Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۵، شماره ۱ و ۲، پائیز و زمستان ۱۳۸۲

جدا سازی ژن گلوکز اکسیداز آسپرژیلوس نایجر و کلونینگ آن در پروکاریوت‌ها

جمشید راهب [1*](Ph.D)، لیدا یکتامرام [1] (M.Sc)، محمدرضا اکبری عیدگاهی [2] (Ph.D)، علی‌اکبر شعبانی [2] (Ph.D) و الهام آقایی [1] (M.Sc)

۱- مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

۲- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سمنان، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

چکیده

سابقه و هدف: گلوکزاکسیداز آنزیمی است که در صنایع غذایی، شیمیایی، آرایشی و بهداشتی و همچنین در کیت‌های تشخیص گلوکز استفاده می‌شود. هدف این مطالعه شناسایی و جداسازی این ژن از ژنوم قارچ آسپرژیلوس نایجر از طریق PCR و کلونینگ آن در E. coli به منظور پایه‌ای برای تولید گلوکزاکسیداز نوترکیب در ایران است.

مواد و روش‌ها: قارچ آسپرژیلوس نایجر (ATCC 9029) در محیط حاوی پپتون و گلوکز و عصاره مالت و در حرارت ۲۴ °c به مدت ۷۲-۴۸ ساعت کشت داده شد. DNA ژنومی قارچ به وسیله سونیکت کردن همراه با ساییدن قارچ سونیکت شده در نیتروژن مایع در بافر لیزکننده شامل EDTA و SDS استخراج شد. برای جداسازی ژن، یک جفت پرایمر طراحی شد و در شرایط بهینه شده PCR، ژن گلوکزاکسیداز تکثیر شد. سپس این ژن به وسیله Ins T/Aclon PCR product cloning kit [Tm] به داخل پلاسمید pTZ57R کلون و در داخل میزبان E. coli،DH5α ترانسفورم شد. نقشه ژنی این پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های محدودکننده، تأیید و پلاسمید نوترکیب pTZ57RGO نامیده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که روش استفاده شده در این مطالعه برای کشت و استخراج DNA از قارچ‌های رشته‌ای نظیر آسپرژیلوس مناسب است. همچنین ژن کدکننده آنزیم گلوکزاکسیداز که به وسیله تکنیکPCR جدا شده است دارای اندازه صحیح در آگاروز ژل الکتروفورزیس می‌باشد. ما نشان دادیم پلاسمید نوترکیب pTZ57RGO در Restriction analysis دارای الگوی صحیح می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه ما ژن گلوکز اکسیداز را از طریق بهینه سازی شرایط PCR از آسپرژیلوس نایجر جدا و در یک میزبان پروکاریوتیک، کلون کردیم. این اولین گزارش از جداسازی و کلونینگ این ژن از طریق مهندسی ژنتیک در ایران است که می‌تواند برای کلونینگ در وکتور بیانی به منظور تولید این آنزیم به‌صورت نوترکیب به کار رود.

کلمات کلیدی: گلوکزاکسیداز، آسپرژیلوس نایجر، اشریشیا کولی.

مقدمه

گلوکزاکسیداز و خصوصیات ساختمانی آن. گلوکزاکسیداز (بتا ـ دی ـ گلوکز: اکسیژن ۱ـ اکسید و ردوکتاز (EC: ۱,۱,۳,۴) پروتئین فلاوین داری (Flavoprotein) است که اکسیداسیون β ـ دی ـ گلوکز را به وسیله اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کند. واکنش می‌تواند به دو مرحله جداگانه تقسیم شود: ۱ـ اکسیداسیون سوبسترا و احیای آنزیم در نیمه واکنش احیا ۲ـ اکسیداسیون مجدد آنزیم در نیمه واکنش اکسیداسیون. در نیمه‌واکنش احیا، آنزیم ابتدا باعث اکسیداسیون بتا ـ دی گلوکز به دی گلوکونولاکتون شده و خود به حالت احیاء در می‌آید ($FADH_2$-) دلتا گلوکونولاکتون تحت هیدرولیز خودبه‌خودی قرار گرفته و به اسید گلوکونیک تبدیل می‌شود. در نیمه‌واکنش اکسیداسیون، حالت احیایی آنزیم ($FADH_2$-) توسط اکسیژن مولکولی به حالت اکسیده اولیه باز می‌گردد

*نویسنده مسئول. تلفن:۳-۴۱۹۵۰۳۱-۰۲۱، نمابر:۳-۴۱۹۵۰۳۱-۰۲۱، E-mail: jam@nrcgeb.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

(FAD-) و در نتیجه پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) تولید می‌شود [۳،۱۰].

