بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

همسانه‌سازی و انتقال ژن لوسیفراز حشره شبتاب

(*Lampyris turkestanicus*) به گیاه توتون (*Nicotiana tobacum*)

نگارش:

بابک لطیف

استاد راهنما:

دکتر مختار جلالی جواران

استاد مشاور:

دکتر حمید رجبی معماری

۱۳۸۸

همسانه‌سازی و انتقال ژن لوسیفراز حشره شبتاب (*Lampyris turkestanicus*) به گیاه توتون (*Nicotiana tobacum*)

چکیده:

" کشاورزی مولکولی" به تولید پروتئین‌های دارویی و آنزیم‌های صنعتی ارزشمند در گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک اطلاق می‌شود. آنزیم لوسیفراز حشره شبتاب یکی از مهمترین آنزیم‌های صنعتی است که به طور وسیعی در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی و بیولوژی سلولی و مولکولی بویژه در تشخیص میزان ATP به منظور تشخیص آلودگی‌های میکروبی، تهیه کیت‌های تشخیص سرطان، غربالگری داروها، زیست‌حسگرها، همچنین در بررسی روابط برهمکنشی و تاخوردگی پروتئین‌ها، سنجش‌های آنزیمی و توالی‌یابی DNA (Pyrosequencing) استفاده می‌شود. ژن لوسیفراز نیز به عنوان ژن گزارشگر ایده‌آل در مهندسی ژنتیک به منظور بهینه‌سازی سیستم انتقال ژن، کاربرد فراوان دارد. تحقیق حاضر جهت انتقال ژن لوسیفراز حشره شبتاب گونه ایرانی *Lampyris turkestanicus* و تولید آن در گیاه توتون انجام گرفت.

در این تحقیق، ژن لوسیفراز حشره شبتاب (luc) به کمک باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سوش *LBA4404* به گیاه توتون کولتیوار *Xanthi* منتقل شد. آغازگرهای مناسب با توجه به توالی‌های انتهای ´۳ و ´۵ ژن لوسیفراز، محل‌های برشی *NcoI* و *BstEII* و توالی افزایش‌دهنده سیستم بیان گیاهی (Kozak sequence) طراحی شدند. ژن مورد نظر به کمک PCR با آغازگرهای اختصاصی جداسازی و پس از عملیات هضم آنزیمی و اتصال (Ligation)، در ناقل بیانی pCAMBIA1304 همسانه‌سازی شد. به منظور اطمینان از همسانه‌سازی ژن مذکور، سازه تهیه‌شده با استفاده از تکنیک‌های مختلف مانند Colony PCR، PCR ، هضم آنزیمی، توالی‌یابی و همردیف‌سازی آن در بانک اطلاعاتی (GenBank)، مورد تایید قرار گرفت. سپس سازه تهیه‌شده توسط روش ذوب و انجماد به باکتری آگروباکتریوم منتقل شد. جهت آلوده‌سازی گیاهان توتون، از ریزنمونه‌های برگی استفاده شد. ریزنمونه‌های تلقیح‌شده توسط آگروباکتریوم، به محیط‌های کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین و سفوتاکسیم منتقل شدند. گیاهچه‌های باززایی‌شده بر روی محیط کشت انتخابی، جداسازی و به محیط کشت ریشه‌زایی انتقال یافتند. گیاهچه‌ها پس از ریشه‌دار شدن، ابتدا به گلدان حاوی پرلایت و در نهایت به خاک منتقل شدند. بررسی مولکولی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، بر روی DNA ژنومی استخراج‌شده از گیاهان باززایی شده، تراریخت بودن آنها را تایید نمود. از گیاهان شاهد غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی PCR استفاده گردید.

واژه‌های کلیدی: لوسیفراز حشره شبتاب، همسانه‌سازی، انتقال ژن، آگروباکتریوم، توتون، کشاورزی مولکولی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول (مقدمه و بررسی منابع) ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- بیولومینسانس ۳

۱-۳- نورافشانی حشره شبتاب ..... Error! Bookmark not defined.

۱-۴- لوسیفراز حشره شبتاب ..... Error! Bookmark not defined.

۱-۵- D- لوسیفرین ۶

۱-۶- مکانیزم تولید نور ۷

۱-۷- کاربردهای لوسیفراز و بیولومینسانس ۸

۱-۷-۱- سنجش ATP توسط لوسیفراز ۸

۱-۷-۲- اندازه‌گیری باکتری‌ها و سلول‌ها ۸

۱-۷-۳- اندازه‌گیری آنزیم‌ها ۹

۱-۷-۴- استفاده از لوسیفراز حشره شبتاب در تکنیک Pyrosequencing ۹

۱-۷-۵- گزارشگرهای زیستی ۱۰

۱-۷-۶- کاربرد لوسیفراز در تکنیک‌های سنجش ایمنی ۱۱

۱-۷-۷- کاربرد لوسیفراز در بررسی اتصال گیرنده- لیگاند ۱۱

۱-۷-۷-۱- روش BRET ۱۱

۱-۷-۷-۲- روش سنجش آلفا ۱۲

۱-۷-۸- کاربرد بیولومینسانس در غربالگری داروها ۱۲

۱-۷-۸-۱- آزمون‌های آزمایشگاهی ۱۳

۱-۷-۸-۱-الف- سنجش فاقد سلول ۱۳

۱-۷-۸-۱-ب- سنجش مبتنی بر سلول ۱۳

۱-۷-۸-۲- آزمون‌های حیاتی ۱۴

۱-۷-۹- تکنولوژی ژن گزارشگر ۱۵

۱-۸- انتقال ژن ۱۹

۱-۸-۱- انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم ۲۰

۱-۸-۱-۱- اساس مولکولی انتقال ژن به وسیله آگروباکتریوم ۲۲

۱-۸-۱-۲- مزایا و معایب انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم ۲۶

