

## جدا سازی ژن گلوکز اکسیداز اسپرژیلوس نایجر و کلونینگ آن در پروکاریوتها

جمشید راهب<sup>۱\*</sup> (Ph.D)، لیدا یکتامرام<sup>۱</sup> (M.Sc)، محمدرضا اکبری عیدگاهی<sup>۲</sup> (Ph.D)، علی اکبر شعبانی<sup>۲</sup> (Ph.D) و الهام آقایی<sup>۱</sup> (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: گلوکز اکسیداز 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 اسپرژیلوس نایجر از طریق PCR و کلونینگ آن در *E. coli* به منظور پایه‌ای برای تولید گلوکز اکسیداز نو ترکیب در ایران است. مواد و روش‌ها: قارچ اسپرژیلوس نایجر (ATCC 9029) در محیط حاوی پیتون و گلوکز و عصاره مالت و در حرارت  $24^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۸-۷۲ 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 گلوکز اکسیداز تکثیر شد. سپس این ژن به وسیله *Ins T/Aclon PCR product cloning kit* به داخل پلاسمید pTZ57R کلون و در داخل میزبان *E. coli*, DH5 $\alpha$  ترانسفورم شد. نقشه ژنی این پلاسمید نو ترکیب با آنزیم‌های محدود کننده، تأیید و پلاسمید نو ترکیب pTZ57RGO نامیده شد. یافته‌ها: نتایج نشان داد که روش استفاده شده در این مطالعه برای کشت و استخراج DNA از قارچ‌های رشته‌ای نظیر اسپرژیلوس مناسب است. همچنین ژن کدکننده آنزیم گلوکز اکسیداز که به وسیله تکنیک PCR جدا شده است دارای اندازه صحیح در آگاروز ژل الکتروفورزیس می‌باشد. ما نشان دادیم پلاسمید نو ترکیب pTZ57RGO در Restriction analysis دارای الگوی صحیح می‌باشد. نتیجه‌گیری: در این مطالعه ما ژن گلوکز اکسیداز را از طریق بهینه سازی شرایط PCR از اسپرژیلوس 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 به صورت نو ترکیب به کار رود.

کلمات کلیدی: گلوکز اکسیداز، اسپرژیلوس نایجر، اشریشیا کولی.

### مقدمه

احیا ۲- اکسیداسیون مجدد آنزیم در نیمه واکنش اکسیداسیون. در نیمه واکنش احیا، آنزیم ابتدا باعث اکسیداسیون بتا - دی گلوکز به دی گلوکونولاکتون شده و خود به حالت احیاء در می‌آید ( $\text{-FADH}_2$ ) دلتا گلوکونولاکتون تحت هیدرولیز خودبه خودی قرار گرفته و به اسید گلوکونیک تبدیل می‌شود. در نیمه واکنش اکسیداسیون، حالت احیایی آنزیم ( $\text{-FADH}_2$ ) توسط اکسیژن مولکولی به حالت اکسیده اولیه باز می‌گردد

گلوکز اکسیداز و خصوصیات ساختمانی آن. گلوکز اکسیداز (بتا - دی - گلوکز: اکسیژن ۱- اکسید و ردوکتاز (EC: ۱,۱,۳,۴) پروتئین فلاوین داری (Flavoprotein) است که اکسیداسیون  $\beta$  - دی - گلوکز را به وسیله اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کند. واکنش می‌تواند به دو مرحله جداگانه تقسیم شود: ۱- اکسیداسیون سوپسترا و احیای آنزیم در نیمه واکنش

را هیدروفیل تر کرده و در نتیجه بعضی از خصوصیات غیرمعمول را به آنزیم اعطا می‌کند که از جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

الف - عدم رسوب آنزیم در  $100^{\circ}\text{C}$  ب - پایداری آنزیم در SDS ۷۵٪/۰ ج - رسوب کردن بسیار کند آنزیم به وسیله اسید تری‌کلرواستیک ۵٪ د - 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 - دی - گلوکز ویژگی بسیار بالا داشته با این حال سایر مونوساکاریدها را نیز در سرعت بسیار پایین تر اکسیده می‌کند [۱۱،۳،۵].

