PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده فنی ومهندسی

پایان نامه کارشناسی ارشد

مهندسی شیمی – گرایش بیوتکنولوژی

خالص سازی اینترلوکین -۲ تولید شده در باکتری *اشرشیا کلی* نوترکیب

سمانه اسفندیار

استاد راهنما:

دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی

استاد مشاور:

دکتر سید عباس شجاع الساداتی

زمستان ۸۷

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه

خانم سمانه اسفندیار پایان نامه ۸ واحدی خود را با عنوان **خالص سازی پروتئین نو ترکیب اینترلوکین – ۲ انسانی** تولید شده توسط باکتری EscherichiaColi در تاریخ ۱۳۸۷/۱۲/۱۷ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی پیشنهاد می کنند.

عضو هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضا
استاد راهنما	دکتر سیره هاشمی نجف آبادی	استادیار	
استاد مشاور	دکتر سید عباس شجاع السادات	استاد	
استاد ناظر	دکتر ابراهیم واشقانی فراهانی	استاد	
استاد ناظر	دکتر رسول خلیل زاده	استادیار	
مدیر گروه (یا نماینده گروه تخصصی)	دکتر ابراهیم واشقانی فراهانی	استاد	

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: **با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:**

ماده 1- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده 2- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده 3- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده 4- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده 5- این آیین‌نامه در 5 ماده و یک تبصره در تاریخ87/4/1 در شورای پژوهشی و در تاریخ 87/4/23 در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ 87/7/15 شورای دانشگاه بـه تـصویب رسـیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده 1: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده 2: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده **سمانه اسفندیار** در رشته **مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی** است که در سال 1387 در دانشکده**فنی ومهندسی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم **سمیره هاشمی نجف آبادی**، مشاوره سرکار جناب آقای دکتر **سید عباس شجاع الساداتی** از آن دفاع شده است.»

ماده 3: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده 4: در صورت عدم رعایت ماده 3، 50% بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده 5: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده 4 را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده 6: اینجانب **سمانه اسفندیار** دانشجوی رشته **مهندسی شیمی -بیوتکنولوژی** مقطع **کارشناسی ارشد**

تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی:**سمانه اسفندیار**

تاریخ و امضا:

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

تقدیم به:

پدر و مادرم عزیزم

که افتخار وجودشان برایم

از هر مدرکی ارزشمندتر و بالاتر است.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

تقدیم به پناهگاه شکیبای دلشوره هایم

همسر عزیزم، مجتبی

که اگر حمایت های بی دریغ او نبود، شاید هرگز، این چنین استوار و قوی گام بر نمی داشتم.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

حال که با استعانت از خداوند بزرگ این مقطع تحصیلی را به پایان رسانیده‌ام:

از تک تک معلمان و بزرگواران در زندگی‌ام...

که در امر تحصیل- تعلیم و تربیت- پژوهش- تحلیل و تحقیق و معرفت همواره مرا تشویق و همراهی کرده و می‌کنند کمال سپاسگزاری و قدردانی را به‌جا می‌آورم. امیدوارم همواره بتوانم به بهترین شکل ادامه دهنده راه و آرمانشان باشم.

از استادان و بزرگواران در دوره تحصیلی کارشناسی ارشد:

استاد راهنمای محترم سرکار خانم **دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی**، به‌خاطر راهنمایی‌های ارزنده ایشان در گامهای تحقیق و صبوری و بزرگواریهای ایشان در طول شکل‌گیری این تحقیق قدردانی می‌کنم

استاد مشاور جناب آقای **دکتر سید عباس شجاع الساداتی**, به‌خاطر راهنمایی‌های ارزنده و بی‌دریغ ایشان در تمام طول تحقیق سپاسگزارم

از کلیه عزیزان در مرکز طبی کودکان بالاخص:

سرکار خانم دکتر زهرا پورپاک، سرکار خانم شکوه اعظم صراف زاده، به‌خاطر همراهی و راهنمایی‌های ایشان در حین تحقیق و همه دوستان و همکلاسی های گرامی که مرا در این تحقیق یاری رساندند، کمال تقدیر و تشکر را دارم.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

چکیده

اینترلوکین-۲ انسانی با ۱۳۴ اسید آمینه و وزن ملکولی معادل ۱۵۵۱۷ دالتون، یک پروتئین تنظیم کننده در سامانه ایمنی است که باعث ایجاد سطح گسترده ای از پاسخ های ایمنی می شود. علاوه بر این، نقش مهمی در تکثیر و تمایز یافتن لمفوسیت های B و T دارد. اینترلوکین-۲ دارای کاربردهای دارویی متنوعی است از جمله در درمان انواع سرطان ها مانند سرطان خون، بیماری های نقص ایمنی و همچنین در تحقیقات آزمایشگاهی به کار می رود.

