بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم دامی

پایان‌نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد (M.Sc.) در رشته
ژنتیک و اصلاح نژاد دام

کلون‌سازی و بیان ژن هورمون محرک فولیکولی اسبی (eFSH) در مخمر پیکیاپاستوریس

پژوهش و نگارش

زهرا الیاسی گرجی

اساتید راهنما

دکتر محمدحسین صنعتی

دکتر سعید حسنی

اساتید مشاور

دکتر حمید گورابی

امیر امیری یکتا

دکتر سعید زره‌داران

زمستان ۱۳۹۱

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد زیر متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان‌نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **زهرا الیاسی گرجی** دانشجوی رشته‌ی **ژنتیک و اصلاح نژاد دام** مقطع **کارشناسی‌ارشد**، تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

پروردگارا

من چیزی نمی‌بینم... آینده پنهان است.....!!!

ولی آسوده ام، چون تو را می‌بینم و تو همه چیز را....

تقدیم به:

پدر و مادر مهربانم

تقدیر و تشکر

راز و رمز پویایی علم و کشف معانی بدیع و تجلی جلوه های شهودی معرفت، کیمیایی است که آسمان علم به برکت سیما و سیره ی نورانی نبی مکرم صلی الله علیه و آله و سلم، انسان در بند خاک را به معراج حضور می خواند.

و چه خرم علمی که از چشمه ی معارف سیراب شود و چه زیبا دانشی که قبای پرنیانش به عطر و بوی گلستان محمدی معطر شود. و امروز کاخ آباد علم به سروش معنوی و مفهوم پیام او بیش از پیش محتاج راهنمایانی است که علاوه بر حفظ آبادانی آن در راه اعتلای آن به فرزندان خویش محبت نمایند.

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق» بسی شایسته است از اساتید راهنمای فرهیخته و فرزانه ی خود، آقایان **دکتر محمد حسین صنعتی** و **دکتر سعید حسنی** و اساتید مشاور ارجمند، آقایان **دکتر حمید گورابی**، **امیر امیری یکتا** و **دکتر سعید زره داران** و نیز اساتید داور محترم، آقایان **دکتر مجتبی آهنی آذری** و **دکتر یوسف جعفری آهنگری**، که با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و سرای علم و دانش را با راهنمایی های کارساز و سازنده بارور ساختند؛ تقدیر و تشکر نمایم.

بی شک نیل به اهداف مورد نظر در این تحقیق در سایه حمایت ها و همکاری های دلسوزانه **پژوهشگاه رویان تهران** و **دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان** میسر گردیده است.

در نهایت از همکاری خالصانه خانواده و دوستان گرانقدرم، خانم ها **زهرا منصوری**، **نجمه سادات مسعودی**، **شیدا احمدوند**، **نیره السادات فاطمی**، **شراره داودی**، **مریم مهدی پور**، **مناخوشبخت**، **زهرا داوری**، **مونا صالحی نسب**، **سپیده آرخی** و **فاطمه نیکویی** و آقایان **سعید شمسکی** و **حبیب الله طاشی** کمال تقدیر و تشکر را دارم.

چکیده

پروتئین FSH اسبی عضوی از خانواده هورمون‌های گلیکوپروتئینی می‌باشد که از غده هیپوفیز اسب ترشح می‌شود. ساختمان این هورمون از دو زیرواحد نامشابه α و β تشکیل شده‌است که با پیوندهای غیرکوالانسی به یکدیگر متصل شده‌اند. بطور کلی این هورمون نقش کلیدی در کنترل عملکرد سلول‌های جنسی مهره‌دارن ایفا می‌کند؛ که این فرآیند در ناباروری انسان و برنامه‌های اصلاح نژاد دام‌های اهلی دارای کاربردهای عملی می‌باشد. هدف از این مطالعه، کلون‌سازی زیرواحدهای این پروتئین در حامل بیانی pPIC-9 و سپس ترشح این هورمون با استفاده از سیستم بیانی مخمر *پیکیاپاستوریس* بوده‌است.

