دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم زیستی

رساله دکتری رشته: زیست شناسی

گرایش: ژنتیک مولکولی

عنوان رساله:

جداسازی و تعیین خصوصیات لیپاز قلیاحرارت‌مقاوم از باکتری بومی *Enterobacter* sp. و بهبود ویژگیهای هیدرولیزی آن با استفاده از روشهای مهندسی پروتئین

نام دانشجو: پریسا فرخ

استاد راهنما (اصلی): جناب آقای دکتر باقر یخچالی

استاد راهنما (دوم): جناب آقای دکتر علی اصغر کارخانه

آذر ۱۳۹۲

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم پریسا فرخ دانشجوی مقطع دکتری رشته ژنتیک به شماره دانشجویی ۸۸۵۱۱۱۲۰۰۶ رساله واحدی خود را با عنوان : **جداسازی وتعیین خصوصیات لیپاز قلیا حرارت مقاوم از باکتری بومی Enterobacter sp. وبهبود ویژگیهای هیدرولیزی آن با استفاده از روشهای مهندسی پروتئین"** در تاریخ ۱۳۹۲/۹/۲ روز شنبه در اتاق شماره ۵۰۰۹ **دانشکده علوم زیستی** ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبهٔ علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	آقای دکترباقر یخچالی	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم	آقای دکتر علی اصغر کارخانه	استادیار	
۳- استاد ناظر داخلی	آقای دکتر سامان حسینخانی	استاد	
۴- استاد ناظر داخلی	آقای دکتر سید جواد مولی	دانشیار	
۵- استاد ناظر خارجی	آقای دکترعلیرضا زمردی پور	دانشیار	
۶-استاد ناظر خارجی	آقای دکتر سعید امین زاده	استادیار	
۷-نماینده تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر مجید صادقی زاده	استاد	

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 تاریخ۸۷/٤/۱ 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 پریسافرخ دانشجوی رشته زیست شناسی-ژنتیک مولکولی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۸ مقطع دکتری دانشکده علوم زیستی 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: .....

۹۲/۱۰/۱۴

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 رساله دکتری نگارنده در رشته زیست شناسی-ژنتیک مولکولی است که در سال ۱۳۹۲ در دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر باقر یخچالی و جناب آقای دکتر علی اصغر کارخانه 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 پریسا فرخ دانشجوی رشته زیست شناسی-ژنتیک مولکولی مقطع دکتری تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: پریسا فرخ

تاریخ و امضا:

۹۲/۱۰/۱۴

"تقدیم به خانواده عزیزم"

پس از سپاس از الطاف پروردگار مهربان
از اساتید راهنمای گرانقدرم؛ جناب آقای دکتر یخچالی و جناب آقای دکتر کارخانه بخاطر تمام زحماتشان کمال تشکر را دارم.
از همکاری سرکار خانم دکتر دینا مرشدی، آقای مهرداد چایچی، آقای مجتبی ثمودی و همچنین سایر دوستانی که در این راه همراه من بودند و از کمکهای آنها بهره بردم، بسیار سپاسگزارم.

چکیده

لیپازهای قلیاحرارت‌مقاوم در صنایع گوناگون کاربردهایی بسیاری دارند. در این مطالعه لیپاز قلیاحرات-مقاوم یک باکتری بومی (*Enterobacter* sp.Bn12) که از خاک پوششی مزارع پرورش قارچ خوراکی در اطراف تهران جداسازی شده، مورد بررسی قرار گرفت. ژن لیپاز (*ELBn12*) از طریق کتابخانه ژنومی شناسایی گردید. بررسی قطعه بدست آمده از کتابخانه ژنومی، توالی کدکننده لیپازی را با وزن مولکولی پیش‌بینی شده ۳۱ kDa نشان داد. توالی پروتئینی لیپاز بدست آمده با لیپاز *Enterobacter* sp.Ag1 ۹۶٪ یکسانی داشت. لیپاز ELBn12 به زیرخانواده I.1 لیپازهای باکتریایی تعلق دارد و جایگاه فعال آن از Ser82، Asp237 و His259 تشکیل شده است. لیپاز ELBn12 در میزبان *Escherichia coli* BL21 pLysS (DE3) تولید و سپس خالص‌سازی گردید. حداکثر فعالیت این لیپاز در ۶۰°C و در pH ۸/۰ در حضور سوبسترای تری‌کاپریلین (C_8) مشاهده شد و فعالیت ویژه آن در این شرایط U/mg ۵۱۰۶±۷۷۵/۹۷ بود ولی این لیپاز تنها ۵۴٪ از فعالیت اولیه خود را پس از یک ساعت گرماگذاری در °C ۶۰ حفظ می‌کرد.

