NCMBJ
Review article

New Cell Mol Biotech
j.10/38 , 2020

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

Corresponding author:

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

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۰ - شماره -۳۸ بهار ۱۳۹۹
مقاله مروری

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بهبود تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری *اشرشیاکلی*

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 نوترکیب می‌توانند در حجم انبوه، کیفیت مطلوب و هزینه پایین برای پاسخگویی به خواسته‌های صنایع مختلف تولید شوند. پروتئین‌های نوترکیب می‌توانند در روش‌های بیانی مختلفی نظیر سیستم‌های بیانی عاری از سلول یا بر پایه سلول‌های پروکاریوتی یا یوکاروتی بیان شوند. با توجه به مزایای استفاده از سلول‌های پروکاریوتی، یکی از سیستم‌های متداول برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، استفاده از باکتری *اشریشیاکلی* (*E.coli*) است. هدف از مطالعه حاضر بررسی دقیق‌تر بیان پروتئین نوترکیب 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 نوترکیب معرفی و سپس راهکارهای عمومی برای بیان بالاتر آنها بررسی شدند. رویکردهای متعددی برای افزایش بازدهی و حلالیت به‌کار گرفته شده است؛ تغییر سرعت سنتز پروتئین‌ها، استفاده از پروتئین‌های اتصالی، موتاسیون در پروتئین هدف، بیان هم‌زمان چاپرون های ملکولی 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 نوترکیب پروتئین‌ها در میزبان‌هایی با سیستم بیانی متفاوت منجر شود.

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

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 نوترکیب یا مهندسی ژنتیک گفته می‌شود. از جمله فعالیت‌های تکنیک مهندسی ژنتیک، کلون‌سازی ژن است که با این روش می‌توان ژن یک پپتید مورد نظر را از میزبان طبیعی جدا کرد و به ژنوم یک میزبان جدید انتقال داد. در نتیجه بیان این ژن هترولوگ، پپتید نوترکیب توسط میزبان مورد نظر تولید خواهد شد.

به‌منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب، سیستم‌های بیانی مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرد. سیستم‌های بیانی را می‌توان به‌صورت زیر دسته‌بندی کرد:

۱) سیستم‌های بیانی پروکاریوتی: شامل *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، *Acinetobacter calcoaceticus*، *Bacillus licheniformis*، *Staphylococcus aureus* 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 سوبسترا و نمک‌ها به این عصاره اضافه می‌گردد و بیان پروتئین با اضافه کردن الگو (mRNA) آغاز می‌شود (۲).

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

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، توانایی-های سیستم بیانی و شرایط بهینه برای تولید پروتئین نوترکیب اشاره کرد (۳). به‌طور کلی پروتئین‌های نوترکیب را 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).

جدول۱. 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 *in vivo* 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

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 آنلاین 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 منجربه شناسایی داروها و کشف فعالیت‌های آن‌ها شود.

با توجه‌به 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*

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

در سال ۱۸۸۵ باکتری *E.coli* توسط تئودور اشریش باکتری-شناس 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 توترکیب 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

تسریع می‌کنند. از دست رفتن کنفورماسیون علاوه‌بر کاهش سطح پروتئین‌های عملکردی، به‌دلیل در معرض بودن سطوح هیدروفوب، افزایش توده‌های پلی‌پپتیدی را در غالب اینکلوژن بادی منجر می‌شود. از جمله مشکلات دیگر این میزبان پروکاریوتی این است که توانایی حذف اینترون‌ها و هم‌چنین تغییرها پس از ترجمه یوکاریوتی مانند متیلاسیون، گلیکوزیلاسیون، تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی را ندارد، که به‌ترتیب می‌توان 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 به‌طور کامل ایمن و قادر نبودن این میزبان در ترشح پروتئین نوترکیب از دیگر معایب *E.coli* محسوب می‌شود.

با وجود تمامی مشکلات ذکر شده، هنوز *E.coli* به‌عنوان میزبان رایج در اکثر آزمایش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در جدول ۲ خلاصه‌ای از مقایسه میزبان‌های رایج در تولید پروتئین نوترکیب خلاصه شده است.

جدول۲. سیستم‌های بیانی گوناگون برای تولید پروتئین‌های نوترکیب (۶).