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

- در صنایع شیمیایی برای تولید اسیدهای آلی نظیر اسید گلوکونیک و همچنین در شوندها

- 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 کمی گلوکز در مایعات بیولوژیکی، مواد غذایی، آشامیدنی و مایعات تخمیری (Fermentation liquor) به کار می‌رود.

- در صنایع بهداشتی-آرایشی نظیر خمیردندان، دهان‌شوویه‌ها، 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 اسپریژیلوس نایجر NRRL-3 جدا و سکانس شد و ژن ساختمانی گلوکزاکسیداز (۱۸۱۵ bp) به همراه نواحی غیرکدکننده طرفین آن مشخص گردید [۸]. Ferederrick و همکاران در سال ۱۹۹۰ ژن این آنزیم را از طریق تشکیل کتابخانه ژنومی و cDNA، از سویه

(FAD-) و در نتیجه پراکسید هیدروژن ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) تولید می‌شود [۳،۱۰].

فعالیت این آنزیم اولین بار توسط Muler در ۱۹۲۸ در عصاره حاصل از کشت اسپریژیلوس نایجر گزارش شد و سپس این آنزیم از اسپریژیلوس تخلیص شد [۱۰]. در حال حاضر گلوکزاکسیداز تجارتي از منابع قارچی نظیر اسپریژیلوس و کلادوسپوریوم تهیه می‌شود [۵،۱۱،۱۲]. گلوکزاکسیداز اسپریژیلوس نایجر آنزیمی است که از دو زیرواحد تشکیل و وزن مولکولی آن ۱۵۰ کیلوالتون 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 محتوی بالایی از ساختمان ثانویه (۲۸٪ ماریج 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 ماریج آلفا احاطه می‌شود. این صفحه بتا یک طرف از جایگاه فعال آنزیم را تشکیل می‌دهد [۳،۵،۱۱]. جداکردن (Dissociation) زیرواحدها تنها در شرایط دناتورده کنندگی امکان پذیر بوده و با از دست دادن فاکتور FAD همراه می‌باشد. گلوکزاکسیداز اسپریژیلوس نایجر یک گلیکوپروتئین بوده و محتوی 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) محتوی 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

بود و برای جلوگیری از رشد باکتری به محیط کشت آمپی سیلین  $50 \mu\text{g/ml}$  اضافه شد. محیط کشت در دمای پتیم  $24^\circ\text{C}$  قرار داده شد و قارچ‌ها پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت رشد کردند. سپس سانتی‌فیوژ شده رسوب قارچ، به فالكون‌های  $50 \text{ ml}$  منتقل شده با آب دی‌یونیزه استریل شسته شده و دوباره سانتی‌فیوژ شد و برای استخراج DNA از بافر لیزکننده شامل EDTA و SDS ( $\text{pH}=8$ ) استفاده شد. بدین منظور به رسوب قارچ در هر فالكون  $50 \text{ ml}$  حدود  $5 \text{ ml}$  از بافر لیزکننده سرد اضافه و در داخل یخ  $5$  نوبت هر نوبت  $30$  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 به صورت هموژن درآمد. سپس فالكون‌ها در تانک ازت و بعد در بن‌ماری  $68^\circ\text{C}$  قرار داده شد. مراحل فوق  $2$  بار دیگر تکرار شد؛ پس از آخرین مرحله نمونه Shake شد و در دمای آزمایشگاه در  $3000 \text{ rpm}$  به مدت  $20$  دقیقه سانتی‌فیوژ شد. از محلول رویی  $4 \text{ ml}$  برداشته و در یخ قرار داده شد. در این زمان  $400 \mu\text{l}$  استات پتاسیم  $5$  مولار به فالكون اضافه گردید و پس از مخلوط کردن، یک ساعت در یخ قرار داده شد. بعد به مدت  $20$  دقیقه در  $3000 \text{ rpm}$  سانتی‌فیوژ شد محلول رویی به فالكون جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانل اضافه گردید. پس از سانتی‌فیوژ در  $13000 \text{ rpm}$ ، محلول رویی را دور ریخته و رسوب در TER بافر شامل

$10 \text{ mM Tris-HCl} + 1 \text{ mM Na}_2 \text{ EDTA} + 10 \mu\text{g RNase A}$  حل شد؛ سپس دوباره ایزوپروپانل اضافه و میکروفیوژ گردید و در نهایت رسوب حاصل در TER حل شد. نمونه حاصل روی  $1\%$  آگارز الکتروفورز گردید.

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

آسپرژیلوس نایجر ATCC 9029 جدا و پس از کلونینگ آن، گلوکز اکسیداز 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

ارگانسم‌ها. باکتری سویه *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) از کلکسیون مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهیه شده است. قارچ *Aspergillus niger* (ATCC9029) از شرکت خریداری شد.

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

کشت قارچ و استخراج DNA کروموزومی. محیط مایع کشت قارچ *A. niger* حاوی عصاره مالت، گلوکز و پیتون

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 به صورت 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 به صورت شبانه روز در انکوباتور ۳۷°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.

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،

با دمای از ۶۷ °C annealing= و کمتر انجام شد که در دمای ۵۶ °C annealing = 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 و 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 به صورت 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 ۲-۳

ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷°C با ۲۰۰rpm قرار داده شد.

به طوری که OD نمونه‌ها به حدود ۰/۴-۰/۵ برسد؛ سپس

نمونه، به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتیفریژ شد و پلت

باکتریایی در ۱۵ ml کلریدکلسیم mM ۱۰۰ سرد

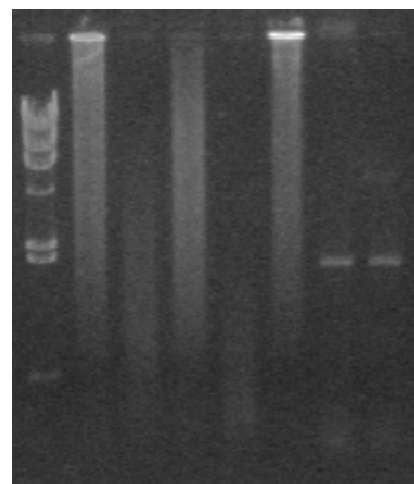
سوسپانسیون شده و به مدت ۰/۵ h بر روی یخ قرار گرفت.

بعد از این مرحله سلول‌ها مجدداً سانتیفریژ شدند. پلت حاصل

## نتایج

کشت و استخراج DNA ژنومیک. آسپرژیلوس در محیط حاوی پیتون، 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.

۱ ۲ ۳



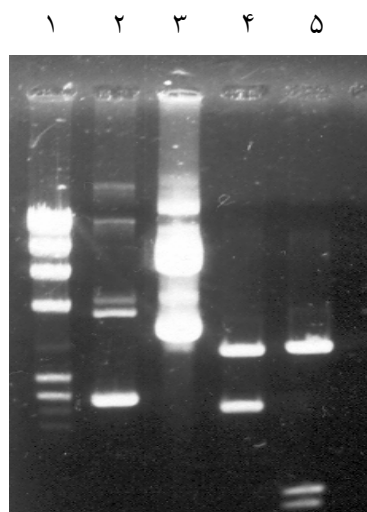
شکل ۱: ستون اول مارکر وزن مولکولی  $\lambda 2$

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  $OD_{260}$  خوانده شد. براساس این که در  $OD_{260} = 1$  غلظت DNA حدود  $50 \mu\text{g/ml}$  می‌باشد و با توجه به اندازه  $1/8 \text{ Kb} \sim \text{DNA}$ ، غلظتی معادل  $36 \mu\text{g/ml}$  از DNA جهت ligation در  $22^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب استفاده شد. بعد از ترانسفورماسیون به E. coli

DH5 $\alpha$  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.



