

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

جمشید راهب^{۱*} (Ph.D)، آمنه محقق^{۱،۳} (M.Sc)، محمدرضا اکبری عیدگاهی^۲ (Ph.D)، علی اکبر شعبانی^۲ (Ph.D)، الهام آقایی^۱ (M.Sc)

۱- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

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 پلاسמיד PTZ57R کلون شد، در ادامه این طرح، ژن گلوکز اکسیداز (GO) به وکتور بیانی دیگر (PKK223-3) وارد شد، که پایه‌ای برای تولید این آنزیم در ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پلاسמיד نوترکیب Pet21aG0 از باکتری *E. coli*-DH5a استخراج و توسط آنزیم‌های محدودکننده BamHI و HindIII برش داده و ژن گلوکز اکسیداز به طول ۱/۸kb جدا و سپس به داخل پلاسמיד PKK223-3 وارد شد و در داخل میزبان *E. coli*-DH5a ترانسفورم گردید. نقشه ژنی این پلاسמיד نوترکیب با آنزیم‌های محدودکننده، تأیید و پلاسמיד PKK223-3GO نامیده شد.

یافته‌ها: ژن کدکننده آنزیم گلوکز اکسیداز که به وسیله Restriction Enzyme ز پلاسמיד Pet21a جدا شده بود، دارای اندازه صحیح در الکتروفورز ژل آگارز می‌باشد. ما نشان دادیم که پلاسמיד 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، اشیریشیا 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 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 سوستر 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.