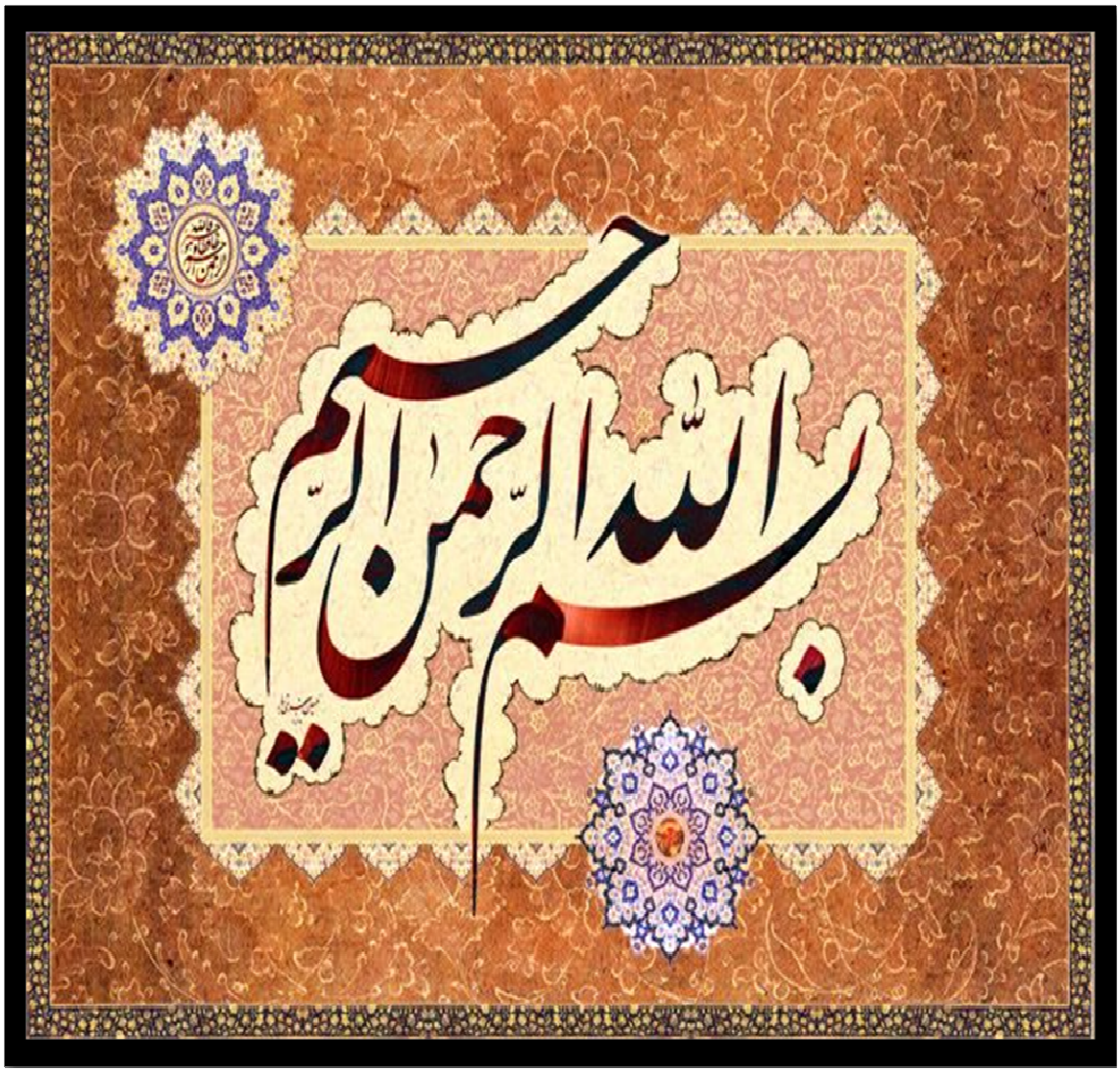

بسم الله الرحمن الرحیم

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست‌شناسی–بیوتکنولوژی میکروبی

عنوان:

افزایش تولید فاکتور رشد اپیدرمال انسانی نوترکیب (*rhEGF*) با استفاده از *اشریشیا کلی*

استادان راهنما:

دکتر ایرج رسولی

دکتر ولی‌الله بابایی‌پور

استادان مشاور:

دکتر جلال‌الدین غنوی

آقای شهرام نظریان

دانشجو:

محمّد رحمتی چاله‌سرائی

آبان ماه ۱۳۸۹

دانشکده علوم پایه

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه تحصیلی

با تاییدات الهی و استعانت از حضرت ولیعصر "عج"

جلسه دفاعیه پایان نامه **آقای محمّد رحمتی چاله سرائی** به شماره دانشجویی **۸۶۷۵۸۶۰۰۲** در رشته **بیوتکنولوژی گرایش میکروبی** در مقطع **کارشناسی ارشد**

تحت عنوان:

افزایش تولید فاکتور رشد اپیدرمال انسانی نوترکیب (*rhEGF*) با استفاده از از *Escherichia coli*

به ارزش **۸ واحد** راس ساعت **۱۳** روز **شنبه** مورخ **۱۳۸۹/۸/۲۹** در دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد تشکیل گردید.