شکل ۲: ستون اول مارکر وزن مولکولی  $\lambda 2$

ستون دوم پلاسمید pTZ57R بریده نشده

ستون سوم پلاسمید pTZ57RGO به صورت بریده نشده

ستون چهارم پلاسمید بریده شده با آنزیم *Hind* III

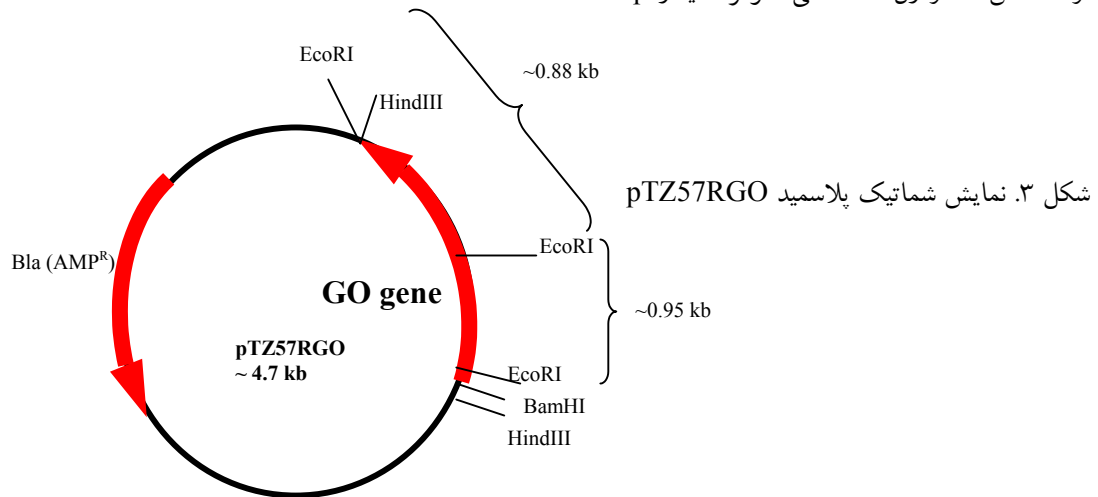
ستون پنجم پلاسمید بریده شده با آنزیم *Eco*RI

## بحث

آنزیم گلوکز اکسیداز 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 گلوکز اکسیداز کاربردهای متنوعی دارد این آنزیم به عنوان زی‌حسگر بیولوژیکی گلوکز، نگهدارنده در صنایع غذایی و در روند تولید اسیدهای آلی در صنعت نان،

به همراه نواحی غیرکدکننده طرفین آن مشخص گردید [۸].  
 Ferederrick و همکاران ژن این آنزیم را از طریق تشکیل کتابخانه ژنومی و cDNA، از سویه اسپرژیلوس نایچر 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 اسپرژیلوس نایچر ACMO4 انجام شد [۷]. ما جداسازی این ژن را از طریق آمپلیفیکاسیون با بهینه‌سازی روش PCR بر روی DNA ژنومیک استخراج شده از سویه اسپرژیلوس نایچر 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].

شوینده‌ها، مواد بهداشتی-آرایشی به کار می‌رود [۵،۱۱].  
 تحقیقات جدیدتر نشان می‌دهد که انتقال ژن گلوکزآکسیداز 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 اسپرژیلوس نایچر NRRL-3 جدا و سکانس شد و ژن ساختمانی گلوکزآکسیداز ۱۸۱۵ bp



در این مطالعه پرایمرها بر اساس سکانس ژن گزارش شده توسط Frederick S. H و همکاران و Kriechbaum و همکاران 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 برگرد؛ بدون اینکه نواحی غیرترجمه‌ای در انتهای 5' و 3' ژن را در محصول PCR شامل شود. اهمیت

در این مطالعه پرایمرها بر اساس سکانس ژن گزارش شده توسط Frederick S. H و همکاران و Kriechbaum و همکاران 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 برگرد؛ بدون اینکه نواحی غیرترجمه‌ای در انتهای 5' و 3' ژن را در محصول PCR شامل شود. اهمیت

Rosenberg S, Glucose oxidase from *Aspergillus niger* cloning, gene sequence, secretion from *Sacharomyces cervisiae* and kinetic analysis of a yeast-driven 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, Alaeddinlu G, Cloning and DNA sequence analysis of glucose oxidase gene from *Aspergillus 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 *aspergillus 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.

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

## منابع

[۱] تحقیق‌راد فرهاد. مطالعه ترمودینامیکی و پیوند شدن مولکولی گلوکز اکسیداز 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 گلوکز اکسیداز 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. 3<sup>rd</sup> 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 *Trichoderma 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,