فعالیت این آنزیم اولین بار توسط Muler در ۱۹۲۸ در عصاره حاصل از کشت آسپرژیلوس نایجر گزارش شد و سپس این آنزیم از آسپرژیلوس تخلیص شد [۱۰]. در حال حاضر گلوکزاکسیداز تجارتی از منابع قارچی نظیر آسپرژیلوس و کلادوسپوریوم تهیه می‌شود [۵،۱۱،۱۲]. گلوکزاکسیداز آسپرژیلوس نایجر آنزیمی است که از دو زیرواحد تشکیل و وزن مولکولی آن ۱۵۰ کیلودالتون می‌باشد. این آنزیم محتوی مولکول FAD بوده که به طور محکم به آن متصل می‌باشد. هر دو زیرواحد محتوی یک پل دی سولفیدی می‌باشد. پروتئین دیمر دارای یک شکل تخم مرغی با محتوای بالایی از ساختمان ثانویه (۲۸٪ مارپیچ و ۱۸٪ صفحات بتا) است. ساختمان سوم آنزیم از دو دسته صفحات بتای جدا و کاملاً مختلف تشکیل شده است. اولین گروه از صفحات بتا قسمتی از Domain (ناحیه) متصل به FAD را تشکیل می‌دهد و دومین گروه، صفحه بتایی است که متشکل از شش رشته غیرموازی بوده و به وسیله چهار مارپیچ آلفا احاطه می‌شود. این صفحه بتا یک طرف از جایگاه فعال آنزیم را تشکیل می‌دهد [۳،۵،۱۱]. جداکردن (Dissociation) زیرواحدها تنها در شرایط دناتوره کنندگی امکان پذیر بوده و با از دست دادن فاکتور FAD همراه می‌باشد. گلوکزاکسیداز آسپرژیلوس نایجر یک گلیکوپروتئین بوده و محتوای کربوهیدراتی آن حدود ۱۵ تا ۱۶ درصد وزن مولکولی آنزیم را شامل می‌شود. به طور کلی هر مولکول گلوکزاکسیداز ۱۵۰ واحد قندی دارد که مانوز فراوان‌ترین آنهاست و گلوکزآمین و گالاکتوز از نظر مقدار در ردیف‌های بعدی قرار می‌گیرند. بخش‌های کربوهیدراتی به صورت پیوندهای N- و O- گلیکوزیدی به پروتئین متصل می‌شوند. حذف آنزیمی (Enzyme removal) محتوای کربوهیدراتی، به میزان ۳۰٪ و ۹۵٪، اثر معنی‌داری بر فعالیت کاتالیتیکی و پایداری آنزیم ندارد. از طرف دیگر وجود مقادیر بالای کربوهیدراتی در آنزیم، خصوصیات ویژه‌ای را به آن داده است از جمله آنزیم را هیدروفیل‌تر کرده و در نتیجه بعضی از خصوصیات غیرمعمول را به آنزیم اعطا می‌کند که از جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

الف ـ عدم رسوب آنزیم در ۱۰۰°C ب ـ پایداری آنزیم در SDS ۰/۷۵% ج ـ رسوب کردن بسیار کند آنزیم به وسیله اسید تری‌کلرواستیک ۵٪ د ـ حلالیت بالای آنزیم در آب و نیاز به غلظت بسیار بالای نمک برای رسوب کردن آنزیم (یعنی ۸۰ تا ۹۰٪ سولفات آمونیوم).

گلوکزاکسیداز برای بتا ـ دی ـ گلوکز ویژگی بسیار بالا داشته با این حال سایر مونوساکاریدها را نیز در سرعت بسیار پایین‌تر اکسیده می‌کند [۱۱،۳،۵].

