مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

بیان موقت ژن pgip2 و ژن کایمریک sppgip2-aaa-pgip1 در Nicotiana benthamiana

رضا محمدزاده*[1]، محمدرضا زمانی[2]، مصطفی مطلبی[3]

[1]استادیار گروه سلولی ومولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، تبریز، ایران
[2]استاد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
[3]ا ستاد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۲/۲٦، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲٦

چکیده

ایجاد مقاومت در برابر بیماری ها با استفاده از ژن های مقاوم به عامل بیماریزا در گیاهان یکی از راهکارهای بهبود محصولات زراعی در کشاورزی می باشد. پلی گالاکتوروناز ها با اشکال ایزو آنزیمی مختلف جزءاولین آنزیم هایی هستند که قارچ های فیتوپاتوژنیک جهت کلونیزاسیون در دیواره سلول گیاهی ترشح می کنند. برخی گیاهان نیز دارای پروتئین های PGIP (Polygalacturonase Inhibitor Proteins) متنوعی هستند که عملکرد مهارکنندگی اختصاصی علیه آنزیم های پلی گالاکتوروناز قارچی دارند. در این تحقیق سازه کایمریک حاوی ژنهای pgip1 و pgip2 و سازه حاوی ژن pgip2 جهت بیان موقت و بررسی فعالیت مهارکنندگی پروتئین کایمر در مقایسه با PGIP2 به برگ های گیاه توتون ترانسفورم گردید. حضور و بیان ژن بترتیب با استفاده از روش PCR و وسترن بلات تائید شد و در سنجش فعالیت آنزیمی به روش Caplet Assay پروتئین کایمری نسبت به پروتئین PGIP2 منفرد افزایش فعالیت نشان داد. در نتیجه پروتئین کایمریک طراحی شده از نظر بیولوژیکی فعال بوده و نسبت به PVPGIP2 منفرد قدرت مهارکنندگی بالاتری را نشان می دهد. پیش بینی می گردد با انتقال پروتئین کایمر به گیاهان زراعی گیاهان تراریخت مقاوم‌تری بدست آید.

واژه های کلیدی: ***پروتئین های مهار کننده پلی گالاکتوروناز، سازه کایمریک، آنزیم پلی گالاکتوروناز.***

* نویسنده مسئول: رضا محمد زاده تلفن: ۰۹۳۸۱۹۸۳۳٦٤ Email: rmohamadzadeh@maragheh.ac.ir

مقدمه

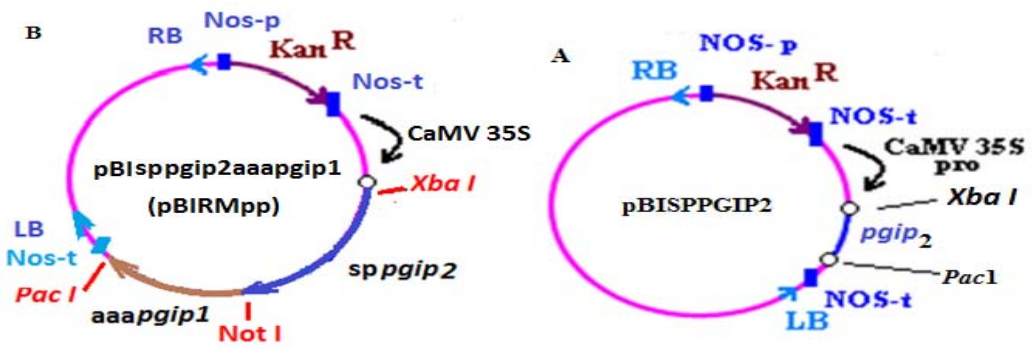
امروزه کنترل بیماری های گیاهی یکی از اهداف مهم اقتصاد جهانی است. انواع متفاوتی از پاتوژن های گیاهی از جمله ویروئیدها، ویروس-ها، فیتوپلاسماها، ریکتسیاها، پروتوزوئرها، قارچ-ها و نماتدها شناسایی شده اند. (Narusaka *et al*., 2009; Bebber *et al*., 2013; Oerke, 2006). از دهه ۱۹۸۰ بخش عمده‌ای از تحقیقات روی شناسایی و کلونینگ ژن‌های مختلفی که در مقاومت به بیماری نقش دارند متمرکز شد. (Narusaka *et al*., 2013a; Fradin *et al*., 2011; Jones *et al*., 2014). دیواره سلولی که ضامن استحکام و شکل سلول گیاهی است. آپوپلاست به عنوان سد فیزیکوشیمیایی در مقابل تهاجم قارچ‌ها می‌باشد، هرچند که این مانع در برابر قارچ ها همیشه موفق نیست (De Lorenzo, 1994; Ten Have, 2000). قارچ‌ها به منظور کلونیزاسیون موفق در بافت میزبان انواعی از آنزیم‌های هضم کننده دیواره سلولی (CWDE) را ترشح می‌کنند. این آنزیم‌های دپلیمریزه کننده پکتینی که با سست نمودن دیواره سلولی، دیگر پلیمرها را در معرض تخریب قرار می‌دهند، اغلب واجد خانواده ژنی هستند (Annis and Goodwin, 1997). ژن های pelA و pelD در قارچ Nectria hematococca (Rogers *et al*., 2000)، ژن Bcpme1 کد کننده پکتین متیل استراز در قارچ Bothrytis cinerea (Cimerman *et al*., 2003)، ژن pecA کد کننده endoPG در قارچ Aspergillus flavus و بیش از شش ژن برای endoPG در قارچ‌های Bothrytis cinerea، Alternaria citri و غیره شناسایی شده‌اند (D'Ovidio *et al*., 2004a). در بین پکتینازها، آنزیم‌های پلی گالاکتورونازی، بخصوص فرم اندوی آنها، نقش مهمی در تخریب دیواره سلول گیاهی دارند (Zamani, 2004; ten have, 1998; Motallebi, 2003). نقش PG به عنوان فاکتور اصلی در آسیب رسانی به میزبان های گیاهی در بسیاری از قارچ های بیماریزا از جمله قارچ Botrytis cinerea، Aspergillus flavus (ten Have *et al*., 1998)، Ralstonia solanacearum، Fusarium oxysporum (Zamani *et al*., 2000, 2004) و Ascochyta rabiei (Motallebi *et al*., 2003) گزارش شده است. این قارچ‌های فیتوپاتوژنیک برای کلونیزاسیون موفق خودشان و همچنین رهاسازی متابولیت هایی که تحریک کننده سنتز بیان EndoPolygalacturonases (PGs) می‌باشند، endoPG را در فاز اولیه آلودگی ترشح می‌کنند (ten Have *et al*., 2001). endoPGها سبب قطعه قطعه و محلول نمودن هوموگالاکتورونان-های دیواره سلول و تولید قطعات الیگوگالاکتورونیدی می شوند (Federici *et al*., 2001). بنابراین، با عملکرد endoPG ضمن اینکه منبع کربنی لازم برای قارچ فراهم می‌شود، نفوذ و کلونیزاسیون پاتوژن قارچی نیز تسهیل می گردد (Shanmugam, 2004). در آپوپلاست بسیاری از گیاهان دو لپه ای و در گیاهان تک لپه ای غنی از پکتین نظیر پیاز، آرابیدوپسیس و گل اطلسی،

