بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم پایه

گروه ژنتیک

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک

کلونینگ توالی کدکننده‌ی آنزیم دی-آمینو اسید اکسیداز کپک *فوزاریوم* در میزبان *ساکارومایسس سرویزیه*

استادان راهنما:

دکتر محسن مبینی دهکردی

دکتر کامران قائدی

استاد مشاور:

دکتر بهناز صفار

پژوهشگر:

مرضیه مؤذنی

خردادماه ۱۳۹۲

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

با تقدیر و سپاس فراوان از یاری و زحمات بی دریغ

اساتید راهنمای بزرگوارم

آقای دکتر محسن مبینی دهکردی و آقای دکتر کامران قائدی

استاد مشاور گرامی خانم دکتر بهناز صفار

اساتید محترم گروه ژنتیک دانشگاه شهرکرد

استاد ارجمندم آقای دکتر رحمان امام زاده

و دوستان عزیزم

خانم ها افضل جوان، محمدی، کریمی، عابدی، غلامیان، کاظمی نسب،

درویشی و...

تقدیم به

همسر عزیزم

به پاس حمایت و محبت‌های بی‌دریغش

چکیده

دی-آمینواسید اکسیداز (DAAO) یک فلاووآنزیم پراکسیزومی حاوی فلاوین آدنین دی نوکلئوتید است که دآمیناسیون اکسیداتیو اسیدهای آمینه‌ی نوع دی را کاتالیز می‌کند. این آنزیم کاربردهای بسیاری در طراحی حس-گرهای زیستی، تولید آنتی‌بیوتیک سفالوسپورین c و چندین ترکیب ارزشمند دارویی و در تشخیص و پیشگیری چندین بیماری از جمله سرطان دارد. اگرچه این آنزیم‌ها به طور وسیع از میکروارگانیسم‌ها تا انسان گسترده‌اند، اما عموما آنزیم‌های میکروبی به دلیل وجود مزایای بسیار نیازهای صنعتی را رفع می‌کنند که در این میان جنس *فوزاریوم* جایگاه ویژه‌ای دارد. هدف از این مطالعه کلون‌سازی توالی نشانه‌ی ترشحی فاکتور آلفای مخمری به همراه ترادف کدکننده‌ی آنزیم دی-آمینواسید اکسیداز از منبع قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* در میزبان یوکاریوتی *ساکارومایسس سرویزیه* به منظور بیان ترشحی آنزیم مورد نظر بود. پس از طراحی پرایمرهای اختصاصی، توالی نشانه فاکتور آلفای مخمری با استفاده از روش PCR تکثیر شد. قطعه‌ی تکثیر شده سپس در وکتور شاتل بیانی p316TDH3 کلون گردید. پس از تأیید کلونینگ، cDNA دی-آمینواسید اکسیداز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. بررسی میزان هماهنگی کدون‌های مورد استفاده در cDNA تکثیر شده در مقایسه با کدون‌های مورد استفاده در میزبان نشان داد که این پروتئین نمی‌تواند به طور مؤثر در میزبان *ساکارومایسس* بیان شود. از این رو پس از بهینه سازی کدون‌ها این قطعه سنتز شد و سپس در پلاسمید p316TDH3 الحاق و در میزبان *E.coli* DH5α ترانسفورم گردید. پس از آن پلاسمید نوترکیب p316TDH3-α-matf-DAO به میزبان *ساکارومایسس سرویزیه* منتقل شد. تعیین توالی قطعه سنتز شده صحت توالی و عدم وجود موتاسیون در آن را اثبات کرد. نتایج حاصل از کلونی PCR و برش‌های آنزیمی تأیید کننده کلون‌سازی قطعات در وکتور هدف می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: دی-آمینواسید اکسیداز، کلون‌سازی، بیان ترشحی، پلاسمید نوترکیب

