بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم زیستی

رساله دوره دکتری بیوشیمی

افزایش پایداری آنزیم لوسیفراز گونه *Photinus pyralis* در برابر هضم پروتئازها با استفاده از روش جهش زایی هدفدار

نگارش

علی ریاحی مدوار

استاد راهنما

دکتر سامان حسینخانی

استاد مشاور

دکتر حسین نادری منش

شهریورماه ۱۳۸۸

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم

خواهران و برادر مهربانم

همسر فداکارم

و تمامی کسانی که هدف و تلاش‌شان برای داشتن ایرانی آباد، آزاد، مقتدر و سربلند است.

تقدیم و تشکر:

سپاس و ستایش خدای را که واحد و صمد و قادر است، مالک ذوالجلال و حی فاطر است، رزاق خلق و عالم ضمایر است، خالق سپهر و نجوم ظاهر است، عالم الغیب و داننده سرایر است، باطن است و اول است و آخر است...

وظیفه خود می‌دانم از تلاش‌ها و زحمات تمامی کسانی که در انجام این تحقیق همکاری داشتند تشکر و قدردانی نمایم:

- **جناب آقای دکتر سامان حسینخانی** که در طی این چهار سال و دوره کارشناسی ارشد همواره در کنارم بودند و لذت پژوهش را در سایه راهنمایی‌های بیدریغشان چشیدم.

- **جناب آقای دکتر حسین نادری منش** که مشاوره این پایان نامه را به عهده داشتند.

- جناب آقایان **دکتر خواجه، دکتر عرفانی، دکتر یخچالی، دکتر رعنایی سیادت** ناظران محترم جلسه دفاع از رساله.

- جناب آقایان **دکتر میرشاهی و دکتر کلهر** اساتید محترم گروه.

- جناب آقایان **دکتر باقی زاده، دکتر گرامی و دکتر ناصری**- همکاران گرامی در مرکز بین‌المللی علوم.

- تمامی مسؤولین محترم ازمایشگاه‌های دانشکده علوم زیستی به ویژه سرکار خانم‌ها زرندی و خرمی شاد.

- آقایان؛ **دکتر سید باقر علیپور، دکتر علی مرادی، دکتر شهروز کاظمی، حجتا.. منتظری، سینا ساریخانی، محمد پاژنگ، خسرو خلیفه، علی شهسواری، سعید عباسی، علی سلیمی، حسین اسدی، مسعود ترکزاده، حسن آریاپور، مهدی ایمانی** و خانم‌ها؛ **مجیدی، عطایی، نظری، محمدی، قلاسی** و تمامی دوستان خوبم در دانشکده علوم زیستی و دانشگاه تربیت مدرس.

از همسرم، خانواده‌ام و خانواده همسرم که لذت بودن را با تمام وجود در کنارشان چشیدم.

چکیده:

آنزیم لوسیفراز حشره شب‌تاب (EC; 1.13.12.7) اکسیداسیون لوسیفرین را در حضور یون‌های منیزیم، ATP و اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کند. لوسیفراز آنزیمی تک زیر واحدی (62 kDa) و دارای دو دمین N- ترمینال و C- ترمینال می‌باشد. این آنزیم، به عنوان ژن گزارشگر در *in vivo* imaging کاربردهای بسیار زیادی دارد. لوسیفراز در مقابل پروتئازها حساس و به سرعت غیر فعال می‌شود. تیمار این آنزیم با تریپسین نشان داده است که در شش جایگاه (K^{206} ، R^{213}، R^{218} ،K^{329}، R^{330} و R^{337}) واقع در دومین N - ترمینال برش داده می‌شود. چهار جایگاه برش (K^{206} ، R^{218} ،K^{329}، R^{330}) در بین تمامی لوسیفرازها حفاظت شده می‌باشند. در این تحقیق اسید آمینه آرژینین۲۱۳ (حفاظت شده نمی‌باشد)، به عنوان یک جایگاه جهش مورد توجه قرار گرفت و با متیونین و گلوتامات جایگزین شد. آرژینین ۳۳۷ به عنوان جایگاه دیگری برای ایجاد جهش انتخاب و جهش‌یافته R337Q در این ناحیه طراحی گردید. جهش‌یافته دیگر براساس تاثیر پرولین بر کاهش احتمال برش طراحی گردید، در این حالت گلوتامین ۳۳۸ (بعد از آرژینین ۳۳۷) با پرولین جایگزین شد. برای ایجاد جهش از روش جهش‌زایی هدفدار به روش SOE-PCR استفاده گردید. بعد از تخلیص پروتئین‌های جهش-یافته و طبیعی، مطالعات پروتئولیز محدود در حضور تریپسین و کیموتریپسین برای بررسی پایداری جهش‌یافته‌ها در حضور پروتئازها انجام شد. همچنین جهت بررسی تغییرات ساختاری از مطالعات فلورسانس استفاده شد. مطالعات فلورسانس نشان دهنده فشرده‌تر شدن ساختار پروتئین در اثر جهش‌های حاصله است که این تغییرات ساختار همراه با افزایش پایداری حرارتی و پایداری پروتئولیتیکی جهش‌یافته‌ها می‌باشد. این افزایش پایداری برای جهش‌یافته R337Q قابل توجه بوده به طوریکه در سلول‌های یوکاریوتی نیز نسبت به لوسیفراز طبیعی پایدارتر می‌باشد.

