Archive of SID

استخراج و خالص سازی آنزیم DNA پلی مراز از باسیلوس استیروترموفیلوس جدا شده از آب گرم استخر گاومیش شهر سرعین

محمد اصغرزاده[۱]، محمدعلی حسین پورفیضی[۲]، عبدالناصر رفیع[۳]

تاریخ پذیرش: ۸۲/۸/۵

Title: Extraction and purification of DNA polymerase enzyme from Bacillus stearothermophilus isolated from Gavmish Goly hot spring in Saraeyn city

Authors : Asgharzadeh M.[1], Houssein Pour Faizi M.A.[2], Rafi A.[3]

Abstract: DNA Polymerase enzyme undertake the DNA replication and in molecular research DNA polymerase enzymes especially thermostable enzymes have great importance. In this reserch, thermostable DNA polymerase was extracted and purified from *Bacillus stearothermophilus* isolated from Gavmish Goly hot spring in Saraeyn city. Bacteria were cultured in Luria-Bertani broth at 55°C and harvested in logarithm phase. Twenty grams of cell paste obtained and resuspended in related buffer. Crude cell extracts were prepared by using of lysozyme and sonication. Purification were performed by ammonium sulfate precipitation and three steps of chromatography with DEAE-sephadex, phosphocellulose and Heparin-sepharose. DNA polymerase enzyme was purified 127-fold and specific activity of the purified enzyme was 223(U/mg). DNA polymerase had the most activity at 55°C. Three protein bands were obtained by using of SDS-PAGE. The major band had a molecular weight of approximately 76000 daltons. *Bacillus stearothermophlius* DNA polymerase can use in DNA replication, site directed mutagenesis and probably in DNA sequencing at high temperature.

Keyword *Bacillus Stearothermophlius*, DNA Polymerase Enzyme, Purification.

1- Assistant Professor, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences.
2-. Professor, School of Science, Tabriz University.
3- Associate Professor, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences.

۱_ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز.
۲-_ استاد دانشکده علوم دانشگاه تبریز.
۳-_ دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده

با توجه به نقش آنزیم DNA پلی مراز در همانند سازی DNA در تحقیقات مولکولی آنزیم های DNA پلی مراز خصوصاً انواع مقاوم به حرارت از اهمیت بسزایی برخوردارند. در این تحقیق، از باکتری باسیلوس استیروترموفیلوس مقاوم به حرارت، جدا شده از آب گرم استخرگاومیش شهر سرعین استان اردبیل آنزیم DNA پلی مراز مقاوم به حرارت استخراج و تخلیص گردید به همین منظور باکتریها در محیط Luria-Bertani broth در دمای ۵۵°C کشت داده شدند و در فاز لگاریتمی برداشته شدند. نتیجتاً بیست گرم خمیر باکتری بدست آمد و در بافر مربوطه به صورت سوسپانسیون در آورده شد سپس با استفاده از لیزوزیم و سونیکاسیون عصاره خام سلولی تهیه گردید بعد به کمک رسوب با سولفات آمونیوم و سه مرحله کروماتوگرافی به ترتیب با DEAE – سفادکس، فسفوسلولز و هپارین سفاروز خالص سازی عصاره خام سلولی صورت گرفت. آنزیم DNA پلی مراز ۱۲۷ برابر تخلیص گردید و در نهایت آنزیم با فعالیت ویژه ۲۲۳(U/mg) تهیه شد. DNA پلی مراز استخراجی در دمای ۵۵°C بیشترین فعالیت را از خود نشان داد. با استفاده از SDS-PAGE سه باند پروتئینی بدست آمد که وزن مولکولی باند اصلی حدود ۷۶۰۰۰ دالتون بود. از آنزیم DNA پلی مراز باسیلوس استیروترموفیلوس می توان در همانندسازی DNA، site directed mutagenesis و DNA sequencing در دمای بالا استفاده نمود.

گل واژگان: باسیلوس استیروترموفیلوس، آنزیم DNA پلی مراز، خالص سازی.