به منظور افزایش پایداری حرارتی لیپاز ELBn12، پنج جهش‌یافته از آن با جهش‌زایی در جایگاه‌های مشخص تهیه گردید. مطالعات بیوانفورماتیک و به دنبال آن بررسی‌های آزمایشگاهی برای بررسی اثر جهش‌ها انجام شد. تمامی این جهش‌یافته‌ها نیز در میزبان *E. coli* BL21 (DE3) pLysS تولید و سپس تخلیص شدند. دو جهش‌یافته K173A و Q177A که از نظر موقعیت در سطح پروتئین قرار دارند، با افزایش پایداری حراراتی و همچنین فعالیت ویژه آنزیم همراه بودند. با این حال اعمال همزمان این دو جایگزینی در یک جهش‌یافته، اثر منفی در پایداری حرارتی داشت. جایگزینی اسیدهای‌آمینه هیدروفوب: Ala و Ile در جایگاه N106 که در فضای اتصال سوبسترا قرار دارد، با افزایش پایداری حرارتی همراه بود ولی فعالیت ویژه آنزیم را کاهش داد. بنابراین به نظر می‌رسد که آسپاراژین ۱۰۶ برای ساختار یا عملکرد آنزیم ضروری است.

لیپاز ELBn12 و اکثر جهش‌یافته‌های آن در شرایط قلیایی پایدار بودند. این آنزیم ها پایداری خوبی را در حضور ۵۰٪ (v/v) حلالهای آلی قطبی و غیرقطبی و همچنین در محلول ۱٪ (w/v) دترجنت‌های غیریونی از خود نشان دادند. بعلاوه پایداری آنزیم‌های مورد بررسی در غلظت ۱۰ mM یونهای فلزی به استثناء یونهای فلزات سنگین (Zn^{2+} و Fe^{3+}) قابل توجه بود. EDTA هم در غلظت ۱۰ mM تاثیر مهاری روی فعالیت هیچ یک از لیپازها نداشت. با نتایج بدست آمده می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که جهش یافته‌های K173A و Q177A از قابلیت های بیشتری برای استفاده در صنایع مختلف برخوردار هستند.

واژگان کلیدی: لیپاز قلیا حرارت مقاوم، انتروباکتر، مهندسی پروتئین

فهرست

عنوان **صفحه**

فهرست جدولها ..... ز
فهرست شکلها ..... ط
فصل اول: مقدمه و مروری برمطالعات انجام شده

۱-۱ تاریخچه استفاده از آنزیم‌ها در صنعت ۱
۱-۲ آنزیم‌های هیدرولیز کننده چربی ۲
۱-۲-۱ لیپاز ۳
۱-۳ ساختار سه بعدی لیپازها ۴
۱-۴ مکانیسم عملکردی لیپازها ۵
۱-۵ موجودات مولد لیپاز ۷
۱-۵-۱ منابع باکتریایی ۸
۱-۶ جداسازی ریزسازواره‌های مولد لیپاز ۸
۱-۷ روشهای سنجش فعالیت لیپاز ۹
۱-۸ روشهای شناسایی لیپازهای جدید در ریزسازواره‌های ۱۰
۱-۹ تنظیم بیان ژن لیپازهای پروکاریوتی ۱۱
۱-۱۰ جایگاه لیپازها در سلولهای باکتریایی ۱۱
۱-۱۱ طبقه‌بندی آنزیم‌های لیپولیتیک باکتریایی ۱۲
۱-۱۱-۱ لیپازهای واقعی (خانواده I) ۱۲
۱-۱۱-۲ خانواده GDSL (خانواده II) ۱۴
۱-۱۱-۳ خانواده III ۱۴
۱-۱۱-۴ خانواده لیپازهای حساس به هورمون (HSL) (خانواده IV) ۱۵
۱-۱۱-۵ خانواده V ۱۵
۱-۱۱-۶ خانواده VI ۱۶
۱-۱۱-۷ خانواده VII ۱۶
۱-۱۱-۸ خانواده VIII ۱۶
۱-۱۲ ویژگیهای لیپازهای باکتریایی ۱۷
۱-۱۲-۱ فعالیت در pH و دماهای مختلف ۱۷

۱-۱۲-۲ پایداری در حضور حلالهای آلی ۱۷
۱-۱۲-۳ اثر یونهای فلزی ۱۸
۱-۱۲-۴ تاثیر مهارکننده‌های روی لیپاز ۱۸
۱-۱۲-۵ تمایل سوبسترایی لیپازهای باکتریایی ۱۹
۱-۱۳ کاربردهای صنعتی لیپازها ۲۰
۱-۱۳-۱ صنایع غذایی ۲۰
۱-۱۳-۲ صنایع شوینده ۲۰
۱-۱۳-۳ صنایع کاغذ و خمیر کاغذ ۲۱
۱-۱۳-۴ صنایع چرم‌سازی ۲۱
۱-۱۳-۵ ساخت ترکیبات شیمیایی ۲۲
۱-۱۳-۶ صنایع نساجی ۲۲
۱-۱۳-۷ صنایع آرایشی ۲۲
۱-۱۳-۸ پزشکی و صنایع دارویی ۲۲
۱-۱۳-۹ تولید سوخت زیستی ۲۳
۱-۱۳-۱۰ حذف آلودگی‌های محیطی ۲۴
۱-۱۴ مهندسی پروتئین ۲۴
۱-۱۴-۱ مهندسی پروتئین با روش منطقی ۲۵
۱-۱۴-۲ مهندسی پروتئین با روش تصادفی ۲۶
۱-۱۵ کاربرد مهندسی پروتئین در بهبود ویژگیهای پروتئین‌ها ۲۷
۱-۱۵-۱ افزایش پایداری ۲۸
۱-۱۵-۱-۱ افزایش پایداری حرارتی ۲۸
۱-۱۵-۲ بهبود ویژگیهای سطحی ۲۹
۱-۱۶ تخلیص لیپاز ۲۹
۱-۱۷ لیپازهای مقاوم به حرارت ۳۰
۱-۱۸ عوامل موثر در پایداری حرارتی لیپازها ۳۱
۱-۱۸-۱ ترکیب اسیدآمینه سازنده لیپاز ۳۱
۱-۱۸-۲ اسیدهای‌آمینه جایگاه فعال ۳۳
۱-۱۸-۳ ترکیب اسیدآمینه‌ای ساختار درپوش ۳۳
۱-۱۸-۴ موتیف‌های AXXXA و GXXXG ۳۳
۱-۱۹ بیان هترولوگ پروتئین‌های نوترکیب در *Escherichia coli* ۳۴

۱-۲۰ دورنگ‌نمایی‌دورانی ۳۵
۱-۲۱ اهداف تحقیق ۳۶

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱ مواد ۳۷
۲-۱-۱ میزبان‌ها ۳۷
۲-۱-۲ پلاسمیدها ۳۷
۲-۱-۳ آنزیم‌ها ۳۸
۲-۱-۴ آغازگرها ۳۸
۲-۱-۵ کیت‌های تجاری ۴۰
۲-۱-۶ نشانگرهای وزن مولکولی DNA و پروتئین ۴۰
۲-۱-۷ محیط کشت ۴۰
۲-۱-۷-۱ محیط غنی‌سازی ۴۰
۲-۱-۷-۲ محیط LB ۴۱
۲-۱-۸ سایر مواد مورد استفاده ۴۱
۲-۲ روشها ۴۱
۲-۲-۱ غربالگری باکتری بومی مولد لیپاز ۴۱
۲-۲-۲ شناسایی باکتریهای مولد لیپاز قلیا حرارت مقاوم ۴۲
۲-۲-۲-۱ بررسی فعالیت آنزیمی با سوبسترای پارانیتروفنیل‌پالمیتات ۴۳
۲-۲-۳ استخراج DNA ژنومی ۴۳
۲-۲-۴ شناسایی مولکولی باکتری Bn12 ۴۴
۲-۲-۴-۱ تکثیر ژن 16S rRNA با PCR ۴۴
۲-۲-۴-۲ همسانه‌سازی محصول PCR در پلاسمید pTZ57R/T ۴۵
۲-۲-۴-۳ تهیه سلولهای مستعد *E.coli* ۴۵
۲-۲-۴-۴ تراریختی سلولهای مستعد با روش شوک حرارتی ۴۶
۲-۲-۴-۵ تعیین توالی ژن 16S rRNA و آنالیز نتایج بدست آمده ۴۶
۲-۲-۵ شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی باکتری Bn12 ۴۷
۲-۲-۶ رسم درختچه فیلوژنتیکی ۴۷
۲-۲-۷ پیش‌بینی تعداد لیپاز(های) ترشحی در باکتری Bn12 ۴۷
۲-۲-۷-۱ زایموگرام ۴۸
۲-۲-۸ ساخت کتابخانه ژنومی ۴۸

۲-۲-۸-۱ برش جزئی DNA ژنومی با آنزیم ۴۹
۲-۲-۸-۲ برش آنزیمی و دفسفریلاسیون پلاسمید(+)pBC KS ۴۹
۲-۲-۸-۳ همسانه‌سازی قطعات DNA ژنومی در پلاسمید(+)pBC KS ۵۰
۲-۲-۹ غربالگری عملکردی کتابخانه ژنومی ۵۱
۲-۲-۱۰ مطالعات بیوانفورماتیکی لیپاز بومی ۵۱
۲-۲-۱۱ واکنش TAIL-PCR ۵۲
۲-۲-۱۱-۱ واکنش اول TAIL-PCR ۵۳
۲-۲-۱۱-۲ واکنش دوم TAIL-PCR ۵۳
۲-۲-۱۱-۳ واکنش سوم TAIL-PCR ۵۴
۲-۲-۱۲ همسانه‌سازی لیپاز بومی در *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ۵۶
۲-۲-۱۲-۱ تکثیر ژن لیپاز ۵۶
۲-۲-۱۲-۲ اضافه نمودن نوکلئوتید آدنین به انتهای محصول PCR ۵۷
۲-۲-۱۲-۳ اتصال ژن لیپاز به پلاسمید pET-26b(+) ۵۸
۲-۲-۱۳ بررسی بیان لیپاز با ژل SDS-PAGE ۶۰
۲-۲-۱۴ بهینه‌سازی شرایط القاء و بیان ژن لیپاز ۶۱
۲-۲-۱۵ تخلیص لیپاز ۶۱
۲-۲-۱۶ اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین ۶۲
۲-۲-۱۷ سنجش فعالیت لیپاز ۶۴
۲-۲-۱۷-۱ اثر دما و pH روی فعالیت و پایداری لیپاز ۶۵
۲-۲-۱۷-۲ بررسی تمایل سوبسترایی لیپاز ۶۵
۲-۲-۱۸ محاسبه بازده خالص‌سازی ۶۶
۲-۲-۱۹ مطالعات بیوانفورماتیکی ساختار لیپاز ۶۶
۲-۲-۲۰ انتخاب جایگاه‌های هدف برای ایجاد جهش ۶۷
۲-۲-۲۰-۱ بررسی اثر جهش‌ها روی ساختار دوم و سوم لیپاز ۶۷
۲-۲-۲۰-۲ بررسی میزان انرژی اتصال لیپازها با لیگاند (Docking) ۶۸
۲-۲-۲۱ ایجاد جهش با روش SOE-PCR ۶۸
۲-۲-۲۱-۱ PCR اول و دوم برای ایجاد جهش N106I ۶۸
۲-۲-۲۱-۲ PCR سوم برای ایجاد جهش N106I ۶۹
۲-۲-۲۱-۳ شرایط انجام واکنش SOE-PCR برای ایجاد سایر جهش‌ها ۷۱
۲-۲-۲۲ همسانه‌سازی و بیان لیپازهای جهش‌یافته در میزبان *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ۷۲

۲-۲-۲۳ جداسازی و بازارایی اجسام نامحلول لیپاز جهش‌یافته N106I ۷۳
۲-۲-۲۴ تخلیص لیپازهای جهش‌یافته ۷۵
۲-۲-۲۵ تعیین خصوصیات لیپازهای جهش‌یافته ۷۶
۲-۲-۲۶ مقایسه فعالیت ویژه لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی ۷۶
۲-۲-۲۷ اثر عوامل شیمیایی مختلف روی فعالیت لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی ۷۶
۲-۲-۲۸ تحلیل آماری داده‌ها ۷۷
۲-۲-۲۹ طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD) ۷۷

فصل سوم: نتایج

۳-۱ غربالگری و انتخاب باکتری مولد لیپاز قلیاحرارت‌مقاوم ۷۸
۳-۲ استخراج DNA ژنومی جدایه Bn12 ۷۹
۳-۳ شناسایی مولکولی جدایه Bn12 ۸۰
۳-۴ شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی باکتری Bn12 ۸۱
۳-۵ رسم درختچه فیلوژنی ۸۲
۳-۶ بررسی تعداد لیپاز(های) ترشحی در باکتری Bn12 ۸۳
۳-۷ ساخت کتابخانه ژنومی ۸۴
۳-۸ غربالگری عملکردی کتابخانه ژنومی ۸۵
۳-۹ تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی لیپاز بومی ۸۷
۳-۱۰ شناسایی ناحیه بالادست ژن لیپاز توسط TAIL-PCR ۹۰
۳-۱۱ همسانه‌سازی لیپاز *ELBn12* در پلاسمید pET-26b(+) ۹۱
۳-۱۲ بیان لیپاز نوترکیب ۹۳
۳-۱۳ بهینه‌سازی بیان لیپاز ELBn12 و تخلیص آن ۹۴
۳-۱۴ اثر دما و pH بر فعالیت و پایداری لیپاز ELBn12 ۹۵
۳-۱۵ بررسی ویژگی سوبسترایی لیپاز ELBn12 ۹۷
۳-۱۶ محاسبه بازده خالص‌سازی لیپاز ۹۸
۳-۱۷ مطالعات نرم‌افزاری ساختار لیپاز ELBn12 ۹۹
۳-۱۷-۱ پیش‌بینی ساختار دوم و سوم لیپاز ELBn12 ۹۹
۳-۱۷-۲ ارزیابی ساختمان سه بعدی لیپاز ELBn12 ۱۰۱
۳-۱۸ مطالعات نرم افزاری ایجاد جهش در لیپاز ۱۰۳
۳-۱۸-۱ بررسی اثر جهش روی پایداری ساختاری لیپاز ELBn12 ۱۰۴

