٨٧/١/١٠٠٨٠
٨٧/٦/١٥

١٠٧٨٦٧

دانشگاه شهید بهشتی
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی- میکروبیولوژی

عنوان پایان نامه

کلونینگ و بیان ژن آنزیم پنی سیلین G آسیلاز در سیستم پروکاریوتی

دانشجو :
فهیمه ترکی نژاد

اساتید راهنما :
جناب آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور
جناب آقای دکتر بیژن بمبئی

استاد مشاور:
سرکار خانم دکتر مهوش خدابنده

۱۳۸۷/۱۰/۰۱ -

تاریخ دفاع:

۱۳۸۷/۶/۳۱

۱۰۷۸۶۷

تاریخ .....
شماره .....
پیوست.....

دانشگاه شهید بهشتی

بسمه تعالی

تهران ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین
تلفن: ۲۹۹۰۱

«صورتجلسه دفاع پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد»

بازگشت به مجوز دفاع ۲۰۰/۱۸۵۸/ت/د مورخ ۸۷/۳/۲۰ جلسه هیأت داوران ارزیابی پایان نامه خانم فهیمه ترکی نژاد به شماره شناسنامه ۲۳۶۹۰ صادره از تهران متولد ۱۳۵۷ دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته زیست شناسی - میکروبیولوژی

با عنوان :

کلونینگ وبیان ژن آنزیم پنی سیلین G آسیلاز در سیستم پروکاریوتی

به راهنمائی:

آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور

آقای دکتر بیژن بمبئی

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۱۳۸۷/۶/۳۱تشکیل گردید و براساس رأی هیأت داوری و با عنایت به ماده ۲۰ آئین نامه کارشناسی ارشد مورخ ۷۵/۱۰/۲۵ پایان نامه مزبور با نمره ۲۰ و درجه عالی مورد تصویب قرار گرفت.

۱- استاد راهنما : آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور

۲- استادراهنما : آقای دکتر بیژن بمبئی

۳- استاد مشاور : خانم دکتر مهوش خدابنده

۴- استاد داور : آقای دکترجمشید فولادی

۵- استاد داورو نماینده تحصیلات تکمیلی : آقای دکتر مسعود حسینی

تقدیم به:

او: او که اراده اش مرا در این دنیای خاکی مفتخر به پیمودن این راه نمود، سجودم را پذیرا باش

آنان: آنانکه وامدار از خود گذشتگی شان گشته ام، تا هستم. بوسه بر خاک پایتان میزنم، باشد که پذیرا باشید.

به نام خدا

کاشکی هستی زبانی داشتی — تا زهستان پرده ها برداشتی
هر چه گویی ای دم هستی از آن — پرده ای دیگر بر او بستی بدان

سپاس خداوند یکتا و آفریدگار توانا را که همه خوبی ها از اوست و بزرگی سزاوار اوست. اکنون که در سایه الطاف بیکران پروردگار این تحقیق پایان پذیرفت، بر خود لازم میدانم از همه آنانکه با گفتار و نوشتار یاریم نمودند سپاسگزاری نمایم

زحمات خالصانه استاد راهنمای گرانقدر جناب آقای دکتر ابراهیمی پور شایسته امتنان بی شائبه می باشد، همراهی ، صبوری و بزرگواری ایشان را ارج می نهم

از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر بمبئی که در تمام مراحل تحقیق، همواره راهنمائی های ایشان روشنگر راهم بوده است تشکر ویژه دارم

از زحمات استاد گرامی سرکار خانم دکتر خدابنده صمیمانه سپاسگزاری می نمایم

از جناب آقای دکتر فولادی، استاد گرانقدر، که داوری پایان نامه اینجانب را پذیرفتند کمال تشکر را دارم و از آنکه افتخار حضور در محضر ایشان را داشته ام بر خود می بالم

از جناب آقای دکتر حسینی که در دوران تحصیل از ایشان بسیار آموخته ام و به جهت آنکه داوری پایان نامه بنده را پذیرفتند، سپاسگزارم

از سرکار خانم دکتر صدیق به جهت همکاریها و مساعدتهای بیدریغشان صمیمانه سپاسگزارم

هر چند که با لغات نمی توانم صبوریها و زحمات شبانه روزی مادر و خواهر بزرگوارم را ارج نهم با این حال سپاس بی پایان خویش را نثار ایشان و روح بزرگوار پدرم می نمایم

از جناب آقای معروفی به جهت حمایتها و محبتهای بیدریغشان بسیار سپاسگزارم

از ریاست محترم دانشگاه شهید بهشتی جناب آقای دکتر شعبانی و ریاست محترم مرکز تحقیقات ژنتیک و زیست فناوری آوری جناب آقای دکتر لطفی کمال تشکر را دارم

