١٢٨٥

١٠٢٩١٦

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پایه

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد (زیست شناسی) بیوشیمی

عنوان:

تخلیص و مطالعه پایداری آنزیم Firefly Luciferase در حضور و عدم حضور اسمولیت ها

نگارش:

مریم مهرابی

۱۳۸۷/۲/۱۵

استاد راهنما:

دکتر سامان حسینخانی

استاد مشاور:

دکتر سیروس قبادی

آبان ۱۳۸۶

بسمه تعالی

تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیئت داوران نسخهٔ نهایی پایان نامه خانم **مریم مهرابی** رشته **زیست شناسی (بیوشیمی)** تحت عنوان: **تخلیص و مطالعه پایداری آنزیم Firefly Luciferase در حضور و عدم حضور اسمولیتها** از نظر فرم و محتوا بررسی نموده و آنرا برای اخذ درجهٔ کارشناسی ارشد مورد تائید قرار دادند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبهٔ علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر سامان حسینخانی	استادیار	
۲- استاد مشاور	دکتر سیروس قبادی	استادیار	
۳- استاد ناظر داخلی	دکتر خسرو خواجه	استادیار	
۴- استاد ناظر خارجی	دکتر ابوالفضل گلستانی	استادیار	
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر خسرو خواجه	استادیار	

۱۰۲۳۱۶

بسمه تعالی

انشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پایه

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادهٔ ۲ در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند

«کتاب حاضر حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ بیوشیمی است که در سال ۱۳۸۶/۸/۱ در دانشکدهٔ علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکارخانم/جناب آقای دکتر سامان حسینی ، مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر سیروس قبادی و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر ــــ از آن دفاع شده است.»

مادهٔ ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادهٔ ۴- درصورت عدم رعایت مادهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس ، تادیه کند.

مادهٔ ۵- دانشجو تعهد و قبول می‌کند درصورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادهٔ ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادهٔ ۶- اینجانب مریم محمرابی دانشجوی رشته بیوشیمی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: مریم محمرابی

تاریخ و امضاء:

تقدیم به:

- کبوتر کوچک آسمان زندگیم، **غزل**

- دو فرشته آسمانی، **پدر و مادر** بزرگوارم که تکیه گاه و حامی من در تمام دوران زندگی و تحصیلم بوده‌اند.

- **همسر** دلسوز وفداکارم که همواره مشوق و همراه من بوده و هست.

- **خواهر**مهربانم که با کمک‌های بی‌شائبه در پیشبرد این تحقیق نقش بسزایی داشتند.

تشکر وقدردانی

حمد و سپاس بی‌پایان خداوندی را که به قلم سوگند یاد می‌کند. خداوند بلند مرتبه‌ای که داناست و نعمت اشتیاق به دانستن را به بندگانش ارزانی می‌دارد. خدای بزرگ را شاکرم که توان طی مرحله‌ای دیگر از دوران تحصیل زندگیم را به من عطا فرمود.

هرچند که زبان و قلم از بیان تشکر شاگرد از استاد قاصر است، اما بر خود لازم می‌دانم که از استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر سامان حسینخانی سپاسگزاری نمایم. دقت نظر و ایده‌های ایشان روشنگر راه این پژوهش بوده و راهنمایی‌های دلسوزانه ایشان بسیار فراتر از یک استاد راهنما بوده است.

از استاد ارجمند آقای دکتر سیروس قبادی که به عنوان استاد مشاور با نظرات ارزشمند خود در پیشبرد این تحقیق نقش بسزایی داشتند، همچنین از آقایان دکتر خسرو خواجه و دکتر ابوالفضل گلستانی که داوری این پایان‌نامه را قبول کردند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از خانم دکتر سهیلا کاشانیان که امکان استفاده از دستگاه CD در دانشگاه رازی کرمانشاه را برای من فراهم نمودند و همچنین آقای هادی روان که به عنوان متصدی دستگاه از کمک و راهنمایی‌ایشان بهره بردم و همین‌طور سایر دوستان در آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه رازی کرمانشاه، بی‌نهایت سپاسگزارم. از کارشناس آزمایشگاه بیوشیمی سرکار خانم زرندی و کارشناسان و دوستان بزرگوار در آزمایشگاه‌های بیوشیمی، بیوفیزیک در دانشگاه تربیت مدرس به خاطر همکاری صمیمانه‌شان سپاسگزارم.

در پایان از تنها سرمایه جاودان زندگی، خانواده عزیزم، که همواره در تمام مراحل زندگی، پشتیبان و حامی‌ام بوده‌اند، بی نهایت سپاسگزارم.

چکیده

آنزیم لوسیفراز حشره شب‌تاب(EC ۱،۱۳،۱۲،۷) اکسیداسیون لوسیفرین را در حضور یون‌های منیزیم، ATP و اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کند. محصول، اکسی‌لوسیفرین، در سطح برانگیخته انرژی تولید می شود که با تنزل به سطح پایه منجر به نشر یک فوتون نور مرئی می‌شود. شناخته شده‌ترین موجود بیولومینسانس، حشره شب تاب آمریکای شمالی، *Photinus pyralis* می باشد. این آنزیم اساس گستره وسیعی از تکنیک‌های تشخیصی را تشکیل می‌دهد. تولید نور توسط آنزیم لوسیفراز یکی از حساس‌ترین ابزار تشخیصی در تشخیص فوق‌العاده حساس ATP برای اندازه گیری آلودگی های میکروبی، سنجش‌های ژن گزارشگر در بیولوژی مولکولی، ارزیابی فعالیت فسفاتازها، استفاده در تعیین توالی DNA و به عنوان یک ابزار در ردیابی تاخوردگی پروتئین و فعالیت چاپرونین‌ها در بدن موجود زنده می‌باشد. با این حال، آنزیم لوسیفراز بسیار ناپایدار است و به سرعت فعالیت خود را حتی در دمای اتاق از دست می‌دهد. این امر منجر به از دست رفتن حساسیت و دقت کاربردهای تشخیصی آنزیم می‌شود. برای بهبود پایداری گرمایی آنزیم از اسمولیت‌ها به عنوان افزودنی های پایدارکننده استفاده کردیم. ابتدا بیان ژن و تخلیص آنزیم لوسیفراز انجام شد. برای بررسی اثراسمولیت ها در پایداری آنزیم مقایسه سینتیکی و ساختاری این آنزیم در غیاب و حضور این اسمولیت‌ها انجام شد. اثرات اسمولیت‌ها شامل سوکروز، سوربیتول و پرولین (۱/۵-۰/٤) برفعالیت باقیمانده آنزیم اندازه‌گیری شد. یک اثر پایدارکننده قوی برای سوکروز، سوربیتول و پرولین در حفظ فعالیت آنزیم لوسیفراز حشره شب‌تاب و جلوگیری ازغیرفعال شدن گرمایی آن مشاهده شد. مطالعات غیرفعال شدن گرمایی نشان داد این اسمولیت‌ها نه تنها فعالیت آنزیم را حفظ می‌کنند، بلکه انرژی فعالسازی غیرطبیعی شدن گرمایی آنزیم و همین طور دمای بهینه فعالیت آنزیم را افزایش می‌دهند. آزمایشات فلورسانس و دورنگ‌نمایی دورانی (CD) نشان دهنده تغییراتی در ساختار دوم وسوم آنزیم، در حضور سوکروز، سوربیتول و پرولین می باشد. نمودار غیر طبیعی شدن که به وسیله تکنیک CD (در ناحیه فرابنفش دور) ثبت شده است، نشان‌دهنده غیرطبیعی شدن گرمایی برگشت‌ناپذیر و افزایش دمای متوسط غیر طبیعی شدن (T_m) آنزیم در حضور این اسمولیت‌ها می‌باشد. در مجموع نتایج نشان می‌دهند که این اسمولیت‌ها سرعت غیرفعال شدن لوسیفراز را کاهش می‌دهند، ساختار دوم وسوم آنزیم و T_m آن را افزایش می‌دهند و بنابراین ساختار فضایی آنزیم را در برابر غیرفعال شدن گرمایی حفظ می کنند.