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته ۱

۱-۱ آمینواسید اکسیداز ۲

۱-۱-۱ انواع آمینواسید اکسیدازها ۴

۱-۱-۱-۱ ال- آمینواسید اکسیداز (LAAO) ۴

۱-۱-۱-۲ دی-آمینواسید اکسیداز (DAAO) ۴

۱-۱-۲ ساختار دی-آمینواسیداکسیداز ۵

۱-۱-۲-۱ ساختار ژن‌های مولد دی-آمینواسید اکسیداز ۵

۱-۱-۲-۲ ساختار پروتئینی دی-آمینواسید اکسیداز ۶

۱-۱-۳ اختصاصیت سوبسترا ۸

۱-۱-۴ مکانیسم آنزیمی ۸

۱-۱-۵ نقش‌های زیستی دی-آمینواسیدها درسلول یوکاریوتی و تنظیم سطوح آنها با DAAO ۹

۱-۱-۵-۱ تنظیم سطح دی- سرین ۱۰

۱-۱-۵-۲ تنظیم ترشح هورمون ۱۰

۱-۱-۵-۳ تنظیم افزایش فشار خون شریانی ۱۰

۱-۱-۵-۴ تنظیم سطح دی-آلانین ۱۱

۱-۱-۵-۵ تنظیم سطح دی-پرولین ۱۱

۱-۱-۶ موجودات زنده‌ی تولید کننده‌ی دی-آمینواسید اکسیداز ۱۱

۱-۲ فوزاریوم ۱۳

۱-۳ کلون‌سازی دی-آمینواسید اکسیداز ۱۳

۱-۳-۱ میزبان‌های پروکاریوتی ۱۳

۱-۳-۱-۱ کاربرد میزبان‌های پروکاریوتی در فرایند کلون‌سازی دی-آمینواسید اکسیداز ۱۴

۱-۳-۲ میزبان‌های یوکاریوتی ۱۵

۱-۳-۲-۱ پایگاه‌های اطلاعاتی مرتبط با مخمر ۱۸

۱-۳-۲-۲ کاربرد میزبان‌های یوکاریوتی در فرایند کلون‌سازی دی-آمینواسید اکسیداز ۱۹

۱-۴ ترانسفکشن ۲۰

عنوان **صفحه**

۱-۴-۱ ترانسفکشن گذرا و پایدار ۲۱
۱-۵ کاربردهای دی-آمینواسید اکسیداز ۲۲
۱-۵-۱ تولید ۷-آمینوسفالوسپورانیک اسید ۲۲
۱-۵-۲ سنتز اجزای فعال فیزیولوژیکی ۲۳
۱-۵-۲-۱ تولید آلفا-کتواسیدها وال-آمینواسیدهای خالص ۲۳
۱-۵-۲-۲ ال-پایپکولیک اسید ۲۳
۱-۵-۲-۳ MTOBA ۲۳
۱-۵-۲-۴ اوماپاتریلات ۲۴
۱-۵-۲-۵ نافارلین ۲۴
۱-۵-۳ دی-آمینواسید اکسیداز در زیست فناوری کشاورزی ۲۵
۱-۵-۴ کاربردهای درمانی ۲۶
۱-۵-۴-۱ تشخیص سرطان ۲۶
۱-۵-۴-۲ تشخیص و پیشگیری بیماری‌های psychosomatic ۲۷
۱-۵-۵ حس‌گرهای زیستی دی-آمینواسید اکسیداز و سنجش دی-آمینواسیدها ۲۷
۱-۶ اهداف تحقیق ۲۹

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۰
۲-۱ مواد ۳۱
۲-۱-۱ ترکیبات شیمیایی ۳۱
۲-۱-۲ سویه‌های میکروبی مورد استفاده ۳۳
۲-۱-۳ پلاسمید مورد استفاده ۳۳
۲-۱-۴ پرایمرهای مورد استفاده ۳۴
۲-۱-۵ محلول‌ها ۳۵
۲-۱-۵-۱ محلول مورد نیاز برای استخراج DNA ژنومی از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* ۳۵
۲-۱-۵-۲ محلول مورد نیاز برای الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۳۵
۲-۱-۵-۳ محلول‌های مورد نیاز برای استخراج RNA ۳۵
۲-۱-۵-۴ محلول‌های مورد نیاز برای استخراج پلاسمید در مقیاس کوچک ۳۶
۲-۱-۵-۵ محلول مورد نیاز برای تهیه‌ی سلول‌های مستعد باکتریایی ۳۷