پروتئین های مهار کننده اندو پلی گالاکتوروناز (PGIP) که از مهمترین گروه‌های مهار کننده پکتینازی هستند، شناسایی شده اند که قادرند از طریق ممانعت فعالیت PG کلونیزاسیون قارچی را محدود کنند (De Lorenzo *et al*., 2003; Ferrari, 2003). پروتئین های مهار کننده اندو پلی گالاکتوروناز (PGIP) مولکول‌های گلیکوپروتئینی می‌باشند که به ماتریکس خارج سلولی سلول گیاهی با پیوندهای یونی متصل شده‌اند (Johnston *et al*., 1994; Gotesson *et al*., 2002). PGها توسط قارچ های فیتوپاتوژنیک با اشکال ایزو آنزیمی مختلف تولید می‌شوند. (De Lorenzo *et al*., 1997; D'Ovidio *et al*., 2004a). در مقابل گیاهان نیز دارای PGIPهای مختلفی هستند که علیه بسیاری از PGهای تولید شده توسط قارچ‌ها، توانایی تشخیص اختصاصی دارند. گزارش های متعددی نشان می‌دهد که این مهار کننده پکتینازی تمایل شدیدی به ترکیبات endoPG قارچی در مقایسه با endoPGهای باکتریای و یا درونزا دارند (Johnston *et al*., 1994; Cervone *et al*., 1990). PGIP در گیاهان علاوه بر تنوع دارای توانایی تشخیص و مهار اختصاصی می‌باشند حتی PGIP های استخراج شده از یک بافت نیز قدرت ممانعتی متفاوتی از خود نشان می‌دهند. (Shanmugam *et al*., 2004) PGIP هایی که از لحاظ خواص بیو شیمیایی نیز بسیار نزدیک به هم می‌باشند دارای فنوتیپ مهاری متفاوتی هستند، مثلا PGIP1 و PGIP2 (2.1) دو نوع PGIP لوبیا (واریته Pinto) با ۹۷ درصد همولوژی ساختار آمینواسیدی، اگرچه از نظر خواص بیو شیمیایی بسیار نزدیک به هم هستند ولی فعالیت مهاری متفاوتی دارند (De Lorenzo *et al*., 1997). در این مطالعه سازه کایمری حاوی دو ژن pgip2 و pgip1 و سازه منفرد حاوی ژن pgip2 بترتیب جهت بیان پروتئین‌های کایمر SPPGIP2-AAA-PGIP1 و PGIP2 به برگ‌های گیاه توتون جهت بیان موقت با استفاده از روش Agroinfiltration ترانسفورم گردید. پس از استخراج پروتئین از برگ‌های تراریخته فعالیت مهارکنندگی مورد بررسی قرار گرفت. هدف در این تحقیق طراحی سازه بیانی پروتئین کایمر SPPGIP2-AAA-PGIP1 جهت بیان این پروتئین در سیستم گیاه بوده که توان مهارکنندگی آن بیشتر از پروتئین PGIP منفرد باشد تا جهت تولید گیاهان زراعی تراریخته مقاوم به پاتوژن های قارچی از این سازه استفاده گردد.

مواد و روش ها

باکتریها و ناقل های مورد استفاده

سازه pBISPPGIP2 حاوی ژن pgip2 و سازه کایمریک pBISPPGIP2-AAA-PGIP1 به دست آمده از اتصال ژنهای pgip1 و pgip2 رقم ناز لوبیا بوسیله لینکر ۳ اسید آمینه‌ای آلانین جهت بیان موقت در گیاه توتون مورد استفاده قرار گرفتند (Mohamadzadeh *et al*., 2011) (شکل ۱).



شکل ۱- شماتیک سازه pBISPPGIP2 (A) و pBIRMpp (B) (Mohamadzadeh *et al.*, 2013).

Figure 1- Schematic of pBISPPGIP2 (A) and pBIRMpp (B) constricts.

سازهای نوترکیب با استفاده از روش Agroinfiltration بوسیله باکتری اگروباکتریوم سویه pGV3101 به برگ توتون ترانسفورم گردیدند.

