بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم زیستی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی

عنوان:

بررسی تاثیر ایجاد پل دی سولفیدی و تبدیل ایزولوسین۲۳۲ به آرژنین در پایداری حرارتی و فعالیت آنزیم لوسیفراز

نگارنده:

سمیه کریم زاده

استاد راهنما

دکتر سامان حسینخانی

بهمن ۱۳۹۰

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم زیستی

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد

اعضای هیئت داوران نسخهٔ نهایی پایان‌نامه **خانم سمیه کریم زاده** رشته بیوشیمی به شماره دانشجویی **۸۸۵۱۶۹۱۰۰۶**

تحت عنوان : " **بررسی تاثیر ایجاد پل دی سولفیدی و تبدیل ایزولوسین ۲۳۲ به آرژنین در پایداری حرارتی و فعالیت آنزیم لوسیفراز** " از نظر فرم و محتوا بررسی نموده و آنرا برای اخذ درجهٔ کارشناسی‌ارشد مورد تائید قرار دادند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکترسامان حسینخانی	دانشیار	
۲- استاد ناظر داخلی	دکتر مریم نیکخواه	استادیار	
۳- استاد ناظر داخلی	دکتر رضا حسن ساجدی	استادیار	
٤- استاد ناظر خارجی	دکتر محبوبه نظری	استادیار	
٥- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر رضا حسن ساجدی	استادیار	

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته ..... است که در سال ..... در دانشکده ..... دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر ..... ، مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر ..... و مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر ..... از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب سمیه کریم زاده دانشجوی رشته بوشیمی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: سمیه کریم زاده

تاریخ و امضا: ۹۰/۱۱/۲۹

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب ..... دانشجوی رشته ..... ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۸ ..... مقطع ..... دانشکده ..... متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا: .....

تاریخ: ۹۰/۱۱/۲۵

سپاس خدایی راکه زیبایی های آفرینش رابر ما برگزید، پاکترین روزی ها رابر ما نازل فرمود. برتری مان بخشید به مالکیت بر همه موجودات، چنان که جمیع خلق به قدرت او گردن به امر ما نهند و به نیروی او سر بر فرمان ما سایند.

درود و سپاس بر پدر و مادرم، آنان که عاشقانه سوختند تا گرما بخش وجودم و روشنگر راهم باشند ناتوان شدند تا به توانایی بر سم و موهایشان سپید شد تا رو سفید شوم و سپاس تمام معلمان و آموزگارانی که در طول دوران تحصیل دانسته هایشان را به من آموختند.

این پژوهش مرهون راهنمایی استاد محترم جناب آقای دکتر سامان حسینخانی می باشد. از ایشان به خاطر زحمات بی شائبه شان کمال تشکر را دارم.

از سرکار خانم دکتر نیکخواه و سرکار خانم دکتر نظری و جناب آقای دکتر رضا حسن ساجدی که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند و پیشنهادهای ارزنده ای در انجام پژوهش و تنظیم آن به اینجانب ارائه دادند بسیار سپاسگزارم.

ازاساتید ارجمند جناب آقای دکتر خواجه و دکتر میرشاهی کمال تشکر را دارم.

از دوستان عزیزم سرکار خانم ها عطایی، مرادی، اولادزاد، رشنو، صادقی، نصراللهی، اسماعیل بیگی، ناظم، سعادتی، خالدیان و آقایان ترکزاده، دکتر مرتضوی و تمامی دوستانم در گروه بیوشیمی که همواره لطف و محبت خود را به من ارزانی داشته اند کمال تشکر را دارم.

با سپاس فراوان از خانواده عزیزم که با حمایت های بی دریغشان سختی مراحل کار را بر من آسان نمودند.

