

דוח מסכם לתוכנית מחקר 10-1355-132

**פיתוח נוגדנים סגוליים וגישות רגישות לבחינת גפנים לנגיעות  
בפיטופלסמה**

**Production of specific antibodies and development of sensitive strategies for diagnosis of  
phytoplasmal infection in grapevine plants**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

המחלקה לפתולוגיה וחקר עשבים, מנהל המחקר החקלאי	מוניר מואסי
המחלקה לפתולוגיה וחקר עשבים, מנהל המחקר החקלאי	עבד גרה
המחלקה לפתולוגיה וחקר עשבים, מנהל המחקר החקלאי	אני פינגשטיין
שה"מ	תרצה זהבי

Munir Mawassi,	The Department of Plant Pathology and Weed Control, Bet-Dagan. P.O.B. 6 Bet-Dagan. Email: <a href="mailto:mawassi@volcani.agri.gov.il">mawassi@volcani.agri.gov.il</a>
Abed Gera,	The Department of Plant Pathology and Weed Control, Bet-Dagan. P.O.B. 6 Bet-Dagan. Email: <a href="mailto:abedgera@volcani.agri.gov.il">abedgera@volcani.agri.gov.il</a>
Annie Fenigstein	The Department of Plant Pathology and Weed Control, Bet-Dagan. P.O.B. 6 Bet-Dagan.
Tirtza Zahavi	Ministry of Agriculture & Rural Development. Email: <a href="mailto:tirtzaz@yahoo.com">tirtzaz@yahoo.com</a>

יולי 2011

תמוז תשע"א

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.  
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא



חתימת החוקר

\*

Kotliarevski, L.\*\*\*, Bar-Joseph, M., Gera, A., **Mawassi, M.** (2011). Detection of phytoplasmal and spiroplasmal infection in plant tissues using fluorescent labeled probes. 'Alon Hanotea' 65, Jan&Feb., 36-39. (in Hebrew).

## תקציר

**הצגת הבעיה:** פיטופלסמות הן חיידקים פתוגניים, חסרי דופן, גרם חיובי, מקבוצת *Mollicutes* המאכלסים את תאי השיפה בצמחים וגורמים למחלת הצהבון. פיטופלסמות פוגעות במגוון רחב של מיני צמחים, כגון, ירקות, עצי פרי, צמחי נוי ומועברות מצמחים נגועים לצמחים בריאים ע"י הרכבה, ריבוי וגטיבי, צמחים טפיליים וע"י מינים ספציפיים של חרקים מוצצי שיפה השייכים ל- *Cicadellidae*, *Psylloidea*, *Coccidea*, *Flugoroidea*. מחלות הנגרמות על ידי פיטופלסמות מתפשטות לאחרונה בארץ וגורמות נזק רב. החיידקים לא ניתן לגדלם בתרבית, הדבר מקשה על חקר הפתוגן.

כיום אין פתרון יעיל להדברת מחלות הנגרמות ע"י פיטופלסמות. גישה אפשרית להתמודדות בפני מחלות היא ביטוי נוגדנים רקומביננטיים היכולים לנטרל את החיידקים. ביטוי גנים זרים בצמחים באמצעות וקטורים ויראליים היא מערכת היכולה לשמש אלטרנטיבה לצמחים טרנסגניים.

**מטרת המחקר:** לבטא בצמחי בנטמינה, וינקה וגפנים גנים של מולקולות נוגדן חד- שרשרתי single chain variable fragment (scFv) המסוגלות להיקשר באופן סגולי ולנטרל פיטופלסמות מקבוצת ה- *Aster yellow* (AY).

**מהלך ושיטות העבודה:** במסגרת עבודת המחקר, ניצלנו וקטור ויראלי המבוסס על גנום נגיף *Grapevine virus A* (GVA), השייך לקבוצת ה- *Vitivirus* שהונדס במעבדתנו לצורך החדרה וביטוי של גן scFv לצורך דיכוי מחלת הצהבון בצמחים. יוצרו נוגדנים רב שבטיים בארנבת כנגד נוגדן רקומביננטי scFv ספציפי לפיטופלסמת AWB המבוטא בחיידקי *Escherichia coli* (*E. coli*). ניבנו שלושה קונסטרוקטים של וירוס אינפקטיבי המבטאים נוגדן רקומביננטי scFv ושובטו בתוך גנום וקטור ה- GVA. הקונסטרוקט הראשון pCAMGVA-scFv-1s (pCAMBIA) הכיל גן scFv-1s בו מופרדות השרשראות הקלה והכבדה בחזרה אחת של רצף של פוליפפטיד המשמש בתור מרווח (spacer). הקונסטרוקט השני pCAMGVA-scFv- $\Delta$ 1s הכיל גן scFv- $\Delta$ 1s בדומה לקלון הקודם אך עם מוטציה ב-start codon. הגן שימש כביקורת שלילית בבדיקת ביטוי של גן scFv. הקונסטרוקט השלישי pCAMGVA-scFv-3s הכיל גן scFv-3s בו מופרדות השרשראות הקלה והכבדה בשלוש חזרות של רצף הפוליפפטיד המשמש בתור מרווח.

**תוצאות עיקריות:** שלושת הקונסטרוקטים הוחדרו לצמחים בשיטת אגרו-אינפלטרציה. האינפקטיביות של הקונסטרוקטים אומתה בעזרת אנליזות Northern blot ו- Western blot. בבדיקות ה- Western blot, לא הצלחנו לגלות הצטברות של חלבון המייצג את הנוגדן הרקומביננטי בצמחים המודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-1s. לעומת זאת, בצמחים המוזרקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s נמצא חלבון בגודל 28 kDa המתאים בגודל ובתגובה הסירולוגית שלו לנוגדן הרקומביננטי. לכן, נבדקה יכולת קישור של הנוגדן הרקומביננטי המבוטא ע"י קונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s, ע"י dot blot. בבדיקה זו לא הצלחנו לגלות פעילות ביולוגית של הנוגדן הרקומביננטי.

בהמשך, בחרנו בצמחי הוינקה הנחשב לפונדקאי מתאים לפיטופלסמות כמערכת אלטרנטיבית לבדיקת פעילות ביולוגית של הנוגדן. מכיוון שצמח הוינקה אינו נחשב לפונדקאי מתאים לנגיף ה- GVA, בדקנו בהתחלה באם קיימת האפשרות שהדבקה ב- GVA היא אפשרית גם אם היא איננה מלווה בהתפשטות

סיסטמית בצמח. למטרה זו, הדבקנו, באמצעות אינפילטרציה, עלים של הצמח בוקטור GVA המבטא את הגן המדווח (eGFP) enhanced Green Fluorescent Protein. צבע ירוק פלורסצנטי התגלה בציטופלסמה של התאים בעלה המוזרק אך לא בעלים הצעירים שמקורם בצימוח חדש. מכאן הסקנו כי ה-GVA יכול להדביק ולהתבטא בווינקה, אבל הוא לא מתפשט בצמח באופן סיסטמי. בשלב הבא בדקנו את הביטוי של נוגדן scFv באמצעות וקטור ה-GVA בעלים של הוינקה. באנליזת Western blot נמצא חלבון בגודל 28 kDa המתאים בגודל ובתגובה הסירולוגית שלו לנוגדן הרקומביננטי בצמחים המודבקים בשני הקונסטרוקטים pCAMGVA-scFv-1s ו-pCAMGVA-scFv-3s.

על סמך תוצאות אלה, החלטנו לבדוק פעילות של נוגדן scFv בצמחי וינקה נגועים בפיטופלסמה. לפי התוצאות שהתקבלו, לא נמצא הבדל ברמות של תוצרי ההגברה בעלים המוזרקים ב-pCAMGVA-scFv-1s או ב-pCAMGVA-ΔscFv-1s לעומת זאת, נמצאה ירידה ברמת תוצרי ההגברה של פיטופלסמה בעלים שהודבקו בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s. כאשר בחנו את רמת הפיטופלסמה בעלים המוזרקים ב-pCAMGVA-scFv-3s בפרקי זמן שונים, נמצא כי חלה ירידה בעוצמת תוצר ה-PCR עם הזמן.

מכיוון שהגפן היא צמח המתאים להדבקה הן ב-GVA והן בפיטופלסמה, בדקנו את האינפיקטיביות של שלושת הקונסטרוקטים המבטאים נוגדן רקומביננטי בשתילונים של תרבויות גפן מהזן *Vitis vinifera cv. Prime*. השתילונים הודבקו בקונסטרוקטים pCAMGVA-scFv-1s ו-pCAMGVA-scFv-3s דרך השורשים. ההדבקה אומתה בבדיקות RT-PCR.

בנוסף, העבודה זו עסקנו בפיתוח גישה לגילוי פיטופלסמה וספירופלסמה ברקמה צמחית באמצעות סמן פלורסצנטי. פותח פרוטוקול לזיהוי פיטופלסמה וספירופלסמה ברקמות צמחיות (גפן, וינקה ועצי הדורים) בעזרת סמן פלורסצנטי באמצעות שיטת FISH. שיטת ה-FISH לגילוי חיידקים של פיטופלסמה וספירופלסמה מבוססת על השימוש במקטעי רצף קצרים (פריימרים) ספציפיים לפתוגנים אלה. סונתזו פריימרים עם רצפים משלימים למקטעי גנים של החיידקים פיטופלסמה וספירופלסמה מסומנים בסמן פלורוסנטי Cy3 (Cyanine 3). נמצא כי בחתכי אורך בעורקי עלים של וינקה, גפן והדרים ניתן היה להבחין בסימון פלורוסנטי ברקמה אשר מקורה בצמחים נגועים בצהבון אך לא ברקמה של צמחים בריאים.

מסקנות והמלצות הימצאות של ביטוי גן המבטא נוגדן רקומביננטי בצמחים ופעילותו כנגד פיטופלסמה בעבודת המחקר הנוכחית, מהווה בסיס להמשך המחקר בנושא של עיכוב וניטרול של פיטופלסמה בצמחים בעזרת הנוגדנים (1): לבדוק פעילות של הנוגדן הרקומביננטי באמצעות הרכבה של צמחים המבטאים את הנוגדן עם צמחים נגועים בפיטופלסמה, (2) לבדוק את יציבות הגן הרקומביננטי בגנום הווקטור הויראלי והביטוי שלו לאורך זמן בצמחים בוגרים.

חקר התפוצה והפיזור של פיטופלסמות אלה בגפנים נגועות באמצעות FISH עשוי לתרום בהבנת מחלת הצהבון באחד הגידולים החשובים בארץ ובעולם.

## דוח מפורט

### מבוא ותאור הבעיה

פיטופלסמות הן חיידקים חסרי דופן, גרם חיובי, מקבוצת *Mollicutes* המאכלסים את תאי השיפה בצמחים. הם בעלי צורה פלאומורפית וגודלם נע בין 200-800 ננומטר. אחד המאפיינים של הפיטופלסמות הוא שלא ניתן לגדלם בתרבית *in vitro* על מצעי מזון, דבר המקשה על חקר הפתוגן. פיטופלסמות גורמות להפרעה במאזן ההורמונלי ולעיכוב בפוטוסינטזה, לאובדן במפל יונים ולשינוי מיקום קלוז בתא. פיטופלסמות פוגעות במגוון רחב של מיני צמחים, כגון, ירקות, עצי פרי, צמחי נוי, וגורמות להפסדים כלכליים קשים. פיטופלסמות הם בעלי גנום DNA קטן, מעגלי, חד-גדילי אשר גודלו נע מ-530 עד kb 1350. פיטופלסמות מופיעות בריכוז נמוך מאוד ופיזורם בצמח אינו אחיד, והן מוגבלות לשיפה. פיטופלסמות מועברות באמצעות וקטורים-חרקיים מוצצי שיפה – leafhoppers ו-plantoppers, השייכים ל- *Cicadellidae*, *Coccidea*, *Flugoroidea* ו-*Psylloidea*. בעת הזנה החרקים רוכשים את החיידקים מצמח חולה ומעבירים אותם לצמחים בריאים. פיטופלסמות יכולות לעבור חורף בתוך הווקטור-חרק או בצמח רב שנתי המשמשים כמאגר.

פיטופלסמות גורמים לטווח רחב של תסמינים: סידור ענפים בצורה של "מטאטא מכשפה", עיוות והצהבת עלים, ניקרוזה, פרחים עקרים, ננסות, כלורוזה בעלים ובנצרים, התפתחות של פרחים ירוקים והעדרות פגמנט, התפתחות של חלקי פרח במבנים של עלים, מראה גידול שיחי בשל התקצרות המרחק בין הפרקים בנצר, מערך דורי של עלים, ריבוי עלים, עצירת צימוח בכלל הצמח, נבילה כללית עד.

