دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری‌های نوین

گروه زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌فناوری گرایش میکروبی

همسانه‌سازی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و ساخت وکتور بیانی آن

استادان راهنما:

دکتر ابوالقاسم اسماعیلی

استاد مشاور:

دکتر محمد ربانی

پژوهشگر:

یاسمن توکلی

آذر ماه ۱۳۹۲

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

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری‌های نوین

گروه زیست فناوری

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌فناوری گرایش میکروبی

خانم یاسمن توکلی تحت عنوان

همسانه‌سازی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز باکتری لاکتوباسیلوس‌کازئی و ساخت وکتور بیانی آن

در تاریخ ..... توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه .....به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای اول پایان‌نامه دکتر ابوالقاسم اسماعیلی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۲- استاد مشاور پایان‌نامه دکتر محمد ربانی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۳- استاد داور داخل گروه دکتر حسن محبت‌کار با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۴- استاد داور خارج گروه دکتر کامران قائدی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

امضای مدیر گروه

تقدیم به مهربان فرشتگانی که:

لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه‌های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست، خانواده عزیزم.

تقدیم به مادرم، آنکه آفتاب مهرش در آستانه قلبم، همواره پابرجاست و هرگز غروب نخواهد کرد، پدر مهربان و خواهران عزیزم.

ذلک فضل من الله و کفی بالله علیما (نسا ۷۰)

چنین فضل از سوی یکتا خداست که دانایی‌ش بس همه خلق راست

سپاس و ستایش مر خدای را جل و جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درفشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید.

نمی‌توانم معنایی بالاتر از تقدیر و تشکر بر زبانم جاری سازم و سپاس خود را در وصف استادان خویش آشکار نمایم، که هر چه گویم و سرایم، کم گفته‌ام.

از استادگران قدر جناب آقای دکتر اسماعیلی که در کمال سعه صدر از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این پایان نامه را به عهده گرفتند،

از استاد فرزانه و دلسوز، جناب آقای دکتر ربانی که زحمت مشاوره این پایان نامه را متقبل شدند که بدون مساعدت‌های ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی رسید؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم. باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

با سپاس بی دریغ خدمت جناب آقای صابر به دلیل یاری ها و کمک های بی چشمداشت ایشان که بسیاری از سختی ها را برایم آسان تر نمودند و دوستان و هم - کلاسی های عزیزم آقایان ترکتاز، دوست محمدی، توشه و خانم ها سیدی پور، خیراندیش، جمشیدی فر، جبالی که مراصمیمانه و مشفقانه در انجام این پایان نامه یاری دادند. به امید آنکه توفیق یابیم جز خدمت به خلق نکوشیم.

چکیده:

