بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

بررسی بیان آنزیم بتا گالاکتوزیداز باکتری باسیلوس سوبتیلس بر سطح اسپور این باکتری به منظور تولید بیوکاتالیست

نگارش
ستاره توسلی

استاد راهنما
جناب آقای دکتر غلامرضا احمدیان

اسفند ماه سال ۱۳۹۰

"حق استفاده از مفاد پایان نامه برای پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری محفوظ است"

پیشگفتار

اکثر باکتری ها به خصوص خانواده باسیلوس ها توانایی تولید مقادیر فراوانی (۲۵- ۲۰ گرم برلیتر) از آنزیم های خارج سلولی را دارند. همچنین از آنجا که این دسته از تولید کنندگان آنزیمی از نظر وزارت غذا و دارو، مطمئن [1] شناخته شده اند، در سال های اخیر استفاده از آنزیم های میکروبی به هر دو فرم آزاد یا متصل به یک تکیه گاه (حامل)[2] کاربردهای فراوانی در زمینه های بیوتکنولوژی ، پزشکی و صنعتی داشته است. تثبیت آنزیم ها[3] باعث ایجاد پایداری، بالا رفتن عملکرد انتخابی [4] آنزیم و اطمینان از بازیافت و توانایی استفاده مجدد از آنزیم تولیدی می باشد. با در نظر گرفتن این نکات و اینکه هدف اصلی صنایع استفاده از آنزیم ها و تکنیک هایی است که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد، محققان امروزه درصدد پیدا کردن بهترین و ساده ترین راه جهت تولید آنزیم موردنیاز و همچنین حامل مناسب می باشند. تحقیقات نشان داده اند که استفاده از حامل های پلیمری گزینه مناسبی برای تثبیت نمی باشند چرا که از یک طرف سطح وسیعی از پلیمر، خالی از آنزیم باقی مانده و از طرف دیگر فعالیت طبیعی آنزیم بیش از پنجاه درصد کاهش می یابد. همچنین طراحی چنین سیستم هایی اساساً وقت گیر بوده و وابسته به آزمون و خطای بسیار است.

امروزه با استفاده تکنیک بیان سطحی[5] می تواند سطحی را برای اتصال پروتئین ها ایجاد که از نظر اقتصادی برای مصارف صنعتی مقرون به صرفه باشد. با استفاده از این تکنیک و روش های مهندسی ژنتیک پروتئین مورد نظر بر روی دیواره یا همان سطح سلول (از جمله باکتری) بیان می شود.

با توجه به اینکه استفاده از سلول محدودیت هایی را در کاربردهای صنعتی ایجاد می کند، حامل جدیدی که امروزه نظر محققان را به خود جلب کرده استفاده از اسپور باکتری ها به خصوص اسپور باسیلوس

1. Generally Regarded As Safe (GRAS)
2. Carrier
3. Enzyme Immobilization
4. Specific activity
5. Surface display system

سوبتیلیس بدلیل بی خطر بودن آن می باشد. در هنگام روبرو شدن با شرایط دشوار محیطی از جمله کمبود مواد غذایی در محیط دو خانواده از باکتری های گرم مثبت ازجمله باسیلوس ها و کلستریدیوم ها توانایی تولید فرم خاصی از سلول بنام اسپور را دارند که از لحاظ متابولیکی غیرفعال و به عبارتی فرم نهفته و خفته سلول باکتری می باشد و نسبت به شرایط دشوار محیطی بسیار مقام است. از اینرو می توان اسپور را به عنوان حامل مناسبی در سیستم بیان سطحی برگزید. اسپور از لحاظ متابولیکی غیرفعال و به عبارتی فرم نهفته و خفته سلول باکتری می باشد. این ساختار می تواند در برابر طیف وسیعی از محرکات خارجی که می تواند سلول رویشی را ازبین ببرند ، مقاومت کند. مقاومت بالای اسپورعمدتاً به دلیل فرم دهیدراته مرکز آن و ساختار مقاوم و غیرقابل نفوذ لایه های پوششی آن است. بیان در سطح اسپور بر پایه ساخت کایمرهای ژنی یک DNA هترولوگ و یک ژن باسیلوسی رمز کننده پروتئین پوشش اسپور استوار است.

سیستم بیان بر روی سطح (فاژ) توسط اسمیت درسال ۱۹۸۵ ابداع گردید (Smith GP.,1985) اولین گزارش مبنی بر استفاده از سطح باکتری برای عرضه پروتئین های هترولوگ در سال ۱۹۸٦ منتشر شد (Charbit et al.,1986; Freudi et al.,1986). اولین بار در سال ۲۰۰۱، از اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس، به منظور بیان آنتی ژن TTFC [٦] استفاده شد (Duc et al.,2003;2007). تنها مورد بیان آنزیم بتا گالاکتوزیداز بر سطح اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس، در سال ۲۰۰۷ توسط کوون و همکارانش (Kwon et al., 2007) گزارش شد. در این مطالعه آنزیم بتا گالاکتوزیداز باکتری اشریشیا کلی بر سطح CotG اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس به منظور تولید بیوکاتالیستی که انجام واکنش ترنس گالاکتوزیلاسیون را در حلال های آبی تسهیل کند، تثبیت شد.

