



جداسازی، بیان ژن و تولید پروتئین افکتور PthA باکتری *Xanthomonas citri subsp citri* عامل

بیماری شانکر مرکبات

مریم مختاری^۱، محمدرضا صفرنژاد^{۲*}، سید مهدی علوی^۳، آدم ترکمن زهی^۱

^۱بخش زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان

^۲بخش ویروس شناسی گیاهی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۲۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۱۷

چکیده

بیماری شانکر باکتریایی مرکبات از جمله مهمترین بیماری های باغات لیموی مکزیکی در جنوب کشور می باشد که توسط باکتری *Xanthomonas citri subsp. citri* (*Xcc*) ایجاد می شود. پروتئین PthA باکتری عامل شانکر مرکبات، به عنوان پروتئین افکتور، نقش اساسی در فرایند بیماری زایی دارد و لذا غیر فعال سازی آن با استفاده از آنتی بادی می تواند منجر به ایجاد مقاومت بر علیه بیماری شود. در این تحقیق جداسازی و بیان ژن *pthA* و خالص سازی پروتئین حاصل از آن صورت پذیرفته است. برای این منظور با استفاده از منابع اطلاعاتی بانک ژن، آغازگرهای اختصاصی برای جداسازی ژن *pthA* طراحی شد و سپس قطعه ژنی مربوطه در ناقل pTZ57R/T همسانه سازی گردید. ژن مزبور سپس به صورت متصل به دنباله شش تایی هیستیدین در ناقل بیانی باکتریایی pET28a همسانه سازی گردیده و بیان آن به صورت نوترکیب در سویه BL21(DE3) باکتری *Escherichia coli* صورت پذیرفت. خالص سازی پروتئین نوترکیب PthA در شرایط طبیعی غیر واسرشتی و با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی بر روی ستون نیکل صورت پذیرفت. صحت بیان پروتئین مذکور با روش های الکتروفورز پروتئین و وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی بادی های اختصاصی توالی شش تایی هیستیدین مورد بررسی و تایید قرار گرفت. پروتئین نوترکیب خالص بدست آمده می تواند به عنوان آنتی ژن برای تولید آنتی بادی های نوترکیب مونوکلونال مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه ها: شانکر مرکبات، پروتئین نوترکیب، افکتور پروتئین PthA، *Xanthomonas citri subsp.citri*

مقدمه

فضای آزاد بین سلولی^۱ جای‌گیری می‌کند و کلنی تشکیل می‌دهد. (Duan *et al.*, 1999) اپیدرم برگ در نتیجه افزایش آلودگی به هم می‌ریزد و تکه‌تکه می‌شود. در برگ‌ها، ساقه‌ها و میوه‌ها زخم‌ها زیاده‌تر شده و سپس حالت شانکر در محل‌های آلوده ایجاد می‌گردد (Dunger *et al.*, 2003; Brunings and Gabriel, 2005). سویه‌های مختلف گونه *X. citri* بر مبنای دامنه میزبانی به پاتوتیپ‌های مختلفی تعلق دارند که به صورت فرم‌ها (پاتوتیپ‌ها)ی مختلف بیماری شناخته می‌شوند. فرم‌های مختلف بیماری در دنیا شامل A، B، C، D، E و A* می‌باشند. این بیماری در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۶۸ در منطقه کهنوج کرمان روی لیمو مکزیکی توسط علیزاده و رحیمیان مشاهده گردید (Alizadeh and Rahimian 1989). نتایج تحقیقات اخیر نشان داده است که تمامی انواع شناخته شده بیماری شانکر مرکبات در ایران از نوع A* می‌باشد (Pruvost *et al.* 2014).

ارتباط بین باکتری‌های گرم‌منفی بیماری‌زای حیوانی و گیاهی با میزبانان بستگی به یک نوع سیستم محافظت‌شده به نام سیستم ترشح نوع سه^۲ دارد، که باعث انتقال فاکتورهای بیماری‌زایی و هارپین‌ها به درون سلول میزبان می‌شود (Büttner *et al.*, 2002; Cornelis & Van Gijsegem, 2000; Hueck, 1998). سیستم ترشحی نوع سه به وسیله یک توالی به طول ۲۳

مرکبات یکی از محصولات مهم باغی در ایران است. سطح زیر کشت مرکبات در دنیا در حدود نه میلیون هکتار می‌باشد که از این مقدار سهم ایران در حدود ۲۶۸ هزار هکتار می‌باشد. میزان تولید مرکبات کشور حدود ۴/۲۹ میلیون تن می‌باشد. ایران به دلیل قرارگرفتن در شرایط جغرافیایی مناسب از لحاظ تولید مرکبات مقام هفتم را در بین تولیدکنندگان عمده مرکبات جهان به خود اختصاص داده است (Ebrahimi, 2009). از مهمترین بیماری‌های درختان لیموترش در مناطق جنوبی کشور بیماری شانکر مرکبات می‌باشد (Khodakaramian *et al.* 1999) که توسط باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) (Schaad *et al.*, 2006) ایجاد می‌شود. مبارزه با این بیماری عمدتاً به روش‌های شیمیایی و با استفاده از ترکیبات مسی می‌باشد. دستیابی به منابع مقاومت ژنتیکی از مهمترین راهکارها در تولید ارقام مقاوم به بیماری می‌باشد که در این خصوص استفاده از ژن آنتی‌بادی‌های اختصاصی راهکاری نوین در این حوزه می‌باشد (Safarnejad *et al.* 2011).

