بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک

عنوان پایان نامه

جداسازی، توالی‌یابی و کلون‌سازی ژن کدکننده‌ی پروتئین مشابه پپتید ضددرد و ضدتومور AGAP از گونه‌های عقرب ایرانی

استاد راهنما:

دکتر هدی آیت

استاد مشاور:

دکتر علی محمد احدی

پژوهشگر:

زینب دهقان موروزه

اسفند ۱۳۹۲

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تقدیم به

این پایان نامه را ضمن تشکر و سپاس بیکران و در کمال افتخار و امتنان تقدیم می نمایم به:

محضر ارزشمند پدر و مادر عزیزم به خاطر همه ی تلاشهای محبت آمیزی که در دوران مختلف زندگی ام انجام داده اند و با مهربانی چگونه زیستن را به من آموخته اند.

تقدیر و تشکر

حمد و سپاس خدای متعال را که انسان را به زیور دانش آراست تا با اندیشیدن و تامل راه درست زیستن را بیاموزد.

صمیمانه ترین سپاس خود را از اساتید گرامی سرکار خانم دکتر آیت و جناب آقای دکتر احدی تقدیم نموده که در راه تحقیق و انجام این پژوهش با راهنمایی های ارزشمندشان مرا یاری نمودند.

از اساتید محترم جناب آقایان دکتر مبینی و دکتر شخصی نیایی که زحمت داوری این پایانامه را بر عهده داشتند تشکر می کنم.

از جناب آقای مهندس بنی مهدی مسئول محترم آزمایشگاه ژنتیک نیز صمیمانه سپاسگزارم.

در پایان از دوستان عزیزم که در طول انجام این تحقیق حامی و پشتیبان من بودند، نهایت تشکر و قدردانی را دارم، امید دارم که همیشه سربلند و شادکام باشند.

چکیده

در سال‌های اخیر مطالعات متعددی بر روی سموم حیوانات و حشرات برای یافتن مولکول‌هایی با خواص دارویی انجام شده است. سموم عقرب دارای مولکول‌های کوچکی با خواص زیستی و دارویی مختلف می‌باشد. بسیاری از این سموم برای درمان سرطان، صرع، بیماری‌های مربوط به سیستم ایمنی، بیماری‌های قلبی و درمان بیماری‌های میکروبی استفاده می‌شوند. پپتید آنتی تومور- ضد درد (BmK AGAP) یک پپتید بلند زنجیر استخراج شده از عقرب *بوتوس* مارتنسی است که بسیاری از مسیرهای درگیر در پیشرفت سرطان را مهار می‌کند و همچنین بر روی کانال‌های سدیمی درگیر در درد اثر گذاشته و خاصیت ضد درد دارد. هدف از این تحقیق تعیین ترادف ژنی پپتید شبه آنتی-تومور- ضددرد (AGAP) از عقرب مزوبوتوس اوپئوس ایرانی *(Mesobuthus eupeus Iranin)* (MeI AGAP) و کلون-ساری آن بوده است. بدین منظور نخست با طراحی یک PCR- نستد اقدام به تکثیر ژنی آن از عقرب ایرانی شد و پس از تعیین توالی و بررسی مقایسه‌ی ترادف ژنی، اقدام به کلون‌سازی آن در وکتور pET شد، همچنین بیان اولیه‌ی آن نیز در میزبان پروکاریوتی *E.coli* سوش BL21 صورت گرفت. بررسی‌های بیوانفورماتیکی، پیشگویی عملکرد آن و ویژگی-های بیوشیمیایی این پروتئین به کمک نرم‌افزارهای CLC، Yasara، Pymol، VMD و سرورهای Hex، Cluspro و Expasy انجام شد. بررسی های بیوانفورماتیکی نشان داد که این توکسین در مقایسه با توکسین BmK AGAP دارای اینترون کوتاه‌تری است ولی ناحیه کد کننده‌ی پپتید بالغ و ساختار سه بعدی و عملکرد آن بر روی کانال‌های سدیمی، شباهت بالایی با توکسین BmK AGAP دارد. بنابراین این توکسین می‌تواند به عنوان دارویی برای درمان سرطان و درد مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: MeI AGAP، توالی‌یابی ژنی، فاکتورهای تنظیمی اینترون، BmK AGAP

