دانشگاه الزهرا (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته بیوشیمی

عنوان

بیان ژن *hbs* از *Bacillus subtilis* ATCC 6633 با استفاده از روش های بیوشیمیایی و مهندسی ژنتیک

اساتید راهنما

خانم دکتر پریناز قدم

خانم دکتر سارا غروی

دانشجو

صغری قدسی

تیر ۱۳۸۹

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه الزهرا (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته بیوشیمی

عنوان

بیان ژن *hbs* از *Bacillus subtilis* ATCC 6633 با استفاده از روش های بیوشیمیایی و مهندسی ژنتیک

اساتید راهنما

خانم دکتر پریناز قدم

خانم دکتر سارا غروی

استاد مشاور

خانم دکتر نرگس تفرشی

دانشجو

صغری قدسی

تیر ۱۳۸۹

با نهایت احساس و احترام

تقدیم به پدر و مادر عزیز و بزرگوارم

حضور شما با همه بزرگ منشی، درایت، صبر، توکل و عشق واقعی به خالق متعال در لحظه لحظه زندگی ام تا همیشه جاری است.درخت حیاتتان جاودانه سبز باد.

تقدیم به همسر مهربان و صبورم

تو را با قلب مهربانت، نگاه پرمهرت، نفس هایی که بوی خدا می دهند و زبانی که کلامی پر از امید و عشق از آن می تراود، می ستایم.

تقدیم به برادران عزیزم

شما که در طول دوران تحصیل و زندگی ام همواره همراه و مشوقم بوده و از هیچ کوششی در حقم دریغ نکرده اید.

سپاس بیکران به درگاه ایزد یکتا که هرچه هستیم و هرچه داریم از اوست.او که قطره ای از اقیانوس بی انتهای علم خود را بر ما عنایت فرمودتا پیوسته مشتاق بهره گیری از قطره ای دیگر باشیم.او را سپاس می گویم که جزء به یاری و اراده او قادر به انجام هیچ کاری نبوده و نیستم.

با تقدیر و تشکر فراوان از :

اساتید عزیز و گرانقدرم سرکار خانم دکتر قدم و سرکار خانم دکتر غروی که نگاهشان به زندگی،کلامشان در توصیف هستی و رفتارشان در قاموس حیات آن چنان امیدبخش و انرژی افزاست که تا همیشه در ذهنم نقش خواهد بست.

در برابراین دو عزیز که از خرمن فضل و دانش ایشان خوشه چینی کرده ام و در این پایان نامه گنجانیده ام، سر تکریم و تواضع فرود می آورم و از خداوند منان سلامتی و عمر با عزت برایشان آرزومندم.

از اساتید محترم سرکار خانم دکتر حناچی و جناب آقای دکتر کاظمی که با پذیرش داوری این پایان نامه، مرا بیش از پیش مورد لطف و محبت خود قرار دادند،صمیمانه سپاسگزارم.

در پایان از تمامی اساتید و عزیزانی که در طول مدت تحصیل از محضرشان کسب علم نموده ام، کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

چکیده

میکروارگانیسم ها برای سازمان دهی و بسته بندی DNA ی خود از تعدادی پروتئین بازی کوچک استفاده می کنند. این پروتئین ها بر روی بیان ژن، رفتار رشد و قابلیت زیست میکروارگانیسم ها، تاثیر عمیقی دارند. این پروتئین ها، پروتئین های شبه هیستونی نامیده می شوند.یکی از پروتئین های شبه هیستونی که به خوبی مطالعه شده است، پروتئین HU از باکتری *E.coli* می باشد. پروتئین HBsu از *Bacillus subtilis* یکی از اعضای خانواده بزرگ پروتئین های شبه هیستونی است.این پروتئین توسط ژن *hbs* رمز می شود.

در این مطالعه، به منظور تولید مقدار زیادی از پروتئین HBsu ، ژن *hbs* همسانه و بیان شد. تولید مقدار زیادی از پروتئین نوترکیب، مراحل بعدی کار را تسهیل می کند.