مقدمه: گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) یک اسیدآمینه‌ی غیرپروتئینی است که به عنوان یک ترکیب داروئی مهم در درمان بسیاری از اختلالات عصبی به کار می‌رود. گابا توسط آنزیم وابسته به PLP گلوتامات دکربوکسیلاز (GAD) تولید می‌گردد. این آنزیم در هردو دسته‌ی باکتری‌های بیماریزا و همزیست لوله‌ی گوارش با مصرف پروتون در ایجاد مقاومت اسیدی نقش دارد. لذا همسانه‌سازی ژن کدکننده‌ی آنزیم GAD از منابع مختلف به منظور مقایسه‌ی توالی ژنی آن با ژن‌های *gad* موجود در سایر موجودات، ساخت ناقل بیانی به منظور خالص‌سازی و تولید انبوه آنزیم و نیز دستکاری پروتئین به منظور بهبود خواص آن، همگی اقدامات مؤثری در جهت تولید انبوه محصول ارزشمند گابا می‌باشند. با توجه به این که آنزیم GAD در پاتوژن‌هایی مانند *لیستریا مونوسایتوژنز* هم در ایجاد مقاومت اسیدی نقش دارد، در نتیجه پیدا کردن یک ترکیب شبه‌داروئی با قابلیت مهار فعالسازی آنزیم می‌تواند راهکار مفیدی در جهت مختل کردن مسیر مقاومت اسیدی در این پاتوژن باشد. **روش‌ها:** در این تحقیق تلاش جهت جداسازی ژن *gad* از ۵ سویه‌ی باکتری‌های اسید لاکتیک، *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونه‌ی *کازئی* PTCC 1608، *لاکتوباسیلوس روتری* DSM 20016، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* PTCC 1638، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر-گونه‌ی *دلبروکی* PTCC 1333 و *لاکتوکوکوس لاکتیس* PTCC 1336، صورت گرفت. پس از PCR با آغازگرهای اختصاصی قطعات به دست آمده جهت توالی‌یابی وارد ناقل همسانه‌سازی pGEM-T گردیدند. پس از توالی‌یابی قطعات ژنی *gad* به صورت جداگانه وارد ناقل بیانی pET-32a(+) شدند. ناقل بیانی نوترکیب سپس وارد باکتری *اشرشیا کلی* سویه‌ی Top10 ،به عنوان میزبان همسانه‌سازی، گردید. جهت بهبود خواص آنزیم با اعمال جهش نقطه‌ای به صورت مجازی از آنزیم GADA/*اشرشیا کلی* به عنوان پروتئین هدف استفاده شد. ابتدا تأثیر جهش‌های تک‌نقطه‌ای مختلف در سرتاسر پروتئین بر پایداری حرارتی آنزیم توسط وب‌گاه PoPMuSiC 2.1 بررسی شدند. جهش‌های پایدارکننده به صورت مجازی در نواحی غیرحفاظت‌شده‌ی جایگاه فعال آنزیم اعمال شدند. تمایل اتصالی آنزیم به کوفاکتور و سوبسترا در جهش‌یافته‌ها و آنزیم اصلی از طریق داک‌گذاری مولکولی بررسی شد. جهت مهار تشکیل فرم فعال آنزیم GAD *لیستریا مونوسیتوژنز* پس از پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین به صورت مجازی، از طریق غربالگری مجازی تمایل اتصالی ۱۳۰۵۹ ترکیب شبه‌داروئی برگرفته از پایگاه داده‌های ZINC به جایگاه دایمریزاسیون آنزیم بررسی شد. **نتایج و بحث:** نتایج توالی‌یابی قطعات به دست آمده بیانگر عدم وجود ژن *gad* در ژنوم باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونه‌ی *کازئی* PTCC 1608 بودند. حال آنکه ژن مورد نظر در سایر سویه‌ها وجود داشت. قطعات ژن *gad* با موفقیت در ناقل بیانی pET-32a(+) همسانه‌سازی شدند. ناقل نوترکیب ساخته‌شده می‌تواند در مطالعات بعدی جهت تولید انبوه و خالص‌سازی راحت‌تر آنزیم به کار رود. در اثر اعمال جهش در جایگاه فعال آنزیم GAD اشرشیاکلی مشخص شد در ۵ جهش‌یافته‌ی D301A، D301T، R395M، S393C و K84T علاوه بر افزایش پایداری حرارتی آنزیم، تمایل اتصالی آن به کوفاکتور و سوبسترا نیز افزایش می‌یابد. نتایج غربالگری مجازی نشان داد ترکیب شبه‌داروئی با شماره دسترسی zinc22781062 دارای تمایل اتصالی بالا به جایگاه دایمریزاسیون زیرواحدهای آنزیم است. از آنجایی که کوچکترین واحد الیگومری مورد نیاز برای شکل‌گیری فرم فعال در آمینواسید دکربوکسیلازهایی مانند GAD به صورت همودایمر می‌باشد، لذا پیش‌بینی می‌شود ترکیب مذکور با اتصال به جایگاه دایمریزاسیون و ممانعت از اتصال زیرواحدها به هم می‌تواند مانع فعال‌سازی آنزیم شود.

