New Cell Mol Biotech
j.9/36 , 2019

Review article

Scan online to view this article

Advances and challenges in recombinant protein expression in *Escherichia coli*

Pardis Saeedi[1], Elham Behzadi[1], Rohallah Kazemi[2], Mohammad Javad Rezaei[1], Jafar Amani[1*]

1- Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Green Gene Company, Tehran, Iran.

Abstract

Escherichia coli is the first bacteria on which cloning and protein expression are carried out. The purpose of this study was to summarize the numerous articles published in the field of protein expression in Escherichia coli. In studies, researchers in a new project require the production of pure protein, which at the theory level is easy to obtain a recombinant protein, but there are virtually many problems, including low growth of host, formation of inclusion, protein not being active, and there is even no protein production in the exprimental scale. To enhance the expression of the protein, factors such as suitable host, vector design, transcriptional settings, selective markers, and reluctant labels are effective. There are a range of fusion proteins that can effect on accurate folding, solubility, and proteolytic resistance. Also the ability to target produced proteins to cytoplasm, periplasm, membranes and the culture medium, and some techniques grant the ability of post translational modifications in prokaryotic cells. Therefore, the key to the successful expression of recombinant proteins in *E. coli* is a combination of expert manipulation of the components of a broad genetic apparatus.

KeyWords: Recombinant protein, *E. coli*, Expression system, Construction of vector, Selected marker, Transcription

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

Corresponding author:
Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Email: Jafar.amani@gmail.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۹ - شماره -۳۶ پائیز ۱۳۹۸
NCMBJ
مقاله مروری

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

پیشرفت‌ها و چالش‌های افزایش بیان پروتئین نوترکیب در *اشرشیاکلی*

پردیس سعیدی[۱]، الهام بهزادی[۱]، روح الله کاظمی[۲]، محمدجواد رضائی[۱]، جعفر امانی[۱*]

۱. دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) ، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، تهران ، ایران.
۲. شرکت ژن سبز، تهران، ایران.

چکیده

باکتری *اشرشیاکلی* مهم‌ترین باکتری است، که در فرآیند کلونینگ و بیان پروتئین، مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از این تحقیق جمع‌بندی مقالات فراوانی که در زمینه بیان پروتئین در *اشریشیاکلی* (*E.coli*) چاپ شده است است. در مطالعه‌های صورت گرفته، محققین در پروژه‌های جدید به دنبال به‌دست آوردن پروتئین خالص هستند که در سطح تئوری مراحل به‌دست آوردن پروتئین نوترکیب بسیار آسان است اما در عمل مشکلات بسیار زیادی از جمله رشد ضعیف میزبان، تشکیل انکلوزیونی، فعال نبودن پروتئین و حتی عدم تولید پروتئین در مسیر وجود دارد. جهت افزایش بیان پروتئین، عواملی نظیر میزبان مناسب، بهینه‌سازی شرایط تخمیر، ساخت وکتور، تنظیمات رونویسی، مارکر انتخابی، برچسب‌های تمایلی، عوامل مؤثری هستند. قابلیت هدف گیری پروتئین تولید شده به سیتوپلاسم، پری پلاسم، غشاهای خارجی و داخلی و محیط رشد، اعطای توانایی برخی اصلاحات پس از ترجمه به سلول‌های پروکاریوت با تکنیک‌هایی میسر می‌گردد. لذا کلید اصلی برای بیان موفقیت آمیز پروتئین‌های نوترکیب در باکتری *اشریشیاکلی* ترکیبی از دستکاری ماهرانه اجزای جعبه ابزار گسترده ژنتیکی است.

واژه‌های کلیدی: بیان نوترکیب، *اشریشیاکلی* ، سیستم‌های بیانی، ساخت وکتور، ماکر انتخابی، رونویسی

مقدمه

بدون شک تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های میکروبی انقلابی در بیوشیمی بوده است. در عصر حاضر کمابیش دیگر تولید اندک پروتئین در بافت‌های عظیم‌الجثه حیوانات و گیاهان و نیاز به حجم زیادی از مایعات بیولوژیک برای تخلیص مقادیر کمی از پروتئین از بین رفته است. محققینی که در یک پروژه جدید ابتدا یک پروتئین خالص به‌دست می‌آورند، بلافاصله به فکر به‌دست آوردن آن در یک فرم نوترکیب می‌افتند. قابلیت بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب به میزان زیاد، امکان بررسی خصوصیت‌های بیوشیمیایی آن، استفاده از آن در فرآیندهای صنعتی و توسعه محصولات تجاری را می‌دهد (۱). در سطح تئوری، مراحل به‌دست آوردن پروتئین نوترکیب بسیار آسان است. ژن مورد نظر در یک وکتور بیانی کلون و به میزبان منتخب منتقل شده، بیان ژن القاء و سپس پروتئین برای تخلیص و تعیین خصوصیت‌های آماده می‌گردد. در عین حال، مشکلات بسیاری می‌تواند وجود داشته باشد. رشد ضعیف میزبان، تشکیل جسم انکلوزیونی (IB)[1]، فعال نبودن پروتئین، و حتی عدم تولید پروتئین، برخی از مشکل‌هایی هستند که اغلب در مسیر وجود دارند. با تمام این اوصاف، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب، به‌طور مداوم در حال پیشرفت است (۱). در سال ۱۹۷۳ Stanley Cohen و Herbert Boyer پیشگام استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب برای کلونینگ و بیان ژن در موجودات دیگر بودند. استفاده از بیان ژن نوترکیب برای تولید صنعتی پروتئین در دهه ۱۹۷۰ به یک صنعت چندین میلیاردی تبدیل شد. با وجود سال‌ها تحقیق فشرده، هیچ سیستم بیان جهانی وجود ندارد که بتواند برای تولید صنعتی

نویسنده مسئول:
دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) ، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی
پست الکترونیکی: Jafar.amani@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲۲

1 Inclusion Body

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

سطوح بالا از هر ژن نوترکیب استفاده شود. به این دلیل، باید قبل از تولید، ارگانیسم میزبان ایده‌آل برای ژن موردنظر شناسایی شود (۲). انتخاب یک سیستم بیانی پروکاریوتی برای تولید انبوه پروتئین نوترکیب به فاکتورهای زیادی بستگی دارد. این فاکتورها شامل ویژگی‌های رشد سلول، سطوح بیان، بیان داخل و خارج سلولی، اصلاحات پس از ترجمه، و فعالیت بیولوژیک پروتئین مورد نظر، علاوه‌بر موارد تنظیمی در تولید پروتئین‌هاست. علاوه‌بر این، انتخاب سیستم بیانی ویژه، مستلزم بودجه‌بندی از نظر طراحی، پردازش و سایر ملاحظات اقتصادی است. مزیت‌های نسبی سیستم‌های بیانی باکتریایی، مخمر، حشره و پستانداران با جزئیات کامل توسط Marino در یک مقاله مروری به‌خوبی توضیح داده شده است. هم‌چنین، Datar و همکارانش، مسائل اقتصادی مربوط به تولید پروتئین در سلول‌های باکتریایی و پستانداران را مورد بررسی قرار داده‌اند (۳).

هدف این مطالعه، جمع‌بندی مقاله‌های فراوانی است که در زمینه بیان پروتئین در *اشریشیاکلی* چاپ شده و تمرکز بر سیستم‌های بیانی و روش‌های تجربی سودمند برای تولید بیشتر پروتئین‌های فعال و مرور فرآیندهای اخیر در این زمینه از دیگر اهداف این بررسی است.

میزبان مناسب برای تولید پروتئین نوترکیب

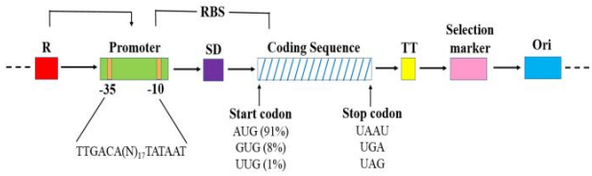
برای تولید بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب پروکاریوتی و یوکاریوتی، سیستم‌های بیان باکتریایی انتخاب ارجح هستند. زیرا باکتری‌ها مقرون‌به صرفه‌اند، ژنتیک آن‌ها شناخته شده و سیستم‌های بسیار مختلفی از باکتری‌های بیانی در دسترس است. در میان میزبان‌های موجود برای بیان پروتئین نوترکیب، *اشریشیاکلی* در یک موقعیت منحصر به‌فرد، به‌دلیل چندین دهه پژوهش گسترده در فیزیولوژی رشد و ژنتیک آن و نیز در دسترس بودن دامنه گسترده‌ای از ابزارهای بیوتکنولوژی برای مهندسی ژنتیک این ارگانیسم است. ارزش *اشریشیاکلی* به‌عنوان یک میزبان برای بیان نوترکیب، به‌ویژه به‌دلیل نرخ رشد سریع آن، ظرفیت فرمانتاسیون مداوم، هزینه پایین محیط کشت، گستردگی حامل‌ها و سطح بیان بالا است. در حدود ۸۰٪ از تمام پروتئین‌هایی که ساختارهای سه بعدی آن‌ها در بانک داده پروتئین (PDB) وجود دارد، پروتئین‌های موجود در *اشریشیاکلی* هستند (۲). در هرحال، با وجود دانش عمیق در مورد ژنتیک و بیولوژی مولکولی *اشریشیاکلی*، امکان بیان هر ژنی به‌طور کارآمد در این ارگانیسم وجود ندارد. این مسأله ممکن است به‌علت خصوصیت‌های ساختاری دقیق و منحصر به‌فرد توالی ژن، پایداری و ساختار دوم mRNA و کارایی ترجمه آن، سهولت تاخوردگی پروتئین، تجزیه پروتئین توسط پروتئازهای میزبان، تفاوت‌های اساسی در ترجیح کدونی بین ژن خارجی و عادی *اشریشیاکلی*، حلالیت و سمیت بالقوه پروتئین خارجی در میزبان باشد. خوشبختانه یکسری قوانین تجربی شناخته شده‌اند که می‌توانند در طراحی یک سیستم بیانی، هدایت‌کننده باشند و عدم پیش‌بینی‌پذیری، این پروسه را در *اشریشیاکلی* محدود نمایند (۳). مهم‌ترین اشکال در سیستم بیانی *اشریشیاکلی* شامل ناتوانی باکتری در انجام بسیاری از اصلاحات پس از ترجمه پروتئین‌های یوکاریوتی است، لذا ساخت و تولید پروتئین‌های پیچیده یوکاریوتی در *اشریشیاکلی* با عدم توانایی در تشکیل پیوندهای دی سولفیدی و گلیکوزیلاسیون موجب تولید پروتئین بی‌ثبات و غیر عملکردی می‌گردد. عدم وجود سیستم ترشحی کارآمد برای آزادسازی پروتئین به محیط کشت گاهی می‌تواند دردسرساز باشد. تولید پروتئین‌های هترولوگ با تیتر بالا اغلب موجب پاسخ استرس و یا تحمل متابولیک، و در نتیجه تاخوردگی اشتباه و تخریب پروتئین‌های هترولوگ و تشکیل اجسام انکلوزیونی می‌گردد که از مشکلات اساسی دیگر استفاده از *اشریشیاکلی* است. افزایش تولید استات به‌عنوان محصول متابولیسم در حین تخمیر، معضل مهم دیگر در استفاده از *اشریشیاکلی* به‌عنوان میزبان است. هنگامی‌که سرعت رشد سلول بالاست منابع کربن نمی‌توانند به‌سرعت متابولیزه شوند و به استات تبدیل می‌شوند. به‌طور کلی مشاهده شده است که حتی غلظت کم استات هم می‌تواند مانع رشد و تولید پروتئین‌های نوترکیب گردد (۴). از طرفی بسیاری از پروتئین‌های یوکاریوتی فعالیت بیولوژیک کامل خود را در فرم غیرگلیکوزیله حفظ می‌کنند و بنابراین تولید آن‌ها در *اشریشیاکلی* امکان‌پذیر است. علاوه‌بر این یک‌سری از فرآیندها در نواحی ترشح خارج سلولی و تشکیل باند دی‌سولفیدی انجام‌پذیر هستند و بایستی مورد بررسی و آزمایش قرار بگیرند. ده‌ها کاندید احتمالی به‌عنوان میزبان وجود دارد که دارای مزایا و معایبی هستند. با این حال، باید به‌خاطر داشت که بسیاری از سویه‌ها اختصاصی بوده و در شرایط خاص استفاده می‌شوند. برای یک بیان اولیه، تنها چند سویه

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

باکتری *اشریشیاکلی* ، مانند BL21 (DE3) و برخی مشتقات اجداد K-12 ضروری هستند (۱). معایبی که اجداد BL21 داشته‌اند با مهندسی ژنتیک برطرف شده‌اند. به‌عنوان مثال ژن پروتئاز Lon و ژن کدکننده پروتئاز غشای خارجی OmpT که موجب تخریب بسیاری از پروتئین‌های خارجی می‌شوند، در سوش‌های جدید حذف شده‌اند. علاوه‌بر این‌ها، مشکل دیگر اجداد BL21 از دست رفتن پلاسمید به‌دلیل جهش hsdSB و در نتیجه متیلاسیون DNA پلاسمیدی و تخریب آن بود که در سوش‌های مهندسی شده مرتفع گردیده است. در سویه محبوب BL21 (DE3) ، پروفاژ λDE3 شامل ژن T7 RNAP تحت پروموتر lacUV5 در کروموزوم BL21 قرار داده شده است (۱).

شکل‌گیری وکتورهای بیانی کارآمد

ساخت یک وکتور بیانی مستلزم عناصر متعددی است که در پیکربندی آن‌ها بالاترین میزان سنتز پروتئین باید درنظر گرفته شود. ساختار ضروری یک وکتور بیانی *اشریشیاکلی* در شکل ۱ نشان داده شده است. پروموتر ۱۰ الی ۱۰۰ باز بالادست جایگاه اتصال ریبوزوم[۲] (RBS) قرار گرفته است و تحت کنترل ژن تنظیمی است که ممکن است بر روی خود وکتور باشد یا در کروموزوم میزبان الحاق شده باشد. پروموتر *اشریشیاکلی* شامل توالی هگزانوکلئوتیدی است که در حدود ۳۵ باز بالادست باز شروع رونویسی (ناحیه ۳۵-) قرار گرفته و توسط یک فاصله انداز کوتاه از یک توالی هگزانوکلئوتیدی دیگر (ناحیه ۱۰-) جدا شده است. پروموترهای زیادی برای بیان ژن در *اشریشیاکلی* وجود دارند، از جمله انواع مشتق شده از باکتری‌های گرم مثبت و باکتریوفاژها (جدول ۱). یک پروموتر مناسب دارای ویژگی‌های مطلوب متعددی است: پروموتر باید قوی باشد، سطح بیان پایه در آن پایین است (به‌عبارت دیگر شدید تحت کنترل است)، به آسانی قابل انتقال به دیگر سویه‌های *اشریشیاکلی* است و القاء آن آسان و کم‌هزینه است (۳). پایین‌دست پروموتر RBS قرار دارد که ناحیه‌ای با طول ۵۴ نوکلئوتید است؛ این ناحیه بین موقعیت (۲±) ۳۵- و ۱۹+ الی ۲۲+ توالی کدکننده mRNA قرار گرفته است. ناحیه شاین-دالگارنو (SD)[۳] در طی آغاز ترجمه با انتهای '3 16S rRNA برهم‌کنش می‌نماید. فاصله بین SD و کدون آغاز در حدود ۵ الی ۱۳ باز را شامل می‌شود و توالی این ناحیه امکان تشکیل ساختار ثانویه در رونوشت mRNA[۴] را محدود می‌کند؛ که تشکیل این ساختارهای ثانویه می‌تواند کارایی مرحله آغاز رونویسی را کاهش دهد. هر دو نواحی '3 و '5 در RBS، تمایل به داشتن محتوای آدنین بالایی از خود نشان می‌دهند (۳).



شکل ۱- نمایش کلی از خصوصیت‌های اصلی و اجزای توالی یک وکتور بیانی پروکاریوت. پروموتر حاوی توالی‌های 35- و 10- است که توسط یک توالی ۱۷ بازی از هم جدا شده‌اند. پیکان‌ها نشان‌دهنده مسیر رونویسی هستند. RBS شامل توالی شاین دالگارنو (SD) است. ۳ کدون آغازی به همراه فراوانی آن‌ها در *اشریشیاکلی* نشان داده شده است. در میان سه کدون پایانی، UAA که پس از آن U قرار گرفته کارآمدترین توالی خاتمه ترجمه در *اشریشیاکلی* است. رپرسور توسط یک ژن تنظیمی (R) کد می‌شود، که ممکن است در خود وکتور وجود داشته باشد یا در کروموزوم میزبان الحاق شود و فعالیت پروموتر را تغییر می‌دهد. خاتمه‌دهنده رونویسی (TT) در جهت پایداری mRNA و وکتور عمل می‌کند. علاوه‌بر این، یک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک، به‌عنوان مثال تتراسایکلین، گزینش فنوتیپیک وکتور را تسهیل می‌نماید، و مبداء همانندسازی (Ori) تعیین کننده تعداد کپی از وکتور است.

خاتمه‌دهنده رونویسی، پایین‌دست توالی آغاز قرار گرفته و به‌عنوان سیگنالی برای خاتمه رونویسی و هم‌چنین به‌عنوان یک عنصر حفاظتی متشکل از ساختارهای ساقه-حلقه[۵]، حفاظت - کننده mRNA از تخریب اگزونوکلئولیتیک و افزایش‌دهنده نیمه‌عمر mRNA، ایفای نقش می‌کند. علاوه‌بر اجزای فوق که دارای تأثیر مستقیم بر کارایی بیان ژن هستند، وکتورها حاوی ژنی هستند که مقاومت به آنتی‌بیوتیک را به سلول میزبان انتقال داده و در غربالگری و ازدیاد پلاسمید نقش دارد. آمپی‌سیلین به‌طور عمومی با این هدف مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ با این‌حال، برای تولید پروتئین‌های درمانی مربوط به انسان، سایر مارکرهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌منظور اجتناب از واکنش‌های آلرژیک احتمالی، ترجیح داده می‌شوند. در نهایت،

2 Ribosome Binding Site

3 Shine-Dalgarno

4 Messenger RNA

5 Stem-loop

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

تعداد کپی پلاسمید توسط مبدأ همانندسازی تعیین می‌شود. در موارد خاص، استفاده از رپلیکون‌های خارج از کنترل[6] منجر به تکثیر بیش از حد پلاسمید و متعاقب آن تولید مقادیر فراوان پروتئین‌های کدشونده توسط پلاسمید خواهد شد. در دیگر موارد، به‌نظر می‌رسد که فایده‌ای در استفاده از پلاسمیدهایی با تعداد کپی بیش از پلاسمیدهای pBR322 وجود ندارد. علاوه‌براین، Vasquez و همکارانش گزارش نمودند که افزایش تعداد کپی پلاسمید تولید تریپسین را در *اشریشیاکلی* کاهش می‌دهد و Minas و Bailey دریافتند که حضور پروموترهای قوی در پلاسمیدهای با تعداد کپی بالا، شدید زندگی سلول را مختل می‌کند (۳). متداول‌ترین پلاسمیدهای بیانی که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرند از ترکیب چندین رپلیکون، پروموتر، مارکر انتخابی، سایت‌های کلونینگ متعدد، و استراتژی‌های پروتئین فیوژن شکل گرفته‌اند (شکل۱). به‌همین دلیل، کاتالوگ وکتورهای بیانی موجود بسیار گسترده است و انتخاب یک وکتور مناسب بسیار گیج‌کننده خواهد بود. برای تصمیم‌گیری و انتخاب آگاهانه، این ویژگی‌ها باید به دقت و با توجه به نیازهای تحقیق ارزیابی شوند (۱).

