NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.12/45 , 2022

Scan online to view this article

Optimization of light chain production of human enterokinase enzyme for use in the pharmaceutical industry

Mohammad Ebrahimifard[1], Mohammad Mahdi Forghanifard[*1], Ahad Yamchi[2], Vajihe Zarrinpur[2]

1. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
2. Department of Biotechnology, Golestan University, Gorgan, Iran.

Abstract

Aim and Background: Enterokinase is a gastrointestinal enzyme that acts as a protease with a specific sequence. Due to the ability of enterokinase to enzymatically digest the recombinant protein at its specific site (including the four amino acids Aspartic acid and one amino acid lysine), which is targeted at the protein, as a very useful tool for purification and separation Target protein from the non-target part is used in the pharmaceutical, food and industrial industries.

Materials and Methods: Independent variables used included OD (0.6, 1.2 and 1.8) at 600 nm, IPTG concentration (0.2, 0.5 and 0.8 mM) and The type of bacterial strain was (ShuffleT7, BL21, NICO21). The response surface methodology (RSM) in the form of a central composite scheme was used to predict independent variables on the production of enterokinase enzyme.

Results: OD equal to 1.8 at 600 nm wavelength, IPTG concentration of 0.71 mM and type of ShuffleT7 bacterial strain, LB culture medium, 2.5 mM lactose concentration and 25 ° C induction temperature, for production Recombinant enterokinase was optimized.

Discussion and Conclusion: Drug proteins play an important role in modern molecular medicine therapies. Enterokinase gene expression in the bacterial system facilitates the purification of low concentrations, so large-scale, highly purified recombinant proteins can be produced and optimized in the bacterial system.

Keywords: Enterokinase, Promoter inductor, Purification, Cloning, Expression host. Iau Science .

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]

Corresponding author:
Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
Email: forghanifard@gmail.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۲ - شماره۴۵ - زمستان ۱۴۰۰
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بهینه‌سازی تولید زنجیره سبک آنزیم انتروکیناز انسانی به‌منظور استفاده در صنایع دارویی

محمد ابراهیمی فرد[۱]، محمد مهدی فرقانی فرد[۱*]، احد یامچی[۲]، وجیهه زرین پور[۱]

۱. گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.
۲. گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: انتروکیناز یک آنزیم دستگاه گوارش است که به‌عنوان یک پروتئاز با توالی خاص عمل می‌کند. به‌دلیل توانایی انتروکیناز برای هضم آنزیمی پروتئین نوترکیب در سایت اختصاصی آن (شامل چهار اسید آمینه آسپارتیک اسد و یک اسید آمینه لیزین است) که در پروتئین هدف قرار داده می‌شود، به‌عنوان یک ابزار بسیار مفید برای امکان خالص‌سازی و جداسازی بخش پروتئین هدف از بخش غیر هدف در صنایع دارویی، غذایی و صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها: متغیرهای مستقل مورد استفاده شامل میزان OD (۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت IPTG (۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ میلی‌مولار) و نوع سویه باکتری (ShuffleT7, BL21, NICO21) بود. از روش سطح پاسخ (RSM) در قالب طرح مرکب مرکزی برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان تولید آنزیم انتروکیناز استفاده شد.

یافته‌ها: میزان OD برابر با ۱/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت IPTG ۰/۷۱ میلی مولار و نوع سویه باکتری ShuffleT7، محیط کشت LB، غلظت لاکتوز ۲/۵ میلی‌مولار و دمای القاء ۲۵ درجه سانتی‌گراد، برای تولید آنزیم انتروکیناز نوترکیب بهینه سازی شد.

بحث و نتیجه گیری: پروتئین‌های دارویی نقش مهمی در درمان‌های نوین پزشکی مولکولی دارند. بیان ژن انتروکیناز در سیستم باکتریایی، تسهیل در خالص‌سازی غلظت‌هایی که پایین است را فراهم می‌کند، بنابراین پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس وسیع و با خلوص زیاد می‌توانند در سیستم باکتریایی تولید و بهینه‌سازی شوند.

واژه‌های کلیدی: انتروکیناز، القاگر پروموتر، خالص‌سازی، کلونینگ، میزبان بیانی، Iau Science.

مقدمه

انترو پپتیداز یکی از اعضای خانواده سرین پروتئازهای نوع II گذرنده از غشاء است که در مرز دوازدهه قرار دارد. این آنزیم به‌عنوان یک زیموژن (پروانتروکیناز) که نیاز به فعال‌سازی توسط یک پروتئاز دیگر، تریپسین و یا به‌احتمال دودنئاز دارد، سنتز می‌شود (۱،۲). انتروکیناز به‌عنوان پروتئاز، به‌طور اختصاصی، پروپپتیدی اسیدی را از تریپسینوژن جدا کرده و آن‌را به تریپسین فعال تبدیل می‌کند. در واقع انتروکیناز یک سرین پروتئاز متصل‌به غشاء در دوازدهه است که تریپسینوژن را در جایگاه خاص X LYS-ASP می‌شکند و آن‌را تبدیل به تریپسین فعال می‌کند (۳،۴). انتروکیناز از روده خوک، گاو، انسان و دیگر موجودات خالص شده است که به‌نظر می‌رسد در اکثر موارد، هترودایمری مرتبط با پیوند دی‌سولفیدی باشد. این آنزیم از یک زنجیره واحد پیش‌ساز مشتق شده که شامل زنجیره سنگین ۱۴۰-۸۲ کیلو دالتونی و زنجیره سبک ۶۲-۲۸ کیلو دالتونی است. هر دو زنجیره انتروکیناز حاوی ۵۰-۳۰ درصد کربوهیدرات است. انتروکیناز در ابتدا به نام انتروپپتیداز شناخته می‌شد، که برای اولین بار توسط پاولوف روسی در سال ۱۸۹۹ کشف شد (۵). کونیتز در سال ۱۹۳۹ اولین بار انتروکیناز را به‌عنوان فعال کننده در دودنئوم پستانداران معرفی کرد که تبدیل آنزیمی تریپسینوژن به تریپسین با استفاده از انتروکیناز خالص خوکی را انجام می‌داد. انتروکیناز یک کیناز نیست، بنابراین در حال حاضر این آنزیم به نام انتروکیناز که منعکس کننده فعالیت پروتئولیتیک آن است، شناخته می شود (۶). بعد از کشف انتروکیناز و شناسایی ویژگی‌های اختصاصی این آنزیم، در اکثر موارد استفاده تجاری

نویسنده مسئول:
گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
پست الکترونیکی: forghanifard@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۶

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]

انتروکیناز به منابع جدا شده از بافت دوازدهه حیواناتی مانند گاو و خوک محدود شده بود. اکنون استفاده از فناوری مهندسی پروتئین امکان تولید و بیان ناهمگن انتروکیناز در میزبان پروکاریوتی به شیوه نوترکیب را ایجاد کرده است (۱). این آنزیم نقشی کلیدی در آبشار گوارشی دستگاه گوارش بازی می‌کند و آن شکستن پپتید فعال‌سازی انتهای آمینی تریپسینوژن و تولید تریپسین فعال است، در نتیجه پس از آن تریپسین منجر به فعال سازی دیگر زیموژن‌های پانکراسی (تریپسین، کیموتریپسین، کربوکسی پپتیداز و الاستاز) می‌شود (۷،۸).

