Crop Biotech.
Vol. 2, No. 3, Autumn and Winter 2013

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دوم، شماره سوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۱ (۱۲-۱)

استفاده ازتکنولوژی پروتئین نوترکیب برای تهیه آنتی‌بادی اختصاصی علیه ناقل بیماری رایزومونیا در چغندرقند

محمدرضا صفرنژاد[۱،۲،*]، مرضیه بصیرت[۳]، محمدعلی ابراهیمی[۴]، حسین صفرپور[۲]، سعید نظری[۳]، سید باقر محمودی[۵] و سعید عطایی کچویی[۶]

۱، بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ۲، بخش ویروس شناسی گیاهی مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران، ایران، ۳، کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران. ایران ۴، استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، ۵، بخش بیماری‌شناسی گیاهی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند، کرج، ایران ۶، بخش کنترل کیفی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۵ - تاریخ تصویب: ۹۱/۲/۲۰)

Applying of Recombinant Protein Technology for Developing of Specific Antibody against Transmitting Agent of Rhizomania in Suger Beet

M. R. SAFARNEJAD[1, 2,*], M. BASIRAT[3], M. A. EBRAHIMI[4], H. SAFARPOUR[2], S. NAZARI[3], B. MAHMOUDI[5] AND S. ATAIE KACHOIE[6]

1, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran. 2, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran. 3, M.Sc of Agricultural Biotechnology, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran, 4, Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran, 5, Iranian Research Institute of Sugar Beet, Karaj, Iran, 6, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

(Received: April. 24, 2012 - Accepted: May. 9, 2012)

Abstract

Rhizomania is one of the most important Sugar beet diseases throughout the world. The disease is caused by *beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV). The *Polymyxa betae* (Keskin) is the only natural transmitting agent of the disease between the plants. The fungus is an obligate parasite and could not be cultured in the media, then detection of fungus is done normally by microscopic observation. In order to facilitate detection process, present study is done to develop specific antibodies against this fungus by applying recombinant protein. The Glutathione-S-transferase (GST) as a specific immunogenic protein is a critical enzyme expressed in zoospores, sporangia and resting spores and could be a good candidate to develop a serological test for *P. betae*. For this aim, the DNA region encoding fungal GST gene was isolated and cloned into pET28a bacterial expression vector. Large scale expression of the recombinant protein was performed in *Escherichia coli* (Migula). Purification was carried out by applying immobilized metal affinity chromatography under native conditions. The purified recombinant GST protein was used for immunization of rabbit. Purification of immunoglobulin was performed by affinity chromatography using protein A column. The purified antibodies were applied for efficient detection of infected plant in serological assays.

Keywords: Suger beet, Rhizomania, *Polymyxa beta*, recombinant protein, antibody

چکیده

بیماری ریشه‌گنایی (رایزومانیا) از مهمترین بیماری‌های ویروسی چغندرقند می‌باشد. عامل این بیماری ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندرقند می‌باشد. قارچ *Polymyxa betae* به عنوان تنها ناقل طبیعی این ویروس شناخته شده است. با توجه به ماهیت پارازیت اجباری ناقل و عدم قابلیت کشت در آزمایشگاه، شناسایی گیاهان آلوده معمولا بر اساس مشاهده میکروسکوپی انجام می‌شود. در این تحقیق به منظور تسهیل در روند شناسایی، آنتی بادی اختصاصی بر علیه این قارچ با استفاده از تکنولوژی پروتئین نوترکیب تولید گردید. پروتئین گلوتاتیون-اس-ترانسفراز (GST) اختصاصی *P. betae*، به عنوان آنتی‌ژن جهت تولید آنتی‌بادی به منظور شناسائی ناقل در گیاهان آلوده استفاده شد. تولید انبوه پروتئین GST بصورت نوترکیب و در میزبان باکتریایی صورت پذیرفت. ابتدا ناحیه کدکننده این پروتئین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و از روی قالب cDNA تهیه گردیده از گیاهان آلوده جداسازی گردید. ژن مزبور سپس به صورت متصل به دنباله شش‌تایی هیستیدین در ناقل بیانی باکتریایی همسانه‌سازی گردیده و بیان آن به صورت نوترکیب در باکتری *Escherichia coli* صورت پذیرفت. خالص‌سازی پروتئین نوترکیب GST در شرایط طبیعی غیر واسرشتی و با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی بر روی ستون نیکل انجام گردید. کمیت و کیفیت پروتئین نوترکیب حاصله بر روی ژل‌پلی‌اکریلامید بررسی شد. به منظور تولید آنتی‌بادی، پروتئین نوترکیب GST خالص جهت انجام ایمنی‌زایی در خرگوش مورد مطالعه قرار گرفت و پس از تهیه آنتی‌بادی با تیتر بالا، خالص‌سازی آن با استفاده از ستون پروتئینA صورت گرفت. نتایج آزمایشات سرولوژیکی حاکی از قابلیت بالای آنتی‌بادی‌های حاصله جهت شناسایی قارچ ناقل در نمونه‌های گیاهی آلوده می باشد.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، *Polymyxa betae*، رایزومانیا، پروتئین نوترکیب، آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای

* نویسنده مسئول: محمدرضا صفرنژاد
E-mail: mrsafarnejad@yahoo.com

مقدمه

شبه قارچ *Polymyxa betae* پارازیت اجباری خاکزی از رده Plasmodiophoromycetes است که بیشتر به گیاهان خانواده اسفناجیان (Chenopodiaceae) محدود می‌شود. نخستین بار کسکین درسال ۱۹۶۴ این قارچ را به عنوان پارازیت ریشه چغندرقند شناسایی و نام‌گذاری کرد (Keskin, 1964). این قارچ از سرتاسر جهان از جمله اروپا، آسیا و آمریکای شمالی گزارش شده است (Putz *et al*. 1990; Biancardi *et al*. 2002)، و در ایران ایزدپناه در سال ۱۳۷۵ وجود شبه قارچ به *Polymyxa betae* را از مزارع چغندر قند استان فارس گزارش کرد. این قارچ در ایران از گسترش وسیعی برخوردار می‌باشد و علاوه بر مناطق انتشار بیماری به تنهایی در بسیاری از مزارع چغندرقند سالم نیز وجود دارد (Gharooni Kardani *et al.* 2009). این قارچ ناقل ویروس‌های زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند[1]، ویروس خاکبرد چغندرقند[2]، ویروس موزائیک خاکبرد چغندرقند[3] و ویروس Q چغندرقند[4] می‌باشد (Meunier *et al*. 2003). ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند عامل بیماری ریشه‌گنایی (رایزومانیا) در چغندرقند است. این ویروس در خارج از ریشه همراه با اسپورهای مقاوم قارچ *P. betae*، قدرت آلوده‌کنندگی خود را بیش از ۱۵ سال حفظ می‌کند (Abe and Tamada, 1986).