۳-۱۸-۲ اثر جهش‌ها روی ساختار دوم و سوم لیپاز ۱۰۵
۳-۱۸-۳ محاسبه انرژی اتصال لیگاندها با لیپازهای طبیعی و جهش‌یافته ۱۰۷
۳-۱۹ ایجاد لیپازهای جهش‌یافته با روش SOE-PCR ۱۱۰
۳-۲۰ همسانه‌سازی لیپازهای جهش‌یافته در پلاسمید pET26b(+) ۱۱۲
۳-۲۱ بیان لیپازهای جهش‌یافته ۱۱۷
۳-۲۲ تخلیص لیپازهای جهش‌یافته ۱۱۸
۳-۲۳ اثر دما و pH روی فعالیت لیپازهای جهش‌یافته ۱۲۰
۳-۲۴ بررسی پایداری حرارتی لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی ۱۲۵
۳-۲۵ اثر جهش‌ها روی پایداری لیپاز در pHهای مختلف ۱۳۰
۳-۲۶ بررسی ویژگی سوبسترایی لیپازهای جهش‌یافته ۱۳۲
۳-۲۷ مقایسه فعالیت ویژه لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی ۱۳۴
۳-۲۸ اثر عوامل شیمیایی مختلف روی فعالیت لیپازهای طبیعی و جهش‌یافته ۱۳۵
۳-۲۸-۱ تاثیر حلالهای آلی روی فعالیت لیپازهای طبیعی و جهش‌یافته ۱۳۵
۳-۲۸-۲ تاثیر دترجنت‌هاروی فعالیت لیپازهای طبیعی و جهش‌یافته ۱۳۸
۳-۲۸-۳ تاثیر یونهای فلزی روی فعالیت لیپازهای طبیعی و جهش‌یافته ۱۴۰
۳-۲۸-۴ تاثیر EDTA روی فعالیت لیپازهای طبیعی و جهش‌یافته ۱۴۲
۳-۲۹ نتایج طیف سنجی دورنگ نمایی‌دورانی (CD) ۱۴۴
فصل چهارم: بحث ۱۴۶
پیشنهادات ۱۶۲
منابع ۱۶۳

فهرست جدولها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱: لیست آنزیم‌های مورد استفاده ۳۸
جدول ۲-۲: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده ۳۹
جدول ۲-۳: مقادیر بکار رفته در PCR ژن 16S rRNA ۴۴
جدول ۲-۴: برنامه واکنش PCR ژن 16S rRNA ۴۴
جدول ۲-۵: مقادیر مواد مورد نیاز برای هضم جزئی DNA ژنومی ۴۹
جدول ۲-۶: مقادیر مواد مورد نیاز برای برش آنزیمی پلاسمید pBC KS(+) ۵۰
جدول ۲-۷: مقادیر مواد مورد نیاز برای دفسفریلاسیون پلاسمید ۵۰
جدول ۲-۸: مقادیر مواد مورد نیاز برای واکنش اتصال در ساخت کتابخانه ژنومی ۵۱
جدول ۲-۹: مقادیر مواد مورد نیاز برای واکنش اول TAIL-PCR ۵۳
جدول ۲-۱۰: مقادیر مواد مورد نیاز برای واکنش دوم TAIL-PCR ۵۴
جدول ۲-۱۱: مقادیر مواد مورد نیاز برای واکنش سوم TAIL-PCR ۵۵
جدول ۲-۱۲: برنامه سه مرحله واکنش TAIL-PCR ۵۵
جدول ۲-۱۳: مقادیر مواد مورد نیاز برای واکنش PCR ژن لیپاز ۵۷
جدول ۲-۱۴: برنامه واکنش PCR ژن لیپاز ۵۷
جدول ۲-۱۵: مقادیر مواد مورد نیاز برای افزودن A به انتهای محصول PCR ۵۸
جدول ۲-۱۶: برنامه PCR برای افزودن A به انتهای محصول PCR ۵۸
جدول ۲-۱۷: مقادیر مواد مورد نیاز برای برش آنزیمی لیپاز *ELBn12* در ناقل TA ۵۹
جدول ۲-۱۸: مقادیر مواد مورد نیاز برای اتصال ژن *ElBn12* به پلاسمید pET-26b(+) ۵۹
جدول ۲-۱۹: مقادیر مورد نیاز برای ساخت محلول‌های استاندارد BSA ۶۳
جدول ۲-۲۰: مقادیر مواد مورد نیاز برای واکنش SOE-PCR اول و دوم جهش N106I ۶۹
جدول ۲-۲۱: برنامه واکنش SOE-PCR اول ودوم جهش N106I ۶۹
جدول ۲-۲۲: مقادیر مواد مورد نیاز برای واکنش SOE-PCR سوم جهش N106I ۷۰
جدول ۲-۲۳: برنامه واکنش SOE-PCR سوم جهش N106I ۷۰
جدول ۲-۲۴: آغازگرها و شرایط واکنش PCR برای اعمال جهش‌های N106A، K173A و Q177A ۷۱
جدول ۳-۱: نتیجه بلاست توالی ژن 16S rRNA باکتری Bn12 ۸۱
جدول ۳-۲: نتایج صفات بیوشیمیایی مورد بررسی برای باکتری Bn12 ۸۲
جدول ۳-۳: میزان خالص‌سازی و بازده لیپاز طبیعی ۹۹
جدول ۳-۴: پایداری ترمودینامیکی ساختار لیپازهای جهش‌یافته ۱۰۵

