بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه الزهراء (س)

دانشکدهٔ علوم پایه

پایان نامه جهت اخذ درجهٔ کارشناسی ارشد

رشتهٔ میکروبیولوژی

عنوان

بررسی توانایی *E. coli* BL21 در بیان دو فرم متفاوت ژن پروکیموزین، خالص سازی و بهینه سازی تولید آن

اساتید راهنما

دکتر عزت عسگرانی

دکتر مهوش خدابنده

استاد مشاور

دکتر غلامرضا احمدیان

دانشجو

لیلا بدیعی فر

خرداد ۱۳۸۷

به یاد پدر مهربان

و

تقدیم به مادر عزیز و بزرگوارم

که فروغ دیدگانش، روشنگر راه و وجود پر مهرش، بزرگ ترین مشوقم بوده است.

و تقدیم به خواهران نازنین و تنها برادر ارجمندم

که کوچکترین موفقیت هایم را بزرگ شمردند.

شکر و سپاس و منت و عزت خدای را پروردگار خلق و خداوند کبریا

که توانم داد تا برگ دیگری از دفتر زندگیم را با موفقیت ورق زده و به لطف بی کرانش در آستانه راه دیگری بایستم.

جای آن دارد که سپاس و قدر دانی صمیمانه خود را به استاد گرامی سرکار خانم دکتر عزت عسگرانی تقدیم نمایم که همواره مرا مرهون لطف خود قرار داده و با بزرگواری از هر گونه مساعدت لازم دریغ نورزیدند.

و مراتب قدر دانی و سپاس بی پایان خود را تقدیم می دارم به استاد ارجمندم سرکار خانم دکتر مهوش خدابنده که هدایت این پژوهش را به عهده داشتند و با راهنمایی های ارزنده خود همواره راهگشا و با چهره ای گشاده پذیرای من بوده اند.

با تشکر فراوان از جناب آقای دکتر غلامرضا احمدیان که در مقام استاد مشاور، راهنمایی های ارزشمندی را برای بهبود این پژوهش ارائه فرمودند.

از جناب آقای دکتر سید صفاعلی فاطمی که در ابتدای راه با نهایت لطف مرا در انجام این کار یاری دادند بسیار سپاسگذارم.

از سرکار خانم دکتر آزیتا صدیق نیز که با محبت بسیار تجربیات ارزشمند خود را در اختیارم گذاردند و صبورانه و دلسوزانه مرا همراهی کردند، صمیمانه تشکر می نمایم.

و با سپاس فراوان از کارشناسان محترم آزمایشگاه؛ سرکار خانم ها سالک، دانش، قندیلی، درچه زاده و جناب آقای قمی، همچنین دوستان بسیار عزیزم سرکار خانم ها امیرخانی، ترکی نژاد و تیموری که در نهایت لطف و محبت مرا از مساعدت های بی آلایش خود بهره مند ساختند.

و در پایان از خانواده عزیزم که وجودشان امید بخش زندگیم بوده و همواره مشوق و حامی ام در تمام مراحل تحصیل بوده اند تشکر نموده و امیدوارم روزی گوشه ای از محبت های بی دریغ ایشان را پاسخگو باشم.

خدایا چنان کن سر انجام کار تو خشنود باشی و ما رستگار

چکیده

کیموزین (EC 3.4.23.4) آسپارتیک پروتئینازی است که در معدهٔ پستانداران نوزاد سنتز می شود. این آنزیم با شکافتن پیوند پپتیدی میان Phe105 Met106 کاپاکازئین شیر مادر منجر به ناپایداری میسلهای شیر و در نهایت انعقاد و تبدیل آن به پنیر می گردد. پروکیموزین یا پیش ساز غیر فعال کیموزین دارای پیش قطعه ایست که در پایداری شکل غیر فعال آنزیم و جلوگیری از ورود سوبسترا به جایگاه فعال مربوطه نقش دارد. واکنش فعال سازی با تخریب پیوندهای الکترواستاتیک میان پیش قطعه و بخش فعال آنزیم در pH اسیدی آغاز و با برش پیش قطعه، آنزیم فعال می گردد. در این کار تحقیقی به منظور بررسی توانایی *E. coli* BL21 در بیان دو فرم کامل و فاقد اگزون ۶ ژن پروکیموزین، شرایط رشد دو سازهٔ *E. coli* BL21 در بردارندهٔ pET-26b(+) حامل دو ژن مذکور، در جهت افزایش تولید پروکیموزین با روش تاگوچی بهینه سازی گردید. نتایج نشان دادند که تحت شرایط بهینهٔ بدست آمده برای هر سازه، میزان تولید پروکیموزین کامل ۳۲/۶۶ درصد و میزان تولید پروکیموزین کوتاه ۴۴/۶۱ درصد از پروتئین کلی سلول بوده و تولید پروکیموزین کوتاه ۱۲/۰۶ درصد بیشتر از فرم کامل آن می باشد. پروکیموزینی که توسط *E. coli* نوترکیب سنتز می شود، در سیتوپلاسم آن به صورت توده های نامحلول و غیر طبیعی به نام اجسام نامحلول یا Inclusion Bodies تجمع می یابد. در این پژوهش ۵۴ درصد از پروکیموزین نامحلول سنتز شده توسط *E. coli* BL21 طی یک فرآیند واسرشته شدن (Denaturation) به حالت محلول درآمده و سپس تحت شرایط مناسب برای کسب ساختمان مجدد و صحیح (Refolding)، قرار گرفت. در مرحلهٔ بعد با به کارگیری روش کروماتوگرافی تعویض آنیونی ستونی، پروکیموزین به میزان ۷۷ درصد خالص گردید. از آنجا که نمونهٔ حاصل از این پژوهش در مقایسه با نمونهٔ استاندارد تجاری (۵۳ درصد خلوص) دارای خلوص بیشتری است، لذا می توان از این روش در جهت خالص سازی پروکیموزین استفاده نمود. برای فعال سازی پروکیموزین به کیموزین نیز ۴ عامل به عنوان متغیر در نظر گرفته شده و برای هر عامل ۳ سطح تعریف شد. سپس با استفاده از روش تاگوچی ۹ آزمایش طراحی گردید. آنالیز نتایج سنجش کمی محلولهای فعال سازی شدهٔ حاصل از هر آزمایش با استفاده از نرم افزار Qualitek-4 (روش تاگوچی) نشان داد که بیشترین میزان فعالیت انعقاد شیر (units/ml)، با کاهش pH تا ۵، سپس ۴ ساعت گرماگذاری محلول اسیدی در ۳۷°C و به دنبال آن خنثی سازی و ۲ ساعت گرماگذاری محلول خنثی در دمای ۳۷°C به دست می آید. در ضمن هر میلی لیتر از محلول فعال سازی شده تحت این شرایط حاوی ۲۶/۰۱ واحد آنزیمی است.