شناسایی گیاهان آلوده به منظور ارزیابی مقاومت ژرم‌پلاسم‌ها نسبت به *P. betae* نیاز به یک سیستم تشخیصی و سنجشی دقیق دارد تا بتواند در شرایط خاک های آلوده، گیاهانی را که دارای میزان اندکی از ناقل هستند را شناسایی نماید (Asher *et al*. 2002). روش میکروسکوپی بر اساس مشاهدات مستقیم اسپورهای استراحتی درون بافت گیاه به دلیل نتایج نادرست، در برخی مواقع تشخیص این قارچ از سایر قارچ‌های خاکزی موجود در ریشه چغندرقند را مشکل می‌سازد. برای رفع این مشکل، تا کنون روش‌های مختلف مولکولی مبتنی بر PCR (Mutasa *et al.* 1996) و پروب‌های اختصاصی (Ward and Adams. 1998) استفاده شده است. علی‌رغم کارآیی بالای این روش‌ها در شناسایی قارچ ناقل، محدودیت عمده آنها عدم توانایی در تعیین زنده یا غیر زنده بودن قارچ می‌باشد. روش‌های سرولوژیکی به صورت مرسوم برای شناسایی و مدیریت بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. به دلیل پایداری کمتر پروتئین‌ها نسبت به DNA، روش‌های تشخیصی سرولوژیکی قابلیت تمایز بین مرده و یا زنده بودن قارچ را دارند. علاوه بر این، روش سرولوژیکی الیزا قابلیت ارزیابی کمی پروتئین را نیز دارد و استفاده از این روش نیازی به تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی ندارد. همچنین توسط این روش‌ها با دقت و سادگی بیشتر و در زمان کمتر می‌توان این قارچ را ردیابی نمود (Mutasa-Göttgens *et al.* 2000). با این وجود، به علت عدم قابلیت کشت قارچ *Polymyxa*، استفاده موثر از روش‌های سرولوژیک برای شناسایی آن نیازمند تعیین یک پروتئین معین ایمنی‌زا می‌باشد که در تمامی مراحل مورفولوژیکی چرخه زندگی قارچ حضور داشته باشد. براساس تحقیقات مشخص شده است که پروتئین گلوتاتیون–اس–ترانسفراز (GST)[5] در تمامی حالات رویشی قارچ در مقادیر بالا وجود دارد (Kingsnorth *et al.* 2003). این پروتئین در مکانیسم‌های دفاعی گیاه میزبان نقش به سزایی دارد (Asher and Kerr. 1996).

1. Beet necrotic yellow vein virus
2. Beet soil born virus
3. Beet soil born mosaic virus
4. Beet virus Q

5. Glutathion-S-transferase (GST)

این تحقیق به تشریح تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی با استفاده از پروتئین نوترکیب GST برای ردیابی قارچ ناقل بیماری رایزومانیا در چغندرقند می‌پردازد.

مواد و روش ها

تهیه نمونه آلوده گیاهی

نمونه چغندرقند آلوده به *P. betae*، از مزرعه آزمایشی چغندرقند واقع در مرکز تحقیقات کشاورزی استان فارس (زرقان) تهیه گردید. تایید آلودگی نمونه مزبور با مشاهده میکروسکوپی اسپورهای استراحتی ناقل در ریشه گیاهان آلوده صورت پذیرفت. برای این منظور، ریشک‌های جانبی ابتدا با آب مقطر شسته شده و در هیدروکسیدپتاسیم ۱۰ درصد به مدت۳۰ دقیقه گذاشته شد و بعد از شستشو مجدد با آب مقطر، آنها را در یک قطره گلیسرول روی لام قرار داده و نمونه در زیر میکروسکوپ با بزرگنمائی X ۴۰ برای مشاهده سیستوسورهای قارچ بررسی شد.

استخراج RNA کل از بافت گیاه

استخراج RNA کل با استفاده از کیت RNA easy plant mini kit (Qiagen, UK) و با توجه به دستورالعمل مربوطه از ریشه‌های آلوده چغندرقند صورت گرفت. مشاهده RNA استخراج گردیده با استفاده از ژل آگاروز صورت پذیرفت. برای تعیین غلظتRNA استخراجی از نانودراپ اسپکتوفتومتر با جذب نوری ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد و سپس نمونه در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

سنتزcDNA از RNA (مرحله ترانویسی معکوس)

سنتز cDNA با استفاده از پرایمر oligo dT هشت‌تایی و کیت iscript TM cDNA synthesis kit (Bio-rad, USA) بر اساس دستورالعمل شرکت مربوطه انجام گرفت. برای این منظور ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده به همراه ۴ میکرولیتر بافر 5x iScript Reaction Mix، آنزیم Reverse transcriptase و آب فاقد نوکلئاز مخلوط گردید. میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر (termocycler) (Eppendorf, Germany) و تیمار دمایی، ۵ دقیقه $25^{\circ}C$، ۳۰ دقیقه $42^{\circ}C$، ۵ دقیقه $85^{\circ}C$ و در آخر $4^{\circ}C$ قرار داده شدند. محصول به‌دست آمده، cDNA تک‌رشته‌ای، مستقیماً برای واکنش PCR و جداسازی ژن GST مورد استفاده قرار گرفت.

تکثیر، جداسازی و همسانه سازی ژن GST:

با استفاده از cDNA به‌دست آمده در مرحله قبل، آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی GST انجام پذیرفت. طراحی آغازگرهای اختصاصی با استفاده از برنامه طراحی پرایمر (Vector NTI, Invitrogen) و همچنین اطلاعات موجود در بانک‌ژن NCBI (Acc. No. AJ132355.1) صورت پذیرفت. واکنش PCR در حجم ۵۰ شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ X)، ۲/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۲۵ mM)، ۱ میکرولیتر از dNTPs (۱۰ mM)، ۱ میکرولیتر آغازگر پیش رو (5´CAACGTCGACAAGGGACCAAGG 3´) و ۱ میکرولیتر آغازگر پس رو (5´CAACGCGGCCGCTTATTTTGGAC CGGCTGC 3´)، ۰/۵ میکرولیتر (حاوی ۲/۵ واحد) از آنزیم *Taq* DNA Polymerase، ۱ میکرولیتر cDNA قالب و ۳۸ میکرولیتر آب‌مقطر تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شامل ۵ دقیقه در $95^{\circ}C$ و ۳۵ چرخه، $95^{\circ}C$ به‌مدت ۱ دقیقه، $55^{\circ}C$ برای ۱ دقیقه، $72^{\circ}C$ به‌مدت ۱دقیقه و ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش نهایی در $72^{\circ}C$ به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ همراه با بافر TAE(1X) (40 mM Tris-acetate, 10 mM EDTA) و با ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد. استحصال باند موردنظر از روی ژل با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل آگاروز (Roche, Germany) صورت پذیرفت و قطعه

موردنظر وارد پلاسمید pTZ57R/T گردید. سپس پلاسمید با روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* سویه DH5α انتقال یافت. در نهایت کلنی‌های حاوی ژن موردنظر با روش غربال کلنی سفید–آبی، استخراج پلاسمید، هضم آنزیمی و تکثیر با PCR انتخاب و تعیین توالی گردیدند. استخراج پلاسمید بر مبنای تخریب قلیایی باکتری‌ها (Sambrook *et al*. 1996) انجام پذیرفت.

بیان و تولید پروتئین GST در باکتری

بعد از توالی‌یابی جهت جداسازی پلاسمید نوترکیب از کیت High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Germany) استفاده گردید و هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Sal*I و *Not*I انجام گرفت. محصول به‌دست‌آمده بر روی ژل آگارز جداسازی شد. قطعه حاوی ژن موردنظر وارد پلاسمید بیانی pET28a (دارای دنباله شش تایی هیستیدین) شد و سپس به باکتری *E. coli* سویه BL21-de3 منتقل گردید. بیان ژن همسانه‌سازی شده تحت شرایط طبیعی طبق دستورالعمل شرکت کیاژن به صورت زیر انجام پذیرفت.

یک کلنی حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط کشت LB broth حاوی کانامایسین قرار داده شد تا OD_{600} آن به ۰/۶ برسد. برای القاء باکتری از IPTG یک میلی‌مولار در حجم نهایی به مدت چهار ساعت و شیکر ۲۸ درجه سلسیوس استفاده شد.

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب

ابتدا جداسازی سلول‌های باکتریای با انجام سانتیرفوژ در g ۴۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه صورت پذیرفت. ته‌نشین[1] به‌صورت شبانه در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. تخریب دیواره سلولی باکتری با استفاده از روش‌های مبتنی بر تکان‌دادن شدید به‌همراه ذرات شیشه، امواج صوتی و آنزیم لیزوزیم با توجه به دستورالعمل‌های موجود (Ausubel *et al*. 1995) صورت پذیرفت. جهت استخراج پروتئین، ابتدا سلول‌ها با کمک ورتکس در ۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده حل و سپس دیواره آن‌ها با روش سونی‌کیت با قدرت رزونانس ۷۵ درصد و آمپیلافیکاسیون ۰/۵ در ۶ سیکل یک دقیقه‌ای (با فواصل استراحت ۳۰ ثانیه‌ای پس از هر سیکل روی یخ)، تخریب شدند. سلول‌های تخریب‌شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی جهت خالص‌سازی جداسازی شد. خالص‌سازی با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل[2] انجام پذیرفت. تایید مرحله بیان و خالص‌سازی پروتئین توسط ژل پلی‌اکریل‌آمید حاوی سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS-PAGE) انجام گرفت (Ausubel *et al*. 1995). تعیین غلظت پروتئین به‌وسیله غلظت‌های مشخص پروتئین استاندارد سرم آلبومین گاوی[3] (BSA) انجام شد. غلظت‌های ۳/۵، ۱/۷۵، ۰/۸۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از BSA و نیز رقت‌های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ از پروتئین نوترکیب موردنظر تهیه شده و با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید (مرکب از ژل متراکم‌کننده چهار درصد pH ۶/۸ و ژل متمایز کننده دوازده درصد pH ۸/۸) تعیین غلظت شد.

ایمنی‌سازی خرگوش

از دو خرگوش ماده نیوزلندی جهت ایمنی‌زایی استفاده گردید. تمامی تزریق‌ها به‌صورت عضلانی (داخل ماهیچه) صورت پذیرفت (Yinghai *et al*. 2007). در تزریق اول مقدار ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پروتئین GST نوترکیب دیالیز شده که با هم‌حجمش اجوانت کامل فروند[4] مخلوط شده بود استفاده شد. تزریق دوم پس از ۱۴ روز با ۱۰۰

1. Pellet

2. *Immobilized Metal Affinity* Chromatography (IMAC)
3. Bovine Serum Albumin
4. Freund complete adjuvant

میکروگرم در میلی‌لیتر از پروتئین که با هم‌حجمش اجوانت ناقص فروند[1] مخلوط شده بود انجام گرفت. چهار تزریق بعد در فواصل ۱۰ روز صورت پذیرفت. دو هفته بعد از آخرین تزریق خون‌گیری نهایی از قلب خرگوش با استفاده از لوله‌های Venoject ژل‌دار انجام شد. خون‌های جمع‌آوری شده به‌مدت چهار ساعت در دمای اتاق و سپس یک شب در چهار درجه سلسیوس قرار گرفتند. سرم حاصل به‌وسیله سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه جداسازی و پس از تقسیم‌شدن در تیوب‌ها در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تعیین عیار آنتی‌سرم

