



همسانه سازی و بیان ژن پیلین باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

حمیده رئیسی^۱، محمدرضا صفرنژاد^{۲*}، سید مهدی علوی^۳، سید علی الهی نیا^۴، ناصر فرخی^۵

^۱ دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

^۲ دانشیار بخش ویروس‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی ایران، تهران، ایران.

^۳ استادیار بخش بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، تهران، ایران.

^۴ استاد گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

^۵ استادیار گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۱۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳

چکیده

بیماری شانکر باکتریایی مرکبات توسط باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) ایجاد می‌شود. سیستم ترشحی نوع سه این باکتری دارای یک ساختار خارج سلولی رشته‌ای است که پروتئین‌های باکتریایی را به داخل سلول گیاه وارد می‌کند. پروتئین پیلین (*HrpE*) جزء اصلی تشکیل دهنده پیلوس می‌باشد که توسط ژن *HrpE* کد می‌شود. تولید پادتن اختصاصی علیه پروتئین پیلین می‌تواند به منظور شناسایی گیاهان آلوده و همچنین به عنوان منبع ژنتیکی مقاومت علیه بیماری مورد استفاده قرار گیرد. غیرفعال‌سازی پروتئین *HrpE* با استفاده از پادتن می‌تواند منجر به سرکوب بیماری در گیاه شود. هدف از این تحقیق جداسازی و بیان ژن *HrpE* و خالص‌سازی پروتئین حاصل از آن بود. برای این منظور، قطعه ژنی *HrpE* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جدا و در ناقل pTZ57R/T همسانه‌سازی شد. بیان این ژن به صورت نوترکیب در ناقل pET28a(+) و در سویه Rosetta باکتری *Escherichia coli* انجام شد. بهینه‌سازی تولید پروتئین نوترکیب تحت تاثیر زمان‌های مختلف، دمای نگهداری و همچنین غلظت‌های مختلف القاکننده مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین مقادیر بیان در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و طی زمان ۱۶ ساعت و با IPTG یک میلی‌مولار به‌دست آمد. خالص‌سازی پروتئین نوترکیب *HrpE* با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی بر روی ستون نیکل صورت پذیرفت. نتایج آزمون‌های الکتروفورز پروتئین و وسترن بلائینگ با استفاده از پادتن‌های اختصاصی، صحت بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب پیلین را مورد تایید قرار دادند. پروتئین نوترکیب تولید شده می‌تواند به عنوان آنتی‌ژن برای تولید پادتن‌های تخصصی تک همسانه‌ای و چند همسانه‌ای مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: شانکر باکتریایی مرکبات، پروتئین نوترکیب، سیستم ترشحی تیپ ۳، ژن *HrpE* پیلوس.

مقدمه

پاتوتیپ‌های A^w و A^* از نظر دامنه میزبانی محدود بوده ولی از نظر نوع علائم مشابه پاتوتیپ A هستند. فرم آسیایی (A^*) این بیماری در ایران روی میوه لیموترش گزارش شده است (Roohani *et al.*, 2012). شانکر آسیایی مرکبات روی ارقام حساس منجر به ریزش برگ، سرخشکیدگی شاخه، ریزش زود هنگام میوه، کاهش بازاری پسندی و کاهش قیمت میوه می‌شود (Graham Gottwald *et al.*, 2002; Duan *et al.*, 1999).

معمولاً بیماری‌زایی در باکتری‌ها تحت تاثیر ژن‌های کنترل‌کننده بیماری‌زایی می‌باشد که در کلاسترهای بزرگ ژنی قرار دارند. با بررسی توالی کلاسترهای ژنی در انواع مختلف باکتری‌ها، شباهت‌های زیادی بین این نواحی و ژن‌های دخیل در شکل‌گیری تاژک دیده می‌شود. ژن‌های دخیل در سیستم ترشح پروتئین نوع سه از جمله نواحی بسیار محافظت شده می‌باشند که نقش مهمی در فرآیند بیماری‌زایی در باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی دارند و باعث انتقال فاکتورهای بیماری‌زایی به درون سلول‌های گیاهی می‌شود (Cornelis *et al.*, 2000; Mokhtari *et al.*, 2015). در سیستم ترشحی نوع سه، انتقال پروتئین‌های افکتور به درون سلول گیاهی توسط یک ساختار سرنگی شکل تحت عنوان اینجکتوزوم صورت می‌پذیرد. بخش خارج سلولی اینجکتوزوم عمدتاً شامل پیلوس است

مرکبات، از محصولات باغی استراتژیک ایران است که مقام اول را در بین تولیدات باغی کشور با سطح زیرکشت ۲۶۸ هزار هکتار و ۴/۳ میلیون تن تولید در سال دارد (Ebrahimi, 2009). با توجه به سطح زیر کشت مرکبات، سهم ایران ۳/۷ درصد از تولید مرکبات جهان می‌باشد که این میزان تولید باعث شده است ایران رتبه هفتم تولید مرکبات در جهان را به خود اختصاص دهد (FAO, 2014).

شانکر باکتریایی مرکبات از بیماری‌های مهم مرکبات است که توسط باکتری *Xanthomonas citri subsp. citri* (Xcc) ایجاد می‌شود (Shaad *et al.*, 2006). لیموترش از میزبان‌های این باکتری در جنوب ایران است (Khodakaramian *et al.*, 1999). بیماری شانکر مرکبات اولین بار در اواخر قرن نوزده در ژاپن دیده شد و شرح آن توسط Clara Hasse (1915) پس از ورود به آمریکا نوشته شد (Shaad *et al.*, 2005; Schoulties *et al.*, 1987). در ایران بیماری شانکر مرکبات اولین بار در سال ۱۳۶۹ توسط علیزاده و رحیمیان در کهنوج گزارش شد (Alizadeh and Rahimian, 1990).

عامل شانکر مرکبات دارای پاتوتیپ‌های مختلفی (پاتوتیپ A ، A^* و A^w) است که روی گونه‌های مرکبات بیماری‌زا هستند. پاتوتیپ A انتشار جهانی داشته و به خاطر قدرت تهاجم زیاد و دامنه میزبانی وسیع بیشترین توجه را به خود اختصاص داده است.

حاضر، جداسازی و بیان ژن *HrpE*، خالص سازی و تولید انبوه پروتئین ژن مذکور بوده است. از پروتئین نوترکیب تولید شده میتوان در پژوهش های بعدی به منظور تولید پادتن تک همسانه ای اختصاصی برای ایجاد مقاومت به بیمارگر با ایجاد گیاهان تراریخته استفاده نمود.

مواد و روش ها

سویه های باکتری و وکتور

سویه ۸۸ باکتری *X. citri* subsp. *citri* باکتری *E. coli* DH5 α و پلاسمید pET28a (تهیه شده از کلکسیون پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج DNA باکتری

باکتری در ۱۰ میلی لیتر محیط مایع LB^۱ به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سلیسیوس و ۱۵۰ دور در دقیقه کشت شد. به منظور استخراج DNA باکتری از کیت استخراج (Bioneer, Daejeon, South Korea) مطابق دستورالعمل مربوطه استفاده شد. کیفیت DNAی استخراجی با استفاده از ژل آگارز یک در صد مورد بررسی قرار گرفت.

تکثیر به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز

جهت جداسازی ژن *HrpE*، ابتدا آغازگر اختصاصی ژن مربوطه با استفاده از منابع بانک

که به صورت میله ای نازک و طویل قادر به نفوذ در دیواره سلولی متخلخل گیاه است (Koebnik, 2005). جز اصلی پیلوس، پروتئین پیلین *HrpE* است که به وسیله ی قطعه ژنی *HrpE* کد می شود (Buttner and Yang, 2009). این قطعه ژنی ۲۸۲ نوکلئوتید دارد و موتاسیون در آن سبب عدم تشکیل پیلوس و عدم ایجاد بیماری یا واکنش فوق حساسیت (HR) می شود. بنابراین تشکیل پیلوس در برهم کنش های تحت کنترل گیاه- باکتری ضروری است (Weber et al., 2005).

در میان راهبردهای مورد استفاده در جهت مدیریت بیماری، تولید رقم مقاوم جز موثرترین روش های پیش گیری بیماری می باشد. دستیابی به منابع مقاوم ژنتیکی از راه کارهای مهم در تولید ارقام مقاوم به بیماری است (Safarnejad et al., 2011). در تولید ارقام مقاوم علاوه بر غربالگری منابع ژنتیکی مقاومت موجود، می توان از پادتن های اختصاصی بر علیه پروتئین های ضروری پاتوژن استفاده کرد (Swarup et al., 1992). بر این اساس پروتئین *HrpE* با توجه به وظیفه اصلی که در ایجاد بیماری دارد، می تواند به عنوان گزینه ای مناسب در ایجاد مقاومت بکار گرفته شود. بیان هترولوگ پروتئین نوترکیب در مطالعات مربوط به بررسی نقش پروتئین و تولید آنتی بادی های اختصاصی می تواند در این مسیر راهگشا باشد (Ariannejad et al., 2012). بنابراین هدف از اجرای تحقیق

¹ Luria broth

همسانه‌سازی در وکتور PTZ57R/T

پس از تأیید محصول PCR بر روی ژل آگارز، قطعه تکثیر شده ژن *HrpE* در ناقل PTZ57R/T به روش T/A کلونینگ و همسانه‌سازی طبق دستورالعمل شرکت سازنده (InsTAclone™ PCR Cloning Kit, Fermentas, Vilnius, Lithuania) انجام شد. تأیید همسانه‌سازی، به روش تعیین ترادف توسط آغازگرهای یونیورسال (T7 promoter) توسط شرکت فزایژوه (تهران، ایران) انجام شد. استخراج پلاسمید بر مبنای کیت (Roche, Mannheim, Germany) و طبق دستورالعمل شرکت مربوطه صورت گرفت.