	میزبان			
خصوصیت	سلول پستانداران	سلول حشرات	مخمر	*E. coli*
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	بسیارزیاد	زیاد	کم	بسیار کم
روش کشت	بسیار مشکل	مشکل	آسان	بسیارآسان
هزینه تولید	بسیار بالا	بالا	پایین	بسیار پایین
تاخوردن پروتئین	بسیار خوب	خیلی خوب	خوب	متوسط
کارایی پروتئین	بسیار خوب	خیلی خوب	خوب	ضعیف

۱-۲. فاکتورهای مهم در بیان پروتئین‌های نوترکیب در *E.coli*

به‌منظور دست‌یابی به بیان بالای پروتئین نوترکیب در *E.coli*، برخی از راه‌کارهای مؤثر در جدول ۳ خلاصه شده است. (۷).

جدول ۳. راه‌کارهای عمومی برای بیان بالاتر پروتئین نوترکیب (۷).

راهبرد	توضیح
سویه میزبان	سویه میزبان بر مقدار بیان تأثیر می‌گذارد.
نوع ناقل مورد استفاده	تعداد نسخه‌های ژن همراه با تعداد نسخه‌های ناقل افزایش می‌یابد. ماهیت و خصوصیات دیگر ناقل نیز در بازده کل تأثیر فراوانی دارد.
آنتی‌بیوتیک انتخابی	آنتی‌بیوتیک انتخابی بر مقدار بیان تأثیر می‌گذارد.
پروموتر	ضعیف یا قوی بودن پروموتر، قابل القاء بودن یا بیان دائم آن و میزان تنظیم پروموتر در بیان اثر دارد.
خاتمه‌دهنده رونویسی	کارآمدی و فاصله خاتمه‌دهنده در پایان رونویسی مهم است.
پایداری mRNA	پایداری mRNA در میزان ترجمه نقش دارد و وجود ساختارهای دوم به‌ویژه در انتهای '۵ نقش مهمی را در پایداری آن بازی می‌کند.
سیگنال‌های ترجمه	محل اتصال ریبوزوم و ساختارهای دوم در انتهای '۵ mRNA ممکن است بر میزان در دسترس بودن مکان اتصال ریبوزوم تأثیر گذار باشد.
کدون‌های غالب	استفاده از کدون‌های اصلی هر ارگانیسم در توالی قطعه کدشونده باعث افزایش بازده بیان می‌شود.
دما	دما نقش اساسی در تاخوردن پروتئین و پایداری آن بازی می‌کند.
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 می‌تواند باعث افزایش حلالیت، پایداری و افزایش بیان پروتئین شود.

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

۱-۲-۱. ناقلین پلاسمیدی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

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 پروموتری؛ با این وجود که پروموترهای بسیار قوی سبب رونویسی سطوح بالای RNA می‌شوند، *E.coli* قادر به بیان بسیاری از پروتئین‌ها نیست. در واقع عوامل تأثیرگذار دیگری به‌جز قدرت پروموتر 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 منجربه بالا رفتن سطح بیان پروتئین می‌شود.
- قدرت مکان اتصال ریبوزوم(RBS).
- تعداد نسخه ژن کلون شده (تعداد ناقل بیانی) در سلول؛ علی رغم تصورات عموم همیشه بالا بودن تعداد نسخه یک ناقل بیانی (قیاس با تعداد نسخهٔ pBR322)، دلیل‌بر 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 موثر 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 پروموتر و نشانگر انتخابی در اکثر ناقلین دیده می‌شود و هم‌چنین ژن گزارشگر، 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 به‌دنبال 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 نسبت‌به سلول‌های حاوی تعداد ناقلین کم‌تر کاهش می‌یابد (۱۰).

پروموتر: پروموتر کمابیش در ۱۰ تا ۱۰۰ جفت باز بالادست مکان اتصال ریبوزوم حضور دارد که به‌وسیله یک ژن تنظیم کننده کنترل می‌شود. پروموترهای هگزا نوکلئوتیدی *E.coli* در محل ۳۵ جفت باز (ناحیه ۳۵-) و ۶ جفت باز (ناحیه ۱۰-) بالادست نقطه آغاز رونویسی حضور دارند. علاوه‌بر این پروموترهای مشتق شده از باکتری گرم مثبت و باکتریوفاژها نیز در *E.coli* قرار دارند. حداقل نیاز یک ناقل بیانی کارآمد حضور توالی پروموتری قوی با میل اتصال بالا به RNA پلیمراز که منتج به افزایش رونویسی ژن مطلوب گردد، است. ویژگی‌های یک پروموتر کارآمد عبارتند از: ۱) قوی باشد تا بیان پروتئین مطلوب را افزایش دهد. ۲) بیان نشتی 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 پروموتر برای تولید پروتئین‌هایی که در سلول تأثیرگذار هستند، ضروری است. به‌عنوان مثال آنزیم *Eco*RI 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 پروموتر قوی و قابل تنظیم می‌توان