۱-۸-۱-۳- روش‌های تراریختی با استفاده از آگروباکتریوم ۲۷

۱-۸-۱-۳-۱- آلوده‌سازی گیاهان زخمی ۲۸

۱-۸-۱-۳-۲- کشت توأم ۲۸

۱-۸-۱-۳-۳- روشس دیسک برگی ۲۸

۱-۸-۲- ناقلین جفتی یا دوتایی ۲۹

۱-۸-۲-۱- ناقلین pCAMBIA ۳۰
۱-۸-۳- پیشبرنده و توالی تنظیم‌کننده DNA ۳۱
۱-۹- استفاده از توتون در تحقیقات ژنتیک و بیوتکنولوژی ۳۲
۱-۹-۱- مشخصات گیاه‌شناسی توتون ۳۳
۱-۱۰- سابقه تحقیقات در زمینه لوسیفراز و بیولومینسانس ۳۴
فصل دوم (مواد و روش‌ها) ۳۸
۲-۱- مواد شیمیایی ۳۹
۲-۲- باکتری‌ها ۳۹
۲-۳- ناقل‌ها ۳۹
۲-۴- محیط‌های کشت ۴۰
۲-۴-۱- محیط کشت باکتریایی LB ۴۰
۲-۴-۱-۱- تهیه ذخیره مادری از باکتری ۴۱
۲-۴-۲- محیط کشت گیاهی MS ۴۱
۲-۴-۲-۱- تهیه محیط کشت MS کامل ۴۲
۲-۴-۲-۲- نحوه تهیه محلول ذخیره‌ای اکسین و سیتوکینین ۴۳
۲-۵- آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده ۴۳
۲-۶- استخراج پلاسمید به روش Mini-Preparation ۴۵
۲-۷- اندازه‌گیری کمّیت و کیفیت DNA ۴۸
۲-۸- الکتروفورز ژل آگارز ۴۸
۲-۸-۱- تهیه بافر TBE (۱۰X) ۴۹
۲-۸-۲- تهیه ژل آگارز ۱٪ ۴۹
۲-۸-۳- تهیه بافر نمونه‌گذاری ۴۹
۲-۸-۴- تهیه محلول اتیدیوم بروماید ۵۰
۲-۹- آغازگرها ۵۰
۲-۱۰- تکثیر قطعه DNA به روش PCR ۵۲
۲-۱۰-۱- دما ۵۳
۲-۱۰-۱-۱- دمای واسرشتگی DNA ۵۳
۲-۱۰-۱-۲- دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۵۳
۲-۱۰-۱-۳- دمای طویل شدن زنجیره DNA ۵۳
۲-۱۰-۲- آنزیم‌های پلیمریزاسیون ۵۳
۲-۱۰-۲-۱- آنزیم *Taq* DNA Polymerase ۵۳
۲-۱۰-۲-۲- آنزیم pfu پلیمراز ۵۴
۲-۱۰-۳- غلظت آغازگرها ۵۴
۲-۱۰-۴- دی‌اکسی نوکلووزید تری فسفات (dNTP) ۵۴
۲-۱۰-۵- یون منیزیوم (Mg^{2+}) ۵۴
۲-۱۰-۶- بافر PCR ۵۵
۲-۱۰-۷- غلظت DNA الگو ۵۵

۲-۱۰-۸- تعداد دور واکنش ۵۵
۲-۱۱- استخراج DNA از ژل ۵۵
۲-۱۲- کلون نمودن ژن luc در پلاسمید pCAMBIA1304 ۵۶
۲-۱۲-۱- هضم آنزیمی ناقل PCAMBIA1304 ۵۷
۲-۱۲-۲- هضم آنزیمی محصول PCR ژن luc ۵۸
۲-۱۲-۳- تهیه مخلوط اتصال ۵۸
۲-۱۳- تهیه سلول‌های مستعد ۵۹
۲-۱۴- انتقال ناقل حاوی ژن لوسیفراز به باکتری *E. cloi* ۶۱
۲-۱۵- تایید سازه‌های تهیه شده حاوی ژن لوسیفراز ۶۲
۲-۱۶- انتقال ناقلpCAMBIA1304 حامل ژن لوسیفراز به آگروباکتریوم ۶۲
۲-۱۶-۱- اثبات وجود سازه در آگروباکتریوم با استفاده از تکنیک Colony PCR ۶۳
۲-۱۷- گیاهان توتون ۶۴
۲-۱۷-۱- کاشت بذور توتون ۶۴
۲-۱۷-۲- زیرکشت گیاهان توتون ۶۴
۲-۱۸- تراریخت نمودن توتون با استفاده از آگروباکتریوم ۶۵
۲-۱۹- استخراج DNA ژنومی گیاه توتون ۶۶
۲-۲۰- آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA ۶۸
فصل سوم (نتایج و بحث) ۶۹
۳-۱- آزمون DNA ژنومی ۷۰
۳-۲- طراحی آغازگرها ۷۰
۳-۳- بهینه‌سازی شرایط PCR برای جداسازی ژن لوسیفراز ۷۳
۳-۴- تکثیر و جداسازی ژن لوسیفراز ۷۵
۳-۵- تخلیص ناقل pCAMBIA1304 ۷۶
۳-۶- کلون کردن قطعه DNA (luc) در ناقل pCAMBIA1304 ۷۶
۳-۷- تایید همسانه‌سازی ژن luc در ناقل pCAMBIA1304 ۷۸
۳-۸- انتقال ژن luc به گیاه توتون ۸۳
۳-۸-۱- آلوده‌سازی ریزنمونه‌های توتون با آگروباکتریوم حاوی ژن luc ۸۴
۳-۸-۲- انتقال جوانه‌های رشدیافته به محیط نوساقه‌زایی ۸۴
۳-۸-۳- انتقال گیاهچه‌های باززایی‌شده به محیط ریشه‌زایی ۸۵
۳-۸-۴- انتقال گیاهان تراریخت به خاک ۸۶
۳-۹- بررسی گیاهان تراریخت احتمالی با استفاده از تکنیک PCR ۸۷
۳-۱۰- بحث ۸۷
۳-۱۱- پیشنهادات ۹۴
منابع ۹۶

