

بسم الله الرحمن الرحيم

روش‌های تولید پروتئین محلول

نویسندگان:

دکتر زهرا امینی بیات

(استادیار بیوشیمی پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران)

شب‌نم شمع ریز

سرشناسه: امینی بیات، زهرا، ۱۳۵۹ -

عنوان و نام پدیدآور: روش‌های تولید پروتئین محلول / تألیف زهرا امینی بیات، شبنم شمع ریز.

مشخصات نشر: تهران: نشر ایده‌نگار، ۱۳۹۴.

مشخصات ظاهری: ۱۰۸ ص: مصور (بخشی رنگی)، نمودار.

شابک: ۸-۸-۹۵۴۶۶-۶۰۰-۹۷۸

وضعیت فهرست‌نویسی: قیفا

یادداشت: کتابنامه: ص: ۶۹-۷۴.

موضوع: پروتئین -- تصفیه

موضوع: نوترکیبی پروتئین‌ها

شناسه افزوده: شابک ریز، شبنم، ۱۳۶۶ -

رده‌بندی کنگ: ۳۹۲ ر ۸ الف / QP ۵۵۱

رده‌بندی دیویی: ۵۴۷

شماره کتابشناسی ملی: ۵۰۳۷



www.iNegar.ir نشر ایده‌نگار

روش‌های تولید پروتئین محلول

نویسندگان: دکتر زهرا امینی بیات

شبنم شمع ریز

ناظر چاپ: منیر غریبی

صفحه‌آرایی و طراحی جلد: منیر غریبی

نوبت چاپ: اول، ۱۳۹۴

شمارگان: ۱۰۰

شابک: ۸-۸-۹۵۴۶۶-۶۰۰-۹۷۸

تکثیر تمام یا قسمتی از این اثر به هر شکل ممنوع است.

متخلفان بموجب قانون حمایت از مؤلفان، مصنفان و هنرمندان تحت پیگرد قانونی قرار می‌گیرند.

نشانی مرکز پخش: تهران، میدان فردوسی، خیابان ایرانشهر، پلاک ۱۶، طبقه سوم، واحد ۵

تلفن: ۲۱ و ۸۸۵۳۵۸۲۰ کدپستی: ۱۵۸۱۶۱۷۷۳۵ صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۷۶۴۳

حضرت علی علیه السلام می‌فرمایند:

ای کمیل، دانش بهر مال است. علم تو را پاسداری می‌کند و تو مال را نگهداری. مال با انفاق کم می‌شود و علم با انفاق افزوده می‌گردد. ای کمیل، اندوختگان دارایی از میان می‌روند و حال آن که دانشمندان باقی هستند تا زمانی که روزگار پا برجاست. وجودهای دانشمندان گم شده و صاحب‌های آنها در دل‌ها موجود است.

www.ketab.ir

مقدمه ناشر ۷/

دباجه نویسنده ۹/

درباره این کتاب ۱۳/

فصل اول: تاخوردگی پروتئین درون سلول زنده

۱.۱ فرایند طبیعی تاخوردگی پروتئینها درون سلول باکتری ۱۹/

۱.۱.۱ تنظیم کننده های سیتوپلاسمی تاخوردگی ۱۹/

۲.۱.۱ انتقال پروتئین ها به خارج از سلول ۲۳/

۳.۱.۱ تنظیم کننده های پلاسمی تاخوردگی ۲۶/

۴.۱.۱ پروتئولیز ۲۶/

۲.۱ روش هایی جهت افزایش دانه محلول پروتئین نو ترکیب و جلوگیری از تشکیل اجسام نامحلول ۲۷/

