مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۶، شماره ۳، بهار ۱۳۸٤

کلونینگ ژن گلوکز اکسیداز آسپرژیلوس نایجر در پروکاریوت‌ها (وکتور PKK223-3)

جمشید راهب*[۱و۳] (Ph.D)، آمنه محقق[۱و۳] (M.Sc)، محمدرضا اکبری عیدگاهی[۲] (Ph.D)، علی‌اکبر شعبانی[۲] (Ph.D)، الهام آقایی[۱] (M.Sc)

۱- پژوهش‌گاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فن‌آوری

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

۳- دانشگاه پیام نور مرکز تهران

چکیده

سابقه و هدف: گلوکز اکسیداز، آنزیمی است که در صنایع غذایی، شیمیایی، آرایشی و بهداشتی و هم‌چنین در کیت‌های تشخیص گلوکز استفاده می‌شود. در مرحله اول این طرح DNA از قارچ رشته‌ای آسپرژیلوس نایجر ATCC9029 با استفاده از روش سونیکاسیون و لیز در نیتروژن مایع جدا شد. سپس DNA ژنومیک استخراج شده در پلاسمید PTZ57R کلون شد، در ادامه این طرح، ژن گلوکزاکسیداز (GO) به وکتور بیانی دیگر (PKK223-3) وارد شد، که پایه‌ای برای تولید این آنزیم در ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پلاسمید نوترکیب Pet21αG0 از باکتری *E. coli*-DH5α استخراج و توسط آنزیم‌های محدودکنندهٔ BamHI و HindIII برش داده و ژن گلوکز اکسیداز به طول ۱/۸kb جدا و سپس به داخل پلاسمید PKK223-3 وارد شد و در داخل میزبان *E. coli*-DH5α ترانسفورم گردید. نقشه ژنی این پلاسمید نوترکیب با آنزیم های محدودکننده، تأیید و پلاسمید PKK223-3GO نامیده شد.

یافته‌ها: ژن کدکنندهٔ آنزیم گلوکز اکسیداز که به‌وسیلهٔ Restriction Enzyme ز پلاسمید Pet21α جدا شده بود، دارای اندازه صحیح در الکتروفورزیس ژل آگارز می‌باشد. ما نشان دادیم که پلاسمید نوترکیب PKK223-3GO در Restriction analysis دارای الگوی صحیح می‌باشد.

نتیجه‌گیری: جداسازی و کلونینگ ژن گلوکز اکسیداز از طریق مهندسی ژنتیک می‌تواند برای کلونینگ در وکتور بیانی به منظور تولید این آنزیم به صورت نوترکیب به کار رود.

واژه‌های کلیدی: گلوکز اکسیداز، اشریشیا کولی، آسپرژیلوس نایجر

مقدمه

گلوکز اکسیداز و خصوصیات ساختمانی آن.

گلوکز اکسیداز (بتا- دی- گلوکز: اکسیژن ۱- اکسیدو ردوکتاز EC: ۱،۱،۳،۴) پروتئین فلاوین‌داری (Flavoprotein) است که اکسیداسیون β – دی- گلوکز را به وسیله اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کند. واکنش می‌تواند به دو مرحله جداگانه تقسیم شود: ۱) اکسیداسیون سوبسترا و احیای آنزیم در نیمه واکنش احیا ۲) اکسیداسیون مجدد آنزیم در نیمه واکنش اکسیداسیون، در نیمه واکنش احیاء آنزیم ابتدا باعث اکسیداسیون بتا – دی گلوکز به دی‌گلوکونولاکتون شده و خود به حالت احیاء درمی‌آید (FADH2-). دلتا گلوکولاکتون تحت هیدرولیز خودبه‌خودی قرار گرفته و به اسید گلوکونیک تبدیل می‌شود.

* نویسنده مسئول. تلفن: ۹-۴۵۸۰۳۰۱-۰۲۱، نمابر: ۴۵۸۰۳۰۱-۰۲۱، E-mail: jam@nrcgeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۴/۱/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۴/۴/۱۳

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

در نیمه واکنش اکسیداسیون حالت احیایی آنزیم (-FADH2) توسط اکسیژن مولکولی به حالت اکسیده اولیه باز می‌گردد (-FAD) و در نتیجه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تولید می‌شود [۱۰،۳].

