بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش ژنتیک

ساخت ژن فیتوکلاتین سنتزی و کلونینگ آن در میزبان پروکاریوتی

استادان راهنما:

دکتر بهناز صفار

دکتر محسن مبینی دهکردی

پژوهشگر:

آزاده محمدی

زمستان ۱۳۸۹

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات

و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه

متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تقدیر و تشکر

سپاس بیکران پروردگار یکتا را که هستی ام بخشید و مرا به طریق علم و دانش رهنمون شد، به همنشینی رهروان دانش مفتخرم نمود و خوشه چینی از خرمن دانش را روزیم ساخت. گذر از این راه و فائق آمدن بر مشکلات و دشواری ها ممکن نبود مگر به لطف خداوند و یاری و همدلی آن هایی که از عطای وجودشان بهره مند بودم.

پروردگارا مرا مدد کن تا دانش اندکم نه نردبانی باشد برای فزونی تکبر و غرور، نه حلقه ای برای اسارت، نه دست مایه ای برای تجارت، بلکه گامی باشد برای تجلی انسانیت و متعالی ساختن زندگی خود و دیگران.

از پدر و مادر عزیزم که وصف نیکی هایشان در وصف واژه نمی گنجد، صمیمانه سپاسگزارم.

از اساتید گرامی سرکار خانم دکتر صفار و جناب آقای دکتر مبینی که در تمام مراحل این پایان نامه راه گشای مشکلاتم بودند، تشکر قدردانی نموده و افتخار شاگردیشان را همواره خواهم داشت.

از جناب آقای دکتر مهنام به واسطه انجام کارهای شبیه سازی این پایان نامه کمال سپاس را ابراز می دارم.

از اساتید محترم سرکار خانم دکتر آیت و جناب آقای دکتر محزونیه که زحمت بازخوانی و داوری این پایان نامه را تقبل نمودند، کمال تشکر را دارم.

هم چنین از اساتید گرامی آقایان دکتر احدی و دکتر عمادی و سرکار خانم دکتر پور احمد که افتخار کسب دانش از محضرشان را داشته ام تشکر و قدردانی می نمایم.

از جناب آقای مهندس بنی مهدی نیزکمال تشکر را دارم.

در پایان از تمامی کسانی که مرا در انجام این پروژه یاری دادند و اسامی آنها ذکر نشد بسیار سپاسگزارم.

تقدیم به

آنهاکه در ترنم نگاهشان

آرام گرفتم

ودر سایبان محبت هایشان

آموختم

پدر و مادر عزیزم

چکیده

امروزه یکی از مهم ترین مشکلات زیست محیطی، آلودگی ناشی از تجمع فلزات سنگین در محیط است که این آلودگی، تاثیرات نامطلوب فراوانی بر سلامت انسان و اکوسیستم می گذارد. یکی از موثرترین روش ها جهت رفع این آلودگی، استفاده از پپتیدهای متصل شونده به فلزات است. فیتوکلاتین های سنتزی دسته ای از این پپتیدها می باشند که به دلیل مزایایی که نسبت به سایر پپتیدهای متصل شونده به فلزات دارند، بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. از این رو با توجه به اهمیت این پپتیدها در جذب فلزات سنگین و نیز مزایای انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی و هم چنین کاربرد روشهای ساخت ژن در حوزه زیست شناسی، در این مطالعه به انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی و سپس به ساخت ژن کد کننده این پپتید و کلون سازی آن پرداخته شده است. در ابتدا توالی فیتوکلاتین سنتزی توسط یک لینکر مارپیچی به توالی هگزاهیستیدین متصل گردید سپس با انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی، از انتخاب درست لینکر، اطمینان حاصل شد. در مرحله بعد ژن کد کننده این پپتید (فیتوکلاتین سنتزی به همراه لینکر و هگزاهیستیدین) در طی دو روش یک مرحله ای و مرحله به مرحله، به کمک اولیگونوکلئوتیدهای هم پوشان و آنزیم *T4 DNA Ligase* ساخته شد. سپس ژن ساخته شده در وکتور pTZ57R/T انتقال یافت و در باکتری اشریشیاکلی (DH5α) کلون گردید. نتایج تعیین توالی نشان داد که دو نوع فیتوکلاتین سنتزی (EC4 , EC11) به همراه لینکر و هگزاهیستیدین ساخته شده و در وکتور مذکور کلون گردیده است.

کلمات کلیدی: پروتئین متصل شونده به فلزات، ژن ساختگی، شبیه سازی دینامیک مولکولی، کلون سازی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول- مقدمه ---------- ۶
۱-۱) پروتئین های متصل شونده به فلزات ---------- ۷
۱-۱-۱) متالوتیونین ها ---------- **۷**
۱-۱-۲) فیتوکلاتین ها ---------- ۸
۱-۱-۲-۱) تاریخچه تحقیقی فیتوکلاتین ها ---------- ۸
۱-۱-۲-۲) ساختار کلی فیتوکلاتین ها ---------- ۹
۱-۱-۲-۳) تنوع پپتیدهای فیتوکلاتین در گیاهان ---------- ۹
۱-۱-۲-۴) بیوسنتز فیتوکلاتین ---------- ۱۰
۱-۱-۳) فیتوکلاتین های سنتزی ---------- ۱۱
۱-۲) ژن های ساختگی و روش تهیه آن ها ---------- ۱۲
۱-۲-۱) روش های ساخت ژن غیر مبتنی بر PCR ---------- ۱۳
۱-۲-۱-۱) سنتز آنزیمی ژن ---------- ۱۳
۱-۲-۱-۲) واکنش مکمل شدن و اتصال ---------- ۱۴
۱-۲-۱-۳) اتصال شات گان و هم اتصالی ---------- ۱۴
۱-۲-۱-۴) واکنش زنجیره ای لیگازی ---------- ۱۵
۱-۲-۲) روش های مبتنی بر PCR ---------- ۱۵
۱-۲-۳) نرم افزارهای طراحی اولیگونوکلئوتیدها برای سنتز شیمیایی ژن ---------- ۱۶
۱-۲-۴) کاربرد ژن های ساختگی ---------- ۱۶
۱-۳) شبیه سازی دینامیک مولکولی ---------- ۱۷
۱-۳-۱) مدل سازی مولکولی ---------- ۱۷
۱-۳-۲) شبیه سازی ---------- ۱۷
۱-۳-۳) مکانیک مولکولی ---------- ۱۷
۱-۳-۴) دینامیک مولکولی ---------- ۱۸
۱-۳-۴-۱) شروع و اجرای شبیه سازی های دینامیک مولکولی ---------- ۱۹
۱-۳-۴-۲) کاربردهای شبیه سازی دینامیک مولکولی ---------- ۲۰

