

کلون سازی cDNA سیستماتین ذرت (CCs)، و ارزیابی اثر بازدارندگی پروتئین آن در شرایط آزمایشگاهی

قدرت‌اله ریاضی^۱

چکیده

جداسازی و کلون سازی ژن‌های نو ترکیب بازدارنده پروتاز (PIs) گیاهی و انتقال آنها به ژنوم گیاهان دیگر، راه را برای مقاومت گیاهان تراریخته در مقابل بعضی آفات مهاجم هموار ساخته است. در پژوهش حاضر با علم به قدرت مهارکنندگی سیستماتین‌ها به‌عنوان عامل مهارکننده پروتاز سیستماتین، ژن‌های سیستماتین از ژنوم ذرت جداسازی گردید. cDNA مربوط به این ژن‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در محیط آزمایشگاه ساخته شد و پس از خالص سازی محصول RT-PCR در ناقل‌های پلاسمید *pUC19* و *pGEX 2T* کلون گردید. ناقل‌های پلاسمید نو ترکیب (حاوی سیستماتین‌های ذرت) با استفاده از دستگاه شوک الکتریکی به سلول‌های مستعد اشرشیاکولی *Dh5a* انتقال داده شدند. سلول‌های مستعد حاوی کلون‌های نو ترکیب در محیط کشت مساعد رشد داده شدند و پروتئین‌های سیستماتین متصل به گلوپتاتین-اس-ترانسفراز (GST) با استفاده از فیلتر گلوپتاتین آگاروز بید (Glutathion Agarose Bead) خالص سازی گردیدند. در هر مرحله از پیشرفت کار وجود ژن‌های سیستماتین به وسیله الکتروفورز نمونه‌ها مورد تأیید قرار گرفت. در آزمایش‌های بعدی اثر بازدارندگی پروتاز و پایداری نسبی سیستماتین‌های نو ترکیب مورد ارزیابی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: سیستماتین ذرت، بازدارنده پروتاز، ناقل پلاسمید، سلول مستعد *E. coli*، تراریخته، شوک الکتریکی

مقدمه

توجه و اهمیت خاصی را در کشورهای توسعه یافته بخود معطوف داشته است. در این شیوه جدید تنها حشرات تغذیه کننده از مواد گیاهی تراژن در معرض آسیب خواهند بود و می‌توان از غیر سمی بودن محصولات ژن (ها) برای انسان اطمینان حاصل نمود (۶). به‌کارگیری تکنیک DNA نو ترکیب، جداسازی و کلون کردن ژن‌های مورد نظر از منابع مختلف

به منظور جلوگیری از خسارت وارده توسط آفات و بیماری‌ها و به‌دست آوردن محصولی سالم و هم‌چنین اجتناب از آلودگی محیط زیست، به موازات برنامه‌های به‌نژادی سنتی، استفاده از دانش مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی به‌عنوان راهکار جدید و جایگزینی، با مزیت آشکار آن در مقایسه با شیوه‌های سنتی،

۱. عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس

کاهش می‌یابد (۱۰). انتقال کلون‌های نوترکیب حاوی ژن‌های مهارکننده‌های پروتئیناز (PIs) به ژنوم گیاهان، راه را برای مقاومت گیاهان در مقابل بعضی حشرات مهاجم هموار ساخته است (۴).

اولین گزارش مبنی بر کاربرد این روش استفاده از گیاه تنباکوی تراریخته با یک ژن مهارکننده تریپسین (*CpTI*) از گیاه Cowpea می‌باشد، که توسط هیلدر و همکاران (۹) معرفی شد. این گروه توانست با بیان پروتئین حاصل از این ژن به مقدار یک در صد کل پروتئین در سطح برگ گیاه، باعث صدمه به لارو یک نوع هلیوتیس (*Heliothis virescens*) که یک آفت جدی تنباکوست، گردد. این موضوع در رابطه با بازدارنده‌های پروتاز نوع سیستاتین همانند ترانس-اپوکسی سوکسینیل-لئوسیکلامیدو بوتان (*Trans - epoxy succinyl leocyclamido butane*) که به‌طور اختصاری E-64 نامیده می‌شود نیز صادق است. این بازدارنده منشأ قارچی داشته (۸) و بر علیه آنزیم‌های پروتازهای سیستتین گونه‌های سخت بال پوشان (*Coleoptera*) مؤثر است (۱۹ و ۳۰). لازم به ذکر است که حشرات راسته‌های سخت بال پوشان و ناجور بالان (*Hemiptera*) دارای محیط گوارشی با اسیدیته ملایم بوده و به‌طور معمول دارای پروتازهای سیستتین در لوله گوارشی خود می‌باشند (۳ و ۱۱) و ۱۴ و ۲۰). در عین حال حشرات با داشتن پروتازهای جایگزین و غیر حساس ممکن است عمل بازدارندگی سیستاتین‌ها را تعدیل نمایند (۲۱). بنابراین به منظور استفاده از مهارکننده‌های پروتاز در گیاهان می‌بایست ضمن در نظر گرفتن پیچیدگی و خصوصیات فیزیولوژیکی پروتازهای موجود در سیستم گوارشی حشرات در شرایط متفاوت، از بازدارنده هائی با طیف وسیع عملکرد و پایدار که به‌طور مؤثر به پروتازهای خود وصل شده و آنها را غیر فعال می‌کنند، استفاده نمود (۱۳).

پژوهش‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نشان می‌دهد که انتقال ژن‌های سیستاتین‌های برنج (*OC I & OC II*) به ژنوم گیاه سیب زمینی، ضمن افزایش مقاومت نسبی این گیاه در مقابل آفت سوسک کلرادو، از پایداری خوبی برخوردار نبوده

گیاهی و انتقال آنها به گونه‌های دیگر، حتی بدون قرابت خویشاوندی، ویژگی این روش را نسبت به شیوه‌های سنتی اصلاح نباتات نشان می‌دهد.

تهیه و تدوین استراتژی‌هائی در به‌کارگیری ژن‌(ها)ی بیان‌کننده بازدارنده‌ها و تنظیم سیستم‌های آنزیمی به‌وسیله آنها، چشم انداز باارزشی را در به‌وجود آوردن گیاهان مقاوم به آفات نشان می‌دهد. دو استراتژی در تولید گیاهان تراریخته مقاوم به حشرات معرفی شده است. در یک استراتژی از پروتئین‌های سمی باسیلوس ترنجینسیس (BT) استفاده می‌شود (۶)، که در آن حشرات تغذیه کننده از بافت‌های گیاهی که این سم در آنها بیان می‌شود، به‌طور مستقیم تحت تأثیر سم هضم شده قرار می‌گیرند. تاکنون تعدادی از این ژن‌ها کلون شده و توسط پلاسمید ناقل به گیاهان منتقل و تراریخته‌های حاصل، تا حد زیادی در مقابل خسارت ناشی از آفات تغذیه کننده مصون مانده‌اند (۲۲ و ۲۷). گرچه گیاهان تجارتي دارنده BT سطح قابل ملاحظه‌ای از مصونیت را در مقابل حشرات از خود نشان داده‌اند، اما محتویات سمی تولید شده توسط باکتری در تحت شرایط مزرعه و به‌خصوص در شدت نور ماورای بنفش پایدار نمی‌ماند. علاوه بر آن تأثیر این سموم بیولوژیکی بر روی آفات به دلیل حالت تکاملی مقاومت آنان به سموم در نهایت و به‌طور سریع از بین می‌رود (۲۶)، لذا می‌بایست به دنبال راه حل‌های جایگزینی دیگری بود.