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

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

پروموترهای قابل‌کنترل: 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، مهارکننده نام دارند. این پروموترها توسط هولوآنزیم RNA پلی‌مراز متصل به فاکتور سیگما، راه اندازی می‌شوند. فاکتور سیگما پروتئینی است که با اتصال به RNA پلی‌مراز سبب شکل‌گیری هولوآنزیم می‌شودو به‌طرف توالی پروموتری حرکت می‌کند (۴).

در جدول ۴ به برخی از پروموترهای *E. coli* اشاره شده است.

جدول ۴. پروموترهای به‌کار 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 نشتی
Trp	شیمیایی (IAA)، گرسنگی غذایی (تریپتوفان)	وجود دانش کافی، سطح بیان بالا، وجود ناقلین فراوان، قابلیت انجام کشت در دمای پایین	بیان نشتی
Tac	شیمیایی (IPTG)، القاء حرارتی	وجود دانش کافی، وجود ناقلین فراوان، بیان بالا، دارا بودن قابلیت القاء در دمای پایین	بیان نشتی
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 نشتی، 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 (گزانتوزین)	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

امروزه سیستم بیانی pET قوی‌ترین سیستمی است که جهت بیان پروتئین نوترکیب به‌کار 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-مراز T7 در میزبان القاء می‌شود. آنزیم RNA پلی‌مراز T7 با قدرت زیاد هشت مرتبه سریع تر از RNA پلی‌مراز *E.coli* رونویسی را انجام می‌دهد. این ناقل از دو گروه تشکیل می-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 *Bam*HI از طریق یک پسوند تعیین می‌کند. علامت (+) به‌دنبال اسم ناقل حاکی از دارا بودن مبدأ همانندسازی F1 دارد. هم‌چنین ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی-

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

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

سویه‌های DH5α، HB101، HMS174 و JM109 از باکتری *E.coli* میزبان‌های مناسبی برای سیستم بیانی pET هستند. تمامی سویه‌های مذکور فاقد ژن RNA پلی‌مراز T7 هستند، لذا ناقل pET برای بیان پروتئین مطلوب نیاز به میزبانی دارد که دارای یک نسخه کروموزومی از ژن RNA پلی‌مراز T7 باشد. این نوع میزبان لیزوژن DE3 است که از فاژ لامبدا مشتق می‌شود. میزبان مذکور متشکل از یک توالی واجد ژن *lac1* و ژن RNA پلی‌مراز T7 تحت کنترل پروموتر *lacUV5* هستند،که این پروموتر توسط IPTG القا می‌شود. توالی ذکر شده درون ژن *int* درج می‌شود. در نتیجه ژن *int* غیرفعال شده و DE3 با استفاده از فاژ کمکی می‌تواند به درون کروموزوم وارد و یا از آن خارج شود. از دیگر میزبان‌های 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 به‌دلیل عدم توانایی تولید متیونین می‌توان پروتئین مطلوب را با به‌کارگیری S-methionine یا Selenomethionine نشاندار نمود. ۲)نوع BLR که به‌دلیل عدم حضور *rec*A، سبب بالا بردن بازدهی ناقل مونومری می‌شود (۱۵).

علی‌رغم اهمیت و مزایای سیستم بیانی pET، به‌کارگیری از آن معایبی از قبیل بیان نشتی پروتئین مطلوب در شرایط غیرالقایی و ایجاد اینکلوژن‌بادی را به‌همراه دارد (۱۴). لذا با به‌کارگیری از ناقل‌های واجد پروموترهای ترکیبی T7/lacO و توالی کدکننده رپرسور *lacI*، می‌توان بر مشکلات این سیستم بیانی چیره شد. توالی اپراتور *lac* در پایین‌دست پروموتر T7 جای‌گذاری می‌شود. جهت‌گیری پروموترهای T7/lacO و LacI مخالف جهت یک‌دیگر می‌باشد. هم‌چنین از نسخه-برداری پروموتر *lacUV5* واقع در کروموزوم میزبان و نیز رونویسی از پروموتر T7/lacO ناقل، توسط RNA پلیمراز T7 توسط رپروسور *Lac* ممانعت می‌شود (۱۶).

