٢٠٣٩٢٨٣ - ١٥٨٣٨٠

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی گرایش

میکروبیولوژی

تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب از سلول یوکاریوت و پروکاریوت

استاد راهنما :

دکتر سید حمید زرکش اصفهانی

پژوهشگر:

مرضیه رضائی

اسفندماه ۱۳۸۹

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات ایران
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
IRANDOC

۱۵۸۳۸۰

۱۳۹۰/۳/۱۶

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات

و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه

متعلق به دانشگاه اصفهان است.

شیوه نگارش پایان نامه
رعایت شده است.

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ی زیست‌شناسی گرایش میکروبیولوژی خانم مرضیه رضائی تحت عنوان

تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب از سلول یوکاریوت و پروکاریوت

در تاریخ ۱۳۸۹/۱۲/۴ توسط هیئت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱. استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر سید حمید زرکش اصفهانی	با مرتبه‌ی علمی دانشیار
۲. استاد داور داخل گروه	دکتر گیتی امتیازی	با مرتبه‌ی علمی استادی
۳. استاد داور خارج گروه	دکتر حمید میرمحمدصادقی	با مرتبه‌ی علمی دانشیار

امضای مدیر گروه

گروه زیست شناسی 1965 Department Of Biology

تحفه‌ای ناچیز تقدیم به:

پیشگاه مقدس اباصالح المهدی (عج)

دو گوهر زندگیم، پدر و مادر عزیزم

دو برادر مهربانم

و

همسرم امید راهم

تقدیر و تشکر:

به نام آن که هستی، نام از او یافت فلک جنبش، زمین آرام از او یافت

حمد و سپاس بیکران، خاص پروردگار یکتا و آفریدگار تواناست که به ما قدرت آموختن و اندیشیدن عطا فرمود.

هر چند این مجال کفایت‌گر سپاس‌گزاری از زحمات کسانی نیست که در طول این مدت، یاری گر من بوده اند، اما حداقل وظیفه‌ی قدردانی، ایجاب می‌کند که با ذکر نامی، قدردانی خویش را از ایشان ابراز کنم.

مراتب امتنان و سپاس خویش را محضر استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر زرکش که در این دوره دوساله صبورانه و دلسوزانه راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشتند، تقدیم می دارم.

از سرکار خانم دکتر امتیازی و جناب آقای دکتر میرمحمدصادقی که زحمت داوری این پایان‌نامه را برعهده داشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از تک‌تک اساتید گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان بویژه اساتید بخش میکروبیولوژی که در مقطع کارشناسی و کارشناسی‌ارشد قریب به ۶ سال افتخار شاگردی آن بزرگواران را داشتم، مراتب قدردانی و سپاسگزاری خود را ابراز می‌کنم.

از اساتید دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به ویژه آقایان دکتر مفید و دکتر ربانی و سرکار خانم مؤذن کارشناس محترم گروه بیوتکنولوژی دارویی کمال سپاسگزاری را دارم.

از تمامی دوستان عزیزم که در طی این تحقیق همواره صمیمانه یار و مددکار من بودند، بالاخص خانم‌ها زاغیان، جعفری، کریمی، حیدری و قاسمی تشکر می‌کنم و از خداوند آرزوی سلامتی و توفیق روزافزون برایشان دارم. در پایان از پدرَ و مادر بزرگوارم و برادران عزیزم و همسر مهربانم که زمینه پیشرفت و شکوفایی را برایم فراهم نمودند، صمیمانه تشکر نموده بسیار ممنون و قدردان ایشانم و از خداوند بزرگ آرزوی سلامتی، سعادت و تعالی همه جانبه را برای ایشان، اساتید ارجمند و دانشجویان عزیز خواستارم.

