دانشکده مهندسی شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی

کشت غیر مداوم با تراکم سلولی بالا برای تولید فاکتور رشد اپیدرمی انسانی نوترکیب در باکتری *اشریشیاکلای* و بررسی فرایند خالص سازی محصول

سید بابک موسوی

استاد راهنما

دکتر سید عباس شجاع الساداتی

استاد مشاور

دکتر رسول خلیل زاده

شهریور ۱۳۹۱

بسم الله الرحمن الرحیم

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه

آقای **سید بابک موسوی** پایان نامه ٦ واحدی خود را با **عنوان فرایند نیمه پیوسته کشت با تراکم سلولی بالا برای تولید فاکتور رشد اپیدرمی انسانی نوترکیب از باکتری اشریشیاکلی و بررسی فرایند خالص سازی محصول** در تاریخ ۱۳۹۱/٦/۲٦ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی پیشنهاد می کنند.

عضو هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضا
استاد راهنما	دکتر سید عباس شجاع الساداتی	استاد	
استاد مشاور	دکتر رسول خلیل زاده	استادیار	
استاد ناظر	دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی	استادیار	
استاد ناظر	دکتر محمدرضا فاضلی	استاد	
مدیر گروه (یا نماینده گروه تخصصی)	دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی	استادیار	

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته مهندسی شیمی است که در سال ۱۳۹۱ در دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر سید عباس شجاع الساداتی ، مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر رسول خلیل‌زاده و مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده رابه عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواندخسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده‌نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب سید بابک موسوی دانشجوی رشته مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی مقطع فوق لیسانس

تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: سید بابک موسوی

تاریخ و امضاء ۱۳۹۱/۸/۱۲

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمي دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنايت به سياست‌هاي پژوهشي دانشگاه در راستاي تحقق عدالت و كرامت انسانها كه لازمه شكوفايي علمي و فني است و رعايت حقوق مادي و معنوي دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضاي هيات علمي، دانشجويان، دانش آموختگان و ديگر همكاران طرح، در مورد نتايج پژوهشهاي علمي كه تحت عناوين پايان‌نامه، رساله و طرحهاي تحقيقاتي كه با هماهنگي دانشگاه انجام شده است، موارد ذيل را رعايت نمايند:

ماده ۱- حقوق مادي و معنوي پايان نامه‌ها / رساله‌هاي مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداري از آن بايد با ذكر نام دانشگاه و رعايت آيين‌نامه‌ها و دستورالعمل‌هاي مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله يا مقالات مستخرج از پايان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشريات علمي و يا ارائه در مجامع علمي بايد به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مكاتبات مقاله باشد.

تبصره: در مقالاتي كه پس از دانش آموختگي بصورت تركيبي از اطلاعات جديد و نتايج حاصل از پايان‌نامه/ رساله نيز منتشر مي‌شود نيز بايد نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار كتاب حاصل از نتايج پايان نامه / رساله و تمامي طرحهاي تحقيقاتي دانشگاه بايد با مجوز كتبي صادره از طريق حوزه پژوهشي دانشگاه و بر اساس آئين نامه هاي مصوب انجام مي‌شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوين دانش فني و يا ارائه در جشنواره‌هاي ملي، منطقه‌اي و بين‌المللي كه حاصل نتايج مستخرج از پايان نامه/ رساله و تمامي طرح‌هاي تحقيقاتي دانشگاه بايد با هماهنگي استاد راهنما يا مجري طرح از طريق حوزه پژوهشي دانشگاه انجام گيرد.

ماده ۵- اين دستورالعمل در ۵ ماده و يك تبصره در تاريخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شوراي پژوهشي دانشگاه به تصويب رسيده و از تاريخ تصويب لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد اين دستورالعمل، از طريق مراجع قانوني قابل پيگيري مي شود.

نام و نام خانوادگي

امضاء

تقدیم به پدر بزرگوار و مادر مهربانم

آن دو فرشته ای که از خواسته هایشان گذشتند، سختی ها را به جان خریدند و خود را ســپر بلای مشکلات و ناملایمات کردند تا من به جایگاهی که اکنون در آن ایستاده ام برسم.

تشکر و قدردانی

بر خود لازم می دانم از خانواده ی عالی قدرم که همیشه همراه و مشوقم بوده اند و از اساتید گرانقدرم که در طول این دوره، از دانش ایشان بهره مند شده ام تقدیر و تشکر کنم. از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر سید عباس شجاع الساداتی که با دلگرمی ها و تشویق هایشان همواره راهنما و چراغ راه من بوده‌اند، کمال تشکر را دارم. همچنین از جناب آقای دکتر رسول خلیل زاده که مشاوره پایان نامه را بر عهده داشتند تقدیر و تشکر می کنم.

در پایان از سرکار خانم فاطمه تیموری، دکتر سپیده حامدی، دکتر لادن رشیدی و دوستان عزیزم، آقای سعید سلالی، آقای مهدی نبوی منش و سایر دوستان و هم آزمایشگاهی هایم که در مراحل مختلف انجام پایان نامه مرا یاری کرده اند تشکر می کنم.

امید خدا را که این پایان نامه مورد قبول خداوند متعال و جامعه علمی قرار گیرد و توانسته باشم وظیفه خود را به عنوان یک دانشجو انجام داده باشم.

چکیده

فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (*hEGF*) یک پلی پپتیدی ۵۳ آمینو اسیدی با وزن مولکولی ۶/۲ کیلو دالتون است. این فاکتور رشد به دلیل قابلیت تحریک رشد سلول های پوستی کاربرد گسترده ای در درمان زخم های پوستی پیدا کرده و کاربرد آن به عنوان افزودنی در لوازم آرایشی روز به روز در حال افزایش است. در این پژوهش از کشت غیر مداوم با تراکم سلولی بالای باکتری *اشریشیاکلای* نوترکیب برای تولید فاکتور رشد اپیدرمی انسانی به صورت درون سلولی استفاده شد. در کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی، در مدت زمان ۲۲ ساعت وزن خشک سلولی ۳۱ گرم بر لیتر به دست آمد. فاکتور رشد اپیدرمی انسانی به شکل توده های پروتئینی نامحلول از باکتری نوترکیب *اشریشیاکلای* نوترکیب جدا شده سپس.توده های پروتئینی نامحلول در بافر تریس حاوی ۲ مولار اوره با *pH* قلیایی و بافر تریس حاوی اوره ۸ مولار، حل شده و خالص سازی آن با استفاده از اولترافیلتراسیون با غشاهای سلولز تری استات با برش حذفی ۵، ۱۰ و ۲۰ کیلو دالتون بررسی شد. در نهایت برای خالص سازی بیشتر نمونه محلول پروتئینی به دست آمده از مرحله اولترا فیلتراسیون، از کروماتوگرافی صافی ژل استفاده شد.

واژه های کلیدی: فاکتور رشد اپیدرمی انسانی نوترکیب، کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی، کشت با تراکم سلولی بالا، اولترافیلتراسیون، کروماتوگرافی صافی ژل

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول مقدمه ۱

فصل دوم مفاهیم بنیادی و مروری بر پژوهش های پیشین..... ۶

۲-۱ فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۷

۲-۱-۱ سازو کار فعالیت فاکتور رشداپیدرمی ۱۱

۲-۱-۲ سابقه تولید و خالص سازی فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۱۳

۲-۲ تولید پروتئین های نوترکیب ۲۰

۲-۲-۱ باکتری *اشریشیاکلای* ۲۳

۲-۲-۳ عوامل مهم در تولید پروتئین های نو ترکیب ۲۵

۲-۲-۴ کشت با تراکم سلولی بالا..... ۲۸

۲-۲-۴-۱ راهبرد های خوراک دهی ۳۰

۲-۳ خالص سازی پروتئین نوترکیب از توده های پروتئینی نا محلول ۳۲

۲-۳-۱ جداسازی توده های پروتئینی، حل کردن و خالص سازی..... ۳۷

۲-۳-۱-۱ از هم گسستن سلول ها..... ۳۸

۲-۳-۱-۱-۱ آسیاب گلوله ای ۳۸

۲-۳-۱-۲ روش فرا آوایی ۳۸

۲-۳-۱-۳ همگن کننده فشار بالا ۳۹

۲-۳-۱-۴ روش شیمیایی ۳۹

۲-۳-۲ حل کردن توده های پروتئینی ۴۰

۲-۳-۳ خالص سازی پروتئین نوترکیب با اولترا فیلتراسیون ۴۲

۲-۳-۴ خالص سازی با استفاده از کروماتوگرافی..... ۴۷

۲-۳-۵ باز تاخوردگی ۴۹

فصل سوم مواد و روش ها ۵۲

۳-۱ مواد شیمیایی و زیست شیمیایی ۵۳

۳-۲ دستگاه ها و تجهیزات ۵۵

۳-۳ میزبان، پلاسمید و ژن ۵۵

۳-۴ محیط کشت ۵۵

۳-۵ تهیه بانک سلولی ۵۶

۳-۶ کشت غیر مداوم با القای خودکار در محیط کشت حاوی لاکتوز ۵۷

۳-۷ کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی و القا با لاکتوز ۵۷

۳-۸ گسستن دیواره سلولی ۵۸

۳-۹ شست و شوی توده های پروتئینی ۵۹

۳-۱۰ حل کردن توده های پروتئینی ۵۹

۳-۱۲ جداسازی پروتئین نوترکیب با اولترافیلتراسیون ۶۰

۳-۱۳ خالص سازی نهایی با استفاده از کروماتوگرافی صافی ژل ۶۱

۳-۱۴ سنجش نتایج مراحل مختلف خالص‌سازی ۶۳

۳-۱۴-۱ محلول های مورد نیاز برای آزمایش الکتروفورز ۶۴

۳-۱۴-۲ طرز تهیه ژل ۶۶

۳-۱۴-۳ روش انجام الکتروفورز ۶۷

۳-۱۴-۴ رنگ آمیزی ژل ۶۷

۳-۱۴-۵ نکات ایمنی ۶۸

۳-۱۵ اندازه گیری توده سلولی ۶۸

۳-۱۶ اندازه گیری غلظت کل پروتئین (روش برادفورد) ۶۹

فصل چهارم نتایج و بحث ۷۱

۴-۱ بررسی بیان پروتئین نوترکیب در کشت غیر مداوم با القای خودکار ۷۲

۴-۲ کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی و بیان با القا به وسیله لاکتوز ۷۴
۴-۳ اندازه گیری غلظت کل پروتئین ۷۷
۴-۴ گسستن دیواره سلولی و شستشوی توده های پروتئینی ۷۸
۴-۵ حل کردن توده های پروتئینی ۷۹
۴-۷ خالص سازی به وسیله اولترا فیلتراسیون ۸۱
۴-۸ خالص سازی نهایی با استفاده از کروماتوگرافی صافی ژل ۸۸
فصل پنجم نتیجه گیری و پیشنهادها ۸۹
۵-۱ نتیجه گیری ۹۰
۵-۲ پیشنهاد ها ۹۱
مراجع ۹۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲- ۱ برخی از فاکتورهای رشد با کابرد های درمانی مهم. ۸

جدول ۲- ۲ پارامتر های کلیدی برای انتخاب سامانه های بیانی بخصوص ۲۲

جدول ۲- ۳ مزیت ها ومعایب تولید پروتئین در قسمت های مختلف باکتری اشریشیاکلای ۲۴

جدول ۲- ۴ روش های ساده و معمول خوراک دهی در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی ۳۱

جدول ۲- ۵ روش های خالص سازی پروتئین ۳۳

جدول ۲- ۶ خواص پروتئین و تاثر آنها روی توسعه روش های خالص سازی ۳۴

جدول ۲- ۷ مزایا و معایب پروتئین های به صورت توده های نامحلول درون سلولی ۳۶

جدول ۲- ۸ خواص پروتئین که روش خالص سازی با کروماتوگرافی را تعیین می کنند ۴۸

جدول ۲- ۹. مقایسه روش های معمول برای باز تاخوردگی تودهای های پروتئینی نامحلول ۴۹

جدول ۳- ۱ مواد مورد استفاده در مرحله تولید پروتئین ۵۳

جدول ۳- ۲ مواد مورد استفاده در مرحله خالص سازی و تحلیل ۵۴

جدول ۳- ۳ دستگاه ها و لوازم استفاده شده برای پژوهش ۵۵

جدول ۳- ۴ ترکیبات ژل های جدا کننده و متراکم کننده در آزمایش الکتروفورز ۶۵

جدول۴- ۱ تاثیر pH و غلظت نمک در خالص سازی به وسیله اولترا فیلتراسیون ۸۳

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۲- ۱. نحوه عمل فاکتور رشد اپیدرمی ۱۲

شکل ۲- ۲. راهبرد های تولید پروتئین نوترکیب در *اشریشیاکلای* ۳۵

شکل ۲- ۳. مراحل خالص سازی توده های پروتئینی..... ۳۷

شکل۳- ۱ مراحل فشرده سازی ژل سفادکس در ستون کروماتوگرافی با استفاده از آداپتور ۶۲

شکل ۴- ۱. نتیجه آزمایش ژل*SDS-PAGE* ٪ ۱۵ برای نمونه های حاصل از بیان پروتئین در..... ۷۳

شکل ۴- ۲. نتیجه آزمایش ژل*SDS-PAGE* ٪ ۱۵ برای مقایسه نمونه های بیان پروتئین نوترکیب در ۷۴.

شکل ۴- ۳ سنتیک رشد در کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی ۷۵

شکل ۴- ۴. نتیجه آزمایش ژل*SDS-PAGE* ٪ ۱۵ برای نمونه های بیان پروتئین در ساعت های..... ۷۶

شکل ۴- ۵ بررسی مقدار پروتئین تولید شده ۵ ساعت پس از القا در کشت غیر مداوم همراه با ۷۶

شکل ۴- ۶ بررسی توده های پروتئین حل شده در اوره ۸ مولار – پیکان نشان دهنده قله مربوط به ۷۷

شکل ۴- ۷ منحنی استاندارد برای اندازه گیری غلظت پروتئین به روش بردفورد..... ۷۸

شکل ۴- ۸. نتیجه آزمایش ژل *SDS-PAGE* ٪ ۱۵ نمونه های مربوط به مراحل کافت سلولی و ۷۹

شکل ۴- ۹ . نتیجه آزمایش ژل *SDS-PAGE* ٪ ۱۵ نمونه های حاصل از حل کردن توده های ۸۰

شکل ۴- ۱۰. نتیجه آزمایش ژل *SDS-PAGE* ٪ ۱۵ برای بررسی تاثیر *pH* و غلظت نمک در ۸۴

شکل ۴- ۱۱ تحلیل نوار پروتئینی مربوط به فاکتور رشد اپیدرمی رد شده از غشاء در ۸۶

شکل ۴- ۱۲ نتیجه آزمایش ژل*SDS-PAGE* ٪ ۱۵ نمونه های خالص شده با غشاهای با ۸۷

شکل ۴- ۱۳ بررسی خالص سازی محلول پروتئین با اولترا فیلتر ۸۷

شکل ۴- ۱۴ کروماتوگرام حاصل از خالص سازی محلول پروتئینی به دست آمده از مرحله ۸۸

فصل اول

مقدمه

مقدمه

از اوایل دهه ۱۹۰۰، پروتئین ها به عنوان مهم ترین مواد درمانی مطرح شده انـد، در آن زمـان عمده ترین منابع در دسترس برای استخراج پروتئین ها گیاهان و جانوران بودند. با ظهور فنـاوری *DNA* نوترکیب در دهه ۱۹۷۰، پی برده شده که پروتئین های نوترکیب درمـانی را مـی تـوان بـه شیوه ای اقتصادی و با بازدهی بالا با استفاده از باکتری *اشریشیاکلای* تولیـد کـرد. در اوایـل دهـه ۱۹۸۰، *FDA* نخستین داروی پروتئینی نوترکیب (انسولین انسانی نوترکیب) تولید شده درباکتری *اشریشیاکلای* نوترکیب *را* برای درمان دیابت تایید کـرد، سـپس راه بـرای توسـعه سـایر داروهـای نوترکیب باز شد. از آن زمان به بعد، علاوه بر *اشریشـیاکلای*، میزبـان هـای بیـانی مختلـف، ماننـد مخمر، قارچ های رشته ای، سلول های حشرات و سـلول هـای پسـتانداران بـرای تولیـد داروهـای نوترکیب مختلف و یا پیچیده تر مانند پادتن مونوکلونال مورد اسـتفاده قـرار مـی گیرنـد. در حـال حاضر بیش از ۱۵۱ داروی نوترکیب منحصر به فرد توسط *FDA* و یـا آژانـس اروپـایی دارو[1] بـرای درمان بیماری های مختلف مورد تایید قرار گرفته است. یک سوم از این پروتئین های درمـانی در *اشریشیاکلای* تولید شده اند، که این امر قابلیـت بـالای *اشریشـیاکلای* بـرای تولیـدپروتئین هـای نوترکیب درمانی را نشان می دهد [۱].

پژوهشگران با بهره گیری از روش ها و فنون مختلف تـلاش هـای زیـادی را بـه منظـور تولیـد پروتئین های نوترکیب در *اشریشیاکلای* (به عنوان بهترین میزبان تولید فراورده هـای نوترکیـب)

1. European Medicines Agency

انجام داده اند تا بتوانند محصول مورد نظر را در کم ترین زمان و با صرف کم تـرین هزینـه تولیـد نمایند. پژوهش هایی که در این رابطه روی *اشریشیاکلای* انجام می شود، بیشتر فراهم کردن یـک راهبرد مناسب برای دستیابی به کشت با تراکم سلولی بالا[1] و قابلیت بیان بیشینه است. چرا که بـه دلیل انباشت درون سلولی بیشتر پروتئین های نوترکیب در *اشریشیاکلای*، قابلیت تولید متناسب با تراکم سلولی نهایی است. بهینه سازی شرایط القا به دلیل اثر گذاری قابل توجه روی افزایش تراکم سلولی بعد از القا و بازدهی تولید پروتئین نوترکیب به عنوان یک رویکرد اساسی در افزایش تولیـد پروتئین های نوترکیب همواره مورد توجه بوده است. تنظیم بیـان ژن نوترکیـب بـا مقـدار القـاگر، ترکیب محیط کشت در طی مدت القا، زمان و طول مدت القا، دمای القـا و اسـتفاده از لاکتـوز بـه جای القاگر سمی $IPTG$[2] از جمله راهبرد هایی است که برای بهینه سازی شرایط القا استفاده می شود[۲].

نیاز به بهبود و گسترش روش های خالص سازی پروتئین های نوترکیب در طی سال های اخیر بسیار افزایش یافته است، زیرا تولید پروتئین های نوترکیـب بـرای اسـتفاده دارویـی، تشخیصـی و استفاده در پژوهش ها، به شدت در حال توسعه هستند [۳]. پیشرفت فنون و روش هـا ی خـالص سازی پروتئین ها، پیش نیاز ضروری برای بسیاری از پیشرفت های زیست فنـاوری اسـت. خـالص سازی پروتئین ها از روش یک مرحله ای ساده ته نشینی تـا فرآینـدهای تولیـدی مقیـاس بـزرگ تغییر می کند. غالباً بیش از یک مرحله برای رسیدن به خلوص مورد نظر لازم است. برای خـالص سازی موفق و مؤثر پروتئین ها، باید مناسب ترین فنون انتخاب شده، عملکرد آنها مطابق با نیازهـا بهینه سازی شده و به یک روش منطقی ترکیب شوند، به طوریکه بازده به حداکثر و تعداد مراحـل مورد نیاز به حداقل برسد [۴].

1. *High Cell Density Cultivation*
2. *Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside (IPTG)*

در شرایط مطلوب، هدف دست یابی به محصول با کیفیت بالا همـراه بـا سـرعت و بـازده زیـاد استخراج و حداقل سرمایه گذاری برای تجهیزات و هزینه های عملیاتی است. البته در عمل، دست یابی به تمامی این خواسته ها امکـان پـذیر نیسـت. هزینـه هـای بـاز تـاخوردگی مولکـول هـا در محصولات پروتئینی زیاد بوده و ۱۵ تا ۷۰ درصد هزینه های تولید محصول را شامل می شود [۴]. با استفاده از یک روش ویژه برای حل کردن توده های پروتئینی نامحلول[1] که تمایل پروتئین ها را برای تجمع کاهش دهد و به دنبال آن استفاده از یک روش پیشرفته برای باز تاخوردگی پـروتئین منجر به افزایش بازده در بازیابی پروتئین نوترکیب فعال از توده های پروتئینی نامحلول خواهد شد [۵]. فرایند ایده آل برای جداسازی زیستی پروتئین باید بهره وری و انتخاب پذیری بالایی داشته و در شرایط عملیاتی ملایم قابل اجرا باشد. همه این خصوصیات با اولترافیلتراسیون که یـک فراینـد جداسازی مبتنی برغشاء با نیروی محرکه فشار است، بـرآورده مـی شـود [۶]. مزیـت قابـل توجـه استفاده از اولترافیلتراسیون توان بالای تولید محصول است، که در فرآیندهای زیستی جذاب است. علاوه بر این، بسیار ارزان تر از سایر روش های جداسازی و خالص سازی مانند کروماتوگرافی است و به کارگیری و افزایش مقیاس آن آسان است [۷].

فاکتور رشد اپیدرمی انسانی[2] (*hEGF*) یک پلی پپتید کوچک ۵۳ آمینو اسیدی با وزن مولکولی ۶۲۰۰ دالتون است. فاکتور رشد اپیدرمی باعث تحریک رشد پوست و سایر بافت های پوششی می شود و به این ترتیب دارای قابلیت بسیار بالایی به عنوان یک عامل در درمان زخم ها است. اثـرات احیا کننده آن بر زخم چشمی که در عمل جراحی پیوند قرنیه ایجاد می شود، زخم هـای پوسـتی مثل سوختگی و پیوند پوست و سایر زخم ها از اهمیت خاص بالینی برخوردار است. در سال هـای اخیر کاربرد های آن به عنوان افزودنی در لوازم آرایشی افزایش یافتـه اسـت [۸]. ایـن ویژگـی هـا ضرورت افزایش مقیاس تولید و خالص سازی فاکتور رشد اپیدرمی انسانی با کیفیـت بـالا را نشـان می دهد. جداسازی فاکتور رشد اپیدرمی انسانی از منابع طبیعی و از طریق سنتز آمینو اسـیدی از

1 . Inclusion Body
2. Human Epithermal Growth Factor (hEGF)

لحاظ اقتصادی قابل توجیه نیست [۹]. عموماً غلظت فاکتور رشد اپیدرمی انسانی در مواد طبیعی،که معمولاً ترکیبات پیچیده ای را با گیرنده هایش تشکیل می دهد، کمتر از یک میکرو گرم در لیتر است، بنابراین جداسازی و خالص سازی آن از منابع طبیعی پرهزینه و زمان بر و میزان تولید خیلی پایین است. با توسعه فناوری مهندسی ژنتیک، روشی مؤثر برای تولید فاکتور رشد اپیدرمی انسانی به وجود آمده است [۱۰].

فاکتور رشد اپیدرمی انسانی نخستین بار از ادرار انسان به وسیله گروه استارکی [۱] و کوهن [۲] جداسازی شد. با این حال جداسازی و خالص سازی مقدار کافی فاکتور رشد اپیدرمی انسانی کار دشواری است، زیرا خواص (نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی و غیره) پروتئین های ناهمگن زیادی در منابع تولید فاکتور رشد اپیدرمی انسانی با خواص فاکتور رشد اپیدرمی انسانی شبیه هستند که جداسازی آن را مشکل می کنند. فرآیند خالص سازی فاکتور رشد اپیدرمی انسانی معمولاً شامل ۳ تا ۶ عملیات واحد مختلف شامل دیالیز،کروماتوگرافی تبادل یونی، کروماتوگرافی تمایلی، کروماتوگرافی صافی ژل، کروماتوگرافی فاز معکوس و غیره است [۱۱].

هدف اصلی در این پژوهش افزایش تولید فاکتور رشد اپیدرمی انسانی در کشت تراکم سلولی بالای باکتری *اشریشیاکلای* و سپس خالص سازی آن با یک روش ساده و اقتصادی با استفاده از اولترافیلتراسیون و به دنبال آن خالص سازی نهایی با استفاده از کروماتوگرافی صافی ژل است.

پروژه حاضر در چهار فصل شامل: مقدمه، مفاهیم بنیادی و مروری بر پژوهش های پیشین، مواد و روش ها و نتایج و بحث ارائه می شود.

1. Starkey
2. Cohen

فصل دوم

مفاهیم بنیادی و مروری بر پژوهش های پیشین

۲-۱ فاکتور رشد اپیدرمی انسانی

فاکتور رشد اصطلاحی است که برای توصیف محدوده وسیعی از پروتئین های منحصر به فرد و از لحاظ ساختاری متفاوت به کار می رود. فاکتورهای رشد باعث افزایش تکثیر و رشد سلول ها می شوند و یک سری خواص مشهور دارند که عبارتند از تنظیم مورفوژنسی[۱] بافت، ایجاد رگ های خونی جدید و تقسیم سلولی. فاکتورهای رشد همچنین نقش مهمی در خود نگه داری و پایداری بافت و التیام زخم دارند. فعالیت فاکتورهای رشد با اتصال به گیرنده های تراغشایی که اغلب شامل تایروزین کیناز[۲] سیتوپلاسمی هستند شروع می شود. در حالت غیر کنترل شده اکثر فاکتورهای رشد و گیرنده هایشان باعث ایجاد تومور می شوند[۱۲]. فاکتورهای رشد به خاطر توانایی در تحریک رشد و تکثیر سلول و برای بسیاری از فرایندها شامل: تسریع میتوژن و تمایز سلول های اپیدرمی و سلول های میان آگنه ای[۳]، شناخته می شوند. اعضای خانواده فاکتور رشد حداقل یک شکل ساختاری مشترک دارند. در ساختار مولکولی این پروتئین ها شش مولکول سیستئین وجود دارد که تشکیل سه پیوند دی سولفیدی می دهند. اعضای گروه شامل: فاکتور رشد اپیدرمی، بتا سلولین[۴]، آمفی رگولین[۵]، نیورگولین[۶] و ۱۸پروتئین دیگر است، که به واسطه گیرنده تیروزین کیناز[۷] *EGF-R* یا*ErbB* فعال می شوند [۱۳].

1. Morphogenesis
2. Tyrosine Kinase
3. Mesenchymal
4. Betacellulin
5. Amphiregulin
6. Neuregulin
7. Tirosin Kinase