۱.۲.۱ مهندسی مسیرهای سیتوپلاسمی تاخوردگی ۲۷/

۲.۲.۱ مهندسی مسیرهای انتقال پروتئین ها ۳۱/

۳.۲.۱ مهندسی مسیرهای پری پلاسمی تاخوردگی ۳۱/

۴.۲.۱ جهش اسیدهای آمینه هیدرو فوبیک سطحی پروتئین به اسیدهای آمینه هیدروفیلیک ۳۲/

فصل دوم: اجسام نامحلول

۱.۲ مورفولوژی و ترکیب اجسام نامحلول ۳۹/

۲.۲ عوامل تعیین کننده مولکولی ۴۰/

۳.۲ عوامل تعیین کننده توالی ۴۲/

۴.۲ کیفیت پروتئین و دینامیک ۴۳/

فصل سوم: تاخوردگی مجدد پروتئین ها در خارج از سلول

۱.۳ شکستن سلولی ۵۲/

۲.۳ جداسازی اجسام نامحلول ۵۳/

۳.۳ محلول سازی اجسام نامحلول ۵۳/

۱.۳.۳ مکانیسم عمل اوره و گوانیدیم هیدروکلراید ۵۷/

۴.۳ خالص سازی قبل از تاخوردگی مجدد / ۵۸

۵.۳ مقدمه ای بر فرآیندهای تاخوردگی مجدد / ۶۴

۶.۳ انواع روش های تاخوردگی مجدد / ۶۴

۱.۶.۳ تاخوردگی مجدد به کمک رقیق سازی / ۶۵

۱.۱.۶.۳ Pulsed dilution تاخوردگی مجدد به کمک / ۶۶

۲.۶.۳ تاخوردگی مجدد به کمک دیالیز / ۶۶

۱.۲.۶.۳ تاخوردگی مجدد به کمک دیالیز یک مرحله ای / ۶۶

۲.۲.۶.۳ تاخوردگی مجدد به کمک دیالیز گام به گام / ۶۷

۳.۲.۶.۳ تاخوردگی مجدد به کمک دیالیز با غلظت کاهشی از دنا تورنت / ۶۷

۱.۶.۳ تاخوردگی مجدد به کمک کروماتوگرافی / ۶۸

۱.۲.۶.۳ تاخوردگی مجدد به کمک کروماتوگرافی انتخاب بر اساس اندازه / ۶۹

۲.۳.۶.۳ تاخوردگی مجدد به کمک کروماتوگرافی تعویض یونی / ۷۱

۳.۳.۶.۳ تاخوردگی مجدد به کمک کروماتوگرافی برهمکنش هیدروفوبیک / ۷۳

۴.۳.۶.۳ کروماتوگرافی تمایلی / ۷۴

۱.۴.۳.۶.۳ ماتریکس تمایلی / ۷۸

۲.۴.۳.۶.۳ خالص سازی در شرایط طبیعی در حضور دنا توره کننده / ۸۰

۳.۴.۳.۶.۳ خالص سازی پروتئین های غشایی / ۸۰

۴.۴.۳.۶.۳ اتصال غیر اختصاصی / ۸۱

۵.۴.۳.۶.۳ فرآیند خالص سازی / ۸۱

۵.۳.۶.۳ تاخوردگی مجدد به کمک سایر روش های کروماتوگرافی / ۸۱

۴.۶.۳ تکنولوژی فشار بالای هیدروستاتیک / ۸۴

۷.۳ روش های بخش نور: روشی منطقی برای طراحی دستورالعمل های تاخوردگی مجدد پروتئین / ۸۴

۱.۷.۳ بخش نوری ایستا / ۸۵

۲.۷.۳ بخش نور دینامیک / ۸۶

۸.۳ آنالیز تاخوردگی مجدد / ۸۸



به نام خدا

مقدمه ناشر

ن وَالْقَلَمِ وَمَا يَسْخَرُونَ

سوئند، قلم و آنچه می‌نویسند. و خداوند به قلم سوگند یاد می‌کند، شاید از آن‌رو که قلم پیوند دهنده انسان‌هاست به سبب آنچه می‌نویسند. و همین قلم، نماد فرهنگ و تمدن و پیشرفت است زیرا هنگامی که دانش به سبب نشر آن فراگیر شد، موجب پیشرفت شده و تمدن ساز خواهد شد.