هیات داوران پس از استماع دفاعیات و پرسش های لازم، نمره و درجه ایشان را به شرح زیر اعلام میدارند:

نمره پایان نامه به عدد ۱۹/۰۴ نمره پایان نامه به حرف نوزده و چهار صدم درجه عالی

درجه عالی۲۰-۱۸ بسیار خوب ۱۷/۹۹-۱۶ خوب ۱۵/۹۹-۱۴ قابل قبول ۱۳/۹۹-۱۲ و غیر قابل قبول کمتر از ۱۲

عنوان	نام ونام خانوادگی	مرتبه دانشگاهی	امضا
استاد راهنما مسؤل	دکتر ایرج رسولی	استاد	
استاد راهنمای دوم	دکتر ولی ا...بابایی پور	استادیار	
استاد مشاور اول	دکتر جلال الدین غنوی	استادیار	
استاد مشاور دوم	آقای شهرام نظریان	دانشجوی دوره دکتری	
داور اول	دکتر مهدی فروزنده	دانشیار	
داور دوم	دکتر سید لطیف موسوی	دانشیار	۸۹/۸/۲۹
نماینده تحصیلات تکمیلی گروه	دکتر منیژه کرمی	استادیار	
نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر حمیدرضا نویدی	استادیار	

اینجانب محمدرحمتی حاجی سرائی متعهد می شوم که مطالب مندرج در این پایان نامه حاصل کار پژوهشی اینجانب تحت نظارت و راهنمایی اساتید دانشگاه شاهد بوده و به دستاوردهای دیگران که در این پژوهش از آنها استفاده شده است مطابق مقررات و روال متعارف ارجاع و در فهرست منابع و مآخذ ذکر گردیده است. این پایان نامه قبلاً برای احراز هیچ مدرک هم سطح یا بالاتر ارائه نگردیده است.

در صورت اثبات تخلف در هر زمان، مدرک تحصیلی صادر شده توسط دانشگاه از درجه اعتبار ساقط بوده و دانشگاه حق پیگیری قانونی خواهد داشت.

کلیه نتایج و حقوق حاصل از این پایان نامه متعلق به دانشگاه شاهد می باشد.

هرگونه استفاده از نتایج علمی و عملی، واگذاری اطلاعات به دیگران یا چاپ و تکثیر، نسخه برداری، ترجمه و اقتباس از این پایان نامه بدون موافقت کتبی دانشگاه شاهد ممنوع است.

نقل مطالب با ذکر مآخذ بلامانع است.

نام و نام خانوادگی امضاء دانشجو

محمدرحمتی حاجی سرائی

Rahmati

تقدیم به
آفریننده ی دانش ها
مادر مهربان و فداکار، پدر زحمتکش و خواهران عزیزم
تمامی انسان های پاک
و
تقدیم به...

چکیده:

فاکتور رشد اپیدرمال انسانی (*hEGF*) پلی‌پپتید مونومری و کوچک است که توسط سلول‌های بافت‌های مختلفی در بدن انسان تولید می‌شود. *hEGF* علاوه بر رشد سلول‌های اپیدرمال، بر روی سلول‌های مختلفی نیز تأثیر می‌گذارد و مصارف بسیار زیادی در صنایع مختلف پزشکی، دارویی، آرایشی و بهداشتی دارد. در حال حاضر این فاکتور رشد توسط محققین و شرکت‌های مختلفی تولید و مصرف می‌گردد. بکارگیری فناوری DNA نوترکیب و استفاده از روش‌های جدید و کارآمد کمک قابل ملاحظه‌ای در دست‌یابی به مقادیر نسبتاً مناسب کرده است ولی تا به حال بازدهی بالایی از میزان تولید *hEGF* نوترکیب پری‌پلاسمی گزارش نشده است. به دلیل بالا بودن سرعت بیان پروتئین‌ها نوترکیب در سیستم‌های بیانی مانند *اشریشیا کلی*، پروتئین‌های نوترکیب به سرعت در سیتوپلاسم سلول تجمع یافته و تولید اجسام نامحلول را می دهند که سبب القاء پاسخ‌های میزبان، عدم ترشح به پری‌پلاسم باکتری و حتی ممکن است موجب لیز باکتری شود. بنابراین برای دستیابی به بازدهی بالای پروتئین نوترکیب ترشحی و فعال به لحاظ عملکرد زیستی، بهینه‌سازی شرایط تولید اهمیت بسزایی دارد.

در این تحقیق اثر دما، غلظت گلوکز اولیه در محیط کشت LB و غلظت آرژینین برای افزایش تولید پری‌پلاسمیک پروتئین نوترکیب *hEGF* در کشت غیرمداوم *اشریشیا کلی* بررسی شد. تحت شرایط بهینه: رشد در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، القاء بیان توسط ۰/۲ میلی‌مولار IPTG، استفاده از ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز، و افزودن ۰/۳ مولار ال-آرژینین مقدار ترشح پروتئین نوترکیب به پری‌پلاسم به ۲۵ درصد پروتئین کل سلول رسید. میزان *فاکتور رشد اپیدرمال انسانی* از پری‌پلاسم باکتری توسط روش شوک اسمزی اصلاح شده در شرایط بهینه ۹۲۰ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمده است که از بالاترین مقادیری است که تاکنون گزارش شده است.

کلیدواژه: فاکتور رشد اپیدرمال انسانی، ال-آرژینین، پری‌پلاسم، ژن سنتتیک، تولید ترشحی

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: کلیات

چکیده: أ
۱-۱- مقدمه: ۲
۱-۲- تاریخچه کشف و معرفی فاکتور رشد اپیدرمال ۴
۱-۳- فاکتور رشد اپیدرمال انسانی ۵
۱-۴- فاکتورهای رشد خانواده *EGF* ۶
۱-۵- ژن *hEGF* ۶
۱-۶- *EGF* انسانی در چه بافت‌هایی تولید می‌شود؟ ۷
۱-۷- فعالیت‌های چندجانبه و متنوع *EGF* ۸
۱-۸- شناسایی گیرنده *EGF* و ساختار آن ۹
۱-۹- فعالیت میتوژنیک فاکتور رشد اپیدرمال ۱۱
۱-۱۰- ساختار *hEGF* ۱۱
۱-۱۱- برهمکنش‌های لیگاند•گیرنده ۱۴
۱-۱۲- کاربردهای *hEGF* ۱۸
۱-۱۳- روش‌های تولید *hEGF* ۱۹
۱-۱۴- معرفی فرایند تخمیر ۱۹
۱-۱۴-۱- کشت غیرمداوم ۲۰
۱-۱۴-۲- کشت غیرمداوم همراه با خوراک‌دهی ۲۰
۱-۱۵- انتخاب سیستم بیانی جهت تولید پروتئین نوترکیب ۲۳
۱-۱۶- سویه‌های *E. coli* ۲۵
۱-۱۷- سابقه و روش‌های تولید فاکتور رشد اپیدرمال انسانی نوترکیب در *اشریشیا کلی* ۲۶

۱-۱۷-۱- بیان hEGF در *اشریشیا کلی* به ۳ روش صورت می‌گیرد: ۲۶
۱-۱۷-۱-۱- تولید سیتوپلاسمی ۲۷
۱-۱۷-۱-۲-ترشح پروتئین نوترکیب ۲۷
۱-۱۷-۱-۲-۱- بیان خارج سلولی ۲۷
۱-۱۷-۱-۲-۲- بیان پری‌پلاسمی ۲۷
۱-۱۸- تخلیص پروتئین نوترکیب هدف از پری‌پلاسم *اشریشیا کلی* ۳۲
۱-۱۹- دلایل و اهداف انجام طرح ۳۴
۲-۱- مواد مورد نیاز: ۳۷
۲-۲- روش‌ها: ۳۹
۲-۲-۱- طراحی و سفارش ژن ۳۹
۲-۲-۱-۱- ترادف ژن *hEGF*-Endoxylanase ۳۹
۲-۲-۲- استریل کردن لوازم، محیط کشت و سایر محلول‌ها ۴۲
۲-۲-۳- کشت باکتری‌های مورد استفاده و نحوهی نگهداری آنها: ۴۳
۲-۲-۴- تهیه سلول‌های مستعد: ۴۳
۲-۲-۵- تراریخت نمودن DNA نوترکیب به‌داخل سلول‌های میزبان *اشریشیا کلی*: ۴۴
۲-۲-۶- تخلیص پلاسمید: ۴۵
۲-۲-۶-۱- تخلیص دستی پلاسمید نیز بدین صورت انجام گرفت: ۴۵
۲-۲-۷- تأیید پلاسمیدهای استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگارز ۴۶
۲-۲-۸- هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده: ۴۸
۲-۲-۹- رسوب‌دهی نمک‌ها از DNA: ۵۰
۲-۲-۱۰- القاء بیان جهت تولید پروتئین نوترکیب در لوله آزمایش و کشت‌های فلاسک: ۵۰
۲-۲-۱۱- تخمیر به روش کشت غیرمداوم ۵۱
۲-۲-۱۲- بخش‌بندی سلول‌های کشت داده شده و استخراج hEGF نوترکیب از پری‌پلاسم *اشریشیا کلی*: ۵۳
۲-۲-۱۳- سنجش میزان بیان ۵۴
۲-۲-۱۳-۱- تریسین-SDS-PAGE ۵۴
۲-۲-۱۳-۱-۱-روش انجام الکتروفورز تریسین-SDS-PAGE ۵۶
۲-۲-۱۴- تخلیص پروتئین‌های نوترکیب به‌کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA: ۵۸
۲-۲-۱۴-۱- مراحل انجام تخلیص پروتئینهای نوترکیب: ۵۸
۲-۲-۱۵- تعیین غلظت پروتئین از محلول حاوی پروتئین‌های نوترکیب: ۵۹
۲-۲-۱۵-۱- مواد بکار رفته: ۶۰

۲-۲-۱۶- انجام لکه‌گذاری وسترن به‌منظور تأیید پروتئین بیان شده: ۶۲
۲-۲-۱۷- سنجش توده سلولی ۶۳
۲-۲-۱۸- تهیه ذخیره (بانک) سلولی از کلون‌های تأیید شده: ۶۴
۲-۲-۱۹- افزایش بیان پری‌پلاسمی پروتئین hEGF: ۶۴
۳-۱- بررسی بیوانفورماتیکی توالی DNA و پروتئینی: ۶۷
۳-۲- تخلیص پلاسمید: ۶۸
۳-۳- هضم آنزیمی پلاسمیدهای حاوی ژن *hEGF*: ۶۹
۳-۴- بیان پروتئین نوترکیب هدف: ۷۱
۳-۵- تخلیص پروتئین‌های نوترکیب: ۷۳
۳-۶- سنجش غلظت پروتئین: ۷۵
۳-۷- آنالیز پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلات با کمک آنتی‌بادی علیه نشان هیستیدین: ۷۷
۳-۸- کشت غیرمداوم ۷۸
۳-۹- افزایش بیان *hEGF*: ۷۹
۳-۹-۱- اثر دما ۸۰
۳-۹-۲- غلظت گلوکز اولیه ۸۱
۳-۹-۳- اثر ال-آرژینین در افزایش ترشح ۸۲
۴-۱- رویکرد کلی این پژوهش: ۸۵
۴-۲- سفارش ژن *hEGF* نوترکیب بصورت سنتتیک: ۸۶
۴-۳- انتخاب سامانه بیانی: ۸۶
۴-۴- همسانه‌سازی ژن *hEGF* روی ناقل *pET22b(+)*: ۸۷
۴-۵- بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب: ۸۸
۴-۶- بررسی پروتئین نوترکیب تولید شده با استفاده از لکه‌گذاری وسترن: ۸۹
۴-۷- بحث ۹۰
۴-۸- پیشنهادها: ۹۱

فصل پنجم:

منابع ۹۳

فصل ششم:

پیوست‌ها ۱۱۶

ABSTRACT: ۱۲۵

فهرست اشکال

عنوان صفحه

شکل ۱-۱: ساختار ژن *hEGF* ۷

شکل ۱-۲: میزان بیان *hEGF* در بافت‌های مختلف ۸

شکل ۱-۳: دو مولکول مستقل *hEGF* ۱۳

شکل ۱-۴: مدل فضا پرکن مولکول *EGF* ۱۴

شکل ۱-۵: ساختار کریستالی کمپلکس *2:2 EGF-EGFR* ۱۵

شکل ۱-۶: نقشه‌های چگالی الکترونی تجربی و پکینگ کریستالی کمپلکس *EGF-EGFR* انسانی ۱۶

شکل ۱-۷: برهمکنش بین *EGF* و *EGFR* ۱۷

شکل ۱-۸: نمونه‌ای از کاربرد *EGF* در درمان اختصاصی سرطان ۱۸

شکل ۱-۹: تاخوردن و ترشح پروتئین در *اشریشیا کلی* ۲۸

شکل ۲-۱: ساختمان پلاسمید *pET22b(+)hEGF* ۳۸

شکل ۲-۲: ساختمان پلاسمید *pET3aEXhEGF* ۳۹

شکل ۲-۳: نقشه حامل بیانی *pET22b(+)* ۴۱

شکل ۲-۴: نقشه حامل بیانی *pET*3a ۴۲

شکل ۳-۱: پیش‌بینی نرم‌افزاری ساختار پروتئین *hEGF53* ۶۸
شکل ۳-۲: ژل الکتروفورز پلاسمیدهای *pET22b(+)hEGF* و *pET3aEXhEGF* ۶۹
شکل ۳-۳: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب *pET22b(+)hEGF* ۷۰
شکل ۳-۴: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب *pET3aEXhEGF* ۷۱
شکل ۳-۵: بررسی بیان ژن نوترکیب به کمک Tricine-SDS-PAGE ۱۵ درصد ۷۳
شکل ۳-۶: بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب *hEFG* ۷۴
شکل ۳-۷: وسترن بلاتینگ پروتئین نوترکیب *hEFG* ۷۷
شکل ۳-۸: بررسی بیان ژن نوترکیب به کمک تریسین-SDS-PAGE ۱۵ درصد در دمای ۳۷ °C ۸۰
شکل ۳-۹: بررسی بیان ژن نوترکیب به کمک تریسین-SDS-PAGE ۱۵ درصد پس از اضافه کردن ۰/۳ مولار ال-آرژینین ۸۳