چکیده

هورمون رشد انسانی یا سوماتوتروپین یک پروتئین تک رشته دارای ۱۹۱ اسیدآمینه به صورت یک ساختار با ۴ هلیکس دارای دو پل دی‌سولفیدی و وزن مولکولی حدود ۲۲ کیلودالتون می‌باشد که توسط سلول‌های سوماتوتروف غده هیپوفیز ساخته شده و به جریان خون آزاد می‌شود. به علت فعالیت‌های بیولوژیکی مهم ومتنوع هورمون رشد، این هورمون دارای کاربردهای گسترده‌ای در پزشکی و بیوتکنولوژی می‌باشد. *Escherichia coli* یکی از میزبان‌های اصلی برای تولید پروتئین خارجی است و از آنجایی که فرم فعال هورمون رشد به صورت غیرگلیکوزیله است، سیستم‌های بیان پروکاریوتی برای بیان این نوع پروتئین‌ها ترجیح دارد. از طرفی سلول‌های کشت شده پستانداران به خاطر تواناییشان در ایجاد ساختار صحیح پروتئین، تجمع و اصلاحات پس از ترجمه‌ای، سیستم مطلوب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب با کاربردهای کلینیکی هستند. بنابراین زمانیکه یک پروتئین در سلول‌های پستانداران بیان می‌شود کیفیت واثر بهتری دارد در مقایسه با زمانیکه در سایر میزبان‌ها از جمله باکتری‌ها، گیاهان و مخمر بیان می‌شود. سیستم‌های گزارشگر ژنتیکی به عنوان ابزاری برای مطالعه‌ی تنظیم و بیان ژن‌ها در سلول‌های یوکاریوتی می‌باشند. ژن‌های گزارشگر دارای کاربردهای ویژه‌ای هستند و اغلب به عنوان شاخصی برای فعالیت رونویسی در سلول‌ها به کار می‌روند.

در این تحقیق ابتدا هورمون رشد انسانی نوترکیب دارای توالی His-Tag در سه سویه پروکاریوت (*E.coli*) شامل TOP10 ، XL1-blue وJM109 و در دو محیط کشت LB و4YT تولید و بهترین سویه تولید کننده rhGH با روش‌های Dot blot، ELISA، SDS-PAGE وWestern blot تعیین شد. در ادامه طی یک فرایند کلونینگ توالی His-Tag از وکتور حذف و مجدداً Subclone تولید شده در سویه‌ی TOP10 بیان شد. و در نهایت هر دو نوع هورمون نوترکیب تولید شده در سلول پروکاریوتی به روش کروماتوگرافی ستون نیکل (برای نوع دارای توالی هیستیدین) و ژل فیلتراسیون (برای نوع طبیعی) خالص شدند. در ادمه تولید یوکاریوت هورمون رشد نوترکیب توسط یک کلون پایدار از سلول‌های CHO ترانسفورم شده با وکتور pSeqTaq انجام و با روش‌هایی مانند ELISA، تولید آن اثبات گردید. سپس فعالیت زیستی هر دو نوع rhGH پروکاریوت و یوکاریوت به روش سیستم گزارشگر ژنی (سیستم گزارشگر-LHRE-TK-Luc) بررسی شد. این سیستم شامل LHRE (عامل اتصال یابنده به مولکول STAT5) مشتق شده از پروموتور ژن بتاکازئین، پروموتور TK و ژن تحت کنترل آن، Luc کدکننده برای آنزیم فایرفلای لوسیفراز می‌باشد و امکان بررسی و اندازه‌گیری انتقال پیام ایجاد شده توسط GH در سلول‌های ترانسفورم شده با ژن GHR را فراهم می‌کند. برای این منظور از سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده با گیرنده هورمون رشد استفاده شده و فرایند انتقال پیام درون سلولی القا شده توسط rhGH و در نتیجه آن بیان آنزیم لوسیفراز و به دنبال آن تولید نور توسط دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از سیستم بررسی فعالیت زیستی نشان دادند که هر دونوع rhGH پروکاریوت و یوکاریوت به خوبی فرایند سیگنالینگ درون سلولی را القا می‌کنند اما در مقایسه با یکدیگر، نوع یوکاریوت دارای فعالیت زیستی بهتری می‌باشد.