در این رابطه، پس از آنکه mRNA از غده هیپوفیز اسب نژاد توربرد ایرانی استخراج شد، برای سنتز cDNA استفاده گردید. هر یک از زیرواحدهای پروتئین FSH، با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی تکثیر یافتند و سپس بطور جداگانه در حامل pTZ57R.T کلون شدند. حامل‌های نوترکیب به درون سلول باکتری DH5α منتقل شدند. کلون‌سازی زیرواحدها با استفاده از آزمون‌های تاییدی نظیر واکنش هضم آنزیمی و تعیین توالی، تایید شد. در ادامه توالی‌های نوکلئوتیدی α و β از حامل باکتریایی خارج و سپس درون حامل بیانی pPIC-9 کلون شدند. دو سازه نوترکیب مجددا در میزبان باکتریایی DH5α تکثیر یافتند و سپس استخراج گردیدند. سازه نوترکیب pPIC-9/FSHα با استفاده از آنزیم برشی *SalI* و سازه نوترکیب pPIC-9/FSHβ با استفاده از آنزیم برشی *SacI* خطی شدند و بطور همزمان طی فرآیند الکتروپوریشن به درون ژنوم سلول مخمر *پیکیاپاستوریس* درج گردیدند. سلول‌های ناقل هر دو زیرواحد با کمک واکنش PCR بر روی ژنوم سلول مخمری تایید و مشخص گردیدند؛ و در محیط کشت بیانی BMMY حاوی متانول کشت داده شدند.

نتایج خوانش توالی نوکلئوتیدی زیرواحد FSHβ نشان داده‌است که در ناحیه 3´UTR هورمون مورد مطالعه نسبت به گزارشاتی که تاکنون ثبت شده‌است، چند تفاوت نوکلئوتیدی مشاهده می‌شود؛ این تفاوت‌ها شامل اضافه شدن سه نوکلئوتید در موقعیت ٤١٨-٤١٣ جفت باز و تغییر یک نوکلئوتید در موقعیت ٤٤٣ جفت باز می‌باشد.

در این مطالعه، بیان پروتئین نوترکیب FSH اسبی در سیستم ترشحی مخمر *پیکیاپاستوریس* با استفاده از آزمون‌های SDS-PAGE، وسترن‌بلاتینگ و رسوب‌دهی ایمنی تایید شد. این تحقیق نشان داده‌است که *پیکیاپاستوریس* سیستم مناسبی برای تولید پروتئین FSH اسبی می‌باشد و شناسایی پروتئین موردنظر با آنتی‌بادی اختصاصی نشان‌دهنده‌ی انجام اصلاحات پس‌ترجمه‌ای صحیح این پروتئین در این سیستم بیانی می‌باشد.

کلمات کلیدی: FSH، *پیکیاپاستوریس*، اسب، کلون‌سازی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- پیدایش صنعت پروتئین‌های نوترکیب ۲

۱-۳- هدف از اجرای طرح و ضرورت انجام آن ۳

۱-٤- اهداف تحقیق ۵

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- هورمون‌های گنادوتروپین ۸

۲-۱-۱- FSH ۱۰

۲-۱-۲- FSH اسبی ۱۱

۲-۱-۲-۱- زیرواحد FSHα اسبی ۱۱

۲-۱-۲-۲- زیرواحد βFSH اسبی ۱۲

۲-۱-۳- گیرنده FSH ۱۲

۲-۱-٤- عملکردهای فیزیولوژیکی FSH ۱۳

۲-۱-۵- تنظیم تولید و ترشح FSH ۱٤

۲-۱-٦- کاربرد بالینی FSH ۱۵

۲-۱-۷- انواع FSH ۱٦

۲-۱-۸- مقایسه FSH نوترکیب و ادراری ۱٦

۲-۲- میزبان‌های مورد استفاده در مهندسی ژنتیک برای تولید پروتئین نوترکیب ۱۷

۲-۲-۱- تاریخچه کاربرد مخمر در عرصه بیوتکنولوژی ۱۹

۲-۲-۲- مخمر *پیکیاپاستوریس* ۲۱

۲-۲-۲-۱- مزایای سیستم بیانی *پیکیاپاستووریس* ۲۲

۲-۲-۲-۲- ژنوتیپ‌های مختلف در *پیکیاپاستوریس* ۲۳

۲-۲-۲-۳- فنوتیپ‌های موجود در *پیکیاپاستوریس* ۲٤

۲-۲-۲-٤- حامل‌های مورد استفاده در مخمر *پیکیاپاستوریس* ۲۵

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۲-۲-۵- پروموترهای مورد استفاده در *پیکیاپاستوریس* ۲۷
۲-۲-۲-۶- مسیر پروموتر AOX در متابولیسم متانول در *پیکیاپاستوریس* ۲۸
۲-۲-۲-۷- توالی پیام ترشحی در *پیکیاپاستوریس* ۲۹
۲-۲-۲-۸- نشانگرهای انتخاب در *پیکیاپاستوریس* ۳۱
۲-۲-۲-۹- معرفی سازه ژنی به ژنوم مخمر *پیکیاپاستوریس* ۳۱
۲-۲-۲-۱۰- بیان پروتئین در *پیکیاپاستوریس* ۳۲
۲-۲-۲-۱۰-۱- بیان سیتوپلاسمی در مقایسه با بیان ترشحی در *پیکیاپاستوریس* ۳۳
۲-۲-۲-۱۱- مسیرشکل گیری پروتئین در *پیکیاپاستوریس* ۳۴
۲-۲-۲-۱۲- اصلاحات پس‌ترجمه‌ای پروتئین در مخمر *پیکیاپاستوریس* ۳۴
۲-۲-۲-۱۲-۱- الگوی گلیکوزیلاسیون در *پیکیاپاستوریس* ۳۵
۲-۲-۲-۱۳- کشت مخمر*پیکیاپاستوریس* ۳۶
۲-۲-۲-۱۴- عوامل موثر بر روی کشت مخمر *پیکیاپاستوریس* ۳۶
۲-۲-۲-۱۴-۱- ظرف کشت ۳۶
۲-۲-۲-۱۴-۲- اجزای محیط کشت مخمر پیکیاپاستوریس ۳۷
۲-۲-۲-۱۴-۳- دمای محیط کشت ۳۷
۲-۲-۲-۱۴-۴- کنترل اسیدیته ۳۸
۲-۲-۲-۱۴-۵- کنترل اکسیژن محلول و القای متانول ۳۸
۲-۲-۲-۱۴-۶- غلظت سلولی مخمر پیکیاپاستوریس ۳۸
۲-۲-۲-۱۴-۷- غلظت متانول در محیط کشت مخمر پیکیاپاستوریس ۳۹
۲-۲-۲-۱۴-۸- مدت زمان القا ۳۹
۲-۲-۲-۱۵- ترشح پروتئین در مخمر *پیکیاپاستوریس* ۳۹
۲-۲-۲-۱۶- شناسایی محصول نوترکیب ترشح شده در محیط کشت مخمر ۴۰
۲-۳- مروری بر مطالعات انجام شده در گذشته ۴۰

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- پژوهشگاه رویان ٤٨

۳-۱-۱- فعالیت‌های پژوهشگاه رویان ٤٨

۳-۲- طراحی توالی آغازگر ٤٩

۳-۳- تهیه بافت هیپوفیز اسب ٥١

۳-۳-۱- استخراج RNA از بافت هیپوفیز قدامی اسب ٥١

۳-۳-۲- حذف آلودگی DNA از RNA استخراج شده ٥٣

۳-۳-۳- بررسی کیفیت RNA خالص شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ٥٣

۳-۳-٤- سنتز cDNA ٥٤

۳-۳-٤-۱- واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای GAPDH ٥٥

۳-۳-٥- واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای زیرواحدهای FSH اسبی ٥٦

۳-۳-٥-۱- واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای زیرواحد FSHα اسبی ٥٦

۳-۳-٥-۲- واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای زیرواحد FSHβ اسبی ٥٧

