بسم الله الرحمن الرحیم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه
گاوازنگ – زنجان

# بررسی اثر ایجاد پیوند دی سولفیدی در ساختار فتوپروتئین نمیوپسین

**پایان‌نامه کارشناسی ارشد**

**مینا رونقی**

**اساتید راهنما: دکتر لیلا حسنی**

**دکتر وهب جعفریان**

تیر ۱۳۹۳

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق را رفیق راهم ساخت تا این پایان نامه را به پایان برسانم . از استاتید فاضل و اندیشمند سرکار خانم دکتر حسنی و جناب آقای دکتر جعفریان عزیز به عنوان استاتید راهنما که همواره بنده را مورد لطف و محبت خود قرار داه‌اند ،کمال تشکر را دارم.

این پایان نامه را ضمن تشکر و سپاس بیکران و در کمال افتخار و امتنان تقدیم می نمایم به:

- محضر ارزشمند پدر و مادر عزیزم به خاطر همه‌ی تلاشهای محبت آمیزی که در دوران مختلف زندگی‌ام انجام داده‌اند و بامهربانی چگونه زیستن را به من آموخته‌اند.

– به برادر عزیزتر از جانم که در تمامی لحظات زندگیم پشتیبانم بوده.

– به خواهرای عزیزم که همیشه مشوقم بودند.

- به همسر مهربانم که در تمام طول تحصیل همراه و همگام من بوده است.

– به خواهرزاده‌های شیرینم: پیمان، نسترن، ایلیا، ابوالفضل و علی کوچولوی نازم.

- به استادان فرزانه و فرهیخته‌ای که در راه کسب علم و معرفت مرا یاری نمودند.

- به آنان که در راه کسب دانش راهنمایم بودند.

- به آنان که نفس خیرشان و دعای روح پرورشان بدرقه‌ی راهم بود (مادربزرگ عزیزم).

- الها به من کمک کن تا بتوانم ادای دین کنم و به خواسته‌ی آنان جامه ی عمل بپوشانم.

- پروردگارا حسن عاقبت ، سلامت و سعادت را برای آنان مقدر نما.

- خدایا توفیق خدمتی سرشار از شور و نشاط و همراه و همسو با علم و دانش و پژوهش جهت رشد و شکوفایی ایران کهنسال عنایت بفرما.

# چکیده

به فرآیند تبدیل انرژی شیمیایی به انرژی مرئی نورانی توسط موجودات زنده بیولومنیسانس گویند و امروزه با توجه به بالا بودن درصد سیگنال فوتون به نویز پس زمینه، بیولومینسانس کاربردهای زیادی در حوزه‌های مختلف علوم زیستی پیدا کرده است. تا کنون هشت نوع فتوپروتئین وابسته به کلسیم گزارش شده که از این میان تنها فتوپروتئین نمیوپسین از شانه‌دار *Mnemiopsis leidy*i تعیین توالی نشده و بصورت نوترکیب بیان نشده است. سیستم نمیوپسین شبیه به آکورین از چتر دریایی *Aequoera* است با این تفاوت که نمیوپسین به نور حساس است. برطبق مطالعات بیوانفورماتیک انتظار می‌رود ایجاد پیوند دی‌سولفیدی در ساختار نمیوپسین، پایداری و حساسیت نوری آن را افزایش دهد. در این مطالعه تک موتانت ها (C163A وC170A) و موتانت دوگانه (C163A-C170A) توسط جهش‌زایی هدفدار انجام شد. ساختار نوع وحشی و موتانت به وسیله دورنگ‌نمایی دورانی و اسپکتروسکوپی فلوئورسانس مطالعه شد. نمیوپسین وحشی و موتانت به سویه بیانی(BL21(DE3 انتقال داده شد و تخلیص پروتئین با دنباله پلی هیستیدینی توسط ستون نیکل سفاروز انجام شد. پروتئین خالص شده توسط SDS-PAGE بررسی شد. نتایج دورنگ‌نمایی دورانی نشان می‌دهد که موتانت دوگانه (C163A-C170A) انتقال α- هلیکس به رندوم کویل را القا می‌کند. فلورسانس ذاتی نشان می‌دهد تک موتانت‌ها اثر کمی در ساختار پروتئین دارند ولی موتانت دوگانه به جابه‌جایی قرمز و کاهش شدت نشر طیف فلورسانس منجر می شود. فلورسانس ANS نشان می‌دهد که گروه های آبگریز در دسترس، بعد از موتاسیون‌ها کاهش می‌یابند. در نتیجه، الحاق باند دی‌سولفیدی، ساختار فتوپروتئین را تغییر می‌دهد و انتظار می‌رود بر عملکرد و پایداری پروتئین اثر بگذارد.

# فهرست مطالب


عنوان شماره صفحه

**فصل اول: مقدمه..... ۱**

پیش گفتار..... ۱

مقدمه..... ۲

۱-۱ تاریخچه بیولومینسانس..... ۲

۱-۲ سیستم بیولومینسانس Cypridina hilgendirfi..... ۴

۱-۲-۱ سیستم‌های بیولومینسانس با ماهیت فتوپروتئینی..... ۴

۱-۳ فتوپروتئین‌های شناخته شده..... ۵

۱-۳-۱ فتوپروتئین‌های رادیولاریان(پروتوزوآ)..... ۵

۱-۳-۲فولاسین..... ۶

۱-۳-۳ فتوپروتئین کاتوپتروس..... ۶

۱-۳-۴ پولینویدین..... ۷

۱-۳-۵ سیمپلکتین..... ۹

۱-۳-۶ فتوپروتئین لومینودسموس..... ۹

۱-۳-۷ فتوپروتئین اوفیوپسیلا..... ۱۰

۱-۳-۸ فتوپروتئین‌های کولنترات..... ۱۰

۱-۳-۹ فتوپروتئین‌های کتنوفور..... ۱۱

۱-۴ جانورشناسی کتنوفورهای دارای سیستم بیولومینسانس..... ۱۲

۱-۴-۱ جایگاه سیستماتیک نمیوپسین..... ۱۳

۱-۴-۲ مورفولوژی نمیوپسین..... ۱۴

۱-۴-۳ دلایل استفاده نمیوپسین از بیولومینسانس..... ۱۵

۱-۴-۴ شکارچیان Mnemiopsis leidyi ..... ۱۵

۱-۵ آشنایی با نمونه‌های دیگری از کتنوفورها ..... ۱۵

۱-۵-۱ Beroe ovate ..... ۱۵
۱-۵-۲ Bolinopsis infundibulum ..... ۱۶
۱-۵-۳ Bathocyroe foster ..... ۱۷
۱-۶ راهبرد اساسی در استخراج و خالص‌سازی فتوپروتئین‌ها ..... ۱۷
۱-۷ بررسی خصوصیات ساختاری و عملکردی آکورین و نمیوپسین طبیعی ..... ۱۸
۱-۷-۱ خصوصیات ساختاری و عملکردی آکورین ..... ۱۸
۱-۷-۲ خصوصیات ساختاری و عملکردی نمیوپسین ..... ۲۳
۱-۷-۲-۱ فعال سازی و غیرفعال سازی نوری در فتوپروتئین نمیوپسین ..... ۲۳
۱-۷-۲-۲ اندازه‌گیری فعالیت نوری در سیستم‌های زنده نمیوپسین ..... ۲۳
۱-۷-۲-۳ طیف نشر بیولومینسانس نمیوپسین طبیعی ..... ۲۴
۱-۷-۲-۴ طیف فلورسانس ذاتی نمیوپسین طبیعی ..... ۲۴
۱-۷-۲-۵ مقایسه دمای مطلوب نمیوپسین طبیعی با آکورین ..... ۲۴
۱-۷-۲-۶ بررسی اثر قدرت یونی و حساسیت به کلسیم در نیوپسین طبیعی ..... ۲۴
۱-۷-۲-۷ PH مطلوب ..... ۲۴
۱-۸ کاربردهای بیولومینسانس ..... ۲۵
۱-۸-۱ خصوصیات کاربردی فتوپروتئین‌ها ..... ۲۵
۱-۸-۱-۱ دهنده انرژی در واکنش انتقال انرژی کمی لومینسانس ..... ۲۵
۱-۸-۱-۲ استفاده از فتوپروتئین‌ها در سنجش‌های دورنگی ..... ۲۶
۱-۸-۱-۳ سایر کاربردها ..... ۲۷
۱-۸-۲ کاربردهای اقتصادی ..... ۲۷
۱-۹ اثر پیوند دی‌سولفیدی بر ساختار و عملکرد پروتئین‌ها ..... ۲۸
۱-۱۰ ظهور زیست فناوری مولکولی ..... ۲۹
۱-۱۱ پروتئین های نوترکیب به عنوان نقطه عطف زیست فناوری مولکولی ..... ۲۹
۱-۱۲ سیستم های بیان پروتئین های نوترکیب ..... ۳۰
۱-۱۲-۱ سیستم بیان اشریشیاکلی ..... ۳۰
۱-۱۳ گروه‌بندی پلاسمیدها ..... ۳۱

۱-۱۴ تهیه DNA پلاسمیدی..... ۳۱
۱-۱۵ مهندسی پروتئین..... ۳۲
۱-۱۶ انجام جهش‌های هدفمند..... ۳۳
۱-۱۷ روش‌های مطالعه ساختار پروتئین..... ۳۵
۱-۱۷-۱ روش طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD) ..... ۳۵
۱-۱۷-۲ طیف‌سنجی فلوئورسانس..... ۳۷
۱-۱۸ اهداف تحقیق..... ۳۸
فصل دوم: بخش تجربی
۲-۱ مواد..... ۳۹
۲-۲ کیت‌ها..... ۴۰
۲-۳ دستگاه‌ها..... ۴۰
۲-۴ روش‌ها..... ۴۱
۲-۴-۱ میکروارگانیسم‌ها..... ۴۱
۲-۴-۲ طراحی پرایمر..... ۴۱
۲-۴-۳ محیط کشت مایع LB..... ۴۱
۲-۴-۴ محیط کشت جامد LB..... ۴۲
۲-۴-۵ محیط کشت TB..... ۴۲
۲-۴-۶ محیط کشت SOB..... ۴۳
۲-۴-۷ محیط کشت SOC..... ۴۳
۲-۴-۸ روش‌های مربوط به کشت و نگهداری باکتری‌ها..... ۴۳
۲-۴-۹ محلول‌ها و بافرها..... ۴۴
۲-۴-۹-۱ بافر X50 TAE..... ۴۴
۲-۴-۹-۲ محلول اتیدیوم بروماید (۱۰ mg/ml)..... ۴۴
۲-۴-۹-۳ محلول‌های مورد نیاز برای تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد..... ۴۴
۲-۴-۹-۴ محلول‌های القاء کننده بیان..... ۴۵

۲-۴-۹-۴-۱ محلول IPTG (100 mM) ..... ۴۵
۲-۴-۹-۴-۲ محلول کانامایسین ( ۱۵۰mg/m ) ..... ۴۵
۲-۴-۹-۴-۳ محلول‌های مورد نیاز در SDS-PAGE ژل الکتروفورز..... ۴۵
۲-۴-۹-۴-۳-۱ محلول استوک آکریل آمید- بیس اکریل آمید (محلول A)..... ۴۵
۲-۴-۹-۴-۳-۲ محلول B (بافر ژل جدا کننده)..... ۴۵
۲-۴-۹-۴-۳-۳ محلول C (بافر ژل استاکینگ)..... ۴۶
۲-۴-۹-۴-۳-۴ محلول بافر الکتروفورز ژل اکریل آمید..... ۴۶
۲-۴-۹-۴-۳-۵ بافر پروتئین الگو..... ۴۷
۲-۴-۹-۴-۳-۶ آمونیوم پرسولفات ۱۰ در صد..... ۴۷
۲-۴-۹-۴-۳-۷ تمد ۱۰ درصد..... ۴۷
۲-۴-۹-۴-۳-۸ محلول رنگ بری ژل آکریل آمید..... ۴۷
۲-۴-۹-۴-۳-۹ محلول رنگ آمیزی ژل پروتئین..... ۴۸
۲-۴-۹-۵ بافرهای مورد نیاز برای کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از نیکل آگارز..... ۴۸
۲-۴-۹-۵-۱ محلول بافر لیز..... ۴۸
۲-۴-۹-۵-۲ محلول بافر شستشو ..... ۴۸
۲-۴-۹-۵-۳ محلول بافر محلول سازی..... ۴۹
۲-۴-۱۰ واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) جهت ایجاد جهش..... ۴۹
۲-۴-۱۱ خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت ( PCR Purification kit)..... ۵۰
۲-۴-۱۲ الکتروفورز DNA پلاسمیدی در ژل آگارز..... ۵۰
۲-۴-۱۳ اثر آنزیم Dpn1 بر روی پلاسمید حاوی جهش..... ۵۱
۲-۴-۱۴ تکثیر پلاسمید حاوی ژن نمیوپسین در میزبان پروکاریوتی..... ۵۱
۲-۴-۱۴-۱آماده سازی سلول‌های مستعد از باکتری E. coli سویه‌ی (BL21(DE3…… ۵۱
۲-۴-۱۴-۲ انتقال شیمیایی پلاسمید حاوی ژن نمیوپسین به سویه(BL21(DE3 باکتری E.Coli…… ۵۲
۲-۴-۱۵ استخراج پلاسمید حاوی ژن نمیوپسین با استفاده از کیت Bionner ..... ۵۲
۲-۴-۱۶ تعیین توالی ..... ۵۳

۲-۴-۱۷ بیان پروتئین‌های نوترکیب تحت سیستم pET در سویه (BL21(DE3 باکتری E.Coli ..... ۵۳
۲-۴-۱۸ تخلیص پروتئین مورد نظر با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی با نیکل آگار ..... ۵۴
۲-۴-۱۹ تهیه ژل پلی آکریل آمید ..... ۵۵
۲-۴-۲۰ الکتروفورز پروتئین به روش SDS-PAGE ..... ۵۶
۲-۴-۲۱ سنجش غلظت پروتئین ..... ۵۶
۲-۴-۲۲ دیالیز نمونه‌ها ..... ۵۷
۲-۵ مطالعات ساختاری ..... ۵۸
۲-۵-۱ مطالعات دورنگ نمایی دورانی ..... ۵۸
۲-۵-۲ مطالعات فلوئورسانس ذاتی ..... ۵۸
۲-۵-۳ فلورسانس ANS ..... ۵۸
فصل سوم: نتایج و بحث
۳-۱ جهش A163C ..... ۶۰
۳-۱-۱ تکثیر اختصاصی ژن نمیوپسین (PCR) ..... ۶۰
۳-۱-۲ انتقال به میزبان بیانی(Transformation) ..... ۶۱
۳-۱-۳ استخراج پلاسمید pET-28a -170 ..... ۶۲
۳-۱-۴ توالی یابی جهش A163C ..... ۶۳
۳-۲ جهش A170C ..... ۶۴
۳-۲-۱ تکثیر اختصاصی ژن نمیوپسین (PCR) ..... ۶۴
۳-۲-۲ انتقال به میزبان بیانی(Transformation) ..... ۶۵
۳-۲-۳ استخراج پلاسمید pET-28a -163 ..... ۶۶
۳-۲-۴ توالی یابی جهش A170C ..... ۶۷
۳-۳ جهش A170C /A163C ..... ۶۸
۳-۳-۱ تکثیر اختصاصی ژن نمیوپسین 163(PCR) ..... ۶۸
۳-۳-۲ انتقال به میزبان بیانی(Transformation) ..... ۶۹
۳-۳-۳ استخراج پلاسمید 170 حاوی ژن نمیوپسین 163 و pET-28a ..... ۷۰

۳-۳-۴ توالی یابی جهش A170C / A163C ..... ۷۱
۳-۴ بیان و تخلیص پروتئین نمیوپسین ..... ۷۳
**۳-۵ بیان و تخلیص پروتئین نمیوپسین ..... ۷۴**
۳-۶ دیالیز و تعیین غلظت پروتئین ..... ۷۵
۳-۷ مطالعات ساختاری ..... ۷۵
۳-۷-۱مطالعات دورنگ نمایی دورانی ..... ۷۵
۳-۷-۲ مطالعات فلورسانس ذاتی و خارجی ..... ۷۷
۳-۷-۳ فلورسانس ANS ..... ۷۹
**۳-۷-۴ بررسی تریپتوفان در حضور خاموش‌کننده اکریل آمید ..... ۸۰**
نتیجه‌گیری ..... ۸۲
پیشنهادات ..... ۸۳
مراجع ..... ۸۴

# فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱: پراکنش نمیوپسین.....۱۳
شکل ۱-۲: ریخت‌شناسی شانه‌دار دریای خزر.....۱۴
شکل ۱-۳: شمایی از شانه‌دار دریایی برووین (Berovine).....۱۶
شکل ۱-۴- شمایی از نحوه عملکرد فتوپروتئین آکورین و فرم های مختلف آن.....۱۹
شکل ۱-۵- شمایی از موقعیت چهار موتیف هلیکس- لوپ- هلیکس اکورین.....۲۰
شکل ۱-۶- شمایی از آمینو اسید های دخیل در میانکنش با کلنترازین.....۲۱
شکل ۱-۷-مقایسه فتوپروتئین‌ها در سه وضعیت مختلف: بدون فلورسانس، فلورسانس آبی‌و فلورسانس سبز.....۲۳
شکل ۱-۸- A. شمایی از عملکرد طبیعی سیستم CHRT در عروس دریایی و B. الگوی آزمایشگاهی این واکنش.....۲۶
شکل ۱-۹- سنجش همزمان و سریع دو هورمون FSH و LH با استفاده از دو فرم جهش یافته از فتوپروتئین اوبلین.....۲۷
شکل ۱-۱۰- تابش نور توسط جانوران.....۲۸
شکل ۱-۱۱- مراحل کلی انجام جهش‌زایی هدفمند.....۳۴
شکل ۳-۱- الکتروفورز محصول PCR استخراج شده از ژل. مارکر وزن مولکولی (M)، محصول PCR ژن نمیوپسین(Mn).....۶۰
شکل۳-۲- کشت سلول‌های باکتریایی BL21(DE3) ترانسفورم شده باpET28a Mnemiopsin بر روی محیط‌های کشت LB جامد حاوی کانامایسین. A: سلول‌های BL21(DE3) بدون حامل. B: سلول‌های BL21(DE3) حاوی وکتور. C:سلول‌های BL21(DE3) بدون وکتور.....۶۱
شکل ۳-۳- کشت تک کلونی‌های BL21 حاوی pET28a حامل ژن نمیوپسین در محیط‌های کشت LB کانامایسین دار. A: کشت تک کلونی BL21 حاوی pET28a حامل ژن نمیوپسین. B: کشت BL21 بدون وکتور. C: کشت تک کلونی BL21 حاوی pET28a حامل ژن نمیوپسین....۶۲

شکل۳-۴- استخراج پلاسمید pET28a ۱۷۰، شستشوی اول (A)، ششستشوی دوم (B) و مارکر وزن مولکولی (M).....۶۳
شکل۳-۵- نتیجه تعیین توالی نوکلئوتیدی وکتور pET28a-170 با پرایمرهای عمومی $T_7$ Promoter و $T_7$ Terminator توسط شرکت Bioneer.....۶۴
شکل ۳-۶- الکتروفورز محصول PCR استخراج شده از ژل. مارکر وزن مولکولی (M)، محصول PCR ژن نمیوپسین(Mn).....۶۵
شکل۳-۷- کشت سلول‌های باکتریایی BL21(DE3) ترانسفورم شده با pET28a-Mnemiopsin بر روی محیط‌های کشت LB جامد حاوی کانامایسین.....۶۵
شکل ۳-۸- کشت تک کلونی‌های BL21 حاوی pET28a حامل ژن نمیوپسین در محیط‌های کشت LB کانامایسین دار. A: کشت تک کلونی BL21 بدون وکتور. B: کشت تک کلونی BL21 حاوی pET28a حامل ژن نمیوپسین.....۶۶
شکل۳-۹- استخراج پلاسمید pET28a 163، A- شستشوی اول، B- ششستشوی دوم و مارکر وزن مولکولی (M).....۶۷
شکل۳-۱۰- نتیجه تعیین توالی نوکلئوتیدی وکتور pET28a-163 با پرایمرهای عمومی $T_7$ Promoter و $T_7$ Terminator توسط شرکت Bioneer .....۶۸
شکل ۳-۱۱- الکتروفورز محصول PCR استخراج شده از ژل. مارکر وزن مولکولی (M)، محصول PCR ژن نمیوپسین (Mn163).....۶۹
شکل ۳-۱۲- کشت سلول‌های باکتریایی BL21(DE3) ترانسفورم شده با pET28a-Mn163 بر روی محیط‌های کشت LB جامد حاوی کانامایسین. A: سلول‌های BL21(DE3) بدون وکتور. B: سلول‌های BL21(DE3) حاوی وکتور.....۶۹
شکل ۳-۱۳- کشت تک کلونی‌های BL21 حاوی pET28a حامل ژن نمیوپسین 163 در محیط-های کشت LB کانامایسین دار.....۷۰
شکل۳-۱۴- استخراج پلاسمید pET28a 170 و مارکر وزن مولکولی (M) .....۷۱
شکل۳-۱۵- نتیجه تعیین توالی نوکلئوتیدی وکتور pET28a-163 با پرایمرهای عمومی $T_7$ Promoter و $T_7$ Terminator توسط شرکت Bioneer.....۷۳

شکل۳-۱۶- ثبت جهش در سایت NCBI با کد دسترسی KF305834 و KF305835 و KJ638907..... ۷۳
شکل ۳-۱۷- بررسی پروتئین نمیوپسین خالص شده با استفاده از SDS-PAGE، (M) مارکر وزن مولکولی پروتئین برحسب کیلودالتون. نمونه پروتئین خالص شده به ترتیب Mn163 (E1 و E2 و رسوب (R)). $Mn_2$ (E1 و E2 و رسوب (R)). Mn170 (E1 و E2 و رسوب (R)). $md_2$ (E1 و E2 و رسوب (R))..... ۷۴
شکل ۳-۱۸- بررسی پروتئین نمیوپسین خالص شده با استفاده از SDS-PAGE، M)) مارکر وزن مولکولی پروتئین برحسب کیلودالتون. نمونه پروتئین خالص شده موتانت ($md_2$) از E1 تا E3 و رسوب (R) (سمت راست). نمونه پروتئین موتانت خالص شده (Mn170) از E1 تا E3 و رسوب (R) (سمت چپ)..... ۷۵
شکل ۳-۱۹- طیف CD چهار نمونه پروتئین $md_2$، $Mn_2$، 163، 170 ..... ۷۶
شکل ۳-۲۰- طیف فلورسانس ذاتی نمیوپسین طبیعی و جهش یافته با تحریک در طول موج ۲۸۰ نانومتر..... ۷۸
شکل ۳-۲۱- طیف فلورسانس ذاتی نمیوپسین طبیعی و جهش یافته با تحریک در طول موج ۲۹۵ نانومتر..... ۷۹
شکل ۳-۲۲- طیف فلورسانس ANS نمیوپسین طبیعی و جهش یافته..... ۸۰
شکل ۳-۲۳- نمودار استرن- ولمر پروتئین وحشی (Mn) و موتانت‌های 163، 170، $md_2$..... ۸۱

# فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۱ فتوپروتئین‌هایی که تا کنون شناسایی، جداسازی و تخلیص شده‌اند..... ۸
جدول ۱-۲ انواع کلنترازین های سنتزی و تفاوت انها با کلنترازین طبیعی..... ۲۱
جدول ۱-۳ مقایسه آنالوگ های مختلف کلنترازین از لحاظ زمان پاسخ دهی و محصول کوانتومی..... ۲۲
جدول ۲-۱ مواد شیمیایی و زیستی مورد استفاده در این پژوهش..... ۳۹
جدول ۲-۲ کیت‌های مورد استفاده در این پژوهش..... ۴۰
جدول ۲-۳ دستگاه‌های مورد استفاده در این پژوهش..... ۴۰
جدول ۲-۴ مشخصات مربوط به پرایمرهای طراحی شده جهت کلونینگ ژن نمیوپسین..... ۴۱

جدول ۲-۵ مواد تشکیل دهنده محیط کشت مایع LB.....۴۳
جدول ۲-۶ محلول‌های مورد نیاز برای تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد.....۴۴
جدول ۲-۷ مواد مورد نیاز برای تهیه محلول SDS-PAGE A.....۴۵
جدول ۲-۸ مواد مورد نیاز برای تهیه محلول SDS-PAGE B.....۴۵
جدول ۲-۹ مواد مورد نیاز برای تهیه محلول SDS-PAGE C.....۴۶
جدول ۲-۱۰ مواد مورد نیاز برای تهیه محلول بافر الکتروفورز ژل آکریل آمید.....۴۶
جدول ۲-۱۱ مواد مورد نیاز برای تهیه سمپل بافر نمونه‌های پروتئینی.....۴۷
جدول ۲-۱۲ مواد مورد نیاز برای تهیه محلول رنگ بری ژل آکریل آمید.....۴۷
جدول ۲-۱۳ مواد مورد نیاز برای تهیه محلول رنگ آمیزی ژل پروتئین.....۴۸
جدول ۲-۱۴ مواد مورد نیاز برای تهیه محلول بافر لیز.....۴۸
جدول ۲-۱۵ مواد مورد نیاز برای تهیه محلول بافر Washing.....۴۸
جدول ۲-۱۶ مواد مورد نیاز برای تهیه محلول بافر Elution ..... ۴۹
جدول ۲-۱۷ مواد مورد نیاز برای انجام واکنش پی.سی.آر.....۴۹
جدول ۲-۱۸ سیکل دمایی مرحله اول پی سی آر.....۵۰
جدول ۲- ۱۹مواد مورد نیاز برای تهیه ژل پائین ۱۲٪ در حجم ۱۵ میلی لیتر و ژل بالا ۵٪ در حجم ۵ میلی لیتر.....۵۶
جدول ۲-۲۰ تهیهٔ استانداردهای پروتئینی به منظور تعیین غلظت نمونه‌های مجهول.....۵۷
جدول۳-۱- درصد ساختار دوم گونه‌های مختلف پروتئینی.....۷۷
جدول ۳-۲- ثابت دینامیکی استرن ولمر.....۸۱

# چکیده

به فرآیند تبدیل انرژی شیمیایی به انرژی مرئی نورانی توسط موجودات زنده بیولومنیسانس گویند و امروزه با توجه به بالا بودن درصد سیگنال فوتون به نویز پس زمینه، بیولومینسانس کاربردهای زیادی در حوزه‌های مختلف علوم زیستی پیدا کرده است. تا کنون هشت نوع فتوپروتئین وابسته به کلسیم گزارش شده که از این میان تنها فتوپروتئین نمیوپسین از شانه‌دار *Mnemiopsis leidy*i تعیین توالی نشده و بصورت نوترکیب بیان نشده است. سیستم نمیوپسین شبیه به آکورین از چتر دریایی *Aequoera* است با این تفاوت که نمیوپسین به نور حساس است. برطبق مطالعات بیوانفورماتیک انتظار می‌رود ایجاد پیوند دی‌سولفیدی در ساختار نمیوپسین، پایداری و حساسیت نوری آن را افزایش دهد. در این مطالعه تک موتانت ها (C163A وC170A) و موتانت دوگانه (C163A-C170A) توسط جهش‌زایی هدفدار انجام شد. ساختار نوع وحشی و موتانت به وسیله دورنگ‌نمایی دورانی و اسپکتروسکوپی فلوئورسانس مطالعه شد. نمیوپسین وحشی و موتانت به سویه بیانی(BL21(DE3 انتقال داده شد و تخلیص پروتئین با دنباله پلی هیستیدینی توسط ستون نیکل سفاروز انجام شد. پروتئین خالص شده توسط SDS-PAGE بررسی شد. نتایج دورنگ‌نمایی دورانی نشان می‌دهد که موتانت دوگانه (C163A-C170A) انتقال α- هلیکس به رندوم کویل را القا می‌کند. فلورسانس ذاتی نشان می‌دهد تک موتانت‌ها اثر کمی در ساختار پروتئین دارند ولی موتانت دوگانه به جابه‌جایی قرمز و کاهش شدت نشر طیف فلورسانس منجر می شود. فلورسانس ANS نشان می‌دهد که گروه های آبگریز در دسترس، بعد از موتاسیون‌ها کاهش می‌یابند. در نتیجه، الحاق باند دی‌سولفیدی، ساختار فتوپروتئین را تغییر می‌دهد و انتظار می‌رود بر عملکرد و پایداری پروتئین اثر بگذارد.

# فصل اول

# مقدمه

## پیش گفتار

بیولومینسانس یا نشر نور به وسیله موجودات زنده، یکی از جالب‌ترین مباحث زیست‌شناسی می‌باشد که با توسعه تحقیقات، کاربردهای تجزیه‌ای آن در مطالعات داخلی[1] و خارج سلولی[2] در زمینه فرآیندهای زیستی نظیر بیان ژن، میانکنش پروتئین‌ها و موارد بالینی مانند پارکینسون، آلزایمر و دیابت روز به روز مشخص‌تر می‌گردد [۱]. فناوری بیولومینسانس یکی از ابزارهای دقیق، ارزان و حساسی است که در ابعاد مختلف فناوری‌های زیستی همچون علوم پزشکی، کشاورزی، صنایع دفاعی و معدن کاربرد دارد [۲]. تشخیص با رادیوداروها در پزشکی هسته‌ای شاخه‌ای از پزشکی است که درآن تشعشع و خواص هسته‌ای نوکلوئیدهای رادیواکتیو و پایدار برای تشخیص و درمان امراض به کار می‌روند. این امر می‌تواند بر پرتودهی مستقیم به وسیله یک تشعشع خارجی و یا با تزریق داروهای نشاندار تحقق یابد. از جمله کاربردهای آن، تشخیص انواع سرطان در مراحل مختلف می‌باشد. به این منظور سودمندترین رادیوایزوتوپ‌ها هسته‌های تابش دهنده گاما هستند. چرا که پرتوهای تابش شده از این مواد، میزان پیشرفت سرطان در بافت‌های بدن را به خوبی مشخص می‌کند. اما لازم به ذکر است که پس از یک تابش شدید اشعه به بدن به منظور تشخیص سرطان، علایم و عوارض متعددی در فرد تظاهر می‌یابد که از آن جمله می‌توان به تخریب ارگان‌های خون‌ساز، تأثیر روی سیستم گوارشی، مغز، غدد تناسلی و پوست به همراه علایمی همچون بی‌اشتهایی، استفراغ، اسهال، تعرق شدید، اختلال در تنفس، لرزش بدن و تب اشاره کرد و البته این عوارض تنها مضرات استفاده از این روش تشخیصی نیست زیرا خود این تشعشعات می‌توانند انواع سرطان‌ها را در درازمدت ایجاد کنند. این در حالی است که استفاده

[1] In vivo
[2] In vitro

از روش‌های مبتنی بر بیولومینسانس هیچ یک از این عوارض را ندارند. روش‌های بیولومینسانس، امروزه از حساس‌ترین روش‌ها برای اندازه‌گیری آلودگی باکتریایی در کلیه صنایع می‌باشند. کلیه صنایعی که استریلیزه بودن برای آنها مهم است، برای تایید محصولات خود از این روش استفاده می‌کنند. همچنین در حال حاضر با استفاده از روش‌های جهش‌زایی در ژن سازنده آنزیم لوسیفراز ، با تغییر برخی از اسیدهای آمینه لوسیفراز، طول موج نور تولیدی آنزیم از ناحیه سبز به قرمز جابه‌جا شده است. از آنجایی که تابش قرمز برخلاف تابش سبز به راحتی می‌تواند از بافت‌های بدن موجودات زنده عبور کند، با انتقال ژن تولیدکننده نور قرمز به بافت‌های بدن موجودات و استفاده از دوربین‌های ویژه، حضور لوسیفراز به سادگی قابل ردیابی خواهد بود و از این طریق بافت‌های سالم از سرطانی قابل تشخیص می‌شوند. همچنین با استفاده از این روش‌ها به راحتی می‌توان مهاجرت سلول‌های سرطانی یا بروز متاستاز را بررسی نمود [۱].

## مقدمه

### ۱.۱ تاریخچه بیولومینسانس

جانوران نورافشان برای بشر اولیه نیز شناخته شده بودند، ولی مطالعه علمی روی آن‌ها دیر زمانی نیست که آغاز شده است. معروف‌ترین جانوری که نورافشانی می‌کند حشره کوچکی موسوم به کرم شب‌تاب است که به انگلیسی *Firefly* نامیده می‌شود.

احتمالا اولین واکنش تولید کننده نور به دست بشر توسط هنینگ براند[1] کیمیاگر و بازرگان اهل هامبورگ در سال ۱۶۶۹ انجام شد. از نظر کیمیاگران آن زمان، سنگ فلاسفه که فلزات را به طلا تبدیل می‌کرد باید جسمی ملون بوده و چون طلا فلزی اصیل است، لذا از نظر هنینگ براند سنگ فلاسفه باید در بدن انسان که اشرف مخلوقات است نیز به نحوی قرار داشته باشد. به همین دلیل، او مقداری ادرار انسان را با ماسه مخلوط و درظرف مسی حرارت داد و متوجه شد که دهانه ظرف و بازمانده تقطیر با نوار سبز رنگی می‌درخشد. اما او موفق نشد که به کمک آن فلزات را به طلا تبدیل کند. هشت سال بعد، لایب نیتر[2] از این آزمایش آگاهی یافته و این ماده را فسفر سفید یعنی حامل نور نامید.

[1] Henning brand
[2] Libe niter

مطالعات اولیه روی بیولومینسانس، توسط تعدادی از دانشمندان نامدار جهان علم انجام شده است که مختصرا به آنها اشاره می‌شود. ارسطو مطالبی را درباره موجودات نورافشان ذکر کرده است. فرانسیس بیکن[1] (۱۶۲۶-۱۵۶۱) فیلسوف انگلیسی روی قارچ‌های شب‌تاب *Luminous fungi* بررسی‌هایی انجام داد [۳]. رابرت بویل[2] (۱۶۹۱-۱۶۲۷) شیمی‌دان معروف انگلیسی در سال ۱۶۶۷ لزوم اکسیژن را برای نورافشانی باکتری‌ها ثابت کرد. بویل نیز موفق به تهیه فسفر از ادرار شد، ولی به واسطه تقدم براند، وی را کاشف فسفر می‌دانند [۴].

مطالعه نوین روی پدیده بیولومینسانس با آزمایش پرفسور رافائل دوبوآ[3] در سال ۱۸۸۵ روی حشره شب تاب *Pyrophous (Coleptera: Elateridae)* موسوم به سوسک پشتک زن آغاز شد.

کلمه لوسیفرین از لوسیفر *Lucifer* به معنای ستاره صبح مشتق شده است که خود از کلمه یونانی *Lucina* به معنی الهه زایمان گرفته شده و در اصطلاح ادبی یونانی و رومی به جای کلمه ماه به کار می‌رود و کلمه *Luciferase* (لوسیفراز) به معنی دارای فروغ می‌باشد.

دوبوآ و تاچاف[4] با کشت باکتری‌های نورافشان روی بدن قورباغه موفق شدند بدن حیوان را در طی سه روز نورافشانی کنند. در نمایشگاه اپتیک پاریس در سال ۱۹۰۰ دوبوآ نمایش دیدنی را از باکتری‌ها ترتیب داد. او شش کوزه‌ی شیشه‌ای یک گالنی مملو از باکتری‌های نورزا و ماده مغذی را در معرض دید عموم قرار داده، باکتری‌ها آنقدر نور تولید می‌کردند که با نور آن امکان مطالعه روزنامه فراهم می-گردید. به این ترتیب تحقیقات جدی پیرامون بیولومینسانس آغاز شد. در اوایل قرن بیستم دانشمندی آمریکایی به نام هاروی[5]، به عنوان رقیب دوبوآ، کارهای او را دنبال کرد و طی این سال‌ها پیگیرانه از سال ۱۹۱۶ تا ۱۹۳۱ مطالعات گسترده‌ای را انجام داد و جهت دیدن موجودات شب‌تاب به اقصی نقاط جهان از جمله ژاپن، جنگل‌های اندونزی و نقاط مختلف آمریکا سفر کرد. او در سال ۱۹۵۲ کتابی درباره بیولومینسانس به رشته تحریر در آورد ودر سال ۱۹۵۷ نیز کتاب تاریخچه لومینسانس[6] را نوشت. هاروی در سال ۱۹۱۷ موفق به کشف سیستم لوسیفرین-لوسیفراز در بدن نوعی سخت پوست دریایی به نام سیپریدینا *Cypridina* شد [۴].

---

[1] Francis Bacon
[2] Robert boyl
[3] Raphael Dubois
[4] Tachaf
[5] Edmund Newton Harvey
[6] A History of Luminescence

## ۲.۱ سیستم بیولومینسانس *Cypridina hilgendirfi*

*Cypridina* موجودی کلاسیک در تحقیقات مدرن بیولومینسانس محسوب می‌گردد. این حیوان نور آبی روشنی ازخود نشر می‌کند. *Cypridina* در دریای ژاپن و جامائیکا زندگی می‌کند [۵]. پروفسور هاروی استاد دانشگاه پرینستون آمریکا از سال ۱۹۱۶ کار خود را در ژاپن روی سیپریدینا آغاز کرد. او در سال ۱۹۱۷ موفق به کشف سیستم لوسیفرین- لوسیفراز در بدن این موجود گردید. در سال ۱۹۱۹ هاروی اظهار داشت که در طی واکنش بیولومینسانس سیپریدینا $CO_2$ آزاد می‌شود [۶].

### ۱.۲.۱ سیستم‌های بیولومینسانس با ماهیت فتوپروتئینی

در سال ۱۹۶۹، یک پروتئین بیولومینانس غیر عادی در ستاره دریایی[1] که برگرفته از نام جنس آن بود، به نام آکورین[2] کشف شد [۷]. برخی از این فتوپروتئین‌ها توانایی نشر نور را در محلول‌های آبی صرفا با افزودن مقدار کمی $Ca^{2+}$ داشتند. این پروتئین به طور شگفت‌آوری حتی در غیاب اکسیژن از خود نور ساطع می‌نمود. پس از برخی بررسی‌ها متوجه شدند که این نور توسط یک واکنش بین مولکولی که درون مولکول پروتئین رخ می‌دهد، ساطع می‌شود و مقدار کل نور منتشر شده متناسب با مقدار پروتئینی است که لومینانس می‌شود. در آن هنگام دریافتند که آکورین یک پروتئین استثنایی است که به طور تصادفی در طبیعت ساخته شده است [۷]. در سال ۱۹۶۶ یک پروتئین نوردهنده غیر عادی دیگری در کرم لوله‌ای[3] کشف گردید [۸]. این پروتئین در حضور پراکسید، آهن و اکسیژن در محیط واکنش قادر به نشر نور است. دراین کشف نیز مقدار کل نور منتشر شده متناسب با مقدار پروتئین مصرفی بود. این دو مثال بیانگر نوع دیگری از سیستمهای بیولومینسانسی، متفاوت از واکنش بیولومینسانس[4] لوسفرین – لوسیفراز بود که در آن لوسیفرین معمولاً یک سوبسترای آلی قابل انتشار و نسبتاً مقاوم به گرماست و لوسیفراز آنزیمی است که اکسیداسیون نوردهنده‌ی (لومینس) یک لوسیفرین را کاتالیز می‌کند [۸].

فتوپروتئین یک واژه عمومی برای پروتئین‌های بیولومینس می‌باشد که این پروتئین‌ها در اندام‌های روشن موجودات شب‌نما یا درخشان به عنوان ترکیب اصلی بیولومینس است و توانایی انتشار نور متناسب با مقدار پروتئین را دارند [۹].

---

[1] Aequrea
[2] Aequorin
[3] Chaetopterus
[4] Bioluminescence

نسبت انتشار نور باعث تمایز واضحی بین یک فتوپروتئین و یک لوسیفراز می‌شود. در یک واکنش لومینسانس لوسیفرین – لوسیفراز، مقدار کل نور منتشر شده با مقدار لوسیفرین متناسب است نه با مقدار لوسیفراز و در سیستم جدید در واقع پروتئین همان لوسیفرین سیستم لوسیفرین – لوسیفراز است که به عنوان فتوپروتئین شناخته شده است.

یک فتوپروتئین در حالت کمپلکس شده با سوبسترای خود پایدارتر از حالت جداگانه‌اش، یعنی یک پروتئین و یک سوبسترا می‌باشد. فتوپروتئین به خاطر پایداری بالایی که نسبت به فرم‌های جداگانه‌اش دارد، به عنوان نخستین ترکیب انتشار دهنده‌ی نور در اندام‌های تولید کننده نور می‌باشد. برای مثال اندام‌های نورزای ستاره‌دریایی آکوراَ دارای آکورین بوده، که در غیاب یون کلسیم بسیار پایدار است اما هر کدام از اجزای آن به تنهایی یعنی کولنترازین[1] آپوآکورین[2] ناپایدارند و به سختی در هر بخش از ستاره دریایی قابل تشخیص هست [۱۰].

در حال حاضر تقریبا ۳۰ نوع سیستم بیولومینسانس گوناگون شناخته شده‌اند که برای هریک اطلاعات بیوشیمیایی بنیادی وجود دارد. حدود نیمی از این سیستم‌ها فتوپروتئین‌ها هستند (جدول ۱–۱). این فتوپروتئین‌ها شامل نوع حساس به یون کلسیم شامل کولنترات‌ها (آکورین، اوبلین، کلایتین و میتروکامبین) و کتنوفورها (نمیوپسین، برووین و بولینوپسین)، انواع فعال سوپراکسیدی از یک کرم فلسی (پولینوئیدین) و صدف فولاس (فولاسین)، نوع فعال سوپراکسید هیدروژن از یک Brittle star (اوفیوپسیلا) و نوع فعال ATP از هزارپای سکویا[3] می‌باشند [۲].

## ۳.۱ فتوپروتئین‌های شناخته شده

فتوپروتئین‌هایی که تا کنون شناخته شده‌اند شامل موارد زیر می‌باشند، در جدول ۱–۱ اسامی فتوپروتئین‌هایی که تاکنون شناسایی، جداسازی و تخلیص شده‌اند آورده شده است.

### ۱.۳.۱ فتوپروتئین‌های رادیولاریان(پروتوزوآ)

فتوپروتئینی حساس به کلسیم، که شبیه به فتوپروتئین‌های کولنترات می‌باشد و از موجود رادیولاریان *(Thalassicola sp)* جداسازی شده، اما ویژگی‌هایش به طور مفصل بررسی نشده است [۱۱].

[1] Coelenterazine
[2] Apoaequorin
[3] Luminodesmus ( Sequoia millipede)