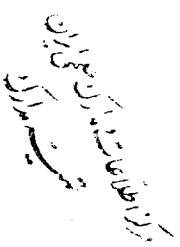
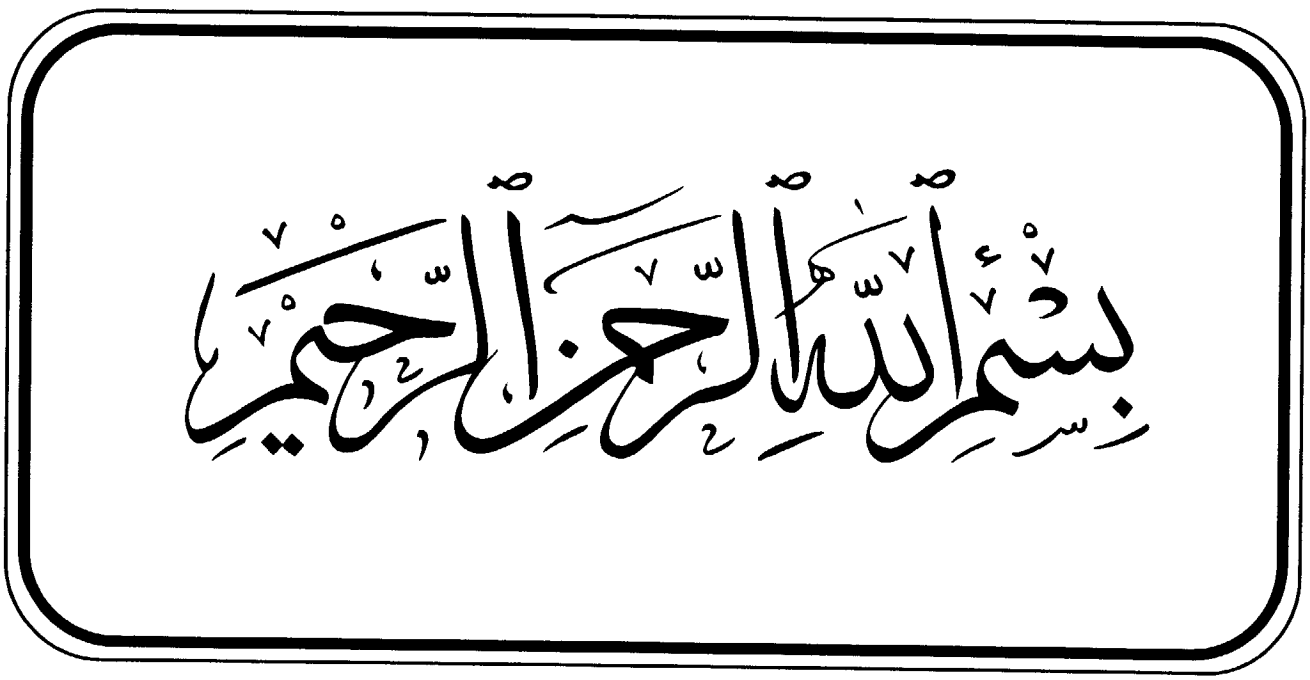
۱۳۸۰ /۱۱/ ۲۰





۳۹۴۶۱

دانشگاه تهران

دانشکده علوم

کلونینگ و بیان ژن هیبرید *hgm-csf::est* در *E.Coli*

نگارش

مهدی دشتبان

016276

اساتید راهنما

آقای دکتر باقر یخچالی

آقای دکتر اشرف الدین سخن سنج

استاد مشاور

آقای دکتر عبدالخالق دیزجی

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی علوم سلولی و مولکولی

تیر ۱۳۸۰

۳۹۴۶۱

« بسمه تعالی »

اداره تحصیلات تکمیلی دانشگاه

احتراماً باطلاع می‌رساند که جلسه دفاع از پایان‌نامه **دوره کارشناسی ارشد** آقای/خانم محمدمهدی رستیان

تحت عنوان : کلونینگ ریبوزوم hgm-csf::est در E.coli

در تاریخ ۸۰/۴/۶ در محل دانشکده علوم دانشگاه تهران برگزار گردید.

