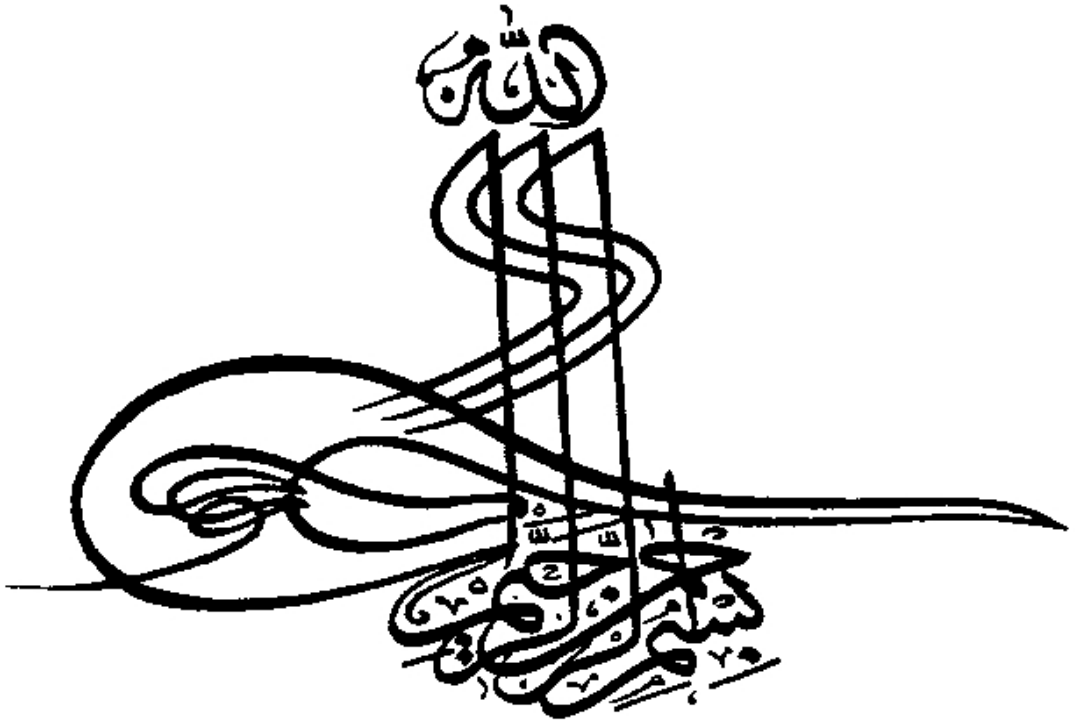


دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد اصلاح نباتات

انتقال ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب

(*Lampyris turkestanicus*) به گیاه کلزا (*Brassica napus* L.)

تحقیق و تدوین: **حسین خسروی**

استاد راهنما: **دکتر مختار جلالی جواران**

استاد مشاور: **دکتر سامان حسینخانی**

تیر89

بسم الله الرحمن الرحیم

حمد و سپاس یزدان پاک را که با الطاف بیکران او توانستم نگارش و تدوین پایان‌نامه و این مرحله از زندگی خود را با موفقییت به پایان برسانم. در این راستا بر خود لازم می دانم از تمامی کسانی که در موفقییت من نقشی داشته‌اند تشکر و قدردانی نمایم .

با زبانی قاصر از پدر و مادر و خانواده‌ام که در تمام مراحل زندگی یاور و پشتیبان من بوده‌اند

از زحمات جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران که همواره در اجرای این پژوهش به عنوان استاد راهنما زحمات فراوانی را متحمل شده‌اند

از استاد مشاور محترم جناب آقای دکتر سامان حسینخانی به خاطر راهنمایی‌های ارزنده‌شان

از زحمات اساتید محترم گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس، دکتر احمد معینی، دکتر قاسم کریم زاده، دکتر حمید دهقانی و دکتر سید رضاقلی میرفخرایی

از جناب آقای دکتر شکیب و دکتر دهقانی به خاطر بازخوانی و داوری پایان‌نامه

از مسئولین محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، سرکار خانم مهندس آزموده و جناب آقای مهندس ایری

از کمک‌ها و راهنمایی‌های سرکار خانم مهندس طاهری جوان و مهندس آرش رزمی

از تمام هم‌آزمایشگاهیها و همکلاسی‌ها

و تمامی عزیزانی که به نوعی در موفقییت‌های بنده نقشی داشته‌اند

کمال امتنان و تشکر را دارم

و برای همه سروران عزیز موفقیت روزافزون و صحت و سلامتی از ایزد منان خواستارم.