لغات کلیدی: لوسیفراز حشره شب‌تاب، بیولومینسانس، اسمولیت‌ها، پایدارسازی، دورنگ نمایی دورانی

فهرست

عنوان صفحه

فصل اول

مقدمه

۱-۱- بیولومینسانس ۲

۱-۲- تاریخچه ۳

۱-۳- موجودات بیولومینسانس ۳

۱-۴- قاب‌بالان ۶

۱-۵- لوسیفراز حشره شب‌تاب *Photinus pyralis* (EC 1.13.12.7) ۷

۱-۶- منشاء تکامل بیولومینسانس در حشرات ۱۰

۱-۷- ساختار کلی آنزیم ۱۱

۱-۸- کاربردهای لوسیفراز ۱۲

۱-۹- پایداری لوسیفراز ۱۴

۱-۱۰- پایداری پروتئین‌ها ۱۴

۱-۱۰-۱- پایداری ترمودینامیکی ۱۶

۱-۱۰-۲- پایداری سینتیکی ۱۶

۱-۱۰-۳- مکانیسم‌های ایجاد کننده واسرشتگی برگشت ناپذیر ۱۷

۱-۱۱- پایدارسازی پروتئین ۱۹

۱-۱۲- روش‌های پایدارسازی پروتئین‌ها ۲۰

۱-۱۲-۱- مهندسی پروتئین..... ۲۰
۱-۱۲-۲- تغییرات شیمیایی..... ۲۲
۱-۱۲-۳- تغییرات سطحی..... ۲۲
۱-۱۲-۴- CLEC ۲۲
۱-۱۲-۵- تثبیت..... ۲۲
۱-۱۲-۶- استفاده از افزودنی‌ها..... ۲۳
۱-۱۳- اسمولیت‌ها..... ۲۳
۱-۱۴- انواع اسمولیت‌ها..... ۲۴
۱-۱۵- آب‌پوشی پروتئین‌ها..... ۲۴
۱-۱۶- میانکنش‌های ترجیحی..... ۲۵
۱-۱۶-۱- کشش سطحی..... ۲۷
۱-۱۶-۲- دورشدگی فضایی..... ۲۹
۱-۱۶-۳- اثر حلال‌گریزی..... ۳۰
۱-۱۷- تغییر انرژی آزاد سطحی..... ۳۱
۱-۱۸- مطالعه بنای فضایی پروتئین..... ۳۳
۱-۱۸-۱- روش‌های نوری تشخیص بنای فضایی پروتئین..... ۳۳
۱-۱۸-۲- کاربرد تکنیک CD در مطالعه تغییرات بنای‌فضایی پروتئین‌ها..... ۳۴
۱-۱۸-۳- فلورسانس..... ۳۶
۱-۱۸-۳- استفاده از فلورسانس در مطالعه پروتئین‌ها..... ۳۷

