بسم الله الرحمن الرحیم

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **مهدی صادقی** دانشجوی رشته **بیوفیزیک** ورودی سال تحصیلی **۸۸** مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم زیستی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمنا نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ

آئین‌نامه 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، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلا به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **بیوفیزیک** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر بیژن رنجبر** از آن دفاع شده است.

ماده 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 اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **مهدی صادقی** دانشجوی رشته **بیوفیزیک** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم زیستی

پایان‌نامه:

دوره کارشناسي ارشد در رشته بیوفیزیک

عنوان:

بررسی ساختار و فعالیت DNAzyme محدودکننده با روش‌های بیوفیزیکی

نگارش:
مهدی صادقی

استاد راهنما:
دکتر بیژن رنجبر

شهریور ۱۳۹۰

چکیده

DNAzyme (دومولکولی[1]) برش دهنده ی DNA وابسته به یون مس (Cu^{2+}) از منحصربه فردترین DNAzymeهای شناخته شده می‌باشد که به دلیل برش اختصاصی DNA در جایگاه وابسته به توالی DNA به عنوان DNAzyme محدود کننده و همچنین به عنوان بیوسنسور برای شناسایی یون مس کاربرد داشته و از اهمیت زیادی برخوردار می باشد. برای مطالعه‌ی ساختاری آنزیم از تکنیک های اسپکتروسکوپیک شامل طیف سنجی فرابنفش، فلورسانس و دورنگ نمایی دورانی استفاده شد . برای مطالعه ی ساختاری و بررس ی میزان هیبریداسیون DNAzyme با سوبسترا از خاصیت هایپرکرومیسیتی و هیپوکرومیسیتی DNA استفاده شد. مطالعات نشان دهنده ی تأثیر پذیری هیبریداسیون از تغییرات pH و دما می باشد که در این مطالعات شرایط بهینه‌ی دمایی و pH برای هیبریداسیون تعیین شد. برای مطالعه‌ی ساختاری آنزیم و کمپلکس آن با سوبسترا از تکنیک دورنگ نمایی دورانی استفاده شد . مطالعات نشان دهنده‌ی تشکیل ساختار سه رشته ای بعد از اتصال آنزیم به سوبسترا است که این نتیجه گزارشات قبلی مبنی بر اتصال آنزیم به سوبسترا از طریق تشکیل DNA سه رشته ای را تایید می کرد. اهمیت تشکیل این ساختار در طراحی آنزیم های جدید بر پایه ی این DNAzyme می‌باشد.

کلید واژه: DNAzyme، برش DNA، طیف سنجی فرابنفش، هیبریداسیون DNA، هیپرکرومیسیتی، هیپوکرومیسیتی، طیف سنجی فلورسانس، دورنگ نمایی دورانی، ساختار DNA