فهرست جدول‌ها

عنوان صفحه

جدول ۱-۱: میزان بیان یا عدم بیان *EGF* در بافت‌های مختلف بدن ۸
جدول ۱-۲: روش‌های خوراک‌دهی برای برقراری کشت غیرمداوم خوراک‌دهی شده ۲۱
جدول ۱-۳: مزایا، معایب و روش‌های اصلاح معایب سیستم بیانی *اشریشیا کلی* ۲۴
جدول ۱-۴: مقایسه دو توالی راهنمای اندوزایلاناز و Pel B ۲۹
جدول ۱-۵: سابقه تولید پروتئین‌های نوترکیب با توالی راهنمای اندوزایلاناز و Pel B ۳۰
جدول ۱-۶: دو جایگاه برش مناسب برای انتهای ´۵ ژن‌ها در مهندسی ژنتیک ۳۱
جدول ۲-۱: مخلوط واکنش هضم آنزیمی برای حامل *pET22b(+)hEGF* ۴۸
جدول ۲-۲: مخلوط واکنش هضم آنزیمی مرحله اول برای حامل *pET3aEXhEGF* ۴۹
جدول ۲-۳: مخلوط واکنش هضم آنزیمی مرحله دوم برای حامل *pET3aEXhEGF* ۴۹
جدول ۲-۴: دامنه جداسازی ژل‌های اکریل‌آمید تریسین-SDS ۵۵
جدول ۲-۵: اجزا و مقدار هر یک از محلول‌های استاندارد در روش پروتئین‌سنجی برادفورد ۶۱

جدول ۳-۱: توالی آمینو اسیدی دو ژن نوترکیب G_1 و G_2 ..... ۶۷

جدول ۳-۲: محاسبه غلظت محلول‌های پروتئینی خالص شده ۷۶

جدول ۳-۳: اثر مقدار اولیه گلوکز روی مقدار تولید پروتئین نوترکیب و تراکم نهایی سلول ۸۱

فهرست نمودارها

عنوان صفحه

نمودار ۳-۱: نمودار منحنی استاندارد برادفورد..... ۷۶

نمودار ۳-۲: تغییرات چگالی سلولی براساس میزان جذب نوری (OD) در طول موج ۶۰۰ نانومتر و نیز سرعت رشد ویژه نسبت به زمان نمونه‌گیری ۷۸

مناجات نامه:

خداوندا تو را سپاس می گویم بخاطر ذات مقدست، بخاطر علم بیکرانت، بخاطر تمام صفات پاک و خوبی ها که تمام خوبی ها از آن توست. ای خدای بزرگ، کریم، پرسخاوت و مهربان، ای خدایی که جن و انس، فرشتگان و تمام موجودات عالم بی انتها از وصف تو عاجزند؛ چراکه تو وصف ناپذیری. خدایا زبان، چشم، گوش، و تک تک سلول های بدنمان که متعلق به توست از بدی و پلیدی نجات بده.

خدایا ما را با قرآن که کلام زیبای تو و راهنمای بشیریت به سوی رستگاریست انس و الفت دائمی عنایت فرما. قرآنی که اگر بر کوه نازل می شد کوه در برابر خداوند متواضع و خاشع می گشت. ای خدای بزرگواری که با گفتن نام مبارکت ذات تشکیل دهنده عالم به سجده می افتند. خدایا حتی مولکول های آب که بیشتر جسم آدمی، کره زمین و بسیاری از موجودات را تشکیل داده است با شنیدن نام مبارک تو به اشکال بسیار زیبا در می آیند و با شنیدن نام شیطان شکل زشت و بی نظم به خود می گیرند...

شکر به خاطر تمام اسرار و معجزات زیبایت...

خدایا تو هر روز به انسان ثابت می کنی که تمام عالم هستی، از کوچکترین شان تا بزرگ ترین شان به تسبیح تو مشغولند، آنوقت انسان ظالم و گناهکار به گردنکشی و نافرمانی تو مشغول است. خدایا ما زهم تا لحظه مرگ به انسان فرصت جبران می دهی ولی افسوس این آفریده شکر، به خود ستم می کند. خدایا من عاجزتر از آنم که بتوانم تو را ستایش کنم.

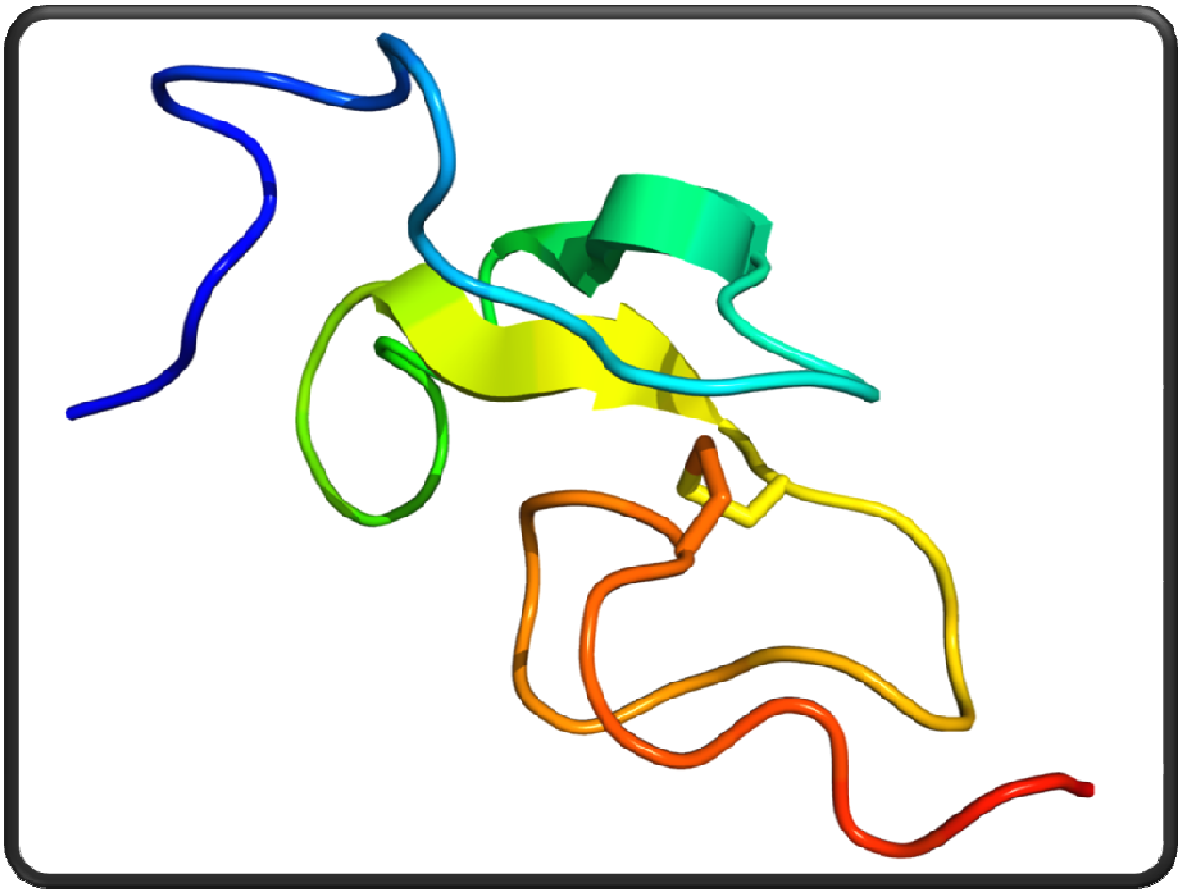
از لطف خداوند مهربان بسیار متشکرم که به این بنده ی حقیر فرصت علم آموزی عطا فرمودند و به لطف او توانستم تنها ذره ی بسیار بسیار ناچیزی از دریای علم بیکران حضرت حق را بیاموزم.

تقدیر و تشکر:

در اینجا لازم می‌دانم که از زحمات همه‌ی عزیزانی که در مقطع کارشناسی ارشد و به نتیجه رسیدن این تحقیق به این بنده حقیر یاری رساندند تشکر و قدردانی نمایم. از حمایت‌ها و کمک‌های تمام اعضای خانواده‌ام بی‌نهایت متشکرم. از حمایت و کمک استاد عزیزم جناب آقای دکتر ایرج رسولی، استاد صبور و مهربانم جناب آقای دکتر ولی‌ا... بابایی پور، استاد و معلم بزرگوارم جناب آقای دکتر جلال‌الدین غنوی، استاد عزیزم جناب آقای دکتر فرهبد، آقای دکتر افشین بهرامی، خانم دکتر پوپک فرنیا و خواهر بزرگوارشان خانم دکتر پریسا فرنیا، آقای شهرام نظریان، آقای دکتر سید لطیف موسوی، خانم دکتر کرمی، خانم دکتر کریمی، خانم دکتر رجبیان و تمامی استادان عزیزم در دانشگاه شاهد متشکر و ممنونم. از لطف و همکاری همکاران بخش‌های CSR، مایکوباکتریولوژی، و کتابخانه و سایر افرادی که در بیمارستان دکتر مسیح دانشوری مرا یاری و حمایت نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از کمک‌ها و هم‌فکری خانم هدی خوشنویس، از زحمات و کمک‌های فراوان خانم حسینی، خانم دکتر مصطفوی، آقایان سید مهدی لاری، رضا رهبر، حسین نوری، مصطفی جمال آبادی، محسن بصیری و همکلاسی‌های خوبم بسیار متشکر و ممنونم.

از کارمندان دانشگاه شاهد؛ آقای شکوری، آقای قاسم خواه، آقای سالار زاده، آقای حبیبی، آقای صدری پور، سرکار خانم محلوجیان و... نیز کمال تشکر و قدردانی دارم.



فصل اول

کلیات

۱-۱- مقدمه:

به دنبال کشف ابزارهایی برای دست‌کاری آزمایشگاهی[۱] توالی‌های DNA در اواخر سال ۱۹۶۰، بیان[۲] ژن‌ها در سلول‌های میکروبی توسط فرایند تخمیر بعنوان یک تکنیک کلیدی جهت تولید پروتئین‌های زیست‌فعال[۳] در مقادیر و کیفیتی که قبلا دست‌یابی به آنها توسط جداسازی از منابع طبیعی مشکل یا غیر ممکن بود، محقق گردید.

در سال ۱۹۸۲ انسولین انسانی اولین محصول جهت درمان بیماری دیابت از فناوری DNA نوترکیب[۴] بدست آمد. تجاری‌سازی این فناوری تاکنون بسیار گسترش یافته است. مثال‌های موفق دیگر از محصولات دارویی تولید شده با این فناوری شامل پروتئین‌های خون مانند اریتروپوئتین[۵]، فاکتورهای انعقادی و ضد انعقاد خون؛ هورمون‌های انسانی مانند *فاکتور رشد اپیدرمال*، هورمون رشد، فاکتورهای رشد فیبروبلاست و...؛ واسطه‌های ایمنی[۶] مانند اینترفرون‌ها و واکسن‌های مختلف می‌باشند. هرچند تجاری‌سازی این پروتئین‌ها از نظر صنعتی نیازمند وجود کشت نوترکیب پایدار به لحاظ ژنتیکی، استفاده از فرایند تخمیر با قابلیت تولید بالا، روش‌های بهینه‌سازی، روش‌های بازیافت و تخلیص مقرون به صرفه است.

در میان تمامی میزبان‌هایی که جهت این منظور قابل استفاده هستند و استفاده می‌شوند، مانند مخمرهای *ساکارومایسس سرویزیه* و *پیچیا پاستوریس*، سلول‌های تخمدان هامستر (CHO)[۷]، و میزبان‌های دیگر، باکتری *اشریشیا کلی* اساساً به دلیل سادگی روش‌های دست‌کاری ژنتیکی، سرعت رشد بالا، قابلیت دست‌یابی به تراکم سلولی بالا، نیازمندی‌های غذایی ساده، توالی ژنوم کاملاً مشخص و مسیرهای متابولیکی کاملاً شناخته شده میزبان برگزیده برای بیان بسیاری از ژن‌های هترولوگ گردید.

---

[1] *In vitro* manipulation
[2] Expression
[3] Bioactive
[4] Recombinant DNA (rDNA) technology
[5] Erythropoietin
[6] Immune modulators
[7] Chinese Hamster Ovary (CHO)

فاکتور رشد اپیدرمال انسانی (*hEGF*) پلی‌پپتید مونومری و کوچک است که توسط سلول‌های بافت‌های مختلفی در بدن انسان تولید می‌شود. *hEGF* علاوه بر رشد سلول‌های اپیدرمال، بر روی سلول‌های مختلفی نیز تأثیر می‌گذارد و مصارف بسیار زیادی در صنایع مختلف پزشکی، دارویی، آرایشی و بهداشتی دارد. در حال حاضر این فاکتور رشد توسط محققین و شرکت‌های مختلفی تولید و مصرف می‌شود. به دلیل اینکه تولید آن از منابع طبیعی وقت‌گیر و هزینه‌بر بوده و نیز امکان بروز مشکلات مختلف، مخصوصاً در موارد مصرف انسانی وجود دارد، این کار مقرون به صرفه نیست. بنابراین راهبردهای مختلفی جهت تولید بهینهٔ آن بکار گرفته شده است. بکارگیری فناوری DNA نوترکیب و استفاده از روش‌های جدید و کارآمد کمک قابل ملاحظه‌ای در دست‌یابی به مقادیر نسبتاً مناسب کرده است ولی تا به حال بازدهی بالایی از میزان تولید *hEGF* نوترکیب فعال زیستی گزارش نشده است. تمامی تلاش‌های محققین در جهت استفاده از حداکثر توانایی میزبان نوترکیب و بکارگیری بهترین سیستم بیانی و راهبرد تولید، در تولید پروتئین فعال است. اکنون تولید پروتئین‌های دارویی بصورت ترشحی مناسب‌ترین روش نسبت به سایر روش‌های ممکن است. هدف از این تحقیق معرفی *فاکتور رشد اپیدرمال انسانی*، روش‌های مناسب برای بالا بردن بازدهی تولید پروتئین بصورت ترشحی و کاملاً فعال و ارزیابی آنها می‌باشد. در فصل اول به معرفی *فاکتور رشد اپیدرمال* انسانی با جزئیات کامل مانند تاریخچه کشف، خانواده *hEGF*، ساختار ژنتیکی و پروتئینی آن، ساختار گیرنده و نحوه عملکرد این پروتئین، کاربردهای بسیار زیاد *hEGF*، و در نهایت به روش‌های تولید و افزایش تولید و نیز راه‌های استخراج آن از میزبان پرداخته‌ایم. فصل دوم مواد و روش‌های بکار رفته در این تحقیق با جزئیات شرح داده شده است. در فصل سوم نتایج حاصل از آزمایش‌ها و کارهای عملی به همراه تصاویر مناسب و تفسیر و ارزیابی آنها ذکر شده است. فصل چهارم مربوط به بحث در مورد رویکرد انتخاب موضوع و اهمیت تحقیق، نتایج بدست آمده و عملکرد مطالعات تحقیقاتی و نیز پیشنهادهای لازم جهت مطالعات بهتر و ایده‌های نو در آینده توسط محققین دیگر می‌باشد.