فصل دوم مواد و روش ها ---------- ۲۱
۲-۱) مواد و وسایل ---------- ۲۲
۲-۱-۱) مواد شیمیایی ---------- ۲۲
۲-۱-۲) آنتی بیوتیک ---------- ۲۳
۲-۱-۳) باکتری مورد استفاده ---------- ۲۳
۲-۱-۴) پلاسمید مورد استفاده ---------- ۲۳
۲-۱-۵) کیت های آزمایشگاهی ---------- ۲۴
۲-۱-۶) اولیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده ---------- ۲۴
۲-۱-۷) آنزیم های مورد استفاده ---------- ۲۵

۲-۱-۸) مارکرهای DNA ---------- ۲۵
۲-۱-۹) محلول ها ---------- ۲۵
۲-۱-۹-۱) محلول های لازم جهت استخراج پلاسمید در مقیاس کوچک ---------- ۲۵
۲-۱-۹-۲) محلول های لازم برای الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ---------- ۲۶
۲-۱-۹-۲-۱) محلول TBE ---------- ۲۶
۲-۱-۹-۲-۲) محلول اتیدیوم برماید ---------- ۲۷
۲-۱-۹-۳) محلول ذخیره IPTG ---------- ۲۷
۲-۱-۹-۴) محلول ذخیره ی X-Gal ---------- ۲۷
۲-۱-۱۰) محیط های کشت باکتری ---------- ۲۷
۲-۱-۱۰-۱) محیط کشت مایع LB ---------- ۲۷
۲-۱-۱۰-۲) محیط کشت جامد LB ---------- ۲۸
۲-۱-۱۰-۳) محیط نگهداری باکتری ---------- ۲۸
۲-۲) روش ها ---------- ۲۸
۲-۲-۱) کشت باکتری ---------- ۲۸
۲-۲-۲) خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت ---------- ۲۹
۲-۲-۳) استخراج DNA پلاسمیدی ---------- ۲۹
۲-۲-۳-۱) استخراج DNA پلاسمیدی با استفاده از روش شکستن قلیایی ---------- ۲۹
۲-۲-۳-۲) استخراج DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت ---------- ۳۰
۲-۲-۴) تعیین غلظت DNA و خلوص آن ---------- ۳۱
۲-۲-۵) برش آنزیمی توسط آنزیم های برش دهنده ی اختصاصی ---------- ۳۱
۲-۲-۵-۱) واکنش برش آنزیمی DNA با یک آنزیم ---------- ۳۲
۲-۲-۵-۲) واکنش برش آنزیمی DNA با دو آنزیم ---------- ۳۲
۲-۲-۵-۳) غیر فعال کردن آنزیم ---------- ۳۲
۲-۲-۶) الکتروفورز DNA ---------- ۳۲
۲-۲-۶-۱) الکتروفورز ژل آگارز ---------- ۳۲
۲-۲-۶-۲) رنگ آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم برماید ---------- ۳۳
۲-۲-۷) اتصال قطعات DNA ---------- ۳۳
۲-۲-۸) انتقال پلاسمید به درون باکتری ---------- ۳۳
۲-۱-۸-۱) دستورالعمل ترانسفورماسیون از کشت شبانه باکتری ---------- ۳۳
۲-۱-۸-۲) دستورالعمل ترانسفورماسیون از کلونی های باکتری ---------- ۳۴
۲-۲-۹) غربال کردن کلون های واجد پلاسمید نوترکیب ---------- ۳۴
۲-۲-۹-۱) غیر فعال شدن ژن ---------- ۳۵
۲-۲-۹-۲) PCR ---------- ۳۵
۲-۲-۹-۳) برش آنزیمی ---------- ۳۵
۲-۲-۱۰) تعیین توالی ---------- ۳۵
۲-۳) ساخت ژن ساختگی(سنتتیک) ---------- ۳۶
۲-۳-۱) انتخاب ژن و لینکر ---------- ۳۶

۲-۳-۲) شبیه سازی دینامیک مولکولی---------- ۳۶
۲-۳-۳) طراحی اولیگونوکلئوتیدها---------- ۳۷
۲-۳-۴) سنتز ژن ---------- ۳۷

فصل سوم نتایج---------- ۳۹
۳-۱) انتخاب لینکر---------- ۴۰
۳-۲) نتایج حاصل از شبیه سازی دینامیک مولکولی ---------- ۴۱
۳-۳) نتایج حاصل از طراحی اولیگو نوکلئوتیدها ---------- ۴۶
۳-۴) سنتز ژن فیتوکلاتین سنتزی به همراه لینکر و هگزا هیستیدین---------- ۴۷
۳-۵) کلون سازی ---------- ۴۸
۳-۶) تعیین توالی ژن در پلاسمید---------- ۵۰

