Archive of SID

تولید آنتی بادی اختصاصی پروتئین PGIP1 بیان شده به صورت هترولوگ در باکتری و استفاده از آن جهت تأیید بیان PGIP در گیاهان کلزای تراریخت

زهرا مقدسی جهرمی، محمدرضا زمانی*، مصطفی مطلبی، امیر بهزاد اخگری و فهیمه فلاحی

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۸/۷/۲۵

چکیده

قارچهای بیماریزای کلزا که سالانه خسارت زیادی را به این محصول وارد می کنند برای نفوذ در گیاه، با ترشح آنزیمهایی باعث تجزیه مولکولهای دیواره سلولی آنها می شوند. در طی تکامل در گیاهان، پروتئینهایی برای مهار این آنزیمها بوجود آمده است. PGIP1 از جمله این پروتئینها بوده که قدرت نفوذ قارچ در گیاه را مهار می نماید. در این تحقیق با توجه به اینکه آنتی بادی علیه پروتئین PGIP1 لوبیا به صورت تجاری موجود نمی باشد و از طرفی جهت تأیید بیان PGIP1 در گیاهان کلزای تراریخت بدست آمده نیاز به آنتی بادی مربوطه می باشد، لذا اقدام به تولید پروتئین PGIP1 در سیستم پروکاریوتی و استفاده از آن جهت تولید آنتی بادی علیه آن گردید. بدین منظور ژن کد کننده PGIP1 کلون شده در pUC19 بوسیله آغازگرهای اختصاصی RB وRB2H (به ترتیب حاوی سایتهای *Nde*1 و*Xho*1) تکثیر و پس از هضم با این دو آنزیم در ناقل pET26b(+) کلون گردید. پلاسمید حاصله پس از تأییدهای مولکولی به میزبان بیانی *E. coli* BL21 (DE3)pLysS منتقل گردید. جهت بهینه سازی شرایط بیان ژن مورد نظر، شرایط مختلفی شامل، غلظتهای متفاوتIPTG، دماهای متفاوت کشت و OD زمان القا در کلونیهای متفاوت مورد بررسی قرار گرفت و نهایتاً OD=0.3 ، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و IPTG =0.5mM بعنوان بهترین شرایط بیانی معرفی گردید. از آنجا که توالی هیستیدین در انتهای پروتئین کد شده وجود دارد، جهت تأیید بیان پروتئین PGIP1 توسط آزمون وسترن بلات از آنتی بادی Anti-His استفاده گردید. پروتئین خالص شده در شش نوبت به دو خرگوش تزریق شد. جهت بررسی میزان تیتر آنتی بادی از آزمون الایزا استفاده گردید. از آنتی بادی تولید شده جهت تأیید بیان پروتئین PGIP1 تولید شده در گیاهان کلزای تراریخت استفاده گردید. نتایج حاصل از آزمون وسترن بلات وجود پروتئین مورد نظر را در پروتئینهای استخراج شده از برگ گیاهان کلزای تراریخت در مقایسه با کلزای غیر تراریخت تأیید نمود.

واژه های کلیدی: گیاه کلزا، آنتی بادی، پروتئنهای مهار کننده فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز، گیاه تراریخت

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ٤٤٥٨٠٣٦٣، پست الکترونیکی: mrzamani97@yahoo.com

مقدمه

گیاه کلزا (*Brassica napus*) با داشتن خصوصیت سازگاری با شرایط مختلف آب و هوایی و نیز بالا بودن میزان روغن دانه آن (٤٥-٤٠ درصد) از اهمیت خاصی برخودار می باشد. از جمله معضلات مهم کشاورزان در زمینه کشت کلزا، آفات وبیماریهای آن بوده که باعث کاهش ۳۰ و حتی در برخی موارد صد در صدی در تولید آن می شوند. مقابله با آفات وبیماریها یکی از ضروری ترین راهها جهت افزایش بازده محصولات کشاورزی می باشد. روشهای قدیمی به نژادی و به زراعی و استفاده از آفت کشهای شیمیایی جوابگوی این نیاز روزافزون و کنترل آفات وبیماریهای گیاهی نمی باشد.

کاربرد روشهای ملکولی به منظور انتقال ژنهای مقاومت علیه بیماریهای گیاهی، به گیاهان زراعی می تواند به

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان یک روش تکمیلی مورد استفاده قرار گیرد. در میان بیماریهای مختلف گیاه کلزا، بیماریهای قارچی بیشترین خسارت را به محصول کلزا وارد می کنند. عوامل بیماریزای قارچی مقدار زیادی از آنزیمهایی را که قادر به تخریب ترکیبات ساختمانی دیواره سلولی گیاه هستند تولید می کنند (۲۰). توانایی عوامل بیماریزای گیاهان برای تولید آنزیمهایی که پلی ساکاریدهای پیچیده دیواره سلولی گیاه را تجزیه می کنند احتمالاً اولین مرحله در فرآیند بیماریزایی میباشند (۲۱). یکی از مهمترین این آنزیمها آنزیم پلی گالاکتوروناز (Polygalacturonase, PG) بوده که توسط قارچهای بیماریزای مختلف ترشح میگردد (۱۰).

