



Scan online to view this article

Progress in *Escherichia coli* production of recombinant proteins

Shokofeh Rezaei, Ahmad Farhad Talebi*

Department of Microbial Biotechnology, Faculty of new Sciences and Technologies, Semnan University, Semnan, Iran

Abstract

Today, using genetic engineering, recombinant proteins can be produced in large volumes, desirable quality and low cost to meet the demands of different industries. The recombinant proteins can be expressed in various expression methods such as cell-free expression systems or prokaryotic or eukaryotic cells. Considering the advantages of using prokaryotic cells, one of the commonly used systems for the production of recombinant proteins is the cultivation of *Escherichia coli* (*E. coli*). The aim of the present study was to evaluate the expression of recombinant protein in *E. coli* and provide a suitable methods for achieving high cell density and maximal expression capability. Hence, by studying about 63 published articles in the field of genetic engineering, various expression systems were introduced for recombinant proteins production. In spite of many advantages and vast applications for this method of recombinant protein production, its use may include problems such as false folding, production of aggregated proteins and the absence of expression of soluble and active ones. Several approaches have been developed to increase the efficiency and solubility; change in the rate of synthesis of proteins, use of binding proteins, mutations in the target protein, simultaneous expression of molecular chaperones and optimization of culture conditions, are among different methods which is evaluated in this study. Virtual cloning has come into the context of developing more advanced software tools and databases and has been able to eliminate the limitations of recombinant expression of proteins in hosts with a different expression system.

Keywords: Virtual cloning, Prokaryotic host, Transformation, Expression systems, Recombinant protein

Corresponding author:

Department of Microbial Biotechnology, Faculty of new Sciences and Technologies, Semnan University,
Semnan, Iran
Email: aftalebi@semnan.ac.ir



بهبود تولید پروتئین‌های نو ترکیب در باکتری اشریشیاکلی

شکوفه رضایی، احمدفرهاد طالبی*

گروه زیست فناوری میکروبی، پردیس علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

چکیده

امروزه با استفاده از مهندسی ژنتیک، پروتئین‌های نو ترکیب می‌توانند در حجم انبوه، کیفیت مطلوب و هزینه پایین برای پاسخگویی به خواسته‌های صنایع مختلف تولید شوند. پروتئین‌های نو ترکیب می‌توانند در روش‌های بیانی مختلفی نظیر سیستم‌های بیانی عاری از سلول یا بر پایه سلول‌های پروکاریوتی یا یوکاریوتی بیان شوند. با توجه به مزایای استفاده از سلول‌های پروکاریوتی، یکی از سیستم‌های متداول برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب، استفاده از باکتری اشریشیاکلی (*E. coli*) است. هدف از مطالعه حاضر بررسی دقیق‌تر بیان پروتئین نو ترکیب در باکتری *E. coli* و ارائه راه‌کارهای مناسب برای دستیابی به کشت با تراکم سلولی بالا و با قابلیت بیان بیشینه است. از این رو با مطالعه حدود ۶۳ مقاله چاپ شده در زمینه مهندسی ژنتیک، سیستم‌های بیانی گوناگون برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب معرفی و سپس راهکارهای عمومی برای بیان بالاتر آنها بررسی شدند. رویکردهای متعددی برای افزایش بازدهی و حلالیت به کار گرفته شده است؛ تغییر سرعت سنتز پروتئین‌ها، استفاده از پروتئین‌های اتصال، موتاسیون در پروتئین هدف، بیان هم‌زمان چاپرون‌های مولکولی و بهینه سازی شرایط کشت از جمله روش‌هایی است که در این مطالعه ارزیابی شده‌اند. کلونینگ مجازی در بستر توسعه روش‌های نرم‌افزاری و پایگاه‌های اطلاعاتی غنی‌تر به کمک ابزار و آزمون‌های آزمایشگاهی آمده و توانسته است به رفع محدودیت‌های بیان نو ترکیب پروتئین‌ها در میزبان‌هایی با سیستم بیانی متفاوت منجر شود.

واژه‌های کلیدی: کلونینگ مجازی، میزبان پروکاریوتی، تراریختگی، سیستم‌های بیانی، پروتئین نو ترکیب.

مقدمه

پروتئین‌ها ماکرومولکول‌هایی هستند که در سیستم متابولیکی و کاتابولیکی موجودات زنده نقش مهمی ایفا می‌کنند. طی سال‌های ۱۹۷۱ تا ۱۹۷۳ دستاوردهای جدید مطالعه‌های ژنتیکی منجر به تحولاتی بنیادین در حوزه زیست‌شناسی مولکولی شد. به مجموعه روش‌های جدید ابداع شده فن‌آوری DNA نو ترکیب یا مهندسی ژنتیک گفته می‌شود. از جمله فعالیت‌های تکنیک مهندسی ژنتیک، کلون سازی ژن است که با این روش می‌توان ژن یک پپتید مورد

نویسنده مسئول:

گروه زیست فناوری میکروبی، پردیس علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
پست الکترونیکی: aftalebi@semnan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۷

نظر را از میزبان طبیعی جدا کرد و به ژنوم یک میزبان جدید انتقال داد. در نتیجه بیان این ژن هترولوگ، پپتید نو ترکیب توسط میزبان مورد نظر تولید خواهد شد.

به منظور تولید پروتئین‌های نو ترکیب، سیستم‌های بیانی مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرد. سیستم‌های بیانی را می‌توان به صورت زیر دسته‌بندی کرد:

(۱) سیستم‌های بیانی پروکاریوتی: شامل *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، *Acinetobacter calcoaceticus* و *Bacillus licheniformis* و سایر سلول‌های پروکاریوتی.

(۲) سیستم‌های بیانی یوکاریوتی: متشکل از سلول‌های پستانداران، گیاهان، حشرات، مخمرها و قارچ‌ها (۱).

(۳) سیستم‌های بیانی عاری از سلول: در این سیستم بیانی ابتدا سلول‌ها تخریب شده و عصاره سلولی تهیه می‌شود. سپس سوپسترا و نمک‌ها به این عصاره اضافه می‌گردد و بیان پروتئین با اضافه کردن الگو (mRNA) آغاز می‌شود (۲).

می‌توان در سه دسته تقسیم‌بندی کرد (جدول ۱). بیان پروتئین در سیستم‌های بیانی مختلف به نوع پروتئین و نوع مصرف آن نیز وابسته است (۴).

هریک از سیستم‌های فوق دارای مزایا و معایبی هستند. از مهم‌ترین عواملی که در انتخاب یک سیستم بیانی باید مدنظر قرار گیرد می‌توان به نوع و ساختار مولکولی ژنی که باید کلون شود، ساختار فیزیکی و شیمیایی پروتئین تولید شده، توانایی‌های سیستم بیانی و شرایط بهینه برای تولید پروتئین نوترکیب اشاره کرد (۳). به‌طور کلی پروتئین‌های نوترکیب را

جدول ۱. گروه‌های مختلف پروتئین‌های نوترکیب.

| گروه | شرایط کیفی و کمی | کاربرد |
|------|---|---|
| ۱ | بازده بالا، قیمت ارزان، خلوص متوسط | آنزیم‌های صنعتی مانند پروتئازها و لیپازها برای پودرهای رختشویی، پروتئین‌هایی استفاده شده در صنایع غذایی، افزودنی‌هایی مانند گلوکز اکسیداز |
| ۲ | خلوص بالا، بازده متوسط | آنزیم‌ها، پروتئین‌هایی که در تشخیص‌های <i>in vivo</i> استفاده می‌شوند، نظیر کلسترول اکسیداز، گلوکز دهیدروژناز یا پنی‌سیلین G آسیلاز |
| ۳ | کیفیت بالا، بیان پروتئین نوترکیب بایستی بر اساس دستورالعمل‌های FDA باشد | پروتئین‌های دارویی انسانی نظیر فاکتور فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی، انسولین |

۱-۱. مزایا و معایب باکتری *E. coli* در تولید پروتئین-

های نوترکیب

در سال ۱۸۸۵ باکتری *E. coli* توسط تئودور اش‌ریش باکتری‌شناس آلمانی کشف شد. این باکتری میله‌ای گرم منفی به صورت بی‌هوازی اختیاری و در بازه دمایی ۸ تا ۴۸ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کند. بیشینه دمای رشد آن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد است. علی‌رغم محدودیت‌های *E. coli* برای تولید برخی از پروتئین‌های بزرگ، ولی تاکنون پروتئین‌های مهم بسیاری با بکارگیری این میزبان تولید شده‌اند (۵). مزایای دیگر این باکتری میزبان عبارتند از: قابلیت بیان پروتئین‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی گوناگون، به‌دلیل مضاعف شدن سریع (حدود ۳۰ دقیقه) با بهره‌مندی از محیط کشت ساده و ارزان است. تخریب سلول‌های *E. coli* جهت جداسازی پروتئین هدف ساده است. هم‌چنین سازوکار تخمیر آن در اکثر کشورها گسترش یافته، وجود ناقلین بیانی و سویه‌های مهندسی شده کارآمد در *E. coli* سبب افزایش کارایی بیان پروتئین در حجم انبوه و نیز مقرون به صرفه شده‌است. در مقابل، از جمله مشکلات تولید پروتئین‌های نوترکیب در *E. coli* از دست رفتن ساختار فضایی طبیعی پلی‌پپتیدهای بالغ حین فرآیند تاخوردگی زنجیره‌های تازه سنتز شده‌است. عواملی مانند افزایش تراکم مولکولی پروتئین در نتیجه افزایش سطح بیان و تغییرهای عوامل محیطی این روند را

پیشرفت تکنولوژی سبب کسب اطلاعات بیشتر در زمینه توالی DNA، ساختار و فرآیند رونویسی ژنوم در گونه‌های مختلف شده است. این داده‌ها در پایگاه‌های اطلاعاتی DNA جمع‌آوری شده که شامل بسیاری از ژن‌هایی است که عملکرد بیولوژیکی آن‌ها هنوز کشف نشده است. با استفاده از ابزار آنالین بیوانفورماتیک می‌توان ژن‌های جدید و فرآیند رونویسی آن‌ها را شناسایی کرد. شناسایی ژن‌های جدید با استفاده از تجزیه و تحلیل پایگاه اطلاعاتی DNA به‌عنوان کلونینگ مجازی (*in silico cloning*) شناخته می‌شود. کلونینگ مجازی نه تنها اطلاعات جدیدی را در مورد ژن‌ها و عملکرد بیولوژیکی آن‌ها ارائه می‌دهد، بلکه ممکن است منجر به شناسایی داروها و کشف فعالیت‌های آن‌ها شود.