عنوان **صفحه**

۲-۱-۵-۶ محلول مورد نیاز برای تهیه‌ی سلول‌های مستعد مخمری ۳۸
۲-۱-۵-۷ محلول مورد نیاز برای ترانسفکشن سلول مستعد مخمری ۳۸
۲-۱-۵-۸ محلول‌های مورد نیاز برای انجام کلونی- PCR در مخمر ۳۸
۲-۱-۵-۹ محلول‌های مورد نیاز برای استخراج پلاسمید از مخمر ۳۹
۲-۱-۶ محیط کشت‌ها ۳۹
۲-۱-۶-۱ محیط کشت لوریا برتانی ۳۹
۲-۱-۶-۲ محیط کشت انتخابی ۴۰
۲-۱-۶-۳ محیط کشت YPD ۴۰
۲-۱-۶-۴ محیط کشت حداقل ۴۱
۲-۱-۶-۵ محیط نگهداری باکتری‌ها ۴۱
۲-۲ تجهیزات آزمایشگاهی ۴۲
۲-۳ روش‌ها ۴۳
۲-۳-۱ بررسی‌های بیوانفورماتیکی ۴۳
۲-۳-۱-۱ دریافت توالی‌های مورد نظر ۴۳
۲-۳-۱-۲ بررسی بخش‌های غشاگذر دی-آمینواسید اکسیداز ۴۳
۲-۳-۱-۳ بررسی موقعیت پروتئین ۴۳
۲-۳-۱-۴ مقایسه کدون‌های مورد استفاده در *فوزاریوم* و مخمر ۴۳
۲-۳-۱-۵ هم‌ترازی توالی‌های مورد نظر ۴۴
۲-۳-۱-۶ رسم فیلوگرام ۴۴
۲-۳-۱-۷ پیش بینی ساختار دو بعدی ۴۴
۲-۳-۱-۸ پیش بینی ساختار سه بعدی ۴۴
۲-۳-۱-۹ طراحی پرایمر ۴۵
۲-۳-۲ تکثیر توالی نشانه‌ی ترشحی فاکتور آلفای مخمری ۴۵
۲-۳-۲-۱ استخراج DNA ژنومی از مخمر ۴۵
۲-۳-۲-۲ تکثیر توالی نشانه‌ی ترشحی فاکتور آلفا ۴۶
۲-۳-۳ ژل الکتروفورز محصول PCR ۴۶
۲-۳-۳-۱ بافر ۱۰X TBE ۴۷

عنوان **صفحه**

۲-۳-۳-۲ اتیدیوم بروماید ۴۷
۲-۳-۳-۳ روش الکتروفورز ۴۷
۲-۳-۳-۴ استخراج DNA از ژل آگارز ۴۸
۲-۳-۴ الحاق توالی نشانه‌ی ترشحی فاکتور آلفای مخمری در پلاسمید p316TDH3 ..... ۴۹
۲-۳-۴-۱ هضم آنزیمی پلاسمید و محصول PCR ۴۹
۲-۳-۴-۲ الحاق قطعه الیگونوکلئوتیدی مورد نظر به داخل وکتور ۵۰
۲-۳-۵ تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد و ترانسفورماسیون ۵۰
۲-۳-۵-۱ ساخت باکتری مستعد با استفاده از کلرید کلسیم ۵۰
۲-۳-۵-۲ ترانسفورماسیون سلول‌های باکتریایی مستعد ۵۱
۲-۳-۶ بررسی حضور قطعه مورد نظر در نمونه‌های باکتری حاصل از ترانسفورماسیون ۵۱
۲-۳-۶-۱ کلونی- PCR باکتری ۵۱
۲-۳-۶-۲ استخراج پلاسمید نوترکیب از *اشریشیاکلای* به وسیله شکستن قلیایی ۵۲
۲-۳-۷ تکثیر توالی کدکننده‌ی دی-آمینواسید اکسیداز ۵۳
۲-۳-۷-۱ استخراج RNA از سلول‌های قارچ رشته‌ای *فوزاریوم اکسیسپوروم* ۵۳
۲-۳-۷-۲ ساخت cDNA ۵۴
۲-۳-۷-۳ تکثیر توالی دی-آمینواسید اکسیداز ۵۶
۲-۳-۸ طراحی و ساخت cDNA کد کننده‌ی دی-آمینواسید اکسیداز ۵۶
۲-۳-۹ تعیین توالی ۵۷
۲-۳-۱۰ تهیه سلول‌های مستعد مخمر و ترانسفکشن ۵۷
۲-۳-۱۰-۱ ساخت سلول‌های مخمر مستعد با استفاده از استات لیتیوم ۵۷
۲-۳-۱۰-۲ ترانسفکشن سلول‌های مستعد مخمری ۵۸
۲-۳-۱۱ بررسی حضور قطعه‌ی مورد نظر در نمونه‌های مخمر حاصل از ترانسفکشن ۵۸
۲-۳-۱۱-۱ کلونی- PCR مخمر ۵۸
۲-۳-۱۱-۲ استخراج پلاسمید از مخمر ۵۹