در استراتژی دیگر از پروتئین‌های بازدارنده با منشأ گیاهی استفاده می‌شود. نشان داده شده است که بازدارنده‌های آلفا آمیلاز، سیستاتین‌ها، پراکسیدازها و یکسری ملکول‌های دیگر در مکانیزم دفاعی گیاهان بر علیه حشرات و پاتوژن‌ها نقش دارند (۶، ۷ و ۱۸). هضم و تجزیه پروتئین‌های جذب شده از گیاهان با آنزیم‌های پروتئولیتیک موجود در لوله گوارشی حشرات صورت می‌پذیرد که این موضوع باعث رشد، تکامل و زاد و ولد حشرات می‌گردد (۲۳). در صورتی که به‌گونه‌ای بتوان از فعالیت این آنزیم‌ها جلوگیری نمود، حشرات با کمبود اسیدهای آمینه مواجه شده و در نتیجه افزایش مرگ و میر، زاد و ولد آنها

سانتی گراد نگهداری شد.

برای استخراج و خالص سازی RNA از کیت شرکت کپازن کانادا و پروتکل مربوطه (۱۹۹۶) استفاده شد. RNA نمونه در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای تعیین میزان RNA استخراجی از دانه ذرت، مقدار ۵ میکرولیتر از عصاره استخراج شده در ۴۹۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده حل و غلظت نمونه بوسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر در مقایسه با شاهد (آب DEPC اتوکلاو شده) اندازه گیری شد.

ازدیاد cDNA سیستماتین ذرت با روش نسخه برداری معکوس (Reverse Transcription)

برای ساخت cDNA از کیت شرکت فارماسیا بیوتک آمریکا (USA Pharmacia Biotech) استفاده شد. محلول تهیه شده به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۶۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و بلافاصله به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ سرد شد. سپس برای تولید cDNA، در یکی از لوله ها ۲۰ پیکو مول پرایمر تصادفی *pd(N)6* (hexadeoxyribonucleotide mixture) که از ۶ دزکسی ریبونوکلوئوتید تصادفی تشکیل و انتهای ۵ آن فسفرلیزه شده و برای ساخت cDNA از mRNA به کار برده می شود، استفاده شد. ترکیبات چند بار با پیپت خوب به هم زده شد و در حمام آب ۳۷ درجه سانتی گراد خوابانده شد و محصول به دست آمده در منهای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمرز

چهار میکرو تیوب PCR با محتوای زیر تهیه شد: تیوب اول: ۳۶/۵ میکرولیتر آب اتوکلاو شده، پنج میکرولیتر بافر DNA Taq پلیمرز، پنج میکرولیتر dNTP به غلظت دو میلی مولار، یک میکرولیتر از پرایمرهای CC1.3 و CC1.5 L، نیم میکرولیتر از آنزیم پلیمرز Taq و یک میکرولیتر از DNA استخراج شده. محتویات تیوب دوم شبیه به اولی بوده و تنها نوع پرایمرها به CC1.5L و CC2.3 تغییر یافت، محتویات

است. هم چنین انتقال ژن های بازدارنده آنزیم های تریپسین (در کلم تراریخته و سویا)، و نوعی از بازدارنده شماره دو موجود در سیب زمینی، حساسیت های متفاوتی را در حشرات مهاجم تغذیه کننده از آنها به وجود آورده است. با جستجو و استفاده از بازدارنده های با طیف عملکرد وسیع تر و پایدارتر و قرار دادن آنها در ژنوم گیاهان دیگر می توان از فعالیت آنزیم های پروتاز به هنگام تغذیه حشرات از گیاهان مهندسی شده جلوگیری نموده یا فعالیت آنها را کاهش داد و بدین ترتیب با جمعیت آفت مبارزه نمود (۵). در این راستا، هدف این پژوهش جداسازی و کلون سازی ژن سیستماتین ذرت (CCs) موجود در دانه های این گیاه، تهیه cDNA، کلون سازی و ارزیابی بازدارندگی پروتئین حاصل از آن در قبال آنزیم پروتاز سیستماتین در محیط آزمایشگاه می باشد.

مواد و روش ها

استخراج DNA و RNA

برای کاشت ذرت در گلخانه مقداری دانه ذرت در یک فلاسک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر شده که هوا به مدت ۴۸ ساعت در آن جریان داشت، خیسانده شد. سپس دانه ها در کیسه های پلی اتیلن سه لیتری که با ورمی کولیت پر شده بود کاشته شدند. گلدان ها در شرایط کنترل شده حرارت و رطوبت گلخانه با میزان ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند و پس از تغذیه با کود کامل ازت، فسفر و پتاسیم (۱۵ - ۳۰ - ۱۵) با دور پنج روز آبیاری شدند. گلدان های کشت شده تحت این شرایط تا زمانی که نهال های ذرت به غلاف نشستند، نگهداری شدند. تعدادی از غلاف های جوان ذرت برداشت و دانه های ذرت نابالغ و هم چنین دیسک هایی از برگ در شرایط استریل جدا و پس از انجماد در نیتروژن مایع، در ۸۰°C - نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی با استفاده از پروتکل K. Edward (۴) انجام گرفت. غلظت DNA ژنومی با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری و DNA استخراج شده در چهار درجه

بعدی ذخیره شد. برای اثبات خالص سازی نمونه‌ها یک آزمایش ژل الکتروفورز انجام گرفت و توالی آنها از طریق بانک ژن مشخص گردید.

کلون سازی cDNA سیستاتین ذرت (CCs) در ناقل *pGEX* *pUC 19* و *2T*

برای کلون سازی محصول RT-PCR خالص شده میبایست آنرا به یک ناقل مناسب متصل نمود. برای این منظور عمل هضم دوگانه توسط آنزیم‌های *SmaI* و *Bam HI* صورت گرفت. در پایان عمل هضم با اضافه نمودن لودینگ بافر (پنج میکرولیتر) به محلول و انتقال آن به آگاروز ژل و الکتروفورز کردن، باندها در زیر نور UV مشاهده شد. پلاسمید *pUC 19* و *pGEX 2T* نیز به همین ترتیب هضم شد. عمل هضم محصول RT-PCR و پلاسمیدها با آنزیم‌های محدود کننده و با استفاده از کیت استاندارد شرکت BOEHRINGER MANNHEIM آلمان (در حال حاضر با شرکت ROCHE ادغام شده است) انجام گرفت. در پایان هر کدام از رسوب حاوی پلاسمید با سیستاتین‌های ذرت گنجانده شده در ۲۰ میکرو لیتر آب مقطر اتوکلاو شده حل و برای استفاده بعدی در یخچال و در چهار درجه سانتی گراد نگه‌داری شد. برای تعیین صحت عمل اتصال محصول در پلاسمید، عمل هضم دوگانه با آنزیم‌های *Sma I* و *Bam HI* بر روی پلاسمید حاوی محصول صورت گرفت و نمونه‌ها الکتروفورز شد.