روش Agroinfiltration

سازهای نوترکیب pBISPPGIP2 و pBISPPGIP2-AAA-PGIP1 از طریق الکتروپوریشن به سویه pGV3101 اگروباکتریوم انتقال یافتند و حضور سازه با استفاده از تکنیک PCR با آنزیم Pfu پلیمراز با استفاده از پرایمر های اختصاصی (جدول ۱-۱) تکثیر و مورد تائید قرار گرفت (شکل ۲). در ۵۰ ماکرولیتر از محیط کشت اگروباکتریوم نوترکیب انکوبه گردید و بصورت شبانه در ۲۸ درجه سلسیوس کشت شدند. سپس محیط سانترفیوژ شده و رسوب سلولی در محلول حاوی pH 5.7، ۱۰ میلی مولار MES، ۱۰ میلی مولار MgCl2 و ۱۵۰ ماکرو مولار استوسیرینگون با OD_{600}=1.0 حل گردید. گیاه توتون در شرایط آزمایشگاهی کشت شده و برگ های تازه و جوان بدست آمده از گیاه توتون با استفاده از اسکالپل خراش داده شده در سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد و سپس در محیط خلاء Infiltration انجام گردید. پس از ۳ یا ٤ روز از این برگها پروتئین استخراج گردید (Schob *et al.*, 1997; 1997 Kapila *et al.*,).

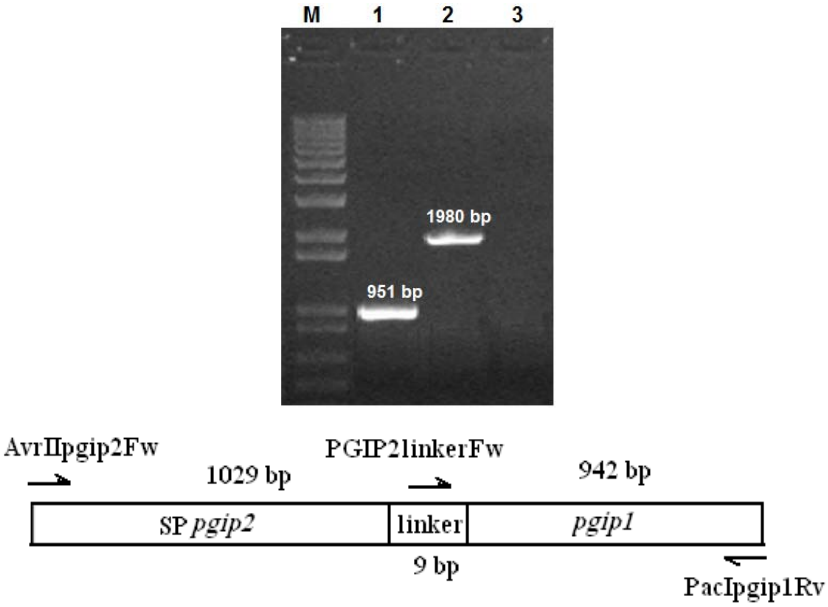
استخراج پروتئین و تلخیص پروتئین

پروتئین از برگ های تراریخت و شاهد طبق روش Powell *et al.* (2000) با اندکی تغییراستخراج گردید. میزان غلظت پروتئین بر اساس BSA با استفاده از روش Bradford تعیین گردید (Bradford, 1976).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر و تایید سازه ها.

Table 1– Primers using for amplify and construct conforming.

Primes name نام پرایمر ها	Primer sequence توالی پرایمر ها
AvrIIpgip2Fw	5"ATGACTCAATTCAATATCCCAGTAACCATGTCTTCAA GCT3
NotIpgip2Rv	5'-GCTCGGCCGCAGTGCAGGCAGGA-3'
NotIpgip1Fw	5'CACTATGCGG CCGCAGAGCT ATGCAACCCA CAAG3'
PacIpgip1Rv	5'CACTTGTTAATTAATTAAGTGCAGGAAGGAAGAGGA G3'



شکل ۲- تائید سازه pBIRMpp با استفاده از الگوی PCR. 1- محصول PCR با سازه pBIRMpp با استفاده از آغازگرهای PGIP2linkerFw و pacIpgip1Rv. 2- محصول PCR با سازه pBIRMpp با استفاده از آغازگرهای AvrIIpgip2Fw و PacIpgip2Rv. 3- محصول PCR با ناقل pBI121MOD. M- مارکر 1k.

Figure 2- Confirming construct using PCR reaction pattern. Line 3 and 1. PCR reaction product by pBI121MOD vector and pBIRMpp construct as a template by PGIP2linkerFw / pacIpgip1Rv primers. Line 2. PCR reaction product by AvrIIpgip2Fw and PacIpgip2Rv primers. M. marker 1kb.