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر منابع گذشته **۱**
۱-۱ توکسین‌ها ۱
۱-۲ توکسین‌های عقرب ۳
۱-۲-۱ توکسین‌های فاقد پیوند دی‌سولفیدی در زهر عقرب ۳
۱-۲-۲ توکسین‌های عقربی موثر بر کانال‌های یونی ۴
۱-۲-۲-۱ توکسین‌های موثر بر کانال‌های پتاسیم ۴
۱-۲-۲-۲ توکسین‌های موثر بر کانال‌های کلسیم ۵
۱-۲-۲-۳ توکسین‌های موثر بر کانال‌های کلر ۵
۱-۲-۲-۴ توکسین‌های موثر بر کانال‌های سدیم ۵
۱-۳ کانال‌های سدیمی ۶
۱-۴ نوروتوکسین‌ها و کانال‌های سدیم ۷
۱-۴-۱ تاخوردگی توکسین‌های موثر بر کانال‌های سدیمی ۷
۱-۴-۲ ساختار ژنی توکسین‌های عقرب موثر بر کانال‌های سدیمی ۹
۱-۵ مکانیسم‌های ایجاد تنوع در پپتیدهای زهر عقرب ۱۰
۱-۵-۱ پلی‌مورفیسم در ژن توکسین‌های عقرب ۱۰
۱-۵-۲ دو برابر شدن شدن ژن توکسین‌های عقرب ۱۱
۱-۵-۳ Trans-splicing در ژن توکسین‌های عقرب ۱۲
۱-۵-۴ پیرایش متناوب در ژن‌های توکسین عقرب ۱۲
۱-۶ کاربرد توکسین‌های عقرب در درمان بیماری‌ها ۱۳
۱-۷ پپتید آنتی تومور – ضد درد BmK AGAP ۱۵
۱-۷-۱ ساختار ژن BmK AGAP ۱۵
۱-۷-۲ ساختار ثانویه RNA در BmK AGAP ۱۶
۱-۷-۳ ساختار پروتئین BmK AGAP ۱۷
۱-۸ سرطان گلیوما ۱۸
۱-۸-۱ درمان گلیوما ۱۸
۱-۸-۲ استفاده از پپتید آنتی تومور- ضد درد (AGAP) در درمان گلیوما ۱۹
۱-۹ سرطان کولورکتال ۲۱
۱-۹-۱ درمان کولورکتال ۲۱
۱-۹-۲ استفاده از پپتید آنتی تومور- ضد درد (AGAP) در درمان سرطان کولورکتال ۲۱
۱-۱۰ مطالعات بیوانفورماتیکی ۲۳
۱-۱۱ اهداف ۲۴

عنوان **صفحه**

فصل دوم: مواد و روش‌ها **۲۵**
۲-۱ تجهیزات آزمایشگاهی ۲۶
۲-۲ مواد ۲۷
۲-۲-۱ ترکیبات شیمیایی ۲۷
۲-۲-۲ آنتی‌بیوتیک مورد استفاده ۲۹
۲-۲-۳ باکتری‌های مورد استفاده ۲۹
۲-۲-۴ وکتور مورد استفاده ۳۰
۲-۲-۵ پرایمرهای مورد استفاده ۳۱
۲-۲-۶ محلول‌ها ۳۱
۲-۲-۶-۱ محلول‌های مورد نیاز جهت استخراج DNA ژنومی عقرب ۳۱
۲-۲-۶-۱-۱ بافر لیز بافت عقرب ۳۱
۲-۲-۶-۱-۲ محلول پروتئیناز K ۳۲
۲-۲-۶-۲ محلول مورد نیاز برای الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۳۲
۲-۲-۶-۲-۱ محلول تریس- بورآت- اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (TBE) ۳۲
۲-۲-۶-۳ محلول‌های مورد نیاز جهت استخراج پلاسمید ۳۲
۲-۲-۶-۴ محلول مورد نیاز برای ساخت سلول مستعد باکتریایی ۳۳
۲-۲-۶-۴-۱ محلول کلرید کلسیم ۳۳
۲-۲-۶-۵ محلول‌های مور نیاز برای بیان پروتئین ۳۳
۲-۲-۶-۵-۱ محلول ایزوپروپیل بتا دی تیوگالاکتوپیرانوزید(IPTG) ۳۳
۲-۲-۶-۵-۲ محلول گلوکز ۳۳
۲-۲-۶-۶ محلول‌های مورد نیاز برای استخراج پروتئین از باکتری ۳۴
۲-۲-۶-۶-۱ بافر لیز باکتری ۳۴
۲-۲-۶-۷ محلول‌های موردنیاز برای الکتروفورز پروتئین در ژل SDS– پلی اکریل آمید ۳۴
۲-۲-۶-۷-۱ محلول استوک آکریل آمید- بیس آکریل آمید ۳۴
۲-۲-۶-۷-۲ محلول آمونیوم پرسولفات (APS) ۳۴
۲-۲-۶-۷-۳ بافر نمونه با غلظت ۲X ۳۵
۲-۲-۶-۷-۴ بافر الکتروفورز ۳۵
۲-۲-۶-۷-۵ محلول رنگ‌آمیزی ۳۵
۲-۲-۶-۷-۶ محلول رنگبر ۳۶
۲-۲-۷ محیط کشت‌ها ۳۶
۲-۲-۷-۱ محیط کشت لوریا برتانی (LB) ۳۶
۲-۲-۷-۱-۱ محیط کشت LB مایع ۳۶
۲-۲-۷-۱-۲ محیط کشت جامد LB آگار ۳۷

عنوان **صفحه**

۲-۲-۷-۲ محیط کشت انتخابی حاوی آمپی سیلین ۳۷
۲-۲-۷-۳ محیط کشتSOB ۳۷
۲-۲-۷-۴ محیط کشت SOC ۳۸
۲-۳ روش‌ها ۳۸
۲-۳-۱ بررسی ژن ۳۸
۲-۳-۱-۱ جمع آوری عقرب ۳۸
۲-۳-۱-۲ طراحی پرایمر جهت تکثیر توالی ژنومی پپتید MeI AGAP در عقرب مزوبوتوس اوپئوس ۳۸
۲-۳-۱-۳ استخراج DNA ژنومی از بافت عقرب ۳۹
۲-۳-۱-۴ حذف رنگریزه از DNA استخراج شده ۴۰
۲-۳-۱-۵ بررسی کیفیت DNA ژنومی استخراج شده از بافت عقرب ۴۱
۲-۳-۱-۶ تکثیر توالی ژنومی پپتیدMeI AGAP ۴۱
۲-۳-۱-۷ ژل الکتروفورز محصولات PCR ۴۳
۲-۳-۱-۸ تعیین توالی و بررسی ترادف ژن MeI AGAP ۴۳
۲-۳-۱-۹ تکثیر توالی DNA کدکننده‌ی پپتید MeI AGAP ۴۳
۲-۳-۲ انتقال ژن به میزبان باکتریایی ۴۴
۲-۳-۲-۱ استخراج پلاسمید ۴۴
۲-۳-۲-۲ برش پلاسمید pET22b(+) با استفاده از آنزیمهای محدودکننده *Bam*HI و *XhoI* ۴۵
۲-۳-۲-۳ برش محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده BamHI و *XhoI* ۴۶
۲-۳-۲-۴ اتصال قطعات DNA با استفاده از آنزیم لیگاز جهت ساخت پلاسمید نوترکیب pET22b(+) ۴۷
۲-۳-۲-۵ تهیه‌ی سلول مستعد Top10F ۴۷
۲-۳-۲-۶ ترانسفورماسیون باکتری‌های مستعد Top10F توسط پلاسمید خالص و نوترکیب ۴۸
۲-۳-۲-۷ غربالگری کلونی‌های واجد پلاسمید نوترکیب از طریق کلونی-PCR ۴۸
۲-۳-۲-۸ استخراج پلاسمید نوترکیب و تعیین توالی آن ۴۹
۲-۳-۳ بیان پپتید MeI AGAP ۵۰
۲-۳-۳-۱ ساخت سلول‌های مستعد باکتری اشرشیاکلای سوش BL21 ۵۰
۲-۳-۳-۲ ترانسفورم کردن باکتری‌های BL21 با پلاسمیدهای نوترکیب ۵۰
۲-۳-۳-۳ تهیه کشت مایع و القا بیان پپتید MeI AGAP در باکتری های BL21 ۵۰
۲-۳-۴ استخراج پروتئین کل از باکتری‌های BL21 ۵۱
۲-۳-۵ الکتروفورز محصولات پروتئینی استخراج شده از باکتری‌های BL21 ۵۱
۲-۳-۵-۱ تهیه ژل SDS-PAGE ۵۱
۲-۳-۵-۲ مراحل ساخت ژل SDS–پلی آکریل آمید ۵۲
۲-۳-۵-۳ آماده سازی نمونه‌های پروتئینی و انجام الکتروفورز ۵۳
۲-۳-۵-۴ رنگ‌آمیزی ژل و رویت باندهای پروتئینی ۵۳

عنوان **صفحه**

۲-۳-۴ مطالعات بیوانفورماتیکی ۵۳
۲-۳-۴-۱ مقایسه‌ی توالی ژنی MeI AGAP با ژن‌هایBmK AGAP و MeVSCT-3 ۵۳
۲-۳-۴-۲ بررسی عناصر تنظیمی، جایگاه‌های پیرایشی و آدنین نقطه‌ی انشعاب در توالی ژن‌های MeI AGAP، BmK AGAP و MeVSCT-3 ۵۳
۲-۳-۴-۳ تعیین قالب خواندن باز در توالی ژنی پپتید MeI AGAP و مقایسه‌ی توالی آمینواسیدی با توکسین‌های موثر برکانال‌های سدیمی و مطالعات فیلوژنتیکی ۵۴
۲-۳-۴-۴ تعیین باندهای دی‌سولفیدی در پپتید MeI AGAP ۵۴
۲-۳-۴-۵ پیشگویی ساختار سه بعدی توکسین MeI AGAP و توکسین‌های موثر بر کانال‌های سدیم ۵۴
۲-۳-۴-۶ مقایسه ساختاری پپتید MeI AGAP با توکسین‌های گروه آلفای موثر بر کانال‌های سدیم ۵۴
۲-۳-۴-۷ بررسی مدل میانکشن کانال‌های سدیمی درگیر در درد و پپتید ۵۵
۲-۳-۴-۸ بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی پروتئین MeI AGAP و مقایسه‌ی آن با توکسین‌های BmK AGAP و MeVSCT-3 ۵۵
۲-۳-۴-۹ بررسی نرم افزاری بیان پروتئین MeI AGAP در باکتری اشرشیاکلای ۵۵

فصل سوم: نتایج **۵۸**
۳-۱ بررسی ژن ۵۶
۳-۱-۱ جمع آوری و شناسایی گونه‌ی عقرب ۵۶
۳-۱-۲ طراحی پرایمر جهت تکثیر توالی ژنی پپتید MeI AGAP ۵۶
۳-۱-۳ استخراج DNA از بافت عقرب ۵۹
۳-۱-۴تکثیر ژن MeI AGAP ۶۰
۳-۱-۵ تعیین توالی ژن MeI AGAP و آنالیز ترادف آن ۶۱
۳-۱-۶ تکثیر DNA کدکننده‌ی پپتید MeI AGAP ۶۳
۳-۲ کلون‌سازی ۶۳
۳-۲-۱ استخراج پلاسمید pET22b(+) ۶۳
۳-۲-۲ هضم پلاسمید pET22b(+) توسط دو آنزیم *Bam*HI و *XhoI* ۶۴
۳-۲-۳ ترانسفورم باکتری‌های مستعد اشرشیاکلای سوش Top10F با استفاده از وکتور نوترکیب pET22b(+) ۶۵
۳-۲-۴ انجام کلنی– PCR بر روی باکتریهای Top10F ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب ۶۵
۳-۲-۵ استخراج پلاسمید نوترکیب از باکتری Top10F ترانسفورم شده ۶۶
۳-۲-۶ تعیین توالی پلاسمید نوترکیب ۶۷
۳-۳ بررسی بیان پپتید MeI AGAP ۶۷
۳-۳-۱ ترانسفورم باکتری‌های مستعد اشرشیاکلای سوش BL21 با وکتور نوترکیب pET22b(+) به روش شوک حرارتی ۶۷