کلمات کلیدی: لوسیفراز، پایداری در برابر پروتئازها، جهش‌زایی هدفدار، تغییرات ساختاری

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست جدول‌ها.....ح

فهرست شکل‌ها.....ط

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه.....۲

۱-۲- بیولومینسانس.....۲

۱-۳- بیولومینسانس در حشرات.....۳

۱-۳-۱- گونه‌های مختلف حشرات بیولومینسانس.....۴

۱-۳-۲- اندامهای نشر کننده نور در قاب‌بالان ۴

۱-۴- بیولومینسانس در حشرهٔ شب‌تاب (Firefly).....۵

۱-۵- ساختار لوسیفراز حشرهٔ شب‌تاب.....۶

۱-۵-۱- دمین‌های موجود در ساختار.....۷

۱-۵-۲- موتیف‌های موجود در ساختار.....۸

۱-۶- جایگاه فعال آنزیم لوسیفراز حشرهٔ شب‌تاب **(Active site)** ۹

۱-۷- سوبسترای لوسیفراز حشرهٔ شب‌تاب.....۱۲

۱-۸- مکانیسم نشر نور حشرات شب‌تاب توسط لوسیفراز ۱۲

۱-۹- کاربردهای لوسیفراز و بیولومینسانس.....۱۴

۱-۹-۱- گزارش‌گرهای زیستی (Bioreporters) ۱۴

۱-۹-۲- اندازه‌گیری ATP ۱۵

۱-۹-۳- استفاده از لوسیفراز در تعیین توالی وابسته به پیروفسفات (Pyrosequencing).....۱۵

۱-۹-۴- کاربرد لوسیفراز در تکنیک‌های سنجش ایمنی(Immuno Assay) ۱۶
۱-۹-۵- تصویربرداری *In vivo* بیولومینسانس (BLI)..... ۱۶
۱-۹-۵-۱- بررسی رشد تومور و متاستاز..... ۱۷
۱-۱۰- محدودیت استفاده از سیستم بیولومینسانس..... ۱۷
۱-۱۰-۱- شیفت نشر نور سبز به قرمز ۱۸
۱-۱۰-۲- اصلاح پایداری حرارتی آنزیم..... ۱۹
۱-۱۰-۳- افزایش پایداری آنزیم در برابر پروتئازها..... ۲۱
۱-۱۱- روشهای بکار رفته به منظور اصلاح ویژگی آنزیم‌ها..... ۲۲
۱-۱۲- پروتئاز ها..... ۲۳
۱-۱۲-۱- اهمیت پروتئازها در موجودات زنده..... ۲۲
۱-۱۲-۱-۱- پروتئازهای داخل سلولی..... ۲۴
۱-۱۲-۲-تقسیم‌بندی پروتئازها..... ۲۵
۱-۱۲-۲-۱- تقسیم‌بندی پروتئازها بر اساس مکانیسم عمل..... ۲۵
۱-۱۲-۲-۱- ۱- سرین پروتئازها (serine protease) ۲۶
۱-۱۲-۳- کاربرد پروتئازها ۲۷
۱-۱۳- پروتئولیز محدود و مطالعه ساختاری پروتئین‌ها..... ۲۷
۱-۱۳-۱- روش انجام پروتئولیز محدود ۲۸
۱-۱۳-۲- عوامل ساختاری تعیین‌کننده در پروتئولیز محدود..... ۲۹
۱-۱۴- هدف..... ۳۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد و دستگاه‌ها..... ۳۳
۲-۲- انتخاب جایگاه جهش..... ۳۵

