بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی گرایش میکروبیولوژی

تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب در برخی باکتری های پروبیوتیک

استادان راهنما:

دکتر سید حمید زرکش اصفهانی

دکتر رحمان امامزاده

استاد مشاور:

دکتر زهرا اعتمادی فر

پژوهشگر:

شیوا شهبازی

بهمن ماه ۱۳۹۱

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی گرایش میکروبیولوژی

خانم شیوا شهبازی تحت عنوان

تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب در برخي باکتری های پروبیوتیک

در تاریخ ۹۱/۱۱/۲۸ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استادان راهنمای پایان نامه دکتر سید حمید زرکش اصفهانی با مرتبه‌ی علمی دانشیار امضاء

دکتر رحمان امامزاده با مرتبه‌ی علمی استادیار امضاء

۲- استاد مشاور پایان نامه دکتر زهرا اعتمادی فر با مرتبه‌ی علمی استادیار امضاء

۳- استاد داور داخل گروه دکتر محمد ربانی با مرتبه‌ی علمی دانشیار امضاء

۴- استاد داور خارج از گروه دکتر حمید میرمحمد صادقی با مرتبه‌ی علمی استاد

امضای مدیر گروه

گروه زیست شناسی Department Of Biology 1965

سپاسگزاری

پروردگارا در این سال‌ها هیچ تلاشی نکردم مگر به لطف و رحمتت و هیچ اندوخته‌ایی ندارم مگر آنچه تو به من عطا نمودی اینک بیش از پیش معترفم که: الهی تنها تو دانی و برآوردن توانی، یاریم فرما.

به مصداق من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق بسی شایسته است که از استاد گرانقدر و بزرگوارم جناب آقای دکتر سید حمید زرکش که در کمال سعه صدر با حسن خلق و فروتنی از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند و از استاد صبور و با تقوایم جناب آقای دکتر رحمان امامزاده که با راهنمایی‌های کارساز و سازنده‌شان گلشن سرای علم و دانش را بارور ساختند کمال تقدیر و تشکر را بنمایم.

از سرکار خانم دکتر زهرا اعتمادی فر، استاد عزیز و مهربانم که مشاوره این پایان نامه را بر عهده گرفتند کمال تقدیر و تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر حمید میر محمد صادقی، مدیر گروه محترم بیوتکنولوژی و جناب آقای دکتر محمد ربانی عضو هیأت علمی دانشگاه اصفهان که داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند کمال تقدیر و تشکر را دارم.

از همکاری صمیمانه جناب آقای دکتر مدرسی عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران و دانشجوی گرامیشان سرکار خانم دکتر منصوری و سرکار خانم دکتر حجتی عضو هیأت علمی دانشگاه اصفهان سپاسگزاری نموده و از درگاه خداوند متعال توفیقات روزافزون برای ایشان مسألت می‌نمایم.

از همه‌ی دوستان عزیزم که در انجام این تحقیق همواره در کنارم بودند و مرا صمیمانه و مشفقانه یاری دادند بی‌نهایت سپاسگزارم.

از پدر و مادر عزیز، دلسوز و مهربانم که همواره مشوق من بوده‌اند و با حمایت‌های همه جانبه‌شان باعث پیشرفت من شده‌اند کمال تقدیر و تشکر را دارم.

سپاس و قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از سلامت و آرامش برای من فراهم آورده است همدلی که مرا در راه رسیدن به اهداف عالی یاری می‌رساند.

از خواهران عزیز و مهربانم همچنین از خانواده محترم همسرم و همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده‌اند خالصانه تشکر می‌کنم.

تقدیم به:

خدای مهربانی که ما را آفرید و از فضلش به ما عطا کرد.

تقدیم به عزیزترین و گرانبهاترین هدیه های آسمانی، آنان که بسان خورشید، آسمان تاریک زندگیم را نورانی نمودند.

پدر عزیزم: که سایه مهرش بر زندگی من بزرگترین هدیه خداست. تمام داشته‌های امروز را مرهون تشویق های دیروز و حمایت‌های امروز و همیشگی ایشان می‌دانم.

مادر مهربانم: که آئینه افتادگی، عاطفه و پارسایی است. او که دلخوشی‌های امروزم را مدیون دلواپسی‌های همیشگی‌اش هستم.

خواهران عزیز و برادر مهربانم به پاس همدلی، همراهی و محبت‌هایشان

با آرزوی روزگاری سراسر سعادت و نیکبختی برای ایشان

همسر عزیزم: او که آئینه‌ی تمام نمای از خودگذشتگی، فداکاری، مهربانی و صداقت است.

و تقدیم به روح پاک آن مهربانی که آفتاب مهرش در آستانه قلبم، همچنان پابرجاست و هرگز غروب نخواهد کرد.

یارب دل ما را تو به رحمت جان ده

درد همه را به صابری درمان ده

این بنده چه داند که چه می باید جست

داننده تویی هر آنچه دانی آن ده

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ایی هستند که تأثیرات مفیدی روی سلامتی انسان و حیوان دارند. باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس*، عضو مشخص شده‌ی باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد که ویژگی‌های آن به طور کامل بررسی شده‌اند. این باکتری ارگانیسم مدل این گروه در نظر گرفته شده است. *L. lactis* برای تولید پروتئین‌های زیستی مفید و برای انتقال DNA پلاسمیدی به سلولهای یوکاریوتی مناسب می‌باشد. اخیراً از *L. lactis* به عنوان اولین ارگانیسم تغییر یافته‌ی ژنتیکی زنده برای درمان بیماری‌های انسانی استفاده شده است.

هورمون رشد انسانی یا سوماتوتروپین یک پروتئین تک‌رشته دارای ۱۹۱ اسیدآمینه به صورت یک ساختار با ۴ مارپیچ و دارای دو پل دی‌سولفیدی و وزن مولکولی حدود ۲۲ کیلو دالتون می‌باشد. که توسط سلول‌های سوماتوتروف غده هیپوفیز ساخته شده و به جریان خون آزاد می‌شود. به علت فعالیت‌های بیولوژیکی مهم و متنوع هورمون رشد، این هورمون دارای کاربردهای گسترده‌ایی در پزشکی و بیوتکنولوژی می‌باشد. از آنجایی که فرم فعال هورمون رشد به صورت غیرگلیکوزیله است، سیستم‌های بیان پروکاریوتی برای بیان این نوع پروتئین‌ها ترجیح دارد. سیستم بیان ژن کنترل شده با نیسین یکی از موفق‌ترین و گسترده ترین ابزار استفاده شده برای تنظیم بیان ژن در باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. این سیستم بیان اطمینان می‌دهد که ژن مقاومت به آنتی بیوتیک و آنتی بیوتیک در پروتئین به‌دست آمده حضور ندارند. هدف از این مطالعه تولید هورمون رشد انسانی به عنوان یک پروتئین دارویی در *L. lactis* می‌باشد. ژن هورمون رشد انسانی نوترکیب با روش PCR تکثیر و با آنزیم‌های *Nco*I و*Sac*I هضم شد و در وکتور pNZ8149 کلون شد. سپس وکتور نوترکیب با روش الکتروپوریشن به داخل *L. lactis NZ3900* منتقل شد و کلنی های حاوی پلاسمید انتخاب شدند. غربالگری براساس توانایی رشد بر روی لاکتوز می‌باشد. حذف ژن *lacF* باعث عدم رشد این سویه بر روی لاکتوز می‌شود مگر اینکه این ژن از طریق پلاسمید فراهم شود. باکتری‌های ترانسفورم شده با PCR ،آزمایش هضم و تعیین توالی DNA شناسایی شدند. سلول‌های *L. lactis NZ3900* در محیط M17 با ۰/۵٪ لاکتوز رشد داده شدند. القاء با ۵ ng/ml نیسین در تراکم سلولی یا OD600 برابر با ۰/۴ انجام شد. بعد از ۵ ساعت سلول‌ها از محیط جدا شدند و عصاره بدون سلول آماده شد. تولید پروتئین هورمون رشد انسانی نوترکیب با استفاده از روش‌های الایزا، دات بلات، SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید شد. ژن هورمون رشد انسانی با موفقیت در وکتور pNZ8149 کلون و به باکتری *L. lactis* NZ3900 منتقل شد. پروتئین هورمون رشد به میزان ۱/۵۹ μg/ml تولید شد.

کلمات کلیدی : پروبیوتیک، نیسین، هورمون رشد انسانی، *لاکتوکوکوس لاکتیس*، *lacF*

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و هدف

۱-۱- پروبیوتیک‌ها ۱

۱-۲- خواص پروبیوتیک‌ها در انسان‌ها و حیوانات ۳

۱-۳- کارآیی فناوری پروبیوتیک‌های نوترکیب ۵

۱-۴- اهمیت صنعتی باکتری‌های اسید لاکتیک ۵

۱-۵- باکتری‌های اسید لاکتیک ، سلامت و تغذیه ۶

۱-۶- استفاده‌های آینده و جدید باکتری‌های اسید لاکتیک ۷

۱-۷- باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان حاملین تحویل مخاطی آنتی‌ژن جهت تولید واکسن‌های زنده ۷

۱-۸- *لاکتوکوکوس لاکتیس*: مدل باکتری‌های اسید لاکتیک و نامزد بالقوه به عنوان حامل واکسن مخاطی ۹

۱-۹- ابزارهای ژنتیکی برای تولید پروتئین‌های هترولوگ در *لاکتوکوکوس لاکتیس* ۱۲

۱-۹-۱. حامل های کلونینگ برای بیان پروتئین هترولوگ ۱۳

۱-۹-۲. بیان و هدف‌گیری پروتئین‌های هترولوگ ۱۳

۱-۱۰- سویه‌های *L. lactis* اصلاح شده‌ی ژنتیکی ۲۰

۱-۱۱- نیسین ۲۲

۱-۱۲- مکانیسم‌های فرض شده برای مقاومت به نیسین در *L. lactis* ۲۴

۱-۱۳- کاربردهای آینده *L. lactis* به عنوان حامل واکسن DNA ۲۵

۱-۱۴- نگرانی‌های ایمنی مرتبط با *L. lactis* نوترکیب به عنوان واکسن زنده ۲۷

عنوان **صفحه**

۱-۱۵- LAB GMOs ۲۷

۱-۱۶- هورمون رشد انسانی ۲۸

۱-۱۷- روش ترانسفورماسیون DNA ۳۱

۱-۱۸- محیط کشت G/L-SGM17B ۳۲

۱-۱۹- اهداف پایان نامه ۳۲

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- کلونینگ ژن هورمون رشد انسانی ۳۴

۲-۱-۱. دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده دربخش کلونینگ ژن ۳۴

۲-۱-۲. مواد مورد استفاده ۳۵

۲-۱-۳. سویه‌های باکتریایی استفاده شده ۳۵

۲-۱-۴. فعال کردن باکتری‌ها در محیط کشت مناسب ۳۶

۲-۱-۴.۱. تهیه محیط کشت‌ها ۳۶

۲-۱-۴.۲. فعال کردن باکتری *Lactococcus lactis* ۳۸

۲-۱-۴.۳. شناسایی اولیه‌ی سویه *L. lactis* جهت تأیید سویه مورد نظر ۳۸

۲-۱-۵. تولید سلول مستعد از باکتری *L. lactis* ۳۹

۲-۱-۵.۱. تهیه محلول‌ها ۳۹

۲-۱-۵.۲. ساخت محیط‌کشت G/L-SGM17B ۴۰

۲-۱-۵.۳. تهیه سلول مستعد برای الکتروپوریشن ۴۰

عنوان **صفحه**

۲-۱-۶. الکتروپوریشن ۴۱

۲-۱-۷. Replica plating ۴۲

۲-۱-۷.۱. مواد لازم ۴۲

۲-۱-۷.۲. روش کار ۴۲

۲-۱-۸. غربالگری کلنی‌های حاوی پلاسمیدpNZ8149 ..... ۴۲

۲-۱-۹. تکثیر پلاسمید pNZ8149 و استخراج آن از باکتری ۴۲

۲-۱-۹.۱. مواد و وسایل لازم ۴۲

۲-۱-۹.۲. تهیه محلول‌ها و بافرها ۴۳

۲-۱-۹.۳. روش انجام استخراج پلاسمید طبق دستور عمل شرکت MoBiTec ۴۴

۲-۱-۹.۴. پاکسازی پلاسمید استخراج شده با کیت استخراج پلاسمید ۴۵

۲-۱-۹.۴.۱. مواد و وسایل لازم ۴۵

۲-۱-۹.۴.۲. مراحل انجام استخراج طبق دستور عمل کیت ۴۵

۲-۱-۱۰. بردن محصول استخراج پلاسمید بر روی ژل آگارز ۴۶

۲-۱-۱۰.۱. مواد لازم ۴۶

۲-۱-۱۰.۲. تهیه‌ی محلول‌ها ۴۶

بافر TAE 10X ۴۶

بافر TBE 10X ۴۷

محلول ذخیره اتیدیوم برماید ۴۷

تهیه‌ی ژل آگارز ۴۷

عنوان **صفحه**

۲-۱-۱۱. خارج کردن ژن rhGH از وکتور TA clone یا pTrc TOPO ۴۸

۲-۱-۱۲. تکثیر وکتور TA clone و استخراج آن از باکتری ۴۹

۲-۱-۱۳. طراحی پرایمر به منظور تکثیر و خارج کردن ژن rhGH از پلاسمید ۵۱

۲-۱-۱۴. انجام PCR به منظور تکثیر توالی rhGH ۵۳

۲-۱-۱۴.۱. مواد لازم ۵۳

۲-۱-۱۴.۲. رقیق‌کردن پرایمرها و DNA الگو ۵۴

۲-۱-۱۴.۳. روش کار ۵۴

۲-۱-۱۴.۴. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل ۵۵

۲-۱-۱۵. استخراج محصول PCR از ژل ۵۵

۲-۱-۱۵.۱. مواد مورد نیاز ۵۶

۲-۱-۱۵.۲. روش کار ۵۶

۲-۱-۱۶. هضم‌دوگانه محصول PCR و وکتور با آنزیم‌های *NcoI* و *Sac I* ۵۷

۲-۱-۱۶.۱. مواد لازم ۵۷

۲-۱-۱۶.۲. واکنش هضم دوگانه محصول PCR ۵۷

۲-۱-۱۶.۳. واکنش هضم دوگانه وکتور pNZ8149 ..... ۵۸

۲-۱-۱۷. تنظیم واکنش آلکالین فسفاتاز برای وکتور pNZ8149 هضم دوگانه شده ۵۹

۲-۱-۱۸. محاسبه میزان وکتور و محصولPCR برای واکنش الحاق ۵۹

۲-۱-۱۹. تنظیم واکنش الحاق ۶۱

۲-۱-۱۹.۱. مواد و وسایل لازم ۶۱

عنوان **صفحه**

۲-۱-۲۰. الکتروپوریشن سلول مستعد باکتری *L. lactis* با وکتور نوترکیب دارای rhGH ۶۳

۲-۱-۲۱. غربال‌گری کلنی‌های حاوی وکتور نوترکیب ۶۳

۲-۱-۲۱.۱. مواد لازم ۶۳

۲-۱-۲۱.۲. روش کار ۶۳

غربالگری کلنی‌های زرد از روی محیط الیکر ۶۳

استخراج پلاسمید از کلنی‌های زرد ۶۴

انجام PCR به منظور بررسی وجود قطعه الحاق یافته در کلنی‌های به دست آمده ۶۴

۲-۱-۲۲. تأیید نهایی وجود قطعه‌ی الحاق یافته‌ی دارای توالی ژن کد کننده rhGH در کلنی‌های غربال شده ۶۴

۲-۱-۲۲.۱. مواد لازم ۶۴

۲-۱-۲۲.۲. روش کار ۶۵

۲-۱-۲۲.۳. تعیین توالی ۶۵

۲-۲- بیان ژن هورمون رشد انسانی نوترکیب در *L. lactis* ۶۶

۲-۲-۱. دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده دربخش بیان ژن هورمون رشد انسانی نوترکیب ۶۶

۲-۲-۲. مواد لازم ۶۶

۲-۲-۳. تهیه محلول‌ها ۶۶

محلول ذخیره نیسین ۶۷

تهیه محلول NaCl 0.85% ۶۷

بافر TES-lysis ۶۷

عنوان **صفحه**

۲-۲-۴. مراحل بیان ژن طبق دستور عمل شرکت MoBiTec ۶۸

۲-۲-۵. آماده کردن عصاره سلولی (cell extracts) ۶۹

۲-۲-۶. تولید هورمون رشد در سیستم بیانی NICE ۶۹

۲-۲-۷. آنالیز پروتئین حاصل از قسمت‌های سلولی ۷۰

۲-۲-۸. آنالیز پروتئین از نمونه‌های بدون سلول(محیط) ۷۰

۲-۲-۹. انجام Dot blot به منظور بررسی نسبی تولید پروتئین هورمون رشد ۷۱

۲-۲-۹.۱. مواد لازم ۷۲

۲-۲-۹.۲. روش تهیه‌ی محلول‌ها ۷۲

فسفات بافر سالین (PBS 10X) ۷۲

مواد لازم ۷۳

محلول Blocking ۷۳

محلول شستشو ۷۳

محلول آنتی‌بادی اولیه و ثانویه ۷۴

معرف ECL ۷۴

۲-۲-۹.۳. روش انجام Dot blot برای بررسی میزان تولید rhGH ۷۵

۲-۲-۱۰. تعیین غلظت هورمون رشد نوترکیب تولید شده به روش ELISA ۷۶

۲-۲-۱۰.۱. مواد لازم ۷۶

۲-۲-۱۰.۲. روش کار ۷۶

۲-۲-۱۱. تعیین وزن مولکولی rhGH تولید شده به کمک روش SDS-PAGE و وسترن بلات ۷۸

عنوان **صفحه**

۲-۲-۱۱.۱. مواد لازم ۷۸

۲-۲-۱۱.۲. روش تهیه‌ی محلول‌ها ۷۹

محلول ذخیره آکریل آمید و بیس آکریل آمید ۴۰٪ ۷۹

محلول ذخیره SDS ۱۰٪ ۸۰

محلول ۱۰٪ آمونیوم پرسولفات (APS) ۸۰

بافر Running 10X ۸۰

بافر Stacking 10 X ۸۰

تانک بافر 10 X ۸۰

بافر انتقال 10 X ۸۱

بافر 2X SDS gel loading ۸۱

محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو ۸۲

محلول رنگ بر کوماسی بلو ۸۲

۲-۲-۱۱.۳. روش انجام Western blot ۸۳

۲-۲-۱۱.۴. روش رنگ آمیزی کوماسی بلو ۸۵

۲-۲-۱۱.۵. روش انتقال به کاغذ نیتروسلولز یا Blotting ۸۶

فصل سوم: نتایج

۳-۱- نتایج بخش کلون سازی ۸۹

۳-۱-۱. فعال کردن باکتری *Lactococcus lactis* ۸۹

۳-۱-۲. شناسایی اولیه‌ی سویه *L. lactis* جهت تأیید سویه مورد نظر ۹۰

عنوان **صفحه**

واکنش رنگ‌آمیزی گرم ۹۰

آزمایش کاتالاز ۹۰

کشت باکتری در محیط الیکر با قندهای مختلف ۹۱

بررسی حذف ژن *lacF* از روی کروموزوم با PCR این ژن ۹۳

۳-۱-۳. تکثیر پلاسمید pNZ8149 توسط *L. lactis* ۹۳

۳-۱-۴. تکثیر توالی هورمون رشد انسانی به منظور خارج کردن آن از وکتور قبلی ۹۵

۳-۱-۵. استخراج محصول PCR از ژل ۹۷

۳-۱-۶. واکنش هضم دوگانه وکتور pNZ8149 ..... ۹۸

۳-۱-۷. واکنش آلکالین فسفاتاز برای وکتور pNZ8149 که هضم‌دوگانه‌شده ۹۸

۳-۱-۸. ترانسفورماسیون سویه *L. lactis* با وکتور نوترکیب به روش الکتروپوریشن ۹۹

۳-۲- نتایج بخش بیان ژن هورمون رشد انسانی نوترکیب ۱۰۲

۳-۲-۱. نتایج Dot blot ۱۰۲

۳-۲-۲. تعیین غلظت هورمون رشد نوترکیب تولید شده به روش ELISA ۱۰۲

۳-۳-۱. تعیین وزن مولکولی rhGH تولید شده به کمک روش SDS-PAGE و وسترن بلات ۱۰۴

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱- بحث ۱۰۶

۴-۱-۱. برتری استفاده از *لاکتوکوکوس* در مقایسه با *E. coli* و گرم منفی‌ها ۱۰۸

۴-۱-۲. برتری استفاده از القاء کننده نیسین در مقایسه با IPTG و مواد مشابه ۱۰۹

۴-۱-۳. برتری *لاکتوکوکوس* نسبت به سیستم کشت سلول برای تولید هورمون رشد ۱۱۰

عنوان **صفحه**

٤-١-٤. نتیجه گیری کلی ١١٠

پیشنهادات ١١٠

منابع ١٢٠

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱: شکل شماتیک از مسیر گلیکولیز در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس*..... ۱۱

شکل۱-۲: تصویر شماتیک از بیان ژن کنترل شده با نیسین..... ۱۵

شکل ۱-۳: نمایش شماتیک یک سیستم هدف‌گیری و بیان پروتئین ۱۸

شکل ۱-۴: نمایش شماتیک ترشح پروتئین هترولوگ در *L. lactis*..... ۱۹

شکل ۱-۵: نمایش شماتیک خوشه ژنی نیسین ۲۳

شکل ۱-۶ :نمایش شماتیک نیسین بالغ..... ۲۴

شکل۱-۷: نمایش شماتیک مکانیسم‌های فرض شده برای مقاومت به نیسین در *L. lactis* ۲۵

شکل ۲-۱: شکل شماتیک که نشان دهنده قسمتی از توالی پلاسمید pTrcHis TOPO است ۵۱

شکل۲-۲ : نقشه ژنی وکتور TA clone ۵۲

شکل۲-۳ : نقشه ژنی پلاسمید pNZ8149..... ۵۲

شکل ۲-۴ : محاسبه میزان وکتور و محصول PCR برای واکنش الحاق ۶۰

شکل۲-۵ . ترتیب قرارگیری ژل و کاغذ نیتروسلولز ۸۶

شکل ۲-۶: مراحل انجام وسترن بلات مستقیم..... ۸۸

شکل۳-۱: کشت سویه‌ی *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر روی محیط M17 ..... ۹۰

شکل۳-۲: لام رنگ آمیزی گرم از *L. lactis*..... ۹۰

شکل ۳-۳ : آزمایش کاتالاز بر روی لام..... ۹۰

شکل۳-۴: کشت *L. lactis* در محیط الیکرتجاری و محیط الیکر با لاکتوز به عنوان تنها منبع کربن..... ۹۱

عنوان **صفحه**

شکل۳-۵: مقایسه کشت سویه در محیط الیکر با لاکتوز به عنوان تنها منبع کربن و محیط الیکر با گلوکز به عنوان تنها منبع کربن..... ۹۲

شکل۳-۶: غربالگری کلنی‌های زرد بر روی محیط الیکر..... ۹۳

شکل ۳-۷ : استخراج پلاسمید از باکتری *L. lactis*..... ۹۴

شکل ۳-۸ : پاکسازی پلاسمید استخراج شده با کیت استخراج پلاسمید Vivantis..... ۹۴

شکل۳-۹: استخراج پلاسمید با کیت شرکت دنا زیست آسیا از باکتری *E. coli* Top10..... ۹۵

شکل۳-۱۰: واکنش هضم دوگانه روی وکتور TA clone به منظور خارج کردن قطعه ژنی..... ۹۵

شکل۳-۱۱: گرادیان دمایی برای انجام واکنش PCR و انتخاب دمای بهینه..... ۹۶

شکل ۳-۱۲: واکنشPCR برای تکثیر توالی هورمون رشد انسانی نوترکیب..... ۹۷

شکل ۳-۱۳: نوار قطعه ژنی بعد از استخراج از ژل..... ۹۷

شکل ۳-۱۴: نوار وکتور هضم شده پس از استخراج از ژل..... ۹۸

شکل ۳-۱۵: نوار وکتور pNZ8149 بعد از واکنش با آلکالین فسفاتاز و پاکسازی با کیت استخراج از ژل..... ۹۸

شکل۳- ۱۶ : غربال‌گری کلنی‌های ترانسفورم شده روی محیط الیکر..... ۹۹

شکل۳-۱۷: مقایسه تحرک الکتروفورزی پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های زرد انتخاب شده بر روی محیط الیکر..... ۱۰۰

شکل۳-۱۸: واکنش PCR برای تأیید وجود قطعه الحاق یافته در کلنی‌های زرد غربال شده می‌باشد..... ۱۰۰

شکل ۳-۱۹: هضم دوگانه وکتور نوترکیب و وکتور خالی با آنزیم‌های محدودالاثر و مقایسه نوار آنها بر روی ژل آگارز..... ۱۰۱

شکل ۳-۲۰ : نتیجه دات بلات..... ۱۰۲

شکل ۳-۲۱ : منحنی استاندارد رسم شده برای نمونه‌های کالیبراتور..... ۱۰۳

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۲۲ : تعیین غلظت rhGH تولید شده در سویه *L. lactis* ۱۰۳

شکل ۳-۲۳: نتایج وسترن بلات با فیلم x-ray ۱۰۴

شکل ۳-۲۵: نتیجه وسترن بلات بر روی کاغذ نیتروسلولز با کمک TMB نامحلول ۱۰۵