۹۴۸۷

به نام خدا

۹۳۱۶۳

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده فنی و مهندسی

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته مهندسی شیمی – گرایش بیوتکنولوژی

طراحی محیط کشت بر اساس آنالیز استوکیومتری تولید اینترلوکین-۲ در باکتری *اشریشیا کلی* نو ترکیب

نگارنده:

امیر محمد فرنود

استاد راهنما:

دکتر سید عباس شجاع الساداتی

استاد مشاور:

دکتر ولی الله بابایی پور

۱۳۸۶/۰۲/۱۰

پاییز ۱۳۸۶

۹۳۱۶۲

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان

آقای امیر محمد فرنود پایان نامه ۸ واحدی خود را **با عنوان طراحی محیط کشت بر اساس آنالیز استوکیومتری تولید اینترلوکین -۲ در اشریشیا کلی نوترکیب** در تاریخ ۱۳۸٦/۷/۱۷ 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 سید عباس شجاع الساداتی	استاد	
استاد مشاور	دکتر ولی الله بابایی پور	استادیار	
استاد ناظر	دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی	استادیار	
استاد ناظر	دکتر بیژن رنجبر	دانشیار	
مدیر گروه (یا نماینده گروه تخصصی)	دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی	استادیار	

این نسخه به عنوان نسخه نهایی پایان نامه ارسالی مورد تایید است.
امضای استاد راهنما

۹۲۱۶۲

دستور العمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه:با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت وکرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی ومعنوی دانشگاه و پژوهشگران لازم است اعضای هیات علمی دانشجویان دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح درمورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان نامه وساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است موارد ذیل را رعایت نمایید:

ماده۱: حقوق مادی و معنوی پایان نامه‌ها / رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره‌برداری ازآن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می‌باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشند.

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

ماده۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آیین‌نامه‌های مصوب انجام می‌شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه‌ای و بین المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسید ه و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

تشکر و قدردانی

در اینجا بر خود لازم می دانم از زحمات بی دریغ استاد ارجمند، جناب آقای دکتر شجاع الساداتی، نهایت تشکر را به عمل آورم که اتمام این پایان نامه مرهون عنایت ایشان بود. از استاد گرانمایه، جناب آقای دکتر بابایی پور نیز سپاسگزارم که انجام این تحقیق بدون راهنمایی و مساعدت های ایشان ممکن نبود.

همچنین زحمات بی دریغ سرکار خانم مهندس یگانه که همواره در این مدت یار و یاور من بوده اند و سرکار خانم تیموری و سایر همکاران در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده فنی و مهندسی و نیز آقای دکتر صادقی زاده و سرکار خانم خورشیدی در آزمایشگاه ژنتیک دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس را ارج می نهم که همیاری ایشان در پیشبرد تحقیق بسیار راهگشا بود.