DNA ژنومی متعلق به باکتری *B.subtilis* ATCC 6633 استخراج شد و با پرایمرهای طراحی شده، واکنش PCR انجام گردید. سپس محصول PCR تخلیص شد و در حامل بیانی pET28a(+)، همسانه گردید. پلاسمید نوترکیب در باکتری *E.coli* DH5α تاریخت شد. به منظور تایید همسانه سازی ، از سلول های تاریخته، پلاسمید استخراج شد. پلاسمید استخراج شده به وسیله PCR آنالیز شد. سپس محصولPCR تعیین توالی گردید. پلاسمیدهای نوترکیب دارای ژن *hbs*، به میزبان بیانی BL21 تاریخت شدند. برای بیان ژن *hbs*، کلونی های مثبت در محیط کشت LB دارای ۵۰µg/µl کانامایسین، کشت داده شدند. سپس IPTG (۱mM) به عنوان القاگر به محیط کشت افزوده شد. برای اطمینان از بیان ژن همسانه شده، SDS-PAGE انجام شد و محصول

۱۱kD پروتئین نوترکیب مشاهده گردید. پروتئین نوترکیب با ستون Ni-NTA تخلـیص گردید.

در این مطالعه، با موفقیت ژن *hbs* همسانه و بیان شـد و پـروتئین نوترکیـب تخلـیص گردید.

کلمات کلیدی : باکتری باسیلوس سوبتیلیس، ژن *hbs* ، همسانه سازی، بیان.

فهرست

عنوان ..... صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱- پروتئین های شبه هیستونی..... ۲

۱-۱-۱- پروتئین شبه هیستونی IHF..... ۳

۱-۱-۲- پروتئین شبه هیستونی Fis..... ۵

۱-۱-۳- پروتئین شبه هیستونی H-NS..... ۷

۱-۱-۴- پروتئین HU ۹

۱-۱-۴-۱- عملکردهای پروتئین HU در سلول..... ۱۱

۱-۱-۴-۲- پروتئین HU در باکتری های گرم مثبت و گرم منفی..... ۱۳

۱-۱-۴-۳- پروتئین های مشابه HU درگونه های باسیلوس..... ۱۳

۱-۱-۵- پروتئین HBsu در باکتری *B. subtilis*..... ۱۴

۱-۱-۵-۱- نقش های مختلف پروتئین شبه هیستونی HBsu در باکتری *B.subtilis* ۱۵

۱-۱-۵-۱-۱- نقش پروتئین HBsu در ترشح پروتئین ها ۱۵

۱-۱-۵-۱-۲- نقش پروتئین HBsu در مقاومت اسپور در باکتری *B.subtilis* ۱۸

۱-۲- همسانه سازی ژن ۱۸

۱-۲-۱- حامل های همسانه سازی ۱۹

۱-۲-۱-۱- پلاسمیدها ۱۹

۱-۲-۱-۱-۱- ویژگی های مناسب پلاسمیدها ۲۰

۱-۲-۱-۱-۲-ویژگی های نا مناسب پلاسمیدها ۲۰

۱-۲-۲- حامل های بیان ژن ۲۱

۱-۲-۳- فاکتورهای موثر در بیان یک ژن همسانه شده ۲۱

۱-۲-۳-۱- پیش بر ها ۲۲

۱-۲-۳-۱-۱- پیش برهای قابل کنترل ۲۲

۱-۲-۳-۱-۱-۱- پیش بر T7 و سیستم pET ۲۳

۱-۴- سیستم های بیان کننده پروتئین های نو ترکیب ۲۴

۱-۴-۱- بیان در *E.coli* ۲۴

۱-۴-۱-۱- ویژگی های مناسب استفاده از *E.coli* به عنوان میزبان ۲۴

۱-۴-۱-۲- مشکلات کلی ساخت پروتئین های نوترکیب در *E.coli* ۲۵

۱-۵- استفاده از برچسب ها در تولید پروتئین های نوترکیب ۲۶

۱-۵-۱- انواع پروتئین های هم جوش ۲۷

۱-۵-۲- مزایای دیگر استفاده از برچسب ها ۲۸

۱-۶- برچسب پلی- هیستیدین (His- tag) ۲۹

۱-۷- هدف از انجام پژوهش ۳۱

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- ابزار و وسایل ۳۴

۲-۲-مواد مورد استفاده در این پژوهش ۳۶
۲-۳-کیت های مورد استفاده در این پژوهش ۳۷
۲-۴-باکتری ها ۳۷
۲-۴-۱- سویه های *E.coli* ۳۷
۲-۴-۲-سویه *B.subtilis* ۳۸
۲-۵-پلاسمید مورد استفاده در پژوهش ۳۸
۲-۶-محیط کشت..... ۳۹
۲-۶-۱- محیط کشت باکتری LB مایع ۳۹
۲-۶-۲-محیط کشت LB جامد ۴۰
۲-۶-۳-محیط کشت نوترینت آگار (N.A) ۴۰
۲-۶-۴-محیط کشت نوترینت براس (N.B) ۴۱
۲-۶-۵- تهیه محلول آنتی بیوتیک..... ۴۱
۲-۷- مراحل انجام پژوهش به صوت گام به گام ۴۱
۲-۷-۱- استخراج DNA ژنومی از باکتری *B.subtilis*..... ۴۱
۲-۷-۱-۱- استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش فنل – کلروفرم ۴۱
۲-۷-۱-۲- استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش SET Buffer..... ۴۴
۲-۷-۲- ارزیابی کیفیت و غلظت DNA استخراج شده..... ۴۵
۲-۷-۲-۱- سنجش غلظت و خلوص DNA به وسیله اسپکتروفوتومتر..... ۴۶

۲-۷-۲-۲- ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز ۴۶

۲-۷-۳- همسانه سازی قطعات حاصل از تکثیر ژن *hbs* ۴۸

۲-۷-۳-۱-تکثیر ژن *hbs* توسط PCR ۴۸

۲-۷-۴- تخلیص باند اختصاصی از ژل آگارز با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل ۵۱

۲-۷-۵- استخراج DNA پلاسمیدی ۵۲

۲-۷-۵-۱- استخراج DNA پلاسمیدی در مقیاس کوچک (Minipreparation) به روش لیز قلیایی ۵۲

۲-۷-۵-۲- استخراج DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید Miniprep معمولی Bioneer ۵۶

۲-۷-۶- آماده سازی ژن *hbs* و پلاسمید pET28a(+) برای واکنش‌اتصال(Ligation) ... ۵۸

۲-۷-۷- اتصال دو قطعه DNA به یکدیگر در آزمایشگاه ۶۱

۲-۷-۸- مستعد کردن باکتری *E.coli* (DH 5α) به روش استفاده از کلرید کلسیم ۶۳

۲-۷-۹- تراریخت کردن پلاسمید به درون باکتری مستعد *E.coli* (DH 5α) ۶۳

۲-۷-۱۰- غربال گری کلونی های آلوده به حامل و تأیید کلونی حاوی حامل نوترکیب ۶۴

۲-۷-۱۱- روش های مربوط به بیان پروتئین نوترکیب در باکتری *E.coli* سویه BL21 (DE3) ۶۶

۲-۷-۱۱-۱- تهیه سلولهای مستعد از باکتری *E.coli* سویه BL21 (DE3) و انتقال حامل نوترکیب به آنها ۶۷

۲-۷-۱۱-۲-القاء بیان پروتئین نوترکیب توسط IPTG(Isopropyl-beta-D-thiogalacto-pyranoside).....۶۷

۲-۷-۱۲- استخراج پروتئین از باکتری ۶۸

۲-۷-۱۳- الکتروفورز پروتئین ها به روش SDS-PAGE ۶۹

۲-۷-۱۴-تخلیص پروتئین HBsu با استفاده از ستون تمایلی Ni-NTA ۷۳

۲-۷-۱۵- سنجش غلظت پروتئین ۷۵

فصل سوم: نتایج

۳-۱- استخراج DNA ژنومی از *Bacillus subtilis* ATCC6633 .....۷۶

۳-۱-۱- استخراج DNA ژنومی از *B. subtilis* ATCC 6633 با روش فنل - کلروفرم ۷۶

۳-۱-۲- استخراج DNA ژنومی از *B. subtilis* ATCC 6633 با روش Set-buffer.....۷۸

۳-۲- تکثیر ژن *hbs* توسط PCR ۷۹

۳-۳- تخلیص باند اختصاصی از ژل آگارز با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل ۸۰

۳-۴- استخراج DNA پلاسمیدی ۸۱

۳-۴-۱- استخراج DNA پلاسمیدی به روش لیز قلیایی ۸۱

۳-۴-۲- استخراج DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت ۸۱

۳-۵- آماده سازی ژن *hbs* و حامل pET28a(+) برای واکنش اتصال ۸۲

۳-۶- همسانه سازی محصول PCR حاصل از تکثیر ژن *hbs* در پلاسمید pET28a(+).....۸۳

۳-۷- تعیین توالی ژن *hbs* همسانه شده.....۸۴

۳-۸- بیان پروتئین HBsu باکتری *B.subtilis* و استخراج آن ۸۶

۳-۹- تخلیص پروتئین HBsu با استفاده از ستون تمایلی Ni-NTA ۸۷

۳-۱۰- سنجش غلظت پروتئین HBsu ۸۸

فصل چهارم: بحث

بحث ۹۰

پیشنهادات..... ۹۶

فصل پنجم: منابع

منابع..... ۹۸

فهرست تصاویر

عنوان.....صفحه

فصل اول: مقدمه

شکل ۱-۱- **ساختار** IHF..... ۴

شکل ۱-۲- ساختار کملپکس IHF-DNA ۴

شکل ۱-۳- ساختار پروتئین Fis ۵

شکل ۱-۴- نقش پروتئینFis بر کنترل بیان ژن..... ۶

شکل ۱-۵- نمای DNA برهنه و DNA همراه با پروتئین H-NS. ۷

شکل ۱-۶- خاصیت مهاری H-NS بر بیان ژن ها و حذف آنها توسط شرایط محیطی ۸

شکل ۱-۷- تفاوت اثر پروتئین های H-NS و HU بر رویDNA ۹

شکل ۱-۸- نقش HU در شروع همانندسازی..... ۱۲

شکل ۱-۹- توالی ژن *hbs* و آمینو اسید های آن..... ۱۴

شکل ۱-۱۰- ساختار سوم هومودایمر پروتئین HBst در باکتری *B.steurothermophilus* و مقایسه پروتئین HBst با HBsu ۱۵

شکل ۱-۱۱- مقایسه ساختار SRP در یوکاریوت ها..... ۱۷

شکل ۱-۱۲- نقش پروتئین شبه هیستونی HBsu در ترشح پروتئین ها در باکتری *Bacillus subtilis* ۱۷

شکل ۱-۱۳- مراحل همسانه سازی در پلاسمید ۲۱

شکل ۱-۱۴- سیستم pET و پروموتر T7 ..... ۲۳

شکل ۱-۱۵- قرار گیری توالی برچسب در پلاسمید و بیان پروتئین نوترکیب فیوز شده ۲۷

شکل ۱-۱۶- برهمکنش میان زیر واحدهای 6×His و ماتریکس Ni-NTA ۳۰

شکل۱-۱۷- تخلیص پروتئین با استفاده از سیستم تخلیص پروتئین - Ni -NTA ۳۰

فصل دوم: مواد و روش ها

شکل ۲-۱- نقشه حلقوی پلاسمید pET 28a (+) و جایگاه های برش آن ۳۸

شکل ۲-۲- ناحیه cloning/expression رشته رمز کننده پلاسمید pET 28a (+) ۳۹

شکل ۲-۳- توالی DNA ای ژن*hbs* ۴۸

شکل ۲-۴- الیگونوکلئوتید طراحی شده به عنوان پرایمر پیش رو (Forward) ۴۹

شکل ۲-۵- الیگونوکلئوتید طراحی شده به عنوان پرایمر پس رو (Reverse) ۴۹

شکل۲-۶- تصویری از ستون Ni-NTA ۷۳

فصل سوم: نتایج

شکل۳-۱- استخراج DNA از سه سویه از باکتری *B.subtilis* با استفاده از روش فنل کلروفرم روی ژل آگارز ۱٪ ۷۸