اهمیت آنزیم گلوکزاکسیداز. گلوکزاکسیداز از نظر تجارتی کاربردهای متنوعی دارد که مهم‌ترین آنها عبارتند از:

– در صنایع شیمیایی برای تولید اسیدهای آلی نظیر اسید گلوکونیک و همچنین در شوینده‌ها

– در صنایع غذایی نظیر صنعت نان، حذف گلوکز از پودر تخم مرغ (Dried egg) و غذاها برای دوام و حفظ رنگ، بو و هم‌چنین حذف اکسیژن از آب میوه‌ها و سبزیجات کنسرو شده و مایونز جهت جلوگیری از فساد.

– مهم‌ترین کاربرد گلوکزاکسیداز در کیت‌های آزمون (Test Kits) و ذی‌حس‌گرها می‌باشد که جهت تعیین کمّی گلوکز در مایعات بیولوژیکی، مواد غذایی، آشامیدنی و مایعات تخمیری (Fermentation liquor) به کار می‌رود.

– در صنایع بهداشتی-آرایشی نظیر خمیردندان، دهان‌شویه‌ها، صابون‌های مایع، کرم‌ها و لوسیون‌های محافظ پوست و مو [۵،۱۱].

جداسازی، کلونینگ و بیان این ژن توسط گروه‌های تحقیقاتی مختلفی انجام شده است. در ۱۹۸۹ ژن این آنزیم از طریق تهیه کتابخانه cDNA از آسپرژیلوس نایجر NRRL-3 جدا و سکانس شد و ژن ساختمانی گلوکزاکسیداز (۱۸۱۵ bp) به همراه نواحی غیرکدکننده طرفین آن مشخص گردید[۸]. Frederrick و همکاران در سال ۱۹۹۰ ژن این آنزیم را از طریق تشکیل کتابخانه ژنومی و cDNA، از سویه

www.SID.ir

Archive of SID

آسپرژیلوس نایجر ATCC 9029 جدا و پس از کلونینگ آن، گلوکزاکسیداز نوترکیب را در مخمر بیان کردند[۶]. در همین سال Whittington و همکاران موفق به تولید مقادیر بالای آنزیم نوترکیب از طریق کلونینگ ژن این آنزیم و بیان آن در ساکارومیسس سرویزیه شدند [۱۳]. در مطالعه دیگری توسط Kim و همکاران، جداسازی ژن این آنزیم از طریق تشکیل یک کتابخانه ژنومی از سویه وحشی آسپرژیلوس نایجر ACMO4 انجام شد [۷].

به دلیل ارزش صنعتی این آنزیم، تولید آن در اختیار شرکت‌های بزرگی نظیر Roche و Sigma قرار دارد و یا نتایج تحقیقات و تولید این آنزیم دارای حق امتیاز ثبت شده patent می‌باشد که اجازه استفاده از نتایج را به سایر کشورها یا شرکت‌ها نمی‌دهد[۵،۱۱]. بنابراین این مطالعه با هدف شناسایی، جداسازی و کلونینگ ژن این آنزیم انجام شده است که بتواند به عنوان گام اول برای تولید این آنزیم در کشور به صورت نوترکیب به کار رود.

مواد و روش‌ها

ارگانیسم‌ها. باکتری سویه E.coli (DH5α) از کلکسیون مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهیه شده است. قارچ Aspergilluse niger (ATCC9029) از شرکت DSMZ خریداری شد.

پلاسمیدها، آنزیم‌ها و مواد. آنزیم‌هایی نظیر T4 DNA ligase، Taq DNA polymerase و آنزیم‌های محدودکننده وdNTP (محصول فرمنتاس) از شرکت سینازن خریداری شد. مارکر، وزن مولکولی و Agarose gel DNA extraction kit محصول شرکت (Roche) بود. Ins T/Aclon ™ PCR product cloning kit شامل پلاسمید TZ57R فرآورده شرکت Fermentase بود. محیط کشت قارچAspergilluse niger حاوی عصاره مالت و پپتون و گلوکز از شرکت Merk بود.