۳-٤- همسانه‌سازی در میزبان باکتریایی ٥٨

۳-٤-۱- ساخت محیط کشت لوریا برتانی (LB) ٥٩

۳-٤-۲- ساخت آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین ٦٠

۳-٤-۳- تهیه سلول مستعد باکتریایی ٦٠

۳-٤-٤- همسانه‌سازی زیرواحدهای ژن FSH اسبی در حامل pTZ57R.T ٦١

۳-٤-٤-۱- فرآیند اتصال زیرواحدهای ژن FSH اسبی به حامل ژنی pTZ57R.T ٦١

۳-٤-٤-۲- ترانسفورماسیون حامل نوترکیب pTZ57R.T/FSHα, β به میزبان باکتریایی ٦٢

۳-٤-٤-۳- رشد باکتری‌های دارای حامل نوترکیب pTZ57R.T در محیط کشت انتخابی LB ٦٤

۳-٤-٤-۳-۱- دستورالعمل ساخت IPTG ٦٤

۳-٤-٤-۳-۲- دستورالعمل ساخت X-gal ٦٤

۳-٤-٥- آزمون‌های تایید و غربال گری باکتری‌های ناقل pTZ57R.T/FSHα, β ٦٥

۳-٤-٥-۱- واکنش کلنی PCR بر روی باکتری‌های ناقل pTZ57R.T/ FSHα, β ٦٥

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-٤-٥-۲- استخراج حامل‌های نوترکیب pTZ57R.T از باکتری‌های رشد یافته ٦٥
۳-٤-٥-۳- برش آنزیمی حامل‌های نوترکیب pTZ57R.T/FSHα, β ٦٨
۳-٤-٥-٤- ذخیره‌سازی کلنی‌های ناقل حامل نوترکیب pTZ57R.T/FSHα, β ٦٩
۳-٤-٥-٥- بررسی حامل‌های pTZ57R.T/FSHα, β با تکنیک خوانش نوکلئوتیدی ٦٩
۳-٤-٦- جداسازی زیرواحدهای FSH اسبی از حامل pTZ57R.T/FSHα, β ۷۰
۳-٤-٦-۱- کشت مایع از کلنی‌های تاییدشده ناقل حامل pTZ57R.T/FSHα, β ۷۰
۳-٤-٦-۲- استخراج حامل‌های pTZ57R.T/FSHα, β در مقیاس انبوه ۷۰
۳-٤-٦-۳- برش آنزیمی حامل‌های ژنی pTZ57R.T/FSHα, β در مقیاس انبوه ۷۰
۳-٤-٦-٤- جداسازی هر یک از زیرواحدهای ژن FSH اسبی از سایر قطعات ژنی با روش خالص‌سازی از ژل آگارز ۷۰
۳-٤-۷- آماده سازی حامل بیانی pPIC-9 ..... ۷۲
۳-٤-۷-۱- استخراج حامل بیانی pPIC-9 ذخیره شده در باکتری ۷۲
۳-٤-۷-۲- هضم آنزیمی حامل بیانی pPIC-9 با استفاده از آنزیم طراحی شده ۷۲
۳-٤-۷-۳- خالص سازی حامل بیانی pPIC-9 ..... ۷۳
۳-٤-۸- همسانه سازی زیرواحدهای FSH اسبی در حامل بیانی pPIC-9 ..... ۷۳
۳-٤-۸-۱- فرآیند اتصال زیرواحدهای FSH اسبی به حامل بیانی pPIC-9 ..... ۷۳
۳-٤-۸-۲- ترانسفورماسیون حامل‌های pPIC-9/ FSHα, β در باکتری DH5α ۷٤
۳-٤-۹- آزمون‌های تایید و غربال‌گری کلنی‌های ناقل حامل نوترکیب pPIC-9 ..... ۷٥
۳-٤-۹-۱- واکنش کلنی PCR بر روی باکتری‌های ناقل حامل نوترکیب pPIC-9 ..... ۷٥
۳-٤-۹-۲- استخراج حامل بیانی نوترکیب pPIC-9 از باکتری‌های رشد یافته ۷٥
۳-٤-۹-۳- برش آنزیمی حامل بیانی نوترکیب pPIC-9 استخراج شده از باکتری ۷٥
۳-٤-۹-٤- ذخیره‌سازی باکتری‌های تایید شده ناقل pPIC-9/FSHα, β ۷٦
۳-٤-۹-٥- بررسی حامل‌های نوترکیب pPIC-9 با تکنیک خوانش نوکلئوتیدی ۷٦
۳-٤-۱۰- آماده‌سازی سازه نوترکیب pPIC-9 برای انتقال به ژنوم مخمر ۷٦
۳-٤-۱۰-۱- انتخاب کلنی و استخراج سازه‌های نوترکیب pPIC-9/FSHα, β ۷٦