هیأت داوران براساس کیفیت پایان‌نامه، استماع دفاعیه و نحوهٔ پاسخ به سوالات، پایان‌نامه ایشان را برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم سلولی و مولکولی معادل با ۱۸ واحد با نمرهٔ ۱۹/۵۶ بادرجهٔ عالی مورد تأیید قرار دارد.

هیأت داوران

سمت	نام و نام خانوادگی	مرتبهٔ دانشگاهی-دانشگاه	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر باقر یمانی	استادیار	مرکز ژنتیک
۲- استاد راهنما	دکتر اثیرالدین کن ع	استادیار	دانشگاه تهران
۳- استاد مشاور	دکتر عبدالخالق دیزجی	استادیار	مرکز ژنتیک
۳- استاد مدعو	دکتر سید مهدی حسینی نژاد	استادیار	مرکز ژنتیک
۴- استاد مدعو	دکتر فریدون رستگار پور	استادیار	مرکز ژنتیک
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی گروه	دکتر طاهره مرادستاری	استادیار	دانشگاه تهران

سرپرست تحصیلات تکمیلی گروه

مدیر گروه

۸۰/۴/۲۰

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده

دانشکده علوم
آموزش تحصیلات تکمیلی ۲

۸۰/۴/۲۰

تقدیم به پدرم

آن روشن طلوع بی غروب، او که به من جرات پرواز در دشت های نا شناس هستی را آموخت.

تقدیم به مادرم

باغ مهربانی های معصومانه، او که بال های فرشته گونه اش را سایه راهم کرده و شمع راه زندگی من شده است.

تقدیم به همسرم

حجم سیال و بزرگ خوبی، انبساط عشق در مسیر پر سنگلاخ انسان شدن.

بر خود لازم میدانم مراتب سپاس و تشکر خود را از استاد ارجمندم آقای دکتر یخچالی که مصاحبت و کمک ایشان همواره راه گشای مشکلاتم بوده است ابراز دارم.

همچنین از آقای دکتر سخن سنج و آقای دکتر دیزجی به جهت راهنمایی و مشاوره این پایان نامه سپاسگزارم.

نمی توانم محبت دوستانم:
خانمها سرکار خانم دکتر خدابنده، شراره شجاعی، ندا واصلی، ژولیت رشیدیان، ترانه حاجیان، سریرا مقدسی، دینا مرشدی و مریم رحیمی و آقایان رامتین رهبر، رسول علیخانی، سعید انصاری،حسن سلیمی،محمد غضنفری و حسین شهبانی را فراموش کنم.

زحمات خانم میرقاسمی مسئول واحد عکسبرداری ومسئولین کتابخانه و سایر دوستانم در مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک را ارج می نهم.

خلاصه:

ساخت پروتئین‌های هیبرید دارای خواص جدید با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب یک پیشرفت جالب در بیولوژی مولکولی است. این ابزار برای مطالعات بنیادی زیست‌شناسی، ساخت واکسن، درمان سرطان و مطالعات زیست محیطی مورد توجه قرار گرفته است.

در برنامه‌های مطالعاتی تولید واکسن استفاده از ادجوانت مؤثر ضروری است و نشان داده شده که برخی از سایتوکین‌ها نظیر اینترلوکین - ۲ و GM-CSF وقتی که به آنتی ژنهای ضعیف متصل شوند یا همراه آنها در حیوان مصرف شوند پاسخ ایمنی را افزایش می‌دهند. بنابراین نتیجه‌گیری شده است که GM-CSF متصل شده به هاپتن‌های باکتریایی بطور مؤثری آنتی ژن را به سیستم ایمنی حمل کرده و فعالیت ادجوانتی از خود بروز داده و باعث افزایش ایمنی زایی آنتی ژن می‌شود.

بر پایه این فرضیه یک ژن هیبرید جدید حاوی ژن est اشرشیاکلی مولد آنتروتوکسین و hgm-csf برای القاء تولید آنتی‌بادی علیه سم ST ساخته شد. پروتئین هیبرید حاصل همچنین ممکن است خصوصیات دیگری داشته باشد که می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد. دو ژن از طریق یک لینکر ۸ اسید آمینه‌ای حاوی پرولین که احتمالاً تاب خوردگی مناسب پروتئین هیبرید را امکان‌پذیر می‌کند به یکدیگر متصل شوند. پروتئین هیبرید در پری پلاسم *E.coli* تولید شده و توسط Western blot و ELISA با استفاده از آنتی‌بادی علیه GM-CSF و ST تأیید شد.

پروتئین هیبرید از روی ژل اکریل آمید خالص سازی و به خرگوش

تزریق شد. پس از دو هفته سرم حیوان تهیه و از نظر وجود آنتی‌بادی بر علیه پروتئین هیبرید و دو جزء آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروتئین هیبرید می‌تواند تولید آنتی بادی علیه هر دو جزء تشکیل دهنده پروتئین هیبرید را القاء کند.

مطالعات و بررسی‌های بیشتر در مورد ویژگیها و خصوصیات هیبرید hGM-CSF::ST در in-vitro و in-vivo در حال انجام می‌باشد و به نظر می‌رسد که ایمنی زایی مولکولهای هاپتن نظیر ST می‌تواند از طریق اتصال به یک پروتئین حامل افزایش یافته و GM-CSF یک سیستم انتقال مناسب برای این مولکول باشد.

«فهرست مطالب»

عنوان | صفحه

● **بخش اول: مقدمه**

۱-۱- مقدمه‌ای بر بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک ۱

۱-۲- اصول بیوتکنولوژی مولکولی ۱

۱-۳- توسعه و تکامل بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک ۲

۱-۳-۱- کلون‌سازی (Cloning) ۲

۱-۳-۲- تکنولوژی DNA نوترکیب (Recombinant DNA Technology) ۲

۱-۳-۳- حامل‌های کلون‌سازی: (Cloning Vectors) ۳

۱-۳-۴- حامل‌های بیان‌کننده: (Expression Vectors) ۴

۱-۴- اتصالات ژنی و اتصالات پروتئینی (Gene Fusion and Fusion Protein) ۵

۱-۴-۱- جداسازی آسانتر محصولات ژنهای خاص ۶

۱-۴-۲- تولید و هدایت یک پروتئین به بخش خاصی از سلول ۶

۱-۴-۳- کاربرد درمانی پروتئین‌های متصل شده ۶

۱-۵- افزایش ایمنی هاپتن‌ها ۶

۱-۶- اشریشیاکلی و اسهال باکتریایی ۷

۱-۶-۱- سموم مقاوم به حرارت یا ST (Heat Stable Toxin) ۸

۱-۷- ایمونوتوکسین‌ها (Immunotoxins) ۹

۱-۷-۱- ساختمان و عملکرد توکسین ۱۲

۱-۷-۲- طراحی ایمونوتوکسین‌ها ۱۳

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران

عنوان | صفحه

۳-۷-۱- بیان ایمونوتوکسین‌ها ۱۳

۴-۷-۱- کاربردهای کلینیکی ایمونوتوکسین‌ها ۱۴

۸-۱- سایتوکاین‌ها ۱۶

۱-۸-۱- اعمال و ویژگی‌های سایتوکاین‌ها: ۱۶

۲-۸-۱- سایتوکاین‌های تحریک کننده عمل خونسازی ۱۷

۳-۸-۱- GM-CSF و اهمیت آن در خونسازی ۱۹

۴-۸-۱- کاربردهای GM -CSF ۲۲

۱-۴-۸-۱- کاربرد GM-CSF در درمان برخی از انواع سرطان ۲۲

۲-۴-۸-۱- کاربرد GM-CSF در ساخت ایمونوتوکسین‌ها ۲۳

۹-۱- ادجوانت ۲۴

۱۰-۱- روش‌های تولید GM-CSF نوترکیب ۲۶

۱۱-۱- هدف تحقیق ۲۷

● بخش دوم: مواد و روشها

۱-۲- مواد ۳۰

۱-۱-۲- مواد شیمیایی ۳۰

۲-۱-۲- آنتی‌بیوتیک‌ها ۳۰

۳-۱-۲- آنتی‌بادی‌ها ۳۱

۱-۳-۱-۲- آنتی‌بادی‌های اولیه ۳۱

۲-۳-۱-۲- آنتی‌بادی‌های ثانویه ۳۱

عنوان | صفحه

۴-۱-۲- باکتری‌ها ۳۱

۵-۱-۲- پلاسمیدها ۳۲

۶-۱-۲- آغازگرها (پرایمرها) ۳۳

۷-۱-۲- کیت‌های آزمایشگاهی ۳۳

۸-۱-۲- آنزیم‌ها ۳۳

۹-۱-۲- مارکرها ۳۴

۱۰-۱-۲- محلول‌ها ۳۴

۱-۱۰-۱-۲- محلول‌های لازم جهت استخراج پلاسمید (مقیاس کوچک) ۳۴

۲-۱۰-۱-۲- محلول‌های لازم برای الکتروفورز ۳۵

۱-۲-۱۰-۱-۲- محلول TBE ۳۵

۲-۲-۱۰-۱-۲- محلول TAE ۳۵

۳-۲-۱۰-۱-۲- محلول اتیدیوم بروماید ۳۵

۴-۲-۱۰-۱-۲- بافر لودینگ (Loading Buffer) ۳۶

۳-۱۰-۱-۲- محلول ذخیره (Isopropyl-B-D-Thiogalacto pyranoside):(IPTG) ۳۶

۴-۱۰-۱-۲- محلول ذخیره X-Gal ۳۶

۵-۱۰-۱-۲- بافر PCR ۳۶

۶-۱۰-۱-۲- محلولهای لازم جهت ژل SDS-PAGE ۳۷

۷-۱۰-۱-۲- محلول‌های لازم جهت رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری ژل SDS-PAGE ۳۸