در این تحقیق با استفاده از کایمر ژنی توالی آنزیم بتا گالاکتوزیداز باسیلوس سوبتیلیس (lacA) و توالی رمز کننده یکی از پروتئین های پوششی اسپور (cotC)، آنزیم بتا گالاکتوزیداز بر سطح اسپور این باکتری با هدف تولید بیوکاتالیستی که واکنش هیدرولیز لاکتوز به گلوکوز و گالاکتوز را تسهیل می کند، تثبیت شد.

آنزیم بتا گالاکتوزیداز از خانواده گلیکوزیل هیدرولازها است. این خانواده گروه وسیعی از آنزیم ها را شامل می شود که قادر به هیدرولیز پیوندهای آلفا.D.گالاکتوزیدها وآلفا.L.آرابینوزیدها و آزادکردن آنها به فرم همی استال یا همی کتال می باشد. این آنزیم وزن مولکولی تقریبی ۷٦ کیلودالتون داشته از ۳ بخش،

6 . C-terminal Fragment of the Tetanus Toxin

انتهای N ترمینال (بخش کاتالیتیکی آنزیم)، قسمت میانی (نقش در تترامریزه شدن) و انتهای C ترمینال (نقش ناشناخته) تشکیل شده است. آنزیم بتا گالاکتوزیداز در صنایع شیری برای تجزیه لاکتوز شیر به گلوکز و گالاکتوز به منظور تولید محصولات لبنی بدون لاکتوز برای افرادی که قادر به تجزیه لاکتوز نمی باشند، از ارزش و کاربرد فراوانی برخوردار است. استفاده از آنزیم بتا گالاکتوزیداز در صنایع با محدودیتهایی از قبیل هزینه زیاد تولید، پایداری و مقاومت کم و عدم توانایی در بازیافت این آنزیم مواجه می باشد.

انتظار می رود در سایه تحقیقات در زمینه بیان در سطح اسپور هزینه های یک فرایند صنعتی از طریق تولید کم هزینه حامل اسپوری، مقاوم بودن حامل اسپوری نسبت به شرایط دشوار واکنش های صنعتی، امکان نوسازی آنزیم در هر بار جوانه زنی و اسپورزایی، جداسازی و جمع آوری کارآمد آنزیم به خصوص انواع گرانقیمت آن، کاهش یابد.

تقدیر و تشکر

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

حال که توفیق جمع آوری و تهیه این مجموعه را یافته ام بر خود واجب می دانم از تمامی عزیزانی که در طی انجام این پژوهش از راهنمایی و یاری شان بهره مند گشته ام تشکر و قدردانی کنم و برای ایشان از درگاه پروردگار مهربان آرزوی سعادت و پیروزی نمایم.

در ابتدا صمیمانه ترین تقدیرها تقدیم به خانواده عزیز و مهربانم که همواره حامی و مشوقم بوده اند، آنان که دعای خیرشان بدرقه ی راهم بود و پیمودن روزهای سخت و آسان زندگی ام بدون دعای خیر، و برکت وجودشان غیرممکن بود.

از استاد راهنمای ارجمند که با سعه صدر و صبوری مرا راهنمایی نموده و با ارائه نظرات سازنده و رهنمودهای بی دریغشان در پیشبرد این پایان نامه سعی تمام مبذول داشتند، کمال تشکر را دارم.

از دوستان و همکاران عزیزم که در مراحل مختلف این پروژه کمک و راهنمایی خود را از من دریغ نداشتند و در این رهگذر عمر یاری گر و دلگرمی من بودند، کمال تشکر وقدردانی را دارم.

و تقدیم به تمام آزاد مردانی که نیک می اندیشند و عقل و منطق را پیشه خود نموده و جز رضای الهی و پیشرفت و سعادت جامعه، هدفی ندارند. دانشمندان، بزرگان و جوانمردانی که جان و مال خود را در حفظ و اعتلای این مرز و بوم فدا نموده و می نمایند.

چکیده فارسی

با افزایش روز افزون نیاز صنایع به تولید آنزیم هایی با کارایی و پایداری بیشتر، قابل بازیافت و البته ارزان لزوم استفاده از فناوری DNA نوترکیب در این عرصه حائز اهمیت می باشد. از اینرو بیان پروتئین های مورد نظر بر سطح سلولهای زنده با استفاده از این فناوری به منظور تولید بیوکاتالیست، می تواند جایگاه ویژه ای را در صنعت به خود اختصاص دهد. توانایی خانواده باسیلوس ها در تولید مقادیر فراوانی از آنزیم های خارج سلولی جایگاه ویژه ای به آنها در بین تولید کنندگان آنزیم های صنعتی داده است. اسپور شکل نهفته باکتری و مقاوم ترین ساختار در طبیعت است. این ویژگی اسپور را به عنوان تکیه گاهی(حامل) مناسب در سیستم بیان سطحی معرفی کرده است. آنزیم بتا گالاکتوزیداز یکی از مهمترین آنزیم های صنایع شیری است که با تجزیه لاکتوز در تولید محصولات لبنی فاقد لاکتوز برای افرادی که قادر به تجزیه لاکتوز نمی باشند، کاربرد فراوانی دارد. در این مطالعه، با استفاده از تکنیک بیان در سطح اسپور، بیوکاتالیستی تولید شد که علاوه بر افزایش پایداری آنزیم به علت اتصال به سطح اسپور، مراحل خالص سازی آنزیم، تسهیل شده و از طرفی دیگر می توان بیوکاتالیست را نیز از محیط واکنش به سادگی استخراج کرد. با این هدف، ترادف ژنی cotC-lacA به ژنوم باکتری باسیلوس سوبتیلیس سویه RH101(ΔcotC) انتقال داده شد. سپس بیان آنزیم بتا گالاکتوزیداز بر سطح اسپور با تکنیک های وسترن بلاتینگ و ایمونوفلورسانس تائید گردید. همچنین آزمایشات اولیه سنجش فعالیت آنزیمی نشان داده شد که این آنزیم پس از اتصال به سطح اسپور فعال میباشد.