کشت قارچ و استخراج DNA کروموزومی. محیط مایع کشت قارچ A. niger حاوی عصاره مالت، گلوکز و پپتون بود و برای جلوگیری از رشد باکتری به محیط کشت آمپی‌سیلین ۵۰ µg/ml اضافه شد. محیط کشت در دمای اپتیمم ۲۴ °C قرار داده شد و قارچ‌ها پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت رشد کردند. سپس سانتریفوژ شده رسوب قارچ، به فالکون‌های ۵۰ ml منتقل شده با آب دی‌یونیزه استریل شسته شده و دوباره سانتریفوژ شد و برای استخراج DNA از بافر لیزکننده شامل EDTA وSDS (pH= ۸) استفاده شد. بدین منظور به رسوب قارچ در هر فالکون ۵۰ml حدود ۵ ml از بافر لیزکننده سرد اضافه و در داخل یخ ۵ نوبت هر نوبت ۳۰ ثانیه Sonicate شد. سپس محتویات، به یک هاون چینی استریل منتقل شد و در شرایط استریل با ازت مایع سائیده شد و با مقدار کمی بافر لیزکننده به‌صورت هموژن درآمد. سپس فالکون‌ها در تانک ازت و بعد در بن‌ماری ۶۸ °C قرار داده شد. مراحل فوق ۲ بار دیگر تکرار شد؛ پس از آخرین مرحله نمونه Shake شد و در دمای آزمایشگاه در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. از محلول رویی ۴ml برداشته و در یخ قرار داده شد. در این زمان ۴۰۰ µl استات پتاسیم ۵ مولار به فالکون اضافه گردید و پس از مخلوط کردن، یک ساعت در یخ قرار داده شد. بعد به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد محلول رویی به فالکون جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانل اضافه گردید. پس از سانتریفوژ در ۱۳۰۰۰ rpm، محلول رویی را دور ریخته و رسوب در TER بافر شامل

۱۰ mM Tris-HCl+ ۱mM Na2 EDTA+۱۰µg RNase A

حل شد؛ سپس دوباره ایزوپروپانل اضافه و میکروفیوژ گردید و درنهایت رسوب حاصل در TER حل شد. نمونه حاصل روی ژل ۱% آگارز الکتروفورز گردید.

طراحی پرایمرها. روش PCR برای تکثیر قطعه مربوط به ژن کدکننده آنزیم گلوکزاکسیداز در DNA ژنومی A.niger مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرها براساس سکانس منتشر شده توسط Frederick SH. و همکاران و همچنین Kriechbaum و همکاران طوری طراحی شد که علاوه بر سکانس کدکننده سایت‌های آنزیمی *Eco*RI و *Hind* III را

www.SID.ir

Archive of SID

به ترتیب در ابتدا و انتهای ژن جهت تسهیل در کلونینگ‌های بعدی فراهم کند. سکانس پرایمرها عبارت است از:

GLO1 (forward): 5'- GAA TTC ATG CAG ACT CTC CTT GTG AGC - 3'

GLO2 (reverse): 5'- AAG CTT TCA CTG CAT GGA AGC ATA ATC - 3'

روش PCR. با توجه به Tm هر کدام از پرایمرها، PCR با دمای از ۶۷ °C =annealing و کمتر انجام شد که در دمای annealing = ۵۶° C باند مورد نظر حاصل شد. تکثیر قطعات نوکلئوتیدی با دستگاه ترموسایکلر (Corber Research) طبق برنامه زیر صورت گرفت:

مرحله ۱: Denaturation (۹۴°C, ۵ min)

مرحله ۲: (Denaturation ۹۴°C ۱min, Annealing ۵۶ °C ۱min, Extention ۷۲°C ۲ min) ۳۰ cycle,

مرحله ۳: Final extention (۷۲°C ۵ min)

مرحله ۴: (۲۵ °C ۱ min)

خالص سازی محصول PCR. برای تخلیص محصول PCR، ابتدا با استفاده از الکتروفورزیس روی ژل آگارز ۱٪ قطعه مورد نظر که اندازه حدود ۱/۸ kb را نشان می‌دهد با تیغ استریل بریده شد به ویال‌های ۱/۵ ml استریل منتقل شد. سپس با استفاده از کیت Agaros gel DNA Extraction قطعه مورد نظر مطابق پروتکل کیت، خالص شد که ۵ µl آن روی ژل، باند مشخصی را نشان می‌دهد.