شاید وضعیت سرائر کتابخوانی و الی‌میلی به نوشتن و مستندسازی یافته‌ها و آموخته‌ها در بین دانش آموخته‌های امروز سرزمین ما، بی‌ربط با عقب ماندگی کشورمان از قافله علم و فناوری نباشد. در حالی که قدمت نظام آموزش در کشور ما بیشتر از تاریخ برخی از کشورهای است که امروزه در دنیای فناوری پیشرو هستند، ناگزیری روش‌های آموزشی در مراکز آموزشی و دانشگاه‌های ما بر کسی پوشیده نیست. تغییر این شرایط علمی جدی می‌طلبد و بر همه ماست که دست به قلم ببریم و هر آنچه آموختیم را به کتاب درآوریم که رسوا، مهربانی فرموده است، دانش را به نوشتن در اختیار بگیرد و از علی این ابی طالب است که دانش با نوشتن پابند کنید زیرا آنچه حفظ شود بگردد و آنچه نوشته شود برقرار ماند. رشد فرهنگ نوشتن و مطالعه می‌تواند در درازمدت سبب رشد دانش و زمینه‌ساز پیشرفت بنیادین کشور شود.

ما و همکارانمان در نشر ایده‌نگار خداوند بزرگ را سپاس می‌گوییم که فرصتی را فراهم نمود تا در خدمت نشر ایده‌ها و دانش متخصصین ارزنده کشورمان باشیم.

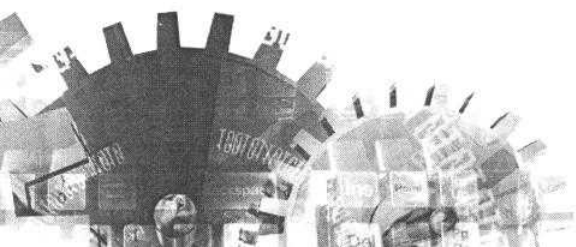
مزید امتنان خواهد بود شما خوانندگان و سروران گرامی ضمن بیگیری اخبار مربوط به کتاب‌های نشر ایده‌نگار در پایگاه اینترنتی انتشارات به آدرس www.iNegar.ir، با نقد این آثار و ارائه نظرات و پیشنهادات خود ما را در ارتقای کیفیت آثار یاری نمایید و موجب بهبود کیفیت علمی آثار نویسندگان شوید. همچنین در صورت تمایل می‌توانید کتاب‌ها و نرم‌افزارهای فنی و مهندسی را از طریق فروشگاه ایده‌نگار به آدرس www.Shop.iNegar.ir سفارش دهید و توسط پیک و یا پست

در محل مورد نظر خود تحویل بگیرید. این فروشگاه دارای نماد اعتماد الکترونیکی می‌باشد و در صورت خرید بیشتر از میزان تعریف شده، ارسال محصولات رایگان خواهد بود. در پایان از تک تک عزیزی که در شرکت مهندسان برنامه‌ریز و نوآور آراین (مبنا) و نشر ایده‌نگار در آماده‌سازی و چاپ این اثر نقش داشته‌اند کمال تشکر و سپاس را داریم. به امید سربلندی ایران و همه ایرانیان

سعید غریبی - هادی غریبی

نشر ایده‌نگار

www.ketab.ir



پروتئین‌های خالص و محلول دارای عملکرد، ابزارهای مهمی در زمینه پزشکی و آکادمی می‌باشند. داشتن ساختار مولکولی پروتئین‌ها به درک عملکرد فیزیولوژیکی آنها و نیز شناخت مسیرهای بیوشیمیایی و تنظیمی که در آنها دخیل می‌باشند، کمک می‌کند. صنایع دارویی و آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی به توسعه پروتئین‌های نو ترکیب علاقه بسیاری دارند. امروزه در آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی تولید پروتئین‌های خالص و عملکردی جزء مسائل اصلی و کلیدی است.

جداسازی پروتئین‌ها از منابع طبیعی آسان نبوده و علاوه بر آن پروتئین حاصل از نظر مقداری کافی نمی‌باشد. بنابراین تولید پروتئین نو ترکیب بهترین راه چاره است. در دهه ۱۹۸۰ توسعه مهندسی ژنتیک، تولید و بیان پروتئین‌های هدف را به شکل نو ترکیب با استفاده از میزبان‌های بیانی مخفف از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها و سلول‌های میزبان یوکاریوتی امکان‌پذیر ساخت.