چکیده

تکنولوژی بیولومینسانس که در کارهای تحقیقاتی و صنعتی استفاده می شود به آنزیم لوسیفراز تکیه دارد که در حضور ATP وMg^{2+} با اکسیداسیون سوبسترای خاص خود که به عنوان لوسیفرین شناخته می شود و تشکیل اکسی لوسیفرین باعث نشر همزمان فوتون می شود. تاکنون کارهای فراوانی برای بهبود ویژگی های ساختاری و عملکردی این آنزیم صورت گرفته است. هدف ما در این مطالعه بررسی تاثیر همزمان دو جهش پایدار کننده آنزیم لوسیفراز بود. پیوند دی سولفیدی و تغییر اسید آمینه آبگریز در معرض حلال به اسیدآمینه با بار مثبت. برای این منظور ما از جهش A296C/A326Cکه باعث ایجاد پیوند دی سولفیدی و در نتیجه افزایش فعالیت ویژه و پایداری حرارتی می شود استفاده کردیم. از سوی دیگر گزارش شده که جایگزینی ایزولوسین ۲۳۲ به عنوان اسید آمینه در معرض حلال یکی از عوامل پایدار کننده آنزیم لوسیفراز می باشد و از آنجایی که یکی از ویژگی های آنزیم های مقاوم به حرارت دارا بودن آرژنین فراوان بخصوص در نواحی در معرض حلال می باشد، جهش I232R انتخاب شد. بنابراین جهش های I232R و I232R/A296C/A326C در لوسیفرازگونه فوتینوس پیرالیس با روش جهش زایی هدفدار ایجاد شد و در کنار آنزیم لوسیفراز طبیعی و دارای جهش A296C/A326C مورد مطالعات ساختاری و سنتیکی قرار گرفتند. نتایج حاکی از این است که جهش I232R وI232R/A296C/A326C باعث افزایش پایداری حرارتی و پروتئازی و کاهش تمایل آنزیم به لوسیفرین وATP شده است ولی نسبت به جهش یافته A296C/A326C پایداری حرارتی کمتر می باشد که نشان دهنده افزایشی نبودن تغییرات ایجاد شده در اثر جهش ها می باشد.

کلمات کلیدی: *Photinus pyralis* ،بیولومینسانس، پیوند دی سولفیدی، جهش زایی هدفدار، لوسیفراز.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲-تاریخچه ۳

۱-۳- ساختار و عملکرد FLuc ۴

۱-۴- ساختار کلی لوسیفراز *Photinus pyralis* ۶

۱-۵- جایگاه فعال آنزیم ۸

۱-۶- تفاوت رنگهای ایجاد شده در واکنشهای بیولومینسانس ۱۱

۱-۷-کاربردها ۱۳

۱-۷-۱- استفاده از لوسیفراز درجداسازی با ظرفیت بالا (HTS) ۱۵

۱-۸-روشهای بکار رفته به منظور اصلاح ویژگی آنزیم‌ها ۱۷

۱-۹- نیروهایی که در پایداری پروتئینها نقش دارند ۱۹

۱-۱۰- پل دی سولفیدی ۲۰

۱-۱۰-۱- نحوه پایداری پروتئین توسط پیوند دی سولفیدی ۲۰

۱-۱۰-۲- استراتژیهای بیان موفق پروتئین های نوترکیب دارای باند دی سولفید در *E. coli* ۲۲

۱-۱۰-۳- بیان پری پلاسمی ۲۳

۱-۱۰-۴- مکانیسم اکسیداسیون پروتئین در پری پلاسم ۲۳

۱-۱۰-۵- بیان سیتوپلاسمی ۲۵
۱-۱۰-۶- تعداد و نقش سیستئینهای موجود در آنزیم لوسیفراز ۲۷
۱-۱۱- نقش آرژنین در پایداری پروتئین ها ۳۰
۱-۱۲- هدف از انجام این پروژه ۳۰
۲-۱- مواد ۳۵
۲-۲- میکروارگانیسم ها و پلاسمیدها ۳۵
۲-۳- PCR ۳۵
۲-۳-۱- Quick-change ۳۵
۲-۳-۳- طراحی پرایمرهای کلونینگ ۳۷
۲-۴- الکتروفورز ژل آگارز ۳۹
۲-۵- هضم مخلوط واکنش PCR با *Dpn*I ۴۱
۲-۶- انتقال محصول هضم آنزیمی به میزبان *E. coli* Top10 ..... ۴۱
۲-۶-۱- تهیه باکتری مستعد ۴۱
۲-۶-۲- انتقال محصول پلاسمیدهای دارای جهش به درون باکتری مستعد *E. coli* Top10 ..... ۴۲
۲-۷- تهیه پلاسمید در مقیاس کم (Miniprep) ۴۳
۲-۸- انتقال پلاسمیدهای دارای جهش به درون باکتری مستعد *E.coli* Origami2(DE3) ۴۴
۲-۱۱- بیان پروتئین ۴۷
۲-۱۱-۱- فرآیند بیان ۴۸
۲-۱۱-۲- بررسی بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از الکتروفورز ۴۹