جهت تخلیص در مرحله اول با استفاده از دستگاه تغلیظ کننده (دارای فیلتر با Cut off پروتئین های کمتر از ۱۵ کیلو دالتون از پروتئین کل گیاهی جدا شدند (با توجه به اینکه وزن مولکولی PGIP2 ۳۱ کیلو دالتون و وزن مولکولی پروتئین کایمر ٦٥ کیلو دالتون می باشد) و باقی مانده پروتئین کل توسط سولفات آمونیوم رسوب داده شد. پروتئین های بدست آمده پس از دیالیز به ستون sp-sepharose column negative (فارماسیا) اضافه گردید، پروتئین های جذب سطحی شده با یک گرادیانت خطی کلرید سدیم ۰,۵-۰ مولار با سدیم استات ۲۰ میلی مولار شستشو شدند در نتیجه پروتئین های غیر اختصاصی در این مرحله از ستون شسته شده و پروتئین مورد نظر به ستون چسبیده برای جدا کردن پروتئین مورد نظر از استات سدیم ۲۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۱ مولار و pH=4.8 استفاده شد. در ادامه از گرا دیانت pH= 8.0-10.5 با استفاده از ایزوالکتروفوکوسینک در یک سیستم Rotofor TEF (Bio-Rad) استفاده گردید. خروجی در حجم های ۱ میلی لیتری توسط دستگاه جمع آوری کننده، جمع آوری شد. و در فالکون ۲۵ میلی لیتری VIVASPIN6 (vs0611) دارای فیلتر با Cut off ۵ کیلو دالتون به مدت ۳۰ دقیقه دور ۷۵۰۰ سانتریفوژ گردید. بعد از سانتریفوژ محلول زیری را دور ریخته محلول بالای فیلتر با سر سمپلر مخصوص نوک سوزنی که حاوی پروتئین های بالای ۵ کیلو دالتونی هستند برداشته شد. برای تغلیظ محلو ل رویی بدست آمده به یک فالکون VIVASPIN4 انتقال یافتند و سانتریفوژ با دور ۷۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. محلول رویی باقی مانده از این مرحله ۰/٦ میلی مولار بود به این محلول ۱ میلی لیتر استات سدیم ۲۰ میلی مولار pH=4.6 اضافه گردید و در دور 75000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و نهایتا ۲۵۰ ماکرولیتر از محلول بعد از سانتریفوژ بالای فیلتر باقی ماند که حاوی پروتئین مورد نظر بود. در نهایت بوسیله دستگاه تغلیظ کننده غلیظ شدند و با استفاده از PAGE-SDS آنالیز گردید (Benedetti *et al.*, 2011). برای تعیین غلظت نهایی از رقت های مختلف پروتئین تخلیص با استفاده از BSA بعنوان کنترل جهت تعیین غلظت پروتئین در ژل آکریل آمید استفاده شد.

SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ

جهت بررسی پروتئین از تکنیک SDS-PAGE استفاده گردید. برای انجام وسترن بلاتینگ ژل پلی آکریل آمید در اندازه مناسب بریده و برای چند دقیقه در بافر انتقال قرار گرفت. کاغذ PVDF به همان اندازه ژل بریده شد و به ترتیب برای ۱۵ ثانیه در متانل ۱۰۰٪، ۵ دقیقه در آب مقطر و ۱۵ دقیقه در بافر انتقال غوطه ور شد. چهار تکه کاغذ واتمن هم اندازه ژل بریده شد و در بافر انتقال مرطوب گردید. سپس ساندویچ حاوی کاغذ واتمن، کاغذ PVDF، ژل پلی آکریل آمید و کاغذ واتمن تشکیل شد. و در حالی که ژل بطرف قطب منفی بود بداخل تانک وسترن منتقل گردید. انتقال به مدت یک شب در

ولتاژ ۲۰ ولت انجام شد. جهت اطمینان از انتقال باندهای پروتئین ژل با کوماسی بلو رنگ آمیزی گردید. غشاء جهت بلوک شدن برای یک ساعت در دمای آزمایشگاه روی شیکر در بافر T-TBS حاوی ۵ در صد شیر بدون چربی قرار گرفت (Benedetti *et al*., 2011). سرم ایمن به نسبت ۲۰۰:۱ در بافر T-TBS رقیق و بمدت ۲-۱ ساعت با غشاء روی شیکر انکوبه شد. سه مرتبه شستشوی غشاء هر بار ۱۰ دقیقه در بافر T-TBS انجام شد. آنتی سرم خرگوش کونژوگه شده به horseradish peroxidise (HRP) به نسبت ۱۰۰۰:۱ در بافر T-TBS رقیق و یک ساعت روی شیکر با غشاء مجاور شد. غشاء سه مرتبه و هر بار ۱۰ دقیقه در بافر T-TBS شستشو داده شد. آشکارسازی توسط محلول کروموژن/سوبسترا (DAB/H2O2) انجام گردید (Benedetti *et al*., 2011).

روش سنجش فعالیت مهارکنندگی

فعالیت مهار کنندگی پروتئین کل گیاهی (total protein) بر فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز (PG) قارچ fusarium phyllophilum با استفاده از Agarose Diffusion Plate Assay انجام شد (Taylor and Secor, 1988). بدین منظور مخلوط آنزیم و پروتئین کل گیاهی به چاهک های پلیت های آگاروز ۸ در صد شامل ۱۰۰ میلی مولار سدیم استات با pH= 4.6 و ۵ در صد سیتروز پکتین (Sigma p3850) اضافه گردید. پلیت ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شدند. با تیمار کردن پلیت به مدت ۵ دقیقه در اسید کلریدریک ٦ نرمال هاله های ایجاد شده به دلیل فعالیت آنزیم ظاهر می گردند. فعالیت مهارکنندگی بصورت نسبت قطر ناحیه هاله شفاف محاسبه می گردد (Benedetti *et al*., 2011).