هدف از این پژوهش، خالص سازی پروتئین نو ترکیب اینترلوکین-۲ انسانی[۱] تولید شده در آزمایشگاه از سویه نوترکیب *E.coli* است. در انجام این تحقیق از روش کروماتوگرافی تمایلی[۲] با استفاده از Ni-NTA آگارز برای خالص سازی استفاده شد. دو روش شستشوی متفاوت در مورد خالص سازی مورد استفاده قرار گرفت که عبارتند از: تغییر pH و استفاده از ایمیدازول.

نتایج به دست آمده نشان داد که خالص سازی بهتری در صورت استفاده از ایمیدازول نسبت به تغییر pH حاصل شد. همچنین از آنجایی که پروتئین مورد نظر به صورت توده‌های پروتئینی غیرفعال[۳] تولید شد، پس از مراحل خالص سازی، مجموعه فرایند هایی برای بازیابی شکل فضایی[۴] آن انجام گرفت. بازیابی شکل فضایی اینترلوکین-۲ در ستون کروماتوگرافی Ni-NTA آگارز با کاهش غلظت اوره از ۰-۸ مولار انجام شد. سپس، اینترلوکین-۲ به دست آمده با آزمایش تکثیر لمفوسیت های T[۵] سنجیده شد و نشان داده شد که اینترلوکین-۲ بازیابی شده فعالیت مناسبی را داراست.

کلمات کلیدی: توده های پروتئینی، بازیابی شکل فضایی، کروماتوگرافی تمایلی، Ni-NTA آگارز

[1] Human Interleukin-2
[2] Affinity Chromatography
[3] Inclusion Body
[4] Refolding
[5] Lymphocyte Transformation Test (LTT)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

فهرست مطالب

۱-*فصل اول:مقدمه*.....۱
۲-*فصل دوم:مروری بر پژوهش های پیشین*.....۷
۲-۱-مقدمه.....۸
۲-۲- *مشکلات مربوط به بازیابی پروتئین های نوترکیب*.....۱۱
۲-۷-*جداسازی توده های پروتئینی، خالص سازی و حل کردن*.....۱۴
۲-۷-۱-شکست سلولی.....۱۴
۲-۷-۱-۱روش های مکانیکی.....۱۴
۲-۷-۱-۲-روشهای غیر مکانیکی.....۱۶
۲-۷-۲-حل کردن توده های پروتئینی.....۱۷
۲-۵-۴- انواع کروماتوگرافی.....۲۰
۲-۵-۴-۱-کروماتوگرافی غربال مولکولی.....۲۱
۲-۵-۴-۲-کروماتوگرافی تعویض یونی.....۲۲
۲-۵-۴-۳-کروماتوگرافی تقابل آب گریزی.....۲۳
۲-۵-۴-۵-کروماتوگرافی تمایلی.....۲۴
۲-۵-۴-۶-کروماتوگرافی تمایلی-یون فلزی تثبیت شده.....۲۶
۲-۷-۳- بازیابی شکل فضایی.....۳۰
۲-۷-۳-۱-دیالیز یک مرحله ای.....۳۲
۲-۷-۳-۲-دیالیز مرحله به مرحله.....۳۳
۲-۷-۳-۳-دیالیز با کاهش غلظت دناتوره کننده.....۳۴
۲-۷-۳-۴-رقیق سازی.....۳۴
۲-۷-۳-۵-رقیق سازی معکوس.....۳۵
۲-۷-۳-۶-مخلوط کردن.....۳۶
۲-۷-۳-۷-رقیق سازی پالسی.....۳۶
۲-۷-۴-رقابت بین بازیابی شکل فضایی وتجمع.....۳۶
۲-۷-۴-۱-بازیابی شکل فضایی با روش SEC.....۳۸
۲-۷-۴-۲-بازیابی شکل فضایی با روش جذب.....۴۰
۲-۸-*سیتوکین ها*.....۴۱
۲-۸-۱-اینترلوکین ها.....۴۲
۲-۸-۱-۱-اینترلوکین ۲.....۴۳
۳-فصل سوم:مواد و روش ها.....۴۶
۳-۱- میزبان و پلاسمید.....۴۷
۳-۲-*تهیه کلکسیون ریزسازواره ها و نگهداری سویه‌ها*.....۴۷
۳-۳-*محیط کشت*.....۴۸

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

۳-۴-تخریب سلولی ۴۸
۳-۵- شستشوی توده های پروتئینی ۴۹
۳-۶-حل کردن توده های پروتئینی ۴۹
۳-۷-کروماتوگرافی تمایلی ۴۹
۳-۸-بازیابی شکل فضایی اینترلوکین ۲ ۵۲
۳-۹-بررسی فرایند تجمع در حین بازیابی شکل فضایی اینترلوکین ۲ ۵۴
۳-۱۰-آزمایش سنجش فعالیت اینترلوکین ۲ ۵۵
۳-۱۰-۱-مواد مورد نیاز برای آزمایش سنجش فعالیت اینترلوکین-۲ ۵۷
۳-۱۱-آزمایش الکتروفورز ۵۸
۳-۱۱-۱- محلول‌های مورد نیاز برای الکتروفورز ۵۸
۳-۱۱-۲- طرز تهیه ژل ۶۱
۳-۱۱-۳-روش انجام الکتروفورز ۶۲
۳-۱۱-۴- نکات ایمنی ۶۲
۳-۱۲- سنجش توده سلولی ۶۳
۳-۱۳- اندازه‌گیری جذب نوری (OD) سوسپانسیون میکروبی ۶۳
۳-۱۴-اندازه گیری میزان کل پروتئین (روش برادفورد) ۶۳
۴-فصل چهارم:نتایج ۶۵
۴-۱-منحنی استاندارد برادفورد ۶۶
۴-۲-تولید ۶۷
۴-۳-حل کردن توده های پروتئینی ۶۸
۴-۴-روش های کروماتوگرافی ۷۰
۴-۵-بازیابی شکل فضایی پروتئین ۸۱
۴-۶-ژل فیلتراسیون ۸۵
۴-۷-نتایج مربوط به آزمایش فعالیت اینترلوکین-۲ ۸۶
۴-۸-اعمال بیولوژیک فعال سازی سلول T ۸۷
۵-فصل پنجم:مراجع ۹۲
۵-۱-مراجع ۹۳

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

فهرست جداول

جدول ۱-۱- محصولات دارویی پرفروش و فروش جهانی آنها از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۳ ۲

جدول ۲-۱- مقایسه میزبان های مختلف ۹

جدول ۲-۲- انواع روش های کروماتوگرافی ۲۰

جدول ۳-۱- طرز تهیه ژل ۱۲/۵% پلی اکریل آمید برای آزمایش SDS-PAGE ۶۰

جدول ۴-۱- غلظت های مختلف آلبومین سرم گاوی به کار برده شده برای رسم منحنی استاندارد در روش برادفورد ۶۶

جدول۴-۲- درصد خلوص و بازیابی مراحل مختلف خالص سازی ۸۰

جدول ۴-۳- میزان تراکم نوری نمونه های حاوی اینترلوکین-۲ ۹۰

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

فهرست اشکال

شکل ۲-۱- مراحل خالص سازی توده های پروتئینی	۱۳
شکل ۲-۲- مراحل روش IMAC	۲۷
شکل ۲-۳- بازیابی شکل فضایی با دیالیز	۳۳
شکل ۲-۴- دیالیز با کاهش غلظت دناتوره کننده	۳۴
شکل ۲-۵- روش رقیق سازی	۳۵
شکل ۲-۶- بازیابی شکل فضایی با روش SEC	۳۹
شکل ۲-۷- بازیابی شکل فضایی با روش جذب	۴۰
شکل ۳-۱- شکل فضایی Ni-NTA	۶۲
شکل ۳-۲- مراحل خالص سازی با Ni-NTA	۶۳
شکل ۴-۱- منحنی استاندارد برادفورد	۶۶
شکل ۴-۲- ژل الکتروفورز مربوط به تولید نمونه	۶۷
شکل۴-۳-احیای پیوند دی سولفیدی توسط مواد احیا کننده	۶۸
شکل ۴-۴- ژل مربوط به مرحله حل کردن	۶۹
شکل ۴-۵- شمایی از NTA	۷۰
شکل ۴-۶- پیوند Ni-NTA آگارز و دنباله هیستیدین	۷۱
شکل ۴-۷- ساختار شیمیایی ایمیدازول و هیستیدین	۷۱
شکل ۴-۸- شمایی کلی از همه مراحل خالص سازی	۷۲
شکل ۴-۹- ژل مربوط به تعیین حجم بهینه Ni-NTA آگارز	۷۴
شکل ۴-۱۰- ژل مربوط به اولین خالص سازی	۷۵
شکل ۴-۱۱- ژل مربوط به شستشوی ثانویه با استفاده از تغییر pH	۷۶
شکل ۴-۱۲-ژل مربوط به شستشوی ثانویه با استفاده از ایمیدازول ۳۰۰ میلی مولار	۷۷
شکل ۴-۱۳- دانسیتومتری ژل الکتروفورز، باند پروتئینی مربوط به نمونه اولیه	۷۸