جدول ۳-۵: مقدار RMSD ساختار سوم لیپازهای جهش‌یافته نسبت به لیپاز طبیعی..... ۱۰۷
جدول ۳-۶: امتیاز MolDock لیپازهای طبیعی و جهش‌یافته با برخی از سوبستراها..... ۱۰۸
جدول ۳-۷: میزان خالص‌سازی و بازده لیپازهای جهش‌یافته..... ۱۱۹
جدول ۳-۸: جدول تجزیه واریانس اثر آنزیم و دما در فعالیت لیپازها..... ۱۲۰
جدول ۳-۹: جدول تجزیه واریانس اثر آنزیم و pH در فعالیت لیپازها..... ۱۲۱
جدول ۳-۱۰: جدول تجزیه واریانس اثر آنزیم و گرماگذاری در دمای $50^{o}C$ در فعالیت لیپازها..... ۱۲۵
جدول ۳-۱۱: جدول تجزیه واریانس اثر آنزیم و گرماگذاری در دمای $60^{o}C$ در فعالیت لیپازها..... ۱۲۶
جدول ۳-۱۲: جدول تجزیه واریانس اثر آنزیم و گرماگذاری در دمای $70^{o}C$ در فعالیت لیپازها..... ۱۲۶
جدول ۳-۱۳: جدول تجزیه واریانس اثر آنزیم و پایداری pH در فعالیت لیپازها..... ۱۳۰
جدول ۳-۱۴: فعالیت نسبی لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی پس از گرماگذاری در بافرهایی با pH های مختلف..... ۱۳۱
جدول ۳-۱۵: جدول تجزیه واریانس اثر آنزیم و سوبسترا در فعالیت لیپازها..... ۱۳۲
جدول ۳-۱۶: جدول تجزیه واریانس اثر آنزیم و و حلال آلی در فعالیت لیپازها..... ۱۳۶
جدول ۳-۱۷: جدول تجزیه واریانس اثر آنزیم و دترجنت در فعالیت لیپازها..... ۱۳۸
جدول ۳-۱۸: جدول تجزیه واریانس اثر آنزیم و یونهای فلزی در فعالیت لیپازها..... ۱۴۰
جدول ۳-۱۹: جدول تجزیه واریانس اثر آنزیم و EDTA در فعالیت لیپازها..... ۱۴۳
جدول ۳-۲۰: فعالیت نسبی لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی در حضور EDTA..... ۱۴۳
جدول ۳-۲۱: پیش‌بینی درصد ساختارهای دوم لیپازهای طبیعی و جهش‌یافته براساس طیف CD..... ۱۴۵

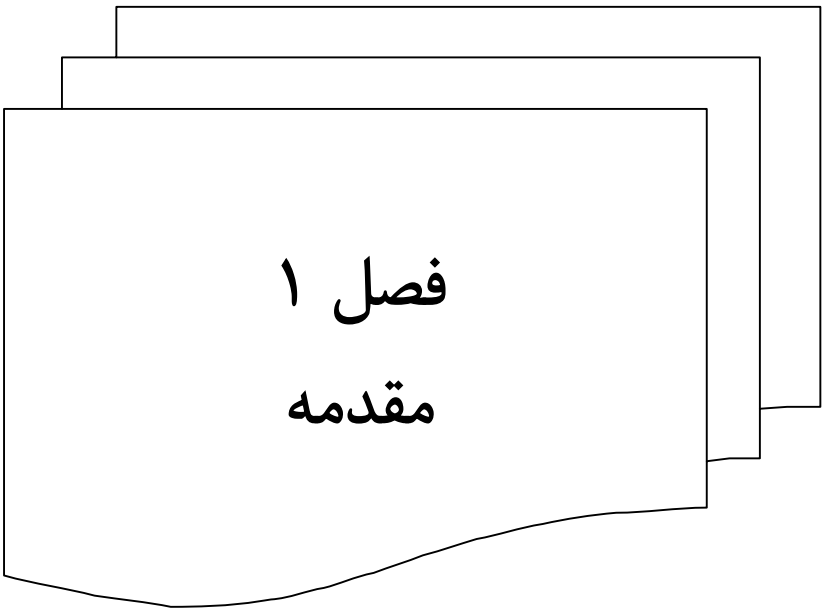
فهرست شکلها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱: واکنشهای مختلفی که توسط لیپازها انجام می‌شود ۳
شکل ۱-۲: مراحل مکانیسم عملکردی لیپازها ۶
شکل ۳-۱: هاله هیدرولیزی باکتریهای مولد لیپاز روی محیط LB حاوی ۰/۵٪ روغن زیتون ۷۹
شکل ۳-۲: الکتروفورز DNA استخراج شده از جدایه Bn12 ۷۹
شکل ۳-۳: الکتروفورز محصول PCR ژن 16S rRNA ۸۰
شکل ۳-۴: الکتروفورز تایید همسانه‌سازی pTA-16S ۸۰
شکل ۳-۵: درختچه فیلوژنی *Enterobacter* sp. Bn12 بر اساس ژن 16S rRNA ۸۳
شکل ۳-۶: الکتروفورز ژل SDS-PAGE و زایموگرام پروتئین‌های تغلیظ شده محیط کشت باکتری Bn12 *Enterobacter* sp. ۸۴
شکل ۳-۷: برش جزئی DNA ژنومی ۸۴
شکل ۳-۸: الکتروفورز برش آنزیمی pBC KS(+) ۸۵
شکل ۳-۹: غربال عملکردی کلنی‌های بدست آمده از کتابخانه ژنومی باکتری Bn12 روی محیط LB حاوی روغن زیتون ۸۶
شکل ۳-۱۰: الکتروفورز پلاسمید pLip و تایید آن ۸۷
شکل ۳-۱۱: توالی نوکلئوتیدی ژن *ELBn12* و توالی اسیدآمینه حاصل از آن ۸۸
شکل ۳-۱۲: همردیفی چندتایی توالی اسیدآمینه پیش‌بینی شده لیپاز ELBn12 (AFU92748) با توالی شبیه‌ترین لیپازهای بدست آمده از بلاست توسط Clustal Omega ۸۹
شکل ۳-۱۳: الکتروفورز محصولات Tail-PCR ۹۰
شکل ۳-۱۴: الکتروفورز محصول PCR لیپاز *ELBn12* ۹۱
شکل ۳-۱۵: الکتروفوز پلاسمید pTA-ELBn12 ۹۲
شکل ۳-۱۶: الکتروفورز برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTA-ELBn12 ۹۲
شکل ۳-۱۷: الکترفورز پلاسمید pYKF و تایید همسانه‌سازی به وسیله PCR ۹۳
شکل ۳-۱۸: بیان لیپاز ELBn12 در *E. coli* BL21 (DE3) pLysS قبل از بهینه‌سازی ۹۳
شکل ۳-۱۹: الکتروفورز ژل SDS-PAGE لیپاز ELBn12 پس از بهینه‌سازی و تخلیص ۹۴
شکل ۳-۲۰: زایموگرام لیپاز ELBn12 پس از خالص‌سازی ۹۵
شکل ۳-۲۱: اثر دما بر فعالیت لیپاز ELBn12 ۹۵
شکل ۳-۲۲: اثر pH بر فعالیت لیپاز ELBn12 ۹۶
شکل ۳-۲۳: اثر دما بر پایداری لیپاز ELBn12 ۹۶

شکل ۳-۲۴: اثر pH بر پایداری لیپاز ELBn12 ..... ۹۷
شکل ۳-۲۵: تمایل سوبسترایی لیپاز ELBn12 ..... ۹۸
شکل ۳-۲۶: ساختار دوم پیش‌بینی شده برای لیپاز ELBn12 توسط برنامه PSIPRED ۱۰۰
شکل ۳-۲۷: مدل پیش‌بینی شده برای ساختار سوم لیپاز ELBn12 ..... ۱۰۱
شکل ۳-۲۸: طرح راماچاندران مدل ساخته شده لیپاز ELBn12 توسط برنامه PROCHECK ۱۰۲
شکل ۳-۲۹: طرح Errat برای مدل لیپاز ELBn12 ..... ۱۰۲
شکل ۳-۳۰: موقعیت ساختاری اسیدهای‌آمینه‌ای از لیپاز ELBn12 که در آنها جهش اعمال شده ۱۰۴
شکل ۳-۳۱: پیش‌بینی ساختار دوم لیپازهای جهش‌یافته‌ای که نسبت به لیپاز طبیعی در آنها تغییر ایجاد می‌شود ۱۰۶
شکل ۳-۳۲: موقعیت قرارگیری لیگاند تری‌کاپریلین در جایگاه فعال آنزیم طبیعی ۱۰۹
شکل ۳-۳۳: پیوندهای هیدروژنی میان لیگاند تری‌بوتیرین و اسیدهای‌آمینه جایگاه فعال برخی از لیپازها ۱۱۰
شکل ۳-۳۴: الکتروفورز محصولات SOE-PCR لیپازهای جهش‌یافته N106I و N106A ۱۱۱
شکل ۳-۳۵: الکتروفورز محصولات SOE-PCR لیپاز جهش‌یافته Q177A ۱۱۱
شکل ۳-۳۶: الکتروفورز محصولات SOE-PCR لیپازهای جهش‌یافته K173A و K173A/Q177A ۱۱۲
شکل ۳-۳۷: الکتروفورز محصول همسانه‌سازی لیپازهای جهش‌یافته در پلاسمید pTZ57R/T ۱۱۳
شکل ۳-۳۸: الکتروفورز برش آنزیمی پلاسمیدهای pTZ57R/T حاوی لیپازهای جهش‌یافته با *Nde*I و *Sac*I ۱۱۳
شکل ۳-۳۹: الکتروفورز محصول همسانه‌سازی لیپازهای جهش‌یافته در pET26b(+) ۱۱۴
شکل ۳-۴۰: الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای YKF برای پلاسمیدهای نوترکیب pET26b(+) حاوی لیپازهای جهش‌یافته ۱۱۵
شکل ۳-۴۱: الکتروفورز برش آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب حاوی لیپازهای جهش‌یافته با *Xba*I و *Hin*dIII ۱۱۵
شکل۳-۴۲: بخشهایی از کروماتوگرام لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی. ۱۱۶
شکل ۳-۴۳: الکتروفورز SDS-PAGE لیپازهای جهش‌یافته در *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ۱۱۷
شکل ۳-۴۴: الکتروفورز SDS-PAGE و زایموگرام لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی پس از تخلیص ۱۱۸
شکل ۳-۴۵: اثر دما و pH بر فعالیت لیپاز جهش‌یافته K173A ۱۲۲
شکل۳-۴۶: اثر دما و pH بر فعالیت لیپاز جهش‌یافته Q177A ۱۲۲
شکل۳-۴۷: اثر دما و pH بر فعالیت لیپاز جهش‌یافته K173A/Q177A ۱۲۳
شکل ۳-۴۸: اثر دما و pH بر فعالیت لیپاز جهش‌یافته N106A ۱۲۴

شکل ۳-۴۹: اثر دما و pH بر فعالیت لیپاز جهش‌یافته N106I ۱۲۴
شکل ۳-۵۰: اثر دمای ۵۰°C بر پایداری لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی ۱۲۷
شکل ۳-۵۱: اثر دمای ۶۰°C بر پایداری لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی ۱۲۸
شکل ۳-۵۲: اثر دمای ۷۰°C بر پایداری لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی ۱۲۹
شکل ۳-۵۳: تمایل سوبسترایی لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی ۱۳۳
شکل ۳-۵۴: فعالیت ویژه لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی ۱۳۵
شکل ۳-۵۵: فعالیت نسبی لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی در حضور حلالهای آلی ۱۳۷
شکل ۳-۵۶: فعالیت نسبی لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی در حضور دترجنت‌ها ۱۳۹
شکل ۳-۵۷: فعالیت نسبی لیپازهای جهش‌یافته و طبیعی در حضور یونهای فلزی ۱۴۱
شکل ۳-۵۸: طیف CD لیپازهای طبیعی و جهش‌یافته در محدوده Far-UV ۱۴۴


فصل ۱
مقدمه