در میان تمام این سیستم‌های بیانی، استفاده از انتروپاکتریوم اشرشیا کلی رایج‌تر است. این کارخانه میکروبی اولین سیستم بیانی بود که حدود ۴۰ سال پیش از این برای تولید پروتئین نو ترکیب استفاده شد و تا به امروز نیز نزدیک ۶۰٪ پروتئین‌های نو ترکیبی که در مقالات گزارش شده‌اند، با استفاده از این میزبان بیان شده‌اند.

دلایل اصلی استفاده از این باکتری عبارتند از: دانش ژنتیکی گسترده‌ای که در رابطه با آن وجود دارد، کاربرد آسان آن، هزینه پایین‌تر نسبت به سایر سیستم‌ها، وجود و نیز میزان بالای تولید پروتئین هدف در آن. با این وجود، استفاده از *E. coli* برای تولید پروتئین نو ترکیب با مشکلاتی نیز روبروست. برای مثال، بسیاری از تغییرات پس از ترجمه که در یوکاریوت‌ها اتفاق می‌افتند، مانند N و O گلیکوزیلاسیون، آمیداسیون، هیدروکسیلاسیون و ... در *E. coli* وجود ندارد. علاوه بر این بیان زیاد پروتئین نو ترکیب، منجر به تجمع پروتئین و تشکیل اجسام نامحلول درون استوبلاسم می‌گردد. بنابراین بیان و خالص‌سازی پروتئین‌های هدف به شکل محلول و با ساختاری غلیظ مشکل عمده در تولید پروتئین نو ترکیب در این میزبان است. با وجود تمام این مسائل، اگر پروتئین که قرار است بیان شود سینوبلاسمی بوده و فاقد تغییرات پس از ترجمه ذکر شده در بالا و ساختار چند دامینی باشد و نیز پیوند دی سولفیدی کمی داشته باشد، استفاده از *E. coli* به عنوان میزبانی برای آزمایش‌های اولیه تولید پروتئین پیشنهاد می‌گردد.

در تولید پروتئین نو ترکیب در *E. coli* برای آنالیزهای بیوشیمیایی، مصارف درمانی و نیز مطالعات ساختاری باید دو مرحله مهم را با موفقیت پشت سر گذاشت: (۱) پروتئین هدف به شکل محلول تولید گردد و (۲) خالص سازی و پایدار سازی ملکول دارای عملکرد، صورت گیرد.

در سه دهه گذشته تلاش های زیادی به منظور بهبود تولید پروتئین های نو ترکیب محلول و دارای عملکرد انجام شده است. این پیشرفت ها شامل توسعه سویه های بیانی مختلف و تنوع گسترده ای از پلاسمیدها تحت کنترل پروموتورهای مختلف یا استفاده از تگ های خاص می باشد. همچنین بیان همزمان پروتئین هدف با چپرون های مولکولی و نیز ایجاد جهش در ژن هدف انجام شده است. علاوه بر این، راه های رشد مختلف، میزان های مختلف القا و نیز تغییراتی در ترکیب محیط کشت متغیرهای مهمی هستند که با هدف بهبود حلالیت و خلوص پروتئین هدف مورد ارزیابی قرار گرفته اند. اما محلول شدن همیشه به معنای عملکردی بودن پروتئین نبوده و در اغلب موارد پروتئین به اشکال محلولی در می آید که تانخورده و غیرفعال بوده و تشکیل ساختار بلورین آن دشوار است. بنابراین پس از بیان پروتئین هدف باید ویژگی های پروتئین رسوب یافته را تعیین کرد. در انتها از آقای مهندس سعید غریبی که در تهیه این کتاب ما را یاری کردند نهایت تشکر را دارم و امیدوارم این کتاب برای دانش پژوهان و متخصصان رشته های مرتبط کشور مفید واقع شود.

زهرامین بیات

بایز ۱۱۹۴