم به پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی. البته باید توجه داشت که برخی ترکیبات تولید شده بر علیه عوامل بیماری‌زا مثل فیتوالکسین‌ها بصورت موضعی عمل کرده و عده‌ای دیگر مثل پراکسیدازها و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی غالباً بطور سیستمیک تولید شده و باعث ایجاد مقاومت عمومی در کلیه بافت‌های گیاه می‌شوند. نتیجه نهایی واکنش‌های فوق حساسیت در محل نفوذ بیمارگر همیشه مرگ و فروپاشی سلول‌های آلوده و سلول‌های مجاور آن‌هاست که در پی آن عوامل بیماری‌زای قارچی یا باکتریایی موجود در ناحیه واکنش فوق حساسیت توسط بافت مرده مجزا شده و به سرعت نابود می‌شوند [۵].

۱-۲- پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی

گیاهان قادرند به تنش‌های زیستی و غیر زیستی واکنش نشان دهند و غالباً این کار را از طریق بیان ژن‌های خاص و سنتز پروتئین‌های متعددی انجام می‌دهند که تصور می‌رود نقش آنها وفق دادن گیاه به تنش و یا دفاع از گیاه باشد. در بین این پروتئین‌های القایی یک گروه حفاظت شده با نام پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی وجود دارد که در اثر حمله بیمارگر یا شرایط مشابه در میزبان تولید می‌شوند [۴۵]. شناسایی این پروتئین‌ها ابتدا در سال ۱۹۸۰ [۸۶] و با مشاهده تجمع‌شان در بافت‌های توتون آلوده به ویروس موزائیک توتون[۳] (TMV) صورت گرفت [۸۴]. این پروتئین‌ها همچنین در واکنش‌های مربوط به مقاومت، بخصوص مقاومت اکتسابی در انواع مختلف گیاهان تولید می‌شوند [۱۰، ۴۳ و ۸۶]. در بسیاری موارد وقتی‌که گیاهان در معرض آلودگی موضعی با بیمارگرهای القا کننده واکنش‌های فوق حساسیت قرار گیرند، مقاومت اکتسابی سیستمیک[۴] (SAR) ایجاد می‌شود که اغلب با ایجاد پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در بافت‌های دور از محل آلودگی اولیه مرتبط می‌باشد. البته تولید این پروتئین‌ها نسبت به واکنش‌های مربوط به فوق حساسیت نسبتاً دیر رخ می‌دهد و لذا این پروتئین‌ها احتمالاً در جلوگیری از

۱- Peroxidase

۲- Phenol compound

۳- Tobacco mosaic virus

۴- Systemic acquired resistance

آلودگی اولیه در این حالت نقشی ندارند. در مقابل، حضور آن‌ها در برگ‌های تلقیح نشده باعث کاهش اندازه لکه‌ها یا تعداد آلودگی‌های ثانویه و کاهش شدت علائم سیستمیک می‌شود [۸۶].

از سوی دیگر برخی محققین معتقدند که پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی ممکن است به عنوان پروتئین‌های تخفیف دهنده تنش برای گیاه عمل نمایند [۸۴]. خسارت سلولی و متعاقب آن مرگ سلول در اثر واکنش‌های فوق حساسیت با افزایش اسید آبسیزیک و اتیلن، جز مهمترین تنش‌های وارد شده به گیاه در پی حمله عوامل بیماری‌زا می‌باشند. ممکن است پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی برای جبران اثرات مضر این عوامل و سایر ترکیبات حاصل از تجزیه سلولی به سلول‌های مجاور بوجود آمده باشند. تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در اثر غلظت بالای اتیلن یا نکروز فیزیولوژیک، پلاسمولیز (تنش شوری)، تنش خشکی، سرما، اشعه ماورای بنفش یا زخم شاهدی بر این مدعا است [۸۶]. برای مثال یونجه در طی دوران سرما پروتئین‌هایی از این نوع تولید می‌کند که اثرات مضر سرما را روی غشاهای سلولی کاهش می‌دهد. هورمون گیاهی اسید آبسیزیک نیز باعث القاء پروتئین‌هایی از این گروه می‌شود. پروتئین‌های مشابه این‌ها، در طی دوران خشکی در بذور در حال رشد و برگ‌های تحت تنش خشکی نیز تولید می‌شوند [۸۴]. علاوه بر نقش‌های ذکر شده، این پروتئین‌ها می‌توانند نقش‌های دیگری هم داشته باشند. تحقیقات در مورد بتا-۱و۳- گلوکاناز نشان دهنده تنوع فعالیت این آنزیم روی سوبستراهای مختلف می‌باشد. به عنوان مثال، یکی از بتا-۱و۳- گلوکانازهای توتون تراریخت از طریق ضعیف کردن آندوسپرم، در جوانه زنی بذر شرکت می‌کند و باعث بیرون آمدن ریشه چه می‌شود. از سوی دیگر در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* یک آنزیم کیتیناز اختصاصی به عنوان فاکتور تنظیم کننده رشد در محیط کشت ترشح می‌شود که با هیدرولیز کیتین موجود در دیواره عرضی قارچ، سبب جدا شدن سلول‌ها پس از تقسیم سلولی می‌گردد [۸۶].