با توجه به اهمیت کاربردی که تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌تواند داشته باشد، هدف مطالعه حاضر ضمن بررسی شرایط بیان پروتئین نوترکیب و تأثیر عوامل مختلف بر بیان آن و بر شناخت سیستم‌های کارآمد جهت دستیابی به بیان بالاتر و بهینه سازی تولید پروتئین نوترکیب در باکتری *E. coli* در شرایط آزمایشگاهی متمرکز است.

۱. تولید پروتئین‌های نوترکیب در *E. coli*

تسریع می کنند. از دست رفتن کنفورماسیون علاوه بر کاهش سطح پروتئین های عملکردی، به دلیل در معرض بودن سطوح هیدروفوب، افزایش توده های پلی پپتیدی را در غالب اینکلوزن بادی منجر می شود. از جمله مشکلات دیگر این میزبان پروکاریوتی این است که توانایی حذف اینترون ها و هم چنین تغییرها پس از ترجمه یوکاریوتی مانند متیلاسیون، گلیکوزیلاسیون، تشکیل پیوندهای دی سولفیدی را ندارد، که به ترتیب می توان با جایگزین کردن cDNA مربوطه در ناقل و جستجوی میزبان مناسب برای اعمال تغییرهای پس از ترجمه برای رفع مشکلات فوق اقدام کرد. از سوی دیگر عدم

حضور سویه *E. coli* در لیست به طور کامل ایمن و قادر نبودن این میزبان در ترشح پروتئین نو ترکیب از دیگر معایب *E. coli* محسوب می شود.

با وجود تمامی مشکلات ذکر شده، هنوز *E. coli* به عنوان میزبان رایج در اکثر آزمایش ها مورد استفاده قرار می گیرد. در جدول ۲ خلاصه ای از مقایسه میزبان های رایج در تولید پروتئین نو ترکیب خلاصه شده است.

جدول ۲. سیستم های بیانی گوناگون برای تولید پروتئین های نو ترکیب (۶).

| میزبان | | سلول پستانداران | سلول حشرات | مخمر | <i>E. coli</i> |
|--------|------------------|-----------------|-------------|---------------|----------------|
| خصوصیت | سرعت رشد | آهسته | آهسته | سریع | بسیار سریع |
| | بازدهی بیان | کمتر از ۱ درصد | حدود ۳ درصد | بیش از ۱ درصد | ۱ تا ۵ درصد |
| | قیمت محیط کشت | بسیار زیاد | زیاد | کم | بسیار کم |
| | روش کشت | بسیار مشکل | مشکل | آسان | بسیار آسان |
| | هزینه تولید | بسیار بالا | بالا | پایین | بسیار پایین |
| | تا خوردن پروتئین | بسیار خوب | خیلی خوب | خوب | متوسط |
| | کارایی پروتئین | بسیار خوب | خیلی خوب | خوب | ضعیف |

۲-۱. فاکتورهای مهم در بیان پروتئین های نو ترکیب در *E. coli*

به منظور دست یابی به بیان بالای پروتئین نو ترکیب در *E. coli*، برخی از راه کارهای مؤثر در جدول ۳ خلاصه شده است. (۷).

جدول ۳. راه کارهای عمومی برای بیان بالاتر پروتئین نو ترکیب (۷).

| راهبرد | توضیح |
|-----------------------|--|
| سویه میزبان | سویه میزبان بر مقدار بیان تأثیر می گذارد. |
| نوع ناقل مورد استفاده | تعداد نسخه های ژن همراه با تعداد نسخه های ناقل افزایش می یابد. ماهیت و خصوصیات دیگر ناقل نیز در بازده کل تأثیر فراوانی دارد. |
| آنتی بیوتیک انتخابی | آنتی بیوتیک انتخابی بر مقدار بیان تأثیر می گذارد. |
| پروموتور | ضعیف یا قوی بودن پروموتور، قابل القاء بودن یا بیان دائم آن و میزان تنظیم پروموتور در بیان اثر دارد. |
| خاتمه دهنده رونویسی | کارآمدی و فاصله خاتمه دهنده در پایان رونویسی مهم است. |
| پایداری mRNA | پایداری mRNA در میزان ترجمه نقش دارد و وجود ساختارهای دوم به ویژه در انتهای ۵' نقش مهمی را در پایداری آن بازی می کند. |
| سیگنال های ترجمه | محل اتصال ریبوزوم و ساختارهای دوم در انتهای ۵' mRNA ممکن است بر میزان در دسترس بودن مکان اتصال ریبوزوم تأثیر گذار باشد. |
| کدون های غالب | استفاده از کدون های اصلی هر ارگانسیم در توالی قطعه کدشونده باعث افزایش بازده بیان می شود. |
| دما | دما نقش اساسی در تا خوردن پروتئین و پایداری آن بازی می کند. |
| شرایط کشت/ محیط کشت | شرایط رشد، میزان اکسیژن، سرعت رشد، منبع کربن و نوع فرمانتور نقش مهمی در میزان بیان دارند. |
| پروتئین ادغامی | اتصال پروتئین هدف به پپتیدهایی که بسیار محلول هستند می تواند باعث افزایش حلالیت، پایداری و افزایش بیان پروتئین شود. |

توضیحات کامل مربوط به مهمترین عوامل در ادامه مورد بحث قرار می گیرد.

۱-۲-۱. ناقلین پلاسمیدی

سیگنال ترشحی و خاتمه دهنده که بسته به پروتئین هدف در برخی وکتورها حضور دارد (۹).

یکی از عوامل مؤثر در سیستم بیانی حفظ پایداری و تعداد نسخه‌های ناقل است. افزایش تعداد نسخه‌های ناقل، افزایش سطح بیان ژن را به دنبال خواهد داشت. از این رو چنانچه ژن هدف توسط یک رپرسور کنترل می‌شود، با بالا رفتن تعداد نسخه‌های ناقل، مولکول‌های رپرسور و در پی آن فاکتورهای همانندسازی و نگهداری پلاسمید بیش‌تری باید فراهم شود. اغلب طی این شرایط سرعت رشد سلول میزبان نسبت به سلول‌های حاوی تعداد ناقلین کم‌تر کاهش می‌یابد (۱۰).

پروموتور: پروموتور کمابیش در ۱۰ تا ۱۰۰ جفت باز بالادست مکان اتصال ریبوزوم حضور دارد که به‌وسیله یک ژن تنظیم کننده کنترل می‌شود. پروموتورهای هگزا نوکلئوتیدی *E. coli* در محل ۳۵ جفت باز (ناحیه -۳۵) و ۶ جفت باز (ناحیه -۱۰) بالادست نقطه آغاز رونویسی حضور دارند. علاوه بر این پروموتورهای مشتق شده از باکتری گرم مثبت و باکتری‌فازها نیز در *E. coli* قرار دارند. حداقل نیاز یک ناقل بیانی کارآمد حضور توالی پروموتوری قوی با میل اتصال بالا به RNA پلیمرز که منتج به افزایش رونویسی ژن مطلوب گردد، است. ویژگی‌های یک پروموتور کارآمد عبارتند از: (۱) قوی باشد تا بیان پروتئین مطلوب را افزایش دهد. (۲) بیان نشستی پایین و قابلیت تنظیمی بالایی داشته باشد که بیان پروتئین تحت کنترل قرار گیرد. (۳) در میزبان‌های مختلف فعال باشد. (۴) القای آن ساده و مقرون به صرفه باشد (۱۱).

تنظیم کارآمد پروموتور برای تولید پروتئین‌هایی که در سلول تأثیرگذار هستند، ضروری است. به‌عنوان مثال آنزیم *EcoRI* در شرایط عدم حضور متیلاز اصلاح کننده و بیان ژن *Lon* سبب مرگ باکتری می‌شود. هم‌چنین عدم کنترل دقیق سیستم بیانی ممکن است پس از چندین چرخه تکثیر سلولی سبب حذف ناقل حاوی ژن هدف شود. به‌دلیل افزایش سرعت رشد در میزبان فاقد ناقل، لذا ناپایداری ناقلین یکی از معایب اصلی برای بیان کارآمد پروتئین نوترکیب در مقیاس بالا است. در نتیجه با به‌کارگیری پروموتور قوی و قابل تنظیم می‌توان

ناقلین بیانی بسیاری جهت بیان پروتئین نوترکیب در سویه *E. coli*، با اعمال دستکاری‌های ژنتیکی و به‌کارگیری عناصر مختلف کنترل کننده ژنتیکی که در رونویسی، ترجمه، پایداری پروتئین تأثیرگذار است، طراحی شده است. از جمله مهم‌ترین عوامل مولکولی که بیش‌تر مورد بررسی قرار گرفته، شامل موارد ذیل است (۸):

- ماهیت توالی پروموتوری؛ با این وجود که پروموتورهای بسیار قوی سبب رونویسی سطوح بالای RNA می‌شوند، *E. coli* قادر به بیان بسیاری از پروتئین‌ها نیست. در واقع عوامل تأثیرگذار دیگری به‌جز قدرت پروموتور وجود دارد، که در ادامه ذکر شده است.
 - ماهیت توالی خاتمه‌دهنده رونویسی؛ اتمام کارآمد رونویسی برای تحقق افزایش بیان ژن بسیار حائز اهمیت است. به‌طوری که توالی خاتمه دهنده سبب پایداری mRNA و در نهایت منجر به بالا رفتن سطح بیان پروتئین می‌شود.
 - قدرت مکان اتصال ریبوزوم (RBS).
 - تعداد نسخه ژن کلون شده (تعداد ناقل بیانی) در سلول؛ علی‌رغم تصورات عموم همیشه بالا بودن تعداد نسخه یک ناقل بیانی (قیاس با تعداد نسخه pBR322)، دلیل بر افزایش بیان پروتئین مطلوب نیست. در حال حاضر اغلب ناقلین بیانی با منشاء همانندسازی pBR322 یا pUC به‌صورت تجاری در دسترس هستند. هم‌چنین تغییر تعداد نسخه برای تنظیم بیان پروتئین در کم‌تر مواردی مورد بررسی قرار می‌گیرد.
 - مکان هدف قرارگیری پروتئین مطلوب در سلول میزبان.
 - کدون مصرفی.
 - تجزیه توالی پروتئینی؛ یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در تجمع توده پروتئینی توالی اسید آمینه‌ای آن پروتئین است. نخستین بار تأثیر انتهای آمینی جهت بررسی پایداری پروتئین در آزمایشگاه الکساندر ورشاوزکی انجام شد.
- اغلب حاملین سویه *E. coli* از ناقل pBR322 که حاوی منشاء همانندسازی *colE1* است، تشکیل می‌شوند. دلایلی که جهت استفاده از مشتقات ناقل فوق وجود دارد شامل شناخت کامل توالی DNA، آگاهی از مکانیسم‌های همانندسازی و تکثیر سلول است. عوامل مختلفی نظیر پروموتور و نشانگر انتخابی در اکثر ناقلین دیده می‌شود و هم‌چنین ژن گزارشگر،

رونویسی از ژن هدف را به گونه‌ای کنترل کرد که در یک بازه زمانی معین انجام شود.