از تمامی همراهان و سروران محترم در مرکز تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بالاخص استاد بزرگوار جناب آقای دکتر کارخانه، جناب آقای قمی، سرکار خانم قندیلی و خانم سالک سپاسگزاری می نمایم

چکیده:

پنی سیلین G آسیلاز (پنی سیلین آمیداز یا پنی سیلین آمیدوهیدرولاز ,PGA; EC 3.5.1.11) آنزیمی است کلیدی که در تولید صنعتی آنتی بیوتیک های نیمه سنتتیک بتا- لاکتام نقش دارد. این آنزیم واکنش تبدیل پنی سیلین G (بنزیل پنی سیلین) را به 6-APA و PAA از طریق هیدرولیز زنجیر آسیل جانبی کاتالیز می کند. نکته حائز اهمیت در مورد این آنزیم این است که حلقه بتا- لاکتام را باز نمی کند و قادر است واکنش را به صورت دو طرفه با دو ویژگی هیدرولازی و ترنسفرازی پیش ببرد.۶- آمینو پنی سیلانیک اسید (6-APA) هسته مشترک پنی سیلین های طبیعی و مصنوعی است. در این تحقیق کلون و بیان ژن پنی سیلین G آسیلاز از باکتری *A.viscosus* در *Escherichia coli(BL21)* به منظور رسیدن به افزایش سطح بیان انجام شد.

در ابتدا باکتری(DSM#20159) *Arthrobacter viscosus* از DSMZ کشور آلمان تهیه گردید. بعد از کشت و استخراج DNA ژنومی، ژن پنی سیلین G آسیلاز (*pga*) با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بوسیله واکنش PCR تکثیر یافت. سپس به ترتیب در کلونینگ وکتور pGEM-5zf(+/-) و وکتور بیانی pET21(a) کلون و در نهایت بیان گردید. وکتور pET21(a) دارای ژن بتالاکتاماز(*bla*) بوده و میتواند پیوند بتا-لاکتام پنی سیلین را تجزیه کند و بر روی نتایج سنجش آنزیم اثر منفی بگذارد. به این ترتیب وکتور بیانی pET26b(+) که دارای ژن مقاومت به کانامایسین (KnR) است برای ادامه کار انتخاب و ژن *pga* در آن نیز کلون گردید. همچنین از طریق طراحی پرایمر جدید، سکانس کد کننده شش اسیدآمینه هیستیدین(6xHis tag) موجود در وکتور، در انتهای ناحیه کربکسیلیک ژن کلون شده قرار گرفت. پس از تعیین توالی و صحت قطعه کلون شده از نظر *pga* (L04471)، کلون های مثبت بر اساس پاسخ متفاوت *Serratia marcescens* (ATCC 27177) به پنی سیلین G و 6-APA (مقاومت به پنی سیلین G و حساسیت به 6-APA) غربال شدند. سنجش آنزیم با روش بالاسینگهام، SDS-PAGE و وسترن بلات با Anti.His HRP conjugate، پردازش اتوکاتالیتیکی را در سیتوپلاسم سلول *BL21* برای تولید آنزیم فعال تأیید کرد.

نتایج این تحقیق، توانایی سویه میزبانی *E.coli(BL21)* را در بیان ژن *pga* متعلق به باکتری گرم مثبت نشان داد. به علاوه، نتایج نشان داد پروموتور T7 و القاء آن بوسیله IPTG برای افزایش سطح بیان آنزیم پنی سیلین آسیلاز متعلق به *A.viscosus* در میزبان *E.coli* مناسب است.

کلمات کلیدی: پنی سیلین G آسیلاز، *Arthrobacter viscosus* ، آنتی بیوتیک های نیمه سنتتیک بتا- لاکتام، ۶- آمینو پنی سیلانیک اسید(6-APA)