در دیواره سلولی بسیاری از گیاهان دو لپه ای و در گیاهان تک لپه ای غنی از پکتین نظیر پیاز (*Allium cepa*) و تره (*Allium ampeloprasum*) و همچنین در آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) و گل اطلسی (*Petunia juss*) گلیکوپروتئینهای مهار کننده آنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز (polygalacturonase-inhibiting proteins/ PGIP) شناسایی شده اند که قادرند از طریق تنظیم یا ممانعت فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز، کلونیزاسیون قارچی را محدود کنند (۷، ۹، ۱۲ و ۲۵).

پروتئینهای مهار کننده آنزیم پلی گالاکتوروناز در به تأخیر انداختن پیشرفت هیف قارچی، کاهش پوسیدگی بافت میزبان، تحریک دیگر پاسخهای دفاعی گیاه و در نهایت توقف کلونیزاسیون قارچی نقش دارند (۷، ۸ و ۱۳). این مهار کننده ها مولکولهای گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۵۵-٤۰ کیلودالتون می باشند که به ماتریکس خارج سلولی گیاه با پیوندهای یونی متصل شده اند (۱۵ و ۲۳). این مهار کننده ها تمایل شدیدی به آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچی در مقایسه با آنزیم پلی گالاکتوروناز‌های باکتریای و یا درونزا دارند (۳ و ۱۷).

گزارشات متعددی نشان می دهد که بیان پروتئینهای مهارکننده فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز در گیاهان تراریخت جهت کنترل بیماریهای قارچی مورد استفاده قرار گرفته است (٤، ۱۸، ۲۲ و ۲۷). هدف از انجام این تحقیق بیان پروتئین PGIP نوترکیب در سلول باکتری،تولید آنتی بادی علیه آن و بررسی بیان پروتئین PGIP در گیاه کلزای تراریخت می باشد

مواد و روشها

به منظور کلون کردن ژن *pgip*1 در وکتور بیانی pET26b(+) ابتدا این ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و الگو قرار دادن پلاسمید نوترکیب pUCFF2 (حاوی ژن *pgip*1) تکثیر گردید.

آغازگرهای مورد استفاده: آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن *pgip*1 واریته دانشجو گیاه لوبیا در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق (جایگاههای برش آنزیمی به صورت تیره (bold) مشخص شده اند)

نام آغازگر	توالی	جایگاه برشی
RB	5’GGAATTC**CATATG**ACTCAATTCAATATCCCAG3’	NdeI
RB2H	5’CCG**CTCGAG**AGTGCAGGAAGGAAG3’	XhoI
SSrf	5′CAC CAA TGT CTC CGG CGC A3’	-
SSRR	5′CGG TTG CCG TCG AAT GTG AT3’	-
T7F	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG G3’	-
T7R	5' GCT AGT TAT TGC TCA GCG G3’	-

www.SID.ir

Archive of SID

شرایط انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز اختصاصی: واکنش زنجیره ای پلیمراز اختصاصی در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ٤۰ نانوگرم DNA پلاسمید، ٦۰ نانوگرم آغازگر، ۰/٤ میلی مولار dNTP، و ۲/۵ واحد آنزیم *Pfu* polymerase و ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X) (۲۰۰ میلی مولار Tris-HCl, pH=8.4، ۵۰۰ میلی مولار KCl و ۵۰ میلی مولار $MgCl_2$) صورت گرفت. واکنش ابتدا در دمای ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ٦۰ ثانیه، دمای ۵۲ درجه سانتی گراد به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه انجام گردید. بعد از اتمام ۳۰ دور، واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

روش استخراج پلاسمید و کلون کردن: استخراج پلاسمید به روش Alkaline lysis صورت گرفت (۲٤). برای کلون کردن ژن تکثیر شده از وکتور pET26b(+) استفاده شد. ابتدا ژن *pgip* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (RB/RB2H) و DNA پلاسمید pUCFF2 به عنوان الگو، تکثیر و قطعه تکثیر شده پس از الکتروفورز از ژل با استفاده از کیت (Agarose Gel DNA Extraction Kit/Roche) خالص سازی گردید. ناقل مذکور و قطعه خالص شده توسط آنزیمهای *Nde*1 و *Xho*1 هضم گردیدند. واکنش اتصال توسط آنزیم T4 DNA ligase در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. باکتری *E. coli* (DH5α) با استفاده از کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار به حالت مستعد شده درآمده و به مدت یک ساعت همراه با DNA مربوطه جهت transformation در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. سپس باکتریها پس از شوک حرارتی ٤۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه در محیط SOB (2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM $MgSO_4$) حاوی ۳۰ میکروگرم در هر میلی لیتر کانامایسین گسترش داده شدند. سازه بدست آمده توسط الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای یونیورسال T7f و T7r و نیز تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفت.