پروموترهای قابل کنترل: پروموترهای قابل کنترلی که در *E. coli* استفاده می‌شوند، عبارتند از: پروموتر اپرون *lac*، پروموتر *trp*، پروموتر *tac*، پروموتر T5 از فاژ T5، پروموتر ژن ۱۰ از باکتریوفاژ T7 و پروموتر P_L از باکتریوفاژ λ. این پروموترها با استفاده از مهارکننده‌ها و یا فعال‌کننده‌ها تنظیم می‌شوند. مولکول‌هایی که توسط یک کلید قابل تنظیم برای روشن یا خاموش کردن رونویسی ژن‌ها فعالیت می‌کنند،

جدول ۴. پروموترهای به کار رفته در *E. coli* (۱۲، ۱۳).

| پروموتر | روش القاء | محاسن | معایب |
|----------------|---|--|---|
| Lac (lacUVS) | شیمیایی (IPTG)، القاء حرارتی | وجود دانش کافی، قابلیت القاء در دمای پایین، وجود محدوده‌هایی از سطوح القاء | بیان پایین نسبت به سایر سیستم‌ها، بیان نشستی |
| Trp | شیمیایی (IAA)، گرسنگی غذایی (تریپتوفان) | وجود دانش کافی، سطح بیان بالا، وجود ناقلین فراوان، قابلیت انجام کشت در دمای پایین | بیان نشستی |
| Tac | شیمیایی (IPTG)، القاء حرارتی | وجود دانش کافی، وجود ناقلین فراوان، بیان بالا، دارا بودن قابلیت القاء در دمای پایین | بیان نشستی |
| P _L | القاء حرارتی | وجود دانش کافی، بیان بالا | عدم انجام القاء کارآمد در دمای پایین، القاء ناقص |
| T7 | شیمیایی (IPTG) القاء حرارتی | وجود دانش کافی، بیان بسیار بالا، وجود ناقلین فراوان، دارا بودن قابلیت القاء در دمای پایین | بیان نشستی، مشکل بودن رسیدن به دانسیته سلولی بالا |
| PhoA | گرسنگی فسفات | امکان القاء در دمای پایین، بیان نسبتاً بالا | محدودیت محیط کشت |
| Ara | شیمیایی (آرابینوز) | وجود دانش کافی، دارا بودن تنظیم دقیق، دارا بودن القاء/مهار سریع، وجود طیف وسیعی از سطوح القاء، امکان القاء در دمای پایین | ناقلین محدود، مهار کاتابولیکی با گلوکز |
| XapA | شیمیایی (گزانوزین) | القاءکننده ارزان‌قیمت، امکان القاء در دمای پایین | عدم وجود اطلاعات کافی |
| Cad | pH اسیدی | بیان بالا، وجود طیف وسیعی از سطوح القاء، القاءکننده ارزان-قیمت | عدم وجود اطلاعات کافی، وجود ناقلین محدود |
| RecA | شیمیایی (نالیدیکسیک اسید) | بیان بالا، عدم نیاز به میزبان خاص | عدم وجود اطلاعات کافی |

شود: (۱) ناقل رونویسی: جهت بیان ژن هدف طراحی شده‌است که متشکل از جایگاه اتصال به ریبوزوم و کدون آغاز ATG هستند. (۲) ناقل‌های ترجمه‌ای: دارای جایگاه اتصال به ریبوزوم مؤثر، مربوط به پروتئین کپسید فاژ T7 هستند. این ناقل موقعیت چارچوب خواندنی (ORF) را نسبت به جایگاه کلونینگ *BamHI* از طریق یک پسوند تعیین می‌کند. علامت (+) به دنبال اسم ناقل حاکی از دارا بودن مبدأ همانندسازی F1 دارد. همچنین ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی-

امروزه سیستم بیانی pET قوی‌ترین سیستمی است که جهت بیان پروتئین نوترکیب به کار گرفته می‌شود. این سیستم بیانی توسط شرکت نواژن طراحی شده است. ناقل‌های pET که در سال ۱۹۸۶ توسط استادیر و همکاران شناخته شدند، ژن هدف را توسط توالی‌های رونویسی و ترجمه باکتریوفاژ T7 کنترل می‌کند و لذا بیان ژن توسط به کارگیری RNA پلی-مرز T7 در میزبان القاء می‌شود. آنزیم RNA پلی‌مرز T7 با قدرت زیاد هشت مرتبه سریع‌تر از RNA پلی‌مرز *E. coli* رونویسی را انجام می‌دهد. این ناقل از دو گروه تشکیل می-

سیلین و یا کانامایسین از جمله نشانگرهای انتخابی این ناقل است (۱۴).

سویه های JM109 و HMS174، HB101، DH5 α و E. coli میزبان های مناسبی برای سیستم بیانی pET هستند. تمامی سویه های مذکور فاقد ژن RNA پلی مرز T7 هستند، لذا ناقل pET برای بیان پروتئین مطلوب نیاز به میزبانی دارد که دارای یک نسخه کروموزومی از ژن RNA پلی مرز T7 باشد. این نوع میزبان لیزوژن DE3 است که از فاژ لامبدا مشتق می شود. میزبان مذکور متشکل از یک توالی واجد ژن *lacI* و ژن RNA پلی مرز T7 تحت کنترل پروموتور *lacUV5* هستند، که این پروموتور توسط IPTG القا می شود. توالی ذکر شده درون ژن *int* درج می شود. در نتیجه ژن *int* غیرفعال شده و DE3 با استفاده از فاژ کمکی می تواند به درون کروموزوم وارد و یا از آن خارج شود. از دیگر میزبان های رایج در بیان پروتئین نوترکیب BL21 است که فاقد پروتئازهای *lon* و *ompT* است. شرکت نواژن دو نوع از مشتقات این میزبان را ارائه داده است: (۱) نوع B834 که به دلیل عدم توانایی تولید متیونین می توان پروتئین مطلوب را با به کارگیری S-methionine یا Selenomethionine نشاندار نمود. (۲) نوع BLR که به دلیل عدم حضور *recA*، سبب بالا بردن بازدهی ناقل مونومری می شود (۱۵).

علی رغم اهمیت و مزایای سیستم بیانی pET، به کارگیری از آن معایبی از قبیل بیان نشتی پروتئین مطلوب در شرایط غیرالقای و ایجاد اینکلوزن بادی را به همراه دارد (۱۴). لذا با به کارگیری از ناقل های واجد پروموتورهای ترکیبی T7/lacO و توالی کدکننده رپرسور *lacI* می توان بر مشکلات این سیستم بیانی چیره شد. توالی اپراتور *lac* در پایین دست پروموتور T7 جای گذاری می شود. جهت گیری پروموتورهای T7/lacO و LacI مخالف جهت یکدیگر می باشد. هم چنین از نسخه برداری پروموتور *lacUV5* واقع در کروموزوم میزبان و نیز رونویسی از پروموتور T7/lacO ناقل، توسط RNA پلیمرز T7 توسط رپرسور *Lac* ممانعت می شود (۱۶).

۱-۲-۲. پروتئین های ادغامی

در سال های گذشته تولید انبوه پروتئین های نوترکیب به گونه ترکیب شده با اپی توپ های پپتیدی در صنعت دارو گسترش

یافته است. به کارگیری از این برچسب ها درجه خلوص پروتئین های نوترکیب را افزایش می دهد. لذا اهمیت استفاده از پروتئین های ادغامی در ادامه ذکر شده است: (۱) تخلیص آسان و سریع پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی جذبی، (۲) به ندرت ساختار و فعالیت زیستی پروتئین را تحت تأثیر می گذارد، (۳) حذف آسان و اختصاصی جهت دستیابی به پروتئین اصلی، (۴) سنجش ساده و بادقت پروتئین نوترکیب طی تخلیص و (۵) توانایی استفاده در طیف وسیعی از پروتئین ها.

دنباله های پپتیدی Poly-Arg، FLAG، Poly-C-myc، His- و S-tag رایج ترین برچسب های به کار گرفته شده هستند. تخلیص هر یک از دنباله ها در شرایط بافری خاص صورت می گیرد. اثر پروتئین های ادغامی کوچک بر ساختار سه بعدی و فعالیت زیستی پروتئین نوترکیب به موقعیت و ترکیب اسید آمینه های آن ها وابسته است. اگر چه پروتئین های بزرگ نیز جهت بالا بردن حلالیت پروتئین به کار گرفته می شوند. برای نمونه اتصال تیوردوکسین به پروتئین سبب افزایش قابلیت حل شدن آن و ممانعت از تشکیل اینکلوزن بادی در سیتوپلاسم سلول می شود. پروتئین A استافیلوکوکوس با افزایش حلالیت سبب ارتقا تاخوردگی پروتئین هدف شده و هم چنین با استفاده از پپتید راهنما در این پروتئین سبب ترشح پروتئین هدف به خارج از سلول می شود. علاوه بر تیوردوکسین برای ارسال پروتئین هدف به فضای پری پلاسم از DsbA استفاده می شود. با این وجود جهت ساخت کریستال و یا تولید آنتی بادی این دنباله های پپتیدی باید حذف شوند (۱۷، ۱۸).

از این رو بسته به ویژگی های زیست شیمی و عملکردی پروتئین هدف انتخاب مناسب ترین سیستم فیوژن بسیار مهم است. در ادامه ۲ نوع پرکاربرد این دنباله های پپتیدی معرفی می شود.