فصل سوم: نتایج ۶۰
۳-۱ نتایج حاصل از مطالعات بیوانفورماتیک ۶۱
۳-۱-۱ بررسی توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی دی-آمینواسید اکسیداز ۶۱

عنوان **صفحه**

۳-۱-۲ بررسی بخش‌های غشاگذر پروتئین دی-آمینواسید اکسیداز ۶۱

۳-۱-۳ بررسی موقعیت پروتئین ۶۲

۳-۱-۴ مقایسه کدون‌های مورد استفاده در *فوزاریوم اکسیسپوروم* و *ساکارومایسس سرویزیه* ۶۳

۳-۱-۵ بهینه‌سازی توالی کدکننده‌ی DAAO *فوزاریوم اکسیسپوروم* بر اساس کدون‌های رایج در *ساکارومایسس سرویزیه* ۶۴

۳-۱-۶ بررسی توالی بهینه‌سازی شده *کدکننده‌ی DAAO فوزاریوم اکسیسپوروم* بر اساس کدون های رایج در *ساکارومایسس سرویزیه* ۶۵

۳-۱-۷ بررسی خصوصیات مختلف پروتئین در چندین گونه‌ی یوکاریوتی و پروکاریوتی ۶۷

۳-۱-۸ بررسی میزان شباهت توالی‌ها و نواحی حفاظت شده در گونه‌های مختلف ۶۸

۳-۱-۹ بررسی رابطه تکاملی بین گونه‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی ۶۹

۳-۱-۱۰ پیش‌بینی ساختار دوم و سوم ۷۰

۳-۲ تکثیر و کلون‌سازی توالی نشانه‌ی ترشحی فاکتور آلفا در میزبان *اشریشیاکلای* ۷۲

۳-۲-۱ نتایج حاصل از استخراج DNA ژنومی از مخمر ۷۲

۳-۲-۲ نتیجه‌ی حاصل از واکنش PCR ۷۳

۳-۲-۳ الحاق توالی نشانه‌ی ترشحی فاکتور آلفای مخمری به پلاسمید p316TDH3 ۷۳

۳-۲-۳-۱ برش آنزیمی پلاسمید و محصول PCR ۷۳

۳-۲-۳-۲ الحاق توالی نشانه‌ی ترشحی به پلاسمید برش خورده ۷۴

۳-۲-۴ ترانسفورماسیون وکتور نوترکیب p316TDH3-α–matf به سلول‌های مستعد باکتریایی ۷۴

۳-۲-۵ نتایج حاصل از بررسی حضور قطعه‌ی مورد نظر در نمونه‌های باکتری حاصل از ترانسفورماسیون ۷۵

۳-۲-۵-۱ نتیجه‌ی PCR بر روی کلونی‌های رشد یافته حاصل از ترانسفورماسیون ۷۵

۳-۲-۵-۲ نتیجه‌ی هضم آنزیمی بر روی وکتور دارای قطعه‌ی الیگونوکلئوتیدی آلفا فاکتور ۷۶

۳-۳ تکثیر و کلون‌سازی cDNA کدکننده‌ی دی-آمینواسید اکسیداز در میزبان *اشریشیاکلای* ۷۶

۳-۳-۱ نتایج حاصل از استخراج RNA از سلول‌های قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* و سنتز cDNA ۷۶

۳-۳-۲ نتایج حاصل از واکنش PCR ۷۷

۳-۳-۳ طراحی و ساخت cDNA کدکننده‌ی دی-آمینواسید اکسیداز *فوزاریوم اکسیسپوروم* ۷۷

۳-۳-۴ نتیجه‌ی تعیین توالی قطعه‌ی وارد شده در وکتور ۷۸

عنوان **صفحه**

۳-۳-۵ نتیجه‌ی الحاق قطعه‌ی حاوی cDNA دی-آمینواسید اکسیداز در وکتور p316TDH3 و ترانسفورماسیون وکتور حاصل..... ۷۸

۳-۳-۶ نتایج حاصل از بررسی حضور قطعه‌ی حاوی cDNA دی-آمینواسید اکسیداز در نمونه‌های باکتری حاصل از ترانسفورماسیون..... ۷۹

