دانشکده‌ی علوم

گروه آموزشی زیست شناسی

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد

در رشته‌ی زیست شناسی گرایش سلولی و مولکولی

عنوان:

ساخت پیش سازواره کربوکسی متیل سلولاز نوترکیب مقاوم به حرارت حاصل از سویه Bacillus pumilus Z14

استاد راهنما:

دکتر صابر زهری

استاد مشاور:

دکتر سعید لطیفی نوید

پژوهشگر:

آنیا اکرمی

تابستان 93

نام خانوادگی دانشجو: اکرمی نام: آنیا

عنوان پایان‌نامه: ساخت پیش سازواره کربوکسی متیل سلولاز نوترکیب مقاوم بـه حـرارت حاصـل از سـویه Bacillus pumilus Z14

استاد راهنما: دکتر صابر زهری

استاد مشاور: دکتر سعید لطیفی نوید

مقطع تحصیلی: **کارشناسی ارشد** رشته: زیست شناسی

گرایش: سلولی و مولکولی دانشگاه: **محقق اردبیلی**

دانشکده: علوم تاریخ دفاع:1393/04/09 تعداد صفحات: 94

چکیده:

آنزیم اندوگلوکاناز یک آنزیم صنعتی با کاربرد فراوان است که تولید نوترکیب آن می‌تواند ارزش افزوده اقتصادی قابـل توجهی داشته باشد. یافته های آزمایشگاهی نشان داد که این آنزیم دارای تحمل دمایی بالا، طیف فعالیـت pH وسـیع بوده و از پایداری نسبتا خوبی در مقابل یون‌ها و دترجنت‌هـا برخـوردار اسـت و بـه دلیـل داشـتن توانـایی هیـدرولیز سوبستراهای طبیعی، درخوراک دام و تجزیه مواد لیگنوسلولزی کاربرد دارد. جهت بیان نوترکیب این آنـزیم از وکتـور pET21b(+) به دلیل داشتن ویژگی های قابل توجه از جمله: پروموتر قوی، تحت تنظـیم بـودن، جایگـاه پلـی لینکـر مناسب و تگ هیستیدینی به عنوان کاست بیانی استفاده شد. به منظور طراحی پرایمر از ناحیه ORF ژن اندوگلوکاناز سویه Bacillus pumilus Z14 استفاده شد. قطعه حاصل از تکثیر ژن اندوگلوکاناز مطابق با ماهیت پرایمرهای طراحی شده دارای جایگاه های برشی BamHI در انتهای ´5 و XhoI در انتهای ´3 بود. بـا وجـود سـه نوکلئوتیـد اضـافی در فرادست پرایمرها، برای افزایش کارامدی برش و نگهداری کپی توالی ژنی جهت تغییـرات و موتاسـیو ن هـای توسـعه دهنده عملکرد آنزیم، نیاز به تهیه پیش سازواره اولیه از ژن تکثیر شده بود که به این منظور از وکتـور pTG19-T بـه عنوان پایه کلونینگ T/A استفاده شـد. جهـت کلونینـگ ژن انـدوگلوکاناز در وکتـور pTG19-T، مخلـوط ligation از طریق شوک حرارتی در سلول های E.coliDH5α ترانسفورم گردید. کلنی های نوترکیب توسـط محـک غربـال گـری آبی/ سفید جداسازی و با آزمون toothpick شناسایی شدند. در نهایت به منظـور تاییـد کلونینـگ از هضـم پلاسـمید نوترکیب توسط آنزیم های محدود کننده استفاده شد. با توجه به تـوالی وکتـور pTG19-T، قطعـه وارد شـده در حـد فاصل دو جایگاه برشی BamHI قرار گرفته بود که در صورت برش بـا آنـزیم BamHI دو قطعـه DNA خطـی شـامل وکتور و ژن خارجی تولید شد که اندازه باند مربوط به قطعه ژن خارجی با اندازه ژن اندوگلوکاناز تکثیر شده، مطابقـت می‌کرد که تاییدی بر صحت کلونینگ بود.