کلمات کلیدی: هورمون رشد انسانی نوترکیب، باکتری *Escherichia coli* ، سلول‌های تخمدان هامستر چینی، ژل‌فیلتراسیون، سیستم گزارشگر ژنتیکی، لومینومتر

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و هدف

۱-۱- هورمون رشد انسانی ۱

۱-۲- تنظیم ترشح هورمون رشد ۳

۱-۳- اثرات فیزیولوژیک هورمون رشد ۶

۱-۴- هورمون رشد و سیستم ایمنی ۸

۱-۴-۱- ترشح GH در سلول‌های ایمنی ۸

۱-۴-۲- نقش بیولوژیک GH در سیتم ایمنی ۱۰

۱-۵- بیماریهای مرتبط با نقص در ترشح هورمون رشد ۱۰

۱-۶- کاربرد هورمون رشد در پزشکی و درمان ۱۲

۱-۷- ساختار گیرنده هورمون رشد ۱۲

۱-۸- مکانیسم انتقال پیام درون سلولی هورمون رشد ۱۳

۱-۹- هورمون رشد نوترکیب ۱۵

۱-۱۰- سیستم‌های یوکاریوتی ۱۵

۱-۱۱- رده سلولی تخمدان هامستر چینی (CHO) ۱۸

۱-۱۲- تکنیک ترانسفکشن DNA برای سلول‌های یوکاریوتی ۲۲

۱-۱۳- تکنیک ترانسفورماسیون DNA ۲۳

۱-۱۳-۱- ترانسفورماسیون و پایداری آن ۲۴

۱-۱۴- بیان پروتئین به صورت اینکلوژن بادی ۲۵
۱-۱۴-۱- بازآرایی پروتئین فعال از اینکلوژن‌بادی ۲۶
۱-۱۵- خالص‌سازی پروتئین‌ها ۲۷
۱-۱۵-۱- تکنیک کروماتوگرافی ۲۸
۱-۱۵-۲- تخلیص پروتئین‌های دارای لیگاند ۳۰
۱-۱۵-۳- تخلیص پروتئین‌ها به روش ژل‌فیلتراسیون ۳۱
۱-۱۶- بررسی فعالیت زیستی ۳۲
۱-۱۶-۱- سیستم‌های گزارشگر بیولومینسانس ۳۴
۱-۱۶-۲- کاربردهای سیستم‌های گزارشگر بیولومینسانس ۳۵
۱-۱۶-۳- ژن‌های لوسیفراز ۳۶
۱-۱۶-۴- فایرفلای لوسیفراز ۳۶
۱-۱۶-۵- رنیلا لوسیفراز ۳۷
۱-۱۶-۶- کلیک بیتل لوسیفراز ۳۷
۱-۱۶-۷- سیستم گزارشگر لوسیفرازی ۳۷
۱-۱۶-۸- استفاده از سیستم‌های گزارشگر بیولومینسانسی به منظور بررسی مسیرهای انتقال پیام ۳۸
اهداف پایان‌نامه ۴۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- بخش پروکاریوت ۴۲
۲-۱-۱- دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده در بخش پروکاریوت ۴۲

۲-۱-۲- سویه‌های باکتری استفاده شده ۴۳
۲-۱-۳- تولید سلول مستعد از باکتری اشرشیاکلی ۴۳
۲-۱-۳-۱- مواد مورد استفاده ۴۳
۲-۱-۳-۲- تهیه محلول‌ها ۴۳
محیط کشت LB ۴۳
محلول $0.1M\ CaCl_2$ ۴۴
محلول $0.1M\ MgCl_2$ ۴۴
محلول ذخیره گلیسیرول-$CaCl_2$ ۴۴
۲-۱-۳-۳- تهیه‌ی سلول مستعد ۴۴
۲-۱-۴- ترانسفورماسیون سلول‌های اشرشیاکلی ۴۵
۲-۱-۴-۱- وکتور مورد استفاده دارای ژن کدکننده هورمون رشد ۴۵
۲-۱-۴-۲- تهیه محلول‌ها ۴۶
محیط کشت SOC ۴۶
تهیه‌ی محلول آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ۴۶
تهیه‌ی محلول آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین ۴۷
۲-۱-۴-۳- روش انجام ترانسفورماسیون ۴۷
۲-۱-۵- استخراج پلازمید به روش Miniprep extraction ۴۷
۲-۱-۵-۱- مواد و وسایل لازم ۴۷
۲-۱-۵-۲- روش کار ۴۸

۲-۱-۶- هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های محدودالاثر ۴۹
۲-۱-۶-۱- مواد لازم ۴۹
۲-۱-۶-۲- روش کار ۴۹
۲-۱-۷- الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز ۵۰
۲-۱-۷-۱- مواد لازم ۵۰
۲-۱-۷-۲- تهیه‌ی محلول‌ها ۵۰
بافر TAE10X ۵۰
بافر TBE10X ۵۱
محلول ذخیره اتیدیوم‌برماید ۵۱
تهیه‌ی ژل آگارز ۵۱
۲-۱-۷-۳- روش تهیه‌ی ژل آگارز ۵۱
۲-۱-۸- تخمین غلظت DNA پلازمیدی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ۵۲
۲-۱-۹- تعیین توالی ژن rhGH موجود در پلازمید استخراج شده ۵۲
۲-۱-۱۰- تولید هورمون رشد نوترکیب انسانی در سویه‌های مختلف باکتری *E.coli* ۵۳
۲-۱-۱۰-۱- مواد لازم ۵۳
۲-۱-۱۰-۲- تهیه‌ی محلول‌ها ۵۳
محیط کشت 4YT ۵۳
محلول IPTG 1M ۵۴
۲-۱-۱۰-۳- روش کار ۵۴

۲-۱-۱۱- لیز سلولی و استخراج پروتئین تولیدی ۵۵
۲-۱-۱۱-۱- مواد لازم ۵۶
تهیه‌ی محلول‌ها ۵۶
بافر شکست سلولی ۵۶
محلول لیزوزیم ۵۶
۲-۱-۱۱-۳- روش کار ۵۶
۲-۱-۱۲-۱- انجام Dot blot به منظور مقایسه نسبی تولید پروتئین در سه سویه‌ی مورد بررسی ۵۷
۲-۱-۱۲-۲- مواد لازم ۵۷
۲-۱-۱۲-۲- روش تهیه‌ی محلول‌ها ۵۸
بافر نمکی فسفات(PBS 10X) ۵۸
محلول Blocking ۵۹
محلول شستشو ۵۹
محلول آنتی‌بادی اولیه و ثانویه ۵۹
معرف ECL ۶۰
کاغذ نیتروسلولز ۶۰
۲-۱-۱۲-۳- روش انجام Dot blot برای بررسی میزان تولید rhGH ۶۱
۲-۱-۱۳- تعیین غلظت هورمون رشد نوترکیب تولید شده به روش ELISA ۶۴
۲-۱-۱۳-۱- مواد لازم ۶۴
۲-۱-۱۳-۲- روش کار ۶۵

۲-۱-۱۴- تعیین وزن مولکولی rhGH تولید شده به کمک روش SDS-PAGE و وسترن‌بلات..... ۶۷
۲-۱-۱۴-۱- تکنیک SDS-PAGE ۶۷
۲-۱-۱۴-۲- تکنیک وسترن بلات ۶۹
۲-۱-۱۴-۳- مواد لازم ۷۱
۲-۱-۱۴-۴- روش تهیه‌ی محلول‌ها ۷۱
محلول ذخیره آکریل‌آمید و بیس آکریل‌آمید ۴۰٪ ۷۲
محلول ذخیره SDS10% ۷۲
محلول ۱۰٪ آمونیوم پرسولفات (APS) ۷۲
بافر Running 10X ۷۲
بافر Stacking 10X ۷۳
بافر Tank 10X ۷۳
بافر Transfer 10X ۷۳
بافر 2X SDS gel loading ۷۴
محلول رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو ۷۴
محلول رنگ‌بر کوماسی‌بلو ۷۴
۲-۱-۱۴-۵- روش انجام تست وسترن بلات ۷۵
۲-۱-۱۴-۶- روش رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو ۷۷
۲-۱-۱۴-۷- روش انتقال به کاغذ نیتروسلولز یا Blotting ۷۷
۲-۱-۱۵- تولید Subclone طبیعی rhGH فاقد توالی His-Tag ۷۸

۲-۱-۱۶- طراحی پرایمر به منظور تکثیر و خارج کردن ژن rhGH از پلازمید ۷۹
۲-۱-۱۷- انجام PCR به منظور تکثیر توالی rhGH ۷۹
۲-۱-۱۷-۱- مواد لازم ۸۰
۲-۱-۱۷-۲- روش کار ۸۰
۲-۱-۱۷-۳- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل ۸۱
۲-۱-۱۸- استخراج محصول PCR از ژل ۸۱
۲-۱-۱۸-۱- مواد مورد نیاز ۸۱
۲-۱-۱۸-۲- روش کار ۸۱
۲-۱-۱۹- الحاق محصول PCR به وکتور InsTAcolone (وکتور pTZ57R/T) ۸۳
۲-۱-۱۹-۱- مواد لازم ۸۳
۲-۱-۱۹-۲- روش کار ۸۳
۲-۱-۲۰- انجام PCR با وکتور pTZ57R/T و پرایمر T7 به منظور بررسی الحاق محصول PCR ۸۴
۲-۱-۲۱- برش وکتور pTZ57R/T و pTrcHisTOPO توسط آنزیم‌های محدودکننده ۸۵
۲-۱-۲۱-۱- مواد لازم ۸۶
۲-۱-۲۱-۲- روش کار ۸۶
۲-۱-۲۲- الحاق قطعه برش‌یافته از وکتور pTZ57R/T و وکتور pTrc/TOPO ۸۷
۲-۱-۲۳- استخراج پروتئین از اینکلوژن‌بادی ۸۷
۲-۱-۲۳-۱- تهیه‌ی محلول‌ها ۸۸
۲-۱-۲۳-۲- روش کار ۸۸

۲-۱-۲۴- خالص‌سازی پروتئین ۸۹
۲-۱-۲۴-۱- خالص‌سازی rhGH متصل شده به His-Tag به روش کروماتوگرافی تمایلی نیکل ۸۹
۲-۱-۲۴-۱-۱- مواد لازم ۹۰
۲-۱-۲۴-۱-۲- تهیه‌ی محلول‌ها ۹۰
۲-۱-۲۴-۱-۳- روش کار ۹۱
۲-۱-۲۴-۲- خالص‌سازی rhGH طبیعی به روش ژل‌فیلتراسیون ۹۲
۲-۱-۲۴-۲-۱- مواد و وسایل لازم ۹۲
۲-۱-۲۴-۲-۲- تهیه‌ی محلول‌ها ۹۲
بافر ستون ۹۲
اتانول ۲۰٪ ۹۳
۲-۱-۲۴-۲-۳- روش کار ۹۳
۲-۲- بخش یوکاریوت ۹۴
۲-۲-۱- دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده در بخش یوکاریوت ۹۴
۲-۲-۲- مراحل کلی ذوب، پاساژ و فریز سلول‌ها ۹۵
۲-۲-۲-۱- مواد لازم ۹۵
۲-۲-۲-۲- رده‌های سلولی مورد استفاده ۹۶
۲-۲-۲-۳- روش تهیه‌ی محیط کشت ۹۶
۲-۲-۲-۴- روش کار ۹۷
۲-۲-۲-۴-۱- ذوب سلول‌ها ۹۷

۲-۲-۴-۲-۲- پاساژ سلول‌ها ۹۸
۲-۲-۴-۳-۲- فریز سلول‌ها ۹۹
۲-۲-۳- کشت سلول‌های CHO و CHO/GHWT ۱۰۰
۲-۲-۴- بررسی تولید rhGH توسط سلول CHO/GHWT به روش ELISA ۱۰۰
۲-۲-۵- بررسی اثر عوامل مختلف بر میزان تولید rhGH به روش ELISA ۱۰۱
۲-۲-۵-۱- مواد لازم ۱۰۱
۲-۲-۵-۲- روش کار ۱۰۱
۲-۲-۶- بررسی اثر عوامل مختلف بر میزان مرگ و میر سلول‌ها توسط فلوسایتومتری ۱۰۳
۲-۲-۶-۱- مواد لازم ۱۰۳
۲-۲-۶-۲- روش کار ۱۰۴
۲-۳- بررسی فعالیت زیستی rhGH ۱۰۵
۲-۳-۱- مواد و وسایل لازم ۱۰۵
۲-۳-۲- تهیه‌ی محلول‌ها ۱۰۵
محلول $CaCl_2$ 2.5M ۱۰۵
بافر TE 0.1M ۱۰۶
بافر HBS 2X ۱۰۶
محیط کشت غنی ۱۰۶
سوبسترای لومینول ۱۰۶
۲-۳-۳- روش انتقال وکتور eGFP به سلول‌های CHO و Hek293 ۱۰۷

۲-۳-۴- بررسی نتایج ترانسفکشن به روش فلوسایتومتری..... ۱۰۸
۲-۳-۵- بررسی فعالیت زیستی rhGH به روش سیستم گزارشگر ژنی..... ۱۰۸
۲-۳-۵-۱- روش کار..... ۱۰۹
۲-۳-۶- بررسی نتایج به کمک دستگاه لومینومتر..... ۱۱۰

فصل سوم: نتایج و مشاهدات

۳-۱- نتایج بخش پروکاریوت..... ۱۱۱
۳-۱-۱- تکثیر پلازمید و بررسی ویژگی‌های پلازمید استخراج شده..... ۱۱۱
۳-۱-۲- مقایسه‌ی کارایی ترانسفورماسیون بین سویه‌های مختلف *E.coli*..... ۱۱۲
۳-۱-۳- بررسی تولید پروتئین rhGH تولید شده توسط سویه‌های مختلف به روش Dot blot..... ۱۱۴
۳-۱-۴- مقایسه‌ی بیان پروتئین rhGH تولید شده در سویه‌های مختلف به روش ELISA..... ۱۱۶
۳-۱-۵- تعیین وزن مولکولی rhGH تولید شده به روش SDS-PAGE و وسترن‌بلات..... ۱۱۷
۳-۱-۶- تولید Subcolone طبیعی rhGH فاقد توالی His-tag..... ۱۱۸
۳-۱-۶-۱- انجام PCR به منظور تکثیر توالی rhGH..... ۱۱۸
۳-۱-۶-۲- انجام PCR با وکتور pTZ57R/T و پرایمر T7 به منظور بررسی الحاق محصول PCR..... ۱۱۹
۳-۱-۶-۳- انجام ترانسفورماسیون با وکتور pTZ57R/T الحاق یافته..... ۱۲۰
۳-۱-۶-۴- برش وکتور pTZ57R/T و pTrcHis توسط آنزیم‌های محدودکننده..... ۱۲۱
۳-۱-۶-۵- الحاق قطعه برش یافته از وکتور pTZ57R/T و وکتور pTrc/TOPO..... ۱۲۱
۳-۱-۷- انجام SDS-PAGE و وسترن‌بلات با پروتئین rhGH تولید شده فاقد His\tag..... ۱۲۲
۳-۱-۸- تعیین توالی Subcolone تولید شده..... ۱۲۳

۳-۱-۹- نتایج بخش استخراج و خالص‌سازی پروتئین rhGH ۱۲۳
۳-۱-۹-۱- خالص‌سازی پروتئین HisTag-rhGH توسط کروماتوگرافی ستون نیکل ۱۲۳
۳-۱-۹-۲- خالص‌سازی rhGH به روش ژل‌فیلتراسیون ۱۲۴
۳-۲- نتایج بخش یوکاریوت ۱۲۶
۳-۲-۱- بررسی تولید rhGH توسط سلول‌های CHO به روش ELISA ۱۲۶
۳-۲-۲- بررسی اثر عوامل مختلف بر میزان تولید rhGH به روش ELISA ۱۲۷
۳-۲-۳- بررسی اثر عوامل مختلف بر میزان مرگ و میر سلول‌ها توسط فلوسایتومتری ۱۲۸
۳-۳- نتایج بخش سنجش زیستی ۱۳۲
۳-۳-۱- نتایج بخش ترانسفکشن با پلازمید eGFP ۱۳۲
۳-۳-۲- بررسی فعالیت زیستی rhGH به روش سیستم گزارشگر ژنی ۱۳۵

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱- نتیجه‌گیری کلی ۱۳۸
۴-۲- تولید rhGH توسط میزبان پروکاریوت ۱۳۹
۴-۳- تولید rhGH توسط میزبان یوکاریوت ۱۴۱
۴-۴- بررسی فعالیت زیستی ۱۴۴
پیشنهادات ۱۴۶
فهرست منابع ۱۴۷
پیوست‌ها ۱۵۶

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱:ساختار هورمون رشد انسانی ۲

شکل۱-۲:تنظیم ترشح GH توسط سه هورمون GHRH، SS و Ghrelin ۴

شکل ۱-۳: تنظیم ترشح GH در سلول‌های غده هیپوفیز پیشین ۵

شکل ۱-۴: نقش GH در متابولیسم قسمت‌های مختلف بدن ۷

شکل ۱-۵: تنظیم ترشح GH در سلول‌های ایمنی ۹

شکل ۱-۶: فرد مبتلا به کوتاهی قد در نتیجه نقص در ترشح GH ۱۱

شکل ۱-۷: ساختار و عملکرد گیرنده هورمون رشد(GHR) ۱۳

شکل ۱-۸: مسیر انتقال پیام ایجاد شده با واسطه GH ۱۴

شکل ۱-۹: نمای شماتیک از تولید مرحله به مرحله‌ی یک رده سلولی ۲۱

شکل ۱-۱۰: نمای شماتیک ترانسفورماسیون ۲۴

شکل ۱-۱۱: انواع روش‌های خالص‌سازی ۲۹

شکل ۱-۱۲: نمای شماتیک از خالص‌سازی پروتئین دارای برچسب هیستیدین ۳۰

شکل ۱-۱۳: نمای شماتیک از خالص‌سازی پروتئین به روش ژل‌فیلتراسیون ۳۱

شکل ۱-۱۴: دیاگرامی از واکنش ایجاد شده تا مرحله تولید نور توسط آنزیم فایرفلای لوسیفراز ۳۶

شکل ۱-۱۵: دیاگرامی از واکنش ایجاد شده تا مرحله تولید نور توسط آنزیم رنیلا لوسیفراز ۳۷

شکل ۱-۱۶: نواحی پروموتوری از سیستم‌های گزارشگر معمول STAT5 ..... ۳۹

شکل ۲-۱: مکانیسم مولکولی تشکیل پلی‌آکریل‌آمید از آکریل‌آمید و بیس‌آکریل‌آمید ۶۸