فهرست مطالب	صفحه
۱- مقدمه	۱
۱-۱- طبقه بندی آنتی بیوتیکها	۲
۱-۲- آنتی بیوتیکهای بتا- لاکتام	۲
۱-۳- پنی سیلین ها	۶
۱-۳-۱- ساختمان شیمیایی پنی سیلین ها	۷
۱-۳-۲- بیو سنتز بنزیل پنی سیلین (پنی سیلین G) در پنی سیلیوم کریزوژنوم	۸
۱-۴- تولید صنعتی آنتی بیوتیکهای نیمه سنتتیک بتا-لاکتام	۹
۱-۵- سنتز کنترل شده ترمودینامیکی(تعادلی) و کینتیکی آنتی بیوتیکهای بتا- لاکتام	۱۱
۱-۶- ۶-آمینو پنی سیلانیک اسید (6-APA)	۱۴
۱-۷- تولید ۶- آمینو پنی سیلانیک اسید(6-APA) به روش آنزیمی	۱۵
۱-۸- آشنایی با پنی سیلین آسیلازها (آمیدازها)	۱۷
۱-۸-۱- نام گذاری آنزیم پنی سیلین آسیلاز	۱۸
۱-۸-۲- طبقه بندی پنی سیلین آسیلازها	۱۸
۱-۸-۳- منابع آنزیم پنی سیلین آسیلاز	۱۹
۱-۸-۴- نقش فیزیولوژیک آنزیم پنی سیلین آسیلاز	۲۰
۱-۸-۵- کاربرد آنزیم پنی سیلین آسیلاز در بیوتکنولوژی	۲۱
۱-۸-۶- ساختمان آنزیم پنی سیلین آسیلاز	۲۱
۱-۸-۷- بررسی مرکز کاتالیتکی آنزیم پنی سیلین آسیلاز و نحوه عملکرد آن	۲۴
۱-۸-۸- اسیدآمینه های مهم از نظر نقش کاتالیتیکی در پنی سیلین G آسیلاز	۲۵
۱-۹- مکانیسم هیدرولیز پنی سیلین G توسط آنزیم پنی سیلین G آسیلاز	۲۷
۱-۱۰- پیش ساز پنی سیلین G آسیلاز و مکانیسم پردازش اتو پروتئولیتیکی	۲۸
۱-۱۱-تنظیم بیان آنزیم پنی سیلین آسیلاز در سلول طبیعی	۲۹

۱-۱۲- پردازش های پس از ترجمه	۳۰
۱-۱۳- پایدار سازی با استفاده از روش تثبیت آنزیم	۳۳
۱-۱۴- تشکیل پروتئین های نوترکیب در *E.coli*	۳۴
۱-۱۵- کدونهای ترجیحی (Codon usage) در *E. coli*	۳۶
۱-۱۶- سیستم کلونینگ ژن	۳۶
۱-۱-۱۷- حاملهای کلونینگ (Cloning vectors)	۳۷
۱-۱۸- حاملهای بیان ژن (Expression vectors)	۳۷
۱-۱۸-۱- مشخصات یک حامل بیان ژن	۳۸
۱-۱۹- پروموتر *lac*	۳۹
۱-۲۰- پروموتر باکتریوفاژ T_7	۳۹
۱-۲۱- هدف از تحقیق	۴۱
۲- مواد و روشها	۴۲
۲-۱- مواد شیمیایی	۴۳
۲-۲- آنتی بیوتیک ها	۴۳
۲-۳- آنتی بادی‌ها	۴۴
۲-۴- باکتری‌ها	۴۴
۲-۵-پلاسمیدها	۴۵
۲-۶- الیگونوکلئوتیدهای آغازگر (پرایمرها)	۴۶
۲-۷-کیت های آزمایشگاهی	۴۷
۲-۸-آنزیم ها	۴۷
۲-۹- نشانگرهای وزن مولکولی DNA و پروتئین :	۴۷
۲-۱۰- محلول ها و بافرها	۴۸
۲-۱۰-۱- محلولهای مورد نیاز برای استخراج DNA پلاسمیدی در مقیاس کم به روش لیز قلیایی	۴۸

۲-۱۰-۲- محلول ها و بافرهای مورد نیاز برای الکتروفورز ژل آگاروز(الکتروفورز افقی)	۴۹
۲-۱۰-۲-۱- محلول TAE	۴۹
۲-۱۰-۲-۲- محلول اتیدیوم برماید 10mg/ml (Staining solution)	۴۹
۲-۱۰-۲-۳- بافرلودینگ DNA (Loading Buffer)	۴۹
۲-۱۰-۳- محلول ذخیره IPTG (Isopropyl-β- Thiogalactopyranoside)	۴۹
۲-۱۰-۴- محلول ذخیره XGal	۴۹
(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)	۴۹
۲-۱۰-۵-بافر PCR	۵۰
۲-۱۰-۶- داکسی نوکلئوتیدتری فسفات (dNTP)	۵۰
۲-۱۰-۷- کلرید منیزیم ($MgCl_2$)	۵۰
۲-۱۰-۸- محلولها و بافرهای مورد نیاز لازم جهت SDS-PAGE	۵۱
۲-۱۰-۹- محلولهای لازم جهت رنگ آمیزی و رنگ بری ژل SDS-PAGE	۵۲
۲-۱۰-۱۰- محلول ها و بافرهای مورد نیاز جهت Western blotting	۵۲
۲-۱۰-۱۱- محلول جهت تهیه عصاره باکتری	۵۳
۲-۱۱- محیط های کشت باکتری	۵۳
۲-۱۱-۱- محیط های کشت مایع LB (Luria-Bertani)	۵۳
۲-۱۱-۲- محیط کشت مایع SML1	۵۳
۲-۱۱-۳- محیط کشت *Arthrobacter viscosus*	۵۴
۲-۱۱-۴- محیط کشت مایع M_9 minimal	۵۴
۲-۱۱-۵- محیط کشت مایع MPAC	۵۴
۲-۱۱-۶- محیط نگهداری باکتری ها	۵۱
۲-۲- روش ها	۵۵
۲-۲-۱- کشت باکتری *Arthrobacter viscosus* DSM NO.20159	۵۵
۲-۲-۱-۱- هیدراسیون آمپول حاوی باکتری لیوفیلیزه	۵۵

۲-۲-۱-۲- کشت و نگهداری باکتریها	۵۵
۲-۲-۲- استخراج DNA ژنومی *Arthrobacter viscosus* DSM NO.2015	۵۷
۲-۲-۲-۱- بافرهای استخراج DNA کروموزومی	۵۷
۲-۲-۲-۲- آنزیم Rnase	۵۷
۲-۲-۲-۳- متعادل کردن یا تنظیم pH فنل(Equilibration of phenol)	۵۷
۲-۲-۲-۴- مراحل استخراج DNA ژنومی *Arthrobacter viscosus*	۵۸
۲-۲-۳- تعیین غلظت و خلوص DNA	۵۹
۲-۲-۴- تکثیر اختصاصی مولکول DNA	۵۹
۲ -۲-۴-۱- طراحی و تعیین غلظت آغازگرهای نوکلئوتیدی(Primers)	۵۹
۲-۲-۴-۲-انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR: Polymerase Chain Reaction)	۶۱
۲-۲-۴-۳- مراحل انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)	۶۱
۲-۲-۴-۴- مواد و محلولهای لازم جهت انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)	۶۲
۲-۲-۴-۴-۱- DNA الگو	۶۲
۲-۲-۴-۴-۲- داکسی نوکلئوتیدتری فسفات (dNTP)	۶۲
۲-۲-۴-۴-۳- کلرید منیزیم ($MgCl_2$)	۶۲
۲-۲-۴-۴-۴- بافر PCR برای Taq DNA polymerase	۶۲
۲-۲-۴-۴-۵- آنزیم Taq DNA Polymerase	۶۳
۲-۲-۴-۴-۶- آنزیم *Pfu DNA polymerase*	۶۳
۲-۲-۴-۴-۷- سولفات منیزیم ($MgSO_4$)	۶۳
۲-۲-۴-۴-۸- بافر PCR برای *Pfu DNA Polymerase*	۶۴
۲-۲-۴-۴-۹- پرایمرها (آغاز گرها)	۶۴
۲-۲-۴-۵- مخلوط واکنش PCR جهت جداسازی ژن *pga*	۶۴
۲-۲-۴-۶- برنامه PCR اول بوسیله DNA ژنومی برای جداسازی ژن *pga*	۶۶
۲-۲-۴-۷- برنامه PCR دوم بوسیله وکتور نوترکیب *pGEM -pga*	۶۶

۲-۲-۵- الکتروفورز DNA بوسیله ژل آگاروز	۶۷
۲-۲-۵-۱- الکتروفورز ژل آگارز	۶۷
۲-۲-۵-۲- رنگ آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید	۶۸
۲-۲-۶- بازیافت قطعات DNA	۶۸
۲-۲-۶-۱- تخلیص محصول PCR با استفاده ازکیت	۶۸
۲-۲-۶-۲- بازیافت قطعات DNA از روی ژل آگارز با استفاده از کیت	۶۹
۲-۲-۷- استخراج DNA پلاسمیدی	۷۱
۲-۲-۷-۱- اصول تهیه DNA پلاسمیدی در مقیاس کم	۷۱
۲-۲-۷-۲- استخراج DNA پلاسمیدی با روش شکستن قلیایی	۷۱
۲-۲-۷-۳- استخراج DNA پلاسمیدی با استفاده ازکیت	۷۳
۲-۲-۸- هضم DNA با آنزیم های برشگر محدودکننده	۷۵
۲-۲-۸-۱- هضم آنزیمی پلاسمید pGEM-5zf(+/-) توسط EcoRV	۷۶
۲-۲-۸-۲- هضم آنزیمی پلاسمیدهای pET-21a(+) وpET-26b(+) توسط آنزیمهای *NdeI* و *SalI*	۷۷
۲-۲-۹- اتصال قطعات DNA (DNA Ligation)	۷۷
۲-۲-۱۰-تهیه سلولهای مستعد (Competent DH5α Cell)	۷۸
۲-۲-۱۱- ترنسفورم کردن سلولهای باکتریایی مستعد شده (Transformation)	۷۹
۲-۲-۱۲- غربال کردن کلون‌های واجد پلاسمید نوترکیب (Screening)	۸۰
۲-۲-۱۲-۱- Selection از طریق غیر فعال کردن ژن Lacz	۸۰
۲-۲-۱۲-۲- روش PCR	۸۱
۲-۲-۱۲-۳- برش های آنزیمی (Restiction-mapping)	۸۱
۲-۲-۱۳- تعیین توالی نوکلئوتیدی (Sequencing)	۸۱
۲-۲-۱۴- ساب کلونینگ DNA جهت بیان پروتئین	۸۲
۲-۲-۱۵- روشهای مربوط به بررسی بیان آنزیم پنی سیلین G آسیلاز	۸۲

۲-۲-۱۵-۱- القاء بیان پروتئین نوترکیب	۸۲
۲-۲-۱۵-۲- استخراج محتوای پروتئینی تام سلولها	۸۲
۲-۲-۱۵-۳- تفکیک پروتئین های پری پلاسمی ، سیتوپلاسمی و اینکلوژن بادی *E. coli*	۸۳
۲-۲-۱۶- غربالگری بیولوژیک کلون های تولید کننده پنی سیلین G آسیلاز بوسیله *Serratia marcescens* ATCC27117	۸۴
۲-۲-۱۶-۱- محلولها و محیط های لازم برای Overlay test	۸۴
۲-۲-۱۶-۲- روش انجام آزمایش Overlay test	۸۵
۲-۲-۱۷- سیستم های بافری پیوسته و نا پیوسته	۸۶
۲-۲-۱۸- پلی اکریل آمید ژل الکتروفورزدر حضور SDS (SDS-PAGE)	۸۷
۲-۲-۱۸-۱ محلولهای مورد نیاز برای پلی آکریلامید ژل الکتروفورز	۸۷
۲-۲-۱۸-۲ تهیه ژلهای فوقانی و تحتانی	۸۹
۲-۲-۱۸-۳- آماده سازی سیستم پلی آکریلامید ژل الکتروفورز	۹۰
۲-۲-۱۹- رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید	۹۲
۲-۲-۱۹-۱- رنگ آمیزی با کوماسی بلو R250 یا G250	۹۲
۲-۲-۲۰- بلاتینگ و ایمونوبلاتینگ	۹۳
۲-۲-۲۰-۱- روش های انتقال	۹۳
۲-۲-۲۰-۲- وسترن بلاتینگ (Western Blotting)	۹۴
۲-۲-۲۰-۲-۱- مواد مورد نیاز برای ایمنوبلاتینگ با Anti.His HRP Conjugate	۹۴
۲-۲-۲۰-۲-۲- وسترن بلا تینگ به روش نیمه خشک	۹۵
۲-۲-۲۱- اندازه گیری مقدار پروتئین	۹۶
۲-۲-۲۱-۱- بررسی کمی بیان پروتئین نوترکیب با روش برادفورد	۹۷
۲-۲-۲۱-۲- روش اندازه‌گیری غلظت پروتئین با معرف برادفورد	۹۷
۲-۲-۲۲- سنجش آنزیم پنی سیلین آسیلاز	۹۸
۲-۲-۲۲- ۱- روش هیدروکسیل آمین	۹۹
۲-۲-۲۲-۲- روش فلورسکامین	۹۹

۲-۲-۲۲-۳- روش بالاسینگهام	۹۵
۲-۲-۲۲-۳-۱- محلولهای ذخیره لازم برای سنجش آنزیم پنی سیلین آسیلاز	۱۰۰
۲- ۲-۲-۲۲-۳-۲- محلولهای تازه برای سنجش آنزیم پنی سیلین آسیلاز	۱۰۰
۲-۲-۲۲-۳-۳- روش سنجش آنزیم پنی سیلین آسیلاز با روش بالاسینگهام	۱۰۰
۳- نتایج	۱۰۲
۳-۱- استخراج DNA ژنومی از باکتری *Arthrobacter viscosus*	۱۰۳
۳-۲- تکثیر ژن پنی سیلین آسیلاز از ژنوم باکتری *Arthrobacter viscosus*	۱۰۳
۳-۳- کلونینگ ژن پنی سیلین آسیلاز در پلاسمید pGEM-5zf(+/-)	۱۰۴
۳-۳-۱- هضم آنزیمی pGEM-5zf(+/-) توسط آنزیم *EcoRV*	۱۰۴
۳-۳-۲- ترنسفورم کردن سلولهای مستعد با محصول Ligation	۱۰۷
۳-۳-۳- جداسازی ژن *pga* از پلاسمید نوترکیب pGEM -*pga* با دو آنزیم *NdeI* , *SalI*	۱۰۹
۳-۴- بیان ژن پنی سیلین آسیلاز از طریق سیستم پروموتر T7 وکتور بیانی pET-21a (+)	۱۱۱
۳-۴-۱- هضم آنزیمی وکتور بیانی pET-21a(+) با دو آنزیم NdeI , SalI	۱۱۱
۳-۴-۲- نتایج ترنسفورم کردن سلولهای مستعد با محصول Ligation	۱۱۳
۳-۴-۳- نتایج شناسایی و تأئید حضور ژن *pga* در وکتور نوترکیب pET21-*pga*	۱۱۴
۳-۴-۴- نتایج تعیین توالی قطعه ژن *pga* در وکتور نوترکیب pET21a-*pga*	۱۱۶
۳-۴-۵- نتایج تست هاله عدم رشد برای سلول طبیعی *Arthrobacter viscosus*	۱۲۰
۳ -۴-۶- نتایج تست هاله عدم رشد برای میزبان نوترکیب (pET21-*pga*) *BL21* با توجه به اثر دما در تولید آنزیم پنی سیلین آسیلاز	۱۲۰
۳ -۴-۷- نتیجه بررسی بیان وکتور نوترکیب pET21-*pga* از طریق الکتروفورز پروتئین	۱۲۲
۳-۵- جداسازی ژن پنی سیلین آسیلاز از pGEM-*pga*	۱۲۳
۳-۵-۱- کلونینگ و ایجاد وکتور نوترکیب pGEM-*pga2*	۱۲۴
۳-۵-۲- جداسازی ژن *pga* از وکتور نوترکیب pGEM-*pga2*	۱۲۶
۳-۵-۳- هضم آنزیمی وکتور بیانی pET-26b(+) با دو آنزیم NdeI , SalI	۱۲۷

۳-۵-۴- تشکیل وکتور نوترکیب pET26b-*pga*	۱۲۹
۳-۵-۵-تأئید حضور ژن *pga* در وکتور نوترکیب pET26-*pga*	۱۳۰
۳-۶- نتایج تعیین توالی قطعه ژن *pga* در وکتور نوترکیب pET26b-*pga*	۱۳۱
۳-۷- نتایج تست هاله عدم رشد برای میزبان نوترکیب BL21 (pET26-*pga*)	۱۳۵
۳-۸- نتایج الکتروفورز پروتئین و وسترن بلات برای وکتور نوترکیب pET26- *pga*	۱۳۷
۳-۹- نتایج بررسی سنجش آنزیم پنی سیلین آسیلاز به روش بالاسینگهام	۱۴۱
۴- بحث	۱۴۵
۵- پیشنهادات	۱۵۵
۶- ضمائم	۱۵۷
ضمیمه ۱	۱۵۸
ضمیمه ۲	۱۶۰
مجموعه پوسترها، سخنرانی و مقاله	
۷- منابع	۱۶۲
فهرست جداول	ط
فهرست اشکال	ی

فهرست جداول	شماره صفحه
جدول ۱-۱. تقسیم بندی آنتی بیوتیک ها بر اساس ساختار شیمیایی	۴
جدول ۱-۲. بازار فروش مهمترین آنتی بیوتیک های خانواده پنی سیلین ها وسفالوسپورین ها	۶
جدول۱-۳. منابع میکروبی تولید کننده پنی سیلین G آسیلاز	۲۰
جدول۱-۴. رزیدوهای اسیدآمینه ای مهم در پنی سیلین G آسیلاز	۲۶
جدول ۲-۱. اسامی باکتریهای سفارش داده شده	۴۵
جدول۲- ۲. فهرست و ویژگیهای سویه‌های *E. coli*	۴۵
جدول ۲-۳. فهرست پلاسمیدهای استفاده شده در این تحقیق	۴۵
جدول ۲-۴. فهرست پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق	۴۶
جدول شماره ۲-۵. مقادیر مواد مورد نیاز برای تهیه ژل جدا کننده با درصد معلوم	۸۹
جدول ۲-۶. مقادیر مواد مورد نیاز برای تهیه ژل متراکم کننده با درصد معلوم	۹۰
جدول ۲-۷. عملکرد سنجش پروتئین با روش برادفورد	۹۸
جدول ۳-۲: بهینه سازی سنجش آنزیم پنی سیلین آسیلاز با روش بالاسینگهام با مقادیر متفاوت آنزیمی	۱۴۳

فهرست اشکال	شماره صفحه
شکل ۱-۱. مثالی از آنتی بیوتیکهای بتا-لاکتام و کلاوولانیک اسید (۲)	۵
شکل۱-۲. ساختار کلی آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و سفالوسپورین و هسته های بتالاکتام آنها (۲)	۵
شکل۱-۳. محل اثر متفاوت دو آنزیم آسیلاز(آمیداز) و بتالاکتاماز به ترتیب در مناطق (1) و(2)	۷
شکل۱-۴.ساختمان شیمیایی پنی سیلین G و پنی سیلین V	۸
شکل۱-۵. مسیر بیوسنتز پنی سیلین G در پنی سیلیوم کریزوژنوم (۲)	۹
شکل۱- ۶. عضو اصلی خانواده آنتی بیوتیکهای نیمه سنتتیک پنی سیلین و سفالوسپورین	۱۰
شکل۱- ۷ .(A) سنتز کنترل شده ترمودینامیکی و کینتیکی پنی سیلین های نیمه سنتتیک	۱۲
شکل ۱-۸. مجموعه واکنشهایی که در سنتز کینتیکی آنتی بیوتیک های بتا- لاکتام دخالت می کنند.	۱۴
شکل۱-۹. فرایند سنتز آنزیماتیک 6-APA از پنی سیلین G (۷)	۱۶
شکل۱-۱۰. هیدرولیز آنزیمی ملکول پنی سیلین G توسط پنی سیلین G آسیلاز	۱۷
شکل۱-۱۱. نام گذاری پنی سیلین آمیداز بر اساس طبقه بندی IUPAC	۱۸
شکل۱- ۱۲. a) ساختار دوم پیش ساز پنی سیلین G آسیلاز	۲۳
شکل۱- ۱۲. b) ساختار دوم پنی سیلین G آسیلاز بالغ	۲۳
شکل۱- ۱۴. ساختمان پنی سیلین G آسیلاز در ترکیب با پنی سیلین G	۲۴
شکل۱- ۱۵. رزیدوهای اسیدآمینه ای هیدروفوب در تشکیل جایگاه اتصال با گروه آسیل (acyl-binding site) سوبسترا شرکت می کنند	۲۴
شکل۱- ۱۶. رزیدوهای اسیدآمینه اصلی شرکت کننده در اتصال با یون کلسیم	۲۶
شکل۱- ۱۷. اسیدآمینه های شرکت کننده در اتصال با سوبسترا (Phe24:B,Phe57:B و Ser67:B)و رزیدوی کاتالیتیک Ser1:B در ترکیب با پنی سیلین G در جایگاه فعال PGA	۲۶
شکل۱- ۱۸. مکانیسم پیشنهادی هیدرولیز پنی سیلین G توسط PGA	۲۷
شکل۱-۱۹.ساختار ژنتیکی و مراحل پردازش پروتئین PGA در *E.coli*	۲۸
شکل۱-۲۰. محدودیت های پس از ترجمه تولید PGA در *E.coli*	۳۲

شکل۱-۲۱. تشکیل پروتئین نوترکیب در *E.coli*	۳۵
شکل۱- ۲۲. اجزاء کنترل سیستم وکتور بیانی pET	۴۰
شکل ۲- ۱ . تاکسونومی باکتری *Arthrobacter viscosus*	۴۴
شکل ۲-۲. مراحل کشت باکتری لیوفیلیزه شده *Arthrobacter viscosus*	۵۶
شکل ۳-۱. استخراج DNA ژنومی از باکتری *A.viscosus*	۱۰۳
شکل ۳-۲. جداسازی و تکثیر ژن *pga* با استفاده از DNA ژنومی	۱۰۴
شکل۳-۳. هضم آنزیمی pGEM-5zf(+/-) توسط آنزیم *EcoRV*	۱۰۵
شکل ۳- ۴. نقشه ژنتیکی کلونینگ وکتور pGEM-5zf(+/-)	۱۰۶
شکل ۳- ۵. توالی محل قرارگیری ژن خارجی یا MCS در پلاسمید pGEM-5zf(+/-)	۱۰۶
شکل ۳- ۶. شناسایی کلون ترنسفورم شده با وکتور نوترکیب pGEM-*pga*	۱۰۸
شکل ۳- ۷. جایگاهای برش آنزیم *BstxI* در پلاسمید نوترکیب pGEM- *pga*	۱۰۸
شکل ۳- ۸. جایگاههای برش آنزیم *NdeI* و*SalI* در pGEM –*pga*	۱۰۹
شکل۳-۹. جداسازی ژن *pga* از وکتور نوترکیب pGEM –*pga* با استفاده از دو آنزیم *NdeI* و *SalI*	۱۱۰
شکل ۳-۱۰. ژن *pga* جدا شده از pGEM –*pga* پس استخراج از ژل الکتروفورز	۱۱۰
شکل ۳-۱۱. هضم آنزیمی وکتور بیانی pET-21(a) با دو آنزیم *NdeI* و *SalI*	۱۱۱
شکل۳ – ۱۲. نقشه ژنتیکی وکتور بیانی pET-21a(+)	۱۱۲
شکل۳- ۱۳. جایگاه کلونینگ دروکتور بیانی pET-21a(+)	۱۱۲
شکل ۳- ۱۴. نتایج استخراج پلاسمید هفت کلونی ترنسفورم شده با pET21-*pga*	۱۱۳
شکل ۳-۱۵. شناسایی ژن *pga* توسط PCR در پلاسمید نوترکیب pET21a-*pga*	۱۱۴
شکل ۳-۱۶. شناسایی ژن *pga* در پلاسمید نوترکیب pET21a-*pga* به وسیله آنزیم *BstxI*	۱۱۵
شکل ۳-۱۷. شناسایی ژن *pga* در پلاسمید نوترکیب pET21a-*pga* به وسیله آنزیم *NdeI/SalI*	۱۱۵
شکل ۳-۱۸: توالی ژن پنی سیلین آسیلاز در وکتور نوترکیب pET21a-*pga* بوسیله پرایمرهای T7 promoter و A.visR	۱۱۶

شکل ۳-۱۹. کروماتوگراف سکانس *pga* در پلاسمید pET21-*pga* توسط پرایمر T7 promoter	۱۱۷
شکل ۳-۲۰. کروماتوگراف سکانس *pga* در پلاسمید pET21-*pga* توسط پرایمر A.visR	۱۱۸
شکل ۳- ۲۱. نتیجه Blast سکانس بدست آمده بوسیله پرایمر T7 Promoter primer	۱۱۹
شکل ۳- ۲۲. نتیجه Blast سکانس بدست آمده بوسیله پرایمر A.visR	۱۱۹
شکل ۳-۲۳. Overlay test برای نمونه سوپرناتانت محیط کشت باکتری *A. viscosus*	۱۲۰
شکل ۳-۲۴. Overlay test برای میزبان نوترکیب BL21(pET21–*pga*) در دمای ۲۸°C	۱۲۱
شکل ۳-۲۵. Overlay test برای میزبان نوترکیب BL21(pET21–*pga*) در دمای ۳۰°C و ۳۷°C	۱۲۱
شکل ۳-۲۶. SDS-PAGE برای بررسی بیان پنی سیلین آسیلاز بوسیله وکتور نوترکیب pET21-*pga*	۱۲۲
شکل۳- ۲۷. PCR با استفاده از الگوی pGEM-*pga*	۱۲۳
شکل ۳-۲۸. خالص سازی محصول PCR بدست آمده از pGEM-*pga*	۱۲۴
شکل ۳-۲۹. نتایج استخراج پلاسمید هشت کلون ترنسفورم شده با pGEM- *pga2*	۱۲۵
شکل ۳-۳۰. شناسایی ژن *pga* در پلاسمید نوترکب pGEM-*pga2*	۱۲۵
شکل ۳- ۳۱. نتیجه برش آنزیمی pGEM-*pga2* با دو آنزیم *NdeI* و *SalI*	۱۲۶
شکل۳-۳۲. خالص سازی محصول برش آنزیمی pGEM-*pga2* با دو آنزیم *NdeI* و *SalI*	۱۲۷
شکل۳ – ۳۳. نقشه ژنتیکی پلاسمید pET-26b(+)	۱۲۸
شکل۳ – ۳۴. جایگاه کلونینگ در وکتور بیانی pET-26b(+)	۱۲۸
شکل ۳-۳۵. هضم آنزیمی وکتور pET-26b(+) با دو آنزیم *NdeI* و *SalI*	۱۲۹
شکل ۳-۳۶. نتایج استخراج پلاسمید سلولهای ترنسفورم شده با pET26b-*pga*	۱۳۰
شکل ۳- ۳۷. تأئید حضور ژن *pga* در وکتور نوترکیب pET26b-*pga*	۱۳۱
شکل ۳۸-۳: توالی ژن پنی سیلین آسیلاز در وکتور نوترکیب pET26-*pga* بوسیله پرایمرهای T7 promote و A.vi-R-His	۱۳۲

شکل ۳-۳۹.کروماتوگراف سکانس *pga* در پلاسمید pET26-*pga* توسط پرایمر T7 promoter	۱۳۳
شکل ۳- ۴۱. نتیجه Blast سکانس بدست آمده برای pET26-*pga* بوسیله پرایمر T7 promoter	۱۳۴
شکل ۳- ۴۲. نتیجه Blast سکانس بدست آمده برای pET26-*pga* بوسیله پرایمر A.vis-R-His	۱۳۴
شکل ۳-۴۳. Overlay test برای میزبان نوترکیب *BL21*(pET26–*pga*)	۱۳۵
شکل ۳- ۴۴. Overlay test برای نمونه سیتوپلاسمی	۱۳۶
شکل ۳- ۴۵. Overlay test برای نمونه پریپلاسمی	۱۳۶
شکل۳-۴۶. منحنی رشد باکتری نوترکیب *BL21* حاوی پلاسمید pET26- *pga*	۱۳۷
شکل ۳- ۴۷. نتایج الکتروفورز پروتئین و وسترن بلات برای pET26- *pga*	۱۳۹
شکل ۳- ۴۸. نتایج الکتروفورز پروتئین و وسترن بلات برای شناسایی فرم فعال آنزیم در بخش محلول سیتوپلاسمی	۱۴۰
شکل ۳-۴۹. نمودار بهینه سازی سنجش آنزیم پنی سیلین آسیلاز با روش بالاسینگهام	۱۴۳
شکل ۳-۵۰. نتیجه سنجش آنزیم پنی سیلین آسیلاز با استفاده ازمعرف پارا دی متیل بنزاآلدئید (PDBA)	۱۴۴

فصل اول

مقدمه