کلید واژه‌ها: آنزیم اندوگلوکاناز، باسیلوس پومیلوس، بیان نوترکیب، پیش سازواره، کاست بیانی، کلونینگ ژن.

فهرست مطالب

شماره و عنوان مطالب **صفحه**

فصل اول: کلیات پژوهش

1-1- مقدمه.....2
1-2- تولید قطعات DNA توسط هضم با آنزیم های محدود کننده.....2
1-3- وارد کردن قطعه‌ی DNA جدا شده به درون ژنوم وکتور.....4
1-3-1- پلاسمیدها.....5
1-3-2- کروموزوم های باکتریوفاژی.....5
1-4- اتصال DNA خارجی به DNA وکتور.....6
1-5- فرآیند Ligation.....6
1-5-1- مستعدسازی سلول‌ها و ترانسفورم.....**Error! Bookmark not defined.**
1-6- انتخاب و غربال گری کلنی های نوترکیب.....**Error! Bookmark not defined.**
1-7- مزایای مهندسی ژنتیک.....**Error! Bookmark not defined.**
1-8- معایب مهندسی ژنتیک.....**Error! Bookmark not defined.**
1-9- آنزیم.....**Error! Bookmark not defined.**
1-10- سلولز.....**Error! Bookmark not defined.**
1-10-1- ساختار شیمیایی سلولز.....**Error! Bookmark not defined.**
1-10-2- ساختار کریستالی سلولز.....**Error! Bookmark not defined.**
1- 11- سلولازها.....**Error! Bookmark not defined.**
1-11-1- گلیکوزیل هیدرولازها.....**Error! Bookmark not defined.**
1-11-1-1- مکانیسم عمل گلیکوزیل هیدرولازها.....**Error! Bookmark not defined.**
1-11-2- ساختمان سلولازها.....**Error! Bookmark not defined.**
1-11-2-1- دومن متصل شونده به سلولز یا CBD.....**Error! Bookmark not defined.**
1-11-2-2- دومن کاتالیتیک.....**Error! Bookmark not defined.**
1-11-2-2-1- خانواده‌های دومن کاتالیتیک.....**Error! Bookmark not defined.**
1-12- تولید کننده‌های سلولازها.....**Error! Bookmark not defined.**
1-13- انواع سلولازها.....**Error! Bookmark not defined.**
1-13-1- سلولازهای غیرتجمعی.....**Error! Bookmark not defined.**
1-13-2- سلولازهای تجمعی.....**Error! Bookmark not defined.**
1-14- کاتابولیسم و مکانیسمهای کاتالیتیکی سلولازها.....**Error! Bookmark not defined.**
1-15- سازمان‌یابی ژن‌های سلولاز.....**Error! Bookmark not defined.**

1-16- سلولازها و بیوتکنولوژی..... **Error! Bookmark not defined.**
1-16-1- بیوتکنولوژی تغذیه..... **Error! Bookmark not defined.**
1-16-2- صنعت و بیوتکنولوژی خوراک دام..... **Error! Bookmark not defined.**
1-16-3- صنعت نساجی و شوینده‌ها..... **Error! Bookmark not defined.**
1-16-4- صنعت کاغذسازی..... **Error! Bookmark not defined.**
1-16-5- کاربرد سلولازها و آنزیم‌های مرتبط در کشاورزی، تحقیقات و توسعه **Error! Bookmark not defined.**
1-16-6- تولید بیواتانول..... **Error! Bookmark not defined.**
1-17- بهبود در خصوصیات سلولازها..... **Error! Bookmark not defined.**
1-18- چشم‌انداز آینده و چالش‌های تحقیق در مورد سلولازها..... **Error! Bookmark not defined.**
1-19- مروری برتحقیقات گذشته..... **Error! Bookmark not defined.**