فهرست جداول

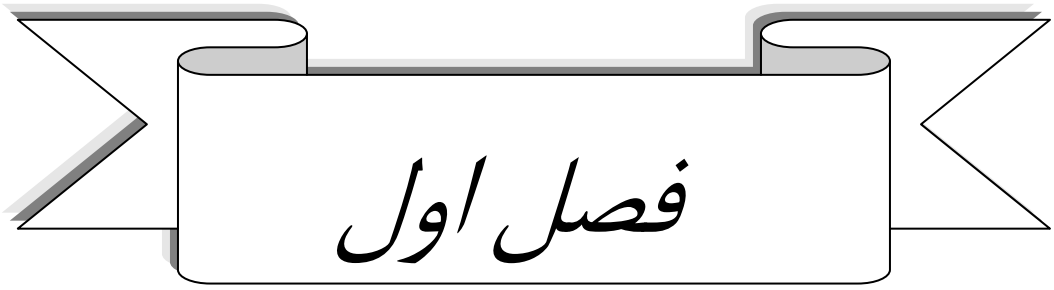
عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- مقایسه لوسیفراز با برخی از ژن‌های گزارشگر متداول ۱۷
جدول ۱-۲- مقایسه ژن‌های گزارشگر مورد استفاده در تولید گیاهان تراریخت ۱۸
جدول ۲-۱- مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت MS و غلظت آنها ۴۲
جدول ۲-۲- غلظت آنتی‌بیوتیک‌های مورد نیاز در محیط‌های کشت ۴۴
جدول ۲-۳- ترکیبات محلول بافر I استخراج پلاسمید و مقدار آنها ۴۵
جدول ۲-۴- ترکیبات محلول بافر II استخراج پلاسمید و مقدار آنها ۴۵
جدول ۲-۵- ترکیبات محلول بافر III استخراج پلاسمید و مقدار آنها ۴۶
جدول ۲-۶- ترکیبات بافر TBE (۱۰X) و مقدار آنها ۴۹
جدول ۲-۷- مواد تشکیل‌دهنده بافر نمونه‌گذاری و غلظت آنها ۵۰
جدول ۲-۸- مواد واکنش هضم آنزیمی ناقل pCAMBI1304 ۵۷
جدول ۲-۹- مواد واکنش هضم آنزیمی محصول PCR ژن luc ۵۸
جدول ۲-۱۰- مواد واکنش اتصال ناقل pCAMBIA1304 و ژن luc ۵۹
جدول ۲-۱۱- مقدار ترکیبات مورد نیاز برای تهیه بافر استخراج CTAB، بافر شستشو و بافر TE ۶۱
جدول ۳-۱- برنامه PCR برای جداسازی ژن luc ۷۴

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- ساختار حاصل از کریستالوگرافی لوسیفراز *P. pyralis* ۵
شکل ۱-۲- ساختار D- لوسیفرین در حشرات ۶
شکل ۱-۳- مکانیسم انجام واکنش بیولومینسانس به کمک آنزیم لوسیفراز ۷
شکل ۱-۴- نمای کلی از سیستم BRET با استفاده از پروتئین‌های لوسیفراز و GFP در طراحی سنسورها ۱۲
شکل ۱-۵- نمایی از تصویربرداری بیولومینسانس از کل بدن جاندار ۱۵
شکل ۱-۶- بررسی میزان رشد تومور با تکنیک تصویربرداری بیولومینسانس از بدن ۱۵
شکل ۱-۷- نقشه شماتیک ناقل Ti ۲۱
شکل ۱-۸- نحوه آلوده شدن سلول گیاهی توسط آگروباکتریوم ۲۶
شکل ۱-۹- نقشه ساختار عمومی ناقل‌های خانواده pCAMBIA ۳۱
شکل ۱-۱۰- نمای کلی روش تکمیل لوسیفراز شبتاب برای مطالعه روابط متقابل بین پروتئین‌ها در گیاه ۳۷
شکل ۲-۱- نقشه ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 ..... ۴۰
شکل ۳-۱- الکتروفورز DNA ژنومی گیاه توتون (غیر تراریخت) بر روی ژل آگارز ۷۰
شکل ۳-۲- توالی آغازگرها ۷۱
شکل ۳-۳- نتیجه همسانه‌سازی مجازی ژن luc در ناقل pCAMBIA1304 ..... ۷۳
شکل ۳-۴- محصول PCR ژن luc بر روی ژل آگارز ۷۴
شکل ۳-۵- محصول PCR ژن luc با آنزیم پلیمرازی *Taq* ۷۵
شکل ۳-۶- الکتروفورز محصول استخراج ناقل pCAMBIA1304 ..... ۷۶
شکل ۳-۷- الکتروفورز محصول هضم آنزیمی ناقل pCAMBIA1304 ..... ۷۷
شکل ۳-۸- کلونی‌های باکتری نوترکیب *E. coli* رشدیافته بر روی محیط LB حاوی کانامایسین ۷۸
شکل ۳-۹- تایید سازه تهیه‌شده با استفاده از تکنیک PCR ۷۹
شکل ۳-۱۰- محصول PCR با آغازگرهای luc بر روی ناقل‌های تخلیص‌شده از کلونی‌ها ۸۰
شکل ۳-۱۱- طرح شماتیک سازه luc.1304 ..... ۸۰
شکل ۳-۱۲- نتایج حاصل از هضم آنزیمی pCAMBIA1304 حاوی ژن luc ۸۱
شکل ۳-۱۳- نتایج حاصل از تعیین توالی ژن luc کلون شده ۸۱
شکل ۳-۱۴- نتایج حاصل از nucleotide BLAST توالی ژن luc کلون شده در NCBI ۸۲
شکل ۳-۱۵- تایید حضور ژن luc در آگروباکتریوم با استفاده از تکنیک Colony PCR ۸۳
شکل ۳-۱۶- ریزنمونه‌های برگی توتون تلقیح شده با آگروباکتریوم بر روی محیط گزینشگر اولیه ۸۴
شکل ۳-۱۷- پیدایش جوانه‌های اولیه و انتقال جوانه‌های باززایی‌شده به محیط کشت نوساقه‌زایی ۸۵
شکل ۳-۱۸- رشد گیاهچه‌ها بر روی محیط‌های نوساقه‌زایی و ریشه‌زایی و انتقال گیاهان به گلدان ۸۶
شکل ۳-۱۹- بررسی DNA ژنومی استخراج‌شده از گیاهان تراریخت و شاهد با استفاده از تکنیک PCR ۸۷



