تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری *E. coli*

بسم‌الله الرحمن رحیم

فهرست مطالب

عنوان.....صفحه

پیشگفتار ۱

فصل ۱ ..... ۳

مقدمه ۳

۱-۱ کلونینگ ژن ۴

۱-۲ بیان پروتئین‌های نوترکیب ۷

۱-۳ میزبان‌ها یا سیستم‌های بیان پروتئین‌های نوترکیب ۹

۱-۳-۱ استفاده از میزبان E. coli در تولید پروتئین‌های نوترکیب ۱۲

۱-۴ آنزیم‌های محدودالأثر ۱۹

۱-۴-۱ جایگاه های شناسایی ۲۰

۱-۴-۲ انواع برش‌های ایجاد شده به وسیله آنزیم‌های محدودالأثر ۲۰

۱-۴-۳ انواع آنزیم‌های محدودالأثر ۲۲

فصل ۲ ..... ۳۱

مقدمه ۳۱

۲-۱ سویه‌ها ۳۱

۲-۲ سروتیپ‌ها ۳۳

۲-۳ محیط‌های کشت *E. coli* ۳۳

۲-۴ پلاسمیدهای طبیعی ۳۴

فصل ۳ ..... ۴۵
۳-۱ خصوصیات وکتورهای کلونینگ ۴۶
۳-۱-۱ وکتورهای مشتق شده از پلاسمیدها ۴۷
۳-۱-۱-۱ انواع ۴۷
۳-۱-۱-۲ روش‌های وارد کردن یا معرفی وکتورهای پلاسمیدی به سلول باکتری ۵۶
۳-۱-۲ وکتورهای مشتق شده از فاژها (وکتورهای ویروسی) ۵۹
۳-۱-۲-۱ فاژ لامبدا (λ) ۶۰
۳-۱-۲-۲ وکتورهای کاسمیدی ۶۹
۳-۱-۲-۳ وکتورهای مشتق شده از فاژهای تک رشته ۷۰
۳-۱-۲-۴ فاژمیدها ۷۵
۳-۱-۲-۵ وکتورهای با ظرفیت پذیرش قطعات بزرگ، کروموزوم‌هاي مصنوعي باکتریایي (BAC) ۷۸
فصل ۴ ..... ۸۱
مقدمه ۸۱
۴-۱ عناصر ضروری وکتورهای بیانی در *E. coli* ۸۳
۴-۱-۱ پروموتر ۸۳
۴-۱-۲ خاتمه دهنده‌های رونویسی و پایداری mRNA ۱۰۲
۴-۱-۳ عناصر مؤثر در آغاز ترجمه ۱۰۲
۴-۱-۴ خاتمه دهنده‌های ترجمه ۱۰۴
۴-۱-۵ کاربری کدون ۱۰۵

۲-۴ سیستم بیان ژن در ناقلpET تحت کنترل پروموترT۷ ..... ۱۰۸
۱-۲-۴ مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۱۹
۲-۲-۴ تنظیم بیان پروتئین در سیستم pET ۱۲۰
۱-۲-۲-۴ پروموتر T۷*lac* ۱۲۱
۲-۲-۲-۴ میزبان‌های pLysS و pLysE ۱۲۲
۳-۲-۲-۴ محیط حاوی گلوگز ۱۲۵
۴-۲-۲-۴ میزبان‌های pLacI ۱۲۵
۵-۲-۲-۴ سیستم pETcoco ۱۲۷
۳-۴ حلالیت و تعیین مکان سلولی ۱۲۹
۴-۴ برچسب‌های پپتیدی ۱۳۱
۱-۴-۴ تولید پروتئین‌های نوترکیب فاقد برچسب‌های فیوژنی ۱۳۳
۵-۴ تکنولوژیGateway ۱۳۴
۱-۵-۴ وکتورهای Gateway Nova pDEST ۱۳۶
۶-۴ میزبان‌های مناسب کلونینگ و بیانی ۱۴۰
مقدمه ۱۵۱
۱-۵ رسوبات درون سلولی (اینکلوژن‌بادی) ۱۵۲
۲-۵ مزایا و معایب تولید پروتئین نوترکیب بصورت اینکلوژن‌بادی ۱۵۵
۳-۵ بازیابی پروتئین‌ها از اینکلوژن‌بادی ۱۵۶
۱-۱-۳-۵ شکست دیواره سلولی ۱۵۸

۵-۳-۱-۲ ترسیب اینکلوژن‌بادی‌ها ۱۶۳
۵-۳-۲ محلول‌سازی اینکلوژن‌بادی‌ها ۱۶۳
۵-۳-۳ باز تاخوردگی یا فولد دوباره پروتئین‌های محلول شده ۱۶۴
۵-۳-۳-۱ متغیرهای فیزیکی و شیمیایی که بازده فولد دوباره پروتئین را افزایش می‌دهند ۱۶۵
۵-۳-۳-۲ روش‌های فولد دوباره ۱۷۰
۵-۴ راه کارهای غلبه بر مشکلات تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیتوپلاسم *E. coli* ۱۷۴
۵-۵ تقسیم‌بندی چاپرون‌های سیتوپلاسمی ۱۷۹
۵-۵-۱ چپرون‌های دخیل در ایجاد پیچش پروتئین ۱۷۹
۵-۵-۲ خانواده Hsp۱۰۰ (از باز شدن تجمعات پروتئینی تا پروتئولیز) ۱۹۱
فصل ۶ ..... ۱۹۹
مقدمه ۱۹۹
۶-۱ انواع مسیرهای ترشحی ۲۰۱
۶-۲ پپتید نشانه ۲۰۷
۶-۳ آنزیم‌های برش دهنده‌ی توالی‌های پپتید نشانه در باکتری *E. coli* ۲۱۰
۶-۴ تقسیم بندی چاپرون‌های پری‌پلاسمی ۲۱۲
۶-۵ پروتئازهای فضای پری پلاسمی ۲۱۷
۶-۶ روش‌های استخراج پروتئین‌های پری‌پلاسمی ۲۱۹
۶-۷ مهندسی مسیرهای ترشحی ۲۲۰
فصل ۷ ..... ۲۲۹