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-٤-۱۰-۲- خطی‌نمودن سازه نوترکیب pPIC-9/FSHα, β از جایگاه خاص ۷٦
۳-٤-۱۰-۳- خالص‌سازی سازه‌های نوترکیب pPIC-9/FSHα, β ۷۷
۳-۵- همسانه سازی سازه‌های نوترکیب در میزبان مخمری ۷۸
۳-۵-۱- تهیه محیط‌های کشت مخمر *پیکیاپاستوریس* ۷۸
۳-۵-۱-۱- محیط کشت YEPD ۷۸
۳-۵-۱-۲- محیط کشت MD ۷۹
۳-۵-۱-۳- محیط کشت BMGY ۷۹
۳-۵-۲- تهیه ذخیره سلولی مخمر *پیکیاپاستوریس* در محیط کشت YEPD ۸۰
۳-۵-۳- آماده‌سازی سلول مخمری و انجام عمل الکتروپوریشن ۸۱
۳-۵-٤- کشت کلنی‌های مخمر *پیکیاپاستوریس* در محیط کشت YEPD ۸۲
۳-۵-۵- استخراج DNA از مخمرهای *پیکیاپاستوریس* رشد یافته ۸۲
۳-۵-٦- واکنش PCR تاییدی با استفاده از آغازگرهای AOX ۸٤
۳-۵-۷- کشت و ذخیره کلنی‌های مخمری نوترکیب تایید شده ۸۵
۳-۵-۸- کشت کلنی‌های نوترکیب *پیکیاپاستوریس* در محیط کشت BMGY ۸۵
۳-۵-۹- کشت کلنی‌های نوترکیب *پیکیاپاستوریس* در محیط کشت BMMY ۸۵
۳-۵-۱۰- نمونه‌گیری از محیط کشت مخمر *پیکیاپاستوریس* در زمان‌های معین ۸٦
۳-۵-۱۱- شناسایی پروتئین ترشح شده در محیط کشت بیانی مخمر *پیکیاپاستوریس* ۸٦
۳-۵-۱۱-۱- سفارش آنتی بادی اختصاصی ژن FSH اسبی ۸٦
۳-۵-۱۱-۲- شناسایی پروتئین FSH اسبی با روش SDS-PAGE ۸۷
۳-۵-۱۱-۳- رنگ آمیزی ژل SDS-PAGE ۸۹
۳-۵-۱۱-٤- شناسایی پروتئین با روش وسترن‌بلاتینگ ۹۰
۳-۵-۱۱-۵- شناسایی پروتئین با روش IP ۹۳

فصل چهارم: نتایج

٤-۱- جداسازی بافت هیپوفیز قدامی اسب و استخراج RNA از آن ۹٦

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

٤-٢- تایید سنتز cDNA ٩٧
٤-٣- تایید تکثیر زیرواحدهای αFSH ,β اسبی در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ٩٧
٤-٤- نتایج تایید ساخت سازه نوترکیب pTZ57R.T/FSHα, β. ٩٨
٤-٤-١- نتایج واکنش کلنی PCR بر روی باکتری‌های ناقل pTZ57R.T/FSHα, β ٩٨
٤-٤-٢- نتایج استخراج هر یک از حامل‌های نوترکیب pTZ57R.T/FSHα, β ٩٩
٤-٤-٣- نتایج برش آنزیمی هر یک از حامل‌های نوترکیب pTZ57R.T/FSHα, β ١٠٠
٤-٤-٤. نتایج تعیین توالی هر یک از حامل‌های نوترکیب pTZ57R.T/FSHα,β ١٠٠
٤-٥- نتایج خارج سازی هر یک از زیرواحدهای FSH اسبی از حامل نوترکیب pTZ57R.T، با روش خالص‌سازی از ژل ١٠٦
٤-٦- نتایج استخراج، برش آنزیمی و خالص‌سازی حامل بیانی pPIC-9 ..... ١٠٧
٤-٧- نتایج تایید ساخت سازه نوترکیب pPIC9 /FSHα, β ١٠٨
٤-٧-١- نتایج واکنش کلنی PCR بر روی باکتری‌های ناقل هریک از زیرواحدهای FSH اسبی در حامل pPIC9 ..... ١٠٨
٤-٧-٢- نتایج استخراج هر یک از حامل‌های نوترکیب pPIC-9/FSHα, β ١٠٩
٤-٧-٣- نتایج برش آنزیمی هر یک از سازه‌های نوترکیب pPIC-9/FSHα, β ١١٠
٤-٧-٤- نتایج تعیین توالی هر یک از حامل‌های نوترکیب pPIC-9/FSHα, β ١١٠
٤-٨- نتیجه خطی نمودن سازه نوترکیب بیانی pPIC-9/FSHα, β ١١٣
٤-٩- تایید درج سازه‌های نوترکیب بیانی pPIC-9/FSHα, β در ژنوم مخمر *پیکیاپاستوریس* ١١٤
٤-١٠- شناسایی پروتئین نوترکیب FSH اسبی از محیط کشت مخمر *پیکیاپاستوریس* ١١٥
٤-١٠-١- شناسایی هر یک از زیرواحدهای پروتئین FSH اسبی از محیط‌کشت مخمر نوترکیب *پیکیاپاستوریس* با روش SDS-PAGE ١١٥
٤-١٠-٢- شناسایی هر یک از زیرواحدهای پروتئین FSH اسبی از محیط‌کشت مخمر نوترکیب *پیکیاپاستوریس* با روش وسترن‌بلاتینگ ١١٥
٤-١٠-٣- شناسایی هریک از زیرواحدهای پروتئین FSH اسبی از محیط‌کشت مخمر نوترکیب *پیکیاپاستوریس* با روش IP ١١٧

