بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

بخش مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی

جداسازی، همسانه‌سازی و توصیف ملکولی ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های اندونوکلئاز اختصاصی تک‌رشته از گیاه جعفری (*Petroselinum crispum* L.) و ساخت سازه بیان پروکاریوتی آنزیم PARS II

مؤلف:

مهدیه میرزایی

استاد راهنما:

دکتر جعفر ذوالعلی

استاد مشاور:

دکتر محمد رهنمائیان

شهریورماه ۱۳۹۱

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط درجه کارشناسی ارشد به

بخش مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی

دانشکده کشاورزی

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچگونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمی شود.

دانشجو : مهدیه میرزایی

استاد راهنما : دکتر جعفر ذوالعلی

استاد مشاور : دکتر محمد رهنمائیان

داور ۱ : دکتر حمیدرضا کاوسی

داور۲ : دکتر جهانگیر حیدرنژاد

معاون آموزشی و پژوهشی دانشکده : دکتر مجید رحیم‌پور

نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر ابراهیم شکوهی

حق چاپ محفوظ و مخصوص به دانشگاه شهید باهنر کرمان است.

تقدیم به:

آنان که سرآغاز تولد من هستند

از یکی زاده می‌شوم و از دیگری جاودانه

پدری که سپیدی را بر تخته سیاه زندگیم نگاشت و مادری که تار مویی از او بپای من سیاه نماند...

تشکر و قدردانی:

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت‌های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. الهی مرا مدد کن تا دانش اندکم نه نردبانی باشد برای فزونی تکبر و غرور، نه حلقه‌ای برای اسارت و نه دست‌مایه‌ای برای تجارت، بلکه گامی باشد برای تجلیل از تو و متعالی ساختن زندگی خود و دیگران.

درود بر روح بلند مهندس افضلی‌پور و بانو فاخره صبا که نامی جاودانه از خود بر جای نهادند.

در ابتدا صمیمانه‌ترین تقدیرها تقدیم به خانواده عزیز و مهربانم که همواره حامی و مشوقم بوده‌اند و پیمودن روزهای سخت و آسان زندگی‌ام بدون دعای خیر و برکت وجودشان غیرممکن بود.

از استاد راهنمای بزرگوار و دلسوزم جناب آقای دکتر جعفر ذوالعلی که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، پدرانه و صبورانه مرا راهنمایی نموده و با ارائه نظرات سازنده و رهنمودهای بی‌دریغشان در پیشبرد این پایان‌نامه سعی تمام مبذول داشتند، کمال تشکر را دارم.

از استاد مشاور ارجمندم جناب آقای دکتر محمد رهنمائیان که در طول این تحقیق مرا مورد لطف و عنایت خویش قرار دادند، صمیمانه سپاسگزارم.

از داورین محترم، جناب آقای دکتر حیدرنژاد و جناب آقای دکتر کاوسی که زحمت بازخوانی و داوری این مجموعه را بر عهده داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

از کلیه اساتید گرانقدر گروه بیوتکنولوژی که در دوران تحصیل از محضرشان کسب فیض نمودم، تشکر می نمایم.

و در نهایت از تمامی دوستان و هم‌کلاسی‌های عزیزم که در طول این مدت افتخار آشنایی و مصاحبت با آنها را داشتم، به پاس محبت‌های بی دریغشان سپاسگزارم.

مهدیه میرزایی

شهریورماه ۱۳۹۱

چکیده:

تکنیک هضم آنزیمی DNA هترودوپلکس، یکی از متداول‌ترین تکنیک‌های مورد استفاده در شناسایی جهش‌های نقطه‌ای در قطعات ژنومی است. در حال حاضر، آنزیم‌های CEL I و CEL II استخراج‌شده از گیاه کرفس (*Apium graveolens* L.)، از کاربرد بسیار گسترده‌ای در این زمینه برخوردارند. این آنزیم‌ها بصورت عصاره خام آنزیمی و کیت‌های تجاری در دسترس محققان قرار دارند. در سال های اخیر تحقیقات متعددی در زمینه شناسایی و معرفی آنزیم های اندونوکلئاز جدید با قابلیت هضم اختصاصی نواحی هترودوپلکس در مولکول های DNA انجام شده است. شناسایی و توصیف هر آنزیم جدید در این حوزه، علاوه بر ارائه خصوصیات عملکردی و کاربردی بیشتر، اطلاعات جدیدی را در رابطه با مکانیزم عمل و تکامل ژنتیکی این خانواده آنزیمی در اختیار محققان قرار می‌دهد. در این تحقیق، با توجه به گزارش اخیر مبنی بر فعالیت نوکلئازی قوی‌تر عصاره آنزیمی گیاه جعفری (*Petroselinum crispum* L.) در مقایسه با گیاه کرفس، توالی‌های ژنی رمزکننده آنزیم‌های اندونوکلئاز اختصاصی تک‌رشته از گیاه جعفری جداسازی گردیده و به نام‌های PARS I و PARS II نامگذاری شدند. همچنین، جهت مقایسه ساختاری و بررسی کمیت و کیفیت فعالیت آنزیمی نوکلئازهای هدف از گیاه جعفری، توالی‌های کد کننده آنزیم های CEL I و CEL II نیز به عنوان نمونه‌های کنترل مثبت از گیاه کرفس جداسازی گردیدند. مطالعه خصوصیات فیزیکوشیمیایی، ساختار مولکولی و قرابت ژنتیکی نشان داد که دو آنزیم PARS I و PARS II به خانواده نوکلئازهای S1/P1 تعلق داشته و شباهت زیادی به نوکلئازهای CEL I و CEL II نشان می‌دهند. با توجه به مشابهت زیاد توالی ژنی *parsII* به نوکلئاز اصلی کیت‌های تشخیص جهش SURVEYOR® (آنزیم CEL II)، این توالی ژنی به ناقل بیان پروکاریوتی pQE60 به منظور تولید فرم نوترکیب آن در باکتری *E. coli* منتقل گردید. سازه بیانی ساخته شده، جهت تولید، خالص سازی و بررسی فعالیت آنزیمی پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

کلید واژه: نوکلئازهای اختصاصی تک رشته، جعفری، کرفس، همسانه سازی

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

۱- مقدمه ۲

۱-۱ کلیات ۲

۱-۲ جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، ساختار مولکولی و روند تکامل ژنتیکی اندونوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته از دو گیاه جعفری و کرفس ۵

۱-۳ بررسی امکان تولید نوترکیب آنزیم PARS II فعال در سیستم بیان پروکاریوتی ۶

۲- مروری بر منابع ۱۰

۲-۱ نوکلئازهای اختصاصی تک رشته DNA ۱۰

۲-۱-۱ نقش بیولوژیکی نوکلئازهای اختصاصی تک رشته ۱۴

۲-۱-۲ کاربردهای نوکلئازهای اختصاصی تک رشته ۱۶

۲-۱-۳ فعالیت ضد توموری برخی از نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته ۱۷

۲-۲ خصوصیات نوکلئازهای CEL I و CEL II ۲۰

۲-۲-۱ جنبه‌های کاربردی آنزیم اندونوکلئاز CEL I ۲۴

۲-۲-۲ نوکلئازهای با قابلیت کاربردی مشابه آنزیم CEL I ۲۸

۲-۳ روش‌های تولید نوکلئازهای برش‌دهنده DNA هترودوپلکس ۳۱

۲-۳-۱ تأمین فعالیت آنزیمی نوکلئازهای CEL I و CEL II ۳۱

۲-۳-۲ تولید نوترکیب نوکلئازهای برش‌دهنده DNA هترودوپلکس ۳۲

۲-۴ سیستم‌های بیان پروکاریوتی ۳۴

۲-۴-۱ سیستم *E. coli* ۳۵

۲-۴-۱-۱ جداسازی و انحلال اجسام ذخیره‌ای ۳۸

۲-۴-۱-۲ فسفوریلاسیون و استیلاسیون پروتئین‌های یوکاریوتی در سیستم *E. coli* ۳۹

۲-۴-۱-۳ انواع پروموتور در سیستم *E. coli* ۴۰

۲-۴-۲ سیستم لاکتوکوکوس لاکتیس ۴۱

۲-۵ سیستم‌های تجاری تولید پروتئین نوترکیب در *E. coli* ۴۲

۲-۵-۱ سیستم QIAexpress ۴۴

۲-۵-۱-۱ ناقلین pQE ۴۶
۲-۵-۱-۲ تنظیم بیان ۴۷
۲-۵-۱-۳ نژادهای *E. coli* میزبان ۴۸
۲-۵-۱-۴ تکنولوژی Ni-NTA ۴۸

۳- مواد و روش‌ها ۵۱
۳-۱ جداسازی و همسانه‌سازی توالی کامل رمزکننده اندونوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته از گیاه جعفری و کرفس ۵۱
۳-۱-۱ مواد گیاهی ۵۱
۳-۱-۲ استخراج RNA کل ۵۱
۳-۱-۳ تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده ۵۲
۳-۱-۴ واکنش نسخه‌برداری معکوس جهت سنتز cDNA ۵۳
۳-۱-۵ طراحی و سنتز آغازگرهای اختصاصی ۵۳
۳-۱-۶ واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای دژنره جهت تکثیر قطعات داخل ژنی ۵۵
۳-۱-۷ واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعه طول کامل ژن ۵۶
۳-۱-۸ آماده‌سازی قطعات DNA تکثیر شده برای همسانه‌سازی در ناقل پلاسمیدی ۵۷
۳-۱-۹ همسانه‌سازی قطعات ژنی در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T ۵۹
۳-۱-۹-۱ قرار دادن قطعه DNA مورد نظر درون ناقل ۵۹
۳-۱-۹-۲ آماده‌سازی باکتری *E. coli* جهت انجام ترانسفورماسیون ۶۰
۳-۱-۹-۳ انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری *E. coli* JM107 ..... ۶۱
۳-۱-۹-۴ گزینش کلنی‌های نوترکیب درمحیط کشت انتخابی حاوی آمپی‌سیلین، IPTG و X-Gal ۶۲
۳-۱-۹-۵ انتخاب کلنی‌های نوترکیب با استفاده از روش colony PCR ۶۲
۳-۱-۹-۶ استخراج پلاسمید نوترکیب از سلول‌های باکتری ترانسفورم شده ۶۳
۳-۱-۹-۷ تأیید پلاسمید نوترکیب با استفاده از آزمون PCR و واکنش هضم آنزیمی ۶۴
۳-۲ بررسی توالی قطعات ژنی تکثیر یافته ۶۱
۳-۲-۱ توالی‌یابی DNA ۶۵
۳-۲-۲ شناسایی و تأیید قطعات DNAی تعیین توالی شده ۶۵
۳-۲-۳ بررسی خصوصِیات فیزیکوشیمیایی و ساختمان توالی‌های آمینواسیدی ترجمه‌شده ۶۵
۳-۳ ساخت سازه بیانی pParsII-QE ۶۶
۳-۳-۱ تکثیر توالی کامل رمزکننده ژن *pars II* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۶۶
۳-۳-۲ آماده‌سازی ناقل و قطعه مورد نظر جهت انجام واکنش اتصال ۶۷
۳-۳-۳ واکنش اتصال ۶۷

۳-۳-۴ انتقال پلاسمید ناقل به باکتری *E. coli* M15 ..... ۶۸
۳-۳-۵ استخراج پلاسمید نوترکیب از سلول‌های باکتری ترانسفورم شده ۶۹
۳-۳-۶ تأیید پلاسمید نوترکیب با استفاده از آزمون PCR و واکنش هضم آنزیمی ۷۱

۴- نتایج ۷۳
۴-۱ جداسازی و همسانه‌سازی اندونوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته از گیاه جعفری (*Petroselinum crispum* L.) و کرفس (*Apium graveolens* L.) ۷۳
۴-۱-۱ جداسازی و همسانه‌سازی قطعات داخلی ۷۳
۴-۱-۱-۱ تکثیر قطعات داخلی PI387، CI387، PII275، PII240، CII275 ..... ۷۳
۴-۱-۱-۲ توالی‌یابی DNA و بررسی توالی قطعات تکثیرشده ۷۶
۴-۱-۲ جداسازی و همسانه‌سازی ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های CEL I, CEL II ,PARS I ,PARS II ۷۸
۴-۱-۲-۱ تکثیر ژن‌های *cel I, cel II ,pars I ,pars II* ۷۸
۴-۱-۲-۲ انتقال پلاسمیدهای ناقل pParsI-TZ، pParsII-TZ، pCelI-TZ و pCelII-TZ به باکتری *E.coli* JM107 ..... ۷۸
۴-۱-۲-۳ تأیید انتقال پلاسمیدهای ناقل با استفاده از واکنش Colony PCR ۷۹
۴-۱-۲-۴ تأیید پلاسمید ناقل با استفاده از واکنش PCR و هضم آنزیمی ۷۹
۴-۲ بررسی خصوصیات توالی‌ها ۸۱
۴-۲-۱ بررسی توالی ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های اندونوکلئاز اختصاصی تک‌رشته در دو گیاه جعفری و کرفس ۸۱
۴-۲-۲ بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و ساختار مولکولی پروتئین‌های آنزیمی PARS I و PARS II ۸۲
۴-۲-۲-۱ بررسی خصوصیات بیوشیمیایی نوکلئازهای PARS I و PARS II ۸۲
۴-۲-۲-۲ بررسی ساختمان دوم و مدلسازی مولکولی پروتئین‌های آنزیمی PARS I و PARS II ۸۷
۴-۲-۳ بررسی فیلوژنتیکی پروتئین‌های آنزیمی PARS I و PARS II ۹۱
۴-۲-۳-۱ بررسی فیلوژنتیکی در سطح ساختمان اول پروتئین‌ها ۹۱
۴-۲-۳-۲ همردیف کردن توالی‌ها و مقایسه خصوصیات بیوشیمیایی ۹۳
۴-۲-۳-۳ بررسی فیلوژنتیکی در سطح ساختمان دوم پروتئین‌ها ۹۶
۴-۳ ساخت سازه بیانی pParsII-QE ۹۸
۴-۳-۱ تکثیر ژن *pars II* و انجام واکنش اتصال ۹۸
۴-۳-۲ انتقال پلاسمید ناقل pParsII-QE به باکتری بیانی *E. coli* M15 ..... ۹۸
۴-۳-۳ تأیید پلاسمیدهای ناقل با استفاده از واکنش PCR و هضم آنزیمی ۹۹

۵- بحث و نتیجه‌گیری ۱۰۱
۵-۱ جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و ساختار مولکولی اندونوکلئازهای ۱۰۱

اختصاصی تک‌رشته از گیاه جعفری (*Petroselinum crispum* L.) و کرفس (*Apium graveolens* L.)
۵-۲ بررسی فیلوژنتیکی پروتئین‌های آنزیمی PARS I و PARS II ۱۰۳
۵-۳ ساخت سازه بیانی آنزیم PARS II در سیستم بیان *E. coli* ۱۰۷
۵-۴ پیشنهادات ۱۰۸

منابع ۱۱۰

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

۱-۱ کلیات

در تاریخ ۱۲ دسامبر ۱۹۴۶ و مدت‌ها قبل از کشف مارپیچ دوگانه DNA، دکتر هرمان مولر[۱] در سخنرانی نوبل خود به اهمیت درک تغییرات میکروسکوپی موسوم به جهش اشاره نمود. او جهش را عامل به وجود آورنده تغییرات در ژنوم و نیروی محرکه تکامل در سلول‌های ژرمینال معرفی نمود. اکنون پس از گذشت ۶۰ سال از آن زمان و با داشتن شناخت جامع‌تری از DNA، ژن، ژنوم و ساختار و عملکرد جهش‌ها، جهش‌زایی و تنوع توالی‌های طبیعی بطور گسترده‌ای در شناسایی عملکردهای جدید، ژن‌های مرتبط با یک عملکرد خاص و همچنین شناسایی مناطق فعال در یک پروتئین بخصوص مورد استفاده قرار می‌گیرند. یک اصل مهم در انجام این روش، بخصوص در مورد جهش‌های نقطه‌ای، استفاده از روش‌های آشکارسازی با حساسیت و اختصاصیت بسیار بالا به منظور غربال قطعات بزرگ DNA می‌باشد. با توجه به اهمیت آشکارسازی جهش‌های نقطه‌ای در ژنتیک و پزشکی، تاکنون تکنیک‌های متعددی برای آشکارسازی این جهش‌ها در ژنوم موجودات ابداع گردیده است. تعیین توالی قطعات DNA یا محصولات تکثیر اختصاصی قطعات موردنظر، آزمون Taq-man، استفاده از سیگنال‌های مولکولی در Real time PCR، آزمون اتصال الیگونوکلئوتید، چیپ‌های DNA و ریزآرایه‌ها، تکنیک‌های متعددی هستند که هر یک با قابلیت‌های خاص خود برای آشکارسازی جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی در توالی‌های ژنومی مورد

۱- Hermann J. Muller

استفاده قرار می‌گیرند. با این وجود، آنچه که در این زمینه بسیار مطلوب خواهد بود، وجود تکنیکی است که علاوه بر قابلیت بکارگیری در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف، کم هزینه و نیازمند به امکانات آزمایشگاهی کمتر بوده و همچنین بتواند بطور همزمان، اطلاعاتی در ارتباط با مکان جهش در اختیار محقق قرار دهد (گوپتا و همکاران، ۲۰۰۱).

اولیکفسکی[۱] و همکاران (۱۹۹۸)، روشی برای شناسایی و آشکارسازی جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی ارائه دادند که مبتنی بر کشف آنزیم اندونوکلئاز CEL I از خانواده اندونوکلئازهای S1/P1 در گیاه کرفس بود. این آنزیم به عنوان اولین آنزیم یوکاریوتی شناخته می‌شود که قادر به برش اختصاصی لوپ‌های جفت‌شدگی ناجور[۲] در قطعات DNA هترودوپلکس می‌باشد. مزیت‌های منحصربفرد این آنزیم نسبت به سایر آنزیم‌های هم‌خانواده خود نظیر نوکلئاز S1، نوکلئاز P1 و نوکلئاز مانگ‌بین، فعالیت بسیار اختصاصی بر روی قطعات DNA هترودوپلکس و فعالیت مطلوب در شرایط pH خنثی است. آنزیم CEL I یک مانوزیل‌گلیکوپروتئین است که انتهای ´۳ لوپ‌های تشکیل شده در قطعات دو رشته‌ای DNA هترودوپلکس را در مکان‌های تغییر نوکلئوتیدها و درج و حذف‌های نوکلئوتیدی کوچک برش می‌دهد (یانگ و همکاران، ۲۰۰۰). اولیکفسکی و همکاران، پس از کشف آنزیم CEL I، روش هضم آنزیمی DNA هترودوپلکس برای غربال جهش‌ها را ارتقا داده و یک روش ساده و بسیار مؤثر را برای شناسایی جهش‌های نقطه‌ای معرفی کردند. در این تکنیک می‌توان مکان‌های ژنی حامل جهش را در یک فرد هتروزیگوت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر کرده و با انجام یک واسرشته‌سازی و در پی آن دورشته‌ای کردن محصولات PCR، قطعات DNA هترودوپلکس حامل لوپ در محل جفت‌شدگی ناجور بازها را بوجود آورد. آنزیم CEL I قادر به برش قطعه DNA هترودوپلکس در محل لوپ جفت‌شدگی ناجور است. بدین ترتیب ضمن کشف یک جهش تک‌نوکلئوتیدی، می‌توان به مکان آن نیز در قطعه DNA موردنظر دست یافت.

تکنیک هضم آنزیمی DNA هترودوپلکس، یکی از متداول‌ترین تکنیک‌های مورد استفاده در شناسایی جهش‌های نقطه‌ای در قطعات ژنومی است. در حال حاضر، محققان از این تکنیک برای تشخیص جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی و درج و حذف‌های کوچک در جنبه‌های مختلف زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیک پزشکی شامل توصیف آلل‌های جهش یافته مرتبط با بیماری‌های لاعلاج نظیر سرطان (وگیاتزاکیس و همکاران، ۲۰۰۷)، تفسیر وقایع مولکولی عامل ناهنجاری‌های

۱- Oleykowski
۲- Mismatch loop

ژنتیکی (شی و همکاران، ۲۰۰۷)، شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات کیفی (ونگ و همکاران، ۲۰۰۶ و نیتو و همکاران، ۲۰۰۷)، اصلاح مبتنی بر نشانگرهای مولکولی (برادی و همکاران، ۲۰۰۷)، تعیین تنوع ژنتیکی و مطالعات فیلوژنتیکی (سوکورنکوف و همکاران، ۲۰۰۱ و کومای و همکاران، ۲۰۰۴) و پروژه‌های TILLING استفاده می‌نمایند (کومای و همکاران، ۲۰۰۶).

جنبه‌های کاربردی گسترده آنزیم CEL I سبب شده است که این آنزیم بشدت مورد تقاضای محققان در تحقیقات مرتبط باشد و همین امر تقاضای جهانی قابل توجهی را برای آن به وجود آورده است. هر محقق بسته به نوع تحقیق، تجهیزات آزمایشگاهی و امکانات مالی که در اختیار دارد، می‌تواند فعالیت آنزیمی CEL I را با استفاده از نمونه آنزیم خالص، کیت‌های تجاری SURVEYOR®، یا عصاره آنزیمی تغلیظ شده تأمین نماید. یک آنزیم مشابه CEL I، با نام CEL II، که این آنزیم نیز از گیاه کرفس جداسازی شده است، با نام تجاری Surveyor™ nuclease توسط کمپانی ترانسژنومیک[۱] به بازار عرضه می‌گردد (پیمکین و همکاران، ۲۰۰۷). این آنزیم، pH بهینه بالاتری نسبت به آنزیم CEL I داشته و همچنین با داشتن قابلیت برش دورشته‌ای در محل لوپ جفت‌شدگی ناجور بازها، کارایی بسیار بیشتری در برش DNA هترودوپلکس نسبت به نوکلئاز CEL I از خود نشان می‌دهد، ولی جای تعجب است که تاکنون هیچ گزارش رسمی (البته بجز دو سند ثبت اختراع US7129075B2 و US7560261B2) در مورد این آنزیم ارزشمند و روش‌های تولید نوترکیب آن ارائه نشده‌است. آنزیم CEL II این امکان را مهیا می‌سازد که بتوان بسادگی مولکول‌های DNA هترودوپلکس را بطور اختصاصی در محل لوپ جفت‌شدگی ناجور بازها برش داده و محصولات هضم آنزیمی را بر روی ژل آگاروز معمولی تفکیک و آشکارسازی نمود.

عرصه‌هایی همچون تشخیص مولکولی آلل‌های جهش‌یافته عامل مقاومت، نقص یا بیماری، تعیین تنوع ژنتیکی، گزینش به کمک نشانگرهای مولکولی و تعیین عملکرد ژن‌های ناشناخته، عرصه‌هایی بزرگ و بنیادین در علوم مرتبط با بیولوژی مولکولی می‌باشند که اهمیت نقش چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی و آشکارسازی این چندشکلی‌ها در هر یک از این عرصه‌ها اجتناب‌ناپذیر است. در تحقیق حاضر، با هدف دستیابی به آنزیم‌هایی با خصوصیات بهتر از آنزیم‌های شناخته‌شده کنونی و با این فرض که عصاره آنزیمی گیاه جعفری، فعالیت آنزیمی

۱- Transgenomic Inc.

بهتری نسبت به عصاره آنزیمی کرفس نشان می‌دهد، نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته از این دو گیاه جداسازی و ساختار مولکولی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱-۲ جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، ساختار مولکولی و روند تکامل ژنتیکی اندونوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته از دو گیاه جعفری و کرفس

اگرچه چندین آنزیم نوکلئاز اختصاصی تک رشته از خانواده نوکلئازهای S1/P1 (نظیر نوکلئازهای SPI، S1، مانگ‌بین[۱]، و ENDO1)، قابلیت خود را برای هضم سوبسترای DNA هترودوپلکس در شرایط آزمایشی نشان داده‌اند، اما تاکنون آنزیم CEL I انتخاب اصلی محققان برای تحقیقات غربال جهش بوده است (تریکوز[۲] و همکاران، ۲۰۰۷). هر یک از آنزیم‌هایی که تاکنون شناسایی شده‌اند، خصوصیات ساختاری و قابلیت‌های عملکردی منحصربفردی را نشان می‌دهند. این آنزیم‌ها از قابلیت‌های متفاوتی برای شناسایی و برش انواع مختلف لوپ جفت شدگی ناجور در مولکول‌های DNA هترودوپلکس برخوردار می‌باشند. به عنوان مثال، نوکلئاز SPI که از اسفناج جداسازی شده است، قادر به برش لوپ‌های حاوی باز گوانین، نمی‌باشد (اولیکفسکی و همکاران، ۱۹۹۹). نوکلئاز ENDO1 از آرابیدوپسیس، انواع مختلف لوپ را با کارایی مطلوب در شرایط آزمایشی برش می‌دهد، در حالی که آنزیم متناظر آن، ENDO5، لوپ‌های جفت‌شدگی ناجور نظیر T/G و A/G را نسبت به T/C یا A/C با کارایی بیشتری برش می‌دهد (تریکوز و همکاران، ۲۰۰۷). آنزیم CEL I نیز اگرچه از قابلیت برش تمام انواع لوپ‌ها برخوردار است، اما کارایی آن برای برش برخی لوپ‌ها نظیر C/C و C/A بیشتر است (اولیکفسکی و همکاران، ۱۹۹۸ و یانگ و همکاران، ۲۰۰۰).

شناسایی فعالیت‌های آنزیمی جدید در عصاره‌های مختلف گیاهی و توصیف آنزیم‌های متناظر، دانش موجود در مورد ساختار و مکانیزم عمل این گروه آنزیمی را افزایش داده و ابزارهای جدیدی با ویژگی‌های عملکردی جدید را به خزانه آنزیمی مورد استفاده در تحقیقات غربال جهش اضافه می‌نماید. در این راستا، ذوالعلی و همکاران (۲۰۰۹)، با هدف شناسایی و بررسی فعالیت‌های آنزیمی مشابه CEL I از منابع گیاهی جدید و به‌منظور دستیابی احتمالی به فعالیت‌های آنزیمی بهتر با خصوصیات متفاوت، میزان بیان ژن و فعالیت آنزیمی CEL I را در گیاه کرفس، با اورتولوگ‌های احتمالی آن در برخی گیاهان خانواده چتریان (Apiaceae) از قبیل شوید، رازیانه،

۱-Mung Bean
۲-Triques

جعفری، هویج و گشنیز مورد مقایسه قرار دادند و درنهایت به این نتیجه رسیدند که عصاره‌آنزیمی استخراج شده از گیاه جعفری از قابلیت برش DNA هترودوپلکس با کارایی تقریباً دو برابر نسبت به عصاره آنزیمی کرفس برخوردار می‌باشد. این در حالی است که اولیکفسکی و همکاران (۱۹۹۸)، با مقایسه فعالیت‌های آنزیمی مشابه CEL I در گیاهان مختلف، فعالیت عصاره آنزیمی جعفری را تقریباً نصف فعالیت آنزیمی عصاره کرفس گزارش کرده‌بودند. البته دلیل این تفاوت را می‌توان استفاده از گیاه جعفری رقم محلی ایران توسط ذوالعلی و همکاران دانست. بااین‌حال، فعالیت آنزیمی بیش از انتظار عصاره آنزیمی جعفری ایرانی در مقایسه با سطح پایین بیان mRNA متناظر CEL I در این گیاه، این احتمال را مطرح ساخت که یک نسخه بسیار فعال از آنزیم مشابه CEL I و یا آنزیم دیگری با قابلیت مشابه در این گیاه بیان می شود. از این‌رو در تحقیق حاضر، به منظور پاسخ به ابهامات موجود و با هدف دستیابی به آنزیمی با خصوصیات بهتر نسبت به نوکلئازهای شناخته‌شده کنونی، ضمن جداسازی و همسانه‌سازی طول کامل cDNA رمزکننده آنزیم‌های نوکلئاز اختصاصی تک‌رشته از گیاه جعفری ایرانی (*Petroselinum crispum* L.) و نامگذاری این نوکلئازها تحت عناوین PARS I و PARS II، ساختار مولکولی، خصوصیات بیوشیمیایی و جایگاه فیلوژنتیکی آنها در مقایسه با سایر نوکلئازهای هم‌خانواده خود مشخص گردید. از آنجا که هدف نهایی این تحقیق، معرفی یک کیت تشخیصی با خصوصیات متمایز خواهد بود، لذا به منظور تخمین میزان فعالیت آنزیمی نوکلئازهای PARS I و PARS II در مقایسه با نوکلئازهای CEL I و CEL II که در حال حاضر مهمترین نوکلئازهای برش‌دهنده DNA هترودوپلکس محسوب می‌شوند، توالی کامل رمزکننده این نوکلئازها نیز همسانه‌سازی و توالی‌یابی شد. شناسایی آنزیم‌های برش‌دهنده لوپ در گیاه جعفری، گامی ارزشمند در راستای تولید کیت‌های تجاری کارآمد جهت غربال جهش‌های نقطه‌ای مبتنی بر عمل مشترک آنزیم‌های نوترکیبی که عمل‌های مشابه و قابلیت‌های متفاوت دارند، خواهد بود.

۱-۳ بررسی امکان تولید فرم نوترکیب آنزیم PARS II فعال در سیستم بیان پروکاریوتی

دستیابی به آنزیم‌های نوترکیب با قابلیت خالص‌سازی آسان، گامی بزرگ در راستای تولید آنزیم‌های ارزشمند و ایجاد امکان تولید تجاری آنها می‌باشد. با توجه به بازده پایین روش‌های خالص‌سازی موجود، تاکنون تلاش‌های زیادی در زمینه تولید نوترکیب مهمترین نوکلئازهای برش‌دهنده DNA هترودوپلکس انجام گرفته‌است. از آن جمله؛ تولید نوکلئاز CEL I نوترکیب در

سیستم‌های بیان توباموویروس (سند ثبت اختراع WO03/06680)، باکولوویروس (پیمکین و همکاران، ۲۰۰۷)، مخمر (بارون و همکاران، ۲۰۰۴) و بیان موقت بواسطه اگروباکتریوم (بندهمان[۱] و همکاران، ۲۰۰۹)، تولید نوکلئاز SPI نوترکیب در سیستم باکولوویروس (پیمکین و همکاران، ۲۰۰۷) و تولید نوکلئاز ENDO1 نوترکیب بصورت بیان موقت بواسطه اگروباکتریوم (تریکوز و همکاران، ۲۰۰۸) می‌باشد. بررسی فعالیت هر یک از نوکلئازهای تولید شده نشان داده‌است که روش‌های نوترکیب، علاوه بر تولید مقادیر زیاد آنزیم در مدت زمان کم، نوکلئازهایی با خواص آنزیمی بهتر تولید می‌کنند (بندهمان و همکاران، ۲۰۰۹). لذا روش‌های تولید نوترکیب، جایگزین بسیار مناسبی برای روش‌های خالص‌سازی موجود خواهند بود.

مهمترین وجه در انتخاب یک روش نوترکیب مناسب، سریع بودن، آسان بودن و مقرون به‌صرفه بودن آن است. سیستم‌های باکتریایی، ساده‌ترین و پرطرفدارترین سیستم‌های میزبانی هستند که جهت بیان پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرند. تلاش‌های زیادی نیز در زمینه تولید این نوکلئازها در سیستم باکتریایی انجام گرفته، ولی هیچ‌یک از آنها به تولید نوکلئاز فعال منجر نشده‌است. بعنوان مثال؛ تلاش‌های اولیه تریکوز و همکاران (۲۰۰۸) به منظور بیان ENDO1 و CEL I در سیستم پروکاریوتی *E. coli* با موفقیت همراه نبود و حتی پس از موفقیت نیز، پروتئین بدست‌آمده فعالیت نوکلئازی نشان نداد. همچنین پیمکین و همکاران (۲۰۰۷) نیز، در تولید CEL I نوترکیب در سیستم‌های بیان پروکاریوتی موفق نبودند. از آنجا که اغلب نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته در حالت فعال بصورت گلیکوپروتئین خارج سلولی می‌باشند، لذا می‌توان مهمترین دلیل این اتفاق را عدم قابلیت سیستم باکتریایی درگلیکوزیله نمودن پروتئین بیان شده دانست.

یانگ و همکاران (۲۰۰۰)، فعالیت آنزیم‌های CEL I و CEL II بازیابی شده از روی ژل SDS را، قبل و پس از حذف قسمت کربوهیدرات پروتئین با استفاده از هضم آنزیمی $Endo\ H_f$، بر روی سوبسترای DNA هترودوپلکس مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد که آنزیم CEL II غیرگلیکوزیله بسیار فعال‌تر از آنزیم CEL I در هر دو حالت گلیکوزیله و غیرگلیکوزیله بوده و می‌تواند براحتی لوپ‌های ناجورباز را شناسایی و برش دهد. بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که واحدهای گلیکان متصل به آنزیم CEL II در تعیین فعالیت این آنزیم تأثیر چندانی ندارند. با توجه به عدم حضور تغییرات پس از ترجمه و گلیکوزیلاسیون در سیستم‌های بیان باکتریایی، انتظار می‌رود که آنزیم CEL II تولید شده در این سیستم فعال باشد. از آنجا که

۱-Bendahmane

نوکلئاز PARS II بدست‌آمده در این تحقیق، شباهت بالایی به آنزیم اصلی کیت‌های تشخیص جهش SURVEYOR® (آنزیم CEL II) نشان می‌دهد، لذا بنظر می‌رسد که تولید این آنزیم در یک سیستم ساده و سریع مانند سیستم باکتریایی امکان‌پذیر باشد. بنابراین در این تحقیق، سازه بیانی آنزیم PARS II به منظور تولید فرم نوترکیب آن در سیستم باکتریایی *E. coli*، ساخته شد.

فصل دوم

مروری بر منابع

۲- مروری بر منابع

۲-۱ نوکلئازهای اختصاصی تک رشته[۱] DNA

تمام موجودات زنده دارای آنزیم‌هایی موسوم به نوکلئاز هستند که قادرند پیوندهای فسفودی‌استر در اسیدهای نوکلئیک را هیدرولیز نمایند. بعضی از آنزیم‌های نوکلئاز در داخل سلول و برخی دیگر در خارج از سلول و در فضای بین سلولی یافت می‌شوند. در داخل سلول این آنزیم‌ها نقش‌های مهمی را در فرایندهای نوترکیبی، همانندسازی، هضم آنزیمی و ترمیم DNA ایفا می‌نمایند. انواع خارج سلولی نیز با هضم DNA آزاد، نوکلئوتیدهای آزاد شده را به چرخه سوخت‌وساز سلولی وارد می‌کنند. انواع بسیار مختلفی از آنزیم‌های نوکلئاز در سیستم‌های زنده شناسایی شده‌اند که بر اساس خصوصیاتی از قبیل هیدرولیز DNA یا RNA، فعالیت اگزونوکلئازی یا اندونوکلئازی، جهت هضم مولکول اسید نوکلئیک، ماهیت پیوند هیدرولیز شده، و عمل اختصاصی بر روی مولکول تک‌رشته‌ای یا دو رشته‌ای، گروهبندی می‌شوند (دسای و شانکار[۲]، ۲۰۰۳ و مارتی و فلک[۳]، ۲۰۰۴).

نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته که به نوکلئازهای خانواده S1 و یا S1/P1 نیز معروف می‌باشند، بطور اختصاصی مولکول‌های اسید نوکلئیک تک‌رشته‌ای و همچنین نواحی تک‌رشته‌ای

۱-Single strand specific (sss) nucleases
۲-Desai and Shankar
۳-Marti and Fleck