فصل دوم: مواد و روش‌ها

2-1- دستگاه‌های مورد استفاده..... **Error! Bookmark not defined.**
2-2- مواد مورد استفاده..... **Error! Bookmark not defined.**
2-3- محیط‌های کشت..... **Error! Bookmark not defined.**
2-3-1- محیط کشت LB (Luria-Bertani)..... **Error! Bookmark not defined.**
2-3-2- محیط کشت SOB مایع..... **Error! Bookmark not defined.**
2-3-3- محیط کشت SOC..... **Error! Bookmark not defined.**
2-4- بافرها و معرف‌ها..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5- روش‌ها..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-1- اصول طراحی پرایمر..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-2- پارامترهای تاثیرگذار در طراحی پرایمرها..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-2-1- اختصاصی بودن..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-2-2- طول پرایمر..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-2-3- دمای T_m پرایمرها..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-2-4- محتوای GC پرایمر..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-2-5- توالی انتهای 3′..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-2-6- توالی‌های پرایمری مکمل..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-2-7- ساختارهای ثانویه..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-3- تکثیر ژن اندوگلوکاناز..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-3-1- طراحی پرایمرهای ژن اندوگلوکاناز سویه Bacillus sp.Z14..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-4- استخراج پلاسمید به روش لیز با KOH..... **Error! Bookmark not defined.**

2-5-4-1- تکثیر ژن سلولاز از DNA ژنومی الگو جهت کلونینگ..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-5- الکتروفورز در روی آگارز..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-6- تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-7- تعیین غلظت‌های مناسب برای تهیه مخلوط ligation..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-8- تهیه مخلوط ligation..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-9- ترانسفورماسیون محصول Ligation به باکتری E. coli..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-9-1- مستعد کردن باکتری E. coli با استفاده از محلول $CaCl_2$ (0/1 M)..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-9-2- ترانسفورم کردن محصول ligation درون باکتری مستعد به روش شوک حرارتی.. **Error! Bookmark not defined.**
2-5-10- انتخاب کلنی..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-11- تأیید کلنی‌های نوترکیب صحیح..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-11-1-آزمونToothpick..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-11-2-Colony PCR..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-12- استخراج پلاسمید به روش miniprep از کلنی نوترکیب..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-13- آنزیم‌های محدودگر و شناسایی پلاسمید نوترکیب..... **Error! Bookmark not defined.**
2-5-14- روش تهیه استوک از کلنی نوترکیب..... **Error! Bookmark not defined.**

فصل سوم: نتایج و بحث

3-1- مقدمه..... **Error! Bookmark not defined.**
3-2- طراحی سازواره بیانی..... **Error! Bookmark not defined.**
3-3- ژن اندوگلوکاناز سویه Bacillus pumilus Z14 و بخش های مختلف تشکیل دهنده آن..... **Error! Bookmark not defined.**
3-3-1- بخش های مختلف تشکیل دهنده ناحیه ORF ژن اندوگلوکاناز..... **Error! Bookmark not defined.**
3-4- نتایج بررسی بیوانفورماتیکی پروتئین EGL با نرم افزارهای آنلاین..... **Error! Bookmark not defined.**
3-5- طراحی کاست بیانی..... **Error! Bookmark not defined.**
3-5-1- اضافه کردن یک نوکلئوتید گوانین به توالی پرایمر Forward (BamCMCf) **Error! Bookmark not defined.**
3-5-2- توالی آمینو اسیدی ژن Egl..... **Error! Bookmark not defined.**
3-6- طراحی پرایمرهای بیانی..... **Error! Bookmark not defined.**
3-6-1- افزودن Tail به توالی پرایمرها..... **Error! Bookmark not defined.**
3-6-2- استفاده از جایگاه برش آنزیم BamHI و XhoI در طراحی پرایمرهای forward و reverse..... **Error! Bookmark not defined.**
3-6-3- حذف سیگنال پپتید در طراحی پرایمر..... **Error! Bookmark not defined.**