نتایج و بحث

بیماری‌های قارچی از مهم‌ترین بیماری-های گیاهی هستند که علاوه بر وارد کردن خسارات زیاد به محصولات کشاورزی مانع کشت آنها در بسیاری از شرایط آب و هوائی می شود. از مهمترین ژن های دفاعی در مقابل حملات پاتوژن های قارچی از دسته ژنهای مهاری آنزیم های پکتینازی به نام پروتئین مهار کننده آنزیم پلی گالاکتوروناز(PGIP) می باشند (De Lorenzo *et al*., 2001). بنابراین انتقال ژن-های مقاومت در برابر بیماری ها از جمله انتقال ژن‌های pgip به گیاهان از طریق روش های بیوتکنولوژی راه موثری برای کنترل بیماری ها بوده و از اهمیت اقتصادی بالایی برخوردار می-باشد (De Lorenzo *et al*., Martin *et al*., 2003; 2003). از جمله بیان PGIP در گلابی، تنباکو، آرابیدوپسیس، برنج، گوجه فرنگی، سیب زمینی و انگور ترانس ژنیک، گسترش بیماری توسط تعدادی از قارچ های مختلف را کاهش می‌دهد (Ferrari *et al*., 2012; Janni *et al*., 2008; Oelofse *et al*., 2006). طبق گزارشات حتی PGIPهایی که از لحاظ خواص بیوشیمیایی نیز

بسیار نزدیک به هم می باشند دارای فنوتیپ مهاری متفاوتی هستند، مثلا PGIP1 و PGIP2(2.1) لوبیا (واریته Pinto) با ۹۷ درصد همولوژی ساختار آمینواسیدی دارای فعالیت مهاری متفاوتی دارند. به‌طوری‌که PGIP2.1 قادر به مهار فعالیت PG قارچ های Aspergillus niger و Fusarium moniliforme بود ولی، PGIP1 فقط فعالیت PG قارچ A. niger را مهار می کند (D'Ovidio *et al*., 2004). این موضوع، اهمیت انتخاب PGIPهای مناسب را برای مقابله بهتر با آلودگی قارچی را نشان می دهد. به‌عنوان مثال، چهار عضو فامیلی PGIP لوبیا PGهای قارچ های مختلف را با میزان اثر بخشی متفاوتی مهار می کنند و PG قارچ سویه Fusarium moniliforme FC-10 تنها به وسیله PVPGIP2 ممانعت می گردد یعنی اختلاف در سطح آمینواسیدی پروتئین های PGIP نقش تعیین کننده ای در اثر متقابل این گونه از پروتئین ها با PG قارچی دارد (Ferrari *et al*., 2003; Favaron *et al*, 1994). در این راستا در تحقیقات قبلی که ژن های pvpgip2 و ژن کایمریک sp-pgip2-AAA-pgip1 از گیاه لوبیا رقم ناز استخراج و بترتیب در ناقل های بیانی گیاهی pBIPGIP2 و pBISPPGIP2AAAPGIP2 کلون شده بودند (Mohammadzadeh *et al*., 2011)، از طریق باکتری Agrobacterium tumefaciens pGV3101 با استفاده از روش Agroinfiltration جهت بررسی کارکرد سازه های تهیه شده و فعال بودن پروتئین کایمریک به برگ گیاه توتون انتقال یافتند. طراحی سازه واجد ژن کایمری sp-pgip2–aaa-pgip1(حاوی ژن های pgip1 و pgip2) که بوسیله لینکر ۳ اسید آمینه ای آلانین به هم متصل شده اند به نحوی است که بطور هم زمان هر دو نوع پروتئین خاصیت مهاری خود را اعمال خواهند کرد (Mohammadzadeh *et al*., 2011). لینکرها ی آلانین به دلیل هیدروفوب بودن باعث متمایز و مجزا قرار گرفتن دو پروتئین به هم متصل شده می گردد و لذا دو پروتئین متصل شده می توانند فعالیت بیولوژیکی خود را حفظ کنند (Masahiro *et al*., 2008). آنالیز های بیوانفورماتیکی Mohammadzadeh *et al*. (2011) نشان داد که پروتئین های متصل شده بوسیله لینکر آلانین از نظر ساختار فضایی از هم کاملا متمایز می باشند به نحوی که در پروتئین کایمر هر دو پروتئین می تواند فعالیت مهارکنندگی خود را حفظ نموده و پس از تولید به صورت بخش های جدا از هم فعالیت مهاری داشته باشند. همچنین ساختار ثانویه mRNA ژن کایمری از لحاظ میزان حداقل انرژی و نیز عدم داشتن ساختار های نامناسب مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت و مشخص گردید که میزان حداقل انرژی (ΔG) این ساختار، انرژی قابل قبولی برای یک mRNA به منظور ترجمه در سیستم گیاهی می‌باشد. فن آوری دستیابی به پروتئین های کایمری یک استراتژی کارآمد برای بیان پروتئین‌هایی است که بتوانند بطور همزمان فعالیت داشته باشند. پروتئین‌های کایمریک نوترکیب بیشتری امروزه تحت اهداف و عناوین

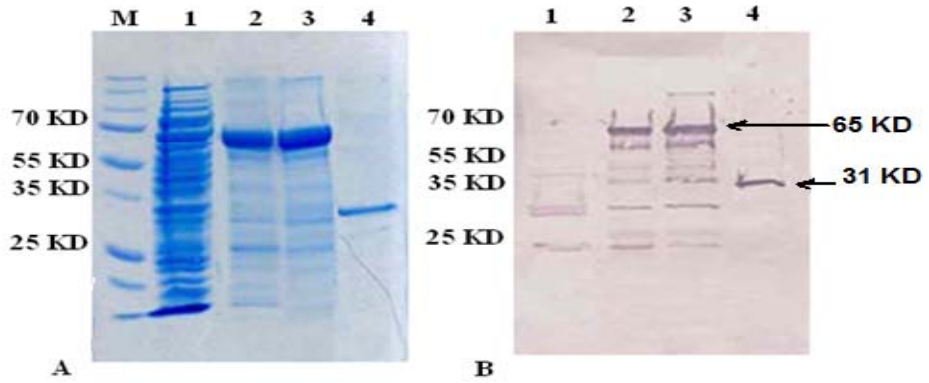
مختلفی مانند واکسن، دارو و غیره طراحی و تولید شده است. مانند پروتئین کایمریک GA733-Fc که بعنوان کاندیدای واکسن برای سرطان کلورکتال می باشد نام برد (Zhe *et al*., 2012) و پروتئین کایمریک مهارکننده ویروس HIV-1 است که گلیکوپروتئین gp41 ویروسی را با پتانسیل و پایداری بالا مورد هدف قرار می‌دهد (Chungen *et al*., 2011).

بیان موقت پروتئین های PGIP2 و کایمریک SP–PGIP2–AAA–PGIP1 در گیاه توتون

به منظور اطمینان از ساختار سازه-های pBIPGIP2 و pBIRMpp جهت بیان PGIP2 و پروتئین کایمر SP-PGIP2-AAA-PGIP1، سازه های مورد نظر به سلول‌های Agrobacterium tumefaciens pGV3101 بر اساس متد الکتروپوریشن منتقل شدند. از طریق PCR حضور سازه ها تائید گردید (شکل ۲) از اگروباکتریوم های تراریخت شده جهت تراریختی برگ گیاه توتون با استفاده از روش agroinfitration بصورت بیان موقت (transient) استفاده گردید. از برگ های تراریخت، پروتئین استخراج گردید و پروتئین PGIP2 و کایمریک بیان شده با استفاده از ستون کروماتوگرافی خالص سازی (partial purification) گردید. نتایج حاصل از انجام SDS-PAGE (شکل A–۳) و وسترن بلات پروتئین نشان داد که سازه های pBIPGIP2 و pBIRMpp در گیاه توتون بیان شده و پروتئین-های PGIP2 و SP-PGIP2-AAA-PGIP1 مورد انتظار بترتیب در محدوده ۳۱ و ٦۵ کیلو دالتون قابل شناسایی می‌باشند (شکل B–۳).

سنجش فعالیت مهارکنندگی PGIP2 و پروتئین کایمریک بیان شده در گیاه توتون

جهت سنجش فعالیت مهارکنندگی از روش Agarose Diffusion Assay استفاده گردید. بدین منظور مقدار ۱۰ میکروگرم از آنزیم FpPG به هر یک از چاهک های پلیت ریخته و مقدار ۳۰ میکروگرم از پروتئین تام اضافه گردید و پس از مدت ۱٦ ساعت فعالیت مهارکنندگی با اضافه کردن اسید کلریدریک ۱ مولار مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت مهارکنندگی بصورت نسبت قطر ناحیه هاله شفاف که نشان دهنده فعالیت آنزیم با ۱/۰، ۰/۵ و ۰/۲ سانتی متر به ترتیب برای PG تنها، PG باضافه پروتئین کل حاوی PGIP2 و PG باضافه پروتئین کل حاوی-PGIP2-AAA PGIP1 محاسبه می‌گردد (شکل ٤). در چاهک حاوی PG تنها، شعاع یا قطر هاله بزرگتر است و نشان دهنده فعالیت کامل آنزیم است. ولی در چاهک های حاوی PG باضافه PGIP2 و PG باضافه PGIP2-AAA-PGIP1 اندازه قطر بترتیب به ۰/۵ و ۰/۲ کاهش یافته است. نتایج بدست آمده نشان داد این پروتئین ها دارای فعالیت مهارکنندگی بر آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ های مورد مطالعه می باشند و فعالیت مهارکنندگی پروتئین کایمری نسبت به PGIP2 بیشتر است (شکل ٤).



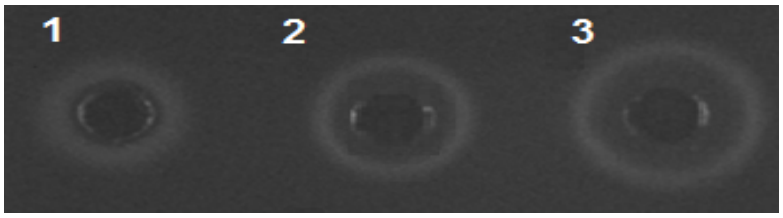
شکل ۳- آنالیز بیان پروتئین های PGIP2 و کایمریک SP-PGIP2-AAA-PGIP1 با استفاده از ژل SDS-PAGE و وسترن بلات.A: ژل SDS-PAGE.۱- الگوی پروتئینی گیاه توتون ترانسفورم نشده، ۲ و۳-پروتئین کایمری خالص شده از گیاه توتون ترانسفورم شده (با سازه pBIRMpp)،٤- پروتئین PGIP2. M- مارکر. B: وسترن بلات. ۱- گیاه توتون ترانسفورم نشده (بدون پلاسمید)، ۲ و۳- گیاه توتون ترانسفورم شده. ٤- پروتئین PGIP2.

Figure 3- Expression of PGIP2 and SP-PGIP2-AAA-PGIP1 proteins analyzed using SDS-PAGE gel and western blot. A. SDS-PAGE gel: 1 total protein pattern of non-transforming plant. 2 and 3 protein pattern of transformed plant counting chimeric proteins. 4 PGIP2 protein. M. marker. B: 1 western blot of non-transformed plant. 2 and 3 western blot of transformed plant. 4 PGIP2 protein.

از پروتئین های استخراج شده از برگ گیاه توتون تراریخت نشده به عنوان کنترل استفاده شد. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید ساختار سازه های بیانی pBIPGIP2 و pBIRMppجهت بیان PGIP2 و پروتئین کایمر SPPGIP2-AAA-PGIP1 در سیستم گیاهی مناسب بوده و پروتئین کایمریک طراحی شده از نظر بیولوژیکی فعال بوده و نسبت به PVPGIP2 منفرد قدرت مهارکنندگی بالاتری را نشان می دهد (شکل ٤) بنابراین می توان با انتقال ژن کایمریک به گیاهان زراعی گیاهان تراریخت مقاومتری ایجاد کرد. همچنین با انجام مطالعات تکمیلی از پروتئین کایمریک برای مهار هم زمان فعالیت چندین PG قارچی با توجه به تنوع و اختصاصی بودن آنها می‌توان استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و از همکاری علمی پروفسور Giulia De Lorenzo از دانشگاه Sapienza Università di Roma در اجرای این تحقیق سپاسگزاری می-گردد.



شکل ٤- سنجش فعالیت مهار کنندگی با استفاده از روش agarose diffusion assay . ۱- اثر مهارکنندگی پروتئین کایمری SPPGIP1-AAA-PGIP2 بیان شده در گیاه توتون بر فعالیت ۱۰ میکروگرم FpPG. ۲- اثر مهاری پروتئین PGIP2 بیان شده در گیاه توتون بر فعالیت ۱۰ میکروگرم FpPG. ۳- فعالیت ۱۰ میکروگرم از PG قارچ fusarium philophium (FpPG).

Figure 4- Assay inhibitor activity using agarose diffusion assay method. 1- inhibitory Effect of SPPGIP1-AAA-PGIP2 chimeric protein expressed in tobacco plant on activity of 10 µg FpPG. 2- Inhibitory Effect of PGIP2 protein expressed in tobacco plant on activity of 10 µg FpPG. 3- Activity of 10 µg FpPG .

منابع

Annis SL, Goodwin PH (1997). Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. European Journal of Plant Pathology 103: 1-14.

Bebber DP, Ramotowski MAT, Gurr SJ (2013). Croppestsand pathogens move pole ward sin warming world. Natural Climate Changes doi: 10.1038/nclimate1990

Benedetti M, Bastianelli E, Salvi G, De Lorenzo G, Caprari C (2011). Artificial evolution corrects a repulsive amino acid in polygalacturonase inhibiting protein (PGIPs). Journal of Plant Pathology 93: 89-95

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248–254.

Cervone F, De Lorenzo G, Pressey R, Darvill A, Albersheim P (1990). Can Phaseolus PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants? Phytochemistry 29: 447-449.

Chungen P (2011). A Novel Chimeric Protein-based HIV-1 Fusion Inhibitor Targeting gp41 Glycoprotein with High Potency and Stability. Journal of Biological Chemistry 12: 28425–28434.

Cimerman A, Reignault P, Levis C, Boccara M (2003). Disruption of Botrytis cinerea pectin methylesterase Gene Bcpme1 reduces virulence on several host plants. Molecular Plant–Microbe Interactions 16: 360– 367.

D'Ovidio R, Mattei B, Roberti S, Bellincampi D (2004a). Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant–pathogen interactions. Biochimistry ET Biophysica Acta 1696: 237– 244.

De Lorenzo G, Castoria R, Bellincampi D, Cervone F (1997). Fungal invasion enzymes and their inhibition. Plant Relationships Part B. Springer, Berlin. pp 61–83.

De Lorenzo G, Cervone F, Bellicampi D, Caprari C, Clark AJ, Desiderio A, Devoto A, Forrest R, Leckie F, Nuss L, Salvi G (1994). Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell–cell communication. Biochemical Science Trans 22: 396–399.

De Lorenzo G, D'Ovidio R, Cervone F (2001). The role of polygacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology 39: 313-335.

De Lorenzo G, Ovidio RD, Cervone F (2003). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology 39: 313-335.

Favaron F, D'ovidio R, Porceddu E, Alghisi P (1994). Purification and molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein. Planta 195: 80–87.

Federici L, Caprari C, Mattei B, Savino C, Di Matteo A, De Lorenzo G, Cervone F, Tsernoglou D (2001). Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). PNAS 98: 13425-13430.

Ferrari S, Sella L, Janni M, De Lorenzo G, Favaron F, D'Ovidio R (2012). Transgenic expression of polygalacturonase-inhibiting proteins in Arabidopsis and wheat increases resistance to the flower pathogen Fusarium graminearum. Plant Biology 14: 31-38.

Ferrari S, Vairo D, Ausubel FM, Cervone F, De Lorenzo G (2003). Tandemly duplicated Arabidopsis genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. The Plant Cell 15: 93-106.

Fradin EF, Abd-El-Haliem A, Masini L, vandenBerg GCM, Joosten MH, Thomma BP (2011). Interfamily transferoftomatoVe1medi- ates Verticillium resistancein Arabidopsis. Plant Physiology doi: 10.1104/pp.111.180067.

Gotesson A, Marshall JS, Jones DA, Hardham AR (2002). Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen phytophthora cinnamomi. Molecular Plant-Microbe Interactions 15: 907-921.

Janni M, Sella L, Favaron F, Blechl AE, De Lorenzo G, D'Ovidio R (2008). The expression of a bean polygalacturonase-inhibiting protein in transgenic wheat confers increased resistance to the fungal pathogen. Molecular Plant-Microbe Interactions 21: 171-177.

Johnston DJ, Williamson B, Mcmillan GP (1994). The interactions in planta of polygalacturonases from Botrytis cinerea with a wall-bound polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in raspberry fruits. Journal of Experimental Botany 45: 1837–1843.

Jones JDG, Witek K, Verweij W, Jupe F, Cooke D, Dorling S (2013). Elevating cropd is ease resistance with cloned genes. Biological Science doi:10.1098/rstb.2013.0087

Joubert DA, Kars I, Wagemakers L, Bergmann C, Kemp G, Vivier MA, van Kan JAL (2007). A polygalacturonase -inhibiting protein from grapevine reduces the symptoms of the endopolygalacturonase BcPG2 from Botrytis cinerea in Nicotiana benthamiana leaves without any evidence. Molecular Plant-Microbe Interactions 20: 392-402.

Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G (1997). An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Science 122: 101-108.

Manfredini C, Sicilia F, Ferrari S, Pontiggia D, Salvi G, Caprari C, Lorito M, De Lorenzo G (2005). Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of Phaseolus vulgaris inhibits BcPG1, a polygalacturonase of Botrytis cinerea important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. Physiology and Molecular Plant Pathology 67: 108-115.

Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC (2003). Resazurin microtiter assay plate testing of Mycobacterium tuberculosis susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. Antimicrobial Agents Chemotherapy 47: 3616–3619.

Masahiro W (2008). Intersubunit linker length as a modifier of protein stability: Crystal structures and thermostability of mutant TRAP. Protein Science 17: 518–526.

Mohammadzadeh R, Motallebi M, Zaman MR (2011). Construction of plant expression cassette for production of chimeric protein containing PGIP1 and PGIP2. Iranian Journal of Cell and Molecular Biology 64: 550-561

Motallebi M, Zaman MR, Hosseinzadeh Colagar A (2003). Relationship between polygalacturonase activity and pathogenicity among Iranian isolates of Ascochyta rabiei. Journal of Science & Technology Agriculture & Natural Resources 6: 159-169.

Narusaka M, Kubo Y, Hatakeyama K, Imamura J, Ezura H, Nanasato Y (2013a). Interfamily transfer of dual NB-LRR genes confers resistance to multiple pathogens. PLoSONE. doi:10.1371/journal.pone.0055954.

Narusaka M, Shirasu K, Noutoshi Y, Kubo Y, Shiraishi T, Iwabuchi M (2009). RRS1 and RPS4 provide dual resistance-gene system againstfungal and bacterial pathogens. Plant Journal 60: 218–226.

Oelofse D (2006). Apple polygalacturonase inhibiting protein1 expressed in transgenic tobacco inhibits polygalacturonases from fungal pathogens of apple and the anthracnose pathogen of lupins. Phytochemistry 67: 255–263.

Oerke EC (2006). Croplossestopests. Journal of Agricultural Science doi: 10.1017/S0021859605005708

Oeser B, Heidrich PM, Muller U, Tudzynski P, Tenberge KB (2002). Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the claviceps purpurea/rye interaction. Fungal Genetics and Biology 36: 176-186.

Powell ALT, van Kan J, ten Have A, Visser J, Greve LC, Bennett AB, Labavitch JM (2000). Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. Molecular Plant-Microbe Interactions 13: 942-950.

Rogers LM, Kim YK, Guo W, Gonzalez-Candelas L, Li D, Kolattukudy PE (2000). Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of Pisum sativum by Nectria hematococca. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 9813-9818.

Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular Cloning a Laboratory manual. 3rd Edition Cold Spring Harhor Press. New York.

Schob H, Kunz C, Meins F (1997). Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: A simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. Molecular Genne and Genetivs 256: 581-585.

Shanmugam V (2004). Role of extracytoplasmic leucine rich repeat proteins in plant defence mechanisms. Journal of Microbiological Research 09-014.

Taylor RJ, Secor GA (1988). An improved diffusion assay for quantifying the polygalacturonase content of Erwinia culture filtrates. Phytopathology 78:1101–1103.

Ten Have A, Breuil WO, Wubben JP, Visser J, van Kan JA (2001). Botrytis cinerea endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. Fungal Genetics and Biology 33: 97-105.

Ten Have A, Mulder W, Visser J (1998). The endopolygalacturonase gene Bcpg 1 is required for full virulence of Botrytis cinerea. Molecular Plant-Microbe Interactions 11: 1009–1016.

Zamani MR, Motallebi M (2000). Comparative study of polygalacturonase activity from different Iranian isolates of Fusarium oxysporum. Iranian Journal of Agricultural Science 31: 293-302.

Zamani MR, Motallebi M, Rostamian A (2004). Characterization of Iranian isolates of Fusarium oxysporum on the basis of RAPD analysis, virulence, and vegetative compatibility. Phytopathology 152: 499-503.

Zhe L (2012). Expression of ga733-fc fusion protein as a vaccine candidate for colorectal cancer in transgenic plants. Journal of Biomedicine and Biotechnology 36: 424-435.

Transient expression of pgip2 and chimeric sppgip2-aaa-pgip1 genes in Nicotiana benthamiana

Mohammadzadeh R*[1]., Zamani M.R. [2], Motallebi M.[3]

[1]Department of Cell and Molecular Biology, University of Maraghe "Maraghe", Iran.
[2]National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
[3]National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

Abstract

Considerable progress has been made toward identifying and cloning genes involved in plant defense responses - one of the strategies to improve agricultural crops. The polygalacturonases (PGs) are among the first enzymes with different isomers produced during infections and colonization of phytopathogenic fungus in plant cell walls. Conversely, some of plant species have evolved polygalacturonase inhibitor proteins (PGIP) that specifically recognize and inhibit fungal PGs. This was exploited in order to construct a chimeric gene that contains pgip1 and pgip2 genes from Phaseolus vulgaris. For expression the fusion gene and pgip2 were transformed into tobacco by agroinfiltration method and the caplet plate assay activity of fusion protein has shown that the chimeric protein had high inhibitory activity against fungal PG enzyme. It can be used for the production of transgenic plants and planning a mutational strategy aimed to improve the recognition of fusion protein properties for inhibition of different PGs at the same time.

Keywords: ***Polygalacturonases (PGs), Polygalacturonase Inhibitor Proteins (PGIP), Chimeric Proteion.***

* Corresponding Author: Mohammadzadeh. M.R Tel:09381983364 Email: rmohamadzadeh@maragheh.ac.ir