کلمات کلیدی: گابا، گلوتامات‌دکربوکسیلاز، همسانه‌سازی، جهش تک‌نقطه‌ای، غربالگری مجازی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول

۱-۱- آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز (GAD) ۱

۱-۱-۱- گلوتامات دکربوکسیلاز در یوکاریوتها ۲

۱-۱-۱-۱- نقش گلوتامات دکربوکسیلاز در انسان ۲

۱-۱-۱-۲- نقش گلوتامات دکربوکسیلاز در گیاهان ۳

۱-۱-۲- گلوتامات دکربوکسیلاز در پروکاریوتها ۴

۱-۱-۲-۱- مسیر مقاومت اسیدی وابسته به گلوتامات ۵

۱-۱-۲-۲- چگونگی عملکرد سیستم gad ۶

۱-۱-۲-۳- مکان قرارگیری *gadC*، *gadB* و *gadA* در کروموزوم *شرشیاکلی* ۷

۱-۱-۲-۴- خصوصیات ساختاری و عملکردی GadB/*شرشیاکلی* ۹

۱-۱-۲-۵- تغییرات کنفرماسیونی وابسته به pH ۱۰

۱-۱-۲-۶- دامنه‌ی اتصال به پیریدوکسال‌فسفات (PLP) ۱۲

۱-۱-۳- همسانه‌سازی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز ۱۳

۱-۲- گابا ۱۳

۱-۲-۱- گیرنده‌های گابا ۱۵

۱-۲-۲-تاریخچه‌ی گابا ۱۸

۱-۲-۳-اثرات فیزیولوژیکی گابا ۱۹

۱-۳- پروبیوتیک‌ها ۲۰

۱-۳-۱- باکتریهای اسیدلاکتیک ۲۱

عنوان **صفحه**

۱-۳-۲- باکتریهای اسید لاکتیک تولیدکننده گابا ۲۳

۱-۳-۳- معرفی باکتریهای اسیدلاکتیک مورد استفاده در این تحقیق ۲۳

۱-۴- مطالعات بیوانفورماتیکی آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۲۵