برچسب پلی هیستیدین (His-tag): هیستیدین محکم ترین پیوند را با بسترهای تثبیت شده با یون فلزی ایجاد می کند. لذا در بسیاری از موارد با به کارگیری کروماتوگرافی تمایلی فلز تثبیت شده (IMAC) قادر به تولید و تخلیص پروتئین های هدف خواهند شد. روی حلقه ایمیدازول

هستیدین، گروه‌های الکترون‌دهنده‌ای وجود دارند که به سرعت با کاتیون‌های فلزی پیوندهای کوردینانس ایجاد می‌کنند. پروتئین‌های دارای پلی-هستیدین پس از شستشوی بستر و با استفاده از کنترل pH بافر ستون یا افزودن ایمیدازول به آسانی جدا می‌شوند. طول برجسب پلی-هستیدین و سیستم حلالیت بر بازدهی تخلیص این سیستم تأثیرگذار است. محدودیت به‌کارگیری ایمیدازول به دلیل ایجاد توده پروتئینی و نیز تأثیرگذاری آن در بررسی کریستالوگرافی و مطالعه‌های رقابتی پروتئین هدف است. اتصال برجسب‌های پلی-هستیدین به پایانه C- یا N- به نوع پروتئین نو ترکیب بستگی دارد. در رابطه با اثر برجسب‌ها بر روی فعالیت زیستی پروتئین باید ذکر کرد که به دلیل طول کوتاه و مقدار ناچیز بار این برجسب‌ها به ندرت بر فعالیت پروتئین مؤثر هستند (۱۹).

S-tag: توالی S-tag یک دنباله پپتیدی با ۱۵ اسید آمینه است که به دلیل ترکیب اسید آمینه‌ای متشکل از ۴ اسید آمینه کاتیونی، ۳ اسید آمینه آنیونی، ۳ اسید آمینه قطبی بدون بار و ۵ اسید آمینه غیرقطبی قابلیت حل شدن دارد. S-tag بر پایه شکل‌گیری مجدد فعالیت ریبونوکلوئوتیک سنجیده می‌شود. پروتئین‌های برجسب‌دار با بسترهای حاوی S- پروتئین اتصال ایجاد می‌کنند و جهت خارج کردن پروتئین هدف به بافری با pH=۲ نیاز است. S-tag دارای قابلیت تخلیص پروتئین‌های نو ترکیب از سلول‌های پستاندارن، عصاره سلولی باکتری‌ها و سلول‌های حشره‌ای آلوده شده با باکولوویروس است. این سیستم به‌طور معمول به‌عنوان برجسب ادغامی دوم استفاده می‌شود (۲۰، ۲۱).

۱-۲-۳. مکان پروتئین در سلول

بیان سیتوپلاسمی: یکی از محدودیت‌های بیان سیتوپلاسمی پروتئین تشکیل اینکلوژن‌بادی‌ها است. لذا نیاز به فرآیند دوباره تاخوردن پروتئین و در نتیجه آن کاهش بازدهی تولید پروتئین و عدم اطمینان از این که آیا پروتئین فعالیت زیستی خود را حفظ کرده، به دنبال دارد. در حال حاضر تمامی عوامل مختلف فیزیکی و شیمیایی که منجر به تشکیل اینکلوژن‌بادی می‌گردد، شناخته نشده است. بررسی آماری ۸۱ پروتئین بیان کرده است که ۶ پارامتر می‌تواند در تشکیل اینکلوژن‌بادی نقش داشته باشند: (۱) معدل بار، (۲) تعداد زیرواحدهای تشکیل دهنده چرخش، (۳) بخش‌های پرولینی، (۴) بخش‌های سیستئینی، (۵) بخش‌های آبگریز و (۶) تعداد کل اسیدهای آمینه. در واقع دو پارامتر اول مؤثرتر هستند (۲۱، ۲۲). بر این اساس راه‌حلی برای کاهش ایجاد اینکلوژن‌بادی و ارتقا تاخوردن پروتئین ایجاد شده که عبارتند از: رشد باکتری در دمای پایین‌تر، گزینش سویه‌های باکتریایی مناسب، بیان به همراه چاپرون، جایگزینی اسیدهای آمینه، بهره‌مندی از تیوردوکسین *E.coli* ادغامی یا به‌صورت بیان هم‌زمان، رشد یا القاء سلول‌های در شرایط استرس اسمزی در حضور سوربیتول و گلیسیل بتائین، رشد در محیط حاوی قندهای غیرمتابولیزه، تنظیم pH مناسب و به‌کارگیری از سویه‌های فاقد تیوردوکسین ردوکتاز (۲۳، ۲۴).

با وجود تمام محدودیت‌ها ایجاد اینکلوژن‌بادی دارای مزایا نیز است که در جدول ۵ ذکر شده است.

جدول ۵. مزایا و محاسن بیان پروتئین در مکان‌های مختلف باکتری *E. coli* (۲۵).

| بیان سیتوپلاسمی: | | |
|--|--|--|
| مزایا | معایب | راه‌کار |
| ایجاد اینکلوژن‌بادی، تفکیک پروتئین‌ها با افزایش غلظت و خلوص، حفظ پروتئین هدف در برابر پروتئازها، به‌کارگیری سیستم‌های بیانی ساده‌تر، بیان پروتئین-هایی که در شکل فعال برای میزبان سمی هستند. | ایجاد اینکلوژن‌بادی، عدم حلالیت پروتئین، ملزم به تاخوردگی مجدد پروتئین برای حفظ فعالیت زیستی، عدم حفظ فعالیت زیستی پس از تاخوردگی مجدد، کاهش تولید نهایی محصول و بالا رفتن هزینه‌ها. | رشد در دمای پایین‌تر، استفاده از پروموتورهای سرمایی، استفاده از سویه‌های مناسب دیگر، بیان چاپرون‌ها، بیان پروتئین هدف به‌صورت ادغامی، به‌کارگیری سویه‌های فاقد تیوردوکسین ردوکتاز، اضافه کردن سوربیتول و گلیسیل بتائین، تنظیم pH، بهره‌مندی از سوکروز و رافینوز در محیط کشت، به‌کارگیری محیط‌های غنی شده |
| عدم توانایی ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی به دلیل احیایی بودن فضای سیتوپلاسم | | |

| | |
|---|--------------------------------|
| بیان میتونین آمینوپپتیداز | وجود میتونین در پایانه N- |
| استفاده از سویه‌های فاقد پروتئاز، جهش در جایگاه برش پروتئازها، بهره‌مندی از پروتئین‌های ادغامی، مهندسی کردن هیدروفوبیسیستی پروتئین، بهبود شرایط فرماتاسیون، بیان هم‌زمان ژن <i>pin</i> فاز T4، بیان چاپرون-ها، فیوز کردن چندین نسخه از ژن هدف | پروتئولیز پروتئین نوترکیب |
| بیان پروتئین با برجسب‌هایی با میل ترکیبی پیش‌بینی شده | پیچیده‌تر شدن فرآیند خالص سازی |

بیان پری پلاسمی:

| | | |
|---|--|---|
| راه‌کار | معایب: | مزایا: |
| به‌کارگیری پپتیدهای راهنمای مناسب‌تر، تغییر ساختار پپتید راهنما از طریق ایجاد جهش | عدم انتقال مؤثر پروتئین در حضور پپتید راهنما | تخلیص ساده‌تر به دلیل کاهش غلظت پروتئین هدف، کم شدن پروتئولیز پروتئین، ارتقا تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی و تاخوردگی پروتئین، حذف میتونین از پایانه N- |

| | |
|--|---|
| بیان هم‌زمان سیگنال پپتیداز | عدم برش پپتید راهنما از پایانه N- پروتئین هدف |
| بیان هم‌زمان <i>prlF</i> به‌کارگیری سویه‌های موتان <i>prlF</i> بیان هم‌زمان <i>priA</i> و <i>Sec</i> بیان ژن‌های <i>pspA</i> | اشباع مسیر انتقال پروتئین |
| جایگزینی اسیدهای آمینه، بیان پروتئین دی‌سولفید ایزومراز، بیان چاپرون‌ها | کاهش تاخوردن پروتئین‌ها |
| رشد در دمای پایین‌تر، محیط کشت حاوی سوکروز و رافینوز | ایجاد اینکلوزی‌بادی |

بیان در غشاء داخلی:

این سیستم جهت بیان پروتئین به صورت انبوه مناسب نمی‌باشد. این روش در تحقیق‌های فارماکولوژی، بررسی فعالیت آنزیمی استفاده می‌شود.

بیان خارج سلولی:

| | | |
|--|--|--|
| راه‌کار | معایب: | مزایا: |
| پیوند با پروتئین‌هایی که ذاتا ترشحی هستند، بیان هم-زمان ژن <i>kil</i> برای افزایش نفوذپذیری غشاء، بهره‌مندی از توالی راهنمای <i>ompA</i> بیان پروتئین رهاکننده باکتریوسین، بهره‌مندی از گلیسین، رشد در محیط حاوی گلیسین، به‌کارگیری پروتئین‌های ادغامی | کاهش کارآمدی ترشح پروتئین‌ها به خارج سلول | کاهش پروتئولیز، خالص سازی ساده‌تر، ارتقا تا خوردن پروتئین‌ها، ایجاد پایانه N- به صورت صحیح |
| افزایش غلظت پروتئین، کروماتوگرافی میل ترکیبی، بهره-مندی از بسترهای جاذب | کاهش غلظت پروتئین و پیچیدگی فرآیند تخلیص پروتئین | |

بیان در سطح سلول:

جهت بیان پروتئین به صورت انبوه مناسب نمی‌باشد. جهت گسترش واکسن‌ها، غربان کردن داروها، کاتالیز کننده‌های زیستی، بررسی برهم‌کنش پروتئین- پروتئین به‌کار گرفته می‌شود.

سایتوکین‌ها)، سبب از بین رفتن فعالیت فیزیولوژیکی این مولکول می‌گردد. علاوه بر این حضور میتونین آغازی سبب تغییر ساختار فضایی هموگلوبین و نیز سبب نتیجه منفی در ویژگی ایمونولوژیک پروتئین‌های دارویی می‌شود. با بهره‌مندی از تولید هم‌زمان میتونین آمینوپپتیداز می‌توان میتونین آغازی باقی‌مانده را از پروتئین هدف حذف کرد (۲۵).

