

جداسازی ژن گلوکز اکسیداز آسپرژیلوس نایجر و کلونینگ آن در پروکاریوت‌ها

جمشید راهب^{۱*} (Ph.D)، لیدا یکتامرام^۱ (M.Sc)، محمدرضا اکبری عیدگاهی^۲ (Ph.D)، علی اکبر شعبانی^۲ (Ph.D) و الهام آقایی^۱ (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 آسپرژیلوس 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 آسپرژیلوس نایجر (ATCC 9029) در محیط حاوی پپتون و گلوکز و عصاره مالت و در حرارت 24°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 α 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 آسپرژیلوس مناسب است. همچنین ژن کد کننده 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 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 به صورت نو ترکیب به کار رود.

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

مقدمه

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 β - 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

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 (FADH_2) دلتا گلوکونولاکتون تحت هیدرولیز خود به خودی قرار گرفته و به اسید گلوکونیک تبدیل می‌شود. در نیمه واکنش اکسیداسیون، حالت احیایی آنزیم (FADH_2) توسط اکسیژن مولکولی به حالت اکسیده اولیه باز می‌گردد