לצמחים אין מערכת חיסונית כמו אצל בע"ח כדי לייצר נוגדנים במטרה לזהות ולעכב פתוגנים פולשים. היום ניתן לייצר צמחים טרנסגניים המבטאים גנים של נוגדנים או חלקים של נוגדנים כנגד אפיטופים של פתוגנים או פולשים אחרים. נוגדנים רקומביננטיים או חלקים שלהם בצמח טרנסגני יכולים לקשור כל סוג של פתוגן (חלבון, אנזים), וכך לשרת כגישה חדשה בבקרת מחלות צמחים.

קיימות שתי שיטות עיקריות לבטא גן זר בצמח: על ידי ביטוי קבוע בעזרת יצירת צמחים טרנסגניים ובעזרת ביטוי חולף באמצעות וקטורים ויראליים. בשיטה הראשונה, הגן מוחדר בתוך כרומוזום הצמח תוך כדי השימוש בחיידקי האגרובקטריום ופלסמיד בינארי המכיל T-DNA. השימוש בוקטורים ויראליים לביטוי גנים זרים בצמחים מקנה כלי ביוטכנולוגי נוסף לשיטות סטנדרטיות כמו הכלאה ושיטה טרנסגנית. היתרונות של השימוש במערכת וירוס-וקטור הוא בביטוי מהיר בו ניתן לבטא גן זר במינים רבים של צמחים תוך מספר שבועות. בנוסף, השיטה מאפשרת לבטא גן בכמות גבוהה בזמן קצר.

לצורך החדרת וביטוי גנים בגפן, פותח לאחרונה במעבדתנו וקטור ויראלי המבוסס על גנום נגיף הגפן *Grapevine virus A (GVA)* השייך לקבוצת ה-*Vitivirus* ובעל גנום של RNA חד-גדילי, חיובי בגודל של כ-7.5kb. הגנום של ה-*GVA* הונדס לוקטור המכיל שני עותקים של הפרומוטור המבקר יצירת חלבון התנועה, בתוספת אתרי רסטרקציה אשר ישמשו לצורך החדרת הגן הזר. במסגרת עבודת המחקר הזו, השתמשנו בוקטור ה-*GVA* לצורך ביטוי נוגדני scFv ספציפיים לפיטופלסמה מקבוצת AY למטרת דיכוי מחלת הצהבון בגפן.

## מטרות המחקר

1) לבטא בצמחים (גפנים, וינקה, בנטמיאנה) גנים של מולקולות נוגדן חד שרשרתית single-chain variable Fragment (scFv) המסוגלים להיקשר באופן ייחודי ולנטרל פיטופלסמות מקבוצת ה- Aster yellows (AY) תוך כדי שימוש בוקטור ויראלי לביטוי הבנוי על בסיס ה- GVA

### טבלה מס' 1. רשימת תחלים אשר שימשו בעבודת המחקר

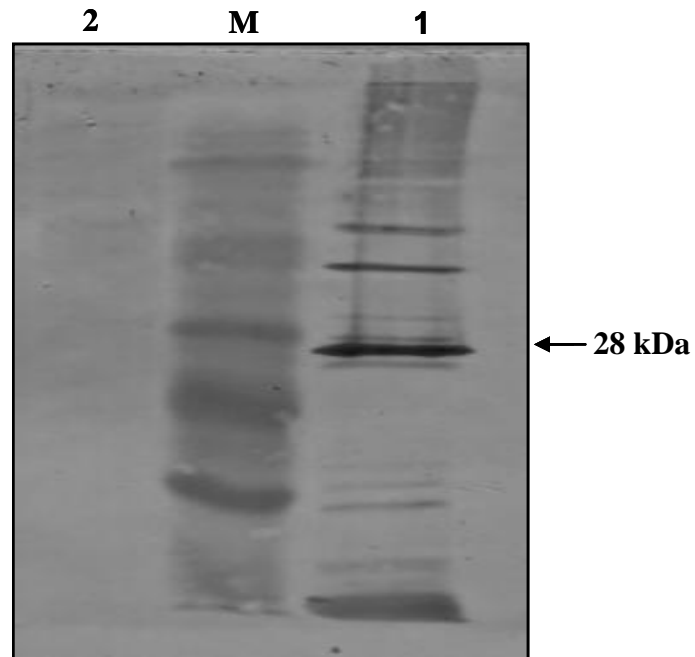
שם התחל	רצף	כיוון התחל	הרצף המוגבר	הערות
P1	5'-AAGAATTTGATCCTGGCTCA GGATT-3'	+	16S rRNA	
P7	5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'	-	23S rRNA	
fU5	5'-CGGCAATGGAGGAAACT-3'	+	16S rRNA	
rU3	5'-TTCAGCTACTCTTTGTAA CA -3'	-	16S rRNA	
ScR16F1A	5'-GCA TGC CTA ATA CAT GCA AG- 3'		16S rRNA	Nested-PCR
ScR16R2	5'-ATC CAT CCG CAC GTT CTC GTA C-3'		16S rRNA	Nested-PCR
ScR16F1	5'-AGG ATG AAC GCT GGC GGC AT- 3'		16S rRNA	PCR
ScR16R1	5'-GTA GTC ACG TCC TTC ATC GT-3'		16S rRNA	PCR
Spr-Crt-RC3	5'-Cy3-TGC TTT TGG TGG TGC TAA TG-3'	+	חלבון ריבוזומלי T2 <i>Spiroplasma citri</i>	FISH
Cy319	5'-AGC TAG AGT TGG ATA GAG G-3'	+	16rRNA Phytoplasma	FISH
VH2For	5'-CGTAAGCGGCCGCATGG TGAAACTGCAGCAGTCAG-3'	+	שרשרת כבדה scFv+NotI	
VK2Rev	5'-GAATCAGGGCCCTACCGTTT GATCTCGAGCTTG-3'	-	שרשרת קלה scFv+ApaI	

### עיקר הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו

במטרה להכין נוגדנים פוליקלונליים כנגד התוצר החלבוני של ה- scFv רצינו לבטא את החלבון בחיידקי *E. coli*, להפיק את החלבון בצורה דנטורטיבית ולאחר מכן להזריק אותו לארנבת. בשלב הביטוי השתמשנו בפלסמיד ביטוי pET-28a. לאחר שיבוט הגן של ה- scFv (בתוספת פפטיד קצר המפריד בין השרשראות הכבדה והקלה) לתוך פלסמיד זה, הקלון שהתקבל (pET-28a-scFv-201) הוחדר לחיידקי BL21. החלבונים אשר הופקו מחיידקים כאלה ואשר טופלו ב- IPTG לצורך השראת ביטוי הגן הרקומבנטי וייצור חלבון המטרה הושוו עם חלבונים אשר הופקו מחיידקים שלא טופלו ב- IPTG. התוצאות הראו כי היה הבדל משמעותי ברמת ביטוי הנוגדן scFv ע"י חיידקים אשר עברו אינדוקציה עם IPTG לאלה שלא קיבלו אינדוקציה.

לצורך מיצוי החלבון, נחתך הפס המייצג את החלבון המתאים לנוגדן הרקומביננטי בגודל 28 kDa, נשטף במים סטריליים מזוקקים ונכתש בבופר PBSx1 באמצעות הומוגנייזר. אמולסיית החלבון שהתקבלה שימשה להזרקה לארנבת לצורך הכנת נוגדנים רב-שבטיים (העבודה נעשתה ע"י טכנאית המחלקה

המוסמכת לעבודה עם בעלי חיים). לאחר שלוש הזרקות כאלה במרווחים של שבועיים בין הזרקה אחת לשנייה, נלקחו דגימות דם מארנבת המוזרקת. יכולת הקישור של הנוגדן הרב שבטי בסרום לחלבון המקור scFv נבדקה בעזרת אנליזת Western blot. מהתוצאות המוצגות בתמונה מס' 1 ניתן לראות כי הנוגדן שהוכן, זיהה בין היתר ובצורה ברורה את הנוגדן scFv המבוטא בחיידקים, אך לא זיהה כלל חלבונים ממיצוי שהופק מצמח בריא של בנטמיאנה



תמונה מס' 1. אנליזת Western blot עם נוגדן ראשוני רב שבטי כנגד נוגדן רקומביננטי scFv. ערוץ 1 מכיל חלבונים אשר הופקו מחיידקים BL21 המכילים את הקונסטרוקט pET-28a-scFv-201 ומבטאים נוגדן רקומביננטי ואשר עברו אינדוציה עם IPTG 0.1 mM. ערוץ 2 מכיל חלבונים אשר הופקו מצמחי בנטמיאנה בריאים. ערוץ M מכיל סמן גודל לחלבונים - Prestained Protein Molecular Weight Marker.

### שיבוט של גן המבטא נוגדן רקומביננטי scFv לתוך וירוס GVA

בעבודת המחקר הנוכחי רצינו לבטא גן המבטא נוגדן רקומביננטי scFv ברקמה צמחית. לשם כך בנינו שלושה קונסטרוקטים (שבטים אינפקטיביים) שהכילו גן המבטא נוגדן רקומביננטי scFv כנגד פיטופלסמת AWB.

**יצירת קונסטרוקט אינפקטיבי עם גן scFv בו מופרדות השרשראות הקלה והכבדה בחזרה אחת של רצף של פוליפפטיד המשמש בתור מרווח (spacer) (scFv-1s)**

לקונסטרוקט ראשון שהכיל גן המבטא נוגדן רקומביננטי scFv כנגד פיטופלסמת AWB והמכיל תוספת רצף של חזרה אחת של פפטיד קצר המשמש כספסר בודד מקלון הנקרא pET-28a-scFv-201 אשר נבנה במהלך עבודת המחקר של התלימדה תמר חורש, הוספו אתרי חיתוך לאנזימי הגבלה NotI ו-ApaI ע"י PCR באמצעות פריימרים VH2For ו-VK2Rev. תוצר ה-PCR בגודל 750bp בודד ונחתך עם אתרי

האנזימים ApaI ו-NotI ולאחר מכן שובט בתוך וקטור ה-GVA הנקרא pGVA118. לאחר מכן, נעשו שחלופים בין הקלון שהתקבל עם הקלון pGVA69-2 על מנת לקבל את ביטוי הנוגדן באמצעות וקטור ה-GVA דרך הפלסמיד הבינארי pCAMBIA2301. לקלון שהתקבל, הנקרא pCAMGVA-scFv-1s, נעשתה קביעת רצף למקטע ה-scFv לצורך אימות הרצף.

#### **יצירת קונסטרוקט אינפקטיבי עם גן scFv-1s עם מוטציה ב-start codon**

הקונסטרוקט השני שנבנה הכיל גן scFv-1s בדומה לקלון הקודם אך עם מוטציה ב-start codon. הגן שימש כביקורת שלילית בבדיקת ביטוי של גן scFv-1s. המוטציה נעשתה תוך כדי השימוש בפריימר סינתטי בו הוחלף הקודון הראשון ATG של הגן עם TTG. בניית הקונסטרוקט, החדרתו לתוך וקטור ה-GVA ולאחר מכן לפלסמיד הבינארי נעשתה בדומה לקונסטרוקט הקודם: נעשה PCR באמצעות הפריימרים ΔVH2For עם מוטציה ב-ATG ו-VK2Rev. תוצר ה-PCR נחתך עם אנזימי הגבלה ApaI ו-NotI, נוקה מהגיל ושובט בווקטור pGVA118. לאחר מכן, נעשו שחלופים בין הקלון שהתקבל עם הקלון pGVA69-2 וזאת לצורך ביטוי וקטור ה-GVA והנוגדן הרקומבנטי דרך הפלסמיד הבינארי pCAMBIA2301. לקלון שהתקבל והנקרא pCAMGVA-ΔscFv-1s נעשתה קביעת רצף למקטע ה-scFv על מנת לוודא שהתקבל קלון ספציפי.

#### **יצירת קונסטרוקט אינפקטיבי עם גן scFv-3s בו מופרדות השרשראות הקלה והכבדה בשלוש חזרות של רצף של פוליפפטיד המשמש בתור מרווח (spacer)**

הקלון הקודם pCAMGVA-scFv-1s והמכיל את המקטע scFv-1s צפוי לבטא את ה-scFv בצורה בה שתי השרשראות מופרדות בינם בפפטיד קצר האמור לסייע בגמישות וארגון מרחבי של השרשראות במטרה לקבלת חלבון או נוגדן פעיל. אף על פי זאת, ישנה אפשרות שהפפטיד הזה יהיה קצר מדי בשביל לקבל נוגדן פעיל. בהתאם לכך, החלטנו על בניית קונסטרוקט נוסף אשר מבטא את ה-scFv עם שלוש חזרות של רצף הפפטיד הקצר. הגן המבטא נוגדן רקומבנטי scFv כנגד פיטופלסמת AWB והמכיל רצף של שלוש חזרות של פפטיד קצר בודד מקלון הנקרא pGEM179-4 אשר נבנה במהלך עבודת המחקר של התלימדה תמר חורש. בשלב הראשון, נעשה PCR באמצעות פרימרים VH2For ו-VK2Rev. תוצר ה-PCR נוקה מהגיל ושובט לתוך הווקטור pGVA118 ולאחר מכן נעשו שחלופים בין הקלון שהתקבל עם הקלון pGVA69-2 על מנת לקבל את ביטוי הנוגדן באמצעות וקטור ה-GVA דרך הפלסמיד הבינארי pCAMBIA2301. הקלון שהתקבל ונקרא pCAM-GVA-scFv-3s נשלח לקביעת רצף למקטע ה-scFv על מנת לוודא שהתקבל קלון ספציפי.

