بسم الله الرحمن الرحيم

pdfMachine
A pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

(گرایش بیوشیمی)

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

مطالعه‌ی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین کایمر حاصل از دو آنزیم الاستاز و ترمولیزین

از:

نرگس اسدی

استاد راهنما:

دکتر سید محسن اصغری

استادان مشاور:

دکتر رضا حسن ساجدی

دکتر مجید تقدیر

اسفند ۱۳۹۰

pdfMachine
A pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

تقدیم به کسانی که محبت آل الله را در وجودم قراردادند:

پدر مهربانم

و

مادر صبورم

و تقدیم به:

دو استاد اندیشه و تفکرم، بزرگوارترین و بی نظیرترین همراهان زندگیم،دو بزرگواری که در مکتب علم و اخلاق شان بسیار آموختم:

برادرم خسرو

و

خواهرم منیژه

و تقدیم به

دوستداران حقیقی علم و دانش

pdfMachine
A pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

به نام تو

ایمان دارم که هر تغییر و تحول بزرگی در مسیر زندگی بدون تحول معرفت و نگرش، میسر نخواهد بود. پس بیائید با توکل، تلاش و تامل در توسعه‌ی دنیای فکریمان برای نیل به آرامش و آسایش توامان اولین گام را برداریم، چون همگی یقین داریم دانایی، توانایی می-آورد.

از استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر سید محسن اصغری بخاطر تمام محبت ها و راهنمایی های بیدریغ شان بی نهایت سپاسگزارم.

از الطاف استادان مشاور ارجمندم، آقای دکتر رضا حسن ساجدی و آقای دکتر مجید تقدیر قدردانی می کنم.

از پروفسور ریحانه سریری بخاطر قبول زحمت داوری رساله و راهنمایی های ارزنده شان کمال تشکر را دارم.

از استاد فرزانه ام، جناب آقای دکتر محمود رضا آقا معالی بخاطر تمام محبت ها و راهنمایی های بیدریغ شان بی نهایت سپاسگزارم و خداوند را شاکرم که افتخار فراگیری اخلاق را در محضر ایشان به من عطا نمود.

از کارشناسان محترم گروه زیست شناسی، سرکار خانم ها هادوی و امیدی تشکر می کنم.

از دوست و همراه عزیزم، آقای نیما چند که در نهایت بزرگواری، صبر و حوصله ،دلسوزانه مرا همراهی نمودندصمیمانه قدردانی می کنم.

از خواهران عزیزم خانم ها رضوان احمدی، مهدیه فرجی، سارا پورآقاجان وسایر دوستان خوبم در آزمایشگاه های تکوین، ژنتیک، زیست دریا،فیزیولوژی گیاهی، شیمی تشکر می کنم.

خداوندا شاکرم که در جمع این عزیزان بزرگوار بزرگترین نعمت هایت را بر من ارزانی نمودی تا فرصت آموختن را در کنارشان داشته باشم .

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

چکیده

مطالعه‌ی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین کایمر حاصل از دو آنزیم الاستاز و ترمولیزین

نرگس اسدی

Zn -متالوپروتئازها یک گروه از آنزیم‌های متعلق به خانواده متالوپروتئازها می‌باشند. اخیرا با توجه به کاربرد این آنزیم‌ها در صنعت به‌خصوص در صنایع غذایی، همچنین پزشکی و نیز طراحی داروها بسیار مورد توجه بوده‌اند. الاستاز سودوموناس آئروجینوزا و ترمولیزین حاصل از باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس جزو این خانواده بوده و دارای مشابهت بالایی در توالی و همچنین همولوژی بالایی دارند. این آنزیم‌ها دارای یک یون روی در جایگاه فعال اند که برای فعالیت ضروری می‌باشد، الاستاز در لوپ اتصالی به کلسیم دارای ۱ یون کلسیم و ترمولیزین دارای ۴ یون کلسیم می‌باشد، به علت وجود این یون‌های کلسیم ترمولیزین پایداری حرارتی بالاتری را دارا می‌باشد، در این تحقیق کلسیم‌های ۱، ۲ و ۴ این آنزیم با لوپ موجود در الاستاز که حاوی کلسیم می‌باشد جایگزین شد و بدین شکل پروتئین کایمر طراحی و سنتز شد. در مطالعات قبلی، ژن این آنزیم از گونه‌ی باکتریایی سودوموناس آئروجینوزا (PTCC 1430) جداسازی، کلون و بیان گردیده بود.در طی آزمایشات نتایج نشان دادند که بیان پروتئین در دمای ۳۰ درجه‌ی‌سانتی‌گراد، با ۴ ساعت انکوباسیون بعد القاء در غلظت یک میلی‌مولار IPTG افزایش یافته است، در این مرحله به منظور بهینه کردن مدت زمان بیان در فواصل مختلف از باکتری‌های القاء شده نمونه‌برداری شد، سپس بیان پروتئین کایمر درون *E. coli* سویه‌ی BL21 صورت گرفت و در نهایت پس از تائید بیان پروتئین کایمر توسط SDS-PAGE، عملکرد پروتئین کایمر نیز مورد بررسی قرار گرفت. سپس به تعیین ویژگی‌های الاستاز وحشی و پروتئین کایمر نظیر pH مطلوب، دمای مطلوب، شرایط بیانی مطلوب (میزان بیان در دماها، زمان‌ها) پرداخته شد. اثر دما و pHهای مختلف بر روی فعالیت پروتئین کایمر، فعالیت بهینه را در $70^{\circ}C$ نشان داد که نسبت به الاستاز وحشی که تعیین خصوصیت شده بود، ۱۰ درجه به سمت دماهای بالاتر شیفت پیدا کرده بود و pH اپتیمم برای فعالیت آنزیم ۸.۵ بود که نسبت به نو ع وحشی آن تغییر نیافته بود. در نهایت با استفاده از همولوژی مدلینگ مدل الاستاز وحشی، پروتئین کایمر برای استفاده در محاسبات تئوری از قبیل DCCM, RMSD, RMSF و میانکنش های الکترواستاتیک ساخته شد.