3-6-4- حذف کدون خاتمه TAA از توالی ژن Egl..... **Error! Bookmark not defined.**
3-7- همسانه سازی (T/A کلونینگ)..... **Error! Bookmark not defined.**
3-8- دلایل انتخاب وکتور کلونینگ pTG19-T جهت کلون کردن ژن Egl.. **Error! Bookmark not defined.**
3-9- تکثیر ژن سلولاز..... **Error! Bookmark not defined.**
3-10- تهیه مخلوط Ligation..... **Error! Bookmark not defined.**
3-11- کلنی های رشد یافته پس از Transformation..... **Error! Bookmark not defined.**
3-12- آزمون Toothpick..... **Error! Bookmark not defined.**
3-13- آزمون Colony PCR..... **Error! Bookmark not defined.**
3-14- استخراج پلاسمید از کلنی های نوترکیب..... **Error! Bookmark not defined.**
3-15- تعیین جایگاه‌های برش آنزیم‌های محدود کننده..... **Error! Bookmark not defined.**
پیشنهادها..... **Error! Bookmark not defined.**
فهرست منابع و مآخذ..... **Error! Bookmark not defined.**

فهرست جدول‌ها

شماره و عنوان جدول **صفحه**

جدول 1-1- انواع انتهاهای ایجاد شده توسط آنزیم های محدودکننده کلاس II.....4

جدول 2-1- دستگاه‌های مورد استفاده.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 2-2- مواد استفاده شده.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 2-3- روش تهیه‌ی محلول‌های مورد استفاده.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 2-4- محلول‌های مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 2-5- برنامه‌ی دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 2-6- برنامه‌ی دمایی واکنش Colony PCR.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 3-1- موقعیت نوکلئوتیدی بخش های مختلف ژن اندوگلوکاناز سویه Bacillus pumilus Z14..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول 3-2- جایگاه قرارگیری دومن های تشکیل دهنده آنزیم اندوگلوکاناز بر اساس توالی آمینو اسیدی..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول 3-3- نتایج حاصل از نرم افزار آنلاین بانک اطلاعاتی موسسه DAMPD در رابطه با پروتئین Egl..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول 3-4- اطلاعات کلیدی در مورد پرایمرهای Forward و Reverse.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 3-5- False priming site پرایمرهای forward و Reverse.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 3-6- مشخصات پرایمر Forward.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 3-7- مشخصات پرایمر Reverse.....**Error! Bookmark not defined.**

فهرست شکل‌ها

شماره و عنوان شکل **صفحه**

شکل 1-1- مراحل مهندسی ژنتیک..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۱-2- ساختار مولکولی سلولز..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل 1-3- مکانیسم inversion در تجزیه کربوهیدرات‌ها..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل 1-4- مکانیسم retention در تجزیه کربوهیدرات‌ها..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل 2-1- دستگاه الکتروفورز افقی..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۲-2- نحوه اثر اتیدیوم بروماید بر بازهایDNA..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل3-1- توالی ژنی مربوط به وکتور pET-21b و مقایسه آن با توالی سایر وکتورهای گروه pET21 **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-2- نقشه ژنتیکی وکتورpET21-b(+)..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-3- بخش‌های مختلف تشکیل دهنده ژن Egl با استفاده از طراحی در نرم افزار simvector **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-4- توالی مربوط به ناحیه ORF ژن Egl و بخش های مختلف تشکیل دهنده آن **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-5- دومن‌ها و نواحی حفاظت شده ژن Egl..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل3-6- ساختار ثانویه پروتئین مدل، الگو و B.pumilus(AY339624.1) **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-7- توالی ژن Egl پس از وارد شدن به ساختار وکتور pET-21b..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-8- بخشی از توالی ژن Egl به همراه توالی آمینو اسیدی..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-9- بخشی از توالی ژن Egl پس از ورود به ساختار وکتورpET-21b به همراه توالی آمینو اسیدی **Error! Bookmark not defined.**