فهرست مطالب

فهرست عناوین **صفحه**

چکیده

فصل اول- مروری بر پیشینهٔ پژوهش

۱-۱- مقدمه ۱
۱-۲- تولید پروتئین های نوترکیب ۲
۱-۲-۲- تولید پروتئین نوترکیب در *E.coli* ۴
۱-۲-۲-۱- میزبان *E.coli* ۴
۱-۲-۲-۲- بیان ژن به وسیلهٔ آغازگرهای قوی و قابل تنظیم ۶
۱-۲-۲-۲-۱- سیستم pET ۷
۱-۲-۳- مکان پروتئین درسلول ۹
۱-۲-۳-۱- بیان سیتوپلاسمی ۱۰
۱-۲-۳-۱-۱- بیان پروتئین به صورت اجسام نامحلول ۱۰
۱-۲-۳-۱-۱-۱- کیفیت پروتئین موجود در اجسام نامحلول باکتریایی ۱۰
۱-۲-۳-۱-۱-۲- چگونگی تشکیل اجسام نامحلول ۱۱
۱-۲-۳-۱-۱-۳- ریخت شناسی اجسام نامحلول ۱۲
۱-۲-۳-۱-۱-۴- عوامل تعیین کننده مولکولی در تشکیل اجسام نامحلول ۱۲
۱-۲-۳-۱-۱-۵- مشکلات ناشی از بیان پروتئین به صورت اجسام نامحلول ۱۳
۱-۲-۳-۱-۱-۶- مزایای بیان پروتئین های نوترکیب به صورت اجسام نامحلول ۱۵
۱-۲-۳-۱-۲- تصحیح انتهای آمینی پروتئین های سیتوپلاسمی ۱۵
۱-۲-۳-۲- بیان پری پلاسمیک ۱۶
۱-۲-۳-۳- بیان به صورت ترشح خارج سلولی ۱۷
۱-۲-۴- تخلیص پروتئین ۱۸
۱-۲-۴-۱- تفکیک اولیه ۱۹
۱-۲-۴-۲- روش کروماتوگرافی ۲۰
۱-۲-۴-۲-۱- صاف کردن به وسیلهٔ ژل ۲۰
۱-۲-۴-۲-۲- کروماتوگرافی تبادل یونی(IEC) ۲۱
۱-۲-۴-۲-۳- کروماتوگرافی برهمکنش آبگریز (HIC) ۲۳
۱-۲-۴-۲-۴- کروماتوکرافی فاز معکوس (RPC) ۲۴
۱-۲-۴-۲-۵- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ۲۴
۱-۲-۴-۲-۶- کروماتوگرافی میل ترکیبی ۲۴
۱-۲-۵- بررسی کمی و کیفی پروتئین ها ۲۵
۱-۲-۵-۱- الکتروفورز براساس جرم مولکولی (SDS-PAGE) ۲۵
۱-۲-۵-۲- سنجش پروتئین ۲۷
۱-۳- سابقه و کاربردهای طراحی آزمایش ها ۲۹
۱-۳-۱- روش های طراحی آزمایش برای بهینه کردن مراحل مختلف فرآیندهای زیستی ۳۰

۱-۳-۱-۱- روش یک عامل در یک زمان ۳۰
۱-۳-۱-۲- روش فاکتوریل کامل ۳۰
۱-۳-۱-۳- روش کسری از فاکتوریل کامل ۳۱
۱-۳-۲- طراحی آزمایش ها ۳۲
۱-۳-۲-۱- انتخاب عوامل و سطوح ۳۲
۱-۳-۲-۲- انتخاب آرایه های متعامد ۳۲
۱-۳-۳- تجزیه و تحلیل نتایج ۳۳
۱-۳-۳-۱- اندازه گیری پاسخ ۳۳
۱-۳-۳-۲- کیفیت هدف و تعیین خصوصیات آن ۳۳
۱-۳-۳-۳- تحلیل واریانس نتایج (ANOVA) ۳۳
۱-۴- تاریخچهٔ تولید پنیر ۳۴
۱-۵- آنزیم های منعقد کنندهٔ شیر و نقش آنها در تولید پنیر ۳۷
۱-۵-۱- رنت، رنین و کیموزین ۳۸
۱-۵-۱-۱- شیمی کیموزین ۴۰
۱-۵-۱-۲- ساختار کیموزین ۴۱
۱-۶- پروتئین های شیر ۴۲
۱-۶-۱- مکانیسم فعالیت کیموزین ۴۲
۱-۷- همسانه سازی مولکولی و بیان ژن کیموزین ۴۵
۱-۷-۱- تولید پروکیموزین نوترکیب ۴۷
۱-۸- مکانیسم فعال سازی پروکیموزین ۴۹
۱-۸-۱- فعال سازی وابسته به pH ۵۰
۱-۹- هدف از تحقیق حاضر ۵۱