[1] Bimolecular

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۱-۱ DNAzyme معرفی..... ۲

۱-۲ تاریخچه..... ۳

۱-۳ RNAهای برش دهنده‌ی DNAzyme..... ۴

۱-۴ DNAzyme برش دهنده‌ی DNA..... ۵

۱-۵ تاریخچه‌ی شناسایی DNAzyme برش دهنده‌ی DNA وابسته به مس..... ۶

۱-۶ انتخاب آزمایشگاهی..... ۶

۱-۷ انتخاب آزمایشگاهی DNAzyme برش‌دهنده‌ی DNA وابسته به مس..... ۷

۱-۸ مکانیسم اتصال DNAzume به سوبسترا..... ۹

۱-۹ مکانیسم برش DNA توسط DNAzyme ۹

۱-۱۰ مکانیسم برش DNAzyme محدودکننده‌ی DNA وابسته به مس..... ۱۰

۱-۱۱ ساختار DNAzyme محدود کننده‌ی DNA..... ۱۲

۱-۱۲ برش هدفمند تحدیدی DNA با DNAzyme..... ۱۴

۱-۱۳ مزیت DNAzymeها نسبت به سایر بیوکاتالیست‌ها..... ۱۵

۱-۱۳-۱ DNAzymeها در برابر ریبوزیم ۱۵

۱-۱۳-۲ مزیت DNAzyme در برابر پروتئین‌ها..... ۱۶

۱-۱۴ محدودیت‌های DNAzyme محدود کننده..... ۱۶

۱-۱۴-۱ محدودیت در برش توالی..... ۱۶

۱-۱۴-۲ محدودیت در برش DNA دو رشته‌ای..... ۱۷
۱-۱۴-۳ مکانیسم اکسیداتیو آنزیم..... ۱۷
۱-۱۵ کاربردها..... ۱۸
۱-۱۶ آینده و استعدادهای DNAzyme برش دهنده‌ی DNA ۲۰
۱-۱۷ سطوح ساختاری..... ۲۲
۱-۱۸ ساختار DNAzymeها..... ۲۲
۱-۱۹ ضرورت تحقیق..... ۲۴

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد مورد استفاده در پایان نامه..... ۲۷
۲-۲ دستگاه‌های مورد استفاده ۲۸
۲-۳ آماده سازی نمونه‌های DNAzyme و سوبسترا..... ۲۹
۲-۴ تعیین غلظت DNAzyme و سوبسترا..... ۲۹
۲-۵ تایید وزن DNAzyme و سوبسترا به وسیله ۱۵٪ D-PAGE..... ۳۰
۲-۶ D-PAGE..... ۳۱
۲-۶-۱ بافرها و محلول‌های مورد نیاز D-PAGE..... ۳۱
۲-۶-۲ روش آماده سازی نمونه برای بردن روی ژل..... ۳۲
۲-۶-۳ رنگ‌آمیزی ژل..... ۳۳
۲-۷ هیبریداسیون DNAzyme و سوبسترا..... ۳۳

۲-۷-۱ بافر هیبریداسیون.....۳۳

۲-۷-۲ شرایط دمایی مورد نیاز برای هیبریداسیون.....۳۴

۲-۷-۳ تعیین استوکیومتری هیبریداسیون آنزیم سوبسترا با استفاده از روش Continuous fraction method (Job Plot).....۳۴

۲-۷-۴ هیبریداسیون DNAzyme و سوبسترا در محدوده‌ی pH ۶-۸ به وسیله‌ی طیف سنجی فرابنفش ۳۴

۲-۷-۵ هیبریداسیون DNAzyme و سوبسترا تحت تیمارهای دمایی مختلف به وسیله ی طیف سنجی فرابنفش.....۳۵

۲-۷-۶ هیبریداسیون DNAzyme و سوبسترا تحت شرایط بهینه سازی شده روی Natural PAGE۱۵٪ ۳۶

۲-۸ واکنش آنزیمی برش سوبسترا.....۳۸

۲-۸-۱ شرایط بافری برای انجام واکنش.....۳۸

۲-۸-۲ شناسایی محصول واکنش روی ژل D-PAGE ۱۵٪.....۳۸

۲-۸-۳ بررسی عملکردآنزیم در محدوده‌ی pH ۶-۸ به وسیله‌ی طیف سنجی فرابنفش.....۳۹

۲-۸-۴ بررسی عملکرد آنزیم در غلظت‌های مختلف مس به وسیله‌ی طیف سنجی فرابنفش.....۴۰

۲-۹ طیف سنجی فرابنفش نمونه‌ها.....۴۰

۲-۱۰ مطالعه‌ی طیف فرابنفش DNAzyme در حضور DNA تک رشته‌ای شاهد ۲۰ نوکلئوتیدی در غیاب و حضور مس به عنوان شاهد.....۴۱

۲-۱۱ مطالعه ساختاری DNAzyme و کمپلکس DNAzyme-Substra به وسیله‌ی تکنیک فلورسانس خارجی DNA با پروب سایبر گولد.....۴۱

