جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

کلونينگ ژن گلوکز اکسيداز از آسپرژيلوس نايجر در پروکاريوتها (وکتور PKK223-3)

آمنه محقق[۱و۳] ** (M.SC) ، جمشيد راهب [۱] (Ph.D)، بخشي خانيکي 3 (P h . D) ، محمدرضا اکبري عيدگاهي[۲] (Ph.D)، علي اکبر شعباني[۲] (Ph.D) و الهام آقايي[۱] (M.SC)

۱_ پژوهشگاه ملي مهندسي ژنتيك و زيست فناوري- اتوبان ۱۵ تهران،کرج _ بعد از پيکان شهر، بلوار پژوهش - تلفن: ۹_۴۵۸۰۳۰۱
۲_ دانشگاه علوم پزشکي و خدمات بهداشتي درماني سمنان، مرکز تحقيقات بيوتکنولوژي
۳_ دانشگاه پيام نور مرکز تهران - تهران _ خيابان پاسداران _ اقدسيه _ گلستان چهارم -تلفن : ۲۸۳۳۰۶۱

چکيده:سابقه و هدف: گلوکز اکسيداز آنزيمي است که در صنايع غذايي، شيميايي، آرايشي و بهداشتي و همچنين در کيت هاي تشخيص گلوکز استفاده مي شود. در مرحله اول اين طرح جداسازي گلوکز اکسيداز از قارچ رشته اي اسپرژيلوس نايجر ATCC9029 با استفاده از روش سونيکاسيون و ليز در نيتروژن مايع انجام شد. سپس DNA ژنوميك استخراج شده در پلاسميد PTZ57R کلون شده است در ادامه اين طرح اين ژن به وکتور بياني ديگري PKK223-3 وارد ميشود که به منظور پايه اي براي توليد اين آنزيم در ايران است.
کلمات کليدي: گلوکز اکسيداز _ اشرشياکولي _ آسپرژيلوس نايجر

Cloning of Glucose oxidas Aspergilusniger in prokaryotic host (PKK223-3 vector)

A.Mohaghegh ** [1,3] (M.SC) , J.Raheb [1]*(Ph.D) , Gh.Khaniki [3] (Ph.D) , M.R. Akbari Eidgahi [2] (Ph.D) , A.A.Shabani [2] (Ph.D). E.Aghaee [1] (M.SC)

Glucose oxidase is an Enzyme that use in food, chemical and personal-care industries as well as glucose diagnostic kits. The aim of this study was cloned Go gene from Aspergillus niger in prokaryotic host. That can be used for production of recombinant enzyme.

مقدمه: گلوکز اکسيداز و خصوصيات ساختماني آن گلوکز اکسيداز (بتا_ دي _ گلوکز: اکسيژن ۱_ اکسيد و ردوکتاز ۱,۱,۳,۴ :EC) پروتئين فلاوين داري (Flavoprotein) است که اکسيداسيون β _ دي _ گلوکز را به وسيله اکسيژن مولکولي کاتاليز مي کند فعاليت اين آنزيم اولين بار توسط Muler (۱۹۲۸) در عصاره حاصل از کشت آسپرژيلوس نايجز گزارش شد و سپس اين آنزيم از آسپرژيلوس تخليص شد [۱۰]. در حال حاضر گلوکزاکسيداز تجارتي از منابع قارچي نظير آسپرژيلوس و کلادوسپوريوم تهيه مي شود [۵،۱۱،۱۲] . گلوکزاکسيداز آسپرژيلوس نايجر آنزيمي است که از دو زير واحد تشکيل و وزن مولکولي آن ۱۵۰ کيلودالتون مي باشد. اين آنزيم محتوي مولکول FAD بوده که به طور محکم به آن متصل مي باشد. هر دو زيرواحد محتوي يك پل دي سولفيدي مي باشد. پروتئين ديمر داراي يك شکل تخم مرغي با محتواي بالايي از ساختمان ثانويه (۲۸% مارپيچ و ۱۸% صفحات بتا) است. ساختمان سوم آنزيم از دو دسته صفحات بتاي جدا و کاملاً مختلف تشکيل شده است. اولين گروه از صفحات بتا قسمتي از Domain (ناحيه) متصل به FAD را تشکيل مي دهد و دومين گروه، صفحه بتايي است که متشکل از شش رشته غيرموازي بوده و بوسيله چهار مارپيچ آلفا احاطه مي شود. اين صفحه بتا يك طرف از جايگاه فعال آنزيم را تشکيل مي دهد [۳،۵،۱۱].جداکردن (Dissociation) زير واحدها تنها در شرايط دناتوره کنندگي امکان پذير بوده و با از دست دادن فاکتور FAD همراه مي باشد. گلوکزاکسيداز آسپرژيلوس نايجر يك گليکوپروتئين بوده و محتواي کربوهيدارتي آن حدود ۱۵ تا ۱۶ درصد وزن مولکولي آنزيم را شامل مي شود
جداسازي، کلونينگ و بيان اين ژن توسط گروه هاي تحقيقاتي مختلفي انجام شده است. در ۱۹۸۹ ژن اين آنزيم از طريق تهيه کتابخانه cDNA از آسپرژيلوس نايجر NRRL-3 جدا و سکانس شد و ژن ساختماني گلوکزاکسيداز (۱۸۱۵bp) به همراه نواحي غير کدکننده طرفين آن مشخص گرديد [۸]. Frederrick و همکاران در سال ۱۹۹۰ ژن اين آنزيم را از طريق تشکيل کتابخانه ژنومي و cDNA، از سويه آسپرژيلوس نايجر ATCC9029 جدا و پس از کلونينگ آن، گلوکزاکسيداز نوترکيب را در مخمر بيان کردند [۶]. در همين سال Whittington و همکاران موفق به توليد مقادير بالاي آنزيم نوترکيب از طريق کلونينگ ژن اين آنزيم و بيان آن در ساکارومايسس سرويزيه شدند [۱۳]. در مطالعه ديگري توسط Kim و همکاران، جداسازي ژن اين آنزيم از طريق تشکيل يك کتابخانه ژنومي از سويه وحشي آسپرژيلوس نايجر ACMO4 انجام شد [۷] اين مطالعه با هدف شناسايي، جداسازي و کلونينگ ژن اين آنزيم در کشور به صورت نوترکيب به کار رود.
مواد و روشها: براي جداسازي ژن گلوکزاکسيداز از وکتور بياني Pet21a ، استخراج پلاسميد در مقياس زياد با استفاده از روش معمول انجام شد. پلاسميدهاي استخراج شده با توجه به جايگاههاي برش روي ژن و وکتور اين پلاسميدها با آنزيم هاي BamHI و HindIII بريده شدند را مطابق پروتکل کيت ، خالص شد که ۵µl آن روي ژل، باند مشخصي را نشان ميدهد. همزمان با اين کار وکتور بياني PKK223-3 نيز توسط آنزيمهاي محدودکننده BamHI و HindIII برش داده شد. ژل آگارز ۱% قطعه موردنظر که همان پلاسميد PKK223-3 خطي شده مي باشد، را نشان ميدهد.سلول پذيرا مطابق