واژه‌های کلیدی: Zn -متالوپروتئاز، پروتئین کایمر، سینتیک، همولوژی مدلینگ

pdfMachine
A pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی ض

چکیده انگلیسی ط

فصل اول: مقدمه و تئوری ۱

۱-۱ آنزیم‌ها و اهمیت آن‌ها ۲

۱-۱-۱ کاربرد آنزیم‌ها ۲

۱-۲ روش‌های دستیابی به فعالیت آنزیمی با خواص جدید ۳

۱-۳ مهندسی پروتئین ۳

۱-۳-۱ روش‌های به کار رفته به‌منظور اصلاح ویژگی پروتئین‌ها ۵

۱-۴ عوامل موثر در پایداری پروتئین ۷

۱-۴-۱ افزایش پایداری در مهندسی پروتئین ۸

۱-۴-۲ ارتباط پایداری و فعالیت پروتئین‌ها ۹

۱-۵ تقسیم‌بندی میکروارگانیسم‌ها بر اساس دما ۱۰

۱-۵-۱ ترموفیل‌ها ۱۰

۱-۶ سودوموناس آئروجینوزا ۱۰

۱-۷ پروتئاز ۱۱

۱-۷-۱ متالوپروتئازها ۱۲

۱-۷-۱-۱ طبقه‌بندی متالوپروتئازها ۱۲

۱-۷-۱-۱-۱ متالوپروتئازهای حاوی یون روی (Zn-metalloproteases) ۱۳

۱-۷-۱-۱-۱-۱ ساختار خانواده M4 متالوپروتئازها ۱۵

۱-۷-۱-۱-۱-۲ کاربردهای آنزیم‌های خانواده‌ی M4 ۱۶

۱-۷-۱-۱-۲ آنزیم‌های خانواده پروتئازهای ترمولیزین-مانند (TLPs) ۱۶

۱-۷-۱-۱-۲-۱ الاستاز ۱۷

pdfMachine
A pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

۱-۷-۱-۱-۲-۱-۱ مکانیسم ترشحی و بلوغ الاستاز ۱۹

۱-۷-۱-۱-۲-۱-۲ بررسی توالی نوکلئوتیدی الاستاز ۲۱

۱-۷-۱-۱-۲-۲ ترمولیزین ۲۳

۱-۸ جایگاه فعال الاستاز و ترمولیزین ۲۴

۱-۹ ناحیه‌ی hinge و اهمیت آن در فعالیت ۲۵

۱-۱۰ نقش یون کلسیم در پروتئازها ۲۷

۱-۱۰-۱ لوپ اتصال به کلسیم در ترمولیزین ۲۷

۱-۱۱ مقایسه‌ی الاستاز و ترمولیزین ۲۷

۱-۱۲ مکانیسم عمل الاستازو ترمولیزین ۳۰

۱-۱۳ پروتئین کایمر (هیبرید) ۳۱

۱-۱۴ دینامیک ملکولی پروتئین‌ها ۳۲

۱-۱۴-۱ شبیه‌سازی دینامیک ملکولی ۳۲

۱-۱۴-۱-۱ مرحله‌ی آغاز شبیه‌سازی ۳۳

۱-۱۴-۱-۲ افزایش دمای سیستم ۳۳

۱-۱۴-۱-۳ متعادل‌سازی شبیه‌سازی ۳۴

۱-۱۴-۱-۴ مرحله تولید شبیه‌سازی ۳۴

۱-۱۴-۱-۵ تحلیل نتایج شبیه‌سازی دینامیک ملکولی ۳۴

۱-۱۴-۲ اهمیت دینامیک مولکولی پروتئین‌ها در عملکرد ۳۵

۱-۱۵ هدف از تحقیق ۳۹

فصل دوم: مواد و روش‌ها ٤٠

۲-۱ دستگاه‌های مورد استفاده ۴۱