۲-۱۱-۱ آماده سازی نمونه.....۴۱

۲-۱۱-۲ تاثیر pH بر فلورسانس خارجی DNAzyme و کمپلکس آن با سوبسترا در حضور و عدم حضور مس ۴۲

۲-۱۱-۳ مطالعه‌ی فلورسانس خارجی DNAzyme در حضور DNA تک رشته‌ای شاهد ۲۰ نوکلئوتیدی در حضور و عدم حضور مس.....۴۳

۲-۱۲ آماده سازی نمونه‌ها برای طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی.....۴۳

فصل سوم: نتایج

۳-۱ تایید وزنی DNAzyme و سوبسترا.....۴۶

۳-۲ Continuous Fraction method (Job plot) ۴۷

۳-۳ نتیجه‌ی هیبریداسیون DNAzyme و سوبسترا تحت تیمارهای دمایی مختلف به وسیله‌ی طیف سنجی فرابنفش.....۴۹

۳-۴ نتیجه‌ی هیبریداسیون DNAzyme و سوبسترا در محدوده‌ی pH ۶-۸ به وسیله‌ی طیف سنجی فرابنفش ۵۱

۳-۵ نتیجه‌ی هیبریداسیون DNAzyme و سوبسترا تحت شرایط بهینه سازی شده روی Natural PAGE۱۵٪ ۵۳

۳-۶ نتیجه‌ی شناسایی محصول واکنش برش سوبسترا روی ژل۱۵% D-PAGE ۵۵

۳-۷ نتیجه‌ی بررسی عملکرد آنزیم در محدوده‌ی pH ۶-۸ به وسیله‌ی طیف سنجی فرابنفش..... ۵۸

۳-۸ نتیجه‌ی بررسی عملکرد آنزیم در غلظت‌های مختلف مس به وسیله‌ی طیف سنجی فرابنفش..... ۶۰

۳-۹ نتیجه‌ی مطالعه ی طیف فرابنفش DNAzyme در حضور DNA تک رشته‌ای شاهد ۲۰ نوکلئوتیدی در غیاب و حضور مس به عنوان شاهد..... ۶۲

۳-۱۰ نتیجه‌ی آزمایش شاهد تاثیر مس روی DNA شاهد ۶۳

۳-۱۱ نتیجه‌ی مطالعه ی ساختاری DNAzyme و کمپلکس DNAzyme-Substra به وسیله ی تکنیک فلورسانس خارجی DNA با پروب سایبر گولد..... ۶۴

۳-۱۲ مطالعه‌ی تاثیر افزایش مس روی کمپلکس DNAzyme-Sybstra بر روی فلورسانس خارجی..... ۶۶

۳-۱۳ نتیجه‌ی بررسی تاثیر pH بر هیبریداسیون DNAzyme و سوبسترا توسط تکنیک فلورسانس..... ۶۸

۳-۱۴ نتیجه‌ی بررسی تاثیر pH بر فعالیت کاتالیتیکی DNAzyme توسط تکنیک فلورسانس..... ۷۰

۳-۱۵ نتایج فلورسانس خارجی DNAzyme با الیگونوکلئوتید شاهد در حضور و عدم حضور مس..... ۷۱

۳-۱۶-۱ نتایج آزمایشات مربوط به دورنگ نمایی دورانی..... ۷۳

۳-۱۶-۲ نتایج طیف گیری CD مربوط به کمپلکس DNAzyme-Substra..... ۷۴

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱ هیبریداسیون آنزیم سوبسترا.....۷۸

۴-۱-۱ نتیجه‌ی مطالعات هیبریداسیون DNAzyme با سوبسترا با استفاده از تکنیک طیف سنجی فرابنفش

.....۷۸

۴-۱-۲ مطالعات هیبریداسیون DNAzyme با تکنیک فلورسانس خارجی با پروب سایبرگولد.....۸۲