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

روش استاندارد تهيه شد. به طور خلاصه يك كلني از باكتري Ecoli سويه DH5α به صورت شبانه روزي (O/N) Overnight در ۳ml محيط LB كشت شد. ۰/۰۵Ml از اين محيط به ۲۰ml محيط LB استريل منتقل و به مدت ۳-۲ ساعت در شيكر انكوباتور ۳۷°c با ۲۰۰rpm قرار داده شد. به طوري كه OD نمونه ها به حدود ۰/۴ -۰/۵ برسد، سپس نمونه، به مدت ۱۰ دقيقه در ۳۰۰۰ دور سانتريفوژ شد و پلت باكتريايي در ۱۵ml كلريد كلسيم ۱۰۰mM سرد سوسپانسيون شده و به مدت ۰/۵h بر روي يخ قرار گرفت. بعد از اين مرحله سلولها مجدداً سانتريفوژ شدند. پلت حاصل در ۳ml كلريدكلسيم سرد و ۰/۵ml گليسرول استريل سوسپانسيون شد. نمونه ها با مقادير ۲۰۰µl در داخل ويال ۱/۵ml استريل اليكوت تا زمان استفاده در فريزر ۷۰°c- نگهداري شد.پلاسميد PKK233-3 حاوي ماركر bla (سايت مقاومت به آمپي سيلين) مي باشد. Ligation ابتدا با اضافه كردن آنزيم T4 DNA Ligase به محلول حاوي ژن گلوكزاكسيداز و وكتور PKK233-3 به صورت شبانه روز در دماي ۲۲°c انجام پذيرفت. محصول Ligation به داخل باكتري پذيرا (Ecoli, DH5α) با استفاده از روش معمول شوك حرارتي، ترانسفورم شد. در مرحله بعد ميزان ۱۰۰µl از باكتري ترانسفورم شده بر روي يك پليت حاوي X-6al و IPT6 و Amp پخش شد و به صورت شبانه روز در انكوباتور ۳۷ °c قرار گرفت. تعدادي از كلني هاي سفيد را انتخاب و براي استخراج پلاسميد در مقياس پائين در محيط مايع LB + Amp به صورت شبانه روز در دماي ۳۷°c در ۲۲۰rpm كشت شد.

نتايج: . قطعه ژن گلوكزاكسيداز ۱/۸kb در آگاروز ژل ۰/۱ الكتروفورزيس از Pet21aGO جداسازي شد. قطعه موردنظر را پس از جداكردن از روي ژل، با agarosegel DNA extraction kit تخليص گرديد. به طور همزمان، پلاسميد PKK223-3 نيز با استفاده از آناليز توسط آنزيمهاي محدود كننده BamHI و HindIII ، بريده شد. داده شده است. سپس ligation ژن موردنظر به داخل پلاسميد PKK223-3 انجام و بعد به داخل باكتري پذيراي مناسب به نام Ecoli DH5α ترانسفورم شد. بعد كشت آنها روي پليت هاي حاوي آمپي سيلين و Xgal و IpT6 به مدت يك شب كلني هاي سفيد به دست آمد كه بعد از كشت اين كلني ها و استخراج پلاسميد از آنها از كلون هايي كه از نظر اندازه پلاسميد نسبت ، پلاسميد اوليه سنگين تر بود يك كلون انتخاب و جهت Restriction Analysis استفاده شد. با هضم آنزيماتيك به كمك آنزيمهايي HindIII و BamHI قطعات مورد انتظار حاصل شد و جهت قرار گرفتن ژن داخل پلاسميد نيز مشخص شد. جايگاههاي برش و جهت قرار گرفتن ژن داخل پلاسميد در (شكل ۱) نشان داده شده است.

بحث:

آنزيم گلوكزاكسيداز اولين بار از عصاره گونه آسپرژيلوس تخليص شد. سپس ميكرو ارگانيسم هاي متعددي از نظر توليد اين آنزيم در مقياس صنعتي غربال گري شدند كه بهترين توليد كننده اين آنزيم آسپرژيلوس نايجر است. [۱۳،۸،۷،۶].. اين آنزيم به عنوان ذي حس گر بيولوژيكي گلوكز، نگهدارنده در صنايع غذايي و در روند توليد اسيدهاي آلي در صنعت نان، شوينده ها، مواد بهداشتي ـ آرايشي به كار مي رود [۱۱،۵]. تحقيقات جديدتر نشان مي دهد كه انتقال ژن گلوكزاكسيداز به گياهان مي تواند به مقاومت پايه هاي گياهي در مقابل آفات منجر شود [۹،۱۴].. گرچه مطالعات اوليه اي بر روي تخليص و خصوصيات ترموديناميكي اين آنزيم در ايران انجام شده است [۲،۱]. ولي بر روي جداسازي ژن اين آنزيم به منظور توليد آنزيم نوتركيب اين اولين مطالعه مي باشد . پلاسميد PKK_{223-3} GO اين امكان را فراهم مي سازد كه بتوانيم اين ژن را به سادگي در اين وكتور بياني تحت پوترهاي مختلف در سيستم هاي پروكاريونيك يا يوكاريونيك كلون نموده و ضمن ارزيابي اين پروموترها در بيان ژن، بتوانيم نقش سيگنال پپتيد را در هنگام توليد آنزيم نوتركيب در اين سيستم ها مشخص نمائيم و بتوانيم در ادامه طرح به بررسي بيان اين در وكتور بياني بپردازيم.

منابع:

[۱] حقيقي راد فرهاد. مطالعه ترموديناميكي و پيوند شدن مولكولي گلوكزاكسيداز با مواد فعال سطحي و اوره. پايان نامه مقطع دكتري فيزيك، انيستيتو بيوشيمي و بيوفيزيك دانشگاه تهران، دانشگاه شيراز، ۱۳۷۲.

[۲] گرگاني محسن، توليد و تخليص آنزيم گلوكزاكسيداز از قارچ آسپرژيلوس نايجر، پايان نامه مقطع كارشناسي ارشد دانشگاه تهران، انيستيتو بيوشيمي و بيوفيزيك دانشگاه تهران ، ۱۳۸۰.

[3] Bright HJ, Prtet DJT, Flavoprotein Oxidase. In: Boyer PD, editor. The enzyme. 3rd ed. Academic press, New York, Sanfrancisco, and London; 1975, p.4210505.

[4] Cassago A, Panepucci RA, Tortella Baiao AM, Henrique-Silva F, Cellophane based miniprep method for DNA extraction from the filamentous fungus Trichoderna 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, niger cloning, gene sequence, from Sacharomyces cervisiae and Kinetic analysis of a yeast-drived enzyme. J Biol Chem, 1990; 256: 3793-802.

[7] Kim MY, Chung HG, Hong SY, Kim HR, Lee JC, Park SM, Lee JH, Yand 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.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

[8] Kriechbaum M, Heilmann HJ, Winetjes FJ, Hahn M, Jany KD, Gassen HG, Sharif F, Alaeddinglu G, Cloning and DNA sequence analysis of glucose oxidase gene form Aspergilles 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. 19992; US patent: 5094951.

(شکل ۱)

PKK223-3 GO و پلاسمید PKK223-3 GO دایجست شده بر روی آگارز 1 درصد:

!) مارکروزن مولکولی 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

7,6,5) پلاسمید PKK223-3 GO دایجست شده با آنزیم های BamHI , HindIII (جهت فلش قطعه ژن گلوکز اکسیداز را با وزن مولکول 1/8 kbp را نشان می دهد)