انتقال کلون‌ها به سلول‌های مستعد اشرشیاکولی

۴۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد *DH 5 α* در محیط اتاق با دو میکرولیتر از پلاسمیدهای حاوی cDNA مورد نظر در *cuvette* برای چندین بار با آرامی پپیت و با استفاده از دستگاه شوک الکتریکی با تنظیم مقاومت 200Ω و ولتاژ دو و نیم ولت، پالس ایجاد و عمل انتقال صورت گرفت. سلول‌های انتقال یافته بلافاصله در یک میلی لیتر محلول تازه LB فاقد آمپی سیلین حل شده و پس از ازدیاد، ۱۰۰ میکرو لیتر از سلول‌های ازدیاد

تیوب سوم شبیه به دومی بوده و تنها نوع پرایمرها به CC1.5S و CC2.3 تغییر یافت و محتویات تیوب چهارم شبیه به تیوب سوم بوده و تنها نوع پرایمرها به CC2.3 و CC2.5S تغییر یافت (پرایمرهای مورد استفاده در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه لوال کانادا ساخته شده است). فرایند PCR با مختصات ۴۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، و ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ دور چرخش انجام شد. سپس نمونه‌ای از هر کدام از محصول به دست آمده و مارکر استاندارد (1 kb) با اضافه نمودن محلول اتیدیوم بروماید (Etidium Bromide) به ژل آگاروز یک درصد منتقل و الکتروفورز شد و باندهای حاصله با استفاده از نور UV مشاهده گردید. طراحی پرایمرها بر مبنای توالی سیستاتین‌های کوتاه و بلند ذرت و جایگاه آنزیم‌های برش دهنده آنها از جمله *Sma I* و *Bam HI* در جدول زیر آمده است. ویژگی این پرایمرها آنست که به دلیل اختصاصی بودن، در فرایند PCR تنها توالی ژن‌های مورد نظر را ازدیاد می‌نمایند.

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
CC1.5L	AGGATCCAATCCAGATGCGCAAACATCGAATC
CC1.5S	AGGATCCGTGGCTGAGAACCCTGGGATGTTG
CC1.3	TCCCCTGGTGCATGCTCTGGCATGTCCGA
CC2.5S	AGGATCCCATGGCCGACAACACCCGGGACG
CC2.3	ACCCGGGAGAAGGAGAGATCCTTAGGCGCT

ترادف نوکلئوتید و خالص سازی cDNA سیستاتین ذرت

برای خالص سازی محصول cDNA از کیت سفالگاس باند پرپ (Pharmacia Biotech, 1995) (Sephalgas Bond prep kit) استفاده شد. نمونه‌هایی از هر محصول RT-PCR به ژل آگاروز یک درصد منتقل و در حضور مارکر استاندارد، الکتروفورز شد. باندهای مشاهده شده در ناحیه سیستاتین‌های ذرت I و II که به دلیل نوع پرایمرهای استفاده شده و وجود سیستاتین‌های کوتاه و بلند به صورت دو باند با وزن ملکولی متفاوت و پشت سر هم در هر ستون دیده می‌شدند، بریده شده و به‌طور جداگانه در لوله‌های یک میلی لیتری ذخیره شدند. محصول خالص RT-PCR به دست آمده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مصارف

لیزوزیم اضافه و دوباره برای مدت پنج دقیقه در یخ نگه‌داری شد. سپس محلول حاصل از عمل لیزوزیم برای ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ g و در ۴ °C سانتریفیوژ و هر دو مایع روئی و رسوب برای آزمایش تعیین پروتئین نگه‌داری شدند.

به نیم میلی لیتر از عصاره، ۰/۷۵ میلی لیتر محلول ۵۰ در صد گلو تاتیون آگاروز بید (Glutathione agarose beads) (چهار میلی لیتر Tris ۵۰ میلی مولار با PH مساوی هشت + ۱۵۰ میلی گرم گلو تاتیون آگاروز بید) اضافه شد. حجم نهائی برای مدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان داده شد تا پروتئین متصل به GST جذب bead شود و سپس برای ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. مایع روئی با پیپت پاستور به آرامی جدا و با اضافه نمودن سه میلی لیتر Tris ۵۰ میلی مولار، ترکیب همانند حالت قبل سانتریفیوژ شد. این عمل برای سه بار تکرار تا تمام پروتئین جذب شده و در نهایت پروتئین جذب شده به bead با نیم میلی مولار Tris ۵۰ میلی مولار حاوی ۱۰ میلی مولار گلو تاتیون ترکیب و با استفاده از سانتریفیوژ به مدت پنج دقیقه در سرعت ۱۰ هزار دور، مایع روئی حاوی پروتئین خالص برداشت شد. این عمل برای به دست آوردن حداکثر پروتئین، یکبار دیگر تکرار و پروتئین خالص در ۲۰ °C - برای مصارف بعدی نگه‌داری شد.

تخمین غلظت پروتئین سیستمین ذرت با استفاده از آزمایش برادفورد (Bradford Test)

به منظور تخمین میزان پروتئین تولیدی، از آزمایش سریع برادفورد (۲) و از BSA (Bovine Serum Albumin) به عنوان استاندارد استفاده شد. برای تخمین غلظت پروتئین حاصله مقدار ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، و ۲۵ میکرو لیتر از غلظت نهایی ۴۰۰ میکرو گرم محلول تهیه شده BSA که غلظت هر کدام به ترتیب دو، چهار، شش، هشت و ده میکرو گرم در میلی لیتر محاسبه شد، برداشت و با اضافه نمودن ۲۰۰ میکرو لیتر محلول برادفورد و آب مقطر دو بار تقطیر شده حجم تمام لوله‌های آزمایش به هزار میکرو لیتر رسانده شد و با اسپکتروفتومتر غلظت‌ها در دو

شده بر روی محیط استریل FastMedia™ LB Agar Amp IPTG/X-Gal تهیه شده از شرکت فرمنتاس (Phermentas Company) به مدت یک شب در درجه حرارت ۳۷ °C نگه‌داری شدند. کلونی‌های به دست آمده در روی پلیت‌های حاوی محیط LB و آمپی سیلین مخلوط شدند و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب نگه‌داری شدند. برای جداسازی و خالص سازی پلاسمیدهای حاوی سیستمین‌های ذرت انتقال یافته به سلول‌های مستعد از کیت فلکسی پرپ شرکت فارماسیا بیوتک (Pharmacia Biotech, Flexi prep kit) و مطابق پروتکل مربوطه عمل شد. برای جداسازی گنجانده از پلاسمید، پنج میکرو لیتر از پلاسمیدهای خالص شده تحت تأثیر آنزیم‌های *Sma I* و *Bam HI* به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد برای تأیید وجود فرایند کلون سازی نگه‌داری و نمونه‌ها ژل الکتروفورز شدند.

تولید پروتئین سیستمین ذرت در *E. coli* و خالص سازی

سلول‌های مستعد *DH5 α* حامل پلاسمیدهای نو ترکیب و خالص سازی شده *pUC 19* و *φGEX 2T* جهت تشخیص تولید پروتئین توسط ژن‌های گنجانده شده، به شرح زیر مورد آزمایش قرار گرفتند:

برای تحریک به تولید پروتئین نو ترکیب، سلول‌های برداشت شده حامل پلاسمیدها در ۲۰ میلی لیتر محیط LB و یک میلی مول (SIGMA, USA) IPTG به غلظت دو میلی مولار برای مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. محصول به دست آمده در سرعت ۶۰۰۰ g و در درجه حرارت چهار درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع روئی دور ریخته شد و رسوب حاصل برای مدت یک ساعت در ۲۰ °C - نگه‌داری شد. آنگاه یک میلی لیتر لیسبس بافر (۵۰ میلی مولار Tris با اسیدیته ۸، ۲۰ میلی مولار EDTA، ۵ در صد حجمی Triton X-100 و گلیسرول) اضافه و محلول به مدت پنج دقیقه در یخ نگه‌داری شد. به این محلول ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر (غلظت نهایی ۰/۰۲۵ در صد)

سیستاتین قرار داده شد. نمونه‌ها در معرض ۲۰۰ ولت جریان الکتریسته الکتروفورز گردیدند. در پایان فعالیت پایداری مهارکننده‌های آزمایش شده که به وسیله کوماسی بریلیانت بلو (Commase Brilliant Blue) رنگ آمیزی شده بودند به صورت باندهای آبی رنگی مشاهده گردید.

نتایج

اندازه‌گیری DNA و RNA استخراج شده

تخمین غلظت DNA ژنومی استخراج شده از برگ ذرت با استفاده از اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر (هر واحد OD معادل ۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر DNA ژنومی است) و با انجام محاسبات، ۴۶۰ میکرو گرم در میلی لیتر به دست آمد. میزان RNA استخراج شده از دانه ذرت، با استفاده از اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر در مقایسه با شاهد (آب خالص دو بار تقطیر شده) خوانده شد. مقدار RNA نیز شبیه به DNA محاسبه گردید، تنها با این تفاوت که هر واحد OD معادل ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر RNA می‌باشد. میزان RNA محاسبه شده ۴۲۴ نانو گرم در میلی لیتر به دست آمد.

توالی و مشاهده باندهای مربوط به سیستاتین نو ترکیب ذرت

بر روی ژل الکتروفورز

توالی cDNA سیستاتین‌های ذرت I و II کوتاه و بلند با استفاده از بانک ژن مشخص شد. سیستاتین ذرت با کد دسترسی D10622, D90549 از نظر آنالیز آنزیمی دارای ۹ جایگاه آنزیمی (شش برش دهنده از جمله *BamHI*, *EcoRI* و *SmaI*) بوده و سیستاتین ذرت II با کد دسترسی D38130 دارای ۷ جایگاه آنزیمی برش دهنده می‌باشد.

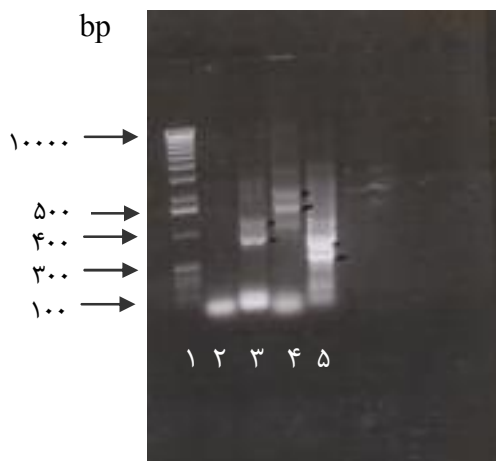
محصول هر کدام از سیستاتین‌های حاصل DNA ژنومی که تحت تأثیر آنزیم‌های برشی قرار گرفته و توسط PCR تکثیر شده بود به ژل الکتروفورز منتقل که نتایج آن در شکل ۱ مشاهده می‌شود. از آنجا که واکنش PCR مربوط به DNA ژنومی یک واکنش غیر اختصاصی بوده و نمی‌توان صد در صد

تکرار و در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و معدل آنها محاسبه گردید. برای نمونه‌های پروتئین‌های نو ترکیب سیستاتین ذرت نیز چگالی نوری به همین ترتیب محاسبه و از نرم افزار گراف کریکر (Crickler graph Software) و OD به دست آمده برای غلظت‌های شناخته شده BSA استفاده و با داشتن معادله رگرسیون حاصل از گراف غلظت پروتئین‌های مورد نظر محاسبه شد.

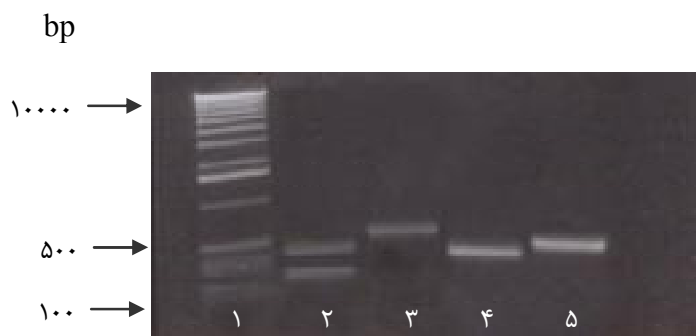
آزمایش فعالیت و پایداری سیستاتین‌های نو ترکیب بازدارنده

پروتاز سیستتین

برای این منظور دو آزمایش ترتیب داده شد که در یکی از پروپاپین (PP) با وزن ملکولی ۳۹ کیلو دالتون و در دیگری از پرو پروتیناز پاپایا (*Carica papaya*) (PP IV) با وزن ملکولی ۱۳ کیلو دالتون به عنوان سوبسترا و از عصاره لوله گوارشی لارو سوسک کلرادو (تهیه شده توسط گروه تحقیقات آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه لاوال) به عنوان منبع سیستتین پروتاز استفاده شد. در هر کدام از این آزمایش‌ها مقدار هفت ونیم میکروگرم از عصاره حاوی پروتاز به حجم ۵۰ میکرو لیتر رسانده شد. سپس مقدار پنج میکرو لیتر از مهارکننده‌های سیستاتین (10 mg/ml) به طور جداگانه با هر نمونه ترکیب و آنگاه با اضافه نمودن ۴۵ میکرو لیتر بافر فعال کننده (Activated Buffer) (100 mM Cit-Po4, PH=6; 0/1 Triton X-100 & 5 mM L-Cysteine) حجم کل هر نمونه به ۱۰۰ میکرو لیتر رسانده شد. برای تعیین فعالیت و مدت پایداری مهارکننده‌ها، ترکیب‌های تهیه شده به نمونه‌های ۱۰ میکرو لیتری تقسیم و در مدت زمان‌های مختلف صفر، ۲۰، ۴۰ ثانیه و ۱، ۵، ۱۰ و ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگه‌داری و در پایان هر وقت فعالیت مهارکنندگی با TCA همانند قبل متوقف شد. برای تشخیص فعالیت و میزان پایداری مهارکننده سیستاتین بر علیه پروتاز سیستتین موجود در عصاره از تکنیک Gelatin-PAGE استفاده شد (۱۸ و ۲۴). نمونه‌های تهیه شده در هر آزمایش را به طور جداگانه در چاهک‌های ژل پلی آکرلامید ریخته و در هر کدام عصاره لوله گوارش لارو حشره سوسک کلرادو حاوی پروتاز سیستتین و مهارکننده



