

همسانه‌سازی، شناسایی و جداسازی یک ژن گلوکز اکسیداز (GOX) از قارچ

Penicillium funiculosum

زهرا اسماعیل پور، قاسمعلی گروسی*، رحیم حداد و رضا حیدری جاپلقی

قزوین، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، دانشکده فنی - مهندسی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۹

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۲۳

چکیده

گلوکز اکسیداز (β -D-گلوکز:اکسیژن ۱-اکسیدوردوکتاز) با استفاده از اکسیژن مولکولی به عنوان پذیرنده الکترون، اکسیداسیون β -D-گلوکز را به گلوکونیک اسید کاتالیز نموده و منجر به تولید پراکسید هیدروژن می‌شود. این آنزیم در دامنه وسیعی از قارچ‌های مختلف، عمدتاً جنس‌های *Aspergillus* و *Penicillium* تولید شده و کاربردهای وسیعی در صنایع مختلف از قبیل شیمی، داروسازی، صنایع غذایی، بیوتکنولوژی و غیره دارد. در این مطالعه، ژن کدکننده گلوکز اکسیداز از قارچ *Penicillium funiculosum* با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جداسازی و در ناقل pUC19 همسانه‌سازی شده و ساختار مولکولی، ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی آن مورد بررسی قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی این ژن، تحت عنوان PFGOX، به طول ۱۸۱۸ bp بوده و یک پروتئین با ۶۰۵ آمینواسید را رمز می‌کند. وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی شده این پروتئین به ترتیب برابر ۶۵/۷۸ کیلو دالتون و ۵/۰۵ می‌باشد. بررسی ساختارهای دوم و سوم توالی پروتئینی PFGOX نشان داد که این پروتئین از نظر ساختاری مشابه با توالی‌های گلوکز اکسیداز گزارش شده از قارچ‌های دیگر می‌باشد. توالی پروتئینی به دست آمده شباهت زیادی را با توالی‌های گلوکز اکسیداز سایر قارچ‌ها از قبیل *Penicillium amagasakiense*، *Talaromyces flavus*، *Talaromyces stipitatus* و *Talaromyces variabilis* نشان داد. بررسی فیلوژنتیکی نیز مشخص کرد که این ژن به زیرگروه IA گلوکز اکسیدازهای قارچی تعلق دارد.

واژه‌های کلیدی: همسانه‌سازی، گلوکز اکسیداز، قارچ، *Penicillium funiculosum*، ساختار سه‌بعدی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۸۱-۸۳۷۱۱۵۹، پست الکترونیکی: ga.garoosi@ikiu.ac.ir

مقدمه

گلوکز اکسیداز (β -D-گلوکز:اکسیژن ۱-اکسیدوردوکتاز، EC 1.1.2.3.4) فلاووپروتئینی با وزن مولکولی ۱۷۵-۱۳۰ کیلودالتون است که با استفاده از اکسیژن مولکولی به عنوان پذیرنده الکترون، اکسیداسیون β -D-گلوکز را به گلوکونیک اسید کاتالیز نموده و منجر به تولید پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شود (۴). این آنزیم در دامنه وسیعی از قارچ‌های مختلف، عمدتاً جنس‌های *Aspergillus* و *Penicillium* تولید شده (۷ و ۱۲) و به دلیل کاربردهای وسیع در صنایع مختلف از قبیل شیمی، داروسازی، صنایع غذایی، بیوتکنولوژی و غیره، به تازگی توجه زیادی را به خود جلب نموده است (۴ و ۳۱). یکی از کاربردهای مهم آنزیم گلوکز اکسیداز در بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، تولید گیاهان مقاوم در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی و باکتریایی است (۹، ۲۰ و ۳۲). گیاهان در برابر حمله عوامل بیماری‌زا، با فعال‌سازی تعدادی از پاسخ‌های دفاعی از قبیل تقویت دیواره سلولی، سنتز فیتوالکسین‌ها (Phytoalexin) و فعال‌سازی برخی آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند کیتیناز و گلوکاناز، از خود محافظت می‌کنند (۲، ۳ و ۲۱). با این وجود، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species, ROS) به ویژه پراکسید هیدروژن، جزء اولین

همسانه‌سازی ژن عامل آنزیم گلوکز اکسیداز (GOX) برای اولین بار از قارچ پنی سیلیوم بومی ایران (*Penicillium funiculosum* PTCC 5301) انجام گردید تا زمینه و مقدمات لازم برای تولید گیاهان تراریخت متحمل فراهم گردد. همچنین، خصوصیات بیوشیمیایی و ساختارهای دویعدی و سه‌بعدی توالی پروتئینی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی پیش‌بینی شده و با استفاده از بررسیهای همولوژی و فیلوژنتیکی با ژنهای گلوکز اکسیداز سایر قارچها نشان داده که ژن همسانه شده به زیرگروه IA تعلق دارد.

مواد و روشها

کشت قارچ و استخراج DNA ژنومی: قارچ *P. funiculosum* با شماره دسترسی PTCC 5301 از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران خریداری و روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت داده شد. محیط کشت PDA به صورت آماده از شرکت پروتون شیمی، ایران تهیه و نمونه‌های قارچی به مدت ۷ روز در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و هر ماه واکشت گردیدند. سپس DNA ژنومی قارچ با استفاده از روش Cubero و همکاران (۱۹۹۹) استخراج گردید (۶).

طراحی آغازگرها و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): تکثیر ژن PfgOX با استفاده از آنزیم *Pfu* (Fermentas) و آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی طراحی شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن گلوکز اکسیداز از قارچهای *P. adametzii* و *P. amagasakiense* (موجود در پایگاه NCBI GenBank با شماره‌های دستیابی EF137913 و AF012277) با استفاده از نرم‌افزار Oligo نسخه ۷ انجام شد (۲۶). آغازگرهای اختصاصی شامل سه نوکلئوتید اضافی و جایگاه شناسایی آنزیم برشی *SacI* در انتهای ۵' بودند که توسط شرکت Metabion آلمان سنتز شدند. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۵۰ μ l حاوی (pH 8.8)، 10 mM Tris-HCl، 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، 10 mM KCl،

پاسخهای دفاعی سلولهای گیاهی در برابر حمله عوامل بیماریزای قارچی و باکتریایی است، به طوری که آنها به عنوان یک مولکول هشدار دهنده ثانویه عمل کرده و آنزیمهای درگیر در استحکام دیواره سلولی و ساخت فیتوالکسین‌ها را فعال می‌سازند (۳۲). بنابراین تولید پراکسید هیدروژن دستورزی شده با استفاده از یک ژن قارچی در گیاهان می‌تواند روش مفیدی در جهت افزایش مقاومت گیاهان در برابر عوامل بیماریزای قارچی و باکتریایی باشد (۱۵).

آنزیم گلوکز اکسیداز ابتدا توسط Muler (۱۹۲۸) از قارچ *Aspergillus niger* جداسازی (۲۲) و اندک زمانی پس از آن مشخص شد که توسط باکتریها و قارچهای متعددی تولید می‌شود. همسانه‌سازی و تعیین توالی DNA ژن گلوکز اکسیداز قارچ *A. niger* NRRL-3، اولین بار توسط Kriechbaum و همکاران (۱۹۸۹) انجام شده (۱۷) و ساختار آن توسط Wholfahrt و همکاران (۱۹۹۹) تعیین گردید (۲۹). مقایسه mRNA و DNA ژن گلوکز اکسیداز نشان داد که هیچ ایترونی در توالی نوکلئوتیدی ژن کدکننده گلوکز اکسیداز قارچ *A. niger* وجود ندارد (۱۷). این موضوع در مورد توالی نوکلئوتیدی ژن گلوکز اکسیداز قارچ *Penicillium variable* (۲۵)، *Talaromyces flavus* (۲۳) و *P. amagasakiense* (۱۸) نیز ثابت شد. اولین بار Fravel و همکاران (۱۹۹۱) و سپس Wu و همکاران (۱۹۹۵) اظهار داشتند که بیان ژن گلوکز اکسیداز در گیاهان می‌تواند مقاومت به آلودگی باکتریایی را فراهم کرده و در مهندسی ژنتیک گیاهی کاربرد داشته باشد (۹ و ۳۲)، به طوری که با افزایش ناگهانی H_2O_2 تحت یک پروموتور القایی، مرگ سلول و واکنش فوق حساسیت را ایجاد نموده و در نتیجه گیاه در برابر بیماری بادزدگی سیب زمینی مقاوم می‌گردد (۲۰).