رپلیکون

رپلیکون‌ها عناصر ژنتیکی هستند که به‌عنوان یک واحد مستقل تکثیر و همانندسازی می‌کنند. پلاسمیدها حاوی رپلیکون هستند. یک رپلیکون شامل یک منشأ همانندسازی همراه با عناصر کنترلی سیس[7] مرتبط با آن است. یک پارامتر مهم هنگام انتخاب یک وکتور مناسب تعداد کپی[8] است. کنترل تعداد کپی در رپلیکون واقع شده است. این منطقی است که فکر کرد که دوز پلاسمید بیش‌تر، به‌عنوان واحدهای بیانی بیشتر در سلول، معادل تولید پروتئین نوترکیب بیش‌تر باشد. با این حال، تعداد پلاسمید بیش‌تر، ممکن است با تحمیل بار متابولیک بیش‌تر، میزان رشد باکتری را کاهش دهد و ممکن است موجب بی‌ثباتی پلاسمید شده، و بنابراین تعداد باکتری‌های سالم برای سنتز پروتئین کاهش یابد. به‌همین دلیل، تعداد کپی پلاسمید بیش‌تر برای بیان پروتئین به‌هیچ‌وجه به معنی افزایش بازده تولید نیست. وکتورهای معمول، مانند سری pET، دارای منشأ pMB1 (مشتق از ColE1، ۱۵ تا ۶۰ کپی در هر سلول؛ بولیوار و همکاران، ۱۹۷۷) هستند، در حالی که یک نوع منشأ pMB1 جهش یافته در سری PUC موجود است (۵۰۰ تا ۷۰۰ کپی در هر سلول) (۵). منشأ ColE1 نوع وحشی (۱۵ تا ۲۰ کپی در هر سلول (۶،۷) را می‌توان در وکتور pQE (Qiagen) یافت. این‌ها همه در یک گروه ناسازگارند که یعنی نمی‌توانند با هم در یک سلول تکثیر شوند، بلکه آن‌ها برای به خدمت گرفتن عوامل همانندسازی سلول با یکدیگر رقابت می‌کنند (۸). برای بیان دو پروتئین نوترکیب با استفاده از دو پلاسمید، سیستم-هایی با منشأ p15A در دسترس هستند (سری پلاسمیدهای pACYC و pBAD، ۱۰ تا ۱۲ کپی در هر سلول) (۱۰، ۹).

هرچند بیان سه گانه به‌ندرت انجام می‌شود، اما با استفاده از پلاسمید pSC101 قابل انجام است. این پلاسمید تحت کنترل دقیق همانندسازی است، لذا تعداد کپی آن کم است (کمتر از ۵ کپی در هر سلول) (۱۱). در مواردی که دوز بالایی از یک ژن کلون شده باشد و یا محصول برای سلول یک اثر زیان‌بار داشته باشد، استفاده از پلاسمیدهای حاوی این رپلیکون می‌تواند یک مزیت محسوب شود (۱۳, ۱۲). روش دیگر، استفاده از وکتورهای دوئت[9] (Novagen) است که می‌توان با کلون کردن دو ژن در پلاسمید بیان دوگانه را تسهیل نمود. پلاسمیدهای دوئت دارای دو سایت کلونینگ، که قبل از هریک از آن‌ها یک پروموتر T7، یک اپراتور lac و یک سایت اتصال ریبوزوم تعبیه شده است. با ترکیب وکتورهای مختلف سازگار دوئت، تا هشت پروتئین نوترکیب را می‌توان از چهار پلاسمید بیانی تولید نمود (۱).

مارکر انتخابی

برای جلوگیری از رشد سلول‌های فاقد پلاسمید، مارکر مقاومت به ستون فقرات پلاسمید اضافه شده است. در سیستم *اشریشیاکلی*، معمولاً ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی به این

6 Runaway replicons

7 cis-acting control elements

8 copy number

9 Duet vectors

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

منظور استفاده می‌شوند. مقاومت به آمپی‌سیلین توسط ژن bla کد می‌شود که یک آنزیم پری پلاسمی تولید می‌کند که حلقه β-لاکتام از آنتی‌بیوتیک‌های β-لاکتام را غیرفعال می‌کند. با این‌حال، β بتالاکتاماز به طور مداوم ترشح می‌شود و تخریب آنتی‌بیوتیک را به دنبال دارد و طی چند ساعت آمپی‌سیلین کمابیش تمام می‌شود (۱۴). در این وضعیت، در حین کشت، سلول‌های فاقد پلاسمید مجاز به افزایش تعداد هستند. هرچند به‌طور تجربی تأیید نشده، عوامل انتخابی که مقاومت آن‌ها بر اساس تخریب است، مانند کلرامفنیکل (۱۵) و کانامایسین (۱۶) نیز می‌توانند این مشکل را داشته باشند. به‌همین دلیل، نشان داده شده است که در حین کشت تتراسایکلین بسیار پایدار است (۱۷)، زیرا مقاومت بر اساس جریان فعال آنتی‌بیوتیک از سلول‌های مقاوم است (۱۸). به‌دلیل هزینه آنتی‌بیوتیک‌ها و گسترش مقاومت به آن‌ها تلاش زیادی برای توسعه سیستم‌های پلاسمیدی فاقد آنتی‌بیوتیک صورت گرفته است. این سیستم‌ها بر اساس تمایل شدید پلاسمیدی[10] هستند، پدیده‌ای که سلول‌های فاقد پلاسمید قادر به رشد و یا زندگی نیستند. به‌عنوان مثال، اگر یک ژن ضروری از ژنوم باکتری حذف شده و در پلاسمید قرار گیرد، پس از تقسیم سلولی، باکتری‌های فاقد پلاسمید خواهند مرد. انواع مختلف سیستم‌های تمایل شدید پلاسمیدی با توجه‌به عملکرد وجود دارند: (۱) سیستم‌های بر اساس توکسین/ آنتی-توکسین، (۲) سیستم‌های بر اساس متابولیسم، و (۳) سیستم‌های تیتراسیون اپراتور رپرسور. در حالی‌که ثابت شده است این فن‌آوری در فرمانتورها و در مقیاس وسیع موفق بوده است، سیستم‌های بیانی بر اساس تمایل شدید پلاسمیدی هنوز به‌طور گسترده فراگیر نشده است (۱).

برچسب‌های تمایلی

در طراحی یک پروژه که در آن یک پروتئین نوترکیب فعال، محلول و خالص مورد نیاز است، داشتن وسیله‌ای برای (الف) تشخیص در حین بیان و تخلیص، (ب) رسیدن به حداکثر حلالیت، و (ج) تخلیص آسان از محیط کشت باکتری، بسیار ارزشمند است. بیان یک زنجیره از اسیدهای آمینه (برچسب پپتیدی[11]) و یا یک پلی‌پپتید بزرگ (فیوژن پروتئین[12]) در پشت‌سر پروتئین دلخواه به شکل یک پروتئین کایمریک، امکان رسیدن به این سه هدف را می‌دهد. در تخلیص پروتئین‌های نوترکیب بایستی از روش‌هایی استفاده نمود که هزینه‌های تولید حداقل و کمیت، کیفیت، پایداری و فعالیت پروتئین تخلیص شده نیز حفظ گردد. لذا از تکنیک کروماتوگرافی تمایلی، که بر اساس میل جذبی خیلی بالای برچسب تمایلی[13] متصل به پروتئین نوترکیب به یک لیگاند تثبیت شده روی ستون است، استفاده می‌گردد (شکل ۲). با کمک این تکنیک ضمن کاهش تعداد مراحل خالص سازی، خلوص پروتئین را نیز می توان افزایش داد. در تکنولوژی DNA نوترکیب، با الحاق یک دنباله با میل جذبی بالا به یک لیگاند خاص، به ناحیه N یا C ترمینال پروتئین نوترکیب، تحت عنوان نشانه یا برچسب (Tag)، می‌توان یک خصوصیت باندینگ خاص به پروتئین داد که تخلیص آن را تسهیل می‌نماید. یکی از مهم‌ترین ابزارهای مورد استفاده در افزایش سطح بیان محصولات پروتئینی نوترکیب برچسب‌های فیوژن پروتئینی هستند، که علاوه‌بر سهولت تخلیص موجب تسریع در بازیابی ویژگی‌های طبیعی ساختاری و عملکردی پروتئین‌ها می‌شوند. در حال حاضر، محققان انواع مختلفی از برچسب‌ها با کاربردهای چندگانه را در اختیار دارند، که آن‌ها را قادر ساخته مطلوب‌ترین روش تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب را برگزینند.

برچسب‌های خالص‌سازی رایج مورد استفاده به سه گروه تقسیم می‌شوند: دمین‌های طبیعی[14]، دمین‌های مهندسی شده[15] و پپتیدها. پروتئین یا دمین‌های طبیعی، پروتئین‌های کروی کوچک با ویژگی اتصال طبیعی، شامل آنزیم‌هایی با تمایل جذبی با سوبسترا یا مهار کننده (مانند β- گالاکتوزیداز و گلوتاتیون S- ترانسفراز(GST))، هم‌چنین پروتئین‌ها یا دمین‌های قابل اتصال به کربوهیدرات (مانند پروتئین قابل اتصال به مالتوز (MBP)) و دمین‌های قابل اتصال به

10 plasmid addiction

11 peptide tag

12 fusion partner

13 Affinity Tag

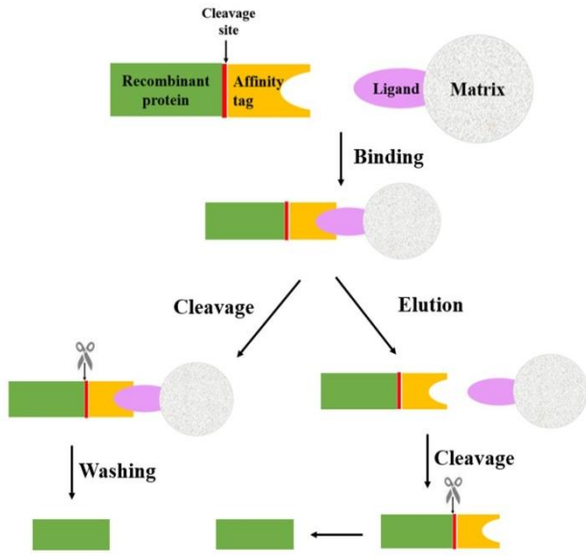
14 Native Domains

15 Engineered Domains

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

پلی‌پپتید(مانند پروتئینA استافیلوکوکی، SPG، پروتئین‌های متصل شونده به استرپتویدین) هستند.



شکل ۲ – مراحل اتصال و جدا شدن پروتئین نوترکیب متصل به برچسب تمایلی. ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی حاوی ماتریکسی متصل به لیگاند اختصاصی است. هنگامی که کلیه پروتئین های محلول از ستون عبور داده می‌شوند، تنها پروتئین نوترکیب مورد نظر که متصل به برچسب تمایلی است می‌تواند با تمای بالا به لیگاند متصل شود. در مرحله بعد می توان با استفاده از هضم پروتئولیتیک از محل سایت برش و سپس با یک شستشوی ساده پروتئین نوترکیب را تخلیص نمود (مسیر سمت چپ). از طرف دیگر می توان فیوژن پروتئین را از ستون جدا و سپس با آنزیم پروتئین را از برچسب جدا کرد (مسیر سمت راست).

دمین‌های مهندسی شده، پروتئین‌هایی با خصوصیات مطلوب توسط روش‌های مهندسی پروتئین طراحی می‌شوند و انواع مناسبی از برچسب را که مناسب با الگوی خالص سازی هستند ایجاد می‌کنند. از جمله آن‌ها دمین‌های باردار شده (مانند basic Z و acid Z)، دمین‌های همراه با His[16] و دمین‌های آنتی ایدیوتیپ[17] می‌باشند. پپتیدها، برچسب های خالص‌سازی کوتاهی هستند که سلول جهت تولید آن‌ها انرژی کم‌تری صرف می‌کند و حذف برچسب و پروسه کلونینگ آن آسان‌تر است. از جمله این برچسب‌ها پپتیدهای آنتی ژن (FLAG)، پپتیدهای بایندینگ با پروتئین و پپتیدهای استرپتویدین- بایندینگ، پپتیدهای باردار شده و پپتیدهای باند با فلز را می توان نام برد.

از انواع رایج برچسب‌های پپتیدی کوچک و توالی‌های مکمل معروف به دنباله می‌توان به His-tag، Gst-tag، MBP-tag، Arg-tag، C-Myc و strep-tag اشاره نمود. در این میان His-tag متداول‌ترین این توالی‌هاست. از آنجا که آنتی‌بادی‌های تجاری برای همه آن‌ها در دسترس است، پروتئین نوترکیب برچسب خورده را می‌توان با روش وسترن بلات، همراه آزمایش بیان شناسایی نمود. برخی محققان معتقدند که برچسب‌های پپتیدی به دلیل کوچک بودن کم‌تر احتمال دارد که در ساختار و عملکرد پروتئین فیوز شده دخالت کند. با این حال، در برخی از موارد ممکن است بر ساختار سوم و یا فعالیت بیولوژیکی پروتئین کایمریک اثرهای منفی داشته باشند. وکتورهایی در دسترس هستند که در آن‌ها امکان استقرار برچسب در هر دو موقعیت N-ترمینال و یا C-ترمینال وجود دارد (هنگامی که برای ترشح پروتئین نوترکیب، در N-ترمینال سیگنال پپتید وجود داشته باشد، گزینه دوم بهتر است). اگر ساختار سه بعدی پروتئین مورد نظر در دسترس باشد، بهتر است برچسب در انتهایی قرار گیرد که در دسترس حلال است (۱). حذف برچسب[18] پس از خالص‌سازی با روش‌های آنزیمی یا شیمیایی امکان‌پذیر است. هیدرولیز شیمیایی به‌نسبت غیر اختصاصی عمل کرده و منجر به برش ناخواسته درون پروتئین هدف شده و اغلب موجب دناتوره شدن پروتئین می‌شود. لذا به‌طور معمول ترجیح داده می‌شود از آنزیم‌های پروتئولیتیک استفاده شود (۱).

تنظیمات رونویسی

پروموتر

پروموتر[19] یا راه انداز ژن توالی DNA در مجاورت محل شروع نسخه‌برداری (محلی اتصال پلیمراز و سایر پروتئین‌ها) است. پروموتر علاوه‌بر شروع رونویسی در تنظیم سرعت و مقدار رونویسی مؤثر است و لذا سطح اول تنظیم ژن در باکتری‌ها را تشکیل می‌دهد. پروموتر مورد استفاده در *اشریشیاکلی* باید خصوصیت‌های ویژه‌ای داشته باشد تا برای سنتز فراوان پروتئین مناسب باشد. اول این‌که بایستی قوی (یعنی میل

16 Patched-His Domains

17 Antiidiotypic Domains

18 Tag Removal

19 Promoter

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

ترکیبی آن با پلی‌مراز زیاد) باشد و پروتئین نوترکیب را تا ۱۰ الی ۳۰ درصد، یا حتی بیش‌تر از کل پروتئین سلول تولید نماید. دوم اینکه باید حداقل میزان فعالیت رونویسی را داشته باشد. بیان ژن در مقیاس بالا مستلزم رشد سلول با تراکم بالا و حداقل فعالیت پروموتر است که پس از القاء یا مهار سرکوب پروموتر رخ می‌دهد. تنظیم شدید پروموتر برای سنتز پروتئین‌هایی که ممکن است برای سلول میزبان مضر باشند، ضروری است. به‌عنوان مثال، پروتئین سمی VP7 روتاویروس، سلول‌ها را به‌طور قابل توجهی از بین می‌برد و تولید آن باید تحت شرایط شدید کنترل‌شده باشد. با این‌حال، در بعضی موارد محدودیت پروموتر بی‌اهمیت است زیرا حتی کم‌ترین مقادیر محصول ژن، به‌علت سمیت شدید، به‌طور مؤثری بقا باکتری را به خطر می‌اندازد. به‌عنوان مثال، مولکول‌هایی که ریبوزوم‌ها را غیرفعال می‌کنند یا پتانسیل غشا را از بین می-برند، کشنده هستند. سمیت ه سلول میزبان محدود به ژن‌های خارجی نیست بلکه بیان بیش از حد یکسری از ژن‌های طبیعی از جمله traT، کدکننده یک لیپوپروتئین غشای خارجی، اندونوکلئاز محدودالاثر *EcoRI* در غیاب متیلاز تغییر دهنده آن، و ژن *lon* است. علاوه‌بر این سیستم‌های بیانی که به‌طور ناقص مهار شده‌اند می‌توانند سبب ناپایداری پلاسمید، کاهش نرخ رشد سلول، و افت تولید پروتئین نوترکیب شوند (۳).

جدول ۱- پروموترهای مورد استفاده به‌منظور بیان مقادیر بالای ژن در *اشریشیاکلی*

پروموتر	تنظیم کننده	القا کننده	منابع
lac	lacI, lacI^q	IPTG	(Gronenborn 1976)
	lacI(Ts)^a, lacI^q(Ts)^a, lacI(Ts)^b	Thermal	(Hasan, N. et al. 1995)
trc and tac	LacI, LacIts	IPTG, thermal	(Brosius et al. 1985)
trp		Trp starvation-indole acrylic acid	(Masuda, K. et al. 1996)
lpp		IPTG -lactose^c	(Derman, A. et al. 1993)
phoA	phoB(positive), phoR (negative)	Phosphate starvation	(Miyake et al. 1985)
recA	lexA	Nalidixic acid	(Easton, A. et al. 1991)
araBAD	araC	L-Arabinose	(Guzman et al. 1995)
proU		Osmolarity	(Herbst, B. et al. 1994)
cst-1		Glucose starvation	(Tunner, J. R.et al. 1992)
tetA	TetR	Tetracycline	(Skerra 1994)
rhaP $_{BAD}$	RhaR, RhaS	L-rhamnose	(Haldimann et al. 1998)
Pm	XylS	m-toluic acid	(Blatny et al. 1997)
cadA	cadR	pH	(Chou, C. et al. 1995)
nar	fnr (FNR, NARL)	Anaerobic conditions, nitrateion	(Lee, J. et al. 1996)
tac, hybrid	lacI, lacI^q lacI^d	IPTG Thermal	(Amann, E. et al. 1983) (Xue, G.-P. et al. 1996)
trc, hybrid	lacI, lacI^q lacI(Ts)^a, lacI^q(Ts)^a	IPTG Thermal	(Brosius, J. et al. 1985)
lpp-lac, hybrid	lacI	IPTG	(Hsiung, H. M. et al. 1989)
P_{syn}, synthetic	lacI, lacI^q	IPTG	(Giacomini, A. et al. 1994)
p_L (λ)	λcIts857	Thermal	(Elvin et al. 1990)
p_L-9G-50, mutant (λ)		Reduced temperature (>20ºC)	(Giladi, H. et al. 1995)
cspA		Reduced temperature (>20ºC)	(Mujacic et al. 1999)
p_R, p_L, tandem (λ)	λcIts857	Thermal	(Elvin, C. et al. 1990)
T7 (T7)	λcIts857	Thermal	(Studier and Moffatt 1986)
T7-lac operator (T7)	lacI^q	IPTG	(Studier and Moffatt 1986)
λpL, pT7, tandem (λ, T7)	λcIts857, lacI^q	Thermal, IPTG	(Mertens, N. et al. 1995)
T3-lac operator (T3)	lacI^q	IPTG	(Giordano, T. J. et al. 1989)
T5-lac operator (T5)	lacI^q, lac^I	IPTG	(Bujard, H. et al. 1987)
T4 gene 32 (T4)		T4 infection	(Duvoisin, R. M. et al. 1986)
nprM-lac operator (Bacillus spp.)	lacI^q	IPTG	(Yamada, M. et al. 1991)
VHb (Vitreoscilla spp.) Protein A (Staphylococcus aureus)		Oxygen, cAMP-CAP^e	(Khosla, C. et al. 1990)

[a] lacI gene with single mutation, Gly-187 → Ser

۱-ژن lacI با یک جهش، GLY-187 ← Ser

[b] lacI gene with three mutations, Ala-241 → Thr, Gly-265 →Asp, and Ser-300→Asn

۲-ژن lacI با سه جهش، Ala-241← ۲۶۵-Thr, Gly ← Asp, and Asn ← Ser-300

[c] The constitutive *lpp* promoter (P_{lpp}) was converted into an inducible promoter by insertion of the *lac*UV5 promoter/operator region downstream of P_{lpp}. Thus, expression occurs only in the presence of a lac inducer

۳-پروموتر lpp سازنده (Plpp) با درج پروموتر / منطقه اپراتور lacUV5 در پایین دست از Plpp به یک مروج القایی تبدیل شد. بنابراین ، بیان فقط در حضور القا کننده لاک رخ می دهد

[d] Wild-type lacI gene

[e] cAMP-CAP, cyclic AMP-catabolite activator protein

۵-cAMP-CAP ، پروتئین فعال کننده AMP-catabolite چرخه AMP

مطالعه‌های فراوانی در زمینه‌ی سیستم‌های اپراتور-پروموتر برپایه *lac* صورت گرفته و نشان می‌دهند که با تغییر موقعیت اپراتور درون توالی پروموتر، سطح بیان پروتئین تا ۷۰ برابر

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

قابل تغییر است. بنابراین، زمانی‌که توالی ۱۷ بازی اپراتور بین نواحی ۱۰- و ۳۵- قرار بگیرد مهار بیان پروتئین ۵۰ الی ۷۰ برابر بیش‌تر از زمانی است که اپراتور بالادست ناحیه ۳۵- یا پایین‌دست ناحیه ۱۰- قرار گرفته باشد.