۴-۱-۳ مطالعه‌ی هیبریداسیون آنزیم و سوبستراروی ژل ۱۵٪ Natural PAGE.....۸۳

۴-۲مطالعات فرایند کاتالیتیکی DNAzyme.....۸۴

۴-۲-۱ مشاهده‌ی محصول برش DNA روی ژل ۱۵٪ D-PAGE.....۸۴

۴-۲-۲ مطالعه‌ی فرایند کاتالیتیکی DNAzyme با تکنیک طیف سنجی فرابنفش.....۸۶

۴-۲-۳ نتایج مطالعه‌ی فعالیت کاتالیتیکی DNAzyme با تکنیک فلورسانس خارجی.....۹۰

۴-۳ مطالعه‌ی ساختاری DNAzyme با تکنیک دورنگ نمایی دورانی (CD).....۹۲

پیشنهادات.....۹۸

مراجع.....۹۹

فهرست علائم و نشانه‌ها

D DNAzyme.....

S Substrate.....

DS کمپلکس DNAzyme و سوبسترا.....

Dnzy DNAzyme.....

فهرست جداول

جدول۱-۲ مشخصات مواد مورد استفاده در پایان نامه..... ۳۰

جدول ۲-۲ نام و مشخصات دستگاه‌های مورد استفاده..... ۳۱

جدول ۳-۱ داده‌های آزمایش Job plot..... ۵۳

فهرست نمودارها و عکس‌ها

شکل ۱-۱ شکل شماتیک انتخاب آزمایشگاهی..... ۸

شکل ۱-۲ مکانیسم اکسیداتیو DNAzyme برش دهنده‌ی DNA..... ۱۱

شکل ۱-۳ ساختار DNAzyme تک مولکولی و دومولکولی و جایگاه برش سوبسترا..... ۱۴

شکل ۱-۴ شکل شماتیک مکانیسم بیوسنسورهای ساخته شده از DNAzyme برش دهنده‌یِ DNA

..... ۲۰

شکل ۲-۱ شکل شماتیک از دستگاه DSC..... ۴۸

شکل ۲-۲ طیف معمول DSC..... ۴۸

عکس ۳-۱ عکس ٪۱۵ D-PAGE..... ۵۰

نمودار ۳-۱ جذب نمونه‌های هیبرید در نسبت‌های مولی مختلف.....۵۲

نمودار۳-۲ جذب نمونه های تیمار شده در دماهای مختلف در ۲۶۰ نانومتر.....۵۴

نمودار ۳-۳ جذب نمونه‌های هیبرید شده در محدوده‌ی pH ۶/۰-۸/۰.....۵۶

عکس ۳-۲ Natural PAGE ۱۵% مربوط به هیبریداسیون آنزیم سوبسترا.....۵۸

عکس ۳-۳ ٪۱۵ D-PAGE فعالیت کاتالیتیکی آنزیم.....۶۰

عکس ۳-۴ ٪۱۵ D-PAGE بررسی عملکرد DNAzyme روی الیگونوکلئوتید شاهد P۱ ۲۰ نوکلئوتیدی.....۶۱

عکس ۳-۵ ٪۱۵D-PAGE تست شاهد برای بررسی اثر مس روی سوبسترا و DNAzyme ۶۱

نمودار ۳-۴ جذب نمونه‌ها در محدوده‌ی pH ۶/۰-۸/۰.....۶۳

نمودار ۳-۵ جذب نمونه‌ها در ۲۶۰ نانومتر در حضور غلظت‌های مختلف مس.....۶۵

نمودار ۳-۶ جذب نمونه‌های شاهد در ۲۶۰ نانومتر.....۶۶

نمودار ۳-۷ جذب نمونه‌های شاهد در حضور مس.....۶۷

نمودار ۳-۸ طیف فلورسانس DNAzyme و کمپلکس DNAzyme-سوبسترا (D+S).....۶۹

نمودار۳-۹ نمودار مربوط به طیف فلورسانس خارجی DNAzyme و کمپلکس آن با سوبسترا در

حضور و عدم حضور مس.....۷۱

نمودار ۳-۱۰ نمودار تغییرات شدت فلورسانس خارجی کمپلکس آنزیم سوبسترا در محدوده‌ی pH ۶/۰-۸/۰.....۷۳

نمودار ۳-۱۱ تغییرات فلورسانس خارجی بعد از افزایش مس به کمپلکس آنزیم سوبسترا.....۷۴

نمودار ۳-۱۲ فلورسانس خارجی DNAzyme در حضور الیگونوکلئوتید شاهد در حضور و عدم حضور مس.....۷۶

نمودار ۳-۱۳ طیف دورنگ نمایی دورانی DNAzyme در محدوده‌ی فرابنفش دور.....۷۷

نمودار ۳-۱۴ طیف CD ناحیه‌ی فرابنفش دور کمپلکس DNAzyme و سوبسترا.....۷۹

فصل اول

مقدمه

۱-۱ معرفی DNAzyme

DNA در فرم تک رشته‌ای می‌تواند ساختارهای متفاوت سه بعدی داشته باشد که بر همین اساس می-تواند نقش‌های متفاوتی به جز ذخیره‌ی اطلاعات که در طبیعت ایفا می‌کند، را به عهده بگیرد؛ مثل نقش‌های آنزیمی و رسپتوری.

DNAهایی که خاصیت آنزیمی از خود نشان می‌دهند را DNAzyme یا Deoxyribozyme می‌نامند. DNAzymeها واکنش‌های مختلفی را کاتالیز می‌کنندکه به عنوان مثال می‌توان به موارد زیر اشاره نمود، برش تک رشته‌ی RNA [۱]، برش تک رشته‌ی DNA [۲, ۳] ، اتصال دو انتهای RNA [۴] و DNA [۵, ۶]، فسفریلاسیون [۷-۹]، آدنیلاسیون، تشکیل پیوند نوکلئوپپتیدی [۱۰]، تشکیل پیوند کربن-کربن [۱۱] و فعالیت پراکسیدازی [۱۲].

یکی از عمده‌ترین فعالیت‌های دیده شده از آنزیم‌های دئوکسی ریبواسیدنوکلئیکی (DNAzyme) فعالیت برش اختصاصی اسیدهای نوکلئیک می‌باشد. در این میان انواع مختلفی از DNAzymeهای برش‌دهنده‌ی RNA شناسایی و جداسازی شده‌است ولی در کل دو نوع از DNAzymeهای برش دهنده‌ی DNA شناسایی و جداسازی شده است. یک نوع از آنها دارای فعالیت بتاگلیکوزیدازی می‌باشد و با دپوریناسیون رشته‌ی DNA باعث برش مولکول DNA می‌شود [۱۳].در حالی که نوع دیگر با مکانیسم اکسیداتیو باعث برش رشته‌ی DNA در جایگاه اختصاصی می‌شود، این آنزیم که با مکانیسم متفاوتی از آنزیم‌های پروتئینی عمل می‌کند، یک رقیب جدی برای آنزیم‌های محدودکننده‌ی پروتئینی می‌باشد [۲, ۱۴, ۱۵] .

این آنزیم علاوه بر نقش یاد شده می‌تواند به عنوان یک نانوبیوسنسور برای شناسایی عنصر مس در محیط مایی نیز بکار رود [۱۶-۱۸] . با توجه به اینکه این آنزیم سوبسترایی از جنس DNA دارد، می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی برای DNAzymeهای برش دهنده‌ی RNA که در تکنیک‌های نانوبیوتکنولوژی مورد استفاده هستند، باشد.