همسانه‌سازی در وکتور بیانی (+) pET28a

انتقال قطعه ژنی *HrpE* به پلاسمید بیانی (+) pET28a به صورت زیر انجام شد. برای این منظور سازه‌های pTZ57R/T-HrpE و pET28a (+) به صورت جداگانه با آنزیم برشی *Xho1/Sal1* برش داده شدند. پس از جداسازی، قطعه مربوطه از روی ژل آگارز خالص‌سازی و الحاق قطعه ژنی *HrpE* در ناحیه پایینی توالی تکرار شش‌تایی هیستیدین ناقل بیانی با استفاده از واکنش آنزیمی T4 DNA ligase صورت پذیرفت و سازه pET28a-HrpE به روش شوک حرارتی به سویه *E. coli* DH5α وارد شد (Sambrook et al., 1996).

بررسی بیان پروتئین نو ترکیب

جهت بررسی بیان ژن تولیدکننده پیلوس در میزبان باکتریایی، بیان ژن در شرایط مختلف دمایی

اطلاعاتی NCBI طراحی شد و به منظور تسهیل در فرآیند همسانه‌سازی در وکتور بیانی، قطعات سایت برشی مربوط به آنزیم‌های برشی *Xho1/Sal1* در نواحی ۵' آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو وارد شد. واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر انجام شد، که شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۷ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۳ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو (آغازگر پیوسته) رو ۳'-TAAAATGTCGACAAATGGAATTATTA-۵' و آغازگر پیوسته رو ۳'-TAAAATCTCGAATTACTGGCCAACGG-۵' (CTG-۵')، یک میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۱۰ نانوگرم و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNA Polymerase Taq (Fermentas, Pittsburgh PA, USA) بود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۴۰ سیکل شامل (یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، یک دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس) ده دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. بعد از انجام PCR محصول واکنش به وسیله‌ی روش الکتروفورز روی ژل آگارز یک در صد جدا سازی شد. باند مورد نظر از روی ژل با استفاده از کیت استخراج از ژل و طبق دستورالعمل شرکت مربوطه (Bioneer, Daejeon, South Korea) خالص‌سازی شد.

انجام شد. رسوب به صورت شبانه در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. معلق‌سازی رسوب با استفاده از بافر لیزکننده صورت گرفت و تخریب دیواره سلولی باکتری با استفاده از امواج صوتی اولتراسونیک با توان ۲۰۰ وات به تعداد هفت دوره ۱۰ ثانیه ای با فواصل میانی ۱۰ ثانیه، بر روی یخ صورت گرفت. سلول‌های تخریب شده به مدت ۳۰ دقیقه در سانتیفریوژ یخچال دار با دمای ۴ درجه سلسیوس و با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ شدند و محلول رویی جهت استفاده در ستون دارای رزین نیکل (Ni^{2+}) جدا سازی شد. با توجه به اینکه قطعه ژنی کلون شده در انتهای آمینی خود دارای دنباله شش تایی هیستیدین^۱ است، پروتئین بیان شده HrpE همراه با این دنباله است و می‌توان آن را توسط کروماتوگرافی و با استفاده از ستون دارای رزین نیکل (Ni^{2+}) تخلیص کرد (Shahryari et al., 2013). تأیید مرحله بیان و خالص‌سازی پروتئین توسط ژل پلی‌اکریل‌آمید و همچنین آزمون وسترن بلائینگ انجام شد (Ausubel et al., 1995). به منظور ردیابی پروتئین نوترکیب متصل به His-tag از پادتن اولیه anti His-tag و سپس پادتن ثانویه GAM^{AP} استفاده شد. ظهور باندهای اختصا صی مربوط به پروتئین نوترکیب متصل به ترادف شش تایی هیستیدین با افزودن سوبسترای نیتروبلوتترازولیوم^۲ (BCIP/NBT) صورت پذیرفت.

و تحت غلظت‌های مختلف ۰/۵ و یک میلی‌مولار IPTG و در زمان‌های ۳، ۶ و ۱۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (Sadeghi et al., 2011). به منظور ارزیابی میزان بیان ژن HrpE در باکتری در حالات مختلف بیانی، از روش SDS-PAGE استفاده شد. برای این منظور ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲٪ مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت به روش کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد (Surendran et al., 2015).

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب پس از بهینه‌سازی شرایط بیان و تحت شرایط طبیعی با استفاده از ستون آگارز حاوی یون‌های نیکل صورت پذیرفت. برای این منظور، ابتدا کلنی باکتری *E. coli* سویه Rosetta حاوی سازه pET28a-HrpE در محیط کشت مایع LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامیسین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۲-۳ ساعت کشت شد تا جذب نوری (OD 600nm) آن به ۰/۴ برسد. به منظور القاء باکتری برای تولید پروتئین نوترکیب، IPTG با غلظت نهایی یک میلی‌مولار اضافه شد و محیط کشت به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و در انکوباتور با ۲۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از گذشت زمان مورد نظر، جدا سازی سلول‌های باکتریایی با انجام سانتیفریوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه

² 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/Nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT)

¹ 6xhis-tag

نتایج و بحث

با توجه به نقش حیاتی و مهمی که پیلوس در پروسه‌ی بیماری‌شانکر دارد، جداسازی و تکثیر قطعه ژن کدکننده زیر واحدهای این ملکول انجام شد. پس از استخراج DNA از کلنی‌های رشدیافته، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *HrpE* انجام شد. باند مربوط به ژن تکثیر شده بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد. نتایج حاصله حاکی از جداسازی و تکثیر قطعه‌ای در حدود ۲۸۲ جفت باز بود. اندازه‌ی قطعه از طریق مقایسه با مارکر ملکولی استاندارد تأیید شد (شکل ۱- الف).