۲-۱۱-۲-۱- الکتروفورز پروتئین ها ۴۹
۲-۱۱-۳- تخلیص پروتئین ۵۲
۲-۱۱-۳-۲- سنجش غلظت پروتئین‌ها ۵۲
۲-۱۲- تایید تشکیل پیوندهای دی سولفیدی ۵۳
۲-۱۳- بررسی خصوصیات پروتئین‌های جهش یافته در مقایسه با وحشی ۵۵
۲-۱۳-۱- تهیه کوکتل ۵۵
۲-۱۳-۲- اندازه‌گیری و مقایسه طیف نشری بیولومینسانس آنزیم لوسیفراز ۵۶
۲-۱۳-۳- اندازه گیری فعالیت آنزیم علیه زمان ۵۶
۲-۱۴- مطالعه ثابت‌های سینتیکی لوسیفرازهای وحشی و جهش یافته ۵۶
۲-۱۴-۱- بررسی دمای بهینه فعالیت آنزیم ۵۶
۲-۱۴-۲- بررسی pH بهینه فعالیت آنزیم ۵۷
۲-۱۴-۳- اندازه‌گیری غیر فعال شدن و پایداری حرارتی آنزیم ۵۷
۲-۱۴-۴- تعیین و مقایسه مقادیر K_m نسبت به ATP و لوسیفرین ۵۸
۲-۱۵- بررسی مطالعات ساختاری ۵۹
۲-۱۵-۱- دیالیز نمونه‌ها ۵۹
۲-۱۵-۲- مطالعات دورنگ نمایی دورانی ۵۹
۲-۱۵-۳- فلورسانس ذاتی و خارجی (ANS) ۶۰
۲-۱۵-۴- خاموشی فلورسانس به روش دینامیک ۶۰
۲-۱۵-۵- پروتئولیز ۶۱

۲-۱۶- مطالعات بیوانفورماتیکی ۶۲
۳-۱- انتخاب جهش ۶۴
۳-۲- ایجاد جهش بر روی ژن لوسیفراز توسط جهش زایی هدفدار ۶۷
۳-۳- بیان و تخلیص پروتئین‌های نوترکیب و طبیعی ۷۱
۳-۴- تشکیل صحیح پیوندهای دی سولفیدی مهندسی شده ۷۳
۳-۵- تعیین خصوصیات آنزیم های وحشی و جهش یافته ۷۴
۳-۵-۱- تعیین طیف نشری بیولومینسانس پروتئین‌های جهش یافته و طبیعی ۷۴
۳-۵-۲- اندازه گیری فعالیت آنزیم علیه زمان ۷۵
۳-۶- تعیین خصوصیات سینتیکی آنزیمهای جهش یافته در مقایسه با وحشی ۷۶
۳-۶-۱- تعیین فعالیت ویژه نسبی آنزیمهای جهش یافته نسبت به فعالیت نسبی آنزیم طبیعی ۷۶
۳-۶-۲- بررسی غیر فعال شدن و پایداری حرارتی آنزیم لوسیفراز ۷۷
۳-۶-۳- مطالعه مقادیر K_m نسبت به لوسیفرین و ATP ۷۹
۳-۶-۴- pH بهینه (Optimum pH) ۸۱
۳-۶-۵- درجه حرارت بهینه (Optimum temperature) ۸۲
۳-۷- بررسی خصوصیات ساختاری آنزیم لوسیفراز با استفاده از تکنیک‌های طیف سنجی ۸۳
۳-۷-۱- مطالعات ساختاری با استفاده از دورنگ‌نمایی دورانی (CD) ۸۳
۳-۷-۲- بررسی ساختاری با استفاده از فلورسانس ذاتی و خارجی ۸۴
۳-۷-۳- بررسی خاموش شدن فلورسانس بوسیله آکریلامید و یدید پتاسیم ۸۷
۳-۷-۴- پروتئولیز ۸۹

۳-۷-۴-۱- پروتئولیز محدود آنزیم های جهش یافته و وحشی در حضور تریپسین..... ۹۰
۳-۸- مطالعات بیوانفورماتیکی..... ۹۲
۴-۱- تشکیل صحیح پیوندهای دی سولفیدی..... ۹۵
۴-۲- تاثیر جهش ها بر روی طیف نشر بیولومینسانس لوسیفراز..... ۹۵
۴-۴- تاثیرجهش ها بر ثابت های سینتیکی..... ۹۷
۴-۴- ۱- تاثیر جهش بر Km لوسیفرین و ATP لوسیفرازهای وحشی وجهش یافته..... ۹۷
۴-۴-۲- تاثیر جهش‌ها در پایداری حرارت آنزیم طبیعی و جهش یافته‌ها..... ۹۸
۴-۵- ویژگیهای ساختاری لوسیفرازهای طبیعی و جهش یافته..... ۱۰۰
۴-۵-۱- بررسی ساختاری با استفاده از فلورسانس..... ۱۰۰
۴-۵-۲- بررسی ساختاری با استفاده از دو رنگ نمایی دورانی..... ۱۰۱
۴-۶- پروتئولیز..... ۱۰۲
۴-۶-۱- عوامل ساختاری تعیین کننده در پروتئولیز محدود..... ۱۰۲
۴-۷- نتیجه گیری..... ۱۰۳
۴-۴- پیشنهادات..... ۱۰۵
فهرست منابع و مآخذ..... ۱۰۶

فهرست جدولها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- لوسیفرازهای استفاده شده در کاربردهای زیست شیمی.....۱۵

جدول۱-۲- مقایسه تعداد سیستئین‌های موجود در ۷ گونه لوسیفراز ۲۷

جدول ۳-۱- خلاصه برخی از ویژگی‌های سینتیکی آنزیم لوسیفراز نوع طبیعی و آنزیم های جهش یافته.....۷۷

جدول ۳-۲- درصد پروتئین های برش نخورده با تریپسین در دمای $۲۳^{o}C$ محاسبه شده با نرم افزارUV-SCAN-IT ۹۱

جدول ۴-۱- مقایسه نتایج کارهای ساختاری و سنتیکی برای آنزیم های جهش یافته ۱۰۵

فهرست شکلها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- مکانیسم واکنش بیولومینسانس و تاریکی توسط firefly لوسیفراز ۶

شکل ۱-۲- (A) ساختارfirefly لوسیفراز تعیین شده توسط Conti در سال ۱۹۹۶ **(B)** ساختار لوسیفراز با اتصال به DLSA (آنالوگ سنتزی).....۸

شکل ۱-۳- جایگاه فعال احتمالی آنزیم لوسیفراز.....۹

شکل ۱-۴- ساختار LcrLuc:DLSA که حاوی سه موتیف حفاظت شده مطرح شده توسط conti برای جایگاه فعال آنزیم می باشد ۱۰

شکل ۱-۵-آنالیز پایگاه PubChem در مورد سیستم های مورد استفاده در سنجش های زیستی.....۱۴

شکل ۱-۶- سنجش CYP به روش استفاده از پرو لوسیفرین ۱۷

شکل ۱-۷- طرح شماتیک مسیر تاخوردگی و جایگزینی پروتئین داخل سلول وابسته به محیط اکسیداتیو برای رسیدن به ساختارنهایی ۲۲

شکل ۱-۸- اکسیداسیون و ایزومریزاسیون وابسته به پروتئین Dsb در فضای پری پلاسم باکتریایی ۲۵

شکل۲-۱- روش Quick change با پرایمرهای همپوشان ۳۶

شکل ۲-۲- نقشه پلاسمیدpET-16b ۴۶

شکل۲-۳- بیان ژن هدف در سیستم pET.....۴۸

شکل۲-۴- واکنش DTNB با تیول آزاد R-SH و تولید TNB^{2-} و ترکیب دی‌سولفید مختلط ۵۴

شکل ۳-۱- نقشه ساختار دوم آنزیم لوسیفراز و محل اسید آمینه های انتخاب شده برای ایجاد جهش.....۶۵

شکل۳-۲-الف) ساختار سه‌بعدی آنزیم لوسیفراز که مکان اسید آمینه های آرژنین و پیوند دی سولفیدی را نشان می دهد. **ب)**مقایسه پیوندهای ایجاد شده توسط ایزولوسین وآرژنین۲۳۲..... ۶۶

شکل۳-۳- محصول حاصل از PCR روی ژل الکتروفورز..... ۶۷

شکل۳-۴- بخشی از کروماتوگرام حاصله از تعیین ترادف DNA آنزیم‌های جهش یافته ومقایسه تعیین توالی پروتئین های حاوی جهش با پروتئین وحشی..... ۷۰

شکل ۳-۵- بررسی درجه خلوص لوسیفراز آنزیم طبیعی و آنزیم‌های جهش یافته بعد از خالص‌سازی با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA سفاروز با استفاده از SDS-PAGE..... ۷۲

شکل ۳-۶- واکنش لوسیفرازهای جهش یافته و طبیعی با DTNB..... ۷۴

شکل ۳-۷- طیف نشری آنزیم‌های لوسیفراز طبیعی و جهش یافته ۷۵

شکل ۳-۸- مقایسه کاهش سرعت فعالیت آنزیم علیه زمان در مورد لوسیفرازهای طبیعی(۱) و جهش یافته ها..... ۷۶

شکل ۳-۹- مقایسه نمودار (الف) غیرفعال شدن حرارتی و (ب) پایداری حرارتی لوسیفرازهای طبیعی و جهش یافته از گونه *P. pyralis*..... ۷۸

شکل ۳-۱۰- محاسبه K_m برای لوسیفرازهای طبیعی وجهش یافته..... ۸۱

شکل ۳ -۱۱- نمودار pH بهینه آنزیم طبیعی..... ۸۲

شکل ۳-۱۲- نمودار درجه حرارت بهینه آنزیم طبیعی..... ۸۳

شکل ۳-۱۳- Far-UV CD برای بررسی ساختار دوم پروتئین‌های جهش یافته وطبیعی..... ۸۴

شکل ۳-۱۴- طیف فلورسانس الف) ذاتی و ب) ANS در حضور لوسیفرازهای طبیعی و جهش یافته..... ۸۶

شکل۳-۱۵- نمودارStern-Volmer لوسیفراز وحشی وجهش یافته در حضور خاموش کننده های الف)آکریل آمید و ب)یدید پتاسیم..... ۸۸

شکل ۳-۱۶- پروتئولیز محدود آنزیم های وحشی وجهش یافته..... ۹۰

شکل۳-۱۷- محاسبه سطح در دسترس حلال اسید آمینه های آرژنین و ایزولوسین ۲۳۲ توسط سرور ASA-View.....۹۲

شکل ۴-۱- ساختار سه بعدی لوسیفراز *Photinus pyralis* که موقعیت آرژنین ۲۳۲ و پیوند دی سولفیدی ایجاد شده را نسبت به جایگاه فعال آنزیم نشان می دهد.....۹۸

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

پدیده های زیستی نادری درطبیعت وجود دارد که جذابیتی مثل بیولومینسانس[1] یعنی تولید نور توسط موجودات زنده داشته باشد، پدیده ای که از زمان های اولیه بشر را به خود جلب کرده است (۱-۳). بیولومینسانس به فرایند تبدیل انرژی شیمیایی به نور در سیستم های زیستی گفته می‌شود (۴). در جاندارن بیولومینسانت، نشر نور جهت به دام اندازی طعمه، ارتباط جنسی و دفاع (استتار) می‌باشد، اگر چه مواردی وجود دارد که نقش بیولومینسانس نامشخص است. بسیاری از موجودات آبزی، حشرات، باکتریها، یک گونه از حلزونها[2]، ژله‌ماهی[3]، بنفشه دریایی،[4] مرجانهای دریایی و برخی از خرچنگها توانایی تولید نور را دارند.

با اینکه اکثریت ارگانیسم های بیولومینسنت در دریا زندگی می کنند تعداد بسیار زیادی از آنها نیز خشکی زی هستند مثل راسته قاب بالان (Coleoptera) در سه زیر خانواده (the firefly) Lampyridae، Phengodida (rairoad worms) و Elaterida (click beetles) به طوریکه لوسیفرازهای مربوط به Firefly نور سبز -زرد (۵۸۰-۵۴۰)، Click beetles نور سبز -نارنجی و Rail road worms نور سبز -قرمز (۶۳۸-۵۳۶) را ساطع می کنند (۵, ۶).

[1] Bioluminesence
[2] Mollusks
[3] Aequorea
[4] Renilla

آنزیم های درگیر در فرایند بیولومینسانس را با نام کلی لوسیفراز نامگذاری کرده اند علیـرغم اینکـه در تمامی موجودات لومینسانت آنزیم لوسیفراز وجود دارد لیکن سوبسـتراهای مـورد اسـتفاده و چگـونگی کاتالیز واکنش به وسیله این آنزیم در موجودات مختلف کاملا متفاوت است. بـه دلیـل کـاربرد فـراوان لوسیفراز حشره شبتاب[1] بیشتر مطالعات بر روی این آنزیم صورت گرفته است.