سومین ویژگی مهم پروموتر قابلیت القاء پذیری آن به شکلی آسان و مقرون‌به صرفه است. از جمله پروموترهایی که برای تولید پروتئین در مقیاس بالا مورد استفاده قرار می‌گیرند، تحت القای دمایی (λp_L) یا القای شیمیایی (*trp*) هستند (جدول ۱). پروموترهای هیبرید *tac* یا *trc* که توسط IPTG ((isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside) IPTG) القاء می‌شوند، پروموترهای قدرتمندی هستند که به‌طور وسیعی در تحقیقات پایه مورد استفاده قرار می‌گیرند. با این‌حال، استفاده از IPTG به‌علت سمیت و هزینه آن، جهت تولید پروتئین‌های درمانی مربوط به انسان نامطلوب است. این معایب IPTG تا به امروز استفاده از پروموترهای *tac* یا *trc* را در تولید پروتئین‌های درمانی انسان، محدود نموده است. وجود ژن موتان *lacI*(Ts) کدکننده رپرسور *lac* حساس به دما، امکان القای دمایی این پروموترها را فراهم آورده است. علاوه‌بر این وکتورهای جدید تنظیم شدیدی نسبت به پروموتر *trc* در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهند. به‌تازگی دو رپرسور موتان *lac* معرفی شده‌اند که علاوه‌بر القاء توسط IPTG نسبت‌به حرارت حساس هستند. بااین‌که ژن *lacI* تیپ وحشی می‌تواند توسط دما القاء شود اما این سیستم به‌طور شدید تنظیم‌شده نیست و در سویه‌های $lacI^q$ قابل استفاده نیست، زیرا تغییر دمایی توانایی غلبه بر مهار شدید ایجاد شده توسط تولید بیش از حد رپرسور *lac* را ندارد. بنابراین این سیستم محدود به تولید پروتئین‌هایی است که برای میزبان مضر نباشند (۳).

پروموترهای پاسخ‌دهنده به سرما، با وجود این‌که نسبت‌به سایر پروموترها مطالعه کم‌تری بر روی آن‌ها انجام شده است، بیان کارآمد ژن در دماهای پایین را تسهیل نموده‌اند. فعالیت پروموتر p_L فاژ لامبدا در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد حداکثر بوده و با افزایش دما کاهش می‌یابد. این پاسخ دمایی پروموتر p_L توسط فاکتور میزبانی الحاق‌شده *اشریشیاکلی* ، یک توالی ویژه، به‌طور مثبت تنظیم می‌شود؛ این فاکتور یک پروتئین چند منظوره است که به DNA متصل و باعث خمیدگی آن می‌شود. پروموتر ژن اصلی شوک سرمایی، *cspA*، به‌طور مشابه در دماهای پایین دارای فعالیت است. تجزیه مولکولی *cspA* و پروموتر P_L منجر به شناسایی نواحی ویژه‌ای از DNA می‌شود که این نواحی در افزایش رونویسی در دماهای پایین‌تر دخیل هستند؛ این مسأله امکان گسترش پروموترهای مشتق از λp_L که در دماهای پایین‌تر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد بسیار فعال هستند، را فراهم می‌آورد. اساس استفاده از پروموترهای پاسخ‌دهنده به سرما برای بیان ژن بر این مبناست که تاخوردگی پروتئین در دماهای ۱۵ الی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تنها اندکی تحت تأثیر قرار می‌گیرد، درحالی‌که سرعت رونویسی و ترجمه به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. در مقابل، این شرایط زمان کافی برای تاخوردگی مجدد را فراهم آورده و تولید پروتئین‌های فعال و اجتناب از تشکیل تجمعات غیرفعال پروتئینی (اجسام انکلوژن)، بدون کاهش بازده نهایی پروتئین هدف را امکان‌پذیر می‌سازد. سایر پروموترهایی که به‌تازگی بررسی شده‌اند (جدول ۱) دارای ویژگی‌های جالبی هستند و اختیارات بیش‌تری برای سیستم-های بیان ژن فراهم می‌آورند. به‌عنوان مثال، پروموتر pH یک پروموتر بسیار قوی است: پروتئین‌های نوترکیب بیش از ۴۰ الی ۵۰ درصد کل پروتئین سلول را به خود اختصاص می-دهند. البته این سطح بیان، برای پروتئین‌های مختلف متفاوت است زیرا سنتز پروتئین علاوه‌بر قدرت پروموتر به کارایی ترجمه نیز بستگی دارد (۳).

پروموترهای *اشریشیاکلی* *به‌طور* عمومی به‌صورت ناحیه‌ای مرکزی واجد هگزامرهای ۱۰- و ۳۵- و فاصله‌انداز ۱۵ الی ۱۹ بازی بین این دو هگزامر است. فرض می‌شود که اجزای خارج این ناحیه مرکزی فعالیت پروموتر را تحریک می‌کنند. مطالعه-های فراوانی نشان داده است که توالی بالادست پروموتر مرکزی سرعت شروع رونویسی را در سلول افزایش می‌دهد. توالی DNA، عنصر UP، که بالادست منطقه ۳۵- پروموتر rRNA *اشریشیاکلی* (*rrn B* P1) قرار گرفته رونویسی را در شرایط سلول[۲۰] (داخل سلول) و هم‌چنین در محیط

20 In vivo

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

آزمایشگاه [i] (خارج سلول) تحریک می‌کند. عنصر UP به‌عنوان یک پروموتر مستقل عمل می‌کند، زیرا زمانی که به سایر پروموترها از جمله *lacUV5* ملحق می‌شود، رونویسی را تحریک می‌کند. توانایی عنصر UP به‌عنوان تقویت‌کننده (In vitro) رونویسی در اتصال با پروموترهای هترولوگ می‌توانند دارای کاربرد عمومی در سیستم‌های بیانی سطح بالا باشد (۳). با وجود اینکه قدرت بیش‌از حد پروموترهای rRNA (P_1 و P_2) به خوبی تأیید شده است، اما این پروموترها برای تولید مقادیر فراوان پروتئین در *اشریشیاکلی* به‌کار گرفته نشده‌اند زیرا تنظیم آن‌ها بسیار سخت و مشکل است. سنتز rRNA در سلول مرتبط با کنترل سرعت رشد است و P_1 و P_2 در دوره‌های رشد سریع سلول فعال هستند و در فاز سکون، رشد غیرفعال می‌شود. بنابراین، پروموترهای rRNA در فاز قبل از القاء پیوسته فعال و یا دارای نشت هستند. پروموتر P_2 ضعیف‌تر و دارای قابلیت القای پایین‌تری در سلول‌های درحال رشد سریع است. با این‌حال، زمانی‌که P_2 از P_1 جدا می‌شود فعالیت آن افزایش یافته و نسبت‌به پاسخ‌های دقیق حساس می‌شود؛ این مطلب نشانگر این است که در فرم طبیعی P_2 به‌طور جزئی مسدود شده است. Brosius و Holy توالی اپراتور *lac* را پایین دست پروموتر P_2 rRNA *rrn B* وارد نمودند و مهار P_2در سویه‌های حامل ژن $lacI^q$ حاصل شد. فعالیت رونویسی توسط تولیدchloramphenicol acetyltransferase و بیان 4.5S RNA مورد ارزیابی قرار گرفت. باوجود این‌که فعالیت P_2 تنها نصف پروموتر *tac* است اما زمانی‌که پروموتر *rrn B* P_1 بالادست پروموتر P_2 قرار می‌گیرد، مهار رونویسی دچار نقص می‌شود (۳). به‌نظر می‌رسد پروموترهای rRNA با استفاده از اصل وارونگی پروموترها به خوبی قابل تنظیم باشند (قسمت سیستم‌های بیانی شدید تنظیم‌شده را ملاحظه فرمایید). بنابراین پروموترهای rRNA می‌توانند بالادست ژن مورد نظر، اما در جهت مخالف رونویسی، کلون شوند. استفاده از سایت‌های الحاقی[21] فاژ لامبدا و یک اینتگراز لامبدا تنظیم‌شده، پروموتر وارونه را برای القاء تسهیل می‌کند، و وجود خاتمه‌دهنده‌های قوی رونویسی در بالادست یک پروموتر بسیار فعال، از ناپایداری وکتور در فاز قبل از القاء ممانعت می‌کند.

21 Integration sites

خاتمه‌دهنده (ترمیناتور)های رونویسی

در پروکاریوت‌ها، خاتمه رونویسی تحت تأثیر دو مکانیسم مختلف است: خاتمه رونویسی وابسته به rho که پروتئین هگزامر rho است؛ این پروتئین باعث رهاسازی رونوشت RNA از الگوی آن می‌شود. از طرف دیگر، خاتمه مستقل از rho وابسته‌به سیگنال‌های کدشده توسط رونوشت است، به‌خصوص ناحیه‌ای با تقارن دوتایی که کدکننده ساختار سنجاق‌سری یا ساقه-حلقه در رونوشت RNA است و ناحیه دیگری که غنی از dA و dT بوده و ۴ تا ۹ باز فرادست توالی دوتایی قرار گرفته است. با وجوداین‌که در ساختار پلاسمیدهای بیانی نادیده گرفته می‌شوند اما خاتمه‌دهنده‌های کارآمد، اجزایی ضروری در وکتورهای بیانی هستند، زیرا دارای عملکردهای متعدد و مهمی هستند. رونویسی از یک پروموتر ممکن است عملکرد آن را مختل کند، که این رویداد به انسداد پروموتر[22] معروف است. این تداخل با قرارگیری صحیح یک خاتمه‌دهنده رونویسی پایین‌دست توالی کدکننده قابل پیش‌گیری است؛ این عمل مانع از رونویسی دائم از پروموتری دیگر می‌شود. به‌طور مشابه، یک خاتمه‌دهنده رونویسی که بالادست پروموتری قرار گرفته که درحال رونویسی ژن مورد نظر است، رونویسی زمینه را به حداقل می‌رساند. هم‌چنین ثابت شده است که رونویسی از یک پروموتر قوی، به‌علت تولید بیش از حد پروتئین ROP دخیل در کنترل تعداد کپی پلاسمید، باعث ناپایداری پلاسمیدها می‌شود. علاوه‌بر این، خاتمه‌دهنده‌های رونویسی پایداری mRNA را تقویت می‌کند و پس از این سطح تولید پروتئین را افزایش می‌دهد. دو خاتمه‌دهنده ویژه و کارآمد عبارتند از T_1 و T_2 که مشتق از اپرون rRNA *rrnB* باکتری *اشریشیاکلی* است، اما توالی‌های دیگری نیز وجود دارند که به‌نسبت مؤثر هستند (۳).

ضدخاتمه دهنده (آنتی‌ترمیناتور) های رونویسی

ضدخاتمه نیز رویدادی تنظیمی است. پروتئین‌های ضد پایان باعث ادامه رونویسی تا انتهای ژن‌های تأخیری می‌شوند، به-

22 Promoter occlusion

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

طوری‌که RNA پلی‌مراز را قادر به گذر از یک پایان دهنده و رونویسی RNA طولانی‌تر می‌سازد. محل عملکرد پروتئین‌های ضدخاتمه مستقل از خاتمه‌دهنده‌ها و در بالا دست واحد رونویسی در جایگاهی متفاوت از منطقه پایان و nut نام دارد. در باکتری‌ها، بسیاری از اپرون‌های دخیل در بیوسنتز اسیدهای آمینه، حاوی تضعیف‌کننده‌هایی[۲۳] در انتهای '5 اولین ژن ساختاری هستند. این تضعیف‌کننده‌ها توسط محصولات آمینواسیدی اپرون ویژه‌ای تنظیم می‌شوند. بنابراین، حضور tRNA شارژ شده متناسب منجر به تشکیل ساختار ثانویه در رونوشت RNA در پی متوقف شدن ریبوزوم می‌شود. در غیاب tRNA شارژ شده متناسب، یک ساختار ضدخاتمه شکل می‌گیرد که مانع از تشکیل سنجاق‌سر در خاتمه‌دهنده و مهار خاتمه رونویسی می‌شود. عنصر ضدخاتمه-ای شناخته شده است که RNA پلی‌مراز را قادر به غلبه‌بر خاتمه وابسته‌به rho در اپرون‌های RNA ریبوزومی نموده و از آن به‌عنوان *boxA* یاد می‌شود. عملکرد ضدخاتمه در رونویسی پروسه پیچیده و قابل توجهی است که فاکتورهای میزبانی شناخته‌شده و هم‌چنین ناشناخته‌ای در آن دخیل هستند. در اینجا، به‌طور خلاصه استفاده از عناصر ضدخاتمه مفید در بیان ژن‌های هترولوگ در *اشریشیاکلی* ذکر می‌گردد (۳). یکی از سیستم‌های بیانی قدرتمند و نامحدود در *اشریشیاکلی*، پروموتر تأخیری فاژ T7 است. فعالیت این سیستم بسته به یک واحد رونویسی است که T7 RNA polymerase را تأمین می‌کند، چرا که مهار شدید این پلی‌مراز برای جلوگیری از نشت پروموتر T7 ضروری است. روش‌های مختلفی برای تنظیم بیان پلی‌مراز T7 مورد استفاد قرار گرفته‌اند که هر یک از این روش‌ها معایب خاص خود را دارند. مرتنز و همکارانش با ساخت یک کاست بیانی T7 RNA polymerase این مشکل را برطرف نموده‌اند، به‌نحوی‌که این کاست به‌طور برگشت‌پذیر تضعیف‌شده و بر اساس λp_L ساخته شده است. بنابراین سطح بیان پایه برای پلی‌مراز T7 با وارد نمودن سه خاتمه‌دهنده رونویسی پشت‌سرهم، بین پروموتر و ژن کدکننده پلی‌مراز T7 تضعیف می‌شود. برای القاء، عملکرد آنتی‌ترمیناتور وابسته به nut_L مشتق از فاژ لامبدا، متوقف می‌شود. پی‌در پی، پروموتر قابل القاء با IPTG نیز به‌طور مشابه قابل استفاده است و امکان برداشت مهار را با تغییر شرایط فراهم می‌آورد. نواحی ضدخاتمه رونویسی از اپرون rRNA *rrnB* باکتری *اشریشیاکلی* در وکتور بیانی pSE420 (واجد پروموتر *trc*) مورد استفاده قرار گرفته است. تسهیل رونویسی از نواحی دارای ساختار دوم شدید اساس ایجاد چنین وکتورهایی است و نتیجه آن پایین آوردن احتمال خاتمه نابالغ رونویسی توسط RNA پلی‌مراز میزبان است. با این‌حال حضور فاکتور ضدخاتمه *rrnB* به ظاهر ناکارآمد به نظر می‌رسد (۳).

سیستم‌های بیانی تنظیم‌شده دقیق

مزایای پروموترهای تنظیم‌شده دقیق منجر به طراحی سیستم‌های بیانی هوشمند و قابل‌کنترلی شده است که به-خصوص برای بیان ژن‌هایی که محصول‌های آن‌ها مخل رشد سلول هستند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. این روش‌ها عبارتند از: استفاده از متد "plating"، افزایش میزان مهار اپراتور، القاء توسط عفونت با فاژ موتان، تضعیف قدرت پروموتر در وکتورهای با تعداد کپی بالا، استفاده از خاتمه‌دهنده‌های رونویسی در ترکیب با عناصر ضدخاتمه، استفاده از پروموتر قابل القاء در پلاسمیدی با تعداد کپی قابل کنترل، سیستم-های با تنظیم متقاطع، انتقال هم‌زمان پلاسمیدهای مختلف با استفاده از SP6 RNA polymerase و استفاده از RNA آنتی‌سنس مکمل mRNA ژن کلون‌شده. در نهایت، یک روش جالب استفاده از پروموترهای دارای قابلیت معکوس شدن است: پروموتر توسط دو جایگاه ادغام[۲۴] فاژ لامبدا احاطه شده و در جهت مخالف ژنی که باید بیان شود، قرار گرفته و تنها توسط القاء نوترکیبی خاص جایگاه[۲۵] با واسطه‌ی اینتگراز λ معکوس می‌شود (۳).

سیستم فوق در کنار معایبش دارای مزایایی نیز است. بنابراین روش‌هایی که وابسته به محیط کشت جامد هستند به‌راحتی برای بیان در مقیاس بالا قابل استفاده نیستند. سیستم‌های مهاری در سطح بالا اغلب منجر به کاهش قابل توجهی در بازده پروتئین می‌شوند، بنابراین بهینه‌سازی میزان مهار اپراتور

23 Attenuator

24 Integration site

25 site-specific

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

در این سیستم‌ها ضروری است. القاء با واسطه‌ی فاژ λ پیچیدگی سیستم را افزایش می‌دهد. استفاده از پروموترهای معکوس مستلزم ساخت وکتورهای پیچیده است. با وجود اینکه بیش‌تر سیستم‌های فوق تاکنون به‌منظور تولید مقادیر فراوان پروتئین در مقیاس وسیع مورد استفاده قرار نگرفته‌اند، اما تأمین‌کننده ابزار مهمی برای بیان ژن هستند (۳).

تنظیم بیان ژن در سطح ترجمه

آغاز ترجمه mRNA

دانش فراوان درباره‌ی پروسه رونویسی امکان استفاده از پروموترهای پروکاریوتی به فرم کاست، بدون تأثیرپذیری از محتوای نوکلئوتیدی اطراف را فراهم آورده است. با این‌حال، شاخص‌های آغاز سنتز پروتئین بسیار مشکل‌تر از آنند که بتوان آن‌ها را کشف نمود؛ و پیچیدگی این مسأله باید درنظر گرفته شود. امروزه مشخص شده است که که طیف وسیعی از نرخ کارایی در ترجمه mRNA های مختلف بیش‌تر به‌علت ویژگی‌های ساختاری منحصر به‌فرد انتهای '5 هر گونه خاص mRNA است. بنابراین برخلاف پروموترهای قابل انتقال، هیچ توالی عمومی برای شروع کارآمد رونویسی طراحی نشده است؛ البته پیشرفت‌هایی در این زمینه از بیان ژن در *اشریشیاکلی* صورت گرفته و راهبردهای ارائه شده است.

ناحیه شروع ترجمه در بیشتر ژن‌های *اشریشیاکلی* شامل کدون آغاز AUG است. توالی GUG توسط ۸٪ از ژن‌ها و UUG گاهی (۱٪) در محل شروع مورد استفاده قرار می‌گیرد. در یک مورد، AUU در کدون آغاز *infC* قرار گرفته است. این کدون برای تنظیم خودبه‌خودی *infC* مورد نیاز است. کارایی ترجمه کدون‌های آغاز در *اشریشیاکلی* مورد بررسی قرار گرفته است. کدون AUG دو تا سه برابر ترجیح داده می‌شود و GUG تنها اندکی بیش از UUG استفاده می‌شود (۳).

Shine و Dalgarno توالی را در جایگاه اتصال ریبوزوم mRNA باکتریوفاژ شناسایی نمودند و احتمال دادند که این منطقه با انتهای '3 مکمل 16 S rRNA در طی آغاز ترجمه، برهم‌کنش می‌نماید. این مسأله توسط Steitz و Jakes تأیید شد. فاصله بین SD و کدون AUG آغازی می‌تواند بین ۵ الی ۱۳ نوکلئوتید باشد و این تعداد بر کارایی آغاز ترجمه تأثیرگذار است. مطالعه‌های فراوانی برای تعیین توالی نوکلئوتیدی بهینه در ناحیه SD و بهترین فاصله بین SD و کدون آغاز، صورت گرفته است. Ringquist و همکارانش نقش RBS را در ترجمه مورد بررسی قرار دادند و به نتایج زیر رسیدند.