با توجه به نقش این آنزیم در ایجاد مقاومت به عوامل بیماریزای قارچی و باکتریایی در گیاهان، جداسازی و

(۲۷). توالی‌یابی DNA پلاسمید نوترکیب با استفاده از آغازگرهای راه‌انداز باکتریوفاژ T7 در دو جهت رفت و برگشت توسط شرکت SeqLab آلمان، انجام شد.

بررسی توالی و پیش‌بینی ساختارهای دوم و سوم پروتئین به دست آمده از PfGOX: توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی با استفاده از برنامه Translate (http://www.expasy.ch/tools/dna.html) مورد ترجمه قرار گرفته و خصوصیات بیوشیمیایی توالی آمینواسیدی به دست آمده، شامل شاخصهای آلفایتیک، آب‌گریزی و ناپایداری با استفاده از برنامه‌های ProtParam (۱۱)، ProtScale

(<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/hydropathy/index.html>) و TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین پیش‌بینی موقعیت زیرسلولی ژن PfGOX با استفاده از برنامه YLOC (۵) انجام گرفت. ساختار دوم توالی پروتئینی PfGOX با استفاده از برنامه SOPMA (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) تعیین گردیده و ساختار سوم توسط برنامه I-TASSER (۳۳) مورد پیش‌بینی قرار گرفت.

بررسی فیلوژنتیکی: توالی آمینواسیدی به دست آمده به منظور یافتن پروتئینهای مشابه در بانکهای اطلاعاتی با استفاده از الگوریتم BLASTp در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) مورد جستجو قرار گرفته و تعدادی توالی پروتئینی از منابع مختلف که بیشترین شباهت را با توالی مورد نظر داشتند، انتخاب شدند. همردیف‌سازی چندگانه توالی پروتئینی PfGOX و توالیهای به دست آمده به منظور شناسایی نواحی حفظ شده در طی تکامل با استفاده از نرم‌افزار ClustalX انجام شد. یک درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor Joining و با استفاده از نرم‌افزار MEGA4.1 Beta 2 (۲۸) ساخته شده و بررسی Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار به منظور بدست آمدن حدود اطمینان برای شاخه‌ها نیز انجام گردید (۸). شماره دستیابی

0.1 mg/ml BSA، 0.1% Triton X-100، 2 mM MgSO₄، 500 μM از هر dNTP، 50 pM از هر آغازگر (رفت و برگشت)، 100 ng DNA الگو و 1.25 واحد از آنزیم Pfu DNA polymerase مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر (Techne-TC512، انگلستان) قابل برنامه‌ریزی در ۳۵ چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده شامل آغازگر رفت با توالی 5'-ATAGAGCTCATGGTGTCTGTATTTCTC-3' و آغازگر برگشت با توالی 5'-ATAGAGCTCCTAGGCACTTTTGGCATAG-3' بود.

همسانه سازی و توالی‌یابی DNA ژنومی PfGOX: پس از خالص‌سازی محصول PCR با اندازه مورد نظر از روی ژل با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک (GF-1 PCR Clean Up Kit-Vivantis)، ژن مورد نظر و ناقل پلاسمیدی pUC19 (Fermentas) توسط آنزیم برشی SacI (Fermentas) تیمار گردیده و مجدداً خالص‌سازی شدند. سپس واکنش اتصال با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 (Fermentas) انجام گرفته و محلول اتصال به روش شوک حرارتی به سلولهای مستعد اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) سویه DH5α، انتقال داده شد (۲۷). با انجام آزمون سفید-آبی، تعدادی کلونی به عنوان کلونیهای نوترکیب انتخاب شده و پلاسمیدهای نوترکیب با روش تحلیل قلیایی با SDS استخراج گردیده و با استفاده از دو تکنیک PCR و برش آنزیمی مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفتند

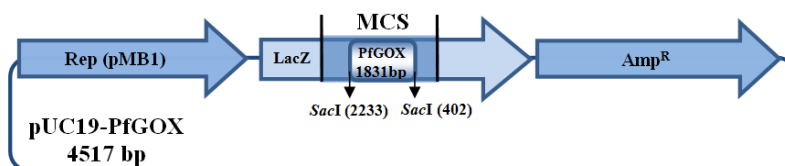
توالی‌های پروتئینی موجود در پایگاه اطلاعات توالی NCBI روابط فیلوژنتیکی، در جدول ۱ آمده است. مورد استفاده جهت بررسی‌های هم‌ردیف‌سازی چندگانه و

جدول ۱- مشخصات توالی‌های پروتئینی مورد استفاده برای تهیه هم‌ردیف‌سازی چندگانه و ترسیم درخت فیلوژنتیکی به همراه شماره دستیابی موجود

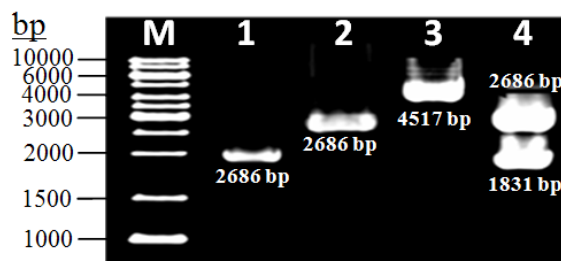
در پایگاه اطلاعات توالی NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

شماره دستیابی	نام ژن	نام علمی	جنس	ردیف
XP_002375824	AfGOX	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus</i>	۱
GAA89731	AkGOX	<i>Aspergillus kawachii</i>		
ACR56326	AnGOX	<i>Aspergillus niger</i>		
XP_001727544	AoGOX	<i>Aspergillus oryzae</i>		
XP_001217613	AtGOX	<i>Aspergillus terreus</i>		
EJD48758	AdGOX	<i>Auricularia delicata</i>	<i>Auricularia</i>	۲
CAD88590	BfGOX	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	<i>Botryotinia</i>	۳
CCF42512	ChGOX	<i>Colletotrichum higginsianum</i>	<i>Colletotrichum</i>	۴
AER13599	GcGOX	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Glomerella</i>	۵
EFZ02033	MaGOX	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium</i>	۶
AAD01493	PaGOX	<i>Penicillium amagasakiense</i>	<i>Penicillium</i>	۷
XP_002563451	PcGOX	<i>Penicillium chrysogenum</i>		
ABN79922	PeGOX	<i>Penicillium expansum</i>		
AJ583233	PvGOX	<i>Penicillium variable</i>		
CCA75795	PiGOX	<i>Piriformospora indica</i>	<i>Piriformospora</i>	۸
AAB09442	TfGOX	<i>Talaromyces flavus</i>	<i>Talaromyces</i>	۹
XP_002482295	TsGOX	<i>Talaromyces stipitatus</i>		
CAE47418	TvGOX	<i>Talaromyces variabilis</i>		
EIW65340	TveGOX	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Trametes</i>	۱۰

(الف)



(ب)



شکل ۱- ساختار و الکتروفورز نتیجه برش آنزیمی ناقل نوترکیب pUC19-PfGOX. (الف) ساختار ناقل نوترکیب pUC19-PfGOX حاوی ژن PfGOX در جهت معمولی روی جایگاه چندگانه برای هم‌سانه‌سازی (MCS). توالی مسئول رونوشت‌برداری ناقل نوترکیب (pMB1)، ژنهای *lacZ* و مقاومت به آمپی‌سیلین (Amp^R) روی ناقل نوترکیب نشان داده شده‌اند. (ب) برش آنزیمی ناقل نوترکیب pUC19-PfGOX با آنزیم برشی *SacI* و الکتروفورز ژل (آگاروز ۱ درصد. M نشانگر وزن مولکولی ۱ Kb، ۱) پلاسمید حلقوی pUC19 فاقد ژن PfGOX و هضم نشده، ۲) پلاسمید pUC19 فاقد ژن PfGOX و هضم شده با آنزیم برشی *SacI* ۳) پلاسمید نوترکیب pUC19-PfGOX هضم نشده، ۴) پلاسمید نوترکیب pUC19-PfGOX هضم شده با آنزیم برشی *SacI*.

نتایج و بحث

و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی شده توالی پروتئینی ژن PfgOX با فرمول مولکولی $C_{2942}H_{4556}N_{782}O_{893}S_{19}$ ، به ترتیب برابر ۶۵/۷۸ کیلودالتون و ۵/۰۵ می‌باشد. همچنین برنامه ProtParam نشان داد که شاخص آلفاتیکی پروتئین PfgOX، به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئینها در برابر حرارت، ۸۶/۲۸ بوده که نشان دهنده مقاوم بودن پروتئینهای گلوکز اکسیداز در برابر حرارت می‌باشد (۳۱). شاخص ناپایداری پروتئینها بیان گر میزان پایداری آنها در لوله آزمایش می‌باشد، و پروتئینهایی با شاخص کمتر از ۴۰ جزء پروتئینهای پایدار تقسیم بندی می‌شوند. شاخص ناپایداری پروتئین مورد نظر در حدود ۲۶/۳۸ محاسبه گردید به علاوه شاخص ناپایداری آن در لوله آزمایش در حدود ۲۶/۳۸ بوده و لذا در رسته پروتئینهای پایدار تقسیم‌بندی می‌شود (۴).