انتقال سازه بدست آمده به باکتری *E. coli* BL21(DE3) انجام شد. سلولهای ترانسفورم شده روی محیط کشت حاوی ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر کانامایسین مورد انتخاب قرار گرفتند.

بیان PGIP در سیستم پروکاریوتی: جهت تعیین شرایط بهینه برای تولید پروتئین PGIP تعداد ٤ کلونی حاوی پلاسمید نوترکیب pETZM1 (حاوی ژن *pgip*1) در محیط کشت LB واجد ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر کانامایسین و ۳٤ میکروگرم در میلی لیتر کلرامفنیکل کشت داده شدند. هر کلون در حجم ۵ میلی لیتر از محیط کشت فوق تلقیح و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط هوادهی (۲۰۰ دور در دقیقه) نگهداری شد و برای تلقیح به ۲۵ میلی لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک استفاده گردید. جهت بدست آوردن بهترین شرایط برای بیان از غلظتهای متفاوت IPTG (۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی مولار)، زمانهای متفاوت القاء (۲، ٤، ٦، ۸ و ۱٦ ساعت پس از القاء)، OD های مختلف مربوط به محیط کشت در زمان القاء (در ٤ حالت OD_{600} برابر ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱/۲) و نیز دو دمای ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی گراد استفاده گردید.

سلولهای باکتری بوسیله سانتریفوژ (٤۰۰۰ دور در دقیقه) و در دمای ٤ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه جمع آوری شدند. رسوب سلولی در فسفات بافر سالین (PBS, pH 7.4) سوسپانسیون شده و بعد از افزودن محلول sample buffer به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. کل پروتئین با ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد آنالیزشده و با کوماسی برلیانت بلو رنگ آمیزی گردید. جهت خالص سازی پروتئین از یک لیتر کشت باکتری حاوی ژن *pgip*1 در شرایط بهینه استفاده شده و

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت پروتئین خالص شده به روش Bradford (۵) تعیین گردید.

استخراج پروتئین گیاهی: استخراج پروتئین از برگ گیاهان تراریخت نسل T0 کلزا (۱) به روش ترکیبی Cervone و همکاران (٦) و Favaron (۱۱) همراه با اندکی تغییر انجام گرفت. سه گرم از پودر لیوفلیزه شده در۲۵ میلی لیتر از بافر کم نمک (low-salt buffer/LSB) که شامل ۵۰ میلی مولار سدیم استات با pH= ۵ ، ۳ میلی مولار اتانل دی آمین تترا استیک اسید، ۱ میلی مولار دی تیوتریتول و گلیسرول ۱۰ درصد بود، حل شد و به مدت حداقل نیم ساعت در ٤ درجه سانتی گراد روی همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس در g ۱۲۰۰۰ در ٤ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به ظرف تمیز منتقل گردید و رسوب به منظور استخراج مجدد در ۱۵ میلی لیتر از بافر با نمک بالا (LSB + high-salt buffer / 1M NaCl) حل شد و به مدت حداقل نیم ساعت (ترجیحاً در طول شب) در ٤ درجه سانتی گراد روی همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس مجدداً در همان شرایط سانتریفیوژ شد و فاز رویی به ظرف قبلی اضافه گردید. محلول جمع آوری شده به منظور کدورت زدایی در g ۱۵۰۰۰ در ٤ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس با سولفات آمونیوم در غلظت نهایی ۸۵ درصد اشباع رسوب دهی شد. رسوب در ۵ میلی لیتر از بافر استات سدیم ۲۰ میلی مولار با pH برابر ۵/۳ حل و به مدت ۱۲ ساعت در مقابل این بافر دیالیز شد و بعد از افزودن PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) تا غلظت نهایی یک میلی مولار جهت استفاده در مراحل بعد در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

تولید آنتی بادی پلی کلونال: پروتئین نوترکیب PGIP با اجوانت فروند امولسیون شده و به مقدار ۵۰۰ میکروگرم به دو خرگوش تزریق شد. تزریق در زمان شروع (صفر) با آنتی ژن همراه با اجوانت کامل (۱:۱) و در روزهای ١٤، ۲۱ و ۲۸ با آنتی ژن همراه با اجوانت ناقص (۱:۱) و در روزهای ۳۵ و ٤۲ با آنتی ژن تنها انجام گرفت. قبل از هر تزریق، خونگیری از خرگوشها صورت می گرفت. ٤ روز پس از تزریق خونگیری انجام و سرم آنها جمع آوری گردید.