۲-۳- PCR ۳۶
۲-۳-۱- ویژگیهای پرایمر ۳۶
۲-۳-۲- طراحی پرایمرها ۳۷
۲-۳-۲-۱- طراحی پرایمرها کلونینگ ۳۷
۲-۳-۲-۲- طراحی پرایمرها برای ایجاد جهش‌های مورد نظر ۳۸
۲-۳-۳- واکنش PCR و SOE-PCR ۳۹
۲-۳-۳-۱- انجام واکنش PCR ۴۰
۲-۳-۳-۲- انجام واکنش SOE-PCR ۴۰
۲-۴- الکتروفورز ژل آگارز ۴۱
۲-۵- استخراج از ژل ۴۱
۲-۶- پاکسازی محصول PCR ۴۳
۲-۷- کلونینگ محصولات PCR حاوی جهش ۴۳
۲-۷-۱- مشخصات و نقشه ناقل pET28a ۴۳
۲-۷-۲- تهیه پلاسمید در مقیاس کم (Miniprep) ۴۵
۲-۷-۳- هضم محصولات PCR و ناقل pET28a با آنزیم‌های محدود اثر BamHI و HindIII ۴۶
۲-۷-۴- انجام واکنش الحاق (Ligation) محصول PCR با پلاسمید pET 28a ۴۷
۲-۷-۵- انتقال محصولات الحاق به سویه DH5α ۴۷
۲-۷-۵-۱- مراحل تهیه باکتری مستعد ۴۷
۲-۷-۵-۲- انتقال ناقل نوترکیب به سویه DH5α ۴۸
۲-۸- غربال‌گری کلون‌های مثبت به روش PCR-Colony ۴۹
۲-۹- تعیین توالی cDNA ۴۹
۲-۱۰- انتقال به داخل سویه BL21 ..... ۵۰

۲-۱۱- بیان بالای پروتئین..... ۵۰
۲-۱۲- تهیه محتوای سلولی از باکتری‌ها..... ۵۱
۲-۱۳- تخلیص پروتئین..... ۵۱
۲-۱۴- الکتروفورز SDS-PAGE..... ۵۲
۲-۱۵- سنجش غلظت پروتئین‌ها ۵۲
۲-۱۶- بررسی خصوصیات پروتئین‌های جهش یافته در مقایسه با طبیعی..... ۵۳
۲-۱۶-۱- بررسی دمای بهینه فعالیت آنزیم..... ۵۳
۲-۱۶-۲- بررسی pH بهینه فعالیت آنزیم ۵۳
۲-۱۶-۳- تعیین و مقایسه مقادیر K_m و V_{max} نسبت به ATP و لوسیفرین ۵۴
۲-۱۶-۴- تعیین فعالیت ویژه آنزیم (Specific Activity)..... ۵۴
۲-۱۶-۵- پایداری حرارتی آنزیم..... ۵۴
۲-۱۶-۶- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نسبت به زمان..... ۵۵
۲-۱۶-۷- اندازه‌گیری و مقایسه طیف نشری بیولومینسانس آنزیم لوسیفراز..... ۵۵
۲-۱۷- بررسی مطالعات ساختاری..... ۵۵
۲-۱۷-۱- دیالیز کردن آنزیم‌ها..... ۵۶
۲-۱۷-۲- اندازه‌گیری فلورسانس ذاتی و فلورسانس خا رجی با استفاده از ANS ۵۶
۲-۱۷-۳- مطالعات خاموش‌کنندگی فلورسانس ۵۷
۲-۱۸- پروتئولیز محدود (Limited Proteolysis) آنزیم لوسیفراز..... ۵۷
۲-۱۸-۱- بررسی فعالیت باقی‌مانده آنزیم‌ها در زمانهای مختلف انکوبه شدن در حضور پروتئازها..... ۵۸
۲-۱۹- مقایسه پایداری لوسیفراز جهش‌یافته (R337Q) نسبت به لوسیفراز طبیعی در سلول‌های یوکاریوتی..... ۵۸
۲-۱۹-۱- ایجاد جهش به روش Quickchange-PCR ۵۸