شکل۳-۲- استخراج DNA با استفاده از روش set-buffer بر روی ژل آگارز ۱٪ ۷۹

شکل ۳-۳- تکثیر ژن *hbs* در باکتری *Bacillus subtilis* بر روی ژل آگارز ۲ درصد ۷۹

شکل ۳-۴- ژن *hbs* ران شده بر روی چاهک بزرگ در ژل آگارز ۲ درصد ۸۰

شکل ۳-۵- ژن *hbs* تخلیص شده با استفاده ازکیت استخراج DNA بر روی ژل آگارز ۲٪ ...۸۰

شکل ۳-۶- استخراج DNA پلاسمیدی به روش لیز قلیایی ۸۱

شکل ۳-۷- استخراج DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت ۸۲

شکل ۳-۸- آماده سازی ژن *hbs* و حامل pET28a(+) برای واکنش اتصال ۸۳

شکل ۳-۹- تأیید حضور قطعه ژن در حامل به کمک PCR ۸۴

شکل ۳-۱۰-تعیین توالی محصول PCR شده ژن *hbs* موجود در پلاسمیدهای تخلیص شده...۸۵

شکل ۳-۱۱- شکل ۳-۱۱- مقایسه توالی نوکلئوتیدی محصول PCR شده ژن *hbs* موجود در پلاسمید های تخلیص شده با توالی همین ژن در سویه مرجع *B.subtilis* ATCC 23857 ... ۸۶

شکل ۳-۱۲- ژل SDS-PAGE نشان دهنده بیان پروتئین نوترکیب ۸۷

شکل ۳-۱۳- ژل SDS-PAGE نشان دهنده تخلیص پروتئین نوترکیب بیان شده ۸۸

شکل ۳-۱۴- منحنی استاندارد جذب علیه غلظت در پروتئین BSA ۸۸

فهرست جداول

عنوان ..... صفحه

فصل اول: مقدمه

جدول ۱-۱- خصوصیات برخی از پروتئین های شبه هیستونی ۳

جدول ۱-۲- نامگذاری پروتئین HU در باکتری های مختلف ۱۰

جدول ۱-۳- توالی و اندازه برچسب های مختلف ۲۸

فصل دوم: مواد و روش ها

جدول ۲-۱- ابزار مورد استفاده در پژوهش ۳۴

جدول ۲-۲- مواد مورد استفاده در این پژوهش ۳۵

جدول ۲-۳-کیت های مورد استفاده در این پژوهش ۳۶

جدول ۲-۴-ارتباط بین درصد آگارز و طول DNA ۴۶

جدول ۲-۵- مقادیر و ترکیبات واکنش PCR ۵۰

جدول ۲-۶- برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR ۵۱

جدول ۲-۷- مقادیر و ترکیبات واکنش هضم آنزیمی محصول PCR ۵۹

جدول ۲-۸- مقادیر و ترکیبات واکنش هضم آنزیمی درحامل pET 28a(+) ۵۹

جدول ۲-۹- مقادیر و ترکیبات واکنش هضم آنزیمی EcoRI درحامل pET 28a(+) ۶۰

جدول ۲-۱۰- مقادیر و ترکیبات واکنش هضم آنزیمی HindIII درحامل pET 28a(+) ... ۶۰

جدول ۲-۱۱- مقادیر وترکیبات واکنش اتصال محصول PCR با پلاسمید pET 28a(+) ۶۲

جدول ۲-۱۲-– مقادیر و ترکیبات واکنش PCR ۶۵

جدول ۲-۱۳- برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR ۶۶

جدول ۲-۱۴-حجم محلول ها وغلظت پروتئین BSA مورد نیاز برای انجام تست برادفورد ... ۷۵

فصل اول

مقدمه