۱-۲-تاریخچه

مطالعه نوین روی پدیده BL با آزمایش پرفسـور رافائـل دو بـوآ در سـال ۱۸۸۵ روی حشـره شـبتاب Pyrophorus (Coleoptera: Elateridae) موسوم به سوسـک پشـتک زن آغـاز شـد (۱, ۷). در سـال ۱۸۷۵ P.Fluger اندام نورافشان حشرات لامپریدا را مورد بررسی قرار داد و نیروی حرارتی را برای این پدیده نشان داد(۸). در سال ۱۹۱۲ W.W.Coblentz، گستره ی طـول مـوج نشـر حشـرات را از nm ۵۳۸ تا nm ۵۸۰ در گونه‌هـای مختلـف بـه دسـت آورد (۹). وی همچنـین بـازده نشـر نـور را بـرای گونـه‌هـای لامپـریس بـین ۹۰-۷۹ درصـد گـزارش کـرد (۱۰). در سـال ۱۹۲۹ K.Hayasi و M.Okuyama عنوان کردند که جریان الکتریکی و مواد شیمیایی با اثر بر عضلات و نه اعصاب، شدت نور را افزایش می دهند. آن ها نشان دادند که در فشار اکسیژن کمتر از ۱/۴ اتمسفر نورافشانی متوقـف می شود (۱۱).

در سال ۱۹۳۵ G.A.Emerson اثر اتر را روی حشره ی شبتاب بررسی کرد و نشان داد که در غلظـت-های کم به دلیل اتساع تراشه ها حشره به صـورت ممتـد نشـر مـی کنـد (۱۲). لوسـیفرین حشـره ی شـبتاب در ۱۹۴۹ توسـط Mc Elroy و B.L.Strchler جداسـازی و خـالص سـازی گردیـد. در سـال ۱۹۶۱ E.H.White و همکارانش ساختمان لوسیفرین را گـزارش کردنـد (۱۳). H.Wynberg در سـال

[1] Firefly luciferase

۱۹۸۰ با مطالعه روی چرخش نوری در BL متوجه شدند که فانوسک های چپ و راست لارو زنده حشره های شبتاب گونه *Photuris versi color* نور پلاریزه را در جهات معکوس نشر می کنند (۱۴).

M.delucaدر سال ۱۹۸۶ ژن لوسیفراز حشره ی شبتاب *Photinus pyralis* را به گیاه توتون منتقل کرد و بدین ترتیب گیاه قادر به ساختن لوسیفراز گردید. اندام این گیاه بعد از پاشیدن محلول لوسیفرین به روی آن نورانی شد (۱۵).

در سال ۱۹۸۹ محققان دانشگاه مسکو به سرپرستی N.N. Ugarova سینتیک و مکانیسم کامل لوسیفراز حشره ی شبتاب را کشف کردند (۱۶). در سال ۱۹۹۶ ساختار سه بعدی کریستال لوسیفراز گونه *P. pyralis* تعیین شد (۱۷) و در آخرین مطالعه انجام گرفته در سال ۲۰۰۶ ساختار کریستالی آنزیم لوسیفراز ژاپنی مقاوم به حرارت در حضورآنالوگ حدواسط لوسیفریل-آدنیلات DLSA (50-O-[dehydroluciferyl)-sulfamoyl]adenosine) به دست آمده است (۱۸).

با مروری بر کارکردهای Mc Elroy تا Deluca مشاهده می شود که از زمان شروع اندازه گیری ها با چشم به عنوان فوتومتر تا زمانی که تکنولوژی اندازه گیری BL پیشرفت کرد، تعداد زیادی حشره ی شبتاب مورد مطالعه قرار گرفته است.

۱-۳- ساختار و عملکرد FLuc[1]

لوسیفراز حشره شب تاب یکی از اعضای ابر خانواده تشکیل دهنده آدنیلات است. اعضای این ابر خانواده شامل آسیل و آریل کواسنتتازها وپپتیدسنتتازهای غیر ریبوزومی می باشند (۱۹). توسط مطالعات همولوژی توالی اولیه آشکار شده است که لوسیفراز بیشتر شبیه به آسیل کوآ لیگاز می باشد (۳۰٪ همولوژی با plant 4-coumarate :CoA ligase)(۲۰).

[1] Firefly Luciferase