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

شکل ۴-۱۴- دانسیتومتری ژل الکتروفورز، باند پروتئینی مربوط به نمونه پس از حل کردن ۷۹
شکل ۴-۱۵- دانسیتومتری ژل الکتروفورز، باند پروتئینی مربوط به شستشوی ثانویه دوم ۸۰
شکل ۴-۱۶-منحنی مربوط به ژل فیلتراسیون ۸۵
شکل ۴-۱۷-تصویر زیر میکروسکوپ لمفوسیت های T ۸۸
شکل ۴-۱۸- تصویر زیر میکروسکوپ لمفوسیت های T به همراه IL-2 خالص شده ۸۹
شکل ۴-۱۹- تصویر زیر میکروسکوپ لمفوسیت های T به همراه IL-2 تجاری ۸۹

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

فصل اول

مقدمه

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

اگر چه بشر از هزاران سال قبل، از فرایند های تخمیری استفاده کرده است، اما فرایند تولید صنعتی پنی سیلین در دهه۱۹۴۰، مقدمه ای برای علم زیست فناوری صنعتی و استفاده از ریزسازواره ها در تهیه محصولاتی نظیر اسید های آلی، الکل ها، اسید های آمینه و مانند آن بود. پس از آشنایی با فنون مهندسی ژنتیک، علم زیست فناوری دستخوش تغییرات غیر قابل انکاری شده و تهیه و بهینه سازی محصولات نوترکیب، تبدیل به بخش بزرگی از این علم شده است. در سال ۱۹۷۲ پرفسور پاول برگ استاد دانشگاه استنفورد و برنده جایزه نوبل در رشته شیمی در سال ۱۹۸۰ اولین DNA نوترکیب را تهیه کرد. در سال ۱۹۷۳ پرسور بویر و همکارانش برای اولین بار موفق به انتقال پلاسمید به باکتری *اشرشیا کلی* شدند و همین گروه در سال ۱۹۸۲ برای اولین بار محصول دارویی نوترکیب انسولین انسانی را تولید کردند. پیشرفت علم در این شاخه از زیست فناوری به گونه ای بوده است که در سال ۱۹۹۹ در حدود ۷۰ درصد از انسولین استفاده شده توسط بیماران دیابتی در آمریکا، از منشا نوترکیب بوده است [۹]. در سال ۲۰۰۳ بیش از ۱۱۰ شرکت تولیدکننده محصولات دارویی نوترکیب، با فروشی بالغ بر ۳۲ میلیارد دلار در دنیا مشغول به کار بوده اند که پیش بینی می شود این عدد در سال ۲۰۱۰ به حدود ۵۳ میلیارد دلار برسد[۵۱]. از مهمترین و پرفروش ترین محصولات نوترکیب می توان به اریتروپویتین با فروش سالیانه ۷ میلیارد دلار، انسولین انسانی با فروش سالیانه ۴ میلیارد دلار، عامل تحریک کننده کلنی های رشد با فروش سالیانه ۲/۶ میلیارد دلار، هورمون رشد انسانی با فروش سالیانه ۱/۷ میلیارد دلار، اینترفرون بتا با فروش سالیانه ۱/۲میلیارد دلار و واکسن نوترکیب هپاتیت ب با فروش سالیانه ۷۲۵ میلیون دلار اشاره کرد[۲۰]. جدول ۱-۱ فهرستی از محصولات دارویی نوترکیب، شرکت ها، میزان فروش و میزان رشد آنها را از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۳ ارائه می‌دهد.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول ۱-۱ محصولات دارویی پرفروش و فروش جهانی آنها از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۳

محصول و نام شرکت	میزان رشد فروش از سال ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۳	فروش در سال ۲۰۰۳ (میلیون دلار)	فروش در سال ۲۰۰۲ (میلیون دلار)	فروش در سال ۲۰۰۱ (میلیون دلار)
Erythropoetin-alpha (Johnson & Johnson)	-۶/۶	۳۹۸۶	۴۲۶۹	۳۴۳۰
Erythropoetin-alpha (Amgen)	۷/۷	۲۴۳۵	۲۲۶۱	۲۱۰۸
G-CSF (Amgen)	-۸/۱	۱۲۶۸	۱۳۸۰	۱۳۴۶
Pegylated G-CSF (Amgen)	۱۷۰/۵	۱۲۵۵	۴۶۴	۰
Human Insulin (Novo Nordisk)	-۰/۹	۲۲۳۵	۲۲۵۵	۲۲۴۴
Interferon beta-1a (Biogen IDEC)	۱۳/۲	۱۱۷۰	۱۰۳۴	۹۷۱
Pegylated Interferon alpha(ScheringPlough)	-۳۲/۳	۱۸۵۱	۲۷۳۶	۱۴۴۷
Tumor Necrosis Factor alpha (Amgen)	۱۴۹/۵	۱۳۰۰	۵۲۱	۸۵۶
Darbepoetin alpha (Amgen)	۲۷۱/۲	۱۵۴۴	۴۱۶	۴۲
Erythropoetin beta (Roche)	۷۲/۱	۱۳۱۸	۷۶۶	۴۷۹
فروش ۱۰ محصول برتر در سال	۱۴/۰	۱۸۳۶۲	۱۶۱۰۲	۱۲۹۲۳
فروش کل محصولات در سال	۱۹/۰	۳۲۰۶۵	۲۶۹۳۵	۲۱۴۷۰

زیست فنآوری با استفاده از مجموعه فنآوری هایی که بر پایه شاخه های مختلف علوم نظیر زیست شناسی, زیست شیمی و مهندسی شیمی استوار است, از خصوصیات سلول ها و مولکول های زیستی بهره می گیرد. بدون شک پروتئین ها, به عنوان محصول نهایی ژن ها, از مهمترین مولکول های زیستی و از

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

عناصر اصلی حیات در تمامی جاندارن محسوب می شوند. زیست فنآوری از منابع متفاوتی برای تولید پروتئین ها بهره می گیرد. این منابع گاهی به صورت نوترکیب با استفاده از ریز سازواره هایی هایی نظیر اشریشیا کلی و مخمرها بوده وگاهی نیز به صورت طبیعی با استفاده از سلول های پستانداران, گیاهان, حشرات یا مایعات فیزیولوژیک نظیر پلاسمای خون هستند[۲].

به طور کلی عملیات تولید پروتئین توسط زیست فنآوری به دو بخش "فرآیند عملیات بالادستی[۱]" و "فرآیند عملیات پایین دستی[۲]" تقسیم می گردد. "فرآیند عملیات بالادستی " عملیاتی نظیر کشت سلولی و تخمیر است که برای تولید پروتئین به صورت محصول اولیه و خام در داخل منبع موردنظر انجام می‌پذیرد. "فرآیند عملیات پایین دستی" عملیاتی است که با استفاده از روش های مختلف جداسازی انجام می گیرد و هدف نهایی آن پالایش محصول پروتئینی مورد نظر از مواد دیگر موجود در محیط زیستی, که عموما" تحت عنوان ناخالصی ها قرار می گیرند, است. این دو بخش دارای تفاوت های اساسی با یکدیگر هستند، اما چگونگی "فرآیند عملیات بالادستی " در نحوه انجام و موفقیت "فرآیند عملیات پایین دستی " تأثیر غیر قابل انکار و به سزایی دارد. در نظر گرفتن خصوصیات ماده اولیه حاصل از "فرآیند عملیات بالادستی" و ویژگی محصول نهایی مورد نظر برای طراحی "فرآیند عملیات پایین دستی " بسیار حائز اهمیت است[۲].

