بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه پیام نور

دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان پایان نامه:

بررسی بیان پروتئین اینترفرون آلفا2b در سیستم بیانی باکتری اشرشیاکلی

نگارش:

نهضت عبدالرسولی

استاید راهنما:

دکتر حمید رجبی معماری دکتر محمد رعایایی اردکانی

استاد مشاور:

دکتر محمد علی ابراهیمی

آذرماه ۱۳۸۹

چکیده

اینترفرون‌ها وسیله دفاعی بدن علیه ویروس‌ها می‌باشند که به سرعت در بدن تولید شده، سلولهای اطراف را به تولید پروتئین‌هائی که تکثیر ویروس را مهار، یا پاسخ ایمنی و رشد سلولی را کنترل می‌کنند، تحریک می‌کنند. در این پژوهش، ژن اینترفرون آلفا۲b پس از تکثیر با آغازگرهای اختصاصی در ناقل بیانی pET-26b(+) تحت کنترل پروموتور T7 و پپتید نشانه پریپلاسمی pelB و با استفاده از آنزیم های برشی NcoI و XhoI کلون گردید. سازه تهیه شده به باکتری اشرشیاکلی سویه BL21(DE3) منتقل گردید. همسانه‌سازی ژن اینترفرون آلفا در ناقل بیانی pET-26b(+) با استفاده از Colony PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی، تأیید شد. سپس بیان ژن اینترفرون آلفا با استفاده از آنالیز بلات نقطه‌ای در زمانهای مختلف پس از القاء با IPTG موردبررسی قرار گرفت. همچنین امکان هدایت پروتئین اینترفرون آلفای تولیدشده به فضای پریپلاسمی باکتری، ۱۵ ساعت پس از القاء موردبررسی قرار گرفت. با استفاده از این روش مشخص شد که اینترفرون آلفا۲b در سیستم بیانی باکتری تولید شده و وارد فضای پریپلاسمی باکتری شده است.

کلید واژه ها: اینترفرون آلفا۲b،(+)pET-26b، اشرشیاکلی، IPTG

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه و هدف	۱
۱-۱- مقدمه	۲
۱-۲- هدف	٤
فصل دوم: مروری بر منابع موجود	٥
۲-۱- تعریف بیوتکنولوژی	٦
۲-۱-۱- پروتئین های نوترکیب به عنوان.....	٦
۲-۲- باکتری اشرشیاکلی	٦
۲-۲-۱- نقش باکتری اشرشیاکلی در بیوتکنولوژی	۷
۲-۲-۲- سویه های مناسب اشرشیاکلی به عنوان...	۸
۲-۲-۲-۱- باکتری اشرشیاکلی سویه BL21	۸
۲-۲-۳- ویژگی های سیستم های بیانی	۹
۲-۲-۳-۱- ویژگی های ناقلین مناسب اشرشیاکلی....	۱۰
۲-۲-۳-۲- سیستم بیانی pET	۱۱
۲-۲-۳-۳- عوامل لازم برای انتخاب یک ناقل	۱۲
۲-۲-٤- فرایند تولید پروتئین نوترکیب	۱۲
۲-۲-٤-۱- مکان بیان پروتئین نوترکیب	۱٤
۲-۲-٤-۲- بیان پریپلاسمی	۱٦
۲-۲-٤-۳- نقش چپرونین ها و فولدازها	۱۷
۲-۳- اینترفرون‌ها	۱۹
۲-۳-۱- تاریخچه ی کشف اینترفرون‌ها	۱۹
۲-۳-۲- انواع طبقه بندی اینترفرون‌ها	۲۳
۲-۳-۳- تولید سلولی اینترفرون‌ها	۲٤
۲-۳-٤- فعالیت و نقش اینترفرون‌ها	۲٥
۲-۳-٥- عملکرد اینترفرون‌ها از دیدگاه مولکولی	۲۷
۲-۳-٦- القاء اینترفرون‌ها	۲۷

۲-۳-۷- پیام رسانی سلولی اینترفرون‌ها ۲۷
۲-۳-۸- مقاومت ویروسها به اینترفرون‌ها ۲۸
۲-۳-۹- کاربردهای درمانی اینترفرون‌ها ۲۹
۲-٤- مروری بر پژوهش‌های انجام شده ۳۱
فصل سوم: مواد و روش‌ها ۳۷
۳-۱- سال و محل انجام تحقیق ۳۵
۳-۲- مواد شیمیایی ۳۵
۳-۳- باکتری‌ها ۳۵
۳-٤- آغازگرها ۳۵
۳-۵ – ناقل‌ها ۳٦
۳-٦- آنتی بیوتیک‌ها ۳٦
۳-٦-۱- کانامایسین ۳٦
۳-۸- محیط‌های کشت ۳۷
۳-۸-۱- محیط‌کشت باکتریایی LB ۳۷
۳-۸-۲- تهیه استوک از کشت باکتری ... ۳۷
۳-۸-۳- محیط گزینشگر ۳۷
۳-۹- استخراج توالی ژن اینترفرون α2b از بانک ژن ۳۸
۳-۱۰- الکتروفورز ژل آگارز ۳۸
۳-۱۰-۱- تهیه بافر TBE ۳۹
۳-۱۰-۲- تهیه ژل آگارز ۱٪ ۳۹
۳-۱۰-۳- تهیه محلول رنگ ژل رد ۳۹
۳-۱۰-٤- تهیه بافر نمونه‌گذاری ٤۰
۳-۱۱- تکثیر به روش PCR ٤۱
۳-۱۱-۱- شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR ۴۱
۳-۱۲- خالص سازی قطعات DNA از ژل ٤۲
۳-۱۳- استخراج پلاسمید ٤۲
۳-۱۳-۱- استخراج پلاسمید به روش Mini- Preparation ٤۳
۳-۱٤- هضم آنزیمی ناقل و محصول PCR ٤٤

۳-۱٤-۱- هضم آنزیمی ناقل بیانی pET-26b ٤٤
۳-۱٤-۲- هضم آنزیمی محصول PCR ٤٦
۳-۱۵- اتصال و انتقال قطعه ژن بریده شده در ناقل ٤٧
۳-۱۵-۱- واکنش اتصال ٤٧
۳-۱۵-۲- ترانسفورماسیون ناقل حامل ژن به باکتری اشرشیاکلی ٤٨
۳-۱۵-۲-۱- تهیه سلول‌های مستعد اشرشیاکلی ٤٨
۳-۱۵-۲-۲- ترانسفورماسیون ناقل نوترکیب به اشرشیاکلی ٤٩
۳-۱٦- غربال گری همسانه‌ها از لحاظ وجود پلاسمید دارای ژن ۵۰
۳-۱٦-۱- استخراج پلاسمید ۵۰
۳-۱٦-۲- Colony PCR ۵۰
۳-۱٦-۳- هضم آنزیمی ۵۱
۳-۱٦-٤- تعیین توالی ژن اینترفرون کلون شده در ناقل ۵۱
۳-۱۷- بررسی بیان پروتئین نوترکیب اینترفرون آلفا2b ۵۱
۳-۱۷-۱- مواد تشکیل دهنده جهت بررسی بیان پروتئین ۵۱
۳-۱۷-۱-۲- باکتری ها ۵۱
۳-۱۷-۱-۳- محیط کشت TB ۵۲
۳-۱۷-۱-٤- تهیه محلول استوک IPTG ۱ مولار ۵۲
۳-۱۸- القا بیان ژن توسط IPTG ۵۲
۳-۱۸-۱- تهیه پروتئین‌های کل ۵۳
۳-۱۸-۲- تهیه پروتئین‌های پریپلاسمی ۵٤
۳-۱۸-۲-۱- مواد مورد نیاز جهت انجام شوک اسمزی ۵۵
۳-۱۸-۲-۲- تهیه عصاره پریپلاسمی به روش شوک اسمزی ۵۵
۳-۱۹- اندازه گیری مقدار پروتئین به روش میکروبرادفورد ۵٦
۳-۱۹-۱- روش کار ۵٦
۳-۲۰- الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید سدیم دودسیل سولفات(SDS-PAGE) ۵۸
۳-۲۰-۱- طرز تهیه محلول های مورد نیاز جهت ساخت ژل پلی‌اکریلامید ۵۸
۳-۲۰-۱-۱محلول ۳۰ درصد اکریل آمید/ بیس اکریل‌آمید ۵۸

۳-۲۰-۱-۲- بافر ژل پایین (ژل جدا کننده) ۵۹
۳-۲۰-۱-۳- بافر ژل بالا (ژل متراکم کننده) ۵۹
۳-۲۰-۱-٤- بافر نمونه‌گذاری (۵x) ٦۰
۳-۲۰-۱-۵- بافر الکترود (بافر مخازن) ٦۰
۳-۲۰-۱-٦- SDS ۱۰ درصد (w/v) ٦۱
۳-۲۰-۱-۷- آمونیوم پرسولفات(APS) ۱۰ در صد ٦۱
۳-۲۰-۱-۸ ترا متیل اتیلن دیامین (TEMED) ٦۱
۳-۲۰-۲- تهیه ژل جداکننده و متراکم کننده پلی اکریل آمید ٦۱
۳-۲۰-۲-۱- تهیه ژل پایین (جداکننده) ٦۱
۳-۲۰-۲-۲ تهیه ژل بالا(متراکم کننده) ٦۲
۳-۲۰-۳- روش کار ٦۲
۳-۲۰-۳-۱- آماده سازی قالب ٦۲
۳-۲۰-۳-۲- تهیه ژل پلی اکریل‌آمید ٦۲
۳-۲۰-۳-۳- آماده سازی نمونه‌ها ٦۳
۳-۲۰-۳-٤- آماده سازی تانک الکتروفورز و بارگذاری نمونه‌ها ٦۳
۳-۲۰-۳-۵- رنگ آمیزی پروتئین‌ها توسط کوماسی بلو ٦٤
۳-۲۰-۳-۵-۱ مواد تشکیل‌دهنده جهت رنگ‌آمیزی ژل و طرز تهیه آنها ٦٤
۳-۲۰-۳-٦- روش کار ٦٤
۳-۲۱- بلات نقطه ای ٦۵
۳-۲۱-۱- مواد مورد نیاز برای انجام بلات نقطه ای ٦٦
۳-۲۱-۱-۱- تهیه TBS1x ٦٦
۳-۲۱-۱-۲- تهیه TBST1x ٦٦
۳-۲۱-۱-۳ تهیه محلول western blocking ٦٦
۳-۲۱-۱-٤- تهیه محلول Anti-His6Peroxidase ٦۷
۳-۲۱-۲- روش کار ٦۷
فصل چهارم: نتایج ٦۸
٤-۱- استخراج توالی ژن IFNα2b از بانک ژن و طراحی آغازگرها ٦۹

٤-٢- استخراج پلاسمید حاوی ژن اینترفرون آلفا ٧٠
٤-٣- تکثیر و خالص سازی ناقل ٧١
٤-٤- هضم آنزیمی ژن و ناقل ٧٢
٤-٥- انجام عمل کلونینگ وبررسی صحت آن ٧٢
٤-٥-١- Colony PCR ٧٤
٤-٥-٢- هضم آنزیمی ٧٤
٤-٥-٣- تعیین توالی ٧٥
٤-٦- بررسی بیان ژن اینترفرون آلفا ٧٦
٤-٦-١- بررسی بیان ژن اینترفرون آلفا با استفاده از روش SDS-PAGE ٧٦
٤-٦-٢- بررسی بیان ژن اینترفرون آلفا با استفاده از بلات نقطه ای ٧٧
٤-٦-٣- بررسی ترشح ژن اینترفرون آلفا در فضای پریپلاسمی ٧٨
فصل پنجم: بحث و پیشنهادات ٨١
٥-١- بحث ٨٢
٥-٢- پیشنهادات ٨٩
منابع ٩١
چکیده ٩٨

فهرست جداول

جدول ۲-۱- مزایا و معایب بیان پروتئین در بخش های مختلف باکتری اشرشیاکلی ۱۵

ادامه جدول ۲-۱- مزایا و معایب بیان..... ۱۶

جدول ۲-۲- تاریخچه کلی کشف اینترفرون‌ها ۲۱

ادامه جدول ۲-۲- تاریخچه کلی کشف اینترفرون‌ها ۲۲

جدول ۳-۱- محیط کشت LB در حجم ۱۰۰ ml ۳۷

جدول ۳-۲- ترکیبات بافر TBE ۳۹

جدول ۳-۳- مواد مورد نیاز جهت ساخت محلول رنگ ژل رد ۳۹

جدول ۳-٤- ترکیبات بافر نمونه گذاری ٤۰

جدول ۳-۵- اجزا مخلوط واکنش PCR در نمونه ۵۰ میکرولیتری ٤۱

جدول ۳-٦- برنامه دمایی و زمانی واکنش PCR ٤۲

جدول ۳-۷- ترکیبات بافر اول جهت استخراج پلاسمید ٤۳

جدول ۳-۸- محلول بافر دوم استخراج پلاسمید ٤۳

جدول ۳-۹- محلول بافر سوم استخراج پلاسمید ٤٤

جدول ۳-۱۰- هضم آنزیمی ناقل ٤۵

جدول ۳-۱۱- هضم آنزیمی محصول PCR ٤٦

جدول ۳-۱۲- اجزای واکنش اتصال ٤۷

جدول ۳-۱۳- ترکیبات محیط کشت TB ۵۲

جدول ۳-۱٤- ترکیبات بافرA ۵٦

جدول ۳-۱۵- ترکیبات بافر B ۵٦

جدول ۳-۱٦- تهیه استاندارد های باغلظت های مختلف از BSA ۵۷

جدول ۳-۱۷- ترکیبات محلول ۳۰ درصد اکریل‌آمید/ بیس اکریل‌آمید ۵۸

جدول ۳-۱۸- ترکیبات بافر ژل پایین ۵۹

جدول ۳-۱۹- ترکیبات بافر ژل بالا ۵۹

جدول ۳-۲۰- ترکیبات بافر نمونه گذاری(۵x) ٦۰

جدول ۳-۲۱- ترکیبات بافر الکترود ٦٠
جدول ۳-۲۲- تهیه ۱۲ میلی لیتر محلول ژل پایین با غلظت‌های مختلف ٦١
جدول ۳-۲۳- تهیه۵ میلی لیتر محلول ژل بالا با غلظت‌های ٤،۳ یا ۵درصد ٦٢
جدول ۳-۲٤- ترکیبات لازم برای ساخت محلول TBS1X ٦٢

فهرست تصاویر

تصویر ۲-۱- کروموزوم باکتری اشرشیاکلی، سویه BL21(DE3) ۹
تصویر ۲-۲- نقشه ژنی پلاسمید pET 26b ۱۲
تصویر ۲-۳- مکانیسم بیان پروتئین نوترکیب درسیستم بیانی pET ۱۳
تصویر ۲-٤- مکانیسم تا خوردن و ترشح پروتئین در اشرشیاکلی ۱۸
تصویر ۲-۵- ساختار مولکولی اینترفرون آلفا۲b انسانی ۱۹
تصویر ۳-۱- نقشه ناقل بیانیpET-26b ۳٦
تصویر ۳-۲- توالی ژن اینترفرون آلفا۲b ۳۸
تصویر ۳-۳- هضم آنزیمی و واکنش اتصال ٤۸
تصویر ۳-٤- ترانسفورماسیون ۵۰
تصویر ۳-۵- فرایند همسانه سازی ژن اینترفرون آلفا۲b ۵۴
تصویر ۳-٦- شمای کلی از تکنیک SDS-PAGE ۵۸
تصویر ۳-۷- تکنیک SDS-PAGE ٦٤
تصویر ۳-۸- تکنیک بلات نقطه ای ٦۵
تصویر ٤-۱- سازواره ناقل بیانی اشرشیاکلی، IFN-pET26b ٦۹
تصویر ٤-۲- محصول PCR با آنزیم پلیمرازی Taq بر روی ژل آگارز ۱٪ ۷۰
تصویر ٤-۳- استخراج پلاسمید ۷۱
تصویر ٤-٤- واکنش هضم آنزیمی ژن و ناقل ۷۲
تصویر ٤-۵- انجام عمل کلونینگ وبررسی صحت آن بر روی محیط کشت ۷۳
تصویر ٤-٦- تأیید حضور پلاسمید در باکتری نوترکیب ۷۳
تصویر ٤-۷- تأیید حضور ژن اینترفرون آلفا در E. coli ۷٤
تصویر ٤-۸- تأیید حضور ژن اینترفرون آلفا ۷۵

تصویر ٤-٩- نتیجه هم‌ردیفی توالی‌های بدست آمده ٧٥

تصویر ٤-١٠- نتیجه BLAST توالی‌های بدست آمده ٧٦

تصویر ٤-١١- آنالیز SDS-PAGE... ٧٧

تصویر ٤-١٢- تأیید بیان ژن توسط تکنیک بلات نقطه ای ٧٨

تصویر ٤-١٣- آنالیز SDS-PAGE.. ٧٩

تصویر ٤-١٤- تأییدحضور ژن در فضای پریپلاسمی ٧٩

فصل اول

مقدمه و هدف

۱-۱- مقدمه

اینترفرون‌ها[۱] گلیکوپروتئین‌هایی از خانواده سایتوکاین‌ها[۲] هستند که در پاسخ به عفونت‌های ویروسی و سایر محرک‌ها ساخته می‌شوند(۲) این پروتئین‌ها، اولین بار در سال ۱۹۵۷ توسط جین لیندمان و الکس ایساک کشف‌شدند(۶۰) و بعنوان اولین خط دفاعی میزبان علیه عوامل عفونی و پیشرفت سرطان می‌باشند(۵۵).

این پروتئین‌ها، بدلیل دارابودن خاصیت ضدویروسی، ضدتکثیری و واسطه ایمنی بربسیاری از سلول‌ها، یکی از موردپسندترین عوامل درمانی محسوب می‌شوند و در آزمایشات پزشکی و در درمان بیماری‌های ویروسی و سرطان موفق بوده‌اند(۳۵) و با سازوکارهای مختلفی برسیستم ایمنی اثر می‌گذارند. این پروتئین‌ها همچنین بر روی تکثیر و تمایز سلولی مؤثر هستند. اینترفرون‌ها وظایف متعدد خود را از طریق تحریک تولید تعداد زیادی پروتئین انجام می‌دهند(٦۰).

پتانسیل دارویی اینترفرون‌ها، با تصویب اینترفرون آلفا ۲aانسانی نوترکیب[۳] بنام روفرون A[٤] در سال ۱۹۸۶ و بعد از آن اینترفرون آلفا ۲b نوترکیب بنام اینترون A[٥] شناخته شد که به عنوان دارو در درمان بیماری های بدخیم و ویروسی بکار رفت. اغلب داروهای نوترکیب اینترفرون آلفا در اشرشیاکلی[٦] تولید و تخلیص می‌شوند(۵۳).

اینترفرون آلفا ۲b، از خانواده اینترفرون‌های نوع یک یا اینترفرون‌های لکوسیتی می‌باشد که ازنظر فیزیولوژیکی پروتئین فعالی است و در پاسخ به بسیاری از عوامل عفونی بیان می‌شود و بسیاری از عملکردهای زیستی مثل جلوگیری از همانندسازی ویروس، جلوگیری از پیشرفت سرطان و دیگر عملکردهای ایمونولوژی را انجام می‌دهند، درنتیجه یکی از داروهای زیستی مورداستفاده برای درمان بیماری‌هایی مثل کم خونی سلول‌های موئی شکل[۷]، هپاتیت B مزمن[۸] و هپاتیت C[۹] مزمن می‌باشند(٥٤).

در سال ۱۹۸٦، سازمان جهانی غذا و دارو[۱۰]، INF-α2b نوترکیب را برای درمان سلول‌های سرطان خون مویی‌شکل، تأیید کرد و در حال حاضر این پروتئین نوترکیب در سیستم بیانی باکتری

۱- Interferon
۲- Cytokine
۳- rhIFNα2a
٤- Roferon-A
٥- Intron-A
٦- *Escherichia coli*
۷- Hairy cell leukemia
۸- Chronic hepatitis B
۹- Chronic hepatitis C
۱۰- Food and Drug Administration

اشرشیاکلی تولید می‌شود(۲۲). هم اکنون این پروتئین رتبه سوم مصرف جهانی داروهای پروتئینی بیولوژیک را بعد از انسولین [۱]و اریتروپوئیتین دارد[۲](۱۵ و۸).

به منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب، سیستم های بیانی مختلفی توسط دانشمندان استفاده و بطور تجاری بهره‌برداری شده‌اند. تنوع سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرند، از پروکارویوت‌هایی چون اشرشیاکلی وباسیلوس سوبتیلیس[۳] تا یوکاریوت‌هایی مانند مخمر، قارچ، کشت سلول‌های پستانداران و حشرات، جانوران و گیاهان می‌باشد(۶۷).

در میان سیستمهای فراوانی که برای تولید پروتئین‌های نامتجانس موجود می‌باشند، باکتری گرم منفی اشرشیاکلی، به عنوان کارخانه تولید پروتئین‌های نوترکیب از اهمیت خاصی برخوردار است(۳).

مزیت‌های بسیاری برای استفاده از سیستم بیانی اشرشیاکلی به اثبات رسیده و آن را یک میکروارگانیسم ارزشمند برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در سطوح بالا باقی گذارده است. ویژگیهای ژنتیکی و فیزیولوژیکی کاملاً شناخته شده آن، تکثیر درزمان کوتاه، آسان بودن دستورزی آن، دانش اثبات شده فرمانتاسیون و نهایتاً ظرفیت بالا برای تجمع پروتئین‌های نوترکیب(بیش از ۲۰٪ از محتوای پروتئین کل سلولی)، اشرشیاکلی را یکی از پرکاربردترین میزبان ها در تولید پروتئین ساخته است(۳۳و ۲۶).

در عین حال معایبی نیز برای این سیستم بیانی وجود دارد، ازجمله اینکه پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در آن دارای اصلاحات پس از ترجمه‌ای نمی‌باشند. فعالیت بیولوژیک و ایمونوژیسیته پروتئین نوترکیب ممکن است با پروتئین طبیعی متفاوت باشد وبیان بالا ممکن است منجر به ایجاد اجسام نامحلول[۴] گردد که ممکن است تخلیص آن را مشکل کند و فعالیت آن را نیز کاهش دهد(۳).

بااین‌حال، بسیاری از پروتئین‌های یوکاریوتی فعالیت زیستی کامل خود را در شکل غیرگلیکوزیله حفظ می‌کنند و بنابراین در اشرشیاکلی می‌توانند تولید شوند. بعلاوه برخی از پیشرفتها، بعنوان مثال، بیان پریپلاسمی، افزایش میزان پروتئین به شکل محلول و تولید پروتئین با تشکیل باندهای دی سولفیدی صحیح را امکانپذیر ساخته است(۲۳و۲۴).

مکان تولید پروتئین در سلول نیز مهم است. پروتئین نامتجانس[۵] می‌تواند در سیتوپلاسم یا در پریپلاسم تولید شود ویا به خارج از سلول ترشح شود(۵۴). ایجاد اجسام نامحلول، یکی از مشکلات

۱- Insulin
۲- Erythropoietin
۳- *Bacillus subtilis*
۴- Inclusion body
۵- Heterologous protein

عمده در مسیر تولید پروتئین بصورت سیتوپلاسمی است. چرا که دوباره تاخوردن[1] پروتئین‌های مجتمع شده کار مشکل و دشواری می‌باشد. عدم اطمینان از اینکه آیا پروتئین‌های تاخورده، فعالیت زیستی خود را بدست می آورند و کم‌شدن بازده پروتئین‌های دوباره تاخورده وتخلیص شده از جمله مشکلات بیان سیتوپلاسمی است(۳و۵۴). همچنین بعلت حضور پروتئازها در سیتوپلاسم تخریب پروتئین قابل حل بیشتر صورت می گیرد(۵۴). پریپلاسم[2]، ۴٪ کل پروتئین‌های سلولی را داراست و متشکل از حدود ۱۰۰ پروتئین می‌باشد. بنابراین تخلیص پروتئینی که بصورت پریپلاسمی صورت می‌گیرد، راحت‌تر است. بیان در پریپلاسم، فضای عالی برای تشکیل پیوندهای صحیح و پیچش صحیح ایجاد می‌کند. ناخالصی پروتئین و فعالیت پروتئازها در پریپلاسم کمتر از سیتوپلاسم است و تخریب و تجزیه پروتئین‌ها در پریپلاسم کمتر اتفاق می‌افتد(۳).

۱-۲- هدف ازتحقیق حاضر

تولید محصولات داروئی مهم از منابع طبیعی آنها اغلب به میزان بسیار اندک و با صرف هزینه بالایی صورت می‌گیرد. با توجه به اهمیت دارویی اینترفرون آلفا ۲b انسانی در ایران و جهان، تولید این دارو در داخل کشور و از طریق بیوشیمیایی امکان‌پذیر، اما بسیار مشکل می‌باشد. زیرا تولید این پروتئین توسط سلول های سالم بسیار کم انجام می‌شود. بنابراین راه آسانتر برای نیل به این هدف استفاده از روشهای مهندسی ژنتیک است. درسالهای اخیر نیز پژوهش‌های گسترده ای برای تولید داروهای نوترکیب از طریق میکروارگانیسم‌ها، حیوانات ترانسژنیک، گیاهان و جانداران دریایی موردتوجه قرارگرفته است.

هدف از این تحقیق، همسانه‌سازی[3] و بیان ژن اینترفرون آلفا ۲b انسانی در باکتری اشرشیاکلی تحت کنترل پروموتور T7 و پپتید نشانه پریپلاسمی pelB[4] جهت امکان هدایت پروتئین تولید شده به فضای پریپلاسمی باکتری است. این تحقیق می تواند امکان تولید پروتئین مهم اینترفرون آلفا۲b انسانی نوترکیب را در شکل صحیح خود و با صرف هزینه‌های بسیار پائین‌تر فراهم آورد. با انجام این تحقیق با هدف بهینه‌کردن تولید اینترفرون آلفا در باکتری اشرشیاکلی می توان زمینه را برای تولید سایر پروتئین ها فراهم کرد.

---

[1]- Refolding
[2]- Periplasm
[3]- Cloning
[4]- Periplasmic signal sequence

فصل دوم

مروری بر منابع

۲-۱- تعریف بیوتکنولوژی

بیوتکنولوژی[۱] یا زیست فناوری علمی است که در راستای افزایش کیفیت زندگی از ابزارهای مختلف به منظور ساخت یا اصلاح محصولات، بهبود گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم استفاده می‌کند. به عبارت دیگر بیوتکنولوژی را می‌توان استفاده از موجودات ویا محصولات آنها به منظور اصلاح سلامت و محیط زیست تلقی کرد. عبارت بیوتکنولوژی، اولین باردر سال ۱۹۱۹ از سوی یک مهندس کشاورزی مجارستانی بنام کارل ارکی [۲]پیشنهاد شد، اما بیوتکنولوژی به مفهوم واقعی از سال ۱۹۴۷ همزمان با تولید صنعتی پنی‌سیلین به روش تخمیر غوطه‌ور شروع شد(۳).

عامل‌اصلی در تکوین بیوتکنولوژی، ظهور پدیده DNA نوترکیب می‌باشد واولین بار، دو دانشمند به نام های هربرت بویر[۳] و استنلی کوهن [٤]در سال ۱۹۷۳ موفق به عمل همسانه سازی ژن[٥] شدند. فناوری DNA نوترکیب بعنوان دستاوردی از مهندسی ژنتیک، نقش بسزائی در تولید و گسترش پروتئین‌های نوترکیب داشته است. با ورود فناوری DNA نوترکیب به عرصه علم، تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس انبوه وبا صرف هزینه بسیار کمتری نسبت به روش های قبلی امکان پذیر شده است. امروزه می توان ژن یا cDNA[٦] کد کننده هر پروتئین را جدا کرد وبه یک سیستم بیان کننده مناسب وارد نمود و اجازه داد تا پروتئین در یک موجود بیگانه که معمولاً یک میکروارگانیسم است تولید شود(۳).

۲-۱-۱- پروتئین‌های نوترکیب به عنوان نقطه عطف بیوتکنولوژی مولکولی

کاربردهای فراوانی برای پروتئین‌های نوترکیب وجود دارد و اثر پروتئین های نوترکیب را می توان در صنایع گوناگون مانند صنایع پزشکی و داروسازی، صنایع کشاورزی وتغذیه، صنایع نفت، محیط زیست وغیره مشاهده کرد.

۲-۲- باکتری اشرشیاکلی

تئودور اشریچ[۷]در سال ۱۸۸۵ برای اولین بار اشرشیاکلی را باعنوان "Bacterium coli commune "

---

[۱]- Biotechnology
[۲]- Karl Erky
[۳]- Herbert Boyer
[٤]- Stanley Cohen
[٥]- Gene cloning
[٦]- Complementary DNA
[۷]- Theodor Escherich

معرفی کرد که از مدفوع نوزادان جدا سازی شده بود و بعدها به نام اشرشیاکلی تغییر نـام یافـت. برای سالهای زیادی این باکتری بعنوان یک ارگانیسم همزیست در روده مطرح بود، تا سال ۱۹۳۵ کـه یک سویه از اشرشیاکلی باعث شیوع اسهال در میان کودکان شد. اشرشیاکلی و خویشاوندان آن بـرای میکروب شناسان بعنوان "باکتریهای روده ای"[۱] شناخته شده‌اند. زیرا آنهـا در روده انسـان و حیوانـات زندگی می‌کنند. اشرشیاکلی از خانواده انتروباکتریاسه بـوده کـه گـرم منفـی، فاقـد اسـپور و میلـه ای شکل‌اند و اغلب توسط فلاژل قادر به حرکت می باشند. اکثر سـویه هـای آنهـا بـه خـوبی در محـیط آزمایشگاهی معمولی در حضور یا عدم حضور اکسیژن رشد می‌کنند و متابولیسم آنها می تواند توسط تنفس یا تخمیر صورت گیرد(٦٨).

۲-۲-۱- نقش باکتری اشرشیاکلی در بیوتکنولوژی

پیشرفتها در زمینه زیست شناسی مولکولی، ژنتیک و بیوشیمی در طی ۴ دهه قبل منجر به پیشرفت های بزرگی در زمینه بیوتکنولوژی شد. تحقیقات برپایه باکتری اشرشـیاکلی نقـش اساسـی را در ایـن پیشرفت ها داشته است و این باکتری همچنان جلودار بسیاری از پیشرفت هـای تکنولـوژیکی اسـت. این باکتری، یکی از میکرو ارگانیسمهایی است که بیشترین مطالعه بر روی آن انجام شده است و یکی از پراسـتفاده‌تـرین میزبانهـا بـرای تولیـد پـروتئین‌هـای نامتجـانس اسـت و ژنتیـک آن بیشـتر از میکروارگانیسم‌های دیگر شناخته شده است. پیشرفت های اخیر در فهم اصول نسخه برداری، ترجمـه و پیچش پروتئین دراشرشیاکلی، همچنین توانائی اصلاح ابزار ژنتیکی و تکثیـر در زمـان کوتـاه، ایـن باکتری را ارزشمندتر از هر میزبان دیگری برای بیان پروتئین‌های پیچیده یوکاریوتی کرده است(۹).

مطالعات وسیع ژنتیکی و بیوشـیمیایی در مـورد ایـن بـاکتری در طـی دهـه ۱۹۶۰ تـا ۱۹۷۰ پایـه تکنولوژی جدید DNA نوترکیب است. ازدیگر ویژگی‌های مهم این باکتری می‌توان به توانـایی رشـد سریع وتراکم بالا در محیط های ساده و ارزان قیمـت، اطلاعـات ژنتیکـی کـاملاً شـناخته شـده و در دسترس بودن تعداد زیادی از ناقلهای همسانه‌سـازی و ناقـل‌هـای بیـانی و سـویه هـای جهـش‌یافتـه میزبانی، کنترل آسان و امکان تولید مقادیر انبوه پروتئین نوترکیب اشاره کرد(۳و۹).

در اوایل پیدایش علم بیوتکنولوژی (دهه ۱۹۶۰)، بر اصـلاح روشـهای فـرآوری زیسـتی هماننـد تولید مخمر، واکسن‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها تأکید می‌شد. این تحقیقات، مطالعات ژنتیکی میکروب‌ها را به منظور افزایش توانائی آنها در تولید بسیاری از محصولات در خدمت بشریت برانگیخـت. اگرچـه در

[۱]- Enteric bacteria

مورد اشرشیاکلی و ژنتیک آن مطالعات زیادی صورت گرفته است، اما کاربرد مستقیم این باکتری در صنعت به موارد خاصی محدود می‌شود و هنوز گسترش نیافته است. در سال ۱۹۶۱ تولید صنعتی اسیدآمینه ترئونین[۱] توسط جهش‌یافته‌های اشرشیاکلی در زمان خود، یک پدیده کاملاً استثنایی به شمار می‌رفت. دراین زمان موجودات زنده عموماً به علل مختلفی در معرض عوامل جهش زا[۲] قرار می‌گرفتند، سپس یک سری از جهش‌های تصادفی از جهش‌یافته‌های مطلوب انتخاب و در تولید مورد استفاده قرار گرفتند(٦٨).

در دو دهه اخیر پیشرفت‌های حاصل نشان داد که تهیه سویه‌های باکتری با قابلیت تولید زیاد مجاز به استفاده در سطح گسترده‌اند. چون ساختار ژنتیکی اشرشیاکلی بخوبی شناخته شده است و ارگانیسمی است که می تواند در محیط غذائی ساده(نمکهای معدنی و گلوکز) تحت شرایط هوازی و بیهوازی رشد کند، این باکتری پایه پیشرفت‌های زیادی در دستکاری‌های ژنتیکی و در نتیجه مهندسی ژنتیک شد(۶۸).

اصل اساسی این دستکاریهای ژنتیکی همسانه‌سازی ژن می‌باشد که جداسازی و همانندسازی قطعات ویژه‌ای ازDNA را امکان‌پذیر می‌سازد و شامل یک سری از مراحل پیوسته است، از جمله جداسازی ژن موردنظر مثل DNA دورشته ای، ورود ژن بدرون ناقل مناسب و بکارگیری ناقل برای ورود DNA به درون سلولی که اطلاع ژنتیکی موردنظر را بیان خواهد کرد(٦٨).

۲-۲-۲- سویه های مناسب اشرشیاکلی به عنوان میزبان باکتریایی

سویه‌های باکتری مورداستفاده برای بیان پروتئین‌های نوترکیب بسیار مهم‌اند. سویه‌های بیانی باید از نظر دارا بودن پروتئازهای طبیعی مضر، ناکارآمد شده باشند، از پلاسمید بیانی به طورپایدار نگهداری کنند و عناصر ژنتیکی مناسب را در سیستم بیانی ارائه دهند، مثل (DE3). سویه‌های ارزشمندی از اشرشیاکلی برای کاربردهای خاص وجود دارد. اشرشیاکلی سویه BL21، یکی از پرکاربردترین میزبان‌های استاندارد مورد استفاده برای بیان پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد(۶۲).

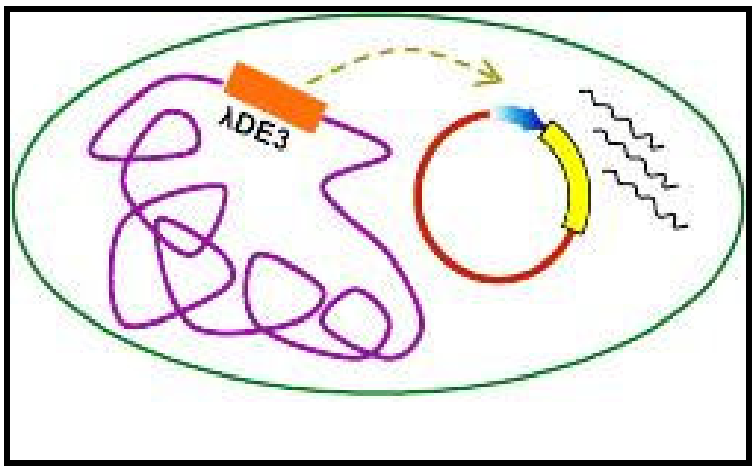
۲-۲-۲-۱- باکتری اشرشیاکلی سویه BL21

معمولا سلول میزبان مناسب اشرشیاکلی برای همسانه‌سازی، سویه BL21(DE3) (تصویر۲-۱) می‌باشد.

---

[۱]- Threonine
[۲]- Mutagenic agents

BL21(DE3)، از سویه های قوی اشرشیاکلی است که قادر به رشد سریع در محیط غذایی حداقل می‌باشد. این سویه، غیربیماری زا بوده و احتمال زنده ماندن آن در بافت‌های میزبان و ایجاد بیماری کم است(۱۴). همچنین این میزبان فاقد پروتئاز lon و پروتئاز غشای خارجی ompT می‌باشد. بدین‌ترتیب از تخریب پروتئین‌های نوترکیب در طول مراحل تخلیص جلوگیری می‌کند(۶۲ و ۱).



تصویر۲-۱- کروموزوم باکتری اشرشیاکلی، سویه BL21(DE3).

مشتقات BL21 شامل:

۱)سویه های $recA^-$: مناسب برای پایداری پلاسمیدهای هدف و دارای توالی‌های تکراری می‌باشند (سویه BLR از شرکت نواژن[۱]).

۲)جهش‌یافته‌های trx/gor^-: برای تشدید تشکیل باندهای دی سولفیدی در سیتوپلاسم باکتری به‌کار می‌رود(سویه های Origami و AD494 از شرکت نواژن).

۳)جهش‌یافته‌های LacY: که قادر به تنظیم کردن سطوح بیان پروتئین می‌باشند (سریهای Tuner از شرکت نواژن).

۲-۲-۳- ویژگی‌های سیستم‌های بیانی[۲]

سیستم‌های بیانی به منظور تولید تعداد زیادی نسخه از پروتئین موردنظر طراحی شده‌اند. بدین منظور یک ناقل بیانی به درون سلول میزبان وارد می‌شود. این ناقل شامل همه کدهای ژنتیکی ضروری برای تولید پروتئین، مانند یک پروموتور مناسب برای سلول میزبان، یک توالی خاتمه دهنده نسخه برداری و یک توالی برای اتصال ریبوزوم است(۳۲).

۱- Novagen
۲- Expression system