پس از تکمیل دوره‌ی ایمنی‌زایی و انجام خون‌گیری به‌منظور تعیین عیار آنتی‌سرم‌های به‌دست آمده از خرگوش‌ها، سنجش الایزا غیرمستقیم در پلیت‌های ۹۶ چاهکی پوشش داده شده با پروتئین نوترکیب GST (با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) انجام شد. در مراحل بعد، پس از استفاده از محلول مسدود کننده PBS 1X-Skim milk دو درصد، سری رقت‌های ۱:۵۱۲ تا رقت ۱:۲۶۲۱۴۴ سرم خون جهت اتصال به آنتی‌ژن استفاده گردیدند. باند شوندگی آنتی‌بادی-آنتی‌ژن با استفاده از آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار شده با آنزیم آلکالین فسفاتاز (goat anti-rabbit, AbD-serotec, UK)، صورت پذیرفت. در مرحله بعد ماده‌زمینه ۴-نیتروفنیل فسفات به چاهک‌ها افزوده گردید و بعد از ۳۰ دقیقه میزان جذب نور در ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه خواندن الایزا خوانده شد. جذب بیش از دو برابر نمونه کنترل منفی مثبت تلقی شد.

خالص‌سازی آنتی‌بادی‌ها از سایر محتویات سرم با روش کروماتوگرافی تمایلی[2] و با استفاده از ستون حاوی پروتئین A (AbD-serotec, UK) و طبق دستورالعمل مربوطه صورت پذیرفت.

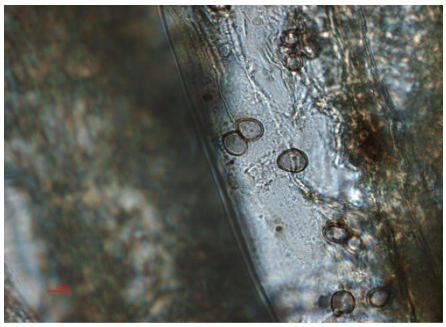
آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای[3]

به‌منظور بررسی کارکرد آنتی‌بادی برای شناسایی نمونه‌های گیاهی آلوده، آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای صورت پذیرفت. برای این منظور ابتدا ۴ میکرولیتر از عصاره گیاهان آلوده به‌صورت لکه دایره‌ای شکل روی غشا نیتروسلولز گذاشته شد. پس از مرحله مسدودکردن، غشا توسط آنتی‌بادی ضد GST متصل به آلکالین فسفاتاز پوشیده و پس از دو ساعت سوبستریت (NBT/BCIP) تهیه شده در بافر AP (Tris-HCl, pH 8.3 25mM, Glycine 92mM, Methanol 20% v/v) به آن اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه غشا توسط آب‌مقطر شسته و وجود یا عدم‌وجود لکه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

مشاهده سیستوسور *P. betae*

مشاهدات میکروسکوپی حاکی از حضور اسپورهای استراحتی *P. betae* در ریشه‌های گیاهان آلوده بود. این اسپورها پس از انجام رنگ‌آمیزی به صورت مجتمع مشاهده شدند (شکل ۱).



شکل ۱- سیستوسورهای *Polymyxa betae* در ریشه چغندر قند آلوده.

استخراج RNA از ریشه و تکثیر cDNA

استخراج RNA با استفاده از دستورالعمل مربوطه

1. Freund incomplete adjuvant
2. Affinity chromatography
3. Dot-blot immunoassay

صورت پذیرفت و محصول نهایی الکتروفورز گردید. مشاهده باندهای RNA ریبوزومی بر روی ژل آگارز حاکی از موفقیت در استخراج RNA گیاهی می‌باشد. غلظت RNA استخراج‌شده توسط دستگاه نانودراپ، ۲/۳۶۰ نانوگرم در میکرولیتر و با نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ برابر ۱/۹۶ تعیین شد که نشان‌دهنده خلوص بالای RNA بود. برای تهیه cDNA از RNA خالص و همچنین آنزیم نسخه‌برداری معکوس و پرایمر oligo dT استفاده گردید. محصول به‌دست آمده از سنتز cDNA به‌عنوان قالب برای جداسازی ژن GST، استفاده گردید.

همسانه‌سازی ژن GST در E.coli سویه DH5α و تجزیه همسانه‌ها

جداسازی ژن GST توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده قالب cDNA و پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت و محصول نهایی بر روی ژل آگاروز الکتروفورز گردید. نتایج مربوطه حاکی از جداسازی و تکثیر قطعه‌ای در حدود ۶۰۰ جفت باز بود. قطعه مربوطه پس از استحصال از روی ژل درون ناقلpTZ57R/T همسانه‌سازی گردید و سازه مربوطه در سویه DH5α باکتری *E. coli* تکثیر گردید. انتخاب کلنی‌های حاوی ژن GST با روش غربال کلنی سفید آبی بر روی محیط کشت حاوی X-gal صورت پذیرفت. کلون‌های حاوی ژن GST با استفاده از آزمون کلنی PCR انتخاب شدند. آزمون‌های تکمیلی هضم آنزیمی وجود ژنGST در این کلنی‌ها را به اثبات رسانیدند.

تعیین ترادف و همسانه‌سازی در ناقل بیان

تعیین ترادف ژن GST در همسانه‌های حاصله با استفاده ازآغازگرهای یونیورسال اختصاصی ناقل توسط شرکت MWG-biotech آلمان صورت پذیرفت. نتایج تعیین ترادف حاکی از وجود قطعه‌ای به طول ۵۶۰ نوکلئوتید بود. مقایسه ترادف فوق با ترادف‌های مشابه موجود در بانک‌ژن NCBI با استفاده از برنامه BLAST نشان داد که این ژن تشابه زیاد (حدود ۹۹٪) با ژن GST قارچ *P. betae* موجود در بانک جهانی ژن NCBI (accession No. AJ132355) دارد. همچنین این مقایسه مشخص نمود ترادف ژن GST حاصله در مقایسه با ترادف موجود در بانک‌ژن فاقد نوکلئوتیدهای شماره ۲۷۱، ۲۷۳ و ۲۹۲ در جهت ´۵ به ´۳ می‌باشد (شکل۲). این حذف در نوکلئوتیدها باعث گردید تا کادر خواندن در طول رشته DNA تغییر نموده و در نهایت ترادف پلی‌پپتید حاصله در ۵ آمینواسید متفاوت باشد (شکل ۳).