مقدمه

DNA پلی مرازها (EC2.7.7.7)، عمل همانند سازی و ترمیم DNA را در موجودات زنده بعهده دارند. این آنزیمها سنتز DNA مکمل را در جهت $5'$ به $3'$ ($5' \rightarrow 3'$) و از روی رشته الگو انجام داده و عمل همانند سازی را در حضور دزاکسی ریبونوکلئوزید تری فسفات و کاتیون دو ظرفیتی Mg^{2+} انجام می دهند(۱).

موجودات زنده به تناسب ویژگیهای ساختاری خود، نیازمند محیط های متفاوتی برای تداوم حیات خود می باشند از آن جمله می توان به میکروارگانیسم هایی مثل ترموفیل ها اشاره نمود که در شرایط دمائی بالا قادر به زندگی می باشند (۲) از این رو آنزیم DNA پلی مراز ترموفیلها، همانندسازی را در دمای بالا انجام می دهد و در نتیجه مقاوم به حرارت می باشد. DNA پلی مرازهای مقاوم به حرارت اهمیت بسزایی در تحقیقات در زمینه بیولوژی مولکولی دارند (۳).

آنزیم DNA پلی مراز مقاوم به حرارت از باکتریهای مختلف مانند Thermus aquaticus YT-1 (۴)، Thermus thermopilus HB-8(۵)، Thermoplasma acidophilum (۶)، Sulfolobus solfataricus (۷)، Bacillus caldotenax (۸) و Thermus caldophilus GK24 (۳) استخراج و خالص شده است. از باکتریهای مقاوم به حرارت می توان از باسیلوس استیروترموفیلوس نام برد که قادر به رشد در دمای ۶۵°C می باشد (۹). در این تحقیق، هدف استخراج و خالص سازی آنزیم DNA پلی مراز باکتری باسیلوس استیروترموفیلوس جدا شده از استخر آب گرم معدنی گاومیش شهر سرعین واقع در استان اردبیل و سپس تعیین خصوصیات آن بود.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش کار

کیت DNA Polymerase Assay، PMSF (Phenyl Methyl Sylfonyl Fluoride)، لیزوزیم، SDS، DTT (Dithiothreitol) و Tris از شرکت Roche، هپارین سفاروز CL-6B، DEAE - سفادکس A-50، آمونیوم پرسولفات، آکریل آمیدوبیس آکریل آمید از شرکت Pharmacia Biotech، فسفو سلولز و استاندارد وزن مولکولی پروتئین از شرکت Sigma و EDTA، Tween-20، KCl و گلیسرول از شرکت Merck تهیه گردید.

استخراج و تخلیص آنزیم DNA پلی مراز

شامل مراحل ذیل بود و تمام مراحل خالص سازی در ۴°C صورت گرفت.

۱_ تهیه عصاره خام سلولی

برای این منظور باکتریها در محیط کشت Luria-Bacto Bertani (LB) (۸) دارای ۱۰gr= Tryptone، Yeast Extract=۵gr و NaCl=۵gr (pH=۷) در دمای ۵۵°C به مدت ۴۸ ساعت به صورت هوازی کشت داده شدند و از کشت فوق به نسبت ۱ به ۱۶ به محیط کشت تازه LB منتقل شد و به مدت ۲۰ ساعت در ۵۵°C به صورت هوازی انکوبه گردید و در ۷۵۵۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و در نهایت ۲۰ گرم خمیر باکتری تهیه گردید سپس باکتری ها دو بار با ۲۰۰ml از بافر (۱۰mM EDTA و pH=۷/۵ و ۵۰mM Tris-HCl) TE شستشو داده شدند و در نهایت باکتریها در ۶۳ml از بافر (pH=۷/۵) ۵۰mM Tris-HCl و ۴mM KCl، ۰/۵mM DTA، ۱M DTT، ۱mM PMSF، Tween-20 ۰/۰۱٪(V/V) و گلیسرول ۱۰٪ (V/V) (بافر A) به صورت سوسپانسیون در آورده شدند و در ۲۰°C- دوازده ساعت فریز گردیدند و پس از ذوب، ۴۰mg لیزوزیم به آن اضافه و ۶۰ دقیقه در ۴°C انکوبه شدند و سپس سلولها تحت تاثیر سونیکاتور به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و در ۷۵۵۰rpm به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. عصاره خام سلولی جدا و تفاله کنار گذاشته شد.