۱-۲ تاریخچه

پیدایش ریبوزیم‌ها در ۱۹۸۰ نشان داد که اسیدهای نوکلیک در پشت پرده‌ی ذخیره سازی اطلاعات ژنتیکی نقش‌های دیگری مثل نقش آنزیمی نیز می‌توانند داشته باشند [۱۹, ۲۰]، ریبوزیم‌های مصنوعی با استفاده از تکنیک انتخاب آزمایشگاهی[۱] از میان تعداد زیادی توالی تصادفی جدا می‌شوند [۲۱-۲۳]. به صورت مشابه اولین گزارش از DNAها با فعالیت آنزیمی یعنی DNAzyme یا Deoxyribozyme اولین بار توسط Breaker و Joyce گزارش شد [۲۴]. وی نشان داد DNA در ورای مرز سلول‌ها در شکل تک زنجیره‌ای خود می‌تواند هم نقش شناسایی مولکولی و هم نقش کاتالیتیکی را به عهده بگیرد [۲۵-۲۷] . یعنی نقش‌هایی که تاکنون تنها برای ماکرومولکول‌هایی ساخته‌شده از جنس پروتئین و RNA متصور بوده‌است. برای مثال تعدادی از اپتامرهای DNA [۲۸] به عنوان لیگاند متصل شونده به پروتئین‌ها و مولکول‌های آلی مختلف شناسایی شده‌اند و پاره‌ی دیگر از DNAهای تک‌رشته‌ای به عنوان آنزیم‌های سنتتیک عمل می‌نمایند. برای جداسازی این مولکول‌ها از روش انتخاب آزمایشگاهی استفاده می‌شود.

[۱] *In vitro* selection

۳-۱ DNAzyme های برش دهنده‌ی RNA

اولین واکنشی که برای فعالیت کاتالیتیکی DNAzymeها گزارش شد عمل برش اختصاصی RNA بود، که این سری از DNAzymeها قادر بودند RNA را در جایگاه اختصاصی برش دهند. چون این DNAzymeها دارای طول‌های کوتاه و ساختار ساده‌ای بودند به همین دلیل بیشترین مطالعه و شناخت روی همین کلاس DNAzymeها می‌باشد.

عمل برش در مولکول RNA معمولا با حمله‌ی نوکلئوفیلی به پیوند فسفودی استر توسط هیدروکسیل ۲’ مجاور پیوند فسفودی استر کلید می‌خورد که با ایجاد مشتق فسفات۳’-۲’حلقوی منجر به شکسته شدن مولکول RNA می‌شود، معمولا DNAzymeها همین مکانیسم را برای برش RNA دارند و با تسریع این مکانیسم در جایگاه فعال خود باعث برش رشته‌ی RNA در جایگاه فعال می‌شود [۲۹, ۳۰].

از معمول‌ترین و شناخته شده ترین DNAzymeهایی که توانایی برش RNA را دارند می‌توان به DNAzymeهای ۱۷-۸ و ۲۳-۱۰ اشاره کرد. این آنزیم‌ها از آن رو دارای اهمیت می‌باشند که دارای ساده‌ترین جایگاه برش RNA هستند و برای برش هر نوع RNA می‌توان از آن‌ها استفاده نمود [۳۱, ۳۲]. هر دوی این آنزیم‌ها برای فعالیت کاتالیتکی خود نیازمند کاتیون دو ظرفیتی مثل منیزیم می‌باشند. برخی DNAzymeهای برنده‌ی RNA وجود دارند که نیازی به کاتیون به عنوان کوفاکتور برای انجام فعالیت کاتالیتیکی ندارند [۳۳, ۳۴] و در برخی آنزیم‌ها از اسیدآمینه‌هایی مانند هیستیدین به عنوان کوفاکتور مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳۵, ۳۶].

۴-۱ DNAzyme برش دهنده‌ی DNA

نبود گروه OH ’۲ در مولکول DNA آن را $۱۰^{۵}$ برابر در مقابل هیدرولیز نسبت به RNA مقاوم‌تر می‌کند. سرعت هیدرولیز غیر کاتالیز شده‌ی DNA در شرایط طبیعی، یعنی pH طبیعی و دمای$۲۵^{o}C$، $۱۰^{-۱۲}$ $min^{-۱}$ می‌باشد [۳۷]. از این رو DNA نسبت به RNA بسیار پایدار می‌باشد که فرایند کاتالیتیکی برش DNA نسبت به RNA را پیچیده‌تر می‌کند.

DNAzymeهایی که برای شکستن پیوند فسفودی‌استر در DNA استفاده شده‌اند، از نظر قرار دادن آب در جایگاه فعال خود به گونه‌ای که با حمله‌ی نوکلئوفیلی بتواند پیوند فسفودی‌استر را در مولکول DNA بشکند بایستی طراحی بسیار پیشرفته‌تری نسبت به DNAzymeهای برش دهنده‌ی RNA داشته باشند، تا بتواند عمل هیدرولیز را برای مولکول DNA انجام دهند، مانند آنچه که در مورد آنزیم‌های پروتئینی نوکلئاز مشاهده می‌شود، این آنزیم‌ها از چند مکانیسم کاتالیتیکی به صورت همزمان استفاده می‌کند تا عمل کاتالیتیکی را به انجام برسانند.

روش‌های انتخاب متداول که از استخر توالی تصادفی[۲] DNA برای پیدا کردن DNAzyme با خاصیت برش DNA با مکانیسم هیدرولیز استفاده می‌کند، کارامد به نظر نمی‌رسند و همانطور که از این پیش-بینی نیز مشخص است، DNAzyme که خاصیت برش DNA با مکانیسم هیدرولیز را داشته باشد تاکنون شناسایی نشده است.

مکانیسم جایگزین برای مکانیسم هیدرولیز، مکانیسم اکسیداتیو می‌باشد که از رادیکالهای آزاد برای عمل برش زنی استفاده می‌کند [۳۸]. تفاوتی که بین هیدرولیز و روش اکسیداتیو وجود دارد و به خصوص برای شرایط داخل سلول بسیار مهم می‌باشد این است که در هیدرولیز، از آب به عنوان یک عامل شیمیایی

[۲] Random sequence pool

استفاده می‌شود که برای سلول غیر سمی بوده و بسیار انتخابی عمل می‌کند در حالی که در روش اکسیداتیو از رادیکال‌های آزاد که برای سلول سمی هستند و علاوه بر DNA می‌توانند پروتئین و لیپید را نیز مورد حمله قرار دهند استفاده، می‌شود.

۱-۵ تاریخچه‌ی شناسایی DNAzyme برش دهنده‌ی DNA وابسته به مس

DNAzyme برش دهنده‌ی DNA وابسته به مس توسط R. R. Breaker گزارش شد ، او این آنزیم را با استفاده از روش انتخاب آزمایشگاهی از داخل یک استخر از توالی‌های تصادفی[۳] جداسازی و شناسایی کرده بود [۱۵]. او در گزارش خود دو کلاس از این آنزیم را معرفی کرده بود. کلاسI برای فعالیت خود علاوه بر کوفاکتور مس نیاز به یک عامل احیاکننده‌ی دیگر نیز دارد ولی کلاسII برای عملکرد آنزیمی خود به عامل احیا کننده نیاز ندارد و تنها از مس برای فعالیت خود استفاده می‌کند.

۱-۶ انتخاب آزمایشگاهی[۴]

باتوجه به آنچه که دانشمندان شیمی آلی با آن آشنا هستند و با نام شیمی ترکیبی شناخته می‌شود، از غربالگری[۵] برای جداسازی ترکیبات آلی مختلف مثل داروها و سنسورها استفاده می‌شود. هر کدام از این ترکیبات یک به یک جدا شده و فعالیت هرکدام به صورت جداگانه سنجیده می‌شود تا مولکول مورد نظر شناسایی شود. البته این روش در مورد شناسایی اسیدهای نوکلئیک با فعالیت کاتالیتیک غیر ممکن به نظر می‌رسد، چون یک آزمایشگاه مفید و کارآمد برای این کار ابعاد خیلی بزرگ، امکانات فراوان و همچنین زمان و نیروی انسانی زیادی می‌طلبد. به همین علت روش جایگزینی که برای جداسازی و

---

[۳] Random sequence pool

[۴] *In vitro* selection

[۵] Screening