#### **הדבקת צמחי בנטמיאנה בוקטור GVA המכיל נוגדן רקומבנטי**

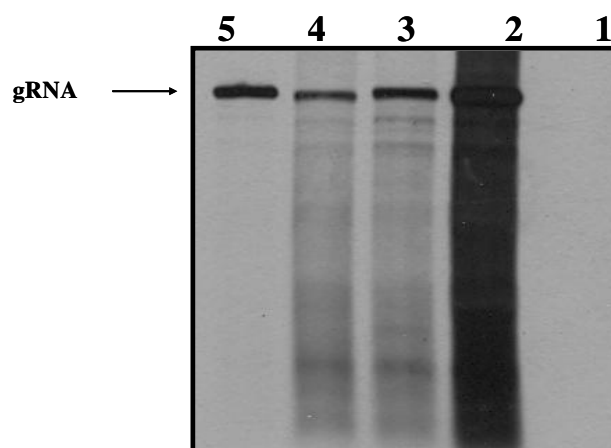
לאחר בניית שלושת הקונסטרוקטים הנ"ל היה צורך לבדוק את האינפקטיביות שלהם בצמחים ואת ביטוי וירוס GVA והנוגדן הרקומבנטי. לצורך זה היה צריך לבצע טרנספורמציה של הפלסמידים האלה לחיידקי אגרובקטריום. הטרנספורמציה לחיידקי ה-*A. tumefaciens* נעשתה ע"י אלקטרופורציה כפי שתואר בשיטות. לאחר מכן, החיידקים גודלו ושימשו להדבקת צמחים של *N. benthamiana* ע"י אגרו-



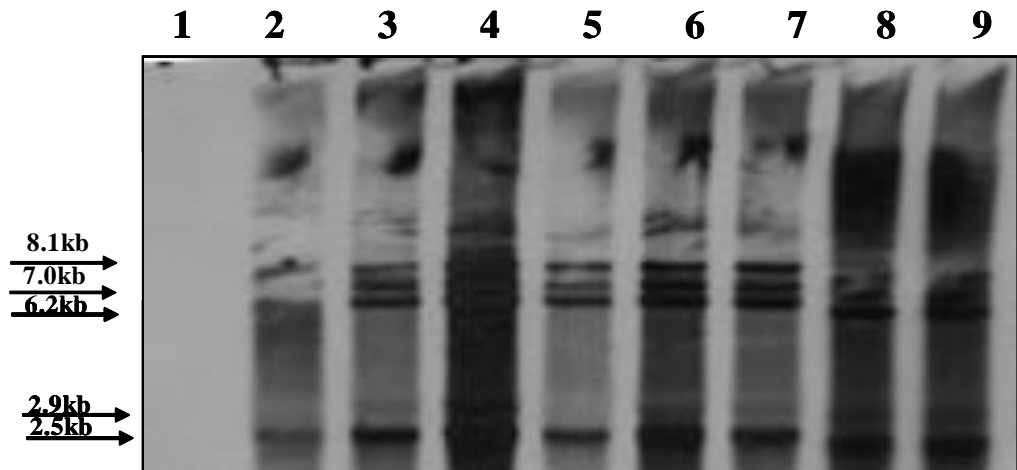
אינפלטרציה. הצמחים המאולחים גודלו בחממה עד להופעת תסמיני מחלה. לאחר 10-14 ימים, הצמחים המודבקים עם כל אחד משלושת הקונסטרוקטים התחילו להראות תסמינים אפייניים להדבקה ב-GVA אשר התבטאו בננסות עלים, ננסות כללית, והופעת כתמים צהובים על כל העלים.

לאחר שנוכחנו לדעת כי הצמחים אשר אולחו ע"י אגרו-אינפלטרציה פיתחו תסמיני מחלה, רצינו לבצע אנליזות מולקולאריות במטרה לאמת הדבקה ב-GVA. לצורך זה הופק RNA כללי מהצמחים הסימפטומטיים. לאחר מכן, ה-RNA עבר אנליזה באמצעות Northern blot והיברידיזציה עם גלאי ספציפי לקצה ה-5' של גנום ה-GVA, מסומן ב-DIG. תוצאות ההיברידיזציה המובאות בתמונה מס' 2 מראות הצטברות של RNA ויראלי גנומי בצמחים המאולחים בשלושת הקונסטרוקטים המבטאים את וקטור ה-GVA. בצמח שלא הודבק, לעומת זאת, לא התגלתה תגובה עם הגלאי. תוצאות אלה מאמתות כי הצמחים המאולחים ע"י אגרו-אינפקציה היו נגועים ב-GVA.

השימש במערכת וירוס-וקטור לביטוי גנים זרים בצמח לפעמים מלווה בתופעת של שמיטת הגן הרקומבנטי של הגן הזר מגנום הוירוס. תופעה זאת מתרחשת בשל ריקומבנציה הומולוגית או הטרולוגית המתרחשת בזמן הרלפקציה של הוירוס. על מנת לבדוק באם הגן הרקומבנטי של ה-scFv הקיים בווקטור ה-GVA עדיין קיים בגנום הוירוס בצמחים המאולחים ולא נזרק מגנום הוירוס היה צריך לבצע אנליזת Northern blot נוספת והיברידיזציה עם גלאי ספציפי לרצף ה-scFv. גלאי כזה מסומן ב-DIG, שימש לצורך בדיקת מספר צמחי *N. benthamiana* מאולחים. התוצאות המוצגות בתמונה מס' 3 מראות הצטברות של RNA ויראלי גנומי ותת-גנומי המעידים על ריפלוקציה של הוירוס. בצמח המודבק ב-GVA ללא scFv לא התקבלה תגובה עם הגלאי. תוצאות אלה מעידות כי רצף ה-scFv לא נשמט מגנום וקטור ה-GVA.



תמונה מס' 2. אנליזת Northern blot והיברידיזציה של RNA כללי עם גלאי ספציפי לקצה ה-5' של גנום ה-GVA. ערוץ 1 מכיל RNA אשר הופק מצמחי בנטמיאנה בריאים. ערוץ 2 מכיל מיצוי RNA אשר הופק מצמחי בנטמיאנה מודבקים בקונסטרוקט אינפקטיבי pCAMGVA-scFv-1s. ערוץ 3 מכיל מיצוי RNA אשר הופק מצמחי בנטמיאנה נגועים בקונסטרוקט אינפקטיבי pCAMGVA-ΔscFv-1s. ערוצים 4-5 מכילים מיצוי RNA אשר הופק מצמחי בנטמיאנה נגועים בקונסטרוקט אינפקטיבי pCAMGVA-scFv-3s. החץ מצביע על מיקום RNA גנומי של GVA.



תמונה מס' 3. אנליזת Northern blot והיברידיזציה של RNA כללי עם גלאי ספציפי ל- scFv. ערוץ 1 מכיל מיצוי RNA אשר הופק מצמחי בנטמיאנה מודבקים קלון אינפקטיבי של GVA ללא גן זר. ערוצים 2-4 מכילים RNA אשר הופק מצמחי בנטמיאנה מודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-1s. ערוצים 5-7 מכילים מיצוי RNA אשר הופק מצמחי בנטמיאנה מודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-ΔscFv-1s. ערוצים 8-9 מכילים מיצוי RNA הגנומי והתת-גנומי של ה- GVA שנוצר בזמן הרפלקציה של גנום הוירוס.

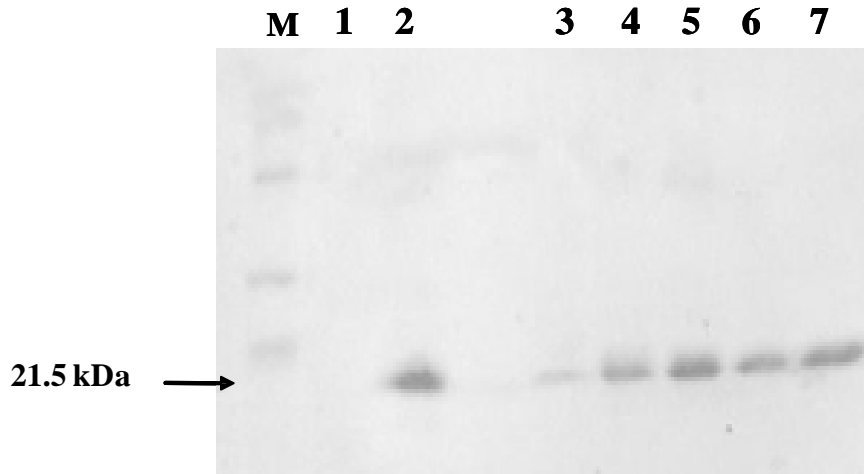
#### בדיקת הצמחים המודבקים באמצעות אנליזת Western blot

לאחר שבדקנו שיש הצטברות RNA של וירוס באנליזת Northern blot בצמחי בנטמיאנה המאולחים בקונסטרוקט אינפקטיבי pCAMGVA-scFv-3s, רצינו לבדוק ביטוי חלבונים של GVA באמצעות אנליזת Western blot. לצורך זה הופקו כלל חלבונים מעלים הסימפטומטיים של צמחי בנטמיאנה מאולחים בשלושת הקונסטרוקטים, כפי שתואר בשיטות. החלבונים הופרדו בג'ל והועברו למברנת ניטרולולוז. נציין כי על מנת לבדוק כי החלבונים הועברו למברנה, הממברנות בכל האנליזות של ה- Western blot נצבעו בצבע Ponceau הצובע את כלל החלבונים בממברנה בצבע ורוד. לאחר ההעברה של החלבונים לממברנה, הממברנה נבדקה עם נוגדנים רב שבטיים כנגד מעטפת חלבונית של ה- GVA. בתמונה מס' 4 ניתן לראות את תוצאות ה- Western blot עם הנוגדן של חלבון המעטפת. התוצאות מראות על ביטוי חלבון בגודל כ-21.5kDa, המתאים לגודל של מעטפת חלבונית של GVA, בדוגמאות החלבונים שהופקו מצמחי בנטמיאנה מאולחים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s.

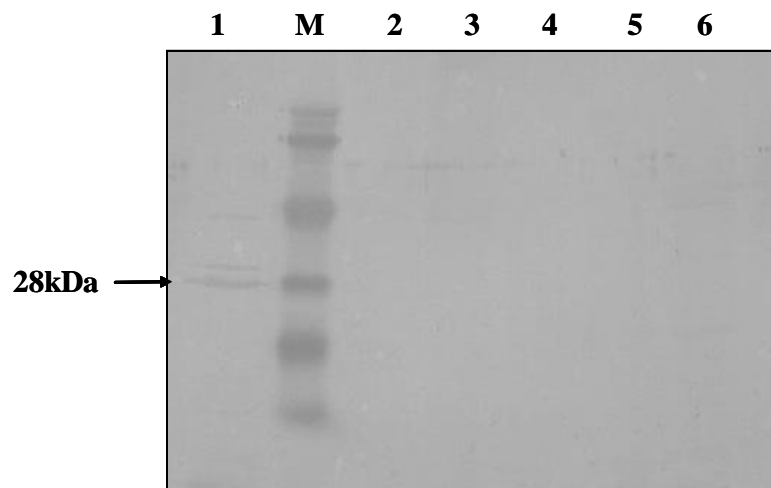
לאחר שבדקנו כי הצמחים המאולחים היו מודבקים בוקטור ה- GVA, רצינו לבדוק באם הוקטור הזה מבטא את הנוגדן הרקומבנטי ברמת החלבון. לצורך זה נעשתה בדיקת Western blot תוך כדי השימוש בנוגדן ספציפי לנוגדן scFv הרקומבנטי.