علایم این بیماری در اندام‌های هوایی گیاه شامل برگ‌ها، ساقه‌ها و میوه‌ها مشاهده می‌گردد. در برگ‌ها باکتری از طریق روزنه‌ها وارد می‌شود. آلودگی به صورت یک سری نقاط دایره‌ای در سطح پشتی برگ دیده می‌شود. باکتری سپس در

¹ Apoplast

² type III protein secretion system (TTSS)

اختصاصیت در هنگام ایجاد مقاومت و یا عفونت‌زایی در گونه‌های میزبان مربوطه در عدم حضور ژن‌های مقاومت می‌شود (Shiotani *et al.*, 2007; Ponciano *et al.*, 2003)

تولید گیاهان مقاوم به بیماری مهمترین راهکار در مبارزه با بیماری شانکر مرکبات می باشد. عدم دسترسی به گیاهان مقاوم و محدودیت وجود ژن-های طبیعی مقاومت بر علیه بیماری سبب گردیده تا استفاده از سایر منابع مقاومت با روش های مبتنی بر مهندسی ژنتیک مورد توجه قرار گیرد. یکی از راه کار های نوین در ایجاد گیاهان مقاوم به بیماری، استفاده از مکانیسم مقاومت حاصل از بیان آنتی بادی در گیاه^۲ می باشد. استفاده از این مکانیسم تاکنون منجر به ایجاد مقاومت بر علیه تعداد زیادی از بیماری های ویروسی، باکتریایی و قارچی شده است (Safarnejad *et al.* 2011, Malembic-Maher *et al.* 2005; Li *et al.* 2008, Cervera *et al.* 2010, Yajima, *et al.* 2010) در مکانیسم اخیر، مختل نمودن فرایند بیماری زایی با هدف قرار دادن پروتئین های ضروری پاتوژن توسط اتصال اختصاصی آنتی بادی-آنتی ژن صورت می‌پذیرد. بر این اساس پروتئین PthA با دارا بودن وظایف ضروری در ایجاد بیماری می تواند یکی از بهترین کاندید ها در ایجاد مقاومت محسوب گردد. در تحقیقات قبلی آپتامر های اختصاصی با قابلیت اتصال به پروتئین PthA را در مورد سویه ایجاد کننده فرم A بیماری شانکر مرکبات ایجاد گردیده است (Zhao

کیلو جفت باز از مجموعه ژن‌های *hrp* کروموزومی یعنی از *hrpA* تا *hrpF* کد می‌شود که داخل شش اپران سازمان یافته است (Bonas *et al.*, 1991; Büttner *et al.*, 2002)

ژن *pthA* از جمله مهمترین ژن‌ها در بیماری-زایی باکتری عامل بیماری شانکر می‌باشد (Shiotani *et al.*, 2007). همولوگ های این ژن شامل *pthB* و *pthC* در سویه های باکتری عامل شانکر مرکبات که باعث ایجاد فرم های B و C می شوند وجود دارند (Al-Saadi *et al.* 2007). این ژن درون خانواده ژنی به نام *avrBs3/pthA* (خانواده عفونت‌زایی و عدم بیماری‌زایی) (افکتورهای TAL^۱) قرار دارد. این خانواده به‌طور گسترده در گونه‌های زائتوموناس وجود دارند (Vauterin *et al.* 1995; Shiotani *et al.*, 2007). ژن *pthA* در تمامی باکتری‌های عامل شانکر مرکبات در حدود سه تا چهار کیلو جفت باز طول دارد. این ژن دارای نواحی تکراری پشت سرهم به تعداد ۱۷/۵ عدد می باشد که هر کدام از این تکرارها ۱۰۲ جفت باز می‌باشد و در قسمت مرکزی ژن وجود دارند. این ناحیه تکراری برای تعیین اختصاصیت میزبان و همچنین عفونت‌زایی لازم می‌باشد (Al-Saadi *et al.*, 2007). پروتئین PthA از ۱۱۶۳ آمینو اسید تشکیل گردیده است. قسمت میانی پروتئین PthA دارای ۱۷/۵ تکرار یکسان از ۳۴ اسید آمینه می‌باشند که تعداد دقیق و آرایش واحدهای تکراری در باکتری های مختلف متفاوت است. این تفاوت باعث عملکرد و

² Plantibody-mediated resistance

¹ Transcriptional Activator-like (TAL) effectors

شد. برای این منظور کیت استخراج (ExiProgen™ Bacteria Genomic DNA Kit, Cat No K-4314, South Korea) مطابق دستورالعمل مربوطه استفاده گردید.

مشاهده DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگاروز صورت پذیرفت و برای تعیین غلظت DNA استخراجی از نانودراپ اسپکتوفتومتر با جذب نوری ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. نمونه در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

در این تحقیق قسمت یک چهارم انتهایی ۳ پیریم ژن *pthA* با اندازه ۶۰۶ جفت باز، به منظور جداسازی مورد استفاده قرار گرفت. طراحی آغازگر با استفاده از ترادف کامل ژن *pthA* موجود در بانک ژن (accession Nr. EF473086.1) صورت گرفت. جهت تسهیل در فرایند همسانه‌سازی در ناقل بیانی ترادف‌های مربوط به هضم آنزیمهای *XhoI/SalI* در انتهای ۵ پیریم آغازگر در نظر گرفته شدند.

واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۳ میکرولیتر از dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر پیش رو (5' TAAAATGTCGACAATGCCACTCCCA CCC 3' و ۱/۵ میکرولیتر آغازگر پس رو (5' TAAAATCTCGAGTTACTGAGGCAAT AGCTC3')، ۰/۲ میکرولیتر (5 Unit/ μ l) از آنزیم (Fermentas, *Taq* DNA Polymerase Pittsburgh PA, USA) ۱ میکرولیتر DNA قالب

(2001). هدف نهایی از این تحقیق تولید گیاهان مقاوم به بیماری شانکر با استفاده از آنتی بادی های اختصاصی پروتئین افکتور می باشد. در ابتدا لازمه ایجاد گیاه مقاوم به بیمارگر با کمک آنتی بادی، خالص‌سازی مهم‌ترین پروتئین بیمارگر می‌باشد که نقش اساسی در ایجاد بیماری دارد. لذا هدف از اجرای تحقیق حاضر، جداسازی، بیان ژن *pthA* خالص‌سازی و تولید انبوه پروتئین ژن مذکور می باشد که در ادامه به منظور تولید آنتی‌بادی اختصاصی مونوکلونال در جهت ایجاد مقاومت به این بیمارگر با ایجاد گیاهان تراریخته مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مواد و روش ها

در این تحقیق از سویه شماره ۸۸ باکتری *X. citri subsp citri* (تهیه شده از کلکسیون موجود در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری) که قبلاً از باغات مرکبات منطقه رودان استان هرمزگان جداسازی شده بود، استفاده شد (Pruvost et al. 2014). کشت باکتری بر روی محیط LB^۱ جامد صورت گرفت و از تک کلون باکتری برای کشت انبوه در محیط مایع LB استفاده گردید.