(i) توالی شاین دالگارنو UAAGGAGG نسبت به توالی AAGGA تولید پروتئین را ۳ الی ۶ برابر افزایش می‌دهد.

(ii) برای هر توالی SD یک حالت بهینه وجود دارد که می‌توان بین ۵-۷ نوکلئوتید برای AAGGA و بین ۴-۸ نوکلئوتید برای UAAGG باشد.

(iii) برای هر توالی SD فاصله‌ای حداقل برای ترجمه مورد نیاز است؛ برای AAGGA، این فاصله حداقل ۵ نوکلئوتید است و برای UAAGGAGG این فاصله ۳ الی ۴ نوکلئوتید است. این فاصله‌ها نشان می‌دهد که ارتباط فیزیکی مهمی بین انتهای '3 S rRNA 16 و آنتی‌کدون fMet- $tRNA_f$ متصل به جایگاه P ریبوزوم وجود دارد (۳).

(iv) ساختار ثانویه در منطقه آغاز ترجمه در mRNA نقشی حیاتی در کارایی بیان ژن دارد. انسداد منطقه SD و/یا کدون AUG توسط ساختار ساقه-لوپ مانع از دسترسی زیرواحد 30 S ریبوزوم به mRNA و مهار ترجمه می‌شود. استراتژی‌های متعددی جهت به حداقل رساندن ساختار ثانویه mRNA به‌کار گرفته شده است. غنی‌سازی RBS با ریشه‌های آدنین و تیمیدین، بیان ژن‌های خاصی را تقویت می‌کند. به‌طور مشابه، موتاسیون نوکلئوتیدهای ویژه‌ای بالادست یا پایین‌دست منطقه SD تشکیل ساختار ثانویه mRNA را مهار و کارایی ترجمه را تقویت می‌کند. روش دیگر استفاده از پدیده طبیعی "جفت شدن ترجمه" (Translational coupling) در باکتری‌هاست. مکانیسم جفت‌شدن ترجمه به‌عنوان توضیحی برای بیان هماهنگ پروتئین‌های مختلف mRNA های پلی‌سیسترونیک درنظر گرفته می‌شود. بنابراین ثابت شده است که پروموتر قوی *gal* می‌تواند سنتز گالاکتوکیناز را در سطوح بالا هدایت کند،

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

وقتی‌که *galK* به لحاظ ترجمه به یک ژن بالادست جفت می‌شود، و این مسأله نشان‌دهنده این است که حتی یک RBS ضعیف ممکن است بسیار کارآمد باشد درصورتی‌که قابل دسترسی به ریبوزوم باشد. این مکانیسم تنظیمی ممکن است کاربردهای مهمی در بیوتکنولوژی برای تولید بالای پروتئین‌ها داشته باشد. در واقع جفت‌شدن ترجمه به‌طور وسیعی برای بیان ژن‌های مختلفی در سطوح بالا مورد استفاده قرار گرفته‌اند. علاوه‌بر اتصال منطقه SD به 16S rRNA، سایر برهم‌کنش‌ها بین mRNA و ریبوزوم در آغاز ترجمه دخیل می‌باشند. مطالعه‌ها نشان داده است که پروتئین ریبوزومی S1 به‌طور مستقیم در شناسایی و اتصال mRNA توسط زیرواحد 30S ریبوزومی دخیل است. برهم‌کنش‌های ساختاری و عملکردی بسیاری از اجزای کمپلس شروع رونویسی پروکاریوت‌ها مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته است (۳).

تقویت‌کننده‌های رونویسی

تقویت‌کننده‌ها[۲۶] عناصری از DNA هستند که می‌توانند رونویسی را افزایش دهند. این عناصر در بالادست (بیش‌تر) یا پایین دست (گاهی) جایگاه آغاز رونویسی قرار دارند. تقویت‌کننده‌ها در پروکاریوت‌ها به پروموتور بسیار نزدیک هستند، اما در یوکاریوت‌ها می‌توانند از پروموتور دور باشند. توالی‌هایی که بیان ژن‌های هترولوگ را در *اشریشیاکلی* تقویت می‌کنند، در باکتری‌ها و هم‌چنین فاژها شناسایی شده‌اند. Olins و همکارانش یک توالی ۹ بازی از ژن g10-L فاژ T7 را شناسایی نمودند که به نظر می‌رسد یک جایگاه اتصال ریبوزوم (RBS) بسیار کارآمد است. در مقایسه با منطقه SD مورد توافق [۱۱]، توالی g10-L منجر به افزایش ۴۰ الی ۳۴۰ برابری در بیان ژن‌های متعدد می‌شود. وقتی که توالی g10-L بالادست توالی SD سنتتیک قرار گیرد باعث افزایش ۱۱۰ برابری در کارایی ترجمه ژن *lacZ* می‌شود. مدلی پیشنهاد شده است که به موجب آن، این توالی تقویت ترجمه را توسط برهم‌کنش با بازهای ۴۵۸ الی ۴۶۶ از 16S rRNA انجام می‌دهد. توضیح دیگر در این رابطه این است که تنها mRNA هایی که واجد جایگاه SD ضعیفی هستند می‌توانند از توالی g10-L سود برده و این مسأله به‌احتمال به‌علت پایداری mRNA بوده و به‌علت برهم‌کنش ویژه با 16S rRNA نمی‌باشد. سایر دانشمندان تقویت قابل توجهی در تولید پروتئین به هنگام استفاده از توالی g10-L مشاهده ننمودند. توالی‌های مشابه g10-L نیز در سایر باکتریوفاژها شناسایی شدند. ژن glnA در *اشریشیاکلی* که در فاصله ۱۲۰ جفت بازی از جایگاه آغاز قرار دارد که دارای دو جایگاه اتصال از فاکتور رونویسی پروتئین C تنظیم کننده نیتروژن (NTRC) است.

گروه‌های تحقیقاتی دیگر توالی‌های غنی از U را در ناحیه ترجمه‌نشدنی '5 (UTR) mRNA شناسایی نمودند که به‌عنوان تقویت‌کننده ترجمه عمل می‌کنند. McCarthy و همکارانش منطقه‌ای در ژن *atpE* باکتری *اشریشیاکلی*، به‌طور دقیق بالادست ناحیه SD، شناسایی نمودند. این توالی ۳۰ بازی جهت بیان بیش‌ازحد ژن‌های اینترلوکین ۲ انسانی و اینترفرون بتا مورد استفاده قرار گرفت. ثابت شده است که توالی U_8 بالادست ناحیه SD در *rnd* mRNA کدکننده RNase D برای ترجمه کارآمد این mRNA ضروری است. حذف این ناحیه بدون تأثیر بر سطح *rnd* mRNA یا جایگاه شروع رونویسی، ترجمه را بیش‌تر کاهش داد. Boni و همکارانش نشان دادن که مولکول هدف برای توالی‌های مشابه، پروتئین S1 زیرواحد 30S ریبوزومی است (۳).

در یک مطالعه جالب، Sprengart و همکارانش ثابت کردند که توالی‌هایی که بلافاصله پایین‌دست کدون آغاز قرار گرفته‌اند، نقش مهمی در آغاز ترجمه ایفا می‌کنند. منطقه ویژه‌ای به نام جعبه پایین‌دست (DB[۲۷]) که بین موقعیت ۱۵+ و ۲۶+ ناحیه کدشونده ژن 0.3 T7 یا بین موقعیت ۹+ و ۲۱+ ناحیه کدشونده ژن 10 T7 قرار گرفته است، به‌عنوان تقویت‌کننده رونویسی عمل می‌کند. منطقه DB مکمل نوکلئوتیدهای ۱۴۶۹ الی ۱۴۸۳ 16S rRNA بوده و به مخالف جعبه پایین‌دست (ADB[۲۸]) معروف است. حذف DB فعالیت ترجمه را متوقف می‌کند. از طرفی، بهینه‌سازی رابطه مکملی بین توالی‌های DB و ADB منجر به حداکثر میزان بیان ژن فیوژن

26 Enhancer

27 Downstream box

28 Anti-downstream box

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

dhfr می‌شود. نکته جالب توجه این است که با تغییر جایگاه DB به بالادست کدون آغاز، در موقعیت SD، این توالی دیگر واجد عملکرد نبود. DB در تعدادی از ژن‌های *E. coli* و باکتریوفاژ وجود دارد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که علاوه‌بر سایت SD و کدون آغاز، توالی‌های دیگری نیز در mRNA برای ترجمه کارآمد حائز اهمیت هستند. با این‌که مکانیسم دقیق اثرهای مشاهده شده به‌طور دقیق مشخص نیست، اما مطالعه‌ها در این زمینه نشان می‌دهد که برای بیان ژن‌ها از مدل‌های "تقویت‌کننده‌های ترجمه‌ای" سود جسته‌اند (۳).

پایداری mRNA

پروسه تخریب mRNA نقطه کنترل اصلی برای بیان ژن کمابیش در تمام ارگانیسم‌ها فراهم نموده است. با وجود این‌که مفهوم mRNA و پایداری آن ۳۵ سال پیش محقق شد، اما درک جزئی از مکانیسم تخریب mRNA به دلائل متعدد چالش قابل توجهی را برانگیخته است. این بخش شاخص‌های ویژه‌ای در ارتباط با پایداری mRNA در خصوص کاربردهای عملی بیان بالای ژن‌ها در *اشریشیاکلی* را مورد نظر قرار داده است. پایداری mRNA در سلول‌ها متفاوت است و اغلب دلیل منطقی برای آن وجود دارد. پروتئینی که فقط برای مدت کوتاهی مورد نیاز سلول است توسط یک پیام ناپایدار تا حد ممکن سنتز می‌شود و با خاموش شدن ژن، سنتز آن متوقف می‌گردد. پایداری را با در نظر گرفتن نواحی غیر کدشونده مولکول RNA ، می‌توان تا حدی تعیین کرد.

در تخریب mRNA در *اشریشیاکلی* انواع مختلف RNase دخالت دارند از جمله اندونوکلئازها (RNase E, RNase K, RNase III) و 3' اگزونوکلئازها (RNase II و پلی‌نوکلئوتید فسفوریلاز [PNPase])؛ تاکنون 5' اگزونوکلئازی در پروکاریوت‌ها شناسایی نشده است. تخریب mRNA تحت تأثیر برش اندونوکلئوتیک غیر اختصاصی قرار نمی‌گیرد، زیرا هیچ رابطه معکوسی بین طول و نیمه‌عمر mRNA وجود ندارد. دو کلاس از عناصر حفاظتی برای پایداری mRNA در *اشریشیاکلی* شناخته شده است. یک مورد شامل توالی‌های 5' UTR در mRNA و دیگری ساختارهای ساقه-ریشه در 3'UTR و نواحی بین سیسترونی هستند. بعضی از این عناصر در ادغام با mRNA هترولوگ و البته تنها تحت شرایط ویژه-ای، به‌عنوان پایدار کننده عمل می‌کنند. به‌عنوان مثال، 5'UTR ژن ۳۲ باکتریوفاژ T4 نیمه‌عمر mRNAهای ناپایدار را در *E.coli*، تنها در سلول‌های آلوده به T4، افزایش می‌دهد. ژن‌های مقاومت به اریترومایسین (*erm*) در باکتری‌های گرم مثبت از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcuc aureus*) و *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) کدکننده mRNAهایی هستند که حاوی عناصر پایدار کننده در 5'UTR خود هستند. با این حال، پایدار سازی mRNA توسط *ermC* و 5' UTR *ermA* توسط آنتی‌بیوتیک القاء می-شود که باعث توقف ریبوزوم و ممانعت از ترجمه می‌شود. به-طور مشابه، تأثیرهای پایدارسازی منطقه 5' باکتریوفاژ p_L λ بر رونوشت *trp*-p_L λ نیازمند آلوده‌شدن با فاژ λ است (۳).

برخلاف مثال فوق، 5' UTR رونوشت ژن *ompA* باکتری *اشریشیاکلی* باعث افزایش نیمه‌عمر تعدادی از mRNAهای هترولوگ تحت شرایط نرمال رشد سریع سلول، می‌شود. Emory و همکارانش نشان دادند که حضور ساختار ساقه-ریشه در/بسیار نزدیک به 5' انتهایی 5' UTR *ompA* برای ایفای نقش پایدارسازی آن ضروری است. علاوه‌بر این، نیمه-عمر mRNA ناپایدار با افزودن ساختار سنجاق‌سر به انتهای 5' آن قابل افزایش است. تصور می‌شود mRNA ای که با یک بخش تک رشته‌ای بلند آغاز می‌شود، قبل از برش mRNA از نواحی میانی، ترجیحاً هدف RNase ای واقع می‌شود که با انتهای 5' برهم‌کنش می‌نماید. بنابراین به نظر می‌رسد اضافه نمودن پایدار کننده *ompA* در 5' به ژن‌های هترولوگ ممکن است بیان ژن را در *اشریشیاکلی* تقویت کند. با این‌حال mRNAهایی که حاوی سایت‌های داخلی پردازش mRNA هستند به‌واسطه حضور پایدار کننده 5' محافظت نمی‌شوند (۳).

کلاس دیگری از عناصر حفاظت‌کننده mRNA شامل توالی-های 3' UTR هستند که می‌توانند ساختارهای ساقه-ریشه تشکیل داده و تخریب اگزونوکلئازی رونوشت را از انتهای 3' بلاک کنند. Wong و Chang یک چنین عنصری را در

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

خاتمه‌دهنده رونویسی ژن پروتئین کریستالی *باسیلوس تورین جنسیس* (*Bacillus thuringiensis*) شناسایی نمودند. الحاق این تنظیم‌کننده مثبت به انتهای '3 ژن پنی‌سیلیناز (*penP*) *باسیلوس لیکنی فورمیس* (*Bacillus licheniformis*) و c-DNA اینترلوکین ۲ انسانی، منجر به افزایش نیمه عمر mRNA و تقویت تولید پلی‌پپتیدهای مربوطه در *باسیلوس سوبتیلیس* و هم‌چنین *اشریشیاکلی* گردید. همانند پایدار کننده‌های '5، کاربرد این تنظیم‌کننده '3 به‌عنوان پایدار کننده عمومی mRNA بعید به‌نظر می‌رسد. به‌عنوان مثال، جایگزینی سنجاق‌سر انتهای '3 در mRNA ناپایدار با سنجاق‌سر mRNA پایدار، بیان رونوشت‌های ناپایدار را تقویت نخواهد کرد. علاوه‌بر این، پیشنهاد شده است که بیان ژن با استفاده از سویه‌های میزبان دارای نقص به لحاظ RNaseهای ویژه‌ای از جمله RNase II و PNPase، ممکن است تقویت شود. البته این پیشنهاد نیز احتمالاً ناکارآمد خواهد بود زیرا عدم وجود RNase II و PNPase، علاوه‌بر تولید بیش‌از حد RNase II، هیچ تأثیری بر میانگین نیمه‌عمر mRNA ندارد. علاوه‌بر این سویه‌های دارای نقص در RNase II و PNPase قادر به ادامه زندگی نیستند. این مسأله و سایر ملاحظات منجر به این نتیجه‌گیری می‌شود: "به‌احتمال پایداری‌های نامتجانس بیش‌تر mRNAهایی که به ساقه-ریشه خاتمه می‌یابند ناشی از قابلیت افتراقی این ساختارهای ساقه-ریشه انتهایی نسبت به نفوذ اگزونوکلئازهای '3 نیست"، و علاوه‌بر این، "آغاز تخریب '3 اگزونوکلئازی RNA به احتمال نادر بوده، به‌جز در مورد RNAهای ناپایدار فاقد سنجاق‌سر '3 و RNAهای با عمر طولانی مقاوم ه حمله توسط دیگر انواع ریبونوکلئازها " (۳).

خاتمه ترجمه

حضور سیگنال توقف در mRNA یک جزء ضروری در فرآیند خاتمه ترجمه است. علاوه‌بر ۳ کدون خاتمه، UAA، UGA، و UAG، این رویداد پیچیده مستلزم برهم‌کنش‌های ویژه‌ای بین ریبوزوم، mRNA و فاکتورهای آزادسازی[۲۹] مختلفی در محل خاتمه است. در *E.coli*، RF-1 خاتمه‌دهنده ترجمه کدون پایان UAG، و RF-2 خاتمه‌دهنده ترجمه UGA و هر دوی این فاکتورها خاتمه‌دهنده کدون UAA هستند. فاکتوری دیگر، RF-3، نیز به‌تازگی کلون شده است.

در طراحی وکتورهای بیانی، به‌منظور جلوگیری از عبور ریبوزوم، به‌طور عمومی هر سه کدون پایانی الحاق می‌شود. در *اشریشیاکلی* کدون UAA نسبت‌به دو کدون دیگر ترجیح داده می‌شود. آنالیز آماری بیش از ۲۰۰۰ ژن *اشریشیاکلی* عدم تصادفی بودن را در کدون توقف و هم‌چنین در نوکلئوتیدهای پس از آن ثابت نموده است. هم‌چنین قدرت ۱۲ تترانوکلئوتید محتمل به‌عنوان سیگنال خاتمه (UAAN، UGAN، UAGN) به‌وسیله سنجش خاتمه در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت؛ در این بررسی کارایی خاتمه توسط رقابت مستقیم این سیگنال‌ها با تغییر چهارچوب خواندن، سنجیده شد. کارایی خاتمه بسته به نوع کدون پایان و هم‌چنین تترانوکلئوتید، بین ۸۰٪ (UAAU) تا ۷٪ (UGAC) تفاوت نشان داد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نوع نوکلئوتیدها پس از کدون پایان، بر کارایی خاتمه ترجمه در *اشریشیاکلی* بسیار تأثیرگذار است. محتوای نوکلئوتیدی در انتهای '5 کدون خاتمه نیز در این امر دخیل است. بنابراین، بار و ویژگی‌های هیدروفوبیسیته آمینواسیدهای قبل از c–ترمینال (منطقه ۲-) در پپتید تازه‌ساز تا ۳۰ برابر تفاوت در کارایی خاتمه UGA را منجر شده است، درحالی‌که خاتمه در UAG حساسیت کم-تری نسبت‌به ماهیت آمینواسید ۲- نشان داده است. برای موقعیت ۱-، گرایش به هلیکس آلفا، رشته بتا و پیچ معکوس، فاکتورهای تعیین‌کننده در خاتمه UGA هستند (۳).

هدف‌گیری پروتئین

بیان سیتوپلاسمی

تشکیل اجسام انکلوژن به‌عنوان مانع مهم در بیان ژن در سیتوسل مطرح می‌شود، که این اجسام دارای معایب متعددی هستند (جدول۲). با وجود این اجسام، عمل دشوار تاخوردگی مجدد پروتئین متراکم، تردید در این‌که پروتئین حاصل عملکرد بیولوژیک خود را حفظ نموده یا خیر و کاهش بازده پروتئین تخلیص‌شده، باید در نظر گرفته شود. تاکنون،

29 Release factors

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

پارامترهای فیزیکوشیمیایی دقیقی که در تشکیل اجسام انکلوژن مشارکت دارند، نامعلوم باقی مانده‌اند. مطالعه‌ای آماری در خصوص ترکیب‌های ۸۱ پروتئین که در *اشریشیاکلی* تشکیل جسم انکلوژن می‌دهند نشان داده است که شش پارامتر در تشکیل اجسام انکلوژن مرتبط هستند: میانگین بار، نسبت ریشه‌های تشکیل دهنده پیچ، نسبت سیستئین، نسبت پرولین، هیدروفیلیسیته و تعداد کل ریشه‌های اسید آمینه. دو پارامتر اول همبستگی قوی‌تری در تشکیل اجسام انکلوژن دارند، درحالی‌که چهار پارامتر دیگر همبستگی ضعیفی نشان می‌دهند. این یافته‌ها جهت ایجاد مدلی برای پیش‌بینی احتمال تشکیل اجسام انکلوژن، تنها بر اساس نسبت آمینواسیدهای پروتئین، به‌کار می‌رود. این مدل برای پیش-بینی عدم حلالیت گیرنده سلول T انسانی $V^{\beta}5.3$ در *اشریشیاکلی* مورد استفاده قرار گرفته است (۳).