مقدمه و بررسی منابع

Introduction

۱-۱- مقدمه

آنزیم لوسیفراز به طور وسیعی در بیوتکنولوژی و بیولوژی سلولی و مولکولی استفاده می‌شود. لوسیفراز یکی از مهمترین آنزیم‌های صنعتی است که در زمینه‌های مختلف بویژه در تشخیص مقدار ATP از طریق لومینومتری (که حساس‌ترین روش سنجش ATP است)، به منظور تشخیص آلودگی‌های میکروبی، اندازه‌گیری میزان حیات سلولی[1]، تهیه کیت‌های تشخیص سرطان و زیست‌حسگرها، همچنین در بررسی روابط برهمکنشی و تاخوردگی پروتئین‌ها، سنجش‌های آنزیمی، توالی‌یابی DNA به روش Pyrosequencing و نیز به عنوان ژن گزارشگر ایده‌آل، کاربرد فراوان دارد.

تولید پروتئین‌های مهم کاربردی (دارویی و صنعتی) از طریق گیاهان را اصطلاحاً کشاورزی مولکولی گویند. از مهمترین مزایای تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های بیانی گیاهی می‌توان به اقتصادی‌تر بودن آن نسبت به سیستم‌های صنعتی، تولید فرآورده‌های بیولوژیکی فعال و مشابه شکل طبیعی، بیان بالای ژن و تولید بالای پروتئین نوترکیب، پایداری بیشتر و همچنین عدم وجود خطرات ناشی از آلودگی اشاره کرد (Daniell *et al.*, 2001). در اواخر دهه ۸۰ میلادی تکنولوژی تولید پروتئین و DNA نوترکیب در گیاهان باعث کشف سیستم‌های بیان گیاهی شد که قادر به تولید پروتئین‌های ارزشمند بودند. کشاورزی مولکولی دارای پتانسیل بالایی در تولید نامحدود پروتئین‌های دارویی و آنزیم‌ها می‌باشد (Schillberg *et al*., 2002).

از جمله مزایای سیستم‌های بیانی گیاهی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- سیستم‌های گیاهی نسبت به سیستم‌های تخمیری و بیورآکتورها اقتصادی‌تر هستند. به طورکلی، برآورد کرده‌اند که ارزش تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان بسته به نوع گیاه می‌تواند یک دهم تا یک پنجاهم قیمت تولید همان پروتئین‌ها در فرمانتور و با استفاده از باکتری *E. coli* باشد (Ghislaine *et al*., 2008).

[1] Viability

۲- امکان تولید انبوه پروتئین‌ها با منشأ خارجی وجود دارد. تخمین زده می‌شود که میزان تولید پروتئین‌ها در گیاهانی نظیر توتون، سویا و یونجه، بیش از ۱۰۰ کیلوگرم به ازای هر هکتار باشد (Maliga, 2002).

۳- امکان بیان پروتئین مورد نظر در قسمت خاصی از گیاه نظیر برگ، ریشه، دانه و یا در اندامک خاصی از سلول (نظیر کلروپلاست و میتوکندری) وجود دارد (Daniell *et al.*, 2002).

۴- برخلاف باکتری‌ها، گیاهان (به دلیل یوکاریوت بودن) می‌توانند پروتئین‌های پیچیده یوکاریوتی را در شکل صحیح خود تولید کنند (Schillberg *et al.*, 2002).

۱-۲- بیولومینسانس

بیولومینسانس یا نشر نور توسط موجودات زنده، یکی از جالب‌ترین مباحث زیست‌شناسی می‌باشد. بیولومینسانس به فرآیند تبدیل انرژی شیمیایی به نور در سیستم‌های زیستی گفته می‌شود و به دو جزء اصلی یعنی آنزیم لوسیفراز و سوبسترای لوسیفرین بستگی دارد. این فرایند در دسته وسیعی از جانداران آبزی و خشکی‌زی مشاهده و گزارش شده است. آنزیم‌های درگیر در این فرایند با نام کلی لوسیفراز نامگذاری شده‌اند. واکنش آنزیم‌ها عموماً منجر به تولید نور سبز- زرد می‌شود. با این حال برخی از آنزیم‌ها به طور طبیعی نور قرمز تولید می‌کنند (Alipour *et al.*, 2004).

در واکنش‌های شیمیایی انرژی به صورت گرما آزاد و یا جذب می‌شود. در واکنش‌های لومینسانس، واکنشگرها در اثر جذب انرژی، به سطح بالایی از انرژی (تراز بالاتر الکترونی) می‌رسند که با بازگشت به حالت پایه، تولید نور می‌کنند. لومینسانس را معمولاً نور سرد نیز توصیف می‌کنند و میزان کمی گرما در جریان این واکنش تولید می‌شود.

