

طراحی و ساخت سازه بیانی گیاهی جهت تولید پروتئین کایمیری حاوی PGIP1 و PGIP2

رضا محمدزاده^۱، مصطفی مطلبی^{۲*} و محمدرضا زمانی^۲

^۱ دانشگاه مراغه، گروه بیولوژی سلولی و مولکولی

^۲ تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۲۰

چکیده

امروزه کنترل بیماری‌های گیاهی یکی از اهداف مهم اقتصاد جهانی است. پاتوژهای قارچی با گسترش وسیع و سریعی که دارند خسارت زیادی به محصولات گیاهی وارد می‌کنند و به همین دلیل مبارزه با پاتوژهای قارچی جزء برنامه‌های اصلی مبارزه با بیماری‌های گیاهی در بسیاری از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی می‌باشد. بیشترین آنزیم‌های قارچی تجزیه‌کننده دیواره سلولی گیاهی که مطالعه شده اند پلی گالاکتوروناز ها (polygalacturonase/PG) می باشند که پیوند بین دی گالاکتورونیک اسید ها که جزء اصلی پکتین ها می باشند را می شکنند. آنزیم‌های پلی گالاکتورونازی توسط اغلب قارچ‌های فیتوپاتوژنیک با اشکال ایزو آنزیمی مختلف تولید می شوند. در مقابل گیاهان نیز دارای PGIP های متنوعی هستند که علیه بسیاری از آنزیم‌های پلی گالاکتورونازی تولید شده توسط قارچها، توانایی تشخیص و مهار اختصاصی دارند. با توجه به عملکرد اختصاصی PGIP ها علیه آنزیم‌های پلی گالاکتوروناز قارچی در این تحقیق از ژنهای *pgip1* و *pgip2* استخراج شده از رقم ناز گیاه لوبیا جهت طراحی و ساخت یک سازه واجد هر دو ژن مذکور که به صورت کایمیریک طراحی شده اند استفاده گردید. در طی مراحل ساخت این سازه‌ها، از ناقلی که دارای دو جایگاه آنزیم‌های برشی *PacI* و *XbaI* برای همسانه سازی ژنهای مورد نظر بین پروموتور CaMV 35S و ترمیناتور NOS می باشد استفاده گردید. از سازه ساخته شده در این تحقیق می توان برای پروژه های انتقال ژن به گیاهان مدل و زراعی جهت بررسی اثرات این ژنها و تولید گیاهان تراریخته مقاوم در برابر قارچها استفاده کرد.

واژه های کلیدی: پروتئینهای مهار کننده پلی گالاکتوروناز (PGIP)، سازه بیانی گیاهی، آنزیم پلی گالاکتوروناز (PG)

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۵۸۰۳۶۳، پست الکترونیکی: motallebi@nigeb.ac.ir

مقدمه

علیه بیماری‌های گیاهی، به گیاهان زراعی می‌تواند به عنوان یک روش تکمیلی مورد استفاده قرار گیرد. دیواره سلول گیاهی با داشتن ساختار پایدار، اولین سد دفاعی در مقابل پاتوژها است. از میان ترکیبات سازنده این دیواره، پلی ساکاریدهای پکتینی جزء اصلی دیواره اولیه دولپه ایها (۹، ۱۴ و ۲۰) و برخی از تک لپه ایها (۱۳) می‌باشند. قارچها بسته به پتانسیل آنزیمی خود قادر به تخریب این سد دفاعی می‌باشند. پکتینازها جزء اولین آنزیم‌هایی هستند که در قارچها جهت نفوذ به سلول گیاهی

متداول ترین روش برای مبارزه با بسیاری از بیماری‌های قارچی استفاده از انواع قارچ کشهای شیمیایی است. اما این گونه مواد نه تنها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشند، بلکه باعث آلوده شدن محیط زیست و نیز ایجاد گونه‌های بیماری زای مقاوم به قارچ کش می‌شوند. تلاش جهت یافتن جایگزینی مناسب برای این ترکیبات شیمیایی، منجر به استفاده از روشهای مختلف کنترل بیولوژیک این گونه بیماریها شده است (۲۵ و ۳۷). کاربرد روشهای مولکولی به منظور انتقال ژنهای مقاوم

متصل شده اند جهت تولید پروتئین کایمر SP-PGIP2-AAA-PGIP1 طراحی و سنتز می‌گردد. از سازه به دست آمده جهت تولید پروتئین کایمری برای مهار همزمان چندین PG با توجه به تنوع و اختصاصی بودن آنها می‌توان استفاده نمود.

مواد و روشها

باکتریها و ناقلهای مورد استفاده: در این تحقیق از باکتری *E. Coli* سویه DH10B XL1 استفاده گردید.

سازه‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل pBIAH17 و pBIAH23 به ترتیب شامل ژنهای *pgip1* و *pgip2* با منشاء لوبیا رقم ناز می‌باشند. همچنین از ناقل pBI121MOD دارای جایگاه برشی آنزیم *PacI* و نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین و نیز ناقل pGAPZαA واجد نشانگر انتخابی مقاومت به ژئوسین استفاده گردید. آنزیمها، محلولها و بافرهای مورد نیاز از شرکت Bio Rad تهیه گردید. تهیه باکتریهای مستعد، واکنش اتصال و انتقال محصول به باکتریهای مستعد، استخراج DNA پلاسمیدی و هضم آنزیمی طبق دستورالعمل (۳۶) انجام شد.

بررسیهای بیوانفورماتیک: با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی برخی خصوصیات ژنهای *pgip1* و *pgip2* نظیر میزان درصد AT و GC (http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis) و نوع و محل برش آنزیمهای محدود الاثر مشخص گردید. در این آنالیز حضور جایگاه برش برای آنزیمهای *XbaI* و *PacI* که جهت همسانه سازی ژن درون ناقل pBI121MOD و آنزیمهای *AvrII* و *NotI* جهت همسانه سازی ژن درون ناقل pGAPZαA مد نظر بودند، بررسی شدند. توالیهای کدکننده دو پروتئین PGIP1 و PGIP2 با استفاده از یک لینکر حاوی ۳ اسید آمینه آلانین به منظور جلوگیری از تداخل شکل فضایی هریک از پروتئینها به هم متصل شدند. سازه دو ژنی از جهت عدم

ترشح می‌شوند. از میان پکتینازها، پلی گالاکتورونازها (polygalacturonase/PG)، نقش مهمی در تجزیه دیواره سلول گیاهی دارند (۲۱، ۳۱، ۴۰، ۴۲، ۴۳ و ۴۴). این آنزیمها توسط پاتوژن بر روی بافت میزبان ترشح می‌شوند. تأثیر این آنزیمها باعث ایجاد و رهاسازی قطعات اولیگوگالاکتورونیدی (Oligogalacturonide) می‌گردد که این قطعات ضمن تأمین منبع کربنی لازم برای رشد قارچ، نفوذ و کلونیزاسیون پاتوژن قارچی را نیز تسهیل می‌نمایند (۳۹).