پس از تایید وجود ژن GST در سازه و انجام تعیین ترادف، همسانه‌سازی آن در ناقل بیان pET28a با استفاده از آنزیم‌های برشی صورت پذیرفت. سپس سازه حاصله به سویه BL21 باکتری *E. coli* منتقل شد.

تولید و تعیین غلظت پروتئین نوترکیب

تولید پروتئین GST در میزبان باکتریایی به‌صورت نوترکیب و در اثر القاء بیان توسط IPTG تحت پروموتور *lac* صورت پذیرفت. در طی مراحل مختلف بیان و خالص‌سازی پروتئین، نمونه‌هایی برداشت گردیده و این روند طی الکتروفورز پروتئین SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۴).

نتایج بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب GST، حاکی از بیان مناسب این پروتئین در میزبان باکتریایی و خلوص بالای آن در آموده خالص شده می‌باشد. وزن پروتئین نوترکیبGST در حدود ۲۵/۵ کیلو دالتون تعیین گردید.

نتایج مربوط به تعیین میزان پروتئین نوترکیب خالص‌شده حاکی از تولید پروتئین نوترکیب خالص GST به میزان ۱۶ میلی‌گرم به ازاء یک لیتر محیط کشت باکتریایی می‌باشد. پس از خالص‌سازی پروتئین به‌دلیل وجود مقادیر بالای ایمیدازول در آموده خالص به منظور حذف این ماده در آموده و مصارف بعدی از قبیل ایمنی زایی در حیوان، عمل دیالیز در حضور بافر PBS صورت پذیرفت. مشاهدات

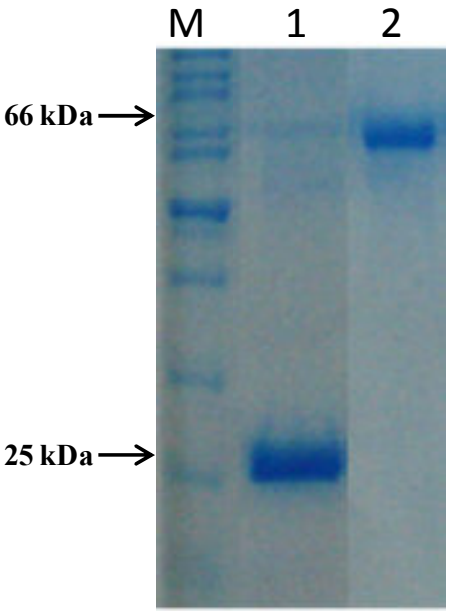
ماکروسکوپی حاکی از این بود که پس از انجام خالص‌سازی، حجم عمده پروتئین خالص نوترکیب به‌صورت رسوب در پائین لوله آزمایش قرار می‌گرفت. به‌منظور رفع این مشکل و افزایش حلالیت پروتئین نوترکیب در بافر، تیمارهای مختلفی از قبیل افزودن ایمیدازول به مقادیر ۱۰–۲۰ میلی‌مولار (Hamilton *et al*. 2003)، استفاده از بافر در pH نقطه ایزوالکتریک و همچنین رقیق‌سازی پروتئین خالص (Treuheit *et al*. 2001) انجام گردید. نتایج نهایی نشان از موفقیت تیمار آخری، کاهش غلظت پروتئین، در کاستن از تشکیل رسوب بود. در این حالت غلظت نهایی پروتئین خالص GST به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رسانیده شد و از آن برای مصارف بعدی، ایمنی‌زایی و آزمون‌های سرولوژیک استفاده گردید.

```
>emb|AJ132355.1|  Polymyxa betae mRNA for glutathione-s-transferase, partial
Length=634

 Score = 1018 bits (1128),  Expect = 0.0
 Identities = 574/578 (99%), Gaps = 3/578 (1%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    TCGGGACCAAGGTCAATGCCTTCGAGGCCGACATCAGAGAGCACAAGGTCGCGACCGGCC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    TCGGGACCAAGGTCAATGCCTTCGAGGCCGACATCAGAGAGCACAAGGTCGCGACCGGCC  60

Query  61   CGAACAAGGGCAAGGACTTCTATGCTATCAACCCGAAGGGGAACGTCCCTGTCGTTGTCA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   CGAACAAGGGCAAGGACTTCTATGCTATCAACCCGAAGGGGAACGTCCCTGTCGTTGTCA  120

Query  121  TCGATGGCACCACCGTCTTGAATGAAAACGCCGCCACTCTGCAATGGATCGCCGACCAGA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  TCGATGGCACCACCGTCTTGAATGAAAACGCCGCCACTCTGCAATGGATCGCCGACCAGA  180

Query  181  ACCCGGCTTCCGAACTCGCCCCTGCTAATGGCACTCCTGAACGCTATTTGTTGCAGTCTA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  ACCCGGCTTCCGAACTCGCCCCTGCTAATGGCACTCCTGAACGCTATTTGTTGCAGTCTA  240

Query  241  AGCTCAGCTATCTGTCGTCTGAAGTTCATGGCTCGTTCGGAC--CTTTGTTCGACCCAAC  298
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||  ||||||||||||
Sbjct  241  AGCTCAGCTATCTGTCGTCTGAAGTTCATGGCTCGTTCGGACCTCTTAGTTCGACCCAAC  300

Query  299  TTCT-CACGACGAAGTCAAGAAATTCTGCTTGAATCGGATTAAGTTGAAGTTCGACTTTC  357
            |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  TTCTCCACGACGAAGTCAAGAAATTCTGCTTGAATCGGATTAAGTTGAAGTTCGACTTTC  360

Query  358  TGTCCAAGGAAGAGCTTCGCAACGGAAGCAAGAAGTATCTGGTTGGCAACAAGTTCACCG  417
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  TGTCCAAGGAAGAGCTTCGCAACGGAAGCAAGAAGTATCTGGTTGGCAACAAGTTCACCG  420

Query  418  TCGCCGACTCGTACCTATACATCATCCTGTCTTGGTGCAAGTACGTCGGCGTTGACTTGG  477
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  TCGCCGACTCGTACCTATACATCATCCTGTCTTGGTGCAAGTACGTCGGCGTTGACTTGG  480

Query  478  CTGACTACCCGGTCCTGAAGAAATACTACGAAGACATTGCCGCTCTGGACTTCGTCAAGC  537
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481  CTGACTACCCGGTCCTGAAGAAATACTACGAAGACATTGCCGCTCTGGACTTCGTCAAGC  540

Query  538  AGGCTCACGCTGCCATGGCTGCAGCCGGTCCAAAATAA  575
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541  AGGCTCACGCTGCCATGGCTGCAGCCGGTCCAAAATAA  578
```

شکل ۲– هم‌ردیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی GST جدایه ایرانی *P.betae*
با جدایه شماره AJ132355.1 بانک ژن NCBI

```
>emb|CAB66903.1|  glutathione-s-transferase [Polymyxa betae]
Length=191

 Score =  357 bits (916),  Expect = 2e-123, Method: Compositional matrix adjust.
 Identities = 185/191 (97%), Positives = 185/191 (97%), Gaps = 1/191 (1%)

Query  1    GTKVNAFEADIREHKVATGPNKGKDFYAINPKGNVPVVVIDGTTVLNENAATLQUIADQN  60
            GTKVNAFEADIREHKVATGPNKGKDFYAINPKGNVPVVVIDGTTVLNENAATLQUIADQN
Sbjct  1    GTKVNAFEADIREHKVATGPNKGKDFYAINPKGNVPVVVIDGTTVLNENAATLQUIADQN  60

Query  61   PASELAPANGTPERYLLQSKLSYLSSEVHGSFGPLFDPT-SHDEVKKFCLNRIKLKFDFL  119
            PASELAPANGTPERYLLQSKLSYLSSEVHGSFGPL     HDEVKKFCLNRIKLKFDFL
Sbjct  61   PASELAPANGTPERYLLQSKLSYLSSEVHGSFGPLSSTQLLHDEVKKFCLNRIKLKFDFL  120

Query  120  SKEELRNGSKKYLVGNKFTVADSYLYIILSWCKYVGVDLADYPVLKKYYEDIAALDFVKQ  179
            SKEELRNGSKKYLVGNKFTVADSYLYIILSWCKYVGVDLADYPVLKKYYEDIAALDFVKQ
Sbjct  121  SKEELRNGSKKYLVGNKFTVADSYLYIILSWCKYVGVDLADYPVLKKYYEDIAALDFVKQ  180

Query  180  AHAAMAAAGPK  190
            AHAAMAAAGPK
Sbjct  181  AHAAMAAAGPK  191
```

شکل ۳- همردیف‌سازی توالی آمینواسیدی GST جدایه ایرانی *P. betae*
با جدایه شماره AJ132355.1 بانک ژن NCBI



شکل ۴- الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE) حاصله از خالص‌سازی پروتئین نوترکیب GST در میزبان باکتریایی. پروتئین نوترکیب GST در میزبان باکتریایی بیان گردیده و پروتئین نوترکیب متصل به دنباله هیستیدین با روش کروماتوگرافی تمایلی خالص گردید. ۱: پروتئین خالص GST نوترکیب، ۲: پروتئین خالص BSA به‌عنوان استاندارد، M: مارکرپروتئینی PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas, Germany).

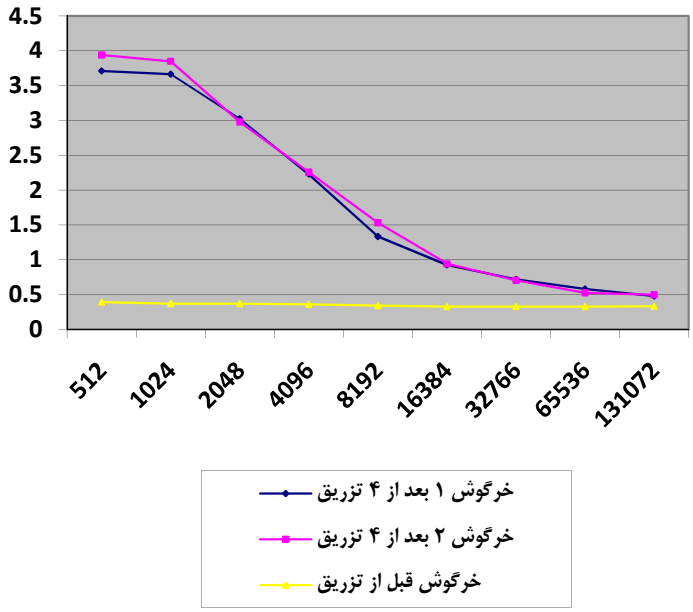
ایمنی‌زایی و تعیین عیار آنتی‌بادی تولید شده

ایمنی‌زایی در خرگوش ماده سفید نیوزلندی با استفاده از پروتئین نوترکیب GST صورت پذیرفت. جهت تعیین عیار آنتی‌بادی، خون‌گیری در مراحل مختلف قبل و بعد از هر ایمنی‌زایی صورت پذیرفت. عیار آنتی‌بادی در هر مرحله ایمنی‌زایی با انجام مقایسه با نمونه سرم منفی (قبل از تزریق) محاسبه گردید. برای این منظور سری رقت‌های ۱:۵۱۲ تا رقت ۱:۲۶۲۱۴۴ از سرم خون تهیه گردیده و قابلیت باند شوندگی آن با آنتی ژن مربوطه، GST نوترکیب، در سیستم الیزا غیرمستقیم بررسی گردید. آخرین رقت آنتی‌سرم مورد استفاده که دارای واکنش مثبت با آنتی‌ژن می‌باشد را به‌عنوان عیار آنتی‌سرم در نظر گرفته شد. در این مورد، نتایج خواندن‌های دستگاه الیزا ریدر باید حداقل بیش از ۲ برابر نمونه کنترل منفی (سرم خون قبل از تزریق) باشد. عیار آنتی‌سرم به‌دست‌آمده در حدود ۱:۸۰۰۰۰ تعیین گردید(شکل۵).

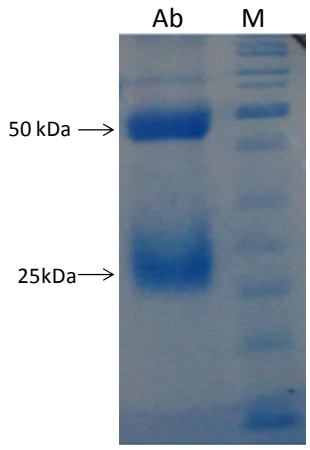
خالص‌سازی آنتی‌بادی

خالص‌سازی آنتی‌بادی با روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از پروتئین A باکتری

Staphylococcus aureus، (Zhang *et al.* 1999)، صورت پذیرفت. آنتی‌بادی خالص‌سازی شده بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید تفکیک شد. دو باند یکی در ناحیه ۲۵ کیلودالتون مربوط به رشته سبک و دیگری در ناحیه ۵۰ کیلو دالتون مربوط به رشته سنگین، مشاهده گردید (شکل ۶).



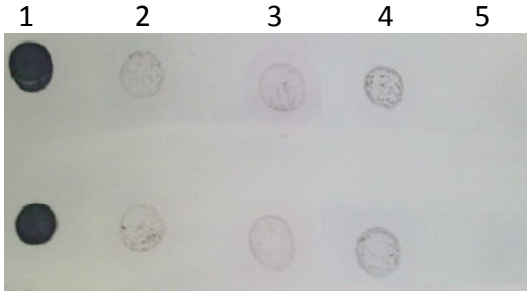
شکل ۵- تعیین عیار آنتی‌بادی چند همسانه‌ای به‌دست‌آمده از خرگوش ایمنی‌زایی شده توسط GST با استفاده از آزمون الایزا غیر مستقیم. پروتئین نوترکیب GST (۱۰µg/ml) برای پوشش‌دادن چاهک‌های الیزا استفاده شد. سری رقت‌های ۵۱۲ تا ۱۳۱۰۷۲ سرم حاصله از خرگوش‌های ایمنی‌زایی شده و همچنین سرم خون قبل از تزریق برای قابلیت اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن استفاده گردید. آنتی‌بادی‌های باند شده توسط آنتی‌بادی GAR^{AP} (رقت ۵۰۰۰) و در حضور پیش‌ساز آنزیمی شناسایی شدند. خواندن واکنش الیزا توسط دستگاه جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر پس از نیم‌ساعت صورت پذیرفت.



شکل ۶- ایمونوگلوبولین خالص‌شده توسط ستون پروتئین A. سرم خون حاوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی جهت استحصال ایمونوگلوبولین و خالص‌سازی آن بر روی ستون حاوی پروتئین A استفاده گردید. خلوص و صحت خالص‌سازی ایمونوگلوبولین بر روی الکتروفورز SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. Ab، ایمونوگلوبولین خالص; M، مارکر پروتئین PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas, Germany).

آزمون نقطه گذاری لکه‌ای

جهت تأیید اختصاصی‌بودن واکنش آنتی‌بادی‌های تولید شده بر علیه نمونه‌های گیاهی آلوده، آزمون نقطه‌گذاری لکه‌ای انجام شد. نتایج این آزمون حاکی از قابلیت بالای آنتی‌بادی‌های تولید شده در تفکیک نمونه سالم از آلوده می‌باشد (شکل۷).



شکل ۷- آزمون نقطه‌گذاری لکه‌ای. اختصاصیت آنتی‌بادی خالص‌شده جهت شناسایی نمونه‌های گیاهی آلوده با استفاده از آزمون نقطه‌گذاری لکه‌ای مورد بررسی و تائید قرار گرفتند. ابتدا عصاره گیاهی آلوده بر روی غشا نیتروسلولز لکه‌گذاری گردیده و سپس آنتی‌بادی خالص متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (غلظت ۱:۱۰۰۰) جهت اتصال به آنتی‌ژن استفاده گردید. انجام واکنش آنتی‌بادی-آنتی‌ژن با استفاده از ماده سابسترات پارا نیتروفنیل فسفات آشکارسازی گردید.

بحث

برای تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه بیمارگرهای گیاهی، از قبیل قارچ‌های بیماری‌زا، عصاره خالص بافت و یا ریسه‌های قارچ به عنوان ایمونوژن ضروری می‌باشد. در مورد قارچ‌های پارازیت اجباری، به علت عدم قابلیت رشد بر روی محیط کشت، فراهم‌آوردن منابع خالص‌شده قارچ جهت ایمنی‌زایی مشکل می‌باشد. بنابراین در مورد قارچ *P. betae* به‌عنوان یک قارچ انگل اجباری و فاقد ریسه، تعیین یک پروتئین ایمونوژن اختصاصی موجود در تمامی حالت‌های مورفولوژیکی قارچ، ضروری می‌باشد. پروتئین گلوتاتیون-اِس-ترانسفراز به‌عنوان یک فرآورده بیولوژیک موجود در تمامی حالت‌های رشدی از قبیل زئوسپور، اسپورانژیوم و اسپورهای استراحتی که ایمونوژن قوی نیز به‌شمار می‌رود، می‌تواند یک گزینه مناسبی برای شناسایی این قارچ باشد (Mutasa-Göttgens *et al*. 2000).

در این تحقیق پروتئین نوترکیب GST اختصاصی قارچ *P. betae* برای تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه قارچ مورد استفاده قرار گرفت. نتایج تعیین ترادف و مقایسه آن با ترادف موجود در بانک‌ژن (acc. nr. Aj132355.1) حاکی از وجود سه عدد حذف در ترادف نوکلئوتیدی مذکور می‌باشد که منجر به تغییر در آمینواسیدهای شماره‌های ۱۰۰-۹۵ گردیده است. این نتایج حاکی از وجود تشابه زیاد در ژن‌های GST این گونه در جدایه‌های مربوطه را دارد. وجود تشابه فراوان در پروتئین GST به‌دلیل وجود نواحی محافظت‌شده درون این پروتئین می‌باشد. این پروتئین در تمامی پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها وجود دارد و دارای نقش‌های اساسی در واکنش‌های سم‌زدایی درون سلول می‌باشند (Udomsinprasert *et al*. 2005; Asher and Kerr, 1996).