تهیه Competent cell (سلول پذیرا). سلول پذیرا مطابق روش استاندارد تهیه شد. به طور خلاصه یک کلنی از باکتری E. coli سویه DH5α به‌صورت شبانه‌روزی Overnight (O/N) در ۳ ml محیط LB کشت شد. ۰/۰۵ml از این محیط به ۲۰ ml محیط LB استریل منتقل و به مدت ۳ـ۲ ساعت در شیکر انکوباتور۳۷°C با ۲۰۰rpm قرار داده شد. به طوری‌که OD نمونه‌ها به حدود ۰/۴ـ۰/۵ برسد؛ سپس نمونه، به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد و پلت باکتریایی در ۱۵ ml کلریدکلسیم ۱۰۰ mM سرد سوسپانسیون شده و به مدت ۰/۵ h بر روی یخ قرار گرفت. بعد از این مرحله سلول‌ها مجدداً سانتریفوژ شدند. پلت حاصل در ۳ ml کلریدکلسیم سرد و ۰/۵ ml گلیسرول استریل، سوسپانسیون شد. نمونه‌ها با مقادیر ۲۰۰ µl در داخل ویال ۱/۵ ml استریل الیکوت تا زمان استفاده در فریزر ۷۰- °C نگهداری شد.

کلونینگ. محصول تخلیص شده PCR حاوی ژن گلوکزاکسیداز با استفاده از InsT/AClone™ PCR product cloning kit داخل پلاسمید PTZ57R کلون شد. پلاسمید PTZ57R حاوی مارکر bla (سایت مقاومت به آمپی‌سیلین) و توانایی α-Complementation می‌باشد. Ligation ابتدا با اضافه کردن آنزیم T4 DNA ligase به محلول حاوی قطعه PCR و وکتور PTZ57R به‌صورت شبانه‌روز در دمای ۲۲ °C انجام پذیرفت. محصول ligation به داخل باکتری پذیرا (E. coli, DH5α) با استفاده از روش معمول شوک حرارتی، ترانسفورم شد. در مرحله بعد میزان ۱۰۰ µl از باکتری ترانسفورم شده بر روی یک پلیت حاوی Amp, IPTG, X -Gal پخش شد و به‌صورت شبانه روز در انکوباتور۳۷°C قرار گرفت. به دلیل وجود پدیده α-Complementation در وکتور مورد استفاده، کلنی‌های سفید از نظر فرآیند Cloning مثبت و کلنی آبی منفی قلمداد می‌شوند. تعدادی از کلنی‌های سفید انتخاب و برای استخراج پلاسمید در مقیاس پایین در محیط مایع LB+Amp به صورت شبانه روز در دمای ۳۷°C در ۲۲۰ rpm کشت شد.

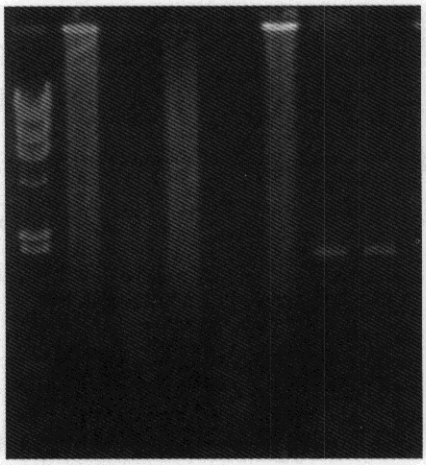
آنالیز پلاسمیدها **(Restriction analysis)**. استخراج پلاسمید در مقیاس کم (Mini preparation) با استفاده از روش معمول لیز قلیایی انجام شد. پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های سفید در مقایسه با پلاسمید کنترل اصلی (یعنی وکتور pTZ57R بدون insert ترانسفورم شده در DH5α) اندازه سنگین‌تری داشتند. با توجه به جایگاه‌های برش روی ژن و وکتور این پلاسمیدها با آنزیم‌های *Hind* III, *Eco* RI بریده شدند و از بین آنها یک پلاسمید که الگوی هضم آنزیمی مورد انتظار را نشان می‌داد به عنوان کلون مورد نظر انتخاب شد.

