بسم الله الرحمن الرحيم

بسمه تعالی

دانشکده علوم زیستی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد

اعضای هیئت داوران نسخهٔ نهایی پایان‌نامه **آقای حسام طاولی** رشته **زیست شناسی (بیوشیمی)** تحت عنوان:«**کلونینگ و بیان قطعه 192 اسید آمینه ای انتهایی آنزیم آلفاآمیلاز از سویه باسیلوس KR8104 و بررسی ساختاری با استفاده از طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی و فلورسانس**» 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	دکتر خسرو خواجه	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر بیژن رنجبر	استاد	
۳- استاد ناظر داخلی	دکتر منوچهر میرشاهی	دانشیار	
٤- استاد ناظر داخلی	دکتر مجید عرفانی مقدم	استادیار	
٤- استاد ناظر خارجی	دکتر محمدیان	استادیار	
٥- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر منوچهر میرشاهی	دانشیار	

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 اسناد 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....**حسام طاولی**.....دانشجوی رشته.....**بیوشیمی**..... ورودی سال تحصیلی.....۱۳۸۶.....

مقطع .....**کارشناسی ارشد**..... 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 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: .....۸۹/۸/۸.....

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** نگارنده در رشته **بیوشیمی** است که در سال **۱۳۸۹** در دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقایان دکتر **خسرو خواجه و بیژن رنجبر** 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 **حسام طاولی** دانشجوی رشته **بیوشیمی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: **حسام طاولی**

تاریخ و امضا: ۱۹/۸/۸

دانشکده : علوم زیستی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته: بیوشیمی

عنوان پایان نامه:

کلونینگ و بیان قطعه ۱۹۳ اسید آمینه ای انتهایی آنزیم آلفا آمیلاز از سویه باسیلوس KR8104 و بررسی ساختاری با استفاده از طیف سنجی دورنگنمایی دورانی و فلورسانس.

نام دانشجو:

حسام طاولی

استاد راهنما(اصلی):

دکتر خسرو خواجه

استاد راهنما(دوم):

دکتر بیژن رنجبر

تیر- ۱۳۸۹

تقدیم به ستونهای سقف زندگانیم:

پدر، مادر

و

همسرم

خداوند بزرگ را شاکرم به خاطر اینکه عطا کرد بر من آنچه را که لیاقت آن را نداشتم و آن نعمت حیات و زندگانی بود.

از پدرم آقای علی اصغر طاولی و مادرم خانم میترا چیتگرکه در طول زندگی ام همچون کوهی استوار تکیه گاهم بودند متشکرم به خاطر آنچه به من آموختند که والاترین آنها تربیت در راه انسان بودن است.

نهایت تشکر را از همسرم خانم نگین شیرزاد دارم که در طول انجام این پایان نامه با مجود تمامی کاستی ها به معنی واقعی یک همسر در کنارم بود وهمسرم بود.

از خانواده همسرم آقای بهروز شیرزاد و ناهید فیض به خاطر تمامی حمایتها و دلگرمی هایشان بسیار سپاس گذارم.

اساتید راهنمای محترم جناب آقایان دکتر خسرو خواجه و دکتر بیژن رنجبر را لایق تشکری بی نهایت می دانم که در طول شاگردی ایشان درس های بزرگی را آموختم که برای یک عمرکفایت می کند.

در پایان تشکری ویژه از آقایان دکتر سیروس قبادی و دکتر محمد حسین میرمومنی دارم که همچون ابری سخاوتمند از باران علم ومعرفت خود کویر تشنه جانم را سیر آب نمودند و الفبای بیوشیمی را به من آموختند.

لایق بهترین ها از تمامی شما متشکرم

چکیده:

بخش ۱۹۳ اسید آمینه ای انتهای کربوکسیل آنزیم آلفا آمیلاز از سویه باسیلوس KR8104 قطعه پروتئینی می باشد که توسط بخش انتهایی ژن کدکننده آنزیم مربوطه کد می شود ولی در آنزیم ترشح شده از این باکتری دیده نمیشود. با توجه به مشاهدات انجام شده این سئوال مطرح می باشد که نقش قطعه ۱۹۳ اسید آمینه ای انتهای کربوکسیل چیست و چرا این قطعه توسط ژن مربوط به این آنزیم کد می شود در حالی که به نظر می رسد آنزیم مربوطه بدون حضور آن فعالیت خود را می تواند انجام دهد. در تحقیق انجام شده در این پایان نامه ما بخش ژنی کد کننده این قطعه انتهایی را به تنهایی و با کمک یک حامل بیانی در باکتری اشرشیا کلی کلون نمودیم و پس از بیان و خالص سازی قطعه پروتئینی ۱۹۳ اسید آمینه ای انتهایی نقش های احتمالی که ممکن بود این قطعه ۱۹۳ اسید آمینه ای داشته باشد مانند نقش چاپرونی، نقش مهار کنندگی و نقش کمک ترشحی را با استفاده از روشهای بیوشیمیایی مورد مطالعه و بررسی قرار دادیم. همچنین ساختار دوم این قطعه پروتئینی را با استفاده از روش طیف سنجی دورنگنمایی دورانی در آب و حلال های تقلید کننده شرایط غشایی مطالعه نمودیم و با ساختار دوم قطعه پروتئین انتهایی کربوکسیل مشابه موجود در آنزیم آلفا آمیلاز از سویه *Altermonas haloplanctis* مورد مقایسه قرار دادیم. در ادامه مطالعه ساختار پروتئین در حضور و عدم حضور حلال های تقلید کننده شرایط غشایی با استفاده از روش فلورسانس انجام شد. نتایج مطالعات بیوشیمیایی نشان داد که قطعه۱۹۳ اسید آمینه ای انتهای کربوکسیل کد شده توسط بخش ژنی انتهایی کد کننده آنزیم آلفا آمیلاز از سویه باسیلوس KR8104 نقش چاپرونی و مهارکنندگی را دارا نمی باشد و با توجه به نتایج حاصل از روشهای بیوشیمیایی و روش طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی و فلورسانس

این احتمال وجود دارد که قطعه انتهای کربوکسیل مانند قطعه انتهای کربوکسیل آنزیم آلفا آمیلاز باکتری *Altermonas haloplanctis* یک کمک کننده ترشحی باشد.

کلید واژگان:

آلفا آمیلاز، کربوکسیل ترمینال، نقش چاپرونی، حلال های تقلید کننده غشایی، دورنگ نمایی دورانی، فلوئورسانس.

فهرست مطالب

فصل اول مقدمه..... ۱

۱-۱ آنزیم ها..... ۲

۱-۲ منابع آنزیمی..... ۳

۱-۲-۱ میکروارگانیسم ها به عنوان عمده ترین منابع آنزیمی..... ۳

۱-۲-۲ موقعیت تاکسونومیک تولید کننده های شناخته شده آنزیمی..... ۳

۱-۳ بازار جهانی آنزیم..... ۴

۱-۴ نشاسته..... ۵

۱-۴-۱ استفاده های صنعتی نشاسته..... ۵

۱-۴-۱-۱ تولید اتانول..... ۶

۱-۴-۱-۲ شیرین کننده ها و شربت ها..... ۶

۱-۴-۱-۳ اسید لاکتیک..... ۶

۱-۴-۱-۴ بیومس میکروبی..... ۷

۱-۵ آنزیم های تبدیل کننده نشاسته..... ۷

۱-۵-۱ اندوآمیلازها..... ۷

۱-۵-۲ اگزوآمیلازها.....۸

۱-۵-۳ آنزیم های شاخه شکن.....۹

۱-۵-۴ ترانسفرازها.....۹

۱-۶ طبقه بندی آنزیم هایی که فعالیت آلفا آمیلازی نشان می دهند.....۱۰

۱-۷ طبقه بندی گلیکوزیل هیدرولاز ها؛ موقعیت آلفا آمیلاز.....۱۲

۱-۸ رابطه آلفا آمیلازهای خانواده GH13 با GH57.....۱۲

۱-۹ ساختار مولکولی آلفا آمیلازها.....۱۳

۱-۹-۱ دمین های آلفا آمیلاز.....۱۳

۱-۹-۲ جایگاه فعال آلفا آمیلازها.....۱۵

۱-۹-۳ یون کلسیم.....۱۵

۱-۱۰ توالی اسید آمینه ای و نواحی حفظ شده آلفا آمیلازها.....۱۵

۱-۱۱ آنزیم آلفا آمیلاز از سویه باکتریایی Bacillus sp. KR ۸۱۰۴ .....۱۶

۱-۱۲ ژن آنزیم آلفا آمیلاز از سویه باکتریایی Bacillus sp. KR ۸۱۰۴.....۱۷

۱-۱۳ مقایسه توالی اسیدآمینه ای استنتاج شده از توالی ژن کامل آلفا آمیلاز سویه Bacillus sp

KR ۸۱۰۴ با نتایج به دست آمده از مطالعه کریستالوگرافی اشعه ایکس این آنزیم.....۱۹

۱-۱۴ سرنوشت ۴۴ اسیدآمینه انتهای آمینو.....۱۹

۱-۱۵ آنزیم آلفا آمیلاز دارای قطعه ۱۹۳ اسید آمینه ای انتهای کربوکسیل (آنزیم نابالغ) و آنزیم فاقد قطعه۱۹۳ اسید آمینه ای (آنزیم بالغ)..... ۲۰
۱-۱۶ مقایسه آنزیم آلفا آمیلاز بالغ و نابالغ..... ۲۰
۱-۱۷ اهمیت فنون DNA نوترکیب..... ۲۱
۱-۱۷-۱ انتخاب میزبان بیان ژن..... ۲۱
۱-۱۷-۲ راهبردهای نسخه برداری (انتخاب حاملین بیان ژن)..... ۲۲
۱-۱۷-۲-۱ Replicon..... ۲۳
۱-۱۷-۲-۲ مارکر مقاوم به آنتی بیوتیک..... ۲۳
۱-۱۷-۲-۳ پروموتر (تنظیم نسخه برداری)..... ۲۳
۱-۱۷-۳ سیستم بیان pET..... ۲۴
۱-۱۸ استراتژی خالص سازی محصول نوترکیب..... ۲۶
۱-۱۸-۱ سیستم های تمایلی..... ۲۷
۱-۱۹ ترشح پروتئین در باکتری ها..... ۲۸
۱-۱۹-۱ مسیرهای ترشح پروتئین در باسیلوس سوبتیلیس..... ۲۸
۱-۱۹-۱-۱ مسیر Sec-SRP..... ۲۹
۱-۱۹-۱-۱-۱ ساختار سیگنال پپتیدهای ترشحی (نوع Sec)..... ۳۰

۲-۲-۲-۳ محیط کشت LB مایع.....۴۱

۲-۲-۲-۴ محیط کشت LB جامد.....۴۱

۲-۳ دستورزی ملکول DNA.....۴۲

۲-۳-۱ کلون کردن قطعه ژنی کد کننده قطعه ۱۹۳ اسیدآمینه ای انتهای کربوکسیل.....۴۲

۲-۳-۱-۱ طراحی پرایمر.....۴۲

۲-۳-۱-۲ مراحل PCR.....۴۳

۲-۳-۱-۳ هضم آنزیمی.....۴۴

۲-۳-۱-۳-۱ انجام واکنش هضم آنزیمی محصول PCR و حامل (+) pET۲۸-a....۴۵

۲-۳-۱-۴ الحاق.....۴۶

۲-۳-۱-۴-۱ الحاق محصول PCR و حامل (+) pET۲۸-a.....۴۶

۲-۳-۱-۵ ترانسفورماسیون محصول الحاق به باکتری اشریشیا کولی (XL۱-blue).....۴۷

۲-۳-۱-۵-۱ تهیه باکتری مستعد.....۴۷

۲-۳-۱-۵-۲ ترانسفورم کردن محصول الحاق به درون باکتری مستعد XL۱-blue.....۴۸

۲-۳-۱-۶ تعیین پلاسمیدهای نوترکیب.....۴۹

۲-۳-۱-۷ تأیید کلونی های نوترکیب ۵۰

۲-۳-۲ تعیین ترادف.....۵۱

۱-۱۹-۱-۱-۲ فرآیند ترشح پروتئین های وابسته به مسیر Sec-SRP.....۳۱

۱-۱۹-۱-۲ مسیر Twin- arginine (Tat).....۳۲

۱-۱۹-۱-۲-۱ ساختار سیگنال پپتیدهای ترشحی (نوع Tat یا RR/KR).....۳۲

۱-۱۹-۱-۲-۲ فرآیند ترشح پروتئین های وابسته به مسیر Tat.....۳۳

۱-۱۹-۱-۳ مسیر ترشحی ABC ۳۳

۱-۱۹-۱-۳-۱ سیگنال پپتید های لنتی بیوتیک و فرومون.....۳۴

۱-۲۰ ترشح پروتئین در باکتری های گرم منفی.....۳۵

فصل دوم مواد و روش ها.....۳۸

۲-۱ مواد شیمیایی.....۳۹

۲-۲ میکروارگانیسم ها و محیط های کشت مورد استفاده.....۳۹

۲-۲-۱ میکروارگانیسم ها و پلاسمیدها.....۳۹

۲-۲-۲ محیط های کشت میکروبی (gr/lit).....۴۱

۲-۲-۲-۱ محیط های کشت مورد نیاز برای رشد باکتری Bacillus sp. KR۸۱۰۴ .....۴۱

۲-۲-۲-۲ محیط کشت مایع برای کشت سویه وحشي Bacillus sp. KR۸۱۰۴ .....۴۱

۲-۳-۳ ترانسفورماسیون پلاسمید pET۲۸-a (+) نوترکیب حاوی ژن کدکننده قطعه ۱۹۳
اسید آمینه ای انتهای کربوکسیل به درون باکتری BL-۲۱.....۵۱
۲-۴ القاء باکتری و بیان قطعه ژنی کلون شده و بررسی امکان وجود قطعه ۱۹۳
اسید آمینه ایدر فرکشن های مختلف سلولی با استفاده از روش SDS-PAGE.....۵۱
۲-۴-۱ بیان ژن.....۵۱
۲-۴-۲ بررسی بیان پروتئین نوترکیب مربوطه و امکان حضور آن در فرکشن های مختلف
سلولی در زمانهای مختلف با استفاده از روش الکتروفورز و خالص سازی پروتئین.....۵۲
۲-۴-۲-۱ الکتروفورز پروتئین ها به روشSDS-PAGE.....۵۳
۲-۵ تخلیص پروتئین های نوترکیب.....۵۵
۲-۵-۱ بافر های مورد نیاز تخلیص پروتئین نوترکیب.....۵۵
۲-۵-۲ روش تخلیص پروتئین نوترکیب.....۵۶
۲-۶ بررسی میزان خلوص هر یک از خروجی ها.....۵۷
۲-۷ تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد.....۵۷
۲-۸ مطالعه اثر قطعه انتهای کربوسیل بر میزان فعالیت آنزیم آمیلاز بالغ.....۵۹
۲-۸-۱ روش Bernfeld.....۵۹
۲-۹ بررسی وابستگی مطلق تاخوردگی مجدد آنزیم آمیلاز بالغ به قطعه انتهای کربوکیسل...۶۰

۲-۱۰ بررسی اثر EDTA برتاخوردگی مجددآنزیم بالغ.....۶۱

۲-۱۱ بررسی تاخوردگی مجدد آنزیم آمیلاز نابالغ.....۶۱

۲-۱۲ آنالیز قطعه های پروتئینی ترشح شده به محیط کشت در سویه وحشیBacillus sp

KR ۸۱۰۴ .....۶۱

۲-۱۳ بررسی مقایسه ای الگوی هضم آنزیم های آمیلاز بالغ و نابالغ و قطعه انتهایی کربوکسیل

توسط آنزیم پروتئاز کیموتریپسین بایکدیگر.....۶۲

۲-۱۴ بررسی فعالیت باقی مانده آنزیم های آمیلاز بالغ و نا بالغ پس از هضم پروتئازی توسط

آنزیم کیموتریپسین.....۶۳

۲-۱۵ مطالعات ساختاری قطعه انتهایی کربوکسیل.....۶۳

۲-۱۵-۱ مطالعات طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی ناحیه UV دور قطعه پروتئین

انتهایی کربوکسیل.....۶۳

۲-۱۵-۲ مطالعه ساختار قطعه ۱۹۳ اسیدآمینه ای انتهایی کربوکسیل در حلال های

تقلید کننده شرایط هیدروفوب غشایی از قبیل (TFE) Trifluoroethanol-۲,۲,۲ و

Sodium dodecyl Sulfat (SDS) به عنوان مدل غشای.....۶۴

۲-۱۵-۳ مطالعات فلورسانس ذاتی.....۶۴

۲-۱۶ پیشگویی ساختار دوم و سوم پروتئین.....۶۴

۲-۱۷ واحد آنزیمی.....۶۵

فصل سوم نتایج.....۶۶

۳-۱ بررسی الگوی ترشح قطعه های پروتئینی ترشح شده به محیط کشت در سویه وحشی Bacillus sp. KR ۸۱۰۴.....۶۷

۳-۲ انجام PCR به منظور به دست آوردن قطعه ژنی کدکننده قطعه ۱۹۳ اسیدآمینه ای انتهای کربوکسیل.....۶۷

۳-۳ هضم آنزیمی محصول PCR و حامل بیانی pET۲۸-a (+) ۶۸

۳-۴ الحاق.....۶۹

۳-۵ ترانسفورماسیون.....۷۰

۳-۶ تشخیص کلونی های حاوی پلاسمید نوترکیب.....۷۰

۳-۷ توالی نوکلئوتیدی قطعه ژنی کد کننده قطعه ۱۹۳ اسید آمینه ای انتهای کربوکسیل کلون شده در حامل pET۲۸-a (+) ۷۲

۳-۸ ترانسفور ماسیون پلاسمید استخراج شده از کلنی ۲۰ درون باکتری BL-۲۱.....۷۴

۳-۹ بیان پروتئین نوترکیب مربوطه و بررسی امکان حضور آن در فرکشن های مختلف سلولی

در زمانهای مختلف با استفاده از روش الکتروفورز.....۷۴

۳-۱۰ تخلیص.....۷۶

۳-۱۱ تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد ۷۷

۳-۱۲ مطالعه اثر قطعه انتهای کربوسیل بر میزان فعالیت آنزیم آمیلاز بالغ.....۷۷

۳-۱۳ بررسی اثر غلظت های مختلف اوره برمیزان فعالیت آنزیم بالغ به عنوان معیاری از

واسرشتگی آنزیم.....۷۸

۳-۱۴ بررسی وابستگی مطلق تاخوردگی مجدد آنزیم آمیلاز بالغ به قطعه انتهای کربوکیسل....۷۸

۳-۱۵ اثر EDTA بر تاخوردگی مجدد آنزیم آمیلاز بالغ.....۷۹

۳-۱۶ بررسی تاخوردگی مجدد آنزیم آمیلاز نابالغ.....۷۹

۳-۱۷ بررسی مقایسه ای الگوی هضم آنزیم های آمیلاز بالغ و نابالغ و قطعه انتهایی کربوکسیل

توسط آنزیم پروتئاز کیموتریپسین بایکدیگر.....۸۰

۳-۱۸ بررسی فعالیت باقی مانده آنزیم های آمیلاز بالغ و نا بالغ پس از هضم پروتئازی توسط

آنزیم کیموتریپسین.....۸۱

۳-۱۹ مطالعات ساختاری قطعه انتهایی کربوکسیل.....۸۲

۳-۱۹-۱ مطالعات دورنگ نمایی دورانی ناحیه UV دور.....۸۲

۳-۱۹-۲ مطالعات دورنگ نمایی دورانی درحضور غلظت های مختلف ماده - ۲,۲,۲

Trifluoroethanol ۸۳

۳-۱۹-۳ مطالعات دورنگ نمایی دورانی در حضور غلظت های مختلف سدیم دودسیل سولفات..... ۸۴

۳-۱۹-۴ مطالعات فلورسانس ذاتی قطعه انتهای کربوکسیل..... ۸۶

۳-۲۰ پیشگویی ساختار دوم پروتئین..... ۸۸

۳-۲۱ پیشگویی ساختار سوم پروتئین..... ۸۹

فصل چهارم بحث و نتیجه گیری..... ۹۰

۴-۱ بیان قطعه ژنی کد کننده پروتئین انتهای کربوکسیل مربوطه و بررسی امکان حضور پروتئین در فرکشن های مختلف سلولی در زمانهای مختلف..... ۹۱

۴-۲ تخلیص پروتئین قطعه انتهایی کربوکسیل..... ۹۱

۴-۳ اثر قطعه انتهای کربوسیل بر میزان فعالیت آنزیم آمیلاز بالغ..... ۹۲

۴-۴ اثر غلظت های مختلف حلال اوره بر فعالیت آنزیم بالغ به عنوان معیاری از واسرشتگی آنزیم..... ۹۲

۴-۵ وابستگی مطلق تاخوردگی مجددآنزیم آمیلاز بالغ به انتهایکربوکیسل..... ۹۳

۴-۶ اثر EDTA بر تاخوردن آنزیم بالغ.....۹۳

۴-۷ بررسی تاخوردگی مجدد آنزیم آمیلاز نابالغ.....۹۴

۴-۸ آنالیز قطعات ترشح شده به محیط خارج سلولی توسط باکتری سویه Bacillus sp. KR ۸۱۰۴.....۹۴

۴-۹ هضم پروتئازی آنزیم بالغ و نابالغ و قطعه انتهای کربوکسیل.....۹۵

۴-۱۰ مطالعات ساختاری توسط طیف سنجی دو رنگ نمایی دوران (CD) و فلورسانس...۹۶

۴-۱۰-۱ مطالعات ساختاری توسط طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی ناحیه UV دور قطعه انتهای کربوکسیل.....۹۶

۴-۱۰-۲ بررسی تغییرات ساختار دوم پروتئین در حضور حلال های تقلید کننده شرایط غشایی.....۱۰۰

منابع.....۱۰۲