۲-۱۹-۱-۱- تخلیص پلاسمید در مقیاس زیاد (Maxiprep) ۶۰
۲-۱۹-۲- کشت سلول یوکاریوتی..... ۶۰
۲-۱۹-۲-۱- ذوب نمودن سلول‌های یوکاریوتی منجمد شده..... ۶۰
۲-۱۹-۲-۲- پاساژ دادن سلول‌های یوکاریوتی..... ۶۱
۲-۱۹-۲-۳- انجماد سلول‌های یوکاریوتی..... ۶۱
۲-۱۹-۳- انتقال پلاسمید به سلول‌ها یوکاریوتی با استفاده از لیپوفکتامین..... ۶۲
۲-۱۹-۴- لیز کردن سلول‌ها یوکاریوتی..... ۶۳
۲-۱۹-۵- اندازه‌گیری فعالیت لوسیفرازهای بیان شده در سلول‌های یوکاریوتی..... ۶۳

فصل سوم: نتایج

۳-۱- انتخاب جهش‌ها..... ۶۵
۳-۲- استخراج ناقل pET16a در مقیاس کم (Miniprep) ۶۸
۳-۳- بهینه سازی واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای کلونینگ..... ۶۹
۳-۴- انجام جهش زایی هدفدار بر روی ژن لوسیفراز *Photinus pyralis*..... ۷۰
۳-۵- کلونینگ و انتقال ژن لوسیفرازهای حاوی جهش در میزبان *E. coli*..... ۷۰
۳-۶- بیان و تخلیص پروتئین‌های جهش‌یافته و طبیعی نوترکیب..... ۷۳
۳-۷- خصوصیات پروتئین‌های جهش یافته در مقایسه با پروتئین طبیعی..... ۷۴
۳-۷-۱- درجه حرارت بهینه عملکرد آنزیم‌های لوسیفراز..... ۷۴
۳-۷-۲- pH بهینه (Optimum pH)..... ۷۵
۳-۷-۳- تعیین و مقایسه مقادیر K_m و V_{max} نسبت به ATP و لوسیفرین ۷۶
۳-۷-۴- فعالیت ویژه آنزیم ۷۹
۳-۷-۵- پایداری حرارتی آنزیم لوسیفراز..... ۷۹

۳-۷-۶- تعیین طیف نشری بیولومینسانس پروتئین‌های جهش‌یافته و طبیعی..... ۸۰
۳-۷-۷- اندازه گیری فعالیت آنزیم (RLU) نسبت زمان ۸۲
۳-۸- بررسی خصوصیات ساختاری آنزیم لوسیفراز با استفاده از تکنیک‌های طیف-سنجی ۸۳
۳-۸-۱- بررسی ساختاری با استفاده از فلورسانس ذاتی..... ۸۳
۳-۸-۲- بررسی ساختاری با استفاده از فلورسانس خارجی..... ۸۴
۳-۸-۳- مطالعات خاموش شدگی فلورسانس ذاتی توسط آکریل آمید و یدید پتاسیم..... ۸۵
۳-۹- بررسی پروتئولیز محدود (Limited Proteolysis) آنزیم‌های لوسیفراز طبیعی و جهش‌یافته.. ۸۶
۳-۹-۱- پروتئولیز محدود آنزیم‌های لوسیفراز طبیعی و جهش‌یافته توسط تریپسین در دمای $^{\circ}C$ ۲۳..... ۸۷
۳-۹-۱-۱- فعالیت آنزیمی باقی‌مانده آنزیم‌های لوسیفراز بعد از تیمار با تریپسین در دمای $^{\circ}C$ ۲۳..... ۸۹
۳-۹-۲- پروتئولیز محدود آنزیم‌های لوسیفراز طبیعی و جهش‌یافته توسط تریپسین در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ ..... ۹۱
۳-۹-۲-۱- فعالیت آنزیمی باقی‌مانده آنزیم‌های لوسیفراز بعد از تیمار با تریپسین در دمای $^{\circ}C$ ۳۷..... ۹۳
۳-۹-۳- پروتئولیز محدود آنزیم‌های لوسیفراز طبیعی و جهش‌یافته در حضور کیموتریپسین..... ۹۴
۳-۹-۳-۱- فعالیت آنزیمی باقی‌مانده آنزیم‌های لوسیفراز بعد از تیمار با کیموتریپسین..... ۹۵
۳-۱۰- مقایسه پایداری لوسیفراز جهش‌یافته (R337Q) نسبت به لوسیفراز طبیعی در سلول‌های یوکاریوتی..... ۹۶
۳-۱۱- نتیجه‌گیری..... ۹۹

فصل چهارم: بحث و پیشنهادها

۴-۱-انتخاب جهش.....۱۰۴

۴-۲- تاثیر جهش‌های وارده بر ثابت‌های سینتیکی آنزیم لوسیفراز.....۱۰۵

۴-۳- طیف‌های بیولومینسانس در لوسیفراز طبیعی و جهش یافته.....۱۰۶

۴-۴- تاثیر جهش‌ها در پایداری حرارتی آنزیم‌ها.....۱۰۷

۴-۵- مطالعات ساختاری لوسیفرازهای طبیعی و جهش یافته با استفاده از فلورسانس.....۱۰۷

۴-۶- مطالعات پروتئولیز محدود (Limited Proteolysis) آنزیم‌های لوسیفرلز طبیعی و جهش-یافته.....۱۱۰

۴-۷- مطالعات پایداری لوسیفراز جهش‌یافته (R337Q) نسبت به لوسیفراز طبیعی در سلول‌های یوکاریوتی.....۱۱۲

۴-۸- نتیجه‌گیری نهایی.....۱۱۳

۴-۹- پیشنهادات.....۱۱۵

مراجع.....۱۱۶

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

۱-۱ موتیف‌های موجود در توالی اسید آمینه ی *Ppy*.....۸

۲-۱- فهرست مواد مورد استفاده.....۳۳

۲-۲- فهرست دستگاه‌های مورد استفاده.....۳۵

۳-۱- ویژگیهای سینتیکی لوسیفرازهای طبیعی و جهش یافته.....۷۸

۳-۲- ماکزیمم طول موج نشری و پهنای پیک در ناحیه ٪ ۵۰ در pH ۷/۸ و pH ۵/۵.....۸۱

۳-۳- محاسبه مقدار لوسیفراز هضم نشده بعد از تیمار با تریپسین.....۸۹

۳-۴- فعالیت آنزیمی باقی‌مانده لوسیفرازها در ۱۵ و۱۸۰ دقیقه بعد از تیمار در حضور تریپسین.....۹۰

۳-۵- محاسبه مقدار لوسیفراز هضم نشده بعد از تیمار با تریپسین.....۹۲

۳-۶- فعالیت آنزیمی باقی‌مانده لوسیفرازها در ۱ و۱۵ دقیقه بعد از تیمار در حضور تریپسین.....۹۴

۳-۷- فعالیت اندازه‌گیری شده لوسیفرازهای طبیعی و جهش‌یافته.....۹۸

۳-۸- تغییرات اعمال شده بر روی ویژگی‌های ساختاری و سینتیکی هر یک از جهش‌یافته‌ها نسبت به آنزیم لوسیفراز طبیعی.....۱۰۰

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

۱-۱- ساختار آنزیم لوسیفراز *P. pyralis*..... ۶

۱-۲- توپولوژی آنزیم لوسیفراز ۸

۱-۳- جایگاه فعال احتمالی آنزیم لوسیفراز..... ۱۱

۱-۴- ساختارD- لوسیفرین..... ۱۲

۱-۵- مکانیسم واکنش تولید نور در حشرات شب‌تاب..... ۱۴

۱-۶- نمای کلی از مراحل تصویربرداری کل بدن جاندار ۱۷

۱-۷- *Phrixotrix hirtus*: گونه نادر برزیلی که توسط لنترن‌های سری نور ساطع می‌کند..... ۱۹

۱-۸- جایگاه‌های برش در حضور تریپسین و کیموتریپسین ۲۲

۱-۹- ساختار شماتیک پروتئازوم در سلول‌های یوکاریوتی..... ۲۵

۱-۱۰- ساختار کریستاله آنزیم تریپسین و موقعیت اسیدهای آمینه درگیر در کاتالیز..... ۲۷

۱-۱۱- واسرشته‌شدن موضعی ساختارهای دوم آلفا هلیکس‌ها و صفحات بتا..... ۳۰

۲-۱- ایجاد جهش در قطعه DNA با استفاده از روش SOE-PCR..... ۳۹

۲-۲- نقشه پلاسمید pET28a ۴۵

۳-۱- مقایسه اسیدهای آمینه لوسیفراز از گونه‌های مختلف..... ۶۶

۳-۲- موقعیت اسیدهای آمینه بر روی ساختار کریستاله آنزیم..... ۶۷

۳-۳- ناقل pET16a استخراج شده در مقیاس کم (Miniprep)..... ۶۹

۳-۴- بهینه سازی شرایط PCR در حضور پرایمرهای پیشرو و معکوس..... ۶۹

۳-۵- SOE-PCR برای ورود کدون‌های مربوط به اسیدهای آمینه..... ۷۰

۳-۶- محصول PCR ژن لوسیفراز طبیعی و پلاسمید pET28a بعد از هضم..... ۷۱

۳-۷- تایید کلونی‌های حاوی ژن لوسیفرازهای جهش‌یافته با استفاده از PCR-Colony..... ۷۲

۳-۸- استخراج پلاسمیدهای حاوی ژن جهش‌یافته لوسیفراز از باکتری DH5α ۷۲
۳-۹- بخشی از کروماتوگرام مربوط به تعیین توالی نمونه Q..... ۷۳
۳-۱۰- بررسی مراحل مختلف خالص‌سازی با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA سفاروز با استفاده از SDS-PAGE..... ۷۴
۳-۱۱- نمودار درجه حرارت بهینه لوسیفرازهای طبیعی و جهش یافته ۷۵
۳ -۱۲- نمودار pH بهینه فعالیت لوسیفرازهای طبیعی و جهش یافته در pHهای مختلف..... ۷۶
۳-۱۳- محاسبه K_m لوسیفرین (LH2 K_m) و ATP K_m برای لوسیفرازهای طبیعی و جهش‌یافته..... ۷۸
۳-۱۴- نمودار پایداری حرارتی لوسیفرازهای طبیعی و جهش یافته..... ۸۰
۳-۱۵- طیف نشری آنزیم‌های لوسیفراز طبیعی و جهش یافته در pH ۷/۸ و pH ۵/۵..... ۸۱
۳-۱۶- مقایسه کاهش فعالیت آنزیم بر حسب زمان برای لوسیفرازهای طبیعی و جهش یافته‌ها..... ۸۲
۳-۱۷- طیف فلورسانس ذاتی لوسیفرازهای طبیعی و جهش یافته..... ۸۳
۳-۱۸- طیف فلورسانس ANS در حضور لوسیفرازهای طبیعی و جهش یافته..... ۸۴
۳-۱۹- نمودار Stern-Volmer لوسیفرازهای طبیعی و جهش یافته در حضور خاموش کننده آکریل آمید..... ۸۵
۳-۲۰- نمودار Stern-Volmer لوسیفرازهای طبیعی و جهش یافته در حضور خاموش کننده یدید پتاسیم..... ۸۶
۳-۲۱- پروتئولیز محدود در حضور تریپسین در دمای ۲۳ $^{\circ}C$..... ۸۸
۳-۲۲- فعالیت آنزیمی باقی‌مانده لوسیفرازها در طی پروتئولیز محدود با تریپسین در دمای $^{\circ}C$ ۲۳ ..... ۹۰
۳-۲۳- پروتئولیز محدود در حضور تریپسین در دمای ۳۷ $^{\circ}C$..... ۹۱
۳-۲۴- فعالیت آنزیمی باقی‌مانده آنزیم‌های لوسیفراز در طی پروتئولیز محدود با تریپسین در دمای **C** ۳۷ $^{\circ}$..... ۹۳

۳-۲۵- پروتئولیز محدود در حضور کیموتریپسین.....۹۵

۳-۲۶- فعالیت باقی‌مانده آنزیم‌های لوسیفراز در طی پروتئولیز محدود با کیموتریپسین در دمای $^{\circ}C$ ۲۳.....۹۶

۳-۲۷- جهش‌زایی به روش Quickchange-PCR ۹۷

۳-۲۸- مقایسه پایداری لوسیفراز طبیعی و جهش‌یافته حاصل از لیز سلولی (CHO) در دمای $\hat{C}$ ۳۷.....۹۹

فصل اول:

مقدمه

۱-۱- مقدمه

لومینسانس فرایندی است که در آن یک مولکول برانگیخته در بازگشت به سطح پایه، انرژی اضافی خود را به صورت نور آزاد می‌نماید.

منبع انرژی مورد استفاده برای ایجاد حالت برانگیخته متفاوت است به همین دلیل این پدیده به شکل‌های مختلف وجود دارد. در ترمولومینسانس (Thermoluminescence) انرژی گرمایی، در کاتدولومینسانس(Cathodoluminescence) انرژی پرتو الکترونی، در تریبولومینسانس (Triboluminescence) انرژی مکانیکی ناشی از فرایند فیزیکی مانند اصطکاک، در کمی‌لومینسانس (Chemiluminescence) انرژی حاصل از واکنش شیمیایی، در فتولومینسانس (Photoluminescence) انرژی پرتوی نورانی و در بیولومینسانس (Bioluminescence) انرژی واکنش شیمیایی حاصل از کاتالیز آنزیم لوسیفراز عامل ایجاد کننده حالت برانگیخته می‌باشند (۱).

۱-۲- بیولومینسانس

به فرایند نشر نور در سیستم‌های زنده اصطلاحاً بیولومینسانس گفته می‌شود که در دسته وسیعی از جانداران گزارش شده است. آنزیم درگیر در این فرایند با نام کلی لوسیفراز نامگذاری شده‌است. همچنین سوبسترای اصلی این آنزیم تحت نام کلی لوسیفرین می‌باشد. لوسیفراز و لوسیفرین در موجودات مختلف نشر کننده نور متفاوت می‌باشند (۲، ۳).

موجودات زنده بیولومینسانس، زیستگاه‌هایی در تمامی محیط‌های خاکی و آبی داشته و شامل باکتری‌ها، حشرات، ماهی‌ها، مرجان‌های دریایی، خرچنگ‌ها و ... می‌باشند. کارکردهای لومینسانس تنوع گسترده‌ای داشته و شامل منحرف کردن شکارچی تا بروز رفتار های جفت گیری می‌باشد (۴). در مقایسه با محیط دریایی که بیشتر رنگ بیولومینسانس مشاهده شده آبی است در محیط های خاکی رنگ بیولومینسانس مشاهده شده اغلب سبز می‌باشد. مشابه اقیانوس‌ها، بیولومینسانس در محیط‌های خاکی نیز به وسیله سیستم‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی که از لحاظ فیلوژنتیکی به هم مرتبط نیستند تولید می‌شود. به کمک آنالیزهای فیلوژنتیکی پیشنهاد شده است که سیستم های لوسیفراز-لوسیفرین دارای بیش از ۳۰ منشاء مستقل می‌باشند (۴). از بین موجودات مختلف بیولومینسانس لوسیفراز حشرات یکی از کاربردی‌ترین لوسیفرازها بوده و بعلت استفاده از آنزیم لوسیفراز گونه *Photinus pyralis* در این تحقیق ساختار و مکانیسم نشر نور و همچنین کاربردهای آن بررسی می‌شود.

۱-۳- بیولومینسانس در حشرات

معروف‌ترین جانوری که نور افشانی می‌کند حشره کوچکی موسوم به حشرهٔ شب‌تاب است که به آن به انگلیسی Firefly گفته می‌شود (۵).

مطالعه روی جنبه‌های مختلف حشرات شب‌تاب بطور جدی از قرن نوزدهم آغاز شده است. پرفسور دوبوآ سیستم لوسیفرین_ لوسیفراز را در این حشرات کشف کرد و شرط اصلی جهت نور-افشانی را در سه ماده اساسی؛ آنزیم لوسیفراز، ترکیب اکسید شدنی (لوسیفرین) و اکسیژن عنوان کرد (۶).

در سال ۱۹۱۲ W.W. Coblentz گسترهٔ طول موج نشر حشرات را از ۵۳۸ nm تا ۵۸۰ nm در گونه‌های مختلف گزارش داد (۷). لوسیفرین حشرهٔ شب‌تاب در ۱۹۴۹ توسط Mc Elroy و B.L. Strchlerجداسازی و خالص گردید. در سال ۱۹۶۱ E.H. White و همکارانش ساختمان لوسیفرین را گزارش کردند (۸). در سال ۱۹۸۹ توالی اسیدآمینه‌ای لوسیفراز چند گونه حشره کشف شد (۹). در

همین سال سینتیک و مکانیسم عمل لوسیفراز کرم شب‌تاب به سرپرستی پرفسور Ugaorva در دانشگاه مسکو شناسایی گردید (۱۰). جایگاه فعال آنزیم هنوز دقیقا مشخص نشده است (۱۱).

۱-۳-۱- گونه‌های مختلف حشرات بیولومینسانس

لومینسانس در حشرات در قاب‌بالان (Coleptora)، دوبالان (Diptera) و Collembola دیده شده است. قاب بالان بزرگترین و متنوع‌ترین موجودات نورافشان هستند. به طور کلی خانواده‌های نورافشان این گروه شامل Fireflies (Lampyridae)، Railroad worms (Phenogodidae) و Click beetles (Elateridae) می‌باشند (۱۲). در طبیعت لوسیفرازهای جدا شده از Firefly نور زرد-سبز (۵۴۰ nm-۵۸۰)، click beetles نور سبز- نارنجی و Rail road worms نور سبز و قرمز (۵۳۶ nm-۶۳۸) ساطع می‌کنند. حشره‌های شب‌تاب (Fireflies) از درخشش‌های سبز-زردی که به طور پیوسته و مداوم توسط لنترن‌های شکمی ساطع می‌شود به منظور جفت‌گیری استفاده می‌کنند (۱۳). Click beetles به هنگام راه رفتن نور سبز از ناحیه سینه‌ای- شکمی تولید می‌کنند. در حالی که هنگام پرواز از لنترن شکمی نور نارنجی- سبز ساطع می‌کنند. کرم‌های بندبند (Railroad worms) دارای وسیع‌ترین طیف رنگی می‌باشند به طوری کـــه لاروها و مـــاده‌ها در طول بدن نور سبز تا نارنجی ایجـــاد می‌کنند. به علاوه گـــونه‌های مختـلف کرم‌های بندبند امریکای شمالی در ناحیه قدامی خود نورهای سبز تا قرمز تولید می‌کنند (۱۲- ۱۶). به طور جالب توجه، نور افشانی با رنگ‌های متفاوت در محیط‌های مختلف برحسب کارکردهای زیستی متنوع تکامل یافته است و به نظر می‌رسد نورافشانی در مرحله لاروی تنها به منظور کارایی دفاعی به کار می‌رود. با این حال لارو نوعی Click beetle برزیلی از این فرایند به منظور جذب شکار استفاده می‌کند (۱۷-۱۹).

۱-۳-۲- اندامهای نشر کننده نور در قاب‌بالان

نورافشانی در قاب‌بالان به وسیله اندام‌های نوری تخصصی یافته از لحاظ بافت شناسی مشابه با بافت چربی بدن تولید می‌شود. اندام‌های تولید کننده نور شامل فوتوسیت‌های منفرد با اندازه بزرگ می‌باشند. در اکثر موارد بیولومینسانس در حشرات شب‌تاب مانند *photinus* و *photuris* به صورت