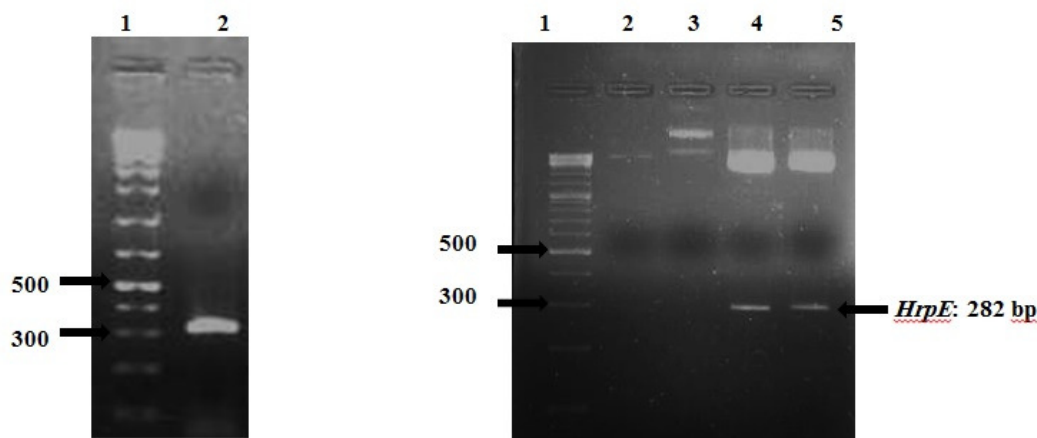
قطعه ژنی تکثیر یافته مربوطه از روی ژل آگارز جداسازی و در ناقل pTZ57R/T همسانه‌سازی شد. به منظور بررسی صحت فرایند همسانه‌سازی، تعیین ترادف انجام و مورد تأیید قرار گرفت. همترازی ترادف مذکور با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی ژن NCBI، حاکی از وجود تشابه بسیار بالا (۱۰۰-۹۵ درصد) در ترادف این قطعه ژنی در سویه‌ها و یا حتی گونه‌های مختلف زاناموناس بود. این تشابه به دلیل اهمیت وجود ساختار محافظت شده این پروتئین برای ایفای نقش اساسی آن در فرایند انتقال پروتئین افکتور و بیماری‌زایی می‌باشد (Shiotani, Nino-Liu et al., 2006 et al., 2007).

انتقال قطعه ژنی *HrpE* به ناقل بیانی pET28a(+) با انجام واکنش هضم آنزیمی (شکل ۱- ب) و الحاق مجدد توسط آنزیم T4 صورت پذیرفت. ناقل بیانی

pET28a(+) به منظور تولید پروتئین نوترکیب در میزبان باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت. این پلاسمید دارای ترادف‌های کدکننده دنباله هیستیدین می‌باشد، وجود این ترادف باعث تسهیل فرآیند خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون آگاروز حاوی ذرات نیکل می‌شود (Berlec et al., 2006). تأیید فرآیند همسانه‌سازی با انجام آزمون‌های کلنی PCR و هضم آنزیمی مجدد صورت پذیرفت.

پس از انتقال پلاسمید نوترکیب pET28a-HrpE به سویه بیانی Rosetta باکتری *E. coli*، تولید پروتئین توسط IPTG بررسی شد. در طی مراحل مختلف بیان و خالص‌سازی پروتئین، نمونه‌هایی برداشت شده و این روند با انجام الکتروفورز پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۲- الف). با توجه به نتایج پروتئین در وزنی حدود ۲۶ کیلو دالتون مشاهده شد که مطابق با وزن پیش‌بینی شده بود. نتایج مربوطه نشان داد که بهترین زمان القاء توسط IPTG برای بالاترین میزان بیان پروتئین، ۱۶ ساعت و غلظت یک میلی مولار از IPTG بود.

در خصوص تولید پروتئین HrpE در *E. coli* به نظر می‌رسد که با توجه به تشابه نوع میزبان که هر دو پروکاریوت هستند، مشکل خاصی در بیان ژن مربوطه ایجاد نشد.



الف

ب

شکل ۱- الف: تکثیر ژن *HrpE* به کمک واکنش PCR و مشاهده آن بر روی ژل آگارز یک درصد. چاهک ۱: مارکر (DNA Ladder Mix)، چاهک ۲: ژن *HrpE* با طول تقریبی حدود ۳۰۰ جفت باز. ب: هضم آنزیمی به منظور جداسازی قطعه ژنی *HrpE* از پلاسمید pTZ57R/T دارای این قطعه ژنی. چاهک ۱: مارکر (DNA Ladder Mix)؛ چاهک ۲ و ۳: واکنش هضم آنزیمی پلاسمید pET28a؛ چاهک ۴ و ۵: واکنش هضم آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T دارای قطعه ژنی *HrpE* و جداسازی قطعه *HrpE*.

Figure 1- A: Amplification of *HrpE* gene and its PCR product on 1% (w/v) agarose gel Lane 1: DNA Ladder Mix, lane 2: *HrpE* gene with length around 300 bp. B: Isolation of *HrpE* gene from pTZ57R/T- *HrpE* by double digestion of construct (Lane 1: DNA Ladder Mix, lane 2,3: double digestion of pET28a, lane 4,5: Double digestion of pTZ57R/T-pthA for isolation of *HrpE* gene.

نو ترکیب *HrpE* در میزبان باکتریایی و خلوص بالای آن در نمونه خالص شده است (شکل ۲-ب).
با مقایسه باند پروتئین خالص با باندهای موجود در نشانگر پروتئین، وزن پروتئین نو ترکیب در حدود ۲۶ کیلو دالتون تعیین شد که از این مقدار ۲۳/۲ مربوط به پروتئین اصلی و مابقی مربوط به دنباله متصل به پروتئین ناشی از پلاسمید بیانی است.
نتایج ردیابی پروتئین نو ترکیب با استفاده از پادتن علیه His-tag در مجاورت کنترل منفی و با روش

بنابراین، با توجه به نقش حیاتی این قسمت از پروتئین در فرآیند بیماری زایی، تولید و خالص سازی این قسمت به منظور تهیه آنتی بادی های اختصاصی صورت پذیرفت.
پس از تخریب سلول های باکتری و آزاد سازی پروتئین های سلولی، جداسازی و خالص سازی پروتئین نو ترکیب متصل به دنباله هیستیدین با استفاده از ستون آگاروز حاوی ذرات نیکل صورت پذیرفت.
نتایج بیان و خالص سازی حاکی از بیان پروتئین

بیان انواع پروتئین‌ها در سویه Rosseta به دلیل داشتن tRNA های برای کدون‌های نادر امکان پذیر است و در نتیجه این سویه دارای توانایی تولید پروتئین نوترکیب با کارایی و میزان بیان بالاتر نسبت به سایر سویه‌های بیانی مانند سویه BL21 است (2010; Rosano & Ceccarelli, Tegel *et al.*,) (2014).

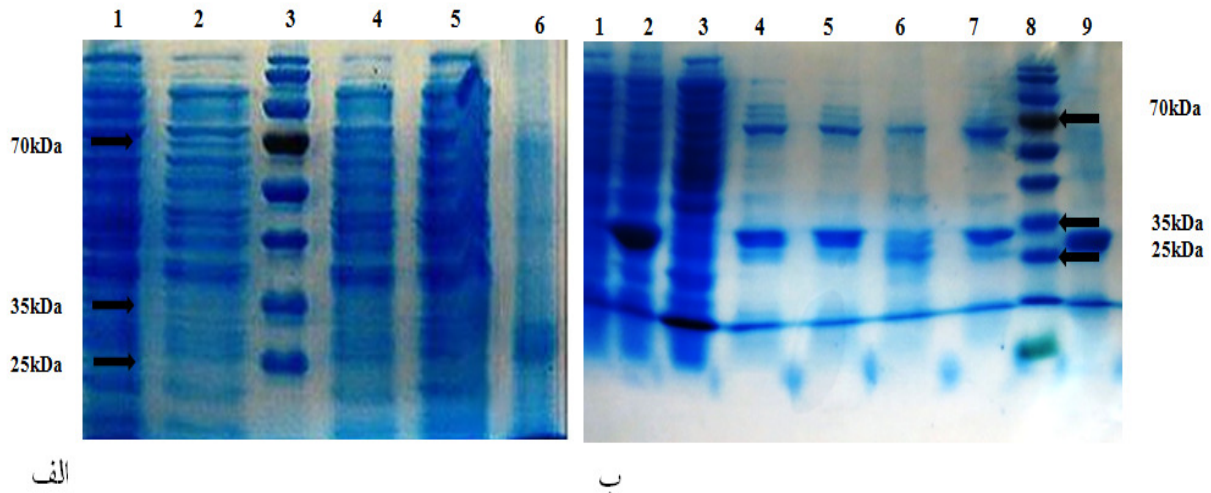
در این تحقیق برای اولین بار ژن *HrpE* از سویه ایجاد کننده فرم A* بیماری شانکر مرکبات جداسازی، بیان و خالص‌سازی گردید. سیستم تخلیص پروتئین نشان دهنده خلوص بالای پروتئین بود که در صورت استفاده از پروتئین به عنوان آنتی ژن از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است، زیرا از مراحل کلیدی در طراحی روش‌های تشخیص بیماری‌های گیاهی، تخلیص آنتی‌ژن است. پروتئین‌های ضروری در بیماری‌زایی عامل بیمارگر از گزینه‌هایی هستند که به عنوان آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زا و محافظتی شناخته شده‌اند. از آنتی‌ژن خالص‌سازی شده می‌توان در تولید آنتی‌بادی علیه بیمارگر در گیاه استفاده کرد.

وسترن بلائینگ، نشان داد که پروتئین نوترکیب HrpE با موفقیت تولید و تخلیص شد (شکل ۳).

بیان ژن هتروولوگوس در باکتری رایج‌ترین سیستم بیانی استفاده شده برای تولید سطح بالایی از پروتئین‌های نوترکیب برای امور تحقیقاتی و تجاری می‌باشد. *E. coli* متداول‌ترین میزبانی است که برای بیان بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود. از جمله مزایایی این سیستم بیانی تکثیر سریع، میزان بالای بیان پروتئین نوترکیب و قدرت بالا جهت پذیرش ژن‌های بیگانه می‌باشد (Rosano & Ceccarelli, 2014; Ariannejad *et al.*, 2012).

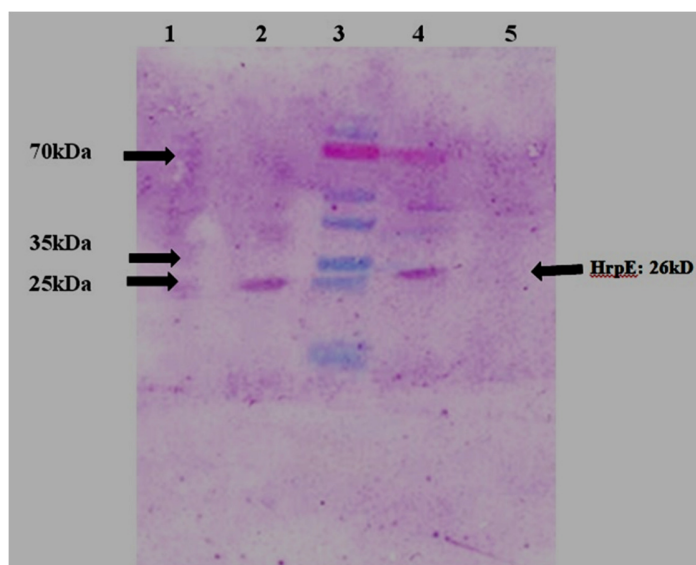
این سیستم‌ها تولید انبوه پروتئین متصل به دنباله هیستیدین و خالص‌سازی آن به وسیله کروماتوگرافی میل ترکیبی در شرایط طبیعی را تسهیل می‌کنند (Berlec *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2007). موارد متعددی از استفاده از این سیستم جهت بیان ژن‌های خارجی در میزبان باکتریایی برای تولید پروتئین نوترکیب گزارش شده است (Perrie *et al.*, 2008; Khatabi *et al.*, 2012; Safarpur *et al.*, 2012; Shahryari *et al.*, 2013; Thaitrong *et al.*, 2013).

در این تحقیق جهت تولید پروتئین نوترکیب از سازه‌های pET28a-HrpE استفاده شد که تحت کنترل پروموتور قدرتمند T7 بوده و تولید پروتئین با غلظت بالا در این سیستم صورت می‌پذیرد (Nanni *et al.*, 2013). بیان ژن در سازه‌های مورد نظر در سویه Rosseta باکتری *E. coli* صورت پذیرفت.



شکل ۲- الف: بررسی بیان ژن *HrpE* در شرایط مختلف القایی بر روی ژل SDS-PAGE (چاهک ۱: نمونه قبل از القاء؛ چاهک ۲: میزان بیان سه ساعت پس از القا با IPTG ۱ میلی مولار؛ چاهک ۳: نشانگر پروتئینی ۱۱۷۰ کیلو دالتون؛ چاهک ۴: بیان شش ساعت پس از القا با IPTG ۱ میلی مولار؛ چاهک ۵: بیان ۱۶ ساعت پس از القا با IPTG ۰/۵ میلی مولار؛ چاهک ۶: بیان ۱۶ ساعت پس از القا با IPTG ۱ میلی مولار). ب: خالص سازی پروتئین افکتور به صورت نو ترکیب متصل به دنباله شش تایی هیستیدین بر روی ستون نیکل (چاهک ۱: نمونه قبل از القا با IPTG؛ چاهک ۲: نمونه بعد از القا با IPTG یک میلی مولار؛ چاهک ۳: مرحله شستشو؛ چاهک ۴، ۵، ۶، ۷ و ۹: پروتئین تخلیص شده *HrpE* با وزن ۲۷ کیلو دالتون؛ چاهک ۸: نشانگر وزن ملکولی پروتئین).

Figure 2- A: SDS-PAGE analysis of *HrpE* expression in different IPTG concentrations and induction period. Proteins were analyzed by (Lane 1: uninduced cells, lane 2: 3 h post induction at 1 mM IPTG, Lane 3: 170 kDa protein marker; lane 4: 6 h post induction at 1 mM IPTG, Lane 5: 16 h post induction at 0.5 mM IPTG, Lane 6: 16 h post induction by 1 mM IPTG). B: Purification of effector protein as fused to 6×-His tag on nickel column (Lane 1: uninduced cells by IPTG, Lane 2: induction by 1 mM IPTG, Lane 3: washing stage, Lane 4, 5, 6, 7 and 9: Purified *HrpE* protein with molecular weight around 27 kDa, Lane 8: protein molecular ladder).