۳-۳-۶-۱ نتیجه‌ی PCR بر روی کلونی‌های رشد یافته حاصل از ترانسفورماسیون ۷۹

۳-۳-۶-۲ نتایج هضم آنزیمی بر روی وکتور نوترکیب دارای قطعه‌ی حاوی cDNA دی-آمینواسید اکسیداز ۸۰

۳-۴ ترانسفکشن وکتور نوترکیب حاصل به سلول‌های مستعد مخمری ۸۰

۳-۴-۱ نتایج حاصل از بررسی حضور قطعه‌ی حاوی cDNA دی-آمینواسید اکسیداز در نمونه‌های مخمر حاصل از ترانسفکشن ۸۱

۳-۴-۱-۱ نتیجه‌ی حاصل از کلونی-PCR..... ۸۱

۳-۴-۱-۲ نتیجه‌ی حاصل از استخراج پلاسمید از مخمر ۸۲

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری ۸۳

۴-۱ بررسی توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی دی-آمینواسید اکسیداز ۸۴

۴-۲ کلون‌سازی توالی نشانه‌ی ترشحی فاکتور آلفای مخمری در وکتور شاتل p316TDH3 ..... ۸۶

۴-۳ کلون‌سازی cDNA کدکننده‌ی دی-آمینواسید اکسیداز در میزبان پروکاریوتی *اشریشیاکلای* ... ۸۷

۴-۴ تولید پروتئین دی-آمینواسید اکسیداز در میزبان یوکاریوتی *ساکارومایسس سرویزیه*..... ۸۹

۴-۵ پیشنهادات ۹۲

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱: a. ساختار اسیدآمینه b. ساختار ال و دی اسیدآمینه ۴

شکل ۱-۲: ساختارهای جزئی زیرواحدها و ساختار سه بعدی DAAO ۶

شکل ۱-۳: یک هم‌ترازی مقایسه‌ای از چندین DAAO میکروبی ۷

شکل ۱-۴: واکنش کاتالیزشده توسط دی-آمینواسید اکسیداز ۹

شکل ۱-۵ : نمایش کروموزوم‌های *فوزاریوم اکسیسپوروم* ۱۳

شکل ۱-۶: استفاده از مخمر در حوزه‌های مختلف فناوری زیستی ۱۶

شکل ۱-۷: نمایش گرافیگی کروموزوم‌های *ساکارومایسس سرویزیه* ۱۷

شکل ۱-۸: چرخه زندگی *ساکارومایسس سرویزیه* ۱۸

شکل ۱-۹: تولید ۷-آمینوسفالوسپورانیک اسید (7-ACA) از سفالوسپورین C با استفاده از سیستم دو آنزیمی دی-آمینواسید اکسیداز/گلوتاریل هیدرولاز ۲۲

شکل ۱-۱۰: دراسمی‌زاسیون متیونین توسط DAAO آ. پروتوفورمیا، کاتالاز، ال- فنیل آلانین دهیدروژناز(L-PheDH) و فرمیک دهیدروژناز(FDH) ۲۴

شکل ۱-۱۱: دراسمیزاسیون دی و ال-۲- نفتیل آلانین (D ,L-2-NAla) کاتالیز شده توسط M213G RgDAAO، کاتالاز و ال–آسپارتات آمینو ترانسفراز (LAAT) ۲۵

شکل ۲-۱: وکتور p316TDH3 ۳۴

شکل ۳-۱: تعیین بخش‌های درون غشایی و برون غشایی پروتئین دی-آمینواسید اکسیداز ۶۲

شکل ۳-۲: نتایج حاصل از نرم‌افزار TargetP 1.1 ۶۲

شکل ۳-۳: پراکنش کدون‌های مورد استفاده در طول توالی کدکننده بیان شده در میزبان *ساکارومایسس سرویزیه* ۶۳

شکل ۳-۴: محتوای cDNA CG کدکننده‌ی DAAO *فوزاریوم اکسیسپوروم* ۶۴

شکل ۳-۵: پراکنش درصد کدون‌ها در گروه‌های کدونی مربوط به cDNA کدکننده‌ی *DAAO فوزاریوم اکسیسپوروم* ۶۴

شکل ۳-۶: بهینه‌سازی توالی کدکننده‌ی DAAO *فوزاریوم اکسیسپوروم* ۶۵

شکل ۳-۷: پراکنش کدون‌های بهینه شده مورد استفاده در طول توالی کدکننده بیان شده در میزبان *ساکارومایسس سرویزیه* ۶۵

شکل ۳-۸: محتوای cDNA CG مولد DAAO *فوزاریوم اکسیسپوروم* پس از بهینه‌سازی کدون‌ها ۶۶

شکل ۳-۹: پراکنش درصد کدون‌ها در گروه‌های کدونی مربوط به cDNA کدکننده‌ی DAAO

عنوان **صفحه**

فوزاریوم اکسیسپوروم پس از بهینه سازی ۶۶
شکل ۳-۱۰: تعداد اسیدهای آمینه مختلف در دی-آمینواسید اکسیداز *فوزاریوم اکسیسپوروم*..... ۶۸
شکل ۳-۱۱: مقایسه توالی پروتئینی آنزیم دی-آمینواسید اکسیداز در چندین گونه‌ی یوکاریوتی و پروکاریوتی..... ۶۹
شکل ۳-۱۲: فیلوگرام مربوط به پروتئین دی-آمینواسید اکسیداز در چندین گونه‌ی یوکاریوتی و پروکاریوتی..... ۷۰
شکل ۳-۱۳: ساختار دوم دی-آمینواسید اکسیداز *فوزاریوم اکسیسپوروم*..... ۷۰
شکل ۳-۱۴: مدل اولیه از ساختار سه بعدی پروتئین (توسط سرور M4T) ۷۱
شکل ۳-۱۵: مدل بهینه شده پس از واکنش با ملکول‌های آب (توسط سرور YASARA)..... ۷۱
شکل ۳-۱۶: DNA ژنومی استخراج شده از سلول‌های مخمری دیپلوئید..... ۷۲
شکل ۳-۱۷: محصول PCR مربوط به توالی ترشحی آلفا فاکتور مخمری..... ۷۳
شکل ۳-۱۸: قطعات حاصل از برش با آنزیم‌های محدودگر *Not* I و *Asc* I..... ۷۴
شکل ۳-۱۹: فرایند ترانسفورماسیون سلول‌های *اشریشیاکلای*..... ۷۵
شکل ۳-۲۰: واکنش PCR برای بررسی کلونی‌های حاوی توالی نشانه‌ی ترشحی آلفا فاکتور..... ۷۵
شکل ۳-۲۱: قطعات حاصل از هضم آنزیمی وکتور نوترکیب p316TDH3α-mf..... ۷۶
شکل ۳-۲۲: محصول PCR مربوط به cDNA دی-آمینواسید اکسیداز..... ۷۷
شکل۳-۲۳: پیک‌های تعیین توالی قطعه‌ی حاوی cDNA کدکننده‌ی DAAO با استفاده از پرایمرهای همگانی M13..... ۷۸
شکل ۳-۲۴: فرایند ترانسفورماسیون سلول‌های *اشریشیاکلای*..... ۷۹
شکل ۳-۲۵: واکنش PCR برای بررسی کلونی‌های *اشریشیاکلای* حاوی cDNA دی-آمینواسید اکسیداز..... ۷۹
شکل ۳-۲۶: هضم آنزیمی وکتور p316TDH3 استخراج شده از *اشریشیاکلای* با آنزیم‌های *Hin*d III و *Asc* I ۸۰
شکل ۳-۲۷: فرایند ترانسفکشن در *ساکارومایسس سرویزیه* ۸۱
شکل ۳-۲۸: شکل ۳-۲۵: واکنش PCR برای بررسی کلونی‌های *ساکارومایسس* حاوی cDNA دی- آمینواسید اکسیداز..... ۸۲
شکل ۳-۲۹: هضم آنزیمی وکتور p316TDH3 استخراج شده از *ساکارومایسس* با آنزیم‌های *Hin*d III و *Asc* I..... ۸۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱. اعضای متعلق به گروه دارای EC number: 1.4.3 ..... ۳