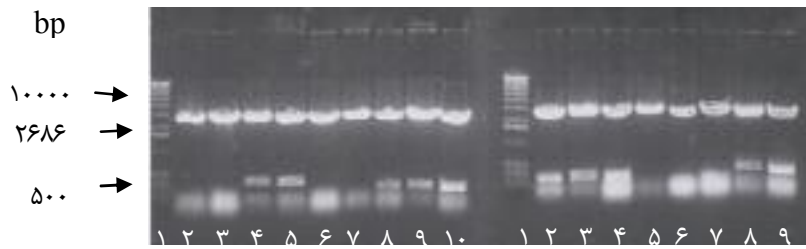
شکل ۱. نتایج حاصل از PCR محصول DNA ژنومیک سیستمین‌های ذرت (CCI & CCII) پس از عمل هضم آنزیمی در ژل آگاروز را نشان می‌دهد. ستون ۱ مارکر استاندارد با وزن مولکولی 1 kb می‌باشد. ستون ۲ فاقد عمل هضم آنزیمی و ستون ۳ باندهای مربوط به سیستمین ذرت (CCI) کوتاه، ستون ۴ باندهای مربوط به سیستمین ذرت (CCI) بلند و ستون ۵ قطعه کروموزوم مربوط به سیستمین ذرت (CCII) را نشان می‌دهد. وجود باندهای اضافی در هر ستون نشان‌دهنده وجود احتمالی ژن‌های همتای سیستمین ذرت می‌باشد.



شکل ۲. نمونه‌های خالص شده cDNA مربوط به هر کدام از سیستمین‌های ذرت در محصول RT-PCR را نشان می‌دهد. ستون ۱ مربوط به مارکر استاندارد با وزن مولکولی 1000 bp می‌باشد. ستون‌های ۲ (باند بالایی) و ستون ۳ مربوط به CCI کوتاه و بلند و ستون‌های ۴ و ۵ به ترتیب مربوط به CCII کوتاه و بلند می‌باشد. باند اضافی پائینی موجود در ستون دو می‌تواند مربوط به محصول مشابه باشد.

پلاسمیدهای نوترکیب *pUC* مقاوم به آمپی سیلین بر روی محیط کشت با رنگ سفید و آبی ظاهر شدند. برای تشخیص پلاسمیدهای حاوی cDNA گنجانده، چند کلونی نوترکیب سفید به‌طور جداگانه جدا و هر کدام پس از رشد در محیط LB دارای آمپی سیلین و به‌مدت یک شب قرار گرفتن بر روی شیکر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برداشت و نمونه‌ای از پلاسمیدهای استحصالی از هر کدام و با عمل هضم و انجام الکتروفورز cDNA، گنجانده تأیید شد. در کلونی‌هایی که تحت

به محصولات آن و باندهای مشاهده شده استناد کرد، لذا برای اطمینان لازم از محصولات RT-PCR استفاده شد. مزیت استفاده از روش نسخه برداری معکوس استفاده از RNA به‌مثابه قالب برای تولید cDNA که فاقد اینترون (قطعه DNAی که هیچ نوع ژنی را بیان نمی‌کند) است، می‌باشد. محصول cDNA به‌دست آمده از mRNA توسط PCR تکثیر که پس ازخالص سازی و ژل الکتروفورز کردن، نتایج در شکل ۲ آمده است.



شکل ۳. پلاسمیدهای نو ترکیب *pUC 19* را نشان می‌دهد (۲۶۸۶ جفت باز) که تحت تاثیر عمل هضم قرار گرفته و cDNA سیستم‌های ذرت از آنها جدا و در وزن ملکولی خود قرار گرفته‌اند.

ردیف‌های ۱ در هر قسمت تصویر، مارکر استاندارد با وزن ملکولی ۱۰۰ bp است. ردیف‌های ۲ و ۳ و ۶ و ۷ از تصویر سمت چپ و ردیف‌های ۵ و ۶ و ۷ از تصویر سمت راست پلاسمیدهایی هستند که تحت تاثیر آنزیم‌های برش دهنده قرار گرفته ولی فاقد قطعه مورد نظر می‌باشند. ردیف‌های ۴ و ۵ و ۸ تا ۱۰ از تصویر سمت چپ به ترتیب کلونی‌های دارای سیستم‌های ذرت CCI و CCH کوتاه (۳۹۵ و ۳۵۰ جفت باز) و ردیف‌های ۲ تا ۴ و ۸ و ۹ از تصویر سمت راست به ترتیب کلونی‌های دارای سیستم‌های ذرت CCI و CCH بلند (۴۵۰ و ۵۰۰ جفت باز) هستند که به وسیله آنزیم‌های مناسب برش دو گانه داده شده‌اند و باقی مانده پلاسمید های pUC در ردیف‌های بالا مشاهده می‌شود.

جدول ۱. چگالی نوری و تعیین غلظت پروتئین برای نو ترکیب سیستم‌های ذرت

نمونه	چگالی نوری تکرار اول	چگالی نوری تکرار دوم	معدل چگالی نوری	غلظت پروتئین μg/ 5 μl
CC I بلند	۰/۲۴۴	۰/۲۴۰	۰/۲۴۲	۳/۵۹
CCI کوتاه	۰/۳۸۷	۰/۳۵۰	۰/۳۶۸	۶/۰
CCII بلند	۰/۷۴۵	۰/۶۸۲	۰/۷۱۳	۱۱/۹۶
CCHII کوتاه	۰/۷۰۷	۰/۶۴۴	۰/۶۷۵	۱۱/۰۶

۳/۵۹ و ۶ میکروگرم در پنج میکرو لیتر برای سیستم‌های ذرت شماره I (به ترتیب بلند و کوتاه) و ۱۱/۹۶ و ۱۱/۰۶ میکروگرم در پنج میکرو لیتر برای سیستم‌های ذرت شماره II (به ترتیب بلند و کوتاه) بود که بیان بهتر سیستم‌های شماره II را در پلاسمید نو ترکیب نشان می‌دهد (جدول ۱).

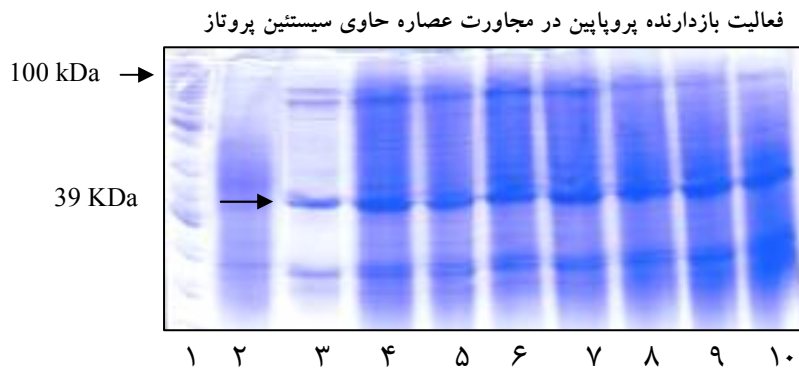
فعالیت و پایداری مهارکننده‌های سیستم‌های