کلمات کلیدی: بیوکاتالیست، حامل، سیستم بیان سطحی، پروتئین پوششی اسپور

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۱) مقدمه	۱
۱-۱) لاکتوز	۱
۱-۱-۱) اثر لاکتوز بر جذب کلسیم	۱
۱-۱-۲) اثر لاکتوز بر فلور روده ای	۲
۱-۱-۳) سایر اثرات	۲
۱-۱-٤) سوء جذب و عدم تحمل نسبت به کربوهیدرات های شیر	۳
۱-۱-٤-۱) سوء جذب و عدم تحمل لاکتوز	٤
۱-۲) آنزیم بتا گالاکتوزیداز (لاکتاز)	۵
۱-۲-۱) کاربردهای آنزیم بتا گالاکتوزیداز	۸
۱-۲-۲) منابع آنزیم بتا گالاکتوزیداز	۹
۱-۳) باکتری باسیلوس سوبتیلیس	۱۰
۱-٤) اسپور	۱۲
۱-٤-۱) اسپورولاسیون	۱۳
۱-٤-۲) ساختار اسپور	۱٦
۱-٤-۳) جوانه زنی اسپور	۱۸
۱-۵) تثبیت آنزیم	۱۸
۱-۵-۱) روش های تثبیت آنزیم	۲۰
۱-۱-۵-۱) روش های فیزیکی	۲۰
۱-۱-۱-۵-۱) روش جذب سطحی	۲۰
۱-۱-۱-۵-۲) به دام انداختن	۲۱
۱-۱-۵-۲) روش های شیمیایی	۲۱
۱-۲-۱-۵-۱) ایجاد ارتباطات عرضی	۲۱

۲-۲-۱-۵-۱) تشکیل پیوند کووالان ۲۱
٦-۱) سیستم بیان سطحی یکی از روش های تثبیت آنزیم ۲۲
۱-۱-٦-۱) پروتئین حامل (پروتئین لنگر) ۲۳
۲-۱-٦-۱) پروتئین هدف ۲٤
۳-۱-٦-۱) سلول میزبان ۲٤
۲-٦-۱)راهکارهای مختلف اتصال ژنی به منظور بیان سطحی ۲٤
۱-۲-٦-۱) اتصال پروتئین هدف از سمت انتهای آمین به سطح سلول ۲۵
۲-۲-٦-۱) اتصال پروتئین هدف از سمت انتهای کربوکسیل به سطح سلول ۲۵
۳-۲-٦-۱) اتصال پروتئین هدف به صورت ساندویچی به قسمت خارج سلولی پروتئین حامل ۲۵
۳-٦-۱) کاربردهای بیان سطحی ۲۸
۱-۳-٦-۱) تولید واکسنهای زنده ۲۸
۲-۳-٦-۱) تولید بیوکاتالیست‌ها ۲۸
۳-۳-٦-۱) تولید بیورمیدیشن ۲۹
۲) بررسی منابع ۳۱
۳) مواد و روش ها ۳۵
۱-۳) مواد ۳۵
۱-۱-۳) محیط های کشت باکتری ۳۵
۱-۱-۱-۳) محیط کشت LB مایع ۳۵
۲-۱-۱-۳) محیط کشت LB جامد ۳۵
۲-۱-۳) محیط کشت تولید اسپور ۳٦
۳-۱-۳) سویه های باکتریایی ۳۷
٤-۱-۳) پرایمرها ۳۷
۵-۱-۳) ناقل های پلاسمیدی ۳۸
٦-۱-۳) آنتی بیوتیک ها ٤۰
۷-۱-۳) نشانگرهای وزن مولکولی ٤۰
۸-۱-۳) آنزیم ها ٤۰
۹-۱-۳) کیت های آزمایشگاهی ٤۱

۳-۱-۱۰) محلول هاو بافرها ٤١
۳-۱-۱۰-۱) محلول ها و بافرهای الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز ٤١
۳-۱-۱۰-۱-۱) بافر Tris-Acetate-EDTA (TAE) ٤١
۳-۱-۱۰-۱-۲) بافر بارگذاری DNA ٤١
۳-۱-۱۰-۱-۳) محلول رنگ آمیزی ژل ٤٢
۳-۱-۱۰-۱-۳) بافر بارگذاری پروتئین ٤٢
۳-۱-۱۰-۱-٤) محلول های مورد نیاز جهت تهیه سلول های اکولی مستعد ٤٢
۳-۱-۱۰-۱-٥) محلول های مورد نیاز جهت استخراج DNA ژنومی از باسیلوس ٤٢
۳-۱-۱۰-۱-٦) نگهداری باکتری ها ٤٣
۳-۱-۱۰-۱-۷) محلول های مورد نیاز جهت آماده سازی اسپور ٤٣
۳-۱-۱۰-۱-۸) محلول های مورد نیاز جهت ترانسفورماسیون طبیعی باسیلوس سوبتیلیس ٤٣
۳-۱-۱۰-۱-۹) محلولهای مورد نیاز جهت خالص سازی پروتئین با روش کروماتوگرافی تمایلی توسط ستون نیکل با استفاده از کیت Ni-NTA agarose beads ٤٤
۳-۱-۱۰-۱-۱۰) محلول مورد نیاز جهت تهیه نمونه پروتئینی ٤٤
۳-۱-۱۰-۱-۱۱) محلول های مورد نیاز جهت رنگ آمیزی و رنگ بری ژل SDS-PAGE ٤٤
۳-۱-۱۰-۱-۱۲) محلول ها و بافر های مورد نیاز جهت SDS-PAGE ٤٥
۳-۱-۱۰-۱-۱۳) محلول ها و بافر های مورد نیاز جهت انجام وسترن بلاتینگ ٤٦
۳-۱-۱۰-۱-۱٤) آنتی بادی ٤٦
۳-۱-۱۰-۱-۱٥) محلول های مورد نیاز جهت سنجش فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز ٤٧
۳-۲) روش ها ٤٨
۳-۲-۱) مرحله اول: تهیه آنتی بادی بر علیه پروتئین بتا گالاکتوزیداز ٤٨
۳-۲-۱-۱) الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز ٤٨
۳-۲-۱-۱-۱) چگونگی تهیه ژل آگارز و الکتروفورز آن ٤٨
۳-۲-۱-۱-۲) چگونگی پر کردن چاهک های الکتروفورز افقی ٤٩
۳-۲-۱-۱-۳) رنگ آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید ٤٩
۳-۲-۱-۲) طراحی پرایمر ها ٤٩
۳-۲-۱-۳) استخراج DNA ژنومی ٥٠

٤-١-٢-٣) واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ٥١
١-٤-١-٢-٣) مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ٥٢
١-١-٤-١-٢-٣) DNA الگو ٥٢
٢-١-٤-١-٢-٣) داکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP) ٥٢
٣-١-٤-١-٢-٣) کلرید منیزیم (MgCl2) ٥٢
٤-١-٤-١-٢-٣) سولفات منیزیم (MgSO4) ٥٣
٥-١-٤-١-٢-٣) آنزیم DNA پلیمراز Taq ٥٣
٦-١-٤-١-٢-٣) بافر PCR برای DNA پلیمراز Taq ٥٣
٧-١-٤-١-٢-٣) آنزیم DNA پلیمراز Pfu ٥٤
٨-١-٤-١-٢-٣) بافر PCR برای DNA پلیمراز Pfu ٥٤
٩-١-٤-١-٢-٣) پرایمرها ٥٤
٢-٤-١-٢-٣) مراحل واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ٥٤
٣-٤-١-٢-٣) برنامه واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ٥٥
٤-٤-١-٢-٣) ترکیب اجزای واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ٥٥
٥-١-٢-٣) کشت باکتری اکولی واجد پلاسمید pET26b ٥٦
٦-١-٢-٣) استخراج پلاسمید pET26b در حجم کم با استفاده ازکیت Roche ٥٧
٧-١-٢-٣) واکنش برش آنزیمی با آنزیم های محدودکننده NdeI و XhoI ٥٨
١-٧-١-٢-٣) برش آنزیمیDNA با یک آنزیم ٥٨
٢-٧-١-٢-٣) واکنش برش آنزیمی DNA با دو آنزیم ٥٨
٣-٧-١-٢-٣) غیر فعال کردن آنزیم های محدود کننده ٥٩
٨-١-٢-٣) بازیاقت قطعات DNA از ژل آگارز ٥٩
٩-١-٢-٣) اتصال قطعه DNA موردنظر و پلاسمید ٦٠
١٠-١-٢-٣) تهیه سلول های مستعد باکتری اکولی سویه های top10 و bl21 و x10gold ٦١
١١-١-٢-٣) انتقال پلاسمید نوترکیب به درون سلول های مستعد اکولی سویه top10 ٦٢
١٢-١-٢-٣) غربال کردن کلون‌های واجد پلاسمید نوترکیب ٦٣
١٣-١-٢-٣) تائید کلون‌های واجد پلاسمید نوترکیب ٦٣
١-١٣-١-٢-٣) انجام PCR با استفاده از پلاسمیدهای نوترکیب ٦٣

۲-۱۳-۱-۲-۳) برش آنزیمی DNA با استفاده از آنزیم های محدودکننده NdeI و XhoI ٦٣
۱٤-۱-۲-۳) انتقال پلاسمید نوترکیب به درون سلول های مستعد اکولی سویه bl21 ٦٤
۱٥-۱-۲-۳) بیان آنزیم بتا گالاکتوزیداز ٦٤
۱٦-۱-۲-۳) خالص سازی آنزیم بتا گالاکتوزیداز با استفاده از ستون نیکـل و روش کروماـتوگرافی تمایلی ٦٤
۱۷-۱-۲-۳) دیالیز آنزیم بتا گالاکتوزیداز ٦٥
۱۸-۱-۲-۳) بررسی پروتئین تخلیص شده ٦٦
۱-۱۸-۱-۲-۳) الکتروفورز پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE (الکتروفورز عمودی) ٦٦
۲-۱۸-۲-۳) آماده سازی نمونه های پروتئینی ٦٧
۳-۱۸-۱-۲-۳) روش انجام الکتروفورز عمودی ٦٧
٤-۱۸-۱-۲-۳) روش رنگ آمیزی و رنگ بری ژل SDS-PAGE ٦٩
۱۹-۱-۲-۳) تهیه آنتی بادی خرگوشی ۷۰
۲-۲-۳) بررسی بیان آنزیم بتا گالاکتوزیداز بر سطح اسپور ۷۰
۱-۲-۲-۳) واکنش زنجیره ای پلیمراز ۷۰
۲-۲-۲-۳) استخراج پلاسمید pKH40 از باکتری اکولی ۷۱
۳-۲-۲-۳) واکنش برش آنزیمی با آنزیم های محدود کننده NheI و NotI ۷۱
٤-۲-۲-۳) اتصال قطعات DNA ۷۱
٥-۲-۲-۳) انتقال پلاسمید نوترکیب به درون سلول های مستعد اکولی سویه x10gold ۷۱
٦-۲-۲-۳) غربال کردن و تائید پلاسمید نوترکیب ۷۱
۷-۲-۲-۳) خطی کردن پلاسمید نوترکیب ۷۲
۸-۲-۲-۳) انتقال پلاسمید نوترکیب خطی شده به باسیلوس سوبتیلیس سویه RH101(ΔcotC) بـا استفاده از روش ترانسفورماسیون طبیعی ۷۲
۹-۲-۲-۳) تائید کلون های باسیلوسی حاوی پلاسمید نوترکیب ۷۳
۱۰-۲-۲-۳) تهیه اسپور از باکتری باسیلوس سوبتیلیس سویه RH101(ΔcotC) ۷۳
۱۱-۲-۲-۳) آماده سازی اسپور ۷۳
۱۲-۲-۲-۳) استخراج پروتئین های اسپور کت ۷٤
۱۲-۲-۲-۳) بررسی بیان آنزیم بتا گالاکتوزیداز ۷٥

۱-۱۲-۲-۲-۳) تکنیک وسترن بلاتینگ ۷۵
۱-۱-۱۲-۲-۲-۳) مراحل انجام وسترن بلاتینگ ۷۶
۲-۱۲-۲-۲-۳) تهیه لام ایمونوفلورسانس ۷۶
۱۳-۲-۲-۳) بررسی فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز ۷۷
٤) نتایج ۷۹
۱-٤) مرحله اول: نتایج حاصل از تهیه آنتی بادی بر علیه پروتئین بتا گالاکتوزیداز ۷۹
۱-۱-٤) نتایج حاصل از استخراج DNA ژنومی ۷۹
۲-۱-٤) نتایج حاصل از تکثیر ژن بتا گالاکتوزیداز توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۸۰
۳-۱-٤) نتایج حاصل از استخراج پلاسمید pET26b در حجم کم با استفاده ازکیت Roche ۸۲
٤-۱-٤) نتایج حاصل از برش آنزیمی توسط آنزیم های محدود کننده NdeI و XhoI ۸۳
٥-۱-٤) نتایج حاصل از انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول های مستعد اکولی سویه top10 ۸٤
٦-۱-٤) نتایج حاصل از غربال کردن کلون‌های واجد پلاسمید نوترکیب ۸٤
۷-۱-٤) نتایج حاصل از تائید پلاسمید نوترکیب ۸٥
۱-۷-۱-٤) انجام PCR با استفاده از پلاسمیدهای استخراج شده از کلون های مثبت احتمالی ۸٥
۲-۷-۱-٤) برش آنزیمی DNA با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده ۸٦
۸-۱-٤) نتایج حاصل از انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول های مستعد اکولی سویه bl21 ۸۷
۹-۱-٤) نتایج حاصل از خالص سازی آنزیم بتا گالاکتوزیداز ۸۸
۱۰-۱-٤) نتایج حاصل از تائید آنتی بادی گرفته شده از خرگوش ۸۹
۲-٤) نتایج حاصل از بیان آنزیم بتا گالاکتوزیداز بر سطح اسپور ۹۰
۱-۲-٤) نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز ۹۰
۲-۲-٤) استخراج پلاسمید pKH40 از باکتری اکولی ۹۲
۳-۲-٤) نتایج حاصل از برش آنزیمی توسط آنزیم های محدود کننده NheI و NotI ۹۳
٤-۲-٤) نتایج حاصل از انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول های مستعد اکولی سویه x10gold ۹۳
٥-۲-٤) نتایج حاصل از غربال کردن کلون‌های واجد پلاسمید نوترکیب ۹٤
٦-۲-٤) نتایج حاصل از تائید پلاسمید نوترکیب ۹٥
۱-٦-۲-٤) انجام PCR با استفاده از پلاسمیدهای استخراج شده از کلون های مثبت احتمالی ۹٥
۲-٦-۲-٤) برش آنزیمی DNA با استفاده از آنزیم محدود کننده ۹٥