www.SID.ir

Archive of SID

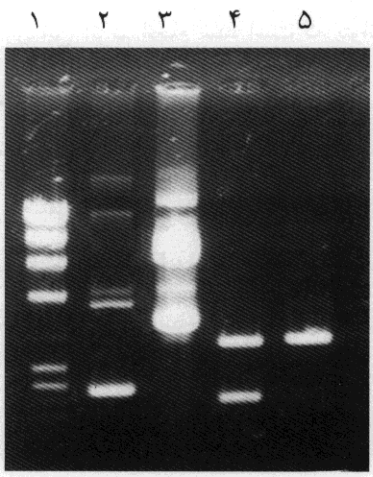
نتایج

کشت و استخراج DNA ژنومیک. آسپرژیلوس در محیط حاوی پپتون، گلوکز و عصاره مالت به خوبی رشد کرد. این محیط توسط ATCC تحت عنوان فرمول Blakeslees توصیه می‌شود. محققین دیگر نیز محیط‌هایی با فرمولاسیون‌های مختلف را استفاده کرده‌اند [۶،۷]. با وجود مشکل بودن کشت و استخراج DNA ژنومیک از قارچ‌های رشته‌ای این مطالعه نشان داد که روش سونیکاسیون و انجماد و ذوب در نیتروژن مایع می‌تواند به اندازه کافی DNA ژنومیک جهت انجام PCR در اختیار قرار دهد.



شکل۱: ستون اول مارکر وزن مولکولی λ2
ستون دوم و سوم محصول PCR قطعه حاوی ژن گلوکز اکسیداز

PCR، کلونینگ و Restriction analysis. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است با تغییر فاکتور دمای annealing، باند مورد انتظار ۱/۸ Kb در آگاروز ژل الکتروفورزیس به دست آمد. قطعه مورد نظر پس از جدا کردن از روی ژل با agarose gel DNA extraction kit تخلیص گردید. DNA تخلیص شده در آب مقطر حل شد و میزان جذب در $OD_{۲۶۰}$ خوانده شد. براساس این که در $OD_{۲۶۰}$ =۱ غلظت DNA حدود ۵۰µg/ml می‌باشد و با توجه به اندازه ۱/۸ Kb ~ DNA، غلظتی معادل ۳۶ µg /ml از DNA جهت ligation در ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب استفاده شد. بعد از ترانسفورماسیون به E. coli DH5α و کشت آنها روی پلیت‌های حاوی آمپی‌سیلین، X-gal و IPTG به مدت یک شب، ۱۹ کلنی سفید به دست آمد. پس از کشت این کلنی‌ها و استخراج پلاسمید از آنها، از کلون‌هایی که از نظر اندازه پلاسمید نسبت به پلاسمید اولیه سنگین‌تر بود (شکل ۲ ستون دوم و سوم) یک کلون انتخاب و جهت Restriction analysis استفاده شد. با هضم آنزیماتیک به کمک آنزیم‌های *Hind* III و *Eco*RI قطعات مورد انتظار حاصل، (شکل ۲ ستون ۴ و ۵) و جهت قرار گرفتن ژن در داخل پلاسمید نیز مشخص گردید. جایگاه‌های برش و جهت قرار گرفتن ژن داخل پلاسمید در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل۲: ستون اول مارکر وزن مولکولی λ2
ستون دوم پلاسمید pTZ57R بریده نشده
ستون سوم پلاسمید pTZ57RGO به‌صورت بریده نشده
ستون چهارم پلاسمید بریده شده با آنزیم *Hind* III
ستون پنجم پلاسمید بریده شده با آنزیم *Eco* RI

بحث

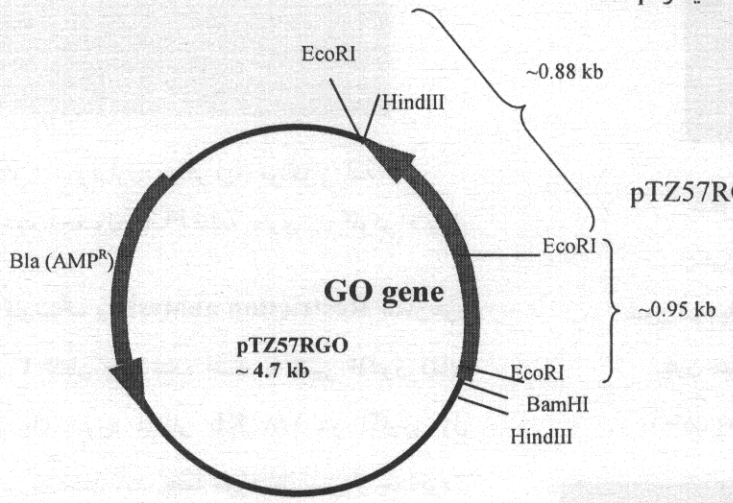
آنزیم گلوکزاکسیداز اولین بار از عصاره گونه آسپرژیلوس تخلیص شد. سپس میکروارگانیسم‌های متعددی از نظر تولید این آنزیم در مقیاس صنعتی غربال‌گری شدند که آسپرژیلوس نایجر بهترین تولیدکننده این آنزیم بوده است [۶،۷،۸،۱۳]. آنزیم گلوکزاکسیداز کاربردهای متنوعی دارد این آنزیم به عنوان ذی‌حس‌گر بیولوژیکی گلوکز، نگهدارنده در صنایع غذایی و در روند تولید اسیدهای آلی در صنعت نان،

www.SID.ir

Archive of SID

شوینده‌ها، مواد بهداشتی-آرایشی به کار می‌رود [۵،۱۱]. تحقیقات جدیدتر نشان می‌دهد که انتقال ژن گلوکزاکسیداز به گیاهان می‌تواند به مقاومت پایه‌های گیاهی در مقابل آفات منجر شود [۹،۱۴]. به دلایل فوق تولید این آنزیم در اختیار شرکت‌های بزرگ بوده و یا نتایج تحقیقات و تولید این آنزیم دارای حق امتیاز ثبت شده patent می‌باشد که اجازه استفاده از آن را به سایر کشورها یا شرکت‌ها نمی‌دهد. گرچه مطالعات اولیه‌ای بر روی تخلیص و خصوصیات ترمودینامیکی این آنزیم در ایران انجام شده است [۱،۲]، ولی بر روی جدا سازی ژن این آنزیم به منظور تولید آنزیم نوترکیب، این اولین مطالعه می‌باشد. بنابراین این مطالعه با هدف شناسایی، جداسازی و کلونینگ ژن این آنزیم انجام شده است که بتواند برای تولید آنزیم نوترکیب در ایران به کار رود.

جداسازی، کلونینگ و بیان این ژن توسط گروه‌های تحقیقاتی مختلفی انجام شده است. در ۱۹۸۹ ژن این آنزیم از طریق تهیه کتابخانه cDNA از آسپرژیلوس نایجر NRRL-3 جدا و سکانس شد و ژن ساختمانی گلوکزاکسیداز bp ۱۸۱۵ به همراه نواحی غیرکدکننده طرفین آن مشخص گردید[۸] Frederrick و همکاران ژن این آنزیم را از طریق تشکیل کتابخانه ژنومی و cDNA، از سویه آسپرژیلوس نایجر ATCC 9029 جدا و کلون کردند [۶]. در مطالعه Kim و همکاران، جداسازی ژن این آنزیم از طریق تشکیل یک کتابخانه ژنومی از سویه وحشی آسپرژیلوس نایجر ACMO4 انجام شد [۷]. ما جداسازی این ژن را از طریق آمپلیفیکاسیون با بهینه‌سازی روش PCR بر روی DNA ژنومیک استخراج شده از سویه آسپرژیلوس نایجر ATCC 9029 به عنوان الگو انجام دادیم. با وجود مشکل بودن کشت و استخراج DNA ژنومیک از قارچ‌های رشته‌ای، این مطالعه نشان داد که روش سونیکاسیون و لیز در نیتروژن مایع می‌تواند به اندازه کافی DNA ژنومیک جهت انجام PCR در اختیار قرار دهد. هر چند در سال ۲۰۰۲ روش ساده و مؤثری توسط Cassago و همکاران برای جداسازی DNA از قارچ‌های رشته‌ای گزارش شد [۴].



شکل ۳. نمایش شماتیک پلاسمید pTZ57RGO

در این مطالعه پرایمرها بر اساس سکانس ژن گزارش شده توسط Frederick S. H و همکاران و Kriechbaum و همکاران طوری طراحی شدند [۶،۸] که ضمن ایجاد جایگاه‌های آنزیمی Eco RI و Hind III به ترتیب در ابتدا و انتهای این ژن، سیگنال پپتید ژن که از ۲۲ اسید آمینه تشکیل شده است را نیز در برگیرد؛ بدون اینکه نواحی غیرترجمه‌ای در انتهای 5' و 3' ژن را در محصول PCR شامل شود. اهمیت سیگنال ترشحی در تولید ژن گلوکزاکسیداز جدا شده از آسپرژیلوس نایجر را قبلاً Whittongton و همکاران نشان داده‌اند [۱۳].