۱-۲-۲. پروتئین‌های ادغامی

در سال‌های گذشته تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب به‌گونه ترکیب شده با اپی‌توپ‌های پپتیدی در صنعت دارو گسترش یافته است. به‌کارگیری از این برچسب‌ها درجه خلوص پروتئین‌های نوترکیب را افزایش می‌دهد. لذا اهمیت استفاده از پروتئین‌های ادغامی در ادامه ذکر شده است: ۱) تخلیص آسان و سریع پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی جذبی، ۲) به‌ندرت 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 پروتئین‌ها.

دنباله‌های پپتیدی Poly-Arg-، FLAG، C-myc-، Poly-His- و S-tag رایج‌ترین برچسب‌های به‌کار گرفته شده هستند. تخلیص هر یک از دنباله‌ها در شرایط بافری خاص صورت می‌گیرد. اثر پروتئین‌های ادغامی کوچک بر ساختار سه‌بعدی و فعالیت زیستی پروتئین نوترکیب به موقعیت و ترکیب اسیدآمینه‌ای آن‌ها وابسته است. اگر چه پروتئین‌های بزرگ نیز جهت بالا بردن حلالیت پروتئین به‌کار گرفته می-شوند. برای نمونه اتصال تیوردوکسین به پروتئین سبب افزایش قابلیت حل شدن آن و ممانعت از تشکیل انکلوژن بادی در سیتوپلاسم سلول می‌شود. پروتئین A استافیلوکوکوس با افزایش حلالیت سبب ارتقا تاخوردگی پروتئین هدف شده و هم‌چنین با استفاده از پپتید راهنما در این پروتئین سبب ترشح پروتئین هدف به خارج از سلول می-شود. علاوه‌بر تیوردوکسین برای ارسال پروتئین هدف به فضای پری‌پلاسم از DsbA استفاده می‌شود. با این‌وجود جهت ساخت کریستال و یا تولید آنتی‌بادی این دنباله‌های پپتیدی باید حذف شوند (۱۷, ۱۸).

از این رو بسته‌به ویژگی‌های زیست شیمی و عملکردی پروتئین هدف انتخاب مناسب‌ترین سیستم فیوژن بسیار مهم است. در ادامه ۲ نوع پرکاربرد این دنباله‌های پپتیدی معرفی می‌شود.

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

هسیتیدین، گروه‌های الکترون‌دهنده‌ای وجود دارند که به سرعت با کاتیون‌های فلزی پیوندهای کوردینانس ایجاد می-کنند. پروتئین‌های دارای پلی-هیستیدین پس از شستشوی بستر و با استفاده از کنترل pH بافر ستون یا افزودن ایمیدازول به‌آسانی جدا می‌شوند. طول برچسب پلی-هیستیدین و سیستم حلالیت بر بازدهی تخلیص این سیستم تأثیرگذار است. محدودیت به‌کارگیری ایمیدازول به‌دلیل ایجاد توده پروتئینی و نیز تأثیرگذاری آن در بررسی کریستالوگرافی و مطالعه‌های رقابتی پروتئین هدف است. اتصال برچسب‌های پلی- هیستیدین به پایانه C– یا N– به نوع پروتئین نوترکیب بستگی دارد. در رابطه با اثر برچسب‌ها بر روی فعالیت زیستی پروتئین باید ذکر کرد که به‌دلیل طول کوتاه و مقدار ناچیز بار این برچسب‌ها به‌ندرت بر فعالیت پروتئین مؤثر هستند (۱۹).

S-tag: توالی S-tag یک دنباله پپتیدی با ۱۵ اسید آمینه است که به‌دلیل ترکیب اسید آمینه‌ای متشکل از ۴ اسیدآمینه کاتیونی، ۳ اسیدآمینه آنیونی، ۳ اسیدآمینه قطبی بدون بار و ۵ اسیدآمینه غیرقطبی قابلیت حل شدن دارد. S-tag بر پایه شکل‌گیری مجدد فعالیت ریبونوکلئولتیک سنجیده می‌شود. پروتئین‌های برچسب‌دار 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 نوترکیب از سلول‌های پستاندارن، عصاره سلولی باکتری‌ها و سلول‌های حشره‌ای آلوده شده با باکولوویروس است. این سیستم به‌طور معمول به‌عنوان برچسب ادغامی دوم استفاده می‌شود (۲۱،۲۰).

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 این‌که آیا پروتئین فعالیت زیستی خود را حفظ کرده، به‌دنبال دارد. در حال حاضر تمامی عوامل مختلف فیزیکی و شیمیایی که منجربه 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 موثرتر هستند (۲۲،۲۱). بر این اساس راه‌حل‌هایی برای کاهش ایجاد اینکلوژن‌بادی و ارتقا تاخوردن پروتئین ایجاد شده که عبارتند از: رشد باکتری در دمای پایین‌تر، گزینش سویه‌های باکتریایی مناسب، بیان به‌همراه 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 (۲۴،۲۳).

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، به‌کار گیری 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 گلیسین بتائین، تنظیم pH، بهره‌مندی از سوکروز و رافینوز در محیط کشت، به‌کارگیری محیط‌های غنی‌شده
	عدم توانایی ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی به‌دلیل احیایی بودن فضای سیتوپلاسم	بیان پروتین‌های Dsb در سیتوپلاسم

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

	وجود میتونین در پایانه N-	بیان میتونین آمینوپپتیداز
	پروتئولیز پروتئین نوترکیب	استفاده از سویه‌های فاقد پروتئاز، جهش در جایگاه برش پروتئازها، بهره‌مندی از پروتئین‌های ادغامی، مهندسی کردن هیدروفوبیسیتی پروتئین، بهبود شرایط فرمانتاسیون، بیان همزمان ژن *pin* فاژ T4، بیان چاپرون-ها، فیوز کردن چندین نسخه از ژن هدف
	پیچیده‌تر شدن فرآیند خالص سازی	بیان پروتئین با برچسب‌هایی با میل ترکیبی پیش‌بینی شده

بیان پری‌پلاسمی:

مزایا:	معایب:	راه‌کار
تخلیص ساده‌تر به‌دلیل کاهش غلظت پروتئین‌هدف، کم شدن پروتئولیز پروتئین، ارتقا تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی و تاخوردگی پروتئین، حذف میتونین از پایانه N-	عدم انتقال مؤثر پروتئین در حضور پپتید راهنما	به‌کارگیری پپتیدهای راهنمای مناسب‌تر، تغییر ساختار پپتید راهنما از طریق ایجاد جهش
	عدم برش پپتید راهنما از پایانه N- پروتئین هدف	بیان همزمان سیگنال پپتیداز
	اشباع مسیر انتقال پروتئین	بیان همزمان *prlF*، به‌کار گیری سویه‌های موتان *prlF*، بیان همزمان *prlA* و *SecE*، بیان ژن‌های Sec و بیان *pspA*
	کاهش تاخوردن پروتئین‌ها	جایگزینی اسیدهای آمینه، بیان پروتئین دی‌سولفید ایزومراز، بیان چاپرون‌ها
	ایجاد اینکلوژی‌بادی	رشد در دمای پایین‌تر، محیط کشت حاوی سوکروز و رافینوز

بیان در غشاء داخلی:

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

بیان خارج سلولی:

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

بیان در سطح سلول:

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

بیان سیتوپلاسمی یک ژن توسط کدون آغازگری که به‌طور عمومی اسیدآمینه متیونین را کد می‌کند، راه‌اندازی می‌شود. اغلب حضور متیونین آغازی تأثیری بر ساختار پروتئین ایجاد نمی‌کند، اما در موارد خاص باقی‌ماندن این اسیدآمینه اضافی در زنجیره پروتئینی آثار منفی به‌جای می‌گذارد. به‌عنوان نمونه متیونین اضافی در RANTES (عضوی از خانواده سایتوکین‌ها)، سبب از بین رفتن فعالیت فیزیولوژیکی این مولکول می‌گردد. علاوه‌بر این حضور متیونین آغازی سبب تغییر ساختار فضایی هموگلوبین و نیز سبب نتیجه منفی در ویژگی ایمونولوژیک پروتئین‌های دارویی می‌شود. با بهره‌مندی از تولید همزمان متیونین آمینوپپتیداز می‌توان میتونین آغازی باقی‌مانده را از پروتئین هدف حذف کرد (۲۵).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

۱-۲-۴. تجزیه پروتئینی

باکتری *E.coli* حاوی آنزیم‌های پروتئازی بسیاری است که با تنظیم فرآیند پروتئولیز به‌صورت اختصاصی و غیراختصاصی نقش مؤثری در فیزیولوژی سلول ایفا می‌کنند. برای مثال، آنزیم سیگنال پپتیداز I، پروتئاز اختصاصی است که حذف پپتید راهنما از انتهای آمینی پروتئین‌های انتقال داده شده به خارج سلول را برعهده دارد. علاوه‌بر 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، به‌طور 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 به‌تدریج 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 (۲۷،۲۶).

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. درصورتی‌که دیگر اسیدهای آمینه به‌جز پرولین ۱۰ دقیقه به نیمه عمر پروتئین می‌افزایند. حضور اسیدهای آمینه با زنجیره جانبی کوتاه پس از متیونین 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 اسیدآمینه لایزین در انتهای آمینی است که در پروتئولیز نقش دارد. اسیدآمینه لایزین با اتصال به زنجیره مالتی یوبیکویتین منجربه تجزیه پروتئین توسط پروتئازهای وابسته به یوبیکویتین در یوکاریوت‌ها می‌گردد. هم‌چنین طبق نظریه PEST رابطه میان نوع اسید آمینه و ناپایداری پروتئین مطرح شده است. بر اساس آنالیز بیوانفورماتیکی، نواحی غنی از اسیدهای آمینه ترئونین، سرین، گلوتامیک اسید و پرولین که به‌وسیله اسیدهای آمینه خاصی احاطه شده‌اند به‌دلیل فسفوریله شدن PEST باعث افزایش اتصال کلسیم و در نتیجه افزایش فرآیند پروتئولیز توسط پروتئازهای وابسته به کلسیم می‌گردد (۲۹).

راه‌حل‌های جهت کاهش تجزیه پروتئین ها ارائه می‌شود: ۱) انتقال پروتئین هدف به فضای پریپلاسم و یا ترشح به خارج سلول، ۲) به‌کار گیری سویه‌های فاقد پروتئاز، ۳) رشد سلول در دمای پایین، ۴) بیان پروتئین‌های ادغامی، ۵) اتصال متوالی چندین کپی از ژن مطلوب، ۶) تولید هم‌زمان چاپرون-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 هیدروفوبیسیتی پروتئین نوترکیب و ۱۰) بهینه کردن شرایط فرمانتاسیون (۳) و (۳۰).

در سلول *E.coli* به‌علت کم بودن تعداد پروتئازهای پری-پلاسم نسبت‌به سیتوپلاسم لذا فرآیند پروتئولیز در فضای پری‌پلاسم 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 درحال حاضر فناوری ترشح پروتئین نوترکیب به‌وسیله 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 به‌همراه خواهد داشت. راه‌حل این مشکل بهره‌مندی از سویه‌های فاقد جایگاه ژنی *rpoH* است. ژن *rpoH*، کد کننده زیرواحد σ^{32}ی RNA پلی‌مراز است که در ایجاد فرآیند پروتئولیز باکتری *E. coli* ایفای نقش می‌کند. اغلب برای بیان پروتئین نوترکیب از سویه‌هایی که در توالی ژن *rpoH* و Clp La آن‌ها جهش ایجاد شده، استفاده می‌شود. ولی باید متذکّر شد که عدم وجود پروتئازها و در نتیجه افزایش توده‌های پروتئینی غیر طبیعی، ایجاد سمیت در میزبان را می‌افزاید (۳۲).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

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

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 انکلوژن بادی ارائه شد. تحت شرایط تنش محیطی و یا اتمام زود هنگام ترجمه منتج به از دست رفتن ساختار فضایی پروتئین و ایجاد اینکلوژن 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 تازننده پروتئین هستند. هم‌چنین چاپرون‌ها در حفظ کیفیت و پایداری پروتئوم بسیار تأثیرگذار هستند (۳۰).

علی‌رغم بیان همیشگی چاپرونین‌ها 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). چاپرونین‌ها را طبق مکانیسم عمل آن‌ها به ۳ بخش طبقه‌بندی می‌کنند. چاپرون‌های تازننده[1] متشکل از GroEL و DnaK هستند که با بهره‌مندی از ATP فعالیت می‌کنند. چاپرون‌های نگه‌دارنده[2] نظیر IbpB که پروتئین‌های نیمه تاخورده را تا کم شدن شرایط تنش‌زا بر سطح خود نگه می‌دارند و دسته سوم چاپرون‌های تجزیه کننده[3] 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 در تاخوردن مجدد پروتئین‌ها نقش دارند (۳۵،۳۴). TF پروتئینی است که به جایگاه خروج پپتید ریبوزوم متصل می‌شود. DnaK ممکن است پروتئین‌های تازه ساخته شده را دربرگیرد. 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*، به‌دلیل 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 موثرین‌ترین روش‌های کاهش تولید پروتئین، کاهش دمای انکوباسیون است (۴۰). دمای پایین سبب کاهش تجمع پروتئین می‌شود، که در درجه حرارت بالاتر به‌دلیل وابستگی دما به برهم‌کنش‌های هیدروفوبی حائز اهمیت است (۴۲،۴۱). زمانی‌که میزبان با مشکل تشکیل انکلوژن 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 به‌مدت ۷۲ ساعت توصیف کرده‌است (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

[1] Folding Chaperones
[2] Holding Chaperones

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

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 تازننده 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 پروتئین-های نوترکیب است. مطالعه‌ها بیانگر این است که در باکتری *E.coli* فقط نیمی از پروتئین‌های نوترکیب (حتی پروتئین‌های با منشأ باکتریایی) به‌صورت محلول بیان می-شوند. طی سال‌های اخیر ثابت شده است که برای ارتقا حلالیت پروتئین‌های نوترکیب، می‌توان آن‌ها را با پروتئین-های حامل با قابلیت انحلال بالا فیوز کرد. باید دقت کرد که تمامی پروتئین‌ها با قابلیت انحلال‌پذیری بالا جهت افزایش حلالیت کارآمد نیستند (۴۷،۴۶). جهت کاهش ایجاد انکلوژن بادی راه‌حل دیگری مطرح می‌شود، که ژن هدف را در انتهای ´۳ ژن کد کننده 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، گلوتاتیون ترانسفراز از شیستوزوما، پروتئینA استافیلوکوکی. برای مثال اینترلوکین‌های IL6, IL4,IL3,IL2 حتی در دمای ۱۵°C نیز به‌صورت اینکلوژن بادی بیان می-شوند، 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 نسبت‌به نوع غیرادغامی پروتئین هدف افزایش یابد و یا با وجود محلول 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. علاوه‌بر 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). لازم‌به ذکر است که کارایی و ویژگی‌های زیست شیمی این پروتئین-های 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 پری‌پلاسم

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 SecG, SecE, SecY, SecA 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 می-شود. در فضای پری‌پلاسمی چاپرون‌های خاصی وجود دارد که در تاخوردگی صحیح پروتئین و تشکیل پیوند دی‌سولفیدی نقش به‌سزایی دارد. به‌علت فضای احیاکنندگی موجود در

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

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 متذکّر شد؛ علاوه‌بر کاهش فراوانی پروتئازهای پری‌پلاسم نسبت‌به سیتوپلاسم که در بخش بیان سیتوپلاسمی مطرح شد، تفکیک و جداسازی پروتئین های 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 زمانی‌که 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 گلوتاتیون، تیوردوکسین‌ها و گلوتاردوکسین‌ها و هم‌چنین عدم حضور آنزیم‌های پری‌پلاسمی نظیر DsbC و DsbA در سیتوپلاسم است. آنزیم‌های DsbC و DsbA علاوه‌بر این‌که 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).

به‌تازگی پژوهشگران موفق شدند که جهش یافته‌های دوتایی در ژن تیوردوکسین ردوکتاز و گلوتاتیون اکسیدوردوکتاز را جداسازی کنند. هر چند که از قابلیت بقا برخوردارند اما سرعت رشد پایینی دارند و فقط توسط احیاکننده خارجی مانند دی تیوتریتول القا می‌شوند. با این وجود در شرایط عدم حضور دی تیوتریتول 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 آلکالین فسفاتاز *E. coli*، مالتاز، اوروکیناز و فعال کننده پلاسمینوژن بافتی هستند.

به‌تازگی سویه‌های مهندسی شده نظیر *Shuffle* و *Origami* عرضه شده است که حاوی جهش در دو ژن تیوردوکسین ردوکتاز و گلوتاتیون اکسیدوردوکتاز هستند. برای جایگزینی انتقال پروتئین به فضای پری‌پلاسمی می‌توان با بهره‌مندی از این سویه‌های 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 منجربه 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. علاوه‌بر در دسترس بودن توالی ژنومی، منبع دیگری به نام برچسب توالی بیان شده (EST) برای شناسایی پروتئین-های 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

RNA ساخته می‌شود. EST به‌صورت تصادفی از روی cDNA گونه‌های مختلف تشکیل شده‌است. آن‌ها برای شبیه-سازی 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 نسبت‌به 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 علاوه‌بر میزان e-value، ترازهای واقعی (actual alignment) نیز بررسی شود. از طرفی، علاوه‌بر 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 درنهایت 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 هم-پوشانی شده را در سایت NCBI پیدا کند. علاوه‌بر به‌دست آوردن توالی همولوگ، بینش گسترده‌ای را در فراوانی رونوشت‌های ژنی در بافت‌های مختلف فراهم می‌کند. هم-چنین این اطلاعات را می‌توان در جستجوگر UniGene-NCBI به‌دست آورد. جست‌وجوی UniGene اطلاعات مربوط به شباهت پروتئین در گونه‌های مختلف، نقشه‌برداری کروموزومی، بیان در بافت‌های مختلف و یا این‌که آیا توالی-های 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 اگزون‌ها و اینترون‌ها هستند. برای رونویسی DNA به RNA اگزون‌ها 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 اگزون-اینترون ژن‌ها را در توالی ژنوم شناسایی می‌کنند. همولوژی توالی‌های ژنومی می-تواند در پایگاه‌های اطلاعاتی خانواده‌های شناخته شده ژن‌ها بررسی شود. ساختار ژن ممکن است در پایگاه ژنومی در دسترس باشد. علاوه‌بر این، پروموتر و عناصر تنظیم کننده در توالی ژنوم نیز شناسایی می‌شوند (۶۱). گاهی اوقات در کلونینگ مجازی توالی کامل یک ژن یا پروتئین ارائه نمی-شود. در این حالت، طول کامل توالی ممکن است با بسط سریع انتهای cDNA، (RACE) به‌دست آید. در این روش RNA رونویسی شده در بافت مورد نظر به cDNA تبدیل می‌شود. لینکرهای الیگونوکلئوتیدی به انتهای ۵ یا ´۳ cDNAمتصل می‌شوند. از طریق PCR، می‌توان با ترکیبی از الیگونوکلئوتیدهای ژن مطلوب و الیگونوکلئوتیدهای 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 به‌طور متقارن بین گروه کنترل و آزمایش هدف

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

بیان شده است. سپس ژن بیان شده می‌تواند به‌صورت مجازی کلون شود (۶۳).

نتیجه‌گیری

تولید پروتئین‌های نوترکیب به‌عنوان یکی از مهم‌ترین شاخه-های زیست‌فناوری مدرن است. از این رو پروتئین‌های یوکاریوتی فراوانی از جنبه دارویی و اقتصادی مورد توجه هستند. اگرچه سیستم‌های بیانی مختلفی به‌عنوان میزبان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرند، باکتری *E.coli* به‌عنوان میزبان غالب استفاده می‌شود. این پروتئین‌ها به‌طور کلی دارای ساختارهای سوم و چهارم هستند و نیاز به پیوندهای دی‌سولفید و اصلاحات بعد از ترجمه برای رسیدن به فعالیت زیستی و ساختار فضایی مناسب دارند. تولید این پروتئین‌ها در *E.coli* چالش‌های فراوانی را می-طلبد؛ زیرا محیط سلولی، ماشین فولدینگ و نقاط کنترل-کننده کیفیت ساختارهای فضایی پروتئین در آن به‌طور کامل با یوکاریوت‌ها متفاوت هستند. یکی از معمول‌ترین مشکلاتی که با آن روبرو هستیم تشکیل توده‌های پروتئینی اینکلوژن-بادی‌ها است. افزایش محصول یک پروتئین نوترکیب و دست-یابی به ساختار صحیح و هم‌چنین کاهش میزان رسوب پروتئین هدف در سلول در طی تولید، همیشه ذهن محققین را به خود معطوف ساخته است. بدین منظور طی سال‌های اخیر و با پیشرفت روش‌های مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، استراتژی‌های متعددی برای افزایش بازدهی میزان حلالیت به‌کار گرفته شده است. از جمله این روش‌ها تغییر سرعت سنتز پروتئین‌ها، استفاده از پروتئین‌های اتصالی فیوژن، موتاسیون در پروتئین هدف، شرایط مساعد کشت و بیان هم‌زمان چاپرون‌های مولکولی است. معرفی توان و کاربرد هریک از این راه‌کارها عمده هدف تحقیق حاضر است. در این راستا ترکیبی از تکنولوژی توالی‌یابی، بیوانفورماتیک و تجزیه و تحلیل مجازی باعث افزایش سهولت پیش‌بینی نقش ژن و تفسیر عملکرد آن خواهد بود. مجموعه این تکنیک‌ها به‌عنوان کلونینگ مجازی امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

منابع

1. Kabirnataj 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

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, Takalloo 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

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. MeuTXKβ1, 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

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 RRK, 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-06]