شکل ۴ نشانگر میزان فعالیت مهارکننده سیستم‌های پایداری آن در برابر عصاره گوارشی لارو سوسک کلرادو حاوی سیستم‌های پروتاز می‌باشد. همان گونه که مشاهده می‌شود شدت تظاهر باندهای موجود در ستون‌های ۳ الی ۱۰ حتی ۳۰ دقیقه پس از

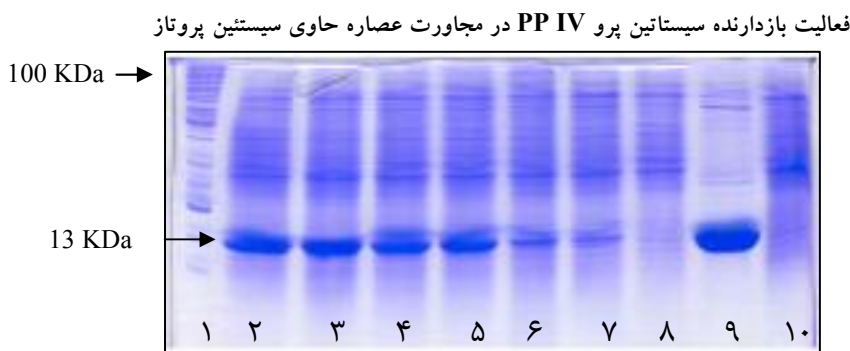
تأثیر این آنزیم‌ها قرار گرفتند باندهای مطابق با وزن ملکولی سیستم‌های ذرت I و II مشاهده شد (شکل ۳).

تعیین غلظت پروتئین سیستم‌های ذرت

شدت رنگ آبی در رابطه با سیستم‌های ذرت II در آزمایش سریع برادفورد نشان دهنده بیان خوب این مهارکننده و رنگ آبی بسیار کم رنگ نشان دهنده حضور کم پروتئین سیستم‌های ذرت بلند بود. برای تعیین دقیق غلظت این پروتئین‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر چگالی نوری (OD) هر کدام از محلول برادفورد و نمونه‌های پروتئین در دو تکرار در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و معدل آنها محاسبه گردید. غلظت پروتئین نمونه‌ها



شکل ۴. ستون ۱ مارکر با وزن ملکولی ۱۰۰ KDa ، ستون ۲ عصاره حاوی پروتاز، ستون ۳ بازدارنده پروپاپین (PP) (۳۹ کیلو دالتون)، و ستون‌های ۴ الی ۱۰ ترکیب بازدارنده و سوبسترا که به ترتیب در مدت زمان‌های صفر، ۲۰، ۴۰ ثانیه و ۱، ۵، ۱۰ و ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار داده شده است را نشان می‌دهد. شدت تظاهر باند در ناحیه ۳۹ کیلو دالتون تا مدت ۳۰ دقیقه پس از مجاورت با سوبسترا (ستون ۱۰) نشانگر پایداری بازدارنده پروپاپین و هیدرولیز نشدن آن می‌باشد.



شکل ۵. ستون ۱ مارکر، ستون ۹ مهار کننده پرو پروتاز پاپایا (۱۳ کیلو دالتون)، ستون ۱۰ عصاره حاوی سیستین پروتاز، و ستون‌های ۲ الی ۸ ترکیب مهار کننده و سوبسترا را که در مدت زمان‌های صفر، ۲۰، ۴۰ ثانیه و ۱، ۵، ۱۰ و ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار داده شده و الکتروفورز گردیده‌اند را نشان می‌دهد. شدت تظاهر باندها از ستون ۲ تا ۵ کاهش بسیار کم داشته و از ستون ۶ تا ۸ کاهش آن شدید به طوری که در ستون ۸ تقریباً ناپدید شده است که خود نشانگر قدرت چسبندگی و فعالیت بازدارنده سیستاتین بر علیه پروتاز پاپایا ولی هیدرولیز تدریجی آن در طول زمان می‌باشد.

نسبتاً خوبی را در مقابل سوبسترای خود یعنی عصاره حاوی پروتاز سیستین نشان داده است، اما پایداری این مهار کننده باندها پایین نمی‌باشد، به گونه‌ای که شدت تظاهر باند مهار کننده مربوطه از ستون ۲ تا ۸ که مربوط به زمان‌های مختلف مجاور کردن آن با سوبسترا می‌باشد به تدریج کم شده و بعد از ۳۰ دقیقه تنها اثر ناچیزی از آن باقی مانده است. این موضوع گواه بر فعالیت نسبی مهار کنندگی در مقابل سوبسترای حاوی سیستین پروتاز مورد آزمایش می‌باشد.

مجاور نمودن مهار کننده با سوبسترا بدون تغییر چندانی باقی مانده است که این موضوع نشانگر فعالیت مهار کنندگی این مهار کننده در مقابل منبع سیستین پروتاز یعنی عصاره روده سوسک کلرادو و عدم تجزیه سوبسترا و هیدرولیز نشدن آن می‌باشد. وجود باند مربوط به این مهار کننده حتی ۳۰ دقیقه پس از مجاور کردن آن با سوبسترا در محیط آزمایشگاه نشان از پایداری خوب این بازدارنده می‌باشد. در شکل ۵ موضوع تا حدودی متفاوت است. در این تصویر مشاهده می‌شود که مهار کننده پرو PP IV فعالیت

بحث

عدم پایداری و از بین رفتن تأثیر سم BT در طول زمان و پایداری پاره‌ای از حشرات در مقابل آن، محققان را بر آن داشته است تا به دنبال راه‌کارهای ژنتیکی دیگری باشند. در این رابطه اقدام به شناسایی و انتقال ژن‌های تولیدکننده پروتئین‌های بازدارنده پروتازها با دامنه وسیع فعالیت بازدارندگی، می‌تواند نتایج رضایت‌بخشی را در سیستم دفاعی گیاهان در مقابل آفات حمله‌کننده ایجاد نماید. سیستم‌های با داشتن مزیت نسبی در مقابل تغییرات اسیدیته لوله گوارشی حشرات در کنترل و مهار پروتازهای موجود در لوله گوارشی حشرات خانواده کلئوپترا مؤثر می‌باشند. از بین محصولات مهندسی شده ژنتیکی می‌توان به سیب زمینی تراژن حاوی ژن بازدارنده اریزا سیستم‌های (OCI) از محصول برنج اشاره کرد که تا حدی در مقابل آفت سوسک کلرادو (CPB) مقاومت نشان داده است ولی این سیستم‌ها قادر به اتصال و غیر فعال کردن پروتازهای کاتپسین نوع B و L نبوده و در محیط آزمایشگاه تنها ۳۰ درصد از فعالیت‌های پروتازی موجود در لوله گوارشی CPB را مهار می‌کند (۱۶). سیستم‌های ذرت به‌عنوان یک جایگزین و مدل جدید که دامنه فعالیت بیشتری را در مقابل پروتازها از خود نشان می‌دهند، معرفی شده‌اند (۱). با وجودی که ۷۱ درصد از اسیدهای آمینه موجود در سیستم‌های ذرت همانند آن در سیستم‌های برنج در فاصله بین اسید آمینه‌های ۳۶ و ۱۳۵ می‌باشد، اما سیستم‌های ذرت دارای قدرت بازدارندگی قوی تری در مقابل پاپین، کاتپسین H و L و قدرت بازدارندگی ضعیف تری در مقابل کاتپسین B می‌باشند. اختلاف سیستم‌های ذرت با سیستم‌های برنج در این می‌باشد که سیستم‌های ذرت می‌توانند دارای پپتیدهای سیگنالی باشند و لذا در یکی از اجزای سلولی نظیر واکوئل، شبکه‌های آندوپلاسمی و یا دستگاه گلژی ذخیره شوند (۱). بر خلاف پروتئین‌های سرین و پروتئین‌های آسپارتیک کاتپسین D که به مقدار زیاد در *E. coli* بیان شده است، مثال‌های محدودی از بیان پروتئین‌های سیستم‌های حتی به مقدار کم در *E. coli* گزارش

