بسم الله الرحمن الرحیم
الحمد لله رب العالمین الرحمن الرحیم مالک یوم الدین
اهدنا الصراط المستقیم
صراط الذین انعمت علیهم غیر المغضوب علیهم
ولا الضالین

دانشگاه الزهرا (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته بیوتکنولوژی میکروبی

عنوان

غربالگری ژن DNA پلیمراز I در بین باسیلوس های گرمادوست بومی

استاد راهنما

دکتر سارا غروی

دکتر عزت عسگرانی

دانشجو

سمیرا محمودنیا

تابستان ۹۱

کلیه دستاوردهای ناشی از تحقیق فوق متعلق به دانشگاه الزهرا (س) است.

خداوندا

تو را بر نعمت های پی در پی و احسان همیشگی ات سپاس می گویم که همواره نضر لطف بر بندگان خود داری و اجر تلاششان را چه نیکو می پردازی. سر تعظیم به درگاهت فرود می آورم که شاید قدر شناس نعمت هایت باشم.

تقدیم به :

پدر و مادر بزرگوارم

به پاس آنکه رنج و مشقت پرورشم را به جان خریدند

کوشش هایم را ستودند و

از پیشرفتم مسرور گشتند

تقدیر و سپاس

بی شک این اثر ثمره الطاف الهی و یاری اساتید و سرورانی است که در طول مدت تحصیل، اینجانب را با بذل محبت، رهین منت خویش ساخته و همواره از ارشادشان بهره مند بوده ام، لذا مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به این عزیزان ابراز داشته، توفیق روز افزون آنان را از درگاه ایزد منان مسئلت می نمایم:

سرکار خانم دکتر سارا غروی

استاد فرزانه که راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشته و همواره با توان علمی و تجربه بالای خود در پیشرفت مرحله به مرحله آن، مرا مورد لطف خود قرار دادند.

سرکار خانم دکتر عزت عسگرانی

استاد گرانقدرم که زحمت راهنمایی این پایان نامه را تقبل کرده و با تدبیر خود مرا در مراحل مختلف انجام این پایان نامه یاری نمودند.

جناب آقای دکتر فولادی

استاد ارجمند که زحمت مطالعه و داوری این پایان نامه را تقبل کرده، همچنین با همکاری خود در مواقع لزوم اینجانب را مورد مساعدت قرار دادند.

جناب آقای دکتر صادقی زاده

استاد گرامی که بذل محبت نموده، زحمت مطالعه و داوری این پایان نامه را تقبل نمودند.

همکاران گرامی و دوستان ارجمندم

واجب می دانم مراتب تشکر و قدردانی خود را به تمامی همکاران و دوستانم در آزمایشگاه ژنتیک و میکروبیولوژی که به هر طریقی در پیشرفت این پایان نامه با اینجانب همکاری نموده اند، ابراز نمایم و از درگاه ایزد منان برای این عزیزان توفیق روزافزون خواستارم.

چکیده :