فصل دوم

مواد و روشها

۲-۱- فهرست مواد مورد استفاده..... ۴۱

۲-۲- فهرست دستگاه‌های مورد استفاده..... ۴۲

۲-۳- بهینه‌سازی بیان ژن..... ۴۳

۲-۳-۱- جدا کردن تک‌کلون‌های حاوی لوسیفراز با بیان ژن بالا..... ۴۳

۲-۳-۲- وکتور pET-16b ۴۳

۲-۳-۳- غربال‌کردن باکتری‌های حاوی پلازمید..... ۴۵

۲-۳-۴- بیان پروتئین..... ۴۶

۲-۴- تهیه محتوای سلولی از باکتری‌ها..... ۴۶

۲-۵- سونیکاسیون..... ۴۷

۲-۶- SDS-PAGE ۴۷

۲-۶-۱- تهیه محلول‌های لازم برای الکتروفورز..... ۴۷

۲-۶-۲- آماده سازی ژل و بارگذاری نمونه ها..... ۴۹

۲-۶-۳- رنگ آمیزی ژل..... ۵۱

۲-۷- تخلیص پروتئین..... ۵۱

۲-۸- سنجش غلظت پروتئین‌ها ۵۲

۲-۹- سنجش فعالیت آنزیمی..... ۵۳

۲-۱۰- بررسی پایداری حرارتی آنزیم..... ۵۴

۲-۱۱- مطالعات غیرفعال شدن گرمایی..... ۵۴

۲-۱۲- مطالعه دورنگ‌نمایی حلقوی (CD)..... ۵۴

۲-۱۳- مطالعات فلورسانس ذاتی..... ۵۵

فصل سوم

نتایج

۳-۱- تخلیص پروتئین..... ۵۷

۳-۲- مطالعات سینتیکی..... ۵۹

۳-۳- دمای بهینه فعالیت آنزیم لوسیفراز در غیاب و حضور اسمولیت‌ها..... ۶۱

۳-۴- بررسی غیرفعال شدن حرارتی آنزیم در غیاب و حضور اسمولیت‌ها..... ۶۲

۳-۵- مطالعات ساختاری..... ۶۳

۳-۵-۱- مطالعه فلورسانس ذاتی..... ۶۳

۳-۵-۲- مطالعات ساختاری به روش دورنگ نمایی دورانی (CD) ۶۸

۳-۵-۳- دورنگ نمایی دورانی دمایی..... ۷۱

فصل چهارم

بحث و نتیجه گیری..... ۷۳

منابع..... ۷۸

فصل اول

مقدمه

۱-۱- بیولومینسانس[1]

لومینسانس فرآیندی است که در آن یک مولکول برانگیخته شده هنگام برگشت به سطح پایه از خود نور ساطع می‌کند. اگرپایین‌ترین تراز انرژی ارتعاشی حالت برانگیخته یک مولکول بالاتر از بالاترین تراز انرژی ارتعاشی حالت پایه یک مولکول باشد، آن مولکول دارای نشر فلورسانس خواهد بود. اگر در حین انتقال الکترون از حالت پایه به برانگیخته جهت اسپین الکترون تغییر کند فسفرسانس و اگر تغییر نکند فلورسانس نامیده می‌شود. در حالتی که جهت اسپین تغییر کند، حالت تهییج شده سه‌گانه[2] نامیده می‌شود و دارای زمان نشر طولانی‌تر (10^{-6} s) و اگر جهت اسپین تغییر نکند، حالت تهییج شده منفرد[3] پیش می‌آید که دارای زمان نشر کوتاه (10^{-9} s) می‌باشد. شکل‌های مختلف این پدیده در طبیعت بر اساس منبع انرژی مورد استفاده برای ایجاد حالت برانگیخته بوجود آمده‌اند. اگر منشاء این پدیده فوتون باشد، به این پدیده **فوتولومینسانس**[4] گویند. منشاء لومینسانس می‌تواند یک واکنش شیمیایی همراه با تولید محصول و نشر نور باشد که به آن **شیمی لومینسانس**[5] اطلاق می‌شود. در این حالت اختلاف سطح انرژی بین حالت گذار و محصول واز طرفی ساختار حالت گذار جهت نشر نور مناسب است. واکنش‌های بیولومینسانس دسته ای از واکنش‌های کمی‌لومینسانس هستند. در واکنش‌های بیولومینسانس منشاء انرژی واکنش‌های آنزیمی است. حالت گذار این واکنش‌ها از لحاظ الکترونی منفرد می‌باشد (۱و۲).

---

1 Bioluminescence
2 Triplet
3 Singlet
4 Photoluminescence
5 Chemiluminescence

۱-۲- تاریخچه

پدیده نشر نور توسط موجودات زنده از زمان‌های دور توجه بشر را به خود جلب نموده است. بیشتر تحقیقات پایه بیولومینسانس حشره شب‌تاب[1] به طور گسترده‌ای بر روی گونه آمریکای شمالی *Photinus pyralis* متمرکز شده و دانسته‌های کنونی ما را در مورد چگونگی تولید نور به وسیله این حشره فراهم نموده است (٤و٣). W.D. McElroy و سایر محققان در دهه‌های ۱۹۵۰ و ۱۹٦۰ ساختار سوبستراها و محصولات این آنزیم را شناسایی کردند (۸-۵). در سال ۱۹۸۵، Marlene Deluca و همکارانش cDNA کدکننده لوسیفراز از *P. pyralis* را کلون کردند و منبعی جدید برای تولید و استفاده از آنزیم لوسیفراز در دسترس محققان قرار گرفت. در دهه ۱۹۹۰ E. Conti و همکارانش ساختمان آنزیم را توسط کریستالوگرافی اشعه ایکس مشخص نمودند (۹).

۱-۳- موجودات بیولومینسانس

موجودات بیولومینسانس به طور وسیع در محیط خشکی و آبی توزیع شده‌اند و شامل باکتری‌های لومینسانت، حشرات، مرجان‌های دریایی، سخت‌پوستان، جلبک‌ها و قارچ‌ها می‌شوند (۲). عملکرد بیولوژیکی بیولومینسانس از گونه‌ای به گونه دیگر تفاوت می‌کند و گستره آن از منحرف کردن حیوانات شکارگر مزاحم تا بروز رفتارهای جفت‌گیری می‌باشد. تولید نور از تبدیل انرژی شیمیایی به حالت برانگیخته الکترونی منشاء می‌گیرد که از لحاظ انرژی برای نشر یک فوتون نور مرئی کافی می‌باشد و این به وسیله اکسیداسیون یک سوبسترا (S) به یک محصول در سطح

1 Firefly

برانگیخته انرژی (P^*) که سپس به مرحله پایه تنزل می‌کند (P) و سبب نشر نـور مـی‌شـود (hv) به انجام می‌رسد.

$$S + O_2 \longrightarrow P^* \longrightarrow P + hv$$

این واکنش به وسیله آنزیم‌هایی که به طور عمومی لوسیفراز نامیده مـی‌شـوند، کاتـالیز مـی‌شـود. اگرچه همه آنزیم‌های لوسیفراز از گونه‌های مختلف واکنش اکسیداسیون را سبب می‌شوند، دراین واکنش‌ها کوفاکتورها وسوبستراهای غیرمرتبط با هم درگیر هستند و این واکـنش‌هـا از مـسیرهای مجزا پیشرفت می‌کنند. در حقیقت، گوناگونی بیولوژیکی وبیوشیمیایی سیستم‌هـای بیولومینـسانس نشان می‌دهد که توانایی تولید نور در طی تکامل از منشاءهای جداگانه ای شکل گرفته است (۲). لوسیفرازها، آنزیم‌های کلیدی کاتالیز کننده واکنش‌های نشر نـور در بیولومینـسانس هـستند. آنهـا اکسیژناسیون ترکیباتی را که عموما" تحت عنوان لوسیفرین نامیده می‌شوند را کاتالیز می‌کننـد. بـا تولید حدواسط غنی از انرژی، که متلاشی شدن خودجوش آن باعث تولید محـصول تهیـیج شـده الکترونیکی منفرد می‌شود که تنزل آن به سطح پایه انرژی نشر یک فوتون نور مرئی با بازده بالا را سبب می‌شود (۱۱). لوسیفرازها به خاطر تولیـد حالـت تهیـیج شـده منفـرد بـا مانـدگاری کوتـاه (10^{-9} s) با نشری افول کننده[1] منحصر به فرد هستند. لوسیفرازها همچنین یک محـیط مناسـب در جایگاه فعال برای این نشر افول کننده فراهم می‌کننـد و مراحـل غیرفعـال کننـده فوتوشـیمیایی و فوتوفیزیکی راحذف می‌کنند. پیامد این عمـل بـازده کوانتـومی بالاسـت (بـیش از۹۰٪). بنـابراین