٤-٢-٧) نتایج حاصل از خطی کردن پلاسمید نوترکیب ٩٧
٤-٢-٨) نتایج حاصل از انتقال پلاسمید نوترکیب به باسیلوس سوبتیلیس به روش ترنسفورماسیون طبیعی ٩٧
٤-٢-٩) نتایج حاصل از تائید کلون های باسیلوسی حاوی پلاسمید نوترکیب ٩٨
٤-٢-١٠) نتایج حاصل از استخراج پروتئین های اسپور کت ٩٩
٤-٢-١١) نتایج حاصل از بررسی بیان آنزیم بتا گالاکتوزیداز ١٠١
٤-٢-١١-١) نتایج حاصل از تکنیک وسترن بلاتینگ ١٠١
٤-٢-١١-٢) نتایج حاصل از لام ایمونوفلورسانس ١٠٢
٤-٢-١٢) نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز ١٠٢
٥) بحث و نتیجه گیری ١٠٤
٦) پیشنهادات ١٠٧
منابع و ماخذ ١٠٨

فهرست جدول ها

عنوان صفحه

جدول ۱-۱. منابع آنزیم بتاگالاکتوزیداز ۱۰
جدول ۲-۱. ژن های تولید کننده آنزیم های صنعتی در باسیلوس سوبتیلیس ۱۲
جدول ۳-۱. محصولات باسیلوسی مورد استفاده در صنعت ۱۳
جدول ٤-۱. مقایسه فرم آزاد و تثبیت شده آنزیم ها ۲۱
جدول ٥-۱. مقایسه ای از انواع روش های تثبیت آنزیم ۲٤
جدول ۱-۲ . خلاصه ای از پروتئین های حامل در سیستم بیان سطحی اسپور ۳٤
جدول ۲-۲. انواع روش های غیر ژنتیکی اتصال آنزیم بتا گالاکتوزیداز با منشاء های متفاوت ۳٥
جدول۱-۳. ترکیبات محیط کشت LB مایع و جامد ۳۷
جدول۲-۳. ترکیبات محیط اسپورولاسیون باسیلوس سوبتیلیس (DSM) ۳۷
جدول۳-۳. سویه های باکتریایی استفاده شده در این مطالعه ۳۸
جدول٤-۳. توالی پرایمر های استفاده شده ۳۹
جدول ٥-۳. فهرست پلاسمیدهای استفاده شده در این تحقیق ۳۹
جدول ٦-۳. مشخصات نشانگر های وزن مولکولی مورد استفاده ٤۱
جدول ۷-۳. اسامی آنزیم های محدود کننده به همراه غلظت و نام شرکت تولید کننده ٤۱
جدول۸-۳. اسامی سایر آنزیم های استفاده شده به همراه غلظت و نام شرکت سازنده ٤۲
جدول۹-۳. ترکیبات 50X TAE stock buffer ٤۲
جدول ۱۰-۳. بافر بارگذاری پروتئین ٤۳
جدول۱۱-۳. ترکیب بافر لیز کننده برای استخراج DNA ژنومی از باسیلوس ٤۳
جدول۱۲-۳. محلول های لازم جهت ترانسفورماسیون طبیعی ٤٤
جدول۱۳-۳. ترکیبات و مقادیر محلول های استفاده شده برای رنگ آمیزی و رنگ بری ژل SDS-PAGE ٤٦
جدول ۱٤-۳. مواد ومحلول های استفاده شده برای تهیه ژل اکریل آمید ٤٦

جدول۱۵–۳. ترکیبات وبافرهای مورد استفاده در آنالیز وسترن بلاتینگ ٤٧
جدول ١٦–٣. برنامه PCR استفاده شده در این تحقیق ٥٦
جدول۱۷–۳. ترکیب اجزای PCR در حضور آنزیم pfu پلیمراز ٥٧
جدول ۱۸–۳. ترکیب اجزای PCR در حضور آنزیم Taq پلیمراز ٥٧
جدول ۱۹–۳. اجزاء هضم آنزیمی با یک آنزیم ٥٩
جدول ۲۰–۳. مواد و مقادیر واکنش اتصالی و شرایط انکوباسیون برای DNA با انتهای صاف و چسبنده ٦١
جدول ۲۰–۳. مقادیر مورد استفاده برای ژل اکریل آمید۱۲ ٪ ٧٠

فهرست نمودارها و شکل ها

عنوان صفحه

شکل ۱-۱ . مدل ساختاری لاکتوز ۱

شکل ۲-۱.مکانیسم وارونگی در هیدرولیز گلیکوزیدها توسط خانواده آنزیمی گلیکوزیل هیدرولازها ۷

شکل۳-۱. مکانیسم حفاظتی در هیدرولیز گلیکوزیدها توسط خانواده آنزیمی گلیکوزیل هیدرولازها ۸

شکل ٤-۱. هیدرولیز لاکتوز به گالاکتوز و گلوکز توسط آنزیم لاکتاز ۹

شکل۵-۱. مراحل اسپورولاسیون ۱۵

شکل ٦-۱ آبشار فاکتورهای رونویسی سیگمای مسئول پروسه اسپورولاسیون ۱٦

شکل ۷-۱ لایه های مختلف اسپور باسیلوس سوبتیلیس ۱۷

شکل ۸-۱. مراحل جوانه زنی اسپور ۲۰

شکل ۹-۱. انواع روش های تثبیت آنزیمی ۲۲

شکل ۱۰-۱. سه بخش اصلی سیستم بیان سطحی در باکتری های گرم مثبت و منفی ۲٦

شکل ۱۱-۱. ۱. انواع اتصالات ۲۹

شکل ۱-۳. نقشه دو وکتور مورد استفاده در این تحقیق ٤۰

شکل ۱-٤. استخراج ژنوم باسیلوس سوبتیلیس ۸۰

شکل ۲-٤. فرم شماتیک زیرواحدهای آنزیم بتا گالاکتوزیداز (lacA) ۸۱

شکل ۳-٤. فرم FASTA از توالی پروتئینی آنزیم بتا گالاکتوزیداز. بخش پررنگ مربوط به بخش کاتالیتیکی آنزیم بوده که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته ۸۱

شکل ٤-٤. واکنش PCR گرادیانت دمایی برای تکثیر قطعه lacA با پرایمرهای lacAF3 و lacAR3. (M) مارکر وزن مولکلی برابر 1Kb، (۱) دمای ٤٦°C، (۲) دمای ٤۸°C، (۳) دمای ۵۰°C، (٤) دمای ۵۲°C، (۵) دمای ۵٤°C ۸۲

شکل ۵-٤. تکثیر قطعه lacA با پرایمرهای lacAF3 و lacAR3 در دمای اتصال ۵۰°C ۸۳

شکل ٦-٤. استخراج پلاسمید pET26b (۵۳٦۰جفت باز) با استفاده از کیت Roche ۸۳

شکل ۷-٤. برش آنزیمی توسط آنزیم های محدود کننده NdeI و XhoI. (۱) پلاسمید بدون ۸٤

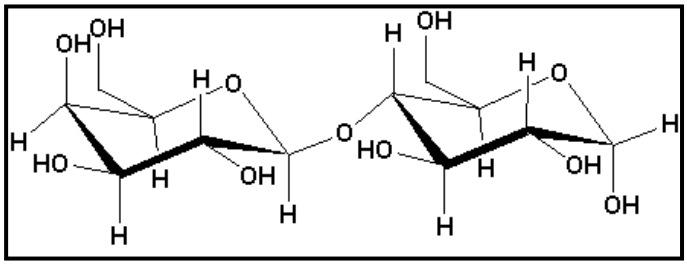
برش (۲) پلاسمید برش خورده با NdeI و XhoI (۳) lacA
شکل ۸-٤. تک کلون های گرفته شده حاصل از ترنسفورماسیون پلاسمید نوترکیب به باکتری اکولی سویه Top10 از محیط LB-Kn ۸۵
شکل ۹-٤. آزمایش اختلاف حرکت روی ژل آگارز از طریق بررسی سریع برای پلاسمید نوترکیب pET26b-lacA ۸٦
شکل ۱۰-٤. انجام واکنش PCR با پلاسمید های نوترکیب به عنوان الگو. (۱) الگو آب به عنوان شاهد برای مواد واکنش (۲) کنترل منفی (پلاسمید بدون قطعه مورد نظر) (۳) کنترل مثبت (lacA) (٦-٤) پلاسمیدهای نوترکیب ۸۷
شکل ۱۱-٤. برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب با آنزیم های محدودکننده NdeI و XhoI. (۱) پلاسمید برش نخورده به عنوان شاهد (۲) پلاسمید خطی شده به عنوان شاهد (۳) پلاسمید سازه ژنی نوترکیب (٤) lacA سازه ژنی نوترکیب (۵) lacA به عنوان شاهد ۸۸
شکل ۱۲-٤. تک کلون های گرفته شده حاصل از ترنسفورماسیون پلاسمید نوترکیب تائید شده به اکولی سویه Bl21 از محیط LB-Kn ۸۹
شکل ۱۳-٤. پروتئین LacA (بتا گالاکتوزیداز) بیان و تخلیص شده. (۱) پروتئین های توتال سلول قبل از بیان (۲) پروتئین های توتال سلول بعد از بیان (۳) پروتئین بتا گالاکتوزیداز خالص شده ۹۰
شکل ١٤-٤. تائید آنتی بادی بر علیه پروتئین LacA با وسترن بلاتینگ ۹۱
شکل۱۵-٤. واکنش PCR گرادیانت دمایی برای تکثیر قطعه lacA با پرایمرهای lacAF5 و lacAR5. (۱) دمای ٤٦°C، (۲) دمای ٤٨°C، (۳) دمای ۵۰°C، (٤) دمای ۵۲°C، (۵) دمای ۵٤°C ۹۲
شکل ١٦-٤. تکثیر قطعه lacA با پرایمرهای lacAF5 و lacAR5 در دمای اتصال ۵۰°C ۹۳
شکل ۱۷-٤. پلاسمید pKH40 (۸٤۸۹ جفت باز) استخراج شده با کیت Roche ۹۳
شکل ۱۸-٤. برش آنزیمی پلاسمید pKH40 با آنزیم های محدو کننده NheI و NotI. (۱) پلاسمید pKH40 بدون برش به عنوان شاهد (۲) پلاسمید pKH40 برش خورده ۹٤
شکل ۱۹-٤. تک کلون های گرفته شده حاصل از ترنسفورماسیون پلاسمید نوترکیب به باکتری اکولی سویه X10gold از محیط LB-Amp ۹۵
شکل ۲۰-٤. آزمایش اختلاف حرکت روی ژل آگارز از طریق بررسی سریع پلاسمید های ۹۵

نوترکیب pKH40-lacA
شکل ۲۱-٤. انجام واکنش PCR با پلاسمید های نوترکیب به عنوان الگو. (۱) کنترل مثبت (پروتئین بتا گالاکتوزیداز) (۲و۳) پلاسمیدهای نوترکیب ۹٦
شکل ۲۲-٤. برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pKH40-lacA با آنزیم محدود کننده NheI و NotI. (۱) پلاسمید pKH40 خطی شده به عنوان شاهد (۲) lacA به عنوان شاهد (۳و٤) پلاسمیدهای نوترکیب برش خورده با آنزیم محدود کننده NheI و NotI ۹۷
شکل ۲۳-٤. برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pKH40-lacA با آنزیم محدود کننده NcoI. (۱) پلاسمید pKH40 خطی شده به عنوان شاهد (۲) پلاسمید غیر نوترکیب (٦-۳) پلاسمیدهای نوترکیب pKH40-lacA ۹۷
شکل ۲٤-٤. خطی کردن پلاسمید نوترکیب pKH40-lacA با آنزیم ScaI. (۱) پلاسمید نوترکیب pKH40-lacA بدون برش به عنوان شاهد (۲) پلاسمید نوترکیب pKH40-lacA خطی شده با آنزیم ScaI ۹۸
شکل ۲۵-٤. تک کلون های حاصل از انتقال پلاسمید نوترکیب خطی شده به باسیلوس سوبتیلیس سویه RH101(ΔcotC) با استفاده از روش ترانسفورماسیون طبیعی بر روی محیط LB-Cm ۹۹
شکل ۲٦-٤): واکنش PCR با پرایمرهای cotCF4 و lacAR5 . (٦) پلاسمید نوترکیب به عنوان کنترل مثبت (۵) ژنوم باسیلوس سوبتیلیس به عنوان کنترل منفی (۱،۲،۳) ژنوم های نوترکیب (٤) ژنوم غیرنوترکیب ۱۰۰
شکل ۲٦-٤) الف) جداسازی پروتئین های پوششی اسپور ب) نامگذاری پروتئین های پوششی اسپور بر اساس الگو تفکیک پروتئین های پوششی اسپور مقاله Ricca & cutting, 2003 ۱۰۱
شکل ۲۷-٤) تائید بیان آنزیم بتا گالاکتوزیداز توسط تکنیک وسترن بلاتینگ. (C+) پروتئین LacA خالص (C-) پروتئین های اسپور غیر نوترکیب (LacA-CotC) پروتئین های اسپور نوترکیب ۱۰۲
شکل ۲۸-٤) تصویر نمونه لام ایمونوفلورسانس. ۱.تصویر میکروسکوپ نوری ۳. تصویر میکروسکوپ فلورسانس. فلورسانس سطح اسپور باکتری دراثر شناسایی کمپلکس پروتئین بتا گالاکتوزیداز و آنتی بادی اولیه توسط FITC ۱۰۳
نمودار ۱-٤) نشان دهنده جذب ۰/۱۷۸ nm برای آنزیم بتا گالاکتوزیداز متصل به سطح اسپور ۱۰٤

۱) مقدمه

۱-۱) لاکتوز

لاکتوز یا قند شیر، یک دی ساکارید با فرمول مولکولی $C_{12}H_{22}O_{11}$ و وزن مولکولی ۳٤۲/۳۰ g/mol می باشد. نام گذاری آیوپاک[1] آن به صورت β.D.galactopyranosyl (1→4) D.galucose می باشد (شکل۱-۱). این قند به وفور در شیر یافت می شود. نام لاکتوز از لاکت (lacte) که درلاتین به معنای شیر است وپسوند اوز (ose) که برای نامگذاری قندها بکار می رود ریشه گرفته است. دی ساکارید لاکتوز نقش مهمی را در فیزیولوژی گوارش و جذب برخی مواد مانند کلسیم بر عهده دارد و کاربردهای صنعتی آن نیز بسیار زیاد است .



شکل ۱-۱ . مدل ساختاری لاکتوز

۱-۱-۱) اثر لاکتوز بر جذب کلسیم

مکانیسم‌های احتمالی متعددی برای جذب کلسیم بیان شده است برای نمونه جذب کلسیم به مقدار قابل ملاحظه‌ای در اثر گنجاندن لاکتوز در رژیم غذایی، بهبود می‌یابد. به نظر می‌رسد که این اثر لاکتوز به محصول متابولیسم حاصل از آن یعنی اسید لاکتیک مربوط باشد که در اثر فعالیت میکروارگانیسم‌ها در روده تولید می شود. توضیح مناسبی که برای بهبود جذب کلسیم توسط لاکتوز وجود دارد این است که اسید تولید شده در روده حلالیت نمک‌های کلسیم را افزایش داده و بنابراین

[1] . IUPAK