جهت استخراج DNA از باکتری، ابتدا باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط مایع LB به مدت یک شب در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و دور دورانی ۲۰۰ دور در دقیقه کشت شد. از کشت شبانه برای استخراج DNA باکتری استفاده

¹ Luria-Bertani

pTZ57R/T و پلاسمید بیانی به صورت جداگانه با آنزیم های *XhoI/SalI* واکنش داده شده و پس از جداسازی و خالص سازی قطعات مربوطه از روی ژل آگاروز، الحاق قطعه ژنی *pthA* در ناحیه پایینی توالی تکرار شش تایی هیستیدین ناقل بیانی با استفاده از واکنش آنزیمی T4 DNA ligase صورت پذیرفت و سازه حاصله به روش شوک حرارتی (Sambrook *et al.*, 1996) در سویه *E. coli* DH5 α باکتری وارد گردید.

به منظور بیان ژن تولید کننده پروتئین افکتور، سازه بیانی حاوی ژن مربوطه، *pET28a-pthA*، با روش شوک حرارتی به سلول های مستعد سویه BL21(DE3) باکتری *E. coli* منتقل شد. جهت بهینه سازی تولید پروتئین در میزبان باکتریایی، بیان ژن در شرایط مختلف دمایی، تحت تاثیر غلظت های مختلف ۰/۵ و ۱ میلی مولار IPTG^۲ و در زمان های متغیر (۳، ۶ و ۱۶ ساعت) مورد بررسی قرار گرفت (Sadeghi *et al.*, 2011). به منظور ارزیابی میزان بیان ژن *pthA* در باکتری در حالات مختلف بیانی، نمونه هایی برداشت شد و بر روی ژل پلی اکریل آمید حاوی سدیم دو سولفات^۳ مورد بررسی قرار گرفت.

پس از بهینه سازی شرایط بیان، خالص سازی پروتئین نوترکیب افکتور تحت شرایط طبیعی با استفاده از ستون آگاروز حاوی یون های نیکل صورت پذیرفت. برای این منظور ابتدا یک کلنی باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) حاوی سازه

و ۸/۳ میکرولیتر آب دو بار تقطیر تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شامل ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سیلسیوس و ۳۵ چرخه، ۹۴ درجه سیلسیوس به مدت یک دقیقه، ۶۰ درجه سیلسیوس به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگاروز ۱٪ همراه با بافر TAE(1X) (40 mM Tris-acetate, 10 mM EDTA) و با ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد. استحصال بانده مورد نظر از روی ژل با استفاده از کیت^۱ MBST طبق دستورالعمل شرکت مربوطه صورت پذیرفت.

همسانه سازی قطعه تکثیر شده ژن *pthA* در ناقل pTZ57R/T به روش T/A کلونینگ و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Fermentas, Pittsburgh PA, USA) صورت پذیرفت. تأیید همسانه سازی در کلون های حاصله به روش غربال کلنی سفید-آبی، کلنی PCR، هضم آنزیمی و همچنین تعیین ترادف توسط پرایمر های یونیورسال به روش اتوماتیک توسط شرکت ژن فن آوران صورت گرفت. استخراج پلاسمید بر مبنای تخریب قلیایی باکتری ها (Sambrook *et al.*, 1996) انجام پذیرفت.

پس از اطمینان از صحت قطعه همسانه سازی شده در کلون منتخب، انتقال قطعه ژنی *pthA* به پلاسمید بیانی *pET28a* با هضم آنزیمی صورت پذیرفت. برای این منظور سازه های *pthA*-

^۲ Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

^۳ sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

^۱ DNA Extraction Kit, MBST, Iran

آمید و همچنین آزمون وسترن بلا تینگ انجام گرفت (Ausubel et al., 1995). به منظور شناسایی پروتئین نوترکیب بر روی غشا پلی وینیلیدن دیفلوراید^۳ از آنتی‌بادی‌های اختصاصی دنباله شش تایی هیستیدین^۴ (Abcam, Cambridge, USA) استفاده گردید. ظهور باندهای اختصاصی مربوط به پروتئین نوترکیب متصل به ترادف شش تایی هیستیدین با افزودن عامل اکسید کننده^۵ NBT و سابسترات^۶ BCIP^۶، صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

استخراج DNA تحت شرایط لیز قلیایی صورت پذیرفت و محصول فرایند استخراج بر روی ژل آگاروز (شکل ۱-الف) حاکی از خلوص بالای اسید نوکلئیک حاصله می باشد. غلظت DNA بدست آمده توسط طیف‌سنجی در حدود ۷۰ نانوگرم بر میکرولیتر محاسبه گردید. به منظور جداسازی قطعه ژنی *pthA*، واکنش PCR انجام گرفت و سپس DNA تکثیر یافته بر روی ژل آگارز بررسی شد. نتایج حاصله حاکی از جداسازی و تکثیر قطعه‌ای در حدود ۶۰۰ جفت باز بود (شکل ۱-ب).

به منظور تایید ماهیت قطعه تکثیر شده، با توجه به وجود سایت برشی آنزیم *BamHI* در محل نوکلئوتید شماره ۴۵۹ قطعه ژنی، محصول

pET28a-*pthA* در محیط کشت مایع LB دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۴-۲ ساعت کشت شد تا جذب نوری (OD_{600nm}) آن به ۰/۴ برسد. به منظور القاء باکتری برای تولید پروتئین نوترکیب افکتور، IPTG با غلظت ۰/۵ میلی مولار در حجم نهایی افزوده گردید و محیط کشت به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و با دور همزن ۲۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد.