سرمهای جمع آوری شده برای پاسخ آنتی بادی بر ضد پروتئین نوترکیب با روش الایزا سنجش گردیدند. بدین منظور پلیتهای ۹٦ خانه ای با ۷۵ نانوگرم پروتئین مورد نظر پوشانده شده و رقتهای متوالی از سرمها به چاهکهای پلیت اضافه گردید. اتصال آنتی بادیها به آنتی ژن با استفاده از آنتی بادی ثانویه کونژوکه با Horseradish peroxidase (HRP) معین شد. رنگ با ارتوفنیلن دی آمین (OPD) به مدت ۳۰ دقیقه ظاهر شد و واکنش با اسید سولفوریک دو مولار متوقف گردید و در ٤۹۰ نانومتر با microplate reader خوانده شد. نتایج در صورتی مثبت در نظر گرفته می شد که حداقل جذب ۲ برابر سرم کنترل بود.

آزمون Western blot: نمونه های پروتئینی در ژل آکریل آمید (SDS-PAGE) الکتروفورز شد. و سپس به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در بافر انتقال (۲/۹۳ گرم گلایسین، ۵/۸۱ گرم تریس، ۰/۳۷۵ گروم SDS و ۲۰۰ میلی لیتر اتانول در حجم یک لیتر با pH برابر ۸/۳) قرار داده شد. غشاء PVDE (Roche) نیز ابتدا به مدت ۱۰ ثانیه در متانل خالص و سپس به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در بافر انتقال قرار داده شد. بعد از آماده شدن ژل و غشاء، پروتئینها با جریان ۸۰ میلی آمپر به مدت ١٦ ساعت به غشاء منتقل شدند. برای پوشاندن نواحی آزاد غشاء با پروتئین، غشاء به مدت یک ساعت در بافر مسدود کننده (Blocking) (۳ درصد شیر خشک بدون چربی در بافر شستشو، pH برابر ۷/٤) در دمای اطاق به آرامی حرکت داده شد و قبل از انکوباسیون با آنتی بادی، به مدت ٤ ساعت سه بار با بافر شستشو (۱۲/۱ گرم تریس، ۹۰/۵ گرم NaCl و ١٤/۸۳ میلی لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

HCl ٦ نرمال در حجم ٥٠٠ میلی لیتر با pH برابر ٧/٤ ، بعنوان بافر شستشو 20X) شستشو گردید. غشاء با آنتی بادی به مدت یک ساعت در دمای اطاق نگهداری گردید. پس از این مدت آنتی بادی خارج و مجدداً غشاء ٣ بار شستشو داده شد. آنگاه ٣-٢ میلی لیتر سوبسترا (Chemiluminescence Western blotting substrate, POD) به غشاء اضافه و تا ظاهر شدن باندها به آرامی حرکت داده شد.

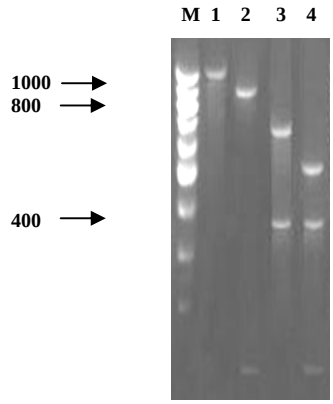
آزمون Western blot برای یررسی دو پروتئین انجام گردید. در مرحله اول جهت تأیید PGIP بیان شده در *E. coli* که برای تأیید از آنتی بادی Anti-His peroxidase با رقت ١ به ٥٠٠ استفاده گردید. در مرحله دوم جهت تأیید بیان PGIP در گیاه کلزای تراریخت که جهت تأیید بیان این پروتئین در گیاه از آنتی بادی تولید شده در این تحقیق با رقت ١ به ٥٠ و آنتی بادی ثانویه استفاده گردید.

نتایج

به منظور تکثیر و کلون کردن ژن *pgip*1 واریته دانشجوی گیاه لوبیا در وکتور بیانی pET26b(+) از ژن *pgip*1 که در وکتور pUC19 کلون شده بود (pUCFF2) بعنوان DNA الگو استفاده گردید . قبل از تکثیر ژن *pgip*1 ، حضور این ژن در سازه pUCFF2 به دو روش الگوی هضم آنزیمی (شکل ١) و الگوی PCR (شکل ٢) مورد تأیید قرار گرفت به منظور تکثیر ژن *pgip*1 از پرایمرهای RB و RB2H که بترتیب دارای سایتهای برشی *Nde*1 و *Xho*1 می باشند و پلاسمید pUCFF2 (حاوی ژن *pgip*1) بعنوان DNA الگو استفاده گردید. مخلوط واکنش اتصال قطعه تکثیر شده و وکتوربیانی pET26b(+) به سلولهای مستعد تازه تهیه شده *E. coli* BL21 (DE3)pLysS ترانسفورم گردید.