در حال حاضر انتروکیناز، ترومبین[1]، فاکتور Xa[2]، TEV[3] و غیره پروتئازهایی هستند که برای برش پروتئین ترکیبی تولید شده در باکتری استفاده می شوند. در میان این پروتئازها، انتروکیناز به‌عنوان یک آنزیم ایده‌آل برای خالص‌سازی پروتئین هدف با شکست دنباله خاص از پروتئین ترکیبی به‌شمار می‌رود (۹،۱۰،۱۱). به‌دلیل توانایی انتروکیناز برای شکافتن پروتئین نوترکیب در جایگاهی بسیار خاص در حضور مواد شوینده، دناتوره‌های مختلف، عمل در یک محدوده گسترده pH و درجه حرارت، این آنزیم تبدیل به یک ابزار بسیار جذاب و مفید برای جداسازی نواحی پروتئین نوترکیب در بیوتکنولوژی شده است (۱۲).

در سال‌های گذشته منبع انتروکیناز طبیعی، با توجه‌به هزینه‌های بالای استخراج و جداسازی آنزیم از حیوانات بوده، که در نهایت منجر به تولید پروتئین آلوده و محدود می‌گردید. بنابراین تلاش‌ها به‌منظور توسعه تولید انتروکیناز با استفاده از روش مهندسی ژنتیک معطوف شده است (۱۳). به‌عنوان مثال، Kim و همکاران در سال ۲۰۲۱ بیان و خالص‌سازی زنجیره سبک انتروکیناز انسانی محلول و فعال در باکتری اشریشیاکلای را مورد مطالعه قرار دادند (۱۴). هم‌چنین Aghaeepoor و همکاران در سال ۲۰۱۹ به بررسی بهینه‌سازی تولید آنزیم استریپتوکیناز نوترکیب در سویه باکتری اشریشیاکلی با روش سطح پاسخ پرداختند (۱۵). با این حال، تاکنون هیچ مطالعه ای در زمینه بهینه سازی شرایط بیان ژن انتروکیناز انجام نشده است، بنابراین هدف از این مطالعه کلونینگ و بیان ژن آنزیم انتروکیناز انسانی در سویه‌های گوناگون باکتری *E.coli* و دست‌یابی به بهترین سویه باکتری *E.coli* مولد آنزیم انتروکیناز و شرایط جهت بیان ژن بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد

در این پژوهش از باکتری *E.coli* سویه‌های BL21، NICo21، Shuffle T7 برای بیان پروتئین انتروکیناز استفاده شد. وکتور مورد استفاده در این مطالعه pET15b است. این وکتور دارای مارکر انتخابی آمپی‌سیلین و پروموتور T7 است.

روش‌ها

استخراج پلاسمید نوترکیب استخراج داده‌های مربوط به ژن موردنظر از بانک ژن و طراحی سازه ژنی

در این مطالعه از روی ژن اصلی انتروکیناز انسانی (EC 3.4.21.9)، سازه ژنی موردنیاز طراحی گردید.

تهیه Competent Cell

مراحل تهیه کشت بر اساس روش Zurawa-Janicka و همکاران (۲۰۱۷) انجام شد. به‌طور خلاصه، پس از تهیه LB broth، به آن سلول میزبان BL21، Nico21 و Shuffle T7 اضافه شد (۷). برای استخراج پلاسمید از تک کلنی‌های کشت داده شده داخل پلیت با استفاده از لوپ برداشته شد و داخل محیط LB broth کشت داده و مقدار ۵ میکرولیتر (۱۰۰ mg/L) آنتی‌بیوتیک آمپی‌سلین نیز اضافه گردید.

پلاسمید pET15b در مقیاس کوچک طبق دستورالعمل با کیت Thermo استخراج گردید.

انجام PCR برای تأیید استخراج پلاسمید

واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۷۵ میکرولیتر آب‌مقطر دو بار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰x، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر دو آغازگر اختصاصی (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم تک پلی‌مراز (۵ واحد/میکرولیتر) و ۵ میکرولیتر DNA (۵۰ نانو گرم) استفاده گردید. در این تحقیق از یک برنامه چرخه حرارتی به‌طور اختصاصی برای آغازگرها استفاده گردید. برای مرحله واسرشت اولیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه اعمال شد. تکثیر در ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۶ درجه به‌مدت ۱ دقیقه و دمای

[1] Thrombin
[2] Factor Xa
[3] Tobacco Etch Virus

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]

گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ ثانیه صورت گرفت. یک سیکل نهایی شامل مرحله گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR در ژل اگارز ۱/۵ درصد TBE و با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت در ۸۰ دقیقه الکتروفورز شد (۱۶،۱۷).

هضم آنزیمی

به‌منظور درج قطعه نوترکیب در پلاسمید، ابتدا لازم است که هم قطعه نوترکیب و هم پلاسمید به‌وسیله آنزیم‌های محدودگر یکسان، بریده شوند. برای انجام هضم آنزیمی در ابتدا و انتهای قطعه نوترکیب، جایگاه برش برای آنزیم‌های *BamHI* و *XhoI* تعبیه شد. پلاسمید pET15b هم در جایگاه کلونینگ خود محل‌های برش برای این دو آنزیم را داشت. مواد موردنیاز برای انجام واکنش هضم آنزیمی شامل آب استریل (۲ میکرولیتر)، بافر ۱۰X (۴ میکرولیتر)، آنزیم *BamHI* ،۱ میکرولیتر (۱۰unit/µl)، آنزیم *XhoI* ، ۱/۲ میکرولیتر (۱۰unit/µl)، پلاسمید و قطعه ژن، ۱۲ میکرولیتر (۱ ماکروگرم) بود. به‌منظور اطمینان از انجام واکنش هضم آنزیمی، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد TBE برده شدند و از هر کدام از نمونه ها، یک کنترل نیز گذاشته شد (۱۸).

جدول ۱. طراحی آزمایش مرحله اول با RSM

سطح	فاکتور		
	OD	Host Cell	IPTG (mM)
۱	۰/۶	BL 21	۰/۲
۲	۱/۲	Shuffle	۰/۵
۳	۱/۸	Nico	۰/۸
RSM با ۳ فاکتور			
Run	Factor 1: OD	Factor 2: Host Cell	Factor 3: IPTG
۱	۰/۶	BL 21 (1)	۰/۲
۲	۰/۶	BL 21 (1)	۰/۸
۳	۱/۲	BL 21 (1)	۰/۵
۴	۱/۸	BL 21 (1)	۰/۲
۵	۱/۸	BL 21 (1)	۰/۸
۶	۰/۶	Shuffle (2)	۰/۵
۷	۱/۲	Shuffle (2)	۰/۲
۸	۱/۲	Shuffle (2)	۰/۸
۹	۱/۲	Shuffle (2)	۰/۵
۱۰	۱/۲	Shuffle (2)	۰/۵
۱۱	۱/۲	Shuffle (2)	۰/۵
۱۲	۱/۸	Shuffle (2)	۰/۵
۱۳	۰/۶	Nico (3)	۰/۲
۱۴	۰/۶	Nico (3)	۰/۸
۱۵	۱/۲	Nico (3)	۰/۵
۱۶	۱/۸	Nico (3)	۰/۸
۱۷	۱/۸	Nico (3)	۰/۲

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]

بیان ژن انتروکیناز و انتخاب بهترین Host Cell

با استفاده از روش آماری RSM، بررسی وضعیت بیان در OD ها و غلظت‌های IPTG مختلف، بهترین Host Cell انتخاب گردید و ادامه کار با این Host Cell انجام شد. هم‌چنین بهترین OD و مقدار IPTG نیز در این مرحله انتخاب گردید (جدول ۱). برای این مرحله استوک Host Cell های مختلف از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد بیرون آورده شد و پس از هم دما شدن، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر کدام داخل یک لوله حاوی محیط LB broth ریخته و سپس مقدار ۵ میکرولیتر (۱۰۰mg/L) آنتی‌بیوتیک Amp به آن افزوده شد و به‌صورت overnight داخل شیکر انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۸۰ rpm قرار گرفت. سپس پیش کشت به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط LB دارای آنتی‌بیوتیک Amp اضافه شد و داخل شیکر انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. حال با توجه‌به OD و IPTG های نوشته شده در جدول ۱ مرحله القاء انجام و پس از اضافه نمودن IPTG، ۴ ساعت دیگر در شیکر انکوباتور با همان دما قرار داده شد. سپس محتویات کشت داده شده داخل یک فالکون استریل ریخته شد و

جدول ۲ -طراحی آزمایش مرحله دوم با RSM

سطح	فاکتور		
	Medium	Lactose (mM)	Tm[1]
۱	M9	۰	۱۸
۲	LB	۲/۵	۲۵
۳	TB	۵	۳۲
Response Surface Methodology (RSM) with 3 Factor			
Run	Factor 1: Medium	Factor 2: Lactose	Factor 3: Tm
۱	LB	۲/۵	۱۸
۲	TB	۵	۱۸
۳	TB	۵	۳۲
۴	TB	۰	۳۲
۵	M9	۲/۵	۲۵
۶	TB	۲/۵	۲۵
۷	LB	۰	۲۵
۸	LB	۲/۵	۳۲
۹	M9	۰	۳۲
۱۰	M9	۵	۳۲
۱۱	LB	۵	۲۵
۱۲	M9	۰	۱۸
۱۳	LB	۲/۵	۲۵
۱۴	LB	۲/۵	۲۵
۱۵	LB	۲/۵	۲۵
۱۶	TB	۰	۱۸
۱۷	M9	۵	۱۸

[1] temperature melting

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]

در دور rpm ۶۵۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۴ دقیقه سانتریفیوژ گردید (۱۹،۲۰).

بهینه‌سازی بیان بیش‌تر پروتئین

بهینه‌سازی در مرحله القاء پروتئین

به‌منظور بهینه‌سازی و گرفتن بیان بالاتر در مرحله القاء، علاوه‌بر القاگر IPTG از القاگر لاکتوز در غلظت‌های mM ۱۰-۴۰ نیز استفاده شد.

بررسی انواع محیط کشت، ترکیب تیمارهای نوع القاگر و دمای القا

در این مرحله برای گرفتن بهترین بیان ممکن، شرایط مختلفی طبق روش آماری RSM و بر پایه نتایج مرحله اول، طراحی شد(جدول ۳). به این صورت که باکتری با شرایط زیر وارد این مرحله شد:

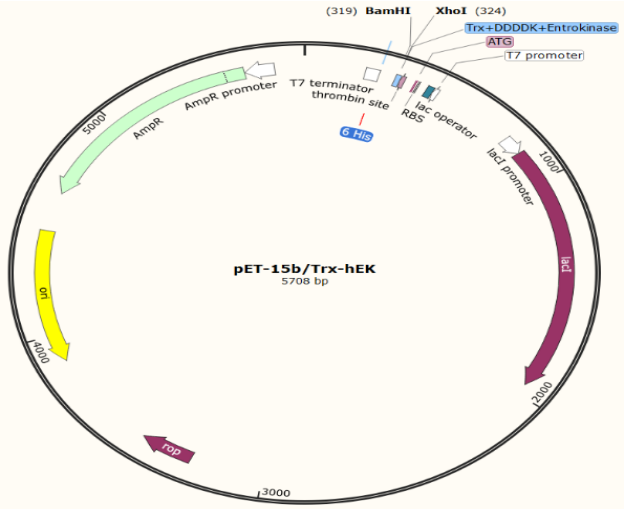
Shuffle T7 , IPTG=0.71mM , OD= 1.8

در تمام تیمارها مقدار IPTG, OD ثابت بود و فاکتورهای مشخص شده طبق جدول ۲ متغیر بودند. محیط‌های کشت مورد نیاز این مرحله نیز تهیه گردید.(در محیط M9 گلوکز بعد از اتوکلاو و توسط فیلتر به محیط اضافه شد) دمای قبل از القاء نیز برای تمامی تیمارها ۳۵ درجه سانتی‌گراد دور شیکر نیز ۱۸۰ rpm بود و دماهای ذکر شده در جدول ۲ مربوط به زمان القاء و پس از افزودن ماده القاگر است. در پایان این مرحله مراحل استخراج، غلظت‌سنجی و الکتروفورز نیز انجام شد.

نتایج

سازه ژنی طراحی شده

سازه ژنی طراحی شده برای بهینه‌سازی متناسب با کدون های *E.coli* و RBS مناسب صورت پذیرفت.



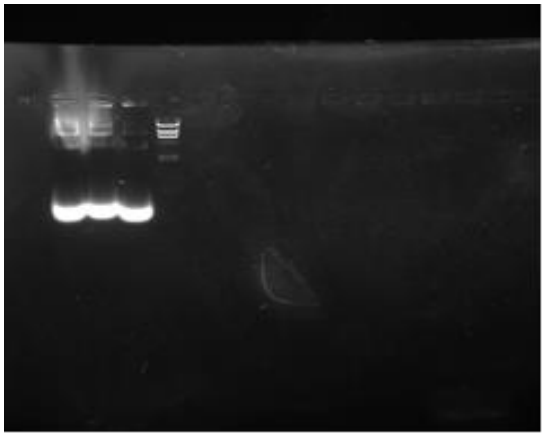
شکل ۱- سازه ژنی طراحی شده به‌همراه وکتور

استخراج پلاسمید نوترکیب

به‌منظور انجام واکنش الحاق ژن در ناقل، استخراج ناقل با استفاده از کیت استخراج ناقل شرکت Thermo انجام شد و درستی انجام عملیات استخراج با بارگذاری ۷ میکرولیتر از ناقل استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی و تأیید شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

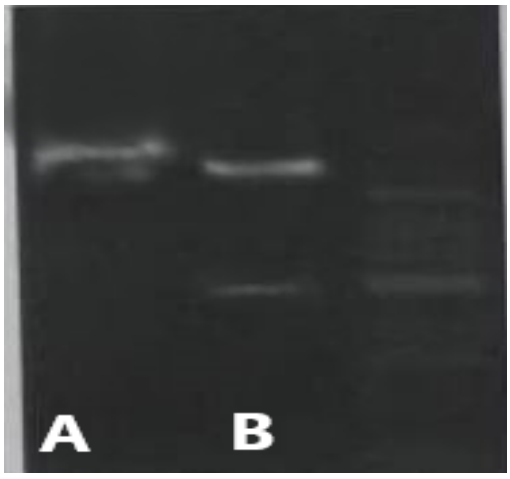
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]



شکل ۲. استخراج پلاسمید PET15b هر سه چاهک مربوط به ناقل pET15b استخراج شده است

هضم آنزیمی

پس از هضم آنزیمی ژن انتروکیناز، الکتروفورز انجام شد و نتیجه آن نشان داد که ژن انتروکیناز در وکتور بیانی کلون شده است.



شکل ۳. الکتروفورز هضم آنزیمی. A. ژن انتروکیناز. B. ژن انتروکیناز کلون شده.

بهینه‌سازی فرآیند بیان ژن انتروکیناز و انتخاب بهترین Host Cell

تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیان‌گر پاسخ، با ضرایب مشخص است. R^2=۰/۹۶۵۳ مؤید این است که مدل رگرسیون، واکنش را به‌خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ۹۶/۵۳ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد. R^2 معیاری است برای این‌که مشخص گردد چه میزان از تغییرات توسط مدل شرح داده شده است و در موارد R^2 واقعی و R^2 تعدیل شده[1] که به‌ترتیب ۰/۹۶۵۳ و ۰/۹۳۴۰ به‌دست آمدند، بیان‌گر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بوده‌اند. هم‌چنین مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش مورد بررسی قرار گرفت که در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود ($P> ۰/۰۵$). از آنجا که فرض آزمون عدم برازش در معادله مدل معنی‌دار نبود؛ مدل بر اساس پارامترهای مختلف برازش گردید. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجاد شده توانسته است که تغییرات در داده‌ها را به اندازه کافی توضیح دهد، لذا این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه تعیین شده برای متغیرهای مورد استفاده مناسب بود. نمودارهای سه‌بعدی سطحی و کانتور[2] برای متغیرها ترسیم شده است. هر شکل اثرات دو متغیر را روی پاسخ نمایش می‌دهند، که در هر نمودار متغیر سوم در میزان بهینه‌اش ثابت نگه‌داشته شده است.

انتخاب بهترین OD

در این مرحله یکی از متغیرهای مستقل بیان آنزیم انتروکیناز در سه OD مختلف (۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸) با طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد که از روش سطح پاسخ

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]

RSM[1] در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD[2]) برای پیش‌بینی متغییرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده و با توجه-به شکل ۱ (الف) می‌توان بیان کرد که تغییرات غلظت میکروارگانیسم به‌طور معنی-داری بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز تأثیر داشته است (P> ۰/۰۵). با توجه‌به شکل همان‌گونه که مشخص است، میزان بیان پروتئین انتروکیناز هم‌راستا با افزایش غلظت میکروارگانیسم روند افزایشی داشته و نمونه‌های حاوی غلظت ۱/۸ از میکروارگانیسم سبب بیان بیش‌ترین میزان آنزیم انتروکیناز شده هم‌چنین کم‌ترین میزان بیان آنزیم انتروکیناز در نمونه‌های حاوی غلظت ۰/۶ میکروارگانیسم بوده است.

انتخاب بهترین غلظت القا کننده (IPTG)

در این مرحله یکی دیگر از متغیرهای مستقل بیان آنزیم انتروکیناز در سه غلظت IPTG مختلف (۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ میلی‌مولار) بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی متغییرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده و با توجه‌به شکل ۱ (ب) بهترین غلظت IPTG برای بیان آنزیم انتروکیناز برابر با ۰/۷۱ میلی‌مولار است که این ناحیه با توجه‌به سطح زیر منحنی پروتئین به‌دست آمد.

انتخاب بهترین سویه

در این مرحله متغیر مستقل سوم بیان آنزیم انتروکیناز در سه سویه مختلف (ShuffleT7, BL21, NICO21) بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی متغییرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده و با توجه‌به شکل ۱ (ج) بهترین سویه برای بیان آنزیم انتروکیناز ShuffleT7 است که این سویه با توجه‌به سطح زیر منحنی پروتئین به‌دست آمد.

ارزیابی نقطه بهینه برای فرآیند بیان آنزیم انتروکیناز در مرحله اول بهینه‌سازی

پس از انجام آزمون‌های اولیه محدوده مناسبه متغیرهای مستقل تولید آنزیم انتروکیناز شامل (میزان OD، غلظت IPTG و نوع سویه باکتری) از روش سطح پاسخ (RSM) در قالب طرح مرکب مرکزی برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان تولید آنزیم انتروکیناز استفاده شد (شکل ۲). در بهینه سازی تولید آنزیم انتروکیناز از ۱۷ تیمار بر اساس طرح مرکب مرکزی، شامل ۳ تکرار در نقطه مرکزی استفاده شد. متغیرهای مستقل مورد استفاده در مرحله اول شامل میزان OD (۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت IPTG (۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ میلی‌مولار) و نوع سویه باکتری (ShuffleT7, BL21, NICO21). نقطه مرکزی دارای شرایط میزان OD برابر با ۱/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت IPTG ۰/۷۱ میلی‌مولار و نوع سویه باکتری ShuffleT7 بود.

بهینه‌سازی مرحله دوم انتروکیناز

انتخاب بهترین محیط کشت

فاکتورهای زیادی بر شرایط تخمیر مؤثر هستند که می-توانند بر رشد باکتری‌ها اثر بگذارند، یکی از آن‌ها نوع محیط کشت مورد استفاده است. که ما در این مرحله از محیط کشت‌های LB[3], TB[4], M9[5] که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی متغییرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده نمودیم و با توجه‌به شکل ۱ (د) می-توان بیان کرد که تغییرات محیط کشت به‌طور معنی‌داری بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز تأثیر داشته است. P<0.05 با توجه‌به شکل همان‌گونه که مشخص است، میزان بیان پروتئین انتروکیناز هم‌راستا با تغییر محیط کشت روند افزایشی داشته و نمونه‌های حاوی محیط کشت LB از سبب بیان بیش‌ترین میزان آنزیم انتروکیناز شده هم-چنین کم‌ترین میزان بیان آنزیم انتروکیناز در محیط کشت M9 بوده است.

انتخاب بهترین غلظت لاکتوز

در این مرحله یکی از متغیرهای مستقل بیان آنزیم انتروکیناز در سه غلظت لاکتوز مختلف (۰، ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار) بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی متغییرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده و با توجه‌به شکل ۱(ه) می‌توان بیان کرد که تغییرات غلظت لاکتوز به‌طور معنی‌داری بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز تأثیر داشته است. P < ۰/۰۵ با توجه‌به شکل همان‌گونه که مشخص است، میزان بیان پروتئین انتروکیناز هم‌راستا با تغییر غلظت لاکتوز روند افزایشی کمی داشته و نمونه‌های حاوی غلظت لاکتوز ۲/۵ میلی-مولار سبب بیان بیش‌ترین میزان آنزیم انتروکیناز شده هم‌چنین کم‌ترین میزان بیان آنزیم انتروکیناز در نبود لاکتوز بوده است.

[1] Response Surface Methodology

[3] Lysogeny broth
[4] Terrific Broth

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]

انتخاب بهترین دمای القاء

در این مرحله یکی از متغیرهای مستقل بیان آنزیم انتروکیناز در سه دمای مختلف (۱۸، ۲۵ و ۳۲ سانتی-گراد) بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی متغییرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده و با توجه‌به شکل ۱ (و) می‌توان بیان کرد که تغییرات دما به‌طور معنی‌داری بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز تأثیر داشته است. $P < ۰/۰۵$ با توجه‌به شکل همان‌گونه که مشخص است، میزان بیان پروتئین انتروکیناز هم‌راستا با تغییر دما روند افزایشی داشته و نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد سبب بیان بیش‌ترین میزان آنزیم انتروکیناز شده هم‌چنین کم‌ترین میزان بیان آنزیم انتروکیناز در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد بوده است.

ارزیابی نقطه بهینه برای فرآیند بیان آنزیم انتروکیناز در مرحله دوم بهینه‌سازی

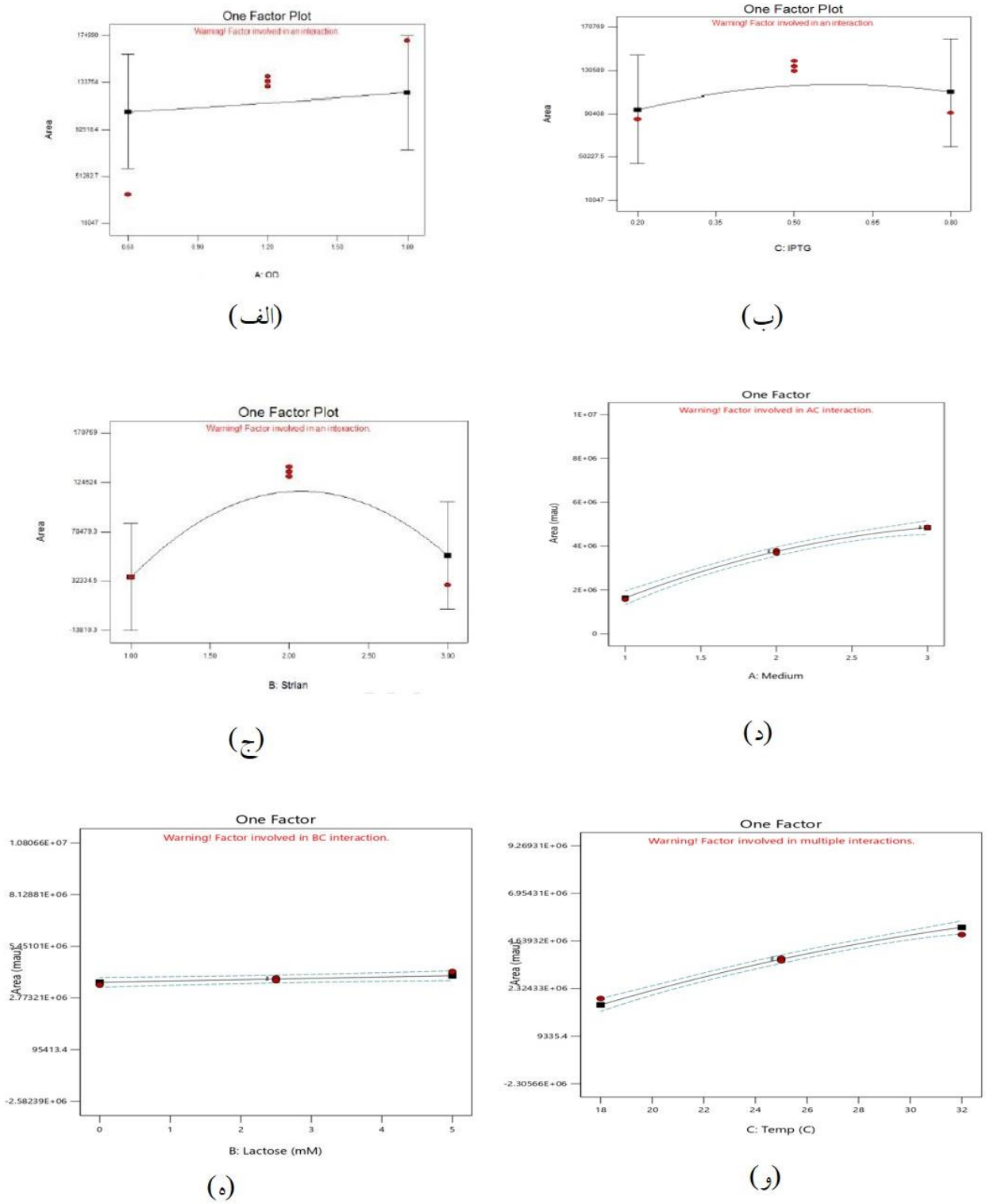
پس از انجام آزمون-های اولیه محدوده مناسبه متغیرهای مستقل تولید آنزیم انتروکیناز شامل (نوع محیط کشت، غلظت لاکتوز و دمای القاء) از روش سطح پاسخ (RSM) در قالب طرح مرکب مرکزی برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان تولید آنزیم انتروکیناز استفاده شد. در بهینه‌سازی تولید آنزیم انتروکیناز از ۱۷ تیمار بر اساس طرح مرکب مرکزی، شامل ۳ تکرار در نقطه مرکزی استفاده شد. متغیرهای مستقل مورد استفاده در مرحله اول شامل نوع محیط کشت (LB, TB, M9)، غلظت لاکتوز (۰، ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار) و دمای القاء (۱۸، ۲۵ و ۳۲ سانتی‌گراد). نقطه مرکزی دارای شرایط محیط کشت LB، غلظت لاکتوز ۲/۵ میلی‌مولار و دمای القاء ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. هم‌چنین پاسخ اندازه‌گیری شده شامل غلظت آنزیم انتروکیناز با استفاده از سطح زیر منحنی پیک نمودار کروماتوگرام کروماتوگرافی مایع با فشار بالا بود. در روش سطح پاسخ برای هر پاسخی مدلی تعریف می شود که اثر مستقل و متقابل متغیرها را بر روی هر پاسخ بررسی می‌کند. تجزیه واریانس برای ارزیابی اثرات معنی‌دار متغیرهای فرآیند بر روی پاسخ انجام شد. با انجام تجزیه و تحلیل ضریب هم‌بستگی (R^2) چند متغیره، مدل‌های مختلف بر اساس R^2 واقعی و R^2 پیش‌بینی شده مقایسه شد. در نهایت تیمار بهینه با توجه‌به نتایج پیش-بینی می‌شود (شکل ۳).

بحث

پزشکی به سمت دوران جدیدی در حرکت است که در آن روش‌هایی برای مدیریت بیماری‌ها در سطح اطلاعات ژنتیکی و پروتئینی که همگی بیولوژی هستند، ایجاد شده است و پروتئین‌های دارویی نقش مهمی در درمان‌های نوین پزشکی مولکولی دارند. در حال حاضر، پروتئین‌های انسانی نوترکیب، بخش قابل توجهی از داروهای بیوتکنولوژی تأیید شده توسط FDA را تشکیل می‌دهند. اگرچه دستکاری در سیستم‌های بیان باکتریایی به‌نسبت آسان و ساده است، اما ایجاد روش‌های مؤثر برای بهبود حلالیت پروتئین‌ها، مانعی است که باید برطرف شود (۲۱). در سال ۲۰۱۷ درویشی به تکثیر، کلون‌سازی و بررسی بیان زنجیره سبک انتروکیناز گاوی در اشریشیاکلای پرداخت. اما در این مطالعه ما به کلونینگ و بهینه‌سازی شرایط بیان ژن، در سویه‌های گوناگون باکتری *Escherichia coli* پرداختیم. از دلایل انتخاب این سیستم بیانی پروکاریوتی، قیمت پایین، بهره‌وری و سرعت بالاست که مناسب‌ترین گزینه برای بیان پروتئین‌های نوترکیب است و در این بین اشریشیاکلای بهترین گزینه است (۲۲،۲۳). نقطه حائز اهمیت در این مطالعه این است که پروتئین زنجیره سبک انتروکیناز انسانی دارای فعالیت بیولوژیکی بالاتری نسبت‌به مشابه گاوی است (۲۴). در سال ۲۰۱۵ نصیبی مطالعه‌ای بر روی تولید پروتئین نوترکیب HFBI در باکتری *E.coli* سویه Shuffle T7 انجام داد و به این نتیجه دست یافت که کاهش دما (از ۳۷ به ۲۲ درجه سانتی‌گراد)، میزان بیان پروتئین نوترکیب را افزایش می‌دهد، ایشان دلیل افزایش بیان پروتئین نوترکیب را کاهش نرخ رشد باکتری و افزایش انرژی باکتری برای تولید بیش‌تر می‌دانست (۲۵) در این پژوهش بهینه‌سازی دما با استفاده از روش RSM صورت گرفت که دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بهترین دما برای بالاترین مقدار تولید پروتئین نوترکیب به‌دست آمد. کاهش دمای القاء منجر به کاهش میزان سنتز پروتئین خواهد شد، چون سنتز پروتئین با سرعت بالا می‌تواند برای تا شدن و حلالیت پروتئین مضر باشد (۲۶). Abdollahzadeh و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه-ای برای بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتینار از روش آماری RSM استفاده نمودند و آن‌ها به این نتیجه رسیدند که استفاده از این روش، برای بهینه سازی تولید آنزیم مؤثر بوده و تولید آنزیم را کمابیش ۱۲ برابر افزایش داد (۲۷)، ما نیز در این مطالعه از روش RSM که رابطه بین یک یا چند متغیر پاسخ را با چندین متغیر مستقل (مورد مطالعه) تعیین می‌کند (۲۸)، استفاده کردیم که منجر به صرفه-جویی در وقت و افزایش کارایی بیان شد. (این روش ۸۴

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]



شکل ۴. نمودار تأثیرفاکتورهای مختلف بیان آنزیم نسبت به سطح زیر منحنی پروتئین

(الف) دانسیته نوری (OD)

(ب) غلظت IPTG

(ج) سویه

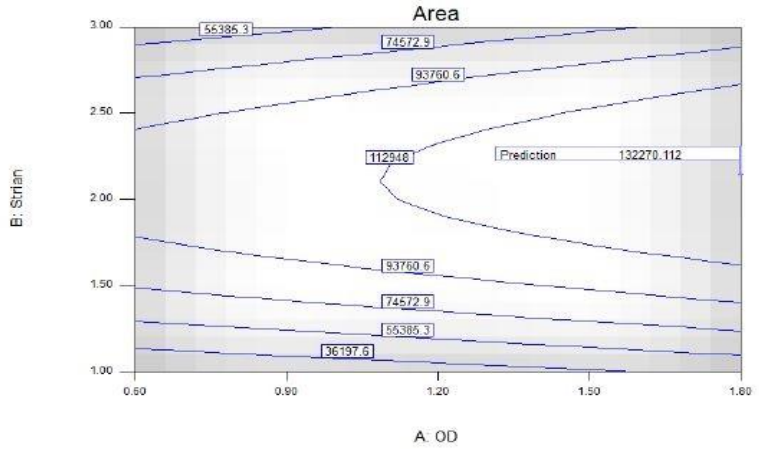
(د) محیط کشت

(ه) غلظت لاکتوز

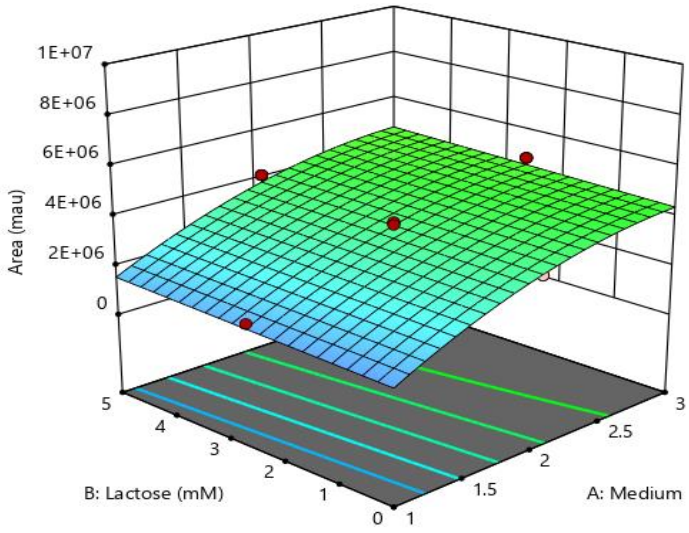
(و) دما

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]



شکل ۵. بهینه‌سازی بیان آنزیم انتروکیناز با تأثیرات OD برابر ۱/۸، غلظت IPTG برابر ۰/۷۱ میلی‌مولار، سویه باکتری ShuffleT7



شکل ۶. بهینه‌سازی تیمارهای مرحله دوم (سطح سه بعدی). با توجه‌به Area های به‌دست آمده بهترین غلظت لاکتوز و بهترین محیط کشت انتخاب گردید.

نمونه را به ۱۷ نمونه مورد بررسی کاهش داد). Packiam و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه‌ای به بهینه‌سازی تولید پروتئین نوترکیب در اشریشیاکلای با استفاده از رویکردهای محاسباتی و تجربی پرداختند. آن‌ها معتقد بودند که کاربرد همه روش‌های بهینه‌سازی به‌ترتیب برای همه فاکتورهای حیاتی در سطح بیان و فرآیند می‌تواند منجر به بازده بالای پروتئین نوترکیب شود. اولین گام در تولید پروتئین‌های نوترکیب در اشریشیاکلای، استفاده از ابزارهای محاسباتی مناسب برای تولید مدلی با استفاده از ویژگی‌های تأثیرگذار است که بهینه‌سازی عوامل مبتنی‌بر ژن و پروتئین را تسهیل می‌کند. گام بعدی استفاده از بهینه‌سازی یک فاکتور در یک زمان و انتخاب براساس دانش روز است، که امکان انتخاب بهینه میزبان، ناقل و محیط را فراهم می‌کند. گام بعدی بهینه‌سازی چند متغیره آماری هست که که برای شناسایی سطوح بهینه تمام فاکتورهای فرآیندی انتخابی ارجح خواهد بود. در طولانی مدت می‌توان با تجربیات به‌دست آمده از گام‌های دوم و سوم، ابزارهای محاسباتی مناسب طراحی و اجرا نمود. چنین سیستم پیشرفته‌ای قادر به پیش‌بینی عملکرد پروتئین در اشریشیاکلای نوترکیب بوده و آزمایش‌های آزمایشگاهی را بیش‌تر کاهش خواهد داد (۲۹). Hui و همکاران در سال ۲۰۲۱ طبق مطالعه‌هایی که بر روی پیش‌بینی بیان پروتئین‌های ترشحی در باکتری‌های گرم منفی انجام دادند به این نتیجه دست یافتند که تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی در *E.coli* در موقعیت‌های غیرسیتوپلاسمی یعنی پری‌پلاسم انجام می‌شود. در پری-

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]

پلاسم *E.coli* دی‌سولفیدی اکسیدوردوکتازها و ایزومرازها قرار گرفته‌اند که تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی را کاتالیز می‌کند و تجمع پروتئین‌های دارای تاخوردگی صحیح را امکان‌پذیر می‌کند، از این رو ایجاد پروتئین محلول، پری-پلاسم را به قسمت ایده‌آلی برای بیان پروتئین‌های درمانی خاص تبدیل نموده است (۳۰). اما با توجه‌به این‌که بیان پروتئین در پری‌پلاسم *E.coli* بسیار اکسید کننده است، ما برای کسب پروتئین دارای پیوند دی‌سولفیدی مطلوب (انتروکیناز) و در نتیجه تاخوردگی صحیح، استفاده از بیان سیتوپلاسمی را در سویه Shuffle T7 انتخاب نمودیم. سویه Shuffle T7 به‌علت تشکیل پیوندهای دی سولفیدی و اختصاصی بودن RNA پلی‌مراز فاژ T7 به‌کار رفته در سیستم بیانی pET برای توالی پروموتری مربوط به خود، برای بیان سیتوپلاسمی پروتئین نوترکیب در اشرشیاکلی حائز اهمیت است، از دیگر مزایای این سویه، اصلاح پیوندهای نادرست اکسید شده است (۳۴-۳۱). Molaee و Abtahi در سال ۲۰۱۱ به بررسی بهینه‌سازی تولید آنزیم استرپتوکیناز نوترکیب در باکتری اشریشیاکلای پرداختند. آن‌ها دریافتند تغییر شرایط محیط کشت می‌تواند باعث افزایش میزان تولید پروتئین-های نوترکیب در باکتری میزبان گردد. وجود برخی عوامل غذایی از جمله گلوکز به‌تنهایی باعث افزایش محصول نمی-شود بلکه امکان دارد کاهش محصول را نیز در پی داشته باشد (۳۵) در این مطالعه میزان بیان پروتئین انتروکیناز هم‌راستا با تغییر محیط کشت (M9, TB, LB) روند افزایشی داشته و نمونه‌های حاوی محیط کشت LB و M9 به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین میزان بیان آنزیم انتروکیناز را نشان داد، در ادامه در مرحله القاء علاوه‌بر IPTG از لاکتوز هم استفاده نمودیم که پایین-ترین غلظت لاکتوز (۲/۵ میلی‌مولار) سبب بیش‌ترین بیان پروتئین نوترکیب گردید. Babakan و همکاران در سال ۲۰۱۹ با بررسی بهینه‌سازی بیان و تخلیص آنزیم گلوتات اندوپپتیداز از باکتری هالوترمولرانت، به‌صورت پری-پلاسمی در غلظت‌های ۰/۴، ۱ و ۲ میلی‌مولار القاگر، بهینه‌سازی نمودند، آن‌ها دریافتند که بهترین نتیجه برای بیان پری‌پلاسمیک پروتئین نوترکیب با غلظت ۲ میلی-مولار IPTG است (۳۶). از جمله متغیرهای این پژوهش، بیان آنزیم انتروکیناز در سه غلظت IPTG (۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ میلی‌مولار) به روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی بود که غلظت ۰/۷۱ میلی‌مولار IPTG بهترین غلظت برای بیان آنزیم انتروکیناز انتخاب گردید. از آنجا که تولید انبوه انتروکیناز محلول در باکتری‌ها هنوز یک چالش حل نشده است، ما در این پژوهش فقط بیان آنزیم انتروکیناز انسانی را بهینه‌سازی نمودیم، برای تولید انبوه این آنزیم باید بهینه‌سازی تخلیص آن نیز مورد بررسی قرار گیرد. هم‌اکنون آنزیم انتروکیناز تجاری در هر دو میزبان باکتریایی (شرکت Gen Script) و یوکاریوتی (شرکت Sigma) تولید و به بازار عرضه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق کلونینگ و بهینه‌سازی شرایط بیان ژن آنزیم انتروکیناز انسانی در سویه‌های SHuffle T7، BL21 و NICO21 باکتری *Escherichia coli* صورت گرفت، که بیان بهتر ژن آنزیم انتروکیناز در سویه SHuffle T7 با نقطه مرکزی دارای شرایط میزان OD برابر با ۱/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر و غلظت IPTG ۰/۷۱ میلی‌مولار همراه بود. ارزیابی نقطه بهینه برای فرآیند بیان آنزیم انتروکیناز در مرحله دوم بهینه‌سازی با نقطه مرکزی دارای شرایط محیط کشت LB، غلظت لاکتوز ۲/۵ میلی‌مولار و دمای القاء ۲۵ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. بیان ژن انتروکیناز در سیستم باکتریایی، سبب تسهیل در خالص‌سازی پروتئین با غلظت‌های پایین، می‌شود، بنابراین با استفاده از نتایج چنین تحقیقاتی، پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس وسیع و با خلوص زیاد (تولید صنعتی)، تولید خواهند شد که می‌تواند منجر به خودکفایی در صنعت داروسازی نوترکیب شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]

منابع

1. Sugama, J., Y. Katayama, Y. Moritoh and M. Watanabe., 2021, Enteropeptidase inhibition improves kidney function in a rat model of diabetic kidney disease, *Diabetes, Obesity and Metabolism* 23(1): 86-96.

2. Wang, J.-H., M.-Z. Tang, X.-T. Yu, C.-M. Xu, H.-M. Yang and J.-B. Tang., 2019, Site-specific, covalent immobilization of an engineered enterokinase onto magnetic nanoparticles through transglutaminase-catalyzed bioconjugation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177: 506-511.

3. Simeonov, P., R. Berger-Hoffmann, R. Hoffmann, N. Sträter and T. Zuchner., 2011, Surface supercharged human enteropeptidase light chain shows improved solubility and refolding yield, *Protein Engineering, Design & Selection*, 24(3): 261-268.

4. Zhang, X.-h., S.-h. Tan and T.-m. Li., 2005, Characterization of Enterokinase and Its Research Advances in Genetic Engineering, *pharmaceutical biotechnology-beijing*- 12(5): 347.

5. Qin, X.,2016, Inactivation of pancreatic digestive proteases by deconjugated bilirubin from the liver: A critical mechanism for gut protection, *J Gastroenterol Pancreatol Liver Disord*, 3(4): 1-2.

6. Pepeliaev, S., J. Krahulec, Z. Černý, J. Jílková, M. Tlustá and J. Dostálová.,2011, High level expression of human enteropeptidase light chain in Pichia pastoris, *Journal of biotechnology* 15 (1):67-75.

7. Zurawa-Janicka, D., T. Wenta, M. Jarzab, J. Skorko-Glonek, P. Glaza, A. Gieldon, J. Ciarkowski and B. Lipinska., 2017, Structural insights into the activation mechanisms of human HtrA serine proteases, *Archives of biochemistry and biophysics*, 621: 6-23.

8. Krahulec, J. and M. Šafránek .,2021. Impact of media components from different suppliers on enterokinase productivity in Pichia pastoris, *BMC biotechnology*, 21(1): 1-9.

9. Nemestóthy, N., G. Megyeri, P. Bakonyi, P. Lakatos, L. Koók, M. Polakovic, L. Gubicza and K. Bélafi-Bakó.,2017,Enzyme kinetics approach to assess biocatalyst inhibition and deactivation caused by [bmim][Cl] ionic liquid during cellulose hydrolysis, *Bioresource technology*, 229: 190-195.

10. Melicherová, K., J. Krahulec, M. Šafránek ,V. Lišková, D. Hopková, D. Széliová and J. Turňa., 2017, Optimization of the fermentation and downstream processes for human enterokinase production in Pichia pastoris, *Applied microbiology and biotechnology*, 101(5): 1927-1934.

11. Marangoni, A. G. 2003, Enzyme kinetics: a modern approach, John Wiley & Sons.

12. Kaur, J., A. Kumar and J. Kaur., 2018. Strategies for optimization of heterologous protein expression in E .coli: Roadblocks and reinforcements, *International Journal of Biological Macromolecules,* 106: 803-822.

13. Mikhailova, A. G. and L .D. Rumsh.,2000, Enteropeptidase, *Applied biochemistry and biotechnology*, 88(1): 159-174.

14. Kim, Y. S., H.-J. Lee, S.-h. Park, Y.-c. Kim and J. Ahn., 2021, Expression and purification of soluble and active human enterokinase light chain in Escherichia coli, *Biotechnology Reports*, 30: e00626.

15. Aghaeepoor, M., A. Akbarzadeh, F. Kobarfard, A. A. Shabani, E. Dehnavi, S. J. Aval and M. R. A. Eidgahi,2019. Optimization and high level production of recombinant synthetic Streptokinase in E. coli using Response Surface Methodology. *Iranian journal of pharmaceutical research*: IJPR, 18(2): 961.

16. Tariq, F., M. A. U. Khan, S. Shahzad, W. B. Chaudhary, A. Arif and G. Gharib., 2018, Production of Remedial Proteins through Genetically Modified Bacteria, *Advancements in Life Sciences* 5(2): 37-45.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]

17. Zoued, A., Y. R. Brunet, E. Durand, M.-S. Aschtgen, L. Logger, B. Douzi, L. Journet, C. Cambillau and E. Cascales., 2014, Architecture and assembly of the Type VI secretion system, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1843(8): 1664-1673.

18. Lim, J., Destabilizing single chain major histocompatibility complex class I protein for repurposed enterokinase proteolysis,2020, *Scientific reports*, 10(1): 1-10.

19. Odonkor, S. T. and K. K. Addo.,2018, Prevalence of multidrug-resistant Escherichia coli isolated from drinking water source, *International journal of microbiology* ,45 (2): 2018-2021.

20. Melicherová, K., J. Krahulec, M. Šafránek ,V. Lišková, D. Hopková, D. Széliová and J. Turňa., 2017, Optimization of the fermentation and downstream processes for human enterokinase production in Pichia pastoris, *Applied microbiology and biotechnology*, 101(5): 1927-1934.

21. Kwon, J., Cho, H., Kim, S., Ryu, Y. and Lee, J.J., 2021. A combination strategy of solubility enhancers for effective production of soluble and bioactive human enterokinase. Journal of Biotechnology, 340, pp.57-63.

22. Burnett, M.J. and Burnett, A.C., 2020. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet*, *2*(2), pp.121-132.

23. Bagno, F.F., Godói, L.C., Figueiredo, M.M., Sérgio, S.A.R., Moraes, T.D.F.S., Salazar, N.D.C., Kim, Y.C., Reyes-Sandoval, A. and da Fonseca, F.G., 2020. Chikungunya E2 Protein Produced in E. coli and HEK293-T Cells—Comparison of Their Performances in ELISA. *Viruses*, *12*(9), p.939.

24. Eliot T. Smith and David A. Johnson: Human enteropeptidase light chain: Bioengineering of recombinants and kinetic investigations of structure and function. Protein Science 2013, 22(5):577–585.

25. Nasibi Nahid, Turkzadeh Mahani Massoud, Mortazavi Morteza. Production of recombinant HFBI protein in E.coli. Thesis from Kerman University. 2015.

26. Ahmad I, Nawaz N, Darwesh NM, ur Rahman S, Mustafa MZ, Khan SB, Patching SG. Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using Escherichia coli. Protein expression and purification. 2018 Apr 1;144:12-8.

27. Abdollahzadeh, R., Pazhang, M., Najavand, S., Fallahzadeh-Mamaghani, V. and Amani-Ghadim, A.R., 2020. Screening of pectinase-producing bacteria from farmlands and optimization of enzyme production from selected strain by RSM. Folia microbiologica, pp.1-15.

28. Hussain, S., Khan, H., Gul, S., Steter, J.R. and Motheo, A.J., 2021. Modeling of photolytic degradation of sulfamethoxazole using boosted regression tree (BRT), artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM); energy consumption and intermediates study. Chemosphere, 276, p.130151.

29. Packiam KA, Ramanan RN, Ooi CW, Krishnaswamy L, Tey BT. Stepwise optimization of recombinant protein production in Escherichia coli utilizing computational and experimental approaches. Applied microbiology and biotechnology. 2020 Apr;104(8):3253-66.

30. Hui, X., Chen, Z., Zhang, J., Lu, M., Cai, X., Deng, Y., Hu, Y. and Wang, Y., 2021. Computational prediction of secreted proteins in gram-negative bacteria. Computational and Structural Biotechnology Journal.

31. Shoae M, Safarpour H, Khorashadizadeh M. Recombinant Production of Bovine Enteropeptidase Light Chain in SHuffle® T7 Express and Optimization of Induction Parameters. The Protein Journal. 2021 Sep 29:1-0.

32. De Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in Escherichia coli. Microbial cell factories. 2009 Dec;8(1):1-8.

33. Dawn, A. and Deep, S., 2021. An improved strategy of TGFβ3 expression in Escherichia coli: Exploiting folding modulators for a switch from misfolded to folded form. International Journal of Biological Macromolecules, 167, pp.787-795.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]

34. Ahmadzadeh, M., Farshdari, F., Nematollahi, L., Behdani, M. and Mohit, E., 2020. Anti-HER2 scFv expression in Escherichia coli SHuffle® T7 express cells: effects on solubility and biological activity. Molecular biotechnology, 62(1), pp.18-30.

35. Molaee N and Abtahi H. (2011). Improvement of recombinant streptokinase production in E.coli. Arak Medical University Journal. 14. 7 . 97 – 103.

36. Babakan., S., Safari., A., Moniri., R., Hamzeh miveh roud., M and Dastmalchi., S. (2019). Optimization of expression and purification of glutathione endopeptidase enzyme from halotermolar bacterium. Cellular and Molecular innovation in biotechnology Journal 344. 9. 23-30.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.12.45.1.0]