جدول ۱-۲. نام و نوع اطلاعات پایگاه‌های اطلاعاتی مرتبط با مخمر ۱۹

جدول ۲-۱. ترکیبات مورد استفاده ۳۱

جدول ۲-۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده ۳۴

جدول ۲-۳. مواد مورد نیاز برای ساخت محلول استخراج DNA ۳۵

جدول ۲-۴. محلول TBE با غلظت ۱۰X ۳۵

جدول ۲-۵. بافر پاکسازی ۳۶

جدول ۲-۶. بافر استخراج RNA ۳۶

جدول ۲-۷. محلول لیز قلیایی I ۳۷

جدول ۲-۸. محلول لیز قلیایی II ۳۷

جدول ۲-۹. محلول لیز قلیایی III ۳۷

جدول ۲-۱۰. مواد مورد نیاز برای تهیه بافر TE با غلظت ۱۰ X ۳۷

جدول ۲-۱۱. مواد مورد نیاز برای تهیه بافر لیتیوم استات ۳۸

جدول ۲-۱۲. مواد مورد نیاز برای تهیه محلول پلی اتیلن گلایکول ۳۸

جدول ۲-۱۳. مواد مورد نیاز برای تهیه بافر کلونی-PCR ۳۹

جدول ۲-۱۴. مواد مورد نیاز برای تهیه بافر لیز ۳۹

جدول ۲-۱۵. مواد مورد نیاز برای تهیه محیط کشت LB ۴۰

جدول ۲-۱۶. مواد مورد نیاز برای تهیه محیط کشت YPD ۴۱

جدول ۲-۱۷. مواد مورد نیاز برای تهیه محیط کشت حداقل ۴۱

جدول ۲-۱۸. تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده ۴۲

جدول ۲-۱۹. شرایط بهینه برای PCR سیگنال پپتید ترشحی فاکتور آلفای مخمر ۴۶

جدول ۲-۲۰. مواد مورد نیاز برای انجام PCR بهینه سیگنال پپتید در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر ۴۶

جدول ۲-۲۱. مخلوط RNA-پرایمر ۵۵

جدول ۲-۲۲. مخلوط سنتز cDNA ۵۵

جدول ۲-۲۳. شرایط بهینه برای PCR توالی cDNA دی-آمینواسید اکسیداز ۵۶

جدول ۲-۲۴. مواد مورد نیاز برای انجام PCR بهینه سیگنال پپتید در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر ۵۶

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱. خصوصیات مختلف پروتئین دی-آمینواسید اکسیداز مربوط به سیزده گونه پروکاریوتی و یوکاریوتی.....

جدول ۳-۲. غلظت و خلوص DNA ژنومی استخراج شده ۷۲

جدول ۳-۳. غلظت RNA استخراج شده از سلول‌های *فوزاریوم اکسیسپوروم*.....۷۶

فصل اول

مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

فصل اول

مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

۱-۱ آمینواسید اکسیداز

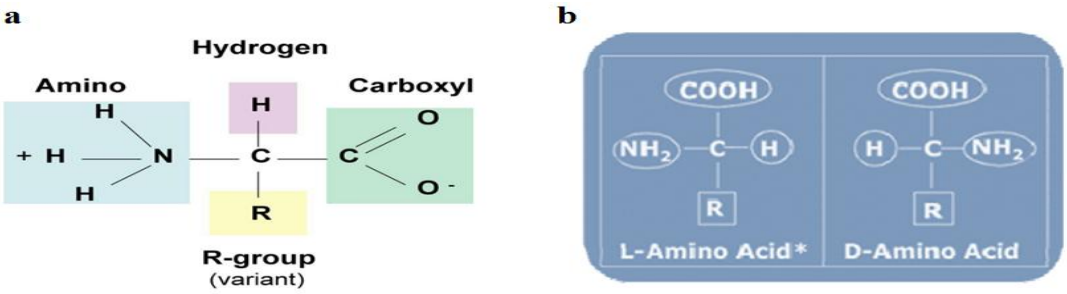
آمینواسید اکسیدازها آنزیم‌هایی هستند که واکنش دآمیناسیون اکسیداتیو (کاتابولیسم اسیدهای آمینه با برداشت گروه α- آمین) اسیدهای آمینه را به یک آلفا کتواسید کاتالیز می‌کنند. این آنزیم‌ها متعلق به گروه اکسیدوردوکتازها (EC1) هستند که بر روی گروه CH-NH2 از دهنده‌ها (۱.۴) و توسط اکسیژن به عنوان پذیرنده (۱.۴.۳) عمل می‌کنند. در جدول ۱-۱ اعضای این گروه را مشاهده می‌کنید.

$$\text{Amino acid} + H_2O + O_2 \rightleftharpoons \text{a 2-oxo acid} + NH_4 + H_2O_2$$