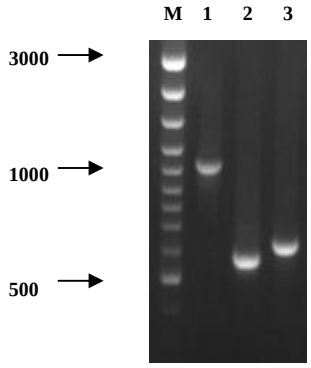
سازه بدست آمده توسط آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای T7F/T7R (شکل ٣) و تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفت. نتایج تعیین توالی نشان داد که این ژن دارای یک ORF به طول ١٠٢٩ جفت باز بوده و می تواند یک پروتئین با وزن ملکولی حدود ٣٧ کیلو دالتون را کد نماید. پلاسمید نوترکیب حاصل پس از تأیید pETZM1 نامگذاری گردید.

.



شکل ١- الگوی هضم آنزیمی ژن *pgip*1

١- محصول PCR ژن با آغازگرهای اختصاصی (١٠٤٧ bp)، ٢- هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *Dra*I (١٤٤ bp+ ٩٠٣)، ٣- هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم*Ava*II (٦٨٩ bp+ ٣٥٨)، ٤- هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیمهای *Ava*II و *Dra*1 (١٤٤ +٥٤٥ +٣٥٨)، M = 100 bp DNA ladder



شکل ٢- الگوی تکثیر ژن *pgip*1 با استفاده از وکتور نوترکیب pUCFF2

١- محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی (١٠٤٧bp)، ٢- محصول PCR با آغازگرهای RB1/SSRr (٥٦٦ bp)، ٣- محصول PCR با آغازگرهای RB2/SSRf (٦٣٢ bp)، M = 100 bp DNA ladder plus

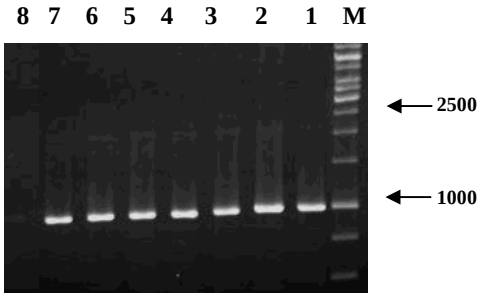
جهت بهینه سازی شرایط بیان پروتئین مورد مطالعه از ٤ کلونی تأیید شده و از مقادیر متفاوت القاء کننده (IPTG)

www.SID.ir

Archive of SID

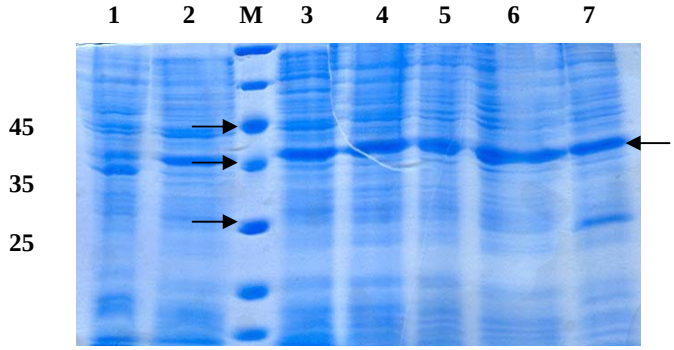
(٠/٥، ٠/٧، ١ میلی‌مولار)، زمانهای مختلف انکوباسیون پس از القا (٢، ٤، ٦، ٨ و ١٦ ساعت)، و دو دمای ٢٨ و ٣٧ درجه سانتی گراد استفاده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که در محیط کشت LB حاوی کانامایسین (30 µg/ml) و کلرامفنیکل (34 µg/ml)، غلظت ٠/٥ میلی مولارIPTG و دمای ٣٧ درجه سانتی گراد، یک باند پروتئینی در محدوده مورد انتظار(حدود ٣٤ کیلو دالتون) تولید می گردد (شکل ٤). در این بررسی از سویه *E. coli* BL21(DE3)pLysS حاوی ناقل (+) pET26b (empty vector) به عنوان شاهد استفاده شد.

توسط آزمون Western blot و با استفاده از آنتی بادی Anti-His مشخص گردید که پروتئین نوترکیب بیان شده در باکتری، پروتئین PGIP بوده که دارای His tag در C-terminal خود می باشد. در این آزمون فقط یک باند پروتئینی حدود ٣٤ کیلودالتون مشخص شده است.



شکل ٣) الگوی تکثیر ژن *pgip1* از کلونیهای حاوی سازه pETZM1
١ الی ٧- کلونیهای مثبت حاوی ژن *pgip1*، ٨- کنترل منفی، M = 1Kb DNA ladder

جهت بررسی پاسخ آنتی بادی تولید شده و میزان اتصال آن به پروتئین نوترکیب در مقایسه با شاهد منفی از آزمون الایزا (ELISA) استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که آنتی بادی تولید شده قادر به تشخیص پروتئین نوترکیب PGIP تولید شده می باشد. در این بررسی بیشترین OD_{490} بدست آمده برابر ٠/٩ و کمترین میزان که مربوط به نمونه شاهد منفی می باشد برابر ٠/٠٥ می باشد.