باید توجه داشت که اگر چه مقدار پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در اثر تنش افزایش می‌یابد، اما مقادیر حداقلی از برخی ایزوفرم‌های[۱] آن‌ها ممکن است همواره در گیاهان سالم نیز یافت شوند که در این حالت به آن‌ها پروتئین‌های شبه مرتبط با بیماری‌زایی[۲] گفته می‌شود. از سوی دیگر مقدار برخی از این پروتئین‌ها نه تنها در اثر حمله بیمارگر، زخم یا دیگر تنش‌های فیزیکی و شیمیایی افزایش می‌یابد، بلکه در طی مراحل نموی خاص و در تعدادی اندام‌ها نیز بالا می‌رود [۲۸]. در بسیاری از گیاهان تجمع این گروه

۱- Isoform

۲- Pathogenesis related like proteins

از پروتئین‌های شبه مرتبط با بیماری‌زایی در اندام‌های تولید مثلی و ذخیره‌ای (مانند بذر) مشاهده شده است [۸۶].

۱-۳- طبقه بندی پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی

طبقه بندی پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی اولین بار در سال ۱۹۸۷ بر اساس پروتئین‌های یافت شده در گیاه توتون انجام گرفت که امروزه هم اساس طبقه بندی این گروه پروتئین‌ها در سایر گیاهان می‌باشد. بر اساس جزئیات سرولوژیکی و توالی‌یابی، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در گیاه توتون به ۵ گروه طبقه بندی شدند. با مطالعه پروتئین‌های مشابه در گیاه گوجه فرنگی این رقم در سال ۱۹۹٤ به ۱۱ افزایش یافت [۱۰، ۸۵ و ۸۶]. معمولاً هر گروه از پروتئین‌ها شامل دو زیر گروه اسیدی و بازی می‌باشد. در گیاه توتون زیر گروه بازی در واکوئل سلول‌ها و زیر گروه اسیدی در فضای خارج سلولی یافت می‌شوند ولی این مطلب الزاماً در مورد سایر گیاهان صادق نیست [۷۷].

ملاک‌های مورد استفاده برای طبقه بندی پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی عبارتند از: ۱- پروتئین‌ها باید توسط بیمارگر در بافت‌هایی که بطور طبیعی پروتئین را تولید نمی‌کنند بیان شوند. ۲- بیان پروتئین باید حداقل در یک نوع بر هم کنش بیمارگر- گیاه در آزمایشگاه‌های مختلف به اثبات رسیده باشد [۸۵]. در آخرین طبقه بندی پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، ۱۷ گروه معرفی شدند که در جدول ۱-۱ نشان داده شده‌اند [۲۵].

جدول ۱-۱- طبقه بندی پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی [۲۵]

Families	Type member	Properties	Gene symbol	Reference
PR-1	Tobacco PR-1a	antifungal	*Ypr1*	Antoniw et al., 1980
PR-2	Tobacco PR-2	b-1,3-glucanase	*Ypr2,* [*Gns2* (*'Glb'*)]	Antoniw et al., 1980
PR-3	Tobacco P, Q	chitinase type I,II, IV,V,VI,VII	*Ypr3, Chia*	Van Loon, 1982
PR-4	Tobacco 'R'	chitinase type I,II	*Ypr4, Chid*	Van Loon, 1982
PR-5	Tobacco S	thaumatin-like	*Ypr5*	Van Loon, 1982
PR-6	Tomato Inhibitor I	proteinase-inhibitor	*Ypr6, Pis* (*'Pin'*)	Green and Ryan, 1972
PR-7	Tomato P_{69}	endoproteinase	*Ypr7*	Vera and Conejero, 1988
PR-8	Cucumber chitinase	chitinase type III	*Ypr8, Chib*	Métraux et al., 1988
PR-9	Tobacco 'lignin-forming peroxidase'	peroxidase	*Ypr9, Prx*	Lagrimini et al., 1987
PR-10	Parsley 'PR1'	'ribonuclease-like'	*Ypr10*	Somssich et al., 1986
PR-11	Tobacco 'class V' chitinase	chitinase, type I	*Ypr11, Chic*	Melchers et al., 1994
PR-12	Radish Rs-AFP3	defensin	*Ypr12*	Terras et al., 1992
PR-13	Arabidopsis THI2.1	thionin	*Ypr13, Thi*	Epple et al., 1995
PR-14	Barley LTP4	lipid-transfer protein	*Ypr14, Ltp*	García-Olmedo et al., 1995
PR-15	Barley OxOa (germin)	oxalate oxidase	*Ypr15*	Zhang et al., 1995
PR-16	Barley OxOLP	'oxalate oxidase-like'	*Yrp16*	Wei et al., 1998
PR-17	Tobacco PRp27	unknown	*Yrp17*	Okushima et al., 2000