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل پنجم: بحث

۵-۱- بحث ۱۲۰

۵-۲- نتیجه‌گیری کلی ۱۲۹

۵-۳- پیشنهادات ۱۳۰

۵-۳-۱- بهینه سازی شرایط کشت ۱۳۰

۵-۲-۲- بهینه‌سازی سازه‌های نوترکیب ۱۳۱

۵-۲-۳- بهینه‌سازی روش‌های شناسایی و خالص‌سازی پروتئین ۱۳۱

فهرست منابع ۱۳٤

ضمائم ۱٤۹

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- تقسیم‌بندی مخمر براساس مصرف متانول ۲۰
جدول ۳-۱- توالی نوکلئوتیدی زیرواحدهای α و β در FSH اسبی ٤۹
جدول ۳-۲- مشخصات آغازگرهای رفت و برگشت زیرواحدهای FSHαβ اسبی ۵۱
جدول ۳-۳- ترکیب سازنده بافرTAE۵۰X ۵٤
جدول ۳-٤- مواد مورد نیاز در ادامه سنتز cDNA ۵۵
جدول ۳-۵- مواد مورد نیاز در واکنش PCR مربوط به آغازگرهای GAPDH ۵٦
جدول ۳-٦- برنامه دمایی تنظیم شده برای آغازگرهای GAPDH ۵٦
جدول ۳-۷- مواد مورد نیاز در واکنش PCR زیرواحد αFSH ۵۷
جدول ۳-۸- برنامه دمایی در واکنش PCR زیرواحد αFSH ۵۷
جدول ۳-۹- مواد مورد نیاز در واکنش PCR زیرواحد βFSH ۵۸
جدول ۳-۱۰- برنامه دمایی در واکنش PCR زیرواحد βFSH ۵۸
جدول ۳-۱۱- اجزای محیط کشت LB باکتری ۵۹
جدول ۳-۱۲- دستورالعمل اتصال زیرواحد αFSH اسبی به حامل ژنی pTZ57R.T ٦۲
جدول ۳-۱۳- دستورالعمل اتصال زیرواحد βFSH اسبی به حامل ژنی pTZ57R.T ٦۲
جدول ۳-۱٤- اجزای محلول شماره یک برای استخراج DNA حلقوی نوترکیب به روش دستی ٦۷
جدول ۳-۱۵- اجزای محلول شماره دو برای استخراج DNA حلقوی نوترکیب به روش دستی ٦۷
جدول ۳-۱٦- اجزای محلول شماره سه برای استخراج DNA حلقوی نوترکیب به روش دستی ٦۷
جدول ۳-۱۷- شرایط واکنش هضم آنزیمی مربوط به حامل نوترکیب pTZ57R.T/FSHα ٦۸
جدول ۳-۱۸- شرایط واکنش هضم آنزیمی مربوط به حامل نوترکیب pTZ57R.T/FSHβ ٦۸
جدول ۳-۱۹- شرایط واکنش هضم آنزیمی مربوط حامل بیانی pPIC-9 ..... ۷۳
جدول ۳-۲۰- دستورالعمل اتصال زیرواحد FSHα اسبی به حامل ژنی pPIC-9 ..... ۷٤
جدول ۳-۲۱- دستورالعمل اتصال زیرواحد FSHβ اسبی به حامل ژنی pPIC-9 ..... ۷٤
جدول ۳-۲۲- شرایط هضم آنزیمی حامل نوترکیب βαFSH , /pPIC-9 ..... ۷۵
جدول ۳-۲۳- شرایط واکنش خطی نمودن حامل نوترکیب α pPIC-9/FSH ۷۷
جدول ۳-۲٤- شرایط واکنش خطی نمودن حامل نوترکیب β pPIC-9/FSH ۷۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۲۵- اجزای تشکیل‌دهنده‌ی محیط کشت YEPD به حجم یک لیتر ۷۸
جدول ۳-۲۶- اجزای تشکیل دهنده محیط کشت MD جامد به حجم یک لیتر ۷۹
جدول ۳-۲۷- اجزای محیط کشت BMGY ۸۰
جدول ۳-۲۸- مواد مورد نیاز واکنش PCR مربوط به آغازگرهای پروموتر AOX ۸۴
جدول ۳-۲۹- برنامه دمایی در واکنش PCR مربوط به آغازگرهای پروموتر AOX ۸۵
جدول ۳-۳۰- آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در شناسایی زیرواحدهای FSH اسبی ۸۷
جدول ۳-۳۱- دستورالعمل ساخت بافر نمونه ۱X (pH=۶/۸) ۸۸
جدول ۳-۳۲- مواد مورد نیاز جهت ساخت ژل جداکننده پلی‌اکریل‌آمید ۸۸
جدول ۳-۳۳- مواد مورد نیاز جهت ساخت ژل متمرکزکننده پلی‌اکریل‌آمید ۸۹
جدول ۳-۳۴- مواد مورد نیاز برای ساخت بافر بارگذاری (۱۰ x) ۸۹
جدول ۳-۳۵- مواد مورد نیاز برای ساخت محلول رنگ‌آمیزی ۸۹
جدول ۳-۳۶- اجزای مورد استفاده برای محلول رنگ‌بری ۳۶
جدول ۳-۳۷ - دستورالعمل ساخت بافر انتقال ۹۱
جدول ۳-۳۸- دستورالعمل ساخت محلول شستشو ۹۱
جدول ۳-۳۹- دستورالعمل ساخت محلول بلوکه‌کننده ۹۱
جدول۳-۴۰- شرایط وسترن‌بلاتینگ زنجیره FSHα اسبی ۹۲
جدول ۳-۴۱- شرایط وسترن‌بلاتینگ زنجیره FSHβ اسبی ۹۲
جدول ۳-۴۲- مواد مورد نیاز مرحله ظهور ۹۳
جدول ۴-۱- غلظت، جذب نوری و میزان خلوص RNA استخراج شده از هیپوفیز قدامی اسب ۹۶