۱-۴-۱- پیش‌بینی مدل سه‌بعدی پروتئین از روی توالی اسیدآمینه ۲۵

۱-۴-۱-۱- مراحل مدل‌سازی مقایسه‌ای ۲۶

۱-۴-۱-۲- جستجو برای الگو ۲۶

۱-۴-۱-۳- انتخاب الگو ۲۶

۱-۴-۱-۴- انجام هم‌ترازسازی میان الگوها و جستار ۲۷

۱-۴-۱-۵- ساخت مدل ۲۷

۱-۴-۱-۶- ارزیابی مدل ۲۷

۱-۴-۲- انجام شبیه‌سازی داک‌گذاری مولکولی ۲۸

۱-۵- اهداف این پژوهش ۲۹

فصل دوم

۲-۱- ریزسازواره‌ها ۳۰

۲-۲- مواد شیمیایی ۳۰

۲-۲-۱- آنتی‌بیوتیکها ۳۲

۲-۲-۲- آغازگرها ۳۲

۲-۲-۳- پلاسمیدها ۳۳

۲-۲-۴- کیتهای آزمایشگاهی ۳۶

۲-۲-۵- آنزیم‌های محدودالاثر ۳۶

۲-۲-۶- سایر آنزیم‌ها ۳۶

عنوان **صفحه**

۲-۲-۷- مارکرها ۳۶

۲-۲-۸- محلول‌ها ۳۶

۲-۲-۹- محیطهای کشت ۳۸

۲-۳- دستگاه‌ها ۴۰

۲-۴- روش‌ها ۴۱

۲-۴-۱- روش سترون‌سازی ۴۱

۲-۴-۲- شناسایی باکتری *لاکتوباسیلوس* ۴۲

۲-۴-۲-۱-رنگ‌آمیزی گرم ۴۲

۲-۴-۲-۲-آزمون کاتالاز ۴۲

۲-۴-۲-۳- شناسایی *لاکتوباسیلوس*ها به روشهای بیوشیمیایی در حد گونه ۴۳

۲-۴-۲-۴- شناسایی باکتریها به روش PCR در حد سوش ۴۳

۲-۴-۳- استخراج DNA ژنومی ۴۳

۲-۴-۴- الکتروفورز DNA ژنومی بر روی ژل آگارز ۴۴

۲-۴-۴-۱- اجزای مورد استفاده در یک فرایند الکتروفورز ۴۴

۲-۴-۵- انجام PCR (جهت تکثیر ژنهای 16SrDNA و گلوتامات‌دکربوکسیلاز) ۴۵

۲-۴-۶- همسانه‌سازی قطعات DNA مورد نظر در ناقل همسانه‌سازی pGEM-T ۵۰

۲-۴-۶-۱- خالص‌سازی محصول PCR ۵۱

۲-۴-۶-۲- اتصال قطعه ژنی حاصل از آغازگرهای جدید به ناقل pGEM-T ۵۲

۲-۴-۶-۳- تهیه سلولهای مستعد ۵۳

۲-۴-۶-۴- تهیه پلیت حاوی آمپی‌سیلین، X-gal و IPTG ۵۴

۲-۴-۶-۵- انتقال ناقل دارای قطعه DNA مورد نظر به باکتری مستعدشده به روش شوک حرارتی .. ۵۴

عنوان **صفحه**

۲-۴-۶-۶- استخراج پلاسمید ۵۴

۲-۴-۷- همسانه‌سازی قطعه ژنی در ناقل بیانی pET-32a(+) و وارد کردن ناقل نوترکیب در باکتری *اشرشیاکلی* سویه‌ی Top10 به منظور افزایش تعداد پلاسمیدهای حامل قطعه ۵۷

۲-۴-۷-۱- استخراج پلاسمید pET-32a(+) ۵۷

۲-۴-۷-۲- برش پلاسمید pET-32a(+) و قطعه‌ی ژنی با آنزیمهای *Bam*HI و *Eco*RI ۵۹

۲-۴-۷-۳- تعیین غلظت ژن ورودی و پلاسمید برای الحاق ۶۰

۲-۴-۷-۴- اتصال قطعه ژنی به ناقل pET-32a(+) ۶۰

۲-۴-۷-۵- انتقال ناقل به سلولهای مستعد ۶۰

۲-۴-۷-۶-کلنی PCR ژن گلوتامات دکربوکسیلاز ناقل بیانی ۶۰

۲-۵- بیوانفورماتیک ۶۱

۲-۵-۱- ساخت مدل سه‌بعدی پروتئین گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۱

۲-۵-۲- ایجاد جهش مجازی ۶۴

۲-۵-۳- انجام مطالعات داک‌گذاری ۶۴

فصل سوم

۳-۱- نتایج رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز ۶۷

۳-۲- نتایج آزمون بیوشیمیایی ۶۸

۳-۳- استخراج DNA ژنومی باکتریهای اسیدلاکتیک با استفاده از کیت استخراج DNA سیناژن ۶۹

۳-۴- نتایج 16srRNA PCR ۷۰

۳-۵- تکثیر ژن *gad* توسط PCR ۷۱

۳-۶- همسانه‌سازی ژن *gad* در ناقل pGEM-T ۷۲

۳-۷- تائید حضور ژن *gad* در ناقل pGEM-T ۷۴

عنوان **صفحه**

۳-۸- نتایج توالی‌یابی ۷۶

۳-۸-۱- توالی‌های به دست آمده از کلیه‌ی سویه‌ها ۷۹

۳-۹- هضم آنزیمی قطعه‌ی ژنی و ناقل بیانی pET-32a(+) با آنزیم‌های *Eco*RI و *Bam*HI ۸۲

۳-۱۰- واکنش اتصال ۸۲

۳-۱۱- تایید حضور قطعه در ناقل بیانی ۸۳

۳-۱۲- پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی ۸۵

۳-۱۳- نتایج غربالگری مجازی به منظور یافتن ترکیب مهارکننده‌ی دایمریزاسیون مناسب ۸۶

۳-۱۴- انجام جهش مجازی به منظور افزایش پایداری حرارتی و افزایش فعالیت آنزیم ۸۸

فصل چهارم

۴-۱- بحث و نتیجه‌گیری ۹۰

۴-۱-۱- همسانه‌سازی، توالی‌یابی و ساخت ناقل بیانی نوترکیب ۹۱

۴-۱-۲- ایجاد جهش نقطه‌ای به منظور افزایش پایداری حرارتی و تمایل اتصال به سوبسترا ۹۴

۴-۱-۳- غربالگری مجازی به منظور یافتن مهارکننده‌ی مناسب جهت مهار دایمریزاسیون آنزیم ۹۶

۴-۲- پیشنهادات ۹۷

منابع ۹۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱. چگونگی عملکرد سیستم gad ۷

شکل ۱-۲. مکان قرارگیری *gadC*، *gadB* و *gadA* در کروموزوم *اشرشیاکلی* ۹

شکل ۱-۳. ساختار آنزیم Gad *اشرشیا کلی* در pH اسیدی ۱۱

شکل ۱-۴. ساختار اسیدآمینه‌ی گابا ۱۴

شکل ۱-۵. ساختار کلی یک زیرواحد گیرنده‌های $GABA_A$ و $GABA_C$ ۱۶

شکل ۱-۶. ساختار گیرنده‌ی $GABA_A$ در حالت مونومر و پنتامر ۱۷

شکل ۱-۷. گیرنده‌ی $GABA_B$..... ۱۸

شکل ۲-۱: شکل شماتیک ناقل pGEM-T ۳۴

شکل ۲-۲: شکل شماتیک ناقل pET-32a(+) ۳۵

شکل ۲-۳: شکل و نقشه‌ی ژنتیکی ناقل pGEM-T ۵۳

شکل۲-۴: شمای کلی پیش‌بینی مدل سه‌بعدی پروتئینها از طریق الگوریتم Hidden Markov Model ۶۳

شکل ۲-۵: شکل شماتیک مراحل ساخت یک مدل توپولوژی ۶۶

شکل ۳-۱: تصویر میکروسکوپی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونه‌ی *کازئی* PTCC 1608 با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم ۶۸

شکل ۳-۲: نتایج حاصل از ژل‌آگارز برای DNA استخراجی توسط کیت استخراج DNA سیناژن ۷۰

شکل ۳-۳: نتایج حاصل از ژل آگارز برای PCR 16srRNA. ۷۱

شکل ۳-۴: نتایج PCR ژنوم باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونه‌ی *کازئی* PTCC 1608 با آغازگر OPK3 ..... ۷۲

شکل ۳-۵: نتایج حاصل از PCR ژنوم ۴ سویه‌ی *لاکتوباسیلوس روتری* DSM 20016، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* PTCC 1638، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه‌ی *دلبروکی* PTCC 1333 و *لاکتوکوکوس لاکتیس* PTCC 1336 با آغازگرهای PLAN رفت و برگشت ۷۳

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۶: باکتریهای رشدکرده بر روی پلیت LB حاوی آمپی‌سیلین، X-gal و IPTG ۷۴

شکل ۳-۷: تائید حضور ژن *gad* در ناقل pGEM-T ۷۵

شکل ۳-۸: تائید حضور ژن *gad* در ناقل pGEM-T ۷۵

شکل ۳-۹: نتایج هم‌ردیفی توالی به دست آمده از سویه‌ی *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونه‌ی *کازئی* PTCC 1608 ..... ۷۷

شکل۳-۱۰: نتایج هم‌ردیفی توالی به دست آمده از سویه‌ی *لاکتوباسیلوس روتری* DSM 20016 ..... ۷۷

شکل ۳-۱۱: نتایج هم‌ردیفی توالی به دست آمده از سویه‌ی *لاکتوکوکوس لاکتیس* PTCC 1336 ..... ۷۸

شکل ۳-۱۲: نتایج هم‌ردیفی توالی به دست آمده از سویه‌ی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* PTCC 1638 ..... ۷۸

شکل ۳-۱۳: : نتایج هم‌ردیفی توالی به دست آمده از سویه‌ی لاکتوباسیلوس *دلبروکی* زیرگونه‌ی *دلبروکی* PTCC 1333 ..... ۷۹

شکل ۳-۱۴: نتایج برش تک‌آنزیمی با آنزیم‌های *Eco*RI و *Bam*HI ۸۳

شکل ۳-۱۵: باکتری‌های ترانسفورم‌شده‌ی رشدکرده بر روی پلیت LB حاوی آمپی‌سیلین ۸۴

شکل ۳-۱۶: تأیید حضور قطعه در ناقل بیانی ۸۴

شکل ۳-۱۷: ساختارهای مونومر و دایمر پیش‌بینی شده برای آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* ۸۵

شکل ۳-۱۸: امتیاز ProSA-Z ساختار پیش‌بینی شده ۸۶

شکل ۳-۱۹: ساختار سه‌بعدی ترکیب به دست آمده با پیش‌بینی قابلیت ممانعت از دایمریزاسیون پروتئین ۸۷

شکل ۳-۲۰: برهمکنش ترکیب بدست آمده با قابلیت ممانعت از دایمریزاسیون با رزیدوهای پروتئین ... ۸۸

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱: مواد شیمیایی مورد استفاده و شرکت سازنده ۳۱

جدول۲-۲: توالی و دمای ذوب آغازگرها ۳۳

جدول ۲-۳: اسامی کیتهای استفاده‌شده ۳۶

جدول ۲-۴: مواد و میزان مورد نیاز برای محیط کشت لوریا-برتانی ۳۹

جدول ۲-۵: مواد و مقدار مورد نیاز برای محیط‌های کشت قندی ۳۹

جدول ۲-۶: دستگاه‌های مورد استفاده ۴۰

جدول ۲-۷: مقادیر مورد نیاز برای انجام PCR ۴۷

جدول ۲-۸: شرایط دمایی انجام PCR با آغازگرهای PLANre (F and R) و PLAN (F and R) ۴۸

جدول ۲-۹: شرایط دمایی انجام PCR با آغازگرهای OPK3 (F and R) ۴۸

جدول ۲-۱۰: شرایط دمایی انجام PCR با آغازگرهای NFRI (F and R) ۴۹

جدول ۲-۱۱: شرایط دمایی انجام PCR با آغازگرهای BH2 (F and R) ۴۹

جدول ۲-۱۲: شرایط دمایی انجام PCR با آغازگرهای DG47F و RW01R ۵۰

جدول ۲-۱۳: اجزای مورد نیاز برای انجام واکنش الحاق قطعه در ناقل pGEM-T ۵۲

جدول ۲-۱۴: جدول اجزای مورد نیاز برای انجام واکنش هضم دوآنزیمی ناقل pGEM-T نوترکیب ۵۶

جدول ۲-۱۵: جدول اجزای مورد نیاز برای انجام واکنش هضم تک‌آنزیمی ناقل pGEM-T نوترکیب ۵۶

جدول ۲-۱۶: اجزای مورد نیاز برای دو هضم تک‌آنزیمی پی در پی (قطعه و ناقل بیانی) بوسیله‌ی آنزیم های *Bam*HI و *Eco*RI ۵۹

جدول ۲-۱۷: مواد و مقادیر مورد نیاز برای واکنش اتصال ۶۰

جدول ۳-۱: تابلوی تخمیر قندها توسط *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونه‌ی *کازئی* PTCC 1608..... ۶۸

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۲: مقادیر غلظت و جذب DNA استخراج‌شده از باکتریهای اسیدلاکتیک ۶۹

جدول ۳-۳: تاثیر جهش‌های مجازی پایدارکننده بر فعالیت کاتالیزوری ۸۹

فصل اول

۱-۱- آنزیم گلوتامات‌دکربوکسیلاز (GAD)[1]

آنزیم گلوتامات‌دکربوکسیلاز، یک آنزیم ضروری است که بیان آن در هر دو دسته‌ی پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها بسیار گسترده است. این آنزیم وابسته به پیریدوکسال‌فسفات[2] به عنوان کوفاکتور بوده و طی یک واکنش غیر قابل-برگشت، با دکربوکسیلاسیون اسیدآمینه‌ی گلوتامات آن را به محصول گاما آمینو بوتیریک‌اسید (گابا)[3] تبدیل می-کند. این واکنش مرحله‌ی محدودکننده‌ی سرعت در مسیر تولید گابا است (Biase and Pennacchietti 2012). آنزیم GAD دارای وظایف مختلفی در انسان، گیاهان و باکتری‌ها می‌باشد (Capitani et al. 2003, Yu et al. 2012).

[1] Glutamic acid decarboxylase (GAD)
[2] PLP
[3] Gamma -aminobutyric acid (GABA)

۱-۱-۱- گلوتامات‌دکربوکسیلاز در یوکاریوت‌ها

۱-۱-۱-۱- نقش گلوتامات‌دکربوکسیلاز در انسان

در انسان گابا علاوه بر وظیفه‌ی اصلی‌اش به عنوان انتقال‌دهنده‌ی عصبی مهاری[1] در دستگاه اعصاب مرکزی، در بسیاری از بافت‌های محیطی و در غدد درون‌ریز[2] هم تولید می‌شود (Adeghate and Ponery 2002). در دستگاه اعصاب مرکزی گابا علاوه بر عملکرد به عنوان انتقال‌دهنده‌ی عصبی مهاری، با دخالت در تنظیم عملکرد غدد درون‌ریز عصبی[3] قادر به اعمال اثر بر محور هیپوتالاموس- هیپوفیز می‌باشد (Lariviere et al. 2002). گابا در پانکراس توسط سلول‌های جزایر β[4] تولید شده و منجر به تنظیم ترشح گلوکاگون از سلول‌های α می‌گردد (Bu et al. 1992).

در انسان دو ایزوفرم ۶۵ و ۶۷ کیلودالتونی آنزیم گلوتامات‌دکربوکسیلاز بیان می‌شود . هردو این ایزوفرم‌ها در حالت عملکردی به صورت دایمر هستند و از نظر توالی اسیدآمینه ۷۳درصد تشابه دارند. تفاوت اصلی توالی GAD65 و GAD67 در ۱۰۰ اسیدآمینه‌ی انتهای N است (Bu et al. 1992, Matsukawa and Ueno 2007). GAD67 نسبتا هیدروفیل و قابل انحلال بوده و در جسم سلولی نورون‌ها و سیتوسل سایر سلول‌ها مثل سلول‌های β پانکراس تولید می‌شود. این ایزوفرم مسئولیت اصلی ساخت گابا را در مغز بر عهده دارد. GAD65 بیشتر هیدروفیل بوده و نسبت به GAD67 انحلال‌پذیری کمتری دارد. این ایزوفرم در غشاء وزیکول‌های سیناپتیک[5] نورون‌ها و وزیکول‌های ریز شبه سیناپتیک[6] در سلول‌های β پانکراس موجود می‌باشد (Matsukawa and Ueno 2007). در نورون‌های تولیدکننده‌ی گابا هر دو ایزوفرم GAD65 و GAD67 بیان می‌شوند اما از لحاظ نحوه‌ی تنظیم و برهم‌کنش با کوفاکتور PLP متفاوت هستند (Lariviere et al. 2002). pH بهینه‌ی عملکرد هر دو ایزوفرم در انسان خنثی می‌باشد (Capitani et al. 2003).

ایزوفرم GAD65 در مواردی توسط پادتن‌های بدن به عنوان یا ماده‌ی خارجی یا آنتی‌ژن شناخته می‌شود و این امر در نهایت می‌تواند منجر به تخریب سلول‌های جزایر β در پانکراس و توسعه‌ی دیابت نوع یک شود (Ronkainen et al. 2006).