خالص سازی یک محصول زیستی مانند آنتی بیوتیک، ویتامین و یا پروتئین نوترکیب، از محیط تخمیر یا کشت سلولی، بخش مهمی از صنعت زیست فناوری می‌باشد. بازیابی پائین دستی، بخش اعظمی از هزینه های محصول را در بر می گیرد و در نتیجه استفاده از روش های جداسازی سریع و موثر برای تولید محصولات زیستی، اساسی می باشد. جداسازی یک محصول زیستی از ناخالصی ها، نیازمند یک سری مراحل خالص سازی می باشد که هر مرحله یک سری از آلوده کننده ها را حذف کرده و محصول را به

[1] Upstream
[2] Downstream

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

خصوصیات نهایی آن نزدیکتر می سازد. نیاز به بهبود و گسترش روش های خالص سازی در طی سال های اخیر، بسیار افزایش یافته است زیرا بیان پروتئین های نوترکیب برای مصارف داروئی، تشخیصی و تحقیقات به طور موفقیت آمیزی در حال توسعه می باشد[۲].

یکی از مهم ترین انواع پروتئین های نوترکیب، اینترلوکین ها هستند. در این میان، اینترلوکین-۲ به دلیل نقش شناخته شده ای که در درمان بیماری سرطان و سایر بیماری های همراه با ضعف سامانه ایمنی، مثل ایدز و ام اس دارد، بیش از سایر اینترلوکین ها مورد توجه قرار گرفته است. این پروتئین با وزن تقریبی ۱۵۵۰۰ دالتون اولین بار در سال ۱۹۷۸ توسط گیلس و همکاران شناخته شده و انتقال ژن آن در سال ۱۹۸۳ انجام گرفت. این پروتئین، توسط بدن برای مقابله با آنتی ژن های بیگانه تولید شده، توسط گیرنده های سلول های T شناسایی شده و تولید بیشتر اینترلوکین-۲ و گیرنده آن را تحریک می کند. حضور اینترلوکین-۲ موجب افزایش رشد و تکثیر سلول های T نابود کننده آنتی ژن و تومور ها می شود. از این خاصیت اینترلوکین-۲ برای زنده نگه داشتن T لمفوسیت های کشت داده شده در کشت بافت نیز استفاده می شود[۱۲،۱۳]. سلول های T یک گروه از لمفوسیت ها هستند که بیشتر با داشتن گیرنده آنتی ژن بر روی سطح خود شناخته می شوند. حرف T در ابتدای نام این سلول ها نشان گر غده تیموس است که خواست گاه اصلی تولید این پروتئینی هاست. در حقیقت اینترلوکین-۲ به طور مستقیم در نابود سازی تومور ها دخالت ندارد، بلکه از طریق فعال سازی سلول های T و همچنین سلول های نابود کننده طبیعی موجبات نابودی تومور ها و سلول های سرطانی را فراهم می آورد. اینترلوکین-۲ همچنین در تکثیر یکی از انواع خاص سلول های T به نام سلول های T تنظیمی موثر است. این سلول ها که نقش مهمی در فعالیت سامانه ایمنی دارند، مانع از فعالیت سلول های T و تولید اینترلوکین-۲ در مقابل آنتی ژن های بدن میزبان می شوند[۶۳]. اینترلوکین-۲ هم چنین در تولید ایمونوگلوبین توسط سلول های B (لمفوسیت هایی که عموماً در مغز استخوان تولید می شوند) نیز نقش موثری دارد.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

اینترلوکین-۲ پروتئینی بسیار پایدار است، به همین دلیل در مقابل تغییراتی مثل جهش های ژنتیکی کوچک، خواص و کارکرد خود را از دست نمی دهد. این مساله استفاده از این پروتئین را برای مصارف دارویی ممکن می سازد. اینترلوکین-۲ نوترکیب تولید شده توسط شرکت آمریکایی کایرون[1] که با نام تجاری پرولوکین[2] عرضه می شود، در سال ۱۹۹۲ مجوز لازم برای استفاده در درمان سرطان کبد و در سال ۱۹۹۸ مجوز لازم برای استفاده در درمان سرطان پوست را توسط انجمن غذا و دارو[3] دریافت کرد.

اگرچه در کشور تلاش هایی برای تولید داروهای نوترکیب مانند هورمون رشد انسانی[۵۹] و اینترفرون گاما[۳۳،۳۴] انجام شده، اما به نظر می رسد که تلاش های بیشتری برای تولید انواع این دارو ها مورد نیاز است. پروژه حاضر در جهت حل بعضی از مشکلات موجود بر سر راه خالص سازی پروتئین اینترلوکین -۲ تولید شده از باکتری نوترکیب *اشرشیا کولی BL21* صورت گرفته و در ۴ فصل مقدمه، مروری بر پژوهش های پیشین، مواد و روش ها و نتایج و بحث ارائه می شود.

[1] Chiron Corporation
[2] Proleukin
[3] Food and Drug Administration

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com