به منظور خالص‌سازی پروتئین نوترکیب، ابتدا جداسازی سلول های باکتریای با انجام سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه صورت پذیرفت. ته نشین^۱ به صورت شبنامه در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. معلق سازی رسوب با استفاده از بافر لیز کننده صورت گرفت و تخریب دیواره سلولی باکتری با استفاده از اموج صوتی اولتراسونیک با توان ۱۵۰ وات به تعداد پنج دوره ۳۰ ثانیه‌ای با فواصل میانی ۳۰ ثانیه بر روی یخ صورت گرفت. سلول-های تخریب شده به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دمای چهار درجه سلسیوس و با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی جهت خالص‌سازی جداسازی شد. خالص‌سازی با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل^۲ انجام پذیرفت (Shahriyari et al., 2013). تایید مرحله بیان و خالص‌سازی پروتئین توسط ژل پلی‌اکریل

³ Polyvinylidene difluoride (PVDF)

⁴ Anti-6X His tag® antibody [4D11]

⁵ nitro blue tetrazolium

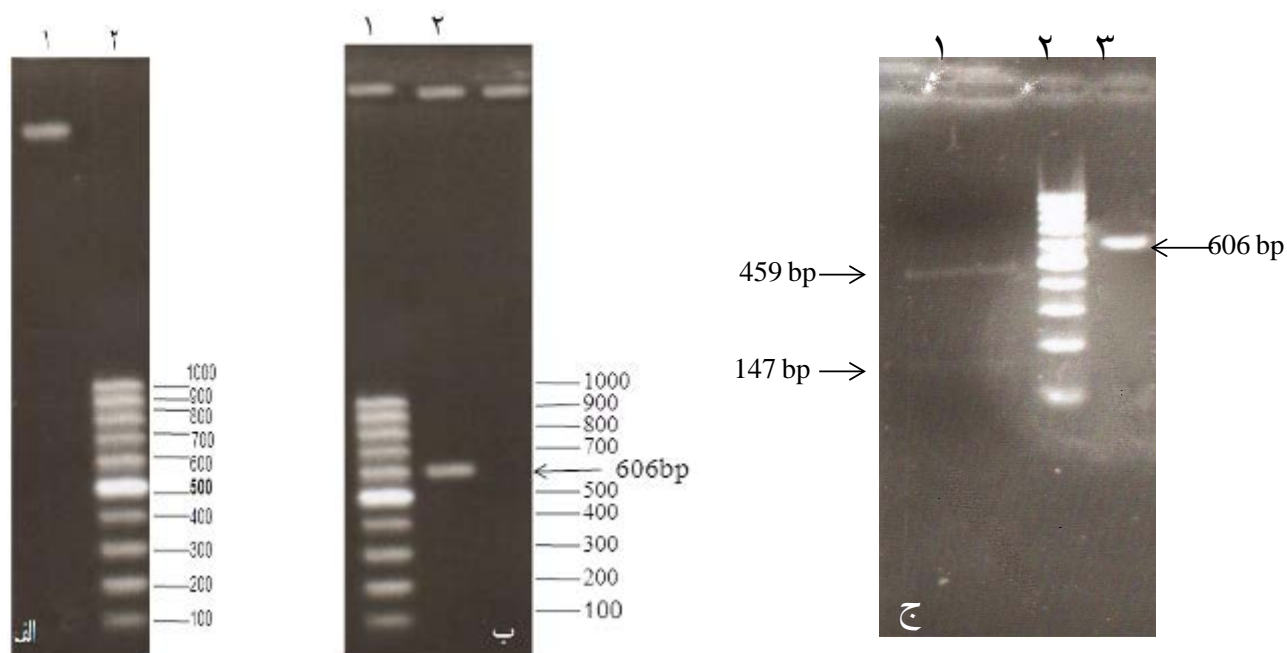
⁶ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

¹ Pellet

² Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC)

۴۵۹ و ۱۴۷ جفت باز می باشد که موید صحت اندازه قطعه تکثیر شده می باشد (شکل ۱-ج).

پی سی ار با آنزیم برشی مذکور واکنش داده شد. محصول هضم آنزیمی بر روی ژل الکتروفورز حاکی از وجود دو قطعه DNA به طول های



شکل ۱- الف: استخراج دی ان ای ژنومی سویه ۸۸ باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* چاهک ۱: دی ان ای استخراج شده باکتری. چاهک ۲: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی محصول شرکت Fermentas. ب: محصول واکنش پی سی ار بر روی ژل الکتروفورز. چاهک ۱: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی. چاهک ۲: ژن *pthA* با طول تقریبی ۶۰۶ جفت باز. ج: برش قطعه ژنی *pthA* با آنزیم *Bam*HI. چاهک ۱: قطعه ژنی *pthA* بریده شده با *Bam*HI. چاهک ۲: Ladder 100 bp. چاهک ۳: محصول پی سی ار قطعه ژنی *pthA* بریده نشده.

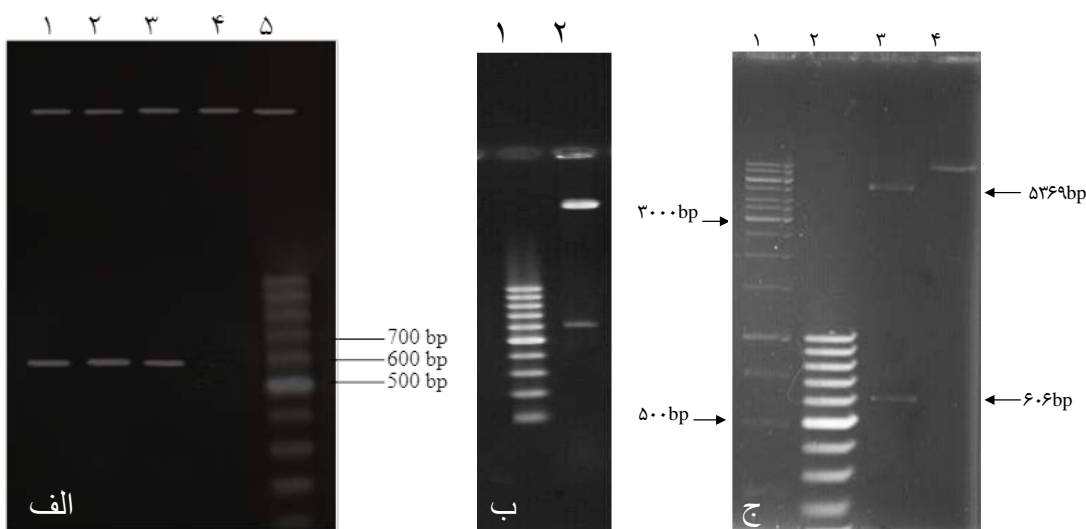
Figure 1- A: Extraction of DNA from strain 88 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, lane1: DNA extracted from bacteria. Lane 2: 100 bp molecular ladder. B: PCR product on agarose gel. Lane 1: 100 bp molecular ladder, lane 2: *PthA* gene with length around 606 bp. C: Digestion of *pthA* amplified fragment with *Bam*HI enzyme. Lane 1: *pthA* fragment digested with *Bam*HI, lane2: 100 bp ladder, lane 3: undigested *pthA* fragment.

هضم آنزیمی مجدد صورت پذیرفت. ناقل بیانی pET28 به منظور تولید پروتئین های نو ترکیب در میزبان باکتریایی مورد استفاده قرار می گیرد. این پلاسمید دارای ترادف های کد کننده دنباله هیستیدین^۱ می باشد که می تواند به صورت متصل به نواحی ۵ پریم و ۳ پریم ژن خارجی باشد. وجود این ترادف باعث تسهیل فرایند خالص سازی پروتئین نو ترکیب با استفاده از ستون های حاوی یون نیکل می گردد (Berlec *et al.*, 2006)

پس از تکثیر و جداسازی قطعه ژنی *pthA* باند مربوطه از روی ژل آگاروز جداسازی و خالص گردیده و در ناقل pTZ57R/T همسانه سازی گردید. به منظور بررسی صحت فرایند همسانه سازی، آزمون کلنی PCR در مورد تعدادی از کلنی های انتخاب شده صورت پذیرفت که نتیجه حاصله حاکی از وجود قطعه ژنی مربوطه در تعدادی از نمونه های انتخاب گردیده می باشد (شکل ۲-الف). صحت وجود قطعه مورد نظر در کلون های انتخاب شده با انجام آزمون های تکمیلی هضم آنزیمی (شکل ۲-ب) و همچنین تعیین ترادف مورد تایید قرار گرفت. همترازی ترادف منبع اطلاعاتی NCBI، حاکی از وجود تشابه بسیار بالا (۹۵-۱۰۰ درصد) در ترادف این قطعه ژنی در سویه ها و یا حتی گونه های مختلف زانتاموناس می باشد. این تشابه به دلیل اهمیت وجود ساختار محافظت شده این پروتئین برای ایفای نقش اساسی آن در فرایند بیماری زایی به عنوان پروتئین افکتور می باشد (Shiotani *et al.*, 2007, Nino-Liu *et al.*, 2006) این ساختار به نحوی در بین باکتری های گرام منفی محافظت شده می باشد که گاهی پروتئین PthA باکتری های بیماری زای گیاهی می توانند در سلول های جانوری نیز ایفای نقش نمایند (Mudgett 2005).

انتقال قطعه ژنی *pthA* به ناقل بیانی pET28a با انجام هضم آنزیمی (شکل ۲-ج) و الحاق مجدد صورت پذیرفت. تایید فرایند همسانه سازی با انجام آزمون های کلنی PCR و

¹ 6His-tag



شکل ۲- الف: نتایج آزمون کلونی پی‌سی‌ار جهت جداسازی کلون‌های حاوی قطعه ژنی *pthA*. چاهک‌های ۱، ۲ و ۳: کلون‌های دارای قطعه ژنی *pthA*. چاهک ۴: کلون فاقد قطعه ژنی *pthA*. چاهک ۵: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی. ب: هضم آنزیمی به منظور جداسازی قطعه ژنی *pthA* از پلاسمید *pTZ57R/T* دارای این قطعه ژنی. چاهک ۱: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی. چاهک ۲: واکنش هضم آنزیمی پلاسمید *pTZ57R/T* دارای قطعه ژنی *pthA* و جداسازی قطعه ژنی *pthA*. ج: جدا شدن قطعه ژنی *pthA* در اثر هضم آنزیمی پلاسمید *pET28a-pthA*. چاهک ۱: نشانگر ۱۰۰۰ جفت بازی. چاهک ۲: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی. چاهک ۳: قطعه ژنی جدا شده *pthA* و پلاسمید *pET28a*. چاهک ۴: پلاسمید نوترکیب هضم نشده

Figure 2- A: The product of colony PCR for selection of clones harbouring *pthA* gene. Lanes 1, 2 and 3: positive clones harbouring *pthA* gene, lane 4: empty clone, lane 5: 100 bp molecular ladder. **B:** Double digestion of *pTZ57R/T-pthA* construct for isolation of *pthA* gene. Lane 1: 100 bp molecular ladder, lane 2: Isolation of *pthA* gene from *pTZ57R/T-pthA* by double digestion of construct. **B:** Double digestion of *pET28a-pthA* for isolation of *pthA* gene, lane 1: 1000bp molecular ladder, lane 2: 100 bp molecular ladder, lane 3: isolated fragment of *pthA* from *pET28a-pthA*, lane 4: undigested *pET28a-pthA* construct.

و خالص سازی پروتئین، نمونه‌هایی برداشت گردیده و این روند با انجام الکتروفورز پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۳-الف). نتایج مربوطه نشان می‌دهد که تولید پروتئین *PthA*

پلاسمید نوترکیب *pET28-pthA* به سویه بیانی BL21(DE3) باکتری *E. coli* منتقل شد و تولید پروتئین افکتور توسط IPTG تحت راه‌انداز *lac* صورت پذیرفت. در طی مراحل مختلف بیان

لوسین زیپر^۱ می باشد که باعث اتصال پروتئین به مولکول های DNA می گردد. همچنین این قسمت دارای ترادف های جاگیری در هسته^۲ و ناحیه فعال کننده رونویسی^۳ می باشد که منجر به ایفای وظایف مهمی در فرایند بیماری زایی می گردند (Shiotani *et al.*, 2007, Yang and Gabriel, 1995). مشخص شده که ناحیه انتهایی کربوکسیل PthA بیشترین شانس را برای قرارگرفتن در سطح پروتئین دارد و بنابراین نقش مهمی را در اتصالات پروتئین-پروتئین دارا می باشد. این پروتئین در القاء واکنش فوق حساسیت در مرکبات نقش اساسی دارد (Zhao *et al.*, 2001). بنابراین با توجه به نقش های حیاتی این قسمت از پروتئین در فرایند 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 نوترکیب متصل به دنباله هیستیدین با استفاده از ستون آگاروز حاوی ذرات نیکل صورت پذیرفت. نتایج بیان و خالص سازی پروتئین نوترکیب افکتور، حاکی از بیان مناسب این پروتئین در میزبان باکتریایی و خلوص بالای آن در نمونه خالص شده می باشد (شکل ۴).

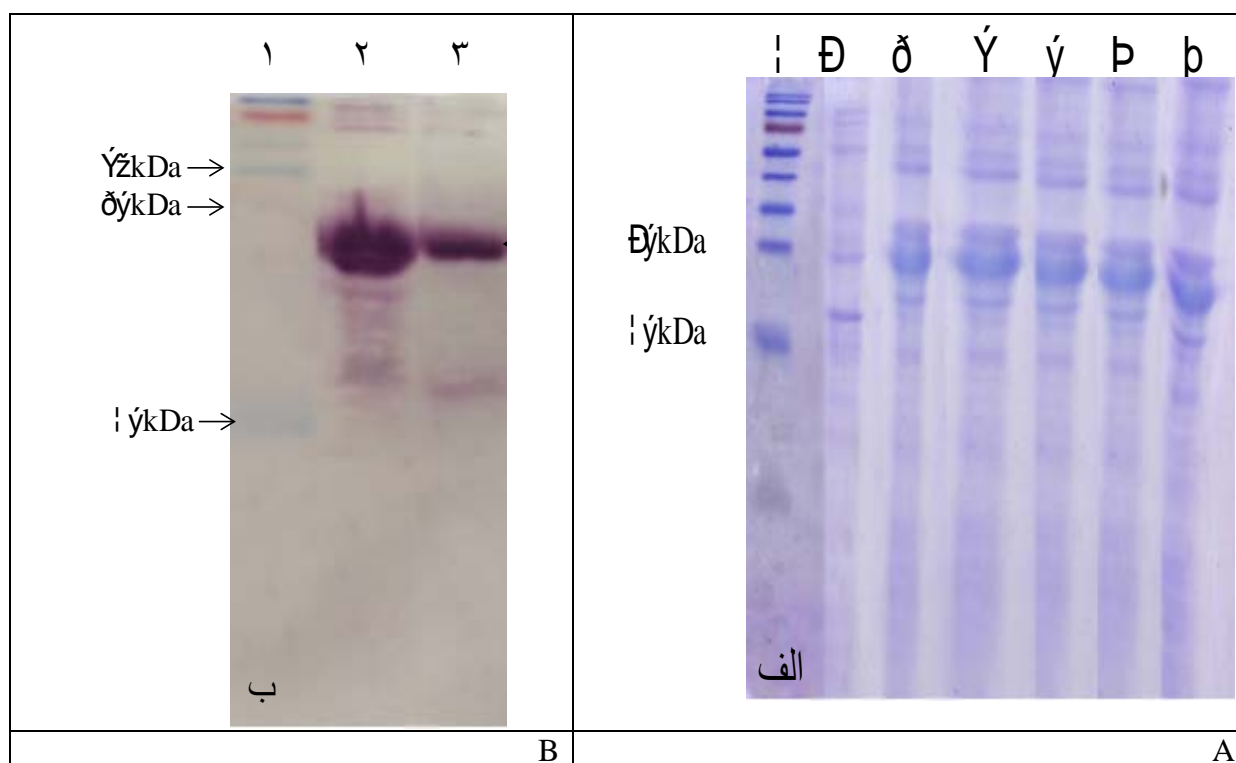
تحت تاثیر تیماری های مربوطه تغییر قابل توجهی نشان نداده است. نتایج تحقیقات قبلی بر روی پروتئین مشابه در شرایط مختلف متفاوت بوده است به نحوی که گاها میزان تولید تحت تاثیر تیمار های مشابه متغیر و یا یکسان بوده است (Zhao *et al.*, 2001). تولید پروتئین در میزبان های خارجی به صورت نوترکیب از مهمترین راهکارها در مطالعات مربوط به بررسی نقش پروتئین و سایر موارد از قبیل تولید آنتی بادی های اختصاصی می باشد (Ariannejad *et al.*, 2012; Papzan and Shahpiri 2012). عموماً بیان پروتئین های نوترکیب در میزبان های خارجی با چالش هایی همراه می باشد. این مشکلات به دلیل عدم تطابق کامل بیان و یا فولدینگ پروتئین خارجی در سیستم بیانی میزبان جدید می باشد (Rosano & Ceccarelli, 2014). در خصوص تولید پروتئین PthA در باکتری *E. coli* به نظر می رسد که با توجه به تشابه نوع میزبان، که هر دو پروکاریوتیک می باشند، مشکل خاصی در بیان ژن مربوطه ایجاد نگردیده است ولی با توجه به اینکه پروتئین مذکور در حالت اصلی از سلول باکتری خارج می گردد، تولید آن تحت شرایط پری پلاسمیک بهتر انجام خواهد گردید.

در این تحقیق ناحیه یک چهارم انتهایی پروتئین PthA برای جدا سازی ژن مربوطه و تولید پروتئین در نظر گرفته شد. تحقیقات قبلی نشان داده است که این قسمت دارای نواحی

¹ leucine zipper

² nuclear localization signal

³ transcriptional activation domain



شکل ۳- الف: بررسی بیان ژن *pthA* در شرایط مختلف القایی بر روی ژل SDS- PAGE. چاهک ۱: نشانگر پروتئینی ۱۷۰ کیلو دالتون. چاهک ۲: نمونه قبل از القاء. چاهک ۳: میزان بیان سه ساعت پس از القاء با IPTG ۰/۵ میلی مولار. چاهک ۴: بیان ۳ ساعت پس از القاء با IPTG ۱ میلی مولار. چاهک ۵: بیان ۶ ساعت پس از القاء با IPTG ۰/۵ میلی مولار. چاهک ۶: بیان ۶ ساعت پس از القاء با IPTG ۱ میلی مولار. چاهک ۷: بیان ۱۶ ساعت پس از القاء با IPTG ۰/۵ میلی مولار. چاهک ۸: بیان ۱۶ ساعت پس از القاء با IPTG ۱ میلی مولار.

ب: آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی اختصاصی دنباله هیستیدین. چاهک ۱: نشانگر پروتئینی. چاهک ۲: بیان قطعه ژنی *pthA* بعد القاء با IPTG ۱ میلی مولار به مدت شش ساعت و تولید پروتئین مربوطه به طول ۲۶ کیلو دالتون. چاهک ۳: قبل از افزودن IPTG.

Figure 3- A: Assessment of expression of *pthA* gene in different inducing environments. Proteins were analyzed by SDS-PAGE. Lane 1: 170 kDa protein marker. Lane 2: non-induced cells, lane 3: expression 3 hour after induction by 0.5 mM IPTG, lane 4: expression 3 hour after induction by 1 mM IPTG, lane 5: expression 6 hour after induction by 0.5 mM IPTG, lane 6: expression 6 hour after induction by 1 mM IPTG, expression 16 hour after induction by 0.5 mM IPTG, lane 8: expression 16 hour after induction by 1 mM IPTG. B: western blot analysis by applying anti his tag antibody. Lane 1: prestained marker, lane 2: expression 6 hour after induction by 1 mM IPTG, Lane 3: non-induced cells.

pthA از سویه ایجاد کننده فرم A* بیماری شانکر مرکبات جداسازی و بیان گردیده و خالص سازی پروتئین مربوطه به صورت نوترکیب صورت پذیرفت. تولید پروتئین نوترکیب PthA می تواند به منظور انجام واکنش های تداخل میزبان-پاتوژن^۳ و همچنین برای تولید آنتی بادی های مونوکلونال نوترکیب و به منظور ایجاد مقاومت بر علیه بیماری با استراتژی مقاومت وابسته به پلانته بادی^۴ مورد استفاده قرار گیرد.

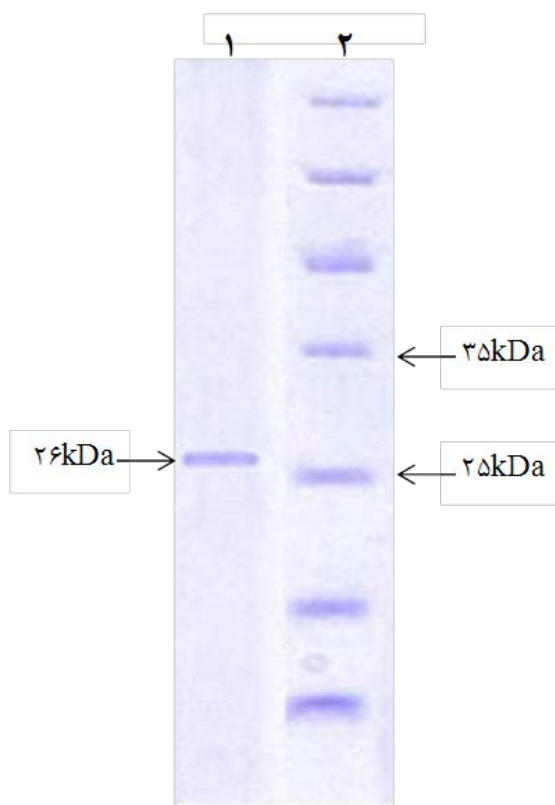
با مقایسه باند پروتئین خالص با باندهای موجود در نشانگر پروتئین، وزن پروتئین نوترکیب افکتور در حدود ۲۶ کیلو دالتون تعیین گردید که از این مقدار ۲۲/۲ مربوط به پروتئین اصلی و مابقی مربوط به دنباله متصل به پروتئین ناشی از پلاسمید بیانی می باشد. میزان پروتئین حاصله با انجام مقایسه با پروتئین استاندارد آلبومین سرم خون^۱ در حدود ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تخمین زده شد. تولید پروتئین بصورت نوترکیب در سلول باکتری از جمله مرسوم ترین روش ها برای تولید مقادیر مورد نیاز در امور تحقیقاتی و یا تجاری می باشد (Rosano & Ceccarelli, 2014). استفاده از این سیستم جهت بیان ژن های خارجی در میزبان باکتری استفاده موارد متعدد برای تولید پروتئین نوترکیب استفاده گردیده است (Safarpur et al., 2012, Shahriari et al., 2013). ژائو^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۱ به منظور تولید آپتامر های اختصاصی بر علیه PthA، این پروتئین را به صورت کامل و همچنین ناحیه انتهایی کربوکسیل (۱۰۰ آمینو اسید انتهایی) را در میزبان باکتریایی بیان و خالص سازی نمودند. استفاده از این پروتئین ها منجر به تولید آپتامر هایی پروتئینی با طول ۷ آمینو اسید گردید که در آزمایشات *in vivo* توانست باعث جلوگیری از فعالیت پروتئین افکتور گردد (Zhao et al., 2001). این تحقیق برای اولین بار ژن

³ Plant-microbe interaction

⁴ Plantibody-mediated resistance

¹ Bovine serum albumin (BSA)

² Zhao



شکل ۴- خالص سازی پروتئین افکتور به صورت نو ترکیب متصل به دنباله شش تایی هیستیدین بر روی ستون نیکل. چاهک ۱: پروتئین تخلیص شده PthA با وزن ۲۶ کیلو دالتون. چاهک ۲: نشانگر وزن مولکولی پروتئین.

Figure 4- Purification of effector protein as fused to 6His tag on nickel column. Lane 1: Purified pthA protein with molecular weight around 26 kDa. Lane 2: protein molecular ladder.