فصل دوم- مواد و روشها

۲-۱- ابزارها و مواد ۵۴
۲-۱-۱- ابزارها و دستگاهها ۵۴
۲-۱-۲- نرم افزارها ۵۵
۲-۱-۳- مواد شیمیایی ۵۵
۲-۱-۴- آنتی بیوتیک‌ها ۵۶
۲-۱-۵- آنتی بادی‌ها ۵۶
۲-۱-۵-۱- آنتی بادی های اولیه ۵۶
۲-۱-۵-۲- آنتی بادی ثانویه ۵۶
۲-۱-۶- کیت های آزمایشگاهی ۵۶
۲-۱-۷- محیط کشت ۵۷
۲-۱-۸- سویهٔ باکتریایی نوترکیب ۵۸
۲-۱-۹- رزین ها ۵۸
۲-۱-۱۰- محلول ها و بافرها ۵۸
۲-۱-۱۰-۱- محلول ذخیره IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside) ۵۸
۲-۱-۱۰-۲- محلولهای الکتروفورز پروتئین SDS-PAGE ۵۸

۲-۱-۱۰-۲-۱- آگار ۱٪ ۵۸
۲-۱-۱۰-۲-۲- محلول اکریل آمید ۵۰ درصد- بیس اکریل آمید ۱/۳ درصد ۵۸
۲-۱-۱۰-۲-۳- محلول بافر ژل متراکم کننده (Stacking buffer) ۵۹
۲-۱-۱۰-۲-۴- محلول بافر ژل جدا کننده (Resolving buffer) ۵۹
۲-۱-۱۰-۲-۵- محلول آمونیوم پرسولفات (APS) ۶۰
۲-۱-۱۰-۲-۶- محلول TEMED یا Tetra methylene diamine ۶۰
۲-۱-۱۰-۲-۷- محلول بافر حلال نمونه (Sample Solvent) ۶۰
۲-۱-۱۰-۲-۸- محلول Tri Chloro Acetic Acid 100% ۶۰
۲-۱-۱۰-۲-۹- محلول رنگ آمیزی کوماسی بلو (stain) ۶۰
۲-۱-۱۰-۲-۱۰- محلول رنگ بر کوماسی بلو (destain) ۶۰
۲-۱-۱۰-۲-۱۱- محلول بافر تانک یا راهبر (Running buffer) ۶۱
۲-۱-۱۰-۲-۱۲- محلول بافر انتقال (Transfer buffer) ۶۱
۲-۱-۱۰-۲-۱۳- محلول بافر شست و شو (Washing buffer) ۶۱
۲-۱-۱۰-۲-۱۴- محلول بافر مسدود کننده (Blocking buffer) ۶۱
۲-۱-۱۰-۲-۱۵- سوبسترا (Substrate) ۶۲
۲-۱-۱۰-۳- بافر لیز کننده (Lysis Buffer) ۶۲
۲-۱-۱۰-۴- محلول شستشوی اول و دوم ۶۲
۲-۱-۱۰-۵- محلول شستشوی سوم ۶۲
۲-۱-۱۰-۶- بافرهای کروماتوگرافی تعویض آنیونی ۶۲
۲-۱-۱۰-۷- محلول سنجش پروتئین به روش Modified Lowry ۶۳
۲-۱-۱۰-۷-۱- محلولهای ذخیره (Stock) ۶۳
۲-۱-۱۰-۷-۲- محلولهای کاری (Working) ۶۳
۲-۱-۱۰-۷-۳- محلول استاندارد ۶۳
۲-۱-۱۰-۸- محلولهای مورد استفاده در فعال سازی ۶۳
۲-۱-۱۰-۸-۱- بافر فسفات سدیم ۶۳
۲-۱-۱۰-۹- محلولهای لازم برای سنجش فعالیت ۶۴
۲-۱- ۱۰-۹-۱- سوبسترا (Substrate) ۶۴
۲-۱-۱۰-۱۰- آماده سازی ستون کروماتوگرافی ۶۴
۲-۲- روش ها ۶۵
۲-۲-۱- کشت و نگهداری باکتری ها ۶۵
۲-۲-۲- کشت باکتری جهت ترسیم منحنی رشد ۶۶
۲-۲-۳- کشت باکتری برای انجام آزمایشهای تاگوچی ۶۶
۲-۲-۴- بررسی پروتئین ها ۶۷
۲-۲-۴-۱- الکتروفورز براساس جرم مولکولی (SDS-PAGE) ۶۷
۲-۲-۴-۱-۱- رنگ آمیزی ژل SDS-PAGE باکوماسی G-۲۵۰ کلوئیدی ۶۹
۲-۲-۴-۲- وسترن بلاتینگ (Western Blotting) ۷۰
۲-۲-۴-۳- Dot Blotting ۷۳
۲-۲-۴-۴- سنجش پروتئین به روش برادفورد ۷۳
۲-۲-۴-۴-۱- مقدمات آزمایش ۷۳