امیر محمد فرنود

پاییز ۸۶

چکیده

یکی از ویژگی های مشترک فرایند های نو ترکیب اتمام ذخیره اسید های آمینه میزبان در زمان تولید پروتئین های نو ترکیب به مقدار زیاد است. غنی سازی محیط با اسید های آمینه لازم یکی از راه حل های موثر پیشنهاد شده برای حل این مشکل می باشد. در تحقیق حاضر از یک مدل استوکیومتری برای یافتن اسید های آمینه لازم و مقادیر آنها برای افزایش رشد باکتری نوترکیب *اشریشیا کلی* **BL21[pET21a-*hil2*]** و افزایش بیان پروتئین نو ترکیب اینترلوکین-۲ استفاده شده است. اسید های آمینه بدست آمده از مدل عبارتند از: لیوسین (۰/۱۲ گرم بر لیتر)، گلوتامین (۰/۳۲ گرم بر لیتر)، اسید آسپارتیک (۰/۲۲ گرم بر لیتر) و گلایسین (۰/۱۱۰ گرم بر لیتر). برای مطالعه اثر این اسید های آمینه و ترکیبات آنها بر رشد و محصول دهی باکتری *اشریشیا کلی* از آزمایش های فاکتوریل کامل استفاده شد. گلوتامین به عنوان عنوان موثرترین اسید آمینه برای افزایش رشد شناخته شد، به این ترتیب که محیط کشت حاوی گلوتامین پس از ۸ ساعت به دانسیته نوری ۳/۷۶ (در ۶۰۰ نانومتر) رسید که نسبت به محیط کشت شاهد تقریبا ۵۰ درصد افزایش نشان می دهد. همچنین ترکیب ۳ تایی اسید های آمینه لیوسین، اسید آسپارتیک و گلایسین به عنوان موثرترین ترکیب برای افزایش محصول دهی شناخته شد. افزودن این ترکیب منجر به افزایش ۴۸ درصدی میزان پروتئین کل در آخرین ساعت نمونه گیری شد و قوی ترین باند پروتئینی آزمایش الکتروفورز نیز حاصل از همین ترکیب بود. این اسید های آمینه به همراه سایر ترکیبات اثر بخش (ترکیب گلوتامین، اسید آسپارتیک و گلایسین و همچنین ترکیب لیوسین، گلوتامین و اسید آسپارتیک) برای بررسی بیشتر مورد آزمایش قرار گرفتند. آزمایش های تکمیلی بر روی این اسید های آمینه و در سه سطح مختلف (دو برابر مقدار استوکیومتری، نصف مقدار استوکیومتری و خود مقدار استوکیومتری) با هدف یافتن مقدار بهینه اسید های آمینه انجام شدند. نتایج این آزمایش ها نشان می دهد که تغییر مقدار اسید های آمینه منجر به بهبود رشد نشده و بیشترین میزان رشد کماکان مربوط به نمونه حاوی اسید آمینه گلوتامین به مقدار ۰/۲۲ گرم بر لیتر بود (با دانسیته نوری ۳/۵۶ در ۶۰۰ نانومتر). همچنین ترکیب اسید آمینه های لیوسین، اسید آسپارتیک و گلایسین در مقادیر استوکیومتری و اسید آمینه گلوتامین در دو برابر مقدار استوکیومتری به عنوان موثر ترین ترکیبات برای افزایش محصول دهی شناخته شدند.

کلمات کلیدی: مدل استوکیومتری، اسید آمینه، اینترلوکین-۲ انسانی، *اشریشیا کلی* نوترکیب، رشد، محصول دهی.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه ۲

فصل دوم: مروری بر پژوهش های پیشین

۲-۱- انتخاب میزبان مناسب به منظور تولید پروتئین های نوترکیب ۷

۲-۲- کشت باکتری *اشریشیا کلی* به منظور تولید پروتئین های نو ترکیب ۱۲

۲-۲-۱- کشت باکتری *اشریشیا کلی* با تراکم سلولی بالا ۱۳

۲-۲-۱-۱- عوامل بازدارنده در کشت با تراکم سلولی بالا ۱۴

۲-۲-۱-۱-۱- اکسیژن ۱۴

۲-۲-۱-۱-۲- محیط کشت ۱۵

۲-۲-۱-۱-۳- تجمع استات ۱۵

۲-۲-۱-۲- روش های کشت ۱۸

۲-۲-۱-۳- روش های خوراک دهی ۲۱

۲-۲-۱-۳-۱- خوراک دهی با نرخ ثابت ۲۲

۲-۲-۱-۳-۲- خوراک دهی لگاریتمی ۲۲

۲-۲-۱-۳-۳- pH-stat ۲۳

۲-۲-۱-۳-۴- DO-stat ۲۴

۲-۲-۱-۳-۵- Cyclic Fed-batch ۲۴

۲-۲-۱-۳-۶- سایر روش های خوراک دهی ۲۵

۲-۳- تولید پروتئین نو ترکیب..... ۲۵
۲-۳-۱- توده های پروتئینی نا محلول..... ۲۶
۲-۳-۲- تولید پروتئین در *اشریشیا کلی*..... ۲۷
۲-۳-۲-۱- تولید پروتئین در سیتوپلاسم..... ۲۸
۲-۳-۲-۲- تولید پروتئین در فضای پری پلاسمی..... ۲۹
۲-۳-۲-۳- تولید پروتئین در خارج سلول..... ۳۰
فصل سوم: مواد و روش ها
۳-۱- میزبان و پلاسمید..... ۳۲
۳-۲- محیط کشت..... ۳۳
۳-۳- تهیه سویه نو ترکیب..... ۳۳
۳-۳-۱- تهیه کلکسیون میکروارگانیسم و نگهداری سویه‌ها..... ۳۵
۳-۴-آزمایش الکتروفورز..... ۳۵
۳-۵- سنجش توده سلولی..... ۳۹
۳-۵-۱- اندازه‌گیری جذب نوری (OD) تعلیق میکروبی..... ۳۹
۳-۶- اندازه گیری پروتئین کل (روش برادفورد)..... ۳۹
۳-۷- انتخاب اسید های آمینه موثر در رشد و محصول دهی *اشریشیا کلی* نوترکیب..... ۴۰
۳-۷-۱- نحوه انجام آزمایش ها..... ۴۱
۳-۸- مدل استوکیومتری..... ۴۲

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- بدست آوردن اسید های آمینه لازم و میزان آنها بر اساس روش استوکیومتری..... ۴۸

۴-۱-۱- تعیین ضرایب استوکیومتری..... ۴۸

۴-۱-۱-۱- تعیین ضرایب استوکیومتری برای اینترلوکین-۲..... ۴۸

۴-۱-۱-۲- تعیین ضرایب استوکیومتری برای ATP ۴۸

۴-۱-۱-۳- تعیین ضرایب استوکیومتری برای گلوکز..... ۴۹

۴-۱-۱-۴- تعیین ضرایب استوکیومتری اسید های آمینه ۵۰

۴-۲- نتایج آزمایش های فاکتوریل کامل (بهینه سازی نوع اسید آمینه)..... ۵۶

۴-۲-۱- اثر اسید های آمینه و ترکیبات آنها بر روی رشد ۵۶

۴-۲-۲- اثر اسید های آمینه و ترکیبات آنها بر روی میزان پروتئین کل..... ۵۹

۴-۲-۳- اثر اسید های آمینه و ترکیبات آنها بر روی میزان بیان..... ۶۰

۴-۳- نتایج آزمایش های تکمیلی (بهینه سازی مقدار اسید آمینه)..... ۶۲

۴-۳-۱- اثر مقادیر مختلف اسید های آمینه و ترکیبات آنها بر روی رشد..... ۶۳

۴-۳-۲- اثر مقادیر مختلف اسید های آمینه و ترکیبات آنها بر روی میزان پروتئین کل ۶۵

۴-۳-۳- اثر مقادیر مختلف اسید های آمینه و ترکیبات آنها بر روی میزان بیان ۶۵

فصل پنجم: نتیجه گیری و ارائه پیشنهاد

۵-۱- نتایج کلی ۷۰

۵-۲- پیشنهاد ها..... ۷۰

مراجع..... ۷۳

واژه نامه فارسی به انگلیسی ۸۵
واژه نامه انگلیسی به فارسی ۸۷

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

اگر چه بشر از هزاران سال قبل از فرایند های تخمیری استفاده کرده است اما آغاز به کار فرایند تهیه پنی سیلین در دهه ۱۹۴۰ مقدمه ای برای علم بیو تکنولوژی صنعتی و استفاده از میکروارگانیسم ها برای تهیه محصولاتی نظیر اسید های آلی، الکل ها، اسید های آمینه و مانند آن بود. پس از آشنایی به فنون مهندسی ژنتیک علم بیوتکنولوژی دستخوش تغییرات غیر قابل انکاری شده و تهیه و بهینه سازی محصولات نو ترکیب تبدیل به بخش بزرگی از این علم شده است. در سال ۱۹۷۲ پروفسور پاول برگ استاد دانشگاه استانفورد و برنده جایزه نوبل در رشته شیمی در سال ۱۹۸۰ اولین دی ان آ ی نو ترکیب را تهیه کرد. در سال ۱۹۷۳ پروفسور بویر و همکارانش برای اولین بار موفق به انتقال پلاسمید به باکتری اشریشیا کلی شدند و همین گروه در سال ۱۹۸۲ برای اولین محصول دارویی نو ترکیب یعنی انسولین انسانی را تولید کردند. پیشرفت علم 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 نو ترکیب بوده است [۹]. در سال ۲۰۰۳ بیش از ۱۱۰ شرکت تولید محصولات دارویی نو ترکیب 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 [۱۱۶]. از مهم ترین و پر فروش ترین محصولات نو ترکیب می توان به اریتروپویتین با فروش سالیانه ۷ میلیارد دلار، انسولین انسانی با فروش با فروش سالیانه ۴ میلیارد دلار با فروش سالیانه ۷ میلیارد دلار، اینترفرون آلفا با فروش سالیانه ۱/۸ میلیارد دلار، عامل تحریک کننده کلنی های رشد[1] با فروش سالیانه ۲/۶ میلیارد دلار، هورمون رشد انسانی با فروش سالیانه ۱/۷ میلیارد دلار، اینترفرون بتا با فروش سالیانه ۲/۱ میلیارد دلار، واکسن نو ترکیب هپاتیت ب با فروش سالیانه ۷۲۵ میلیون دلار، سوماتو تروپین با فروش سالیانه ۷۰۰ میلیون دلار و فعال کننده پلاسمینوژن بافت با فروش سالیانه ۶۰۰ میلیون دلار اشاره کرد [۳۶]. جدول ۱ لیستی از محصولات دارویی نو ترکیب، شرکت ها، میزان فروش و میزان رشد آنها از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۳ ارائه می دهد.

[1] GCSF

جدول ۱- ۱۰ محصول دارویی نوترکیب پرفروش و فروش جهانی آنها از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۳

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

یکی از مهم ترین دسته پروتئین های نو ترکیب اینترلوکین ها هستند. در این میان اینترلوکین-۲ بـه دلیـل نقش شناخته شده ای که در درمان بیماری سرطان (و سایر بیماری هایی که با ضـعف در سیسـتم ایمنـی همراه هستند مثل ایدز و ام اس) دارد [۱۴۵] بیش از سایر اینترلوکین ها مورد توجه قـرار گرفتـه اسـت. این پروتئین با وزن تقریبی ۱۵۵۰۰ کیلو دالتون اولـین بـار در سـال ۱۹۷۸ توسـط گـیلس و همکـاران شناخته شده و انتقال ژن آن در سال ۱۹۸۳ انجام گرفت. این پروتئین توسط بدن برای مقابله با آنتـی ژن ها تولید می شود. هنگامی که عوامل خارجی مثل مولکول ها، میکروب ها یا به طـور کلـی آنتـی ژن هـا وارد بدن می شوند، این عوامل توسط گیرنده های آنتی ژن که در سطح لمفوسیت ها بیان می شوند مورد شناسایی قرار می گیرند. چسبیدن آنتی ژن به گیرنده های سلول های **T** موجـب تولیـد اینترلـوکین-۲ و گیرنده آن می شود و حضور اینترلوکین-۲ موجب افزایش رشد و گسترش سـلول هـای **T** نـابود کننـده آنتی ژن و تومور ها می شود، از این خاصیت اینترلوکین-۲ برای زنـده نگـه داشـتن T لمفوسـیت هـای کشت داده شده در کشت بافت نیز استفاده می شود [۱۱,۱۲]. سلول های T یک گروه ازلمفوسـیت هـا هستند که بیشتر با داشتن گیرنده آنتی ژن بر روی سطح خود شناخته می شوند. حـرف **T** در ابتـدای نـام این سلول ها نشان گر غده تیموس است که خواست گاه اصلی تولید این پروتئین ها اسـت. در حقیقـت اینترلوکین-۲ به طور مستقیم در نابود سازی تومور ها دخالتی ندارد، بلکه از طریق فعـال سـازی سـلول های **T** و هم چنین سلول های نابود کننده طبیعی[1] موجبات نابودی تومور ها و سـلول هـای سـرطانی را فراهم می آورد. اینترلوکین هم چنین در گسترش یکی از انواع خاص سلول های **T** به نام سلول هـای **T** تنظیمی[2] موثر است. این سلول ها که نقش مهمی در فعالیت سیستم ایمنی دارند، مـانع از فعالیـت سـلول های **T** علیه آنتی ژن های خود بدن می شوند و در واقع مانع از تولید اینترلوکین-۲ در مقابل ایـن آنتـی ژن ها می شوند [۱۴۱]. اینترلوکین-۲ هـم چنـین در تولیـد ایمونـو گلوبـولین توسـط سـلول هـای **B** (لمفوسیت هایی که عموما در مغز استخوان تولید می شوند) نیز نقش موثری دارد.

اینترلوکین-۲ پروتئینی بسیار پایدار است، به همین دلیل در مقابـل تغییراتـی مثـل جهـش هـای ژنتیکـی کوچک، خواص و کارکرد خود را از دست نمی دهد. این مساله استفاده از این پروتئین را برای مصـارف

---

[1] Natural Killer Cells
[2] Regulatory T Cells

دارویی ممکن می سازد. اینترلوکین-2 تولید شده در بدن حالت گلیکوزیله دارد، اما گلیکوزیله شدن خواص آن را در مورد افزایش رشد سلول های T تغییر نمی دهد [۱۲۲]. به همین دلیل امکان تولید این پروتئین در سلول های پروکاریوت مانند اشریشیا کلی نیز وجود دارد. 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.

یکی از مشکلات بر سر راه تولید پروتئین های نو ترکیب مصرف بی رویه اسید های آمینه درون سلولی است که در اثر تولید یک پروتئین خارجی ایجاد می شود [۱۱۵]. چنین مساله ای به ایجاد فشار متابولیکی بر سلول شده و می تواند فرایند رشد و تولید پروتئین را کند و یا متوقف سازد. به همین دلیل انتظار می رود که افزودن اسید های آمینه بر محیط کشت در هنگام تولید پروتئین های نو ترکیب موجب افزایش رشد و محصول دهی شود [۵۲]. در تحقیق حاضر نیز با در نظر گرفتن همین مساله تلاش شده است تا اثرات افزایش اسید های آمینه بر رشد و تولید اینترلوکین-۲ بررسی شود. باید دقت داشت که اگر افزایش اسید های آمینه بر اساس یک راه کار معین صورت نگیرد می تواند حتی منجر به کاهش محصول دهی نیز بشود[۱۲۰] به همین دلیل و برای یافتن اسید های آمینه موثر بر رشد باکتری و تولید اینترلوکین-۲ از یک مدل استوکیومتری نسبتا ساده استفاده شد و با استفاده از این مدل نه تنها اسید های آمینه موثر، بلکه میزان حدودی آنها نیز بدست آمد.

اگر چه در کشور تلاش هایی برای تولید داروهای نوترکیب مانند هورمون رشد انسانی [۱۴۰] و اینترفرون گاما [۷۱,۷۲] انجام شده اما به نظر می رسد که تلاش های بیشتری برای تولید انواع این دارو ها احتیاج است. پروژه حاضر در جهت حل بعضی از مشکلات موجود بر سر راه تولید پروتئین اینترلوکین-۲ از باکتری نوترکیب اشریشیا کلی **BL21** صورت گرفته و در۵ فصل مقدمه، مروری بر پژوهش های گذشته، مواد و روش ها، نتایج و بحث و نتیجه گیری و طرح پیشنهاد ارائه می شود.

---

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

فصل دوم

مروری بر پژوهش های پیشین

۲-۱- انتخاب میزبان مناسب به منظور تولید پروتئین های نو ترکیب

میزبان های مختلفی برای تولید محصولات نو ترکیب قابل استفاده هستند، سلولهای یوکاریوت مانند مخمر ها، قارچ های تک رشته ای، حشرات، گیاهان و پستانداران و همچنین سلولهای پروکاریوت مانند *اشریشیا*، *باسیلوس* و *استافیلو کوکوس* از جمله این میزبان ها هستند. مقدار و کیفیت پروتئین های تولید شده به عواملی از قبیل تعداد ژن های کپی شده، بازده نسخه برداری و ترجمه، پایداری mRNA، پایداری و حلالیت پروتئین و اصلاحات پس ترجمه ای[1] آن بستگی دارد که تمام این مسائل نیز به نوع میزبان وابسته هستند. باید توجه داشت که انتخاب میزبان نه تنها بر تولید پروتئین بلکه بر نحوه جداسازی و خالص سازی آن نیز موثر خواهد بود.

جدول ۲- مقایسه میزبان های مختلف تولید پروتئین نو ترکیب [۲۵].

ویژگی	*اشریشیا کلی*	مخمر	سلول حشرات	سلول پستانداران
سرعت رشد	خیلی سریع	سریع	آهسته	آهسته
بازدهی بیان	۱ تا ۵ درصد	بیش از ۱ درصد	حدود ۳۰ درصد	کمتر از ۱ درصد
محصول دهی	خیلی بالا	بالا	بالا	پایین
قیمت محیط کشت	خیلی کم	کم	زیاد	خیلی زیاد
روش کشت	بسیار آسان	آسان	مشکل	بسیار مشکل
هزینه تولید	خیلی پایین	پایین	بالا	خیلی بالا
تا خوردن پروتئین	متوسط	خوب	خیلی خوب	خیلی خوب
کارایی پروتئین	نا مطلوب	خوب	خیلی خوب	خیلی خوب

در یک باکتری پروکاریوت مانند *اشریشیا کلی* با این که امکان تغییرات پس ترجمه ای وجود ندارد اما عواملی مانند تعدد پژوهش های موجود، تعداد زیاد پلاسمید های قابل دسترس، توانایی ترشح پروتئین به محیط کشت، سرعت رشد بالا و خواص فیزیکی و شیمیایی شناخته شده، این میزبان را به

[1] Post-translational Modifications

انتخاب مناسبی برای تولید پروتئین تبدیل کرده است [۱۲۷]. سلول های حیوانی توانایی تولید پروتئین با فعالیتی مشابه با پروتئین اصلی (گلیکوزیله شده) را دارند، هم چنین این سامانه ها را می توان در مقیاس بالا نیز راه اندازی کرد، با این حال این سلول ها معایبی چون محیط کشت گران قیمت و سرعت رشد پایین و هم چنین پایداری ژنتیکی کمتری نسبت به باکتری ها دارند. در مخمر ها عملیات تخمیر نسبتا ارزان انجام می گیرد و امکان گلیکوزیلاسیون و تشکیل باند های دی سولفیدی نیز وجود دارد. اما اصلاحات پس ترجمه ای در این دسته از میزبان ها قابلیت کمتری نسبت به سلول های حیوانی دارد. قارچ ها نیز تخمیر نسبتا ارزانی دارند و از توانایی فرستادن پروتئین به محیط کشت نیز برخوردار هستند، اما بازده بیان بالایی ندارند و به لحاظ ژنتیکی نیز مانند باکتری ها شناخته شده نیستند. جدول ۳ فهرستی از میزبان های مختلف تولید پروتئین نو ترکیب، پروتئین های تولید شده در آنها، میزان تولید، نوع محیط و نوع خوراک دهی استفاده شده در آنها ارائه می دهد.

جدول ۳- مروری بر میزبان های مختلف تولید پروتئین نوترکیب، نام محصول و تراکم سلولی آنها [۱۴۵].

نام میزبان	تراکم سلولی	نام محصول	مقدار محصول	مرجع
Bacillus subtilis				
Bacillus subtilis	56 g/l	Phytase	47.7 U/ml	[۱٤۷]
Bacillus subtilis	35.6 g/l	Phytase	28.7 U/ml	[٦۹]
Bacillus subtilis	(OD_{600}) 60.1	Penicillin G acylase	1960 U/l	[۱٦۰]
Bacillus subtilis	(OD_{600}) 65	Subtilisin	6.19 U/l	[۱۰۸]
Bacillus subtilis	184 g/l	β-galactosidase	157 g/l.day	[۱۱۲]
Saccharomyces cerevisiae				
Saccharomyces cerevisiae	~ 45 g/l	Cutinase	1.6 g/l	[٤٤]
Saccharomyces cerevisiae	~ 45 g/l	Human granulocyte-colony stimulating factor	1.3 g/l	[۸٥]
Saccharomyces cerevisiae	120 g/l	Ergosterol	1500 mg/l	[۱۳۰]
Saccharomyces cerevisiae	53.6 g/l	Human granulocyte-colony stimulating factor	~150 mg/l	[۸]
Saccharomyces cerevisiae	50 g/l	β-galactosidase	6.28*10^5 U/lh	[۳۸]
Pichia pastoris				
Pichia pastoris	125 g/l	Human cystatin_C	0.72 g/l	[٤٦]
Pichia pastoris	325 g/l (WCW)	Human regenerating gene IV	25 mg/l	[۹۰]
Pichia pastoris	110 g/l	α-amylase	340 mg/l	[۸۷]
Pichia pastoris	OD 321	Phytase	4946 U/ml	[۲۳]

Pichia pastoris	~ 45 g/l	Bovine entrokinase light chain	9000 U/ml	[١١٧]
Ralstonia eutropha				
Ralstonia eutropha	113 g/l	Organophosphohydrolase	1353 U/mg	[١٠]
Ralstonia eutropha	182 g/l	Organophosphohydrolase	1.2 g/l	[١٣٦]
Ralstonia eutropha	281 g/l	Poly(3-hydroxybutyrate)	232 g/l	[١٢٦]
Ralstonia eutropha	75 g/l	Poly(3-hydroxybutyrate)	54.8 g/l	[١٤٣]
Ralstonia eutropha	300 g/l	Poly(3-hydroxybutyrate)	97% recovery	[٧٤]
Hansenula polymorpha				
Hansenula polymorpha	~120 g/l	Levansucrase	12200 U/l	[١١٣]
Hansenula polymorpha	~35 g/l	Hirudin	144 mg/l	[٧٣]
Hansenula polymorpha	83 g/l	Human serum albumin	550 mg/l	[٥٨]
Hansenula polymorpha	350 g/l (WCW)	Human α1 (I) procollagen	0.6 g/l	[٣٤]
Hansenula polymorpha	OD_{600} 70	Interferon α-2a	350 mg/l	[١٠٤]
Kluyveromyces marxianus				
Kluyveromyces marxianus	105 g/l	Biomass	2.9 g/l.h	[١٦]
Kluyveromyces marxianus	28.13 g/l	Oligonucleoides	2.42 g/l.h	[٤٥]
Kluyveromyces marxianus	~60 g/l	Lactase	NA	[١٤]
Kluyveromyces marxianus	~20 g/l	β-galactosidase	~3000 U/g	[٩٨]
Kluyveromyces marxianus	12.2 g/l	β-galactosidase	2800 U/g	[٣٣]
Panax notoginseng				
Panax notoginseng	27.3 g/l	Ginseng saponin	290 mg/l	[١٤٩]
Panax notoginseng	28.9 g/l	Ginseng saponin	0.92 g/l	[١٦١]
Panax notoginseng	24 g/l	Ginseng saponin	1.75 g/l	[٥٤]
Panax notoginseng	24 g/l	Ginseng saponin	1.7 g/l	[٥٣]
Panax notoginseng	24.1 g/l	Ginseng saponin	1.4 g/l	[٦١]
Taxus chinensis cells				
Taxus chinensis cells	22 g/l	Paclitaxel	67 mg/l	[٢٥]
Taxus chinensis cells	22.7 g/l	Taxane	278 mg/l	[٣٩]
Taxus chinensis cells	16.58 g/l	Taxane	5.4 mg/DCW	[١١١]
Taxus chinensis cells	15.9 g/l	Taxoid	~70 mg/l	[١٦٢]
Taxus chinensis cells	~17 g/l	Taxol	67.1 mg/l	[١٤٨]