روش‌های تجربی متعددی برای به حداقل رساندن تشکیل اجسام انکلوژن و بهبود تاخوردگی پروتئین مورد استفاده قرار گرفته است. این روش‌ها شامل رشد باکتری در دماهای پایین-تر؛ غربالگری سویه‌های مختلف *اشریشیاکلی*؛ جایگزینی ریشه-های آمینواسیدی انتخابی؛ تولید هم‌زمان چاپرون‌ها؛ استفاده از تیوردوکسین به‌عنوان همیار الحاقی یا تولید هم‌زمان با پروتئین موردنظر؛ رشد و القای سلول‌ها تحت شوک اسموتیک در حضور سوربیتول و گلایسیل بتائین؛ افزودن قندهای غیرقابل متابولیزه به محیط کشت؛ تغییر pH محیط کشت؛ و استفاده از سویه‌های دارای نقص در تیوردوکسین ردوکتاز (۳).

پتانسیل احیا مربوط به شرایط احیا سیتوپلاسمی نیز مشکل دیگری ایجاد می‌کند. پروتئین‌های سیتوپلاسمی باکتریایی حاوی ریشه‌های سیستئین اندک و در نتیجه باندهای دی-سولفیدی کمی هستند. بیش‌تر پروتئین‌های حاوی باندهای دی‌سولفید پایدار از سیتوپلاسم بیرون می‌روند. بنابراین، پروتئین‌های پستانداران که ساختار چهارم پیچیده آن‌ها تا اندازه‌ای به تشکیل باندهای دی‌سولفیدی بستگی دارد،به احتمال در سیتوپلاسم باکتری‌ها با کنفورماسیون صحیح خود نمی‌شوند. Bardwell و همکارانش پیشنهاد نمودند که فرکانس پایین باندهای دی‌سولفیدی در پروتئین‌های سیتوپلاسمی به احتمال ناشی از عدم حضور سیتوپلاسم لازم برای سیستم تشکیل باندهای دی‌سولفیدی از جمله پروتئین-های DsbA و DsbB، و یا مکانیسمی که به‌طور فعال از تشکیل باندهای دی‌سولفیدی در سیتوپلاسم جلوگیری کند، است. موتانت‌هایی از *اشریشیاکلی* جداسازی شده‌اند که تشکیل در سیتوپلاسم را امکان‌پذیر نموده‌اند. این موتاسیون‌ها ژن *trxB* کدکننده تیوردوکسین ردوکتاز را غیرفعال نموده و در پتانسیل احیا سولفیدریل سیتوپلاسم مشارکت می‌کند. تیوردوکسین به‌تنهایی برای تشکیل باند دی‌سولفیدی ضروری است. توالی دقیق این رویدادها نامشخص است اما سیتوپلاسم به احتمال حاوی پروتئین دیگری مشابه تیوردکسین بوده که می‌تواند توسط تیوردوکسین ردوکتاز احیا شود؛ در غیاب تیوردوکسین ردوکتاز، فرم اکسیده این پروتئین نامعلوم تشکیل باندهای دی‌سولفیدی را در سیتوپلاسم تسهیل می-کند. سایر محققان به‌تازگی از سویه‌های *اشریشیاکلی* حامل موتاسیون خنثی در ژن *trxB* استفاده نمودند و مقادیر قابل-توجهی از پروتئین‌های عملکردی واجد باند دی‌سولفید در سیتوپلاسم مشاهده نمودند. این سویه‌های دارای نقص در تیوردوکسین ردوکتاز ابزارهای ارزشمندی برای تولید پروتئین‌های پیچیده در *اشریشیاکلی* خواهند بود. بیان سیتوپلاسمی یک ژن بدون توالی راهنما مستلزم حضور کدون آغاز، رایج‌ترین آن کدون متیونین، است. با این‌که این آمینواسید اضافی ممکن است هیچ تأثیر نامطلوبی بر پروتئین سنتز شده نداشته باشد اما موارد ویژه‌ای دیده شده که در آن این متیونین اضافی عواقب زیادی دارد (۳). به‌عنوان مثال، حفظ متیونین آغازی در RANTES، عضوی از سایتوکاین-های خانواده کموکاین، فعالیت فیزیولوژیک این مولکول را به-طور کامل از بین برده و ویژگی‌های آنتاگونیستی قوی به RANTES متیونیلیه اعطا می‌کند. به‌طور مشابه، ریشه متیونین غیرعادی در N-ترمینال می‌تواند کنفورماسیون هموگلوبین انسانی را تغییر دهد. علاوه‌بر این، وجود آمینواسید اضافی تغییر در خصوصیت‌های ایمونولوژیک پروتئین‌های دارویی را امکان پذیر نموده و مشکلاتی در تأیید محصول برای استفاده‌های کلینیکی به‌همراه خواهد داشت.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

ترجمه در باکتری‌ها توسط N-فرمیل متیونین آغاز می‌شود که در طی سنتز دفرمیله می‌شود اما به اجبار حذف نمی‌شود. متیونین N-ترمینال ممکن است توسط متیونین آمینوپپتیداز اندوژن برش بخورد که البته این مطلب بستگی به طول زنجیره جانبی آمینواسید دوم دارد. بنابراین ریشه‌هایی با زنجیره جانبی کوچک مثل Gly، Ala، Pro، Ser، Thr، Val، Cys و با درجه کم‌تری Asn، Asp، Leu و Ile حذف متیونین را از N-ترمینال تسهیل می‌کنند. یک استراتژی موفقیت‌آمیز برای حذف ریشه متیونین بیان هم‌زمان با ژن متیونین آمینوپپتیداز *اشریشیاکلی* است. روش دیگر استفاده از دی‌پپتیدیل آمینوپپتیداز I است؛ این آنزیم دی‌پپتید را از انتهای آمینو حذف می‌کند اما نمی‌تواند باند پپتیدی حاوی ریشه پرولین را برش دهد (۳).

جدول ۲- اهمیت نسبی بخش‌های مختلف بیان ژن در *اشریشیاکلی* و استراتژی‌های برای برطرف نمودن مشکلات آزمایشگاهی محتمل

بخش موردنظر			استراتژی و راه حل
سیتوپلاسم			
مزایا	تولید انکلوژن بادی	جدا سازی آسان پروتئین در خلوص و غلظت بالا ؛ محافظت پروتئین هدف از گزند پروتئازها؛ بمناسب رای تولید پروتئین‌های فعالی که برای میزبان کشنده‌اند	
	بازده پروتئین بالاتر		
	سازه پلاسمید ساده		
معایب	تولید انکلوژن بادی	عدم حلالیت پروتئین؛ تاخوردن مجدد برای بازیابی فعالیت پروتئین؛ با تاخوردن مجدد پروتئین ممکن است فعالیت بیولوژیک آن دوباره باز نگردد. کاهش عملکرد نهایی پروتئین؛ افزایش هزینه تولید	کاهش درجه حرارت رشد پروموترهای شوک سرما (دمای پایین تر) انتخاب گونه‌های مختلف باکتری اشریشیا کلی جایگزینی اسید آمینه بیان همزمان چاپرون‌های مولکولی همیارهای الحاقی سویه‌های ناکارآمد در تیوردوکسین ردوکتاز سوربیتول و گلایسیل بتائین در محیط کشت تغییر pH ساکارز، رافینوز در محیط رشد محیط کشت رشد غنی
	کاهش مقدار محیطی تشکیل باند دی سولفید را تسهیل نمی کند		سویه های ناکارآمد در تیوردوکسین ردوکتاز
	تخلیص پیچیده تر است (از میان انواع پروتئین ها)	همیارهای الحاقی وابستگی (ممکن است نیازمند برش باشند)	
پری پلاسم			
مزایا	تخلیص پروتئین ساده تر است (انواع پروتئین ها کمترند)		
	پروسه لیز پروتئین کوتاه تر است	استفاده از گونه هایی که در بیان پروتئازها نقص دارند. استفاده از همیارهای الحاقی و دیگر روش های ذکر شده در بالا	
	تشکیل باندهای دی سولفیدی بیشتر		
معایب	سیگنال پپتید همیشه موجب تسهیل انتقال نمی شود یا موجب خروج بیش از حد پروتئین می شود	بیان همزمان سیگنال پپتیداز I بیان همزمان prlF استفاده از سوش های موتانت prlF بیان همزمان prlA4 و secE بیان pspA بیان همزمان ژن های sec پروتئین های الحاقی	
	کاهش فولدینگ	جایگزینی آمینو اسیدی بیان همزمان ایزومراز دی سولفید	
	امکان تشکیل انکلوژن بادی	بیان همزمان مولکول های چاپرونی کاهش دمای رشد افزودن ساکارز یا رافینوز به محیط کشت	
غشای داخلی			
	تاکنون برای بیان بالای پروتئین به کار نرفته است		
	ممکن است مطالعات فارماکولوژیک و فعالیت های آنزیمی را تسهیل نماید		

Dalboge و همکارانش هورمون رشد انسانی دارای N-ترمینال اضافی تولید نمودند که این دنباله توسط دی‌پپتیدیل آمینوپپتیداز I حذف و هورمون رشد اصلی حاصل گردید. این روش نیازمند دنباله‌ای در انتهای آمینی است به‌طوری‌که حاوی تعدادی ریشه اسید آمینه بوده و به‌گونه‌ای طراحی شده که برش متیونین N-ترمینال در آن امکان‌پذیر باشد. علاوه‌بر این، ریشه آمینو اسید دوم یا سوم در پروتئین هدف باید پرولین باشد. روش دیگر ایجاد انتهای آمینی صحیح برای هر

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

پروتئین است. احتمال تخریب پروتئین در سیتوپلاسم *اشریشیاکلی* به‌علت حضور تعداد پروتئازهای بیش‌تر، نسبت‌به سایر بخش‌ها بیش‌تر است. این موضوع در بخش تجزیه پروتئین مورد بررسی قرار گرفته است. مسأله دیگر در بیان سیتوزولی ژن، تخلیص پروتئین هدف از سایر پروتئین‌های درون سلولی است. بر اساس محاسبات، کروموزوم *اشریشیاکلی* ۳۰۰۰ الی ۴۰۰۰ ژن را کد می‌کند که البته تمام این ژن‌ها تحت شرایط ویژه رشد بیان نمی‌شوند (۳).

بیان پری‌پلاسمی

پس از سنتز پروتئین های *اشریشیاکلی* در سیتوپلاسم این امکان وجود دارد که محصول ژن کلون شده به سیتوپلاسم، غشاء داخلی یا خارجی، یا فضای پری‌پلاسمی برود. ترشح محصول ژن کلون شده به فضای پری‌پلاسمی اغلب باعث افزایش بیان پروتئین خارجی می‌شود که ممکن بوده توسط پروتئازها در سیتوپلاسم تجزیه گردد (۱۹). تشکیل باندهای دی سولفیدی پایدار تنها در غشاء سلول رخ می‌دهد که توسط تیول- دی سولفید اکسیدوردوکتازها که به نام پروتئین‌های Dsb شناخته می‌شوند کاتالیز می‌شود. بنابراین پروتئین‌های حاوی باند دی سولفیدی مثل قطعات آنتی‌بادی و بسیاری از هورمون‌های پپتیدی با کنفورماسیون طبیعی در پری‌پلاسم تولید می‌شوند (۲۰).

چند ویژگی کلی برای انتقال پروتئین‌های نوترکیب به پری-پلاسم وجود دارد: ۱) محیط اکسیده پری‌پلاسم، ایجاد باندهای دی‌سولفیدی را تسهیل می‌کند. ۲) پری‌پلاسم تنها حاوی ۴٪ از پروتئین‌های کل سلول است (۱۰۰ پروتئین مختلف). ۳) پری‌پلاسم حاوی پروتئاز کم‌تری از سیتوپلاسم است و تجزیه پروتئین در آنجا کم‌تر صورت می‌گیرد و از این طریق فعالیت بیولوژیکی، پایداری و حلالیت پروتئین‌های منتقل شده افزایش می‌یابد. ۴) امکان تخلیص آسان توسط شوک اسمزی وجود دارد. ۵) کاهش قابل توجه در میزان ناخالصی‌ها می‌تواند با هدف‌گیری تولید پروتئین در پری‌پلاسم میزبان حاصل شود. ۶) در پری‌پلاسم تشکیل اینکلوژن بادی به حداقل می‌رسد. ۷) انتقال به پری‌پلاسم می‌تواند فرآیندهای پایین دستی را تسهیل کند و صحت N-ترمینال پروتئین تولید شده را تأمین می‌کند (انتقال از عرض غشاء به‌طور معمول با سیگنال پپتیدهای N-ترمینال هدف گیری می‌شود) (۲, ۳, ۱۹, ۲۱-۲۳).

پروتئین‌های هترولوگ به‌منظور رسیدن به پری‌پلاسم، به توالی N- ترمینال مجهز می‌شوند که آن‌ها را به یک کانال هدایت کننده پروتئین در غشاء سیتوپلاسمی به نام Sec-translocon هدایت می‌کند. پروتئین‌ها از دو مسیر به Sec-translocon هدایت می‌شوند، مسیر post translational SecB- targeting و co- translational signal recognition particle targeting (SRP) (۲۰).

انتقال پروتئین از عرض غشای درونی به پری‌پلاسم نیازمند توالی نشانه است. انواع مختلفی از پپتیدهای نشانه جهت انتقال پروتئین به سیتوپلاسم در *اشریشیاکلی*، به‌طور موفقیت‌آمیزی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این توالی‌ها شامل انواع سیگنال‌های پروکاریوتی هستند از جمله: سیگنال *اشریشیاکلی* PhoA ، OmpA، OmpT، LamB و OmpF، بتا لاکتاماز، انتروتوکسین‌های ST-II، LT-A، LT-B، پروتئین A استافیلوکوکوس اورئوس، PelB اروینیا، توالی نشانه PelB دژنره، RNase موشی و سیگنال هورمون رشد انسانی (۳).

با این وجود، انتقال پروتئین به پری‌پلاسم پروسه‌ای پیچیده و تاحدی ناشناخته است؛ و حضور پپتید نشانه همیشه متضمن انتقال کارآمد پروتئین از عرض غشای درونی نیست. به‌عنوان مثال، با این‌که تولید باکتریایی ایمنوگلوبولین‌های انسانی به-طور کامل موفقیت‌آمیز بوده است اما تولید واریانت‌های گیرنده سلول T در پری‌پلاسم، با وجود شباهت‌های ساختاری این دو خانواده، بسیار مشکل است. بنابراین با وجود برش صحیح پپتید نشانه، هیچ پروتئین گیرنده سلول T در پری‌پلاسم مشاهده نشده است. بخش‌هایی از این گیرنده که به‌طور صحیح در پری‌پلاسم تا خوردند، با القای پاسخ شوک گرمایی در دمای پایین به همراه بیان بالای چاپرون Dsb A حاصل گردید. به‌نظر می‌رسد این روش shotgun، القای تمام انواع چاپرون‌ها، ازجمله انواع ناشناخته پری‌پلاسمی را امکان‌پذیر

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

سازد. اکنون مشخص شده است که علاوه‌بر توالی نشانه، سایر خصوصیت‌های ساختاری پروتئین‌ها در انتقال غشایی دخیلند (۳).

استراتژی‌های انتقال بهینه پروتئین‌ها به پری‌پلاسم شامل تأمین اجزای دخیل در انتقال و پردازش پروتئین است: تولید بالای سیگنال پپتیداز I، استفاده از سویه‌های موتان *prlF*، بیان هم‌زمان ژن‌های *prlA4* و *secE*، بیان ژن *prlF*، بیان ژن *pspA*، و تنظیم منفی، حذف یا عدم استفاده از ژن بتالاکتاماز برای اجتناب از احتمال بارگیری بیش از حد مکانیسم‌های انتقالی یا رقابت بر سر پردازش پپتیدهای نشانه. امکان محدودیت‌های انتقالی در مطالعه Hsiung و همکارانش مورد بررسی قرار گرفته است؛ این محققان مشاهده نمودند که پس از القاء با IPTG مقادیر فراوان پیش‌ساز هورمون رشد انسانی درون‌سلول انباشته شد، درحالی‌که افزایشی در مقدار هورمون انتقالی دیده نشد. تاکنون مکانیسم‌های انتقال پروتئین‌ها به پری‌پلاسم به‌طور کامل شناخته نشده است (۳).

ترشح خارج‌سلولی

انتقال و ترشح پروتئین نوترکیب در *اشریشیاکلی* فرآیند پیچیده‌ای است و چندین فاکتور روی موفقیت آن اثر می‌گذارد، از جمله اندازه پروتئین نوترکیب، ترکیب اسیدآمینه پپتید راهنما و هم‌چنین پروتئین هدف و مقادیر بیان (۲).

هدف‌گیری پروتئین سنتز شده جهت ترشح به محیط کشت فواید قابل توجهی دارد. متأسفانه *اشریشیاکلی* به‌طور عمومی پروتئین‌های اندکی را ترشح می‌کند و دستکاری مسیرهای انتقالی متعدد برای تسهیل ترشح پروتئین‌های خارجی امر بسیار دشواری است. درک مسیر ترشحی در *اشریشیاکلی* به‌منظور تصور مشکلات دخیل در ترشح پروتئین ضروری است (۳).

ویژگی اکثر سویه‌های *اشریشیاکلی* این است که مسیرهای سازماندهی شده برای انتقال پروتئین‌ها از غشاء خارجی را ندارند. روش‌های اصلی ترشح پروتئین در *اشریشیاکلی* قابل تقسیم به دو دسته است: (i) به‌کارگیری مسیرهای موجود برای پروتئین‌های ترشحی و (ii) استفاده از توالی‌های لیدر (راهنما یا نشانه) ، همیارهای الحاقی، پروتئین‌های نفوذپذیر کننده (Permeabilizing protein)، مواد غذایی، یا سایر عوامل تأثیرگذار بر ترشح پروتئین در نتیجه"نشت"یا نفوذپذیری انتخابی برای خروج دارند. روش اول، مسیر وابسته به ذره شناسایی سیگنال (SRP) (Signal recognition particle ((SRP)) مزیت ویژه‌ای در ترشح پروتئین مورد نظر دارد و حداقل آلودگی توسط پروتئین‌های غیر هدف را دارد. شاید بهترین مثال در این مورد ژن همولیزین باشد که برای ساخت پروتئین‌های هیبرید ترشحی مورد استفاده قرار می‌گیرد. SRP باکتری یک GTPase است که می‌تواند به توالی نشانه پروتئین‌های ترشحی خاص یا به قطعات ترنس ممبران پروتئین‌های غشاء داخلی متصل شود و سپس کمپلکس زنجیره نو پدید متصل به ریبوزوم به غشاء هدف گیری شود. روش دوم وابسته به القای نشت محدود در غشای خارجی منتج به ترشح پروتئین است. مثال‌هایی در این رابطه عبارتند از: استفاده از توالی راهنما *pelB*، توالی راهنما *ompA*، توالی راهنمای پروتئین A، بیان هم‌زمان پروتئین رهاسازی باکتریوسین، پروتئین رهاسازی باکتریوسین القاء شده با میتومایسین به همراه افزودن گلایسین به محیط کشت، و بیان هم‌زمان ژن *kil* جهت نفوذپذیر نمودن غشا. علاوه‌بر این دیده شده که بیان هم‌زمان دو فاکتور ترشحی (secY و secE)، ترشح پروتئین‌های خاصی را افزایش می‌دهد (۲۲).