حسین خسروی

چکیده:
پیشرفت‌های اخیر در زیست شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی گیاهی تصور عمومی را در مورد کاشت گیاهان به صورت سنتی و فقط به عنوان یک منبع غذایی به سمت اینکه گیاهان می‌توانند در نقش کارخانه‌های زیستی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب و دارویی ظاهر شوند تغییر داده است ." زراعت مولکولی" به تولید پروتئین‌های دارویی و آنزیم‌های صنعتی ارزشمند در گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک اطلاق می‌شود. آنزیم لوسیفراز حشره شب‌تاب یکی از مهمترین آنزیم‌های صنعتی است که به طور وسیعی در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی و بیولوژی سلولی و مولکولی بویژه در تشخیص میزان ATP به منظور تشخیص آلودگی‌های میکروبی، تهیه کیت‌های تشخیص سرطان، غربالگری داروها، زیست‌حسگرها، سنجش‌های آنزیمی و توالی‌یابی DNA (Pyrosequencing) استفاده می‌شود. ژن لوسیفراز نیز به عنوان ژن گزارشگر ایده‌آل در مهندسی ژنتیک به منظور بهینه‌سازی سیستم انتقال ژن، کاربرد فراوان دارد. تحقیق حاضر جهت انتقال ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب گونه ایرانی *Lampyris turkestanicus* و امکان سنجی تولید آن در گیاه کلزا انجام گرفت. در این تحقیق، ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب (*luc*) که تحت پیشبرنده 35S ویروس موزایک گل کلم (CaMV 35S) در پلاسمید pCAMBIA1304 کلون شده بود به اگروباکتریوم سویه LBA4404 منتقل گردید و به وسیله Colony PCR با آغازگرهای اختصاصی تأیید شد. سپس پلاسمید نوترکیب شامل ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب (*luc*) به کمک اگروباکتریوم به گیاه کلزا منتقل گردید. ریزنمونه های لپه‌ای از گیاه کلزا رقم PF4570/91 برای تراریخت سازی مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین آستانه تحمل گیاه کلزا به آنتی بیوتیک هیگرومایسین غلظت‌های مختلف این آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه‌های تلقیح‌شده توسط آگروباکتریوم، به محیط‌های کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین و سفوتاکسیم منتقل شدند. گیاهان تراریخت بر روی محیط MS حاوی 7/5 mg/l آنتی بیوتیک هیگرومایسین انتخاب شدند و به محیط طویل شدن شاخه و ریشه زایی انتقال یافتند. آنالیز PCR گیاهان تراریخت وجود ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب را در گیاهان تراریخت تأیید نمود.

واژه‌های کلیدی: لوسیفراز حشره شب‌تاب، انتقال ژن، آگروباکتریوم، کلزا، کشاورزی مولکولی

فهرست

فصل اول مقدمه و بررسی منابع 8
1-1- مقدمه 9
2-1- لومینسانس (Luminescence) 11
3-1- بیولومینسانس 11
4-1- موجودات بیولومینسانس 12
5-1- حشره شب‌تاب 13
6-1- لوسیفراز حشره شب‌تاب 13
7-1- لوسیفرین حشره شب‌تاب 14
1-7-1- آنالوگهای لوسیفرین 14
8-1- مکانیزم تولید نور 15
9-1- کاربردهای لوسیفراز و بیولومینسانس 16
1-9-1- سنجش ATP توسط لوسیفراز 16
2-9-1- اندازه‌گیری باکتری‌ها و سلول‌ها 17
3-9-1- اندازه‌گیری آنزیم‌ها 17
4-9-1- استفاده از لوسیفراز حشره شب‌تاب در تکنیک Pyrosequencing 17
5-9-1- گزارشگرهای زیستی 18
6-9-1- کاربرد لوسیفراز در تکنیک‌های سنجش ایمنی 19
7-9-1- کاربرد لوسیفراز در بررسی اتصال گیرنده- لیگاند 19
1-7-9-1- روش BRET 19
2-7-9-1- روش سنجش آلفا 20
8-9-1- کاربرد بیولومینسانس در غربالگری داروها 20
1-8-9-1- آزمون‌های آزمایشگاهی 21
1-8-9-1-الف- سنجش فاقد سلول 21
1-8-9-1-ب- سنجش مبتنی بر سلول 21
2-8-9-1- آزمون‌های حیاتی 21
9-9-1- ژن گزارشگر 22
10-1- سابقه تحقیقات در زمینه بیولومینسانس و لوسیفراز 26
1- 11- سیستم‌های مختلف بیان ژن هدف در گیاهان 29
1- 11- 1- انتقال ژن هدف به هسته سلول گیاهان 29
2-11-1- گیاهان تراریخت کلروپلاستی 29

1-11-3- کشت های سوسپانسیون سلولی جهت تولید پروتئین های نوترکیب..... 30
1-12- روش‌های انتقال ژن به گیاهان..... 30
1-12-1- اگروباکتریوم 32
1-12-2- طبقه بندی آگروباکتریوم ها 32
1-12- 3- اساس انتقال ژن به وسیله اگروباکتریوم..... 33
1-12-4- روش تراریختی گیاهان با آگروباکتریوم 36
1-12-5- مزایا و معایب روش اگروباکتریوم برای انتقال ژن به گیاهان..... 37
1-13- ناقلین pCAMBIA..... 38
1-13-1- پیشبرنده و توالی تنظیم کننده DNA..... 40
1-14- گیاه شناسی کلزا 41
1-14-1- منشاء پیدایش کلزا 41
1-14-2- مشخصات گیاهشناسی 42
1-14-2-1- ارقام و گونه ها 42
1-15-تاریخچه تراریختی در گیاه کلزا..... 42
فصل دوم مواد و روش‌ها 45
2-1- بخش ملکولی..... 43
2-1-1- مواد شمیایی 43
2-2- ناقل‌ها 43
2-3- محیط کشت باکتریایی LB 44
2-3-1- تهیه ذخیره مادری از باکتری..... 45
2-4- آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده..... 45
2-5- ژن لوسیفراز شب‌تاب گونه ایرانی..... 46
2-6- آغازگر ها..... 47
2-7- استخراج پلاسمید به روش Mini-Preparation..... 47
2-8- انتقال ناقل pCAMBIA1304 حامل ژن لوسیفراز به آگروباکتریوم 50
2-9- اثبات وجود سازه درآگروباکتریوم..... 51
2-10- سویه اگروباکتریوم 51
2-10-1-شرایط کشت *Agrobacterium tumefaciens*..... 52
2-11- انتقال ژن و کشت بافت گیاهی 52
2-11-1- مواد گیاهی و آماده سازی بذرها..... 52
2-11-2- محیط کشت گیاهی MS..... 52
2-11-3- طرز تهیه محلولهای ذخیره‌ای هورمون‌های گیاهی 55
2-12- تراریخت کردن ریز نمونه های برگ های لپه ای 56