فصل چهارم بحث---------- ۵۲
۴-۱) نقش هگزاهیستیدین و لینکر انتخابی ---------- ۵۳
۴-۲) ضرورت شبیه سازی ---------- ۵۴
۴-۳) شبیه سازی دینامیک مولکولی---------- ۵۴
۴-۴) ساخت ژن ---------- ۵۵
۴-۵) کلون سازی ژن فیتوکلاتین سنتزی به همراه لینکر و هگزاهیستیدین ---------- ۵۶
منابع ---------- ۵۸

فهرست شکل ها و نمودارها ----------

تصویر ۱-۱) مسیر بیوسنتز فیتوکلاتین ---------- ۱۰
تصویر ۱-۲) ساختار شیمیایی PCs و ECs ---------- ۱۱
تصویر۱-۳) ساخت پیش ساز tRNA تیروزین باکتری *E.coli*---------- ۱۴
تصویر۱-۴) اتصال شات گان و هم اتصالی ---------- ۱۵
تصویر ۱-۵) واکنش زنجیره ای لیگازی ---------- ۱۵
تصویر۱-۶) مقایسه روش اولیه (A) و روش SGS (B) ---------- ۱۶
تصویر۲-۱) وکتور pTZ57R/T ---------- ۲۳
تصویر۲-۲) توالی DNA جایگاه‌کلونینگ چندتایی در وکتور pTZ57R/T---------- ۲۴
تصویر۲-۳) شمایی از سنتز ژن به روش مرحله به مرحله ---------- ۳۷
تصویر ۳-۱) تغییر ساختار پپتید گسترده در زمان های مختلف شبیه سازی---------- ۴۳
تصویر ۳-۲) کل توالی ژنی به همراه جایگاههای برش آنزیمی ---------- ۴۶
تصویر ۳-۳) توالی پروتئینی حاصل از ژن ---------- ۴۶
تصویر ۳-۴) شمایی از اولیگونوکلئوتیدهای طراحی شده ---------- ۴۷
تصویر ۳-۵) بررسی اثر غلظت های مختلف اولیگونوکلئوتیدها جهت سنتز ژن ---------- ۴۷
تصویر ۳-۶) *محصول* PCR ژن سنتز شده و مارکر ۱۰۰ جفت باز---------- ۴۸
تصویر ۳-۷) مقایسه پلاسمید های استخراج شده از کلونی های سفید و کلونی آبی---------- ۴۹
تصویر ۳-۸) انجام PCR بر روی کلون های سفید ---------- ۴۹
تصویر ۳-۹) مقایسه برش آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده *از کلونی های سفید و آبی با آنزیم های HindIII, NdeI* ---------- ۵۰
تصویر ۳-۱۰) نتیجه حاصل از تعیین توالی ژن در پلاسمید مربوط به $(Glu\text{-}Cys)_4Gly$ ---------- ۵۱
تصویر ۳-۱۱) نتیجه حاصل از تعیین توالی ژن در پلاسمید مربوط به $(Glu\text{-}Cys)_{11}Gly$ ---------- ۵۱
نمودار ۳-۱) تغییرات RMSD اسکلت اصلی در حضور یون های کلر و سدیم ---------- ۴۱
نمودار ۳-۲) تغییرات شعاع چرخش اسکلت اصلی در حالت طبیعی---------- ۴۱
نمودار ۳-۳) تغییرات دمای اسکلت اصلی در حالت طبیعی ---------- ۴۲
نمودار ۳-۴) تغییرات فاصله وسط فیتوکلاتین سنتزی تا وسط هگزاهیستیدین برای حالت ۱
(حالت طبیعی) ---------- ۴۳
نمودار ۳-۵) تغییرات RMSD اسکلت اصلی در حضور یون های کلر و روی---------- ۴۴
نمودار ۳-۶) تغییرات RMSD اسکلت اصلی در حضور یون های کلر و مس ---------- ۴۴
نمودار ۳-۷) تغییرات شعاع چرخشی در طی شبیه سازی در حضور روی ---------- ۴۴
نمودار ۳-۸) تغییرات شعاع چرخشی در طی شبیه سازی در حضور مس ---------- ۴۵
نمودار۳-۹) فاصله گروه های اتم های مس از گروه اتم های گوگرد سیستئین ---------- ۴۵
نمودار۳-۱۰) فاصله گروه های اتم های روی از گروه اتم های گوگرد سیستئین ---------- ۴۶

فهرست جدول ها ----------

جدول۱-۱) فیتوکلاتین و پپتیدهایی که از نظر ساختاری خویشاوند فیتوکلاتین ها می باشند---------- ۹
جدول۲-۱) اولیگونوکلئوتیدهای به کار گرفته شده جهت سنتز ژن مورد نظر ---------- ۲۵
جدول۳-۱) تغییرات ساختاری و ترمودینامیکی در ۵ نانوثانیه آخر شبیه سازی برای حالت طبیعی ---------- ۴۲
جدول ۳-۲) تغییرات RMSD، شعاع چرخش، دما و انرژی پتانسیل در ۵ نانوثانیه آخر در حالت ۲
(در حضور روی) و در حالت ۳ (در حضور مس) ---------- ۴۵
جدول ۳-۳) فاصله گروه های اتم های مس و روی از گروه اتم های گوگرد سیستئین ---------- ۴۶
جدول ۴-۱) مقایسه فاصله پیوند cu-s در کمپلکس Cus3 و پیوند zn-s در کمپلکس الکل
دهیدروژناز، با همین فواصل در پپتید شبیه سازی شده ---------- ۵۵

فصل اول

مقدمه

فصل اول

مقدمه

۱-۱)پروتئین های متصل شونده به فلزات

پروتئین های متصل شونده به فلز نقش مهمی در پایداری ساختمان، سیگنالینگ، انتقال، پاسخ ایمنی، کنترل متابولیسم و هموستازی فلزات ایفا می کنند. پپتیدها و قطعات پروتئینی با اندازه های مختلف، در زنجیره‌های جانبی خود دارای چندین گروه عملکردی هستند که برای اتصال به فلز مناسب هستند [۱و۲].از سوی دیگر برخی فلزات سنگین مانند روی و مس ریز مغذی های ضروری برای یکسری از فرایندهای فیزیولوژیکی هستند. مقادیر زیاد این فلزات و دیگر یون های فلزات سنگین غیر ضروری مثل کادمیوم، سرب و جیوه برای سلولها بسیار سمی هستند [۳].