پدیده بیولومینسانس در گونه‌های مختلفی از جانداران وجود دارد که از نظر فیزیولوژیکی متفاوتند. برای هر یک از این موجودات، موارد بیوشیمی، رنگ و مکانیسم نشر نور متفاوت است. در

جاندارن نورزا از پدیده نشر نور جهت به دام‌اندازی طعمه، ارتباط جنسی و دفاع یا استتار استفاده می‌شود، اگر چه مواردی وجود دارد که نقش بیولومینسانس نامشخص است (Carlson and Copeland, 1985). بسیاری از موجودات آبزی، حشرات، باکتری‌ها، یک گونه از حلزون‌ها، عروس دریایی[1]، بنفشه دریایی[2]، مرجان‌های دریایی و برخی از خرچنگ‌ها توانایی تولید نور را دارند. با وجود اینکه در تمامی موجودات لومینسانت آنزیم لوسیفراز وجود دارد، اما سوبستراهای مورد استفاده و چگونگی کاتالیز واکنش به وسیله این آنزیم در موجودات مختلف کاملاً متفاوت است. به دلیل کاربرد فراوان لوسیفراز حشره شبتاب[3]، بیشتر مطالعات بر روی این آنزیم صورت گرفته است. آنزیم لوسیفراز با استفاده از O_2، Mg^{2+} و ATP با انجام عمل اکسیداتیو، دکربوکسیلاسیون بر روی سوبسترای D-لوسیفرین، نور سبز- زرد و نیز آدنوزین مونوفسفات (AMP)، CO_2، اکسی‌لوسیفرین و پیروفسفات (PPi) تولید می‌کند (Gomi *et al*., 2002).

۱-۳- نورافشانی حشره شبتاب

حشره شبتاب، نامی کلی برای حشراتی است که دارای یک ناحیه نورانی در زیر شکم و در بندهای انتهایی دُم بنام فانوسک[4] می‌باشند (John *et al*., 2004). به دلیل حضور لوسیفراز در فانوسک، این بخش در شب می‌درخشد. حشره شبتاب متعلق به راستهٔ قاب‌بالان[5] است. نور تولید شده توسط این حشره همانند سایر قاب‌بالان به منظور به دام انداختن طعمه، دفاع (استتار) و جلب جنس مخالف به کار می‌رود. در بعضی از گونه‌ها در تمام مراحل دگردیسی حشره اعم از تخم، لارو، حشره بالغ نر و ماده، نورافشانی دیده می‌شود. در شمال ایران دو گونه حشره شبتاب با نام‌های *Lampyris*

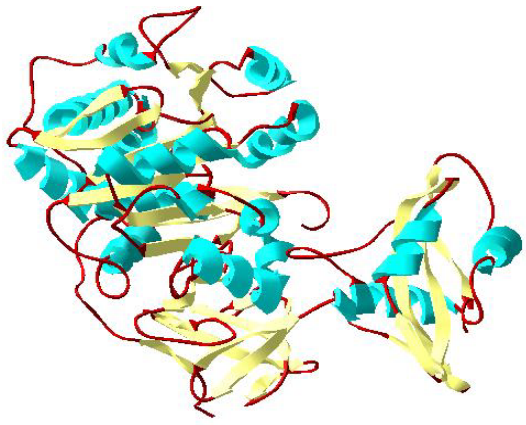
[1] *Aequorea*
[2] *Renilla*
[3] Firefly luciferase
[4] Lantern
[5] Coleoptera

turkestanicus و *Lamproidea maculata* مشاهده و گزارش شده است. هر دو گونه به فراوانی یافت می‌شوند.

۱-۴- لوسیفراز حشره شبتاب

لوسیفراز حشره شبتاب در سال ۱۹۵۶ توسط گرین[1] و مکلروی[2] بدست آمد. آنها نقطه ایزوالکتریک لوسیفراز را بین ۶/۲ و ۶/۳ گزارش کردند. در سال ۱۹۷۷ لوسیفراز بسیار خالص از حشره شبتاب *Luciola mingrelica* توسط دانشمندان روسی تهیه شد. در سال ۱۹۸۹، وزن مولکولی لوسیفراز حشره شبتاب *Photinus pyralis* از طریق روش HPLC به میزان ۶۲ KDa محاسبه شد (Branchini and Rollins, 1989). ساختار سه بعدی کریستال لوسیفراز *Photinus pyralis* با حد تفکیک ۲ A° در سال ۱۹۹۶ تعیین شد (شکل ۱-۱).

ژن لوسیفراز حشره شبتاب گونه ایرانی *Lampyris turkestanicus* که در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفته است، دارای ۱۶۴۴ جفت باز است که ۵۴۷ اسیدآمینه را کد می‌کند (شماره دستیابی GenBank: AY742225).

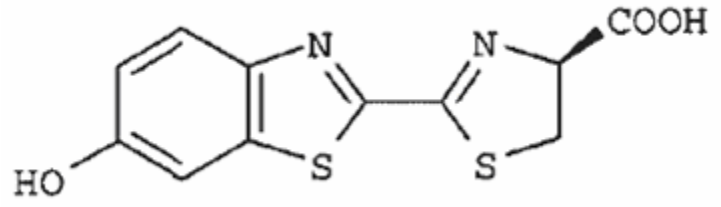


شکل ۱-۱- ساختار حاصل از کریستالوگرافی لوسیفراز *P. pyralis*

[1] A.A.Green
[2] W.D.McElory

۱-۵- D-لوسیفرین

پس از آنکه لوسیفرین از حشره شبتاب *P. pyralis* آمریکای شمالی به دست آمد، سنتز شیمیایی آن برای اولین بار در سال ۱۹۶۱ آغاز شد که از نظر آنزیماتیکی فعال بود. سپس ساختار لوسیفرین با کمک کریستالوگرافی اشعه ایکس تایید گردید. صرفنظر از مرحله دگردیسی و یا موقعیت فانوسک، به نظر می‌رسد که لوسیفرین در میان گونه‌های Beetle حفظ شده است (Blank *et al.*, 1971). مطالعه اجزای مولکولی در مکانیسم‌های بیوشیمیایی حشرات نشان می‌دهد که سوبسترای لوسیفراز یک اسید آلی پلی‌هتروسیکل است [۲-(۶-هیدروکسی بنزوتیازول-۲- ایل)-۲- تیازولین-۴- کربوکسیلیک اسید] که معمولاً لوسیفرین نامیده می‌شود. فرمول شیمیایی D-لوسیفرین در زیر نمایش داده شده است (شکل ۱-۲).