فعالیت این آنزیم اولین بار توسط Muler (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 [۱۲،۱۱،۵]. گلوکزاکسیداز آسپرژیلوس نایجر آنزیمی است که از دو زیر واحد 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 دی‌سولفیدی می‌باشند. 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 به‌وسیله چهار مارپیچ آلفا احاطه می‌شود. این صفحه بتا، یک طرف از جایگاه فعال آنزیم را تشکیل می‌دهد [۱۱،۵،۳]. جداکردن (Dissociation) زیرواحدها تنها در شرایط دناتوره‌کنندگی امکان‌پذیر بوده و با از دست دادن فاکتور FAD همراه می‌باشد. گلوکزاکسیداز آسپرژیلوس نایجر یک گلیکوپروتئین است و محتوای کربوهیدارتی 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 کاتالیتکی 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 می‌کند و در نتیجه بعضی از خصوصیات غیرمعمول را به آنزیم اعطا می‌نماید که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

الف) عدم رسوب آنزیم در $100^{o}c$؛ ب) پایداری آنزیم در SDS ۰/۷۵٪؛ ج) رسوب کردن بسیار کند آنزیم به‌وسیله 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 دارد، با این حال سایر مونوساکاریدها را نیز در سرعت بسیار پایین‌تر اکسیده می‌کند [۵،۳،۱۱].

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

- در صنایع شیمیایی برای تولید اسیدهای آلی نظیر اسیدگلوکونیک 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) به‌کار می‌رود.
- در صنایع بهداشتی - آرایشی نظیر خمیر دندان، دهان‌شویه‌ها، صابون‌های مایع، کرم‌ها و لوسیون‌های محافظ پوست و مو [۱۱،۵].

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 (۱۸۱۵bp) به همراه نواحی غیر کدکننده طرفین آن مشخص گردید [۸].

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

Ferederrick و همکاران در سال ۱۹۹۰ ژن این آنزیم را از طریق تشکیل کتابخانه ژنومی و cDNA، از سویه آسپرژیلوس نایجر ATCC9029 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 [۱۱،۵]. بنابراین این مطالعه با هدف شناسایی، جداسازی و کلونینگ ژن این آنزیم در کشور به صورت نوترکیب اجرا شد.

مواد و روش‌ها

ارگانیسم‌ها. باکتری سویه *E. coli*-DH5α از کلکسیون مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهیه شد.

پلاسمیدها، آنزیم‌ها و مواد. آنزیم‌هایی نظیر T4DNA Ligase و آنزیم‌های محدودکنندهٔ BamHI و HindIII از شرکت سیناژن خریداری شد. مارکر وزن مولکولی و Agarose gel DNA Extraction Kit محصول شرکت (Roche) بود. پلاسمید PKK223-3 فرآورده شرکت Fermentase بود.

جداسازی ژن گلوکزاکسیداز. برای جداسازی ژن گلوکزاکسیداز از وکتور بیانی Pet21α، استخراج پلاسمید در مقیاس زیاد (Large scale) با استفاده از روش معمول انجام شد. پلاسمیدهای استخراج شده با توجه به جایگاه‌های برش روی ژن و وکتور این پلاسمیدها با آنزیم‌های BamHI و HindIII بریده شدند. سپس با استفاده از الکتروفورزیس روی ژل آگارز ۱٪ قطعه مورد نظر که همان ژن گلوکزاکسیداز ۱/۸kb بود با تیغ استریل بریده و به ویال‌های ۱/۵ml استریل منتقل شد. سپس با استفاده از کیت Agarose gel DNA Extraction، قطعه مورد نظر مطابق پروتکل کیت، خالص شد، ۵µl آن روی ژل، باند مشخصی را نشان می‌داد. هم‌زمان با این کار وکتور بیانی PKK223-3 نیز توسط آنزیم‌های محدودکننده BamHI و HindIII برش داده شد. ژل آگارز ۱٪، قطعه مورد نظر که همان پلاسمید PKK223-3 خطی شده می‌باشد را نشان داد.