1Decay emitting light

لوسیفرازها عملا" انواع ویژه از اکسیژنازهایی هستند که برای نشر نور مناسب شده‌انـد. اگـر چـه همه واکنش‌های بیولومینسانس شناخته شـده بـه اکـسیژن (۱۲) ووسـاطت پراکـسی نیـاز دارنـد، لوسیفرازها گروه‌های متنوعی از آنزیم های غیرمرتبط هستند که براساس لوسیفرین‌های متفاوت از لحاظ شیمیایی و کوفاکتورهای گوناگون عمل می‌کنند (۱۳و۲).

برای مثال در باکتری‌ها، لوسیفراز یک فلاوین مونواکسیژناز هترودایمر ٤٠ و ۳۵ کیلودالتونی اسـت که اکسیداسیون $FMNH_2$ و یک آلدهیـد بلنـد زنجیـر ١٤-٧ کربنـه را کاتـالیز مـی‌کنـد و اسـید کربوکسیلیک مربوطه و FMN تهییج شده تولید می‌کند. بیشترین نشر نـور درآنهـا درطـول مـوج ٤٩٠ نانومتر است (١٤).

در بعضی از قاب‌بالان[1]، به عنوان مثال لوسیفراز آکوارین[2] یک مونـومر ۳۵ کیلودالتـونی اسـت کـه تشکیل یک حد واسط پراکسی کولنترازین (یک ایمیدازول پیـرازین) کـه محکـم و پایـدار بـه آن متصل است و شکستن آن همراه با تغییر در ساختار فضایی[3] وسیله Ca^{2+} القاء مـی‌شـود و تولیـد کولنترامید تهییج شده و CO_2 می‌کند (۱۵). چون کولنترامید نشرکننده نور اغلب بـه محکمـی بـه پروتئین متصل می‌ماند، بعضی از این لوسیفرازها "فوتوپروتئین" نامیده می‌شوند که پروتئین‌هـایی هستندکه نوررا به طور مداوم و بدون چرخه نوسازی[4] پروتئین نشر می‌کنند (١٦). دردینوفلاژلاهـا یک لوسیفراز ۱۳۷ کیلودالتونی شامل ۳ دمین فعال کاتالیتیکی و مشخص می‌باشـد (۱۷) کـه یـک

1 Coleoptera
2 Aequorin
3 Conformation
4 Turn over

لوسیفرین تتراپیرول را اکسید می‌کند. ساختار سه‌بعدی لوسیفراز باکتریایی و فوتوپروتئین‌ها و آکوارین اخیرا" به وسیله کریستالوگرافی اشعه X مشخص شده است (۲۰-۱۸).

حشرات، غنی ترین ومتنوع ترین موجودات بیولومینسانس هستند. در حدود ۲۵۰۰ گونه تاکنون شناخته شده است. اما بسیاری احتمالا" هنوز ناشناخته باقی مانده اند. امروزه بیشترین گونه لومینسنت معرفی شده در راسته‌های:

1- Collembola (Springtails)
2- Diptera (Fungus-gnats)
3- Coleoptera (Fireflies, Click beetles, Railroad worms)

قرار می گیرند. گونه های لومینسنت Collembola معمولاً در خاک مشاهده می گردند. آنها فلاش‌های نوری متمایل به سبز از خود ساطع می‌کنند (۲۱).

۱-٤- قاب‌بالان:

راسته قاب‌بالان بیشتر شامل گونه‌های بیولومینسنت خاکی می‌باشد. به طور کلی آنها در خانواده Elateroidea یافت می‌شوند که شامل:

1- Fireflies (Lampyridae)
2- Railroad worms (Phengodidae)
3- Click beetles (Elateridae)

می‌باشد. Fireflies فلاشهای سبز-زرد از لانترن‌های شکمی خود به منظور جذب جنس مخالف نشر می‌کنند و به وسیله مدت زمان، فاصله بین چشمک‌ها و فرکانس آنها مشخص می‌شوند (۲٤-۲۲). مدل‌های ویژه ورنگ‌های به خصوص نور نشری برای تشخیص حداکثر بیولومینسانس

توسط قوه بینایی در محیط‌های نوری مختلف وعملکردهای بیولوژیکی متفاوت مناسب شده‌اند (۲۹-۲۵). لاروهای Firefly از ارگان شکمی خود نشر نور را انجام می‌دهند. Click beetles هنگامی که بر روی زمین راه می‌روند نور سبز پیوسته‌ای از لانترن‌های پشتی و هنگامی‌که پرواز می‌کنند نور شدید نارنجی- زرد پیوسته‌ای از لانترن شکمی خود نشر می‌دهند (۲۵). نرهایRailroad worms در مرحله بلوغ دارای لومینسانس ضعیفی می‌باشند، اما ماده‌ها در مرحله لاروی دارای لومینسانس فراوانی می‌باشند. گونه‌های آمریکای جنوبی دارای دو ردیف از لانترن‌های جانبی با نشر نور سبز-نارنجی و لانترن سری با نشر نور زرد-سبز تا قرمز می‌باشند (۲۷).

لوسیفراز حشره شب‌تاب به طور گسترده‌ای در ۵۰ سال گذشته مطالعه شده ویکی از بهترین مدل‌های بیولومینسانس شناخته شده است. این لوسیفرازها اکسیداسیون وابسته به ATP لوسیفرین بنزوتیازول راکاتالیز می‌کنند و نور سبز-زرد تولید می‌کنند. لوسیفرازهای Click beetles و Railroad worms نوری در محدوده سبز تا نارنجی(λ_{max}=۵۳۰-۵۹۳ nm) و حتی قرمز (λ_{max}=۶۲۳ nm) بااستفاده از لوسیفرین حشره شب‌تاب و احتمالا" با همان مکانیسم که کمتر مطالعه شده نشر می‌کنند (۳۱و۳۰).

۱-۵- لوسیفراز حشره شب‌تاب ***Photinus pyralis*** **(EC 1.13.12.7)**

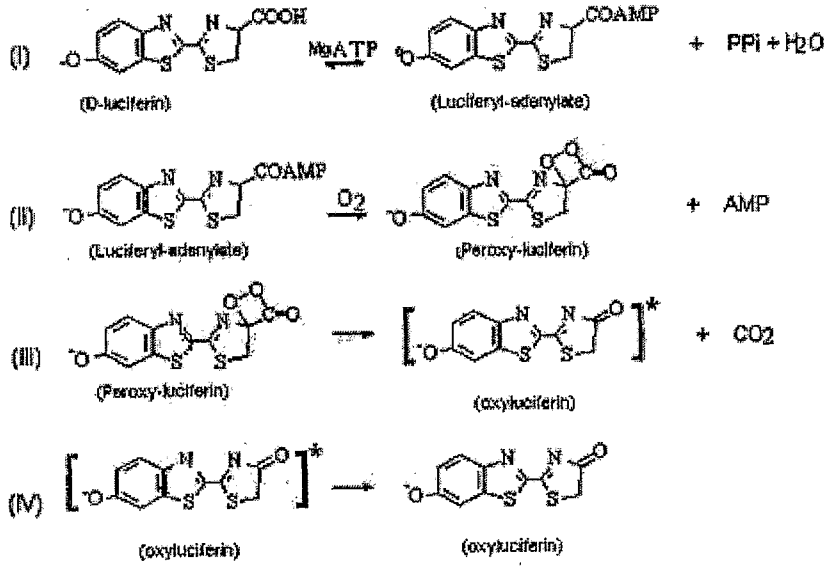
دربخش انتهایی بدن حشره شب‌تاب (۳ تا ٤ بند انتهایی) ارگان تولید کننده نور به نام فانوس[1] وجود دارد که شامل فوتوسیت‌هایی است که لوسیفراز درآنجا نشر نور را انجام می‌دهد. حشره