2-12-1- باززایی گیاهان تراریخت 56
2-13- استخراج DNA ی ژنومی از گیاه کلزا 57
2-13-1- اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA 58
2-14- الکتروفورز با ژل آگارز 58
2-14-1- مواد و وسایل لازم برای الکتروفورز با ژل آگارز 58
2-14-2-تهیه ژل آگارز 59
2-14-3- تهیه بافر نمونه گذاری 59
2-14-4-تهیه محلول اتیدیوم بروماید 60
2-14-5-الکتروفورز DNAی ژنومی 60
2-14-6- آنالیز گیاهان تراریخت 61
2-14-7- آنالیز در سطح DNA 61
2-14-8- آزمون PCR برای ژن لوسیفراز 62
فصل سوم نتایج و بحث 63
3-1- غربالگری کلون‌های حاوی پلاسمیدهای نوترکیب pCAMBIA1304 64
3-2-تأیید کلون های نوترکیب اگروباکتریوم حاوی پلاسمید pCAMBIA1304 64
3-3-انتقال ژن *LUC* به کلزا با استفاده از روش اگروباکتریوم 65
3-4-مراحل کشت بافت و رشد گیاه 66
3-5- بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراجی 68
3-7- بررسی گیاهان باززایی شده (تراریخت احتمالی) با استفاده از تکنیک PCR 69
3-8- بحث 70
فصل چهارم منابع 75

فهرست جداول

جدول 1-1- مقایسه ژن های گزارشگر مورد استفاده در تولید گیاهان تراریخت 24
جدول 1-2- مقایسه لوسیفراز با برخی از ژنهای گزارشگر متداول 25
جدول2-1- غلظت آنتی‌بیوتیک‌های مورد نیاز در محیط‌های کشت 46
جدول 2-2- ترکیبات محلول بافرI استخراج پلاسمید 48
جدول 2-3- ترکیبات محلول بافرII استخراج پلاسمید 48
جدول 2-4- ترکیبات محلول بافرIII استخراج پلاسمید 48
جدول 2-5- ترکیبات محیط کشت MS 54

جدول 2-6- روش ساخت سایر محیط های مورد نیاز..... 55
جدول 2-7-ترکیبات بافر استخراج 58
جدول 2-8- ترکیبات بافرTBE 59
جدول 2-9- ترکیبات بافر نمونه گذاری 60
جدول 2-10 مواد مورد مصرف برای PCR..... 62
جدول 2- 11 شرایط PCR 62

فهرست اشکال

شکل 1-1- ساختار D- لوسیفرین در حشرات 16
شکل 1-2- مکانیسم انجام واکنش بیولومینسانس 17
شکل 1-3- نمای کلی از سیستم BRET..... 21
شکل2-1- نقشه ناقل بیانی گیاهی pCAMB IA1304: 44
شکل3-1- تایید حضور ژن *LUC* در آگروباکتریوم 65
شکل 3-2: برگ‌های لپه‌ای پس از آلوده سازی بر سطح محیط همکشتی 66
شکل3-3- باززایی بر سطح محیط انتخابی 67
شکل 3-4- گیاه باززایی شده بر سطح محیط کشت انتخابگر 68
شکل 3-5- DNAی ژنومی استخراج شده از گیاهان 68
شکل 3-6- بررسی DNA ژنومی استخراج شده از گیاهچه‌های باززایی‌شده 70

انتقال ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب

(*Lampyris turkestanicus*) به گیاه کلزا (*Brassica napus* L.)

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در زیست شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی گیاهی تصور عمومی را در مورد کاشت گیاهان به صورت سنتی و فقط به عنوان یک منبع غذایی به سمت اینکه گیاهان می‌توانند در نقش کارخانه‌های زیستی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب و دارویی ظاهر شوند تغییر داده است. گیاهان به دلیل توانایی تولید نامحدود در تعداد و مقدار پروتئین‌های ایمن و ارزان نوترکیب دارای قابلیت کشاورزی زیستی هستند. تحقیقات گسترده در دو دهه اخیر نشان داده است که دامنه وسیعی از پروتئین‌های مهم و ضروری می‌توانند به طور مؤثری در گیاهان بیان شوند. نمونه‌هایی شامل پروتئین‌های سرم و فاکتورهای رشدی، آنتی بادی‌ها، واکسن‌ها، آنزیم‌های تجاری، پلیمرهای زیستی و معرف‌های مولکول‌های زیستی وجود دارند.(Fischer and mans..,2000) آنزیم لوسیفراز حشره شب‌تاب یکی از مهمترین آنزیم‌های صنعتی است که به طور وسیعی در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی و بیولوژی سلولی و مولکولی بویژه در تشخیص میزان ATP به منظور تشخیص آلودگی‌های میکروبی، تهیه کیت‌های تشخیص سرطان، غربالگری داروها، زیست‌حسگرها، همچنین در بررسی روابط برهمکنشی و تاخوردگی پروتئین‌ها، سنجش‌های آنزیمی و توالی‌یابی DNA (Pyrosequencing) استفاده می‌شود. ژن لوسیفراز نیز به عنوان ژن گزارشگر ایده‌آل در مهندسی ژنتیک به منظور بهینه‌سازی سیستم انتقال ژن، کاربرد فراوان دارد. تحقیق حاضر جهت انتقال ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب گونه ایرانی*Lampyris turkestanicus* و بررسی امکان سنجی تولید آن در گیاه کلزا انجام گرفت.