۲-۲ مواد شیمیایی مورد استفاده ۴۱

۲-۳ فیلترها و کیت‌های مورد استفاده ۴۱

pdfMachine
A pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

۲-۴ میکروارگانیسم‌های مورد استفاده ۴۱

۲-۵ تخلیص پروتئازها ۴۱

۲-۶ روش‌های الکتروفورزی ۴۳

۲-۶-۱ SDS-PAGE ۴۳

۲-۶-۲ تهیه محلول‌های رنگ‌آمیزی کوماسی بلو ۴۳

۲-۶-۳ انجام رنگ آمیزی کوماسی‌بلو ۴۳

۲-۶-۴ الکتروفورز ژل آگارز ۴۴

۲-۶-۵ مراحل انجام زایموگرام ۴۴

۲-۷ انتقال ناقل جدید به میزبان ۴۵

۲-۷-۱ استخراج پلاسمید ۴۵

۲-۷-۲ تعیین توالی نوکلئوتیدی ۴۵

۲-۸ بیان الاستاز ۴۶

۲-۹ تهیه محتوای سلولی از باکتری ۴۶

۲-۱۰ منحنی وابستگی فعالیت به دما ۴۶

۲-۱۰-۱ اثر دما روی فعالیت الاستاز و کایمر ۴۷

۲-۱۱ اثر pH روی فعالیت الاستاز و کایمر ۴۷

۲-۱۲ تعیین پارامترهای سینتیکی (K_m, V_{max}) ۴۷

۲-۱۳ محاسبات ترمودینامیکی. ۴۷

۲-۱۳-۱ روش‌های محاسباتی ۴۸

۲-۱۳-۱-۱ مدل‌سازی مقایسه‌ای ۴۸

۲-۱۳-۱-۱-۱ انتخاب الگو ۴۸

۲-۱۳-۲ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) ۴۹

۲-۱۳-۲-۱ ابزار محاسبه ۴۹

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

۲-۱۳-۲-۲ روش محاسبه ۴۹
۲-۱۳-۳ تحلیل اطلاعات ۵۰
۲-۱۳-۳-۱ حرکت‌ها و نوسانات درون ملکولی ۵۰
۲-۱۳-۳-۲ محاسبات انرژی ۵۰
۲-۱۳-۳-۳ تعیین هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین به روش تئوری ۵۱
۲-۱۳-۳-۴بررسی هیدروپاتی ۵۱
۲-۱۳-۳-۵ مقایسه توالی‌های آمینواسیدی الاستاز با ترمولیزین ۵۱
فصل سوم: نتایج ۵۲
۳-۱ طراحی و سنتز ژن کایمر ۵۳
۳-۲ جاگذاری ژن کایمر در وکتور بیانی ۵۵
۳-۲-۱ Colony-PCR ۵۵
۳-۲-۲ تائید صحت ژن کایمر سنتز شده با استفاده از Sequencing ۵۵
۳-۳ بیان الاستاز وحشی و پروتئین کایمر ۵۷
۳-۳-۱ ژلاتین زایموگرام ۵۹
۳-۴ تخلیص الاستاز وحشی و پروتئین کایمر ۶۰
۳-۴-۱ کروماتوگرافی تمایلی ۶۰
۳-۴-۲ کروماتوگرافی تعویض یونی ۶۲
۳-۴-۳ ژل فیلتراسیون ۶۳
۳-۴-۳-۱ G50 ۶۳
۳-۴-۳-۲ G75 ۶۴
۳-۴-۳-۳ HIC (کروماتوگرافی میانکنش آبگریز) ۶۵
۳-۵ مطالعات سینتیکی ۶۵
۳-۵-۱ اثر دما روی فعالیت آنزیم وحشی و الاستاز کایمر ۶۵

pdfMachine
A pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

۳-۵-۲ اثر pH روی فعالیت آنزیم وحشی و پروتئین کایمر ۶۸
۳-۵-۳ منحنی آرنیوس و انرژی فعال‌سازی آنزیم وحشی و پروتئین کایمر ۶۸
۳-۵-۴ پارامترهای سینتیکی آنزیم وحشی و پروتئین کایمر (تعیین خصوصیات کاتالیتیک) ۷۰
۳-۶ آنالیز توالی ۷۳
۳-۶-۱ مدل‌سازی مولکولی ۷۳
۳-۶-۲ مدل‌سازی مقایسه‌ای ۷۳
۳-۶-۳ بررسی و تست صحت (اعتبار) مدل ۷۴
۳-۶-۴ بهینه‌سازی ساختار مدل با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ۷۴
۳-۶-۴-۱ پایداری شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ۷۴
۳-۶-۵ مقایسه‌ی RMSF الاستازوحشی و پروتئین کایمر ۷۷
۳-۶-۵-۱ انعطاف‌پذیری ساختاری (RMSF) ۷۷
۳-۶-۵-۲ مقایسه‌ی RMSF اسیدهای آمینه‌ی اصلی در جایگاه فعال ۷۸
۳-۶-۵-۳ مقایسه‌ی RMSF اسیدهای آمینه‌ی دراطراف جایگاه فعال ۸۰
۳-۶-۵-۴ مقایسه‌ی RMSF در ناحیه‌ی لولا ۸۲
۳-۶-۶ مقایسه‌ی DCCM آنزیم وحشی و پروتئین کایمر ۸۲
۳-۷ مقایسه‌ی ساختاری آنزیم وحشی و پروتئین کایمر ۸۳
۳-۷-۱ جایگاه فعال در الاستاز ۸۳
۳-۷-۲ آنالیز ناحیه‌ی لولا (hinge) ۸۴
۳-۸ پل‌های نمکی ۸۵
۳-۹ پیوندهای هیدروژنی در الاستاز وحشی و پروتئین کایمر ۸۶
فصل چهارم: بحث ۸۸
۴-۱ طراحی آنزیم کایمر و خصوصیات ساختمانی آن ۸۹
۴-۲ بیان ژن الاستاز وحشی و کایمر، بلوغ آنزیم (maturation) در *E. coli* وتخلیص آنزیم ها ۹۰

pdfMachine
A pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

۴-۳ وابستگی فعالیت به دما ۹۱
۴-۳-۱ دمای بهینه و فعالیت در دماهای بالا ۹۱
۴-۳-۲ فعالیت در دماهای پایین و انرژی فعال‌سازی ۹۱
۴-۴ وابستگی فعالیت به pH ۹۲
۴-۵ مقایسه Km آنزیم وحشی و پروتئین کایمر ۹۳
۴-۶ اثر کلسیم ۹۳

pdfMachine
A pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

فهرست جدول ها

جدول۱-۱ انواع پپتیدازها در دودمان MA ۱۴

جدول۱-۲ عناصری ساختاری دوم در متالوپروتئازها ۱۴

جدول۱-۳ اسیدهای آمینه ی متصل به کلسیم در ترمولیزین ۲۷

جدول۱-۴ مقایسه ی بعضی از اسیدهای آمینه در الاستاز و ترمولیزین ۲۹

جدول۳-۱ مقایسه انرژی فعال سازی و تغییرات انتالپی فعال سازی آنزیم‌های وحشی و کایمر در دمای ۲۵ °C ۷۰

جدول۳-۲ پارامترهای سینتیکی ۷۲

جدول۳-۳ بررسی صحت(اعتبار) مدل پروتئین کایمر ساخته شده ۷۴

جدول۳-۴ مقایسه‌ی DCCM آنزیم وحشی و پروتئین کایمر در دماهای ۲۵ و ۶۰ درجه سانتی گراد ۸۲

جدول۳-۵ فواصل جایگاه کاتالیتیک در جایگاه فعال الاستاز وحشی و پروتئین کایمر ۸۳

جدول۳-۶. پل‌های نمکی در پروتئین کایمر و الاستاز وحشی ۸۵

جدول۳-۷ تعداد کل پیوندهای هیدروژنی در الاستاز وحشی و پروتئین کایمر ۸۶

جدول۳-۸ پیوندهای هیدروژنی جایگاه فعال در الاستاز وحشی و پروتئین کایمر ۸۶

جدول۳-۹ پیوندهای هیدروژنی لوپ متصل به کلسیم در الاستاز وحشی و پروتئین کایمر ۸۷

pdfMachine
A pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

فهرست شکل‌ها

شکل۱-۱ مراحل کلی انجام جهش‌زایی هدف‌دار ۶
شکل۱-۲ خانواده Zn متالوپروتئازها ۱۳
شکل۱-۳ ساختار ترمولیزین ۱۵
شکل۱-۴ الگوی فولدینگ موتیف HEXXH ۱۶
شکل۱-۵ مقایسه‌ی محل اتصال کلسیم در اعضای خانواده‌ی ترمولیزین ۱۷
شکل۱-۶ ساختار جایگاه فعال (۱) و لوپ اتصال به کلسیم(۲) در الاستاز ۱۸
شکل۱-۷ ساختار ثانویه‌ی الاستاز(از DSSP) ۱۸
شکل۱-۸ مکانیسم ترشح الاستاز در سودوموناس آئروجینوزا ۱۹
شکل۱-۹ توالی‌های درگیر در فرایند بلوغ الاستاز ۱۹
شکل۱-۱۰ پری‌پروالاستاز (۵۳.۶ kDa) ۲۰
شکل۱-۱۱ ترشح پروتئین از مسیر نوع ۲ ۲۰
شکل۱-۱۲ تشکیل پیوند دی سولفیدی جهت بلوغ الاستاز ۲۱
شکل۱-۱۳ توالی نوکلئوتیدی ژن *lasB* و توالی DNA مجاور ۲۲
شکل۱-۱۴ ساختار ثانویه ی ترمولیزین (از DSSP) ۲۳
شکل۱-۱۵ ساختار β گسترده در ترمولیزین ۲۳
شکل۱-۱۶ ریشه‌های واقع در جایگاه فعال ترمولیزین ۲۴
شکل۱-۱۷ جایگاه فعال الاستاز ۲۴
شکل۱-۱۸ Alignment ساختاری تعدادی از Zn- متالوپروتئازها ۲۵
شکل۱-۱۹ مقایسه‌ی جایگاه فعال بین الاستاز و ترمولیزین ۲۵
شکل۱-۲۰ مکانیسم ارائه شده برای تغییرات ساختاری در هنگام فرآیند کاتالیز ۲۶

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Get yours now!
"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

شکل۱-۲۱ تغییر زاویه در ناحیه‌ی hinge در الاستاز ۲۶

شکل۱-۲۲ مراحل مکانیسم کاتالیتیک الاستاز و ترمولیزین ۳۰

شکل۱-۲۳ مراحل شبیه سازی دینامیک ملکولی ۳۲

شکل۳-۱ تطبیق توالی ترمولیزین و الاستاز و superposition ساختارها ۵۴

شکل۳-۲ توالی ساختار دوم در پروتئین کایمر ۵۴

شکل۳-۳ آنالیز محصولات Colony-PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز به‌منظور غربال کلون‌های BL21 ۵۵

شکل۳-۴ توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی الاستاز کایمر ۵۶

شکل۳-۵ مقایسه ی فاز رسوب(Inclusion body) (۲) و محلول پروتئین(۱) ۵۷

شکل ۳-۶ پروتئین (♦)Soluble (■)Inclusion body ۵۸

شکل۳-۷ بیان پروتئین کایمر ۵۸

شکل۳-۸ بیان پروالاستاز ۵۸

شکل۳-۹ اثر زمان‌های مختلف در بیان پروالاستاز ۵۹

شکل۳-۱۰ زایموگرام الاستاز وحشی ۵۹

شکل۳-۱۱ زایموگرام پروتئین کایمر ۶۰

شکل۳-۱۲ پروالاستاز به دست آمده توسط ستون مربوطه ۶۱

شکل۳-۱۳ پروتئین کایمر به دست آمده توسط ستون مربوطه ۶۱

شکل۳-۱۴ کروماتوگرام مربوط به ستون Q-Sepharose (HP) ۶۲

شکل۳-۱۵ الاستاز به دست آمده توسط ستون مربوطه ۶۳

شکل۳-۱۶ کروماتوگرام الاستاز وحشی مربوط به ستون G50 ۶۴

شکل۳-۱۷ کروماتوگرام الاستاز وحشی مربوط به ستون G75 ۶۴

شکل۳-۱۸ کروماتوگرام ستون HIC (کروماتوگرافی میانکنش آبگریز) ۶۵

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Get yours now!
"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

شکل۳-۱۹ اثر حرارت روی فعالیت الاستاز وحشی (●) و پروتئین کایمر (▲) در عدم حضور کلسیم ۶۶

شکل۳-۲۰ اثر حرارت روی فعالیت الاستاز وحشی (●) و پروتئین کایمر (▲) در غلظت ۵ میلی‌مولار کلسیم ۶۷

شکل ۳-۲۱ اثر حرارت روی فعالیت الاستاز وحشی (●) و پروتئین کایمر (▲) در غلظت ۱۰ میلی‌مولار کلسیم ۶۷

شکل۳-۲۲ اثر pH روی فعالیت الاستاز وحشی و پروتئین کایمر ۶۸

شکل۳-۲۳ منحنی آرنیوس واکنش پروتئولیز الاستاز وحشی (O) پروتئین کایمر(Δ) در عدم حضور کلریدکلسیم ۶۹

شکل۳-۲۴ منحنی آرنیوس واکنش پروتئولیز الاستاز وحشی(♦) و کایمر(■) در غلظت ۵ میلی‌مولارکلرید کلسیم ۶۹

شکل۳-۲۵ منحنی آرنیوس واکنش پروتئولیز الاستاز وحشی(♦) و کایمر(■) در غلظت ۱۰ میلی‌مولار کلریدکلسیم ۷۰

شکل۳-۲۶ منحنی لاین ویور-برک برای به‌دست آوردن پارامترهای سینتیکی الاستاز وحشی ۷۱

شکل۳-۲۷ منحنی مکائیلیس- منتون فعالیت پروتئازی الاستاز وحشی در غلظت‌های مختلف کازئین ۷۱