۸-۱۰-۱-۲- محلول‌های لازم جهت وسترن بلاتینگ ۳۸

عنوان | صفحه

۹-۱۰-۱-۲- محلول جهت تهیه عصاره باکتری ۳۹

۱۱-۱-۲- محیط های کشت باکتری ۴۰

۱-۱۱-۱-۲- محیط کشت مایع LB (Luria- Bertani) ۴۰

۲-۱۱-۱-۲- محیط کشت جامد LBAgar ۴۰

۳-۱۱-۱-۲- محیط CFA آگار ۴۱

۴-۱۱-۱-۲- محیط نگهداری باکتری‌ها ۴۱

۲-۲- روش ها ۴۲

۱-۲-۲- کشت باکتری ۴۲

۲-۲-۲- استخراج DNA پلاسمیدی با روش شکستن قلیایی ۴۲

۳-۲-۲- تعیین غلظت DNA و خلوص آن ۴۴

۴-۲-۲- برش آنزیمی DNA توسط آنزیمهای برش دهنده (Restriction Enzymes) ۴۴

۱-۴-۲-۲- واکنش برش آنزیمی DNA با یک آنزیم ۴۵

۲-۴-۲-۲- واکنش برشی آنزیمی DNA با دو آنزیم ۴۵

۳-۴-۲-۲- غیرفعال کردن آنزیم ۴۵

۵-۲-۲- الکتروفورز مولکولهای DNA ۴۶

۱-۵-۲-۲- الکتروفورز ژل آگارز ۴۶

۲-۵-۲-۲- رنگ‌آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید ۴۶

۶-۲-۲- بازیافت قطعات DNA ۴۷

۱-۶-۲-۲- بازیافت قطعات DNA از ژل آگارز به روش فنل کلروفرم ۴۷

عنوان | صفحه

۱-۱-۶-۲-۲- متعادل کردن یا تنظیم PH فنل (Equilibration of Phenol) ... ۴۹

۲-۶-۲-۲- خالص سازی محصول PCR با کیت ۴۹

۷-۲-۲- تکثیر اختصاصی مولکول DNA ۵۰

۱-۷-۲-۲- واکنشهای زنجیری پلیمراز (Polymerase Chain Reaction, PCR) ۵۰

۲-۷-۲-۲- مواد و مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)..... ۵۱

۱-۲-۷-۲-۲- DNA الگو ۵۱

۲-۲-۷-۲-۲- داکسی نوکلئوتید سه فسفاته (dNTP)..... ۵۲

۳-۲-۷-۲-۲-کلرید منیزیم (MgCl2)..... ۵۲

۴-۲-۷-۲-۲- آنزیم Taq DNA Polymerase..... ۵۳

۵-۲-۷-۲-۲- پرایمرها (جلودارها)..... ۵۳

۶-۲-۷-۲-۲- دمای جفت شدن پرایمرها (Annealing Temperature or Ta) ۵۳

۷-۲-۷-۲-۲- بافر PCR..... ۵۴

۸-۲-۷-۲-۲- مراحل PCR..... ۵۴

۹-۲-۷-۲-۲- ترکیب واکنش PCR..... ۵۵

۸-۲-۲- اتصال قطعات DNA (DNA Ligation)..... ۵۵

۱-۸-۲-۲- دفسفوریلاسیون انتهاهای ۵ (Dephosphorylation)..... ۵۶

۲-۸-۲-۲- اتصال انتهاهای چسبنده (Ligation of cohesive termini)..... ۵۷

۳-۸-۲-۲- غیرفعال کردن آنزیم T4 DNA Ligase..... ۵۸

۹-۲-۲- تهیه باکتری‌های مستعد برای پذیرش DNA پلاسمیدی خارجی
(Competent Bacteria)..... ۵۸

عنوان | صفحه

۱-۹-۲-۲- سلول مستعد تازه ۵۸

۲-۹-۲-۲- سلول مستعد منجمد شده (Frozen)..... ۵۹

۱۰-۲-۲- انتقال پلاسمید به درون باکتری (Bacterial Transformation) ۵۹

۱۱-۲-۲- غربال کردن کلونهای واجد پلاسمیدهای نوترکیب (Screening) ۶۱

۱-۱۱-۲-۲- مقاومت کلون به آنتی‌بیوتیک..... ۶۱

۲-۱۱-۲-۲- استفاده از روش PCR ۶۱

۳-۱۱-۲-۲- استفاده از برش‌های آنزیمی..... ۶۲

۱۲-۲-۲- بررسی پروتئین‌ها..... ۶۲

۱-۱۲-۲-۲- الکتروفوز ژل پلی‌اکریل آمید..... ۶۲

۲-۱۲-۲-۲- تهیه ژل SDS-PAGE و الکتروفورز ۶۲

۳-۱۲-۲-۲- رنگ‌آمیزی ژل اکریل آمید باکوماسی بلو R -۲۵۰..... ۶۴

۱۳-۲-۲- تفکیک پروتئین‌های پری پلاسمی *E.Coli* از سایر پروتئین‌ها:..... ۶۴

۱۴-۲-۲- استخراج پروتئین هیبرید hCM-CSF::ST از ژل اکریل آمید..... ۶۶

۱۵-۲-۲- وسترن برای بلاتینگ (Western Blotting)..... ۶۷

۱۶-۲-۲- Dot Blotting ۶۹

۱۷-۲-۲- تولید آنتی بادی علیه پروتئین هیبرید hGM-CSF::ST..... ۶۹

۱-۱۷-۲-۲- بررسی وجود آنتی بادی علیه پروتئین هیبرید hGM-CSF::ST و تعیین تیتر تقریبی آن ۷۰

عنوان | صفحه

● **بخش سوم: نتایج**

۳-۱- مقدمه ۷۱

۳-۲- بررسی بیان ژن هیبرید *hgm-csf::est* در پلاسمید pBY17 ..... ۷۱

۳-۳- کلونینگ ژن *hgm-csf::est* در پلاسمید pKK 223-3 ..... ۷۲

۳-۳-۱- بیان سیتوپلاسمی ژن هیبرید *hgm-csf::est* در پلاسمید pDY18 تحت پروموتور tac ۷۴

۳-۴- کلونینگ و بیان پری پلاسمی ژن *hgm-csf::est* تحت پروموتور و توالی نشانه cstH ۷۵

۳-۵- کلونینگ و بیان پری پلاسمی ژن *hgm-csf::est* تحت پروموتور tac ۷۹

۳-۶- کلونینگ ژن هیبرید *hgm-csf::est* در پلاسمید pHEN4 ..... ۸۱

۳-۶-۱- بیان پری پلاسمی ژن *hgm-csf::est* در پلازمید pDY21 ..... ۸۳

۳-۷- تولید آنتی بادی علیه پروتئین هیبرید hGM-CSF::ST ۸۶

● **بخش چهارم: بحث**

● **بخش پنجم: منابع**