از این رو ارگانیسم های عالی در پاسخ به حضور فلزات سنگین، پپتیدهای غنی از سیستئین مانند گلوتاتیون[1]، فیتوکلاتین[2] و متالوتیونین[3] را تولید می کنند. این پپتیدها به یون های فلزی نظیر کادمیوم، جیوه، مس، سرب متصل شده و آن ها را به فرم غیر فعال از نظر زیستی تبدیل می کنند [۴و۵].

۱-۱-۱)متالوتیونین ها

این نام اولین بار در سال ۱۹۵۷ برای یک پروتئین متصل شونده به کادمیوم که از کلیه پستانداران به دست آمده بود،مورد استفاده قرار گرفت [۶]. اما اکنون به تعدادی از پروتئین های غنی از سیستئین با وزن مولکولی پایین که به یونهای فلزی نظیر روی، کادمیوم، مس، جیوه و نقره متصل می شوند و آن ها را به شکل غیرفعال از نظر زیستی جدا می کنند، اطلاق می شود. متالوتیونین ها به طور گسترده در میان ارگانیسم های زنده توزیع و در پستانداران، گیاهان و قارچ ها حفاظت شده اند [۷ و ۸ و ۹].

[1] Glutathione (GSH)
[2] Phytochelatins (PCs)
[3] Metallothionein (MTs)

این پروتئین توسط فولر[1] و همکاران به سه دسته طبقه بندی شد: دسته اول متالوتیونین هایی که با متالوتیونین اسب هومولوژی دارند، دسته دوم بقیه متالوتیونین ها که با متالوتیونین اسب هومولوژی ندارند و دسته سوم کدستین[2] و فیتوکلاتین ها که پپتیدهای غنی از سیستئینی هستند که به طور آنزیمی سنتز می‌شوند [۱۰].

۱-۱-۲) فیتوکلاتین ها

همانطور که در بالا اشاره شد، فیتوکلاتین ها دسته ای از پپتیدهای متصل شونده به فلزات هستند که تحت عنوان متالوتیونین های دسته III طبقه بندی می شوند [۱۱]. این پپتید در انواع زیادی از گونه های گیاهی (نظیر تک لپه ایها، دولپه ایها، بازدانگان و جلبک ها)،گونه های قارچی مختلف و در دیاتوم های آبزی شناسایی شده است. اما این پپتید در هیچ گونه جانوری شناسایی نشده است [۱۲و۱۳].

فیتوکلاتین ها به دلیل ویژگی های ساختاری منحصر به فردشان به ویژه داشتن واحدهای تکرار شونده پیوسته γGlu-Cys مزایای بیشتری نسبت به متالوتیونین ها دارند. به طوری که فیتوکلاتین ها توانایی جذب بیشتر یون های فلزی را نسبت به متالوتیونین دارند [۱۴].

۱-۱-۲-۱) تاریخچه تحقیقی فیتوکلاتین ها

قبل از کشف فیتوکلاتین ها، محققان احتمال درگیری متالوتیونین ها در سم زدایی فلزات در گیاهان را مورد بررسی قرار دادند به طوری که متالوتیونین ها به عنوان کمپلکس های متصل شونده به فلزات در جانوران و قارچ ها شناسایی شدند [۱۱].

اما حدود بیست سال قبل فیتوکلاتین ها به عنوان اولیگو پپتیدهای غنی از سیستئین شناسایی شدند و مشخص شد که آنها از نظر ساختار و مسیرهای بیوسنتزی متفاوت از متالوتیونین ها هستند.به طوری که اولین بار هایاشی[3] و گروهش در شیزوساکارومایسس پمبه[4]، پپتیدهایی را در کمپلکس های متصل شونده به کادمیوم شناسایی کردند که این پپتیدها در معرض یونهای کادمیوم تولید می شدند و این پپتیدها را کدستین نامیدند. بعدا دو نوع کدستین A و B به ترتیب با ساختار $(\gamma Glu\text{-}Cys)_n Gly$ n=2 و n=3 شناسایی شدند [۱۵و۱۶]. در سال ۱۹۸۵ گریل[5] و همکاران نیز به طور مستقل پپتیدهای مشابهی را شناسایی کردند که این پپتیدها در سلول های گیاهی مختلف در معرض قرار گرفته با یون های کادمیوم، میزان بالاتری از پلیمریزه شدن (n=2-11) را دارا بودند و آنها را فیتوکلاتین نامیدند که واژه فیتو به معنای گیاهان و کلاتین به معنای ویژگی جذب فلز می باشد [۱۷و۱۸و۱۹].

[1] Fowler
[2] Cadystin
[3] Hayashi
[4] *Schizosaccharomyces pombe*
[5] Grill

۱-۱-۲-۲) ساختار کلی فیتوکلاتین ها

آنالیزهای اولیه نشان داد که فیتوکلاتین ها، تنها از سه اسید آمینه گلوتامات، سیستئین و گلایسین تشکیل شده اند و واحدهای گلوتامات و سیستئین از طریق پیوند γ- کربوکسیل آمید به هم متصل شده اند. در واقع این پپتیدها ساختارهای تکراری از دی پپتیدهای γGlu-Cys دنبال شده با یک گلایسین انتهایی هستند. $(\gamma\ \text{Glu-Cys})_n\text{Gly}$، n=2-11، که مقدار n بستگی به گونه و شرایط در معرض قرارگیری با یون های فلزی دارد [۲۰و۲۱و۲۲].