بیان پروتئین نوترکیب GST در میزبان باکتریایی و خالص‌سازی آن با استفاده از ستون نیکل منجر به تولید ۱۶ میلی‌گرم پروتئین خالص به ازاء یک لیتر محیط کشت باکتریایی شد. نتایج اولیه حاکی از رسوب پروتئین حاصله پس از تکمیل فرایند خالص‌سازی بود. استفاده از این پروتئین (دارای رسوب) برای ایمنی‌زایی خرگوش منجر به تولید آنتی‌بادی با تیتر بالا نگردید. با توجه به لزوم حفظ فرم طبیعی پروتئین برای ایمنی‌زایی و عدم قابلیت استفاده از مواد کاهنده، از قبیل اوره، تیمارهای دیگری از قبیل استفاده از ایمیدازول، استفاده از pH ایزوالکتریک و رقیق‌سازی پروتئین برای رفع این معضل اجرا گردید. نتایج حاصله حاکی از قابلیت کاهش غلظت پروتئین، در کاستن از تشکیل رسوب

بود. در این حالت غلظت نهایی پروتئین خالص GST به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رسانیده شد. Treuheit *et al*. (2001) رابطه بین غلظت پروتئین و میزان رسوب را مورد بررسی قرار دادند و کارآیی کاستن غلظت پروتئین در کاهش تشکیل رسوب را تایید نمودند. پس از تهیه آنتی‌بادی‌های خالص، نتایج تست دیبا با استفاده از عصاره‌های آلوده به قارچ *P. betae* حاکی از قابلیت استفاده از این آنتی‌بادی‌ها برای شناسایی گیاهان آلوده می‌باشد. نتایج تحقیقات قبلی نیز موید قابلیت استفاده از تکنولوژی پروتئین نوترکیب در تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی به‌منظور شناسایی قارچ‌های مولد بیماری‌های گیاهی می‌باشد (Peschen *et al*. 2008; Kingsnorth *et al*. 2003).

سپاسگزاری

از بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، بخش ویروس‌شناسی گیاهی مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، بخش بیماری‌شناسی گیاهی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، بخش کنترل کیفی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و دانشگاه پیام نور برای فراهم آوردن امکانات این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

ایزدپناه، ک. ا. هاشمی، پ. کامران، ر. پاک نیت، م. سهندپور، آ و معصومی، م. ۱۳۷۵. وجود گسترده بیماری ریشه‌ریشی چغندرقند (شبه *Rhizomania*) در فارس. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۳۲: ۲۰۶-۲۰۰.

Abe H, Tamada T (1986) Association of beet necrotic yellow vein virus with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 52: 232-247.

Asher M, Kerr S (1996) Rhizomania: progress with resistant varieties, British Sugar Beet Review, 64:19-22.

Asher MJC, Chwarszczynska DM, Leaman M (2002) The evaluation of rhizomania resistant sugar beet for the UK. Annals of Applied Biology. 141: 101-109.

Ausubel F, Brent R, Kingstone R (1995) Current Protocols in Molecular Biology. New York, Wiley Interscience.

Benov L, AI-Ibraheem J (2002). Disrupting *Escherichia coli*: A comparison of methods. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 35(4): 428-43.

Biancardi E, Lewellen R, De Biaggi M, Erichsen AW, Stevanato P (2002) The origin of rhizomania resistance in sugar beet. Euphytica. 127: 383–97.

Gharooni Kardani S, Jafarpour B, Falahati Rastegar M, Tabasinezhad F (2009) Detection of *Polymyxa betae* in sugar beet roots using RT-PCR method in Razavi Khorasan province. Journal of Plant Protection. 23:17-24.

Hamilton S, Odili J, Pacifico MD, Wilson GD, Kupsch JM (2003) Effect of imidazole on the solubility of a his-tagged antibody fragment., 22(6):347-55.

Keskin B (1964) *Polymyxa betae*n. sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugen den twicklung der Zuckerrübe. Arch. Mikrobiol. 49: 348-374.

Kingsnorth CS, Asher MJC, Keane GJP, Chwarszczynska DM, Luterbacher MC, Mutasa-Gottgens, ES (2003) Development of a recombinant antibody ELISA test for the detection of *polymyxabetae*and its use in resistance screening. Plant Pathology. 52: 673-680.

Meunier A, Schmit JF, Stas A, Kutluk N,

Bragard C (2003) Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of beet necrotic yellow vein virus, Beet soil borne virus, and Beet virus Q and their vector Polymyxa betae on sugar beet. Appl. Environ Microbiol. 69(4): 2356-60.

Mutasa ES, Chwarszczynska DM, Asher MJC (1996) Single tube, nested PCR for the diagnosis of *Polymyxa betae* infection in sugar beet roots and colorimetric analysis of amplified products. Phytopathology. 86: 493–7.

Mutasa-Göttgens ES, Chwarszczynska D, Halsey K, Asher MJC (2000) Specific polyclonal antibodies for the obligate plant parasite Polymyxa – a targeted recombinant DNA approach. Plant Pathology. 49: 276-287.

Peschen D, Li HP, Fischer R, Kreuzaler F, Liao YC (2004) Fusion proteins comprising a Fusarium-specific antibody linked to antifungal peptides protect plants against a fungal pathogen. Nat. Biotechnol. 22: 732–738.

Putz C, Merdinoglu D, Lemaire O, Stocky G, Valentin P, Wiedemann S (1990) Beet necrotic yellow vein virus. Causal agent of sugar beet rhizomania, Review of Plant Pathology. 69: 247-254.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1996) Molecular Cloning - A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Treuheit MJ, Kosky AA, Brems DN (2001) Inverse Relationship of Protein Concentration and Aggregation. Pharmaceutical Research. 19:511-516.

Udomsinprasert R, Pongjaroenkit S, Wongsantichon J, Oakley AJ, Prapanthadara LA, Wilce MC, Ketterman AJ (2005) Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. Biochem. J. 388: 763–71.

Ward E, Adams MJ (1998) Analysis of ribosomal DNA sequences of *Polymyxa* species and related fungi and the development of genus- and species-specific PCR primers. Mycological Research. 102: 965–74.

Yinghai X, Yuzhi H,Yazhong X, Wei F (2007) Preparation and Application of Polyclonal Antibody against a Recombinant Laccase, Cellular & Molecular Immunology. 4: 315-317.

Zhang L, Jacobsson K, Ström K, Lindberg M, Frykberg L (1999) Staphylococcus aureus expresses a cell surface protein that binds both IgG and beta 2-glycoprotein I. Microbiology. 145: 177-183.