شده است (۲۹). در این پژوهش موفق شدیم تا cDNA سیستم‌های ذرت را به روش Reverse transcription به دست آورده و پروتئین‌های فعال سیستم‌ها را هر چند به مقدار کم در باکتری اشرشیاکولی تولید نماییم. چنانچه در تعیین غلظت محصول پروتئین سیستم‌ها در جدول ۱ مشاهده می‌شود بیان ژن حاکی از مقادیر متفاوت و نسبتاً کم سیستم‌های ذرت بلند و کوتاه می‌باشد. این اختلاف در میزان تظاهر پروتئین نو ترکیب می‌تواند به نوع ساخت نو ترکیب‌ها (نوع پلاسמיד و سلول‌های مستعد استفاده شده) مربوط شود. هم‌چنین عدم پایداری بعضی از پروتئین‌های نو ترکیب در سلول‌های مستعد نیز می‌تواند در تظاهر پروتئین نو ترکیب دخالت داشته باشد که احتیاج به تحقیق بیشتر دارد. چنانچه گزارش شده است شرایط مختلف از جمله نوع باکتری میزبان همراه با تعداد پلاسמיד حمل‌کننده نشانگر آنتی بیوتیک در بهینه سازی تولید انبوه پروتئین در اشرشیاکولی متفاوت و تأثیر گذار می‌باشد. قوی و یا ضعیف بودن و هم‌چنین خاصیت تنظیم‌کنندگی و جهت نسبی و قدرت پروموتور تأثیر اساسی بر روی پلاسמיד دارد (۱۵). Kane (۱۲) معتقد است که پایداری mRNA بر روی تولید اثر می‌گذارد، در حالی که ساختمان دوم، به خصوص انتهای ۵' آن، اغلب یک نقش بحرانی را بازی می‌کند که هم‌چنین می‌تواند بر روی دسترسی به ناحیه اتصال ریبوزوم اثر بگذارد، و این نهایتاً بر روی سطح بیان پروتئین مؤثر می‌باشد. سایر شرایط رشد همانند درجه حرارت پائین، سطح اکسیژن، منبع کربن، سرعت رشد و غیره نیز می‌تواند بر میزان تولید پروتئین تأثیر گذار باشد (۱۲). آبه و همکاران (۱) در یافته‌های خود پیرامون ویژگی‌های فیزیولوژیکی سیستم‌های I ذرت اظهار می‌دارند که در گیاه ذرت میزان mRNA این سیستم‌ها دو هفته بعد از گل‌دهی به حداکثر رسیده و بیان آن در طول بالغ شدن دانه ذرت ادامه می‌یابد. در پژوهش حاضر نیز برای به دست آوردن حداکثر DNA و mRNA این سیستم‌ها زمان برداشت غلاف‌های ذرت دو هفته بعد از گل‌دهی صورت گرفت. با وجودی که تلاش زیادی صورت گرفت تا مطابق پروتکل‌ها و

می‌باشد را تغییر دادند، موفق به بیان پروتئین متصل ۱۲۰ اسید آمینه‌ای فاقد سیگنال پپتید در سطح مطلوبی شدند. میشاد و همکاران (۱۶) از سلول‌های مستعد JM-109 به‌عنوان یک گونه با ارزش برای بیان GST-OC I استفاده نموده‌اند.

چنانچه از نتایج این پژوهش به‌دست آمد CC I و CC II در مقایسه توالی اسیدهای آمینه و تعداد جفت بازشان و در نتیجه خصوصیات بیوشیمیایی آنها در مقابل پروتازها با هم تفاوت دارند که این موضوع با نتایج به‌دست آمده توسط آبه و همکاران (۱) مطابقت دارد. از طرف دیگر خصوصیات سیستمین‌های ذرت با سیستمین‌های برنج (OCs) به دلیل داشتن یک نشان پپتیدی که باعث هدایت تجمع این نوع سیستمین‌ها در محل به‌خصوصی از اجزا درون سلولی می‌شود (نیاز به تحقیق دارد)، متفاوت است. در مجموع قدرت بازدارندگی سیستمین‌های ذرت (CCs) نسبت به سیستمین‌های برنج (OCs) به دلیل میل ترکیبی آنها با پروتازها، بیشتر می‌باشد. هر دوی سیستمین ذرت دارای قدرت بازدارندگی قوی تری در مقابل پایین می‌باشند (به‌ترتیب K_i 3.7×10^{-8} و 6.6×10^{-8} برای CCI و CCII در مقایسه با 3.64×10^{-8} و 1.14×10^{-6} برای OCI و OCII). همچنین CCI دارای قدرت بازدارندگی قوی تری در مجاورت کاتاپسین H (K_i 5.7×10^{-9})، در مقایسه با OCI (K_i 7.8×10^{-8}) و OCII (K_i 2.5×10^{-7}) می‌باشد (۱ و ۲۱).

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولین محترم وزارت جهاد سازندگی وقت که فرصت انجام این پژوهش را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می‌نمایم. هم‌چنین از آقایان دکتر دومنیک میشاد و دکتر بین کوک اساتید بخش فیزیولوژی دانشگاه لاوال کانادا که در انجام مراحل آزمایش‌ها با طرح مباحث علمی و فراهم نمودن تجهیزات آزمایشگاهی مرا یاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

دستورالعمل‌های موجود شرایط مناسبی برای تولید و بیان حداکثری پروتئین نوترکیب به‌وجود آید، لیکن نوع ناقل پلاسمید و سلول‌های مستعد مورد استفاده و سایر عوامل ناشناخته موانعی را در راه به‌دست آوردن این سطح مطلوب از پروتئین فعال نوترکیب را ایجاد نمود. در عین حال بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب سیستمین ذرت هر چند به‌مقدار کم در این آزمایش بیانگر این مطلب است که با استفاده از سلول‌های مستعد بهتر و کلون سازی موثرتر قطعه ژن در پلاسمید می‌توان به این مهم دست یافت. آبه و همکاران (۱) معتقدند که بیان کم این پروتئین در سلول مستعد *E. coli* می‌تواند ناشی از وجود سیگنال پپتید نسبتاً طولانی همراه این پروتئین باشد که از نفوذ آن در غشای سیتوپلاسمی اشرشیاکولی می‌کاهد. علت استفاده از پلاسمید *pGEX* به‌عنوان ناقل در این آزمایشات به‌دلیل نقش هدایتی آن در قرار دادن نوترکیب در اشرشیاکولی و اتصال آن به انتهای کربوکسیل ملکول ۲۶ کیلو دالتونی GST بوده که اغلب پروتئین متصل شده را قادر می‌سازد که در محیط آبی محلول بوده و براحتی بتواند از ماده خام باکتریایی جدا شود (۲۵). ناقل *pGEX 3x* قبلاً توسط میشاد و همکاران (۱۷)، به‌صورت موفقیت آمیز برای بیان سیستمین برنج (OCs) استفاده شده بود. در پژوهش حاضر از ناقل *pUC 19* به‌عنوان ناقل اصلی برای کلون سازی، و قدرت افزایش دهی میزان بیان در باکتری اشرشیاکولی استفاده شد (۲۸ و ۳۱). هم‌چنین دلیل استفاده از ناقل *pGEX 2T* که انتهای NH₂ اسید آمینه از آن منشاء می‌گیرد، امکان تولید پروتئینی با اسید آمینه‌های سیستمین ذرت با و یا بدون سیگنال پپتید بوده است. آبه و همکاران (۱) با استفاده از ناقل *pCC7S* در سلول‌های مستعد *E. coli* موفق به بیان پروتئین سیستمین ذرت با وزن ملکولی ۱۷ کیلو دالتون به‌مقدار کم شدند، اما زمانی که آنها نوع پلاسمید نوترکیب *pCC7H* که بنا به گفته ایشان یک پلاسمید ساخته شده قوی در افزایش مقدار بیان پروتئین نوترکیب سیستمین ذرت