شکل3-10- نتایج به دست آمده از سایت Restriction mapper : فهرستی از آنزیم هـای برنـده و نبرنـده تـوالی Egl **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-11- توالی 111 نوکلئوتیدی مربوط به سیگنال پپتید ژن Egl..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-12- فرم حلقوی وکتور pTG19..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-13- فرم خطی و توالی Multiple cloning site وکتورpTG19 . **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-14- ژل آگارز 0/7٪ مربوط به محصول PCR با پرایمرهای BamCMCf و XhoCMCb **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-15- نقشه وکتور نوترکیب pAZ_8..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-16- باکتری های transform شده رشد یافته بر روی محیط SOB آگار **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-17- ژل آگارز 0/7٪ مربوط به آزمون Toothpick..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل 3-18- محصول حاصل از colony PCR سلول های transform شـده در حضـور پرایمرهـای BamCMCf و XhoCMCb در سطح ژل آگارز 0/7٪..... **Error! Bookmark not defined.**
شکل 3-19- پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های 10 و 23 در سطح ژل آگارز 0/7٪ **Error! Bookmark not defined.**
شکل 3-20- جایگاه‌های برشی آنزیم‌های محدود کننده بر روی وکتور نوترکیب pAZ_8 **Error! Bookmark not defined.**

فهرست علائم اختصاری

مفهوم یا توضیح	علامت اختصاری
Base pair	bp
Cellulase binding domain	CBD
Carboxymethyl cellulose	CMC
Escherchia coli	E.coli
Glycosyl hydrolase	GH
Isopropyl thiogalactoside	IPTG
Kilo base	kb
Kilo dalton	kDa
Luria-Bertani	LB
nanometer	nm
Open reading frame	ORF
Polymerase chain reaction	PCR
Ribosome binding site	RBS
Super optimal broth	SOB
Super optimal broth with catabolite repression	SOC
Tris-Acetic acid-EDTA	TAE
Melting temprature	T_m
5-bromo-4-chloro-indolyl-B-D-galactopyranoside	x-Gal

فصل اول:

کلیات پژوهش

1-1- مقدمه

مهندسی ژنتیک[1] یا به عبارت بهتر نوترکیبی DNA در شرایط آزمایشگاهی یک روش بیوشیمیایی جهت تبادل اطلاعات ژنتیکی بین موجودات زنده مختلف است که این رشته کاربردهای بالقوه زیادی در پزشکی، کشاورزی و صنعت دارد. مهندسی ژنتیک یک رشته نسبتاً جدید می‌باشد که تاکنون تنها یک هدف عمده را دنبال می‌کند و آن جداسازی و تقویت قطعه خاصی از اطلاعات ژنتیکی یک موجود اهدا کننده مناسب می‌باشد، که می‌تواند رونوشت RNA یا محصول پروتئینی آن موجود باشد که در مقادیر زیاد به دست آمده و با جزئیات کامل مطالعه می‌شود. مهندسی ژنتیک اسامی دیگری هم دارد که از آن جمله می‌توان به دستکاری ژن، شبیه سازی ژن، تکنولوژی DNA نوترکیب، تغییرات ژنتیکی و ژنتیک جدید اشاره کرد (Greenaway, 1980). مهندسی ژنتیک در چهار مرحله اساسی انجام می‌گیرد (شکل 1-1):1- تولید قطعات DNA با استفاده از آنزیم های محدود کننده. 2- اتصال قطعات DNA جدا شده به ژنوم وکتور یا مولکول حامل. 3- معرفی وکتور نوترکیب به یک گیرنده مناسب (سلول میزبان) جهت تکثیر. 4- غربالگری[2] (Nicholl, 1994).

1-2- تولید قطعات DNA توسط هضم با آنزیم های محدود کننده

آنزیم های محدود کننده، آنزیم‌هایی هستند که توالی های DNA خاصی را شناسایی کرده و منجر به هضم DNA دو رشته ای توسط شکستن دو پیوند فسفودی استر می‌شود (یکی در هر رشته از DNA دو رشته ای). این آنزیم‌ها بخشی از سیستم restriction-modification سلول های باکتریایی هستند که از سلول باکتری در برابر حمله DNA بیگانه به ویژه DNA باکتریوفاژ حفاظت می‌کنند. همه آنزیم های

1- Gene engineering
2- Screening

محدودکننده[1] و متیل ترانسفرازهای مربوط به آن‌ها بر اساس ساختار ژنی و پروتئینی، وابستگی به کوفاکتور و اختصاصی بودن اتصال و برش در سه گروه طبقه بندی می‌شوند:

آنزیم های کلاس I که به صورت زیرواحدهای مختلفی از کمپلکس های آنزیمی چند منظوره واقع شده اند. این آنزیم ها، DNA را در مکان های غیر اختصاصی که معمولا 100 تا 1000bp با توالی شناسایی شده فاصله دارند، برش می‌دهند. این گروه برای فعالیت خود به Mg^{2+}، ATP و S – آدنوزیل متیونین به عنوان کوفاکتور نیاز دارند. آنزیم های کلاس II و متیل ترانسفرازهای مربوط به آن‌ها به صورت پروتئین های مجزا عمل می‌کنند. این آنزیم‌ها از نظر مکانی خاص هستند یعنی پیوندهای فسفودی استر خاصی را در دو رشته DNA در داخل یا نزدیکی توالی شناسایی خود، هیدرولیز می‌کنند وبرای فعالیت خود به یون Mg^{2+} به عنوان کوفاکتور نیاز دارند. آنزیم های کلاس III مانند آنزیم های کلاس I، به صورت زیرواحدهای مختلفی از کمپلکس های آنزیمی چندمنظوره عمل می‌کنند. این آنزیم‌ها توالی های خاصی را شناسایی کرده اما 25 تا 27 bp را در خارج جهت ′3 توالی شناسایی شده برش می‌دهد. این گروه فاقد فعالیت ATPase، آنزیم های کلاس یک بوده و برای فعالیت بهSAM[2] نیاز ندارند (Peacock, 2010).

اندوگلوکانازهای کلاس II به عنوان عوامل کلیدی برای انواع کاربردها در زیست شناسی مولکولی و تکنولوژی DNA نوترکیب از جمله: تهیه نقشه ژنتیکی، آنالیز پلی مورفیسم طول قطعه محدود شده، توالی یابی و کلونینگ DNA استفاده می‌شوند. آنزیم های کلاس II، توالی نوکلئوتیدی کوتاهی را شناسایی می‌کنند و DNA دو رشته ای را در مکان های خاصی در داخل یا مجاور توالی مذکور برش می‌دهند. طول توالی های شناسایی متفاوت است. اکثر آنزیم های کلاس II توالی شناسایی پالیندرومیک دارندکه توسط ویژگی ساختاری مشترکی شناخته می‌شوند. آنزیم های کلاس II با برش های خود سه نوع انتهای DNA ایجاد می‌کنند که همه انتهاها دارای گروه های ′5 فسفات و ′3 هیدروکسیل هستند . انتهای ′5 چسبنده مانند انتهای ایجاد شده توسط HindIII، انتهای ′3 چسبنده مانند انتهای ایجاد شده

1- Restriction enzymes
2- S-adenosylmethionine

توسط KpnI ، انتهای صاف مانند انتهای ایجاد شده توسط PvuII. در مقابل انتهای صاف، بیرون زدگی های انتهاهای ′5 و′3، انتهاهای چسبنده یا Overhang نامیده می‌شوند جدول 1-1، (Pingoud et al, 2005).

جدول 1-1- انواع انتهاهای ایجاد شده توسط آنزیم های محدودکننده کلاس II

نوع انتهای ایجاد شده	نام آنزیم	توالی شناسایی
′5 چسبنده	HindIII	5′-AAGCTT-3′ 3′-TTCGAA-5′ → A TTCGA-5′ + 5′-AGCTT A
′3 چسبنده	KpnI	5′-GGTACC-3′ 3′-CCATGG-5′ → GGTAC-3′ C + C 3′-CATGG
صاف	PvuII	5′-CAGCTG-3′ 3′-GTCGAC-5′ → CAG-3′ GTC-5′ + 5′-CTG 3′-GAC

هضم مولکول های DNA با آنزیم های محدود کننده کلاسII مخلوطی از قطعات پلی نوکلئوتیدی تولید می‌کند که هنگام تجزیه و تفکیک نمودن می‌توانند به منظور مشخص کردن DNA مجهول مورد استفاده قرار گیرند. چندین روش جهت تفکیک قطعات DNA وجود دارد که رایج ترین آن الکتروفورز روی ژل است. به طور کلی قطعات DNA که وزن مولکولی آنها در محدوده 10^3 تا 3×10^7 دالتون می‌باشند با روش الکتروفورز می‌توان تفکیک نمود (Greenaway, 1980).

1-3- وارد کردن قطعه‌ی DNA جدا شده به درون ژنوم وکتور

سیستم های وکتوری: برای این که یک مولکول DNA بتواند به عنوان حامل کلون سازی ژن به کار رود بایستی چندین ویژگی داشته باشد، از جمله این که: یک حامل باید بتواند درون سلول میزبان همانند سازی کند تا نسخه های متعددی از مولکول DNA نوترکیب ایجاد شوند و به سلول های دختری منتقل گردند. مولکول حامل بایستی نسبتاً کوچک و ترجیحاً کوچکتر از 10 هزار بار (10kb) باشد، چرا که طی خالص سازی احتمال شکستن در مولکول‌های بزرگ بیشترو دستکاری آن‌ها نیز مشکل‌تر است. DNA

وکتور باید بتواند اطلاعات ژنتیک خارجی را دریافت کند و به این منظور برای وکتور به صرفه است که دارای یک محل شکست منفرد برای یک آنزیم محدودکننده خاص باشد. ورود DNA خارجی به وکتور نباید عملکردهای ضروری را معیوب کند(یعنی کنترل همانندسازی). وکتورها بایستی با صفتی کد شوند که سلول های حاوی آن وکتور یا مشتق شده نوترکیب از آن به آسانی از جمعیت های مخلوط جدا شوند. دو نوع مولکول دارای این خصوصیات، پلاسمیدها و کروموزوم‌های باکتریوفاژی هستند (Strauss, 2003).

1-3-1- پلاسمیدها

انواع زیادی از پلاسمیدها در طبیعت در باکتری‌ها و برخی مخمرها یافت می‌شوند، پلاسمیدها در مقایسه با کروموزوم سلول میزبانی، DNA حلقوی کوچکی هستند که اغلب در موقعیت خارج کروموزومی حفظ می‌شوند. اگرچه پلاسمیدها به طور کلی برای رشد و تقسیم سلولی غیر ضروری اند، اغلب صفاتی مانند مقاومت به آنتی بیوتیک را به سلول میزبان می‌دهندکه می‌تواند یک مزیت انتخابی تحت شرایط خاص باشد. ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک توسط DNA پلازمیدی (pDNA) کد شده که اغلب در ساخت وکتورها برای مهندسی ژنتیک استفاده می‌شوند. در آزمایشگاه‌ها برای اطمینان از وجود یک پلاسمید ویژه در باکتری اغلب از مقاومت به آنتی بیوتیک به عنوان شاخص انتخابگر استفاده می‌شود، به این صورت که در محیط رشد حاوی آنتی بیوتیک مناسب فقط سلول های دارای پلاسمید زنده خواهند ماند. دامنه اندازه پلازمیدها از 1kbبرای کوچک ترین آن‌ها تا حدود 250 kb برای بزرگ ترین پلازمیدها متغیر است[1].

1-3-2- کروموزوم های باکتریوفاژی

باکتریوفاژها ویروس‌هایی هستند که به طور اختصاصی باکتری‌ها را آلوده می‌کنند و ساختمان ساده‌ای دارند و فقط از یک مولکول DNA یا RNA تشکیل شده‌اند که چندین ژن ازجمله ژن‌هایی برای

1- http://gs.washington.edu/.../lectureFeb25

همانندسازی فاژ را حمل می‌کنند. اگرچه انواع مختلفی از باکتریوفاژها وجود دارند اما فقط λ و M13 به عنوان حامل کلون کردن نقش اساسی را برعهده دارند (Brown, 2001).

1-4- اتصال DNA خارجی به DNA وکتور

هدف نهایی این مرحله اتصال کووالان قطعه DNA خارجی به ژنوم وکتور و سپس تشکیل یک مولکول DNA نوترکیب است. ارتباط کووالان دو قطعه DNA توسط آنزیم DNA لیگاز انجام می‌گیردکه معمولاً از باکتری Ecoli آلوده شده به فاژ T4 خالص شده است. این آنزیم پیوندهای فسفودی استر بین گروه های ′5 فسفریل و در نوکلئوتید انتهایی از قطعات DNA مجاور را سنتز می‌کند (Greenaway et al, 1980).

1-5- فرآیند Ligation

ژنوم دهنده توسط آنزیم محدودکننده هضم می‌شود که تولید قطعاتDNA با انتهای چسبنده می‌کند، این قطعات در دمای پایین با پلازمیدی که توسط همان آنزیم محدودکننده هضم شده مخلوط می‌شوند سپس آنزیم DNA لیگاز به مخلوط واکنش اضافه می‌شود. واکنش Ligation به دلیل مشکلاتی که در جای گیری دو مولکول DNA مجاور نسبت به همدیگر وجود دارد، در دامنه پایینی رخ می‌دهد و به نظر می‌رسد که ترجیحی برای قطعات DNA کوچک باشد. این روش می‌تواند برای اتصال قطعاتDNA با انتهای صاف که توسط هضم با برخی آنزیم های محدودکننده تولید شده اند استفاده شود ولی دراین صورت کارآیی بالایی ندارد زیرا آنزیم لیگاز قادر به نگه داشتن مولکول های متصل شونده نیست و برای در کنار هم قرار گرفتن انتهاها باید منتظر اتصال اتفاقی باشد. بنابراین اتصال انتهاهای تراز[1] بایستی در غلظت بالا انجام شود تا شانس کنار هم قرار گرفتن صحیح قطعات افزایش یابد. برخلاف آن

1- Blunt end

Family name: Akrami	Name:Ania
Title of Thesis : Construction of a preconstruct for recombinant thermostable Carboxy methyl cellulase from the strain of Bacillus pumilus Z14	
Supervisor(s): Dr. Zahri, Saber Advisor(s): Dr. Latifi-navid, Saeid	
Graduate Degree **M.Sc.** Major: Biology University: **Mohaghegh Ardabili** Graduation date: 2014	 Specialty: Cellular and Molecular Biology Faculty: Science Number of pages: 94

Abstract:

The endoglucanase are industrial enzymes which their recombinantly productions are economically important. The laboratory findings showed that the enzymes from Bacillus pumilus is thermostable, active in wide pH scale range, has significant stability in presence of the ions and detergents and can hydrolyse native lignocellulosic materials of fodder. In order to heterologous production of the enzyme, the pET21-b(+) expression vector was selected. The vector has important features for heterologous expression including: strong and regulative promoter, suitable multiple cloning site and histidine tag in downstream of cloning site. The two specific tailed primers was designed to amplify the ORF of the gene from B.pumilus Z14 which was included two restriction sites of BamHI-5´ and XhoI-3´. In order to increment of restriction efficiency and future modifications of the gene, an expression preconstruct was prepared by cloning of the PCR fragment in vector pTG19-T. The recombinant molcules were transformed in E.coliDH5α using heat shock/$CaCl_2$ method. The correct colonies were selected using blue/white screening and toothpick methods. The recombinant molecule was confirmed by appropriate restriction endoglucanase digestion. The insert was cloned in pTG19-T between two digestion sites of BamHI and digestion with the restriction enzyme produced two linear fragment. The lower band was matched to the size of the full length gene.

Keywords: Bacillus pumilus, Cloning, Endoglucanase, Expression vector, Heterologous expression, Preconstruct.

University of Mohaghegh Ardabili

Faculty of Scince

Department of Biology

Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of M.Sc. in Department of Cellular and Molecular Biology

Title:

Construction of a preconstruct for recombinant thermostable Carboxy methyl cellulase from the strain of Bacillus pumilus Z14

Supervisor:

Saber Zahri (Ph. D)

Advisor:

Saeid Latifi-Navid (Ph. D)

By:

Ania Akrami

June - 2014