---

[1] Inhibitory neurotransmitter
[2] Endocrine
[3] Neuroendocrine
[4] β island
[5] Synaptic vesicles
[6] Synaptic-like microvesicles

دو ژن کدکننده‌ی ایزوفرم‌های ۶۵ و ۶۷ کیلودالتونی در دو ناحیه‌ی جدا و به ترتیب بر روی کروموزوم‌های شماره‌ی ۱۰ و ۲ قرار دارند. شباهت این دو ژن به قدری زیاد است که این فرضیه را مطرح می‌کند که این دو ژن در طول تکامل در اثر پدیده‌ی دو نسخه‌نویسی[1] یک ژن اجدادی مشترک ایجاد شده‌اند (Lariviere et al. 2002).

۱-۱-۱-۲- نقش گلوتامات‌دکربوکسیلاز در گیاهان

Ca^{2+} یون درگیر در بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی داخل‌سلولی در سلول‌های یوکاریوتی است. در این مسیرهای پیام‌رسانی پروتئین‌هایی با قابلیت اتصال به یون Ca^{2+} وجود دارند که کالمودولین[2] یکی از شناخته‌شده‌ترین این پروتئین‌ها می‌باشد (Babu et al. 1988). در گیاهان بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی داخل‌سلولی نیازمند تشکیل کمپلکس CaM/Ca^{2+} می‌باشند که از آن جمله می‌توان به فعالیت‌هایی مانند پاسخ به انواع استرس‌های محیطی، رشد و تکوین را نام برد (Bouché et al. 2005, Yang Tianbao and Poovaiah 2003).

گلوتامات‌دکربوکسیلاز گیاهی در گیاهان بسیاری از جمله گل اطلسی[3] (Snedden et al. 1996)، سویا (Snedden et al. 1995)، تنباکو (Baum et al. 1996) و آرابیدوپسیس[4] (Zik et al. 1998) بیان می‌شود و نقش عمده‌ی آن پاسخ به استرس اکسیداتیو و تنظیم تکامل می‌باشد. گلوتامات‌دکربوکسیلاز موجود در گیاهان و همچنین مخمرهایی نظیر ساکارومایسس سرویزیه دارای ناحیه‌ی اتصال به کمپلکس کالمودولین (CaM)/ Ca^{2+} در انتهای C می‌باشد. کمپلکس CaM/Ca^{2+} باعث فعال‌سازی آنزیم می‌شود. دامنه‌ی[5] اتصال به کمپلکس CaM/Ca^{2+} در عدم وجود این کمپلکس باعث مهار عملکرد این آنزیم می‌گردد (Gut et al. 2009). تحقیقات در این زمینه نشان داده‌اند حذف این دامنه‌ی تنظیمی منجر به تولید بی‌رویه‌ی گابا و کاهش شدید گلوتامات می‌گردد. تغییرات نامطلوب در غلظت این متابولیت‌ها منجر به مشکلات تکاملی نظیر شکل‌گیری ساقه‌های کوتاه در اثر عدم توانایی سلول‌های پارانشیمی در طویل شدن می‌شود (Baum et al. 1996). گابا همچنین اسیدآمینه‌ی درگیر در یک‌سری مسیرهای پیام‌رسانی است و گیرنده‌های اختصاصی آن نیز در گیاهان شناسایی شده‌اند (Palanivelu et al. 2003). گلوتامات‌دکربوکسیلاز در ریشه‌ی بعضی گیاهان نیز تولید می‌شود و بیان آن در شرایطی مثل پاسخ به استرس گرمایی صورت می‌گیرد (Bouche et al. 2004). وزن مولکولی این آنزیم در گیاهان ۵۰۰ کیلودالتون بوده و pH بهینه‌ی عملکرد آن ۵،۸ می‌باشد. البته در pH خنثی و در حضور کمپلکس CaM/Ca^{2+} نیز فعالیت چشم‌گیری از این آنزیم مشاهده شده‌است (Capitani et al. 2003).

---

[1] Gene duplication
[2] Calmodulin (CaM)
[3] *Petunia*
[4] *Arabidopsis*
[5] Domain