همسازسازی و بررسی توالی نوکلئوتیدی ژن PfgOX و خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین به دست آمده ژن کدکننده PfgOX با استفاده از تکنیک PCR از قارچ پنی سیلیوم بومی ایران (*P. funiculosum*)، جداسازی و در ناقل پلاسمیدی pUC19 همسازسازی شده و نتایج توالی-یابی و بررسی با برنامه BLAST نشان داد که قطعه همسازسازی شده در جهت معمولی، یک ژن گلوکز اکسیداز می‌باشد (شکل ۱). توالی DNA ژنومی PfgOX، ثبت شده در پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank با شماره دستیابی HQ529689، به طول ۱۸۱۸ bp بوده که با کدون ATG آغاز شده و با کدون TAG خاتمه یافته و یک پروتئین با ۶۰۵ آمینواسید را کد می‌نماید (شکل ۲). بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین به دست آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده

1	Atgggtgtctgtattttctcagcaactctctttttatctcgcggtcacgggtccaagcctacctgcctgccaacagattgatgtccagctctagttctctcagtg	33
101	Accctagcaagggttgcaaggaaagacctatgattacatcattgctgggtggcttgactggccttactgtgtgtgccaatgacagagaaaaccccccaagat	
201	D P S K V A G G K T Y D Y I I A G G G L T G L T V A A K L T E N P K I	67
301	Caaagtctcgtgcttgaagggtctctatgagtcacaacagtgaggccatctcagggatccaaatgcttatggacaaatctttggcaccactggtgat	100
401	K V L V I E K G F Y E S N D G A I I E D P N A Y G Q I F G T V D	133
501	Tgcacgtactcctactgctgctcaggtgctgctgcccactccttcaatgctacctgccaatggaaaccaaggtactggtcaatccggagccccgcgacaac	167
601	A R T P T A A Q V A A G H S F A T H G T G T V Q S G A R D N	200
701	Tctctatgatcatgaaccaatctcagcaaaacaaagttgtgatgctgcccgtgctgcttcccacaaaccagcccgccggatctggagatcct	233
801	V S M I M N N L D E N Q V R V D A A R A W L L P N Y Q R F N L E I L	267
901	Tactgttcagatggttgtaagggtctctttaaacagacgcatccgggtccccagggctgtgtgtaacttcggtactaaagccgctcaactttgac	300
1001	Gtcttctgctaaagcaggtcctcttggctgctgctcagctatctctcgcgtgatcttggaaatattctggcatagggtgaaagctggtctctgatcagg	333
1101	Ccaatgctactcagctctctgatctcctggttgatcaatgatgcaagaccagaccacaaccactgtcagttcccggtgctagtgccgctggtggtca	367
1201	Gggtcagggcgtctctctcggcaatttcaactgaaacctcgtgactacgccccagggcagggaactactcaacaccaagctcagcaaatgggcccag	400
1301	Gagaccgttgccgctggtggtttccataatgtaactgctctcaaatgcaaatgcaaatgcaaatgcaaatgcaaatgcaaatgcaaatgcaaatgcaaatgca	433
1401	Agcttttcaatggacaccgagggcaagatcaactcagcttatggggtctcatcccttcaactcgtggttccggtccatctcctcagtagagctcctact	467
1501	Atggcaatgcccacagccccaatctctcctgaaacaggttgacacctcctgcccagctgctgcttccaagcctgctcgtgatctcaccagcccaaggc	500
1601	Gctatgaaggagtactctcgtgggagactctccaggatacaactggtccagaatgctactcttctcagtggtcggatattgctctacagaactcc	533
1701	Gtccccactggcgtgtagcagctgctctatgatgctctagagagcttgggtggtgctgctgctactgccaaggtgtacgggtaccacaaggcctacg	567
1801	Tgtctcaggtggtctctctcctcagctcaggtgctctctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcag	600
	Tatgccaagaagtgctag	605
	Y A K S A *	

شکل ۲- توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن PfgOX. توالی پپتید راهنما به صورت زیرخط، آمینواسیدهای Cys و Asn درگیر در فرآیند N-گلیکوزیلاسیون به ترتیب با علامت مربع و دایره و آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال به صورت ضخیم نشان داده شده‌اند. همچنین شماره‌های بازها و آمینواسیدها به ترتیب در سمت چپ و راست آورده شده است.

His₅₂₀ و His₅₆₃ می‌باشد. Arg₅₁₆ مهم‌ترین آمینواسید جهت اتصال مؤثر آنزیم گلوکز اکسیداز به D-β-گلوکز می‌باشد، در حالی که Asn₅₁₈ به میزان کمتری در این واکنش شرکت می‌کند (۳۰). آمینواسیدهای آروماتیک Tyr₇₃، Phe₄₁₈ و Trp₄₃₀ به منظور جهت‌گیری صحیح سوبسترای و نیز جهت اکسیداسیون سریع گلوکز حائز اهمیت می‌باشند (۴). همچنین آمینواسیدهای His₅₂₀ و His₅₆₃ در طی واکنش با OH₁ گلوکز پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌دهند (۴). همچنین، مقایسه توالی آمینواسیدی ژن PFGOX با ژنهای گلوکز اکسیداز از *A. niger* (۱۰)، *P. amagasakiense* (۱۶) و *P. variable* (۲۵)، ۴ جایگاه N-گلیکوزیلاسیون را در موقعیتهای حفظ شده Asn₉₃، Asn₁₆₅، Asn₁₇₂ و Asn₃₉₂ نشان داد. در حالی که در توالی آمینواسیدی ژنهای گلوکز اکسیداز از *A. niger* (۱۳)، *P. amagasakiense* (۱۶) به ترتیب ۶ و ۵ جایگاه N-گلیکوزیلاسیون شناسایی شده است.

پیش‌بینی موقعیت زیرسلولی این پروتئین با استفاده از برنامه YLOC نشان داد که این آنزیم همانند سایر آنزیمهای گلوکز اکسیداز در مسیرهای متابولیکی فعال بوده و محل فعالیت آن خارج از اندامکهای سلولی از قبیل میتوکندری و پراکسیزوم می‌باشد. همچنین بررسیها با برنامه TMHMM نشان داد که PFGOX با داشتن یک دومین غشایی در انتهای آمینوی خود، به عنوان یک پروتئین خارج سلولی شناخته شده و قادر به خروج از سلول می‌باشد. این پیش‌بینیها با نتایج Petruccioli و همکاران (۱۹۹۷) مشابه می‌باشد (۲۴). به طوری که آنها نشان دادند که آنزیم گلوکز اکسیداز به طور طبیعی از درون سلولهای قارچی *P. variable* به درون محیط کشت ترشح می‌کند. به هر حال این فعالیت منحصر به فرد نیاز به بررسی‌های دقیق‌تری دارد.

بررسی ساختار دوم و سوم توالی پروتئینی ژن PFGOX:
بررسی ساختار دوم توالی پروتئینی ژن PFGOX با استفاده

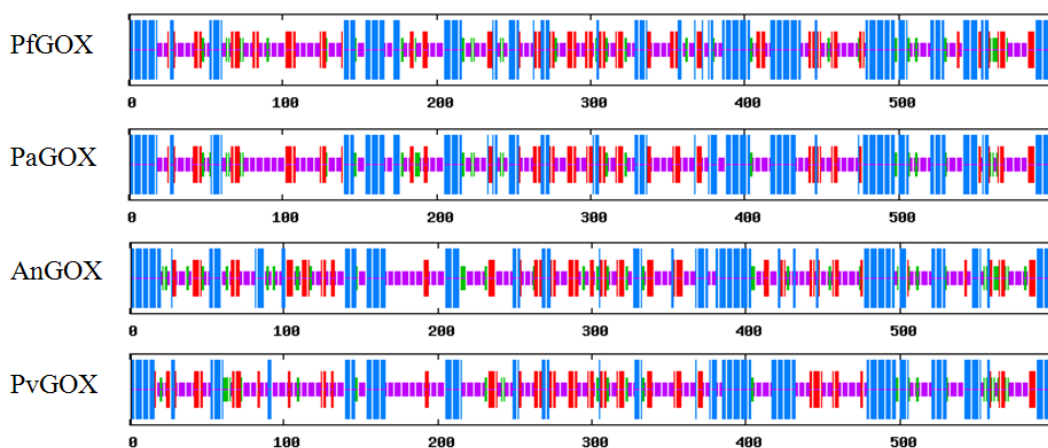
شاخص آب‌گریزی (Hydropathy) محاسبه شده با استفاده از برنامه ProtScale به روش Doolittle & Kyte (۱۹۸۲) نشان داد که توالی پروتئینی ژن PFGOX به میزان زیادی آب‌گریز بوده (۱۹) و از مجموع کل آمینواسیدها، ۵۹ آمینواسید با بار منفی (Asp+Glu) داشته، در حالی که تعداد کل آمینواسیدهای با بار مثبت آن (Arg+Lys) برابر ۴۴ می‌باشد.