از جمله یون های فلزی که باعث القا سنتز فیتوکلاتین می شوند می توان به کادمیوم، جیوه، قلع، نیکل، مس، بیسموت، نقره، آنتیموان، تنگستن، روی و تلوریوم اشاره کرد که در این بین کادمیوم قوی ترین القا کننده است و منیزیم، سدیم، آلومینیوم، کلسیم، کروم، منگنز، کبالت، سزیم غیر القا کننده های سنتز فیتوکلاتین هستند [۲۰].

ذکر این نکته قابل توجه است که پیوند گاما بین گلوتامات و سیستئین نشان دهنده این است که سنتز فیتوکلاتین ها نمی تواند از طریق ریبوزوم رخ دهد بلکه توسط یک سری آنزیم ها انجام می شود که در ادامه به طور مفصل به آن پرداخته می شود[۲۳].

۱-۱-۲-۳) تنوع پپتیدهای فیتوکلاتین در گیاهان

همانطور که در مطالب قبل آمد، فیتوکلاتین ها در انتهای کربوکسیل خود دارای اسیدآمینه گلایسین هستند. اما برخی از انواع فیتوکلاتین بدون گلایسین، در کمپلکس های متصل شونده به کادمیوم در شیزوساکارومایسس پمبه و کاندیدا گلابراتا[1] گزارش شده اند [۱۳و۲۴]. چنین پپتیدهایی در گیاهان عالی فراوان نیستند اما مقدار زیادی از آنها در ریشه های ذرت در معرض قرار گرفته با یون های کادمیوم، یافت می‌شوند [۲۵].

علاوه بر این پپتید، سه پپتید دیگر خویشاوند با فیتوکلاتین از منابع گیاهی مختلف شناسایی شده اند. این پپتیدها در اسید آمینه انتهای کربوکسیل خود تفاوت دارند که این اسید آمینه می تواند آلانین ،سرین،گلوتامین و گلوتامات باشد [۲۶و۲۷]. در جدول ۱-۱ فیتوکلاتین و پپتیدهایی که از نظر ساختاری خویشاوند فیتوکلاتین ها می باشند، آورده شده است [۲۸].

جدول۱-۱) فیتوکلاتین و پپتیدهایی که از نظر ساختاری خویشاوند فیتوکلاتین ها می باشند [۲۸].

پپتیدهای (EC)γ خویشاوند با فیتوکلاتین	ساختار	منبع
فیتوکلاتین (کدستین)	$(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{Gly}$	مخمر
هومو فیتوکلاتین	$(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{Ala}$	تیره لگومینوز
فیتوکلاتین بدون گلایسین	$(\gamma\text{Glu-Cys})_n$	ذرت و مخمر
هیدروکسی متیل فیتوکلاتین	$(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{Ser}$	تیره گندمیان
ایزوفیتوکلاتین (گلوتامات)	$\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{Glu}$	ذرت
ایزوفیتوکلاتین (گلوتامین)	$(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{Gln}$	ترب کوهی

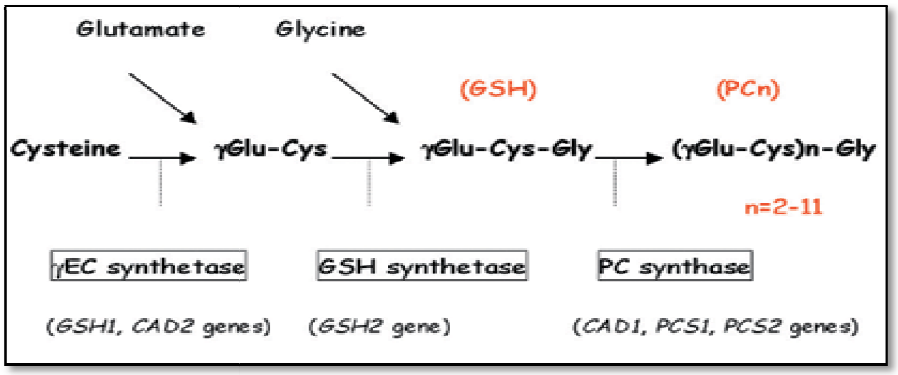
[1] *Candida glabrata*

۱-۱-۲-۴)بیوسنتز فیتوکلاتین

تصویر ۱-۱ مسیر بیوسنتز فیتوکلاتین از پیش سازهای متداولش یعنی گلوتامات، سیستئین و گلایسین را نشان می دهد. این مسیر با مسیر بیوسنتز گلوتاتیون هم پوشانی دارد زیرا گلوتاتیون سوبسترا جهت سنتز فیتوکلاتین ها می باشد.

بیوسنتز گلوتاتیون شامل دو واکنش متوالی است که با دخالت γEC سنتتاز[۱] و گلوتاتیون سنتتاز[۲] انجام می‌شود. هر دو این واکنش ها به ATP به عنوان سوبسترا نیاز دارند، اولی یک آنزیم محدودکننده مقدار، جهت سنتز گلوتاتیون می باشد اما دومین آنزیم چنین نیست [۲۹].

همانطور که در تصویر۱-۱ مشخص است آنزیم فیتوکلاتین سنتاز[۳]، فیتوکلاتین ها را از گلوتاتیون، با انتقال بخش γ-Glu-Cys از یک مولکول دهنده به یک مولکول گیرنده، سنتز می کند.این واکنش شامل انتقال پپتید بخش γ-Glu-Cys گلوتاتیون به مولکول گلوتاتیون دوم می باشد تا PC2 ایجاد شود و در مراحل بعد با انتقال این بخش به مولکول PC، اولیگومر n+1 ایجاد می شود.



تصویر ۱-۱) مسیر بیوسنتز فیتوکلاتین (۲۸)

بررسی ها نشان داد که یون های کادمیوم باعث افزایش فعالیت γEC سنتتاز می شوند [۳۰و۳۱و۳۲]. از سوی دیگر، موتانت هایی از شیزوساکارومایسس پمبه و آرابیدوپسیس تالیانا[۴] که کمبود فیتوکلاتین را دارند و نسبت به کادمیوم بیش حساس هستند، در γEC سنتتاز و گلوتاتیون سنتتاز دارای نقص هستند. ژن های کد کننده آنزیم های کلیدی جهت بیوسنتز فیتوکلاتین ها در زیر تصویر۱-۱ آورده شده اند [۳۳و۳۴و۳۵].

از جمله تحقیقات انجام گرفته در زمینه فیتوکلاتین سنتاز می توان به بیان ژن فیتوکلاتین سنتاز، آرابیدوپسیس تالیانا در باکتری اشریشیاکلی اشاره کرد که این آزمایش منجر به افزایش محتوای فلزی درون سلولی شد [۳۶] و در آزمایشی دیگر افزایش بیان فیتوکلاتین سنتاز مخمر شیزوساکارومایسس پمبه در باکتری اشریشیاکلی، انجام گرفت که در نهایت منجر به سنتز فیتوکلاتین و نیز انباشت ۷/۵ برابری کادمیوم شد [۳۷].

---

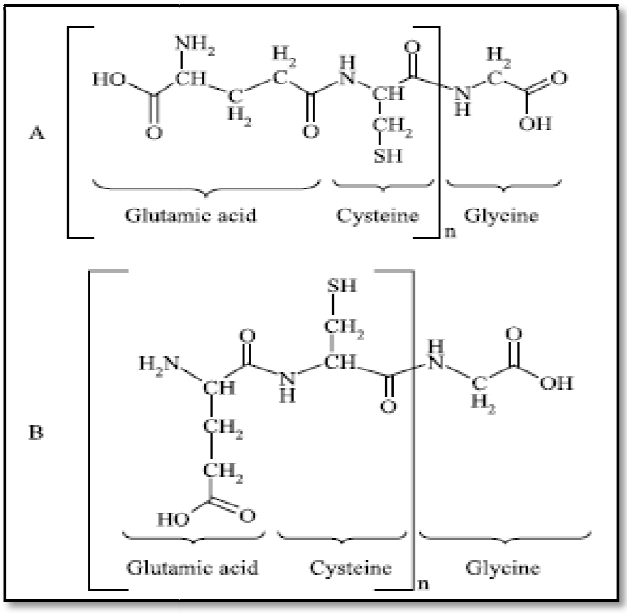
[1] γEC Synthetase
[2] GSH Synthetase
[3] PC Synthase
[4] *Arabidopsis thaliana*

۱-۱-۳) فیتوکلاتین های سنتزی[1]

دسته دیگر از پپتیدهای متصل شونده به فلزات فیتوکلاتین های سنتزی با ساختار کلی (Glu-Cys)$_n$Gly هستند [۳۸] که ساخت ژن کد کننده این پپتید و کلون سازی آن، مبنای مطالعات این رساله می باشد.

بررسی ها اثبات کرد که فیتوکلاتین های سنتزی با ظرفیت دو برابری نسبت به متالوتیونین ها به فلزات متصل می شوند از سوی دیگر جدا سازی وتخلیص فیتوکلاتین ها از گیاهان یا دیگر ارگانیسم ها کاری خسته کننده و زمان بر می باشد از این رو استفاده از فیتوکلاتین های سنتزی بسیار کارآمد و مناسب می باشد.

در این پپتیدها برخلاف فیتوکلاتین ها پیوند بین گلوتامات و سیستئین از نوع آلفا می باشد بنابراین این پپتید از طریق ریبوزم قابل سنتز می باشد. البته گمان می رفت به دلیل تفاوت پیوند آلفا و گاما در فیتوکلاتین سنتزی و فیتوکلاتین، تمایل اتصال به فلزات بین این دو پپتید متفاوت باشد اما آزمایشات انجام گرفته توسط بای[2] در سال ۱۹۷۷ مشخص کرد که EC2 و EC4 در یک رفتار مشابه با PC2 و PC4 به انواع مختلفی از فلزات متصل می شوند [۲۲و۳۹]. تصویر ۱-۲ ساختار شیمیایی PCs و ECs را نشان می دهد، به تفاوت پیوند بین گلوتامات و سیستئین در هر دو توجه کنید.



تصویر ۱-۲) ساختار شیمیایی PCs (A) و ECs (B) (۳۸)

از جمله کارهای انجام شده بر روی فیتوکلاتین سنتزی می توان به آزمایش های بای و همکارانش اشاره کرد : در سال ۲۰۰۰ یک سیستم پیوسته ژنی متشکل از توالی سیگنال و نه اسید آمینه اول لیپوپروتئین را به دومین ترانس ممبران پروتئین A غشای بیرونی[3] متصل کرده سپس توالی فیتوکلاتین سنتزی (EC8,

[1] Synthetic phytochelatins (ECs)
[2] Bae
[3] Outer membrane protein A(OmpA)

(EC11, EC20 به این سیستم اضافه کردند در نهایت فیتوکلاتین سنتزی بر روی سطح سلول با استفاده از سیستم پیوسته لیپوپروتئین و دومین ترانس ممبران پروتئین A غشای بیرونی بیان شد و با این روش یک راهکار جدید جهت رفع آلودگی فلزات سنگین ابداع شد [۳۸].

در سال ۲۰۰۱ جهت غلبه بر محدودیت جذب فلز از طریق غشا، سیستم انتقال دهنده جیوه را به همراه فیتوکلاتین سنتزی (EC20) بیان کردند هم چنین نتایج این آزمایش نشان داد که این روش و روش بیان فیتوکلاتین های سنتزی بر روی سطح میکروارگانیسم ها، به یک میزان در جذب فلز نقش دارند [۴۰].

در سال ۲۰۰۲ جهت افزایش انباشت فلزات، فیتوکلاتین سنتزی (EC20) با استفاده از پروتئین هسته یخی[1] کوتاه شده، بر روی سطح باکتری موراکسلا[2] بیان شد و این آزمایش نشان داد که تولید EC20 در موراکسلا. تقریبا سه برابر *E.Coli* است و ظرفیت اتصال به جیوه در موراکسلا. نوترکیب ده برابر افزایش یافته است.

در واقع فلزات سنگین به دلیل ماهیت پایدارشان یکی از اصلی ترین آلوده کننده های محیط به شمار می آیند به همین دلیل تا به امروز راهکار های زیادی جهت رفع این آلودگی مورد استفاده قرار گرفته است [۴۱]. یکی از بهترین روش ها استفاده از فیتوکلاتین سنتزی است به طوری که یکی از جدیدترین حس گر های زیستی که امروزه مورد استفاده قرار گرفته بر اساس تثبیت این پپتید بر روی سطح طلا می باشد این بیوسنسور جدید قادر به تشخیص جیوه، کادمیوم، سرب، مس و روی در غلظت های۱۰۰fM-۱۰mM می‌باشد [۴۲]. به علاوه همانطور که قبلا اشاره شد بیان فیتوکلاتین های سنتزی توسط ارگانیسم های مختلف از جمله باکتری ها یک راهکار مناسب جهت رفع آلودگی فلزات سنگین از جمله جیوه از محیط است [۴۰].

لازم به ذکر است که علاوه بر پپتید های غنی از سیستئین، پپتیدهای غنی از هیستیدین مانند هگزا هیستیدین و پپتیدهایی با ترکیب غنی از هیستیدین و سیستئین، برای اتصال و جذب فلزاتی نظیر کادمیوم و نیکل نیز مورد استفاده قرار گرفته اند [۴۳و۴۴].

از جمله کارهای انجام گرفته در این مطالعه، ساخت ژن فیتوکلاتین سنتزی است که در بخش بعدی (بخش ژن های ساختگی)، روش های ساخت ژن و روش مورد استفاده جهت ساخت ژن مذکور آورده شده است.

۱-۲) ژن های ساختگی و روش تهیه آنها

ساخت شیمیایی ژن ها ابزاری قوی جهت تحقیقات زیستی پایه ای و کاربرد های بیوتکنولوژی است به علاوه تکنیک بسیار موثری جهت روشن ساختن عملکرد ژن ها و آنالیز بر هم کنش پروتئین – نوکلئیک اسید می باشد [۴۵]. در بسیاری از موارد ممکن است ساخت شیمیایی ژن ها تنها گزینه باشد زیرا ممکن است DNA الگو به آسانی در دسترس نباشد، به علاوه توصیف عملکرد ژن به بیان در یک سیستم هترولوگ نیاز دارد [۴۶و۴۷] و در این موارد اغلب بهینه سازی کدون به منظور رسیدن به میزان بالایی از بیان ضروری است، هم چنین ممکن است ساخت شیمیایی ژن ها جهت اجتناب کردن از موتان زایی هدفمند و کلون سازی مجدد پرهزینه و خسته کننده، ترجیح داده شود [۴۸و۴۹و۵۰و۵۱].

[1] Nucleation protein ice (INPNC)
[2] *Moraxella sp.*

اولین تجربه ساخت شیمیایی ژن ها در اوایل دهه ۱۹۶۰، مربوط به ژنهای رمزگذار tRNA بوده است [۵۲و۵۳] و اولین ژن کد کننده پروتئین، سوماتوستاتین[1]، به طور شیمیایی در سال ۱۹۷۷ ساخته شد [۵۴]. بعد از آن در دهه ۱۹۷۰ و اوایل دهه۱۹۸۰ بسیاری از ژنهای کد کننده پروتئین، به طور شیمیایی ساخته و درباکتری اشریشیاکلی بیان شدند [۵۵و۵۶].

برای ساخت ژن روش های زیادی مورد استفاده قرار گرفته است به طوری که روش های اولیه سنتز ژن مبتنی بر اتصال آنزیمی[2] بودند [۵۲و۵۴] اما در دهه ۱۹۹۰ با پیشرفت تکنولوژی واکنش زنجیره ای پلیمرازی[3]، ساخت شیمیایی توالی های بلند ژنی میسر شد. به طور کلی روش های ساخت ژن را می توان به دو دسته تقسیم کرد که شامل روش های غیر مبتنی بر PCR و روش های مبتنی بر PCR می باشند [۴۹].