جدول ۱-۱. اعضای متعلق به گروه دارای EC number: 1.4.3

EC1.4.3.1	D-aspartate oxidase
EC1.4.3.2	L-amino-acid oxidase
EC1.4.3.3	D-amino-acid oxidase
EC1.4.3.4	amine oxidase (flavin-containing)
EC1.4.3.5	pyridoxamine-phosphate oxidase
EC1.4.3.6	amine oxidase (copper-containing)
EC1.4.3.7	D-glutamate oxidase
EC1.4.3.8	ethanolamine oxidase
EC1.4.3.10	putrescine oxidase
EC1.4.3.11	L-glutamate oxidase
EC1.4.3.12	cyclohexylamine oxidase
EC1.4.3.13	protein-lysine 6-oxidase
EC1.4.3.14	L-lysine oxidase
EC1.4.3.15	D-glutamate(D-aspartate) oxidase
EC1.4.3.16	L-aspartate oxidase
EC1.4.3.19	glycine oxidase

همه اسیدهای آمینه به جز گلایسین، دارای حداقل یک کربن نامتقارن (اتم کربنی که به ۴ گروه مختلف متصل است) هستند (شکل ۱a-۱) و به همین خاطر ترکیبات فعال نوری محسوب می‌شوند. این ترکیبات نور پلاریزه را منحرف می‌کنند. این بدین معنی است که اسیدهای آمینه می‌توانند دو شکل فضایی متفاوت دی یا ال داشته باشند، که تصویر آینه‌ای یکدیگرند. برای تعیین ایزومری، چپ یا راست بودن عامل آمین در ساختار اسیدآمینه ملاک است، به این صورت که اگر در سمت چپ بود ال-اسیدآمینه و اگر در سمت راست بود دی-اسیدآمینه نامیده می‌شود (شکل ۱b-۱). برخلاف قندهای طبیعی که از نوع دی هستند، اسیدهای آمینه طبیعی موجود در ساختار پروتئین‌ها همگی از نوع ال هستند. وقتی موجود زنده‌ای می‌میرد، نسبت دی به ال از ۰ به ۱ تغییر می‌کند. این فرایند راسمی‌زاسیون نام دارد. ایزومرهای نوری را انانتیومر گویند [۱].



شکل۱-۱: a. ساختار اسیدآمینه b. ساختار ال و دی آمینواسید [۱].

۱-۱-۱ انواع آمینواسید اکسیدازها

۱-۱-۱-۱ ال-آمینواسید اکسیداز[۱] (LAAO)

ال-آمینواسید اکسیداز (EC 1.4.3.2) دآمیناسیون اکسیداتیو تعدادی از اسیدهای آمینه نوع ال، غالباً اسیدهای آمینه آروماتیک و هیدروفوب را کاتالیز می‌کند. این آنزیم متعلق به خانواده اکسیدو ردوکتازها است و دارای یک کوفاکتور به نام فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD)[۲] می‌باشد. LAAO اولین بار توسط Zeller و Martiz در ۱۹۴۴ کشف شد [۲]. این آنزیم تقریباً ۳۰٪ از کل سم برخی گونه‌های مار را تشکیل می‌دهد [۳]. LAAO ها پراکنش بسیاری در طبیعت دارند و در باکتری، قارچ، جلبک سبز، گیاهان و سم مار یافت شده اند.LAAO ها دارای ۳ بخش[۳] ساختاری هستند. تا اواخر ۲۰۰۹، ۱۱ ساختار برای این دسته از آنزیم‌ها مشخص و در بانک اطلاعات پروتئین (PDB[۴]) قرار گرفته است [۴].

۱-۱-۱-۲ دی-آمینواسید اکسیداز[۵] (DAAO)

دی-آمینواسید اکسیداز (**DAAO**; also DAO, OXDA, DAMOX) یک فلاوآنزیم شناخته شده است که دآمیناسیون اکسیداتیو وابسته به اکسیژن ایزومرهای نوع دی اسیدهای آمینه را با اختصاصیت نوری کامل کاتالیز می‌کند که حاصل آن آلفا کتواسیدها، آمونیوم و پراکسید هیدروژن است [۵]. ملکول فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD) در این واکنش نقش گروه همراه[۶] را ایفا می‌کند. ویژگی عمده‌ی همه DAAOها، اختصاصیت بالای آنها به سمت ایزومرهای دی-اسیدهای آمینه است. آنها همیشه نسبت به ایزومر ال مربوطه غیرفعال هستند [۶]. اگرچه این آنزیم اولین بار توسط Krebs در سال ۱۹۳۵ توصیف شد [۷] ولی تا سال

---

1. L- amino acid oxidase
2. Flavin adenine dinucleotide
3. Domain
4. Protein Data Bank
5. D- Amino acid oxidase
6. Prostethic