شکل ۱-۲- ساختار D- لوسیفرین در حشرات

با وجود پژوهش‌های فراوان، بجز در یک مورد که لوسیفرین از طریق رژیم غذایی کسب می‌شود، تاکنون منشاء لوسیفرین در دوبالان شناسایی نشده است.

منشاء لوسیفرین در موجود آبزی Dinoflagellate، کلروفیل می‌باشد. این موجودات تک‌سلولی آغازین، فتوسنتزکننده هستند و به دلیل نقش آنها به عنوان آغازکننده چرخه غذایی در اقیانوس‌ها، حائز اهمیت می‌باشند. پدیده فسفروسانس[1] اقیانوس‌ها (درخشندگی آب اقیانوس در شب هنگام) غالباً توسط این موجودات ایجاد می‌شود (Hastings, 1983). با بررسی مسیر بیوسنتز لوسیفرین از منشا کلروفیل در این موجودات و شناسایی آنزیم‌های کلیدی این مسیر بیوسنتزی، به دلیل وجود همولوژی بالا این احتمال وجود دارد که با انتقال ژن(های) کنترل‌کننده این مسیر، گیاه قادر به تولید لوسیفرین

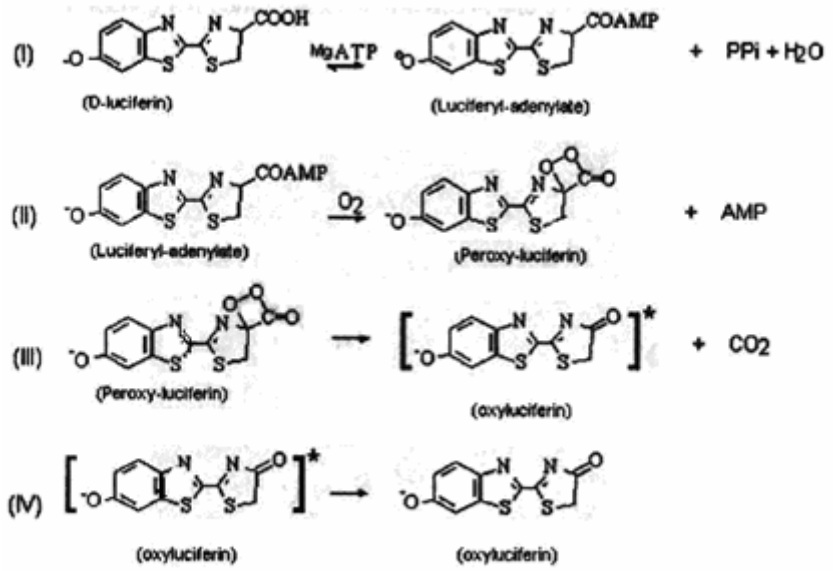
[1] Phosphorescence

از کلروفیل گردد. این موضوع می‌تواند نیاز به استفاده از لوسیفرین خارجی را در بررسی‌های سیستم لوسیفراز در گیاه مرتفع سازد.

۱-۶- مکانیزم تولید نور

لوسیفراز با منشاء حشره‌ای [EC: ۱،۱۳،۱۲،۷] در طی واکنش با D-لوسیفرین، ATP و اکسیژن مولکولی، در اکثر گونه‌ها نور سبز- زرد نشر می‌کند (λmax =۵۷۰ nm). واکنش کاتالیز شده به وسیله آنزیم لوسیفراز به صورت زیر است: (شکل ۱-۳)

$$ATP + LH_2 + Luc + Mg^{2+} \longrightarrow Luc.LH_2\text{-}AMP + PPi \longrightarrow$$
$$E.LH_2\text{-}AMP + O_2 \longrightarrow Luc + AMP + CO_2 + OXL + Light\ emission$$



شکل ۱-۳- مکانیسم انجام واکنش بیولومینسانس به کمک آنزیم لوسیفراز

در مرحله اول لوسیفرین با Mg^{2+}-ATP واکنش می‌دهد و تشکیل لوسیفریل آدنیلات و پیروفسفات می‌دهد. لوسیفریل آدنیلات بوسیله اکسیژن مولکولی، اکسید و حدواسط پراکسید حلقوی به نام دی‌اکستانن (پراکسی لوسیفرین) تشکیل و یک مولکول AMP آزاد می‌شود. دی‌اکستانن در نتیجه تبدیلات داخل مولکولی، دکربوکسیله می‌شود تا تولید اکسی‌لوسیفرین تهییج شده در فرم انول

یا کتو کند. برگشت این ماده به حالت پایه همراه با نشر یک کوانتوم نور مرئی با طـول مـوج مـاکزیمم ۵۷۰- ۵۶۲ نانومتر است که نور سبز مایل به زرد تولید می‌کند (Shimomura *et al.*, 1997).

۱-۷- کاربردهای لوسیفراز و بیولومینسانس

لوسیفراز در شاخه‌های مختلف علوم زیستی کاربردهای متعددی دارد که از آن جمله می‌توان بـه موارد زیر اشاره نمود:

۱-۷-۱- سنجش ATP توسط لوسیفراز

ATP در تمام سلول‌های زنده وجود دارد. این ترکیب، سطح انرژی سلول را مـشخص مـی‌کنـد و تولید آن به شدت کنترل می‌شود. بنابراین مقدار ATP اندازه‌گیری شده، بیان‌کننده تعداد سـلول‌هـای زنده در محیط می‌باشد. در حقیقت در این روش ATP تولید شده توسط سیستم‌های زیـستی، سـریعاً توسط سنجش آنزیمی در حضور لوسیفراز اندازه‌گیری می‌شود.

مقدار ATP اندازه‌گیری شده می‌تواند به منظور آگاهی از آلودگی میکروبی در آب و مواد غذایی به کار رود. به علاوه در بیوتکنولوژی و صنایع دارویی، ATP اندازه‌گیری شده برای بررسی تکثیـر سـلولی، نحوه پیر شدن و مرگ سلول و سمیت سلولی استفاده می‌شود. در پزشکی از این روش می‌تـوان جهـت سنجش آلودگی باکتریایی ادرار و در سنجش آنتی‌بیوتیکی و تست حساسیت استفاده کرد. در سنجش میزان فسفوکراتین نیز می‌توان از این روش بهره برد (Osterberg *et al.*, 1991).

۱-۷-۲- اندازه‌گیری باکتری‌ها و سلول‌ها

در بدن همه موجودات زنده از جمله باکتری‌ها ATP وجود دارد. با توجه به حساسیت زیـاد ایـن روش نسبت به ATP، می‌توان از این سیستم برای اندازه‌گیری باکتری‌ها استفاده کرد. در خاکـشناسی جهت اندازه‌گیری میزان باکتری‌های خاک، کنترل مواد غذایی و آب از این سیستم استفاده مـی‌شـود. دانشمندان سازمان NASA آمریکا به منظور بررسی حیات در کـرات دیگـر، سـنگ‌هـای آسـمانی یـا

موادی که از خارج جو توسط فضانوردان آورده می‌شوند را با ترکیبات سیستم بیولومنیسانس حشره شبتاب مخلوط و از طریق میزان نور تولیدی به احتمال وجود حیات در آنها پی می‌برند (Thore *et al*., 1983).

۱-۷-۳- اندازه‌گیری آنزیم‌ها

بسیاری از آنزیم‌ها در بدن به نحوی با ATP در ارتباط هستند. از این رو می‌توان آنها را به کمک سیستم بیولومینسانس مورد سنجش قرار داد. تعدادی از این آنزیم‌ها عبارتند از:

Creatine phosphokinase (CPK)، ATP-sulphurylase، Apyrase، Adenylate kinase و غیره.

۱-۷-۴- استفاده از لوسیفراز حشره شبتاب در تکنیک Pyrosequencing

این تکنیک نوعی روش جدید تعیین توالی DNA تک‌رشته‌ای بصورت غیرالکتروفورزی است که طی آن چهار آنزیم DNA پلیمراز، ATP سولفوریلاز، آپیراز (آنزیم هضم‌کننده dNTPs) و لوسیفراز حشره شبتاب با همکاری هم موجب راه‌اندازی واکنش‌های توالی‌یابی DNA می‌شوند که مراحل آن به شرح زیر است (Ronaghi *et al*., 1996).

در مرحله اول یک آغازگر با DNA تک‌رشته‌ای الگو هیبرید می‌شود و با آنزیم‌های DNA پلیمراز، ATP سولفوریلاز، آپیراز و لوسیفراز حشره شبتاب آنکوبه می‌گردد. همچنین سوبستراهای APS (آدنوزین-۵ٰ-فسفوسولفات) و لوسیفرین نیز اضافه می‌شوند.

در مرحله دوم، به ترتیب چهار نوع نوکلئوتید به واکنش سنتز DNA اضافه می‌شوند که اگر با نوکلئوتید رشته الگو مکمل باشند، DNA پلیمراز آن را به رشته جدید متصل می‌کند. البته بجای نوکلئوتید dATP از آنالوگ dATPαS استفاده می‌شود که برای لوسیفراز قابل شناسایی نیست، اما قادر است توسط DNA پلیمراز در رشته DNA جدید قرار گیرد. اتصال نوکلئوتید به رشته جدید با

جدا شدن یک مولکول پیروفسفات (PPi) همراه است که مولاریته آن با مولاریته نوکلئوتید اضافه شده به رشته یکسان است.

در مرحله سوم، آنـزیم ATP سـولفوریلاز در حـضور سوبـسترای APS، پیروفـسفات را بـه ATP تبدیل می‌کند. این ATP توسط آنزیم لوسیفراز حس شده و ایـن آنـزیم سوبـسترای لوسـیفرین را بـه اکسی‌لوسیفرین تبدیل می‌کند که این عمل موجب آزاد شدن نور مرئـی متناسـب بـا ATP آزاد شـده می‌شود. این نور توسط ابزار سنجش نور مانند لومینومتر یا دوربین CCD شناسایی شده و بصورت یک پیک در پیروگرام ظاهر می‌شود. هر سیگنال نوری متناسب با تعداد نوکلئوتید الحاق‌شده است.

در مرحله بعد آنزیم آپیراز، dNTPهـای ملحـق نـشده و همچنـین ATPهـای اضـافی را تجزیـه می‌کند. پس از اتمام تجزیه، dNTP بعدی اضافه می‌شود.

در نهایت با افزودن دوره‌ای نوکلئوتیدها در یک پروسه مداوم، رشته DNA مکمل ساخته شـده و توالی نوکلئوتیدی آن با توجه به سیگنال پیک‌ها در پیروگرام تعیین می‌شود.

۱-۷-۵- گزارشگرهای زیستی[1]

گزارشگرهای زیستی، سلول‌های زنده و دستورزی شده‌ای هستند که در پاسخ به عوامل فیزیکـی و یا شیمیایی خاص محیط، تولید پیام قابل سـنجش مـی‌کننـد. ایـن گزارشـگرها از دو جـزء ژنتیکـی اساسی شامل یک ژن گزارشگر و یک پیشبرنده تشکیل شده‌اند. پیشبرنده در حـضور عامـل هـدف در محیط سلول‌ها فعال شده و سبب بیان ژن گزارشگر می‌گردد. فعال شدن ژن گزارشگر منجر بـه تولیـد پروتئین‌های گزارشگری می‌شود که تولید پیام قابل سنجش می‌کنند. امروزه گزارشگرهای زیـستی بـه منظور شناسایی آلاینده‌ها، زمینه‌های تشخیص پزشکی، تنظیم و کنترل فرآیندهای کشت و محاسبات میکروالکترونیکی زیستی[2] بکار می‌روند (Hauke and Mona, 2006).

[1] Bioreporters
[2] Biomicroelectronics

۱-۷-۶- کاربرد لوسیفراز در تکنیک‌های سنجش ایمنی[1]

در ا ین تکنیک از آنزیم لوسیفراز به همراه آنتی‌بادی‌ها یا آنتی‌ژن‌ها استفاده می‌شود و اتصال یا عدم اتصال آنتی‌بادی- آنتی‌ژن به وسیله اندازه‌گیری نور تولید شده توسط لوسیفراز سنجیده می‌شود (Kricka, 1996).

۱-۷-۷- کاربرد لوسیفراز در بررسی اتصال گیرنده- لیگاند

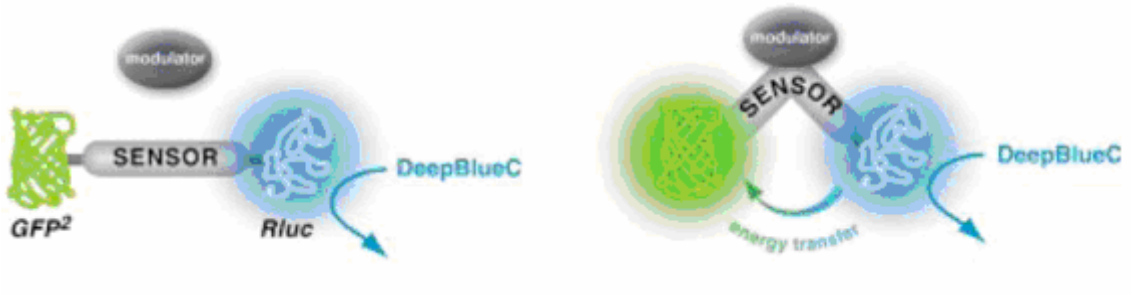
میانکش گیرنده و لیگاند در حضور آنزیم لوسیفراز با روش‌های مختلفی امکانپذیر است.

۱-۷-۷-۱- روش BRET[2]

BRET یک روش پیشرفته است که در مطالعات میانکنش گیرنده- لیگاند و تعیین نقشه مسیرهای انتقال پیام[3] کارایی دارد. در این روش نیازی به منبع نور تحریک‌کننده خارجی نیست و اساس این روش، انتقال انرژی رزونانس بین بخش دهنده بیولومینسانس و بخش گیرنده فلورسانس می‌باشد. در حقیقت انرژی غیرتابشی حالت برانگیخته یک مولکول به مولکول گیرنده انتقال می‌یابد. در این حالت میزان انتقال انرژی به فاصله بین بخش‌های دهنده و گیرنده و موقعیت گروه‌ها نسبت به یکدیگر بستگی دارد (Milligan, 2004).

دسته‌ای از حسگرهای زیستی براساس اصول BRET عمل می‌کنند. در این حسگرها پروتئین‌های لوسیفراز و GFP[4] به طور مستقیم توسط یک پپتید به یکدیگر متصل می شوند. پپتید ارتباطی می‌تواند یک توالی تنظیمی قابل شناسایی توسط لیگاندها و پروتئین‌های سلولی باشد. اتصال لیگاند به این توالی سبب تغییر جهت‌گیری نسبی حسگر و تغییر پیام تولید شده می‌گردد (Milligan, 2004) (شکل ۱-۴).

[1] Immuno assay
[2] Bioluminescence Resonance Energy Transfer
[3] Signal transduction
[4] Green Fluorescent Protein



شکل ۱-۴- نمای کلی از سیستم BRET با استفاده از پروتئین‌های لوسیفراز و GFP در طراحی سنسورها

۱-۷-۷-۲- روش سنجش آلفا[1]

در این روش یک حسگر مولکولی تشکیل می‌شود. این حسگر شامل یک گروه عملکردی از ذرات دهنده O_2 و اجزای گیرنده O_2 می‌باشد. در حقیقت یک ژل هیدراته به مولکول زیستی متصل می‌شود. تحریک این ژل توسط لیزر در طول موج ۶۸۰ نانومتر سبب رها شدن O_2 می‌گردد. O_2 تولید شده سریعاً توسط لوسیفراز متصل به گیرنده، تولید نوری با طول موج ۶۲۰- ۵۳۰ نانومتر می‌نماید. هر اندازه گروه‌های دهنده و گیرنده به یکدیگر نزدیکتر باشند، پیام ایجاد شده قوی‌تر می‌باشد. این روش فوق‌العاده حساس به خصوص برای مطالعه پیامبرهای ثانویه نظیر AMP و یا IP3 کاربرد دارد. به علاوه روش مناسبی برای غربالگری دارو می‌باشد.

۱-۷-۸- کاربرد بیولومینسانس در غربالگری داروها[2]

فرایند کشف دارو، فرایندی پیچیده است که هدف نهایی آن شناسایی مولکول‌هایی با فعالیت فارماکولوژیکی خاص در انسان می‌باشد. یکی از مراحل کلیدی در فرایند کشف دارو، مرحلهٔ غربالگری دارو است. به طور کلی در این مرحله، فعالیت مولکول‌های دارویی مورد نظر علیه یک هدف خاص از طریق آزمون‌های ویژه با استفاده از سیستم لوسیفراز سنجش می‌شود (Aldo *et al*., 2003). چنین آزمون‌هایی به دو دسته آزمون‌های آزمایشگاهی و آزمون‌های حیاتی تقسیم می‌شوند.

[1] Alpha assay
[2] Drug screening