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 (o/n) Overnight در ۳ml محیط LB کشت شد. ۰/۰۵ml از این محیط به ۲۰ml محیط LB استریل منتقل و به مدت ۳-۲ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷°c با ۲۰۰rpm قرار داده شد. به طوری که OD نمونه‌ها به حدود ۰/۴تا ۰/۵ رسید، سپس نمونه، به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد و پلت باکتریایی در ۱۵ml کلرید کلسیم ۱۰۰mM سرد سوسپانسیون شده و به مدت ۰/۵h بر روی یخ قرار گرفت. بعد از این مرحله، سلول‌ها مجدداً سانتریفوژ شدند. پلت حاصل در ۳ml کلریدکلسیم سرد و ۰/۵ml گلیسرول استریل، سوسپانسیون شد. نمونه‌ها با مقادیر ۲۰۰µl در داخل ویال ۱/۵ml استریل الیکوت و تا زمان استفاده در فریزر ۷۰°c- نگه‌داری شد.

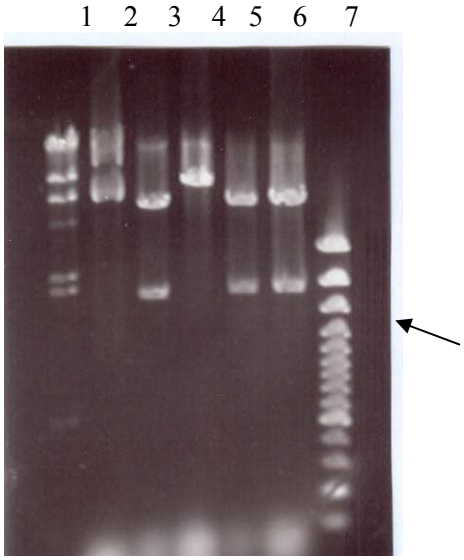
کلونینگ. پلاسمید PKK233-3 حاوی مارکر bla (سایت مقاومت به آمپی‌سیلین) می‌باشد. Ligation ابتدا با اضافه کردن آنزیم T4 DNA Ligase به محلول حاوی ژن گلوکزاکسیداز و وکتور خطی شده PKK233-3 به صورت شبانه‌روز در دمای ۲۲°c انجام پذیرفت. محصول Ligation به داخل باکتری پذیرا (*E. coli*-DH5α) با استفاده از روش معمول شوک حرارتی، ترانسفورم شد. در مرحله بعد میزان ۱۰۰µl از باکتری ترانسفورم شده بر روی یک پلیت حاوی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

X-6al و IPTG و Amp پخش شد و به صورت شبانه‌روز در انکوباتور $37^{o}c$ قرار گرفت. تعدادی از کلنی‌های سفید، انتخاب و برای استخراج پلاسمید در مقیاس پائین در محیط مایع LB+Amp به صورت شبانه‌روز در دمای $37^{o}c$ در ۲۲۰rpm کشت شد.

آنالیز پلاسمیدها (Restriction analysis).

استخراج پلاسمید در مقیاس کم (Minipreparation) با استفاده از روش معمول لیز قلیایی انجام شد. پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های سفید در مقایسه با پلاسمید کنترل اصلی (یعنی وکتور PKK233-3 بدون Insert ترانسفورم شده در DH5α) اندازه سنگین‌تری داشتند. با توجه به جایگاه‌های برش روی ژن و وکتور، این پلاسمید با آنزیم‌های BamHI و HindIII بریده شد و از بین آن‌ها یک پلاسمید که الگوی هضم آنزیمی مورد انتظار را نشان می‌داد به عنوان کلون مورد نظر انتخاب شد.



شکل ۱. الکتروفورز پلاسمید PET21αGO و پلاسمید PET21αGO دایجست شده (جهت کلونینگ) بر روی ژل آگارز ۱ درصد:

1) مارکروزن ملکولی λ_2

2) پلاسمید PET21αGO دایجست شده با HindIII

3) پلاسمید PET21αGO دایجست شده با HindIII

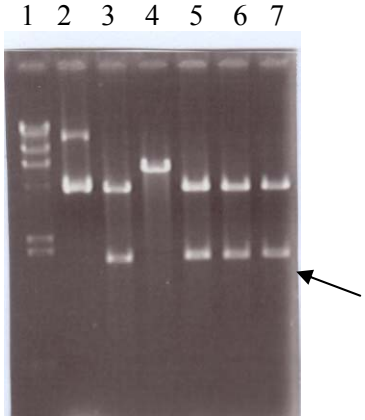
4) پلاسمید PET21αGO دایجست شده با BamHI

5,6) پلاسمید pet21aG0 دایجست شده با BamHI و HindIII (فلش، ژن 1/8kbpG0 را نشان می‌دهد)