در این تحقیق، ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب (luc) که در ناقل بیانی pCAMBIA1304 که تحت پیشبرنده 35S ویروس موزایک گل کلم (CaMV 35S) همسانه‌سازی شده بود توسط روش ذوب و انجماد به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سوش *LBA4404* منتقل و به وسیله Colony PCR با آغازگرهای اختصاصی تأیید شد. سپس پلاسمید نو ترکیب شامل ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب (luc) به کمک باکتری آگروباکتریوم به گیاه کلزا منتقل گردید. ریزنمونه‌های لپه‌ای از گیاه کلزا رقم PF4570/91 برای تراریخت سازی مورد استفاده قرار گرفت.. جهت تعیین آستانه تحمل گیاه کلزا به آنتی بیوتیک هیگرومایسین غلظت‌های مختلف این آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان تراریخت بر روی محیط MS حاوی آنتی بیوتیک هیگرومایسین و سفوتاکسیم انتخاب شدند. گیاهچه‌های باززایی‌شده بر روی محیط کشت انتخابی، جداسازی و به محیط کشت ریشه‌زایی انتقال یافتند. گیاهچه‌ها پس از ریشه‌دار شدن، ابتدا به گلدان حاوی پرلایت و در نهایت به خاک منتقل شدند آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت وجود ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب (luc) را در گیاهان تراریخت تأیید نمود. از گیاهان شاهد غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی PCR استفاده گردید.

واژه‌های کلیدی: لوسیفراز حشره شب‌تاب، انتقال ژن، آگروباکتریوم، کلزا، کشاورزی مولکولی

فصل اول مقدمه و بررسی منابع

1-1- مقدمه

آنزیم لوسیفراز به طور وسیعی در بیوتکنولوژی و بیولوژی سلولی و مولکولی استفاده می‌شود. لوسیفراز یکی از مهمترین آنزیم‌های صنعتی است. این آنزیم اساس گستره وسیعی از تکنیک‌های تشخیصی را تشکیل می‌دهد. تولید نور توسط آنزیم لوسیفراز یکی از از حساس‌ترین ابزار تشخیصی مقدار ATP از طریق لومینومتری (که حساس‌ترین روش سنجش ATP است)، به منظور تشخیص آلودگی‌های میکروبی، ارزیابی فسفاتازها، توالی‌یابی DNA به روش Pyrosequencing اندازه‌گیری میزان حیات سلولی[1]، تهیه کیت‌های تشخیص سرطان و زیست‌حسگرها، غربال گری داروها، بررسی روابط برهمکنشی و تاخوردگی پروتئین‌ها، سنجش‌های آنزیمی و به عنوان ژن گزارشگر کاربرد فراوان دارد.

گیاهان تراریخت[2] می توانند به عنوان بیوراکتورهای زنده برای تولید ارزان مواد شیمیایی، زیست داروها و پروتئینهای با ارزش عمل نمایند که این پدیده به زراعت مولکولی[3] معروف می‌باشد. با استفاده از روش زراعت مولکولی می توان کربوهیدراتها، اسیدهای چرب، پلی پپتیدها، واکسن ها، آنزیم های صنعتی و پلاستیک های تجزیه پذیر زیستی را در سیستم های گیاهی تولید نمود.

از مهمترین مزایای تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های بیانی گیاهی می‌توان به اقتصادی‌تر بودن آن نسبت به سیستم‌های صنعتی، تولید فرآورده‌های بیولوژیکی فعال و مشابه شکل طبیعی، بیان بالای ژن و تولید بالای پروتئین نوترکیب، پایداری بیشتر و همچنین عدم وجود خطرات ناشی از آلودگی اشاره کرد (Daniell *et al.*, 2001). در اواخر دهه 80 میلادی تکنولوژی تولید پروتئین و DNA نوترکیب در گیاهان باعث کشف سیستم‌های بیان گیاهی شد که قادر به تولید پروتئین‌های ارزشمند بودند. زراعت مولکولی دارای پتانسیل بالایی در تولید نامحدود پروتئین‌های دارویی و آنزیم‌ها می‌باشد (Schillberg *et al.*, 2002).

مزایای گیاهان تراریخت شده در جدول شماره.1 خلاصه شده است. مزیت عمده سیستم گیاهی در مقایسه با سایر سیستم‌ها این است که گیاهان می‌توانند جهت تولید هر نوع پروتئین در مقیاس زیاد با قیمتی حدود 10% سیستم‌های دیگر مورد استفاده قرار بگیرند. این صرفه جویی به دلیل تمام نشدن سرمایه در مقایسه با سیستم‌های تخمیری و کاهش هزینه‌های پی در پی، توانایی نگهداری و برداشت گیاهان با استفاده

1-Viability
2 -Transgenic plants
3 -Molecular Farming

از روش‌های سنتی و عدم نیاز فعالیت‌های کشاورزی به مهارت‌های خاص است. بر خلاف سیستم‌های تخمیری و حیوانات تراریخته میزان تولید در گیاهان زیاد و هزینه تولید ارزان است. برخلاف حیوانات تراریخته در سیستم گیاهی نیازی به نگهداری یک گله حیوان تراریخته نیست. همچنین مواد گیاهی می‌توانند به صورت بذر نگهداری و در موقع نیاز کشت و مورد بهره برداری قرار گیرند.

یک مزیت دیگر سیستم‌های گیاهی نسبت به سایر سیستم‌ها سلامتی[1] آنهاست زیرا معمولاً حاوی بیماری زای انسانی و حیوانی نیستند. اگر بتوان برخی پروتئین‌های نوترکیب خاص را در قسمت‌های خوراکی مثل دانه و میوه بیان کرد بسیاری از هزینه‌ها کاهش می‌یابد و یا به طور کلی حذف می‌شود. این عمل به ویژه در واکسن‌ها و آنتی‌بادی‌هایی که برای ایمنی درمانی[2] کاربرد دارند مؤثر است. (Daniell *et al*., 2001)

پروتئین‌های نوترکیب را می‌توان در بخش‌های مختلف گیاهی مانند میوه، ریشه، برگ، دانه و.. تولید نمود. تجمع پروتئین‌های نوترکیب در دانه فواید دیگری هم دارد در غلات پروتئین‌های تجمع یافته در دانه می‌تواند در شرایط مختلف برای ماهها و یا سال‌ها بدون کاهش فعالیت بیولوژیکی پایدار باقی بماند. به علاوه جمع شدن اختصاصی پروتئین‌ها در دانه در مقایسه با تجمع در قسمت‌های رویشی بیشتر می‌تواند از افزایش پروتئین‌های مزاحم جلوگیری کند.

1- سیستم‌های گیاهی نسبت به سیستم‌های تخمیری و بیورآکتورها اقتصادی‌تر هستند. به طورکلی، برآورد کرده‌اند که ارزش تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان بسته به نوع گیاه می‌تواند یک دهم تا یک پنجاهم قیمت تولید همان پروتئین‌ها در فرمانتور و با استفاده از باکتری *E. coli* باشد (Ghislaine *et al*., 2008).

2- امکان تولید انبوه پروتئین‌ها با منشأ خارجی در گیاهان وجود دارد. تخمین زده می‌شود که میزان تولید پروتئین‌ها در گیاهانی نظیر توتون، سویا و یونجه، بیش از 100 کیلوگرم به ازای هر هکتار باشد (Maliga, 2002).

3- امکان بیان پروتئین مورد نظر در قسمت خاصی از گیاه نظیر برگ، ریشه، دانه و یا در اندامک خاصی از سلول (نظیر کلروپلاست و میتوکندری) وجود دارد (Daniell *et al*., 2002).

1-Safety
2 -Immunotherapy

4- برخلاف باکتری‌ها، گیاهان (به دلیل یوکاریوت بودن) می‌توانند پروتئین‌های پیچیده یوکاریوتی را در شکل صحیح خود تولید کنند (Schillberg *et al.*, 2002).

هم اکنون تقاضای روزافزون به داروهای بیولوژیکی، تشخیصی و در عین حال قیمت بالای آنها، دسترسی به آنها را محدود کرده است بنابراین به نظر می رسد که استفاده از بیوراکتورهای گیاهی جایگزین مناسبی برای سایر سیستمها باشد.

1-2- لومینسانس (Luminescence)

لومینسانس پدیده نشر نور توسط یک مولکول برانگیخته ضمن بازگشت به سطح پایه می باشد. براساس نوع منبع مورد استفاده برای ایجاد حالت برانگیخته درمولکولها، انواع لومینسانس وجود دارد. در فتولومینسانس (فلورسانس و فسفروسانس) اشعه الکترومگنتیک، در پیرولومینسانس(Pyroluminescence) گرما ، درکمی لومینسانس (Chemiluminescence) انجام یک واکنش شیمیایی و در بیولومینسانس(Bioluminescence) با واسطه آنزیم لوسیفراز شیمیایی تامین کننده انرژی لازم برای ایجاد حالت برانگیخته می‌باشند (Meighen.,1993)

1-3- بیولومینسانس

پدیده نشرنور توسط موجودات زنده اولین بار توسط چینی ها و سپس توسط ارسطو در چهار قرن قبل از میلاد گزارش شده ا ست . (Meighen ., 1991)

بیولومینسانس یا نشر نور توسط موجودات زنده، یکی از جالب‌ترین مباحث زیست‌شناسی می‌باشد. بیولومینسانس به فرآیند تبدیل انرژی شیمیایی به نور در سیستم‌های زیستی گفته می‌شود و به دو جزء اصلی یعنی آنزیم لوسیفراز و سوبسترای لوسیفرین بستگی دارد. این فرایند در دسته وسیعی از جانداران آبزی و خشکی‌زی مشاهده و گزارش شده است. آنزیم‌های درگیر در این فرایند با نام کلی لوسیفراز نامگذاری شده‌اند. واکنش آنزیم‌ها عموماً منجر به تولید نور سبز- زرد می‌شود. با این حال برخی از آنزیم‌ها به طور طبیعی نور قرمز تولید می‌کنند (Alipour *et al.*, 2004).

فیزیولوژیست فرانسوی Raphel Dubis در قرن 19 برای اولین بار ماهیت شیمیایی ترکیبات دخیل در پدیده بیولومینسانس را شناسایی و پیشنهاد کرد که بیولومینسانس شامل سوبسترای مقاوم به حرارت (لوسیفرین) و آنزیم حساس به حرارت (لوسیفراز) می با شد (Meighen., 1993).

در واکنش‌های شیمیایی انرژی به صورت گرما آزاد و یا جذب می‌شود. در واکنش‌های لومینسانس، واکنشگرها در اثر جذب انرژی، به سطح بالایی از انرژی (تراز بالاتر الکترونی) می‌رسند که با بازگشت به حالت پایه، تولید نور می‌کنند. لومینسانس را معمولاً نور سرد نیز توصیف می‌کنند و میزان کمی گرما در جریان این واکنش تولید می‌شود. لوسیفرین در حضور اکسیژن مولکولی به لوسیفراز متصل و یک حد واسط پر انرژی (اکسی لوسیفرین) به وجود می آورد، در مرحله بعد اکسی لوسیفرین تجزیه و نشر نور صورت می گیرد .مکانیسم کلی نشر نور در موجودات زنده در زیر بیان شده است.

$$\textbf{Luciferase} + \underset{\textbf{Luciferin}}{\textbf{O}_2} \longrightarrow \textbf{Oxyluciferin} \longrightarrow \textbf{Light}$$

1-4- موجودات بیولومینسانس

پدیده بیولومینسانس در گونه‌های مختلفی از جانداران وجود دارد که از نظر فیزیولوژیکی متفاوتند. برای هر یک از این موجودات، موارد بیوشیمی، رنگ و مکانیسم نشر نور متفاوت است. در جاندارن نورزا از پدیده نشر نور جهت به دام‌اندازی طعمه، ارتباط جنسی و دفاع یا استتار استفاده می‌شود، اگر چه مواردی وجود دارد که نقش بیولومینسانس نامشخص است (Carlson and Copeland, 1985). بسیاری از موجودات آبزی، حشرات، باکتری‌ها، یک گونه از حلزون‌ها، عروس دریایی[1]، بنفشه دریایی[2]، مرجان‌های دریایی و برخی از خرچنگ‌ها توانایی تولید نور را دارند. با وجود اینکه در تمامی موجودات لومینسانت آنزیم لوسیفراز وجود دارد، اما سوبستراهای مورد استفاده و چگونگی کاتالیز واکنش به وسیله این آنزیم در موجودات مختلف کاملاً متفاوت است. به دلیل کاربرد فراوان لوسیفراز حشره شب‌تاب[3]، بیشتر مطالعات بر روی این آنزیم صورت گرفته است. آنزیم لوسیفراز با استفاده از O_2، Mg^{2+} و ATP با انجام عمل اکسیداتیو، دکربوکسیلاسیون بر روی

1- *Aequorea*
2- *Renilla*
3- Firefly luciferase

سوبسترایD-لوسیفرین، نور سبز- زرد و نیز آدنوزین مونوفسفات (AMP)، CO_2، اکسی‌لوسیفرین و پیروفسفات(PPi) تولید می‌کند (Gomi *et al*., 2002).

1-5- حشره شب‌تاب

حشره شب‌تاب، حشره‌ای است که دارای یک ناحیه نورانی در زیر شکم و در بندهای انتهایی دُم(3-4 بند انتهایی) بنام فانوسک[1] می‌باشند (John *et al*., 2004). به دلیل حضور لوسیفراز در فانوسک، این بخش در شب می‌درخشد. حشره شب‌تاب متعلق به راستهٔ قاب‌بالان[2] است. نور تولید شده توسط این حشره همانند سایر قاب‌بالان به منظور به دام انداختن طعمه، دفاع (استتار) و جلب جنس مخالف به کار می‌رود. در بعضی از گونه‌ها در تمام مراحل دگردیسی حشره اعم از تخم، لارو، حشره بالغ نر و ماده، نورافشانی دیده می‌شود. در زبان فارسی این حشره به نام‌های دیگر از قبیل: چراغله، آتشپزه، شب چراقک و غیره موسوم است. در شمال ایران دو گونه حشره شب‌تاب با نام‌های *Lampyris turkestanicus* و *Lamproidea maculata* مشاهده و گزارش شده است. هر دو گونه به فراوانی یافت می‌شوند.

1-6- لوسیفراز حشره شب‌تاب

لوسیفراز حشره شب‌تاب در سال 1956 توسط گرین[3] و مکلروی[4] بدست آمد. آنها نقطه ایزوالکتریک لوسیفراز را بین 6/2 و 6/3 گزارش کردند. در سال 1977 لوسیفراز بسیار خالص از حشره شب‌تاب *Luciola mingrelica* توسط دانشمندان روسی تهیه شد. در سال 1989، وزن مولکولی لوسیفراز حشره شب‌تاب *Photinus pyralis* از طریق روش HPLC به میزان 62 KDa محاسبه شد (Branchini and Rollins, 1989). ساختار سه بعدی کریستال لوسیفراز *Photinus pyralis* در سال 1996 تعیین شد

ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب گونه ایرانی *Lampyris turkestanicus* که در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفته است، دارای 1644 جفت باز است که 547 اسیدآمینه را کد می‌کند (شماره دستیابی GenBank: AY742225).

1 -Lantern
2- Coleoptera
3- A.A.Green
4- W.D.McElory

1-7- لوسیفرین حشره شب‌تاب

لوسیفرین طبیعی ایزومرD می‌باشد بهمین دلیل نام رایج تر آن D-luciferin است. فرمول بسته آن C11H8N 2O 3S2 با جرم مولکولی 280 است. بشکل کریستالهای سوزنی با رنگ زرد کم رنگ می‌باشد کریستالیزاسیون مجدد آن مشکل بوده و تصعید آن با دکربوکسیلاسیون همراه است لوسیفرین در الکلهای 5-1 کربنه-استن اتیل استات محلول است اما در بنزین، اتر، نفت، اتیل اتر نامحلول است و در آب در pH=6/5 کم محلول است.(Merck.,1989)

1-7-1- آنالوگهای لوسیفرین

الف)L-luciferin

L - لوسیفرین با آنزیم لوسیفراز واکنش نشان نمی‌دهد و تولید نور نمی کند .با این وجود در واکنش‌های CL شرکت می کند.

ب)آنالوگهای هیدروکسی

تمام آنالوگهای منوهیدروکسی بر آنزیم بی اثرند ولی تنها ترکیب 4 و 6 دی هیدروکسی، با آنزیم تولید نور قرمز می کند در حالی که لوسیفرین نور زرد-سبز می دهد

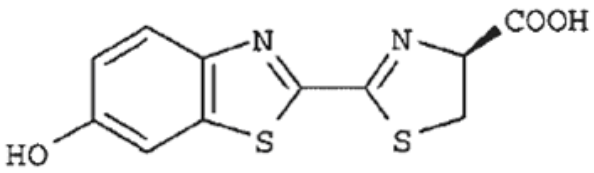
ج)آنالوگهای آمینولوسیفرین

تنها مشتقی از آمینو لوسیفرین که با آنزیم واکنش نشان می‌دهد 6-آمینولوسیفرین است. در این ترکیب بجای گروه OH گروه آمین قرار دارد و رنگ نور حاصله با آنزیم، قرمز است.(White and Worther.,1966) بنابراین وجود گروه OH در موقعیت 6 و گروه COOH در موقعیت 4 فرم D جهت فعالیت آنزیم تعیین کننده است.

D- لوسیفرین

پس از آنکه لوسیفرین از حشره شب‌تاب *P. pyralis* آمریکای شمالی به دست آمد، سنتز شیمیایی آن برای اولین بار در سال 1961 آغاز شد که از نظر آنزیمی فعال بود. سپس ساختار لوسیفرین با کمک کریستالوگرافی اشعه ایکس تعیین گردید. صرفنظر از مرحله دگردیسی و یا موقعیت فانوسک، به نظر می‌رسد که لوسیفرین در میان گونه‌های Beetle حفظ شده است (Blank *et al.*, 1971). مطالعه اجزای مولکولی در

مکانیسم‌های بیوشیمیایی حشرات نشان می‌دهد که سوبسترای لوسیفراز یک اسید آلی پلی‌هتروسیکل است [2-(6-هیدروکسی بنزوتیازول-2- ایل)-2- تیازولین-4- کربوکسیلیک اسید] که معمولاً لوسیفرین نامیده می‌شود. فرمول شیمیایی D-لوسیفرین در زیر نمایش داده شده است (شکل 1-2).



شکل 1-1- ساختار D- لوسیفرین در حشرات

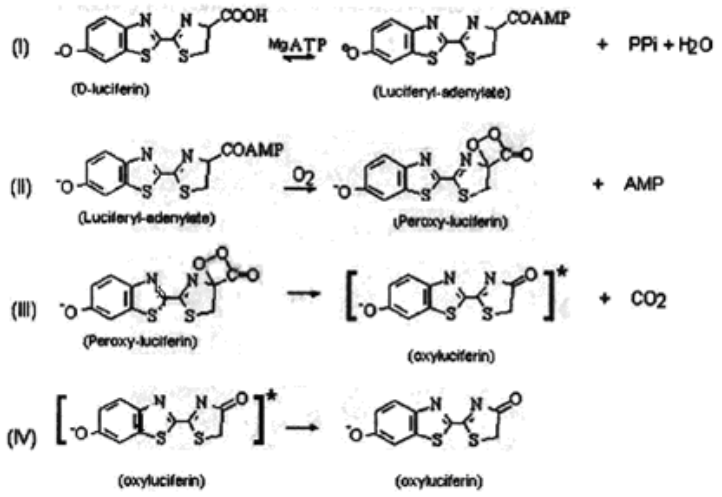
منشاء لوسیفرین در موجود آبزی Dinoflagellate، کلروفیل می‌باشد. این موجودات تک‌سلولی آغازین، فتوسنتزکننده هستند و به دلیل نقش آنها به عنوان آغازکننده چرخه غذایی در اقیانوس‌ها، حائز اهمیت می‌باشند. پدیده فسفروسانس[1] اقیانوس‌ها (درخشندگی آب اقیانوس در شب هنگام) غالباً توسط این موجودات ایجاد می‌شود (Hastings, 1983). با بررسی مسیر بیوسنتز لوسیفرین از منشا کلروفیل در این موجودات و شناسایی آنزیم‌های کلیدی این مسیر بیوسنتزی، به دلیل وجود همولوژی بالا این احتمال وجود دارد که با انتقال ژن(های) کنترل‌کننده این مسیر، گیاه قادر به تولید لوسیفرین از کلروفیل گردد. این موضوع می‌تواند نیاز به استفاده از لوسیفرین خارجی را در بررسی‌های سیستم لوسیفراز در گیاه مرتفع سازد.

1-8- مکانیزم تولید نور

لوسیفراز با منشاء حشره‌ای [EC: 1.13.12.7] در طی واکنش با D-لوسیفرین، ATP و اکسیژن مولکولی، در اکثر گونه‌ها نور سبز- زرد نشر می‌کند (λmax =570 nm). این واکنش به وسیله آنزیم لوسیفراز به صورت زیر کاتالیز می‌شود: (شکل 1-2)

$$ATP + LH_2 + Luc + Mg^{2+} \longrightarrow Luc.LH_2\text{-}AMP + PPi$$
$$E.LH_2\text{-}AMP + O_2 \longrightarrow Luc + AMP + CO_2 + OXL + \text{Light emission}$$

1- Phosphorescence



شکل 1-2- مکانیسم انجام واکنش بیولومینسانس به کمک آنزیم لوسیفراز

در مرحله اول لوسیفرین با Mg^{2+}-ATP واکنش می‌دهد و تشکیل لوسیفریل آدنیلات و پیروفسفات می‌دهد. لوسیفریل آدنیلات بوسیله اکسیژن مولکولی، اکسید شده و یک ماده حد واسط پراکسید حلقوی به نام دی‌اکستانن (پراکسی لوسیفرین) تشکیل و یک مولکول AMP آزاد می‌شود. دی‌اکستانن در نتیجه تبدیلات داخل مولکولی، دکربوکسیله می‌شود تا تولید اکسی‌لوسیفرین تهییج شده در فرم انول یا کتو کند. برگشت این ماده به حالت پایه همراه با نشر یک کوانتوم نور مرئی با طول موج ماکزیمم 570- 562 نانومتر است که نور سبز مایل به زرد تولید می‌کند (Shimomura *et al.*, 1995).

1-9- کاربردهای لوسیفراز و بیولومینسانس

لوسیفراز در شاخه‌های مختلف علوم زیستی کاربردهای متعددی دارد که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

1-9-1- سنجش ATP توسط لوسیفراز

در تمام سلول‌های زندهATP وجود دارد. این ترکیب، سطح انرژی سلول را مشخص می‌کند و تولید آن به شدت کنترل می‌شود. بنابراین مقدار ATP اندازه‌گیری شده، بیان کننده تعداد سلول‌های زنده در محیط

می‌باشد. در حقیقت در این روش ATP تولید شده توسط سیستم‌های زیستی، سریعاً توسط سنجش آنزیمی در حضور لوسیفراز اندازه‌گیری می‌شود.