بیان سیتوپلاسمی یک ژن توسط کدون آغازگری که به‌طور عمومی اسیدآمینه میتونین را کد می‌کند، راه‌اندازی می‌شود. اغلب حضور میتونین آغازی تأثیری بر ساختار پروتئین ایجاد نمی‌کند، اما در موارد خاص باقی‌ماندن این اسیدآمینه اضافی در زنجیره پروتئینی آثار منفی به‌جای می‌گذارد. به‌عنوان نمونه میتونین اضافی در RANTES (عضوی از خانواده

۱-۲-۴. تجزیه پروتئینی

باکتری *E. coli* حاوی آنزیم‌های پروتئازهای بسیاری است که با تنظیم فرآیند پروتئولیز به صورت اختصاصی و غیراختصاصی نقش مؤثری در فیزیولوژی سلول ایفا می‌کنند. برای مثال، آنزیم سیگنال پپتیداز *l*، پروتئاز اختصاصی است که حذف پپتید راهنما از انتهای آمینی پروتئین‌های انتقال داده شده به خارج سلول را برعهده دارد. علاوه بر این فرآیند پروتئولیز اختصاصی در پاسخ به شرایط محیطی SOS نیز توسط RecA دیده می‌شود.

فرآیند پروتئولیز غیراختصاصی طبق شرایط رشد متفاوت است. برای نمونه، به طور معمول پروتئین‌های غیرطبیعی و یا پروتئین‌هایی که تاخوردگی صحیح خود را از دست داده‌اند، در شرایط مختلف رشد تجزیه می‌شوند. علی‌رغم این‌که تخریب پروتئین طی مراحل اولیه کمبود مواد غذایی افزایش می‌یابد، اما به تدریج در شرایط تداوم کمبود مواد غذایی شدت آن کاهش می‌یابد. برای مثال بیشینه فعالیت پروتئاز Clp، در انتهای فاز رشد تصاعدی و ابتدای فاز سکون مشاهده شده است (۲۶، ۲۷).

Tobias و همکاران (۲۸) جهت به حداقل رساندن پروتئولیز در باکتری *E. coli* قانونی به نام «انتهای N» را بیان کردند. در واقع این قانون حاکی از رابطه مستقیم پایداری متابولیکی پروتئین با اسیدهای آمینه انتهای آمینی است. برای مثال با افزودن اسیدهای آمینه تریپتوفان، لیزین، آرژنین، لوسین، و تیروزین در انتهای آمینی پروتئین مورد آزمایش نیمه عمر آن ۲ دقیقه افزایش می‌یابد. در صورتی که دیگر اسیدهای آمینه به جز پرولین ۱۰ دقیقه به نیمه عمر پروتئین می‌افزاید. حضور اسیدهای آمینه با زنجیره جانبی کوتاه پس از میتونین آغازی حذف آن را از طریق میتونین آمینو پپتیداز سرعت می‌بخشد. طبق مطالعه‌های حاضر، جایگیری لوسین در موقعیت دوم (بعد از حذف میتونین) سبب ناپایداری پروتئین می‌شود. عامل مهم دیگر حضور اسید آمینه لایزین در انتهای آمینی است که در پروتئولیز نقش دارد. اسید آمینه لایزین با اتصال به زنجیره مالتی یوبیکویتین منجر به تجزیه پروتئین توسط پروتئازهای وابسته به یوبیکویتین در یوکاریوت‌ها می‌گردد. همچنین طبق نظریه PEST رابطه میان نوع اسید

آمینو و ناپایداری پروتئین مطرح شده است. بر اساس آنالیز بیوانفورماتیکی، نواحی غنی از اسیدهای آمینه ترئونین، سرین، گلوتامیک اسید و پرولین که به وسیله اسیدهای آمینه خاصی احاطه شده‌اند به دلیل فسفوریله شدن PEST باعث افزایش اتصال کلسیم و در نتیجه افزایش فرآیند پروتئولیز توسط پروتئازهای وابسته به کلسیم می‌گردد (۲۹).

راه‌حل‌های جهت کاهش تجزیه پروتئین‌ها ارائه می‌شود: (۱) انتقال پروتئین هدف به فضای پریپلاسم و یا ترشح به خارج سلول، (۲) به کارگیری سویه‌های فاقد پروتئاز، (۳) رشد سلول در دمای پایین، (۴) بیان پروتئین‌های ادغامی، (۵) اتصال متوالی چندین کپی از ژن مطلوب، (۶) تولید هم‌زمان چارپون-ها، (۷) بیان هم‌زمان ژن *pin* باکتریوفاژ T4، (۸) قرار گرفتن برخی اسیدهای آمینه با اسیدهای آمینه خاص جهت حذف مکان برش پروتئازها، (۹) بهبود هیدروفوبیسیته پروتئین نو ترکیب و (۱۰) بهینه کردن شرایط فرمانتاسیون (۳) و (۳۰).

در سلول *E. coli* به علت کم بودن تعداد پروتئازهای پری-پلاسم نسبت به سیتوپلاسم لذا فرآیند پروتئولیز در فضای پری پلاسم کم‌تر از سیتوپلاسم رخ می‌دهد. برای نمونه پروانسولین انتقال یافته به پریپلاسم در حدود ۱۰ مرتبه پایدارتر از زمانی است که آن پروتئین در سیتوپلاسم بیان می‌شود. علی‌رغم وجود فعالیت پروتئولیتیک در فضای پری-پلاسم، ترشح پروتئین به خارج از سلول راهکار موفق‌تری است. متأسفانه در حال حاضر فناوری ترشح پروتئین نو ترکیب به وسیله باکتری *E. coli* گسترش پیدا نکرده است (۳۱).

القاء پروتئین‌های شوک حرارتی طی پاسخ به شرایط تنش‌زا، سبب بیان ژن *Lon* و تولید پروتئاز La و پروتئازهای دیگر می‌شود، بنابراین افزایش تجزیه پروتئین را به همراه خواهد داشت. راه‌حل این مشکل بهره‌مندی از سویه‌های فاقد جایگاه ژنی *rpoH* است. ژن *rpoH* کد کننده زیرواحد $\sigma^{۳۲}$ سی RNA پلی‌مراز است که در ایجاد فرآیند پروتئولیز باکتری *E. coli* ایفای نقش می‌کند. اغلب برای بیان پروتئین نو ترکیب از سویه‌هایی که در توالی ژن *rpoH* و Clp La آن‌ها جهش ایجاد شده، استفاده می‌شود. ولی باید متذکر شد که عدم وجود پروتئازها و در نتیجه افزایش توده‌های پروتئینی غیر طبیعی، ایجاد سمیت در میزبان را می‌افزاید (۳۲).

۳-۱. راه‌حل‌های کاهش تاخوردگی نادرست پروتئین و ممانعت از تشکیل اینکلوزن‌بادی

۱-۳-۱. به‌کارگیری چاپرون‌ها

در بیان بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب، تاخوردگی نادرست پروتئین مشاهده می‌شود. طبق توضیحات بخش بیان سیتوپلاسمی چند راه‌کار جهت کاهش ایجاد اینکلوزن بادی ارائه شد. تحت شرایط تنش محیطی و یا اتمام زود هنگام ترجمه منتج به از دست رفتن ساختار فضایی پروتئین و ایجاد اینکلوزن بادی می‌شود. این مشکلات با بهره‌مندی از مکانیسم‌های محافظت‌شده سلول برای تازدن مجدد پروتئین و افزایش حلالیت پروتئین قابل حل شدن است. چاپرون‌های مولکولی موجود در سلول واسطه‌های تازنده پروتئین هستند. هم‌چنین چاپرون‌ها در حفظ کیفیت و پایداری پروتئوم بسیار تأثیرگذار هستند (۳۰).

علی‌رغم بیان همیشگی چاپرون‌ها در سلول، در شرایطی نظیر شوک گرمایی یا در شرایط استرس بیان آن‌ها افزوده می‌شود. به همین دلیل آن‌ها را به پروتئین‌های استرسی و یا پروتئین‌های شوک گرمایی (Hsps) تقسیم‌بندی می‌کنند (۳۳). چاپرون‌ها را طبق مکانیسم عمل آن‌ها به ۳ بخش طبقه‌بندی می‌کنند. چاپرون‌های تازنده^۱ متشکل از GroEL و DnaK هستند که با بهره‌مندی از ATP فعالیت می‌کنند. چاپرون‌های نگه‌دارنده^۲ نظیر IbpB که پروتئین‌های نیمه تاخوردگی را تا کم شدن شرایط تنش‌زا بر سطح خود نگه می‌دارند و دسته سوم چاپرون‌های تجزیه‌کننده^۳ مانند ClpB که در شرایط استرس سخت مانع از تجمع توده‌های پروتئینی می‌شود.

در سیتوپلاسم *E. coli* سیستم‌های چاپرونی DnaK- DnaJ-GrpE، GroEL-GroES و Trigger Factor پروتئینی تاخوردن مجدد پروتئین‌ها نقش دارند (۳۴، ۳۵). TF پروتئینی است که به جایگاه خروج پپتید ریبوزوم متصل می‌شود. DnaK ممکن است پروتئین‌های تازه ساخته شده را

¹ Folding Chaperones

² Holding Chaperones

دربگیرد. DnaK و GroEL با کمک نگه‌دارنده‌ها در تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها نقش دارند (۳۶). Hsp نگه‌دارنده‌ای است که بیش‌تر مطالعه شده است. Hsp33 که در شرایط القای حرارتی کشف شد، در حالت تعادل یک مونومر احیاء شده است. زمانی که سلول در معرض اکسیژن فعال قرار گیرد، تشکیل پیوند دی سولفیدی درون مولکولی سبب ایجاد چاپرون فعال با ساختار فضایی دایمر می‌شود (۳۷).

باکتری *E. coli* با پراکنده کردن توده‌های پروتئینی به‌وسیله ClpB قادر به مقابله با شرایط استرس سخت است. ClpB عضوی از خانواده Hsp100 است که شامل ClpA، ClpX و ClpY است. نقش اولیه این چاپرون‌ها در تجزیه پروتئین است (۳۸). برای مثال بیان پروتئین آلدئید دهیدروژناز 3A1 (ALDH3A1) قرنیه انسانی در باکتری *E. coli*، به دلیل حلالیت و درجه خلوص پایین این پروتئین با مشکل مواجه می‌شود. لذا برای بهبود حلالیت و افزایش سطح بیان، پروتئین نوترکیب ALDH3A1 با ۶ دنباله هیستیدینی ادغام شده و به‌صورت هم‌زمان با دو گروه از چاپرون‌های مولکولی GroES/GroEL و DnaK/DnaJ/GrpE بیان شده است. در نهایت مقدار چشم‌گیر پروتئین نوترکیب ALDH3A1 به فرم محلول و فعال در *E. coli* تولید شده است (۳۹).

۱-۳-۲. کاهش سرعت تولید

کاهش سرعت تولید پروتئین فرصت مناسبی برای ایجاد تاخوردگی صحیح پروتئین فراهم می‌کند. از موثرترین روش‌های کاهش تولید پروتئین، کاهش دمای انکوباسیون است (۴۰). دمای پایین سبب کاهش تجمع پروتئین می‌شود، که در درجه حرارت بالاتر به دلیل وابستگی دما به برهم‌کنش‌های هیدروفوبی حائز اهمیت است (۴۱، ۴۲). زمانی که میزبان با مشکل تشکیل اینکلوزن بادی مواجه است، بیان پروتئین نوترکیب باید در محدوده دمایی ۲۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد انجام شود. اگرچه گزارشی بیان موفق را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت توصیف کرده است (۴۳). با این حال بیان پروتئین در دمای خیلی پایین سبب کاهش سرعت رشد سلول و کاهش غلظت پروتئین می‌شود. لذا ممکن است چاپرون‌های مولکولی به اندازه کافی کارآمد نباشند، در نتیجه

بودن، فاقد فعالیت زیستی باشند. برای مثال در فرآورده‌های درمانی مانند فاکتور انعقادی Xa یا اینتروپپتیداز، دنباله ادغامی به‌طور معمول کارآمد نیست، لذا باید حذف شود (۴۹).

۱-۳-۴. پروتئین NusA

علی‌رغم این‌که پروتئین‌های ادغام شده برای افزایش قابلیت انحلال‌پذیری، بایستی از انحلال‌پذیری بالایی برخوردار باشند ولی تنها این خصوصیت کافی نیست و تاکنون مکانیسم دقیق پروتئین‌ها شناخته نشده‌است. علاوه بر مکانیسم عمل افزایش انحلال‌پذیری، تأثیر پروتئین‌های ادغامی بر ممانعت از تشکیل انکلوژن بادی به‌طور کامل آشکار است. علی‌رغم این‌که پروتئین‌های ادغامی انحلال‌پذیر، تاخوردگی صحیح پروتئین هدف را تسهیل می‌کنند، اما کارآمدی تاخوردگی پروتئین بیش‌تر بسته به پروتئین هدف نیست. تاکنون برای افزایش انحلال‌پذیری، پروتئین‌های ادغامی گوناگون نظیر پروتئین‌های متصل شونده به مالتوز و NusA معرفی شده‌اند (۵۰). لازم به ذکر است که کارایی و ویژگی‌های زیست‌شیمی این پروتئین‌های ادغامی متفاوت از یکدیگر است. پروتئین NusA علاوه بر افزایش حلالیت، اغلب سبب بهبود تاخوردگی پروتئین هدف نیز می‌شود. برخی پروتئین‌های نامحلول در *E. coli* با اتصال انتهای آمینی پروتئین هدف به NusA به فرم محلول بیان خواهند شد. به‌طور معمول پروتئین NusA به‌صورت اتصال به دنباله هیستیدین به‌کار گرفته می‌شود (۵۱).

۱-۳-۵. انتقال به فضای پری پلاسمی

پروتئین هدف‌گذاری شده برای هدایت به فضای پری‌پلاسمی و یا خارج سلولی، باید از طریق غشای سیتوپلاسمی انتقال یابد. اغلب از طریق مسیرهای ترشحی عمومی که متشکل از پروتئین‌های غشایی نظیر SecA, SecY, SecE, SecG است، عبور می‌کنند. پروتئین‌ها برای انتقال اغلب دارای یک نقطه با تاخوردگی کم و یا حاوی پپتید راهنما هستند. پپتید راهنما یک دنباله آمینی ۳۰-۸ اسیدآمینه‌ای است که در حین انتقال دنباله مذکور به‌وسیله آنزیم سیگنال پپتیداز حذف می‌شود. در فضای پری‌پلاسمی چاپرون‌های خاصی وجود دارد که در تاخوردگی صحیح پروتئین و تشکیل پیوند دی‌سولفیدی نقش به‌سزایی دارد. به‌علت فضای احیاکنندگی موجود در

تاخوردگی پروتئین تحت تأثیر قرار گیرد (۴۴). مثال شناخته شده از این استراتژی عبارتند از: بیان هم‌زمان چاپرون‌های سازگار با سرما برای ایجاد تاخوردگی صحیح پروتئین نوترکیب است. بیان هم‌زمان همولوگ سرمادوست چاپرون GroELS باکتری *E. coli* که در واقع چاپرون Cpn60 و Cpn10 از باکتری *Oleispira antarctica* است، برای باکتری *E. coli* یک سیستم تازنده کارآمد در دمای ۱۲-۴ درجه سانتی‌گراد فراهم می‌آورد. در نتیجه سبب بهبود رشد میزبان در دمای پایین و افزایش حلالیت پروتئین می‌گردد (۴۵).

۱-۳-۳. به‌کارگیری فناوری پروتئین ادغامی

یکی از مشکلات طرح‌های پروتئومیک عدم حلالیت پروتئین‌های نوترکیب است. مطالعه‌ها بیانگر این است که در باکتری *E. coli* فقط نیمی از پروتئین‌های نوترکیب (حتی پروتئین‌های با منشأ باکتریایی) به‌صورت محلول بیان می‌شوند. طی سال‌های اخیر ثابت شده است که برای ارتقا حلالیت پروتئین‌های نوترکیب، می‌توان آن‌ها را با پروتئین‌های حامل با قابلیت انحلال بالا فیوز کرد. باید دقت کرد که تمامی پروتئین‌ها با قابلیت انحلال‌پذیری بالا جهت افزایش حلالیت کارآمد نیستند (۴۶، ۴۷). جهت کاهش ایجاد انکلوژن بادی راه‌حل دیگری مطرح می‌شود، که ژن هدف را در انتهای ۳' ژن کدکننده محصولی که به فرم محلول و مقدار بالا بیان می‌شود، درج کنند. این پروتئین‌های ادغامی متشکل است از: پروتئین متصل شونده به مالتوز Male از باکتری *E. coli* (فاقد پپتید راهنما برای هدایت به خارج سلول)، تیوردوکسین، گلوکاتینون ترانسفراز از شیستوزوما، پروتئین A استافیلوکوکی. برای مثال اینترلوکین‌های IL2, IL3, IL4, IL6 حتی در دمای ۱۵°C نیز به‌صورت اینکلوژن بادی بیان می‌شوند، اما بعد از ادغام توالی ژن آن‌ها به ژن تیوردوکسین trxA، هریک از پروتئین‌های نوترکیب به فرم محلول حاصل می‌شوند و تا ۲۰ درصد کل پروتئین سلول را تشکیل می‌دهد (۴۸).

علی‌رغم موفقیت آمیز بودن این سیستم، ممکن است میزان تاخوردگی‌های نادرست پروتئین‌های ادغامی حتی نسبت به نوع غیرادغامی پروتئین هدف افزایش یابد و یا با وجود محلول

آلکالین فسفاتاز *E. coli*، مالتاز، اوروکیناز و فعال کننده پلازمینوزن بافتی هستند.

به تازگی سوبه‌های مهندسی شده نظیر *Origami* و *Shuffle* عرضه شده است که حاوی جهش در دو ژن تیوردوکسین ردوکتاز و گلوکاتایون اکسیدوردوکتاز هستند. برای جایگزینی انتقال پروتئین به فضای پری‌پلاسمی می‌توان با بهره‌مندی از این سوبه‌های جدید پروتئین‌ها را درون سیتوپلاسم با حفظ فرم فعالشان بیان کرد. هم‌چنین با به‌کارگیری دی‌سولفید ایزومراز DsbC به بیان درون سیتوپلاسمی پروتئین هدف افزوده می‌شود (۵۴، ۵۵).

۲. کلونینگ مجازی (*in silico* cloning)

پیشرفت تکنولوژی سبب کسب اطلاعات بیش‌تر در زمینه توالی DNA، ساختار و فرآیند رونویسی ژنوم در گونه‌های مختلف شده است. این داده‌ها در پایگاه‌های اطلاعاتی DNA جمع‌آوری شده که شامل بسیاری از ژن‌هایی است که عملکرد بیولوژیکی آن‌ها هنوز کشف نشده است. با استفاده از ابزارهای آنلاین بیوتکنولوژی می‌توان ژن‌های جدید و فرآیند رونویسی آن‌ها را شناسایی کرد. شناسایی ژن‌های جدید با استفاده از تجزیه و تحلیل پایگاه اطلاعاتی DNA به‌عنوان کلونینگ مجازی شناخته می‌شود. کلونینگ مجازی نه تنها اطلاعات جدیدی را در مورد ژن‌ها و عملکرد بیولوژیکی آن‌ها ارائه می‌دهد، بلکه ممکن است منجر به شناسایی داروها و کشف فعالیت‌های آن‌ها شود.

در دهه ۱۹۸۰، آگاهی از اطلاعات ژنومیک و ارتقا سطح تکنولوژی برای تحقیقات زیست‌شناسی، منجر به تشکیل کنسرسیوم‌هایی با هدف توالی‌یابی ژنوم باکتری، مخمر، کرم و انسان شد. که در سال ۲۰۰۱ اولین پیش‌نویس ژنوم انسان منتشر شد (۵۶). این توالی‌های در دسترس از ژن‌های مختلف به دانشمندان فرصت شناسایی ژن‌ها و پروتئین‌های جدید را داد. علاوه بر در دسترس بودن توالی ژنومی، منبع دیگری به نام برجسب توالی بیان شده (EST) برای شناسایی پروتئین‌های جدید استفاده می‌شود (۵۷). EST، توالی کوتاهی است، که از یک یا دو انتهای DNA مکمل (cDNA) تشکیل شده است. cDNA توسط آنزیم ترانسکریپتاز معکوس از روی توالی

سیتوپلاسم، شرایط برای ایجاد تاخوردگی صحیح و تشکیل پیوند دی‌سولفیدی محیا نیست. لذا بایستی پروتئین هدف را به پری‌پلاسم هدایت کرد.

از مزایای دیگر انتقال پروتئین به پری‌پلاسم باید متذکر شد؛ علاوه بر کاهش فراوانی پروتئین‌های پری‌پلاسم نسبت به سیتوپلاسم که در بخش بیان سیتوپلاسمی مطرح شد، تفکیک و جداسازی پروتئین‌های انتقال یافته به پری‌پلاسمی در مقایسه با جداسازی مجدد از عصاره کل سلول ساده‌تر است. از نگاهی دیگر، انتقال پروتئین به فضای پری‌پلاسمی به‌عنوان یک محدودیت برای بیان پروتئین‌های نوترکیب با اندازه بزرگ و در حجم بالا، به حساب می‌آید. اغلب زمانی که پروتئین‌های بزرگ به پپتید راهنما متصل می‌شوند، دیگر قابلیت انتقال به پری‌پلاسمی را ندارند (۵۲).

۱-۳-۶. شکل‌گیری پیوند دی‌سولفید درون سیتوپلاسم

یکی از عوامل محدودکننده تشکیل پیوند دی‌سولفیدی درون سیتوپلاسمی ایجاد شرایط احیایی به علت وجود عواملی نظیر گلوکاتایون، تیوردوکسین‌ها و گلوکاتاردوکسین‌ها و هم‌چنین عدم حضور آنزیم‌های پری‌پلاسمی نظیر DsbA و DsbC در سیتوپلاسم است. آنزیم‌های DsbA و DsbC علاوه بر این که با فعالیت اکسیداسیونی جفت سیستئین‌های پروتئین قابلیت ایجاد پیوندهای دی‌سولفید را دارند، بلکه با استفاده از ویژگی دی‌سولفید ایزومرازی، توانایی اصلاح پیوند تشکیل شده را نیز دارا نیستند (۵۳).

به تازگی پژوهشگران موفق شدند که جهش یافته‌های دوتایی در ژن تیوردوکسین ردوکتاز و گلوکاتایون اکسیدوردوکتاز را جداسازی کنند. هر چند که از قابلیت بقا برخوردارند اما سرعت رشد پایینی دارند و فقط توسط احیاکننده خارجی مانند دی‌تیوتریتول القا می‌شوند. با این وجود در شرایط عدم حضور دی‌تیوتریتول نیز مشتق باکتریایی با سرعت رشد بالا جداسازی شده است. به‌طور معمول پروتئین فعالیت زیستی خود را در شرایطی که پیوند دی‌سولفیدی به شکل صحیح تشکیل شود، به‌دست می‌آورد. برخی از این پروتئین‌ها نظیر

RNA ساخته می‌شود. EST به صورت تصادفی از روی cDNA گونه‌های مختلف تشکیل شده‌است. آن‌ها برای شبیه‌سازی ژن‌ها یا پروتئین‌های جدید، نقشه‌برداری از ژنوم و شناسایی مناطق کدگذاری در توالی ژنوم مفید هستند (۵۸).

۲-۱. استفاده از پایگاه اطلاعاتی EST در کلونینگ مجازی

تلاش برای استفاده از پایگاه EST در وب سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) شروع می‌شود. گام بعدی این است که از طریق جستجوی همولوگ (Blast)، هماهنگی قابل توجهی بین ESTهای توالی DNA ترجمه شده و پایگاه اطلاعاتی DNA پیدا شود. میزان هم‌ترازی (Alignment) بین توالی‌ها توسط e-value نشان داده می‌شود. میزان پایین e-value، احتمال بالاتر بودن شباهت توالی EST را نسبت به توالی همولوگ نشان می‌دهد. این مقدار نه تنها بر اساس درجه شباهت بین توالی‌ها، بلکه براساس طول توالی همولوگ نیز تعیین می‌شود. از آن جهت که توالی‌های EST کوتاه هستند (میانگین حدود ۴۰۰-۵۰۰ نوکلئوتید) و ممکن است توالی کدگذاری را نشان ندهد، توصیه می‌شود که علاوه بر میزان e-value، ترازهای واقعی (actual alignment) نیز بررسی شود. از طرفی، علاوه بر انتخاب و گزینش گام به گام پایگاه‌های اطلاعاتی EST، ممکن است همولوژی توالی جدید با ژن‌ها یا پروتئین‌های شناخته شده، نمایش داده شود. به عنوان نمونه: برای کلونینگ کانال کلسیم نوع T، در پایگاه اطلاعاتی EST توالی‌های همولوگ با کانال کلسیم نمایش داده شد، که یک کلون EST با همولوژی ۴۵٪ با کانال کلسیم کلون شده یافت شد و در نهایت توالی کامل کانال کلسیم جدید تعیین شد (۵۹، ۶۰).

در تمام رویکردها، پس از اولین تجزیه و تحلیل، توالی EST با پایگاه اطلاعاتی EST هم‌تراز می‌شود تا توالی‌های هم‌پوشانی شده را در سایت NCBI پیدا کند. علاوه بر به دست آوردن توالی همولوگ، بینش گسترده‌ای را در فراوانی رونوشت‌های ژنی در بافت‌های مختلف فراهم می‌کند. هم‌چنین این اطلاعات را می‌توان در جستجوگر UniGene-NCBI به دست آورد. جست‌وجوی UniGene اطلاعات مربوط به شباهت پروتئین در گونه‌های مختلف، نقشه‌برداری

کروموزومی، بیان در بافت‌های مختلف و یا این که آیا توالی‌های mRNA در دسترس هستند، را ارائه می‌دهد.

۲-۲. استفاده از پایگاه‌های اطلاعات ژنومی در کلونینگ مجازی

حضور EST در یک پایگاه اطلاعاتی به میزان بیان ژن در بافت‌ها، که از کتابخانه ژنومی جمع‌آوری شده، وابسته است. بنابراین ناکارآمدی استفاده از پایگاه EST در کلونینگ مجازی، این است که شناسایی رونوشت ژن‌هایی با سطح بیان پایین و محدود دشوار است. توالی ژنومی شامل آگزون‌ها و اینترون‌ها هستند. برای رونویسی DNA به RNA آگزون‌ها بریده و به یکدیگر متصل می‌شوند و سپس به پروتئین‌ها ترجمه می‌شوند. برای شناسایی ژن‌ها در پایگاه اطلاعات ژنومی، برنامه‌های مربوط به پیش‌بینی ژن در دسترس است (مانند Gene scan)، که ساختار آگزون-اینترون ژن‌ها را در توالی ژنوم شناسایی می‌کنند. همولوژی توالی‌های ژنومی می‌تواند در پایگاه‌های اطلاعاتی خانواده‌های شناخته شده ژن‌ها بررسی شود. ساختار ژن ممکن است در پایگاه ژنومی در دسترس باشد. علاوه بر این، پروموتور و عناصر تنظیم کننده در توالی ژنوم نیز شناسایی می‌شوند (۶۱). گاهی اوقات در کلونینگ مجازی توالی کامل یک ژن یا پروتئین ارائه نمی‌شود. در این حالت، طول کامل توالی ممکن است با بسط سریع انتهای cDNA، (RACE) به دست آید. در این روش RNA رونویسی شده در بافت مورد نظر به cDNA تبدیل می‌شود. لینکرهای الیگونوکلوئوتیدی به انتهای ۵ یا ۳ cDNA متصل می‌شوند. از طریق PCR، می‌توان با ترکیبی از الیگونوکلوئوتیدهای ژن مطلوب و الیگونوکلوئوتیدهای مختص لیگاندها، انتهای ۵ و ۳ ژن مطلوب را گسترش داد (۶۲).

گام مهم در ارزیابی رونویسی ژن‌های جدید، تجزیه و تحلیل بیان ژن مطلوب در بافت‌های مختلف است، که با RT-PCR انجام می‌شود. هم‌چنین رونویسی‌های جدید ممکن است با استفاده از تکنولوژی ریزآرایه یا غربالگری استخراج شوند. مزیت آن‌ها شناسایی عملکرد رونویسی ژن جدید است، زیرا ژن مطلوب به طور متقارن بین گروه کنترل و آزمایش هدف

بیان شده است. سپس ژن بیان شده می تواند به صورت مجازی کلون شود (۶۳).

نتیجه گیری

تولید پروتئین های نو ترکیب به عنوان یکی از مهم ترین شاخه های زیست فناوری مدرن است. از این رو پروتئین های یوکاریوتی فراوانی از جنبه دارویی و اقتصادی مورد توجه هستند. اگرچه سیستم های بیانی مختلفی به عنوان میزبان برای تولید پروتئین های نو ترکیب مورد استفاده قرار می گیرند، باکتری *E.coli* به عنوان میزبان غالب استفاده می شود. این پروتئین ها به طور کلی دارای ساختارهای سوم و چهارم هستند و نیاز به پیوندهای دی سولفید و اصلاحات بعد از ترجمه برای رسیدن به فعالیت زیستی و ساختار فضایی مناسب دارند. تولید این پروتئین ها در *E.coli* چالش های فراوانی را می طلبد؛ زیرا محیط سلولی، ماشین فولدینگ و نقاط کنترل کننده کیفیت ساختارهای فضایی پروتئین در آن به طور کامل با یوکاریوت ها متفاوت هستند. یکی از معمول ترین مشکلاتی که با آن روبرو هستیم تشکیل توده های پروتئینی اینکلوژن بادی ها است. افزایش محصول یک پروتئین نو ترکیب و دستیابی به ساختار صحیح و هم چنین کاهش میزان رسوب پروتئین هدف در سلول در طی تولید، همیشه ذهن محققین را به خود معطوف ساخته است. بدین منظور طی سال های اخیر و با پیشرفت روش های مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، استراتژی های متعددی برای افزایش بازدهی میزان حلالیت به کار گرفته شده است. از جمله این روش ها تغییر سرعت سنتز پروتئین ها، استفاده از پروتئین های اتصالی فیوژن، موتاسیون در پروتئین هدف، شرایط مساعد کشت و بیان هم زمان چاپرون های مولکولی است. معرفی توان و کاربرد هریک از این راه کارها عمده هدف تحقیق حاضر است. در این راستا ترکیبی از تکنولوژی توالی یابی، بیوانفورماتیک و تجزیه و تحلیل مجازی باعث افزایش سهولت پیش بینی نقش ژن و تفسیر عملکرد آن خواهد بود. مجموعه این تکنیک ها به عنوان کلونینگ مجازی امروزه مورد استفاده قرار می گیرد.

1. Kabirataj S, Nematzadeh G, Zolala J, Talebi AF. High-efficient transgenic hairy roots induction in chicory: re-dawn of a traditional herb. *Acta Agric Slov.* 2016;107(2):321-34.
2. Yokoyama S. Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* 2003;7(1):39-43.
3. Goudarzi Z, Shojaosadati SA, Sajedi RH, Maghsoudi A. Optimization of Auto-induction Conditions for the Heterologous Expression of a Maltogenic Amylase in *Escherichia coli*. *Appl Food Biotechnol.* 2016;3(2):105-13.
4. Sawers G, Jarsch M. Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996;46(1):1-9.
5. Marino M. Expression systems for heterologous protein production. *BioPharm.* 1989;2(3):18.
6. Schmidt F. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;65(4):363-72.
7. Hammarström M, Hellgren N, van den Berg S, Berglund H, Härd T. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Science.* 2002;11(2):313-21.
8. Fakruddin M, Mohammad Mazumdar R, Bin Mannan KS, Chowdhury A, Hossain MN. Critical factors affecting the success of cloning, expression, and mass production of enzymes by recombinant *E. coli*. *ISRN Biotechnol.* 2012;2013.
9. Klumpp S. Growth-rate dependence reveals design principles of plasmid copy number control. *PloS one.* 2011;6(5):e20403.
10. Reece RJ. *Analysis of genes and genomes*: Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2004.
11. Brown TA. *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*: John Wiley & Sons; 2016.
12. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiol.* 2014;5:172.
13. Jia B, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open biology.* 2016;6(8):160196.
14. Vahedi F, Talebi A, Ghorbani E, Behroozikhah A, Shahriari Ahmadi F, Mahmoudi M. Isolation, cloning and expression of the *Brucella melitensis* *Omp31* gene. *Iranian J Vet Res.* 2011;12(2):156-62.
15. Weiner MP, Anderson C, Jerpseth B, Wells S, Johnson-Browne B, Vaillancourt P. Studier pET system vectors and hosts. *Strateg. Mol. Biol.* 1994;7:41-3.
16. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;72(2):211.
17. Young CL, Britton ZT, Robinson AS. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J.* 2012;7(5):620-34.

18. Vincentelli R, Cimino A, Geerlof A, Kubo A, Satou Y, Cambillau C. High-throughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli*. *Methods*. 55, no. 1 2011;55(1):65-72.
19. Khandelwal P. Lab-to Process-Scale Protein Purification: An IMAC Resin for a Highly Productive Histidine-Tagged Protein Purification Process. *Genetic Engineering & Biotechnology News*. 2017;37(9):24-5.
20. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;60(5):523-33.
21. Hirose S, Noguchi T. ESPRESSO: a system for estimating protein expression and solubility in protein expression systems. *Proteomics*. 2013;13(9):1444-56.
22. Diaz AA, Tomba E, Lennarson R, Richard R, Bagajewicz MJ, Harrison RG. Prediction of protein solubility in *Escherichia coli* using logistic regression. *Biotechnol Bioeng*. 2010;105(2):374-83.
23. Gatti Lafranconi P, Natalello A, Ami D, Doglia SM, Lotti M. Concepts and tools to exploit the potential of bacterial inclusion bodies in protein science and biotechnology. *The FEBS journal*. 2011;278(14):2408-18.
24. Malakar P, Venkatesh K. Characterization of burden on growth due to the nutritional state of media and pre-induced gene expression. *Archives Microbiol*. 2013;195(4):291-5.
25. Hannig G, Makrides SC. Strategies for optimizing heterologous protein. 1998.
26. Rosen R, Biran D, Gur E, Becher D, Hecker M, Ron EZ. Protein aggregation in *Escherichia coli*: role of proteases. *FEMS microbiology letters*. 2002;207(1):9-12.
27. Govers SK, Mortier J, Adam A, Aertsen A. Protein aggregates encode epigenetic memory of stressful encounters in individual *Escherichia coli* cells. *PLoS biology*. 2018;16(8):e2003853.
28. Tobias JW, Shrader TE, Rocap G, Varshavsky A. The N-end rule in bacteria. *Science*. 1991;254(5036):1374-7.
29. Qile M, Ji Y, Houtman MJ, Veldhuis M, Romunde F, Kok B, et al. Identification of a PEST sequence in vertebrate KIR2. 1 that modifies rectification. *Frontiers in physiology*. 2019;10:863.
30. Khosrowabadi E, Takaloo Z, Sajedi RH, Khajeh K. Improving the soluble expression of aequorin in *Escherichia coli* using the chaperone-based approach by co-expression with artemin. *Preparative Biochem Biotechnol*. 2018;48(6):483-9.
31. Schumann W, Ferreira LCS. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genet Mol Biol*. 2004;27(3):442-53.
32. Tsai C-H, Ho Y-H, Sung T-C, Wu W-F, Chen C-S. *Escherichia coli* proteome microarrays identified the substrates of ClpYQ protease. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(1):113-20.
33. Mokry DZ, Abrahão J, Ramos CH. Disaggregases, molecular chaperones that resolubilize protein aggregates. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2015;87(2):1273-92.
34. Xu X, Liang K, Niu Y, Shen Y, Wan X, Li H, et al. BAH1 an E3 Ligase from *Arabidopsis thaliana* Stabilizes Heat Shock Factor σ 32 of *Escherichia coli* by Interacting with DnaK/DnaJ Chaperone Team. *Curr Microbiol*. 2018;75(4):450-5.

35. Wang Z, Zhang M, Lv X, Fan J, Zhang J, Sun J, et al. GroEL/ES mediated the in vivo recovery of TRAIL inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Scienti Rep.* 2018;8(1):15766.
36. Santra M, Dill KA, de Graff AM. How Do Chaperones Protect a Cell's Proteins from Oxidative Damage? *Cell systems.* 2018.
37. Fassler R, Edinger N, Rimon O, Reichmann D. Defining Hsp33's Redox-regulated Chaperone Activity and Mapping Conformational Changes on Hsp33 Using Hydrogen-deuterium Exchange Mass Spectrometry. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* 2018(136):e57806.
38. Deville C, Carroni M, Franke KB, Topf M, Bukau B, Mogk A, et al. Structural pathway of regulated substrate transfer and threading through an Hsp100 disaggregase. *Sci Adv.* 2017;3(8):e1701726.
39. Voulgaridou G-P, Mantso T, Chlichlia K, Panayiotidis MI, Pappa A. Efficient *E. coli* expression strategies for production of soluble human crystallin ALDH3A1. *PloS one.* 2013;8(2):e56582.
40. Zhu S, Gao B, Aumelas A, del Carmen Rodríguez M, Lanz-Mendoza H, Peigneur S, et al. MeuTXK β 1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics.* 2010; 1804(4), 872-883.
41. Van Dijk E, Hoogeveen A, Abeln S. The hydrophobic temperature dependence of amino acids directly calculated from protein structures. *PLoS Comput Biol.* 2015;11(5):e1004277.
42. Vera A, González- Montalbán N, Arís A, Villaverde A. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnology Bioeng.* 2007;96(6):1101-6.
43. San-Miguel T, Pérez-Bermúdez P, Gavidia I. Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *SpringerPlus.* 2013;2(1):89.
44. Strocchi M, Ferrer M, Timmis KN, Golyshin PN. Low temperature- induced systems failure in *Escherichia coli*: insights from rescue by cold- adapted chaperones. *Proteomics.* 2006;6(1):193-206.
45. Ferrer M, Chernikova TN, Yakimov MM, Golyshin PN, Timmis KN. Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nature Biotechnol.* 2003;21(11):1266.
46. Song J-A, Lee D-S, Park J-S, Han K-Y, Lee J. A novel *Escherichia coli* solubility enhancer protein for fusion expression of aggregation-prone heterologous proteins. *Enzyme Microbial Technol.* 2011;49(2):124-30.
47. Nallamsetty S, Waugh DS. A generic protocol for the expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* using a combinatorial His 6-maltose binding protein fusion tag. *Nature Protocols.* 2007;2(2):383.
48. Raran-Kurussi S, Waugh DS. Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* with a His 6 or dual His 6-MBP tag. *Protein Crystallography: Springer;* 2017. p. 1-15.
49. Gellissen G. *Production of recombinant proteins: Novel microbial and eukaryotic expression systems:* John Wiley & Sons; 2006.
50. Raran- Kurussi S, Waugh DS. Unrelated solubility- enhancing fusion partners MBP and NusA utilize a similar mode of action. *Biotechnol Bioeng.* 2014;111(12):2407-11.
51. Li K, Jiang T, Yu B, Wang L, Gao C, Ma C, et al. *Escherichia coli* transcription termination factor NusA: heat-induced oligomerization and chaperone activity. *Scient Rep.* 2013;3:2347.

52. Raivio TL, Silhavy TJ. Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55(1):591-624.
53. Hatahet F, Boyd D, Beckwith J. Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics.* 2014;1844(8):1402-14.
54. Berkmen M. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2012; 82(1), 240-251.
55. Makino T, Skretas G, Georgiou G. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microbial cell Fact.* 2011;10(1):32.
56. Elkins KM. An in silico DNA cloning experiment for the biochemistry laboratory. *Biochem Mol Biol Edu.* 2011;39(3):211-5.
57. Mondal TK, Ganie SA, Niraj RRR, Rana MK. Cloning and in silico analysis of a gene encoding a putative β -carbonic anhydrase from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *J Plant Interact.* 2014;9(1):504-13.
58. Padaria JC, Vishwakarma H, Biswas K, Jasrotia RS, Singh GP. Molecular cloning and in-silico characterization of high temperature stress responsive pAPX gene isolated from heat tolerant Indian wheat cv. Raj 3765. *BMC research notes.* 2014;7(1):713.
59. Han W, Ding P, Xu M, Wang L, Rui M, Shi S, et al. Identification of eight genes encoding chemokine-like factor superfamily members 1–8 (CKLFSF1–8) by in silico cloning and experimental validation. *Genomics.* 2003;81(6):609-17.
60. Negi B, Salvi P, Bhatt D, Majee M, Arora S. Molecular cloning, in-silico characterization and functional validation of monodehydroascorbate reductase gene in *Eleusine coracana*. *PloS one.* 2017;12(11):e0187793.
61. Milne CB, Kim PJ, Eddy JA, Price ND. Accomplishments in genome- scale in silico modeling for industrial and medical biotechnology. *Biotechnol J.* 2009;4(12):1653-70.
62. Brassac J, Blattner FR. Species-level phylogeny and polyploid relationships in *Hordeum*(Poaceae) inferred by next-generation sequencing and in silico cloning of multiple nuclear loci. *Syst Biol.* 2015;64(5):792-808.
63. Veenstra JA, Rombauts S, Grbić M. In silico cloning of genes encoding neuropeptides, neurohormones and their putative G-protein coupled receptors in a spider mite. *Insec Biochem Molec Biol.* 2012;42(4):277-95.

