بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم دامی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته
علوم دامی- گرایش ژنتیک و اصلاح نژاد دام

بهینه سازی بیان ژن FSH گوسفندی در مخمر پیکیاپاستوریس

پژوهش و نگارش:
مرضیه سلطانی‌نژاد

اساتید راهنما:
دکتر حمید گورابی
دکتر سعید زره داران

اساتید مشاور:
دکتر محمدحسین صنعتی
مهندس امیر امیری یکتا
دکتر سعید حسنی

پاییز ۱۳۹۳

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه انجام فعالیت‌های پایان‌نامه‌های تحصیلی با بهره‌گیری از حمایت‌های علمی، مالی و پشتیبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت می‌پذیرد، به منظور رعایت حقوق دانشگاه، نسبت به رعایت موارد زیر متعهد می‌شوم:

۱. این گزارش حاصل فعالیت‌های علمی- پژوهشی و دانش و آگاهی نگارنده است مگر آنکه در متن به نویسنده یا پدید آورنده اثر ارجاع داده شده باشد.

۲. چاپ هر تعداد نسخه از پایان‌نامه با کسب اجازه کتبی از مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه خواهد بود.

۳. انتشار نتایج پایان‌نامه به هر شکل (از قبیل کتاب، مقاله و همایش) با اطلاع و کسب اجازه کتبی از استاد راهنما خواهد بود. نام کامل دانشگاه:

به فارسی: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

و به انگلیسی: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

در بخش آدرس‌دهی درج خواهد شد.

٤. در انتشار نتایج پایان‌نامه در قالب اختراع، اکتشاف و موارد مشابه، نام کامل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به عنوان عضو حقوقی در انتهای فهرست اسامی درج گردد.

۵. تعیین ترتیب اسامی نویسندگان در انتشار نتایج مستخرج از پایان‌نامه و هر گونه تفاوت احتمالی در آن با فهرست مصوب اسامی هیات راهبری پایان‌نامه با تایید استاد راهنمای اول خواهد بود.

اینجانب **مرضیه سلطانی‌نژاد** دانشجوی رشته **ژنتیک و اصلاح نژاد دام** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

مرضیه سلطانی‌نژاد

سپاس بی کران **پروردگار یکتا** را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت

تقدیم به

تقدیم با بوسه بر دستان پدرم:

به او که نمی دانم از بزرگی اش بگویم یا مردانگی، سخاوت، سکوت، مهربانی و .....

پدرم راه تمام زندگیست

پدرم دلخوشی همیشگیست

تقدیم به مادر عزیزتر از جانم:

او که دریای بی کران فداکاری و عشق است. کسی که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر.

تشکر و قدردانی

بدون شک جایگاه و منزلت معلم، اجّل از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی شائبه ی او، با زبان قاصر و دست ناتوان، چیزی بنگاریم. امابر حسب وظیفه و ازباب جمله "من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر الله عزّ و جلّ": از اساتید باکمالات و شایسته؛ جناب آقایان **دکتر حمید گورابی و دکتر سعید زره داران** که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ لگی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله رابر عهده گرفتند؛ از اساتید صبور و باتقوا، جناب آقایان **دکتر محمد حسین صنعتی، دکتر سعید حسنی و دکتر امیر امیری یکتا**، که زحمت مشاوره این رساله را در حالی متقبل شدند که بدون مساعدت ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی رسید؛ و از اساتید فرزانه و دلسوز؛ جناب آقایان دکتر مجتبی آهنی آذری و دکتر یوسف جعفری آهنگری که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

همچنین از همسر مهربانم سپاسگزارم که در پیمودن این مسیر پر دشوار و با صبوری بسیار همراه و همگام من بوده است

بدون شک نیل به اهداف مورد نظر در این تحقیق در سایه حمایت ها و همکاری های دلسوزانه همکار گرانقدرم **خانم بهارک عبدامامی** که در راه رسیدن به این اهداف از هیچ لگی مضایقه نکردند و همچنین دوستان عزیزم خانم ها **عاطفه باقری، سمیه ابولقاسمی، نیرالسادات فاطمی، مینو غفاری، فرشته قدمگاهی، رقیه طعنه گنبدی، بهناز زرین کمر و مهسا امیری نیا** و همچنین زحمات و کمک های بی دریغ جناب آقای **محمود سلطانی نژاد** و همچنین **خواهر عزیزم** میسر گردیده است.