בתמונה מס' 5 ניתן לראות את תוצאות ה- Western blot שנעשתה לחלבונים שהופקו מצמחי בנטמיאנה מאולחים בקונסטרוקטים pCAMGVA-scFv-1s או pCAMGVA-ΔscFv-1s תוך כדי השימוש בנוגדן רב שבטי כנגד נוגדן רקומביננטי scFv. לפי התוצאות ניתן לראות כי הנוגדן זיהה בצורה ברורה את הנוגדן scFv המבוטא בחיידקים, אך לא בצמחים המאולחים בשני קונסטרוקטים הנ"ל ולא בצמח בריא. לעומת

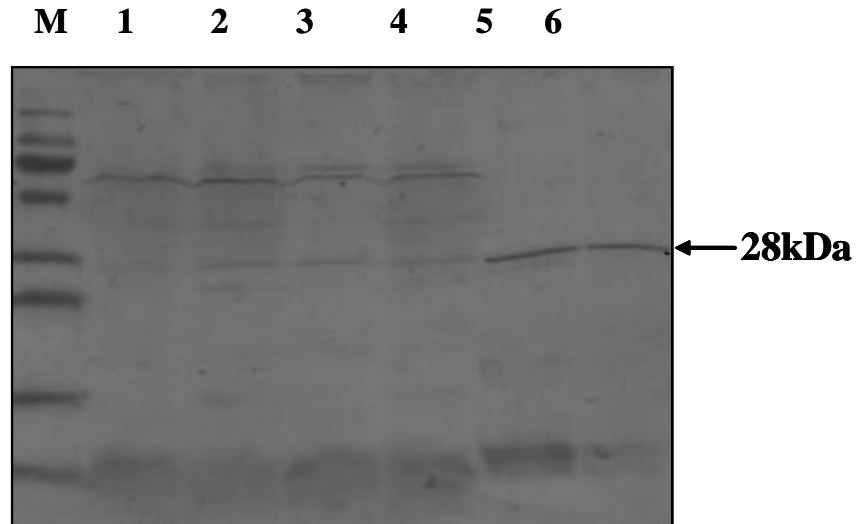
זאת, כאשר בדקנו באמצעות Western blot את החלבונים של הצמחים המאולחים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s קיבלנו תוצאות אחרות. תמונה מס' 6 מציגה תוצאות של ביטוי חלבון בגודל כ- 28kDa המתאים לגודל של נוגדן רקומביננטי scFv בממברנה המכילה כלל חלבונים שהופקו מצמחי בנטמיאנה שאולחו בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s. תגובה דומה התקבלה במיצוי כלל חלבונים שהופק מחיידק, אך לא זיהה במיצוי כלל חלבונים שהופק מצמח בנטמיאנה המאולח ב-GVA ללא גן זר.



תמונה מס' 4. אנליזת Western blot עם נוגדן רב שבטי כנגד חלבון המעטפת של וירוס GVA. ערוץ 1 מכיל חלבונים אשר הופקו מצמחי בנטמיאנה בריאים. ערוץ 2 מכיל חלבונים אשר הופקו מצמחי בנטמיאנה נגועים בווקטור של GVA ללא גן זר (קונסטרוקט 4-469). ערוצים 3-4 מכילים חלבונים אשר הופקו מצמחי בנטמיאנה מודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-AscFv-1s. ערוץ 5 מכיל חלבונים אשר הופקו מצמחי בנטמיאנה מודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-1s. ערוצים 6-7 מכילים חלבונים אשר הופקו מצמחי בנטמיאנה מודבקים ב-pCAMGVA-scFv-3s. ערוץ M מכיל סמן גודל לחלבונים - Prestained Protein Molecular Weight Marker. החץ מציג את מיקום חלבון המעטפת של הוירוס בגודל 21.5 kDa.



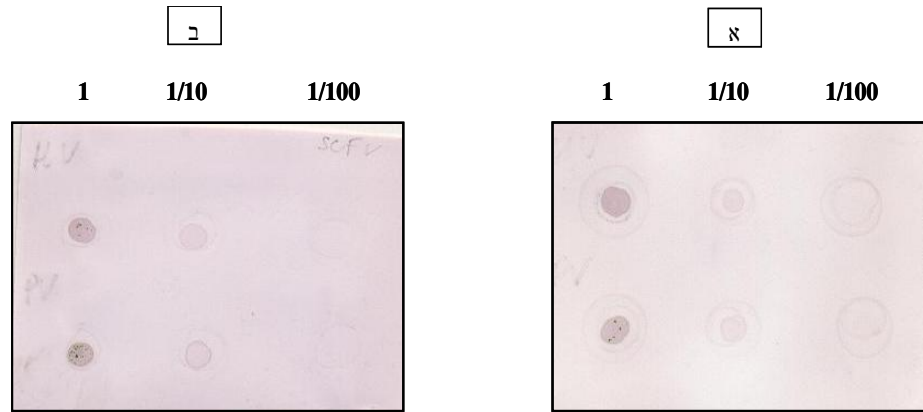
תמונה מס' 5. אנליזת Western blot עם נוגדן רב שבטי כנגד נוגדן רקומביננטי scFv. ערוץ 1 מכיל חלבונים אשר הופקו מחיידק BL21 המכילים את הקונסטרוקט pET-28a-scFv-201 ומבטאים נוגדן רקומביננטי ואשר עברו אינדוקציה עם 0.1 mM IPTG. ערוץ M מכיל סמן גודל לחלבונים - Plus Prestained Protein Ladder. ערוץ 2 מכיל חלבונים אשר הופקו מצמחי בנטמיאנה מודבקים בווקטור GVA ללא גן זר (קונסטרוקט 4-469). ערוצים 3-4 מכילים חלבונים אשר הופקו מצמחי בנטמיאנה מודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-1s. ערוצים 5-6 מכילים חלבונים אשר הופקו מצמחי בנטמיאנה מודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-Δ.scFv-1s.



תמונה מס' 6. אנליזת Western blot עם נוגדן רב שבטי כנגד נוגדן רקומביננטי scFv. ערוץ M מכיל סמן גודל לחלבונים - Plus Prestained Protein Ladder. ערוץ 1 מכיל חלבונים אשר הופקו מצמחי בנטמיאנה נגועים בקונסטרוקט אינפקטיבי pCAMGVA-scFv-3s. ערוצים 2-4 מכילים חלבונים אשר הופקו מצמחי בנטמיאנה נגועים בקונסטרוקט אינפקטיבי pET-28a-scFv-201 ומבטאים נוגדן רקומביננטי ואשר עברו אינדוציה עם IPTG 0.1 mM.

#### בדיקת פעילות נוגדן רקומביננטי scFv ע"י dot blot

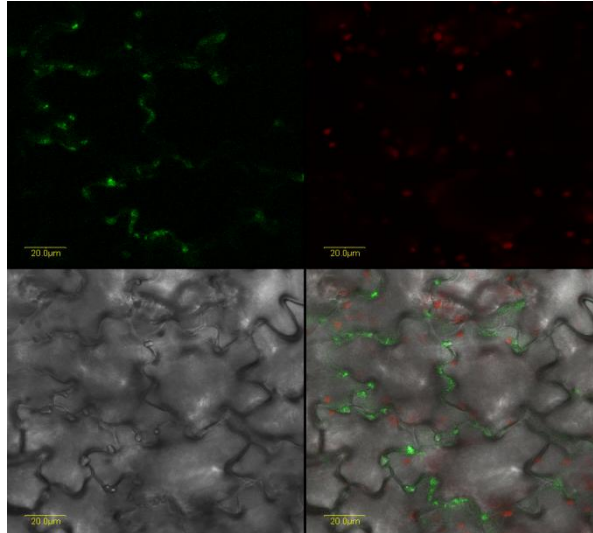
מאחר והתקבל ביטוי גן המבטא נוגדן רקומביננטי scFv-3s בצמחי בנטמיאנה המאולחים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s באנליזת Western blot, רצינו לבדוק יכולת קישור של הנוגדן הרקומביננטי כנגד פיטופלסמת AWB, ע"י dot blot. לשם כך, מיהולים שונים של שני כתשים שהוכנו מעלים של וינקה בריאה ומעלים סימפטומטיים של וינקה נגועה ב-AWB (עם סימני כלורוזה ונסות), עברו קיבוע על שתי ממברנות ניטרוצלולוז. ממברנה א' אשר שימשה בתור ביקורת שלילית הוגבה עם כתש שהוכן מעלים סימפטומטיים של צמח בנטמיאנה מאולח ב-GVA ללא גן זר. ממברנה ב' הוגבה עם כתש שהוכן מעלים סימפטומטיים של בנטמיאנה מודבקת בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s. לאחר מכן, שתי הממברנות נבדקו עם נוגדן רב שבטי כנגד נוגדן רקומביננטי scFv. לפי התוצאות המוצגות בתמונה מס' 7, לא ניתן היה לראות שיש הבדל כלשהו בעוצמת התגובה בין כתש שהוכן מעלים הבריאים של וינקה לבין כתש שהוכן מעלים הסימפטומטיים של וינקה הנגועה בפיטופלסמה. כמו כן, לא ניתן היה להבחין בהבדל בעוצמת התגובה בין שתי הממברנות כאשר בתור נוגדן שימשו המיצויים של בנטמיאנה נגועה ב-GVA ללא גן זר (בממברנה א') ובנטמיאנה מודבקת בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s (בממברנה ב').



תמונה מס' 7. מבחן dot blot עם נוגדן רב שבטי כנגד נוגדן רקומביננטי scFv-3. ממברנות א' ו- ב' מכילות מיהולים שונים של כתש מעלי וינקה בריאה (שורה עליונה) ועלי וינקה נגועה ב-AWB (שורה תחתונה). ממברנה א' הוגבה עם מיצוי אשר הוכן מצמחי בנטמיאנה מודבקים בקונטרקט 4-469. ממברנה ב' הוגבה עם מיצוי אשר הוכן מצמחי בנטמיאנה מודבקים בקונטרקט pCAMGVA-scFv-3s.

### הדבקת צמחי וינקה בוקטור GVA המכיל eGFP

מאחר ולא הצלחנו לזהות פעילות של נוגדן רקומביננטי scFv-3s בצמחי בנטמיאנה ע"י dot blot, למרות שהיה ביטוי ב-Western blot, החלטנו להשתמש במערכת צמחים אחרת: וינקה או גפן. שני הצמחים האלה הם פונדקאים טבעיים לפיטופלסמה. מאידך, צמח הוינקה איננו נחשב לפונדקאי מתאים לנגיף ה-GVA. אף על פי זאת, קיימת האפשרות שהדבקה ב-GVA היא אפשרית אך איננה מלווה בתפשטות סיסטמית בצמח. על מנת לבדוק וירוס ה-GVA יכול להדביק את הצמח וינקה, הדבקנו, באמצעות אינפילטרציה, עלים של הצמח בוקטור GVA המבטא את הגן המדווח eGFP. לאחר 24 שעות העלים המודבקים נסרקו תחת מיקרוסקופ קונפוקלי באורך גל של 488 nm. תמונה מס' 8 מציגה ביטוי של ה-eGFP בעלה המוזרק של וינקה. בתמונה ניתן לראות צבע ירוק פלורוסנטי בציטופלסמה של התאים בעלה המוזרק. לעומת זאת, כאשר בדקנו עלים צעירים שמקורם בצימוח חדש של צמחים מוזרקים לא ניתן היה לראות פלורסנציה. מכאן הסקנו כי ה-GVA יכול להדביק וינקה, אבל הוא לא נע בצמח באופן סיסטמי.

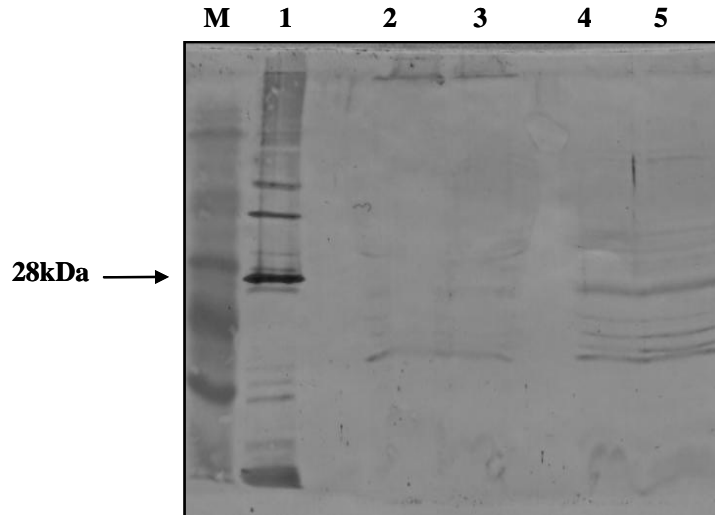


תמונה מס' 8. צילומים של מיקרוסקופ קונפוקלי לבחינת ביטוי של eGFP בעלי וינקה. עלים של וינקה הודבקו ע"י אגרו-אינפלטרציה עם ווקטור של GVA המבטא eGFP (קונסטרוקט 6-160). לאחר 24 שעות העלים המוזרקים נבדקו במיקרוסקופ קונפוקאלי לביטוי eGFP למעלה צד שמאל: צילום באור Ultraviolet (UV) באורך גל של 488 nm המראה את ה-eGFP הזוהר (למעלה צד שמאל). למעלה צד ימין: צילום של אוטו-פלורוסנציה של הרקמה הצמחית. למטה שמאל: צילום באור נראה. למטה צד ימין: שילוב של כל הצילומים הנ"ל.

#### בדיקת ביטוי נוגדן רקומביננטי scFv בוינקה

בהסתמך על תוצאות אלה, רצינו לבדוק את הביטוי והפעילות הביולוגית של נוגדן רקומביננטי המבוטא דרך ווקטור ה-GVA בעלים מוזרקים של וינקה נגועה בפיטופלסמה.

לאחר שראינו כי GVA יכול להדביק צמחי וינקה, רצינו לבדוק ביטוי של הנוגדן הרקומביננטי בצמחי וינקה ע"י Western blot. לצורך זה, צמחי וינקה בריאים הודבקו בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-1s או pCAMGVA-ΔscFv-1s. לאחר 10 ימים, הופקו כלל החלבונים מעלים מאולחים. החלבונים הורצו בגיל והועברו לממברנת ניטרוצלולוז. הממברנה נבדקה עם נוגדן רב שבטי כנגד נוגדן רקומביננטי scFv. התוצאות שהתקבלו והמוצגות בתמונה מס' 9 מראות על ביטוי של חלבון בגודל כ-28 kDa, המתאים לגודל של נוגדן רקומביננטי scFv, כלל בדוגמאות של החלבונים שהופקו מצמחי וינקה מאולחים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-1s וגם בחלבונים שהופקו מחיידק המבטא את הנוגדן הרקומביננטי (ביקורת חיובית). מאידך, באותה בדיקת ה-Western blot לא התקבלה תגובה עם החלבונים שהופקו מצמח בנטמיאנה נגוע ב-GVA ללא גן זר ולא עם החלבונים שהופקו מצמחי בנטמיאנה מודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-ΔscFv-1s. לפי תוצאות אלה ניתן היה להסיק כי חל ביטוי של הנוגדן הרקומביננטי scFv באמצעות וקטור ה-GVA בעלים של צמח הוינקה המאולחים.



תמונה מס' 9. אנליזה Western blot עם נוגדן רב שבטי כנגד נוגדן רקומביננטי scFv. ערוץ M מכיל סמן גודל לחלבונים - Prestained Protein Molecular Weight Marker. ערוץ 1 מכיל חלבונים אשר הופקו מחיידקים BL21 המכילים את הקונסטרוקט pET-28a-scFv-201 ומבטאים נוגדן רקומביננטי ואשר עברו אינדוקציה עם IPTG 0.1 mM. ערוץ 2 מכיל חלבונים אשר הופקו מצמחי בנטמיאנה מודבקים ב-GVA ללא גן זר. ערוץ 3 מכיל חלבונים אשר הופקו מצמחי וינקה מודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-ΔscFv-1s. ערוץ 4 מכיל חלבונים אשר הופקו מצמחי וינקה מודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-1s. ערוץ 5 מכיל חלבונים אשר הופקו מצמחי וינקה מודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s. החץ מציג את מיקום הנוגדן הרקומביננטי 28kDa.

### בדיקת פעילות נוגדן scFv בוינקה

#### בדיקת פעילות נוגדן scFv בוינקה ע"י nested-PCR

לאחר שמצאנו כי צמחי וינקה יכולים לבטא נוגדן רקומביננטי באמצעות וקטור ה-GVA, רצינו לבדוק האם לנוגדן המבוטא בדרך זו יש פעילות ביולוגית או השפעה כלשהי על חיידקי הפיטופלסמה. לצורך זה השתמשנו בצמחי וינקה נגועים בפיטופלסמה עם עלים סימפטומטיים. העלים הסימפטומטיים הוזרקו עם הקונסטרוקטים pCAMGVA-scFv-1s, pCAMGVA-ΔscFv-1s או pCAMGVA-scFv-3s. העמדת ניסויי זה מבוססת על ההנחה שלנו שביטוי הנוגדן הרקומביננטי בעלים מאוכלסים בפיטופלסמה יגרום לנטרול חיידקי הפיטופלסמה במידת מה ובהתאם לכך לירידה בריכוז חיידקי הפיטופלסמה בעלים המוזרקים.

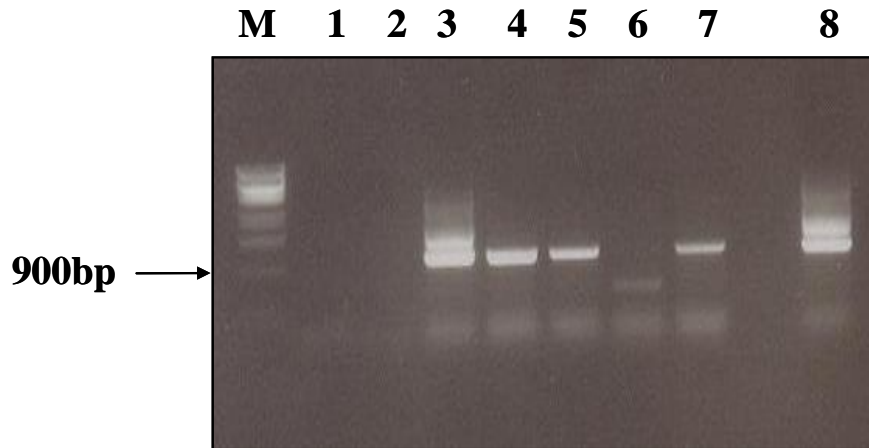
בניסויי ראשוני רצינו לעקוב אחרי שינויים ברמת אוכלוסיית הפיטופלסמה בזמנים שונים לאחר ההזרקה בחיידקים המבטאים את וקטור ה-GVA והנוגדן הרקומביננטי. למטרה זו, הופק DNA כללי מעלים מוזרקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s בפרקי הזמן 1, 2, 4, 8, 14 ימים לאחר ההזרקה. לאחר מכן, בוצע nested-PCR לצורך זיהוי של פיטופלסמה באמצעות תחלים P1/P7 ו-U3/U5. לפי התוצאות המוצגות בתמונה מס' 10 ניתן לראות תוצרי הגברה DNA שהתקבלו ב-nested-PCR בגודל 900 bp. רמת תוצרי ההגברה של ה-DNA הלכה ופחתה עם הזמן. בניסוי הסיפיפי המוצג, בדוגמא של ה-8 ימים לאחר ההזרקה לא קיבלנו תוצרי הגברה. בחזרות אחרות של הניסויי בימים 8 ו-14 ימים הייתה ירידה משמעותית ברמת תוצרי ההגברה של ראקציות ה-PCR בהשוואה לימים 1-4. בעלים הסימפטומטיים הלא

מוזרקים (ביקורת חיובית), רמת תוצרי הגברת DNA לא השתנתה לאחר שבועיים. לפי התוצאות האלה ניתן להציע כי הנוגדן הרקומבננטי המבוטא באמצעות הקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s, המבטא נוגדן המכיל שלוש חזרות של פפטיד מגשר, יש פעילות ביולוגית או השפעה על חיידקי הפיטופלסמה. בניסוי שני רצינו לבדוק באם ניתן לקבל השפעה דומה על חיידקי הפיטופלסמה גם באמצעות השימוש בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-1 המבטא נוגדן המכיל חזרה אחת של הפפטיד המגשר. לשם כך, עלים סימפטומטיים של צמחי וינקה נגועים בפיטופלסמה הוזרקו עם הקונטרקט pCAMGVA-scFv-1 או pCAMGVA- $\Delta$ scFv-1 שאינו מבטא את הנוגדן הרקומבננטי. לאחר שבועיים מההזרקה, הופק DNA כללי מהעלים המוזרקים ונעשתה בדיקת PCR חצי כמותי. לפי התוצאות שהתקבלו והמוצגות בתמונה מס' 11 התקבלו תוצרי הגברה בגודל 900 bp התואם לגן של לפיטופלסמה, אך, ללא הבדל ברמות ההגברה בשני הסוגים של העלים.

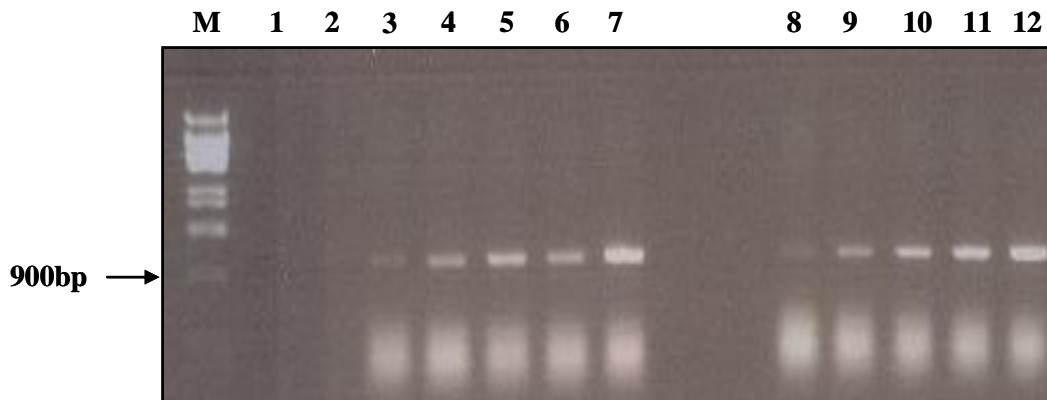
#### **בדיקת פעילות נוגדן scFv בוינקה במיקרוסקופ אלקטרוני**

מאחר ומצאנו כי בעלים של הוינקה הנגועיה בצהבון והמבטאים נוגדן רקומביננטי עם שלוש חזרות של פפטיד מגשר באמצעות הקלון ב-pCAMGVA-scFv-3s, ריכוז ה-DNA של הפיטופלסמה יורד עם הזמן לאחר ההדבקה, רצינו לבדוק באמצעות מיקרוסקופ אלקטרוני חודר את צורת החלקיקים של חיידקי הפיטופלסמה. הבדיקה בוצעה ע"י פרופ' Elliot Katigima בברזיל. תמונה מס' 12 מציגה תאי שיפה של עלי וינקה בריאה ונגוע בפיטופלסמה שצולמו במיקרוסקופ האלקטרוני. בתמונה מס' (א) 12 ניתן לראות תאי שיפה של עלי וינקה בריאה ללא צהבון אשר אינם מכילים חלקיקים דמויי פיטופלסמה. לעומת זאת בתמונה (ב) 12 נראים תאי שיפה של עלי וינקה נגועה בפיטופלסמה מוזרקים ב-GVA ללא גן זר. בתמונה ניתן לראות תאי שיפה של עלי וינקה נגועה בפיטופלסמה מוזרקים בוקטור GVA המבטא נוגדן רקומביננטי עם שלוש חזרות של פפטיד מגשר (קלון pCAMGVA-scFv-3s). לפי התמונה ניתן להבחין בשינוי בצורה של החלקיקים של חיידקי הפיטופלסמה. בנוסף, ניתן לראות גם חלקיקים שלמים של החיידק. מכאן, הסקנו כי נוגדן scFv-3s כנראה נקשר לחלקיקי הפיטופלסמה וגרם להרס שלהם.

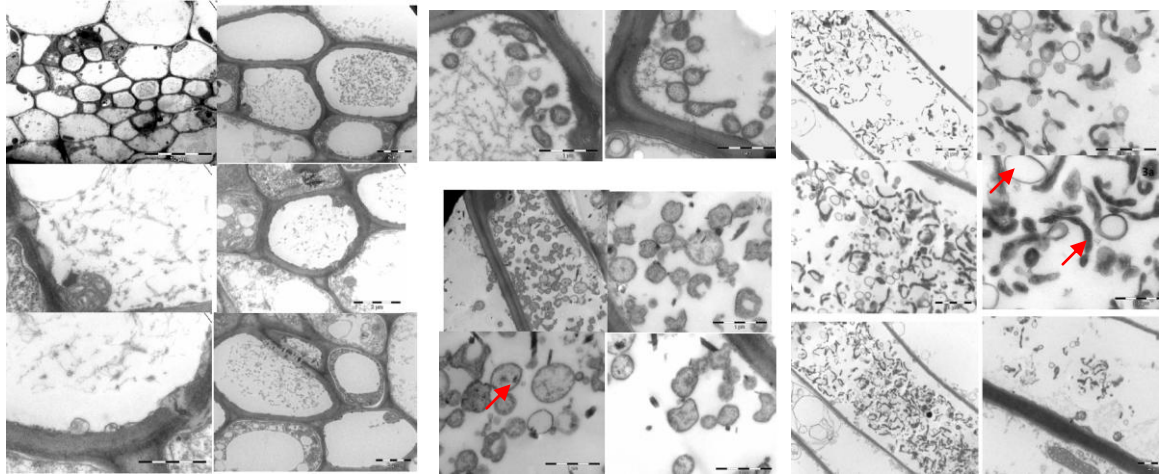




תמונה מס' 10. הפרדה באלקטרופורזה, בג'ל 1% אגרוז, של תוצר nested-PCR בגודל 900bp של פיטופלסמת AWB מצמחי וינקה נגועים בצהבון ואשר נעשה עם הפריימרים P1/P7 ו-rU3\fu5. ערוץ M מכיל סמן הגודל ל-DNA, ערוצים 1-2 מכילים תוצרי הגברה של ראקציות אשר הכילו מים סטריליים במקום DNA. ערוצים 3-7 מכילים תוצרי הגברה של ראקציות אשר הכילו מיצוי DNA המופק מעלים המוזרקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s לאחר 1, 2, 4, 8 ו-14 ימים לאחר ההזרקה, בהתאמה. ערוץ 8 מכיל תוצרי הגברה של ראקציה אשר הכילה מיצוי DNA אשר הופק מעלים לא מוזרקים.



תמונה מס' 11. הפרדה באלקטרופורזה, בג'ל 1% אגרוז, של תוצר semi quantitative nested-PCR בגודל 900bp של פיטופלסמת AWB מצמחי וינקה נגועים בצהבון ואשר נעשה עם הפריימרים P1/P7 ו-rU3\fu5. ערוץ M מכיל סמן הגודל ל-DNA, ערוצים 1-2 מכילים תוצרי הגברה של ראקציות אשר הכילו מים. ערוצים 3-7 מכילים תוצרי הגברה של ראקציות אשר הכילו DNA אשר הופק מעלים מוזרקים בקונסטרוקט pCAMGVA-AscFv-1s לאחר 14 ימים מההזרקה. ערוצים 8-12 מכילים תוצרי הגברה של ראקציות אשר הכילו DNA אשר הופק מעלים מוזרקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-1s לאחר 14 ימים מההזרקה.



א

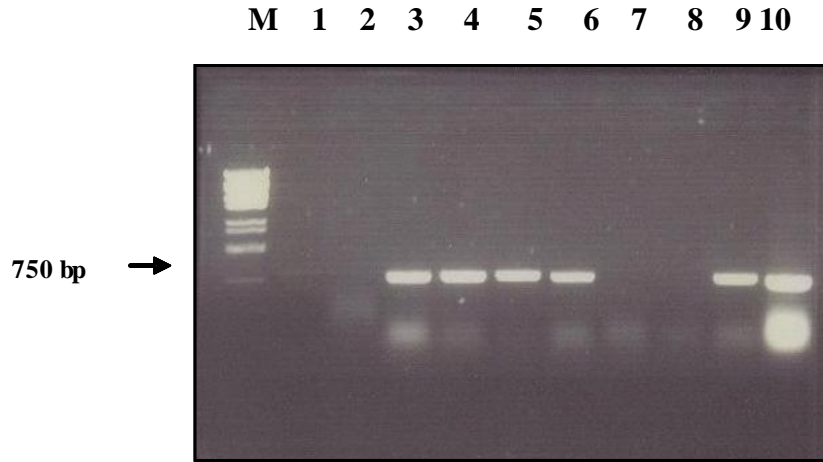
ב

ג

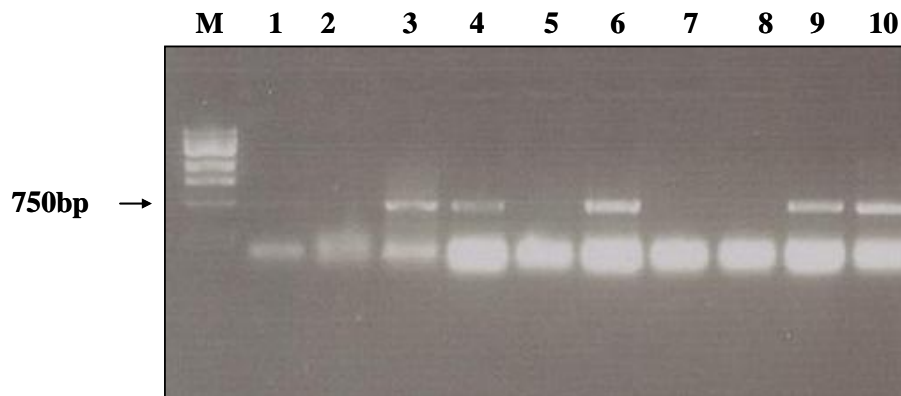
תמונה מס' 12. צילומים של מיקרוסקופ אלקטרוני לבחינת צורת חלקיקי פיטופלסמת AWB בעלי וינקה. עלים של וינקה נגועה בפיטופלסמת AWB הודבקו ע"י אגרו-אינפלטרציה עם קלון איפקטיבי pCAMGVA-scFv-3s. לאחר 10 ימים העלים המוזרקים והלא מוזרקים נבדקו במיקרוסקופ אלקטרוני לבחינת צורה של תאי הפיטופלסמה. א: צילום המראה את תאי שיפה בעלי וינקה בריאה. ב: צילום המראה תאי שיפה של וינקה נגועה בפיטופלסמת AWB לאחר הזרקה ב-GVA ללא גן זר (חץ אדום מצביע על חלקיקים האופייניים של פיטופלסמה). ג: צילום המראה תאי שיפה בעלי וינקה נגועה בפיטופלסמת AWB לאחר הזרקה בקלון pCAMGVA-scFv-3s (חצים אדומים מצביעים על חלקיקי פיטופלסמה שלמים ועל חלקיקים שצורתם לא נורמאלית).

### הדבקת שתילוני גפן בוקטור GVA המכיל גן המבטא נוגדן רקומביננטי scFv

מאחר והגפן נחשבת לפונדקאי מתאים להדבקה הן בפיטופלסמה והן בוירוס ה-GVA רצינו לבדוק את הביטוי של הנוגדן הרקומביננטי באמצעות וקטור ה-GVA בגפנים. כללית, שתיל הגפן נחשב לצמח שקשה להדביק אותו באופן מיכאני. מעבודות אשר נעשו במעבדה שלנו ע"י עובדים אחרים, נמצא כי המערכת היעילה להדבקת גפן בוירוס הרקומביננטי היא ע"י הדבקת שורשים של שתילונים של תרביות גפן בחיידקי אגרובקטריום באמצעות שיטה הנקראת Agrodrenching. לכן, על מנת לבדוק את ביטוי הנוגדן הרקומביננטי באמצעות וקטור ה-GVA השתמשנו באותה שיטה של הדבקה והדבקנו את הקונסטרוקטים pCAMGVA-scFv-1 ו-pCAMGVA-scFv-3s לשורשים של שתילונים של תרביות גפן מהזן *Vitis vinefra* cv. Prime. לאחר חודש הופק RNA כללי מעלים וגבעולים של שתילוני הגפן המודבקים. ה-RNA שימש בתור תבנית לסינתזת cDNA באמצעות פריימר GVA051 הספציפי לקצה 3' של גנום ה-GVA ולאחר מכן, בוצע RT-CR באמצעות פריימרים VH2For ו-VK2Rev. בתמונות מס' 13 ו-14 ניתן לראות את תוצרי הגברת DNA ומהם ניתן ללמוד כי חלה הגברה של תוצר בגודל כ-750 bp בדוגמאות של השתילונים המודבקים בכל אחד משני הקונטרקטים pCAMGVA-scFv-1s ו-pCAMGVA-scFv-3s.



תמונה מס' 13. הפרדה באלקטרופורזה, בג'ל 1% אגרוז, של תוצר RT-PCR בגודל 750 bp שמקורו בנוגדן רקומביננטי scFv-1s. הנוגדן בודד והוגבר באמצעות RT-PCR באמצעות התחלים VH2For/VK2Rev. ערוץ M מכיל סמן גודל ל-DNA, Bst EII /DNA. ערוץ 1 מכיל תוצרי הגברה של ראקציה אשר הכילה מיס סטריליים. ערוץ 2 מכיל תוצרי הגברה של ראקציה אשר הכילה cDNA שנעשה על RNA גפן בריאה. ערוצים 3-9 מכילים תוצרי הגברה של ראקציות אשר הכילו cDNA שנעשה על RNA של שתילוני גפן מודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-1s. ערוץ 10 מכיל תוצרי הגברה של ראקציה אשר הכילה DNA של הקונסטרוקט pET-28a-scFv-201.



תמונה מס' 14. הפרדה באלקטרופורזה, בג'ל 1% אגרוז, של תוצר RT-PCR בגודל 750 bp שמקורו בנוגדן רקומביננטי scFv-3s. הנוגדן הרקומביננטי בודד והוגבר באמצעות RT-PCR באמצעות הפרימרים VH2For ו-VK2Rev. ערוץ M מכיל סמן גודל ל-DNA, Bst EII /DNA. ערוץ 1 מכיל תוצרי הגברה של ראקציה אשר הכילה מיס סטריליים. ערוץ 2 מכיל תוצרי הגברה של ראקציה אשר הכילה cDNA שנעשה על RNA גפן בריאה. ערוצים 3-9 מכילים תוצרי הגברה של ראקציות אשר הכילו cDNA שנעשו על RNA של שתילוני גפן מודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s. ערוץ 10 מכיל תוצרי הגברה של ראקציה אשר הכילה DNA של הקונסטרוקט pET-28a-scFv-201.

### זיהוי פיטופלסמה וספירופלסמה בצמחים באמצעות שיטת FISH

בעבודה ניסינו לפתח פרוטוקול לזיהוי של פיטופלסמה וספירופלסמה ברקמות צמחיות שונות.

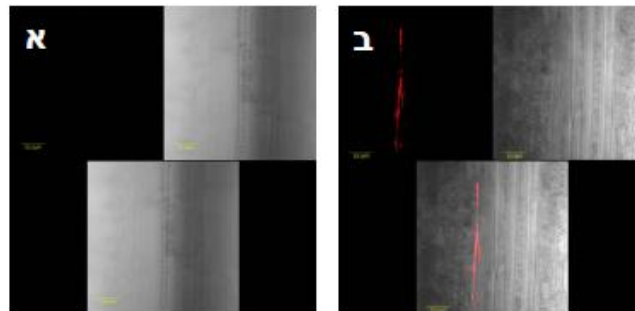
בכדי להתאים את שיטת FISH לגילוי נגיעות של פיטופלסמה וספירופלסמה בצמחים, בחרנו בצמחי וינקה וגפן עם תסמינים אופייניים למחלת הצהבון ועצי הדר עם תסמינים אופייניים למחלת העלעלת.

בניסוי נבדקו צמחי וינקה עם סימני נגיעות בפיטופלסמת AWB, תרביות גפן נגועות בפיטופלסמת Stolbur ועצי הדרים נגועים ב-Spiroplasma citri. חתכי אורך ורוחב של עורקים מעלים של צמחי וינקה, גפן והדר נגועים עברו קיבוע והיברידיזציה לגלאי פלורסצנטי מסומן Cy3 ספציפיים לפיטופלסמה וספירופלסמה. על

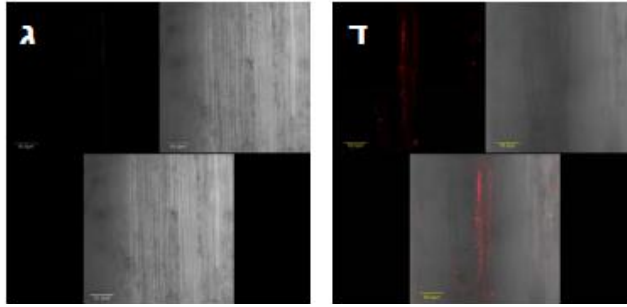
מנת לוודא כי הצמחים האלה אכן הם נגועים בפיטופלסמה (וינקה וגפן) או ספירופלסמה (הדרים) נעשו בדיקות באמצעות nested-PCR. תוצאות של בדיקות הרצף שהתקבלו הראו כי תוצרי ה-PCR הם ספציפיים לפיטופלסמה וספירופלסמה.

השימוש בגלאי פלורוסנטי מסומן ב-Cy3 ספציפי לפיטופלסמה, נמצא כי בחתכי אורך בעורקי עלים של וינקה וגפן ניתן היה להבחין בסימון פלורסצנטי ברקמה אשר מקורה בצמחים נגועים בצהבון אך לא ברקמה של צמחים בריאים (בתמונה מס' 15 ו-16 הפלורוסנציה נראית בצבע אדום). בדומה, השימוש בגלאי פלורוסנטי מסומן ב-Cy3 ספציפי לספירופלסמה (תמונה מס' 17), איפשר זיהוי פלורוסנציה בחתכי אורך של עורקים של עלי הדרים נגועים בעלעלת אך לא בערוקי עלים אשר מקורם מעצי הדר בריאים. חשוב לציין כי בחתכי אורך של עורקי עלים, הסימון הפלורסצנטי היה נראה בצינורות השיפה, ללא רקע או ספיחה לא ספציפית ברקמות העצה.

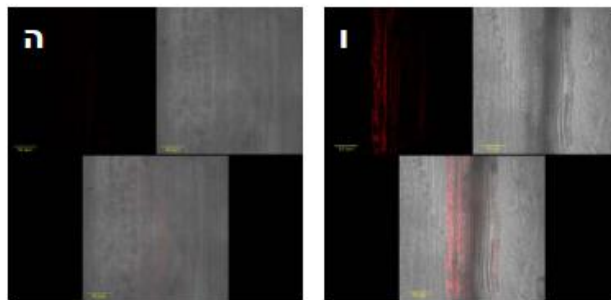
ניתן לציין כי בחתכי רוחב של עורקים של עלי וינקה, גפן והדרים בסימון פלורסצנטי, זיהוי של סימון פלורסצנטי של צינורות שיפה לא היה אפשרי עקב סימון לא ספציפי לרקמה.



תמונה מס' 15. תמונות שצולמו באמצעות מיקרוסקופ קונפוקאלי המציגות תוצאות FISH בחתכי אורך של עורקים של עלים לגילוי של פיטופלסמה בוינקה. תמונות מצד שמאל (א) מציגות מבחני FISH שנעשו לחתכי אורך של עורקי עלים שמקורם מצמחים בריאים, תמונות מצד ימין (ב) מציגות מבחני FISH שנעשו לחתכי אורך של עורקי עלים שמקורם מצמחים נגועים בפיטופלסמה. סיגנל ה-FISH מופיע בצבע אדום ברקמות השיפה בתמונות (ב). כל אחת מהתמונות מוצגת בצילום באור UV באורך גל 543nm (שמאל למעלה), באור רגיל (ימין למעלה), ובשניהם יחד (למטה).



תמונה מס' 16. תמונות שצולמו באמצעות מיקרוסקופ קונפוקאלי המציגות תוצאות FISH בחתכי אורך של עורקים של עלים לגילוי של פיטופלסמה בגפן. תמונות מצד שמאל (ג) מציגות מבחני FISH שנעשו לחתכי אורך של עורקי עלים שמקורם מצמחים בריאים, תמונות מצד ימין (ד) מציגות מבחני FISH שנעשו לחתכי אורך של עורקי עלים שמקורם מצמחים נוגעים פיטופלסמה. סיגנל ה-FISH מופיע בצבע אדום ברקמות השיפה בתמונות (ד). כל אחת מהתמונות מוצגת בצילום באור UV באורך גל 543nm (שמאל למעלה), באור רגיל (ימין למעלה), ובשניהם יחד (למטה).



תמונה מס' 17. תמונות שצולמו באמצעות מיקרוסקופ קונפוקאלי המציגות תוצאות FISH בחתכי אורך של עורקים של עלים לגילוי של ספירופלסמה בהדרים. תמונות מצד שמאל (ה) מציגות מבחני FISH שנעשו לחתכי אורך של עורקי עלים שמקורם מצמחים בריאים, תמונות מצד ימין (ו) מציגות מבחני FISH שנעשו לחתכי אורך של עורקי עלים שמקורם מצמחים נוגעים ספירופלסמה. סיגנל ה-FISH מופיע בצבע אדום ברקמות השיפה בתמונות (ו). כל אחת מהתמונות מוצגת בצילום באור UV באורך גל 543nm (שמאל למעלה), באור רגיל (ימין למעלה), ובשניהם יחד (למטה).

## דיון ומסקנות

לצורך החדרת וביטוי גנים בגפן, פותח לאחרונה במעבדתנו וקטור ויראלי המבוסס על גנום נגיף הגפן GVA השייך לקבוצת ה- *Vitivirus* ובעל גנום של RNA חד-גדילי, חיובי בגודל של כ- 7.5kb. הגנום של ה-GVA הונדס לווקטור המכיל שני עותקים של הפרומוטור המבקר יצירת חלבון התנועה, בתוספת אתרי רסטרקציה אשר משמשים לצורך החדרת הגן הזר. במסגרת עבודת המחקר הזו, נצלנו את וקטור ה-GVA לצורך ביטוי נוגדנים scFv ספציפיים לפיטופלסמה מקבוצת AY למטרת דיכוי מחלת הצהבון ברקמה צמחית. כדי לבטא נוגדן רקומביננטי scFv כנגד פיטופלסמת AY בצמחים, בנינו שלושה קונסטרוקטים (שבטים אינפקטיביים) המכילים גן המבטא נוגדן רקומביננטי: 1) scFv-1s עם חזרה אחת של ספיסר, 2) ΔscFv-1s עם חזרה אחת של ספיסר ומוטציה ב-start codon, 3) scFv-3s עם 3 חזרות של ספיסר. הכנסת פפטיד מגשר הבנוי מארבע חומצות אמינו של Gly ו-Ser (Gly<sub>4</sub>Ser) בין השרשראות הקלה והכבדה של הנוגדן הרקומביננטי נעשתה על מנת לאפשר גמישות והתארגנות מרחבית תלת-ממדית של השרשראות וקבלת תוצר חלבוני פעיל ביולוגית. ככל שהפפטיד המגשר בין השרשראות יותר גדול צפוי התארגנות מרחבית יותר קלה. על סמך זה, הוחלט על בניית שני מבנים של הנוגדן הרקומביננטי אחד עם פפטיד מגשר אחד והשני עם שלוש חזרות של הפפטיד המגשר [(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>]. בתור ביקורת שלילית לניסויים, נבנה גם

קונסטרוקט נוסף המכיל את רצף הנוגדן הרקומבננטי עם הפפטיד המגשר היחיד אך עם מוטציה בקודון התרגום הראשון המשתקת תרגום הגן לחלבון. כל אחד משלושת המבנים האלה שובט לתוך הגנום של וקטור ה-GVA הנמצא בתוך הפלסמיד הבינארי pCAMBIA2301 המשמש כאמצעי החדרה וביטוי של הוירוס בתוך הצמח.

שלושת הקונסטרוקטים הוכנסו לחיידקי אגרובקטריום ולאחר מכן הוזרקו לצמחי בנטמיאנה ע"י אגרו-אינפילטריציה, לצורך בדיקת האינפיקטיביות שלהם. הצמחים המודבקים התחילו להראות תסמינים אופייניים להדבקה ב-GVA 10-14 יום לאחר ההדבקה. על מנת לודא הדבקה ספציפית, הופקו RNA וכלל חלבונים מעלים סימפטומטיים לשם אנליזות Northern blot ו-Western blot. לפי תוצאות של ה-Northern blot והיברידיזציה עם גלאי ספציפי ל-GVA ניתן היה לראות הצטברות של RNA ויראלי גנומי בצמחים המאולחים בשלושת הקונסטרוקטים המבטאים את וקטור GVA. בצמחים בריאים, לא התגלתה תגובה עם הגלאי. בדומה, תוצאות ה-Western blot הראו ביטוי חלבון המעטפת של ה-GVA בצמחים המודבקים בכל אחד משלושת הקונסטרוקטים. לפי תוצאות אלה ניתן להסיק כי התרחשה הדבקה ספציפית של הצמחים עם הקונסטרוקטים שהוכנו.

השימוש במערכת וירוס-וקטור לביטוי גנים זרים בצמח לפעמים מלווה בתופעת של שמיטת הגן הרקומבננטי של הגן הזר מגנום הוירוס. תופעה זאת מתרחשת בשל ריקומבנציה הומולוגית או הטרולוגית המתרחשת בזמן הרפלקציה של הוירוס. לפי התוצאות שהתקבלו כאן ניתן היה להסיק כי רצף ה-scFv לא נשמט מגנום וקטור ה-GVA. לכן, בהמשך, בדקנו ביטוי של הנוגדן באנליזת Western blot ע"י השימוש בנוגדן כנגד ה-scFv אשר הוכן במסגרת עבודת המחקר הזו. לפי התוצאות שהתקבלו לא ניתן היה לקבוע באם חל ביטוי של נוגדן scFv בצמחים המודבקים בקונסטרוקטים pCAMGVA-scFv-1s ו-pCAMGVA-ΔscFv-1s עם מוטציה ב-start codon. לעומת זאת, בצמחים המודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s התקבלה תגובה עם חלבון בגודל כ-28 kDa המתאים לגודל הנוגדן הרקומבננטי scFv. הסיבה שלא התגלה ביטוי של הנוגדן בצמחים המודבקים בקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-1s אינה ברורה, אך קיימת האפשרות כי הביטוי של הנוגדן קיים אם כי בריכוזים נמוכים שלא ניתן היה לגלות אותם בבדיקה זו.

מאחר ונמצא ביטוי של נוגדן רקומבננטי scFv בצמחי בנטמיאנה באמצעות הקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s נעשה ניסוי לבדיקה יכולת הקישור של הנוגדן לפיטופלסמת AWB, ע"י dot blot. הוכנו שתי ממברנות כאשר כל אחת הכילה מצויים מצמחי וינקה נגועה בפיטופלסמה ומצויים מצמחי וינקה ללא פיטופלסמה. ממברנה אחת הוגבה עם מיצוי מצמח בנטמיאנה מודבק ב-pCAMGVA-scFv-3s המבטא נוגדן הרקומבננטי, והממברנה השנייה הוגבה עם מיצוי מצמח בנטמיאנה מודבק בוקטור GVA ללא גן זר. לפי התוצאות, לא ניתן היה להבחין כי קיים הבדל בעוצמת התגובה בין שתי הממברנות האלה, ולא בין המיצויים של הוינקה הנגועה והחופשייה מפיטופלסמה. המסקנה הייתה כי הגישה הזו, בתנאים שנעשתה בהם, לא מתאימה לבדיקת הפעילות הביולוגית של הנוגדן הרקומבננטי. בנוסף, בבדיקה זו הייתה בעיית רקע הנובעת כנראה מקשירה לא ספציפית של הנוגדנים השניוניים למיצויים הנמצאים בממברנה.

מאחר ולא הצלחנו לזהות פעילות של נוגדן רקומביננטי scFv בצמחי בנטמיאנה בשיטת dot blot, החלטנו לעבור למערכת אחרת והיא השימוש בצמח הפונדקאי לפיטופלסמה, וינקה. אך, קודם היה צורך בבדיקת היכולת של וקטור ה- GVA להדביק צמחי וינקה. למטרה זו, נעשתה אגרו-אינפילטרציה של עלים של וינקה עם קונסטרוקט המבטא GVA המייצר GFP. בבדיקה במיקרוסקופ קונפוקאלי אובחן ביטוי של GFP בציטופלסמה של תאים בעלים המוזרקים. לעומת זאת בעלים הלא מוזרקים לא נמצא ביטוי של הגן. מכאן ניתן היה להסיק כי GVA יכול להתבטא בעלה הוינקה המוזרק, אך הוא איננו מתפשט ממקום ההדבקה לרקמות הצמח באופן סיסטמי.

לאחר שמצאנו כי צמחי הוינקה ניתנים להדבקה מקומית ב-GVA, רצינו לבדוק ביטוי דומה של הנוגדן scFv באמצעות וקטור ה- GVA בעלה של וינקה. לשם כך, עלים של וינקה הוזרקו בכל אחד מהקונסטרוקטים pCAMGVA-scFv-1s, pCAMGVA-Δ1s ו-pCAMGVA-scFv-3s. שבועיים לאחר ההזרקה, הופקו חלבונים מעלים המוזרקים ונבדקו באנליזת Western blot עם נוגדן כנגד scFv. התוצאות הראו ביטוי של נוגדן רקומביננטי בעלים המוזרקים עם pCAMGVA-scFv- ו-pCAMGVA-scFv-3s אך לא בעלים המוזרקים עם pCAMGVA-Δ1s. העובדה כי הקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-1s הביא לביטוי נוגדן בעלים של וינקה אך לא בצמחי הבנטמיאנה מעידה כי הקונסטרוקט הוא תקין אך כנראה בצמחי הבנטמיאנה רמת הביטוי הייתה מזערית ולא ניתנת לגילוי בבדיקה.

לאחר שנוכחנו לדעת על ביטוי הנוגדן הרקומביננטי בעלי הוינקה המוזרקים, רצינו לבדוק את הפעילות הביולוגית של הנוגדן והיכולת שלו להשפיע על רמת חיידקי הפיטופלסמה בצמחי וינקה נגועים ב-AWB. הנחנו כי הנוגדן המתבטא בעלים מאוכלסים בפיטופלסמה יגיב על רמת החיידקים בעלה המוזרק. לצורך זה, עלים של צמחי וינקה נגועים בפיטופלסמה הוזרקו בקונסטרוקט עם pCAMGVA-scFv-3s. ה-DNA הופק מעלים המוזרקים בפרקי זמן שונים ונבדק לזיהוי פיטופלסמה ע"י nested-PCR. התוצאות שהתקבלו הראו כי הייתה ירידה משמעותית ברמת תוצרי ההגברה עם הזמן. חשוב לציין כי בחלק מהניסויים שנעשו, 14 יום לאחר ההזרקה תוצר ה-PCR היה חלש באופן משמעותי בהשוואה לביקורות. מהתוצאות שהיו מתקבלות ניתן היה להציע כי הנוגדן הרקומביננטי המבוטא באמצעות הקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s, המבטא נוגדן עם שלוש חזרות של פפטיד מגשר, מאופיין בפעילות ביולוגית המשפיעה על חיידקי הפיטופלסמה ברקמה הצמחית. מצד שני, ולהבדיל מהעלים המוזרקים עם pCAMGVA-scFv-1s ו-pCAMGVA-ΔscFv-1s, העלים המוזרקים בקונסטרוקטים pCAMGVA-scFv-3s לא התגלה הבדל ברמת ה-DNA של הפיטופלסמה שבועיים לאחר ההזרקה. בהסתמך על תוצאות אלה ניתן היה להסיק כי הנוגדן הכולל שלוש חזרות של הפפטיד המגשר המחבר בין השרשראות הכבדה והקלה היה בעל יכולת קשירה ספציפית לפיטופלסמת AWB. לעומת זאת, לנוגדן הכולל רק חזרה אחת של הפפטיד המגשר לא הייתה יכולת קשירה לפיטופלסמה. הסבר אפשרי לתוצאה זו, הוא שהפפטיד המגשר הארוך מאפשר התארגנות מרחבית תלת-ממדית יעילה ומתאימה של השרשראות הכבדה והקלה ומאפשר קבלת נוגדן פעיל ביולוגית. מאידך, הפפטיד המגשר הקצר כנראה ואיננו מאפשר קבלת נוגדן פעיל.

ההסבר לירידה בריכוז ה-DNA של חיידקי הפיטופלסמה בעלים המבטאים את הנוגדן הרקומבננטי באמצעות הקונסטרוקט pCAMGVA-scFv-3s אינו ידוע. אחת ההסברים שאפשר לתת לתופעה היא שקישור הנוגדן לתאי החיידק עשויה להביא לתופעת כלשהי אשר גורמת להרס התאים של החיידק ובהמשך לפירוק ה-DNA שלו כמו תופעת האפופטוסיס Apoptosis. על מנת לאמת תופעה זו, בוצעו בדיקות במיקרוסקופ אלקטרוני ונבחנו צורות תאים של החיידק ברקמה המבטאת את הנוגדן. לפי התוצאות שהתקבלו, ראינו שינוי בצורה של מרבית, אך לא בכול, חלקיקי הפיטופלסמה. מרבית החיידקים נראו בצורה לא נורמאלית וכנראה עברו ליזיס.

לפי תוצאות אלה ניתן היה להסיק, כי נוגדן עם שלוש חזרות של פפטיד מגשר הוא בעל פעילות ביולוגית המשפיעה על הפיטופלסמה. ההסבר האפשרי, הוא כנראה שהנוגדן נקשר לחיידק וגורם להרס שלו, אם כי לא כל חלקיקי הפיטופלסמה נקשרו כנראה לנוגדן. בהמשך המחקר, מומלץ לבצע בדיקות נוספות של צורת תאי פיטופלסמה בעלים המבטאים נוגדן רקומבננטי פעיל.

מכיוון שהגפן נחשבת לפונדקאי טבעי הן לפיטופלסמה והן ל-GVA נקבעה מטרה המשכית לעבודת מחקר זו והיא לבטא את הנוגדן הרקומבננטי בצמחי גפן כגישה להתמודד עם חיידקי הפיטופלסמה הגורמים למחלה קשה בגידול חקלאי חשוב זה. בשלב ראשון לקראת מטרה זו נעשו במסגרת עבודת המחקר הזו הדבקות של שתילוני גפן בתרבית עם הקונסטרוקטים pCAMGVA-scFv-1s ו-pCAMGVA-scFv-3s דרך השורשים, בשיטת ה-Agrodrenching. לאחר חודש ימים מההדבקה, נעשו בדיקות לאימות ההדבקה ע"י RT-PCR. התוצאות הראו כי התקבל תוצר הגברה בגודל המתאים לגן scFv בשתילונים המודבקים בכל אחד משני הקונסטרוקטים ב-4 עד 5 שתילונים מתוך 9 שהודבקו. תוצאה זו תואמת את אחוז ההדבקה של שתילוני גפן עם מגוון קונסטרוקטים של GVA המתקבלת באופן רוטיני במעבדה שלנו בשיטה זו (Muruganantham et al., 2009).

אציין כי המחקר הנוכחי נמשך במעבדה ע"י עובדים ובימים בהם התבצעה כתיבת העבודה הזו נבחרו שתילוני הגפן החיוביים לפי בדיקות ה-PCR והועברו לעציצים עם אדמה לצורך הקשחה. הצמחים הבוגרים נבדקו באמצעות RT-PCR לנוכחות ה-GVA וליציבות הרצף של הנוגדן הרקומבננטי בגנום הווירוס. כל הצמחים הבוגרים היו חיוביים לבדיקות ה-GVA, אך 30% מהם הכילו את הנוגדן הרקומבננטי. בשאר הצמחים, כנראה שהווירוס "סילק" מתוכו את הרצף של הנוגדן הרקומבננטי. הניסויים של בדיקת העמידות של הצמחים החיוביים בפני הדבקות בחיידקי הפיטופלסמה טרם החלו.

### **זיהוי פיטופלסמה וספירופלסמה בצמחים באמצעות שיטת FISH**

במסגרת המחקר הנוכחי נבחנה שיטה לזיהוי פיטופלסמה וספירופלסמה ברקמות צמחיות בעזרת סמן פלורסצנטי. סונתזו פריימרים עם רצפים משלימים למקטעי גנים של החיידקים פיטופלסמה וספירופלסמה מסומנים בסמן פלורוסנטי Cy3. לאחר הליך של היברידיזציה בין הגלאים המסומנים והגנום של הפתוגנים ברקמה צמחית מקובעת, נעשו הסתכלויות באמצעות מיקרוסקופ קונפוקאלי באורך גל 543nm לצורך זיהוי מיקום ורמת הפלורסצנציה.

התוצאות של גלוי פיטופלסמה וספירופלסמה באמצעות FISH תאמו את התוצאות שהתקבלו בבדיקות ה-PCR. אף על פי זאת, חשוב לציין כי שיטת ה-FISH איננה גישה חלופית ל-PCR למטרת



דיאגנוסטיקה של חיידקים אלה. שיטות ה-PCR ו-nested-PCR הן שיטות רגישות לגילוי ריכוזים נמוכים של הפתוגן, אם כי הן יכולות להיות מסובכות ומתסכלות בשל זיהומים במערכת. בנוסף שיטות אלה אינן מתאימות לקביעת המיקום או הפיזור של החיידקים ברקמות צמח שונות. לעומת זאת, לשיטת ה-FISH, המבוססת על אנליזה היסטולוגית וציטולוגית, קיים יתרון לקביעת מיקום ופיזור החיידקים ברקמות הצמח לאחר קיבוע. יתרון נוסף של ה-FISH לעומת הגישות המולקולאריות המבוססות על PCR, הוא שהשיטה הזו אינה דורשת הפקות של DNA של הפתוגן או הצמחים. מאידך, על מנת שהשיטה תהיה רגישה ואמינה יש צורך בכיול פרמטרים שונים, כמו טמפרטורה, שטיפות וריכוז מלחים. בנוסף, מצאנו כי ע"י השימוש בחתכי אורך של עורקים של עלים ניתן היה לקבל תוצאות יותר ספציפיות לגילוי פיטופלסמה וספירופלסמה בגפנים והדרים, בהתאמה, בהשוואה לחתכי אורך או חתכי רוחב של אותן הרקמות. השימוש בחתכי רוחב במיוחד, הן של גבעולים והן של עורקים של עלים, היה מלווה לרוב בקבלת ספיחה לא ספציפית של הפריימר הפלורסצנטי לרקמות העצה, בנוסף לספיחה הספציפית לחיידקים ברקמות השיפה.

שיטת ה-FISH לגילוי חיידקים של פיטופלסמה וספירופלסמה מבוססת על השימוש במקטעי רצף קצרים (פריימרים) ספציפיים לפתוגנים אלה. במאגרי גנים ניתן למצוא היום רצפים של מקטעי גנום רבים לחיידקים אלה אשר יכולים לשמש אותנו לסינתזת פריימרים שונים עם סימון פלורסצנטי אשר ישמשו לכיול המערכת. בין הרצפים הקיימים במאגרי הגנים ניתן למצוא גם רצפים ספציפיים לקבוצות או לתת-קבוצות של הפתוגנים האלה, כגון רצפים ספציפיים לקבוצות ה-*Stolbur*, ואחרים לקבוצות ה-AY. על ידי השימוש בפריימרים שונים מסומנים במולקולות פלורסצנטיות שונות וספציפיים לקבוצות או לתת-קבוצות פיטופלסמה שונות, ניתן באמצעות FISH לאבחן הדבקה משולבת של פיטופלסמה באותן הרקמות של הצמח. חשוב לציין כי הדבקה משולבת של פיטופלסמה בצמחים היא תופעה נפוצה במיוחד בגפנים. בארץ, גפנים נגועות במחלת הצהבון הקשה, יכולות להיות נגועות בו זמנית בלפחות שלוש קבוצות של פיטופלסמה: *Stolbur*, AY ו-Western-X. חקר התפוצה והפיזור של פיטופלסמות אלה בגפנים נגועות באמצעות FISH עשוי לתרום בהבנת מחלת הצהבון באחד הגידולים החשובים בארץ ובעולם.

## סיכום עם שאלות מנחות

<p style="text-align: center;"><b>מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</b></p>
<p>לכטא scFv סגולי לפיטופלסמה בחיידקים ובצמחים ע"י ווקטור ויראלי</p>
<p style="text-align: center;"><b>עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.</b></p>
<p>שובט הגן של ה-scFv לתוך גנום וירוס ה-GVA.          שובט גן פגום של ה-scFv לתוך גנום וירוס ה-GVA במטרה לשמש כביקורת שלילית לניסויים.          הודבקו צמחי בנטמינה, גפנים, וצמחי וינקה בוירוס רקומביננטי ע"י אגרואינפקציה.          נעשו אנליזות Northern ו-Western לבחינת ביטוי ה-scFv בצמחים.          נעשו אנליזות של semi-quantitative PCR לבחינת ריכוז חיידקי הפיטופלסמה בצמחי וינקה נגועים.          פיתוח גישה לגילוי חיידקי פיטופלסמה וספירופלסמה בחלקים שונים של צמחי וינקה, גפן והדרים שונים ע"י השימוש בגלאי DNA פלורוסנטי מסומן ב-Cy3.</p>
<p style="text-align: center;"><b>המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.</b></p>
<p>התגלה ביטוי של הנוגדן בצמחי הוינקה אך לא בצמחי הבנטמינה ע"י השימוש במערכת וירוס-ווקטור של GVA למרות שהתוצאות מראות כי הוורוס עובר רפלקציה בצמח הוינקה אך אינו מתפשט באופן סיסטמי. בעלים של צמח הוינקה המבטאים את הנוגדן הרקומביננטי השלם התגלה כי ריכוז ה-DNA של חיידקי הפיטופלסמה היה פחות מאשר בעלים המבטאים את הגן הרקומביננטי הפגום.          בהסתכלויות במיקרוסקופ אלקטרוני התגלו חלקיקים פגומים של חיידקי פיטופלסמה בצמחים המבטאים את הנוגדן אך לא בצמחים ללא נוגדן.          הודבקו גפנים בוירוס המבטא נוגדן. ביטוי הנוגדן אומת במבחני PCR. בדיקת הפעילות הביולוגית של הנוגדן בגפנים החלה ותהליך זה ימשך במעבדה מעבר לתקופת המחקר.          פותחה שיטה לגילוי חיידקי פיטופלסמה וספירופלסמה בחלקי צמח שונים ע"י השימוש בגלאי DNA פלורוסנטי.</p>
<p style="text-align: center;"><b>הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר.</b></p>
<p>המשך המחקר יעסוק בבחינת הפעילות הביולוגית של הנוגדנים בגפנים המודבקים והמבטאים את הנוגדן הרקומביננטי.</p>
<p style="text-align: center;"><b>האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.</b></p>

	לא
<b>פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)</b>	
	רק בספריות <input type="checkbox"/>
	ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) (X) <input checked="" type="checkbox"/>
	חסוי – לא לפרסם <input type="checkbox"/>