۲_ رسوب با سولفات آمونیوم

به عصاره خام سلولی تهیه شده (۶۰ml) به آرامی پودر سولفات آمونیوم (۳) به مقدار ۳۳/۶۶ گرم اضافه گردید در حالی که به ملایمت بر روی بهم زن مغناطیسی بهم زده می شد تا غلظت نهایی سولفات آمونیوم به ۸۰٪ اشباع برسد و بعد از دو ساعت بهم زدن، با ۷۴۰۰rpm به مدت ۷۰ دقیقه سانتریفوژ رسوب بدست آمد و سپس رسوب در ۲۰ml بافر(pH=۷/۵) ۵۰mM Tris-HCl و ۴mM KCl، ۰/۵mM EDTA، ۱mM DTT، Tween-20 ۰/۰۱٪(V/V) و گلیسرول ۱۰٪ (V/V) (بافر B) حل گردید. محلول دو بار (بار اول ۵ ساعت و بار دوم ۱۴ ساعت) با ۲۰۰۰ میلی لیتر از بافر B دیالیز شد و حجم نهایی بعد از دیالیز به حدود ۳۰ میلی لیتر رسید.

۳_ کروماتوگرافی با DEAE – سفادکس A-50

محلول حاصل از مرحله بالا (۳۰ml) به ستون DEAE - سفادکس A-50 (۵۷cm×۱/۹cm) Load گردید که ستون قبلاً با بافر B متعادل شده بود سپس ستون با ۲۰۰ml بافر B شستشو داده شده و elution با ۳۰۰ml بافر B به صورت گرادیان مرحله ای KCl از ۴۰mM → ۱۰۰۰mM انجام پذیرفت. سرعت

www.SID.ir

Archive of SID

جریان ۴۰ml/h بود و فراکسیونهای ۱۰ml جمع آوری گردید و محلول جمع آوری شده با ۲۰۰۰ میلی لیتر از بافر B دو مرتبه (بار اول ۵ ساعت و بار دوم ۱۴ ساعت) دیالیز شد.

۴_ کروماتوگرافی با فسفوسلولز

ابتدا فسفوسلولز با بافر B متعادل گردید و بعد محلول حاصل از مرحله بالا (۵۰ml) به ستون فسفوسلولز (۱۰/۵cm×۲/۹cm) Load شد (۶) و ستون با ۱۰۰ml از بافر B شستشو شده elution با ۱۶۰ml از بافر B با گرادیان مرحله ای ۴۰mM → ۱۰۰۰mM انجام پذیرفت. سرعت جریان ۳۰ml/h بود و نتیجتاً فراکسیون های ۱۰ میلی لیتری جمع آوری گردید و محلول جمع آوری شده با ۳۰۰۰ میلی لیتر از بافر B دو بار دیالیز شد.

۵_ کروماتوگرافی هپارین سفاروز CL-6B

محلول حاصل از مرحله ۴ با ستون هپارین سفاروز (۵/۶cm×۲/۱cm) که قبلاً با همان بافر B متعادل شده بود، Load گردید (۷) و با ستون ۱۰۰ml از بافر B شستشو شد و elution با ۱۱۰ml از بافر B با کمک گرادیان مرحله ای ۴۰mM → ۱۰۰۰KClmM صورت گرفت سرعت جریان ۲۰ml/h بود و فراکسیون های ۵ میلی لیتری جمع آوری گردید و با ۲۰۰۰ میلی لیتر از بافر B دو بار دیالیز انجام گرفت.

اندازه گیری پروتئین

میزان پروتئین با روش Bradford تعیین گردید(۱۰) و از آلبومین سرم گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

سنجش فعالیت DNA پلی مراز

برای سنجش DNA پلی مراز از کیت DNA Polymerase Assay غیر رادیواکتیو شرکت Roche استفاده گردید. محاسبه فعالیت آنزیم در مقایسه با کنترل مثبت کیت که آنزیم Klenow است و همراه کیت می باشد، صورت گرفت و فعالیت DNA پلی مراز در ۳۰-۸۰°C بررسی شد.

تعیین وزن مولکولی

وزن مولکولی DNA پلی مراز با استفاده از تکنیک (SDS - PAGE) Sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gel electrophoresis به روش Laemmli تعیین شد (۱۱) و برای دیدن باندها رنگ آمیزی نیترات نقره صورت گرفت (۱۲).

نتایج

رشد باکتری باسیلوس استیروترموفیلوس و تولید DNA پلی مراز از ۲۰ لیتر کشت باکتریایی در محیط LB بیست گرم خمیر باکتری تهیه شد و باکتریها از کشت ۲۰ ساعته برداشت شدند که در فاز لگاریتمی رشد بودند و تولید DNA پلی مراز در بالاترین حد بود.

خالص سازی آنزیم DNA پلی مراز

DNA پلی مراز، بر طبق روشی که در بخش مواد و روش کار توضیح داده شده است، ۱۲۷ برابر تخلیص گردید. خلاصه ای از نتایج خالص سازی DNA پلی مراز در جدول ۱ نشان داده شده است. در طی مراحل خالص سازی فعالیت ویژه افزایش پیدا نمود و در نهایت به ۲۲۳ واحد در هر میلی گرم از پروتئین توتال رسید (جدول ۱). در طی

www.SID.ir

Archive of SID

خالص سازی محصول تقریباً خالصی از آنزیم تهیه شد که با الکتروفورز SDS-PAGE مشخص گردید. در کروماتوگرافی با DEAE - سفادکس، فسفو سلولز و هپارین سفاروز بیشترین فعالیت آنزیم در فراکسیون حاصل از elution به ترتیب ۱۷۵mM KCl، ۲۰۰ و ۳۷۵ بود.

جدول ۱: خالص سازی آنزیم DNA پلی مراز از باسیلوس استیروترموفیلوس

بازده (%)	فعالیت ویژه (U/mg)	فعالیت توتال (U)	پروتئین توتال(mg)	حجم (ml)	مراحل خالص سازی
۱۰۰	۱/۷۶	۷۵۰	۴۲۶	۶۰	عصاره خام
۷۲	۳/۲۶	۵۳۷	۱۶۵	۳۰	سولفات آمونیوم
۷۴	۱۲/۵	۵۶۲	۴۵	۵۰	DEAE - سفادکس
۴۲	۱۷۳/۶	۳۱۲	۱/۸	۳۰	فسفو سلولز
۱۹	۲۲۳	۱۴۴	۰/۶۴۵	۱۵	هپارین سفاروز CL-6B

اثر حرارت بر روی فعالیت

فعالیت DNA پلی مراز در ۳۰-۸۰°C بررسی شد. آنزیم استخراجی بیشترین فعالیت را در ۵۵°C داشت و در ۷۰°C فقط حدود ۲۰٪ فعالیت و در ۷۵°C، ۶٪ فعالیت را نشان داد و در بالاتر از ۷۵°C فعالیتی مشاهده نگردید و در دمای پایین نیز فعالیت آنزیم کم شد. به طوری که در ۴۰°C، ۲۰٪ فعالیت و در ۳۰°C حدود ۸٪ فعالیت آنزیم وجود داشت (شکل ۱) و آنزیم همچنین ۳۰ دقیقه در حرارت ۵۰-۸۰°C انکوبه شد و سپس در ۵۵°C فعالیت آنزیم بررسی شد، فعالیت آنزیم در اثر حرارت بالا از بین رفت به طوری که حرارت ۸۰°C به مدت ۳۰ دقیقه به طور کامل فعالیت آنزیم را متوقف نمود.

وزن مولکولی

وزن مولکولی آنزیم DNA پلی مراز استخراجی با SDS-PAGE بررسی شد، سه باند پروتئینی بدست آمد که باند اصلی وزن مولکولی حدود ۷۶۰۰۰ دالتون داشت و وزن مولکولی دو باند ضعیف دیگر حدود ۱۰۰۰۰۰ و ۳۴۰۰۰ دالتون بود که در مقابل protein molecular weight markers حاوی ۸ پروتئین با وزنهای مولکولی ۳۶۰۰۰، ۴۵۰۰۰، ۵۵۰۰۰، ۶۶۰۰۰، ۸۴۰۰۰، ۹۷۰۰۰، ۱۱۶۰۰۰ و ۲۰۵۰۰۰ دالتون به دست آمد.

بحث

براساس روش توصیفی فوق DNA پلی مراز مقاوم به حرارت تقریباً خالصی از باکتری باسیلوس استیروترموفیلوس جدا شده از آب گرم استخر گاومیش شهر سرعین استخراج و تخلیص گردید. باکتریها در فاز لگاریتمی رشد (کشت ۲۰ ساعته) برداشته شدند در این مرحله، بیشترین حد تقسیم سلولی و همانند سازی DNA وجود دارد لذا مقدار DNA پلی مراز در بالاترین حد در سلول باکتری می باشد.روش نسبتاً ساده ای برای خالص سازی پروتئین مورد استفاده قرار

www.SID.ir

Archive of SID

گرفت، می توان از این روش برای استخراج DNA پلی مرازهای مختلف اقدام نمود. DNA پلی مراز باسیلوس استیروترموفیلوس همانند سایر DNA پلی مرازهای مقاوم به حرارت مانند DNA پلی مراز Thermus aquaticus (۴ و۱۳)، Sulfolobus solfataricus (۷ و ۱۴)، Sulfolobus acidocaldarius (۱۵) و Thermoplasma acidophilus (۶) فعالیت در درجه حرارت بالا می کند و احتمال می رود که ساختمان DNA پلی مرازهای فوق از نظر اسیدهای آمینه موجود حداقل در بعضی موقعیت ها از جمله نواحی اتصال نوکلئوتیدها و محل اتصال DNA پلی مراز به DNA مشابه بوده باشند بطوری که توسط Delarue و همکارانش مشابه بودن بخشی از DNA پلی مرازها بیان گردیده است (۱۶) ولی به جهت این که دمای اپتیمم فعالیت DNA پلی مرازهای مقاوم به حرارت با هم مختلف است و از نظر بعضی از خصوصیات تفاوت هایی با هم دارند لذا در ترتیب اسیدهای آمینه با همدیگر تفاوت هایی را خواهند داشت.

آنزیم DNA پلی مراز توسط پروتئازها تجزیه می شود لذا طی استخراج و تخلیص برای جلوگیری از عمل سرین پروتئازها از PMSF استفاده گردید. استفاده از PMSF در طی خالص سازی لازم است به طوری که وقتی که از PMSF استفاده نشد، آنزیمی استخراج نگردید و در تحقیقات قبلی نیز از PMSF استفاده کرده بودند (۳،۶ و ۸).

برای افزایش پایداری آنزیم DNA پلی مراز، پایدار کننده های مختلفی مانند Tween-80 (۱)، مانیتول ۵٪ (۱)، Tween-20 (۸)، گلیسرول (۱، ۴، ۵، ۷ و ۸)، Triton X-100 (۱، ۶، ۱۵ و۱۷)، ژلاتین (۳) و ساکاروز (۱۷) استفاده می شود که می توان یکی از این مواد یا چند تا از آنها استفاده نمود. در این تحقیق از گلیسرول و Tween-20 به عنوان پایدار کننده آنزیم در طی مراحل تخلیص استفاده گردید و هم چنین برای پایداری آنزیم در طی نگهداری می توان از گلیسرول، آلبومین سرم گاوی و ژلاتین استفاده نمود (۱)، امروزه در اکثر محصولات تجارتی از گلیسرول استفاده می شود.

برای پاره کردن سلول ها از لیزوزیم و سونیکاسیون استفاده گردید که Simpson و همکارانش از این روش استفاده کرده بودند (۱) و می توان از هموژنایزور تحت فشار $400 kg/cm^2$ (۶ و ۱۵) و از French press استفاده نمود (۳)، که احتمالاً بتوان مقدار بیشتری DNA پلی مراز استخراج نمود. از آنزیم DNA پلی مراز فوق می توان در همانند سازی DNA، site directed mutagenesis و احتمالاً DNA sequencing در دمای بالا استفاده نمود و پیشنهاد می شود در تحقیقات آینده استخراج و تخلیص آنزیم در حضور پایدار کننده های دیگری مانند Triton X-100، مانیتول و ژلاتین صورت گیرد.

نتیجه گیری

از آنزیم DNA پلی مراز باسیلوس استیروترموفیلوس می توان در همانندسازی DNA، site directed mutagenesis و DNA sequencing در دمای بالا استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از همکاری و تشریک مساعی کارکنان بخش فرآورده سازمان انتقال خون تبریز،

www.SID.ir

Archive of SID

خانم شهابی و آقای لطفی کارکنان آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پیراپزشکی در انجام و پیشبرد این تحقیق سپاسگزاری بعمل می آید.

References:

1-. Simpson H.D., Coolbear T., Vermue M., Daniel R.M. Purification and some properties of a thermostable DNA polymerase from a Thermotoga species, Biochem. Cell. Biol., 1990, 68: 1292-1295.

2- Brock T.D. Life at high temperatures, Science, 1985, 230: 132-138.

3- Park J.H., Kim J.S., Kwon S.T., Lee D.S. Purification and characterization of Thermus caldophilus Gk24 DNA polymerase, Eur. J. Biochem., 1993, 214: 135-140.

4- Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus, Journal of Bacteriology, 1976, 127(3): 1550-1557.

5- Ruttimann C., Cotoras M., Zaldivar J., Vicuna R. DNA polymerases from the extremely thermophilic bacterium Thermus thermophilus HB-8, Eur. J. Biochem., 1985, 149: 41-46.

6- Hamal A., Forterre P., Elie C. Purification and characterization of a DNA polymerase from the archaebacterium Thermoplasma acidophilum, Eur. J. Biochem, 1990, 190(3): 517-521.

7- Rella R., Raia C.A., Pisani F.M., D'Auria S., Nucci R., Gambacorta A., De Rosa M., Rossi M. Purification and properties of a thermophilic and thermostable DNA polymerase from the archaebacterium Sulfolobus solfataricus, Ital. J. Biochem, 1990, 39(2); 83-99.

8- Burrows J.A., Goward C.R. Purification and properties of DNA polymerase from Bacillus caldotenax,. Biochem. J., 1992, 287: 971-977.

9- Sharp R.J., Bown K.J., Tkinson A.A. Phenotypic and genotypic characterization of some thermophilic species of Bacillus, Journal of General Microbiology, 1980, 117: 201-210.

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

11- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head

www.SID.ir

Archive of SID

of bacteriophage T4, Nature, 1970, 227: 680-685.

12- Switzer R.C., Merril C.R., Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamid gels, Analytical Biochemistry, 1979, 98: 231-237.

13- Lawyer T. C., Stoffel S., Saiki R.K., Myambo K., Drummond R., Gefand D.H. Isolation, characterization and expression in Escherichia coli of the DNA polymerase gene from Thermus aquaticus, The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(11): 6427-6437.

14- Pisani F.M., De Martino C., Rossi M. A DNA polymerase from the archaeon Sulfolobus solfataricus shows sequence similarity to family B DNA polymerases, Nucleic Acids Research, 1992, 20(11): 2711-2716.

15- Elie C., De Recondo A.M., Forterre P. Thermostable DNA polymerase from the archaebacterium Sulfolobus acidocaldarius, Eur. J. Biochem., 1989, 178: 619-626.

16- Delarue M., Poch O., Tordo N., Moras D., Argos P. An attempt to unify the structure of polymerases, Protein Engineering, 1990, 3(6): 461-467.

17- Salhi S., Elie C., Jean-Jean D., Meurier-Rotival M., Forterre P., Rossignol J.M., De Recondo A.M., The DNA polymerase from the archaebacterium Sulfolobus acidocaldarius: A thermophilic and thermoresistant enzyme which can perform automated polymerase chain reaction, Biochermical and Biophysical Research Communications, 1990, 167(3): 1341-1347.

www.SID.ir