DNA پلیمراز ها از آنزیم های مهم و اساسی در حفظ، همانندسازی و انتقال اطلاعات ژنتیکی در تمام ارگانیسم ها می باشند.. DNA پلیمراز ها کاربرد های فراوانی در بیولوژی مولکولی، به ویژه در PCR و توالی یابی دای دی اکسی دارند. شناسایی *Taq polymerase* انقلابی در بیولوژی مولکولی به وجود آورد. از آن پس تحقیقات در این زمینه جهش چشمگیری پیدا کرد و DNA پلیمراز های مقاوم به حرارت مختلفی برای دست یابی به آنزیمی با ویژگی های مطلوب مورد مطالعه قرار گرفتند. مطالعه حاضر نیز با هدف آشکار سازی ظرفیت بالقوه و تعیین ویژگی های DNA پلیمراز های مقاوم به حرارت یوباکتر های جمع آوری شده از چشمه های آب گرم اردبیل انجام گرفت. با توجه به ناشناخته بودن سویه های بومی، سویه های مورد مطالعه به روش فیلوژنی مولکولی با استفاده از توالی ژن ۱۶S rDNA تعیین هویت شدند. بررسی ها نشان دادند که سویه های مورد مطالعه به جنس *Geobacillus* تعلق دارند. سپس با استفاده از توالی بخش های حفاظت شده این ژن در باسیلوس های گرما دوست گوناگون، پرایمر هایی برای شناسایی دامنه های مختلف این ژن در سویه های بومی طراحی گردید. آنالیز توالی ها و دامنه ها در ۸ سویه مورد مطالعه نشان داد که این آنزیم به خانواده A آنزیم های DNA پلیمراز تعلق دارد و دارای دامنه ′۵ به′۳ اگزونوکلئازی و فاقد دامنه ′۳ به ′۵ اگزونوکلئازی می باشد. در مرحله بعد عصاره سلولی این باکتری ثهیه و در واکنش PCR جایگزین Taq پلیمراز گردید. نتایج نشان داد که آنزیم DNA پلیمراز موجود در عصاره سلولی توانایی انجام واکنش PCR را دارد.

کلمات کلیدی : ترموفیل، DNA پلیمراز مقاوم به حرارت، حفاظت شده

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : کلیات و مروری بر پیشینه پژوهش

چکیده ..... أ

مقدمه ۱

۱-۱ اکسترموفیل ها، منبع بیوکاتالیست های جدید..... ۲

۱-۱-۲ خصوصیت آنزیم های جدا شده از باکتری های ترموفیل ۴

۱-۱-۳ مصارف صنعتی آنزیم های ترموفیل ۴

۱- ۲ ژئوباسیلوس ها ۵

۱- ۳ DNA پلیمراز ۷

۱-۳-۱ ساختارعمومی DNA پلیمرازها ۸

۱-۳-۲ خانواده های DNA پلیمرازها ۱۱

۱ - ۴ DNA پلیمراز های پروکاریوتی ۱۲

۱-۴-۱ DNAپلیمراز I ۱۲

۱-۴-۲ DNA پلیمراز II ۱۴

۱-۴-۳ DNA پلیمراز III ۱۴

۱-۵ DNA pol I , ویژگی ها و عملکرد آن..... ۱۴

فهرست مطالب

عنوان	صفحه

۱ -۵-۱ همانند سازی و پلیمریزاسیون ۱۴

۱-۵-۲ فعالیت ′۵-′۳ اگزوئوکلئازی یا غلط گیری ۱۵

۱-۵-۳ فعالیت ′۳-′۵ اگزونوکلئازی ۱۶

۱-۶ DNA پلیمراز های مقاوم به حرارت و کاربرد در تکنیک های مولکولی ۱۷

۱-۶-۱ DNA پلیمراز های مقاوم به حرارت با ویژگی های جدید ۱۹

۱-۶ -۲ DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت بومی ۲۲

۱- ۷ هدف از انجام پژوهش ۲۳

فصل دوم : مواد و روش ها

۲-۱ ابزار و وسایل مورد استفاده ۲۵

۲-۲ مواد ۲۶

۲-۳ باکتری ها ۲۷

۲-۳-۱سویه *Geobacillus stearothermophillus* ۲۷

۲-۳- ۲ سویه *Geobacillus kastuphillus* ۲۷

۲- ۳-۳ باکتری های بومی و روش نگه داری آنها ۲۷

۲- ۴ محیط کشت ۲۸

۲- ۴- ۱ محیط کشت TSB (Triple Sugar Broth)..... ۲۸

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۵ مراحل انجام پژوهش به صوت گام به گام ۲۸

۲- ۵- ۱ کشت باکتری ۲۸

۲- ۵- ۲ استخراج DNA ژنگان از سویه های استاندارد و بومی ۲۹

۲-۵-۲-۱ استخراج DNA ژنگانی با استفاده از روش Set Buffer ۲۹

۲- ۵- ۳ ارزیابی کیفیت و غلظت DNA استخراج شده ۳۰

۲-۵-۳-۱- سنجش غلظت و خلوص DNA به وسیله نانودراپ ۳۱

۲-۵-۳-۲ ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز..... ۳۱

۲-۵-۴ تعیین هویت سویه های ترموفیل بومی به روش مولکولی ۳۳

۲-۵-۴-۱تکثیر بخشی از توالی ۱۶ S rDNA به وسیله PCR ۳۳

۲-۵-۴-۲ تعیین توالی محصول PCR ژن ۱۶S rDNA ۳۶

۲-۵-۴-۳ آنالیز توالی حاصل از تعیین توالی ژن ۱۶S rDNA ۳۶

۲-۵-۴-۴ ترسیم درخت فیلوژنتیک ۳۶

۲-۵-۵ روش به کار رفته جهت حصول بلند ترین توالی ژن DNA پلیمراز I ۳۷

تکثیر دامنه های مختلف ژن DNA پلیمراز I سویه های بومی ۳۷

فهرست مطالب

عنوان	صفحه

۲-۵-۵-۱ شناسایی دامنه ٔ۵ به ٔ۳پلیمرازی ۳۷

۲-۵-۵-۲ تکثیر بلند ترین توالی ژن DNA پلیمراز I در سویه های بومی ۴۰

۲-۵-۵-۲-۱ تعیین توالی محصول PCR ۴۲

۲-۵-۵-۲-۲ آنالیز توالی حاصل از تعیین توالی ژن DNA پلیمراز ۴۲

۲-۵-۵-۳ شناسایی دامنه ٔ۳ به ٔ۵ اگزونوکلئازی ۴۳

۲ - ۶ تخلیص عصاره سلولی باکتری ۴۵

۲-۶-۱ تغلیظ عصاره سلولی با آمونیوم سولفات ۴۶

۲-۶-۲ دیالیز پروتئین ها ۴۷

۲-۶-۳ الکتروفورز پروتئین ها به روش SDS-PAGE ۴۹

۲-۶-۴ انجام واکنش PCR با استفاده از کل پروتئین سلولی ۵۳

۲-۶-۵ تخلص آنزیم DNA پلیمراز با ستون DEAE-sepharose C۱-۶B ۵۵

۲-۶-۵- ۱ مراحل آماده سازی ستون کروماتوگرافی ۵۵

۲-۶-۶ سنجش فعالیت آنزیمی DNA پلیمراز I با انجام واکنش PCR ۵۷

۲-۶-۶-۱ استخراج از ژل به روش فنل/کلروفورم ۵۸

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل سوم : نتایج

۳-۱ کشت باکتری..... ۶۱

۳-۲ استخراج DNA ژنومی..... ۶۱

۳-۳ تکثیر بخشی از توالی DNA ژنومی سویه های بومی ۶۲

۳- ۴ تعیین توالی محصول PCR بخشی از توالی ژن ۱۶S rDNA ۶۳

۳- ۵ رسم درخت فیلوژنتیک ۶۳

۳- ۶ تکثیر بخش پلیمرازی سویه های بومی ۶۴

۳-۷ تکثیر حداکثر توالی ژن DNA پلیمراز I سویه های بومی ۶۵

۳- ۸ تعیین توالی قطعه ۲۴۵۰ جفت بازی ژن DNA پلیمراز I سویه های بومی ۶۶

۳- ۹ تکثیر قسمت میانی ژن DNA پلیمراز I سویه های بومی ۶۶

۳- ۱۰ تعیین توالی قسمت میانی ژن DNA پلیمراز I سویه های بومی ۶۶

۳-۱۱ بررسی ۲۴۵۰ جفت باز از ژن DNA پلیمراز I سویه های بومی ۶۸

۳-۱۱-۱ بررسی جایگاه فعال و تعیین رزیدوهای مهم در فعالیت پلیمرازی ۶۸

۳-۱۱-۲ بررسی توالی دامنه ´۳به´۵ اگزونوکلئازی ۷۱

۳-۱۱-۳ بررسی توالی دامنه ´۵ به ´۳ اگزونوکلئازی ۷۲

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳- ۱۲ باند پروتئینی DNA پلیمراز I به همراه سایر پروتئین های سیتوپلاسمی بر روی ژلSDS -PAGE ۷۲

۳-۱۳ نتیجه حاصل از واکنش PCR با استفاده از پروتئین کل سلول ۷۳

۳-۱۴ نتیجه حاصل از واکنش PCR بعد از خالص سازی آنزیم با ستون DEAE-sepharose C۱-۶B..... ۷۴

۳-۱۵ باند پروتئینی DNA پلیمراز I بعد از عبور از ستون بر روی ژل SDS-PAGE ۷۶

فصل چهارم : بحث و پیشنهادات

۴-۱ استخراج DNA ژنومی ۷۹

۴-۲ تعیین هویت سویه ها و رسم درخت فیلوژنتیک ۸۰

۴-۳ تکثیر ژن DNA پلیمراز I سویه های بومی ۸۱

۴-۴ بررسی های بیوانفورماتیکی و فعالیت های بالقوه DNA پلیمراز جدید ۸۲

۴-۵ تخلیص و انجام واکنش PCR با استفاده از عصاره سلولی باکتری ترموفیل بومی ۸۴

۴-۶ پیشنهادها ۸۵

پیوست ۸۷

فهرست مطالب

عنوان	صفحه

فهرست منابع ۸۹

اختصارات به کار رفته	نام کامل
Sp	Species (گونه) {مفرد}
Spp	Species (گونه) {جمع}
g	Gram (گرم)
°C	Centigrade (سانتیگراد)
cc	Cubic Centimetre (سی سی)
ml	Mililitre (میلی لیتر)
OD	Optical density (جذب نوری)
TSB	Triple Sugar Bruth
UV	Ultraviolet (ماوراء بنفش)
PCR	Polymerase Chain Reaction واکنش زنجیره ای پلیمراز
Taq	Taq polymerase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat (سدیم دو دسیل سولفات)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic

فصل اول

مقدمه

مقدمه

نقش آنزیم ها در فرآیندهای زیستی مدت زیادی است که شناخته شده به طوری که تاریخچه کاربرد آنها به زمان یونان قدیم بر می گردد که از آنزیم های میکروارگانیسم ها در آشپزی، تولید الکل، پنیر و ..... استفاده می کردند (Vieille and Zeikus , ۲۰۰۱). آنزیم های مزوفیل اغلب برای شرایط واکنش های شدید که در پروسه های صنعتی مورد نیاز است، مناسب نیستند چون فاقد پایداری لازم می باشند (Demirjian and Morís-Varas, ۲۰۰۱). به همین دلیل استفاده ازبیوکاتالسیت های جدید(خصوصا مقاوم به حرارت) در واکنش های آلی از نیازهای ضروری صنایع مختلف می باشد. در سال ۱۹۶۷ Thomas D Brock از دانشگاه Wisconsin برای اولین بار وجود میکرو ارگانیسم هایی را گزارش کرد که دمای اپتیمم رشد آنها بالاتر از ۷۵ درجه بوده و در چشمه آب داغ پارک ملی Yellowstone رشد می کردند (Trinidad and Barros, ۲۰۰٦)(Bruins *et al.,* ۲۰۰۱). از آن زمان تاکنون ترموفیل ها به دلیل ویژگی های منحصر بفرد بسیار مورد توجه قرار گرفته اند و موضوعی چالش برانگیز و جذاب را برای محققان ایجاد کرده اند. اجزای سلولی ارگانیسم های ترموفیل (آنزیم ها، پروتئین ها و نوکلئیک اسید ها) به حرارت مقاوم هستند. علاوه بر دمای بالا، آنها به دناتوراسیون در شرایط اسیدی یا بازی شدید هم مقاومند و همین ویژگی ها سبب شده که مورد توجه بسیاری از صنایع قرار گیرند. با توجه به این که میکروارگانیسم ها منبع دائمی تولید کننده این بیوکاتالیست ها می باشند، جداسازی و غربالگری آنها به منظور دست یابی به آنزیم های جدید با ویژگی های مطلوب از اهمیت ویژه ای برخوردار است (Dalboge and Lange, ۱۹۹۸) (Aehle.W ۲۰۰٤). آنزیم های DNA پلیمراز به خاطر نقش کلیدی در شکل گیری و تداوم حیات سلولی و نیز جایگاه ویژه در زیست شناسی مولکولی، از اهمیت ویژه ای برخوردار است و در بین آنها DNA پلیمرازI به دلیل نقشی که در پشبرد تحقیقات ژنتیک مولکولی دارد از بقیه ممتازترمی باشد.

۱-۱ اکسترموفیل ها، منبع بیوکاتالیست های جدید

زندگی میکروبی به محیط های خاص محدود نمی شود و جوامع میکروبی در محیط های متنوعی یافت می شوند. اکسترموفیل ها موجوداتی هستند که در محیط هایی با شرایط ویژه[۱] تکامل یافته اند. آنها در نیچه های اکولوژیکی چون اعماق دریا، چشمه های آب گرم،زمین های سولفاته و..... به خوبی رشد کرده و با این شرایط سخت سازگار شده اند. در نتیجه، آنها بیوکاتالیست هایی را تولید می کنند که در شرایط نا متعادل هم عمل می کند. قلمرو اکسترموفیل ها به طور قابل توجهی گسترده است. آنها به رده های حقیقی از جمله گرمادوست ها، اسیددوست ها (pH<۴)، قلیا دوست ها (pH>۹)، سرمادوست ها، فشار دوست ها تعلق دارند. اکثریت آنها اعضاء گروه آرکی باکترها هستند اما تعدادی نیز به گروه باکتری های حقیقی تعلق دارند (Demirjian and Morís-Niehaus and Bertoldo, ۱۹۹۹) (Varas, ۲۰۰۱). اکسترموفیل ها، منبع جداسازی و تولید آنزیم های با مقاومت های ویژه تحت عنوان اکسترموزایم ها هستند. آنزیم های مزوفیل اغلب در شرایط واکنش های شدید که در پروسه های صنعتی مورد نیاز است،کارآمد نیستند چون فاقد پایداری لازم می باشند(Bruins ME *et al.*, ۲۰۰۱). به همین دلیل استفاده از چنین بیو کاتالسیت هایی در واکنش های آلی از نیازهای ضروری صنایع مختلف می باشد.

یکی از رده های مهم اکسترموفیل ها، ترموفیل ها هستند. ترموفیل ها بر اساس نیاز حرارتی به دو گروه اجباری و اختیاری تقسیم می شوند:

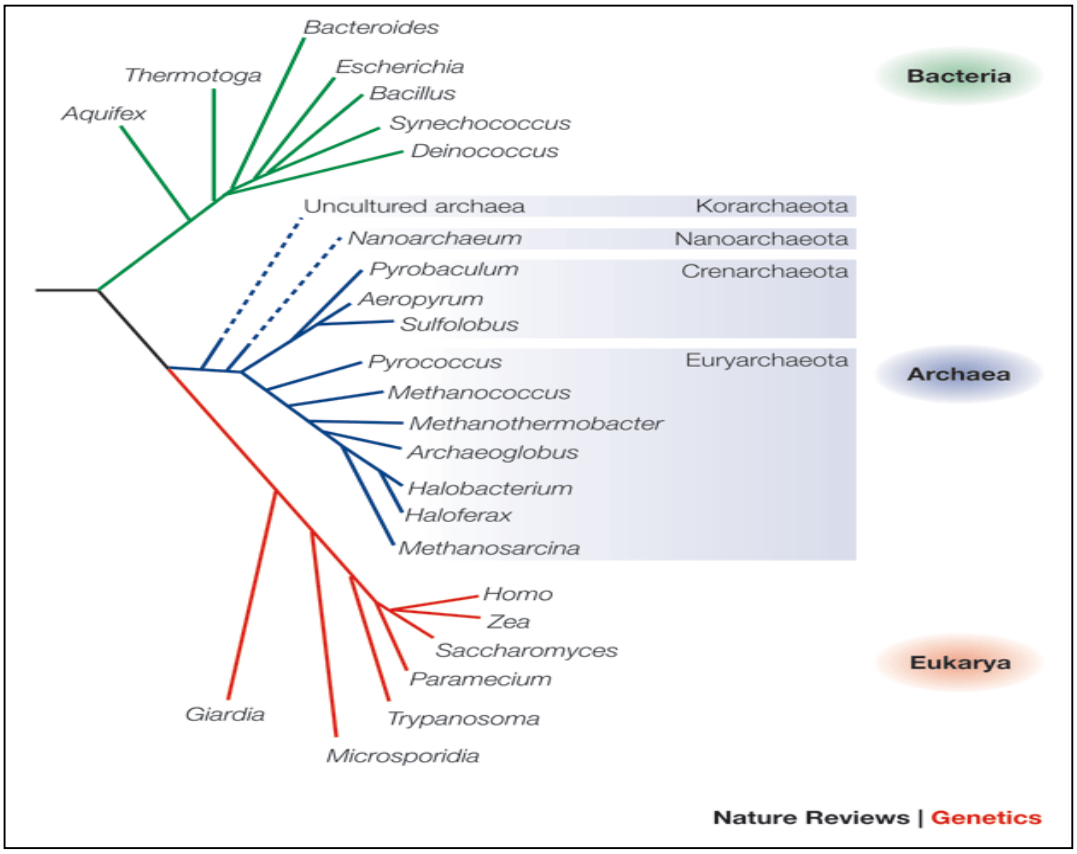
۱) ترموفیل های اجباری به درجه حرارت های بالا برای رشد نیاز دارند.

۲) ترموفیل های اختیاری (معتدل) هم در درجه حرارت های بالا و هم در درجه حرارت های زیر ۵۰ °C به خوبی رشد می کنند.

---

۱. extreme

هایپرترموفیل ها شاخص اکسترموفیل ها هستندکه در دمای بالاتر از ۸۰°C رشد می کنند. (Weigel and Adams, ۱۹۹۹). اکثر ترموفیل ها و هایپرترموفیل ها اعضای شاخه ی آرکی ها هستند و عموما در دمای بالای ۸۰ °C رشد می کنند، در حالی که ترموفیل های عضو شاخه ی یو باکترها در حرارت های بین ۷۰ °C تا ۶۰ رشد می کنند. شکل ۱-۱ محل قرار گیری گونه های ترموفیل و هایپرترموفیل را در درخت فیلوژنی جهانی نشان می دهد .



شکل (۱-۱) : قرار گیری گونه های ترموفیل و هایپرترموفیل در درخت فیلوژنی جهانی(Nature Reviews)

آنزیم های ترموفیلیک و هایپرترموفیلیک (ترموزایم ها) جزء گروهی از آنزیم ها هستند که اکستر موزایم ها نام دارند. اکسترموزایم ها دارای عملکرد در میزان نمک بالا (هالوزایم ها)، تحت شرایط قلیایی بالا (آلکالوزایم ها) و تحت شرایط اکستریم دیگر مثل فشار، اسیدیته و ..... می باشند

(Horikoshi and Grant, ۱۹۹۸). پایداری و فعالیت ذاتی آنزیم های ترموفیلیک و هایپرترموفیلیک در دماهای بالا، سبب برتری بیوتکنولوژیکی آنها نسبت به آنزیم های مزوفیل یا سایکروفیل می شود.

۱-۱-۲ خصوصیات آنزیم های جدا شده از باکتری های ترموفیل :

۱) مقاومت حرارتی

۲) مقاومت در برابر واسرشت شدن توسط موادی نظیر شوینده ها و حلال های آلی

۳) تحمل شرایط دارای pH اسیدی یا بازی

۴) مناسب برای فرآیند های تخمیری خاص

۱-۱-۳ مصارف صنعتی آنزیم های ترموفیل

بیش از ۷۰٪ استفاده جهانی آنزیم های مقاوم به حرارت در صنایع به شرح زیر است :

- صنایع شوینده از پروتئازهای آلکالوفیلیک استفاده می کنند.
- صنایع نشاسته از آمیلازها، گلوکوآمیلازها و گلوکوایزومرازها بهره می گیرند.

صنایع لبنی از آنزیم های دلمه کننده شیر در بخش های مختلف استفاده می کنند (Burton and Cowan, ۲۰۰۲)(Chiraldi and Rose, ۲۰۰۲).

آنزیم های مقاوم به حرارت کاربردهای وسیع صنعتی در بیوتکنولوژی دارند. از مزایای استفاده از آنزیم های ترموفیل ها در پروسه های بیوتکنولوژی این است که در درجه حرارت های بالا احتمال آلودگی توسط مزوفیل های معمولی وجود ندارد، قابلیت حلالیت ترکیبات آلی افزایش می یابد. همچنین سرعت واکنش و ضریب پخش سوبسترا افزایش یافته و در نتیجه بازده پروسه افزایش می

یابد. این آنزیمها همچنین به عنوان مولکول هایی برای درک مکانیسم های پایداری و فعالیت های حرارتی استفاده می شوند که این پدیده ها در مهندسی پروتئین سودمند هستند.

۱-۲ ژئوباسیلوس ها

در بین باکتری های گرمادوست(ژئو) باسیلوس ها از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشند و طیف وسیعی از آنزیم های مهم صنایع مختلف را تولید می کنند. (Slobodkina *et al.*, ۲۰۰۵) (Breithaupt, ۲۰۰۲) این خانواده شامل باکتری های هوازی ، بی هوازی اختیاری، میله ای شکل گرم مثبت و دارای اسپور هستند که در بر گیرنده باکتری های ترموفیل، سایکروفیل، اسیدوفیل، آلکالوفیل آب شیرین و هالوفیل هستند و می توانند از منابع مختلف کربن برای رشد هتروتروفی استفاده کنند و یا به صورت اتوتروف رشد کنند . در طبقه بندی سویه‌های باسیلوس در سال ۱۹۴۹ توسط Gordon and Smith ،۲۰۶ سویه مورد بررسی قرار گرفتند که ۴۶ سویه از آن‌ها مزوفیل بودند و باقی آن‌ها در دو گروه گرمادوست متعلق به *B. stearothermophilus* و *B. coagulans* جای گرفتند. سه دهه پس از آن، مشخص شد که باسیل‌های گرمادوست، یک گروه کاملا مجزا هستند. در سال ۱۹۹۳ ، White et al بررسی ۲۳۴ سویه جدا شده از سطح جهان را انجام دادند که ضمن آن ۹۶ ویژگی فنوتیپیک برای هر سویه از قبیل ویژگی‌های رشد، استفاده از کربوهیدرات‌ها، مقاومت نسبت به بازدارنده ها، تجزیه سوبستراها در محیط و دمای ذوب DNA مورد بررسی قرار گرفت و به دنبال آن در سال ۱۹۸۰ ، Woese team با انجام بررسی‌های ژنتیکی متوجه شدند که بخش‌های حفاظت شده‌ی جالب توجهی در ۱۶S rRNA تمام باکتری ها وجود دارد که به شاخص شناسایی این گروه بدل گشته است. (Daniel R Zeigler,۲۰۰۱) (شکل ۱-۲)