پروتئین‌های الحاقی

پروتئین‌های نوترکیب هدف همیشه در حالت محلول ایجاد نمی‌شوند. برای پروتئین‌هایی با تمایل قطعات نامحلول، مهندسی متابولیک از طریق تکنولوژی پروتئین الحاقی (فیوژن پروتئین) منجر به بیان محلول می‌شود. در سال‌های اخیر افزایش قابل توجهی در مهارت و تنوع پروتئین‌های الحاقی مورد استفاده در تحقیقات بیولوژیک، مشاهده می‌شود. مزیت‌های پروتئین‌های الحاقی موارد کاربردی فراوانی را شامل می‌شود و در مطالعه‌های گسترده و جامعی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. جدول ۳ بیش‌تر پروتئین‌های الحاقی شناخته شده را نشان می‌دهد. سایر مطالعه‌های طراحی و دست‌ورزی سایت‌های برش مناسب، شرط لازم پروتئین‌های الحاقی، جهت برش آنزیمی یا شیمیایی و حذف پروتئین‌های الحاقی را مورد

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

مطالعه قرار می‌دهند. این بخش به‌طور خلاصه استفاده از سیستم‌های الحاقی که دارای اثر مستقیم بر تولید بالا و در برخی موارد، ترشح پروتئین‌های هدف هستند را مورد بررسی قرار داده است (۳).

در واقع به‌منظور تسهیل بیان، حلالیت و تخلیص پروتئین‌های نوترکیب تعداد زیادی از اجزای پروتئین الحاقی ایجاد شدند. این پروتئین‌های الحاقی یا کایمریک به‌طور معمول شامل یک جزء یا دنباله هستند که ممکن است مرتبط یا حتی نامرتبط به پروتئین‌های هدف باشند. اکثر همیارهای الحاقی برای هدف تخلیص با میل ترکیبی اختصاصی به‌کار می‌روند. این دنباله‌های الحاقی امتیازات دیگری نیز دارند: با حفاظت پروتئین از پروتئولیز داخل سلولی، حلالیت را افزایش می‌دهند یا می‌توانند به‌عنوان گزارشگرهای بیان اختصاصیGFP (پروتئین فلئورسانت سبز) به‌طور مستقل یا در ترکیب با BFP (پروتئین فلورسانت آبی) برای سنجش انتقال انرژی فلورسانت (FRET) مورد استفاده قرار گیرند. مقادیر بالای بیان اغلب از N- ترمینال یک همیار الحاقی به یک توالی بیان شونده به‌طور ضعیف انتقال پیدا می‌کند (به‌احتمال به‌علت پایدار شدن mRNA). همان‌طور که پیش‌تر بحث شد، دنباله‌های میل ترکیبی معمول، دنباله پلی‌هیستیدین (His-tag) است که سازگار با کروماتوگرافی میل ترکیبی فلزی بدون حرکت (IMAC) و دنباله گلوتاتیون S- ترانسفراز برای تخلیص از طریق رزین بر پایه گلوتاتیون است. دنباله‌های میل ترکیبی دیگر نیز وجود دارد. پروتئین‌های الحاقی متداول دیگری با در نظرگرفتن بهینه سازی بیان نوترکیب شامل پروتئین اتصال به مالتوز (MBP) و (N-utilizing NusA substance A) است که به‌طور ویژه باعث افزایش حلالیت پروتئین‌هایی می‌شوند که تمایل به تشکیل اینکلوژن بادی دارند (۲۲).

Uhlen و همکارانش همیار الحاقی چند منظوره‌ای را براساس پروتئین A استافیلوکوک یا مشتقات سنتتیک آن ایجاد نمودند. علاوه‌بر کاربرد آن به‌عنوان نشان تمایلی تخلیص، بخش پروتئین A به‌عنوان همیار محلول کننده جهت تاخوردگی بهتر پروتئین عمل می‌کند و حضور پپتید نشانه پروتئین A منجر به ترشح پروتئین به محیط کشت می‌شود.

یک همیار الحاقی دیگر مشتق از پروتئین G استافیلوکوک (SPG)، پروتئین دیواره سلولی باکتریایی، است که نواحی اتصالی مجزایی برای آلبومین، درون دُمین انتهای آمینی خود، و ایمنوگلوبولین G، درون دُمین انتهای کربوکسیل خود، دارد. دُمین اتصال به آلبومین حداقل شامل ۴۶ ریشه(Residue) مشتق از SPG بوده و به‌عنوان نشان تمایلی برای تخلیص پروتئین‌های کدشونده با cDNA استفاده می‌شود. علاوه‌بر این، ترکیب دُمین‌های SPG و پروتئین A گزینه جدیدی برای تخلیص ارائه می‌دهد و پروتئین هدف را به میزان بیش-تری از تخریب پروتئولیتیک محافظت می‌کند. کاربرد جالب و مهم دُمین اتصال به آلبومین توانایی آن در پایدار نمودن پروتئین‌های دارای عمر کوتاه در گردش پیرامونی (Peripheral circulation) پستاندارن است؛ این اثر با واسطه‌ی اتصال دُمین SPG به البومین سرم، پروتئینی با طول عمر بالا ایجاد می‌شود. مطالعه‌ها نشان می‌دهند که همیارهای الحاقی مشتق از SPG نیمه‌عمر CD4 محلول انسانی را در موش افزایش داده و حذف گیرنده مکمل نوع ۱ آن را در موش صحرائی کاهش داده است (۳).

به‌تازگی سیستم تمایلی دیگری ساخته شده است که از ۷ نشان تمایلی مختلف استفاده می‌کند. این سیستم چندجزئی امکان استفاده از شرایط مختلف، برای مراحل اتصال و هم-چنین مراحل شستشو، و ابزاری مناسب جهت تولید، شناسایی، و تخلیص پروتئین‌های نوترکیب را فراهم آورده است. اتصال تیوردوکسین به پروتئین‌های هدف حلالیت پروتئین‌های الحاقی تولیده شده در سیتوپلاسم *اشریشیاکلی* را به میزان چشم‌گیری افزایش داده و از تشکیل اجسام انکلوژنی جلوگیری می‌کند. به‌طور مشابه، هومولوگ تیوردوکسین، DsbA، به‌عنوان همیار الحاقی برای هدایت انتقال پروتئین به پری‌پلاسم مورد استفاده قرار می‌گیرد. تمامی اجزاء الحاقی به‌یک میزان در کاهش تشکیل انکلوژن بادی مؤثر نیستند. Kapust و Waugh در یک مقایسه سیستمیک اثر اجزاء الحاقی مختلف در افزایش حلالیت ۶ پلی‌پپتید مستعد ایجاد اینکلوژن بادی مورد بررسی قرار داده و دریافتند که MBP بیش‌تر از تیوردوکسین یا گلوتاتیون s- ترانسفراز حل کننده است (۱).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

جدول ۳. همیارهای الحاقی و کاربردهای آنها

همیارهای الحاقی	لیگاند/ ماتریکس	شرایط تخلیص
Flag peptide	Anti-Flag monoclonal antibodies, M1, M2	Low calcium, EDTA, glycine
His_6	Ni^{2+}-nitrilotriacetic acid	Imidazole
Glutathione-S-transferase	Glutathione-Sepharose	Reduced glutathione
Staphylococcal protein A	Immunoglobulin G-Sepharose	Low pH, IgG-affinity ligand
Streptococcal protein G	Albumin	Low pH, albumin-affinity ligand
Calmodulin	Organic ligands, peptide ligands, DEAESephadex	Low calcium
Thioredoxin	ThioBond resin	Ion exchange
b-Galactosidase Ubiquitin	$TPEG^b$-Sepharose	Borate
Chloramphenicol acetyltransferase	Chloramphenicol-Sepharose	Chloramphenicol
S-peptide (RNase A, residues 1–20)	S-protein (RNase A, residues 21–124)	Denaturing or nondenaturing conditions
Myosin heavy chain		Differential solubility in low/high salt
DsbA		
Biotin subunit (in vivo biotinylation)		
Avidin	Biotin	Denaturation (urea, heat)
Streptavidin	Biotin	Denaturation (urea, heat)
Strep-tag	Streptavidin	2-Iminobiotin, diaminobiotin
c-myc	Anti-myc antibody	
Dihydrofolate reductase	Methotrexate-agarose	Folate buffer
CKS^c		
Polyarginine	S-Sepharose	NaCl
Polycysteine	Thiopropyl-Sepharose	Dithiothreitol
Polyphenylalanine	Phenyl-Superose	Ethylene glycol
lac repressor	lac operator	Lactose analog, DNase, restriction endonuclease
T4 gp55		
Growth hormone N terminus		
Maltose-binding protein	Amylose resin	Maltose
Galactose-binding protein	Galactose-Sepharose	Galactose
Cyclomaltodextrin glucanotransferase	a-Cyclodextrin-agarose	a-Cyclodextrin
Cellulose-binding domain	Cellulose	Water
Hemolysin A, E. coli		
l cII protein		
TrpE or TrpLE		
Protein kinase site(s)		
(AlaTrpTrpPro)n		Aqueous two-phase extraction
HAId epitope		
BTag (VP7 protein region of bluetongue virus)	Anti-BTag antibodies	
Green fluorescent protein (GFP)		
Blue fluorescent protein (BFP)		

الحاق ژن‌ها به توالی یوبی‌کوئیتین بازده تولید پروتئین را از مقادیر غیرقابل شناسایی به ۲۰٪ از کل پروتئین سلول افزایش داده است. نتایج مشابهی توسط سایر محققین به‌دست آمده است. افزایش قابل توجه در بازده پروتئین ناشی از حفاظت پروتئین هدف از پروتئولیز، تاخوردگی مناسب‌تر، و ترجمه کارآمد mRNA خواهد بود. یوبی‌کوئیتین یا مسیر متابولیک یوبی‌کوئیتین در ارگانیسم‌های پروکاریوت وجود ندارد. Baker و همکارانش برای حذف یوبی‌کوئیتین از پروتئین‌های الحاقی، پروتئاز ویژه یوبی‌کوئیتین Ubp2 را هم‌زمان در *اشریشیاکلی* بیان نمودند و برش یوبی‌کوئیتین از پروتئین الحاقی را هم‌زمان با ترجمه تحریک نمودند (۳).

به‌طور معمول معایب اصلی تکنولوژی‌های پروتئین‌های الحاقی این است که اول جدا سازی پروتئین‌ها به پروتئازهای گران

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

(مثل فاکتور Xa و انتروکیناز) نیاز دارد، دوم شکست به‌ندرت کامل می‌شود و منجر به کاهش بازدهی می‌شود و سوم مراحل دیگری لازم است تا یک محصول فعال (با تاخوردگی و ایزومریزاسیون باندهای دی سولفیدی) به‌دست آید و در نهایت حلالیت تضمین نمی‌شود (۱).

چاپرون‌های مولکولی

امروزه ثابت شده است که تاخوردن مؤثر پروتئین‌ها پس از ترجمه، گردهم‌آیی پلی‌پپتیدها به‌صورت ساختارهای الیگومریک، و استقرار پروتئین‌ها به‌واسطه پروتئین‌های اختصاصی به نام چاپرون‌های مولکولی امکان پذیر است. اثبات اینکه تولید و گردهم‌آیی کارآمد ریبولوز بیس فسفات کربوکسیلاز پروکاریوتی در *اشریشیاکلی* نیازمند پروتئین‌های GroES و GroEL است، منجر به تمایل فزاینده‌ای در استفاده از چاپرون‌های مولکولی برای بیان ژن در *اشریشیاکلی* گردید. با این‌حال، نتایج تجربی حاصل از استفاده چاپرون‌ها متناقض بوده و اثرهای تولید هم‌زمان چاپرون‌ها در بیان ژن به‌ظاهر محدود به نوع پروتئین است. به‌عنوان مثال، با این‌که بیش از ۴۰۰ محقق از پلاسمیدهای GroESL استفاده نموده‌اند اما تنها نیمی از آن‌ها بهبود بیان ژن را گزارش نمودند. این مطلب با مشاهده‌های اخیر مبنی‌بر این‌که تولید هم‌زمان تیوردوکسین باعث افزایش قابل توجه در حلالیت ۸ پروتئین مهره‌داران شده، در حالی‌که تولید هم‌زمان چاپرون-های GroESL حلالیت تنها چهار مورد از این پروتئین‌ها را افزایش داده است، هم‌خوانی دارد. این‌که سطوح درون‌سلولی گونه‌های مختلف چاپرون محدود به شرایط بیان بالای ژن است، همچنان نامعلوم باقی‌مانده است. به‌عنوان مثال، Knappik و همکارانش اثر کاتالیست‌های فرآیند تاخوردگی را بر تولید قطعات آنتی‌بادی در پری‌پلاسم مورد آزمایش قرار دادند. با این‌که وجود پروتئین ایجاد کننده باند دی‌سولفیدی DsbA درون سلول به‌طور کامل ضروری است، اما بیان بیش از حد آن بازده تولید قطعه‌های آنتی‌بادی را افزایش نمی‌دهد. محققان فرضیه‌ها و تصورهای استفاده از چاپرون‌ها در بیان ژن را مورد بازبینی قرار داده و اظهارهای دقیق و مستدلی را ارائه دادند (۳).

چاپرون‌های مولکولی بر اساس مکانیسم عمل به سه کلاس تقسیم بندی می‌شوند: ۱) چاپرون‌های تاخوردن (folding chaperons): چاپرون های تا خوردن مثل DnaK و GroEL که تا خوردن مجدد یا عدم تا خوردن سوبستراهایشان را از طریق تغییر کنفورماسیون وابسته به ATP وساطت می‌کنند و از این طریق نیز از تشکیل انکلوژن بادی از طریق کاهش تجمعات جلوگیری می‌کند و پروتئولیز پروتئین‌هایی را که به اشتباه تاخورده‌اند را تحریک می‌کند. ۲) چاپرون‌های نگهدارنده (Holding chaperons): مثل IbpA و IbpB که می‌تواند مشترک با چاپرون‌های تاخوردن عمل کند و تا حدی پروتئین‌های تا خورده را روی سطحشان و تحت شرایط خاصی نگه دارد و پروتئین‌های دناتوره شده بر اثر گرما را از تجمعات برگشت ناپذیر حفاظت کند.۳) چاپرون‌های جلوگیری کننده از تجمع (chaperons Disaggregate): مثل clpB و HtpG که باعث تحریک حلالیت پروتئین‌های تجمع یافته‌ی القاء کننده استرس می‌شوند (۲۲).

به‌طور عمومی تاخوردن پروتئین در جهت ایجاد محصول نهایی پایدار به لحاظ ترمودینامیکی پیش می‌رود. پروتئین-هایی که شدید ناپایدار هستند حتی در حضور چاپرون‌ها، به-احتمال به‌طور نادرستی تا می‌خورند. بنابراین نقص پلی‌پپتید-ها، تولید دُمین‌های نشانه از کمپلکس‌های پروتئینی چند زیرواحدی، فقدان تشکیل باندهای دی‌سولفیدی که به‌طور معمول در ساختار پروتئین مشارکت دارند، یا نبود اصلاحات پس از ترجمه ازجمله قندی‌شدن، دستیابی به پایداری ترمودینامیکی را غیرممکن می‌سازند. علاوه‌بر این واضح است که انواع مختلف چاپرون‌ها به‌طور هماهنگ عمل می‌کنند. بنابراین تولید بیش از حد یک چاپرون نشانه بی‌نتیجه خواهد بود. به‌عنوان مثال، تولید بالای DnaK به‌تنهایی باعث ناپایداری پلاسمید می‌گردد که این ناپایداری با تولید هم‌زمان DnaJ کاهش می‌یابد. به‌طور مشابه بیان هم‌زمان ۳ ژن چاپرون در *اشریشیاکلی* حلالیت کینازهای متعددی را افزایش می‌دهد. در برخی موارد، ضروری است چاپرون‌های کلون‌شده از منشأ یکسان به‌عنوان پروتئین هدف به‌طور هم‌زمان بیان شوند. متغیر مورد نظر دیگر دمای رشد است. به‌عنوان مثال، بیان هم‌زمان GroES-GroEL تولید بتا گالاکتوزیداز را در

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

دمای ۳۰ درجه افزایش می‌دهد اما این اتفاق در ۳۷ یا ۴۲ درجه اتفاق نمی‌افتد؛ این درحالی است که DnaK و DnaJ در تمام دماهای تست شده مؤثر بودند. در نهایت این‌که بیان بالای چاپرون‌ها می‌تواند منجر به تغییرهای فنوتیپی ازجمله رشته‌ای شدن سلول شود و زنده ماندن سلول و تولید پروتئین را به مخاطره اندازد (۳).

در دو گزارش اخیر نشان داده شده است که بیان هم‌زمان پروتئین دی‌سولفید ایزومراز (PDI) انسان و موش صحرایی با ژن هدف، بازده پروتئین با تاخوردگی صحیح را در پری‌پلاسم *اشریشیاکلی* افزایش می‌دهد. تشکیل باند دی‌سولفیدی در پری‌پلاسم توسط گروهی از پروتئین‌ها تسهیل می‌شود که پتانسیل ردوکس صحیح را حفظ می‌کنند. تصور می‌شود که DsbA، پروتئین پری‌پلاسمی محلول، تشکیل باند دی-سولفیدی را در پروتئین‌ها به‌طور مستقیمکاتالیز می‌کند؛ در حالی‌که DsbB، پروتئین غشای داخلی، در اکسیداسیون مجدد DsbA نقش دارد. PDI یوکاریوتی قادر به کامل نمودن فنوتیپ‌های موتانت خنثی *dsbA* است، اما عملکرد آن در موتانت‌های *dsbB* کمابیش از بین رفته است. علاوه‌بر این، توانایی PDI برای افزایش بازده پروتئین‌های هدف با افزودن گلوتاتیون خارجی افزایش می‌یابد. این مشاهده‌ها پیشنهاد می‌کنند که PDI برای اکسیداسیون مجدد خود وابسته به پروتئین‌های ردوکس باکتریایی است. بیان PDI موش صحرایی جهت تقویت تاخوردگی صحیح فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی، گزارش شده است (۳).

جدول ۴. کدون‌های کم‌کاربرد در *E.coli*

Codon(s)	Amino acid
AGA, AGG, CGA, CGG.	Arg
UGU, UGC	Cys
GGA, GGG	Gly
AUA	Ile
CUA, CUC	Leu
CCC, CCU, CCA	Pro
UCA, AGU,UCG, UCC	Ser
ACA	Thr

بیان هم‌زمان ژن‌های مختلف کدکننده چاپرون و پروتئین‌های هدف نوترکیب در افزایش پروتئین بیان شده در بخش محلول مؤثر است.به‌طور مثل بیان هم‌زمان سیستم چاپرونی Dnak- Dnaj- GrpE و GroEL- GroEs همراه با فاکتور شروع کننده، حلالیت پروتئین‌های بیان شده را افزایش می‌دهد. سیستم‌های چاپرونی، تعاونی هستند و بهترین استراتژی شامل بیان هم‌زمان ترکیب‌های چاپرون‌های متعلق‌به GroEL , Dnak, ClpB و خانواده چاپرون‌های شروع کننده همراه با ریبوزوم است (۲۴).

تاخوردگی نادرست پروتئین به غلظت‌های درون‌سلولی واسطه‌های مستعد تجمع (Aggregation-prone) نسبت داده می‌شود. بنابراین، با این‌که موضوع این مقاله حداکثر نمودن سنتز پروتئین است اما کاهش سرعت سنتز پروتئین بایستی تاخوردگی نامناسب پروتئین را رد کند. در واقع، استفاده از پروموترهای ضعیف‌تر یا شرایط القای جزئی پروموترهای قوی‌تر می‌تواند منجر به تولید مقادیر بیش‌تر پروتئین محلول شود. Kadokura و همکارانش ثابت نمودند توانایی موتانت‌های *اشریشیاکلی* برای ترشح مقادیر فراوان آلکالین فسفاتاز به پری‌پلاسم به‌علت سرعت پایین‌تر سنتز محصول ژن *phoA* است (۳).