پروتئینهای مهار کننده آنزیم پلی گالاکتوروناز (polygalacturonase-inhibiting proteins/PGIP) در به تأخیر انداختن پیشرفت هیف قارچی، کاهش پوسیدگی بافت میزبان، تحریک دیگر پاسخهای دفاعی گیاه و در نهایت توقف کلونیزاسیون قارچی نقش دارند (۲، ۹، ۱۱ و ۲۰). این مهار کننده ها مولکولهای گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۴۰-۵۵ کیلودالتون می‌باشند که به ماتریکس خارج سلولی گیاه با پیوندهای یونی متصل شده اند (۲۳، ۳۵).

ژنهای کد کننده PGIP به صورت خانواده ژنی سازمان دهی شده اند. اعضای مختلف هر خانواده ممکن است پروتئینهایی با صفات تقریباً مشابه کد کنند اما ویژگی و عمل تنظیمی آنها متفاوت است (۷ و ۱۷). به عنوان مثال چهار عضو فامیلی PGIP لوبیا PG های قارچهای *Botrytis cinerea* و *Colletotrichum lupini* را با میزان اثر بخشی متفاوتی مهار می‌کنند و PG قارچ سویه *Fusarium moniliforme* FC-10 تنها به وسیله PVP-GIP2 ممانعت می‌گردد (۱۴ و ۱۷). گزارشات متعددی نشان می‌دهد که بیان پروتئینهای مهارکننده فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز در گیاهان تراریخت جهت کنترل بیماریهای قارچی مورد استفاده قرار گرفته است (۲۲، ۲۴، ۲۶، ۳۴ و ۴۱). در این تحقیق سازه حاوی دو ژن *pgip1* و *pgip2* به صورت کایمر که به وسیله لینکر حاوی ۳ کدون آلانین به هم

آلانین همپوشانی دارد) (جدول ۱) و شرایط ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۲۸ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و نهایتاً ۵ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد با آنزیم *Pfu* پلیمرز (شرکت Roche) تکثیر شد. محصول PCR با آنزیم‌های *NotI* و *AvrII* هضم شد. همچنین ناقل pGAPZα نیز با همین آنزیم‌ها هضم گردید. پس از هضم آنزیمی، هر دو قطعه (محصول PCR مربوطه و بدنه ناقل pGAPZα) روی ژل آگارز یک درصد جداسازی و خالص‌سازی شدند. پس از واکنش اتصال، محصول به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه DH10B XL1 با استفاده از الکتروپوریشن منتقل شد. پس از کشت باکتری‌ها بر روی محیط LB با نمک پایین و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک زئوسین به عنوان نشانگر انتخابی، از کلونیهایی به دست آمده جهت تأیید ساخت سازه واجد ژن *pgip2* توسط تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت.

وجود ترادفهای ناپایدار کننده RNA همچنین انواع ساختارهای دوم mRNA و نیز از جهت پایداری در سیستم گیاهی با مراجعه به سایت RNA mfold به نشانی اینترنتی (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna->) (form1.cgi) بررسی گردید (۱۹ و ۳۰) پیش‌بینی ساختار فضایی پروتئین کایمریک مورد مطالعه با استفاده از سایت I-tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I->) (TASSER) به صورت online انجام پذیرفت (۱). همچنین نواحی هیدروفوب، هیدروفیل و احتمال گلیکوزیله شدن پروتئین مورد نظر با استفاده از نرم‌افزارها و داده‌های موجود در بانک اطلاعات پروتئین (Swiss-Prot و TrEMBL) پیش‌بینی گردید.

ساخت سازه بیانی **pBIRMpp**: ساخت سازه دو ژنی واجد ژنهای *pgip1* و *pgip2* طبق مراحل زیر انجام شد:

الف- ژن *pgip2* که در ناقل pBIAH23 همسانه‌سازی شده بود با واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *AvrIIpgip2Fw* و *NotIpgip2Rv* (حاوی جایگاه برش آنزیم *NotI* که با توالی لینکر ۳ اسید آمینه

جدول ۱- لیست پرایمرهای مورد استفاده برای کلونینگ، تکثیر، تأیید و شناسایی ژنهای *pgip1* و *pgip2*

5' Poly cloning site	Orientation	Sequence 5' to 3'	Primers
<i>AvrII XbaI</i>	Sense	5'-GCCCTAGG TTAATTAAATGACTCAATTCAATATC	<i>AvrIIpgip2Fw</i>
<i>NotI</i>	Anti-sense	5'-GCGCGGCCGCGAGTGCAGGCAGGA	<i>NotIpgip2Rv</i>
<i>NotI</i>	Sense	5'-CACTATGCGGCCGAGAGCTATGCAACCCACAAG	<i>NotIpgip1Fw</i>
<i>PacI</i>	Anti-sense	5'-CACTTGTTAATTAATTAAGTGCAGGAAGGAAGAGGAG	<i>PacIpgip1Rv</i>
-	Sense	5'-CTGCCTGCACTGCGGCC	PGIP2linkerF
-	Sense	5'-GGCGAACAGTTCATACAGATGCT	CaMV 35s
-	Anti-sense	5'-CGC GAT AAT TTA TCC TAG TTT GC	nosR
-	Anti-sense	5'-GCAAATGGCATTCTGCATCC- ³	<i>Aox1Rv</i>

۱) و شرایط ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۲۸ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و نهایتاً ۵ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد با آنزیم *Pfu* پلیمرز (شرکت Roche) تکثیر شد. محصول

ب- ژن *pgip1* که در ناقل pBIAH17 همسانه‌سازی شده بود با واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *NotIpgip1Fw* (حاوی جایگاه برش آنزیم *NotI* که با توالی لینکر ۳ اسید آمینه آلانین همپوشانی دارد) و *PacIpgip1Rv* (حاوی جایگاه برش آنزیم *PacI*) (جدول

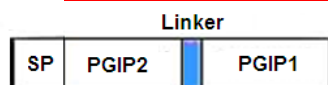
که به وسیله لینکر ۳ اسید آمینه ای آلانین به هم متصلند) و پلاسمید pBI121MOD با استفاده از آنزیمهای *XbaI/PacI* هضم شدند. پس از انجام واکنش اتصال، محصول به دست آمده جهت تکثیر به وسیله الکتروپوریشن به سلولهای *E. coli* DH10B XL1 منتقل شدند. باکتریهای تراریخت بر روی محیط LB با نمک پایین و ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین به عنوان نشانگر انتخابی رشد داده شدند. کلنیهای حاصل پس از استخراج پلاسمید با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی به منظور تأیید ساخت سازه مورد بررسی قرار گرفت.

PCR با آنزیمهای *PacI* و *NotI* هضم شد. همچنین پلاسمید نوترکیب به دست آمده از مرحله "الف" نیز با همین آنزیمها هضم گردید. پس از انجام واکنش اتصال، محصول به وسیله الکتروپوریشن به سلولهای *E. coli* DH10B XL1 منتقل گردید. باکتریهای تراریخت بر روی محیط LB با نمک پایین و ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک ژوسین به عنوان نشانگر انتخابی رشد داده شدند. ج- جهت انتقال قطعات از پلاسمید نوترکیب به دست آمده از مرحله "ب" به پلاسمید بیانی گیاهی pBI121MOD (حاوی جایگاه برش برای آنزیم *pacI*)، پلاسمید نوترکیب (حاوی ژنهای *pgip1* و *pgip2*)

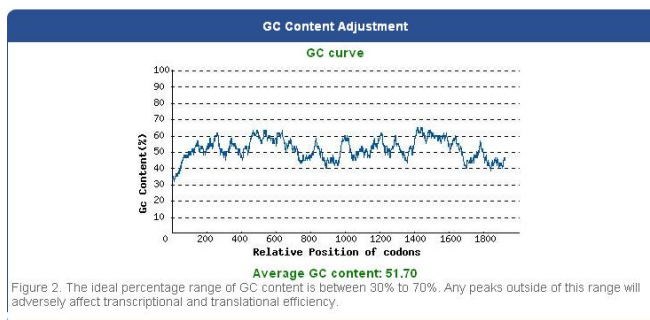
```

ATGACTCAATTCAATATCCAGTAACCATGTCTTCAAGCTTAAGCATAATTTTGGTCATT 60
CTTGATCTTTTGAGAAGTGCAGTCTCAGAGCTATGCAACCCACAAGACAAGCAAGCCCTT 120
CTCAAATCAAGAAAGACCTTGGCAACCCAACCACTCTCTCCTCATGGCTTCCAACCACC 180
GACTGTGCAACAGAACCTGGCTAGGTGTTTTATGCGACACCGACCCAAACATATCGC 240
GTCAACAACCTCGACCTCTCCGGCCTTAACCTCCCAAACCCCTACCCATATCCCTTCCCTC 300
CTCGCCAAACCTCCCACTACCTCAATTTCTATACATTTGGTGGCATCAATAACCTCGTCCGT 360
CCAATCCCCCCCCGCCATCGTAACTCACCAACTCCACTATCTCTATATCACCCACACC 420
AATGTCTCCGGCGCAATACCCGATTTCTTGTGCACAGATCAAACCCCTCGTCACCCCTCGAC 480
TTCTCCTACAACGCCCTCTCCGGCACCCCTACCTCCCTCCATCTCTCTCTCCCAACCTC 540
GTCCGAATCACATTCGACGGCAACCGAATCTCCGGCGCCATCCCGACTCCTACGGCTCA 600
TTTTCGAAGCTGTTACAGTCGATGACCATCTCCGGCAACCGCCTCACCGGGAAGATTCCG 660
CCGACGTTTGCGAATCTGAACCTGGCGTTCGTTGACTTGTCTCGAAACATGCTGGAGGGT 720
GACGCGTCGGTGTGTTCCGATCAGATAAGAACACGCAGAAGATACATCTGGCGAAGAAC 780
TCTCTTGCCTTTGATTTGGGGAAAGTGGGGTGTCAAAGAACTTGAACGGGTTGGATCTG 840
AGGAACAACCGTATCTATGGGACGCTACCGCAGGGACTGACGCAGCTAAAGTTTCTGCAC 900
AGTTTTAAATGTGAGCTTCAACAATCTGTGCGGTGAGATTCTCAAGGTGGGAACCTTGCAA 960
AGATTTGACGTTTCTGCTTATGCCAACAACAAGTGTGTGTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 1020
TGCAGCTCGGGCCGCAAGACTATGCAACCCACAAGATAAGCAAGCCCTTCTCCAATCAAG 1080
AAAGACCTTGGCAACCCAACCACTCTCTCTCATGGCTTCCAACCACCGACTGTTGTAAAC 1140
AGAACCTGGCTAGGTGTTTTATGCGACACCGACCCAAACATATCGCGTCAACAACCTC 1200
GACCTCTCCGGCCATAACCTCCCAAACCCCTACCCATACCCCTTCCCTCCCTCGCCAACCTC 1260
CCCTACCTCAATTTCTATACATTGGCGGCATCAATAACCTCGTCCGTTCCAATCCCCCCC 1320
GCCATCGTAACTCACCAACTCCACTATCTCTATATCACTCACACCAATGTCTCCGGC 1380
GCAATACCCGATTTCTTGTGCACAGATCAAACCCCTCGTCACCCCTCGACTTCTCCTACAAC 1440
GCCCTCTCCGGCACCCCTCCCTCCCTCCATCTCTTCTCTCCCAACCTCGGAGGAATCACA 1500
TTCGACGGCAACCGAATCTCCGGCGCCATCCCGACTCTACGGCTCGTTTTTCGAAGCTG 1560
TTTACGGCGATGACCATCTCCCGCAACCGCCTCACCGGGAAGATTCCACCGACGTTTGCG 1620
AATCTGAACCTGGCGTTCGTTGACTTGTCTCGGAACATGCTGGAGGGTGACGCGTCGGTG 1680
TTGTTCCGGGTGAGATAAGAACACGAAGAAGATACATCTGGCGAAGAACTCTCTTGCTTTT 1740
GATTTGGGGAAAGTGGGGTGTCAAAGAACTTGAACGGGTTGGATCTGAGGAACAACCGT 1800
ATCTATGGGACGCTACCTCAGGACTAGCGCAGCTAAAGTTCTGCAAAGTTTAAATGTG 1860
AGCTTCAACAATCTGTGCGGTGAGATTCTCAAGGTGGGAACCTGAAAAGGTTTGACGTT 1920
TCTTCTTATGCCAACAACAAGTGTGTGTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT

```



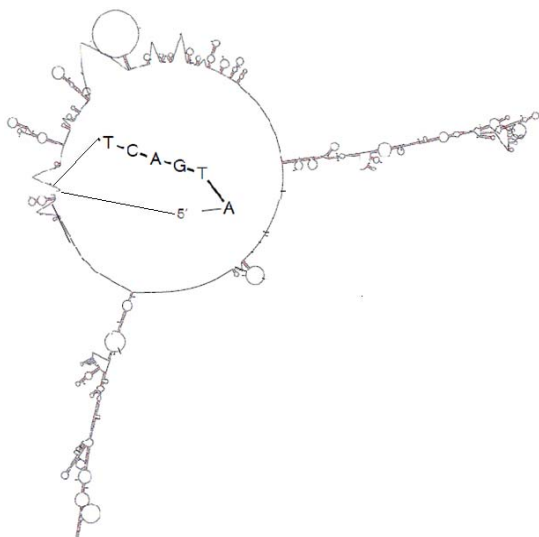
شکل ۱- ترادف اسید نوکلئیک ژن کایمیری حاوی *pgip1* و *pgip2* و رابط حاوی کدون ۳ اسید آمینه ای آلانین و نمایش شماتیک دو قطعه مورد نظر که با استفاده از رابط به یکدیگر متصل شده است. توای ۱ الی ۸۷ سیگنال پپتید، توای ۸۸ الی ۱۰۲۶ ژن *pgip2* توای ۱۰۲۷ الی ۱۰۳۵ لینکر، توای ۱۰۲۸ الی ۱۹۷۷ ژن *pgip1*



شکل ۲- بررسی میزان درصد GC ژن کایمیریک با استفاده از سایت GenScript به صورت online انجام شد، درصد GC برابر ۵۱/۷۰ محاسبه گردید که برای بیان در میزبان گیاهی توتون مناسب می باشد.

نتایج

می باشد. همچنین ساختار پروتئین حاصل از این ژن مصنوعی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مربوط به پیش بینی ساختارهای پروتئینی نشان داد که پروتئینهای PGIP1 و PGIP2 به خوبی از یکدیگر متمایز بوده که این امر نشان دهنده عملکرد مناسب لینکر ۳ اسید آمینه ای آلانین می باشد (شکل ۴). با توجه به متمایز بودن PGIP1 و PGIP2 در پروتئین کایمر، این پروتئین نوترکیب می تواند فعالیت مهارکنندگی PGIP1 و PGIP2 را به طور همزمان داشته باشد.



شکل ۳- پیش بینی ساختار ثانویه mRNA مربوطه به ژن کایمیری در نقطه شروع ۵' (آغاز ترجمه) ساختارهای نامناسب وجود ندارد. علاوه بر آن میزان حداقل انرژی این ساختارها، حاوی انرژی قابل قبولی برای یک mRNA و به منظور ترجمه در سیستم گیاه توتون می باشد (پایداری مناسب).

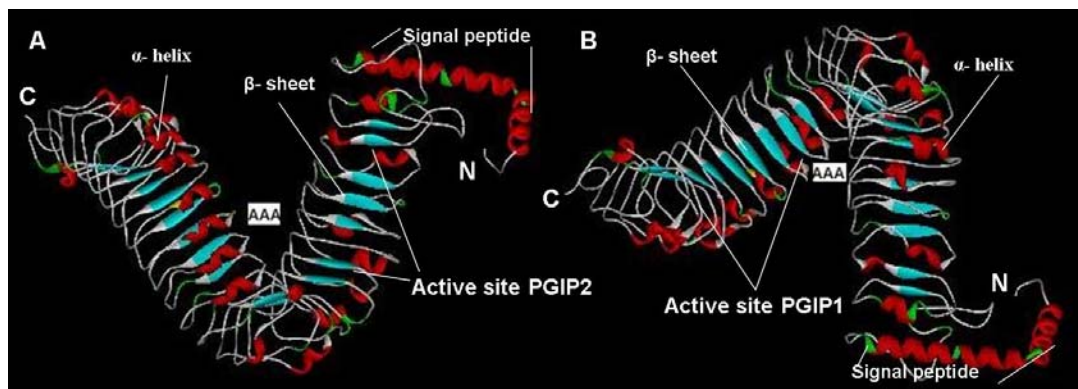
بررسی ساختار mRNA و پروتئین کایمیری PGIP2-

AAA-PGIP1: برای تولید پروتئین کایمیری PGIP1 و PGIP2 از لینکر ۳ اسید آمینه ای آلانین استفاده گردید. توالی نوکلئوتیدی این ۳ اسید آمینه با توالی آنزیم *NotI* همپوشانی دارد. از این مشابهت جهت طراحی پرایمرهای مناسب برای اتصال این دو ژن در فرآیند همسانه سازی استفاده گردید. توالی پیشنهادی کایمیری *sp-pgip2-AAA-* در شکل ۱ ارائه شده است. از آنجا که در این تحقیق هدف انتقال این ژن کایمیری به گیاه توتون می باشد لذا محتوی GC آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که میزان GC این ژن ۵۱/۷ درصد می باشد. با توجه به پیش بینی بیوانفورماتیکی انجام شده که طیف GC را بین ۳۰ تا ۷۰ نشان می دهد، بنابراین توالی کایمیری از محتوای GC مناسبی جهت بیان در گیاه توتون برخوردار می باشد (شکل ۲).

ساختار ثانویه mRNA کایمیری *pgip2-AAA-pgip1* از لحاظ میزان حداقل انرژی که نشان دهنده میزان پایداری آن می باشد و نیز عدم داشتن ساختارهای نامناسب مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در نقطه شروع mRNA کایمیری ساختار نامناسبی دیده نمی شود (شکل ۳). میزان حداقل انرژی (ΔG) این ساختار برابر - 177.82 کیلوکالری بر مول می باشد. این میزان انرژی قابل قبولی برای یک mRNA به منظور ترجمه در سیستم گیاهی

سازی (شکل ۵) با ترتیب *pgip2*-AAA-*pgip1* در وکتور بیانی pBI121MOD بر اساس مراحل زیر همسانه سازی شد.

ساخت سازه بیانی pBIRMpp حاوی ژن کایمیری *pgip2*-AAA-*pgip1* به منظور ساخت سازه بیانی حاوی ژن کایمیری توالیهای DNA ژنهای *pgip1* و *pgip2* با توالی لینکر حاوی ۳ کدون اسید آمینه آلانین طی فرآیند همسانه



شکل ۴- ساختار سوم پروتئین کایمر (sp-*pgip2*-AAA-*pgip1*) بر اساس روش ab initio به وسیله سایت I-tasser پیش بینی شده است. پیش بینی ساختار پروتئینی نشان می‌دهد که جایگاه فعال دو توالی پروتئینی PGIP2 و PGIP1 در ساختار فضایی به خوبی از یکدیگر متمایز هستند. (A) ساختار فضایی پروتئین کایمر از زاویه ای نمایش داده شده که آزاد و متمایز قرار گرفتن جایگاه فعال پروتئین PGIP2 را نشان می‌دهد. (B) ساختار فضایی پروتئین کایمر از زاویه ای نمایش داده شده که آزاد و متمایز قرار گرفتن جایگاه فعال پروتئین PGIP1 را نشان می‌دهد.

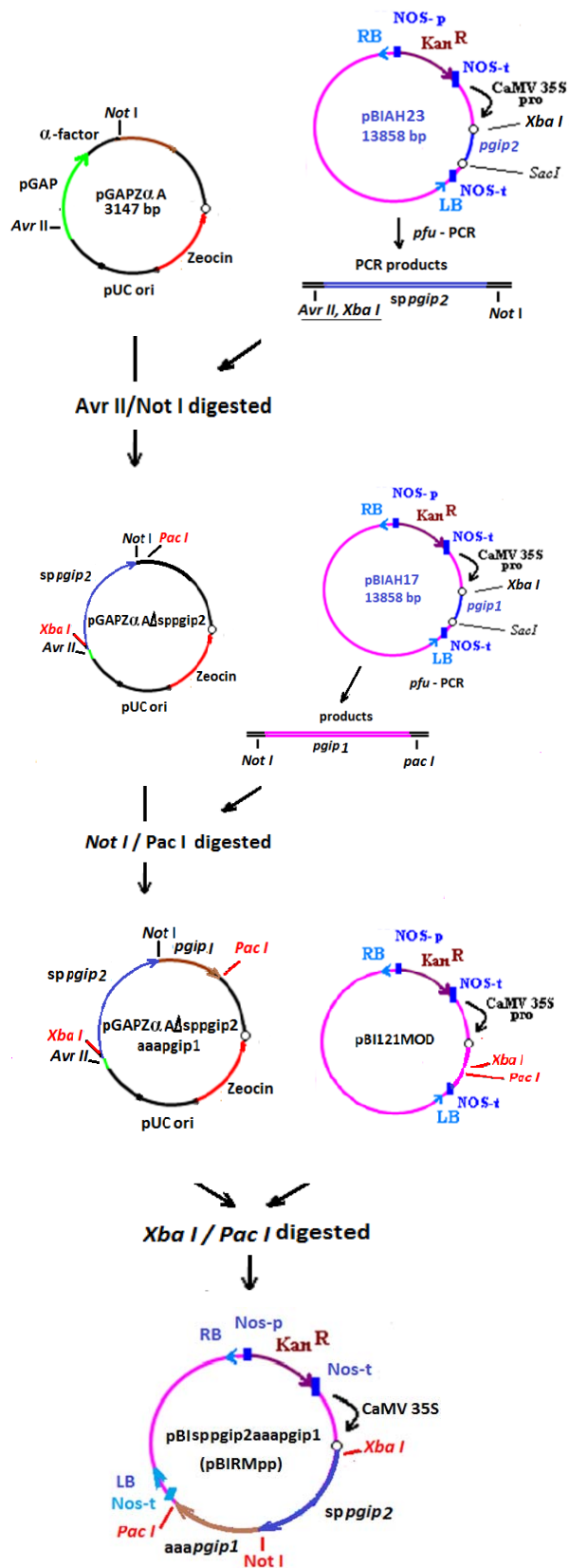
اختصاصی *NotI**pgip1*Fw و *PacI**pgip1*Rv به دست آمده بود و همچنین سازه pGAPZαAΔsppgip2 با آنزیمهای *NotI* و *AvrII* در ناقل pGAPZαA هضم شده و ژن مذکور در جایگاه مورد نظر همسانه سازی گردید (شکل ۵). سازه *pgip1* و *pgip2* که به وسیله لینکر ۳ اسید آمینه ای آلانین به هم متصل شده اند با استفاده از تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱).

ج- ساخت سازه pBIRMpp: جهت انتقال قطعه کایمیری از سازه pGAPZαAΔsppgip2aaapgip1 (به دست آمده از مرحله ب) به ناقل بیانی گیاهی pBI121MOD (pBI121) حاوی جایگاه برش برای آنزیم *pacI*، سازه pGAPZαAΔsppgip2aaapgip1 و ناقل pBI121MOD با استفاده از آنزیمهای *XbaI* و *PacI* هضم شدند. قطعه کایمیری مورد نظر در جایگاه *XbaI* و *PacI* ناقل pBI121MOD هضم شده با این دو آنزیم همسانه سازی گردید (شکل ۵).

الف- ساخت سازه pGAPZαAΔsppgip2: برای همسانه سازی ژن *pgip2* محصول PCR این ژن پس از هضم با آنزیمهای *AvrII* و *NotI* در ناقل pGAPZαA هضم شده باین دو آنزیم وارد شد (شکل ۵). جایگاه برش آنزیم *NotI* تعبیه شده در انتهای ۵' آغازگر Reverse، با توالی لینکر ۳ اسید آمینه ای همپوشانی دارد لذا می‌توان برای کد نمودن لینکر ۳ اسید آمینه ای آلانین از آن استفاده نمود. واکنش اتصال به سلولهای *E. coli* سویه DHB10 منتقل گردید. باکتریهای تراریخت بر روی محیط LB حاوی زئوسین به عنوان نشانگر انتخابی رشد داده شدند. سازه استخراج شده از کلونیهایی به دست آمده به نام pGAPZαAΔsppgip2 نامگذاری شده و در مرحله بعدی فرآیند همسانه سازی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۵).

ب- ساخت سازه pGAPZαAΔsppgip2aaapgip1: به منظور همسانه سازی ژن *pgip1* در پایین دست ژن *pgip2* در سازه pGAPZαAΔsppgip2 (به دست آمده از مرحله قبلی)، محصول PCR این ژن که با استفاده از آغازگرهای

شکل ۵- شماتیک استراتژی کلونینگ توأم ژنهای *pgip2* و *pgip1* در ناقل بیانی گیاهی pBI121



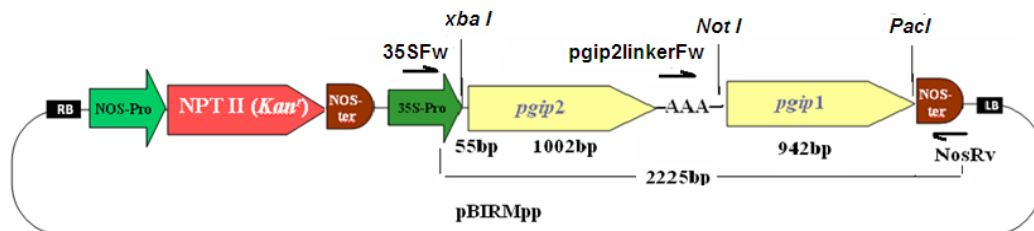
سازه pBIMODsppgip2aaapgip1 به دست آمده با استفاده از الگوی هضم آنزیمی و PCR مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۶). برای سهولت استفاده از نام سازه مذکور، این سازه به نام pBIRMpp (حاوی ژن کایمری *pgip2* و *pgip1* که به وسیله لینکر ۳ اسید آمینه ای آلانین به هم متصل شده اند) نامگذاری گردید (شکل ۵).

بحث

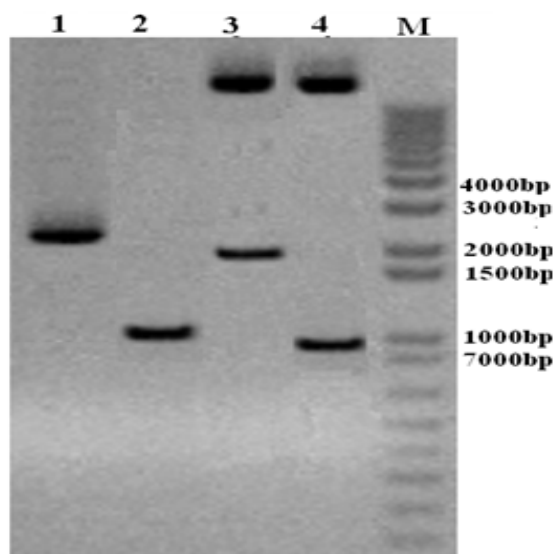
مطالعات مختلف نشان می‌دهد که در طول کشت گیاهان زراعی کاهش محصول ناشی از حمله قارچهای پاتوژن به گیاهان همواره به عنوان اصلی‌ترین عامل زیانهای اقتصادی محسوب می‌شود (۳ و ۴۳). ژنهای دخیل در مکانیسمهای دفاعی گیاهان بعد از تماس گیاه با یک عامل زنده و یا غیر زنده فعال شده و پروتئینهایی که در ایجاد مقاومت در گیاه نقش دارند را کد می‌کنند (۳، ۱۰، ۱۷، ۳۲ و ۳۸). در آپوپلاست بسیاری از گیاهان دو لپه ای و معدودی از گیاهان تک لپه ای غنی از پکتین (نظیر پیاز، لوبیا، تره و همچنین در آرابیدوپیزیز و گل اطلسی) پروتئینهای مهار کننده اندو پلی گالاکتوروناز که از مهم ترین گروه مهار کننده آنزیمهای پکتیناز می باشند، شناسایی شده اند (۸ و ۹). PGIPها یکی از مهم ترین ژنهای دفاعی گیاهان در مقابل حملات پاتوژن‌ها می باشند (۱۰، ۱۵ و ۳۹). که به صورت اختصاصی قادر به مهار فرمهای ایزوآنزیمی آنزیم پلی گالاکتوروناز می باشند (۳۹). از آنجا که پروتئینهای PGIP با مهار فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز، قادرند مانع نفوذ قارچ و کلونیزاسیون آن در گیاه میزبان گردند (۱۰، ۱۲ و ۱۷) و با توجه به اینکه که بیان PGIP در گلابی، تنباکو، آرابیدوپسیس، برنج، گوجه فرنگی، سیب زمینی و انگور ترانس ژنیک، گسترش بیماری توسط تعدادی از قارچهای مختلف را کاهش می دهد (۱۶، ۳۳ و ۴۱).

بیوتکنولوژی راه مؤثری برای کنترل بیماریها بوده و از اهمیت اقتصادی بالایی برخوردار می‌باشد (۲۷ و ۳۷).

بنابراین انتقال ژنهای مقاومت در برابر بیماریها از جمله انتقال ژنهای *pgip* به گیاهان از طریق روشهای



A



B

شکل ۶-۸- شکل شماتیک کاست بیانی کایمیری، محل آغازگرها و همچنین جایگاه آنزیمهای برشی مشخص شده است.

(B) تأیید سازه pBIRMpp توسط هضم آنزیمی و PCR. ۱: محصول PCR با جفت پرایمرهای 35SFw/NosRv. ۲: محصول PCR با جفت پرایمرهای pgip2linkerFw/NosRv. ۳: الگوی هضم آنزیمی سازه pBIRMpp با آنزیمهای (*XbaI* و *PacI*). ۴: الگوی هضم آنزیمی سازه pBIRMpp با آنزیمهای (*NotI* و *PacI*). M: نشانگر مولکولی Ladder 1Kb plus.

لینکرهای آلانین در تولید پروتئینهای کایمیری به طور معمول استفاده می‌گردد، مطالعه تأثیر طول لینکر آلانین در پایداری و فعالیت پروتئین به وسیله Clifford et al (1998) انجام شده است. این لینکرها به دلیل هیدروفوب بودن باعث متمایز و مجزا قرار گرفتن دو پروتئین به هم متصل شده می‌گردد و لذا دو پروتئین متصل شده می‌توانند

در این تحقیق سازه واجد ژن کایمیری *pgip1-pgip2-sp* AAA-حاوی ژنهای *pgip1* و *pgip2* که به وسیله لینکر ۳ اسید آمینه ای آلانین به هم متصل شده اند جهت انتقال به گیاه طراحی و ساخته شد. این طراحی به نحوی است که به طور همزمان هر دو نوع پروتئین خاصیت مهاری خود را اعمال خواهند کرد.

کایمیریک نو ترکیب بیشتری امروزه تحت اهداف و عناوین مختلفی مانند واکسن، دارو و غیره طراحی و تولید شده است. مانند پروتئین کایمیریک GA733-Fc که به عنوان کاندیدای واکسن برای سرطان کلورکتال می باشد نام برد (۴۵) و پروتئین کایمیریک مهارکننده ویروس HIV-1 است که گلیکوپروتئین gp41 ویروسی را با پتانسیل و پایداری بالا مورد هدف قرار می دهد (۶).

با استفاده از سازه به دست آمده در این تحقیق می توان جهت تولید پروتئین کایمیری حاوی دو ژن *pgip2* و *pgip1* در گیاهان مورد نظر برای مهار فعالیت فرمهای مختلف آنزیم پلی گالاکتورناز قارچهای بیماری زا استفاده نمود.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از همکاری علمی پروفیسور Giulia De Lorenzo از دانشگاه Sapienza Università di Roma در اجرای این تحقیق سپاسگزاری می گردد. همچنین از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به دلیل تأمین بوجه پژوهشی این تحقیق (طرح ۳۵۳) تشکر و قدردانی به عمل می آورد.

فعالیت بیولوژیکی خود را حفظ کنند (۵، ۲۸ و ۲۹). آنالیزهای بیوانفورماتیکی در این تحقیق هم نشان داد که پروتئینهای متصل شده به وسیله لینکر آلانین از نظر ساختار فضایی از هم کاملاً 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 بخشهای جدا از هم فعالیت مهاری داشته باشند.

همچنین در این تحقیق ساختار ثانویه mRNA کایمیری *pgip2-AAA-pgip2* از لحاظ میزان حداقل انرژی که نشان دهنده میزان پایداری آن می باشد و نیز عدم داشتن ساختارهای 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 می باشد.

فن آوری دستیابی به پروتئینهای کایمیری یک استراتژی کارآمد با صرفه اقتصادی و پرسرعت برای بیان پروتئینهایی است که بتوانند به طور همزمان فعالیت داشته باشند. ساخت این نوع پروتئینها در تولید داروهای چند منظوره بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (۴، ۵ و ۱۸). پروتئینهای

منابع

1. Ambrish, R., Alper, K., and Yang, Z. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 5(4), 725–738.
2. Boller, T., Felix G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60, 379-406.
3. Bolton, M.D., Thomma, B.P., Nelson, B.D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol Plant Pathol* 7, 1–16.
4. Center, R.J., Kobe, B., Wilson, K.A., Teh, T., Howlett, G.J., Kemp, B.E., and Pountourios, P. (1998). Crystallization of a trimeric human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain fragment as a chimera with maltose-binding protein. *Protein Sci.* 7, 1612–1619.
5. Clifford, R., Robinson and Robert, T., Sauer (1998). Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 95, pp. 5929–5934.
6. Chungun, P., Lifeng, C., Hong, L., Lu, L., and Shibo, J. (2011). A Novel Chimeric Protein-based HIV-1 Fusion Inhibitor Targeting gp41 Glycoprotein with High Potency and Stability. *J Biol Chem.* 12; 286(32): 28425–28434.
7. Cook, B.J., Clay, R.P., Bergmann, C.W., Albersheim, P., Darvill, A.G. (1999). Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differ in their susceptibilities to polygalacturonase-inhibiting proteins. *Mol. Plant Microbe In.* 12, 703–711.
8. De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., Cervone, F. (2001). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 39, 313-335.

9. De Lorenzo, G., F. Cervone, D. Bellicampi, C. Caprari, A.J. Clark, A. Desiderio, A. Devoto, R. Forrest, F. Leckie, L. Nuss and G. Salvi. (1994). Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication. *Biochem. Sci. Trans.* 22, 396-399.
10. De Lorenzo, G., Ferrari S. (2002). Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 295-299.
11. De Lorenzo, G., R. Castoria, D. Bellincampi and F. Cervone. (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.
12. Desiderio, A., Aracri, B., Leckie, F., Mattei, B., Salvi, G., Tigelaar, H., Van Roekel JSC., Baulcombe, D.C., Melchers, L.S., De Lorenzo, G., Cervone, F. (1997). Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant-Microbe Interact* 10, 852-860.
13. Dixon, M., D. Jones, J. Keddie, C. Thomas, K. Harison and J. Jones. (1996). The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeats proteins. *Cell.* 84, 457-459.
14. Favaron, F., R. D'ovidio, E. Porceddu and P. Alghisi. (1994). Purification and molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein. *Planta.* 195, 80-87.
15. Federici, L., Di Matteo, A., Fernandez Recio, J., Tsernoglou, D., Cervone, F. (2006). polygalacturonase inhibiting proteins: players in plant innate immunity? *Trends in Plant Science* 11, 65-70.
16. 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(1), 31-38.
17. Ferrari, S., Vairo, D., Ausubel, F.M., 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.
18. Giavedoni, L.D., Jones, L., Gardner, M.B et al. (1992) Vaccinia virus recombinants expressing chimeric proteins of human immunodeficiency virus and ginterferon are attenuated for nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 3409-13.
19. Gustafsson, C., Govindarajan S and Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *TRENDS in Biotechnology* Vol.22 No.7 July
20. Hahn, M.G., P. Buchell, F. Cervone, S.H. Doares, R.A. O'Neill, A. Darvill and P. Albersheim. (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.
21. Huang, Q., and C. Allen. (2000). Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanaceae* on tomato plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57, 77-83.
22. Janni, M., Sella, L., Favaron, F., Blechl, A.E., 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 *Bipolaris sorokiniana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 171-177.
23. Johnston, D.J., B. Williamson and G.P. Mcmillan. (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.
24. Joubert, D.A., Kars, I., Wagemakers, L., Bergmann, C., Kemp, G., Vivier, M.A., van Kan, J.A.L. (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, 392-402.
25. Kubicek C.P., Mach R.L., Peterbauer C.K., and Lorito M. (2001). *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology.* 83(2), 11-23.
26. 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. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67, 108-115.

27. Martin, A., Camacho, M., Portaels, F. & Palomino, J. C. (2003). Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3616–3619.
28. Masahiro, W., Yumiko, M., Ichiro, Y., Sam-Yong, P., Jeremy, R.H., and Jonathan G. H. (2008). Intersubunit linker length as a modifier of protein stability: Crystal structures and thermostability of mutant TRAP. *Protein Sci.* 17(3), 518–526.
29. McWherter, C.A., Feng, Y., Zurfluh, L., Klein, B.K., Baganoff M.P., Polazzi, J.O., Hood, W.F., Paik, K., Abegg, A.L., Grabbe E.S et Al. (1999). Circular permutation of the granulocyte colony-stimulating factor receptor agonist domain of myelopointin. *Biochemistry.* 38, 4564-4571.
30. Michael, Z. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* Vol. 31, No. 13.
31. Motallebi, M., M.R. Zamani and A. Hosseinzadeh Colagar. (2003). Relationship between polygalacturonase activity and pathogenicity among Iranian isolates of *Ascochyta rabiei*. *J.Sci & Technol. Agric & Natur. Resour.*, Winter 2003, Ifahan. Univ. Technol. Isfahan. Iran. 6(4), 159-169.
32. Newman, M.A et al. (1994). Defense related gene induction in *Brassica campestris* in response to defined mutants of *Xanthomonas campestris* with altered pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interact*, 7, 553–563.
33. Oelofse, D. et al. (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.
34. Powell, A.L.T., van Kan, J., ten Have, A., Visser, J., Greve, L.C., Bennett, A.B., Labavitch, J.M. (2000). Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 942-950.
35. Salvi, G., F. Giarrizzo, G. De Lorenzo and F. Cervone. (1990). A polygalacturonase-inhibiting protein in the flowers of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology.* 136: 513-518.
36. Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning A Laboratory manual.* 3rd Edition Cold Spring Harhor Press. New York.
37. Scholten, O.E., Klein-Lankhorst, R.M., Esselink, D.G., De Bock, T.S., Lange. W. (1997). Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to resistance against beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in Beta accessions. *Theor Appl Genet.* 94(1), 123-30.
38. Seidl V., Schmoll M., Scherm B., Balmas V., Seiboth B., Migheli Q., Kubicek C P. (2006). Antagonism of *Pythium* blight of Zucchini by *Hypocrea jecorina* does not require cellulase gene expression but is improved by carbon catabolism derepression. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 257 Page 145 - April 2006.
39. Shanmugam, V. (2004). Role of extracytoplasmic leucine rich repeat proteins in plant defence mechanisms. *J. Microbiological Research*, 09-014.
40. Shieh, M.T., R.L. Brown, M.P. Whitehead, J.W. Cary, P.J. Cotty, T.E. Cleveland and R.A. Dean. (1997). Molecular genetics evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton balls. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3548–3552.
41. Tamura, M., Gaob, M., Tao, R., Labavitch, J.M., Dandekar, A.M. (2004). Transformation of persimmon with a pear fruit polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) gene. *Sci Hort* 103, 19–30.
42. ten Have, A., W. Mulder, J. Visser and J.A. van Kan. (1998). The endopolygalacturonase gene Bcpg 1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 1009–1016.
43. Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., van Kan, J.A.L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol* 8, 561–580.
44. Zamani, M.R., M. Motallebi and M.A. Arefpour. (2000). Comparative study of polygalacturonase activity from different Iranian isolates of *Fusarium oxysporum*. *Iranian Journal of Agricultural Science.* 31, 293-302.
45. Zhe, L., Kyung-Jin, L., Yingxue, S., Jeong-Hwan, L., Yangkang, S., Young-Kug, C., Doo-Byoung, O., Kyung-A, H., Seung, H.h., Yeon, S.n., and Kisung, K. (2012). Expression of GA733-Fc Fusion Protein as a Vaccine Candidate for Colorectal Cancer in Transgenic Plants. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* Volume 2012, Article ID 364240, 11 pages

Construction of plant expression cassette for production of chimeric protein containing PGIP1 and PGIP2

Mohammadzadeh R.², Motallebi M.¹ and Zamani M.R.¹

¹ National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

² Cell and Molecular Biology Dept., Maragheh University, Maragheh, I.R. of Iran

Abstract

Polygalacturonase inhibiting proteins (PGIPs) selectively inhibit the polygalacturonases (PGs) secreted by the invading plant pathogenic fungi. The PGIPs display the differential inhibiting towards the PGs from different fungi, also towards the different isoforms of the PGs originating from the specific pathogen. In this study an expression cassette was constructed to produce a chimeric protein containing PGIP1 and PGIP2 as a fused protein using three alanine as linker. The chimeric gene is under the control of CaMV 35S promoter and NOS as terminator. Pgps1 and pgip2 genes have been amplified from Naz cultivar of bean. All the intermediate and final constructs were confirmed by PCR and restriction digestion patterns. In addition, the final construct also was confirmed by sequencing. The Chimeric construct from this study can be used to produce transgenic plants resistant to fungal pathogens.

Key words: polygalactronase inhibition protein (PGIP), plant expression cassette, polygalactronase enzyme