شکل۳-۲۸ منحنی لاین ویور-برک الاستاز کایمر با سوبسترای کازئین ۷۲

شکل۳-۲۹ منحنی مکائیلیس-منتون فعالیت پروتئازی پروتئین کایمر در غلظت‌های مختلف کازئین ۷۲

شکل۳-۳۰ RMSD الاستاز وحشی و پروتئین کایمر در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ۷۵

شکل۳-۳۱ RMSD الاستاز وحشی و پروتئین کایمر در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۷۶

شکل۳-۳۲ RMSF الاستاز وحشی و پروتئین کایمر در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۷۷

شکل۳-۳۳ RMSF الاستاز وحشی و پروتئین کایمر در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ۷۷

شکل۳-۳۴ RMSF اسیدهای آمینه‌ی در جایگاه فعال الاستاز و پروتئین کایمر در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۷۸

شکل۳-۳۵ RMSF اسیدهای آمینه‌ی در جایگاه فعال الاستاز و پروتئین کایمر در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ۷۸

شکل۳-۳۶ مقایسه‌ی RMSF اسیدهای آمینه‌ی اصلی جایگاه فعال الاستاز و پروتئین کایمر ۷۹

شکل۳-۳۷ مقایسه‌ی RMSF اسیدآمینه‌ی اطراف جایگاه فعال الاستاز و پروتئین کایمر ۸۰

شکل۳-۳۸ مقایسه‌ی RMSF ناحیه‌ی لولا در الاستاز وحشی و پروتئین کایمر ۸۲

شکل۳-۳۹ ناحیه‌ی لولا در الاستاز و ترمولیزین و پروتئین کایمر ۸۵

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Get yours now!
"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

شکل۴-۱ **اثر حرارت روی فعالیت الاستاز وحشی در غلظت‌های مختلف کلسیم** ۹۳

شکل۴-۲ **اثر حرارت روی فعالیت پروتئین کایمر (Δ ، ▲) در غلظت‌های مختلف کلسیم** ۹۴

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Get yours now!
"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

۱-۱ آنزیم‌ها و اهمیت آن‌ها

اگر واکنشی از جنبه‌ی ترمودینامیکی انجام‌پذیر باشد حداقل یک آنزیم در طبیعت برای آن وجود دارد که قادر به کاتالیز آن واکنش است. منابع تولیدکننده آنزیم‌ها بسیار متعدد هستند. اما میکروارگانیسم‌ها از مهمترین و عمده‌ترین آن‌ها می‌باشند. با پیدایش فناوری DNA نوترکیب و نیازهای جدید، میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان منابع آنزیمی اهمیت بیشتری یافتند. جستجو و یافتن کاتالیزورهای زیستی هم با اهداف علمی و هم با جنبه‌ها و اهداف کاربردی صورت می‌گیرد. درهر دو حالت میکروارگانیسم‌ها برتری دارند. این میکروارگانیسم‌ها متعلق به سه قلمرو Archaea، Bacteria و Eukaryotes می‌باشند. بیشتر آنزیم‌های میکروبی قابل تجاری شدن در تعداد معدودی از جنس‌های قارچی و باکتریایی یافت می‌شوند و درسطوح خاصی از موقعیت‌های رده‌بندی تجمع یافته‌اند. به طور عمده شناخته شده‌ترین آن‌ها متعلق به جنس‌های باکتریایی *Bacillus*، *Pseudomonas* و قارچ‌های آسکومیست شامل جنس‌های *Aspergillus*، *Fusarium* و *Trichoderma* هستند.

۱-۱-۱ کاربرد آنزیم‌ها

آنزیم‌ها در پزشکی و صنعت کاربرد فراوانی دارند. کاربرد آنزیم‌ها در پزشکی در زمینه‌ی تشخیص بیماری و درمان آن‌ها است. آنزیم‌های مورد استفاده در پزشکی به‌طور عمده از بافت‌های جانوری و باکتریایی استخراج می‌شوند که ممکن است داخل سلولی،یا خارج سلولی باشند. بیشترآنزیم‌های مورد استفاده در صنعت منبع میکروبی داشته و معمولا خارج سلولی هستند. در زیر تنها چند آنزیم که در پزشکی و صنعت کاربرد دارند ذکر می‌شود [۱، ۲]:

۱- پروتئاز: ازجمله در ساخت پنیر، ترد کردن گوشت و هضم غذا در حیوان و انسان می‌شود.

۲- آمیلاز: از جمله در تولید شربت‌های دارای فروکتوز بالا و صنایع تخمیری استفاده می‌شود.

۳- پنی‌سیلین آسیلاز: در تولید پنی‌سیلین‌های نیمه سنتزی استفاده می‌شود.

۴- آرژیناز: در تعیین سطح آرژنین در پلاسما و ادرار از این آنزیم استفاده می‌گردد.