شکل ۳- آزمون وسترن بلات با استفاده از پادتن اختصاصی دنباله هیستیدین (چاهک ۱، ۲ و ۴: بیان قطعه ژنی HrpE بعد القا با ۱ میلی مولار؛ چاهک ۳: نشانگر پروتئینی؛ چاهک ۵: نمونه قبل از افزودن IPTG).

Figure 3- Western analysis by applying anti his-tag antibody (Lane 1, 2 and 4: HrpE expression after induction by 1 mM IPTG, lane 3: prestained marker, Lane 5: non-induced cells by IPTG).

تولیدی، می‌توان از طریق پادتن تک همسانه‌ای نوترکیب (recombinant monoclonal antibodies) بر علیه این پروتئین، مانع از تشکیل پیلوس شد و در نتیجه مانع انتقال افکتور پروتئین به داخل سیتوسل سلول گیاهی و ایجاد بیماری شد که این هدف به منظور ایجاد مقاومت بر علیه بیماری با استراتژی مقاومت وابسته به پلنتی‌بادی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

با توجه به این که بیان آنتی‌بادی در گیاه یک ابزار قوی برای سرکوب بیماری‌گرهای گیاهی است، تولید و بیان پادتن علیه پروتئین‌های ضروری بیمارگر و انتقال قطعات پادتن تولید شده به گیاه روش مناسبی جهت بیان پادتن در گیاه و در نتیجه سرکوب بیماری است (Le Gall *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2011; Shahryari *et al.*, 2013). در نتیجه با توجه به دارا بودن خصوصیت آنتی‌ژنی پروتئین نوترکیب HrpE

- Alizadeh A, Rahimian H (1990). Citrus canker in Kerman province. *Iran Journal Plant Pathology* 26: 42 (In Persian).
- Ariannejad H, Nassiri MR, Aslaminejad A, Tahmoorespour M, Valizadeh R, Asoodeh A, Ghovvati S (2012). Cloning, nucleotide characterization and modeling expression of phytase gene *phyC* from *Bacillus subtilis*. *Journal of Agricultural Biotechnology* 4: 19-33 (In Persian).
- Ausubel F, Brent R, Kingstone R, Moore D, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*, New York, Wiley Interscience, 4648 Pp.
- Berlec A, Jevnikar Z, Majhenic AC, Rogelj I, Strukelj B (2006). Expression of the sweettasting plant protein brazzein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*: a path toward sweet lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73: 158-165.
- Buttner D, Yang H (2009). Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology* 150: 1656-1664.
- Cornelis GR, Gijsegem FV (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annual Review of Microbiology* 54: 735-774.
- Duan YP, Castaneda AL, Zhao G, Erdos G, Gabriel DW (1999). Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. *Molecular Plant Microbe Interaction* 12: 556 – 560.
- Ebrahimi Y (2009). Citrus situation in Iran. Ministry of Jihad e Agriculture. pP39. (In Farsi)
- Fao (2014). FAOSTAT, production, from <http://www.fao.org>.
- Fischer R, Emans N, Schillberg S (2001). Achieving plant disease resistance by antibody expression. *Canadian Journal Plant Pathology* 23: 236–45.
- Fu W, Lin J, Cen P (2007). 5-Aminolevulinate production with recombinant *Escherichia coli* using a rare codon optimizer host strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 777-782.
- Gottwald TR, Graham JH, Schubert TS (2002). Citrus Canker: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress* DOI:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.
- Graham JH, Gottwald TR, Cubero J, Achor D (2004). *Xanthomonas axonopodus* pv. *citri*: Factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology* 5: 1-15.
- Huang J, Ru B, Dai P (2011). Bioinformatics resources and tools for phage display. *Molecules* 16: 694–709.
- Khatabi B, He B, Hajimorad MR (2012). Diagnostic potential of polyclonal antibodies against bacterially expressed recombinant coat protein of *Alfalfa mosaic virus*. *Plant Disease* 96: 1352-1357.
- Khodakaramian G, Rahimian H, Mohamadi M, Alameh A (1999). Phenotypic features, host range and distribution of the strains *Xanthomonas axonopodis* including citrus canker in southern Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 35: 102-111. (In Persian with English summary).
- Koebnik R (2005). The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *Journal of Bacteriology* 187: 24587.
- Le Gall F, Bove JM, Garnier M (1998). Engineering of a single-chain variable-fragment (scFv) antibody specific for the stolbur phytoplasma (Mollicute) and its expression in *Escherichia coli* and tobacco plants. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4566–72.
- Mokhtari M, Safarnejad MR, Alavi SM, Torkamanzehi A (2015). Isolation, gene expression and PthA effector protein production of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causal agent of citrus bacterial canker. *Journal of Agricultural Biotechnology* 7(2): 155-170 (In Persian).

- Nanni V, Bertolini P, Baraldi E, Zanetti M, Dalla Serra M, Bellucci M, Mose C (2013). Peach (*Prunus persica*) defensin PPDFN1 displays antimicrobial activity against fungal pathogens through specific lipid binding and membrane permeabilization. *Acta horticulturae* 1012: 699-704
- Nino-liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ (2006). *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology* 7: 303-324.
- Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW (2008). Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *International Journal of Pharmaceutics* 364:272-280.
- Roohani R, Soltani Najafabadi M, Alavi SM, Farrokhi N, Shamsbakhsh M (2012). Transcript analysis of some pathogenicity-related elements in an Iranian A* isolate of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Journal Crop Protection* 1 (4): 337-347.
- Rosano GL, Ceccarelli EA (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5: 172.
- Sadeghi HMM, Rabbani M, Rismani E, Moazen F, Khodabakhsh F, Dormiani K, Khazaei Y (2011). Optimization of the expression of reteplase in *Escherichia coli*. *Research in Pharmaceutical Sciences* 6: 87-92.
- Safarnejad MR, Salehi Jouzani GR, Tabatabaie M, Twyman RM, Schillberg S (2011). Antibody-mediated resistance against plant pathogens. *Biotechnology Advances* 29: 961-971.
- Safarpur H, Safarnejad MR, Tabatabaie M, Mohsenifar A (2012). Developing of nanobiosensor based high-throughput screening for evaluation of sugar beet germplines against *Polymyxa betae*. *Communication in Applied Biological Science* 77: 7-14.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1996). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy GH, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK, Vidaver AK (2005). Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolia* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel *et al.*, 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith, 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. rev.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker *et al.*, 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 494-518.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Sechler A, Agarkova I, Stormberg PE, Stormberg VK, Vidaver AK (2006). Emended classification of Xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 690-695.
- Schoulties CL, Civerolo EL, Miller JW, Stall RE, Krass CJ (1987). Citrus canker in Florida. *Plant Disease* 71: 388-395.
- Shahryari F, Shams-Bakhsh M, Safarnejad MR, Safaiee N, Ataie Kachoeie S (2013). Preparation of polyclonal antibody against Immunodominant membrane protein (IMP) of *Candidatus Phytoplasma aurantifolia*. *Iranian Journal of Biotechnology* 11: 14-21.
- Shahryari F, Shams-Bakhsh M, Safarnejad MR, Safaiee N, Ataie Kachoeie S (2013). Preparation of polyclonal antibody against Immunodominant membrane protein (IMP) of *Candidatus Phytoplasma aurantifolia*. *Iranian Journal of Biotechnology* 11: 14-21.

- Shiotani H, Fujikawa T, Ishihara H, Tsuyumu S, Ozaki K (2007). A pthA homolog from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* responsible for host-specific suppression of virulence. *Journal of Bacteriology* 189: 3271-3279.
- Swarup S, Yang Y, Kingsley MT, Gabriel DW (1992). An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, pthA, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Molecular. Plant Microbe Interaction* 5: 204–213.
- Tegel H, Tourle S, Ottosson J, Persson A (2010). Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3). *Protein Expression and Purification* 69:159-167.
- Thaitrong N, Charlermroj R, Himananto O, Seepiban C, Karoonuthaisiri N (2013). Implementation of Microfluidic Sandwich ELISA for Superior Detection of Plant Pathogens. *PLoS ONE* 8:1-9.
- Weber E, Ojanen-Reuhs T, Huguet E, Hause G, Romantschuk M, Korhonen TK, Bonas U, Koebnik R (2005). The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *Journal of Bacteriology* 187: 2458-2468.

Gene cloning and expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pilin

Raeisi H.¹, Safarnejad M.R.*², Alavi S.M.³, Elahinia S.A.¹, Farokhi N.⁴

¹Ph.D. Student of Plant Pathology, College of Agricultural Sciences, Guilan University, Rasht, Iran.

²Associate Professor of Department of Plant Viruses, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization of Iran. Tehran, Iran.

³ Assistant Professor of Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

⁴ Professor of Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences, Guilan University, Rasht, Iran.

⁵Assistant Professor of Department of Plant Sciences & Biotechnology, Faculty of Life Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Abstract

Citrus bacterial canker is a disease caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*). The bacterial type III secretion system (TTSS) consist of an extracellular filamentous structure mediating transfer of bacterial proteins into the plant cytosols. The main part of the pilus is pilin protein (HrpE) that is encoded by the *HrpE* gene. Production of specific antibodies against the pilin protein can be implemented for detection of infected plants as well as to develop a source of genetic resistance against disease. Inhibition of HrpE protein through antibody therapy leads to suppression of disease in the plant. The objective of the present study was to isolate, clone and express the *HrpE* gene. To do this, the *HrpE* gene was amplified by PCR using gene-specific primers and cloned to the pTZ57R/T vector. Then, it was cloned to the pET28a(+) bacterial expression vector and expressed in the *E. coli* strain Rosetta as host. The protein production procedure was optimized for incubation time and temperature as well as the concentration of inducer. The greatest amount of the recombinant protein was yielded at 1 mM IPTG at 30° C for 16 h. Purification of HrpE recombinant protein was done via metal affinity chromatography. The results of both SDS-PAGE and Western blotting assays confirmed the expression accuracy and purity of recombinant pilin protein. The recombinant protein can be used as an antigen to develop monoclonal and polyclonal antibodies.

Keywords: *Citrus bacterial canker, Xanthomonas citri* subsp. *citri*, recombinant protein, type III secretion system(TTSS), *HrpE*, pilus.

* Corresponding Author: Safarnejad M.R.

Tel:02122413407

Email: mrsafarnejad@yahoo.com