پلاسمید نوترکیب pTZ57RGO این امکان را فراهم می‌سازد که بتوانیم این ژن را به سادگی از جایگاه‌های مختلف آنزیمی برش زده و در وکتورهای بیانی تحت پروموترهای مختلف در سیستم‌های پروکاریوتیک یا یوکاریوتیک کلون

www.SID.ir

Archive of SID

نموده و ضمن ارزیابی این پروموترها در بیان این ژن، بتوانیم نقش سیگنال پپتید را در هنگام تولید آنزیم نوترکیب در این سیستم‌ها مشخص نمائیم. ما در این مطالعه برای اولین بار در ایران ژن این آنزیم را از طریق دست‌ورزی‌های ژنتیکی به دست آوردیم.

منابع

[۱] حقیقی‌راد فرهاد. مطالعه ترمودینامیکی و پیوند شدن مولکولی گلوکزاکسیداز با مواد فعال سطحی و اوره. پایان‌نامه مقطع دکتری فیزیک، انیستیتو بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، دانشگاه شیراز، ۱۳۷۲.

[۲] گرگانی محسن. تولید و تخلیص آنزیم گلوکزاکسیداز از قارچ آسپرژیلوس نایجر، پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه تهران، انیستیتو بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، ۱۳۸۰.

[3] Bright HJ, Prtet DJT, Flavoprotein Oxidase. In: Boyer PD, editor. the enzyme. 3rd ed. Academic press, New York, Sanfrancisco, and London; 1975, p.421-505.

[4] Cassago A, Panepucci RA, Tortella Baiao AM, Henrique-Silva F, Cellophane based mini-prep method for DNA extraction from the filamentous fungus Trichoderna reesei, BMC Microbiol, 2002; 2: 14-17.

[5] Cherry JR, Berka RM, Halkier T, Recombinant expression of a glucose oxidase from a Cladosporium strain, 1999. US patent: 5879921.

[6] Frederick KR, Tung J, Emerick RS, Masiarz FR, Chamberlin SH, Vasavada A, Rosenberg S, Glucose oxidase from Aspergillus niger cloning, gene sequence, secretion from Sacharomyces cervisiae and kinetic analysis of a yeast-drived enzyme. J Biol Chem, 1990; 256: 3793-802.

[7] Kim MY, Chung HG, Hong SY, Kim HR, Lee JC, Park SM, Lee JH, Yang MS, Kim DH, Characterization of a novel allele of glucose oxidase from a Korean wild type strain of Aspergillus niger, Mol Cells, 2001; 11: 2891-6.

[8] Kriechbaum M, Heilmann HJ, Wientjes FJ, Hahn M, Jany KD, Gassen HG, Sharif F, Alaeddinglu G, Cloning and DNA sequence analysis of glucose oxidase gene from Aspergilles niger NRRL-3, FEBS Letters, 1989; 255: 63-6.

[9] Li-ping Z, Jing-hua Y, Tian-ran L, Yu-qi Y, He-ling Z, Late blight resistant transgenic potato expressing glucose oxidase gene. J Agri Univer Hebei, 2001; 14: 22-6.

[10] Pazur JH, Kleppe K, The oxidation of glucose and related compounds by glucose oxidase from Aspergillus niger. Biochemistry, 1964; 3: 578-83.

[11] Rosenberg S, Production of glucose oxidase in recombinant systems. 1992; US patent: 5094951.

[12] Swoboda BEP, Massey V, Purification and properties of the glucose oxidase from aspergilluse niger. J Biol Chem, 1965; 240: 2209-15.

[13] Whittington H, Kerry-Williams S, Bidgood K, Dodsworth N, Peberdy J, Dobson M, Hinchliffe E, Balance DJ, Expression of the Aspergillus niger glucose oxidase gene in A. niger, A. nidulance and Sacharomyces cervisiae. Curr Genet, 1990; 18: 531-6.

[14] Yoon IN, Kim HI, Young E, Proceeding of Plant and animal genom VII conference, 1999; San Diego, USA. p. 523.

www.SID.ir