انطباق کدون‌های ترجمه (Codon Usage)

انطباق کدون‌های ترجمه، عدم استفاده ژن‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی از کدون‌های هم‌معنی به میزان یکسان است. یکی از مشکل‌ها در کلون کردن و بیان هترولوگ ژن‌ها، موضوع انطباق کدون‌های ترجمه است، زیرا به‌طور معمول موجب عدم

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

بیان مناسب ژن‌های مربوط به یک ارگانیسم در ارگانیسم دیگر می‌شود. علت این امر تفاوت در الگوی کدون‌های پرکاربرد یا کدون‌های دارای tRNAهای فراوان در ارگانیسم‌های متفاوت است. برای جلوگیری از این مشکل، یا با توالی ژن مورد نظر را با الگوی کاربرد کدون میزبان تغییر داده و ژن به‌صورت سنتتیک تولید می‌شود یا از سویه‌های دست‌ورزی شده‌ای استفاده می‌گردد که به‌خوبی توانایی ترجمه همه کدون‌ها را دارند. در برخی ارگانیسم‌ها مشخص شده است که مقدار بعضی از گونه‌های tRNA در سلول کم (tRNA نادر) است که از قضا مسئول شناسایی کدون‌های مختلفی (کدون‌های دژنره (Degenerated Codon)) هستند. لذا ژنی که بیش‌تر کدون‌های آن نیازمند مولکول‌های tRNA نادر هستند، دچار تأخیر در ترجمه شده و در میزان فراورده نهایی آن مؤثر خواهد بود(۲۵).

آنالیز سیستماتیک الگوی انطباق کدون‌های ترجمه در *اشریشیاکلی* مشاهده‌های زیر را در پی داشته‌اند (۱). کمابیش برای تمام خانواده‌های کدون‌های دژنره گرایش کدونی (codon bias) نسبت‌به یک یا دو کدون خاص وجود دارد. (۲) کدون‌های ویژه‌ای بارها توسط ژن‌های مختلف، صرف‌نظر از فراوانی پروتئین مربوطه، مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ به‌عنوان مثال، CCG کدون ترجیحی برای پرولین است (۳). ژن‌های دارای بیان بالا نسبت‌به ژن‌هایی که در سطوح پایین یا متوسط بیان می‌شوند، گرایش کدونی بیش‌تری از خود نشان می‌دهند. لذا انطباق کدون‌های ترجمه در ژن‌های دارای بیان بالا، اهمیت بیش‌تری دارد. (۴) فرکانس استفاده از کدون‌های هم‌معنی به‌طور معمول بیانگر فراوانی tRNA هم‌جنس آن‌هاست. این مشاهده‌ها اشاره بر این دارد که ژن‌های هترولوگ غنی از کدون‌هایی که به‌ندرت توسط *اشریشیاکلی* مورد استفاده قرار می‌گیرند، ممکن است در *اشریشیاکلی* به‌نحو م مکرراً ثری بیان نشوند (۳).

$tRNA^{Arg\ (AGG/AGA)}$ فرعی آرژینین به‌عنوان فاکتور محدود‌کننده در بیان باکتریایی بسیاری از ژن‌های پستانداران شناخته شده است، زیرا کدون‌های AGA و AGG به‌ندرت توسط *اشریشیاکلی* استفاده می‌شوند. این معضل با موتاسیون هدایت شده و جایگزینی کدون‌های کمیاب آرژنین با کدون ترجیحی(CGC) آن در *اشریشیاکلی* قابل حل است (۲۵). بیان هم‌زمان ژن *argU* (*dnaY*) کدکننده $tRNA^{Arg}_{(AGG/AGA)}$ منجر به تولید فراوان پروتئین هدف می‌شود. هنگامی‌که کدون‌های AGG قبل از کدون دهم از کدون آغازی ژن *lacZ* جای داده می‌شوند، تولید بتاگالاکتوزیداز کاهش می‌یابد. به‌طور مشابه، Goldman و همکارانش گزارش نمودند که وقتی کدون‌های با کاربرد اندک به‌طور متوالی در نزدیکی انتهای '5 mRNA قرار گیرند، ممانعت ترجمه mRNAی مورد آزمایش در لوسین و هم‌چنین آرژینین بسیار قوی‌تر خواهد بود. Ivanov و همکارانش گزارش نمودند که تکرار پشت سرهم کدون AGG منجر به ممانعت اساسی در بیان ژن، مستقل از محل استقرار آن‌ها در mRNA، می‌شود. این محققان تأثیر بازدارندگی را به رقابت کدون‌های AGGAGG پشت‌سرهم با توالی SD طبیعی نسبت می‌دهند. بیان ژن ICP4 هرپس سیمپلکس ویروس به‌علت وجود قطعه پیوسته از کمابیش ۱۹ ریشه سرین بی‌تأثیر است. بهبودی در کارایی سنتز ICP4 به کمک موتاسیون خاموش در منطقه غنی از سرین، مکمل‌سازی محیط کشت با سرین، بیان بالای سریل-tRNA سنتتاز، یا بیان $tRNA^{Ser5}$، مشاهده نشد. سطح بیان ژن به‌نسبت معکوس متناسب با تعداد کدون‌های سرین در این منطقه است. با این‌که این مورد به‌طور مسلم یک مورد افراطی است اما بر اثرهای معکوس قطعه‌های بلند با کدون‌های مشابه بر کارایی ترجمه دلالت دارد. از طرفی محققان دیگر بیان کارآمد ژن‌هایی را گزارش نموده‌اند که حاوی کدون‌های کم کاربرد هستند. در مورد ژن $V^{\beta}5.3$ گیرنده سلول T انسانی که ۴٪ آن کدون‌های AGA/AGG است، افزایش منبع درون‌سلولی $tRNA^{Arg\ (AGG/AGA)}$ منجر به افزایش قابل توجه مقادیر $V^{\beta}5.3$ شناسایی‌شده در سلول نمی‌شود (۳). لذا برای حل مشکل کاربرد و ترجیح کدونی دو استراتژی قابل استفاده است: ۱) بهینه‌سازی کدون(codon optimization)توالی‌های کدکننده خارجی و ۲) افزایش و در دسترس قرار دادن tRNAهای کمیاب در میزبان اصلاح شده است (۲۶). منطق پشت بهینه‌سازی انطباق کدون‌های ترجمه، تغییر کدون نادر در ژن هدف، به کدون رایج میزبان است. به‌طوری‌که توالی اسیدآمینه پروتئین کدشده در این

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

روند نباید تغییر کند (۲۸, ۲۷). این امر با جهش‌زایی هدایت شده خاموش(site-directed silent mutagenesis) و یا سنتز کل ژن یا بخش‌هایی از آن میسر می‌گردد. بهینه‌سازی کدون توسط جهش‌زایی هدایت شده خاموش یک فرآیند سخت و گران است، بنابراین زمانی‌که پروتئین‌های نوترکیب زیادی مورد نیاز است مفید خواهد بود. از سوی دیگر، طراحی و سنتز ژن مستلزم انتخاب بهترین توالی از تعداد زیادی از ترکیب‌های ممکن است. ساده‌ترین روش، یک استراتژی به نام "یک آمینو اسید، یک کدون" است، که جایگزینی تمام کدون‌های یک اسیدآمینه داده شده با فراوان‌ترین کدون در ژن هدف میزبان است. الگوریتم‌های پیشرفته‌تر، که پارامترهای دیگری مانند بهینه‌سازی زمینه کدون (codon context) و هماهنگی کدونی (codon harmonization)، مطرح شده‌اند (۲۹) که بعضی از آن‌ها به‌صورت وب سرور و یا نرم‌افزار مستقل دردسترس هستند (۱). از طرفی، برای تولید و بیان بالای پروتئین نوترکیب هترولوگ در سلول‌ها، در دسترس بودن tRNA شارژ شده کدون نادر عامل عمده تعیین‌کننده سطح پروتئین تولید شده‌است (۳۰). کاهش tRNAهای با فراوانی کم باعث به تأخیر انداختن ریبوزوم و متعاقب آن جدا شدن از رشته RNA و در نتیجه، عدم تولید یک محصول کامل می‌گردد (۳۱). برای حل این معضل، چندین سویه حامل پلاسمید حاوی نسخه‌های اضافی ژن tRNAهای نادر می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.

تخریب پروتئین

پروتئولیز پروسه‌ای انتخابی و بسیار تنظیم‌شده است که نقش مهمی در فیزیولوژی سلول دارد. *اشریشیاکلی* حاوی تعداد زیادی پروتئاز است که در سیتوپلاسم، پری‌پلاسم و غشاهای داخلی و خارجی استقرار یافته‌اند. این آنزیم‌های پروتئولیتیک در بسیاری از فعالیت‌های متابولیک، ازجمله حذف انتخابی پروتئین‌های غیرعادی، مشارکت دارند. آسیب یا تغییر پروتئین ممکن است ناشی از شرایط مختلفی باشد ازجمله پلی-پپتیدهای ناقص، موتاسیون‌های ناشی از جانشینی آمینواسید، سنتز بیش از حد زیرواحدها در کمپلکس‌های مولتی‌مری، آسیب پس از ترجمه به‌واسطه اکسیداسیون یا حمله رادیکال-های آزاد، و مهندسی ژنتیک. چنین پروتئین‌های نابهنجاری توسط ماشین پروتئولیتیک باکتریایی حذف می‌شوند. تاکنون، مکانیسم تخریب پروتئین به‌طور کامل شناخته نشده است و تمام مسیرها یا آنزیم‌های پروتئولیتیک عملگر در *اشریشیاکلی* شناخته نشده‌اند. به‌عنوان مثال، پروتئاز جدیدی در ارتباط با غشای خارجی به‌تازگی شناخته شده است و مکانیسم جدیدی برای تخریب پروتئین‌های غیرعادی در *اشریشیاکلی* آشکار شده است. توجه علمی به این حیطه ابزارها و استراتژی‌های جدیدی برای به حداقل رساندن تخریب پروتئین‌های هترولوگ در *اشریشیاکلی* ایجاد نموده است (۳).

با این‌که ویژگی‌های ساختاری دقیقی که تغییرپذیری پروتئین‌ها را سبب می‌شود شناخته نشده‌اند، اما یک سری از شاخص‌های ناپایداری پروتئین روشن شده‌اند. در مجموعه‌ای از مطالعه‌های سیستماتیک، Varshavsky و همکارانش قانون انتهای N را تنظیم نمودند که پایداری متابولیک یک پروتئین را به ریشه‌های انتهای آمینو مرتبط می‌داند. بنابراین، در *E.coli*، Arg، Lys، Leu، Phe، Tyr و Trp انتهای آمینو نیمه عمر دو دقیقه‌ای به پروتئین مورد نظر اعطا می‌کنند، در حالی‌که سایر اسیدهای آمینه به جز پرولین نیمه‌عمری بیش از ده ساعت به همان پروتئین ارائه می‌دهند. آمینواسیدهای با زنجیره جانبی کوچک در جایگاه دوم پلی‌پپتید کاتالیز متیونین انتهای آمینو توسط متیونین آمینوپپتیداز را تسهیل می‌کنند. بنابراین، مطالعه‌ها پیشنهاد می‌کنند که به‌احتمال Leu در موقعیت دوم با حذف ریشه متیونین در معرض قرار گرفته و منجر به ناپایداری پروتئین می‌شود. شاخص دوم ناپایداری پروتئین ریشه لیزین داخلی ویژه‌ای است که نزدیک انتهای آمینو قرار گرفته است. این ریشه پذیرنده زنجیره مولتی یوبی‌کوئیتین است که تخریب پروتئین را توسط پروتئاز وابسته‌به یوبی‌کوئیتین در یوکاریوت‌ها تسهیل می‌کند. نکته جالب توجه این است که در یک پروتئین چند زیرواحدی، این دو شاخص می‌توانند در زیرواحدهای مختلفی قرار گرفته و هم‌چنان پروتئین را برای پردازش مورد هدف قرار بدهند (۳).
ارتباط دیگر بین محتوای آمینواسیدی و ناپایداری پروتئین در فرضیه PEST مطرح شده است. براساس آنالیزهای آماری پروتئین‌های یوکاریوتی که دارای عمر کوتاهی هستند، تصور

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

می‌شود پروتئین‌ها توسط مناطق غنی از Pro، Glu، Ser و Thr احاطه شده توسط ریشه‌های آمینواسید خاصی ناپایدار می‌شوند. فسفریلاسیون دُمین‌های PEST منجر به افزایش اتصال کلسیم شده و تخریب پروتئین توسط پروتئازهای وابسته به کلسیم را تسهیل می‌کند. پیشنهاد شده است که پروتئین‌های غنی از PEST به‌نحو کارآمدی در *اشریشیاکلی* تولید می‌شوند، زیرا به‌ظاهر فاقد سیستم پروتئولیتیک PEST است (۳).

استراتژی‌های به حداقل رساندن پروتئولیز پروتئین‌های نوترکیب در *اشریشیاکلی* در جدول۲ خلاصه شده است. این استراتژی‌ها عبارتند از: هدف‌گیری پروتئین به پری‌پلاسم یا محیط کشت، استفاده از سویه‌های میزبان دارای نقص در پروتئازها، رشد سلول‌های میزبان در دمای پایین، ساخت پروتئین‌های الحاقی انتهای آمینو یا کربوکسیل، الحاق پشت سرهم چندین کپی از ژن هدف، بیان همزمان چاپرون‌های مولکولی، بیان همزمان ژن *pin* T4، حذف سایت‌های برش پروتئازی با جایگزینی برخی آمینواسیدها، بهینه‌سازی شرایط تخمیر و تغییر هیدروفوبیسیته پروتئین هدف (۳).

با اینکه روش‌های مختلف برای پایداری پروتئین مؤید ابتکار محققان است، اما سودمندی برخی از روش‌های فوق بسته به نوع استفاده پروتئین نوترکیب دارای محدودیت است. بنابراین، به‌عنوان مثال، حضور بخش الحاقی در پروتئین هدف ممکن است با خصوصیت‌های ساختاری و عملکردی یا کاربردهای درمانی محصول تداخل داشته باشد. دست‌ورزی شیمیایی یا آنزیمی سایت‌های برش برای حذف بعدی همیارهای الحاقی، پروسه پیچیده‌ای است که ملاحظات فراوانی را به همراه دارد: در دسترس بودن سایت‌های برش برای هضم آنزیمی؛ خلوص، ویژگی، و هزینه آنزیم‌های تجاری موجود؛ صحت انتهای آمینو یا کربوکسی برپایه هضم آنزیمی؛ تغییرهای محتمل در پروتئین هدف بر اساس تیمار شیمیایی، و از قبیل آن. برای تولید پروتئین‌های الحاقی در مقیاس بالا، برخی از این مشکلات چند برابر می‌شوند. الحاق کپی‌های چندتایی ژن هدف برای ساخت پلی‌پپتیدی با چند دُمین، مستلزم تبدیل متعاقب آن به واحدهای پروتئینی منومری توسط برش با سیانوژن بروماید است. در این مورد، پروتئین هدف نباید حاوی ریشه‌های متیونین داخلی باشد و از طرفی بایستی قادر به مقاومت در برابر شرایط سخت واکنش باشد. علاوه‌براین تغییرهای محدودی در زنجیره جانبی اسیدهای آمینه ممکن است رخ دهد و سمیت سیانوژن بروماید مسأله مهمی در واکنش‌های برش در مقیاس بالا پدید می‌آورد. به‌طور مشابه، تغییرهای منطقی توالی یک پروتئین مستلزم اطلاعات ساختاری زیادی است که ممکن است این اطلاعات در دسترس نباشند. چاپرون‌های مولکولی به‌طور موفقیت‌آمیزی جهت پایداری پروتئین‌های ویژه‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند اما قطعیت این روش هنوز تأیید نشده است (۳).

سیتوپلاسم *اشریشیاکلی* نسبت‌به پری‌پلاسم حاوی پروتئازهای بیش‌تری است. بنابراین، احتمال تخریب پروتئین‌های تجمع-یافته در پری‌پلاسم کم‌تر است. به‌عنوان مثال پروانسولین تجمع یافته در پری‌پلاسم ده برابر پایدار از نوع تولید شده در سیتوپلاسم است. با این‌حال، فعالیت پروتئولیتیک در پری-پلاسم قابل توجه است. ترشح به محیط کشت روش جایگزین بهتری برای پایداری پروتئین است. متأسفانه تکنولوژی ترشح پروتئین از *اشریشیاکلی* به محیط کشت هنوز در مراحل ابتدایی خود به‌سر می‌برد. کاتالیزور اصلی تخریب پروتئین در باکتری‌ها القای پروتئین‌های شوک گرمایی در پاسخ به شرایط مختلف استرس، از جمله القای دمایی بیان ژن یا تجمع پروتئین‌های خارجی غیرعادی در سیتوپلاسم، است. در چنین شرایطی تولید محصول ژن *lon*، پروتئاز La، و سایر پروتئازها تقویت می‌شود. این مشکل با استفاده از سویه‌های میزبان دارای نقص در جایگاه *rpoH* (*htpR*) به حداقل رسید. ژن *rpoH* زیرواحد σ^{32} RNA پلی‌مراز را کد می‌کند، که فعالیت‌های پروتئولیتیک مختلفی را در *اشریشیاکلی* تنظیم می‌کند. میزبان‌های حامل موتاسیون *rpoH* ثبت شده‌اند و تولید پروتئین‌های خارجی را در *اشریشیاکلی* به میزان قابل توجهی افزایش داده‌اند. سویه SG21173 که در پروتئاز La و Clp و جایگاه *rpoH* دارای نقص است، در تولید پروتئین بسیار کارآمد است. میزبان‌های زیادی وجود دارند که دارای نقص در پروتئازها هستند، از جمله انواعی که به لحاظ تمام جایگاه‌های پروتئازهای شناخته‌شده دارای نقص هستند و این

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

مسأله بر پایداری پروتئین ترشحی تأثیرگذار است. پروتئولیز ممکن است بیش از آن‌که علتی برای مشکل تاخوردگی باشد، یک اثر باشد، که به‌عنوان سیستم دفع مواد تجمع یافته و غلط تاخورده عمل می‌کند. بنابراین، عدم وجود پروتئازها احتمال افزایش سمیت را در میزبان به‌عنوان نتیجه انباشت پروتئین-های غیرعادی، به همراه خواهد داشت (۳).

فولدینگ پروتئین و تخریب پروتئولیتیک به‌طور عمیقی در ارتباط با کاتابولیسم بوده و با بازیافت فولدینگ نادرست یا پروتئین آسیب دیده در حفظ منابع سلولی مؤثر است. در سیتوپلاسم باکتری *اشریشیاکلی*، بیش‌تر (البته نه همه) مراحل تخریب اولیه توسط پنج Hsp وابسته‌به ATP انجام می‌شود: Lon/La، FtsH / HflB، ClpAP، ClpXP و ClpYQ / HslUV. هر پروتئین هترولوگ غنی از اسیدآمینه‌های غیرقطبی در پایانه کربوکسیل، سوبسترا مناسبی برای پروتئازهای سلولی خواهد بود (۳۲). یک استراتژی ممکن برای جلوگیری از تخریب پروتئین این است که از گونه‌های میزبان دارای جهش در ژن پروتئاز استفاده شود. با این حال، اشکالاتی در این روش وجود دارد. به‌عنوان مثال، غیرفعال شدن Lon منجر به رشته‌ای شدن پروتئین می‌شود و FtsH یک پروتئین ضروری برای جهش‌های حساس به حرارت است. علاوه‌بر این، چندین پروتئاز وجود دارند که به‌طور معمول در تخریب یک پروتئین خاص نقش دارند، اما جهش در ژن‌های کدکننده پروتئازها، نرخ رشد سلول را کاهش خواهد داد. یک استراتژی دیگر این است که پلی پپتید مورد نظر به‌صورت نامحلول در سلول تولید شود، زیرا پروتئین‌های انکلوزیونی از تخریب محافظت می‌شوند. برای یک پروتئین معمول و محلول، این را می‌توان با استفاده از سویه‌های جهش‌یافته در سیستم‌های چاپرونی مولکولی اصلی به‌دست آورد (۳۳،۳۴). با این حال، لازم به ذکر است که پروتئازهای خاصی (مانند OmpT) به سطح اجسام انکلوزیون جذب شده و ممکن است پروتئین را در حین فرآیند فولدینگ مجدد تخریب نمایند (۳۲, ۱). پروتئاز غشای داخلی، FtsH، نیز تحت شرایط دناتوره فعال شده و می‌تواند پروتئین‌های نوترکیب مرتبط با غشاء داخلی را در حین فولدینگ مجدد پردازش کند (۳۵).

شرایط تخمیر

تولید پروتئین در *اشریشیاکلی* با استفاده از سیستم‌های کشت با چگالی سلولی بالا به میزان زیادی قابل افزایش است. این سیستم‌ها در سه گروه batch، fed batch و continuous تقسیم‌بندی می‌شوند. در این روش‌ها به غلظت‌های سلولی بیش‌از g/L ۱۰۰ می‌توان دست پیدا نمود و تولید مقرون به-صرفه پروتئین نوترکیب امکان‌پذیر است (۳۶). مقالات مروری در مورد سیستم های تخمیر در مقیاس بالا منتشر شده است. ترکیب محیط کشت رشد سلول بایستی به‌طور دقیقی طراحی و کنترل شود زیرا ممکن است اثرهای متابولیک مهمی بر تولید پروتئین داشته باشد. به‌عنوان مثال، ترجمه mRNAهای مختلف علاوه‌بر تغییرهایی در محیط کشت، توسط دما نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد. ترکیب مواد غذایی و متغیرهای تخمیر از جمله دما، pH، و سایر پارامترها می‌توانند بر فعالیت پروتئولیتیک، ترشح، و میزان تولید تأثیر بگذارند. دستکاری‌های ویژه‌ای در محیط کشت انجام شده است که آزادسازی پروتئین به محیط کشت را تقویت نموده است. افزودن گلایسین به محیط رشد آزادسازی پروتئین‌های پری-پلاسمی به محیط کشت را، بدون لیز سلولی قابل‌توجهی، تقویت نموده است. به‌طور مشابه، رشد سلول‌ها تحت استرس اسمزی در حضور سوربیتول و گلایسیل بتائین بیش از ۴۰۰ برابر افزایش در تولید پروتئین فعال و محلول ایجاد نموده است (۳۷).

سیستم‌های کشت با چگالی سلولی بالا دارای معایبی هستند از جمله: دسترسی محدود به اکسیژن محلول در چگالی سلولی بالا، مقادیر دی‌اکسید کربن که می‌تواند نرخ رشد را کاهش و تشکیل استات را افزایش دهد، کاهش در کارایی اختلاط فرمانتور، و تولید گرما. تکنیک‌هایی برای به حداقل رساندن این معایب به‌طور جزئی مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. ساده‌ترین راه برای افزایش مقدار اکسیژن موجود در ظروف کشت، افزایش سرعت لرزش (shaking) (۳۵۰–۴۰۰ rpm) ، تا حدی که تولید کف نکند، است. البته در صورت کف کردن، افزودن یک ماده ضدکف (antifoaming) توصیه می‌شود، هرچند ضدکف‌ها بر میزان رشد برخی ارگانیسم‌ها و تولید

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

پروتئین نوترکیب تأثیر دارند (۳۸ ،۱). هم‌چنین، هوادهی مناسب بستگی‌به نسبت حجم به ظرفیت ظرف محیط کشت دارد. به‌عنوان یک قاعده کلی، حجم محیط کشت باید کم‌تر یا برابر ۱۰٪ ظرفیت ظرف باشد (۱). چالش اصلی در تولید پروتئین نوترکیب با این سیستم انباشته‌شدن استات است که عاملی لیپوفیلیک بوده و برای رشد سلول مضر است. استراتژی‌های متعددی برای کاهش تولید استات ابداع شده‌اند اما دارای معایب متعددی هستند. این مشکل به‌تازگی از طریق مهندسی متابولیک در *اشریشیاکلی* برطرف شده است. ژن *alsS* باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* کدکننده آنزیم استولاکتات سنتاز در سلول‌های *اشریشیاکلی* کلون شده است. این آنزیم تولید پیروات به محصولی غیرسمی و غیر اسیدی را کاتالیز می‌کند. کاهش در انباشت استات پیشرفت مهمی در تولید پروتئین نوترکیب ایجاد نمود. سویه‌های موتان *اشریشیاکلی* که در سایر آنزیم‌ها دارای نقص هستند نیز ایجاد شده‌اند و استات کم‌تری و مقادیر بیش‌تر پروتئین‌های نوترکیب انسانی را تولید نموده‌اند (۳۷).

دو پارامتری که در فرآیند تولید پروتئین نوترکیب به‌ندرت مورد بحث قرار گرفته‌اند، کشت آغازگر (starting culture) و زمان القاء کشت است. اکثر پروتکل‌ها کاربرد پیش کشت یک شبه اشباع شده با فاکتور رقت ۱/۱۰۰ در محیط کشت بزرگ‌تر را پیشنهاد نموده‌اند. البته ممکن است سلول‌های محیط آغازگر در وضعیت متابولیک یکسان نباشند که پس از رقت در محیط‌های تازه، ممکن است در نقاط غیرقابل القاء باشند. پیش کشت مناسب با سلول‌ها در مرحله رشد فعال یکسان را می‌توان با رشد آغازگر یک شب در ۲۰-۲۵ درجه یا با استفاده از یک سیستم آهسته رهش گلوکز تهیه نمود. پس از تلقیح و رشد بیش‌تر، زمان القاء است که اغلب در اواسط فاز لگاریتمی که سلول‌ها به‌سرعت در حال رشدند و ترجمه پروتئین حداکثر است، صورت می‌گیرد (۳۹، ۱). در محیط‌های القایی اتوماتیک (auto induction media)، مخلوطی از گلوکز، لاکتوز، و گلیسرول در یک ترکیب بهینه‌سازی شده استفاده می‌شود. گلوکز منبع ترجیحی کربن در طول دوره رشد است، که معمولاً در اواسط تا اواخر فاز لگاریتمی متابولیزه می‌شود و تا تخلیه کامل گلوکز جذب لاکتوز صورت نمی‌گیرد (۱،۴۰).

سیستم بدون سلول

سنتز پروتئین بدون سلول (Cell-Free Protein Synthesis) (CFPS) رونویسی و ترجمه در شرایط آزمایشگاهی، سیستمی بسیار مقتدر و مطلوب برای تولید سریع و انبوه یک پروتئین هدف است. سیستم بدون سلول علاوه‌بر سادگی، دارای پتانسیل مهندسی بیش‌تر و انعطاف‌پذیری است. عصاره‌های سلولی، طیف وسیعی از اجزا مانند اسیدهای آمینه جدید، نوکلئوتیدهای سنتتیک، کوفاکتورها و پروتئین‌های توکسیک برای سلول‌های زنده، می‌تواند در یک سیستم CFPS گنجانده شود (۴۱).

CFPS دارای مزایای بسیاری نسبت به روش‌های سلولی سنتز پروتئین است. به‌ویژه، یک واکنش فاقد سلول، با احتساب آماده‌سازی عصاره به‌طور معمول یک تا دو روز طول می‌کشد، در حالی‌که بیان پروتئین در سلول، ممکن است یک تا دو هفته طول بکشد (۴۲). CFPS یک واکنش باز است. عدم وجود دیواره سلولی اجازه می‌دهد تا دستکاری مستقیم محیط شیمیایی میسر باشد. نمونه به‌راحتی گرفته می‌شود، بهینه-سازی غلظت، و نظارت واکنش به‌سادگی قابل اجراست. از آنجا که در سیستم CFPS سلول زنده استفاده نمی‌شود، سمیت پروتئین تولید شده مشکلی ایجاد نخواهد کرد. در CFPS اسیدهای آمینه غیر طبیعی در ساختارهای پروتئینی به‌کار می‌روند، که باز بودن واکنش برای افزودن tRNAهای اصلاح شده و اسیدهای آمینه غیر طبیعی مورد نیاز مناسب است (۴۳). با این که سیستم CFPS ابزار ارزشمندی برای محققان است، ذخیره‌سازی عصاره سلولی فضاهای بسیار زیادی را در فریزر اشغال می‌کند. دانشمندان برای حل این معضل، لیوفیلیزه کردن عصاره به پودر را پیشنهاد نموده‌اند. این پودر لیوفلیزه شده علاوه‌بر اشغال فضای کم، می‌تواند برای مدت طولانی در دمای اتاق ذخیره شود (۴۴).

اساس سنتز پروتئین فاقد سلول (CFPS)، تولید یک پروتئین کاربردی در لوله آزمایش به‌جای سلول است. تهیه یک کیت CFPS مستلزم جداسازی سیتوپلاسم از دیواره سلولی انواع

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

مختلفی از سلول (باکتری‌ها، تک‌یاخته‌ها، گیاهان، حشرات و پستانداران) است. لیزات سلولی محیطی مملو از مولکول‌های زیستی فعال است که بسیاری از عملکردهای سلولی (شامل مسیرهای متابولیک، و هم‌چنین رونویسی و ترجمه) را انجام می‌دهند. تهیه لیزات برای CFPS به‌طور قابل توجهی از نظر ترکیب بافری، نوع انرژی، به‌کارگیری گونه‌های سلولی مختلف جهش یافته، مولکول‌های کوچک مکمل و افزودن پروتئین‌هایی مانند پلی‌مرازها بهبود یافته است (۴۵). دو نوع اساسی CFPS وجود دارد؛ یکی عصاره سلولی بهینه‌سازی شده (optimized cell extracts) (اغلب CFPS مبتنی‌بر عصاره (Lysate-based CFPS) نیز نامیده می‌شود)، رویکردی که بیش از ۵ دهه در حال استفاده بوده است، و دیگری سیستم خالص (PURE system) که به‌تازگی توسعه یافته و مخلوطی از مجموعه‌ای حداقل از اجزای بهینه‌سازی شده (مانند ریبوزوم، tRNAها، tRNA سینتتازها، فاکتورها، اسیدهای آمینه و منابع انرژی) موردنیاز برای سنتز پروتئین است (۴۵).

۱) CFPS مبتنی بر عصاره

عصاره سلولی بهینه‌سازی شده است که در برخی از کیت‌های CFPS تجاری پروکاریوتی و یوکاریوتی ، mRNA رونویسی شده و پروتئین ترجمه شده با هم تولید می‌گردد. افزودن یک DNA کدکننده پروتئین موردنظر همراه با یک پلی‌مراز موجب تولید سریع‌تر رونوشت‌های mRNA می‌شود، به این ترتیب بیان پروتئین با افزایش تولید mRNA محدود نمی‌شود. لذا در این CFPSها بیان پروتئین در بازده بالاتر صورت می‌گیرد، و مرحله رونویسی حذف می‌شود.

۲) CFPS خالص

مخلوطی از مجموعه سنتتیک اجزای حاوی حداقل بهینه‌سازی شده و ضروری برای سنتز پروتئین، مانند ریبوزوم، tRNAها، tRNA سینتتازها، فاکتورها، اسیدهای آمینه و منابع انرژی (ATP) است. CFPS خالص مزایای متعددی نسبت‌به CFPS مبتنی‌بر عصاره دارد. این سیستم فاقد هرگونه مولکول زیستی و متابولیت‌هایی است که به‌طور مستقیم در سنتز پروتئین‌ها شرکت نمی‌کنند. به‌طور مثال، فاقد نوکلئازها و پروتئازها است که باعث کاهش طول عمر DNA، mRNA و پروتئین‌ها می‌گردد و نیز آنزیم‌های متابولیک که می‌تواند برخی نوکلئوتیدها و آمینو اسیدهای ضروری برای رونویسی و ترجمه را به محصولات غیرکاربردی تبدیل کنند، در این سیستم حضور ندارند. علاوه‌بر این، امکان حذف ساده اجزای خاصی از ماشین ترجمه و یا جایگزینی اگزوژن اجزای درونی وجود دارد. اشکال اصلی CFPS خالص این است که هزینه هر میلی‌گرم پروتئین تولید شده، به‌طور قابل توجهی بالاتر از میزان معادل تولید شده در CFPS مبتنی‌بر عصاره است (۴۵).

نتیجه‌گیری و مسیرهای آینده

چالش‌های آینده در استفاده از *اشریشیاکلی* برای بیان ژن، شامل فاکتورهای زیر می‌شود: اولین فاکتور دستیابی به بازده تقویت شده از پروتئین‌های صحیح تاخورده با دستکاری ماشین چاپرون‌های مولکولی سلول. این عمل شاید با بیان هم‌زمان ژن‌های کدکننده چندین چاپرون یا توسط روش‌هایی که تعداد زیادی از مولکول‌های چاپرون درون سلول را فعال می‌کنند، امکان‌پذیر باشد. دومین فاکتور، محقق نمودن مکانیسم ترشحی قوی و درستی برای رهاسازی پروتئین به محیط کشت است. سیستم‌های متعددی وجود دارند که ترشح پروتئین‌های نوترکیب به محیط کشت را تسهیل می‌کنند. برخی از این سیستم‌ها برپایه استفاده از پپتیدهای نشانه، همیارهای الحاقی، و عوامل نفوذپذیرکننده‌ای هستند که باعث قطع و نشت محدود غشای خارجی می‌شود. سایر سیستم‌ها منحصر به استفاده از مسیرهای ترشحی موجود است که اختصاصیت بیش‌تری را برای ترشح نوید می‌دهد. تحقیقات در این زمینه مستلزم درک گسترده‌ای از مسیرهای مختلف ترشح در *اشریشیاکلی* است. سومین فاکتور اعطای توانایی برخی اصلاحات پس از ترجمه به سلول‌های پروکاریوت، از جمله قندی شدن است. این عملکرد نیز با مهندسی آنزیم‌های گلیکوزیلاسیون یوکاریوتی درون کروموزوم *اشریشیاکلی* قابل انجام است (۳). در جمع‌بندی نتایج، در فرآیند تولید پروتئین نوترکیب، باید تلفیقی از کلیه استراتژی‌های ذکر شده و به روز رسانی شده به‌کار گرفته شود تا تولیدی بیشتر و پروتئینی عملکردی به‌دست آید.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

پیشرفت‌های اخیر در بیان پروتئین نوترکیب در *اشریشیاکلی* متکی‌بر مدولاسیون و غلبه‌بر بسیاری از مسائل از جمله پایداری mRNA، انطباق کدونی و تشکیل انکلوزیون‌بادی است. استراتژی‌های ژنتیک منشأ اولیه نوآوری بیان پروتئین نوترکیب در باکتری‌هاست که به‌طور مداوم محدودیت‌ها و مشکلاتی وجود دارد. لذا کلید اصلی برای بیان موفقیت آمیز پروتئین‌های نوترکیب در باکتری *اشریشیاکلی* ترکیبی از دستکاری ماهرانه اجزای جعبه ابزار گسترده ژنتیکی است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

منابع

1. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Frontiers in Microbiology. 2014;5:172.

2. Aune TEV. High level recombinant protein production in Escherichia coli by engineering broad-host-range plasmid vectors containing the Pm/xylS expression cassette. 2008.

3. Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. Microbiological reviews. 1996;60(3):512-38.

4. Waegeman H, De Mey M. Increasing recombinant protein production in E. coli by an alternative method to reduce acetate: INTECH Open Access Publisher; 2012.

5. Minton NP. Improved plasmid vectors for the isolation of translational lac gene fusions. Gene. 1984;31(1-3):269-73.

6. Gao LML. The effect of wave reflection of artificial boundaries in viscoelastic media [J]. J. Hydraulic Engineering. 1986;6.

7. Li L, O'Brien KJ. Rightful resistance in rural China: Cambridge University Press; 2006.

8. Del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejas R. Replication and control of circular bacterial plasmids. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62(2):434-64.

9. Kreuzaler F, Ragg H, Fautz E, Kuhn DN, Hahlbrock K. UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of Petroselinum hortense. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1983;80(9):2591-3.

10. Guzman L-M, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. J. bacteriology. 1995;177(14):4121-30.

11. Nordström K. Plasmid R1—replication and its control. Plasmid. 2006;55(1):1-26.

12. Stoker NG, Fairweathe NF, Spratt BG. Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in Escherichia coli. Gene. 1982;18(3):335-41.

13. Wang RF, Kushner SR. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in Escherichia coli. Gene. 1991;100:195-9.

14. Korpimäki T, Kurittu J, Karp M. Surprisingly fast disappearance of β-lactam selection pressure in cultivation as detected with novel biosensing approaches. J. microbiological methods. 2003;53(1):37-42.

15. Lee C-H, Moseley S, Moon H, Whipp S, Gyles C, So M. Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic Escherichia coli heat-stable toxin II producers. Infection and immunity. 1983;42(1):264-8.

16. Umezawa H, TAKAHASHI Y, KINOSHITA M, NAGANAWA H, MASUDA T, ISHIZUKA M, et al. Tetrahydropyranyl derivatives of daunomycin and adriamycin. The Journal of antibiotics. 1979;32(10):1082-4.

17. OULUENSIS U. Jarkko Korpi.

18. Chan W, Leyland M, Clark J, Dodd H, Lian L-Y, Gasson M, et al. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: antibacterial activity of fragments of nisin. FEBS letters. 1996;390(2):129-32.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

19. 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 biotechnology. 2012;2013.

20. Schlegel S, Rujas E, Ytterberg AJ, Zubarev RA, Luirink J, De Gier J-W. Optimizing heterologous protein production in the periplasm of E. coli by regulating gene expression levels. Microbial cell factories. 2013;12(1):1.

21. Schumann W, Ferreira LCS. Production of recombinant proteins in Escherichia coli. Genetics and Molecular Biology. 2004;27(3):442-53.

22. Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Molecular and cellular biochemistry. 2008;307(1-2):249-64.

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

24. Sørensen HP, Mortensen KK. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. Microbial cell factories. 2005;4(1):1.

25. Chaudhuri K. Recombinant DNA Technology: The Energy and Resources Institute (TERI); 2013.

26. Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. Journal of biotechnology. 2005;115(2):113-28.

27. Welch M, Govindarajan S, Ness JE, Villalobos A, Gurney A, Minshull J, et al. Design parameters to control synthetic gene expression in Escherichia coli. PloS one. 2009;4(9):e7002-e.

28. Menzella HG. Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in Escherichia coli. Microb Cell Fact. 2011;10(15):10.1186.

29. Angov E, Legler PM, Mease RM. Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding. Heterologous Gene Expression in E coli: Springer; 2011. p. 1-13.

30. Li G-W, Oh E, Weissman JS. The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. Nature. 2012;484(7395):538-41.

31. Quax TE, Claassens NJ, Söll D, van der Oost J. Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression. Molecular cell. 2015;59(2):149-61.

32. Ramseier TM, Jin H, Squires CH. Process for improved protein expression by strain engineering. Google Patents; 2013.

33. Mattoo RU, Goloubinoff P. Recruiting unfolding chaperones to solubilize Misfolded Recombinant proteins. Protein Aggregation in Bacteria: Functional and Structural Properties of Inclusion Bodies in Bacterial Cells. 2014:63-75.

34. Nannenga BL, Baneyx F. Reprogramming chaperone pathways to improve membrane protein expression in Escherichia coli. Protein Science. 2011;20(8):1411-20.

35. Arolas JL, García-Castellanos R, Goulas T, Akiyama Y, Gomis-Rüth FX. Expression and purification of integral membrane metallopeptidase HtpX. Protein expression and purification. 2014;99:113-8.

36. Huang C-J, Lin H, Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2012;39(3):383-99.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

37. Sohoni SV, Nelapati D, Sathe S, Javadekar-Subhedar V, Gaikaiwari RP, Wangikar PP. Optimization of high cell density fermentation process for recombinant nitrilase production in E. coli. Bioresource technology. 2015;188:202-8.

38. Routledge SJ, Bill RM. The effect of antifoam addition on protein production yields. Recombinant Protein Production in Yeast: Springer; 2012. p. 87-97.

39. Fernández-Castané A, Vine CE, Caminal G, López-Santín J. Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by Escherichia coli in fed-batch high cell density cultures. Journal of biotechnology. 2012;157(3):391-8.

40. Studier FW. Stable expression clones and auto-induction for protein production in E. coli. Structural Genomics: Springer; 2014. p. 17-32.

41. Karig DK, Iyer S, Simpson ML, Doktycz MJ. Expression optimization and synthetic gene networks in cell-free systems. Nucleic acids research. 2012;40(8):3763-74.

42. Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, Jewett MC. Cell-free protein synthesis: applications come of age. Biotechnology advances. 2012;30(5):1185-94.

43. Swartz JR. Cell-free protein expression: Springer Science & Business Media; 2012.

44. Smith MT, Bennett AM, Hunt J, Bundy BC. Creating a completely “Cell-free” system for protein synthesis. Biotechnology Progress. 2015.

45. Rosenblum G, Cooperman BS. Engine out of the chassis: cell-free protein synthesis and its uses. FEBS Lett. 2014;588(2):261-8.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.8.2]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-03-19]