مختاری و همکاران، ۱۳۹۴
 محترم بخش بیوتکنولوژی گیاهی پژوهشگاه ملی
 مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری تشکر و
 قدردانی نمایند.

سپاسگزاری:
 نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند از
 همکاری صمیمانه دانشجویان و کارشناسان

منابع

- Alizadeh A, Rahimian H (1989). Citrus canker in Kerman province. Iranian Journal of Plant Pathology 26:118. (In Farsi)
 Al-Saadi A, Reddy JD, Brunings A, Gabriel D (2007). All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one pthA homolog with 17.5 repeats that determines

- pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 934-943.
- 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 Farsi).
- Ausubel F, Brent R, Kingstone R (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, Wiley Interscience.
- Benov L, Al-Ibraheem J (2002). Disrupting *Escherichia coli*: A comparison of methods. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35: 428-43.
- Berlec A, Jevnikar Z, Majhenic AC, Rogelj I, Strukelj B (2006). Expression of the sweet-tasting plant protein brazzein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*: a path toward sweet lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology* 73: 158-165.
- Bonas U, Schulte R, Fenselau S, Minsavage GV, Staskawicz BJ, Stall RE (1991). Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 4: 81-88.
- Brunings AM, Gabriel DW (2003). *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology* 4: 141-157.
- Büttner D, Nennstiel D, Klüsener B, Bonas U (2002). Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of bacteriology* 184: 2389-2398.
- Cervera M, Esteban O, Gil M, Gorris MT, Martínez MC, Peña L, Cambra M (2010). Transgenic expression in citrus of single-chain antibody fragments specific to Citrus tristeza virus confers virus resistance. *Transgenic Research* 19: 1001-1015.
- Cornelis GR, Van Gijsegem F (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annual Reviews in Microbiology* 54: 735-774.
- Duan Y, Castaneda A, 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 Interactions* 12: 556-560.
- Dunger G, Arabolaza AL, Gottig N, Orellano EG, Ottado J (2005). Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* *hrp* cluster in citrus canker and nonhost plant responses. *Plant Pathology* 54: 781-788.
- Ebrahimi Y (2009). Citrus situation in Iran. Ministry of Jihad e Agriculture. P39. (In Farsi)
- 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 Farsi).
- Hueck CJ (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and molecular biology reviews* 62: 379-433.
- Li HP, Zhang JB, Shi RP, Huang T, Fischer R, Liao Y (2008). Engineering Fusarium head blight resistance in wheat by expression of a fusion protein containing a Fusarium-specific antibody and an antifungal peptide. *Molecular Plant Microbe Interaction* 21: 1242-1248.
- Malembic-Maher S, Gall FL, Danet JL, Borne FD, Bové JM, Garnier-Semancik M (2005). Transformation of tobacco plants for single-chain antibody expression via apoplastic and symplasmic routes, and analysis of their susceptibility to stolbur phytoplasma infection. *Plant Science* 168: 349-358.
- Mudgett MB (2005). New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annual Review of Plant Biology* 56: 509-531.

- Nino-Liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ (2006). *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology* 7: 303-324.
- Papzan Z, Shahpiri A (2012). Comparison of Reduction Activity of three Rice (*Oryza sativa*) Thioredoxin Isoforms in Reaction with Insulin. *Journal of Agricultural Biotechnology* 4: 35-48 (In Farsi).
- Ponciano G, Ishihara H, Tsuyumu S, Leach JE (2003). Bacterial effectors in plant disease and defense: keys to durable resistance? *Plant diseases* 87: 1272-1282.
- Pruvost O, Goodarzi T, Boyer I K, Soltaninejad H, Escalon A, Alavi S M, Javegny S, Boyer C, Cottyn B, Gagnevin L, Vernière C (2014). Genetic structure analysis of strains causing citrus canker in Iran reveals the presence of two different lineages of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A*. *Plant Pathology* 64: 776-784.
- Rosano GL, Ceccarelli E A (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 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.
- Shahryari F, Shams-Bakhsh M, Safarnejad MR, Safaiee N, Ataie Kachoiee 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.
- Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings JG (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 472 - 489.
- Yajima W, Verma SS, Shah S, Rahman MH, Liang Y, Kav NN (2010). Expression of anti-sclerotinia scFv in transgenic *Brassica napus* enhances tolerance against stem rot. *Nature of Biotechnology* 27: 816-821.
- Yang Y, Gabriel DW (1995). *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 8: 627-631.
- Zhao G (2001). Phage display screening and expression in plants of peptide aptamers that bind to *pthA*. Dissertation, University of Florida.

Isolation, gene expression and PthA effector protein production of *Xanthomonas citri* subsp *citri* causal agent of citrus bacterial canker

Mokhtari M.¹, Safarnejad M.R.*², Alavi S.M.², Torkamanzahi A.³

¹Department of Biology, Sistan and Baluchestan University, Zahedan.

²Department of Plant Viruses, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran.

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

Abstract

The citrus bacterial canker is among the most important diseases in Mexican lime gardens in southern area of Iran. The disease is caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*). The PthA bacterial protein, as an effector protein, is crucial in pathogenesis pathway. Inhibition of its functions through antibody could lead to suppression of disease in plant. The present study was performed for isolation and expression of *pthA* gene and purification of PthA recombinant protein. For this aim the specific primers were designed for isolation of 606 bp of hydroxyl terminal of this gene followed by PCR amplification and cloning into pTZ57R/T vector. The coding sequence of truncated *pthA* was inserted to pET28a bacterial expression vector as a C-terminal fusion to 6XHis tag. Production of recombinant protein was performed in BL21(DE3) strain of *E. coli*. The purification was done under native condition through affinity chromatography on nickel column. Total yield was assessed by SDS-PAGE and western blotting analysis. The results confirmed production of PthA recombinant protein with molecular weight around 26 kDa. The purified recombinant protein could be used as an antigen for production of recombinant monoclonal antibodies.

Key words: Citrus bacterial canker, *Xanthomonas citri* subsp *citri* , recombinant protein, PthA, effector protein.

* Corresponding Author: Safarnejad M.R.

Tel: ۰۲۱۲۲۴۰۳۰۱۲

Email: mrsafarnejad@yahoo.com