1 Lantern

شب‌تاب، این آنزیم را برای نشر فلاش‌هایی از نور برای جذب جفت خود استفاده می‌کند. آنزیم یک اکسیژناز با وزن مولکولی ٦٢ کیلودالتون می‌باشد (٣٢). اما بر خلاف اکسیژنازهای دیگر، هیچ گروه پروستتیکی در این واکنش درگیر نمی‌باشد. آنزیم به ATP و یون منیزیم (Mg^{2+}) و اکسیژن مولکولی وترکیب هتروسیکلی به نام لوسیفرین حشره شب‌تاب که یک بنزوتیازول می‌باشد، نیاز دارد تا نور را در یک پروسه چند مرحله‌ای تولید کند (٣٣).

درمرحله اول لوسیفرین با Mg^{2+}-ATP واکنش می‌دهد و تشکیل لوسیفریل‌آدنیلات و پیروفسفات را می‌دهد. لوسیفریل آدنیلات به وسیله اکسیژن مولکولی اکسید می‌شود و حدواسط پراکسید حلقوی به نام دی‌اکستانن (پراکسی‌لوسیفرین) ویک مولکول AMP آزاد می شود. دی‌اکستانن در نتیجه تبدیلات داخل مولکولی دکربوکسیله می‌شود، تا تولید اکسی‌لوسفرین تهییج‌شده در فرم انول یا کتو کند (شکل ١-١)، وقتی به حالت پایه برمی‌گردد با نشر یک کوانتوم نور مرئی با طول موج ماکزیمم ٥٧٠-٥٦٢ نانومتر که نور سبزمایل به زرد تولید می‌کند (٣٤).

لوسیفرازهای *Luciola cruciata* و *Luciola mingrelica* مانند *Photinus pyralis* نور با طول موج ٥٧٠-٥٦٢ نانومتر تولید می‌کنند درحالی‌که *Luciola lateralis* رنگ سبز با طول موج ٥٥٢ نانومتر تولید می‌کند (٣٥). لوسیفرازهای *Luciola cruciata* و *Luciola lateralis* بومی ژاپن هستند (٣٦) و لوسیفراز *Luciola mingrelica* از نواحی جنوبی روسیه جمع‌آوری شده‌است (٣٥).



شکل۱-۱- مکانسیم و ساختار شیمیایی سوبسترا و حدواسط‌های واکنش بیولومینسانس که توسط آنزیم لوسیفراز کاتالیز می‌شود

آزمایشات اخیر نشان داده است که فرم کتوی اکسی لوسیفرین به تنهایی قادر به تولید همه رنگ‌ها می‌باشد. احتمالا" لوسیفراز با تغییر رزونانس مبنی بر غیرمستقرشدن اکسی‌لوسیفرین برانگیخته، رنگ ساطع شده را تغییر می‌دهد. مشاهده شده است که در محیط اسیدی رنگ نور نشری قرمز می‌شود، این به دلیل وجود فرم آنیونی "کتو" از محصول واکنش در محیط اسیدی می‌باشد. نشر سبز-زرد به خاطر فرم آنیونی "انول" اکسی‌لوسیفرین می‌باشد (۱و۳۷).

بعد از درخشش اولیه نور، شدت لومینسانس به سرعت کاهش می‌یابد که احتمالا" به دلیل خاصیت مهارکنندگی محصول آنزیم (اکسی‌لوسیفرین) می‌باشد. بازده کوانتومی آن (۰/۸۸) بالاترین مقدار شناخته شده در بین واکنش‌های بیولومینسانس (٦)، با حدودا" یک فوتون نور نشر