در نهایت از زحمات خالصانه پرسنل محترم **پژوهشگاه رویان تهران و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان** کمال تقدیر و تشکر را دارم.

چکیده

هورمون محرک فولیکولی گوسفندی (oFSH) یک هورمون گلیکوپروتئینی است که از غده هیپوفیز قدامی ترشح می‌شود و نقشی اساسی در عملکرد سیستم تولید مثلی مهره‌داران ایفا می‌کند. این هورمون یک هورمون هترودایمریک شامل دو زیر واحد آلفا با ۹۲ اسید آمینه و بتا با ۱۱۱ اسید آمینه است که به‌صورت غیر کوالانسی بهم متصل‌اند. مخمر متیلوتروپ پیکیاپاستوریس یک میزبان ایده‌آل برای تولید پروتئین خارجی است. این مخمر به‌عنوان اقتصادی‌ترین سیستم بیانی یوکاریوتی برای ترشح پروتئین خارجی به داخل محیط کشت شناخته شده است. هدف از این طرح بهینه‌سازی بیان ژن FSH گوسفندی در مخمر پیکیاپاستوریس بود که توسط تنظیم و تغییر شرایط کشت مانند دما، درصد القای متانول، اسیدیته و ظرف کشت میسر می‌شود. برای انجام این تحقیق ابتدا فرایند بیان در یک دوره انکوباسیون ۵ روزه در دماهای مختلف (۱۵–۱۸–۲۱–۲٤–۲۷–۳۰–۳۲)، درصدهای مختلف القای متانول (۰/۵٪–۱٪–۲٪–۳٪)، اسیدیته (٤–۵–٦–۷–۸) و ظروف کشت متفاوت (زاویه‌دار و بدون زاویه) با سه تکرار انجام شد. پس از پایان فرایند بیان پروتئین نوترکیب ترشح شده در محیط کشت توسط روش TCA تغلیظ شد و سپس سطوح بیان در شرایط مختلف محیط کشت با استفاده از تکنیک‌های SDS-PADE و وسترن بلاتینگ مورد ارزیابی قرار گرفت. نهایتا دما، القای متانول، اسیدیته و ظرف کشت مناسب در طول فرایند بیان ژن، انتخاب شد. نتایج حاصل از SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ باند پروتئینی تقریبا ۱۸ کیلو دالتون را در محدوده مورد نظر نشان داد. این نتایج نشان داد که تاثیر پارامترهای محیطی روی بیان پروتئین قابل مشاهده است. همچنین این بررسی نشان داد که بهینه‌ترین شرایط کشت، دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، القای متانول ۰/۵ درصد، اسیدیته ٦ و ظرف کشت زاویه دار (بافل فلاسک) بود.

کلمات کلیدی: FSH گوسفندی، پیکیاپاستوریس، درصد القای متانول، دما، ظرف کشت، اسیدیته

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۲ هورمون‌های گلیکوپروتئینی و هورمون FSH ۲

۱-۳ ضرورت انجام تحقیق ۳

۱-٤ اهداف تحقیق ٤

فصل دوم: مرور منابع

۲-۱ هورمون ٦

۲-۲ گنادوتروپین‌ها ٦

۲-۳ هورمون FSH ۷

۲-۳-۱- زیرواحد FSHα گوسفندی ۸

۲-۳-۲- زیرواحد βFSH گوسفندی ۹

۲-٤- عملکردهای فیزیولوژیکی FSH ۹

۲-۵- کاربرد بالینی FSH ۱۰

۲-٦- سطح FSH ۱۰

۲-٦-۱- سطوح پایین FSH ۱۱

۲-٦-۲ سطوح بالای FSH ۱۲

۲-۷- منابع FSH ۱۱

۲-۸- هورمونهای نوترکیب ۱۲

۲-۹- تاریخچه استفاده از FSH نوترکیب ۱۲

۲-۱۰- مقایسه FSH نوترکیب و ادراری ۱۳

۲-۱۱- فواید FSH نوترکیب ۱۳

۲-۱۲- میزبانهای مورد استفاده در مهندسی ژنتیک برای تولید پروتئین نوترکیب ۱۳

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۱۳- سیستم‌های بیانی مخمر ۱۵
۲-۱٤- میزان مصرف متانول ۱٦
۲-۱۵- مخمر پیکیاپاستوریس ۱۹
۲-۱٦- مزایای سیستم بیانی پیکیاپاستوریس ۱۷
۲-۱۷- معایب سیستم بیانی مخمر پیکیاپاستوریس ۱۷
۲-۱۸- بیان پروتئین در مخمر پیکیاپاستوریس ۱۸
۲-۱۹- بیان سیتوپلاسمی در مقایسه با بیان ترشحی در پیکیاپاستوریس ۱۸
۲-۲۰- اصلاحات پس از ترجمه پروتئین در مخمر ۱۹
۲-۲۱- گلیکوزیلاسیون ۱۹
۲-۲۲- مروری بر تحقیقات انجام شده ۲۰

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱ دستگاه‌ها و تجهیزات ۲٦
۳-۱-۱- دستگاه‌ها ۲٦
۳-۱-۲- تجهیزات ۲۷
۳-۲- مواد ۲۷
۳-۲-۱- میزبان مخمری (Pichia pastoris) ۲۷
۳-۲-۲- نشانگرهای وزن مولکولی پروتئین ۲۸
۳-۲-۳- آنتی بادی ۲۸
۳-۲-٤- مواد شیمیایی مورد استفاده ۳٤
۳-۳- روش‌ها ۳۰
۳-۳-۱- تهیه محیط‌های کشت مخمر ۳۰

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۳-۲- رشد مخمر در محیط‌های کشت ۳۸
۳-۳-۳- جدا کردن محیط بیانی از رسوب سلولی ۳۳
۳-٤- روش‌های تغلیظ پروتئین ٤۰
۳-٤-۱- روش اول: تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ٤۰
۳-٤-۲- روش دوم : اسید استیک-Nacl ٤۱
۳-٤-۳- روش سوم ٤۱
۳-۵- لیز کردن دیواره مخمر ۳٤
۳-٦- شناسایی پروتئین نوترکیب گوسفندی ترشح شده در محیط کشت بیانی مخمر پیکیاپاستوریس به روش‌های مختلف ۳٦
۳-٦-۱- شناسایی پروتئین نوترکیب گوسفندی به روش SDS-PAGE ۳٦
۳-٦-۲- شناسایی پروتئین نوترکیب گوسفندی به روش نیترات نقره ٤۸
۳-٦-۳- شناسایی پروتئین نوترکیب گوسفندی به روش وسترن بلاتینگ ۵۰
۳-۷- آغاز مرحله بهینه سازی شرایط کشت ۵۸
۳-۷-۱- دمای محیط کشت ۵۸
۳-۷-۲- تغلیظ به روش TCA ۵۹
۳-۷-۳- القاء متانول ٦۱
۳-۷-٤- کنترل اسیدیته ٦۳
۳-۷-۵- ظرف کشت ٦٤
۳-۸ نرم افزارهای مورد استفاده ٦٦