مقدمه ۲۲۹
۷-۱ تقسیم بندی برچسب‌های پپتیدی بر اساس اندازه ۲۳۰
۷-۲ تقسیم بندی برچسب‌های پپتیدی بر اساس عملکرد ۲۳۱
۷-۲-۱ برچسب‌های تمایلی ۲۳۴
۷-۲-۲ برچسب‌های افزایش دهنده حلالیت ۲۳۸
۷-۳ انتخاب برچسب مناسب ۲۴۲
۷-۴ وکتورهای بیانی pET حاوی برچسب‌های پپتیدی ۲۴۳
۷-۵ برش و حذف برچسب پروتئینی با استفاده از آنزیم‌های برشی اختصاصی ۲۴۵
فصل ۸ ..... ۲۴۹
مقدمه ۲۴۹
۸-۱ روش‌های جداسازی ژل الکتروفورز ۲۵۲
۸-۱-۱ اصول الکتروفورز ۲۵۲
۸-۱-۲ الکتروفورز ژل پلی آکریلآمید سدیم دودسیل سولفات ناپیوسته (**SDS-PAGE**) ۲۵۴
۸-۱-۳ ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF) ۲۵۸
۸-۱-۴ ردیابی پروتئین‌ها در ژل‌ها ۲۶۱
۸-۲ روش وسترن بلاتینگ ۲۶۲
۸-۲-۱ انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشاء ۲۶۲
۸-۲-۲ رنگ‌آمیزی ژل ۲۶۴
۸-۲-۳ مسدودسازی غشاء ۲۶۵

۸-۲-۴ تشخیص با آنتی‌بادی ۲۶۵
۸-۳ کروماتوگرافی ۲۶۶
۸-۳-۱ کروماتوگرافی طرد اندازه (SEC) یا ژل فیلتراسیون ۲۶۷
۸-۳-۲ کروماتوگرافی تعویض یونی (IEC) ۲۷۰
۸-۳-۳ کروماتوگرافی برهمکنش آبگریز (HIC) ۲۷۳
۸-۳-۴ کروماتوگرافی تمایلی ۲۷۵
۸-۳-۵ کروماتوگرافی بر روی عوامل کلاته‌کننده یا کروماتوگرافی تمایلی فلز تثبیت شده (IMAC) ۲۷۷
۸-۳-۶ کروماتوگرافی بر روی ماتریکس‌های گلوتاتیون ۲۸۰
منابع ۲۸۱
واژه‌نامه ۲۹۵
نمایه ۳۰۷

پیشگفتار

به نام آنکه هستی، نام از او یافت　　فلک جنبش، زمین آرام از او یافت

پروتئین‌ها ماکرومولکول‌های حیاتی در سلول زنده هستند. آنها در انواع واکنش‌ها و فرآیندهای سلولی از قبیل آبشارهای انتقال پیام، پاسخ‌های ایمنی، چسبندگی سلولی و سیکل سلولی دخالت دارند. بنابراین هرگونه اختلالی در تولید، ساختار و عملکرد آنها در سلول، بیماری‌هایی را به دنبال خواهد داشت. بسیاری از این بیماری ها با جایگزین کردن پروتئین معیوب با پروتئین سالم قابل درمان می‌باشند مثلا معرفی انسولین سالم به بیمار در درمان دیابت. با معرفی تکنولوژی DNA نوترکیب در سال ۱۹۷۰ پروتئین‌های دارویی بسیاری با استفاده از میزبان‌های مختلفی تولید شدند که البته این روش ایمن‌تر، سریع‌تر و ساده‌تر از استخراج و تخلیص پروتئین مربوطه از منابع طبیعی‌اش بود. در بین میزبان‌هایی که به منظور تولید پروتئین‌های دارویی استفاده می‌شوند، *E. coli* به لحاظ تولید سریع و مقرون به صرفه پروتئین هدف، ژنتیک کاملا شناخته شده و وکتورهای تجاری متعدد در دسترس جایگاه خاصی دارد. باید توجه داشت که نکات منفی نیز در استفاده از این میزبان وجود دارد که تلاش‌های گسترده‌ای در جهت رفع آنها انجام شده است. کتاب حاضر ضمن تشریح مفاهیم پایه تولید نوترکیب پروتئین‌ها، تکنیک‌های کاربردی در این زمینه را نیز در قالب هشت فصل جداگانه معرفی می‌کند لذا مطالعه این کتاب به کلیه دانشجویان و علاقمندان در زمینه بیوتکنولوژی توصیه می‌شود.

درگردآوری و تألیف این کتاب سعی شده است که از جملات ساده و روان و شکل‌های متعدد جهت انتقال بهتر مفاهیم استفاده شود، لیکن طبیعتا اشکالاتی وجود خواهد داشت. از این رو صمیمانه از شما خواننده گرامی خواستاریم تا در راستای بهبود کیفیت این کتاب در چاپ‌های بعدی کلیه اشکالات علمی و نگارشی مربوطه را با ما در میان بگذارید.

دکتر زهرا حاجی حسن

استادیار دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران