



Scan online to view this article

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

Mohammad Ebrahimifard¹, Mohammad Mahdi Forghanifard^{*1}, Ahad Yamchi², Vajihe Zarrinpur²

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

Abstract

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

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

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

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

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

Corresponding author:

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



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

بهینه‌سازی تولید زنجیره سبک آنزیم انتروکیناز

انسانی به منظور استفاده در صنایع دارویی

محمد ابراهیمی فرد^۱، محمد مهدی فرقانی فرد^{۱*}، احمد یامچی^۲، وجیهه زرین پور^۱

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.

۲. گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

چکیده

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

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

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

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

واژه‌های کلیدی: انتروکیناز، القاگر پرومومتر، خالص‌سازی، کلونینگ، میزان بیانی، Iau Science

می‌کند (۳،۴). انتروکیناز از روده خوک، گاو، انسان و دیگر موجودات خالص شده است که به نظر می‌رسد در اکثر موارد، هترودایمری مرتبط با پیوند دی‌سولفیدی باشد. این آنزیم از یک زنجیره واحد پیش‌ساز مشتق شده که شامل زنجیره سنگین ۱۴۰-۸۲ کیلو دالتونی و زنجیره سبک ۶۲-۲۸ کیلو دالتونی است. هر دو زنجیره انتروکیناز حاوی ۵۰-۳۰ درصد کربوهیدرات است. انتروکیناز در ابتدا به نام انتروپیتیداز شناخته می‌شد، که برای اولین بار توسط پاولوف روسی در سال ۱۸۹۹ کشف شد (۵). کونیتز در سال ۱۹۳۹ اولین بار انتروکیناز را به عنوان فعال کننده در دودنئوم پستانداران معرفی کرد که تبدیل آنزیمی تریپسینوژن به تریپسین با استفاده از انتروکیناز خالص خوکی را انجام می‌داد. انتروکیناز یک کیناز نیست، بنابراین در حال حاضر این آنزیم به نام انتروکیناز که معکس کننده فعالیت پروتئولیتیک آن است، شناخته می‌شود (۶). بعد از کشف انتروکیناز و شناسایی ویژگی‌های اختصاصی این آنزیم، در اکثر موارد استفاده تجاری

مقدمه

انتروپیتیداز یکی از اعضای خانواده سرین پروتئازهای نوع II گذرنده از غشاء است که در مرز دوازدهه قرار دارد. این آنزیم به عنوان یک زیموژن (پروانتروکیناز) که نیاز به فعال‌سازی توسط یک پروتئاز دیگر، تریپسین و یا به-احتمال دو دنثاز دارد، سنتز می‌شود (۱،۲). انتروکیناز به عنوان پروتئاز، به طور اختصاصی، پروپیتیدی اسیدی را از تریپسینوژن جدا کرده و آن را به تریپسین فعال تبدیل می‌کند. در واقع انتروکیناز یک سرین پروتئاز متصل به غشاء در دوازدهه است که تریپسینوژن را در جایگاه خالص X LYS-ASP می‌شکند و آن را تبدیل به تریپسین فعال

نویسنده مسئول:

گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
پست الکترونیکی: forghanifard@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۶

باکتری *E.coli* مولد آنزیم انتروکیناز و شرایط جهت بیان ژن بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد

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

روش‌ها

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

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

تهیه Competent Cell

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

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

انجام PCR برای تأیید استخراج پلاسمید
واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۷۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش $10\times$ ، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر دو آغازگر اختصاصی (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم DNA تک پلی‌مراز (۵ واحد/میکرولیتر) و ۵ میکرولیتر (۵۰ نانو گرم) استفاده گردید. در این تحقیق از یک برنامه چرخه حرارتی به طور اختصاصی برای آغازگرها استفاده گردید. برای مرحله واسرثت اولیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اعمال شد. تکثیر در ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۶ درجه به مدت ۱ دقیقه و دمای

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

در حال حاضر انتروکیناز، ترموبین^۱، فاکتور Xa^۲ TEV^۳ و غیره پروتئازهایی هستند که برای برش پروتئین ترکیبی تولید شده در باکتری استفاده می‌شوند. در میان این پروتئازها، انتروکیناز به عنوان یک آنزیم ایده‌آل برای خالص‌سازی پروتئین هدف با شکست دنباله خاص از پروتئین ترکیبی به شمار می‌رود (۹،۱۰،۱۱). بدليل توانایی انتروکیناز برای شکافتن پروتئین نوترکیب در جایگاهی بسیار خاص در حضور مواد شوینده، دناتورهای مختلف، عمل در یک محدوده گسترده pH و درجه حرارت، این آنزیم تبدیل به یک ابزار بسیار جذاب و مفید برای جداسازی نواحی پروتئین نوترکیب در بیوتکنولوژی شده است (۱۲).

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

^۱ Thrombin

^۲ Factor Xa

^۳ Tobacco Etch Virus

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

هضم آنژیمی

به منظور درج قطعه نوترکیب در پلاسمید، ابتدا لازم است که هم قطعه نوترکیب و هم پلاسمید به وسیله آنژیم‌های محدودگر یکسان، بریده شوند. برای انجام هضم آنژیمی در ابتدا و انتهای قطعه نوترکیب، جایگاه برش برای آنژیم‌های pET15b و *XhoI* تعییه شد. پلاسمید هم در

جدول ۱. طراحی آزمایش مرحله اول با RSM

سطح	فاکتور		
	OD	Host Cell	IPTG (mM)
۱	۰/۶	BL 21	۰/۲
۲	۱/۲	Shuffle	۰/۵
۳	۱/۸	Nico	۰/۸

جدول ۱. طراحی آزمایش مرحله اول با RSM

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

Amp به آن افزوده شد و به صورت overnight داخل شیکر انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۸۰ rpm قرار گرفت. سپس پیش کشت به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط LB دارای آنتی‌بیوتیک Amp اضافه شد و داخل شیکر انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. حال با توجه به IPTG و OD های نوشته شده در جدول ۱ مرحله القاء انجام و پس از اضافه نمودن IPTG، ۴ ساعت دیگر در شیکر انکوباتور با همان دما قرار داده شد. سپس محتویات کشت داده شده داخل یک فالکون استریل ریخته شد و

بيان ژن انتروکیناز و انتخاب بهترین Host Cell

با استفاده از روش آماری RSM، بررسی وضعیت بیان در OD ها و غلظت‌های IPTG مختلف، بهترین Host Cell انتخاب گردید و ادامه کار با این Host Cell انجام شد. هم‌چنین بهترین OD و مقدار IPTG نیز در این مرحله Host Cell های مختلف از فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد بیرون آورده شد و پس از هم دما شدن، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر کدام داخل یک لوله حاوی محیط LB broth ریخته و سپس مقدار ۵ میکرولیتر (۱۰۰ mg/L) آنتی‌بیوتیک

جدول ۲ - طراحی آزمایش مرحله دوم با RSM

سطح	فاکتور		
	Medium	Lactose (mM)	¹ Tm
۱	M9	.	۱۸
۲	LB	۲/۵	۲۵
۳	TB	۵	۳۲

Response Surface Methodology (RSM) with 3 Factor			
Run	Factor 1: Medium	Factor 2: Lactose	Factor 3: Tm
۱	LB	۲/۵	۱۸
۲	TB	۵	۱۸
۳	TB	۵	۳۲
۴	TB	.	۳۲
۵	M9	۲/۵	۲۵
۶	TB	۲/۵	۲۵
۷	LB	.	۲۵
۸	LB	۲/۵	۳۲
۹	M9	.	۳۲
۱۰	M9	۵	۲۲
۱۱	LB	۵	۲۵
۱۲	M9	.	۱۸
۱۳	LB	۲/۵	۲۵
۱۴	LB	۲/۵	۲۵
۱۵	LB	۲/۵	۲۵
۱۶	TB	.	۱۸
۱۷	M9	۵	۱۸

¹ temperature melting



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

نتایج سازه ژنی طراحی شده

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

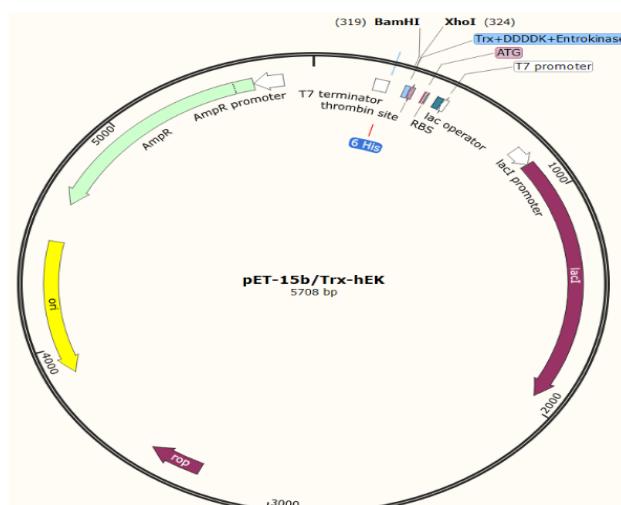
در دور ۶۵۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۴ دقیقه سانتریفیوز گردید (۱۹, ۲۰).

بهینه سازی بیان بیشتر پروتئین بهینه سازی در مرحله القاء پروتئین به منظور بهینه سازی و گرفتن بیان بالاتر در مرحله القاء علاوه بر القاگر IPTG از القاگر لاکتوز در غلظت های mM ۴۰-۴۰ نیز استفاده شد.

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

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

Shuffle T7 ، IPTG=0.71mM ، OD= 1.8

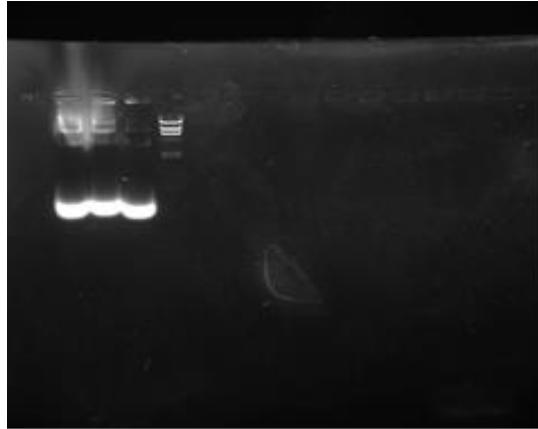


شکل ۱- سازه ژنی طراحی شده به همراه وکتور

از ناقل استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی و تأیید شد.

استخراج پلاسمید نوترکیب

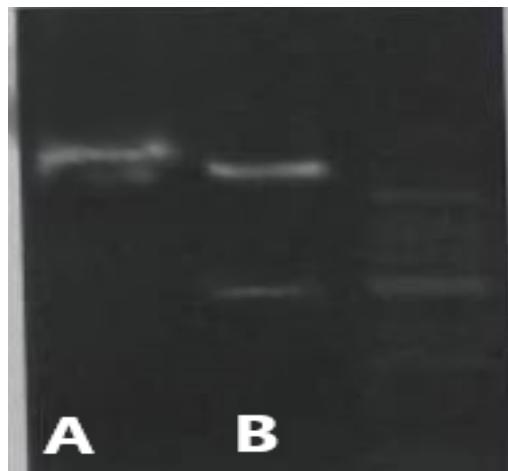
به منظور انجام واکنش الحاق ژن در ناقل، استخراج ناقل با استفاده از کیت استخراج ناقل شرکت Thermo انجام شد و درستی انجام عملیات استخراج با بارگذاری ۷ میکرولیتر



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

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

هضم آنزیمی



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

آزمون عدم برازش در معادله مدل معنی‌دار نبود؛ مدل بر اساس پارامترهای مختلف برازش گردید. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجاد شده توانسته است که تغییرات در داده‌ها را به اندازه کافی توضیح دهد، لذا این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه تعیین شده برای متغیرهای مورد استفاده مناسب بود. نمودارهای سه‌بعدی سطحی و کانتور^۲ برای متغیرها ترسیم شده است. هر شکل اثرات دو متغیر را روی پاسخ نمایش می‌دهند، که در هر نمودار متغیر سوم در میزان بهینه‌اش ثابت نگه‌داشته شده است.

انتخاب بهترین OD

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

بهینه‌سازی فرآیند بیان ژن انتروکیناز و انتخاب Host Cell

تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه $R^2 = ۰/۹۶۵۳$ کافی بیان گر پاسخ، با ضرایب مشخص است. مؤید این است که مدل رگرسیون، واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ۹۶/۵۳ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد. R^2 معیاری است برای این‌که مشخص گردد چه میزان از تغییرات توسط مدل شرح داده شده است و در موارد R^2 واقعی و R^2 تعدل شده^۱ که به ترتیب $۰/۹۶۵۳$ و $۰/۹۳۴۰$ به دست آمدند، بیان گر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بوده‌اند. همچنین مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش مورد بررسی قرار گرفت که در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود ($P < 0/05$). از آنجا که فرض

استفاده شد. متغیرهای مستقل مورد استفاده در مرحله اول شامل میزان OD ($0/6$, $1/2$ و $1/8$) در طول موج 600 نانومتر، غلظت IPTG ($0/2$, $0/5$ و $0/8$ میلی‌مولاو) و نوع سویه باکتری (ShuffleT7, BL21, NICO21). نقطه مرکزی دارای شرایط میزان OD برابر با $1/8$ در طول موج 600 نانومتر، غلظت IPTG $0/71$ میلی‌مولاو و نوع سویه باکتری ShuffleT7 بود.

بهینه‌سازی مرحله دوم انتروکیناز انتخاب بهترین محیط کشت

فاکتورهای زیادی بر شرایط تخمیر مؤثر هستند که می-توانند بر رشد باکتری‌ها اثر بگذارند، یکی از آن‌ها نوع محیط کشت مورد استفاده است. که ما در این مرحله از محیط کشت‌های LB³, TB⁴, M9⁵ که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان آنژیم انتروکیناز استفاده نمودیم و با توجه به شکل ۱ (د) می-توان بیان کرد که تغییرات محیط کشت به طور معنی‌داری بر میزان بیان آنژیم انتروکیناز تأثیر داشته است. $P < 0.05$. با توجه به شکل ۱ (د) می-توان بیان آنژیم انتروکیناز استفاده نمودیم و با توجه به شکل ۱ (ب) بهترین غلظت IPTG برای بیان آنژیم انتروکیناز برابر با $0/71$ میلی‌مولاو است که این ناحیه با توجه به سطح زیر منحنی پروتئین به دست آمد.

انتخاب بهترین غلظت لاکتونز

در این مرحله یکی از متغیرهای مستقل بیان آنژیم انتروکیناز در سه غلظت لاکتونز مختلف ($0/0/5$, $2/5$ و 5 میلی‌مولاو) بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان آنژیم انتروکیناز استفاده و با توجه به شکل ۱ (ج) بهترین سویه برای بیان آنژیم انتروکیناز شفاف است که این سویه با توجه به سطح زیر منحنی پروتئین به دست آمد.

RSM^۱ در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان آنژیم انتروکیناز استفاده و با توجه به شکل ۱ (الف) می‌توان بیان کرد که تغییرات غلظت میکرووارگانیسم به طور معنی‌داری بر میزان بیان آنژیم انتروکیناز تأثیر داشته است ($P < 0.05$). با توجه به شکل همان‌گونه که مشخص است، میزان بیان پروتئین انتروکیناز هم‌راستا با افزایش غلظت میکرووارگانیسم روند افزایشی داشته و نمونه‌های حاوی غلظت $1/8$ از میکرووارگانیسم سبب بیان بیش‌ترین میزان آنژیم انتروکیناز شده هم‌چنین کم‌ترین میزان بیان آنژیم انتروکیناز در نمونه‌های حاوی غلظت $0/6$ میکرووارگانیسم بوده است.

انتخاب بهترین غلظت القا کننده (IPTG)

در این مرحله یکی دیگر از متغیرهای مستقل بیان آنژیم انتروکیناز در سه غلظت IPTG مختلف ($0/0/5$, $0/2$ و $0/8$ میلی‌مولاو) بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان آنژیم انتروکیناز استفاده و با توجه به شکل ۱ (ب) بهترین غلظت IPTG برای بیان آنژیم انتروکیناز برابر با $0/71$ میلی‌مولاو است که این ناحیه با توجه به سطح زیر منحنی پروتئین به دست آمد.

انتخاب بهترین سویه

در این مرحله متغیر مستقل سوم بیان آنژیم انتروکیناز (ShuffleT7, BL21, NICO21) در سه سویه مختلف در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان آنژیم انتروکیناز استفاده و با توجه به شکل ۱ (ج) بهترین سویه برای بیان آنژیم انتروکیناز شفاف است که این سویه با توجه به سطح زیر منحنی پروتئین به دست آمد.

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

پس از انجام آزمون‌های اولیه محدوده مناسبه متغیرهای مستقل تولید آنژیم انتروکیناز شامل (Mیزان OD, غلظت IPTG و نوع سویه باکتری) از روش سطح پاسخ (RSM) در قالب طرح مرکب مرکزی برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان تولید آنژیم انتروکیناز استفاده شد (شکل ۲). در بهینه سازی تولید آنژیم انتروکیناز از ۱۷ تیمار بر اساس طرح مرکب مرکزی، شامل ۳ تکرار در نقطه مرکزی

³ Lysogeny broth

⁴ Terrific Broth

^۱ Response Surface Methodology

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

انتخاب بهترین دمای القاء

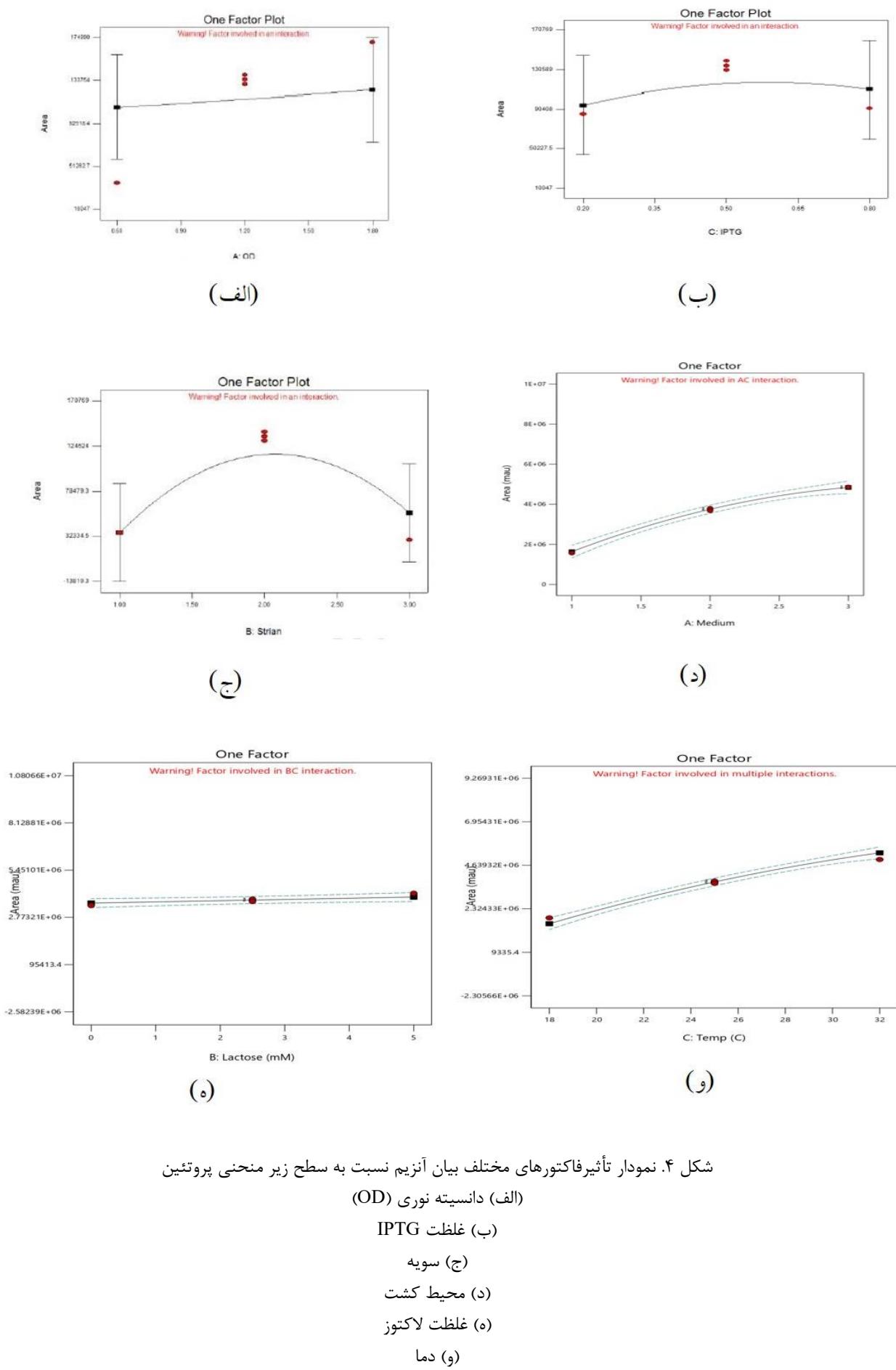
در این مرحله یکی از متغیرهای مستقل بیان آنزیم انتروکیناز در سه دمای مختلف (۱۸، ۲۵ و ۳۲ سانتی-گراد) بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده و با توجه به شکل ۱ (و) می‌توان بیان کرد که تغییرات دما به‌طور معنی‌داری بر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

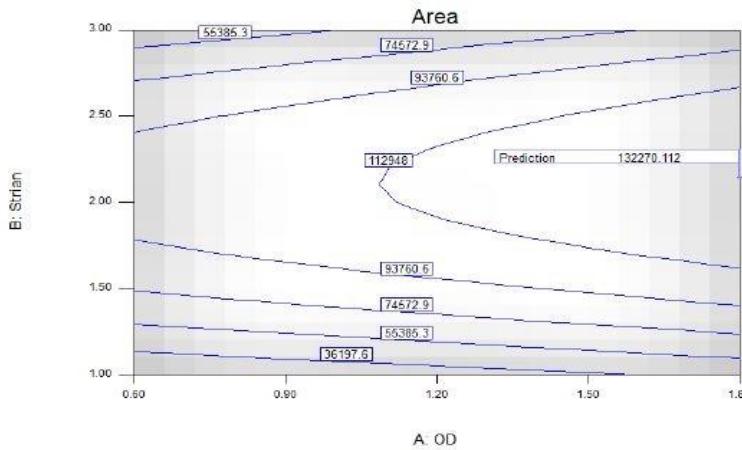
ارزیابی نقطه بهینه برای فرآیند بیان آنژیم

انتر و کیناز در مرحله دوم یهینه سازی

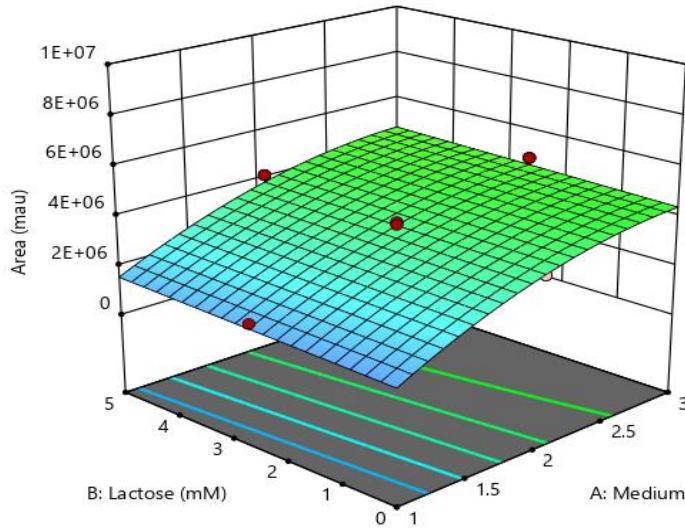
پس از انجام آزمون-های اولیه محدوده مناسبه متغیرهای مستقل تولید آنژیم انتروکیناز شامل (نوع محیط کشت، غلظت لاکتوز و دمای القاء) از روش سطح پاسخ (RSM) در قالب طرح مرکزی برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان تولید آنژیم انتروکیناز استفاده شد. در بهینه‌سازی تولید آنژیم انتروکیناز از ۱۷ تیمار بر اساس طرح مرکزی،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

بحث





شکل ۵. بهینه‌سازی بیان آنزیم انتروکیناز با تأثیرات OD برابر $1/8$ ، غلظت IPTG برابر 0.071 میلی‌مولار، سوبه باکتری ShuffleT7



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

محیط را فراهم می‌کند. گام بعدی بهینه‌سازی چند متغیره آماری هست که برای شناسایی سطوح بهینه تمام فاکتورهای فرآیندی انتخابی ارجح خواهد بود. در طولانی مدت می‌توان با تجربیات بهدست آمده از گام‌های دوم و سوم، ابزارهای محاسباتی مناسب طراحی و اجرا نمود. چنین سیستم پیشرفته‌ای قادر به پیش‌بینی عملکرد پروتئین در اشریشیاکلای نوترکیب بوده و آزمایش‌های آزمایشگاهی را بیش‌تر کاهش خواهد داد (۲۹). Hui و همکاران در سال ۲۰۲۱ طبق مطالعه‌هایی که بر روی پیش‌بینی بیان پروتئین‌های ترشحی در باکتری‌های گرم منفی انجام دادند به این نتیجه دست یافتند که تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی در *E.coli* در موقعیت‌های غیرسیتوپلاسمی یعنی پری‌پلاسم انجام می‌شود. در پری-

Packiam نمونه را به ۱۷ نمونه مورد بررسی کاهش داد. و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه‌ای به بهینه‌سازی تولید پروتئین نوترکیب در اشریشیاکلای با استفاده از روش‌های محاسباتی و تجربی پرداختند. آن‌ها معتقد بودند که کاربرد همه روش‌های بهینه‌سازی به ترتیب برای همه فاکتورهای حیاتی در سطح بیان و فرآیند می‌تواند منجر به بازده بالای پروتئین نوترکیب شود. اولین گام در تولید پروتئین‌های نوترکیب در اشریشیاکلای، استفاده از ابزارهای محاسباتی مناسب برای تولید مدلی با استفاده از ویژگی‌های تأثیرگذار است که بهینه‌سازی عوامل مبتنی بر ژن و پروتئین را تسهیل می‌کند. گام بعدی استفاده از بهینه‌سازی یک فاکتور در یک زمان و انتخاب براساس دانش روز است، که امکان انتخاب بهینه میزبان، ناقل و

انتروکیناز انسانی را بهینه‌سازی نمودیم، برای تولید انبوه این آنژیم باید بهینه‌سازی تخلیص آن نیز مورد بررسی قرار گیرد. هم‌اکنون آنژیم انتروکیناز تجاری در هر دو میزبان باکتریایی (شرکت Gen Script) و یوکاریوتی (شرکت Sigma) تولید و به بازار عرضه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق کلونینگ و بهینه‌سازی شرایط بیان ژن SHuffle آنژیم انتروکیناز انسانی در سویه‌های Escherichia coli T7، BL21 و NICO21 باکتری صورت گرفت، که بیان بهتر ژن آنژیم انتروکیناز در سویه SHuffle T7 با نقطه مرکزی دارای شرایط میزان OD IPTG برابر با $1/8$ در طول موج 600 نانومتر و غلظت 71 میلی‌مولار همراه بود. ارزیابی نقطه بهینه برای فرآیند بیان آنژیم انتروکیناز در مرحله دوم بهینه‌سازی با نقطه مرکزی دارای شرایط محیط کشت LB، غلظت لاکتوز $2/5$ میلی‌مولار و دمای القاء 25 درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. بیان ژن انتروکیناز در سیستم باکتریایی، سبب تسهیل در خالص‌سازی پروتئین با غلظت‌های پایین، می‌شود، بنابراین با استفاده از نتایج چنین تحقیقاتی، پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس وسیع و با خلوص زیاد (تولید صنعتی)، تولید خواهد شد که می‌تواند منجر به خودکفایی در صنعت داروسازی نوترکیب شود.

پلاسم دی‌سولفیدی اکسیدوردوکتازها و ایزومرازها قرار گرفته‌اند که تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی را کاتالیز می‌کند و تجمع پروتئین‌های دارای تاخوردگی صحیح را امکان‌پذیر می‌کند، از این رو ایجاد پروتئین محلول، پری‌پلاسم را به قسمت ایده‌آلی برای بیان پروتئین‌های درمانی خاص تبدیل نموده است (30). اما با توجه‌به این که بیان پروتئین در پری‌پلاسم E.coli بسیار اکسید کننده است، ما برای کسب پروتئین دارای پیوند دی‌سولفیدی مطلوب (انتروکیناز) و در نتیجه تاخوردگی صحیح، استفاده از بیان سیتوپلاسمی را در سویه Shuffle T7 انتخاب نمودیم. سویه Shuffle T7 به‌علت تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی و اختصاصی بودن RNA پلی‌مراز فاز T7 به‌کار رفته در سیستم بیانی pET برای توالی پرموموتی مربوط به خود، برای بیان سیتوپلاسمی پروتئین نوترکیب در اشرشیاکلی حائز اهمیت است، از دیگر مزایای این سویه، اصلاح پیوندهای نادرست اکسید شده است ($31-34$). Abtahi و Molaei در سال 2011 به بررسی بهینه‌سازی تولید آنژیم استرپتوکیناز نوترکیب در باکتری اشرشیاکلای پرداختند. آن‌ها دریافتند تغییر شرایط محیط کشت می‌تواند باعث افزایش میزان تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری میزان گردد. وجود برخی عوامل غذایی از جمله گلوکز به‌تهاهای باعث افزایش محصول نمی‌شود بلکه امکان دارد کاهش محصول را نیز در پی داشته باشد (35) در این مطالعه میزان بیان پروتئین انتروکیناز هم‌راستا با تغییر محیط کشت (LB) روند افزایشی داشته و نمونه‌های حاوی محیط کشت LB و M9 به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان بیان آنژیم انتروکیناز را نشان داد، در ادامه در مرحله القاء علاوه‌بر IPTG از لاکتوز هم استفاده نمودیم که پایین‌ترین غلظت لاکتوز ($2/5$ میلی‌مولار) سبب بیشترین بیان پروتئین نوترکیب گردید. Babakan و همکاران در سال 2019 با بررسی بهینه‌سازی بیان و تخلیص آنژیم گلوتات اندوپیتیداز از باکتری هالوترمولرات، به‌صورت پری‌پلاسمی در غلظت‌های $0/4$ ، 1 و 2 میلی‌مولار القاگر، بهینه‌سازی نمودند، آن‌ها دریافتند که بهترین نتیجه برای بیان پری‌پلاسمیک پروتئین نوترکیب با غلظت 2 میلی‌مولار IPTG است (36). از جمله متغیرهای این پژوهش، بیان آنژیم انتروکیناز در سه غلظت IPTG $0/2$ ، $0/5$ و $0/8$ میلی‌مولار) به روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی بود که غلظت $0/71$ میلی‌مولار IPTG بهترین غلظت برای بیان آنژیم انتروکیناز محلول در باکتری‌ها هنوز یک چالش حل نشده است، ما در این پژوهش فقط بیان آنژیم

1. Sugama, J., Y. Katayama, Y. Moritoh and M. Watanabe., 2021, Enteropeptidase inhibition improves kidney function in a rat model of diabetic kidney disease, *Diabetes, Obesity and Metabolism* 23(1): 86-96.
2. Wang, J.-H., M.-Z. Tang, X.-T. Yu, C.-M. Xu, H.-M. Yang and J.-B. Tang., 2019, Site-specific, covalent immobilization of an engineered enterokinase onto magnetic nanoparticles through transglutaminase-catalyzed bioconjugation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177: 506-511.
3. Simeonov, P., R. Berger-Hoffmann, R. Hoffmann, N. Sträter and T. Zuchner., 2011, Surface supercharged human enteropeptidase light chain shows improved solubility and refolding yield, *Protein Engineering, Design & Selection*, 24(3): 261-268.
4. Zhang, X.-h., S.-h. Tan and T.-m. Li., 2005, Characterization of Enterokinase and Its Research Advances in Genetic Engineering, *pharmaceutical biotechnology-beijing-* 12(5): 347.
5. Qin, X.,2016, Inactivation of pancreatic digestive proteases by deconjugated bilirubin from the liver: A critical mechanism for gut protection, *J Gastroenterol Pancreatol Liver Disord*, 3(4): 1-2.
6. Pepeliaev, S., J. Krahulec, Z. Černý, J. Jílková, M. Tlustá and J. Dostálková.,2011, High level expression of human enteropeptidase light chain in *Pichia pastoris*, *Journal of biotechnology* 15 (1):67-75.
7. Zurawa-Janicka, D., T. Wenta, M. Jarzab, J. Skorko-Glonek, P. Glaza, A. Gieldon, J. Ciarkowski and B. Lipinska., 2017, Structural insights into the activation mechanisms of human HtrA serine proteases, *Archives of biochemistry and biophysics*, 621: 6-23.
8. Krahulec, J. and M. Šafránek .,2021. Impact of media components from different suppliers on enterokinase productivity in *Pichia pastoris*, *BMC biotechnology*, 21(1): 1-9.
9. Nemestóthy, N., G. Megyeri, P. Bakonyi, P. Lakatos, L. Koók, M. Polakovic, L. Gubicza and K. Bélafi-Bakó.,2017,Enzyme kinetics approach to assess biocatalyst inhibition and deactivation caused by [bmim][Cl] ionic liquid during cellulose hydrolysis, *Bioresource technology*, 229: 190-195.
10. Melicherová, K., J. Krahulec, M. Šafránek ,V. Lišková, D. Hopková, D. Széliová and J. Turňa., 2017, Optimization of the fermentation and downstream processes for human enterokinase production in *Pichia pastoris*, *Applied microbiology and biotechnology*, 101(5): 1927-1934.
11. Marangoni, A. G. 2003, Enzyme kinetics: a modern approach, John Wiley & Sons.
12. Kaur, J., A. Kumar and J. Kaur., 2018. Strategies for optimization of heterologous protein expression in E .coli: Roadblocks and reinforcements, *International Journal of Biological Macromolecules*, 106: 803-822.
13. Mikhailova, A. G. and L .D. Rumsh.,2000, Enteropeptidase, *Applied biochemistry and biotechnology*, 88(1): 159-174.
14. Kim, Y. S., H.-J. Lee, S.-h. Park, Y.-c. Kim and J. Ahn., 2021, Expression and purification of soluble and active human enterokinase light chain in *Escherichia coli*, *Biotechnology Reports*, 30: e00626.
15. Aghaeepoor, M., A. Akbarzadeh, F. Kobarfard, A. A. Shabani, E. Dehnavi, S. J. Aval and M. R. A. Eidgahi,2019. Optimization and high level production of recombinant synthetic Streptokinase in *E. coli* using Response Surface Methodology. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 18(2): 961.
16. Tariq, F., M. A. U. Khan, S. Shahzad, W. B. Chaudhary, A. Arif and G. Gharib., 2018, Production of Remedial Proteins through Genetically Modified Bacteria, *Advancements in Life Sciences* 5(2): 37-45.



17. Zoued, A., Y. R. Brunet, E. Durand, M.-S. Aschtgen, L. Logger, B. Douzi, L. Journet, C. Cambillau and E. Cascales., 2014, Architecture and assembly of the Type VI secretion system, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1843(8): 1664-1673.
18. Lim, J., Destabilizing single chain major histocompatibility complex class I protein for repurposed enterokinase proteolysis, 2020, *Scientific reports*, 10(1): 1-10.
19. Odonkor, S. T. and K. K. Addo., 2018, Prevalence of multidrug-resistant Escherichia coli isolated from drinking water source, *International journal of microbiology* ,45 (2): 2018-2021.
20. Melicherová, K., J. Krahulec, M. Šafránek ,V. Lišková, D. Hopková, D. Széliová and J. Turňa., 2017, Optimization of the fermentation and downstream processes for human enterokinase production in *Pichia pastoris*, *Applied microbiology and biotechnology*, 101(5): 1927-1934.
21. Kwon, J., Cho, H., Kim, S., Ryu, Y. and Lee, J.J., 2021. A combination strategy of solubility enhancers for effective production of soluble and bioactive human enterokinase. *Journal of Biotechnology*, 340, pp.57-63.
22. Burnett, M.J. and Burnett, A.C., 2020. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet*, 2(2), pp.121-132.
23. Bagno, F.F., Godói, L.C., Figueiredo, M.M., Sérgio, S.A.R., Moraes, T.D.F.S., Salazar, N.D.C., Kim, Y.C., Reyes-Sandoval, A. and da Fonseca, F.G., 2020. Chikungunya E2 Protein Produced in *E. coli* and HEK293-T Cells—Comparison of Their Performances in ELISA. *Viruses*, 12(9), p.939.
24. Eliot T. Smith and David A. Johnson: Human enteropeptidase light chain: Bioengineering of recombinants and kinetic investigations of structure and function. *Protein Science* 2013, 22(5):577–585.
25. Nasibi Nahid, Turkzadeh Mahani Massoud, Mortazavi Morteza. Production of recombinant HFBI protein in *E.coli*. Thesis from Kerman University. 2015.
26. Ahmad I, Nawaz N, Darwesh NM, ur Rahman S, Mustafa MZ, Khan SB, Patching SG. Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 2018 Apr 1;144:12-8.
27. Abdollahzadeh, R., Pazhang, M., Najavand, S., Fallahzadeh-Mamaghani, V. and Amani-Ghadim, A.R., 2020. Screening of pectinase-producing bacteria from farmlands and optimization of enzyme production from selected strain by RSM. *Folia microbiologica*, pp.1-15.
28. Hussain, S., Khan, H., Gul, S., Steter, J.R. and Motheo, A.J., 2021. Modeling of photolytic degradation of sulfamethoxazole using boosted regression tree (BRT), artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM); energy consumption and intermediates study. *Chemosphere*, 276, p.130151.
29. Packiam KA, Ramanan RN, Ooi CW, Krishnaswamy L, Tey BT. Stepwise optimization of recombinant protein production in *Escherichia coli* utilizing computational and experimental approaches. *Applied microbiology and biotechnology*. 2020 Apr;104(8):3253-66.
30. Hui, X., Chen, Z., Zhang, J., Lu, M., Cai, X., Deng, Y., Hu, Y. and Wang, Y., 2021. Computational prediction of secreted proteins in gram-negative bacteria. *Computational and Structural Biotechnology Journal*.
31. Shoae M, Safarpour H, Khorashadizadeh M. Recombinant Production of Bovine Enteropeptidase Light Chain in SHuffle® T7 Express and Optimization of Induction Parameters. *The Protein Journal*. 2021 Sep 29:1-0.
32. De Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*. 2009 Dec;8(1):1-8.
33. Dawn, A. and Deep, S., 2021. An improved strategy of TGFβ3 expression in *Escherichia coli*: Exploiting folding modulators for a switch from misfolded to folded form. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, pp.787-795.



34. Ahmadzadeh, M., Farshdari, F., Nematollahi, L., Behdani, M. and Mohit, E., 2020. Anti-HER2 scFv expression in Escherichia coli SHuffle® T7 express cells: effects on solubility and biological activity. Molecular biotechnology, 62(1), pp.18-30.
35. Molae N and Abtahi H. (2011). Improvement of recombinant streptokinase production in E.coli. Arak Medical University Journal. 14. 7 . 97 – 103.
36. Babakan., S., Safari., A., Moniri., R., Hamzeh miveh roud., M and Dastmalchi., S. (2019). Optimization of expression and purification of glutathione endopeptidase enzyme from halotermolar bacterium. Cellular and Molecular innovation in biotechnology Journal 344. 9. 23-30.