بررسی توالی آمینواسیدی و موتیفهای ساختاری توالی پروتئینی ژن PFGOX: بررسی توالی آمینواسیدی نشان داد که ژن PFGOX با ۱۸۱۸ bp طول، یک پروتئین اولیه با ۶۰۵ آمینواسید را کد می‌کند که مانند آنزیمهای کیتیناز و گلوکاناز، می‌تواند در جهت تولید گیاهان مقاوم در برابر عوامل بیماریزای قارچی و باکتریایی مورد استفاده قرار بگیرد (۱، ۲ و ۳). ژن PFGOX همانند سایر ژنهای گلوکز اکسیداز از *A. niger* (۱۰)، *P. amagasakiense* (۱۶) و *P. variable* (۲۵) دارای یک توالی پپتید راهنما به طول ۱۸ آمینواسید با ترادف MVSFVFLSTLLLSAATVQA در انتهای آمینوی خود می‌باشد که پس از جداسازی، یک پروتئین بالغ و فعال به طول ۵۸۷ آمینواسید را تولید می‌کند. توالی گلوکز اکسیداز از *A. niger* با داشتن یک پپتید راهنما به طول ۲۲ آمینواسید، دارای یک آمینواسید بازی (Arg) در موقعیت ۱- می‌باشد که موجب برش پیوند پپتیدی بین آمینواسیدهای Arg و Ser و نهایتاً جداسازی توالی پپتید راهنما می‌شود (۱۷). در حالی که آمینواسید موقعیت ۱- در توالی پپتیدی ژن PFGOX یک آمینواسید آب‌گریز (Ala) بوده و نشان دهنده سازوکار متفاوت در جداسازی توالی پپتید راهنما می‌باشد.

پروتئین بالغ PFGOX مشابه با توالی پروتئینی ژنهای گلوکز اکسیداز از *A. niger* (۱۰)، *P. amagasakiense* (۱۶) و *P. variable* (۲۵) دارای سه آمینواسید Cys در موقعیتهای حفظ شده Cys₁₆₈، Cys₂₁₀ و Cys₅₂₅ و یک جایگاه فعال با ۷ آمینواسید Tyr₇₃، Phe₄₁₈، Trp₄₃₀، Arg₅₁₆، Asn₅₁₈

درصد) و ۲۶۳ ماریپچ تصادفی (۴۳/۴۷ درصد)، AnGOX (*A. niger*) با ۱۸۵ ماریپچ α (۳۰/۵۸ درصد)، ۱۱۰ صفحه β (۱۸/۱۸ درصد) متصل شده توسط ۵۹ پیچ β (۹/۷۵ درصد) و ۲۵۱ ماریپچ تصادفی (۴۱/۴۹ درصد) و PvGOX (*P. variable*) شامل ۱۸۲ ماریپچ α (۳۰/۰۸ درصد)، ۱۰۲ صفحه β (۱۶/۸۶ درصد) متصل شده توسط ۳۹ پیچ β (۶/۴۵ درصد) و ۲۸۲ ماریپچ تصادفی (۴۶/۶۱ درصد) تشابه زیادی را نشان داد (۱۰، ۱۶ و ۲۵) (شکل ۳).

از برنامه SOPMA نشان داد که این پروتئین حاوی ۲۰۸ آمینواسید درگیر در ماریپچ α (۳۴/۳۸ درصد)، ۱۱۴ آمینواسید تشکیل دهنده صفحه β (۱۸/۸۴ درصد)، ۴۸ آمینواسید موجود در پیچ β (۷/۹۳ درصد) و ۲۳۵ آمینواسید درگیر در ماریپچ تصادفی (۳۹/۸۶ درصد) می‌باشد (شکل ۳). این نتایج با ساختار دوم توالی پلی‌پپتیدی ژن‌های گلوکز اکسیداز از قبیل PaGOX (*P. amagasakiense*) که حاوی ۲۰۶ ماریپچ α (۳۴/۰۵ درصد)، ۹۹ صفحه β (۱۶/۳۶ درصد) متصل شده توسط ۳۷ پیچ β (۶/۱۲)

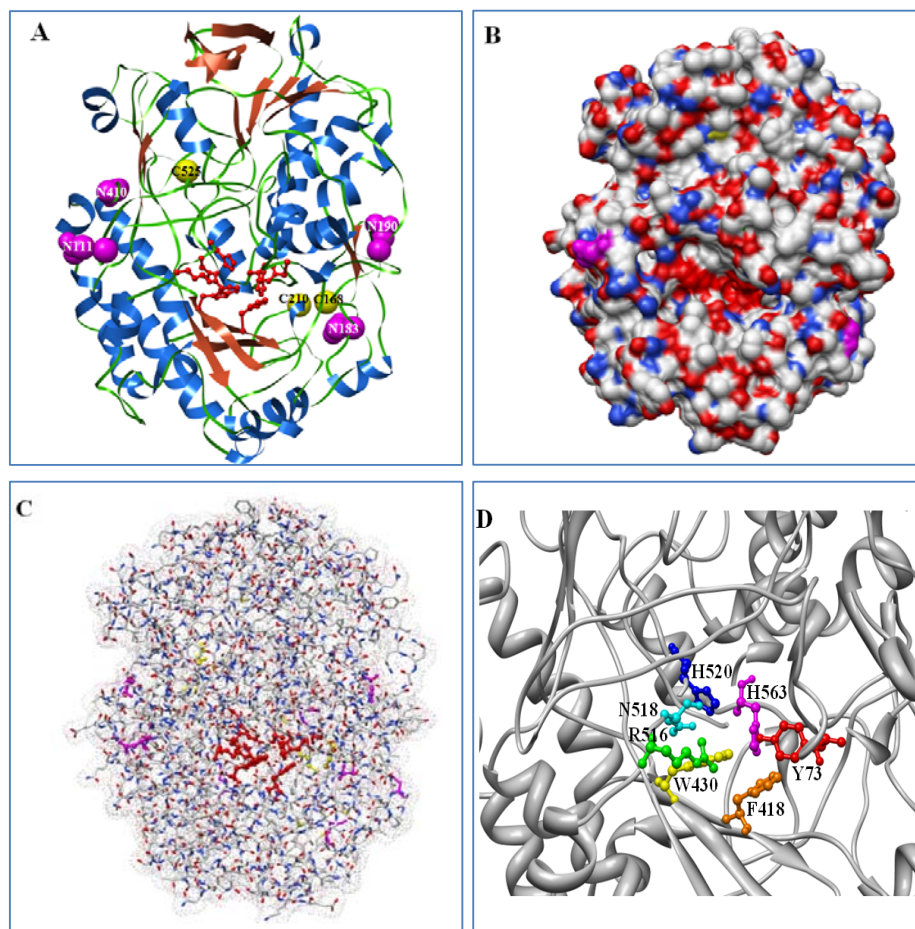


شکل ۳- ساختار دوم توالی پروتئینی PfGOX با استفاده از برنامه SOPMA و مقایسه آن با توالی پلی‌پپتیدی ژن‌های گلوکز اکسیداز از قبیل PaGOX (*P. amagasakiense*)، AnGOX (*A. niger*) و PvGOX (*P. variable*). ماریپچ‌های α ، صفحات β ، پیچ‌های β و ماریپچ‌های تصادفی به ترتیب با خطوط آبی، قرمز، سبز و بنفش نشان داده شده‌اند.

مانوز پیوند برقرار نمایند (۴). همچنین، آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال طوری در کنار یکدیگر آرایش یافته‌اند تا بتوانند با کوفاکتور فلاوین آدنین دی‌نوکلئوتید (FAD) پیوند غیرکوالان برقرار نمایند (۲۹). شکل ۴ الف طرح روبانی آنزیم PfGOX و توزیع آمینواسیدهای Cys، آمینواسیدهای Asn درگیر در فرآیند N-گلیکوزیلاسیون و آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال را نشان می‌دهد. نمایش سطح جامد و طرح گوی و میله به همراه سطح و اندروالس در پروتئین PfGOX به ترتیب در شکل‌های ۴ ب و ۴ ج نشان داده شده‌اند. همچنین شکل ۴ د موقعیت

پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی توالی پروتئینی ژن PfGOX بوسیله برنامه I-TASSER نشان داد که این آنزیم مشابه با ساختار سه‌بعدی ژن‌های PaGOX (*P. amagasakiense*) (۲۹) و AnGOX (*A. niger*) (۱۴) حاوی ۱۵ صفحه β و ۲۲ ماریپچ α می‌باشد (شکل ۴). نحوه آرایش ماریپچ‌های α و صفحات β در ساختار سه‌بعدی پروتئین PfGOX و به طور کلی آنزیم‌های گلوکز اکسیداز به گونه‌ای است که ماریپچ‌های α در سطح خارجی پروتئین و صفحات β در داخل پروتئین قرار گرفته‌اند. آمینواسیدهای Asn درگیر در فرآیند N-گلیکوزیلاسیون در سطح خارجی پروتئین به گونه‌ای واقع شده‌اند تا بتوانند با کربوهیدرات‌های غنی از قند

قرارگیری آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال را نشان می‌دهد.



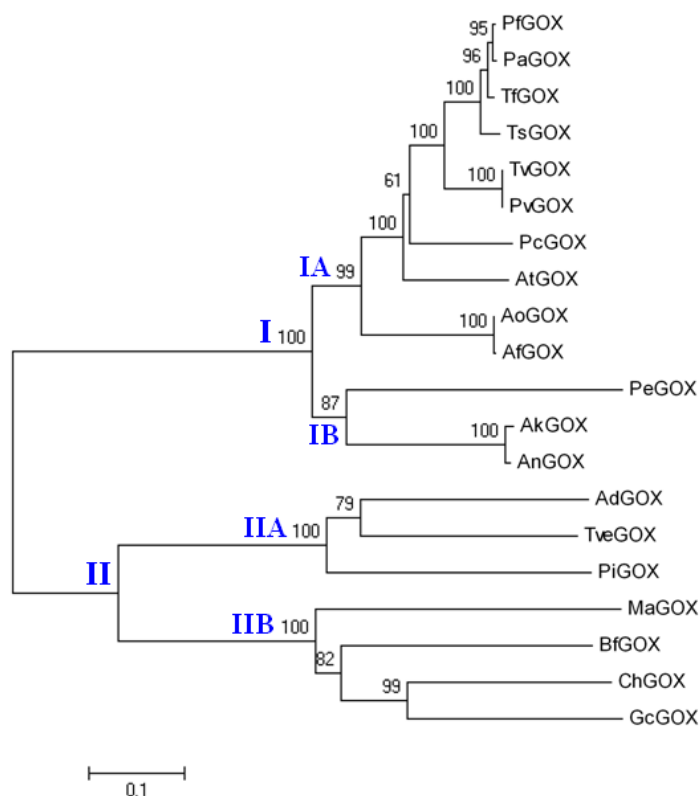
شکل ۴- مدل‌های سه‌بعدی توالی پروتئینی ژن PfGOX. الف) مدل سه‌بعدی رویان (Ribbon) توالی پروتئینی ژن PfGOX. ماریج‌های α ، صفحات β و نواحی ماریج پیچیده به طور مشخص در ساختار سه‌بعدی قابل مشاهده می‌باشند. آمینواسیدهای Cys و آمینواسیدهای Asn درگیر در فرآیند N-گلیکوزیلاسیون به شکل کرولی (Sphere) به ترتیب با رنگهای زرد و ارغوانی قابل مشاهده می‌باشند. همچنین آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال به شکل گوی-میله (Ball-stick) قرمز رنگ نشان داده شده‌اند. ب) مدل سه‌بعدی توالی پروتئینی ژن PfGOX با سطح جامد. ج) مدل سه‌بعدی گوی-میله (Ball-stick) توالی پروتئینی ژن PfGOX به همراه سطح و اندروالسی ۱۰ درصد. آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال به شکل گوی-میله (Ball-stick) قرمز رنگ نشان داده شده‌اند. د) نحوه آرایش آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال در فضای سه‌بعدی به منظور برقراری پیوند غیرکوالان با کوفاکتور FAD.

یکسانی)، ۹۹ درصد (با ۹۹ درصد یکسانی)، ۹۸ درصد (با ۹۶ درصد یکسانی) و ۹۴ درصد (با ۸۹ درصد یکسانی) دارد (شکل ۵). توالی پپتید راهنما، آمینواسیدهای Cys، آمینواسیدهای Asn درگیر در فرآیند N-گلیکوزیلاسیون و آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال به طور مشخص در شکل ۵ نشان داده شده‌اند.

بررسی‌های همولوژی و فیلوژنتیکی: توالی پروتئینی ژن PfGOX با سایر ژنهای گلکز اکسیداز از قارچهای دیگر مورد مقایسه قرار گرفته و مشاهده شد که بالاترین تشابه را با ژنهای PaGOX از *P. amagasakiense*، TfGOX از *T. flavus*، TsGOX از *T. stipitatus* و T. variabilis به ترتیب به میزان ۹۹ درصد (با ۹۹ درصد

AkGOX	MQTLFVSSLVVSLAALAHFYIRSN-GTHASLLTDFPMDVAGRTVDYIAGGGLTGLTAAARLTENFDITVLVIESGSYESDRGIIIEDLNAYGDFIPGSSV
AngOX	MQTLFVSSLVVSLAALAHFYIRSN-GTHASLLTDFPMDVAGRTVDYIAGGGLTGLTAAARLTENFDITVLVIESGSYESDRGIIIEDLNAYGDFIPGSSV
AoGOX	MKSAIIPSPILFSLALACNYSDEKHFDDVSSLLSDPKVESEKTFDVIAGGGLTGLTVAATKLTENFDIEVLVIEKGFYSESCGSIYEDLNAYGDFIPGTDV
AfGOX	MKSAIIPSPILFSLALACNYSDEKHFDDVSSLLSDPKVESEKTFDVIAGGGLTGLTVAATKLTENFDIEVLVIEKGFYSESCGSIYEDLNAYGDFIPGTDV
TvGOX	MVSVFLSLLLSVATAQVYSPAQCIDVQSSLLSDPKVAGKTYDYIAGGGLTGLTVAAKLSENFKKIKLVIEKGFYSESDGAIIEDANAYGQIFGTTV
PvGOX	MVSVFLSLLLSVATAQVYSPAQCIDVQSSLLSDPKVAGKTYDYIAGGGLTGLTVAAKLSENFKKIKLVIEKGFYSESDGAIIEDANAYGQIFGTTV
PfGOX	MVSVFLSLLLSVATAQVYSPAQCIDVQSSLLSDPKVAGKTYDYIAGGGLTGLTVAAKLSENFKKIKLVIEKGFYSESDGAIIEDANAYGQIFGTTV
PaGOX	MVSVFLSLLLSVATAQVYSPAQCIDVQSSLLSDPKVAGKTYDYIAGGGLTGLTVAAKLSENFKKIKLVIEKGFYSESDGAIIEDANAYGQIFGTTV
TfGOX	MVSVFLSLLLSVATAQVYSPAQCIDVQSSLLSDPKVAGKTYDYIAGGGLTGLTVAAKLSENFKKIKLVIEKGFYSESDGAIIEDANAYGQIFGTTV
TsGOX	MVSVFLSLLLSVATAQVYSPAQCIDVQSSLLSDPKVAGKTYDYIAGGGLTGLTVAAKLSENFKKIKLVIEKGFYSESDGAIIEDANAYGQIFGTTV
PcGOX	MVSVFLSLLLSVATAQVYSPAQCIDVQSSLLSDPKVAGKTYDYIAGGGLTGLTVAAKLSENFKKIKLVIEKGFYSESDGAIIEDANAYGQIFGTTV
AtGOX	IAMRHTSYFELDLATVSAALVSECVNQVQALLTDFVADIKFDYIAGGGLTGLTVAAKLSENFKKIKLVIEKGFYSESDGAIIEDANAYGQIFGTTV
PeGOX	-----IRMATALH-----QADFDLQSSLLTDFTKVAGTTFDYIAGGGLTGLTVAARLTENFDITVLVIERGFYSESDGAIIEDANAYGQIFGTTV
AkGOX	DHAYEFVELATNNTALIRSGNGLGGSTLVNGGTTTRPHKACQVDSWEIVFVNEGWNWDMVAAYSLQAEARARAPNAKQIAAGHYFNASIGLNTSTVHAGPR
AngOX	DHAYEFVELATNNTALIRSGNGLGGSTLVNGGTTTRPHKACQVDSWEIVFVNEGWNWDMVAAYSLQAEARARAPNAKQIAAGHYFNASIGLNTSTVHAGPR
AoGOX	DQAYQYFVPLAVNRRTELIRSGNGLGGSTLVNGGTTTRPHKACQVDSWEIVFVNEGWNWDMVDFEYMKKAERAPNEAQAAGHYFNASIGLNTSTVHAGPR
AfGOX	DQAYQYFVPLAVNRRTELIRSGNGLGGSTLVNGGTTTRPHKACQVDSWEIVFVNEGWNWDMVDFEYMKKAERAPNEAQAAGHYFNASIGLNTSTVHAGPR
TvGOX	DQNYLTVPL-INNRSSIRSGKGLGGSTLVNGGTTTRPHKACQVDSWEIVFVMEGWNWDMTFEYMKKAELARAPDAQAAGHYFNASIGLNTSTVHAGPR
PvGOX	DQNYLTVPL-INNRSSIRSGKGLGGSTLVNGGTTTRPHKACQVDSWEIVFVMEGWNWDMTFEYMKKAELARAPDAQAAGHYFNASIGLNTSTVHAGPR
PfGOX	DQNYLTVPL-INNRSSIRSGKGLGGSTLVNGGTTTRPHKACQVDSWEIVFVMEGWNWDMTFEYMKKAELARAPDAQAAGHYFNASIGLNTSTVHAGPR
PaGOX	DQNYLTVPL-INNRSSIRSGKGLGGSTLVNGGTTTRPHKACQVDSWEIVFVMEGWNWDMTFEYMKKAELARAPDAQAAGHYFNASIGLNTSTVHAGPR
TfGOX	DQNYLTVPL-INNRSSIRSGKGLGGSTLVNGGTTTRPHKACQVDSWEIVFVMEGWNWDMTFEYMKKAELARAPDAQAAGHYFNASIGLNTSTVHAGPR
TsGOX	DQNYLTVPL-INNRSSIRSGKGLGGSTLVNGGTTTRPHKACQVDSWEIVFVMEGWNWDMTFEYMKKAELARAPDAQAAGHYFNASIGLNTSTVHAGPR
PcGOX	DQNYLTVPL-INNRSSIRSGKGLGGSTLVNGGTTTRPHKACQVDSWEIVFVMEGWNWDMTFEYMKKAELARAPDAQAAGHYFNASIGLNTSTVHAGPR
AtGOX	DQNYLTVPL-INNRSSIRSGKGLGGSTLVNGGTTTRPHKACQVDSWEIVFVMEGWNWDMTFEYMKKAELARAPDAQAAGHYFNASIGLNTSTVHAGPR
PeGOX	DAAYQYFVPLAVNRRTELIRSGNGLGGSTLVNGGTTTRPHKACQVDSWEIVFVNEGWNWDMVDFEYMKKAERAPNEAQAAGHYFNASIGLNTSTVHAGPR
AkGOX	DTGDDNSPIVKALMSAVEDRGVPTKDLGGSDPHGVSMPFPTLHEDQVRSDAAREWLLPNYQRPNLQVLTGGYVGVKLLSINMTTPRAVGVFEGTHKGN
AngOX	DTGDDNSPIVKALMSAVEDRGVPTKDLGGSDPHGVSMPFPTLHEDQVRSDAAREWLLPNYQRPNLQVLTGGYVGVKLLSINMTTPRAVGVFEGTHKGN
AoGOX	DNGKPMSPIMKALMNTSALGVVPTQDFLCHSPRGVSMIMNLDENQVRYDAARAWLLPNYQRPNLLELTGMVGVKLVFKQTASGPAQVGVNFGTNKAVN
AfGOX	DNGKPMSPIMKALMNTSALGVVPTQDFLCHSPRGVSMIMNLDENQVRYDAARAWLLPNYQRPNLLELTGMVGVKLVFKQTASGPAQVGVNFGTNKAVN
TvGOX	DNGKPMSPIMKALMNTSALGVVPTQDFLCHSPRGVSMIMNLDENQVRYDAARAWLLPNYQRPNLLELTGMVGVKLVFKQTASGPAQVGVNFGTNKAVN
PvGOX	DNGKPMSPIMKALMNTSALGVVPTQDFLCHSPRGVSMIMNLDENQVRYDAARAWLLPNYQRPNLLELTGMVGVKLVFKQTASGPAQVGVNFGTNKAVN
PfGOX	DNGKPMSPIMKALMNTSALGVVPTQDFLCHSPRGVSMIMNLDENQVRYDAARAWLLPNYQRPNLLELTGMVGVKLVFKQTASGPAQVGVNFGTNKAVN
PaGOX	DNGKPMSPIMKALMNTSALGVVPTQDFLCHSPRGVSMIMNLDENQVRYDAARAWLLPNYQRPNLLELTGMVGVKLVFKQTASGPAQVGVNFGTNKAVN
TfGOX	DNGKPMSPIMKALMNTSALGVVPTQDFLCHSPRGVSMIMNLDENQVRYDAARAWLLPNYQRPNLLELTGMVGVKLVFKQTASGPAQVGVNFGTNKAVN
TsGOX	DNGKPMSPIMKALMNTSALGVVPTQDFLCHSPRGVSMIMNLDENQVRYDAARAWLLPNYQRPNLLELTGMVGVKLVFKQTASGPAQVGVNFGTNKAVN
PcGOX	DNGKPMSPIMKALMNTSALGVVPTQDFLCHSPRGVSMIMNLDENQVRYDAARAWLLPNYQRPNLLELTGMVGVKLVFKQTASGPAQVGVNFGTNKAVN
AtGOX	DNGKPMSPIMKALMNTSALGVVPTQDFLCHSPRGVSMIMNLDENQVRYDAARAWLLPNYQRPNLLELTGMVGVKLVFKQTASGPAQVGVNFGTNKAVN
PeGOX	DTGHSFSPMLKALMNTSALGVVPTQDFLCHSPRGVSMIMNLDENQVRYDAARAWLLPNYQRPNLLELTGMVGVKLVFKQTASGPAQVGVNFGTNKAVN
AkGOX	HNYYAKHEVLLAAGS-AVSPITILEYSGIGMKSILEPLGIDTVVDLIPVGLNMDDQTTTSTRSRTSAGAGGGQAAMFATFNETFGDYAEKHEHLLNTKLD
AngOX	HNYYAKHEVLLAAGS-AVSPITILEYSGIGMKSILEPLGIDTVVDLIPVGLNMDDQTTTSTRSRTSAGAGGGQAAMFATFNETFGDYAEKHEHLLNTKLD
AoGOX	HNYYAKHEVLLAAGS-AISPLILEYSGIGLKDVLVSAAGVEVVDLIPVGLNMDDQTTTSTRSRTSAGAGGGQAAMFATFNETFGDYAEKHEHLLNTKLD
AfGOX	HNYYAKHEVLLAAGS-AISPLILEYSGIGLKDVLVSAAGVEVVDLIPVGLNMDDQTTTSTRSRTSAGAGGGQAAMFATFNETFGDYAEKHEHLLNTKLD
TvGOX	FDVYAKHEVLLAAGS-AISPLILEYSGIGLKSVLDAANVTQLVLDLIPVGLNMDDQTTTSTRSRTSAGAGGGQAAMFATFNETFGDYAEKHEHLLNTKLD
PvGOX	FDVYAKHEVLLAAGS-AISPLILEYSGIGLKSVLDAANVTQLVLDLIPVGLNMDDQTTTSTRSRTSAGAGGGQAAMFATFNETFGDYAEKHEHLLNTKLD
PfGOX	FDVYAKHEVLLAAGS-AISPLILEYSGIGLKSVLDAANVTQLVLDLIPVGLNMDDQTTTSTRSRTSAGAGGGQAAMFATFNETFGDYAEKHEHLLNTKLD
PaGOX	FDVYAKHEVLLAAGS-AISPLILEYSGIGLKSVLDAANVTQLVLDLIPVGLNMDDQTTTSTRSRTSAGAGGGQAAMFATFNETFGDYAEKHEHLLNTKLD
TfGOX	FDVYAKHEVLLAAGS-AISPLILEYSGIGLKSVLDAANVTQLVLDLIPVGLNMDDQTTTSTRSRTSAGAGGGQAAMFATFNETFGDYAEKHEHLLNTKLD
TsGOX	FDVYAKHEVLLAAGS-AISPLILEYSGIGLKSVLDAANVTQLVLDLIPVGLNMDDQTTTSTRSRTSAGAGGGQAAMFATFNETFGDYAEKHEHLLNTKLD
PcGOX	FDVYAKHEVLLAAGS-AISPLILEYSGIGLKSVLDAANVTQLVLDLIPVGLNMDDQTTTSTRSRTSAGAGGGQAAMFATFNETFGDYAEKHEHLLNTKLD
AtGOX	FDVYAKHEVLLAAGS-AISPLILEYSGIGLKSVLDAANVTQLVLDLIPVGLNMDDQTTTSTRSRTSAGAGGGQAAMFATFNETFGDYAEKHEHLLNTKLD
PeGOX	FDVYAKHEVLLAAGS-AISPLILEYSGIGLKSVLDAANVTQLVLDLIPVGLNMDDQTTTSTRSRTSAGAGGGQAAMFATFNETFGDYAEKHEHLLNTKLD
AkGOX	WAEETVARGGFHNVTALIQYENYRDWLVKDNVAYSLEFLDLAGVNSFDVMDLLPFTRGVHILDKDPYLRHFAYPDQVFLNEFDLLGQAATQLARNTS
AngOX	WAEETVARGGFHNVTALIQYENYRDWLVKDNVAYSLEFLDLAGVNSFDVMDLLPFTRGVHILDKDPYLRHFAYPDQVFLNEFDLLGQAATQLARNTS
AoGOX	WAEETVARGGFHNVTALIQYENYRDWLVKDNVAYSLEFLDLAGVNSFDVMDLLPFTRGVHILDKDPYLRHFAYPDQVFLNEFDLLGQAATQLARNTS
AfGOX	WAEETVARGGFHNVTALIQYENYRDWLVKDNVAYSLEFLDLAGVNSFDVMDLLPFTRGVHILDKDPYLRHFAYPDQVFLNEFDLLGQAATQLARNTS
TvGOX	WAEETVARGGFHNVTALIQYENYRDWLVKDNVAYSLEFLDLAGVNSFDVMDLLPFTRGVHILDKDPYLRHFAYPDQVFLNEFDLLGQAATQLARNTS
PvGOX	WAEETVARGGFHNVTALIQYENYRDWLVKDNVAYSLEFLDLAGVNSFDVMDLLPFTRGVHILDKDPYLRHFAYPDQVFLNEFDLLGQAATQLARNTS
PfGOX	WAEETVARGGFHNVTALIQYENYRDWLVKDNVAYSLEFLDLAGVNSFDVMDLLPFTRGVHILDKDPYLRHFAYPDQVFLNEFDLLGQAATQLARNTS
PaGOX	WAEETVARGGFHNVTALIQYENYRDWLVKDNVAYSLEFLDLAGVNSFDVMDLLPFTRGVHILDKDPYLRHFAYPDQVFLNEFDLLGQAATQLARNTS
TfGOX	WAEETVARGGFHNVTALIQYENYRDWLVKDNVAYSLEFLDLAGVNSFDVMDLLPFTRGVHILDKDPYLRHFAYPDQVFLNEFDLLGQAATQLARNTS
TsGOX	WAEETVARGGFHNVTALIQYENYRDWLVKDNVAYSLEFLDLAGVNSFDVMDLLPFTRGVHILDKDPYLRHFAYPDQVFLNEFDLLGQAATQLARNTS
PcGOX	WAEETVARGGFHNVTALIQYENYRDWLVKDNVAYSLEFLDLAGVNSFDVMDLLPFTRGVHILDKDPYLRHFAYPDQVFLNEFDLLGQAATQLARNTS
AtGOX	WAEETVARGGFHNVTALIQYENYRDWLVKDNVAYSLEFLDLAGVNSFDVMDLLPFTRGVHILDKDPYLRHFAYPDQVFLNEFDLLGQAATQLARNTS
PeGOX	WAKDVMVARGGFHNVTALIQYENYRDWLVKDNVAYSLEFLDLAGVNSFDVMDLLPFTRGVHILDKDPYLRHFAYPDQVFLNEFDLLGQAATQLARNTS
AkGOX	NSGAMQTYFAGETIPGDNLAYDADLSANVEYIFNYFRPNYHGVGII-NMMPKEMGGVVDNAAARYVGVGGLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFYGMALKVADAI
AngOX	NSGAMQTYFAGETIPGDNLAYDADLSANVEYIFNYFRPNYHGVGII-NMMPKEMGGVVDNAAARYVGVGGLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFYGMALKVADAI
AoGOX	NTGEMKKYFAGETIPGDNLAYDADLSANVEYIFNYFRPNYHGVGII-NMMSREMGVVDNAAARYVGVGGLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFYGMALKVADAI
AfGOX	NTGEMKKYFAGETIPGDNLAYDADLSANVEYIFNYFRPNYHGVGII-NMMSREMGVVDNAAARYVGVGGLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFYGMALKVADAI
TvGOX	KGAMAQYFAGETIPGDNLAYDADLSANVEYIFNYFRPNYHGVGII-NMMAKELGGVVDATAKYVGTGGLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFYGMALKVADAI
PvGOX	KGAMAQYFAGETIPGDNLAYDADLSANVEYIFNYFRPNYHGVGII-NMMAKELGGVVDATAKYVGTGGLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFYGMALKVADAI
PfGOX	KGAMAQYFAGETIPGDNLAYDADLSANVEYIFNYFRPNYHGVGII-NMMSRELGGVVDATAKYVGTGGLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFYGMALKVADAI
PaGOX	KGAMAQYFAGETIPGDNLAYDADLSANVEYIFNYFRPNYHGVGII-NMMSRELGGVVDATAKYVGTGGLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFYGMALKVADAI
TfGOX	KGAMAQYFAGETIPGDNLAYDADLSANVEYIFNYFRPNYHGVGII-NMMSRELGGVVDATAKYVGTGGLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFYGMALKVADAI
TsGOX	KGAMAQYFAGETIPGDNLAYDADLSANVEYIFNYFRPNYHGVGII-NMMSRELGGVVDATAKYVGTGGLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFYGMALKVADAI
PcGOX	KGAMAQYFAGETIPGDNLAYDADLSANVEYIFNYFRPNYHGVGII-NMMSRELGGVVDATAKYVGTGGLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFYGMALKVADAI
AtGOX	NSGAMQTYFAGETIPGDNLAYDADLSANVEYIFNYFRPNYHGVGII-NMMSRELGGVVDATAKYVGTGGLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFYGMALKVADAI
PeGOX	---IQRYRRLGR-CETETPCQLP-CWHEFYDMERTWGRGR-----ECLWCESLRVIDGSIPPTQVSSHVMTIFYGMALKVADAI

شکل ۵- هم‌دیف‌سازی چندگانه ژن PfgOX با توالیهای پروتئینی گلوکز اکسیداز از فارچهای دیگر با استفاده از نرم‌افزار ClustalX. توالی پیتید راهنما، آمینواسیدهای Cys، آمینواسیدهای Asn درگیر در فرآیند N-گلیکوزیلاسیون و آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال به ترتیب با کادرهای آبی، زرد، ارغوانی رنگ و علامت مثلث نشان داده شده‌اند. شماره دستیابی توالیهای پروتئینی مورد استفاده در تهیه هم‌دیف‌سازی چندگانه در جدول ۱ آمده است.



شکل ۶- بررسی فیلوژنتیکی ژن PfGOX با توالیهای پروتئینی گلوکز اکسیداز از قارچهای دیگر. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA4.1 Beta 2 به روش Neighbor Joining رسم گردید. شماره دستیابی توالیهای پروتئینی مورد استفاده در ساخت درخت فیلوژنتیکی در جدول ۱ آمده است.

Metarhizium، *Glomerella*، *Colletotrichum* و

Piriformospora می‌باشد.

در این تحقیق یک ژن گلوکز اکسیداز، تحت عنوان PfGOX، از قارچ پنی سیلیوم بومی ایران (*P. funiculosum* PTCC 5301) با استفاده از واکنش PCR جداسازی و همسانه‌سازی گردیده و ویژگیهای بیوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از بررسیهای مدلینگ ساختاری نشان داده شد که PfGOX از نظر ساختارهای دوم و سوم مشابه با سایر توالیهای گلوکز اکسیداز از قارچهای دیگر بوده و بررسیهای همولوژی و فیلوژنتیکی نشان داد که این ژن شباهت بالایی با توالیهای پروتئینی گلوکز اکسیداز سایر قارچها داشته و به زیرگروه IA گلوکز اکسیدازهای قارچی تعلق دارد.

بررسی فیلوژنتیکی توالی پروتئینی PfGOX با توالیهای پلی‌پپتیدی گلوکز اکسیداز از قارچهای دیگر با استفاده از نرم‌افزار Mega4 به روش Neighbor Joining نشان داد که درخت فیلوژنتیکی به دست آمده به دو گروه اصلی I و II تقسیم می‌شود (شکل ۶). گروه I عمدتاً شامل قارچهای *Talaromyces* و *Aspergillus*، *Penicillium* دهنده خویشاوندی نزدیک از نظر ژنتیکی و تکامل از یک جد مشترک می‌باشد. گروه I به دو زیرگروه IA و IB تقسیم‌بندی می‌شود، به طوری که ژن PfGOX به همراه ژنهای PaGOX (*P. amagasakiense*) (۱۶) و PvGOX (*P. variabile*) (۲۵) در زیرگروه IA قرار داشته در حالی که ژن AnGOX (*A. niger*) (۱۰) متعلق به زیرگروه IB می‌باشد. گروه II نیز خود شامل دو زیرگروه IIA و IIB است که شامل قارچهای *Botryotinia*، *Auricularia*

منابع

۱. اصفهانی، ک.، مطلبی، م. و زمانی، م.ر. ۱۳۹۰. طراحی و ساخت سازه‌های بیانی گیاهی جهت انتقال ژن‌های *chit42* و *bgn13.1* قارچ تریکودرما به صورت منفرد و توأم. مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۴: ۸۸۰-۸۹۴.
۲. روحی، ل.، زمانی، م.ر. و مطلبی، م. ۱۳۹۲. انتقال ژن بتا گلوکاناز (*bgn1*) از *Trichoderma virens* به گیاه کلزا جهت ایجاد مقاومت علیه قارچ *Sclerotinia sclerotiorum*. مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۶: ۲۸-۴۰.
3. Baker, C.J. and Orlandi, E.W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:299-321.
4. Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S. and Ananthanarayan, L. 2009. Glucose oxidase, an overview. *Biotechnol. Adv.* 27:489-501
5. Briesemeister, S., Rahnenführer, J. and Kohlbacher, O. 2010. Going from where to why. interpretable prediction of protein subcellular localization. *Bioinformatics* 26:1232-8.
6. Bero, O.F., Crespo, A., Fatehi, J. and Bridge, P.D. 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized and other fungi. *Pl. Syst. Evol.* 216:243-249.
7. Eryomin, A.N., Droshtenyuk, A.P., Zhavnerko, G.K., Semashko, T.V. and Mikhailova, R.V. 2004. Quartz sand as an adsorbent for purification of extracellular glucose oxidase from *Penicillium funiculosum* 46.1. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40:178-185.
8. Felsenstein, J. 1985. Confidence limit on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol.* 39:783-91.
9. Fravel, D.R. and Roberts, D.P. 1991. In situ evidence for the role of glucose oxidase in the biocontrol of *Verticillium* wilt by *Talaromyces flavus*. *Biocontrol Sci. Technol.* 1:91-99.
10. Frederick, K.R., Tung, J., Emerick, R.S., Masiarz, F.R., Chamberlain, S.H., Vasavada, A. and Rosenberg, S. 1990. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*, cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *J. Biol. Chem.* 265: 3793-3802.
11. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. In: J. M. Walker (Ed), *The proteomics protocols handbook*. (pp. 571-607.) Humana Press.
12. Hatzinikolaou, D.G., Hansen, O.C., Macris, B.J., Tingey, A., Kekos, D., Goodenough, P. and et al. 1996. A new glucose oxidase from *Aspergillus niger* characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:371-81.
13. Hecht, H.J., Kalisz, H.M., Hendle, J., Schmid, R.D. and Schomburg, D. 1993. Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 229:153-72.
14. Kalisz, H.M., Hecht, H.J., Schomburg, D. and Schmid, R.D. 1991. Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1080:138-142.
15. Kazan, K., Murray F.R., Goulter, K.C., Llewellyn, D.J. and Manners, J.M. 1998. Induction of cell death in transgenic plants expressing a fungal glucose oxidase. *Phytopathol. Society.* 6:555-562.
16. Kiess, M., Hecht, H.J. and Kalisz, H.M. 1998. Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase. *Europ. J. Biochem.* 252:90-99.
17. Kriebbaum, M., Heilman, H.J., Wientjes, F.J., Hahn, M., Jany, K.D., Gassen, H.G., Sharif, F. and Alaedinoglu, G. 1989. Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL-3. *Dep. Biological Sci.* 1:63-66.
18. Kusai, K., Sekuzu, I., Hagihara, B., Okunuki, K., Yamauchi, S. and Nakai, M. 1960. Crystallization of glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *Biochim. Biophys. Acta.* 40:555-557.
19. Kyte, J. and Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-32.
20. Lee, Y.H., Yoon, I.S., Suh, S.C. and Kim, H.I. 2002. Enhanced disease resistance in transgenic cabbage and tobacco expressing a glucose oxidase gene from *Aspergillus niger*. *Plant Cell Rep.* 20:857-863.
21. Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell.* 79:583-593.
22. Muller, D. 1928. Oxidation von glukose mit extrakten aus *Aspergillus niger*. *Biochem. Z.* 199:136-170.
23. Murray, F.R., Llewellyn, D.J., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. 1997. Isolation of the glucose

- oxidase gene from *Talaromyces flavus* and characterisation of its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Curr. Genet.* 32:367–375.
24. Petruccioli, M., Piccioni, P. and Federici, F. 1997. Glucose oxidase overproduction by the mutant strain M-80.10 of *Penicillium variable* in a benchtop fermenter. *Enz. Microb. Technol.* 21:458–462.
 25. Pulci, V., D'ovidio, R., Petruccioli, M. and Federici, F. 2004. The glucose oxidase of *Penicillium variable* P16: gene cloning, sequencing and expression. *Appl. Microbiol.* 38:233–238.
 26. Rychlik, W. 2007. OLIGO 7 primer analysis software. *Meth. Mol. Biol.* 402:35-59.
 27. Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed. Vol:1-3.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
 28. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596–1599.
 29. Wholfahrt, G., Witt, S., Handle, J., Schomburg, D., Kalisz, H.M. and Hecht, H.J. 1999. 1.8 and 1.9 a resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidase as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystal. Sect. Dep.* 55:969–977.
 30. Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H. and Kalisz, H. 2000. Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D-glucose. *J. Biochem.* 347:553–9.
 31. Wong, C.M., Wong, K.H. and Chen, X.D. 2008. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:927–938.
 32. Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Levine, E.B., Fitzsimmons, K.C. and Shah, D.M. 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell.* 7:1357–1368.
 33. Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics.* 9:40–26.

Cloning, Identification and Isolation a Glucose Oxidase Gene from *Penicillium funiculosum*

Esmailpour Z., Garoosi Gh.A., Haddad R. and Heidari Japelaghi R.

Agricultural Biotechnology Dept., Imam Khomeini International University, Qazvin, I.R. of Iran

Abstract

Glucose oxidase (β -D-glucose:oxygen 1-oxidoreductase) catalyzes the oxidation of β -D-glucose to gluconic acid, by utilizing molecular oxygen as an electron acceptor with simultaneous production of hydrogen peroxide. Glucose oxidase has been purified from a range of different fungal sources, mainly from the genus *Aspergillus* and *Penicillium* and has wide applications in chemical, pharmaceutical, food, biotechnology and other industries. In this study, a glucose oxidase (GOX)-encoding gene was isolated from *Penicillium funiculosum* by polymerase chain reaction (PCR) technique and then was cloned into a pUC19 plasmid. Then, molecular structure, biochemical and phylogenetic characteristics were analyzed. Nucleotide sequence of the gene, called PfGOX, revealed a 1818 bp long, encoding a protein of 605 amino acid residues. The calculated molecular mass and the predicted isoelectric point of the deduced polypeptide were 65.79 kDa and 4.50, respectively. Analysis of secondary and three dimensional structures of the deduced polypeptide sequence for PfGOX was shown that PfGOX is similar to those of previously reported glucose oxidase proteins from other fungi. The deduced protein sequence was indicated a high similarity to glucose oxidases isolated from fungi such as *Penicillium amagasakiense*, *Talaromyces flavus*, *Talaromyces stipitatus*, and *Talaromyces variabilis*. Phylogenetic study was also demonstrated that PfGOX gene belongs to the subgroup IA of fungous glucose oxidases.

Key words: Cloning, Glucose oxidase, Fungus, *Penicillium funiculosum*, Three dimensional structure