عنوان **صفحه**

۳-۳-۲ بررسی توالی آمینواسیدی کدشده در وکتور pET22b(+) ۶۸
۳-۳-۳ کشت باکتری BL21، استخراج پروتئین کل و الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE ۶۸
۳-۴ مطالعات بیوانفورماتیکی ۶۹
۳-۴-۱ مقایسه توالی ژنی MeI AGAP با BmK AGAP و MeVSCT-3 ۶۹
۳-۴-۲ بررسی اینترون، عناصر تنظیمی، جایگاه‌های پیرایشی و آدنین نقطه انشعاب در توالی ژن‌های MeI AGAP، BmK AGAP و MeVSCT-3 ۷۱
۳-۴-۳ مقایسه توالی آمینواسیدی پپتید MeI AGAP با توکسین‌های موثر برکانال‌های سدیمی و مطالعات فیلوژنتیکی ۷۵
۳-۴-۴ تعیین باندهای دی‌سولفیدی در پپتید MeI AGAP ۷۷
۳-۴-۵ پیشگویی ساختار سه بعدی توکسین‌ها ۷۷
۳-۴-۶. مقایسه ساختاری پپتید MeI AGAP با توکسین‌های گروه آلفا ۷۷
۳-۴-۷ نتایج حاصل از برهم کنش بین پپتید MeI AGAP وکانال‌های سدیمی و تفسیر این نتایج ۷۹
۳-۴-۸ نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی پروتئین MeI AGAP ۸۴
۳-۴-۹ بررسی بیان پروتئین MeI AGAP در اشرشیاکلای ۸۵

فصل چهارم: بحث **۹۰**
۴-۱ اهمیت توکسین‌های عقرب ۸۷
۴-۲ تکثیر توالی ژن MeI AGAP ۸۹
۴-۳ انتخاب وکتور بیان، باکتری مناسب کلون و بیان پروتئین و انتخاب آنزیم‌های محدود کننده ۹۰
۴-۴ مطالعات بیوانفورماتیکی ۹۱
۴-۴-۱ بررسی ژن ۹۱
۴-۴-۲ بررسی پروتئین ۹۲
۴-۴-۳ ویژگی های بیوشیمیایی پروتئین MeI AGAP ۹۶
۴-۴-۵ بررسی بازدهی بیان پروتئین MeI AGAP در میزبان پروکاریوتی ۹۶
۴-۴-۶ نتیجه گیری کلی ۹۷
پیشنهادات ۹۷
پیوست‌ها **۱۰۳**
منابع **۱۰۵**

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱: ساختارکانال‌های وابسته به ولتاژ سدیمی ۶
شکل ۱-۲: جایگاه‌های اثرگذاری نوروتوکسین‌ها روی کانال‌های وابسته به ولتاژ سدیمی ۷
شکل ۱-۳: ساختار سه بعدی توکسین‌های موجود در گونه‌های مختلف حیوانات که روی کانال‌های سدیمی اثر دارند. ۸
شکل ۱-۴: ساختار ژن کد کننده‌ی توکسین‌های موثر بر کانال‌های سدیمی ۹
شکل ۱-۵: توالی نوکلئوتیدی ژن‌های کد کننده‌ی توکسین‌های کانال‌های سدیمی ۱۰
شکل ۱-۶: نرخ وقوع جهش‌های جایگزینی در نواحی مختلف توالی نوکلئوتیدی توکسین‌های عقرب ۱۱
شکل ۱-۷: تصویر شماتیکی از جایگاه پیرایش′ ۳ ژن توکسین عقرب BmKK2 از عقرب چینی بوتوس مارتنسی ۱۲
شکل ۱-۸: نتایج آنالیز سیستماتیک اینترون BmK AGAP ۱۶
شکل ۱-۹: ساختار ثانویه RNA. آدنین نقطه branch با فلش مشخص شده است ۱۷
شکل ۱-۱۰: ناحیه دمین مرکزی و دمین NC موجود در BmK AGAP که با دایره قرمز مشخص شده است ۱۷
شکل ۱-۱۱: سلول‌های SHG-44 درمان شده با غلظت ۰ ، ۱۰ ، ۲۰ و ۳۰ میکرومولار AGAP که بعد از رنگ آمیزی با Hoechst 33258 با میکروسکوپ فلورئوسنت مشاهده شده‌اند ۲۰
شکل ۱-۱۲: مورفولوژی سلول‌های SW480 که با DAPI رنگ آمیزی شده اند ۲۳
شکل ۲-۲: توالی جایگاه کلون سازی در وکتور(+)pET-22b ۳۰
شکل ۳-۱: نتیجه ی بلاست نوکلئوتیدی cDNA کد کننده‌ی پپتید BmK AGAP از عقرب چینی بوتوس مارتنسی ۵۷
شکل ۳-۲: مقایسه‌ی توالی ژنی پپتیدهایی که همولوژی بالایی با cDNA، BmK AGAP نشان دادند. ۵۹
شکل ۳-۳: الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از بافت عقرب روی ژل آگارز ۱٪ ۵۹
شکل ۳-۴: الکتروفورز محصول PCR بدست آمده با پرایمرهای Fagp و Ragp روی ژل آگاروز٪ ۱ ۶۰
شکل ۳-۵: الکتروفورز محصولات PCR با پرایمرهای Fagp و Ragpn روی ژل آگاروز٪ ۱ ۶۱
شکل ۳-۶: ترادف ژنی مربوط به پپتید MeI AGAP ۶۱
شکل ۳-۷: بلاست توالی ژن MeI AGAP در NCBI ۶۲
شکل ۳-۸: الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز ۱٪ ۶۳
شکل ۳-۹: الکتروفورز محصولات استخراج پلاسمید (+)pET22b روی ژل آگاروز ۱٪ ۶۴
شکل ۳-۱۰. الکتروفورز محصول برش پلاسمید (+)pET22b با استفاده از آنزیم‌های *Bam*HI و *XhoI* ۶۴
شکل ۳-۱۱: ترانسفورم باکتری اشرشیاکلای سوش Top10F با استفاده از پلاسمید (+)pET22b ۶۵
شکل ۳-۱۲: الکتروفورز محصولات کلنی– PCR بر روی ژل آگاروز٪ ۱ ۶۶
شکل ۳-۱۳: الکتروفورز محصولات استخراج پلاسمید نوترکیب (+)pET22b روی ژل آگاروز ٪ ۱ ۶۶

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱۴: محل قرارگیری توالی MeI AGAP در توالی پلاسمید pET22b(+) ۶۷
شکل ۳-۱۵: ترانسفورم باکتری‌های اشرشیاکلای سوش BL21 ۶۷
شکل ۳-۱۶: توالی آمینواسیدی پروتئین MeI AGAP به همراه توالی‌های قبل و بعد آن در وکتور ۶۸
شکل ۳-۱۷: الکتروفورز پروتئین کل استخراج شده از باکتری BL21 بر روی ژل SDS – PAGE ۶۹
شکل ۳-۱۸: مقایسه توالی ژن MeI AGAP با ژنهای BmK AGAP و MeVSCT-3 ۷۱
شکل ۳-۱۹: مقایسه توالی‌های تنظیمی و اینترون ژن‌های MeI AGAP و BmK AGAP ۷۲
شکل ۳-۲۰: مقایسه توالی‌های تنظیمی و اینترون ژن‌های MeI AGAP و MeVSCT-3 ۷۲
شکل ۳-۲۱: مقایسه توالی‌های تنظیمی و اینترون ژن‌های BmK AGAP و MeVSCT-3 ۷۳
شکل ۳-۲۲: ساختار ثانویه‌ی RNA در جایگاه پیرایشی اینترون ژن MeI AGAP ۷۴
شکل ۳-۲۳: ساختار ثانویه‌ی RNA در جایگاه پیرایشی ژن BmK AGAP ۷۴
شکل ۳-۲۴: ساختار ثانویه‌ی RNA در جایگاه پیرایشی ژن MeVSCT-3 ۷۵
شکل ۳-۲۵: نتیجه بررسی همولوژی توالی پروتئینی توکسین MeI AGAP با توکسین‌های گروه آلفا ۷۵
شکل ۳-۲۶: نتیجه بررسی همولوژی توالی پروتئینی توکسین‌های گروه آلفا با توکسین‌های گروه بتا ۷۶
شکل ۳-۲۷: نتایج حاصل ازمطالعات فیلوژنتیکی که با استفاده ازسرور Clustal W بدست آمده است ۷۶
شکل ۳-۲۸: شمایی از ساختار سه بعدی حفاظت شده در توکسین‌های موثر بر کانال‌های سدیمی ۷۷
شکل۳-۲۹: شمایی از بررسی همولوژی ساختاری توکسین MeI AGAP با توکسین‌های گروه آلفا که با استفاده از نرم افزار Yasara انجام شده است ۷۹
شکل ۳-۳۰: میانکنش بین قطعات S3-S4 و S5-S6 از دمین IV کانالهای سدیم Nav1.8 و Nav1.9 و پپتید MeI AGAP ۸۲
شکل ۳-۳۱: نمودار مربوط به شاخص سازگاری کدون‌ها در میزبان اشرشیاکلای ۸۵
شکل ۳-۳۲: منحنی محتوای GC در توالی کدکننده‌ی پپتید MeI AGAP ۸۵
شکل ۳-۳۳: نمودار مربوط به توزیع میزان رایج بودن کدون‌های توالی کدکننده‌ی پپتید MeI AGAP در میزبان اشرشیاکلای ۸۶

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱. تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده ۲۶
جدول ۲-۲. ترکیبات شیمیایی مورد استفاده ۲۷
جدول۲-۳. مارکرهای مورد استفاده ۲۸
جدول۲-۴. آنزیم‌های مورد استفاده ۲۹
جدول ۲-۵. بافر آنزیم‌های مورد استفاده ۲۹
جدول ۲-۶. پرایمرهای مورد استفاده ۳۱
جدول۲-۷. ترکیبات و غلظت مورد نیاز آن‌ها برای ساخت بافر لیز بافت عقرب ۳۲
جدول ۲-۸. ترکیبات و مقدار مورد نیاز آن‌ها برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محلول TBE با غلظت 10X ۳۲
جدول۲-۹. ترکیبات و غلظت مورد نیازآن‌ها برای ساخت محلول های I، II و III مربوط به استخراج پلاسمید ۳۳
جدول ۲-۱۰. مواد و غلظت مورد نیاز آن‌ها برای تهیه بافر لیز باکتری ۳۴
جدول ۲-۱۱. ترکیبات و غلظت مورد نیاز آن‌ها برای تهیه ۵ میلی لیتر بافر نمونه با غلظت ۲X ۳۵
جدول ۲-۱۲. ترکیبات و غلظت مورد نیاز آن‌ها برای تهیه ۵۰۰ میلی لیتر بافر تانک ۳۵
جدول ۲-۱۳. ترکیبات و مقادیر مورد نیاز آن‌ها برای ساخت ۱۰۰ میلی لیتر محلول رنگزا ۳۶
جدول ۲-۱۴. ترکیبات و مقادیر مورد نیاز آن‌ها برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محلول رنگبر ۳۶
جدول ۲-۱۵. مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB مایع ۳۷
جدول۲-۱۶. مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB جامد ۳۷
جدول۲-۱۷. ترکیبات و غلظت‌های مورد نیازآن‌ها برای تهیه۵۰ میلی لیتر محیط کشت SOB ۳۸
جدول ۲-۱۸. توالی‌های مورد استفاده در طراحی پرایمرهای مربوط به تکثیر توالی ژنومی پپتید MeI AGAP ۳۹
جدول ۲-۱۹. مواد و غلظت مورد نیاز از آن‌ها برای تکثیر ژن MeI AGAP با حجم ۲۵ میکرولیتر ۴۱
جدول ۲-۲۰. شرایط بهینه جهت تکثیر ژن MeI AGAP ۴۲
جدول ۲-۲۱. مواد و غلظت مورد نیاز از آن‌ها برای تکثیر ژن MeI AGAP با حجم ۲۵ میکرولیتر ۴۲
جدول ۲-۲۲. شرایط بهینه جهت تکثیر ژن MeI AGAP ۴۲
جدول ۲-۲۳. مواد و غلظت مورد نیاز از آن‌ها برای تکثیر cDNA پپتید MeI AGAP با حجم ۲۵ میکرولیتر ۴۳
جدول ۲-۲۴. شرایط بهینه جهت تکثیر DNA کدکننده‌ی پپتیدMeI AGAP ۴۴
جدول۲-۲۵. مواد و مقادیر مورد نیاز برای انجام واکنش برش توسط آنزیم *Bam*HI ۴۵
جدول ۲-۲۶. مواد و مقادیر مورد نیاز برای انجام واکنش برش محصول PCR با *BamHI* ۴۶
۲-۲۷. مقادیر مورد نیاز جهت اتصال پلاسمید و قطعه مورد نظر ۴۷
۲-۲۸. مواد و غلظت مورد نیاز آن‌ها برای انجام واکنش کلنی– PCR ۴۹

۲-۲۹. شرایط انجام واکنش کلنی– PCR ۴۹
جدول ۲-۳۰. مقادیر لازم جهت انجام واکنش برش آنزیمی با آنزیم‌های *Bam*HI و *XhoI* ۵۳
۲-۳۰. ترکیبات مورد نیاز برای ساخت ۱۰ میلی لیتر ژل جدا کننده با غلظت ۱۴٪ ۵۱
۲-۳۱. ترکیبات مورد نیاز برای ساخت ۵ میلی لیتر ژل متراکم کننده با غلظت ۵٪ ۵۲
جدول ۳-۱. مقایسه‌ی توالی اینترون ژن‌های MeI AGAP، BmK AGAP و MeVSCT-3 ۷۳
جدول ۳-۲. موقعیت باندهای دی سولفیدی در پپتید MeI AGAP که با استفاده از سرور DIANNA بدست آمده است ۷۷
جدول ۳-۳. نتایج حاصل از بررسی همولوژی ساختاری با استفاده از نرم افزار Yasara ۷۸
جدول ۳-۵. انرژی، فاصله پیوندی و آمینواسیدهای درگیر در میانکنش بین کانالهای سدیم و پپتید MeI AGAP ۸۳
جدول ۳-۶. نوع پیوندهای درگیر در میانکنش بین کانال‌های سدیم و پپتید MeI AGAP ۸۵
جدول۳-۷. نوع، تعداد و درصد اسیدهای آمینه موجود در پروتئین MeI AGAP ۸۴
جدول ۴-۱. ویژگی‌های آمینواسیدهای تغییر یافته در پپتیدهای MeI AGAP و BmK AGAP ۹۳
جدول ۴-۲. ویژگی‌های آمینواسیدهای تغییر یافته در پپتیدهای MeI AGAP و MeVSCT-3 ۹۳
جدول ۴-۳. ویژگی‌های آمینواسیدهای تغییر یافته در پپتیدهای BmK AGAP و MeVSCT-3 ۹۳

فهرست پیوست‌ها

عنوان **صفحه**

پیوست ۱. کروماتوگرام مربوط به تعیین توالی ژن MeI AGAP با پرایمر پیشرو Fagp و Ragpn ۹۹
پیوست۲. کروماتوگرام مربوط به تعیین توالی پلاسمید حاوی قطعه کدکننده‌ی پپتید MeI AGAP با پرایمر RagpXH ۹۹

فصل اول

مقدمه و مروری بر منابع گذشته

۱-۱ توکسین‌ها

توکسین‌ها، بخشی از راهکارهای دفاعی و استراتژی‌هایی جهت شکار هستند که توسط حیوانات، گیاهان و میکروب‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱]. توکسین‌ها را می‌توان به دو دسته پپتیدی و غیر پپتیدی تقسیم بندی کرد. توکسین‌های غیرپپتیدی از جلبک، گیاهان، ماهی و وزغ قابل جداسازی است و توکسین‌های پپتیدی در مارها، عقرب‌ها، عنکبوت‌ها، حلزون‌ها و شقایق دریایی وجود دارند [۲]. از مهم‌ترین کاربردهای درمانی پپتیدهای حیوانات، استفاده از آن‌ها در درمان سرطان می‌باشد. در طول سه دهه‌ی گذشته، تلاش‌های بسیاری جهت یافت ویژگی‌های ضد سرطانی توکسین‌ها صورت پذیرفته است، این امر موجب شناسایی مولکول‌های متعددی با این ویژگی گردیده، به طوری که حتی تعدادی از این مولکول‌ها در مرحله آزمایش-های کلینیکی قرار دارند و ممکن است در آینده به عنوان داروهایی برای درمان سرطان معرفی گردند. بررسی‌ها نشان داده است که سم مار، قورباغه، وزغ و عقرب دارای توکسین‌هایی با خاصیت ضدسرطانی می-باشند)5(. توکسین‌های زیستی را می‌توان براساس منبع تولیدکننده به سه دسته طبقه بندی نمود:

۱- توکسین‌های میکروبی: توکسین‌هایی که در این دسته قرار می‌گیرند، ترکیباتی با وزن مولکولی بالا می‌باشند که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. توکسین بوتولینم، پروتئین نوروتوکسیک تولید شده توسط باکتری‌های گرم مثبت کلستردیوم بوتولینم[1] می‌باشد، از این توکسین در درمان بیماری های ماهیچه‌ای استفاده می‌شود. یکی دیگر از توکسین‌های موجود در باکتری‌ها، کلستردیال[2] است، که در درمان بیماری‌هایی همچون سرطان، پیشگیری از مسمومیت غذایی و انتقال دارو کاربرد دارد.

۲- توکسین‌های گیاهی: این توکسین‌ها شامل متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط گیاهان می‌باشند. این مواد هم دارای اثرات سودمند و هم مضر در انسان و حیوانات هستند. از جمله این توکسین‌ها می‌توان آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، اگزالات، تانن‌ها و ضد ویتامین‌ها را نام برد. بسیاری از داروهای مخدر و اعتیادآور مانند کوکائین، نیکوتین و مورفین جزء توکسین‌های مضر برای انسان و حیوانات هستند. از اثرات سودمند این توکسین‌ها استفاده از آنها در تولید مواد آرایشی، درمان بیماری‌های گوارشی و سرطان می‌باشد [۳].

۳- توکسین‌های جانوری: سم تولید شده توسط حیوانات زهرآلود در منطقه خاصی از بدنشان که غدد زهر نامیده می‌شود، ذخیره می‌گردد. حیوانات از زهر برای دفاع و جمع آوری طعمه استفاده می‌کنند. زهر شامل مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات زیستی فعال، پپتیدها، آنزیم‌ها و لیپیدها می‌باشد. حیواناتی همچون مار، عنکبوت، عقرب، کرم، زنبور عسل، حشرات، زنبورها، مورچه‌ها، وزغ و قورباغه تولید-کننده سم هستند [۴, ۵]. سموم موجود در حیوانات دارای عملکردهای متنوعی می‌باشند، از جمله این عملکردها می‌توان تاثیر آنها روی سیستم عصبی، کانال‌های یونی، انتقال نوروترانسمیترها، فعالیت‌های ضدمیکروبی و آنتی‌توموری و اثرات همولیتیک را نام برد. علاوه بر این طیف گسترده‌ای از آنزیم‌ها همچون فسفولیپاز A2، اسفنگومیولینازها، پروتئازها و اکسیدازها نیز جزء توکسین‌های موجود در این موجودات می‌باشند [۶]. در طول ۳۰ سال گذشته مطالعات زیادی روی پروتئین‌های زهر انجام گرفته است، این مطالعات منجر به ایجاد موادی با خواص زیستی متعدد برای توصیف کانال‌ها، توسعه داروها و حشره‌کش‌ها شده است [۷].

[1] *Clostridium botulinum*
[2] *Clostridial*

۱-۲ توکسین‌های عقرب

حدود ۱۶ خانواده و ۱۵۰۰ گونه و زیرگونه‌ی مختلف از عقرب در سراسر جهان وجود دارد [۸]. سم عقرب شامل منبع مختلفی از توکسین‌ها از جمله موکوپلی ساکاریدها، هیالورونیداز، فسفولیپاز، مولکول‌هایی با وزن مولکولی کم مانند سروتونین و هیستامین، مهار کننده‌ی پروتئازها، نمک‌های غیر آلی، ترکیبات پلی‌پپتیدی و پپتیدها و پروتئین‌های نوروتوکسیک کوچک بوده که به طور ویژه با کانال‌های یونی برهم کنش می‌دهند [۹]. سم‌های عقرب را می‌توان براساس اندازه مولکولی، عملکرد و مکانیسم فعالیت‌شان تقسیم‌بندی کرد. این توکسین‌ها براساس اندازه مولکولی به دو دسته‌ی کوتاه-زنجیر و بلند-زنجیر، براساس فعالیت آن‌ها روی حیوانات مختلف به دو دسته‌ی توکسین‌های اختصاصی پستانداران و توکسین‌های اختصاصی حشرات و براساس مکانیسم فعالیت به دو گروه نوروتوکسین[۱] و سیتوتوکسین[۲] تقسیم بندی می‌شوند. همچنین، آن‌ها را به دو دسته‌ی توکسین‌های دارای پیوند دی‌سولفیدی و توکسین‌های فاقد پیوند دی-سولفیدی نیز طبقه‌بندی می‌نمایند [۱۰]. توکسین‌های دارای پیوند دی‌سولفیدی را می‌توان به چهار گروه طبقه بندی نمود: توکسین-های موثر بر کانال‌های K^+، توکسین‌های موثر بر کانال‌های Ca^{2+}، توکسین‌های موثر بر کانال های Cl^- و توکسین‌های موثر بر کانال‌های Na^+ [۱۱].

۱-۲-۱ توکسین‌های فاقد پیوند دی‌سولفیدی در زهر عقرب

بعضی از پپتیدهای ضدمیکروبی موجود در کیسه‌ی زهر عقرب متعلق به خانواده‌ی توکسین‌های فاقد پیوند دی سولفیدی می‌باشند. اخیراً چندین پپتید از کیسه زهر گونه‌های مختلف عقرب استخراج شده که در این دسته قرار می‌گیرند: هادرورین[۳] از زهر عقرب هادروروس آزتکوس[۴]، پارابوتوپورین[۵] از عقرب پارابوتوس اسلکتری[۶] و پاندینین-۱[۷] از زهر عقرب پاندینوس امپراطور[۸] [۱۲-۱۴]. این پپتیدهای ضد میکروبی پلی-کاتیونیک بوده و ساختار آلفا هلیکسی دارند. دو نوع از این توکسین‌ها که خاصیت ضدمالاریایی دارند، موسین[۹]-۲ و موسین-۲۵ می‌باشند که از زهر عقرب مزوبوتوس اوپئوس استخراج شده‌اند. این توکسین‌ها انگل‌های پروتوزوآ فالسی پاریوم پلاسمودیم را می‌کشند و از پیشرفت بیماری مالاریا جلوگیری می‌کنند. با

[1] Neurotoxin
[2] Cytotoxin
[3] Hadrurin
[4] *Hadrurus aztecus*
[5] Parabutoporin
[6] *Parabuthus schlechter*
[7] Pandinin1
[8] *Pandinus imperator*
[9] Meucin

توجه به اینکه این توکسین‌ها به سلول‌های انسانی آسیب وارد نمی‌کنند، می‌توانند کاندیدای خوبی برای درمان مالاریا باشند [۱۵]. BmKn2، موکوپورین[1]- M1 و Kn2-7 سه گروه دیگر از این توکسین‌ها هستند که دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی ویروس HIV می‌باشند [۱۶].

۱-۲-۲ توکسین‌های عقربی موثر بر کانال‌های یونی

۱-۲-۲-۱ توکسین‌های موثر بر کانال‌های پتاسیم

توکسین‌های موثر بر کانال‌های پتاسیم، پپتیدهایی با ۷۰-۲۰ اسیدآمینه وسه باند دی سولفیدی هستند، اکثریت آن‌ها کمتر از۴۰ اسیدآمینه دارند و توالی اسیدآمینه‌ای آنها دارای تنوع بالایی می‌باشد [۱۷]. اعضای این خانواده در فرایندهای متنوع سلولی از جمله رپلاریزه شدن پتانسیل عمل، مسیر سیگنالی کلسیم، تنظیم حجم سلول، مهاجرت و تکثیر سلولی نقش دارند [۱۸]. برخی از کانال‌های پتاسیم به عنوان هدفی برای طراحی داروهای جدید درمانی می‌باشند. به عنوان مثال Kv1.3 یک کانال پتاسیم وابسته به ولتاژ است که بر روی سطح لنفوسیت های T بیان می‌شود و هدف مناسبی برای تعدیل سیستم ایمنی می‌باشد، بنابراین تنظیم عملکرد این کانال‌ها در درمان بیماری‌های خود ایمنی می‌تواند مفید واقع شود [۱۹]. توکسین‌های کانال‌های پتاسیم[2] (KTX) دارای ساختار اولیه، ویژگی‌ها و فعالیت‌های متنوعی هستند [۲۰, ۲۱]. این توکسین‌ها براساس موقعیت باند دی‌سولفیدی و توالی اسید آمینه‌ای به چهار خانواده طبقه بندی می‌شوند: -β-KTX ,α-KTX ,κ-KTX ,γ–KTX [۹, ۲۲]. خانواده α-KTX توکسین‌هایی با ۴۲-۲۳ اسیدآمینه و ۳ یا ۴ باند دی سولفیدی می‌باشند [۲۲, ۲۳]. این خانواده روی کانال‌های پتاسیم وابسته به ولتاژ و کانال‌های پتاسیمی فعال شده به وسیله کلسیم موثر هستند [۲۳]. β-KTXها توکسین‌هایی با ۶۸-۴۵ اسیدآمینه و جزء پپتیدهای بلند زنجیر می‌باشند [۲۴, ۲۵]. از جمله توکسین_های این گروه می‌توان HgeβKTx, BmTXKβ, TtrKIK, TstβKTx, TdiKIK, TcoKIK را نام برد[۲۵]. γ-KTX پپتیدهایی با ۴۷-۳۶ اسیدآمینه می‌باشند که به طور ویژه کانال‌های hERG[3] موجود در سلول‌های ماهیچه‌ای قلب را مورد هدف قرار می‌دهند [۲۶].-κ KTXها کوچکترین خانواده از این گروه توکسین‌هاست که دارای یک ساختار مارپیچ پایدار همراه با دو پل دی‌سولفیدی می‌باشند [۲۷].

[1] Mocoporin
[2] Potassium channel toxins
[2] Human Ether-à-go-go Related Gene