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل چهارم: نتایج

٤-١ تایید بیان پروتئین نوترکیب گوسفندی در مخمر پیکیاپاستوریس به روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ ٧٢
٤-١-١- ژل SDS-PAGE ٥٦
٤-١-٢- وسترن بلاتینگ ٥٧
٤-٢- بررسی میزان بیان ژن FSH گوسفندی نوترکیب به روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ . ٧٤
٤-٢-١- پارامتر دمای محیط کشت ٧٤
٤-٢-١-١-الکتروفورز ژل SDS-PAGE و رنگ آمیزی به روش کوماسی‌بلو ٧٤
٤-٢-١-٢- الکتروفورز ژل SDS-PAGE و رنگ آمیزی به روش نیترات نقره ٧٧
٤-٢-١-٣ وسترن بلاتینگ ٧٨
٤-٢-٢- پارامتر القای متانول ٧٩
٤-٢-٢-١- الکتروفورز ژل SDS-PAGE و رنگ آمیزی به روش کوماسی بلو ٧٩
٤-٢-٢-٢- الکتروفورز ژل SDS-PAGE و رنگ آمیزی به روش نیترات نقره ٨١
٤-٢-٢-٣- روش وسترن بلاتینگ ٨٣
٤-٢-٣- پارامتر اسیدیته محیط کشت ٨٤
٤-٢-٣-١- الکتروفورز ژل SDS-PAGE و رنگ آمیزی به روش کوماسی بلو ٨٤
٤-٢-٣-٢- الکتروفورز ژل SDS-PAGE و رنگ آمیزی به روش نیترات نقره ٨٧
٤-٢-٣-٣- روش وسترن بلاتینگ ٨٨
٤-٢-٤- پارامتر ظرف کشت ٨٩
٤-٢-٤-١- الکتروفورز ژل SDS-PAGE و رنگ آمیزی با کوماسی بلو ٨٩
٤-٢-٤-٢- الکتروفورز ژل SDS-PAGE و رنگ آمیزی به روش نیترات نقره ٩٠
٤-٢-٤-٣- روش وسترن بلاتینگ ٩١

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

٤-٣- انتخاب بهترین شرایط کشت برای مخمر پیکیا پاستوریس و بررسی بیان ژن FSH نوترکیب گوسفندی با استفاده از تکنیک وسترن بلاتینگ.....۹۲

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

نتیجه گیری..... ۱۰۰

پیشنهادات..... ۱۰۰

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱ جایگاه اتصال الیگوساکاریدها بر روی توالی اسیدآمینه‌ای زیرواحد αFSH گوسفندی (جنینگز و همکاران ۲۰۰۹) ۱۰

شکل ۲-۲ جایگاه اتصال الیگوساکاریدها بر روی توالی اسیدآمینه‌ای زیرواحد βFSH گوسفندی (جنینگز و همکاران ۲۰۰۹) ۱۱

شکل ۳-۱ نحوه‌ی اتصال اکریلامید و بیس اکریلامید ۴۵

شکل ۳-۲ نمای سطح مقطع از دستگاه الکتروبلات ۵۴

شکل ۳-۳ انواع ظروف کشت مخمر ۶۷

شکل ٤-۱ الکتروفورز ژل SDS-PAGE و تایید حضور پروتئین نوترکیب در مخمر پیکیاپاستوریس ۷۲

شکل ٤-۲ وسترن بلاتینگ و تایید حضور ژن در مخمر پیکیاپاستوریس ۷۳

شکل ٤-۳ نتایج بهینه سازی بیان ژن باالکتروفورز ژل SDS-PAGE – برای دمای ۳۲ و ۳۰- رنگ آمیزی با کوماسی بلو ۷۵

شکل ٤-٤ نتایج بهینه سازی بیان ژن با الکتروفورز ژل SDS-PAGE برای دمای ۲۷ و ۲٤ درجه سانتیگراد- رنگ آمیزی با کوماسی بلو ۷۵

شکل ٤-۵ نتایج بهینه سازی بیان ژن با الکتروفورز ژل SDS-PAGE برای دمای ۲۱ و ۱۸ درجه سانتیگراد رنگ آمیزی با کوماسی بلو ۷٦

شکل ٤-٦ نتایج بهینه سازی بیان ژن با الکتروفورز ژل SDS-PAGE- رنگ آمیزی با کوماسی بلو برای دمای ۱۵ درجه ساتیگراد ۷۷

شکل ٤-۷ نتایج بهینه سازی بیان ژن باالکتروفورز ژل SDS-PAGE برای نمونه‌های دما- رنگ آمیزی با نیترات نقره ۷۸

شکل ٤-۸ نتایج بهینه سازی بیان ژن و شناسایی پروتئین نوترکیب FSH گوسفندی با روش وسترن بلاتینگ برای نمونه‌های با دماهای مختلف محیط کشت ۷۹

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ٤-٩ نتایج بهینه سازی بیان ژن با الکتروفورز ژل SDS-PAGE برای القای ۰/۵ و ۱ درصد - رنگ آمیزی با کوماسی بلو ۸۰
شکل ٤-١٠ نتایج بهینه سازی بیان ژن با الکتروفورز ژل SDS-PAGE برای القای ۲ و ۳ درصد - رنگ آمیزی با کوماسی بلو ۸۰
شکل ٤-١١ نتایج بهینه سازی بیان ژن با الکتروفورز ژل SDS-PAGE برای درصدهای مختلف القای متانول - رنگ آمیزی با نیترات نقره ۸۱
شکل ٤-١٢ نتایج بهینه سازی بیان ژن و شناسایی پروتئین نوترکیب FSH گوسفندی با روش وسترن بلاتینگ برای نمونه‌های با درصدهای مختلف القای متانول ۸۳
شکل ٤-١٣ نتایج بهینه سازی بیان ژن با الکتروفورز ژل SDS-PAGE برای اسیدیته ٤ و ٥ - رنگ آمیزی با کوماسی بلو ۸٤
شکل ٤-١٤ نتایج بهینه سازی بیان ژن با الکتروفورز ژل SDS-PAGE برای اسیدیته ٦ - رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو ۸٥
شکل ٤-١٥ نتایج بهینه سازی بیان ژن با الکتروفورز ژل SDS-PAGE برای اسیدیته ۷ و ۸ - رنگ آمیزی با کوماسی بلو ۸٦
شکل ٤-١٦ نتایج بهینه سازی بیان ژن با الکتروفورز ژل SDS-PAGE برای اسیدیته‌های مختلف- رنگ آمیزی با نیترات نقره ۸۷
شکل ٤-١٧ وسترن بلاتینگ – نمونه های با pHهای مختلف- غلظت نمونه‌ها ۲۰ میکرولیتر ۸۸
شکل ٤-١٨ نتایج بهینه سازی بیان ژن با الکتروفورز ژل SDS-PAGE برای ظرف کشت زاویه‌دار - رنگ آمیزی با کوماسی بلو ۸۹
شکل ٤-١٩ ژل نیترات نقره- نمونه ظرف کشت های مختلف- مقدار همه نمونه‌ها ۲۰ میکرولیتر ۹۰
شکل ٤-٢٠ وسترن بلاتینگ- نمونه ظرف کشت های مختلف- غلظت همه نمونه‌ها ۲۰ میکرولیتر ۹۱
شکل ٤-٢١ وسترن بلاتینگ نمونه پروتئینی برای الگوی بهینه ۹۲

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱ دستگاه های مورد استفاده ۳۱
جدول ۳-۲ آنتی بادی مورد استفاده ۳۵
جدول ۳-۳ موادشیمیایی مورد استفاده ۳۵
جدول ۳-٤ مواد مورد نیاز ساخت Breaking buffer ٤۳
جدول ۳-۵ مواد مورد نیاز برای ساخت ژل جداکننده ۱۵٪ ٤۷
جدول ۳-٦ مواد مورد نیاز برای ساخت ژل متمرکز کننده ٤۷
جدول ۳-۷ مقدار و نوع ترکیبات بافر مهاجرت (۱۰x) ٤۸
جدول ۳-۸ مواد مورد نیاز برای ساخت محلول رنگ آمیزی ٤۹
جدول ۳-۹ مواد مورد نیاز برای ساخت محلول رنگ بری ٤۹
جدول ۳-۱۰ دستورالعمل ساخت محلول شستشو ۵٦
جدول ۳-۱۱ دستورالعمل ساخت بافر انتقال ۵٦
جدول ۳-۱۲ دستورالعمل ساخت محلول بلوکه کننده ۵۷
جدول ۳-۱۳ شرایط وسترن بلاتینگ زنجیره βFSH گوسفندی ۵۷
جدول ۳-۱٤ مواد مورد نیاز مرحله ظهور ٤٦
جدول ۳-۱۵ مراحل انجام فرایند بیان برای پارامتر دما (سه بار تکرار برای هر دما) ٦۳
جدول ۳-۱٦ مراحل انجام فرایند بیان برای پارامتر القای متانول (سه بار تکرار برای درصدهای مختلف القا) ٦۵
جدول ۳-۱۷ مراحل انجام فرایند بیان برای پارامتر PH (سه بار تکرار) ٦٦
جدول ۳-۱۸ مراحل انجام فرایند بیان برای پارامتر ظرف کشت (سه بار تکرار) ٦۷
جدول ٤-۱ مقایسه میانگین سطوح مختلف پارامترهای محیط کشت بر بیان ژن FSH گوسفندی ۸۲

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه و کلیات

تولید مثل از جمله صفات اقتصادی تاثیر گذار بر پویایی واحدهای پرورش گوسفند می‌باشد. به‌عبارتی قسمت عمده سودمندی پرورش گوسفند به بره‌زایی مربوط است. هر گونه اختلال در این فرایند موجب کاهش سود و ایجاد خسارت می‌شود و به‌کار گیری روش‌های مناسب برای افزایش بازده تولید مثل، افزایش کارایی اقتصادی در صنعت پرورش گوسفند را به دنبال دارد. در این خصوص، برخی پژوهشگران معتقدند که هزینه نگهداری حیوان ماده نسبت به سایر هزینه‌ها در تولید بره و یا گوساله گوشتی خیلی بالاتر از هزینه مشابه در طیور می‌باشد، زیرا نسبت تولید مثل در آنها به مراتب پایین‌تر از طیور می‌باشد. بنابراین، افزایش بازده تولید مثل سبب کاهش چشمگیر هزینه‌های اقتصادی تولید گوشت می‌گردد (فولر و همکاران، ۲۰۰۳). این صفات از جمله صفات کمی بوده که تحت تاثیر عوامل ژنتیکی و محیطی می‌باشند. به‌طور کلی شروع فعالیت‌های تولید مثلی، همراه با تغییرات هورمونی است که این تغییرات می‌تواند ناشی از عوامل ژنتیکی و محیطی نظیر طول دوره روشنایی باشد (برد و همکاران، ۱۹۸۲).

از سوی دیگر از جمله مهمترین صفات تولید مثلی در گوسفند چندقلوزایی می‌باشد که با میزان تخمک‌گذاری ارتباط مستقیم داشته و تحت تاثیر تعداد معدودی هورمون و ژن‌های ویژه قرار دارد (اسنیمان و همکاران، ۱۹۹۷). چنانچه روش مناسبی برای افزایش کارایی این دو مهم به‌کار گرفته شود، می‌توان بازده تولید مثل را بطور قابل توجهی افزایش داد.

۱-۲ هورمون‌های گلیکوپروتئینی و هورمون FSH

هورمون‌های گلیکوپروتئین ملکول‌های دارای دو زیر واحد نامشابه می‌باشند، ۱- زیرواحد α که بطور عمومی و مشترک در تمام هورمون‌های گلیکوپروتئین یک موجود یکسان است و ۲- زیرواحد β که در هر هورمون به طور اختصاصی عمل کرده و به گیرنده خاص خود متصل می‌شود و برای فعالیت بیولوژیکی هورمون‌های گلیکوپروتئینی لازم می‌باشد (فان و هندریکسون، ۲۰۰۷؛ فیدلر و همکاران ۱۹۹۸). الیگوساکاریدهایی که در زیرواحد α جای گرفته‌اند به زیرواحد β متصل می‌شوند و در سرهم‌بندی خاص توالی‌های پروتئینی نقش دارند. از آنجایی که در ساختار سه‌بعدی پروتئین، زیرواحدهای اختصاصی β قادر به اتصال به زیرواحد عمومی α می‌باشند می‌توان نتیجه گرفت که

علیرغم اختصاصی بودن زیرواحد β در هورمون‌های گلیکوپروتئینی یک موجود، برخی از مناطق در این زیرواحد در هورمون‌های گلیکوپروتئینی بسیار به یکدیگر شبیه می‌باشند (اولا آگور و تیموسی، ۱۹۹۸).

هر کدام از این زیر واحدهای پلی‌پپتیدی به‌تنهایی هیچ اثر بیولوژیک ندارند و به‌طور غیرکوالانسی و با پیوندهای هیدروژنی و واندروالسی و دی‌سولفیدی با یکدیگر متصل شده‌اند. یک نوع از این هورمون‌ها FSH[۱] یا هورمون محرک فولیکولی نام دارد که از سلول‌های غده‌ی هیپوفیز ترشح می‌شود (برگ، ۱۹۹۹ ؛ فابین و همکاران، ۱۹۹۸؛ فان و هندریکسون، ۲۰۰۷؛ فیدلر و همکاران، ۲۰۰۳؛ کیان‌و همکاران، ۲۰۰۹؛ سانیوشی و همکاران، ۲۰۰۱؛سوهن وهمکاران، ۲۰۰۳؛ برآون و مک نیلی، ۱۹۹۹).

زیر واحد آلفای هورمون FSH گوسفندی شامل ۹۲ اسید آمینه و زیر واحد بتای این هورمون دارای ۱۱۱ اسید آمینه می‌باشد که در جایگاه اسید آمینه Asn23 و Asn6 دارای گروه‌های کربوهیدراتی هستند (فیدلر و همکاران، ۲۰۰۳).

۱-۳ ضرورت انجام تحقیق

هورمون محرک فولیکولی (FSH) نقش کلیدی در توسعه و عملکرد سیستم تولیدمثلی ایفا می‌کند. این هورمون بطور گسترده در حوزه‌های تشخیص و درمان در پزشکی تولیدمثل مورد استفاده قرار می‌گیرد. تحولات مربوط به زیست‌فن‌آوری نشان داده‌است که هیچ ملکول دیگری وجود ندارد که بتواند مانند FSH منحصر به‌فرد باشد و دامنه وسیعی از فعالیت‌های زیستی را داشته باشد (رز و همکاران، ۲۰۰۰). این هورمون نقش حیاتی در انتخاب فولیکول بالغ بازی می‌کند. پس از بلوغ فولیکول غالب، ترشح FSH متوقف می‌شود. بنابراین، می‌توان با بالا نگهداشتن FSH در گردش خون، تعداد تخمک‌های بالغ و در پی آن نرخ تخمک‌ریزی را افزایش داد؛ و در نهایت میزان موفقیت در فن‌آوری‌های کمک باروری[۲] (ART) نظیر تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم[۳] (ICSI)، انتقال گامت به داخل لوله فالوپ[۴] (GIFT) و نیز انتقال جنین[۵] (ET) افزایش می‌یابد (جنینگز و همکاران، ۲۰۰۹).

---

[۱] Follicle stimulation hormon
[۲] Assisted Reproductive Technology
[۳] Intra Cytoplasmic Sperm Injection
[۴] Gamete Intra Fallopian Tube Transfer
[۵] Embryo Transfer

یکی‌از منابع تامین هورمون FSH نوترکیب مخمر پیکیاپاستوریس است. بهینه‌سازی شرایط کشت مخمر به منظور افزایش بیان هورمون FSH نوترکیب گوسفندی از جمله راهکارهای مورد توجه هم از نظر اقتصادی و هم زمانی بوده که پارامترهایی چون نوع میزبان، نوع محیط کشت، pH محیط، دمای کشت و غلظت متانول (عامل القایی) و... در آن دخیل می‌باشند. با تغییر این فاکتورها و اندازه‌گیری مقدار پروتئین ترشح شده توسط مخمر پیکیاپاستوریس در شرایط مختلف محیط کشت می‌توان به مقدار بالایی از پروتئین نوترکیب دست یافت.

١-٤ اهداف تحقیق

١) بررسی میزان بیان پروتئین FSH گوسفندی در سیستم ترشحی مخمر *پیکیاپاستوریس* با استفاده از تکنیک‌های SDS-PAGE[١] و وسترن‌بلاتینگ[٢].

٢) بهینه‌سازی تولید پروتئین محرک فولیکول گوسفندی نوترکیب و کاربرد آن در صنعت پرورش گوسفند به‌منظور بازدهی بیشتر تولید مثلی و در نهایت کاهش هزینه‌های مربوط به بخش درمان و بهبود ناباروری در گوسفند می‌باشد.

[١] Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
[٢] Western Blotting

فصل دوم

مرور منابع

تحقیقات بر روی حیوانات بزرگ‌جثه، محرک مهمی در زمینه اکتشافات زیست‌شناسی تولید مثل بوده‌است. آلن و مور، (۱۹۷۲) گنادوتروپین‌های A و B را در خون و ادرار یک زن شناسایی نمودند که امروزه این دو گنادوتروپین به نام‌های LH[۱] و FSH شناخته می‌شوند. توجه به گنادوتروپین‌ها با شناخت نقش هیپوفیز در تنظیم غدد جنسی آغاز شد (لوننفلد، ۲۰۰٤). گنادوتروپین‌ها جهت تحریک تخمدان در زنان و نیز حیوانات به‌منظور تشکیل و تکامل تخمک و جنین و نیز درمان ناباروری استفاده می‌شود (آلن و مور، ۱۹۷۲).

۲-۱ هورمون

دستگاه هورمونی از تعدادی غده به نام غدد مترشحه داخلی تشکیل می‌شود که گروه‌هایی از پیام‌های شیمیایی به نام هورمون را تولید می‌کنند. هورمون‌ها مواد شیمیایی هستند که از غدد مترشحه داخلی به جریان خون ترشح می‌شوند و توسط خون به اعضا یا بافت های دیگر بدن حمل شده و در آنجا فعالیت خود (اصلاح ساختار یا عملکرد عضو یا بافتی از بدن) را انجام می‌دهند (هامز، ۲۰۰۳).

از نظر ترکیب شیمیایی هورمون ها به سه دسته هورمون‌های پپتیدی (شامل هورمون پپتیدی ساده مانند انسولین یا هورمون‌های گلیکوپپتیدی ساده مثل FSH و LH)، هورمون‌های استروییدی (که منبع آن‌ها کلسترول می‌باشد مانند هورمون‌های جنسی) و هورمون‌های آمینی (که از یک اسید آمینه تشکیل شده‌اند مانند هورمون های تیروییدی و هورمون های قسمت مرکزی غده فوق کلیوی) تقسیم می‌شوند (بیتو و همکاران، ۱۹۹٦؛ هامز، ۲۰۰۳).

۲-۲ گنادوتروپین‌ها

گنادوتروپین‌ها به خانواده هورمون‌های گلیکوپروتئینی تعلق دارند که شامل هورمون محرک فولیکول (FSH)، هورمون تشکیل‌دهنده جسم زرد (LH)، هورمون محرک تیروئید (TSH) می‌شوند که از غده هیپوفیز ترشح می‌شوند. البته هورمون‌های گنادوتروپین کورونیک (CG) یا گنادوتروپین مادیان آبستن (PMSG) نیز جز این دسته هستند که از جفت ترشح می‌شوند (اولاآگور و تیموسی، ۱۹۹۸).

[۱] Luteinizing hormone