۱-۲- تاریخچه کشف و معرفی فاکتور رشد اپیدرمال[1]

ریتا لِوی-مونتالسینی[2]، یک زیست‌شناس تکوینی[3]، با کشف فاکتور رشد عصب[4] در اوایل سال ۱۹۵۰ پیشگام ایده‌ی فاکتورهای رشد بود [۱]. در سال ۱۹۵۳، دکتر استنلی کوهن به گروه لِوی-مونتالسینی پیوست و شروع به کار بر روی *NGF* و جداسازی فاکتورهای رشد از غدد بزاقی[5] نمود. دکتر استنلی کوهن در طول مطالعه بر روی فاکتور رشد عصب غدهٔ تحت-فکی[6] موش نر [۲]، با تزریق عصاره غده بزاقی به موش‌های تازه متولد شده متوجه باز شدن زودرس پلک‌های چشم و درآوردن دندان آن‌ها طی ۶-۷ روز اول، در مقایسه با موش‌های کنترل گردید، درحالیکه در حیوانات کنترل ۱۴-۱۲ روزه این فرایند رخ می‌دهد [۲،۳]. وی برای اولین بار موفق به شناسایی و تخلیص اولین فاکتور رشد گردید. این مشاهدات سبب شد کوهن پیشنهاد دهد که عصاره غده بزاقی حاوی مواد پیش‌برنده‌ی[7] رشد که مسئول تکوین زودرس موش است، می‌باشند. تحقیقات بیشتر در این مورد سبب شد کوهن ماده مسئول تسریع رشد را جداسازی کند، که بخاطر توانایی‌اش در تحریک تکثیر سلول‌های اپیدرمال و اپیتلیال قرنیه[8] موشی آن‌را فاکتور رشد اپیدرمال نامید [۳].

استنلی کوهن و ریتا لِوی-مونتالسینی برای پیشگام بودنشان در شناسایی فاکتور رشد، بطور مشترک جایزه نوبل فیزیولوژی و پزشکی سال ۱۹۸۶ را دریافت کردند.

فاکتور رشد اپیدرمال که بدلیل توانایی در مهار ترشح اسید معده بتا-اوروگاسترون[9] نیز نامیده می‌شود [۴] پلی‌پپتید تک‌رشته‌ای کوچک، دارای ۵۳ اسید آمینه، به وزن ۶/۲ کیلودالتون، pH ایزوالکتریک ۴/۶، با ۶ اسید آمینهٔ سیستئین، فاقد لیزین، آلانین و فنیل آلانین است [۵،۶]. در مولکول بالغ و فعال *EGF*، ۳ پیوند دی‌سولفیدی درون مولکولی حاصل از اتصال اسید آمینه‌های سیستئین، Cys^{6}-Cys^{20}، Cys^{14}-Cys^{31} و Cys^{33}-Cys^{42} وجود دارد [۵،۷،۸] (شکل ۱-۳). ساختار *EGF* بوسیلهٔ این پیوندهای دی‌سولفیدی به ۳ لوپ A (اسید آمینه‌های ۶ تا ۱۹، به شکل مارپیچ آلفا)، B (اسید آمینه‌های ۲۰ تا ۳۱،

[1] Epidermal Growth Factor (*EGF*)
[2] Rita Levi-Montalcini
[3] Developmental biologist
[4] Nerve Growth Factor (NGF)
[5] Salivary glands
[6] Sub-maxillary gland
[7] Promoting
[8] Corneal
[9] β-Urogastron