از جمله روش های ساخت ژن غیر مبتنی بر PCR می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- سنتز آنزیمی ژن[4]

۲- واکنش مکمل شدن و اتصال[5]

۳- اتصال شات گان و هم اتصالی[6]

۴- واکنش زنجیره ای لیگازی[7]

۱-۲-۱) روش های ساخت ژن غیر مبتنی بر PCR

۱-۲-۱-۱) سنتز آنزیمی ژن

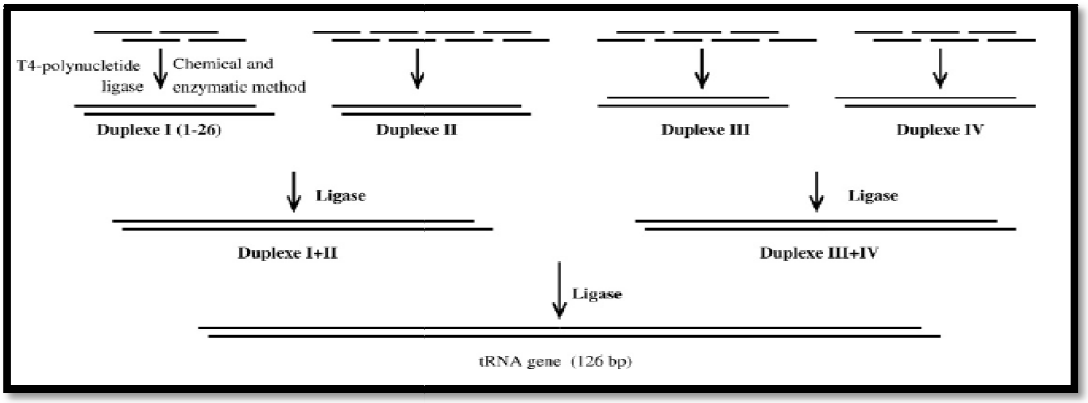
نتایج مطالعات فیزیکی و ژنتیکی نشان داد که نوترکیبی ژنتیکی مستلزم شکست و پیوند مجدد مولکول‌های DNA است و برای اولین بار در دهه ۱۹۶۰ آنزیم هایی که شکست های تک رشته ای را در DNA دو رشته ای ترمیم می کنند در باکتری *E.coli* و سلول های *E.coli* عفونی شده با باکتریوفاژ T4 کشف شدند. سپس مشخص شد که این آنزیم ها می توانند جهت اتصال دئوکسی ریبونوکلئوتیدهایی که به طور شیمیایی ساخته شده اند، مورد استفاده قرار گیرند تا ساختارهای مارپیچی دوتایی پیوسته ای را تشکیل دهند و سنتز DNA دو رشته ای ۳۰ نوکلئوتیدی مربوط به ژن tRNA به همین روش انجام شد [۵۷و۵۸].

در آزمایشی دیگر خورانا[8] و همکارانش جهت سنتز ژن پیش ساز tRNA تیروزین از روش آنزیمی استفاده استفاده کردند به طوری که این ژن ۱۲۶ نوکلئوتیدی را در ۲۶ بخش تقسیم کردند که هر بخش نیز ۶-۱۱ نوکلئوتید طول داشت سپس از دو روش مختلف جهت سنتز ژن استفاده کردند. در روش یک مرحله ای تمام قطعات با هم برای سنتز ژن مورد استفاده قرار گرفتند ولی در روش دوم که روش دو مرحله ای بود قطعات به ترتیب برای سنتز ژن مورد استفاده قرار گرفتند به عنوان مثال قطعه ۲و۳و۴ تحت واکنش اتصال توسط آنزیم لیگاز قرار گرفتند سپس قطعه ۵ اضافه شده و در نهایت قطعه ۱ به مخلوط قبلی اضافه شد تا دوپلکس I

---

[1] Somatostatin
[2] Enzymatic ligation
[3] Polymerase Chain Reaction (PCR)
[4] Enzymatic gene synthesis
[5] Annealing and ligation
[6] Shotgun and Co ligation
[7] Ligase Chain Reaction (LCR)
[8] Khorana

تشکیل شود به همین طریق دوپلکس II و III و IV نیز ساخته شدند سپس دوپلکس I و II ، III و IV نیز توسط آنزیم لیگاز به هم متصل شدند سپس دوپلکس I+II و II+IV نیز توسط آنزیم لیگاز به هم متصل شدند و در نهایت ژن مد نظر ساخته شد. [۵۹و۶۰]. *(تصویر۱-۳)* لازم به ذکر است که در این مطالعه، ساخت ژن با توجه به این روش انجام شد.



تصویر۱-۳) ساخت پیش ساز tRNA تیروزین باکتری اشریشیاکلی *(۶۱)*

۱-۲-۱-۲) واکنش مکمل شدن و اتصال

در دهه ۱۹۸۰ روش کلی جهت سنتز ژن، سر هم بندی کل ژن از تعداد زیادی اولیگو نوکلئوتید از طریق واکنش مکمل شدن و اتصال بود. در ابتدا هر دو رشته توالی مورد نظر به انتهاهای چسبنده کوتاه تقسیم می شدند تا جفت های مجاور اولیگو نوکلئوتیدهای مکمل بتوانند بر روی هم سوار شوند سپس اولیگو نوکلئوتید های سنتز شده قبل از اتصال به شکل یک دوپلکس مطابق با ژن کامل ،تحت فرآیند کینازی و مکمل شدن قرار می گرفتند. این راهکار اولیه با استفاده از اولیگونوکلئوتیدهای طویل تر توسعه پیدا کرد و در نهایت منجر به کاهش مقدار اولیگونوکلئوتیدها و کاهش هزینه ها شد [۶۲].

۱-۲-۱-۳) اتصال شات گان و هم اتصالی

گراندستروم[1] و همکارانش در سال ۱۹۸۵ روش اتصال شات گان را ارائه کردند. ژن ساختاری کد کننده فلاودوکسین به سه قسمت تقسیم شد که هر قسمت ۱۳۱-۱۹۱ نوکلئوتید طول داشت. هر قسمت توسط اتصال آنزیمی از سه جفت مکمل از اولیگونوکلئوتیدها که انتهاهای تک رشته ای کوتاه مکمل با جفت مجاور داشتند، ساخته شد. هم اتصالی سه قسمت، ژن ساختاری ۴۲۰ جفت بازی نهایی را ایجاد کرد [۶۳]. (تصویر۱-۴)

[1] Grundstrom