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- ساختار کامل پروتئینی FSH اسبی ۱۱
شکل ۲-۲- جایگاه اتصال الیگوساکاریدها بر روی توالی اسیدآمینه‌ای زیرواحد FSHα اسبی..... ۱۱
شکل ۲-۳- جایگاه اتصال الیگوساکاریدها بر روی توالی اسید آمینه‌ای زیرواحد FSHβ اسبی ۱۲
شکل ۲-٤- حامل‌های رایج در *پیکیاپاستوریس* ۲٦
شکل ۲-٥- مسیر استفاده از متانول در *پیکیاپاستوریس* ۲۹
شکل ۲-٦- انواع ظروف کشت مخمر ۳۷
شکل ٤-۱- تایید استخراج mRNA از بافت هیپوفیز اسب ۹٦
شکل ٤-۲- تایید ساخت cDNA در واکنش RT-PCR، با الکتروفورز ژل آگارز یک درصد..... ۹۷
شکل ٤-۳- نتایج تکثیر زیرواحدهای αFSH و βFSH اسبی با الکتروفورز ژل آگارز یک درصد ۹۸
شکل ٤-٤- نتایج واکنش کلنی PCR بر روی باکتری‌های ناقل pTZ57R.T/FSHα, ... ۹۹
شکل ٤-٥- نتایج استخراج حامل‌های نوترکیب pTZ57R.T/FSHα, β، از باکتری‌های رشدیافته ۹۹
شکل ٤-٦- نتایج واکنش برش آنزیمی حامل‌های نوترکیب pTZ57R.T/FSHα, β..... ۱۰۰
شکل ٤-۷- نتیجه تعیین توالی حامل نوترکیب pTZ57R.T/FSHα به شکل خوانش Fasta..... ۱۰۲
شکل ٤-۸- بخشی از نمودار خوانش حامل نوترکیب pTZ57R.T/FSHα با نرم‌افزار Finch..... ۱۰۳
شکل ٤-۹- نتیجه تعیین‌توالی حامل نوترکیب pTZ57R.T/FSHβ به شکل خوانش Fasta..... ۱۰٤
شکل ٤-۱۰- بخشی از نمودار خوانش حامل نوترکیب pTZ57R.T/FSHβ با نرم افزار Finch..... ۱۰٥
شکل ٤-۱۱- مقایسه توالی زیرواحد FSHβ اسبی با توالی NCBI و Ensembl ۱۰٦
شکل ٤-۱۲- نتایج خارج‌سازی زیرواحدهای FSHα, β اسبی با روش خالص‌سازی از ژل ۱۰۷
شکل ٤-۱۳- نتایج استخراج، خطی‌نمودن و خالص‌سازی حامل بیانی pPIC-9..... ۱۰۸
شکل ٤-۱٤- نتایج واکنش کلنی PCR بر روی باکتری‌های ناقل pPIC-9/FSHα, β..... ۱۰۹
شکل ٤-۱٥- نتایج استخراج سازه نوترکیب pPIC-9/FSHα, β از باکتری..... ۱۰۹
شکل ٤-۱٦- نتایج واکنش هضم آنزیمی سازه نوترکیب بیانی pPIC-9/FSHα, β..... ۱۱۰
شکل ٤-۱۷- نتیجه خوانش نوکلئوتیدی سازه نوترکیب pPIC-9/FSHα با نرم افزار Finch..... ۱۱۱
شکل ٤-۱۸- نتیجه خوانش نوکلئوتیدی سازه نوترکیب pPIC-9/FSHβ با نرم‌افزار Finch..... ۱۱۲
شکل ٤-۱۹- نتایج استخراج، خطی‌نمودن و خالص‌سازی سازه‌های نوترکیب بیانی pPIC-9/FSHα, β.. ۱۱۳

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ٤-٢٠- اجزای تشکیل‌دهنده هر یک از سازه‌های نوترکیب pPIC-9/FSHα, β خطی‌شده ١١٣
شکل ٤-٢١- واکنش PCR بر روی ژنوم *پیکیاپاستوریس* ناقل سازه نوترکیبpPIC-9/FSHα, β..... ١١٤
شکل ٤-٢٢- شناسایی پروتئین FSH اسبی با روش SDS-PAGE در ژل ١٥ درصد پلی‌اکریل‌آمید..... ١١٥
شکل٤-٢٣- شناسایی پروتئین FSHα اسبی با روش وسترن‌بلاتینگ ١١٦
شکل ٤-٢٤- شناسایی پروتئینFSHβ اسبی با روش وسترن‌بلاتینگ ١١٦
شکل ٤-٢٥- نتیجه واکنش IP با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی زیرواحد βFSH اسبی ١١٧

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

در طول چند دهه گذشته ژنتیک‌دانان برای تولید داروهای مناسب جهت درمان بیماری‌های مختلف، به فن‌آوری‌های دستکاری DNA، در موجودات زنده روی آوردند. از آنجایی که امروزه پروتئین‌ها در صنعت داروسازی ارزش تجاری بالایی بدست آورده‌اند، مطالعات بسیاری به‌منظور تولید کافی و موثر آنها به‌شکل نوترکیب انجام شده‌است (مکآلی پاتریک و همکاران، ۲۰۰۵).

۱-۲- پیدایش صنعت پروتئین‌های نوترکیب

پروتئین‌ها گروهی از درشت‌ملکول‌های سلول‌های زنده می‌باشند و بعد از آب بیشترین ترکیب سازنده‌ی سلول‌ها را شامل می‌شوند. هر سلول برای ایفای یک نقش خاص باید پروتئین ویژه‌ای تولید نماید. برای مثال مقادیر بالایی از پروتئین‌های خاص به نام هورمون توسط سلول‌های غدد درون‌ریز تولید می‌گردد و به بخش‌های مختلف بدن منتقل می‌شود تا سلول‌های هدف را برای انجام نقش‌های متفاوت تحریک سازد (هولز، ۱۹۹٦).

منابع طبیعی پروتئین‌ها اغلب محدود می‌باشند؛ به‌عبارت دیگر غلظت آنها در واحد حجم پایین و استخراج آنها کاری بسیار پرهزینه و با خطرآلودگی و عفونت همراه می‌باشد. لذا فرآوری میزان بالای پروتئین از موجودات مهندس ژنتیک‌شده می‌تواند جایگزین مناسبی برای منابع طبیعی آنها باشد (ماتانوویچ و همکاران، ۲۰۱۲).

با ظهور کلونینگ ملکولی و فن‌آوری DNA نوترکیب (شامل مهندسی ژنتیک، مهندسی پروتئین و مهندسی سوخت و ساز) در سال ۱۹۷۰، تولید دامنه وسیعی از پروتئین‌ها در میزبان‌های جدید ممکن گردید. در سال ۱۹۸۲ انسولین به عنوان اولین محصول نوترکیب وارد بازار جهانی شد و پس از آن پروتئین‌های دیگری نظیر اینترفرون‌ها، اریتروپویتین‌ها، واکسن‌ها و به تازگی آنتی‌بادی‌ها، در حال ساخت می‌باشند (ماتانوویچ و همکاران، ۲۰۱۲).

امروزه تولید پروتئین نوترکیب به یک تجارت چند بیلیون دلاری تبدیل شده‌است. فروش جهانی پروتئین‌های دارویی نوترکیب در سال ۲۰۰۸ نزدیک به ۸۷ بیلیون دلار بوده و پیش‌بینی می‌شود این عدد به ۱٦۹ بیلیون دلار در سال ۲۰۱٤ برسد (ماتانوویچ و همکاران، ۲۰۱۲).