7) مارکر وزن ملکولی ۱۰۰ bp

نتایج

همان‌طورکه در شکل ۱ نشان داده شده است، قطعه ژن گلوکزاکسیداز ۱/۸kb در الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ از PET21αGO جدا شد. قطعه مورد نظر پس از جداکردن از روی ژل، با Agarose gel DNA extraction kit تخلیص گردید. به طور هم‌زمان، پلاسمید PKK223-3 نیز با استفاده از آنالیز توسط آنزیم‌های محدودکننده BamHI و HindIII، بریده شد، که در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲. Map پلاسمید PKK223-3 GO و پلاسمید PKK223-3 GO دایجست شده بر روی آگارز ۱ درصد:

1) مارکر وزن ملکولی λ_2

2) پلاسمید PKK223-3 GO

3) پلاسمید PKK223-3 GO دایجست شده با HindIII

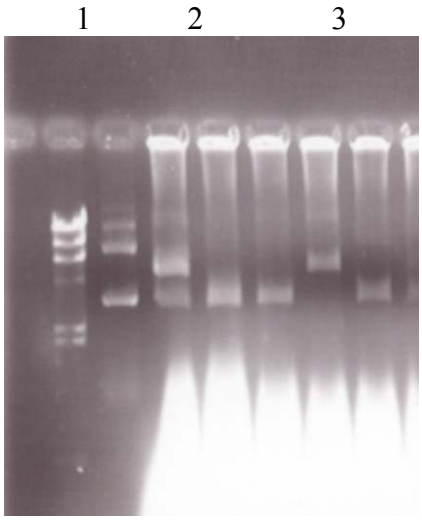
4) پلاسمید PKK223-3 GO دایجست شده با BamHI

5,6,7) پلاسمید PKK223-3 GO دایجست شده با آنزیم‌های BamHI، HindIII (فلش قطعه ژن گلوکزاکسیداز را با وزن ملکول 1/8 kbp نشان می‌دهد)

سپس Ligation ژن مورد نظر به داخل پلاسمید خطی شده PKK223-3 انجام و بعد به داخل باکتری پذیرای مناسب به نام *E. coli*-DH5α ترانسفورم شد. کشت آن‌ها روی پلیت‌های حاوی آمپی‌سیلین و Xgal و IPTG به مدت یک شب کلنی‌های سفید به وجود آورد، که بعد از کشت این کلنی‌ها و استخراج پلاسمید از آن‌ها؛ یک کلون از کلون‌هایی که از نظر اندازه پلاسمید نسبت به پلاسمید اولیه سنگین‌تر بود (شکل ۳، ستون سوم) انتخاب و جهت Restriction Analysis استفاده شد. با هضم آنزیماتیک به

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

کمک آنزیم‌هایی HindIII و BamHI قطعات مورد انتظار حاصل شد (شکل ۴، ستون ۵، ۶ و ۷) و جهت قرار گرفتن ژن داخل پلاسمید نیز مشخص شد.

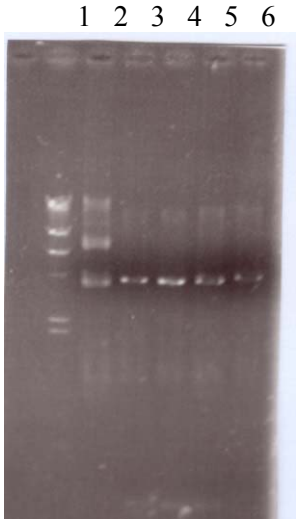


شکل ۳. Map کلون ژن گلوکزاکسیداز داخل وکتور PKK223-3 بر روی ژل آگارز ۱ درصد:

1) مارکر وزن ملکولی λ_2

2) پلاسمید PKK223-3 فاقد ژن گلوکزاکسیداز

3) پلاسمید PKK223-3 واجد ژن گلوکزاکسیداز



شکل ۴. الکتروفورز پلاسمید PKK223-3 و پلاسمید PKK223-3 دایجست شده (جهت کلونینگ)، بر روی ژل آگارز ۱ درصد:

1) مارکروزن ملکولی λ_2

2) پلاسمیدPKK223-3

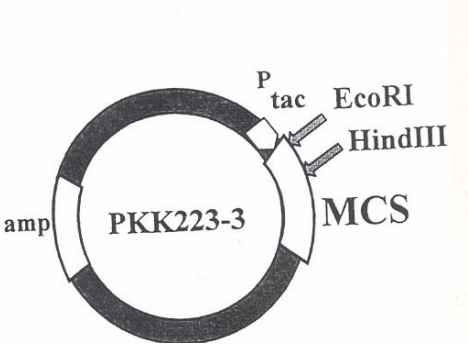
3) پلاسمیدPKK223-3 دایجست شده با آنزیم BamHI

4) پلاسمید PKK223-3 دایجست شده با آنزیم BamHI

5) پلاسمید PKK223-3 دایجست شده با آنزیم HindIII

6) پلاسمید PKK223-3 دایجست شده با آنزیم‌های BamHI و HindIII

جایگاه‌های برش و جهت قرار گرفتن ژن داخل پلاسمید در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل۵. نقشه ژنتیکی پلاسمید

بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم گلوکزاکسیداز اولین بار از عصاره گونه آسپرژیلوس تخلیص شد. سپس میکروارگانیسم‌های متعددی از نظر تولید این آنزیم در مقیاس صنعتی غربال‌گری شدند که بهترین تولیدکننده این آنزیم آسپرژیلوس نایجر است [۱۳،۸،۷،۶].

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، شوینده‌ها، مواد بهداشتی ـ آرایشی به کار می‌رود [۱۱،۵]. تحقیقات جدیدتر نشان می‌دهد که انتقال ژن گلوکزاکسیداز به گیاهان می‌تواند به مقاومت پایه‌های گیاهی در مقابل آفات منجر شود [۱۴،۹]. 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 و شرکت‌ها نمی‌دهد. گرچه مطالعات اولیه‌ای بر روی تخلیص و خصوصیات ترمودینامیکی این آنزیم در ایران انجام شده است [۲،۱]؛ ولی این اولین مطالعه بر روی جداسازی ژن این آنزیم به منظور تولید آنزیم نوترکیب می‌باشد. 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 ۱۸۱۵bp به همراه نواحی غیر کدکننده طرفین آن مشخص

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

گردید [۸]. Ferederick 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]. در این مطالعه هدف ما به وجود آوردن یک پلاسمید نوترکیب جهت تولید آنزیم نوترکیب است. پلاسمید نوترکیب PKK223-3 GO این امکان را فراهم می‌سازد که بتوانیم این ژن را به سادگی در این وکتور بیانی تحت پروموترهای مختلف در سیستم‌های پروکاریونیک یا یوکاریونیک کلون نموده و ضمن ارزیابی این پروموترها در بیان ژن، بتوانیم نقش سیگنال پپتید را در هنگام تولید آنزیم نوترکیب در این سیستم‌ها مشخص نماییم و بتوانیم در ادامه طرح به بررسی بیان ژن در وکتور بیانی بپردازیم.

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. New York: Academic press; 1975, p.421-505.

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

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

[6] Frederick KR, Tung J, Emerick RS, Masiarz FR, Chamberlain SH, Vasavada A, et al. Glucose oxidase from Aspergillus niger. Cloning, gene sequence, secretion from Saccharomyces cerevisiae and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. J Biol Chem, 1990; 65(7):3793-802.

[7] Kim Kim MY, Chung HJ, Hong SY, Kim HR, Lee JC, Park SM, et al. Characterization of a novel allele of glucose oxidase from a Korean wild type strain of Aspergillus niger. Mol Cells, 2001; 11(3):281-6.

[8] Kriechbaum M, Heilmann HJ, Wientjes FJ, Hahn M, Jany KD, Gassen HG, et al. Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from Aspergillus niger NRRL-3. FEBS Lett, 1989; 255(1):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. 1999; 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, et al. Expression of the Aspergillus niger glucose oxidase gene in A. niger, A. nidulans and Saccharomyces cerevisiae. Curr Genet, 1990; 18(6):531-6.

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

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]