مقدار ATP اندازه‌گیری شده می‌تواند به منظور آگاهی از آلودگی میکروبی در آب و مواد غذایی به کار رود. به علاوه در بیوتکنولوژی و صنایع دارویی، ATP اندازه‌گیری شده برای بررسی تکثیر سلولی، نحوه پیر شدن و مرگ سلول و سمیت سلولی استفاده می‌شود. در پزشکی از این روش می‌توان جهت سنجش آلودگی باکتریایی ادرار و در سنجش آنتی‌بیوتیکی و تست حساسیت استفاده کرد. در سنجش میزان فسفوکراتین نیز می‌توان از این روش بهره برد (Osterberg *et al.*, 1991).

1-9-2- اندازه‌گیری باکتری‌ها و سلول‌ها

در بدن همه موجودات زنده از جمله باکتری‌ها ATP وجود دارد. با توجه به حساسیت زیاد این روش نسبت به ATP، می‌توان از این سیستم برای اندازه‌گیری باکتری‌ها استفاده کرد. در خاکشناسی جهت اندازه‌گیری میزان باکتری‌های خاک، کنترل مواد غذایی و آب از این سیستم استفاده می‌شود. دانشمندان سازمان NASA آمریکا به منظور بررسی حیات در کرات دیگر، سنگ‌های آسمانی یا موادی که از خارج جو توسط فضانوردان آورده می‌شوند را با ترکیبات سیستم بیولومنیسانس حشره شب‌تاب مخلوط و از طریق میزان نور تولیدی به احتمال وجود حیات در آنها پی می‌برند (Thore *et al.*, 1983).

1-9-3- اندازه‌گیری آنزیم‌ها

بسیاری از آنزیم‌ها در بدن به نحوی با ATP در ارتباط هستند. از این رو می‌توان آنها را به کمک سیستم بیولومینسانس مورد سنجش قرار داد. تعدادی از این آنزیم‌ها عبارتند از:

Creatine phosphokinase (CPK)، ATP-sulphurylase، Apyrase، Adenylate kinase و غیره.

1-9-4- استفاده از لوسیفراز حشره شب‌تاب در تکنیک Pyrosequencing

این تکنیک نوعی روش جدید تعیین توالی DNA تک‌رشته‌ای بصورت غیر الکتروفورزی است که طی آن چهار آنزیم DNA پلیمراز، ATP سولفوریلاز، آپیراز (آنزیم هضم‌کننده dNTPs) و لوسیفراز حشره شب‌تاب با

همکاری هم موجب راه‌اندازی واکنش‌های توالی‌یابی DNA می‌شوند که مراحل آن به شرح زیر است (Ronaghi *et al*., 1996).

در مرحله اول یک آغازگر با DNA تک‌رشته‌ای الگو هیبرید شده و با آنزیم‌های DNA پلیمراز، ATP سولفوریلاز، آپیراز و لوسیفراز حشره شب‌تاب در محلول واکنش قرار می‌گیرد. همچنین سوبستراهای APS (آدنوزین-5́-فسفوسولفات) و لوسیفرین نیز اضافه می‌شوند.

در مرحله دوم، به ترتیب چهار نوع نوکلئوتید به واکنش سنتز DNA اضافه می‌شوند که اگر با نوکلئوتید رشته الگو مکمل باشند، DNA پلیمراز آن را به رشته جدید متصل می‌کند. البته بجای نوکلئوتید dATP از آنالوگ dATPαS استفاده می‌شود که برای لوسیفراز قابل شناسایی نیست، اما قادر است توسط DNA پلیمراز در رشته DNA جدید قرار گیرد. اتصال نوکلئوتید به رشته جدید با جدا شدن یک مولکول پیروفسفات (PPi) همراه است که مولاریته آن با مولاریته نوکلئوتید اضافه شده به رشته یکسان است.

در مرحله سوم، آنزیم ATP سولفوریلاز در حضور سوبسترای APS، پیروفسفات را به ATP تبدیل می‌کند. این ATP توسط آنزیم لوسیفراز حس شده و این آنزیم سوبسترای لوسیفرین را به اکسی‌لوسیفرین تبدیل می‌کند که این عمل موجب آزاد شدن نور مرئی متناسب با ATP آزاد شده می‌شود. این نور توسط ابزار سنجش نور مانند لومینومتر یا دوربین CCD شناسایی شده و بصورت یک پیک در پیروگرام ظاهر می‌شود. هر سیگنال نوری متناسب با تعداد نوکلئوتید الحاق‌شده است. در مرحله بعد آنزیم آپیراز، dNTPهای ملحق نشده و همچنین ATPهای اضافی را تجزیه می‌کند. پس از اتمام تجزیه، dNTP بعدی اضافه می‌شود. در نهایت با افزودن دوره‌ای نوکلئوتیدها در یک پروسه مداوم، رشته DNA مکمل ساخته شده و توالی نوکلئوتیدی آن با توجه به سیگنال پیک‌ها در پیروگرام تعیین می‌شود.

1-9-5- گزارشگرهای زیستی[1]

گزارشگرهای زیستی، سلول‌های زنده و دستورزی شده‌ای هستند که در پاسخ به عوامل فیزیکی و یا شیمیایی خاص محیط، تولید پیام قابل سنجش می‌کنند. این گزارشگرها از دو جزء ژنتیکی اساسی شامل یک ژن گزارشگر و یک پیشبرنده تشکیل شده‌اند. پیشبرنده در حضور عامل هدف در محیط سلول‌ها فعال شده و

1- Bioreporters