منابع مورد استفاده

1. Abe, M., K. Abe, M. Kuroda and S. Arai. 1992. Corn kernel cysteine protease inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. *Eurp. J. Biochem.* 209:933-937.
2. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
3. Chen, M. S., B. Johnson, L. Wen, S. Muthukrishnan, K.J. Kramer, T. D. Morgan and G. R. Reeck. 1992. Rice Cystatin Bacterial Expression, Purification, Cysteine Proteinase Inhibitory Activity, and Insect Growth Suppressing Activity of a Truncated Form of the protein. *Protein Express Purif* 3:41-49.
4. Edward. K., C. Johnston and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR Analysis. *Nucleic Acids Res.* 19:1349.
5. Felton, G. W, C. B. Summers and A. J. Mueller. 1994. Oxidative responses in soybean foliage to herbivory by bean leaf beetle and three-cornered alfalfa hopper. *J. Chem. Ecol.* 20(3): 639-650.
6. Gatehouse, A. M. R., Y. Shi, K. S. Powell, C. Brough, V. A. Hider, W. D. Hamilton, C. Newwell, A. Merryweather, D. Bulter and J. A. Gatehouse. 1991. Approaches to insect resistance using transgenic plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London.*
7. Gatehouse A. M. R., Down R. E, K. S Powell, N. Sauvion, Y. Rahbe, C. A. Newell, A. Merryweather, W. D. O. Hamilton and J. A Gatehouse. 1996. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol. Exp. Appl.* 79: 295-307.
8. Hanada, K., M. Tamai, M. Yamagishi, S. Ohmura, J. Sawada and I. Tanaka. 1978. Isolation and Characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* 42:523-528.
9. Hilder, V. A., A. M. R. Gatehouse, S. E. Sheerman, R. F. Barker and D. Boulter. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330:160-163.
10. Hilder, V. A., A. M. R. Gatehouse and D. Boulter. 1993. Proteinase Inhibitor Approach, PP. 317-338. *In: Kung S-D and R. Wu (Eds.), Transgenic Plants: Engineering and Utilization, Vol. 1. Academic Press, New York.*
11. Hines, M. E., C. I. Osuala and S. S. Nielsen. 1991. Isolation and partial characterization of a soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of coleoptera digestive proteolytic activity. *J. Agric. Food Chem.* 39:1515-1520.
12. Kane, J. F. 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 6: 494-500
13. Lawrence, P. K. and K. R. Koundal. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. Review Article. *EJB Electronic J. Biotechnol.* 5(1): 93-109.
14. Liang, C., G. Brookhart, G.H. Feng, G.R. Reeck and K. J. Kramer. 1991. Inhibition of digestive proteinase of stored grain coleoptera by oryzacystatin, A cysteine proteinase inhibitor from rice seeds. *FEBS Lett.* 278:139-142.
15. Mertens, S., M. Craxton and M. Goedert. 1996. SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 383: 273-276
16. Michaud, D., B. Nguyen-Quoc and S. Yelle. 1994. Production of oryzacystatins I and II in *E. coli* using the glutathione S-Transferase gene fusion system. *Biotechnol. Prog.* 10:155-159.
17. Michaud, D., L. Cantin and T. C. Vrain. 1995. Carboxy-Terminated Truncation of Oryza cystatin II by Oryzacystatin-Insensitive Insect Digestive Proteinases. *Archives of Biochem. Biophys.* 322:469-474.
18. Michaud, D. and A. Asselin. 1995. Review, Application to plant proteins of gel electrophoretic methods. *J. Chromatogr. A.* 696:263-279.
19. Murdock, L. L., R. E. Shad and M. A. Pomeroy. 1988. Effects of E-64, a cysteine proteinase inhibitor, on cowpea weevil growth, development and fecundity. *Environ. Entomol.* 17:467-469.
20. Murdock, L. L., G. Brookhart, P. E. Dunn, D. E. Foard, S. Kelly, L. Kitch, R. E. Shade, R. H. Shuckle and J. L. Wolfson. 1987. Cysteine digestive proteinases in coleoptera. *Comp. Bioch. Physiol.* 87:783-787.
21. Michaud, D., B. Nguyen-Quoc. T. C. Vrain. D. Fong. and S. Yelle. 1996. Response of Digestive Cysteine Proteinases from the Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) and the Black Vine Weevil (*Otiorynchus sulcatus*) to a Recombinant form of Human Stefin A. *Archives of Insect Biochemistry and Physiol.* 31: 451-464.
22. Perlak, F.J., T.B Stone, Y.M. Muskopf, L. J. Petersen, G. B. Parker, S. A. McPherson, J. Wyman, S. Love and G. Reed. 1993. Genetically improved potatoes: Protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant. Mol. Biol.* 22: 313-321.
23. Ryan. C. A. 1989. Proteinase inhibitor gene families: Strategies for transformation to improve plant defense against herbivores. *Bio Essays* 10:20-24.
24. Smith, B. J. 1984. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. PP.41-55. *In: J.M Walker (Ed.), Methods in Molecular Biology. Vol. 1. Proteins. Humana Press, Clifton, New Jersey.*

25. Smith, D. B. and K. S. Johnson. 1988. Single step purification of polypeptides expressed in *E. coli* as fusions with GST. *Gene*. 6:31-40.
26. Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. of Entomol.* 39:47-79.
27. Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Hofte, S. Jansens, M. D. De Beucketeer, C. Dean, M. Zebean, M. V. Van Montagu and J. Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328:33-37.
28. Vieira, J. and J. Messing. 1982. The pUC Plasmids, an M13mp7-Derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*. 19:259-268.
29. Willetts, N. and B. M. Wilkins. 1984. Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. *Microbiol. Rev.* 48:24-41.
30. Wolfson, J. L. and L.L. Murdock. 1987. Suppression of larval Colorado potato beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. *Entomol. Exp. Appl.* 44:235-240.
31. Yanisch-Perron, C., J. Viera and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUc19 vectors. *Gene*. 33:103-119.