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Get yours now!
"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

۱-۲ روش‌های دستیابی به فعالیت آنزیمی با خواص جدید

- بدست آوردن فعالیت‌های غیرمعمول و جدید از آنزیم‌های موجود در محیط‌های مختلف.
- تغییر محیط واکنش با تغییر شرایط واکنش.
- استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک مثل مهندسی پروتئین و directed evolution.

افزایش اطلاعات درباره‌ی توالی ژن‌های جدید جدا شده از ارگانیسم‌های طبیعی و مقایسه آنزیم‌های همولوگ با الگوی تاخوردگی و عمل مشابه اما خواص و ویژگی‌های متفاوت، امکان آگاهی از اساس ملکولی و آمینواسیدهای درگیر در هر خصوصیت را فراهم می‌کند [۳].

۱-۳ مهندسی پروتئین

مهندسی پروتئین تولید، فعالیت و ساختار آن را بررسی می‌کند. طراحی و مهندسی پروتئین بر اساس مجموعه‌ای از قوانین بنیادی است که خود شکل دهنده‌ی پایه‌های اولیه‌ی زیست‌فناوری[1] است. کاربرد این شاخه از علم شامل ایجاد موتیف‌های ساختاری، از قبیل دسته‌های مارپیچ آلفا یا زیپ لوسین، تولید پروتئین برای مصارف درمانی و نیز تولید گسترده‌ی پروتئین‌ها برای مصرف صنعتی است. مطالعه‌ی اسیدهای آمینه که بالقوه نقش عملکردی یا ساختاری ایجاد می‌کنند، حذف یا جایگزینی‌های اسید-های آمینه به منظور تعیین نقش محدودیت‌های ایجاد شده توسط آن‌ها، بررسی نیروهای آبگریز، نیروهای الکترواستاتیک، جایابی پیوندهای هیدروژنی، پل‌های نمکی، پیوندهای دی‌سولفیدی و بررسی نقش آب و فلزات از جمله رهیافت‌هایی است که مهندسین پروتئین برای رسیدن به زمینه‌های تخصصی از آن‌ها بهره می‌گیرند یکی از اهداف بلند مدت این تلاش‌ها، تعیین قوانین بنیادی به-منظور طراحی پروتئین در شرایط *de novo* است. طراحی و ساخت یک پروتئین، با ساختار و عملکردی مطلوب، از اهداف مهندسی پروتئین می‌باشد. به طور کلی زمینه‌های فعالیت مهندسی پروتئین را می‌توان به صورت زیر برشمرد [۳ - ۴]:

۱- تشخیص ماکرومولکول‌ها، به‌ویژه چگونگی تشخیص پروتئین‌ها توسط یکدیگر، یا تعیین لیگاندهای متصل به آن‌ها. می-توان‌از مهندسی پروتئین به‌منظور تشخیص ماکرومولکول‌ها برای طراحی پروتئین‌هایی که هدف‌های ویژه‌ای را تعقیب می‌کنند، استفاده شود.

1 Biotechnology

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Get yours now!
"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

۲- ارسال دارو به بافت هدف. در اینجا سعی می‌شود بخش اعظم دارو تنها به هدف مورد نظر برسد و بدین ترتیب از آثار زیانبار دارو کاسته شود. برای رسیدن به این هدف می‌توان آنزیم‌هایی طراحی کرد که "پیش دارو" را به شکل فعال آن تبدیل کنند. بدین ترتیب دارو به احتمال بیشتری به مکان مورد نظر خواهد رسید.

۳- جایگزینی زیستی. یعنی پاکسازی محیط از ترکیبات خطر ناک، در حقیقت با طراحی پروتئین‌هایی که به مواد شیمیایی ویژه‌ای متصل می‌شوند، می‌توان مسیری امن و ارزان را برای پاکسازی بدست آورد.

۴- کاتالیزورهای زیستی مهندسی شده. در اینجا آنزیم‌های مهندسی شده‌ای طراحی می‌شوند که قادرند فرآیندهای شیمیایی مورد نظر را از نقطه نظر کابردی امکان‌پذیر و یا مطلوب سازند.

در واقع هدف نهایی در این زمینه، ارائه‌ی چارچوبی برای یافتن رابطه‌ی حاکم بین ساختار سه بعدی یک پروتئین و عملکرد آن است.

یکی از روش‌های بررسی و شناسایی نحوه‌ی عملکرد پروتئین‌ها، استفاده از روش‌های جهش‌زایی است. البته اطلاعات ناقصی که در ارتباط با نیروهای عمل کننده‌ی درون پروتئین‌ها و نیز نیروهای بین پروتئین و لیگاند وجود دارد، استفاده از روش‌های جهش‌زایی (هدف‌دار) را مشکل کرده است.