۲-۲-۴-۴-۲- روش کار ۷۳
۲-۲-۴-۵- سنجش پروتئین به روش Modified Lowry ۷۴
۲-۲-۵- پیمایش تراکم سنجی ژل رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو ۷۵
۲-۲-۶- تولید آنتی بادی علیه پروکیموزین ۷۵
۲-۲-۶-۱- روش استفاده از ژل Preparative برای تخلیص پروکیموزین ۷۶
۲-۲-۶-۲- تزریق پروکیموزین تخلیص شده به خرگوش ۷۸
۲-۲-۶-۳- بررسی وجود آنتی‌بادی در سرم و تعیین تیتر تقریبی آن ۸۰
۲-۲-۷- جداسازی و خالص سازی پروکیموزین ۸۰
۲-۲-۷-۱- شکستن سلول (Cell disruption) ۸۰
۲-۲-۷-۲- شستشوی اجسام نامحلول (IB) ۸۱
۲-۲-۷-۳- حل کردن اجسام درون سلول ۸۱
۲-۲-۷-۴- ایجاد تاشدگی مجدد (refolding) ۸۲
۲-۲-۷-۵- کروماتوگرافی تعویض یونی ۸۲
۲-۲-۷-۵-۱- کروماتوگرافی تعویض آنیونی با رزین DE-52 (روش توده ای) ۸۲
۲-۲-۷-۵-۲- کروماتوگرافی تعویض آنیونی با رزین DE-52 (روش ستونی) ۸۳
۲-۲-۸- روش فعال سازی پروکیموزین به کیموزین ۸۴
۲-۲-۹- سنجش فعالیت انعقاد شیر کیموزین ۸۴
۲-۲-۹-۱- سنجش کیفی ۸۴
۲-۲-۹-۲- سنجش کمی ۸۵

فصل سوم- نتایج تحقیق

۳-۱- منحنی های رشد دو سویهٔ نوترکیب *E.coli* BL21 ۸۶
۳-۲- بهینه سازی شرایط رشد دو سویهٔ نوترکیب *E.coli* BL21 با استفاده از روش آماری تاگوچی ۸۸
۳-۲-۱- نتایج بدست آمده از آزمایشهای تاگوچی ۹۰
۳-۳- نتایج استفاده از ژل Preparative جهت تخلیص پروکیموزین ۱۰۴
۳-۳-۱- تولید آنتی بادی علیه پروکیموزین ۱۰۶
۳-۴- نتایج حاصل از حل اجسام نامحلول ۱۰۷
۳-۵- ایجاد تا خوردگی مجدد (Refolding) ۱۰۷
۳-۶- خالص سازی ۱۰۸
۳-۶-۱- تخلیص به روش کروماتوگرافی تعویض آیونی توده ای ۱۰۸
۳-۶-۲- تخلیص به روش کروماتوگرافی تعویض آنیونی ستونی ۱۰۹
۳-۷- نتایج حاصل از فعال سازی پروکیموزین به کیموزین ۱۱۱
۳-۸- جمع بندی کلی نتایج ۱۲۱

فصل چهارم- بحث وپیشنهادات

۴-۱- بحث ۱۲۳
۴-۲- پیشنهادات ۱۳۴

فصل پنجم- منابع

۵-۱- منابع انگلیسی..... ۱۳۵
۵-۲- منابع فارسی..... ۱۴۰

بررسي توانايي ***E. coli* BL21** در بيان دو فرم متفاوت ژن پروكيموزين، خالص سازي و بهينه سازي توليد آن

نام و نام خانوادگي: ليلا بديعي فر
رشته تحصيلي: زيست شناسي- ميكروبيولوژي
اساتيد راهنما: دكتر عزت عسگراني و دكتر مهوش خدابنده
استاد مشاور: دكتر غلامرضا احمديان
تاريخ دفاع: ۹ خرداد ۱۳۸۷

كيموزين (EC 3.4.23.4) آسپارتيک پروتئينازي است كه در معدة پستانداران نوزاد سنتز مي شود. اين آنزيم با شكافتن پيوند پپتيدي ميان Phe105- Met106 كاپاكازئين شير مادر منجر به ناپايداري ميسلهاي شير و در نهايت انعقاد و تبديل آن به پنير مي گردد. پروكيموزين يا پيش ساز غير فعال كيموزين داراي پيش قطعه ايست كه در پايداري شكل غير فعال آنزيم و جلوگيري از ورود سوبسترا به جايگاه فعال مربوطه نقش دارد. واكنش فعال سازي با تخريب پيوندهاي الكترواستاتيک ميان پيش قطعه و بخش فعال آنزيم در pH اسيدي آغاز و با برش پيش قطعه، آنزيم فعال مي گردد. در اين كار تحقيقي به منظور بررسي توانايي *E. coli* BL21 در بيان دو فرم كامل و فاقد اگزون ۶ ژن پروكيموزين، شرايط رشد دو سازة *E. coli* BL21 در بردارندة pET-26b(+) حامل دو ژن مذكور، در جهت افزايش توليد پروكيموزين با روش تاگوچي بهينه سازي گرديد. نتايج نشان دادند كه تحت شرايط بهينة بدست آمده براي هر سازه، ميزان توليد پروكيموزين كامل ۳۲/۶۶ درصد و ميزان توليد پروكيموزين كوتاه ۴۴/۶۱ درصد از پروتئين كلي سلول بوده و توليد پروكيموزين كوتاه ۱۲/۰۶ درصد بيشتر از فرم كامل آن مي باشد. پروكيموزيني كه توسط *E. coli* نوتركيب سنتز مي شود، در سيتوپلاسم آن به صورت توده هاي نامحلول و غير طبيعي به نام اجسام نامحلول يا Inclusion Bodies تجمع مي يابد. در اين پژوهش ۵۴ درصد از پروكيموزين نامحلول سنتز شده توسط *E. coli* BL21 طي يک فرآيند واسرشته شدن (Denaturation) به حالت محلول درآمده و سپس تحت شرايط مناسب براي

كسب ساختمان مجدد و صحيح (Refolding)، قرار گرفت. در مرحلة بعد با به كارگيري روش كروماتوگرافي تعويض آنيوني ستوني، پروكيموزين به ميزان ۷۷ درصد خالص گرديد. از آنجا كه نمونة حاصل از اين پژوهش در مقايسه با نمونة استانداردد تجاري (۵۳ درصد خلوص) داراي خلوص بيشتري است، لذا مي توان از اين روش در جهت خالص سازي پروكيموزين استفاده نمود. براي فعال سازي پروكيموزين به كيموزين نيز ۴ عامل به عنوان متغير در نظر گرفته شده و براي هر عامل ۳ سطح تعريف شد. سپس با استفاده از روش تاگوچي ۹ آزمايش طراحي گرديد. آناليز نتايج سنجش كمي محلولهاي فعال سازي شدة حاصل از هر آزمايش با استفاده از نرم افزار Qualitek-4 (روش تاگوچي) نشان داد كه بيشترين ميزان فعاليت انعقاد شير (units/ml)، با كاهش pH تا ۵، سپس ۴ ساعت گرماگذاري محلول اسيدي در ۳۷°C و به دنبال آن خنثي سازي و ۲ ساعت گرماگذاري محلول خنثي در دماي ۳۷°C به دست مي آيد. در ضمن هر ميلي ليتر از محلول فعال سازي شده تحت اين شرايط حاوي ۲۶/۰۱ واحد آنزيمي است.

۱-۱- مقدمه

علم ژنتیک در اواخر دهۀ ۱۹۷۰ به عصر جدیدی که در آن، پیشرفت در دو زمینۀ پژوهشی حکمفرما بود وارد شد. این دو زمینه عبارتند از: (۱) به کار گرفتن **فناوری تولید DNA نوترکیب (مهندسی ژنتیک**[1]) به منظور مجهز کردن سلول با قابلیت سنتز مواد جدید و (۲) توانایی سنتز خطی نوکلئوتیدهای (توالی یابی[2]) مولکول DNA. اینک با کمک این دستکاری های ژنی می توان ژن های باکتریهای مختلف را به یکدیگر یا ژنهای یوکاریوتی را به باکتریها (یا بر عکس)، منتقل کرد تا این سلولهای "مهندسی شده" به صورت کارخانه های کوچکی درآیند و پروتئینهایی که از نظر اقتصادی اهمیت بسیار دارند، به مقادیر نسبتا" زیاد تولید کنند؛ از جملۀ این پروتئینها می توان آنزیمها، هورمونها (مثلا" انسولین و هورمون رشد) و اینترفرونها[3] (بعضی از پروتئینهای لنفوسیت ها که از تکثیر بسیاری از ویروسها جلوگیری می کنند) را نام برد. میزان تولید این پروتئینها در محیط طبیعی به حدی ناچیز است که استخراجشان از خون یا بافتهای لاشه و پالایش آنها، مستلزم هزینۀ سنگینی است که در نتیجه تولید آنها در مقیاس وسیع و صنعتی مقرون به صرفه نخواهد بود (۱۰۰).

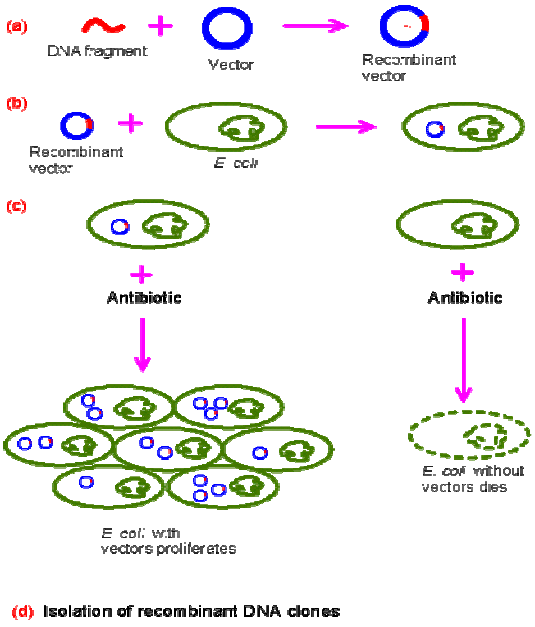
مهندسی ژنتیک برای تولید آنزیم های مورد نیاز در صنایع غذایی نیز بسیار راهگشا بوده است. با نگرشی به منابع موجود در می یابیم که نخستین افزودنی غذایی، ماده ای به نام کیموزین[4] بوده است که مردم بیشتر آن را به نام رنت[5] می شناسند. کیموزین آنزیمی است که برای انعقاد شیر و تبدیل آن به پنیر مورد استفاده قرار می گیرد. این آنزیم به عنوان نخستین فرآوردۀ بیوتکنولوژی نوین، در باکتریها تولید گردیده است. امروزه ۹۰ درصد از پنیرها با استفاده از آنزیم مهندسی ژنتیک شده تولید می گردند در حالیکه تا پیش از این، برای دست یابی به آنزیم مذکور، چاره ای جز جداسازی آن از شیردان یک گوسالۀ شیرخوار وجود نداشت.

---

[1] Genetic engineering
[2] Sequencing
[3] Interferons
[4] Chymosin
[5] Rennet

۱-۲- تولید پروتئین های نوترکیب

اولین بار دو دانشمند به نام های Herbert Boyer و Stanley Cohen در سال ۱۹۷۳ موفق به انجام عمل همسانه سازی شدند. به طور کلی همسانه سازی[1] به مفهوم جداسازی قطعهٔ معینی از مولکول DNA و انتقال آن به درون یک میزبان مناسب به وسیلهٔ یک حامل مناسب، مثل پلاسمید[2] می باشد (۱۲). شکل (۱-۱) مراحل اصلی همسانه سازی ژن را نشان می دهد.



شکل ۱-۱ مراحل مختلف همسانه سازی.

هدف اصلی از کلون کردن ژن برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی، بیان ژن کلون شده در یک میزبان انتخابی می باشد. متأسفانه هیچ اطمینانی مبنی بر بیان موفقیت آمیز ژن اضافه شده به یک حامل کلون سازی وجود ندارد. علاوه بر این، غالبا ″ میزان زیادی از فرآوردهٔ پروتئینی کد شده توسط ژن کلون شده، برای مقاصد تجاری مورد نیاز می باشد. در پاسخ به این نیاز که همان میزان بالای بیان می باشد، تعداد زیادی از حامل های بیانی اختصاصی با دستکاری

[1] cloning
[2] plasmid

عناصر کنترل کنندهٔ ژنتیکی که در مراحل مختلف بیان ژن شامل رونویسی[۱]، ترجمه[۲]، پایداری پروتئین[۳]، ترشح از سلول[۴] و محدودیت اکسیژنی[۵] نقش دارند به کار گرفته شده اند.

هیچ استراتژی واحدی برای دست یابی به حداکثر میزان بیان در مورد تمام ژن های کلون شده وجود ندارد. اغلب ژن های کلون شده دارای ویژگی های مولکولی اختصاصی می باشند لذا پیش از دست یابی به شرایطی که در آن بیشترین میزان بیان حاصل شود، نیاز به صرف زمان و تلاش قابل ملاحظه ای می باشد (۳۳).

میزان بیان ژن بیگانه به خصوصیات ارگانیسم میزبان بستگی دارد، بنابراین به منظور انتخاب سلول مناسب برای یک پروتئین خاص علاوه بر خصوصیات و استفاده مورد نظر از پروتئین هدف بایستی عواملی چون خصوصیات رشد سلولی[۶]، سطوح بیان[۷]، اصلاحات بعد ترجمه ای[۸] و هزینه ها نیز در نظر گرفته شود (۵). گرچه محدودهٔ وسیعی از ارگانیسم های پروکاریوتی و یوکاریوتی قادر به بیان ژن های بیگانه می باشند، اما اغلب فرآورده های پروتئینی مهم تجاری تولید شده توسط فناوری DNA نوترکیب در *Escherichia coli* سنتز می شوند. استفادهٔ وسیع از این ارگانیسم در پرتو تحقیقات بسیار زیادی که در مورد ژنتیک، بیولوژی ملکولی، بیوشیمی و فیزیولوژی آن صورت گرفته، قابل درک می باشد (۳۳). البته سیستم های میزبانی دیگری مانند *Bacillus subtilis* ، مخمر و سلول های حیوانی، گیاهی و حشره ای نیز برای بیان برخی از ژن های کلون شده مورد استفاده قرار می گیرند. بهرحال، استراتژی ها ی ماهرانه ای که برای *E. coli* طراحی گردیده اند، اصولا" بایستی برای تمام سیستم ها قابل اجرا باشند (۳۳).

---

[1] transcription
[2] translation
[3] protein stability
[4] Secretion from the host cell
[5] Oxygen limitation
[6] Cell growth characteristics
[7] Expression levels
[8] Post translational modifications

۱-۲-۲- تولید پروتئین نوترکیب در *E. coli*

۱-۲-۲-۱- میزبان *E. coli*

ژنوم *E. coli*، تقریبا" از ۱۰^۶ × ۴/۶ جفت باز تشکیل شده و شامل بیش از ۴۰۰۰ ژن رمزگذار[1] برای پروتئین ها می باشد. علت آنکه *E. coli* بیش از سایر میکروارگانیسم های پروکاریوتی به منظور تولید پروتئین های نوترکیب مورد توجه و به میزان وسیعی مورد استفاده قرار گرفته است (۵)، مزایای منحصر بفرد این ارگانیسم می باشد، که عبارتند از:

- استفاده از سویه های *E. coli* به عنوان "کارخانه هایی" برای سنتز پروتئین، به دلیل سهولت استفاده و هزینه های پایین تر، یکی از قدیمی ترین و مشهورترین تکنیک های تولید بوده و به طور وسیعی در تولید صنعتی پروتئین های نوترکیب در سراسر دنیا به کار گرفته می شود.
- ژنوم *E. coli* کاملا" تعیین ترادف شده و اطلاعات مربوط به آن در پایگاه داده های عمومی موجود می باشد.
- تعداد زیادی از حامل های بیانی مشهور، برای تولید پروتئین هدف، به صورت داخل سلولی یا ترشح شده به پری پلاسم (غالبا" با تا خوردگی[2] صحیح) یا پروتئین فیوژن به راحتی در دسترس بوده و می توانند برای تخلیص سریع مورد استفاده قرار گیرند.
- *E. coli*، نقش تاریخی مهمی را در تولید پروتئین های تجاری مهم از قبیل هورمون ها، سیتوکین ها و آنزیم ها بازی کرده است.
- دانش قابل توجهی در رابطه با ژنتیک مولکولی و ابزارهای دستکاری ژنتیکی این باکتری ها، برای ایجاد هر یک از سویه های *E. coli* اصلاح شده با ویژگی های متنوع به دست آمده است.

[1] Coding
[2] Folding

- *E. coli* قادر به تولید مقادیر زیادی از پروتئین های نامتجانس[1] بوده و با رشد سریع و انبوه در بیوراکتورهای حاوی مواد مایع ارزان قیمت، به سهولت میزان تولید را افزایش می دهد.
- *E. coli* پروتئین ها را بدون بهسازی[2] هایی نظیر گلیکوزیلاسیون[3] تولید می کند. این مسئله خصوصا ً در مورد پروتئین هایی که نیازی به گلیکوزیلاسیون ندارند، مفید می باشد. چنانچه همان پروتئین ها در سیستم های دیگری (مثل مخمر) تولید شوند، که گلیکوزیله شده، یا کربوهیدرات های نابجایی به آن ها اضافه شود که منجر به غیرفعال شدن پروتئین بیان شده و ایجاد یک خطر بالقوه ایمونوژنسیتی[4] گردد، کاربرد چنین سیستم هایی می تواند مشکل ساز باشد.
- تولید پروتئین های درمانی در محیط کشت *E. coli* از مشکلات اساسی که در هنگام تولید این پروتئین ها در محیط کشت های سلولی پستانداران با آن مواجه می شویم نظیر مراحل اضافی، طولانی و پرهزینه به منظور تأیید حذف ویروس های خارجی که ممکن است در چنین شرایطی حضور یابند، جلوگیری می کند (۶۴).

با وجود این مزایا، یکی از مشکلاتی که در مورد بیان پروتئین های پستانداران در *E. coli* وجود دارد این است که بیشتر پروتئین های بیان شده به صورت اجسام نا محلول[5] تشکیل می گردند. ولی این مشکل با ترفندهایی نظیر استفاده از سیستم های بیانی پستانداران یا حشرات قابل حل است. از طرف دیگر رشد دادن *E. coli* در مقایسه با کشت های پستانداران و حشرات سریعتر و ارزان تر می باشد. بعلاوه، از آنجا که تعدادی از پروتئین ها در شکل طبیعی شان برای میزبان سمی اند، بنابراین بیان به صورت اجسام نامحلول تنها راه دست یابی به مقادیر زیادی از پروتئین های نوترکیب می باشد (۴۶).

[1] heterologous
[2] modifications
[3] glycosilation
[4] Immunogenicity
[5] Inclusion Bodies

سویه هایی از *E. coli* که به طور معمول برای بیان مورد استفاده قرار می گیرند، سویه های BL21 و K12 و مشتقاتشان هستند که همگی غیر بیماریزا بوده و ایجاد بیماری توسط آنها در میزبان بعید می باشد. به منظور غلبه بر مشکلات مربوط به بیان پروتئین، سویه های اختصاصی بیشماری ایجاد شده اند؛ از جمله سویه هایی که به منظور تسهیل تشکیل پیوندهای دی سولفیدی، کاهش فعالیت پروتئازی، بیان ژن های مصرف کنندهٔ کدون هایی که در *E. coli* نادر[1] بوده، همینطور متابولیسم و تا خوردگی کارآمدتر[2] پروتئین اصلاح شده اند (۵).

برای تولید یک پروتئین، ژن کدکنندهٔ آن باید در یک کاست بیانی در بردارندهٔ مناطق راه اندازی و تنظیم نسخه برداری و همچنین ترجمهٔ فرآوردهٔ پروتئینی قرار داده شود(۵).

۱-۲-۲-۲- بیان ژن به وسیلهٔ آغازگرهای[3] قوی و قابل تنظیم

حداقل نیاز برای یک سیستم بیانی کارآمد، حضور یک ترادف آغازگر قوی و قابل تنظیم در فرادست[4] ژن کلون شده می باشد. یک آغازگر قوی دارای میل ترکیبی بالایی نسبت به RNA پلی مراز بوده[5] و این باعث می شود که غالبا" منطقهٔ فرودست[6] مجاور به میزان زیادی نسخه برداری شود. توانایی تنظیمی آغازگر، سلول و نیز محقق را قادر می سازد تا میزان نسخه برداری را با یک روش دقیق کنترل کند. آغازگر مربوط به اپرون لاکتوز[7] *E. coli*، به صورت وسیعی در مورد ژن های کلون شدهٔ بیانی مورد استفاده قرار گرفته است. بهرحال، آغازگرهای دیگری نیز وجود دارند که دارای ویژگی های خاصی برای کنترل بیان مفید می باشند (۳۳).

ممکن است تصور شود که یک روش خوب برای بهینه سازی بیان ژن کلون شده، وارد کردن آن داخل یک پلاسمید و تحت کنترل آغازگری قوی است که دائما" نسخه برداری را به

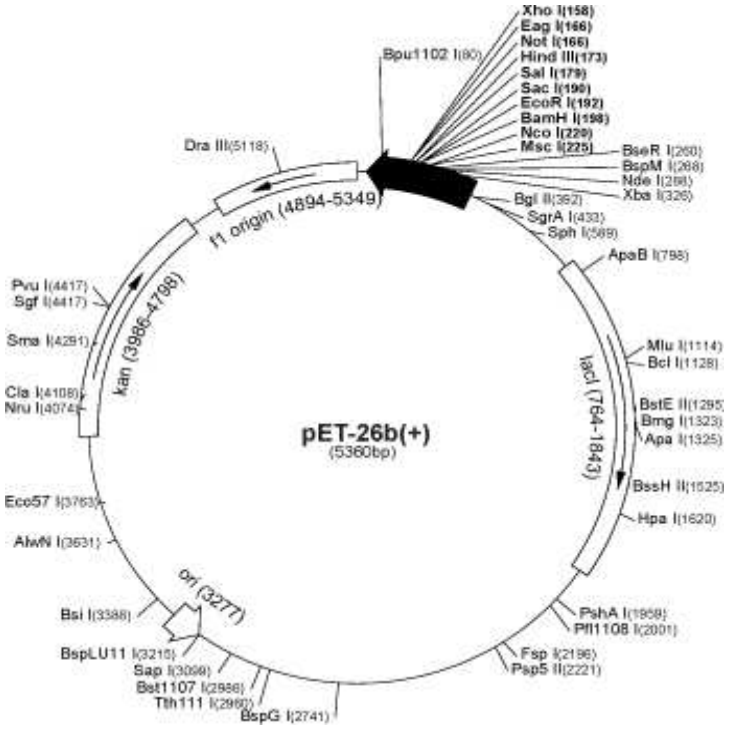
[1] rare
[2] more efficient
[3] promoters
[4] upstream
[5] RNA polymerase
[6] downstream
[7] *lac* (lactose) operon

راه می اندازد. اما توجه به این نکته ضروری است که، بیان زیاد و مداوم یک ژن کلون شده غالبا" برای سلول میزبان مضر می باشد زیرا با کاهش انرژی باعث صدمه زدن به وظایف حیاتی سلول میزبان می گردد. بعلاوه، تمام یا بخشی از پلاسمید حامل ژن کلون شده ای که دائما" بیان می شود ممکن است بعد از چندین چرخه تقسیم سلولی از دست برود چرا که سلول های فاقد پلاسمید سریع تر رشد کرده و سرانجام در محیط کشت غالب می شوند. ناپایداری پلاسمیدی، مشکل بزرگی است که ممکن است از تولید مؤثر فرآوردۀ ژن کلون شده در یک مقیاس وسیع، جلوگیری کند. برای غلبه بر این مشکل، بهتر است که نسخه برداری به صورتی کنترل شود که ژن کلون شده تنها در مرحلۀ ویژه ای از چرخۀ رشد سلول میزبان و همچنین تنها در یک دورۀ ویژه بیان شود. دست یابی به چنین مقصودی تنها با استفاده از یک آغازگر قوی قابل تنظیم میسر می شود. پلاسمید هایی که به منظور انجام چنین وظیفه ای ساخته شده اند، حامل های بیانی نامیده می شوند (۳۳).

۱-۲-۲-۲-۱- سیستم pET[1]

قدرتمندترین سیستمی که تا حال حاضر به منظور همسانه سازی و بیان پروتئین های نوترکیب در *E. coli* طراحی شده سیستم pET (شرکت نواژن[2]) می باشد. در این نوع پلاسمیدها ژن مورد نظر تحت کنترل توالی های رونویسی و (به طور اختیاری) ترجمۀ پرقدرت باکتریوفاژ T7 قرار می گیرد و بیان توسط فراهم آوردن ذخیره ای از T7RNA پلی مراز در سلول میزبان القاء می گردد. آنزیم RNA پلی مراز T7 پلی پپتیدی است که حدود ۹۸ KD بوده و به طور ویژه آغازگر اختصاصی خود را شناسایی می نماید و رونویسی را آغاز می نماید. این آنزیم بسیار فعال بوده و زنجیره RNA را هشت مرتبه سریعتر از RNA پلی مراز *E. coli* طویل می کند (۸۹). امروزه بسیاری از پروتئین های نوترکیب در این سیستم بیان می گردند.

[1] Plasmid for Expression by T7 RNA Polymerase
[2] Novagen



شکل ۱- ۲ مشخصات حامل بیانی pET 26b(+) برای بیان پروتئین های نوترکیب در *E. coli*.

حامل های pET ابتدا توسط Studyier و همکاران در سال ۱۹۸۶ معرفی شدند و مشتقات جدید آن دارای صفات تشدید شده ای به منظور تسهیل بیشتر همسانه سازی[1]، تشخیص و خالص سازی پروتئین هدف می باشد (۸۷)

میزبان های باکتریایی مناسب جهت کار همسانه سازی، سویه های HMSI7, HB101 NovaBlue DH5α, و JM109 از باکتری *E. coli* می باشند، که همگی آن ها فاقد ژن T7RNA پلی مراز می باشند. جهت تولید پروتئین نوترکیب، معمولاً″ پلاسمید pET نوترکیب به سویه هایی از *E. coli* که یک کپی کروموزومی از ژن T7RNA پلی مراز را دارا می باشند، منتقل می شود. این میزبان ها لیزوژن[2] های باکتریوفاژ DE3 (یک مشتق فاژ لامبدا) هستند، که دارای یک قطعه حاوی ژن *lacI* و ژن T7RNA پلی مراز تحت کنترل آغازگر *lacUV5* می باشد. این قطعه در ژن *int* داخل می گردد. به علت غیر فعال شدن ژن اینتگراز، DE3 برای هر

[1] Cloning
[2] lysogen