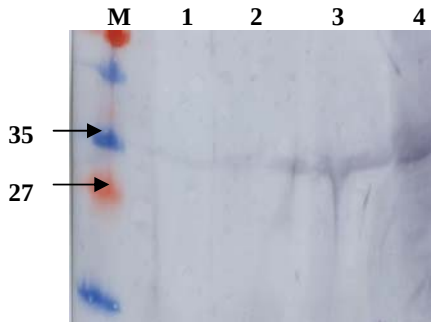
شکل ٤) الگوی پروتئینی حاصل از بیان PGIP در باکتری *E. coli* BL21(DE3) pLysS حاوی pETZM1
١- باکتری حاوی Empty vector، ٢- باکتری حاوی سازه pETZM1 (non- induced)، ٣ الی ٧- باکتری حاوی سازه pETZM1 (واجد ژن *pgip1*) بترتیب ٢، ٤، ٦، ٨ و ١٦ ساعت بعد از القاء (فلش باند حدود ٣٧ کیلو دالتون را نشان می دهد)، M= مارکر پروتئینی

به منظور تأیید بیان پروتئین PGIP در گیاهان کلزای تراریخت، از پروتئینهای استخراج شده از این گیاهان جهت انجام Western blot استفاده گردید. در این آزمون آنتی بادی پلی کلونال تولید شده علیه پروتئین PGIP، وجود یک باند پروتئینی در محدوده وزن ملکولی مورد انتظار را در پروتئینهای استخاج شده از کلزای تراریخت

www.SID.ir

Archive of SID

مشخص نمود (شکل ۵). از پروتئینهای استخراج شده از باکتری حاوی pETZM1 به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. این نتایج نشان داد که آنتی بادی اختصاصی تولید شده قادر به شناسایی یک باند پروتئینی در محدوده وزن ملکولی مورد انتظار برای PGIP می باشد.



شکل ۵) western blot حاصل از بیان PGIP در گیاه کلزای تراریخت

۱- پروتئین استخراج شده از گیاه کلزای غیر تراریخت (کنترل منفی)، ۲ و ۳- پروتئین استخراج شده از گیاهان کلزای تراریخت، ٤- پروتئین استخراج شده از باکتری حاوی ناقل pETZM1 (کنترل مثبت)، M= pre-stained protein ladder plus

بحث

هدف از این تحقیق بیان پروتئین PGIP نوترکیب در سلول باکتری، تولید آنتی بادی علیه آن و بررسی بیان پروتئین PGIP در گیاه کلزای تراریخت می باشد. بنابراین از آنجا که آنتی بادی علیه پروتئین PGIP به صورت تجاری موجود نبوده و قابل تهیه نمی باشد، اقدام به تولید آنتی بادی اختصاصی علیه این پروتئین گردید و از آن در آزمون Western blot جهت بررسی گیاهان تراریخت استفاده گردید.

با توجه به به اینکه ژن *pgip*1 گیاه لوبیا در جایگاه آنزیمی *Xba*1/*Sac*1 ناقل pUC19 کلون شده بود تا بتوان از آن جهت انتقال به ناقل pBI121 استفاده نمود، لذا با طراحی دو آغازگر اختصاصی با جایگاههای برشی *Nde*1/*Xho*1 ، این ژن تکثیر و در ناقل بیانی پروکاریوتی کلون گردید. تعیین توالی ژن *pgip* کلون شده در این ناقل صحت ORF این ژن را تأیید نمود. ضمن اینکه الگوی پروتئینی مورد انتظار نیز بیان PGIP مورد نظر را مورد تأیید قرار داد. جهت تأیید بیشتر بیان پروتئین PGIP در باکتری *E. coli* از تکنیک Western blot استفاده گردید که می تواند بطور قطعی تأیید کننده PGIP بودن این پروتئین باشد. بدین منظور در انتهای پروتئین PGIP بیان شده یک توالی کوتاه His-tag قرر داده شد تا بتوان با آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی (Anti- His) این پروتئین را تأیید نمود. استفاده از این آنتی بادی وجود یک باند پروتئینی را در پروتئینهای *E. coli* مشخص نمود که از آن برای تهیه آنتی بادی استفاده گردید. شناسایی PGIP بیان شده در باکتری (شاهد مثبت) به صورت تک باند اختصاصی توسط آنتی بادی تولید شده در این تحقیق، صحت آنتی بادی اختصاصی تولید شده علیه این پروتئین را مورد تأیید قرار می دهد.

در این تحقیق بیان پروتئین PGIP در گیاه تراریخت کلزا با استفاده از آنتی بادی تولید شده، توسط آزمون Western blot مورد تأیید قرار گرفت. اهمیت آزمون Western blot جهت تأیید بیان پروتئین هترولوگ در گیاه تراریخت، در مقایسه با سایر روشهای تأیید تراریخت بودن گیاه، از آن جهت است که سایر روشهای تأیید تراریختی نظیر PCR و Southern blot حضور تراژن در ژنوم گیاه را مورد بررسی قرار می دهد صرفنظر از اینکه آیا ژن در گیاه تراریخت قادر به بیان می باشد یا خیر. در روش Northern blot وجود transcript مربوط به تراژن مورد نظر، بررسی می گردد که لزوماً به معنی بیان کامل ژن نمی باشد. در صورتیکه در آزمون Western blot مرحله نهایی بیان ژن و تولید پروتئین مورد بررسی و تأیید قرار می گیرد که عدم silencing ژن مورد نظر را نیز نشان می دهد.

با انتقال ژن PGIP گیاه لوبیا به گیاه کلزا و بیان هترولوگ پروتئین PGIP در این گیاه می توان با ممانعت از فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچهای بیماریزا، با این بیماریها

www.SID.ir

Archive of SID

مقابله نمود. گزارشهای مختلفی مبنی بر انتقال ژن *pgip* به برخی از گیاهان زراعی جهت مقابله با قارچهای بیماریزا وجود دارد. Janni و همکاران (۲۰۰۸) ژن *pgip* لوبیا را به گیاه گندم منتقل کرده و نشان دادند که مقاومت گیاهان تراریخت بدست آمده نسبت به قارچ *Bipolaris sorokiniana* بیشتر شده است (١٤). انتقال ژن *pgip* انگور به گیاه توتون نیز باعث ایجاد مقاومت گیاهان تراریخت به قارچ *Botrytis cinerea* شده است (١٦). Manfredini و همکاران (۲۰۰۵) ژن *pgip* لوبیا را به گیاه آرابیدوپسیس و توتون منتقل و نشان دادند که بخوبی از فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *Botrytis cinera* ممانعت بعمل می آورد (۱۸). همچنین ژن *pgip* گلابی به خرمال، گوجه فرنگی و انگور منتقل شده و نشان داده شده است که در محدود کردن کلونیزاسیون قارچ بیماریزا نقش ایفاء می کنند (٤، ۲۲ و ٢٦). بیان PGIP سیب در گیاه توتون سبب مهار فعالیت آنزیمهای پلی گالاکتوروناز قارچهای بیماریزا می گردد (۱۹). در این تحقیق با استفاده از آزمون Western blot نشان داده شد که پروتئین PGIP در گیاهان کلزای تراریخت بیان شده است. در مراحل بعدی می توان با استفاده از آزمونهای زیست سنجی نقش این ژن در ایجاد مقاومت علیه قارچهای بیماریزای گیاهی را مورد ارزیابی قرار داد.

منابع

۱- اخگری امیر بهزاد. ١٣٨٦. کلونینگ (همسانه سازی)، تعیین توالی و مقایسه توالی ژنهای *pgip*1 و *pgip*2 در سه واریته لوبیا و انتقال ژن *pgip*2 به کلزا و تأیید ملکولی گیاهان تراریخت. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی. دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات، تهران.

۲- فلاحی فهیمه. ۱۳۸۵. مقایسه اثر مهاری PGIP عصاره هیپوکتیل واریته های لوبیا بر آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* و جدا سازی و کلونینگ ژنهای *pgip*1 و *pgip*2 واریته Jules و دانشجو. پایان نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی- گرایش علوم سلولی و ملکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه رازی، کرمانشاه.

3- Abu-Goukh A.A. and Labavitch J..M. 1983. The in vivo role of ‘‘Bartlett’’ pear fruit polygalacturonase inhibitors. Physiol. Plant Pathol. 23: 123–135.

4- Aguero C.B., Uratsu S.L., Greve C., Powell A.T. Labavitch J. M., Meredith C.P., and Dandekar A.M. 2005. Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. Molecular Plant Pathology, 6(1): 43-51.

5- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254

6- Cervone, F., De Lorenzo G., Degra L., Salvi G. and Bergami M. 1987. Purification and Characterization of a Polygalacturonase-Inhibiting Protein from *Phaseolus vulgaris L.* Plant Physiology. 85: 631-637.

7- De Lorenzo G., Ovidio R D. and Cervone F. 2001. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. Annu. Rev Phytopathol. 39: 313-335.

8- De Lorenzo G., Castoria R., Bellincampi D. and Cervone F. 1997. Fungal invasion enzymes and their inhibition. in: Carrol, G. and P. Tudzynski. Eds., The Mycota. V. Plant Relationships Part B. Springer, Berlin, pp. 61–83.

9- De Lorenzo G. and Ferrari S., 2002. Polygalacturonase inhibiting proteins in defense against Phytopathogenic fumgi. Curr. Opin. Plant Biol. 5: 295-299.

10- Di-Pietro A. and Roncero MIG. 1996. Purification and characterization of an exopolygalacturonase from the Tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici.* Mycrobiology Letters-FEMS. 145: 295-299.

11- Favaron, F. 2001. Gel detection of Allium porrum polygalacturonase-inhibiting protein reveals a high number of isoforms. Physiological and Molecular Plant Pathology. 58: 239-245.

12- Federici L., Caprari C., Mattei B. Savino C., Di Matteo A., De Lorenzo G., Cervone F., and Tsernoglou D. 2001. Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with

www.SID.ir

Archive of SID

PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). PNAS 98: 23, 13425-13430.

13- Hahn M.G., Buchell P., Cervone F., Doares S.H., O'Neill R.A., Darvill A. and Albersheim P. 1989. Roles of cell wall constituents in plant pathogen interactions. in: E. Nester and T. Kosuge, Eds., Plant–Microbe Interactions. McGraw-Hill, New York, pp 131–181.

14- Janni M., Sella L., Favaron F., Blechl A.E., and De Lorenzo G. 2008. The expression of bean PGIP in transgenic wheat confers increased resistance to the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*. Molecular Plant Microbe Interactions. 21(2): 171-177.

15- Johnston D.J., Williamson B. and Mcmillan G.P. 1994. The interactions in planta of polygalacturonases from Botrytis cinerea with a wall-bound polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in raspberry fruits. J. Exp. Bot. 45: 1837–1843.

16- Joubert DA, Kars I, Wagemakers L, Bergmann C, Kemp G, Vivier MA, van Kan JA. 2007. A polygalacturonase-inhibiting protein from grapevine reduces the symptoms of the endopolygalacturonase BcPG2 from *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana* leaves without any evidence for *in vitro* interaction. Molecular Plant Microbe Interactions. , 20(4):392-402.

17- Johnston D.J., Ramanathan V. and Williamson B. 1993. A protein from immature raspberry fruits which inhibits endopolygalacturonases from *Botrytis cinerea* and other micro-organisms. J. Exp. Bot. 44: 971–976.

18- 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. Physiol Mol Plant Pathol , 67(2): 108-115.

19- Oelofse D., D. Meyer I.A., Riaan Arendse S. Gazendam I. and Berger D.K. 2006. Apple polygalacturonase inhibiting protein1 expressed in transgenic tobacco inhibits polygalacturonases from fungal pathogens of apple and the anthracnose pathogen of lupins. Phytochemistry, 67(3): 255-263.

20- Patino B., Posada ML., Gonzalez-Jaen MT. and Vazquez C. 1997. The course of pectin degradation by polygalacturonases from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici.* Microbios 91: 47-54.

21- Petrini O. and Ouellette GB. 1994. Host wall alterations by parasitic fungi. APS Press St. Paul, Minnesota, USA.

22- Powell A.L., van Kan J., ten Have A., Visser J., Greve L.C., Bennett A.B. and Labavitch J.M., 2000. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol. Plant Microb. Interact.* 13, pp. 942–950.

23- Salvi G., Giarrizzo F., De Lorenzo G. and Cervone F. 1990. A polygalacturonase-inhibiting protein in the flowers of *Phaseolus vulgaris L.* Plant Physiology. 136: 513-518.

24- Sambrook J. and Russell D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, NewYork, NY.

25- Schillberg S., Zimmerman S., Zhang M. Y. and Fischer R. 2001. Antibody-based resistance to plant pathogens. Transgenic Res. 10, 1–12.

26- Tamura M.G., Tao R., Labavitch J.M. and Dandekar A.M. 2004. Transformation of persimmon with a pear fruit polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) gene. Scientia Horticulturae, 103: 19-30.

www.SID.ir

Archive of SID

Antibody Production against the heterologous expressed PGIP1 to confirm the transgenic canola plants

Moghaddassi Jahromi Z., Zamani M.R., Motallebi M., Akhgari A. and Fallahi F.

National Institute for Genetic Engineering and Biothechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Phytopathogenic fungi cause serious yield losses of oilseed crops including canola. Many phytopathogenic fungi produce polygalacturonase enzymes (PGs) which are thought to play an important role to degrade the pectin component of plant cell walls. On the other hand polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) which are cell wall bounded proteins are secreted by plants and they defend the cell walls against PGs. Due to the lack of commercial PGIP1 antibody, in this study PGIP1 was expressed in prokaryotic system to be used for production of antibody. The pgip gene was amplified using two primers RB and RB2H contaning *Nde*I and *Xho*I sites respectively and cloned in pET26b(+).The new construct was confirmed and transferred to *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. The optimized conditions for expression of PGIP1 was IPTG = 0.5mM ,OD = 0.3 and 37ºC for culture temperature. The expression of PGIP1 was confirmed using Anti-His antibody due to the presence of His-tag in expressed protein. The antibody against the expressed protein (PGIP1) was produced and the obtaining serum tested by Elisa. This antibody used for Western blotting to confirm the presence of the expressed PGIP1 in protein profile of transgenic canola plants. Western blot analysis of transgenic lines compared to non-transgenic line of canola plants confirmed the expression of PGIP1 in transgenic lines.

Keywords: Canola plants, antibody, PGIP, Transgenic plant

www.SID.ir