در مهندسی پروتئین بررسی تغییرات ایجاد شده یکی از اهداف مهم برای درک عملکرد و ساختار پروتئین به شمار می‌رود. در واقع باید اطمینان یافت که تغییر ایجاد شده در پروتئین، ناشی از همان جهشی است که ایجاد شده و فعالیت‌های خاج از کنترل، سبب ایجاد تغییر در پروتئین نشده است. تنها در این صورت می‌توان تغییرات مشاهده شده در ساختار یا عملکرد پروتئین را به تغییرات القا شده مرتبط کرد. یکی از روش‌هایی که دقت روش جهش‌زایی را تعیین می‌کند، استفاده از روش طیف‌سنجی جرمی و روش پراش الکترون است. در واقع این روش یونیزاسیون موجب تولید مجموعه‌ای از یون‌های پروتئینی باردار می‌شود که تنها در یک بار با هم اختلاف دارند. بنابراین یکی از کاربردهای مهم مهندسی پروتئین، درک ساختار، عملکرد و چگونگی تا خوردن پروتئین است. مهندسی پروتئین در زمینه‌ی صنعتی نیز گسترش زیادی یافته است. از این جمله می‌توان به طراحی و تولید آنزیم‌های پایدار و کارآمد در مقیاس صنعتی اشاره کرد. آنزیم‌های مهندسی شده در صنعت بسیار مورد توجه‌اند، زیرا با استفاده از فناوری مذکور آنزیم‌هایی با کارایی بالا بدست می‌آیند که دارای خصوصیات مطلوبی از قبیل پایداری حرارتی، پایداری pH، کارایی کاتالیتیکی، ویژگی برای محصول و سوبسترا می‌باشند [۳ و ۴]. در فرآیندهای صنعتی چندین مزیت دیگر هم برای آنزیم‌های مهندسی شده وجود دارد. به‌عنوان نمونه آنزیم‌های پایدار این امکان را فراهم می‌سازند که واکنش‌ها در دماهای بالاتری صورت

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Get yours now!
"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

پذیرند که این خود موجب افزایش سرعت و راندمان واکنش، در مقایسه با دماهای پایین می‌گردد. همچنین این روش دانش ما را در ارتباط با ساختمان پروتئین‌ها افزایش می‌دهد [۴،۳].

مهندسی پروتئین نتیجه جهش در یک یا تعداد بیشتری نوکلئوتید ویژه در یک ژن می‌باشد که در آن کدها بین دو پروتئین وحشی (wild type) و تغییر یافته مقایسه می‌شود. تغییرات هدفمند یک آمینواسید در مقابل پروتئین طبیعی خودش، جهش‌زایی هدفمند (site-directed mutagenesis) نامیده می‌شود. برای این کار نیاز به ژن مورد نظر و اطلاعات ساختار سوم پروتئین یا پروتئین‌های همولوگ آن و طی مراحل زیر است:

۱- تخلیص پروتئین مورد نظر جهت بررسی همولوژی و تعیین ترادف با استفاده از اسپکتروسکوپی جرمی.

۲- جداسازی و تعیین ترادف ژن مورد نظر و بیان پروتئین نوترکیب آن.

۳- کریستالیزاسیون پروتئین مورد نظر و آنالیز پروتئین مورد نظر توسط تفرق اشعه ایکس.

۴- بررسی ساختار سه‌بعدی جهت مطالعه فعالیت و توضیح مکانیسم عمل آنزیم‌ها.

۵- انتخاب آمینواسیدهای اساسی در عملکرد پروتئین جهت بهبود کارکرد پروتئین از طریق جهش‌زایی هدفمند.

۶- انجام موتاسیون‌های نقطه‌ای هدفمند بر سطح DNA، کلونینگ و بیان محصول نوترکیب ژن‌های جهش یافته.

۷- بررسی خصوصیات محصولات پروتئینی جهش‌یافته در مقایسه با پروتئین طبیعی.

۱-۳-۱روش‌های بکار رفته به‌منظور اصلاح ویژگی پروتئین‌ها

پروتئین‌ها به دلیل کاربرد وسیع، امروزه در سطح صنعتی تولید می‌شوند. ولی فقط تعداد کمی از آن‌ها قادر به انجام واکنش در شرایط مورد نیاز از قبیل مقاومت به حلال‌های آلی، حرارت، محیط اسیدی و بازی و غیره هستند. تلاش‌های زیادی برای ایجاد تغییر در عملکرد پروتئین‌ها به منظور رسیدن به شرایط مطلوب نظیر پایداری حرارتی، پایداری به pH، ویژگی‌های کینیتیکی، پایداری در حلال‌های آلی، تغییر وابستگی به کوفاکتور و سوبستراهای مختلف انجام می‌شود. یکی از راه‌ها برای برآوردن این نیازها، جدا کردن پروتئین‌های جدید از ارگانیسم‌های مقاوم (برای مثال به وسیله غربال کردن نمونه‌های خاک یا شرایط محیطی دشوار) و بهینه‌کردن شرایط واکنش پروتئین وحشی می‌باشد. جهت فایق آمدن بر این محدودیت‌ها، امروزه به طور گسترده‌ای از روش‌های

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Get yours now!
"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA