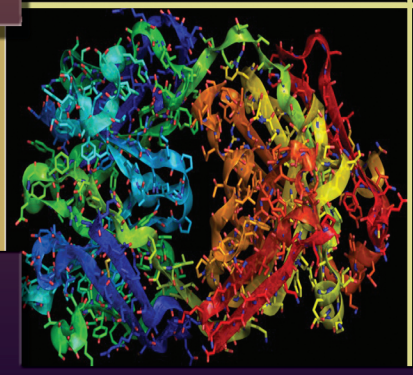
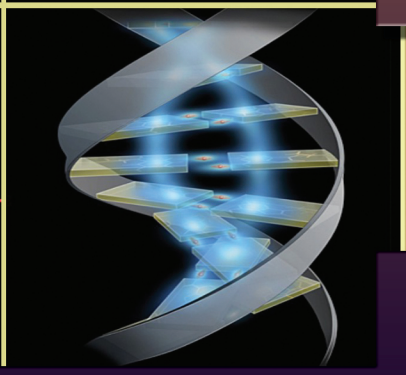
دانشگاه صنعتی مالک اشتر

تولید پروتئینهای نوترکیب

سیستم های پروکاریوتی و یوکاریوتی جدید

مؤلف: جرد جلیسن
مترجمان: نرگس ملک ثابت
محمد رضا معصومیان
محمد علی نصیری خلیلی
رسول خلیل زاده

بسم الله الرحمن الرحیم

الحمد لله رب العالمین و صلی الله علی محمد و آله الطاهرین

تولید پروتئین های نوترکیب

سیستم‌های پروکاریوتی ویوکاریوتی جدید

مترجمان : نرگس ملک ثابت
محمدرضا معصومیان
محمدعلی نصیری خلیلی
رسول خلیل زاده

سرشناسه :جلیسن ، جرد – Gellissen Gerd
عنوان ونام پدیدآور: تولید پروتئین های نوترکیب : سیستم های پروکاریوتی و یوکاریوتی جدید / مولف جرد جلیسن ؛ مترجمان نرگس ملک ثابت ... { و دیگران }
مشخصات نشر : تهران : دانشگاه صنعتی مالک اشتر ، ۱۳۸۸
مشخصات ظاهری : ۶۲۴ ص . : مصور ، جدول ، نمودار
یاداشت : مترجمان : نرگس ملک ثابت ، محمدرضا معصومیان ، محمد علی نصیری خلیلی ـ رسول خلیل زاده
یادداشت عنوان اصلی : Production of Recombinant Protehns
Novel microbial and Eukaryotic expyession system
یادداشت : کتابنامه . یادداشت : نمایه . شابک : ۱۴۰۰۰۰ ریال : 978-964-8452-94-5
موضوع : نو ترکیبی پروتئین ها موضوع : نوترکیبی میکروب ها موضوع : ژنتیک – ناقل ها
شناسه افزوده : ملک ثابت، نرگس ۱۳۵۳ - ، مترجم شناسه افزوده : دانشگاه صنعتی مالک اشتر.
رده بندی کنگره : ۱۳۸۸ ۸ گ ۹ ن/ ۶۵ / ۲۴۸ TP رده بندی دیویی : ۶۶۰/۶۲ شماره کتابشناسی ملی : ۱۹۱۶۱۸۷

« پژوهشکده علوم وفناوری زیستی»

انتشارات دانشگاه صنعتي مالك اشتر

عنوان‌کتاب: .....تولید پروتئین های نوترکیب سیستم های پروکاریوتی ویوکاریوتی جدید
مترجمان: نرگس ملک ثابت ـ محمدرضا معصومیان ـ محمدعلی نصیری خلیلی ـ رسول خلیل زاده
ناشر: ..... انتشارات دانشگاه صنعتی مالک اشتر
طرح روی جلد: .....فریناز عسگری
چاپ: ..... مرکز آموزشی، پژوهشی اطلاع‌رسانی
ویراستار: .....امین پژوهش جهرمی
لیتوگرافی، صحافی: ..... فرارنگ
تیراژ: ..... ۱۰۰۰ جلد
نوبت چاپ:.....اول، زمستان ۱۳۸۸
قیمت: ..... ۱۴۰۰۰ تومان

شابک: ۵-۹۴-۸۴۵۲-۹۶۴-۹۷۸ ISBN: 978-964-8452-94- 5

کلیه حقوق چاپ برای ناشر محفوظ است
نقل مطالب فقط با ذکر مشخصات کامل کتاب و با اشاره به نام ناشر مجاز است.
آدرس: تهران، لویزان، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، مرکز آموزشی، پژوهشی اطلاع‌رسانی،
مدیریت انتشارات. تلفن: ۲۲۹۳۲۸۹۱

فهرست مطالب

پیشگفتار مؤلف ..... أ
پیشگفتار مترجمان ..... ت

فصل اول:راهکارها و معیارهای انتخاب سیستم بیان ۱
راهکارها و معیارهای انتخاب یک سیستم بیان ۲

فصل دوم:اشریشیاکلی (Esherichia.coli) ۱۱
۲-۱- مقدمه ۱۳
۲-۲- سویه‌ها، ژنوم و کشت ۱۴
۲-۳- ناقلین بیان ۱۷
۲-۳-۱- همانندسازی ناقلین مشتق از pMB1 ..... ۱۸
۲-۳-۲- جداسازی پلاسمید در داخل سلول ۱۹
۲-۳-۳- مهندسی ژنوم ۲۳
۲-۳-۴- پروموترهای اشریشیاکلی ۲۴
۲ -۴ - تنظیم بیان ژن ۲۶
۲-۴-۱- کنترل منفی ۲۷
۲-۴-۲- کنترل مثبت ۳۱
۲-۵ - نسخه‌برداری ۳۵
۲-۵-۱- شروع ترجمه ۳۵
۲-۵-۲- کاربری کدون ۳۸
۲-۵-۳- خاتمه ترجمه ۴۲
۲-۵-۴- خاتمه نسخه‌برداری و پایداری mRNA ۴۲
۲-۶- تولید پروتئین ۴۴
۲-۶-۱- تشکیل اینکلوژن بادی ۴۴
۲-۶-۲- پردازش میتونین ۴۸
۲-۶-۳- ترشح به داخل فضای پری پلاسم ۴۹
۲-۶-۴- تشکیل پیوند دی‌سولفید و تاخوردگی ۵۱
۲-۶-۵- انتقال غشایی پروتئین‌های تاخورده به روش آرژنین دوتایی ۵۲

۲-۶-۶- تشکیل پیوند دی‌سولفید در سیتوپلاسم ۵۳
۲-۶-۷- نمایش سطح سلول و ترشح از خلال غشای خارجی ۵۴
۲-۷- مثال‌هایی از محصولات و فرایندها ۵۷
۲-۸- نتایج و چشم‌اندازهای آینده ۵۸
پیوست ۶۰
مراجع ۶۲

فصل سوم:سودوموناس فلورسنس (Pseudomonas fluorescens) ۷۳
۳-۱- مقدمه ۷۵
۳-۲- زیست‌شناسی سودوموناس فلورسنس ۷۷
۳-۳- تاریخچه و تاکسونومی سویه سودوموناس فلورسنس واریته یک MB101 ۷۸
۳-۴- کشت ۷۹
۳-۵- ژنومیک و ژنومیک عملکردی سویه MB101 سودوموناس فلورسنس ۸۰
۳-۶- سیستم بیان مرکزی پروتئین‌های هترولوگ ۸۴
۳-۶-۱- پلاسمیدهای عاری از آنتی‌بیوتیک دارای ژن‌های PyrF و ProC ۸۵
۳-۶-۲- استراتژی حذف ژن و مارکرهای دوباره استفاده شونده ۸۶
۳-۶-۳- ترشح پری‌پلاسمی و کاربرد ترانس‌پوزومها ۸۷
۳-۶-۴- سیستم‌های دیگر بیان ژن: پروموترهای القای‌شونده توسط آنترانیلات و بنزوئات ۸۸
۳-۷- تولید پروتئین‌های هترولوگ در سودوموناس فلورسنس ۸۹
۳-۷-۱- پروتئین‌های دارویی ۸۹
۳-۷-۲- آنزیم‌های صنعتی ۹۴
۳-۷-۳- پروتئین‌های کشاورزی ۹۶
۳-۸- نتیجه‌گیری ۹۶
پیوست‌ها ۹۹
مراجع ۱۰۱

فصل چهارم: استافیلوکوکوس کارنوسوس و دیگر باکتریهای گرم مثبت (Staphylococcus Carnosus). ۱۰۹
۴-۱- مقدمه ۱۱۰
۴-۲- روش‌های خروج پروتئین از سلول در باکتری‌های گرم مثبت ۱۱۱

۴-۲-۱- مسیر ترشحی معمولی (Sec) ۱۱۲
۴-۲-۲- مسیر انتقال غشایی از طریق آرژنین‌های دوتایی (Tat) ۱۱۵
۴-۲-۳- پیام‌های ترشح ۱۱۸
۴-۳- تاخوردگی پروتئین‌های خارج سیتوپلاسمی ۱۱۹
۴-۴- دیواره سلولی به عنوان سدی در مقابل ترشح پروتئین‌های هترولوگ ۱۲۲
۴-۵- تجزیه پروتئین‌های ترشحی با پروتئازهای همراه با سلول و پروتئازهای ترشحی ۱۲۳
۴-۶- استافیلوکوکوس کارنوسوس ۱۲۴
۴-۶-۱- توصیف کلی ۱۲۴
۴-۶-۲- ابزارهای میکروبیولوژی و بیولوژی مولکولی ۱۲۵
۴-۶-۳- استافیلوکوکوس کارنوسوس به عنوان میزبانی برای آنالیز موارد بیماریزایی استافیلوکوکی ۱۲۶
۴-۶-۴- ترشح پروتئین‌های هترولوگ توسط استافیلوکوکوس کارنوسوس ۱۲۷
۴-۶-۵- نمایش سطحی پروتئین در استافیلوکوکوس کارنوسوس ۱۳۳
پیوست ۱۳۶
مراجع ۱۳۷

فصل پنجم: آرکسولا آدنینی ورانس (Arxula adeninivorans) ۱۴۵
۵-۱- تایخچه تحقیقات روی آرکسولا آدنینی ورانس ۱۴۷
۵-۲- فیزیولوژی و دوریختی وابسته به حرارت ۱۴۹
۵-۳- ژنتیک و بیولوژی مولکولی ۱۵۵
۵-۴- Arxula Adeninivorans به عنوان یک دهنده ژن ۱۵۷
۵-۵- سیستم‌های پایه گذاری شده بر پایه A. adeninivorans ۱۵۸
۵-۵-۱- سیستم تاریختی ۱۵۸
۵-۵-۲- بیان ژن هترولوگ ۱۵۹
۵-۶- استنتاج‌ها و چشم‌اندازها ۱۶۶
پیوست‌ها ۱۶۷
مراجع ۱۶۹

فصل ششم: هانسنولا پلی‌مورفا (Hansenula Polymorpha) ۱۷۵

۶-۱- تاریخچه، موقعیت مورفولوژیکی، پایه ژنتیکی و بیوشیمیایی هانسنولا پلی مورفا ۱۷۷
۶-۲- ویژگی‌های ژنومی هانسنولا پلی مورفا ۱۸۲
۶-۳- گلیکوزیلاسیون با اتصال N در هانسنولا پلی مورفا ۱۸۶
۶-۴- سیستم بیان مبتنی بر هانسنولا پلی مورفا ۱۹۰
۶-۴-۱- تراریختی ۱۹۰
۶-۴-۲- سویه‌ها ۱۹۲
۶-۴-۳- پلاسمیدها و عناصر موجود ۱۹۵
۶-۵- مواردی از محصول و فرایند ۲۰۰
۶-۶- نتیجه‌گیری و چشم‌انداز ۲۰۴
۶-۶-۱- محدودیت‌های سیستم‌های بیان مبتنی بر هانسنولا پلی مورفا ۲۰۴
۶-۶-۲- تاثیر ژنومیک عملکردی در توسعه سیستم‌های مبتنی بر هانسنولا پلی مورفاRB11 ۲۰۵
پیوست‌ها ۲۰۸
مراجع ۲۱۲

فصل هفتم:پیشیا پاستوریس(Pichia Pastoris) ۲۲۵
۷-۱ مقدمه ۲۲۷
۷-۲ ساخت سویه‌های بیانی ۲۲۸
۷-۲-۱ اجزای ناقل بیانی ۲۲۹
۷-۲-۲ پروموترهای دیگر ۲۳۰
۷-۲-۳ مارکرهای انتخابی ۲۳۲
۷-۲-۴- سویه‌های میزبانی ۲۳۴
۷-۲-۵- ساخت سویه‌های بیانی ۲۳۶
۷-۲-۶- سویه‌های چندنسخه‌ای ۲۳۷
۷-۲-۷- رشد در کشت‌های فرمانتوری ۲۳۹
۷-۳- تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌های ترشحی ۲۴۰
۷-۳-۱ نشانگرهای ترشحی ۲۴۱
۷-۳-۲- گلیکوزیلاسیون با اتصال O ۲۴۳
۷-۳-۳- گلیکوزیلاسیون با اتصال N ۲۴۵
۷-۳-۴- تبدیل کربوهیدرات متصل شده با اتصال N به فرم انسانی ۲۴۷

۷-۴ نتیجه‌گیری ۲۴۹
پیوست‌ها ۲۵۰
مراجع ۲۵۲

فصل هشتم: یارویا لیپولیتیکا(Yarrowia lipolytica) ۲۵۷
۸-۱- تاریخچه، موقعیت فیلوژنی، ژنتیک پایه و بیوشیمی ۲۵۹
۸-۱-۱- ویژگی‌های اصلی ۲۵۹
۸-۱-۲- دورنمای تاریخی در تکامل مطالعات ۲۶۰
۸-۱-۳- ترشح پروتئین‌ها ۲۶۲
۸-۱-۴- تولید پروتئین‌های هترولوگ و گلیکوزیلاسیون ۲۶۲
۸-۲- ویژگی‌های ژنوم Y. lipolytica ۲۶۴
۸-۳- تشریح سیستم بیان ۲۶۶
۸-۳-۱- سویه‌های میزبان ۲۶۶
۸-۳-۲- انتخاب مارکرها و نشانه‌های بیان ۲۶۷
۸-۳-۳- ناقل‌های شاتل برای بیان پروتئین هترولوگ ۲۷۶
۸-۴- مثال‌ها ۲۸۳
۸-۵- روش‌های تراریختگی ۲۸۵
۸-۵-۱- مواد ۲۸۶
۸-۵-۲- آماده‌سازی سلول‌های مستعد ۲۸۶
۸-۵-۳- تراریختگی ۲۸۷
۸-۶- نتیجه‌گیری و روند آینده ۲۸۸
پیوست‌ها ۲۹۰

فصل نهم: آسپرژیلوس سوژا(Aspergillus Sojae) ۲۹۹
۹-۱- مقدمه ۳۰۱
۹-۲- طبقه‌بندی ۳۰۲
۹-۳- سیستم بیان ژن ۳۰۵
۹-۳-۱- انتخاب سویه ۳۰۵
۹-۳-۲- تراریختگی ۳۰۶

۹-۳-۲-۳- مارکرهای انتخابی اکسوتروف ۳۰۸
۹-۳-۳- عناصر پروموتری ۳۱۰
۹-۴- Aspergillus sojae به عنوان کارخانه سلولی برای پروتئین‌های خارجی ۳۱۲
۹-۴-۱- تولید پروتئین‌های قارچی ۳۱۳
۹-۴-۲- تولید پروتئین‌های غیرقارچی ۳۱۴
۹-۴-۳- تخمیر کنترل شده ۳۱۵
۹-۵- توسعه سویه ۳۱۷
۹-۵-۱- سویه‌های پروتئاز منفی ۳۱۷
۹-۵-۱-۲- تخریب ژنی ۳۱۸
۹-۵-۲- جهش‌یافته‌های با ویسکوزیته پایین ۳۲۲
۹-۶- دورنما ۳۲۶
پیوست‌ها ۳۲۸
مراجع ۳۳۱

فصل دهم: سوردایا ماکروسپورا (Sordaria macrospora) ۳۳۵
۱۰-۱- مقدمه ۳۳۷
۱۰-۲- بیولوژی عمومی ۳۳۸
۱۰-۳- مشخصات مرفولوژیکی، فیلوژنی و چرخه زندگی سوردایا ماکروسپورا ۳۳۸
۱۰-۴- تولید موتانتهای نازا به عنوان سویه‌های میزبان ۳۴۰
۱۰-۵- سوردایا ماکروسپورا به عنوان میزبانی ایمن برای بیان ژن هترولوگ ۳۴۲
۱۰-۶- تکنیک‌های ژنتیک مولکولی پیشرفته در مورد S.macrospora ۳۴۳
۱۰-۷- جداسازی و ویژگی توالیهای پروموتر قوی سوردایا ماکروسپورا ۳۴۵
۱۰-۸- سازمان‌دهی ناقلین برای بیان موثر ژن در سوردایا ماکروسپورا ۳۴۷
۱۰-۸- بیان موفق ژن گزارشگر EGFP نوترکیب در سوردایا ماکروسپورا ۳۵۲
نتایج ۳۵۶
پیوست‌ها ۳۵۷
مراجع ۳۵۹

فصل یازدهم: سلول‌های پستانداران ۳۶۳

۱۱-۱- چرا سلول‌های پستانداران برای بیان ژن‌های هترولوگ استفاده می‌شوند؟ ۳۶۴
۱۱-۲- دودمان‌های سلولی پستانداران برای تولید پروتئین ۳۶۵
۱۱-۳- سیستم‌های بیان در سلول‌های پستانداران ۳۶۷
۱۱-۳-۱- طراحی واحد بیان پایه ۳۶۷
۱۱-۳-۲- بیان ناپایدار و حامل‌های اپی‌زومی: جایگزینی برای ادغام پایدار ۳۶۹
۱۱-۳-۳- ادغام پایدار در داخل ژنوم میزبان ۳۷۱
۱۱-۳-۴- راهبردهای انتخاب برای سلول‌های پستانداران ۳۷۳
۱۱-۳-۵- نشانگرهای انتخابی اکسوتروفی و تکثیر ژن ۳۷۶
۱۱-۳-۶- جایگاه ادغام: شاخصی اصلی در مقدار بیان ۳۷۸
۱۱-۴- فرایندهای تخمیری مبتنی بر سلول پستانداران ۳۸۲
۱۱-۴-۱- تخمیر غیرمداوم و غیرمداوم همراه با خوراک‌دهی ۳۸۳
۱۱-۴-۲- تخمیر مداوم پرفیوژنی ۳۸۴
۱۱-۴-۳- تولید مداوم با بیوراکتورهای فیبر توخالی ۳۸۶
۱۱-۵- نتیجه‌گیری ۳۸۹
پیوست ۳۹۰
مراجع ۳۹۱

فصل دوازدهم: سلول‌های گیاهی ۳۹۵
۱۲-۱- بیولوژی عمومی سلول‌های گیاهی ۳۹۶
۱۲-۱-۱- برتری سلول‌های گیاهی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب ۳۹۶
۱۲-۱-۲- سنتز N – گلیکان در گیاهان ۳۹۷
۱۲-۲- توصیف سیستم بیان ۳۹۸
۱۲-۲-۱- سیستم کشت و میزبان‌های بیان ۳۹۸
۱۲-۲-۲- تهیه کشت معلق سلول‌ها ۳۹۹
۱۲-۲-۳- ذخیره و بازیافت بهینه پروتئین ۴۰۰
۱۲-۲-۴- طراحی ساختار بیان ۴۰۰
۱۲-۲-۵- پایداری پروتئین‌های خارجی ۴۰۳
۱۲-۲-۶- افزایش تجمع پروتئین با افزودنی‌های محیط کشت ۴۰۴
۱۲-۲-۷- سایر ویژگی‌های محیط کشت ۴۰۷

۱۲-۲-۸- روش‌های کشت و برداشت ۴۰۸
۱۲-۳- مثال‌هایی از تولید پروتئین‌های نوترکیب در کشت معلق سلول‌های گیاهی ۴۱۰
۱۲-۴- چگونگی کاربرد مدل دودمان‌های سلولی معلق توتون برای تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب ۴۱۲
۱۲-۵- نتیجه‌گیری ۴۱۷
پیوست‌ها ۴۱۸
مراجع ۴۱۹

فصل سیزدهم: ناقلین بیان ادغامی وسیع الطیف برای قارچ‌ها، بر اساس عناصر DNA ریبوزومی ... ۴۲۷
۱۳-۱- چرا ناقل بیانی طیف گسترده موردنیاز است؟ ۴۲۹
۱۳-۲- چه عناصری برای ناقل بیانی طیف گسترده لازم است؟ ۴۳۱
۱۳-۳- ساختار DNA ریبوزومی و کاربرد آن به عنوان هدف ادغام ۴۳۱
۱۳-۳-۱- سازمان‌دهی rDNA در مخمر ۴۳۲
۱۳-۳-۲- شاخصه‌های توالی rDNA ۴۳۴
۱۳-۴- تراریختی بر مبنای ادغام rDNA ۴۳۵
۱۳-۵- ادغام rDNA به عنوان ابزاری برای هدف‌گیری چندین کاست بیانی ۴۴۰
۱۳-۵-۱- ادغام هم‌زمان پلاسمیدهای گزارشگر در آ. آدنی‌نیوورانس ۴۴۱
۱۳-۵-۲- راهکارهای تولید ترکیبات دارویی با ادغام هم‌زمان ژن‌های مختلف ۴۴۱
۱۳-۶- نتیجه‌گیری و دورنما ۴۴۳
مراجع ۴۴۵

فصل چهاردهم: تخمیر مقایسه‌ای ۴۵۱
۱۴-۱- مقدمه ۴۵۴
۱۴-۲- اشریشیا کلی ۴۵۴
۱۴-۲-۱- محیط کشت‌ها و راهبردهای تخمیری ۴۵۵
۱۴-۲-۲- فرایند پایین‌دستی ۴۵۹
۱۴-۲-۳- مطالعه موردی: تولید GFP در تخمیر با تراکم سلولی متوسط اشریشیاکلی ۴۶۱
۱۴-۳- استافیلوکوکوس کارنوسوس ۴۶۱
۱۴-۳-۱- محیط کشت‌ها و راهبردهای تخمیر ۴۶۳

۱۴-۴- آرکسولا آدنینی‌وورانس ۴۶۴
۱۴-۴-۱- وضعیت حاضر محیط‌های کشت و راهبردهای تخمیری ۴۶۵
۱۴-۴-۲- توسعه محیط کشت و راهبردهای تخمیری ۴۶۶
۱۴-۴-۳- مطالعه موردی : تولید فیتاز خارجی در کشت فلاسک لرزان و تخمیر. غیرمداوم همراه با خوراک‌دهی همراه با تراکم سلولی بالای آ. آدنینی‌وورانس ۴۷۱
۱۴-۵- هانسنولا پلی‌مورفا ۴۷۲
۱۴-۵-۱- محیط کشت‌ها و راهبردهای تخمیری ۴۷۳
۱۴-۵-۲- فرایند پایین‌دستی ۴۷۶
۱۴-۵-۳- مطالعه موردی: تولید پروتئین ترشحی در اچ. پلی‌مورفا ۴۷۶
۱۴-۶- سورداریا ماکروسپورا ۴۷۸
۱۴-۶-۱- وضعیت حاضر محیط کشت‌ها و راهبردهای تخمیری ۴۷۹
۱۴-۶-۲- توسعه محیط‌های کشت و راهبردهای کشت غوطه‌ور ۴۸۰
پیوست‌ها ۴۸۶
مراجع ۴۹۶

فصل پانزدهم: واکسن‌های نوترکیب هپاتیت B: خصوصیات بیماری و تولید واکسن ۵۰۵
۱۵-۱- مقدمه ۵۰۶
۱۵-۲- ویروس و بیماری‌زایی آن ۵۰۷
۱۵-۲-۱- هپادنا ویروس‌ها ۵۰۷
۱۵-۲-۲- زیر تیپ‌های HBV ۵۱۴
۱۵-۲-۳- بیماریزایی ۵۱۷
۱۵-۲-۴- پاسخ ایمنی ۵۱۸
۱۵-۲-۵- واکسن‌های پیشگیری کننده از HBV ۵۲۰
۱۵-۳- تولید واکسن نوترکیب ۵۲۱
۱۵-۳-۱- مخمرها به عنوان ارگانیسم‌هایی برای تولید ۵۲۲
۱۵-۳-۲- ساخت سویه اچ. پلیمورفا بیان‌کننده آنتی‌ژن S هپاتیت B ۵۲۲
۱۵-۳-۳- فرایند تولید HBsAg حاصل از اچ. پلیمورفا ۵۲۵
۱۵-۴- هپاواکس‌ژن® ۵۳۱
۱۵-۴-۱- مطالعات پیش کلینیکی ۵۳۲

۱۵-۴-۲- مطالعات کلینیکی ۵۳۳
۱۵-۴-۳- واکسن پیشگیری‌کننده نسل دوم سوپرواکس ۵۳۵
۱۵-۵- واکسن‌های هپاتیت B: گذشته، حال و آینده ۵۳۶
۱۵-۵-۱- کاربرد و موفقیت واکسیناسیون پیشگیرانه هپاتیت B ۵۳۶
۱۵-۵-۲- نقایص کنونی واکسن‌های هپاتیت B ۵۳۶
۱۵-۵-۳- سایر راهکارهای واکسیناسیون ۵۳۹
۱۵-۵-۴- درمان هپاتیت مزمن ۵۴۳
۱۵-۵-۵- واکسن‌های ترکیبی ۵۴۴
۱۵-۶- نتایج ۵۴۵
مراجع ۵۴۶

فصل شانزدهم: ترکیبات دارویی بیولوژیک و محیط صنعت ۵۶۹
۱۶-۲- گزارش موفقیت‌های اولیه ۵۷۳
۱۶-۳- دشواری مسیر ۵۷۶
۱۶-۴- پیشرفت در بسیاری از زمینه‌ها ۵۷۷
۱۶-۵- بازارهای فروش در حال و آینده چگونه خواهند بود؟ ۵۸۵
۱۶-۶- پیشرفت کلینیکی داروهای بیولوژیکی ۵۸۹
۱۶-۷- انتقال دارو و مدیفیکاسیون پروتئین‌ها ۵۹۳
۱۶-۸- سیستم‌های بیان برای تولید تجاری دارو ۵۹۵
۱۶-۹- آیا تقاضا افزایش خواهد یافت؟ ۵۹۶
۱۶-۱۰- نتیجه‌گیری و چشم‌انداز آینده ۵۹۷
مراجع ۶۰۱

فهرست نمایه ۶۰۳

پیشگفتار مؤلف

تولید پروتئین‌ها، به ویژه فرایند تولید محصولات دارویی تحت‌الشعاع فناوری DNA قرار گرفته است. در آغاز این فناوری جدید فقط تعداد محدودی از میکروارگانیسم‌ها مد نظر بود، به طوری که اشریشیاکلی[1] از پروکاریوت و مخمر نانوایی ساکارومی‌سیس سروزیه[2] به عنوان میکروب یوکاریوتی برای چنین فرایندهایی به کار گرفته می‌شد. درباره این ارگانیسم‌ها گنجینه اطلاعاتی موجود، نشات گرفته از کاربرد ایمن آن‌ها در علوم و تحقیقات بود و در مورد مخمر، کاربرد آن در صنعت غذایی نیز دیده می‌شد. از این رو، محدودیت‌ها و موانعی وجود داشت که تحقیقات را به سمت ارگانیسم‌های دیگری ترغیب می‌کرد که قادر به برطرف کردن نیازها و تقاضاهای موجود برای بیان تعداد رو به رشد محصولات ژنی باشند. در نتیجه تعداد الگوهای بیان میکروبی و سلولی گسترش یافت. با این وجود، بیش‌تر محصولاتی که روانه بازار می‌شوند هنوز به تعداد محدودی ارگانیسم متکی بوده و اغلب ارگانیسم‌هایی که به صورت جدید تعریف شده‌اند، برای تحقیقات در دانشگاه‌ها به کار گرفته می‌شوند. به رغم ویژگی‌های ممتاز برخی از سیستم‌هایی که به صورت صنعتی استفاده می‌شوند، هنوز محدودیت‌ها و موانعی در توسعه فرایندهای خاص به چشم می‌خورد.

کتاب حاضر مروری جامع و مفصل بر سیستم‌های فعلی و سیستم‌هایی دارد که جدیداً تعریف شده‌اند و مقایسه وسیعی از گزینه‌های متداول با گزینه‌های جدید را در برمی‌گیرد. در این کتاب دو باکتری گرم منفی (سودوموناس فلورسانس و اشریشیاکلی)، باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس کارنوسوس، چهار گونه مخمر (آرکسولاآدنینی ورانس، هانسنولاپلی‌مورفا، پیشیاپاستوریس و یارویا لیپولی‌تیکا) و دو قارچ رشته‌ای (آسپرژیلوس سوژا و سورداریا ماکروسپورا) توصیف می‌شوند و در ادامه نظر اجمالی به بیان در سلول‌های پستانداران و گیاهان خواهد شد.

1- Escherichia coli
2- Saccharomyces Cerevisiae

پیشگفتار مترجمان

کتاب حاضر ترجمه‌ای است از کتاب:

"Production of recombinant Proteins, Novel microbial and Eukaryotic expression systems"

که نخستین بار در سال ۲۰۰۵ توسط پروفسور جرد جلیسن[1] از آلمان به لاتین تالیف شده است. در این کتاب به طور مفصل به معرفی انواع سیستم‌های بیان پروکاریوت و یوکاریوت اعم از سیستم‌های متداول و سیستم‌های جدید پرداخته شده و این سیستم‌ها را به طور مقایسه‌ای برای تولید محصولات نوترکیب بررسی کرده است. از این‌رو می‌تواند به خوبی سلایق و اهداف طیف وسیعی از اساتید، پژوهشگران و تولیدکنندگان محصولات پروتئینی نوترکیب را پوشش دهد.

تمامی تلاش گروه مترجمان در جهت رعایت امانت‌داری و حسن ترجمه آن به فارسی صورت گرفته است. با توجه به تعدد اصطلاحات علمی به کار برده شده، علیرغم چندین مرتبه بازخوانی امکان وجود اشکالاتی هست. بنابراین، راهنمایی خوانندگان کتاب و اساتید محترم می‌تواند ما را در رفع اشکالات موجود یاری رساند.

در خاتمه مراتب قدردانی خود را از همکاری علمی خانم‌ها، دکتر مریم شاه حسینی، دکتر سایه عبدالصمدی و دکتر فرزانه پورعسگری اعلام نموده و از آقای محسن زارعی که در تایپ و ویرایش این اثر کمال همکاری را نموده‌اند، سپاس‌گزاری می‌نماییم.

اسفند ماه ۱۳۸۷

1 - Gerd Gellissen

فصل اول

راهکارها و معیارهای انتخاب سیستم بیان

راهکارها و معیارهای انتخاب یک سیستم بیان

تولید پروتئین‌های نوترکیب از منطقی اقتصادی و کیفی تبعیت می‌کند که از طریق ویژگی‌ها و کاربردهای پیش‌بینی شده ترکیبات تولیدی هدایت می‌شود. برای تولید آنزیم‌های صنعتی یا افزودنی‌های خوراکی از طریق فناوری زیستی باید روشی فراهم شود که با تولید انبوه چنین محصولاتی از منابع صنعتی قابل رقابت باشد. در نتیجه، روش‌های تولیدی الزاما بایستی به گونه‌ای توسعه یابد که برای به کارگیری اصول کاملا موثر و متکی به کاربرد ترکیبات محیطی ارزان قیمت در فرایند تخمیر باشد. منطق حاکم برای تولید داروها و ترکیبات دیگری که برای مصارف انسانی در نظر گرفته می‌شوند، رعایت جوانب ایمنی محصول و دقت در تولید محصولات صحیح و درست است. با شکل‌گیری ژنومیک سیستماتیک که نتیجه آن افزایش تعداد اهداف ژنی در شاخه‌های مختلف صنعتی (به طور مثال صنعت دارویی، ر.ک فصل ۱۶) است، نیاز به سیستم‌های بیان مناسب نیز در حال افزایش است. هم اکنون تولید داروهای بیوتکنولوژی تایید شده به کاربرد میزبان‌های E.coli، چند نوع مخمر و سویه‌های سلولی پستانداران محدود می‌شود. در این کتاب، سیستم‌های بیان مختلف از پروکاریوت‌های گرم منفی و گرم مثبت، چند نوع مخمر و قارچ رشته‌ای تا سلول‌های پستاندارن و گیاهی توصیف می‌شوند که عمدتا انواع مختلف سلولی و ارگانیسم‌ها را در بر می‌گیرد. برخی از سیستم‌هایی که در اینجا معرفی می‌شوند، نقش چشمگیری در مسیر تولید پروتئین‌های ارزشمندی داشته‌اند که پیش از این روانه بازار شده‌اند. حال آن که، برخی دیگر به عنوان سیستم‌های جدیدی معرفی می‌شوند که در حال پایه‌گذاری هستند. ولی ثابت می‌شود که دارای پتانسیل بالقوه برای کاربردهای صنعتی هستند. تمام این سیستم‌ها دارای ویژگی‌های خاص و مطلوب بوده، در عین حال محدودیت‌ها و نقاط ضعفی نیز دارند، همان گونه که در سیستم‌های شناخته شده (که در تولید پروتئین‌های نوترکیب به کار می‌روند) نیز این محدودیت‌ها دیده می‌شود. از آن جایی که سیستم منفردی وجود ندارد که برای تمام پروتئین‌های ممکن آیده‌ال باشد، پیش‌بینی قطعی برای توسعه موفقیت‌آمیز چنین سیستمی، نتیجه نادرستی است که منجر به صرف زمان و سرمایه می‌شود. بنابراین بهتر است برای تولید پروتئین خاص در مقادیر و کیفیت بالا، توانایی چند ارگانیسم یا سلول انتخاب شده، به طور موازی مورد ارزیابی قرار گیرد (ر.ک.فصل ۱۳).

جدول ۱-۱) برخی از پارامترهای اصلی در انتخاب سیستم بیان خاص

سیستم بیان	رده‌بندی	توسعه سیستم	پیوندهای دی‌سولفید	گلیکوزیلاسیون	ترشح	هزینه‌های تخمیر	کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها	هزینه‌های ایمنی	فرایندهای توسعه یافته	محصولات روانه بازار
Mammalian Cells	یوکاریوت‌های عالی	توسعه کامل	بله	بله - مشابه انسانی	امکان‌پذیر	بالا	بی نیاز	بالا	مقیاس صنعتی	بله
Plant Cells	یوکاریوت‌های عالی	توسعه کامل	بله	بله - مشابه انسانی	امکان‌پذیر - محدودبه اندازه	متوسط	بی نیاز	پایین	مقیاس‌پایلوت	خیر
Sordaria macrospora	قارچ رشته‌ای	مراحل ابتدایی	بله	بله ـ ویژگی‌های دقیق ناشناخته است	امکان‌پذیر	پایین	بی نیاز	پایین پیش‌بینی می‌شود	مقیاس آزمایشگاهی	خیر
Aspergillus sojas	قارچ رشته‌ای	توسعه کامل	بله	بله ـ ویژگی‌های دقیق ناشناخته است	امکان‌پذیر	پایین	بی نیاز	پایین	مقیاس‌پایلوت	خیر
Arxula adeninivorans	مخمر دوریخت	مراحل ابتدایی	بله	بله ـ ویژگی‌های دقیق ناشناخته است	امکان‌پذیر	پایین	بی نیاز	پایین پیش‌بینی می‌شود	مقیاس آزمایشگاهی	خیر
Yarrowia lipolyltica	مخمر دوریخت	مراحل ابتدایی	بله	بله ـ ویژگی‌های دقیق ناشناخته است	امکان‌پذیر	پایین	بی نیاز	پایین پیش‌بینی می‌شود	مقیاس آزمایشگاهی	خیر
Pichia pastoris	مخمر متیلوتروف	توسعه کامل	بله	بله ـ بدون مانوز انتهایی با پیوند α-۱و۳	امکان‌پذیر	پایین	بی نیاز	پایین	مقیاس صنعتی	بله
Hansenula Polymorpha	مخمر متیلوتروف	توسعه کامل	بله	بله ـ بدون مانوز انتهایی با پیوند α-۱و۳	امکان‌پذیر	پایین	بی نیاز	پایین	مقیاس صنعتی	بله
Staphylococcus Carnosus	باکتری گرم مثبت	توسعه کامل	محدود	خیر	امکان‌پذیر	پایین	به طور خاص نیاز دارد	پایین	مقیاس‌پایلوت	خیر
Pseudomonas fluorescence	باکتری گرم منفی	توسعه کامل	بله ـ در پری‌پلاسم	خیر	ترشح پری‌پلاسمی	وابسته به پروموتر - پایین یا متوسط	بی نیاز	پایین	مقیاس‌پایلوت	خیر
Escherichia coli	باکتری گرم منفی	توسعه کامل	بله ـ در پری‌پلاسم	خیر	ترشح پری‌پلاسمی	وابسته به پروموتر - پایین یا متوسط	به طور خاص نیاز دارد	پایین	مقیاس صنعتی	بله

در ستون «سیستم بیان»[1] فهرست سیستم‌های ذکر شده در فصول مختلف این کتاب ارایه شده است. ستون «طبقه‌بندی»[2]، طبقه‌بندی جزیی این ارگانیسم‌ها را نشان می‌دهد. زمینه‌های رنگی نمایانگر پیچیدگی ارگانیسم مربوط است که به ترتیب در خاکستری روشن، متوسط و تیره افزایش می‌یابد. در ستون‌های بعدی جنبه‌های مثبت و منفی از طریق رنگ زمینه متمایز می‌شود، به طوری که رنگ روشن نمایانگر اعتبار منفی و خاکستری تیره، اعتبار مثبت است. در زمینه‌هایی با خاکستری متوسط، حالت حد واسط را نشان می‌دهد. ستون «توسعه سیستم»[3]، «مراحل اولیه»[4] و «کاملا توسعه یافته»[5] را

1- Expression System
2- Classification
3- Development of System
4- Early Stages
5- Completely developmented

متمایز می‌کند که توسعه یافته بیانگر دسترس‌پذیری کامل روش‌ها و عناصر مربوط به دست‌کاری ژنتیکی، بیان ژن مورد نظر و کنترل آن است و مراحل اولیه نشان‌دهنده توسعه ناتمام است.

در ستون «پیوندهای دی‌سولفیدی»[۱] و «گلیکوزیلاسیون»[۲] دو مورد از تغییرات پس ترجمه‌ای مشخص می‌شود که به ویژه در تولید پروتئین‌های هترولوگ حائز اهمیت است. عموما پروکاریوت‌ها، توانایی محدودی در ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی دارند و اگر یک یا چند پیوند دی‌سولفیدی برای فعالیت پروتئین مورد نظر لازم باشد، سیستم یوکاریوتی انتخاب مناسب‌تری است. اگر پروتئین برای کارکرد مناسب نیاز به N یا O-گلیکوزیلاسیون داشته باشد، پروکاریوت‌ها مناسب نیستند از این رو در تولید گلیکوپروتئین‌هایی که برای مصارف انسانی تهیه می‌شوند، باید احتیاط کرد. تا به حال نیز تنها سلول‌های پستانداران امکان ساخت گلیکوپروتئین‌های سازگار انسانی را دارا بوده‌اند. گلیکوپروتئین‌های حاصله توسط دو گونه مخمر متیلوتروف H.polymorpha و P.pastoris بدون مانوز انتهایی با اتصال α-۱و۳ هستند که تصور می‌شود آلرژن باشند. در مورد دو مخمر دیگر و قارچ‌های ذکر شده، ترکیب خاص گلیکوزیلاسیون آن‌ها تا به حال تعیین نشده و از این رو اعتبار آن‌ها به صورت منفی نشان داده شده است. «ترشح»[۳] پروتئینی خاص در تمام سیستم‌های ذکر شده مشخص شده است. البته در مورد دو باکتری گرم منفی E.coli و P.fluorescens ترشح به معنای تجمع محصول در فضای پری‌پلاسم است و رهایی کامل محصول مستلزم تجزیه غشای خارجی است. در سه ستون «هزینه تخمیر»[۴] و «کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها»[۵] و «هزینه ایمنی»[۶] به جنبه‌های عملی تولید پروتئین مورد نظر اشاره می‌شود. عموما هزینه‌های تخمیر در سلول‌های پستانداران (که بیش‌تر به علت هزینه‌های محیط است) بسیار بیش‌تر از سلول‌های گیاهی، قارچ‌ها، مخمرها و پروکاریوت‌ها است. البته کاربرد ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوزید[۷] (IPTG) که به عنوان القاکننده پروموتر

1- Disulfide Bonds
2- Glycosylation
3- Secretion
4- Costs of fermentation
5- Use of Antibiotics
6- Safety Costs
7- IsoPropylThioGalactopyranoside

مطرح است، باعث افزایش هزینه‌های تولید پروتئین در E.coli و P.fluorescens می‌شود که به صورت زمینه خاکستری متوسط دیده می‌شود. کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها در فرایند تخمیر، به طور فزاینده‌ای نامطلوب می‌شود. اگر هدف تولید پروتئین دارویی در E.coli یا S.carnosus باشد، سیستم پلاسمید/ میزبانی باید انتخاب شود که امکان بقای پلاسمید بدون کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها را فراهم کند. «هزینه‌های ایمنی» به قابلیت‌های یک سیستم تولیدی حامل عوامل بیماری‌زای انسانی اشاره دارد، به طوری که سیستم‌های سلولی مشتق شده از پستانداران در معرض بالاترین ریسک قرار دارند. به طور مثال به عنوان حاملین رتروویروس‌ها مطرح هستند. ستون «فرایندهای توسعه‌یافته»[1] بیانگر آن است که آیا فرایندهای مبتنی بر سیستم بیان خاص وارد مرحله پایلوت یا مقیاس صنعتی شده‌اند. «محصولات روانه بازار»[2] نشان می‌دهد که کدامیک از این سیستم‌ها پیش از این تمامی این موانع را گذرانده است.

فضای رقابتی سیستم‌های مورد نظر در جدول ۱-۱ نشان داده شده است. بین پیچیدگی پروتئین خاص و پیچیدگی و قابلیت سیستم بیان تطابق مختصری دیده می‌شود. پروتئین‌های دارای یک زیر واحد به راحتی در میزبان‌های باکتریایی تولید می‌شوند. حال آن که پروتئین‌هایی که به گلیکوزیلاسیون پیچیده و صحیح پستانداران و یا وجود پیوندهای دی‌سولفیدی نیاز دارند، مستلزم تولید در میزبان‌های یوکاریوتی هستند. البته تحقیقات جاری برای توسعه الگوهای بیانی، احتمالا میکروب‌های دیگری را با موقعیت رده‌بندی پایین‌تر نسبت به یوکاریوت‌ها معرفی خواهد کرد که برای تولید چنین محصولات پیچیده‌ای مناسب باشند. به طور مثال، سیستم‌های تولیدی مبتنی بر کاربرد E.coli به طور موفقیت‌آمیزی در فرایند تولید فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (t-PA) به کار گرفته می‌شوند (ر.ک.فصل ۲). هم‌اکنون اجزایی در اختیار گونه‌های مخمری متیلوتروف P. pastoris و H. polymorpha است که برای سنتز پروتئین‌هایی با گلیکوزیلاسیون هسته داخلی[3] یا پروتئین‌هایی با الگوی گلیکوزیلاسیون از نوع اتصال N برای انسانی کردن پروتئین استفاده می‌شود (ر.ک.فصل ۶ در مورد H. polymorpha و فصل ۷ در مورد P. pastoris).

1- Process Developed
2- Products on Market
3- Core glycosylated proteins

به طور کلی سیستم‌های میکروبی در مقایسه با سیستم‌هایی مبتنی بر یوکاریوت‌های عالی به لحاظ اعتبار و کنترل، سهل‌الوصول‌تر هستند. باکتری گرم منفی E.coli، نخستین ارگانیسمی بود که به علت سابقه طولانی به عنوان ارگانیسم آزمایشگاهی، آسان بودن دست‌کاری ژنتیکی آن و دسترس‌پذیری فرایند تخمیر، در تولید پروتئین نوترکیب به کار گرفته شد، ولی نقاط ضعف آن در ترشح پروتئین و عدم گلیکوزیلاسیون، محدودیت‌هایی را در استفاده عمومی آن اعمال می‌کند. به علاوه، محصولات نوترکیب در این باکتری اغلب به شکل آنکلوژن بادی[1] باقی می‌مانند. اگر چه آنکلوژن بادی، ماده آغازین مناسبی برای خالص‌سازی و فرایندهای فرودستی است، ولی غالبا پروتئین‌هایی به صورت نامحلول و توده‌هایی را شامل می‌شود که از لحاظ بیولوژیکی غیرفعال هستند که در این موارد به مراحل پیچیده و پرهزینه‌ای برای بازیافت دوباره محصول غیرفعال نیاز است. با این وجود، هنوز هم E.coli به عنوان گزینه‌ای برای تولید پروتئین‌های پیچیده مطرح است (ر.ک.فصل ۱۲) و هنوز محصولات دارویی زیادی وارد بازار می‌شوند که از E.coli مشتق شده‌اند.

P. fluorescens نمایانگر سیستمی است که به تازگی به عنوان باکتری گرم منفی دیگر تعریف شده است. برخی از ویژگی‌های مفید این ارگانیسم در فصل ۳ اشاره شده است که شامل عدم وابستگی به آنتی‌بیوتیک، توانایی ترشح پروتئین و تولید پروتئین به فرم محلول و فعال است.

S. carnosus نمایانگر باکتری گرم مثبت است که توانایی ترشح به محیط کشت را دارد. این سویه محدودیت‌های خاص سیستمی ندارد که اغلب در مورد باکتری‌های گرم مثبت برشمرده می‌شود؛ مانند تجزیه پروتئولیتیکی محصولات که به واسطه پروتئازهای مترشحه از میزبان صورت می‌گیرد و به عنوان اشکالی در کاربرد سویه‌های Bacillus subtilis مطرح است. در مورد S.carnosus پروتئازها در میان دیواره سلولی باقی می‌مانند و می‌توان با کاربرد یک لیپاز محافظ مشتق شده از S.hyicus به عنوان پیشرو در صدور پروتئین برای جلوگیری از تجزیه پروتئین در حین عبور از دیواره سلولی استفاده کرد. به علاوه با کاربرد این سویه، امکان ترشح پروتئین‌های هترولوگ

1- Inclusion bodies

چربی‌دوست نیز وجود دارد که به صورت اجزای داخل سلولی نامحلول به هنگام کاربرد میزبان‌های مخمر مانند H.polymorpha دیده می‌شوند. کاربرد احتمالی دیگر این سویه، قلاب کردن پروتئین‌های صادر شده به سطح میزبان از طریق توالی سیگنال انتهای کربوکسیل است. میکروب‌های نوترکیبی که چنین نمایش سطحی را ارایه می‌دهند، می‌توانند برای تولید واکسن‌های زنده و بیوکاتالیست‌ها مورد استفاده قرار گیرند (ر.ک. فصل ۴).

قارچ‌ها، ترکیبی از مزایای سیستم‌های میکروبی و یوکاریوتی مانند قابلیت تخمیر ساده و قابلیت ترشح پروتئین را دارند. قارچ‌های رشته‌ای مانند Aspergillus.sp به طور دقیق پروتئین‌های طبیعی را ترشح می‌کنند، ولی در موارد خاصی در ترشح پروتئین‌های نوترکیب دچار مشکل می‌شوند. بنابراین پروتئین‌های خارجی باید اجبارا به صورت پروتئین‌های ترکیبی تولید شوند تا محصول مورد نظر طی پردازش پروتئولیتیکی بعدی از آن جدا شود. به علاوه آسپرژیلوس معمولا اسپورهایی را تولید می‌کند که در فرایند تولید محصولات دارویی، نامطلوب هستند. با این وجود Aspergillus.sp به طور موثر در تولید فیتاز یا لاکتوفرین استفاده می‌شود. (ر.ک.فصل ۹). سویه S. macrospora بدون این اسپورهای نامطلوب بوده و از این رو به عنوان گزینه انتخابی برای تولید محصولات دارویی نوترکیب پیشنهاد می‌شود (ر.ک. فصل ۱۰).

این کتاب انتخاب سیستم‌های مختلف مخمر را نیز در بر می‌گیرد. مخمر ساکارومیسیس سروزیه که به صورت سنتی در صنعت پخت نان استفاده می‌شود، برای تولید HbsAg و انسولین مورد استفاده قرار گرفته‌اند که هر دو توسط FDA تایید شده‌اند. ولی نقاط ضعفی در کاربرد این سیستم وجود دارد، بدین ترتیب که S.cerevisiae باعث افزایش گلیکوزیلاسیون (هیپرگلیکوزیلاسیون) پروتئین‌های نوترکیب می‌شود و رشته‌های کربوهیدراتی با اتصال N به یک مانوز ختم می‌شوند که با پیوند α-۳،۱ به رشته متصل است و آلرژن محسوب می‌شود. ولی در دو سویه متیلوتروف مخمر، رشته‌های کربوهیدارتی با اتصال N به مانوزی ختم می‌شوند که با اتصال α-۲،۱ به رشته اتصال دارد و آلرژن نیست. به علاوه، میزان هیپرگلیکوزیلاسیون در آن‌ها در مقایسه با مخمر نانوایی کمتر است. هر دو سویه متیلوتروف به عنوان میزبان‌های تولیدکننده پروتئین‌های خارجی محسوب می‌شوند. در این میان

H.polymorpha به عنوان میزبان تولیدکننده پروتئین‌های صنعتی و دارویی با سیر رشد فزاینده‌ای به طور خاص، مطرح است. در این دو گونه، ابزار و لوازمی فراهم شده تا بتوان گلیکو پروتئین‌هایی را با الگوی گلیکوزیلاسیونی برای انسانی کردن پروتئین تولید کرد و امکان ترشح پروتئین‌هایی با گلیکوزیلاسیون داخلی را فراهم کرد (ر.ک. فصل ۶ و۷). به تازگی دو گونه دوریختی[1] Arxula adeninivorans و Yarrowia lipolytica به عنوان الگوهای بیان مشخص شده‌اند. ولی بایستی پتانسیل این سیستم‌های جدید در فرایندهای صنعتی به اثبات برسد. هر دو ارگانیسم دوریختی وابستگی به دما از خود نمایش می‌دهند و هیف (ریسه) در آن‌ها در دماهای بالاتر تشکیل می‌شود. در A.adeninivorans گلیکوزیلاسیون با اتصال O تنها در شرایطی انجام می‌گیرد که مخمر میزبان در حالت جوانه زدن قرار داشته باشد. (ر.ک. فصل ۵ و۸). همه مخمرها و شاید همه قارچ‌های رشته‌ای می‌توانند به طور موازی با کاربرد محدوده وسیعی از ناقلین برای تولید محصول مشخص، مورد ارزیابی قرار گیرند (ر.ک. فصل۱۳).

سلول‌های پستانداران (مانند CHO[2] یا BHK[3]) امکان اصلاح ترکیبات هترولوگ مطابق با الگوی پستانداران را به طور دقیق دارا هستند، ولی فرایند تخمیر در آن‌ها پرهزینه بوده و میزان محصول نیز بسیار کمتر از چیزی است که در سیستم‌های مختلف میکروبی حاصل می‌شود. همچنین سلول‌های پستانداران به طور بالقوه‌ای مستعد آلودگی با عوامل ویروسی هستند. از این رو کنترل دقیق تمام مراحل تخمیر و خالص‌سازی موردنیاز است. البته، این کنترل به راحتی با کاربرد بیوراکتورهای فیبر توخالی[4] امکان‌پذیر است که در فصل ۱۱ به آن اشاره شده است. تا به حال تولید ترکیبات صنعتی در این میزبان‌ها به داروهای گران قیمت محدود می‌شد؛ ولی در حال حاضر تولید موفقیت‌آمیز محصولات دارویی مانند آنتی‌بادی‌ها و مشتقات آن‌ها، محصولات خونی مانند فاکتور VIII به دلیل نیاز به گلیکوزیلاسیون صحیح با کاربرد سیستم کشت سلول پستانداران میسر شده است.

1- Dimorph
2- Chinese Hamster Ovary Cell
3- Baby Hamster Kidney Cell
4- Hollow Fiber Bioreactors

کشت سوسپانسیون سلولی گیاهان نیز بیش‌تر فواید گیاهان خشکی را دارا است و از این رو به عنوان گزینه‌ای برای تولید مقادیر کم یا متوسط پروتئین‌ها مطرح می‌شود. فواید کاربرد این سیستم‌ها شامل امکان تولید پروتئین‌ها تحت قوانین GMP، جداسازی پروتئین‌ها از محیط کشت به طور مداوم و کاربرد شرایط استریل است. البته اصلاحات زیادی در میزان تولید محصول و بهینه‌سازی فرایندهای پایین‌دستی[1] لازم است تا کاربرد این سیستم از لحاظ تجاری امکان‌پذیر شود (ر.ک. فصل ۱۲).

1- Downstream

فصل دوم

اشریشیاکلی (Esherichia.coli)

جوزف آلتن بوخنر[1] و رالف ماتیس[2]

1- Josef AltenBukhner
2- Ralf Mattes

فهرست ژن‌ها

Gene	Encoded gene product or function
adhE	alcohol dehydrogenase
araA,B,D	L-arabinose-specific metabolism, kinase, isomerase, epimerase
araC,I	L-arabinose-dependent regulators
araE	L-arabinose-specific transport
argU (*dnaY*)	arginine $tRNA_5^{[AGA/AGG]}$
atpE	membrane-bound ATP synthase, subunit c
cer	recognition sequence for the site-specific recombinase XerCD
dnaK,J	HSP-70-type molecular chaperone, with DnaJ chaperone
glyT	glycine $tRNA_2$, UGA suppression
grpE	GrpE heat shock protein; stimulates DnaK ATPase; nucleotide exchange function
hok	post-replicational killing by the gene product of the *parB* system of plasmid R1
ileX,Y	Isoleucine $tRNA_2$ and variant
int	integrase
lacZ,Y,I	lactose-specific β-galactosidase, permease and regulator (repressor)
leuW	leucine $tRNA_3$
lysT	lysine tRNA (multiple loci, *lysQTVWYZ*)
ompA	outer membrane protein 3a
ori (*oriC*)	origin of DNA replication (*E. coli* chromosome origin of replication)
parB	stability locus of plasmid R1 consisting of *hok* and *sok* genes
pelB	pectate lyase of *Erwinia carotovora*
proL	proline $tRNA_2$
recA	enzyme for general recombination and DNA repair; pairing and strand exchange
rhaA,B,D	L-rhamnose-specific metabolism, isomerase, kinase, aldolase
rhaR,S	L-rhamnose-dependent regulators
rhaT	L-rhamnose-specific transport
rop (*rom*)	repressor of primer (RNA organizing protein) of ColE1-type plasmids

Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eucaryotic Expression Systems. Edited by Gerd Gellissen
Copyright © 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
ISBN: 3-527-31036-3

Gene	Encoded gene product or function
rrnB,D,E	operons encoding ribosomal RNA and tRNAs
sacB	levan sucrase of *Bacillus subtilis*
sok	suppressor of post-replicational killing by *hok* gene product of plasmid R1
ssrA	tmRNA or 10Sa RNA
supE,F	(amber suppression); glutamine $tRNA_2$ (*glnV*); tandemly duplicated tyrosine $tRNA_1$ (*tyrTV*)
ter	terminus of DNA replication
trpR	regulator of *trp* operon and *aroH*
trxA,B	thioredoxin and thioredoxin reductase

۲-۱- مقدمه

باکتری گرم منفی اشریشیا کلی نخستین میکروارگانیسمی بود که به عنوان مدلی برای بررسی‌های ژنتیکی و زیست‌شناسی مولکولی و نیز به عنوان نخستین میکروارگانیسم در مهندسی ژنتیک و تولید پروتئین‌های نوترکیب به کار رفت.

اطلاعات ما درباره ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی، رشد، تکامل و ساختار ژنومی این باکتری از سال ۱۹۶۴ که نخستین تالیفات در مورد نقشه پیوستگی ژنی منتشر شد، رشد زیادی کرده است. تمامی دانش موجود امروزی در مورد این باکتری در مرجع استاندارد «اشریشیاکلی و سالمونلا» گرداوری شده است [۸۶] و هم اکنون به صورت آزاد در دسترس است. امروزه اشریشیاکلی از ارگانیسم مدل در تحقیقات آزمایشگاهی علوم پایه به میکروارگانیسم صنعتی تبدیل شده است که از هر پروکاریوت دیگری در سیستم‌های بیان بیش‌تر استفاده می‌شود. این باکتری به عنوان ارگانیسم استاندارد برای تولید آنزیم‌ها برای اهداف تشخیصی و آنالیزی و حتی برای سنتز پروتئین‌های دارویی به کار رفته است و این تنها به شرطی امکان‌پذیر است که پروتئین مورد نظر دارای چندین زیر واحد نباشد، یا نیاز به تغییرات پایه‌ای بعد از ترجمه نداشته باشد.

در طی چهل سال گذشته، رشد عظیمی در دانش و تجربه مربوط به صنعت تخمیر و تولید پروتئین‌ها در مقیاس بالا صورت گرفته است. سویه‌های زیادی از این باکتری در دسترس است که برای تولید پروتئین در سیتوپلاسم و یا پری‌پلاسم سازگار شده‌اند و هزاران ناقل بیان با پروموترهای قابل تنظیم مختلف و دنباله‌های[1] متنوع برای تخلیص کارآمد پروتئین طراحی و ساخته شده‌اند. به دلیل ویژگی‌های ساختاری منحصر به فرد ژن‌های ویژه و محصولات آن‌ها، بهینه‌سازی فرایندهای وابسته به E. coli اغلب خسته‌کننده به ویژه و به وقت و هزینه بالایی نیاز دارد. نقاط محدودکننده اصلی شامل ناپایداری ناقلین (به ویژه در طی تخمیر در مقیاس بالا)، بازده پایین مرحله آغاز و طویل شدن فرایند ترجمه، ناپایداری mRNA، سمیت محصول ژن و

1- Tag

مساله ناپایداری، هتروژنی و تاخوردگی نامناسب محصول پروتئینی هستند که به تولید پروتئین‌های غیرفعال می‌انجامد.

این فصل برخی از ویژگی‌های اصلی E.coli را به عنوان سلول میزبان توصیف می‌کند و روی بعضی از مشکلات مطرح شده متمرکز می‌شود و در نهایت پیشرفت‌های اخیر در غلبه بر این مسایل را بازگو می‌کند.

۲-۲- سویه‌ها، ژنوم و کشت

در پی توصیف اولیه اشریشیاکلی توسط T. Escherich در سال ۱۸۸۵، یک رده[1] از اشریشیاکلی K12 در سال ۱۹۲۲ جداسازی شد که در سال ۱۹۲۵ در دانشگاه استانفورد به نام «K۱۲» ثبت شد.

در اوایل سال‌های ۱۹۴۰، فردی به نام تاتوم[2] کارهایش را روی باکتری‌ها شروع کرد و نخسیتن جهش‌یافته اگزوتروف را جداسازی نمود. در سال ۱۹۶۶، دمرک[3] و همکارانش، فرهنگ‌نامه تعیین جایگاه‌های ژنی، جایگاه‌های جهش، پلاسمیدها و اپی‌زومها، فاکتورهای جنسی، صفات فنوتیپی و سویه‌های باکتریایی (که به مرور توسعه یافته بودند) را گردآوری و کددهی کردند. در سال ۱۹۹۸، مرجع مفیدی برای اصطلاح‌شناسی و شرح علائم قدیمی و جای‌گزینی اصطلاحات توسط برلاین[4] تدوین شد. این توصیفات که بر پایه نقشه‌های پیوستگی ژنی قدیمی نوشته شد. به کمک نقشه‌های فیزیکی دقیق امروزی مربوط به آن توسط رود[5] در سال ۱۹۹۸ کامل شد.

بکمن[6] در سال ۱۹۷۲، شجره‌نامه و توصیفی از سویه‌های استاندارد مختلف شامل سویه B اشریشیاکلی منتشر شد که در بیش‌تر آزمایشگاه‌های دنیا به کار می‌رود.

در ضمیمه این فصل، ویژگی‌های اصلی بیش‌تر سویه‌های وابسته و متداول خلاصه شده است که امروزه کاربرد دارند.

1- line
2- E.L. Tatum
3- Demerec
4- Berlyn
5- Rudd
6- Bachmann

نخستین توالی ژنومی کامل از یک سویه اشریشیاکلی توسط بلاتنر[1] و همکارانش در سال ۱۹۹۷ برای سویه MG1655 از K12 (۴۶۳۹۲۲۱ جفت نوکلئوتید) ثبت شد. تعیین توالی ژنومی سویه خویشاوند W3110 هنوز کامل نشده است، ولی حدود ۲ مگا باز از آن مقایسه شده است. بر پایه این مقایسه، نرخ تغییرات نوکلئوتیدی کمتر از ۷-۱۰ نوکلئوتید به ازای هر جایگاه نوکلئوتیدی در سال تخمین زده می‌شود. بنابراین درجه تفاوت بین دو سویه فوق به طور قابل ملاحظه‌ای پایین به نظر می‌رسد [۶۰]. بر پایه گزارش‌های آزمایشگاهی، این زیرسویه‌ها[2]، ۴۰ کم و بیش سال پیش از سویه W1485 مشتق شده‌اند [۹]. برای روشن شدن تفاوت‌های بین ژنوم سویه مرجع MG1955 و سویه‌هایی که امروزه به کار می روند روشی جای‌گزین برای تعیین توالی کل ژنوم به کار رفته است. به کمک آرایه‌های کل ژنومی[3] به عنوان ابزاری برای تعیین حذف‌ها، ماهیت واقعی سه حذف در سویه‌های انتخاب شده ویژه آشکار شد که پیش از آن مبهم بود. همچنین حذف دیگری که کاملا ناشناخته بود، توسط پیترز[4] و همکارانش در سال ۲۰۰۳ شناسایی شد.

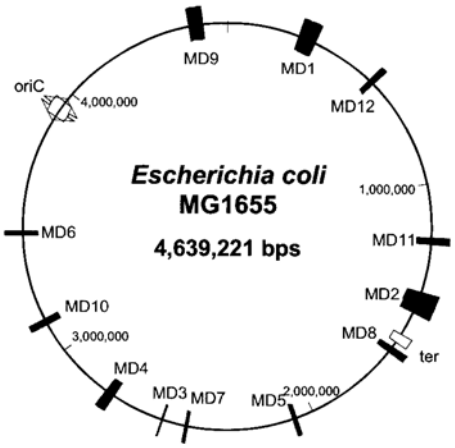
تلاش‌های انجام شده در رابطه با تعیین توالی ژنومی، امکان مقایسه توالی‌ها را با گونه‌های دیگر و نیز گونه‌های خویشاوند با اشریشیا کلی فراهم کرده است. این کوشش‌ها به ظهور این دیدگاه انجامید که نیروهای تکاملی، ژنوم باکتریایی را شکل می‌دهند.

این مقایسه‌ها، الگوهای تکان‌دهنده‌ای را نشان داده است که در آن‌ها صدها جزایر[5] اختصاصی برای هر سویه در یک اسکلت[6] عمومی جای گرفته‌اند. این اسکلت نوکلئوتیدی بسیار حفاظت شده است و ۹۸ درصد نوکلئوتیدهای آن در بین سویه‌ها یکسان است.

از دست دادن ژن و انتقال افقی ژن دو پدیده‌ای هستند که در شکل دادن ژنوم اشریشیا کلی اجدادی سهم زیادی داشته‌اند و نتیجه کارکرد آن‌ها، تنوع وسیع و طیف گسترده سویه‌های امروزی است که دارای آرایه‌های ژنی بسیار متفاوتی هستند [۹۷].

1- Blattner
2- Sub-strains
3- Whole- genome arrays
4- Peters
5- Islands
6- Backbone

بی تردید امروزه اشریشیا کلی دارای برخی از ژن‌ها است که کارکرد آن‌ها قابل صرف نظر کردن است و همین‌طور دارای ژن‌هایی است که برای اهداف آزمایشگاهی و تکنیکی لازم نیستند. عناصر ترانسپوزونی و پیش‌فاژهای مخفی[1] در سویه‌های صنعتی ممکن است حتی پایداری ژنوم را به خطر بیندازند. در نتیجه دانش ما از ژنوم به این مساله منجر شد تا با کاربرد ابزارهای دقیق مهندسی ژنوم، به خلق سویه‌های جدیدی بپردازیم [۱۳۵]. نخسیتن نتیجه چنین کاری، تولید سویه MDS12 از اشریشیا کلی بود که حاصل ۱۲ دوره حذف در ژنوم و شکل‌گیری دوباره ژنوم بوده است. این فرایند منجر به تولید ژنومی به اندازه ۴/۲۶۳ مگا باز شد که برابر با ۸/۱ درصد کاهش اندازه، ۹/۳ درصد کاهش در محتوای ژنی و حذف ۲۴ مورد از ۴۴ مورد عناصر ترانسپوزونی (انتقال‌پذیر) است (شکل ۲-۱) [۶۸]. همچنین نتایج این بررسی‌ها مشخص کرد که تعیین ویژگی‌های اولیه در MDS12 و مقایسه با سویه‌های والدینی، تغییرات فنوتیپی کمی را نشان می‌دهد. همچنین ویژگی‌های رشد و قابلیت تراریخت شدن[2] با سویه MG1655 یکسان است. این راهبردها فرصت‌های جدیدی برای طراحی گونه‌هایی با ویژگی‌های مطلوب فراهم کرده است.



شکل ۲-۱) جابه‌جایی حذف‌های MD1 تا MD12. روی نقشه حلقوی ژنوم MG1655 منشا همانندسازی (Ori C) و ناحیه خاتمه (Ter) مشخص شده‌اند [۶۸].

1- Cryptic Prophages
2- Transformability

کشت اشریشیاکلی نخستین بار در سطح آزمایشگاهی در دانشگاه‌ها پایه‌گذاری شد. تفاوت‌های مشاهده شده در رفتار جهش‌یافته‌ها و سویه‌های گوناگون این باکتری، دانشمندان را بر آن داشت روش‌های ژنتیکی ویژه‌ای را ابداع کنند تا سویه‌های جدیدی خلق شود که با شرایط خاصی سازگار هستند. تبدیل E.coli به میکروارگانیسم صنعتی موجب شد تا تحقیقات و پیشرفت‌های بیش‌تری پایه‌گذاری شود و استاندارد امروزی تراکم بالای سلولی[1] (HCD) در کشت باکتری بنا نهاده شود [۷۴، ۹۶ و ۱۳۱]. همانند پلاسمیدهای بیان متنوعی که هر یک به سویه جهش‌یافته ویژه خود به عنوان میزبان نیاز دارند، دستورالعمل‌های[2] تخمیری نیز که برای سویه‌های مختلف اشریشیاکلی توسعه یافته‌اند تفاوت زیادی با هم دارند.

جزییات این دستورالعمل‌ها برای سویه‌های مختلف E.coli همچون W3110 K12، HB101 و BL21 (و موتانتهای آن) در دسترس است [۱، ۵۶ و ۱۰۰].

یکی از مشکلات اصلی در توسعه روش‌های کشت با تراکم بالای سلولی، تمایل اشریشیاکلی در تولید استات است که مهارکننده رشد باکتری‌ها است [۷۹]. پایه تمایل باکتری به تولید استات و جزییات آن روشن شده است [۶۷] و چندین راهکار برای جلوگیری از این مساله تدارک دیده شده است. برای مثال کاربرد متیل ـ آلفا ـ گلوکزید به عنوان منبع کربن [۳۳] برای باکتری، این مشکل را برطرف خواهد کرد. سرانجام کاربرد ابزار مهندسی متابولیک که از آنزیم استولاکتات سنتتاز[3] بهره می گیرد که از باکتری باسیلوس سوبتیلیس گرفته شده است.[۵] یا با کاربرد مکانیسم کنترل پس‌گرا[4]، تغذیه با گلوکز به عنوان روش‌های استاندارد پیشنهاد می‌شود [۱].

۲-۳- ناقلین بیان[5]

یک ناقل بیان به طور معمول دارای منشا همانندسازی (ori)، شناساگر[6] مقاوم به آنتی‌بیوتیک و کاست بیان[7] برای نسخه‌برداری تنظیم شده و ترجمه ژن موردنظر است.

1- High Cell Density
2- Protocols
3- Acetolactate Synthetase
4- Feed – back
5- Expression Vectors
6- Marker
7- Expression Cassette

همچنین ناقل بیان ممکن است دارای ویژگی‌های دیگری شامل وظایف پایدارکننده پلاسمید و ژن‌ها یا ساختارهای DNA باشد که در جابه‌جایی و انتقال پلاسمید به سویه‌های دیگر دخالت دارند.

باید یادآوری کرد که سیستم ناقل مشتق از پلاسمید شبهColE1[1] به نام pMB1 بیش از سایر ناقلین به کار رفته است[۱۸].

۲-۳-۱- همانندسازی ناقلین مشتق از pMB1

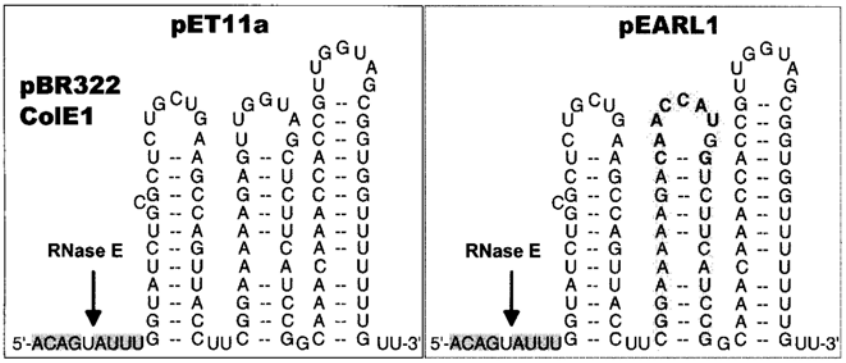
پلاسمید pMB1 برای همانندسازی به RNA پلیمراز و DNA پلیمراز I نیاز دارد. همانندسازی توسط RNA آنتی‌سنس (RNA I) کنترل می‌شود که به پیش‌ساز RNA پرایمر (RNA II) متصل می‌شود و بدین ترتیب از کارکرد RNaseH و در نتیجه از بلوغ و کامل شدن پرایمر جلوگیری می‌کند. در مرحله بعد پروتئین کوچکی به نام ROP که توسط پلاسمید کددهی می‌شود، به مجموعه[2] RNA I و RNA II متصل شده و آن را پایدار می‌کند[۱۲۱]. حذف ژن rop، همانند آنچه در مورد پلاسمیدهای خانواده PUC انجام شده است[۱۲۹]، تعداد کپی پلاسمیدها را در سلول از ۵۰ به ۱۵۰ افزایش می‌دهد. افزایش تعداد کپی در هنگام تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب نیز دیده شده است. در چنین مواردی، مصرف بیش از حد اسیدهای آمینه به تجمع tRNA های شارژ نشده منجر می‌شود. به دلیل همولوژی توالی این tRNAها با RNA I [۱۳۰] میان‌کنش RNA I و RNA II دچار اختلال می‌شود و این مساله موجب تکثیر DNA پلاسمیدی می‌شود. افزایش تعداد کپی (تا ۲۵۰ پلاسمید به ازای هر سلول و بیش‌تر) موجب افزایش بیش‌تر کپی ژن نوترکیب می‌شود.

در نهایت این مساله ممکن است ظرفیت متابولیکی سلول‌ها را متاثر سازد و به نوبه خود سنتز پروتئین را متوقف کند. سیستم‌های بیانی قوی همچون سیستم T7 آمادگی این پدیده را دارند.

به تازگی ناقل جدیدی از نوع ColE1 ساخته شده که در آن ناحیه‌ای از RNA I (که به احتمال خیلی زیاد با tRNA های شارژ نشده میان‌کنش می‌دهد)، تغییر یافته

1- COLE1- like plasmid
2- Complex

است (شکل ۲-۲). در حقیقت با این پلاسمید جدید، تعداد کپی طی سنتز پروتئین در مقیاس انبوه، ثابت می‌ماند [۴۹].



شکل ۲-۲) ساختار لوپ ـ ساقه[1] در RNA I که به عنوان آنتی‌سنس مهارکننده برای پرایمر RNA II عمل می‌کند. نیمه عمر RNA I به وسیله جایگاه برش RNaseE تعیین می‌شود. به نظر می‌رسد، tRNAهای بدون اسید آمینه (شارژ نشده) با RNA I و یا RNA II میان‌کنش داده و کمپلکس کنترل‌کننده را از بین می‌برد و در نتیجه DNA پلاسمیدی بیش از حد تکثیر می‌شود. تغییر در لوپ ۲ (PEARL1) منجر به پایداری تعداد کپی ناقلین مشتق از ColE1 می‌شود [٤٩].

۲-۳-۲- جداسازی پلاسمید در داخل سلول[2]

بسیاری از سویه‌های اشریشیاکلی که برای نرخ بالای تراریختی[3] انتخاب شده‌اند، با تشکیل کم بیوماس[4] در طی تخمیر با تراکم بالای سلولی (HCD) شناخته می‌شوند [۷۴].

در سویه‌های قوی‌تر مثل E.coli W3110، هر چند که ناقلین بیان مشتق از ColE1 ناپایدار هستند، تراکم بالای سلولی قابل دست‌یابی است [۱۲۷]. بیش‌تر این ناپایداری را می‌توان به ویژگی +recA بودن [قابلیت نوترکیب شدن] سویه میزبان نسبت داد. معمولا در سویه‌های نوترکیب شونده قوی، پلاسمیدهای دارای تعداد کپی

1- Loop-Stem
2- Plasmid Partitioning
3- transformation
4- Biomass

بالا، دچار نوترکیبی هموLوگ[1] می‌شوند. این رویداد، آن‌ها را به پلاسمیدهای دوتایی با اتصال سر به دم (انتهای پلاسمید به ابتدای بعدی و برعکس) تبدیل می‌کند.

این دایمرها می‌توانند دوباره به حالت مونومر تبدیل شوند و یا این که در یک نوترکیبی هموLوگ شرکت کرده و تشکیل ساختارهای چهارتایی یا بیش‌تر بدهند. چون تعداد منشا همانندسازی یا توالی‌های ori در میزان همانندسازی موثر است، ممکن است میزان همانندسازی دایمر دو برابر باشد و در نتیجه جمعیت پلاسمیدی غالب را تشکیل دهد. در مورد انواع پلاسمیدهای چندتایی[2] به دلیل از بین رفتن کنترل و کامل نشدن چرخش دور همانندسازی این فرایند دچار کندی می‌شود [۱۱۸]. در سیستم‌هایی شبیه پلاسمیدColE1 که سلول‌های دختری حاصل از تقسیم پلاسمیدها به صورت تصادفی توزیع می‌شوند و به عبارتی جداسازی درون سلولی نشده‌اند، ناپایداری پلاسمیدی و کاهش تعداد کپی بیش‌تر دیده می‌شود.

این بدان معنی است که مولتی‌مرها در سلول‌های خاص تجمع یافته و زیرجمعیتی[3] از سلول‌ها را به وجود می‌آورند که میزان از دست دادن پلاسمید در آن‌ها بیش‌تر است. برای جلوگیری از این پدیده، پلاسمید ColE1 دارای توالی قابل تشخیص به نام Cer است که توسط آنزیم ریکامبیناز[4] (با ویژگی جایگاه) به نام Xer CD شناسایی می‌شود. این آنزیم توسط کروموزوم باکتری کد می‌شود و با اتصال به توالی Cer و به کمک چندین پروتئین کمکی، دایمرها (چه به شکل کروموزومی و چه پلاسمیدی) را به منومر تبدیل می‌کند [۳۵]. به علاوه یک پروموتر در ناحیه ۲۴۰ جفت بازی cer قرار گرفته است که ساخته شدن یک نسخه ۹۵ نوکلئوتیدی را هدایت می‌کند. احتمالا این نسخه ۹۵ نوکلئوتیدی که Rcd نام دارد، تقسیم سلول‌های دارای ساختارهای پلاسمید مولتی‌مر را به تاخیر می‌اندازد [۱۱۱].

عمده ناقلین کلون‌سازی و بیان نوعColE1، توالی Cer با کارکرد مطلوب ندارند. نبود این توالی روی سویه‌های باکتریایی recA- که در آن‌ها امکان تشکیل ساختارهای مولتی‌مر وجود ندارد، تاثیری ندارد. برعکس، همین نقص در سویه‌های باکتریایی

1- Homologous Recombination
2- Multimers
3- Sub-population
4- Recombinase

+Rec همچون سویه W3110 مشکل‌ساز است. به عنوان مثال در سویه نوترکیب W3110 دارای ناقل بیان القاشونده توسط L- رامنوز، در شرایط نبود توالی Cer در ساختار پلاسمید و نبود فشار انتخابی آنتی‌بیوتیک، پس از فرایند تخمیر غیرمداوم همراه با خوراک‌دهی[1]، ۵۰٪ سلول‌ها، پلاسمیدشان را از دست می‌دهند. برعکس در صورت وجود توالی Cer در ساختار پلاسمید، بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها، پلاسمیدشان را حفظ می‌کنند.

پس از جداسازی پلاسمید از بیومس مشخص شد که تمامی پلاسمیدهای بدون توالی Cer، به صورت مولتی و در حالی که بیش از ۹۰٪ پلاسمیدهای دارای Cer به فرم منومر بودند [۱۲۷]. ابزار دیگر پایدارسازی پلاسمیدها، کاربرد سیستم کشته شدن بعد از جدایی[2] است که اصطلاحا به آن مدل اعتیاد نیز گفته می‌شود. این سیستم ابقای پلاسمید، از لکوس ژنی پایداری ParB در پلاسمید R1 الهام گرفته شده است و شامل دو ژن (کشنده میزبان)[3] و Sok (جلوگیری‌کننده از کشته شدن میزبان)[4] است. ژن hok پروتئینی بسیار سمی برای سلول کد می‌کند، در حالی که ژن sok، نسخه‌ای از mRNA می‌سازد که مکمل mRNA مربوط به hok بوده و پس از اتصال و جفت شدن با آن، از ترجمه محصول ژن hok جلوگیری می‌کند. mRNA مربوط به hok پایدار است، ولی نسخه sok ناپایدار است. بنابراین هنگامی که پلاسمید در سلول از دست برود، به دلیل عدم پایداری و در نتیجه تجزیه سریع‌تر محصول sok، نسخه mRNA مربوط به ژن hok با تولید پروتئین سمی، سلول بدون پلاسمید[5] را از بین می‌برد [۸۵]. در مجموع این سیستم پایدارکننده پلاسمید نیست، بلکه از تکثیر سلول‌های بدون پلاسمید جلوگیری کرده و آن‌ها را حذف می‌کند. کاربرد چنین روش‌هایی در سیستم‌های بیان ناپایدار، ممکن است به کاهش رشد سلول‌ها بیانجامد و حتی به مشکلات بار متابولیکی سلول بیفزاید. اگر پروموتر به طور قوی تنظیم نشود یا محصول ژن برای سلول زیان‌آور باشد، برای کمک به کاهش بار متابولیکی که در اثر

1- Fed-batch fermentation
2- Post- segregational killing system
3- Host killing (hok)
4- Suppressar of Host killing
5- Plasmid - Free cell

آن به سلول‌ها وارد می‌شود، پروموترهایی پایدارتر باقی می‌مانند که تعداد کپی کمتری دارند. این مساله هنگامی اهمیت بیش‌تری دارد که از یک پروموتر قوی برای بیان ژن استفاده می‌شود. بیش‌تر پلاسمیدهای نوع ColE1 با تعداد کپی پایین از پلاسمید p15A مشتق شده‌اند که پلاسمیدهای pACYC177 و pACYC184 از آن جمله‌اند [۳۱]. برای بیان ژن در گونه‌های مختلف می‌توان از ناقلین وسیع‌الطیف[1] از نظر میزبانی مثل RSF1010 استفاده کرد که تعداد کپی متوسطی دارند و دارای انواع مختلف کنترل همانندسازی می‌باشند [۱۰۸]. ناقلین دیگر نیز حتی با تعداد کپی پایین‌تر وجود دارند که شامل مشتقات pSC101 [۱۲۰]، RK2 [۱۱۰] یا پلاسمید F [۶۱] هستند. همچنین این پلاسمیدها از چند جنبه سازگار می‌باشند و حتی می‌توان از آن‌ها برای بیان چند ژن هم‌زمان در یک سلول بهره برد. اگر لازم باشد دو یا چند ژن در داخل سلول به طور هم‌زمان بیان شوند، می‌توان این دو ژن را به صورت سر به دم به دنبال هم در پایین‌دست پروموتر قرار داد. اگر کارایی ترجمه ژن‌های مورد نظر یا فعالیت آنزیم‌های کد شده نامتعادل باشد، ساده‌ترین راه برای بهبود شرایط تولید، کاربرد ناقلین با تعداد کپی متفاوت است که مدل‌های بیان مشابهی دارند. همچنین برای بیان هم‌زمان دو یا چند ژن در یک سلول، بایستی در مرحله انتخاب، پلاسمیدهای مورد نظر دارای ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک متفاوتی باشند. به عنوان مثال، برای تولید انتخابی اسیدهای آمینه از هیدانتوئین‌های راسمیک[2] باید آنزیم‌های هیدانتوئیناز، کربامویلاز[3] و راسماز که فعالیت ویژه آنزیمی آن بیش از ده برابر با یکدیگر تفاوت دارد، در همان سلول تولید شود [۱۲۷]. در بررسی فوق، ژن‌های مختلف متعلق به آنزیم‌ها، به داخل یک کاست بیان القاشونده با L- رامنوز الحاق شدند که در مشتقات پلاسمیدهای pACYC184، pSC101 و pBE322 قرار داشت. ترکیبات مختلف این پلاسمیدها به سویه‌های گیرنده وارد شد و در نهایت راکتورهای سلولی با چرخه مناسبی از واکنش‌ها، بهینه‌سازی و توسعه داده شد.

1- Broad - host range vector
2- Racemic hydantoins
3- Carbamoylase

۲-۳-۳- مهندسی ژنوم

در بسیاری از موارد، قرار دادن ژن‌ها در نقاط ویژه‌ای از کروموزوم نسبت به کاربرد پلاسمیدها ارجحیت دارد. این مساله هنگامی اهمیت بیش‌تری دارد که از پروموترهای بسیار قوی برای جبران کم بودن تعداد کپی ژن استفاده می‌شود [۸۱]. هم‌اکنون برای اشریشیاکلی چندین سیستم الحاقی[1] وجود دارد. به عنوان مثال ناقل pKO3 ممکن است برای داخل کردن و الحاق ژن در کروموزوم توسط روش نوترکیب همولوگ در سویه‌هایی مورد استفاده قرار گیرد که +Rec هستند. این ناقل در همانندسازی خود حساس به حرارت بوده و دارای ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک و نیز ژن sacB است که به لوان سوکراز[2] کد می‌شود. کاست بیان به همراه ژن مورد نظر که در دو انتهای آن‌ها توالی‌های هدف کروموزومی قرار گرفته است، در پلاسمید pKO3 قرار داده می‌شوند و ناقل نوترکیب به داخل سویه اشریشیاکلی وارد می‌شود. در شرایط وجود آنتی‌بیوتیک و حرارت غیرمجاز برای تکثیر پلاسمید، سلول‌هایی انتخاب می‌شوند که پلاسمید الحاقی در آن‌ها وجود دارد. در مرحله بعد، سلول‌ها در شرایط وجود سوکروز کشت داده می‌شوند که برای سلول‌های دارای پلاسمید به دلیل وجود آنزیم لوان سوکراز کشنده است (انتخاب بر پایه وجود پلاسمید). نیمی از کلونی‌های بدون پلاسمید، ژن مورد نظر را به همراه کاست در ژنوم خود خواهند داشت و توالی دیگری از ناقل همراه آن نخواهد بود [۷۸]. نوع دیگری از الحاق ژنی مستقل از rec، سیستمی است که بر پایه نوترکیبی با ویژگی جایگاه[3] λ بنا نهاده شده است. در این سیستم، بیان به همراه ژن مورد نظر در داخل پلاسمید دارای جایگاه اتصال λ (attP) قرار می‌گیرند. به کمک هضم با آنزیم‌های محدودگر، جایگاه همانندسازی این پلاسمید از آن برداشته می‌شود و پس از اتصال دوباره، این ساختار به داخل سویه‌ای از اشریشیاکلی وارد می‌شود که در خود پلاسمید حساس به حرارت، دارای ژن اینتگراز[4] λ دارد. حلقه DNA وارد شده به داخل جایگاه کروموزومی attB الحاق می‌شود و سپس پلاسمید کمکی با رشد باکتری‌ها در شرایط حرارت غیرمجاز به تدریج حذف می‌شود [۷].

1- Integration
2 - Lavan sucrase
3 - Site- Specific recombination
4 - Integrase

در پایان راه جدیدی برای مهندسی DNA در اشریشیاکلی وجود دارد که نیاز به وجود جایگاه برش آنزیم‌های محدودگر[1] نداشته و به عبارتی مستقل از وجود recA است. این سیستم recET نام دارد. سویه‌های اشریشیاکلی که به دلیل جهش در ژن sbcA یا به علت قرار گرفتن recET تحت کنترل پروموتر دیگر، ژن recET را بیان می‌کنند قادرند قطعات DNA محصول PCR را جذب کرده و آن‌ها را در کروموزوم خود الحاق کنند. این رویداد به شرطی امکان‌پذیر است که دو انتهای محصول PCR دارای قطعات به طول ۴۰ تا ۶۰ جفت نوکلئوتید همولوگ با جایگاه هدف در کروموزوم باشد. این بدان معنی است که ژن موردنظر قادر است به طور پایدار به داخل هر ناحیه‌ای از کروموزوم وارد شده یا در ناقلین با تعداد کپی پایین یا زیاد وارد شود و تحت کنترل سیستم موجود در جایگاه وارد شدن خود در توالی هدف قرار گیرد و بنابراین نیازی به جایگاه برش برای آنزیم‌های محدودگر ندارد [۱۳۵].

ژن‌های آنتی‌بیوتیک که برای انتخاب و اطمینان از الحاق ژن استفاده می‌شوند نیز در مرحله بعد قابل حذف خواهند بود. به عنوان مثال می‌توان از اینتگرازهای ویژه برای توالی خاص بهره برد. به علاوه چنین روشی برای مهندسی سویه‌های خاص برای تولید پروتئین‌های نوترکیب بسیار مفید است، به طوری که مثلا می‌توان ژن پروتئازها یا RNase ویژه‌ای را به صورت هدف‌گیری شده غیرفعال کرد (مقایسه ساخت MDS12 در شکل ۲-۱؛ [۶۸]).

۲-۳-۴- پروموترهای اشریشیاکلی

پروموترها، توالی‌هایی از DNA هستند که اتصال RNA پلیمراز و شروع نسخه‌برداری را رهبری و جهت‌دهی می‌کنند. آن‌ها معمولا دارای دو توالی شش‌تایی ۱۰- و ۳۵- هستند که توسط توالی فاصله‌گذار[2] ۱۶ تا ۱۹ تایی از هم جدا شده‌اند.

زیرواحد سیگما، پروموتر ویژه‌ای را به RNA پلیمراز معرفی می‌کند [۳۸]. باکتری اشریشیاکلی دارای هفت فاکتور سیگمای مختلف و در نتیجه هفت نوع پروموتر است. فاکتور سیگمای ۷۰، متداول‌ترین فاکتوری است که در شناسایی پروموتر به کار می رود. شروع نسخه‌برداری را می‌توان به چهار مرحله اصلی تقسیم‌بندی کرد[۶۴]: ۱)

1 - Restriction
2 - Spacer

تشخیص توالی پروموتر توسط مجموعه کامل آنزیم RNA پلیمراز[1] ۲) ایزومریزاسیون کمپلکس شروع به‌صورت تغییر شکل فضایی به گونه‌ای که قادر به آغاز نسخه‌برداری باشد. ۳) آغاز سنتز RNA و ۴) تبدیل کمپلکس آغازین به کمپلکس طویل‌سازی و خالی شدن ناحیه پروموتر.

تماس اولیه بین RNA پلیمراز و پروموتر منجر به تشکیل کمپلکس باز[2] می‌شود که در طی آن رشته‌های DNA در محدوده نقطه شروع سنتز RNA در موقعیت ۱+ باز می‌شود. در کمپلکس باز، آنزیم RNA پلیمراز ناحیه ۵۰- تا ۲۰+ را پوشانده است [۸۳]. پروموترهای قوی مربوط به فاکتور سیگما ۷۰ در نواحی ۱۰- و ۳۵- توالی‌هایی دارند که به ترتیب بسیار شبیه توالی‌های حفاظت شده TAATAT (در ۱۰-) و TTGACA (در ۳۵-) است. ویژگی دیگر آن فاصله بین ۱۰- و ۳۵- است که بهترین طول این ناحیه ۱۷ نوکلئوتید است و البته نوع نوکلئوتیدهای توالی فاصله گذار اهمیت کمتری دارد. نواحی دیگری که قدرت پروموتر را تحت تاثیر قرار می‌دهند، یکی ناحیه غنی از AT در بالادست توالی ۳۵- (حدود موقعیت ۴۳-) و دیگری ناحیه ۱+ تا ۲۰+ است که به نظر می‌رسد به ترتیب در تشخیص ناحیه پروموتری و خالی شدن ناحیه پروموتری نقش دارند.

هر یک از چهار مرحله در شروع نسخه‌برداری می‌توانند محدودکننده کارکرد و سرعت پروموتر باشند و این بدان معنی است؛ پروموترهایی که قدرت مشابه دارند، می‌توانند توالی‌های کاملا متفاوتی داشته باشند که بستگی به بهینه‌سازی هر یک از چهار مرحله دارد. در حقیقت بیش‌تر پروموترهایی که در اشریشیاکلی یافت شده‌اند، در توالی‌های ۶ تایی حفاظت شده، تفاوت‌های زیادی دارند. دلیل روشنی برای چنین تفاوت‌هایی این است که محصولات ژنی در مقادیر متفاوتی موردنیاز هستند. حتی از این مساله مهم‌تر این است که پروموترها با توالی‌های تنظیمی هم‌پوشانی دارند.

دو یا تعداد بیش‌تری پروموتر که ممکن است توسط فاکتورهای سیگمای یکسان و یا متفاوت شناسایی شوند را می‌توان به صورت سر به دم قرار داد، تا سلول بتواند به علائم ویژه پاسخ دهد و به شرایط فیزیولوژیکی درون خود نیز پاسخگو باشد.

---

1 - Holoenzyme RNA Polymerase
2 - Open Complex

در گذشته کوشش‌های زیادی برای کاربرد پروموترهای طبیعی در ناقلین بیان صورت گرفته است. هدف این تلاش‌ها، خلق عناصر مناسب برای رسیدن به حدبیش‌تر کارایی و تنظیم دقیق است تا بیش‌ترین میزان تولید پروتئین را منجر شود و ناپایداری پلاسمیدی را کاهش دهد.

معماری پروموتری کاملا متفاوت در برخی فاژهای لیزکننده مثلT3، T5 یا T7 وSP6 یافت شده است. این فاژها، RNA پلیمراز خود را کد می‌کنند که از نظر ساختاری بسیار ساده‌تر از آنزیم‌های نوع میزبان است. این پلیمرازها بسیار فعال‌ترند و نواحی حفاظت شده‌ای از موقعیت‌های ۱۷- تا ۶+ را می‌پوشانند. این پروموترها، قوی‌ترین نوع شناخته شده در میکروارگانیسم‌ها هستند که به طور گسترده‌ای در ناقلین بیان استفاده شده‌اند و در شرایطی که در نزدیکی آن‌ها توالی‌های تنظیمی طبیعی مربوط به پروموتر اشریشیاکلی قرار داده شود برای بیان ژن در شرایط آزمایشگاهی و سایر کاربردها مناسب هستند [۴۴ و ۱۰۳].

۲ -۴ - تنظیم بیان ژن

بیان ژن هترولوگ[1]، به طوری که حدود ۳۰ درصد پروتئین تام سلول از یک نوع باشد، به طور قطع به ناپایداری ژنتیکی بالایی می‌انجامد. بنابراین پروموترهای به کار گرفته در ناقلین بیان، بایستی در طی رشد باکتری به طور مطمئنی قابل تنظیم باشند و تنها هنگامی که سلول‌ها به بیشینه تراکم سلولی رسیدند، ژن‌ها روشن شوند و پروموترها عمل کنند. مکانیسم‌های متفاوتی برای تنظیم بیان ژن در طبیعت شناسایی شده است. اتصال پروتئین تنظیمی به پروموتر، احتمالا مرسوم‌ترین نوع آن‌ها است، ولی مکانیسم‌های دیگری همچون کاهش نسخه‌برداری[2]، RNA آنتی سنس، مکانیسم ضدخاتمه، تغییر در فاکتورهای سیگما و کاربرد فاکتورهای ضدسیگما وجود دارد. شرایطی که می‌توانند باعث تغییر در فعالیت پروموتر شوند، بی‌شمار هستند. مثال‌های دلخواه می‌تواند شامل مواردی همچون تغییر در دسترسی به منبع کربن، نیتروژن، فسفات و سایر مواد معدنی و یا تغییر در درجه حرارت مناسب برای رشد،PH، ذخیره

1 - Heterologous gene expression
2 - Transcriptional attenuation

اکسیژن، اسمولاریته و شرایط جهش‌زا باشد[۱۰۵]. بسیاری از این راه‌ها برای استفاده در سیستم‌های بیان بررسی شده‌اند. با این حال در مقایسه با روش‌های یاد شده فوق، کاربرد پروتئین‌های تنظیمی که در پاسخ به شرایط محیطی همچون کاربرد منبع کربن یا دمای رشد به پروموتر متصل می‌شوند، برای تنظیم فعالیت پروموتر مرسوم‌تر است. اساسا پروتئین‌های متصل شونده به DNA می‌توانند فعالیت پروموتر را در دو راه مختلف تنظیم کنند: در سیستم‌های کنترل منفی، پروتئین مهارکننده به ناحیه پایین‌دست پروموتر متصل می‌شود و نسخه‌برداری را مستقیما مهار می‌کند. در پروموترهای با تنظیم مثبت، هم فاصله بین ۱۰- تا ۳۵- در حالت بهینه نیست و هم توالی‌های ۶ تایی حفاظت شده ۳۵- کاملا با حالت آیده‌ال و مناسب، متفاوت است. در چنین مواردی، وجود پروتئین‌های فعال‌کننده برای اتصال به RNA پلیمراز لازم هستند. هر دو نوع پروموتر با تنظیم مثبت و منفی را می‌توان به وسیله القا یا مهار کنترل کرد. در سیستم‌های القایی با کنترل منفی، یک افکتور (مولکول اثرگذار[1]) به مهارکننده یا رپرسور[2] متصل می‌شود و از اتصال آن به توالی اپراتور جلوگیری می‌کند. اپراتور جایگاه اتصال مهارکننده یا رپرسور است. در سیستم‌های القایی مثبت، فعال‌کننده‌ها در حضور مولکول‌های اثرگذار، تنها به توالی هدف خود متصل می‌شوند. بنابراین در مورد ژن‌های مقاوم به جیوه، فعال‌کننده MerR، در غیاب یون‌های جیوه به اپراتور متصل می‌شود، ولی تنها هنگامی که یون جیوه به آن متصل می‌شود، فعال باقی می‌ماند [۸۸].

در سیستم‌هایی که بر پایه مهار طراحی شده‌اند، شرایط برعکس است: رپرسور یا مهارکننده غیرفعال در حضور مولکول اثرگذار فعال می‌شود و به اپراتور خود متصل می‌شود و فعال‌کننده توسط مولکول اثرگذار غیرفعال می‌شود.

۲-۴-۱- کنترل منفی

بسیاری از پروموترها- به ویژه انواع متعلق به اپرون‌های کاتابولیسم کربوهیدرات- به هر دو شکل منفی و مثبت کنترل می‌شوند. بهترین مثال شناخته شده آن‌ها،

1 - Effector
2 - Repressor

پروموتر اپرون Lac[1] باکتری E.coli است که برای مصرف لاکتوز است. مهارکننده لاکتوز (LacI) به پایین‌دست پروموترLac (موقعیت۱+ تا ۲۱+) در شرایط عدم وجود لاکتوز متصل شده و نسخه‌برداری از ژن‌های LacZYA را مهار می‌کند. در حضور الولاکتوز- که از لاکتوز توسطβ- گالاکتوزیداز LacZ ساخته می‌شود- یا در صورت افزودن القای‌کننده سنتتیک IPTG (ایزوپروپیل ـ تیوگالاکتو پیرانوزید)، میل ترکیبی رپرسور به اپراتور از دست می‌رود. به علاوه، نسخه‌برداری به طور مثبت توسط پروتئین فعال‌کننده کاتابولیتی[2] (CAP) کنترل می‌شود. نسخه‌برداری موثر تنها زمانی میسر است که کمپلکس فعال‌کننده cAMP- CAP تشکیل شود که این کمپلکس به بالا دست ناحیه ۳۵- (حدود موقعیت ۶۵-) متصل می‌شود. تنها در غیاب گلوکز، سطحcAMP در سلول به اندازه کافی بالاست و نسخه‌برداری از اپرون لاکتوز انجام می‌گیرد. در شرایط وجود گلوکز، مصرف آن ارجحیت دارد. زمانی که هر دو کربوهیدرات به طور هم زمان به سلول اضافه شوند، رشد تغییر نکرده و مشابه رشد در شرایط وجود گلوکز است.

هنوز هم مشتقات پروموتر لاکتوز در ناقلین بیان اشریشیاکلی کاربرد دارند. یکی از پیشرفت‌هایی که در بهبود پروموترLac حاصل شد، ادغام ناحیه ۳۵- از پروموتر اپرون تریپتوفان trp با ناحیه ۱۰- پروموتر Lac بود (در واقع قبل از آن پروموتر بهبود یافته lacUV5 استفاده شد). در پروموترtac جدید، طول ناحیه فاصله‌گذار ۱۰- و ۳۵-، ۱۶ جفت باز و در پروموترtrc، ۱۷ جفت باز بود[۲۶]. در این دو پروموتر، در مقایسه با پروموتر نوع وحشی، مرحله شروع نسخه‌برداری ده برابر فعال‌تر و از کارایی بالاتری برخوردار است، به ویژه هنگامی که از پلاسمیدهای چند کپی استفاده شود. همچنین این پروموترها، مستقل از فعال‌سازی کاتابولیتی، قادر به تولید پروتئین نوترکیب در مقیاس بالا هستند.

این پروموترها، مثال‌های خوبی برای حل مسایلی هستند که افراد به گونه‌ای در مهندسی پروموترهای تنظیم منفی با آن مواجه هستند. ژن کروموزومی LacI با تعداد خیلی کمی مولکول مهارکننده lac (به طور متوسط حدود ۱۰ مولکول)، روشن

1 - Lac- operon
2 - Catabolite Activator Protein

می‌شود. اگر توالی‌های اپراتوری- پروموتری Lac به داخل پلاسمیدهای چند کپی نوعColE1 (با ۴۰ کپی در هر کروموزوم یا بیش‌تر) وارد شوند، بیش‌تر اپراتورهای Lac توسط مولکول‌های مهارکننده اشغال نخواهند شد و در نتیجه این پروموترها به طور دائمی نسخه‌برداری می‌شوند. همچنین دو نوع دیگر اپراتور Lac (که اپراتور کاذب هم نامیده می‌شوند) وجود دارند که یکی از آن‌ها در بالادست پروموتر Lac در انتهای′ ۳ ژن LacI و دیگری در پایین‌دست از این پروموتر و داخل توالی کدکننده ژن LacZ قرار دارد. تنها در صورت وجود هر سه اپراتور و فاصله صحیح آن‌ها، مهار کامل پروموترLac میسر است [۸۹]. تلاش‌های زیادی برای افزایش قابلیت مهار پروموتر Lac و مشتقات آن صورت گرفته است. نخستین قدم، جداسازی جهش LacIq بود که جهش در پروموتر ژن LacI رخ داده و تولید LacI تا ۱۰ برابر افزایش می‌یافت [۲۹]. این ژن هم از یک پلاسمیدF و هم از یکی از مشتقات فاژΦ۸۰ تهیه شده است. این روش، کاربرد ناقلین بیان مبتنی بر پروموترLac را به سویه‌های ویژه‌ای از اشریشیاکلی محدود می‌کند. ناقلین دیگر، ژن LacI یا حتی LacIq را با خود دارند و کمتر وابسته به ژن‌های میزبان هستند [۲]. این سویه‌ها با محتوی مهارکننده بالا، با القای‌کننده ضعیف لاکتوز به طور کامل القای نمی‌شوند، ولی هنوز می‌توان با کاربرد IPTG (که غیرقابل هیدرولیز است) به القای کامل دست یافت. از سوی دیگر این القای‌کننده به دلیل قیمت بالا و سمیت، برای تولید پروتئین‌های درمانی پیشنهاد نمی‌شود. یک راهکار جای‌گزین، کاربرد مهارکننده Lac حساس به حرارت است که این سیستم با تغییر در افزایش درجه حرارت رشد از C ˚۳۰ به C ˚۴۲ القای می‌شود. کاربرد ژن LacI ts در ناقل، هنوز سطح پایه بالایی از بیان وجود دارد، در حالی که ژن LacI qts تولید پروتئین را ۵ برابر کاهش می‌دهد [۳ و ۵۴]. به علاوه، افزایش در دمای رشد، باعث تشکیل اینکلوژن بادی[1] و القای بیان پروتئین‌های شوک حرارتی خواهد شد. سرانجام مشخص شده است که می‌توان با تغییر مکان اپراتور در ناحیه پروموتری، سطح بیان پایه را تغییر داد [۷۱]. تغییر مکان اپراتور Lac از ناحیه بالادست ۳۵- و پایین‌دست ۱۰- به حد فاصل این دو ناحیه موجب شد مهار شدیدا افزایش یابد.

1 - Inclusion body

سیستم تنظیمی Lac در سیستم‌های بیان دیگر که بسیار کارآمد هستند، نیز استفاده می‌شود. ناقلین pET دارای پروموتر بسیار قوی تاخیری T7 هستند که توسط RNA پلیمراز بسیار فعال T7 نسخه‌برداری می‌شود.

RNA پلیمراز موردنیاز به صورت ترانس[1] (هم‌زمان و کمکی) هم با آلوده‌سازی باکتری‌ها توسط فاژT7 (روشی که برای تخمیر در مقیاس بالا امکان‌پذیر نیست) و هم با کاربرد پیش فاژ λDE3 (که در آن ژن RNA پلیمراز تحت کنترل پروموتر LacUV5 قرار دارد) فراهم می‌شود. در این سیستم، مشکل اصلی، بیان ناخواسته ژن در سطح بسیار کم است. این مشکل تا حدی به وسیله وارد کردن ژن LacI به ناقل بیان و یا با افزودن اپراتورLac در پایین‌دست توالی پروموتریT7 یا با کاربرد پلاسمید کدکننده لیزوزیمT7 (که RNA پلیمراز T7 را تجزیه می‌کند) برطرف می‌شود [۱۱۷]. سیستم تنظیم منفی دیگری که غالبا استفاده می‌شود، بر پایه پروموتر بسیار قوی چپPL از فاژ لامبدا طراحی شده است. این پروموتر به طور بسیار دقیقی توسط مهارکننده cI فاژ لامبدا تنظیم می‌شود. یکی از محدودیت‌های کاربرد این پروموتر این است که تنها به وسیله مهارکننده حرارتی λcI 857 قابل القای است [۹۵]. مدل دیگر تنظیم پایین‌دستی در سال ۱۹۸۷ توسط حسن و زیبالسکی[2] توصیف شده است. در این روش، یک پروموترtac قابل معکوس مورد استفاده قرار می‌گیرد. در طی رشد سلولی، پروموتر برای معکوس از ژن هدف قرار گرفته است و عمل نمی‌کند. در هنگام بیان ژن، پروموتر به واسطه عمل آنزیم اینتگراز λ در جایگاه‌هایattB و attP برای معکوس از ژن هدف قرار می‌گیرد. ژن int (که آنزیم اینتگراز را کد می‌کند) نیز در این حالت، روی یک فاژ لامبدا حساس به حرارت القای‌پذیر قرار دارد و بیان آن با شوک حرارتی خفیف القای می‌شود. معکوس شدن سریع است و بازده آن ۹۵ درصد است.

پروموتر قوی دیگر با تنظیم منفی که غالبا مورد استفاده قرار می‌گیرد، پروموتر تریپتوفان مشتق از اپرون تریپتوفان باکتریE.coli است. در حضور تریپتوفان زیاد، مهارکننده به اپراتور متصل می‌شود و با کاهش تریپتوفان القای صورت می‌گیرد. از معایب این سیستم بیان کم و ناخواسته پروموتر در شرایط عدم القای، محدودیت در

1 - Trans
2- Szybalski

انتخاب محیط‌های کشت و محدودیت به تریپتوفان در شرایطی است که به تولید پروتئین در مقیاس بالا نیاز باشد. در چنین شرایطی فرایندهای تخمیر در مقیاس بالا مشکل است که می‌توان به جای این کار با افزودن القای‌کننده بتاایندول اکریلیک اسید، پروموتر را القای کرد، ولی با این وجود ترکیب فوق گران و هزینه‌بر است [۱۲].

به طور کلی، تنظیم‌های پایین‌دستی[1] در پروموترهای کنترل منفی مساله مشکلی است و به تعادلی بین میزان رپرسور و اپراتور نیاز دارد. القای به ویژه در مورد پروموترهای قوی و ناقلین چند کپی و القای‌کننده‌های پایدار منجر به بالا رفتن سطح mRNA می‌شود که ممکن است ساست و همین‌طور به سنتز سریع پروتئین منجر می‌شود که اغلب تشکیل اینکلوژن بادی می‌دهند.

۲-۴-۲- کنترل مثبت

۲-۴-۲-۱-اپرونL – آرابینوز

پاسخ آهسته ولی مطمئن و فعالیت پایه‌ای بسیار کم، ویژگی سیستم‌های تنظیم مثبت است. متداول‌ترین سیستم کنترل مثبت در اشریشیاکلی، سیستم L – آرابینوز است. L – آرابینوز می‌تواند به عنوان منبع انحصاری کربن در E.coli به کار رود. این ماده به وسیله دو سیستم انتقال مختلف araE و araFGH جذب می‌شود و به گزیلوز ۵- فسفات تبدیل می‌شود که آنزیم‌های لازم توسط سه ژن araB، araA و araD کد می‌شوند. این سه ژن به صورت یک اپرون واحد araBAD و ژن‌های araFGH و araE نیز در اپرون مجزایی سازمان‌دهی شده‌اند. این ژن‌ها، یک واحد تنظیمی تشکیل می‌دهند که توسط araC تنظیم می‌شود. ژن araC در بالادست و برای مخالف با اپرون araBAD قرار گرفته است [۱۰۷]. ژن araC به خانوادهAraC / xyls تعلق دارد که عمومی‌ترین نوع تنظیم‌کنندگان مثبت هستند [۴۷]. ناحیه غیرژنی بین araC و araBAD بسیار پیچیده است. سه اپراتور به نام‌های araI وaraO1 و araO2 و دو جایگاه اتصال پروموترها به نام Pc و pBAD برای RNA پلیمراز و مجموعهcAMP- CAP وجود دارد. کاربرد L-آرابینوز به فعال شدن کاتابولیتی بستگی دارد. جایگاه‌های اتصال AraC غیرمعمول هستند و شامل دو توالی مستقیم ۱۷ جفت بازی (به جای توالی معکوس و کوتاه DNA) هستند. طبق مدل کنونی، همودایمرAraC در غیاب L-

1- Down- regulation

آرابینوز به نیمی از جایگاه araI و araO2 متصل می‌شود و در نتیجه یک لوپ DNA دو رشته‌ای ۲۱۰ جفت بازی تشکیل می‌شود. در این کنفورماسیون لوپ، نسخه‌برداری پروموترPc مهار شده و پروموتر pBAD غیرفعال است (چون نیمی از جایگاه دومaraI اشغال نشده است). اتصال آرابینوز بهAraC توام باcAMP- CAP، لوپ را باز می‌کند. AraC توانایی خود را برای اتصال به جایگاه دورتر از دست می‌دهد و در عوض به جایگاه نزدیک‌تر (نیمه‌مجاورaraI) متصل شده و نسخه‌برداری از pBAD را فعال می‌کند. علاوه بر این، نسخه‌برداری از Pc تا ۱۰ برابر افزایش می‌یابد تا این که سنتز کافیAraC (در مدت ۱۰ دقیقه) و در نتیجه اتصال آن بهaraO1، نسخه‌برداری بیش‌تر را مهار می‌کند. در ناقلین بیان، به طور طبیعی پروموترpBAD ara اشریشیاکلی و یا سالمونلا تیفی موریوم مورد استفاده قرار می‌گیرد. بیش‌تر ناقلین، ژن araC را نیز حمل می‌کنند. واضح است که در صورت وجود کپی کروموزومی به تنهایی، مقدارaraC محدود خواهد بود و از این رو از پلاسمیدهایی با چند کپی استفاده می‌شود که دارای عناصر اپراتوری متعدد هستند.

در این ناقلین میزان القای برای مهار، ۲۵۰ تا ۱۳۰۰ برابر است که این میزان به محیط کشت مورد استفاده بستگی دارد و سطح پایه‌ای بیان به ویژه در حضور گلوکز بسیار پایین است [۵۰]. این پروموتر حدود ۲/۵ تا ۴/۵ برابر از پروموترtac ضعیف‌تر است، ولی بسته به کارایی ترجمه می‌توان مقدار تولید محصول را تا ۳۰ درصد کل پروتئین سلولی افزایش داد. می‌توان القای را با کاربرد ذخایر آرابینوز در غلظت کمتر از شرایط بهینه، تعدیل کرد. تنها در حضور مقادیر خیلی پایین آرابینوز، ترکیبی از جمعیت سلول‌های القای شده و القای نشده وجود دارد[۱۱۳].

۲-۴-۲-۲- اپرونL – رامنوز

کاتابولیسم L -رامنوز در اشریشیاکلی مثال دیگری از تنظیم مثبت است. L –رامنوز از طریق محصول ژن rhaT جذب می‌شود و توسط rhaB به L -رامنولوز و طی مرحله بعد توسط rhaA به رامنولوز۵-فسفات، فسفریله می‌شود که در نهایت توسط یک آلدولاز (rhaD) هیدرولیز می‌شود. ژن‌هایrhaBAD تشکیل یک اپرون را می‌دهند ولیrhaT در نزدیک آن‌ها با پروموتر خودش قرار گرفته است. در بالادست ژنrhaBAD، دو ژن به نام‌های rhaR و rhaS هستند که برای مخالف قرار گرفته‌اند.

محصولات ژنی rhaR و rhaS نیز به خانواده فعال کنندگان AraC/XylS تعلق دارند (شکل ۲-۳). محصولات هر دو ژن RhaR و RhaS در حضور رامنوز به ناحیه غیر کدکننده بینrhaR و rhaS متصل می‌شوند.

RhaR نسخه‌برداری از ژن‌های rhaR و rhaS را فعال می‌کند و RhaS با اتصال به پروموترrhaBAD، نسخه‌برداری از ژن‌های ساختمانی rhaBAD را فعال می‌کند. به علاوه، L – رامنوز هنگامی مصرف می‌شود که کمپلکسcAMP- CAP (فعال شدن کاتابولیتی) به بالا دست پروموترrhaS متصل شود [۱۰ و۱۲۴].

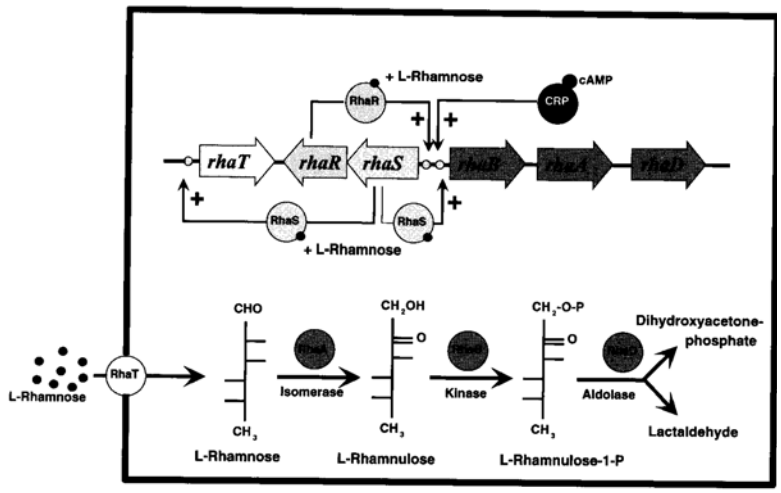
تنظیم پروموتر rhaBAD نسبت بهaraBAD دقیق‌تر و مطمئن‌تر است. سطح پایه نسخه‌برداری (تعیین شده با کاربرد نسخه فیوژن باLacZ) ۱۰ برابر پایین‌تر است، در حالی که سطح القای شده بیانaraBAD وrhaBAD یکسان است [۵۱].

مدل‌های بیان مختلفی طراحی و ساخته شده‌اند که شامل پروموترrhaBAD توام با جایگاه اتصال cAMP- CAP، یک جایگاه اتصال ریبوزوم، چندین جایگاه برش آنزیمی برای قرار دادن ژن مورد نظر و یک خاتمه‌دهنده نسخه‌برداری هستند (شکل ۲-۴). این مدل‌ها در پلاسمیدهای مختلفی الحاق شده‌اند و برای بیان چندین ژن مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

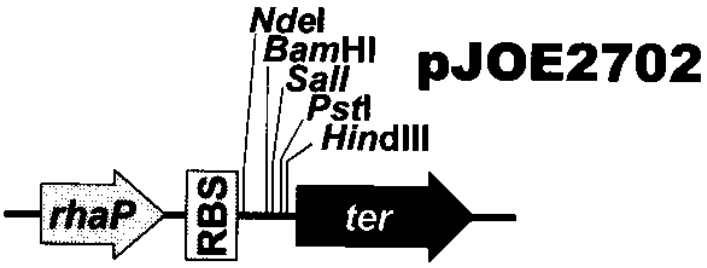
به طور کلی با کاربرد این سیستم تنظیمی می‌توان پروتئین دلخواه را به میزان ۳۰٪ پروتئین تام سلولی تولید کرد. بر خلاف سیستم ara، ژن‌های تنظیمی rhaRS قابل چشم‌پوشی هستند؛ به نظر می‌رسد تنها نسخه کروموزومی ژن برای تولید پروتئین‌های تنظیمی برای اشباع جایگاه‌های اتصال آن‌ها، حتی در پلاسمیدهای چند کپی[1]، کافی باشد. زمان‌های القای مناسب برای دست‌یابی به بیشینه بازده محصول پروتئینی بین ۴ تا ۱۰ ساعت متفاوت است.

این پاسخ بسیار آهسته، برای پروتئین‌هایی مفید است که تمایل به تشکیل اینکلوژن بادی دارند و همین‌طور برای پروتئین‌های آنزیمی مفید است که لازم است به فضای پری پلاسمی منتقل شوند.

1- Multicopy



شکل ۲-۳) مسیر متابولیسمی L – رامنوز، چرخه‌ها و ژن‌های درگیر آن. نسخه‌برداری از ژن‌های rhaBAD به وسیله فعال‌کننده RhaS کنترل می‌شود (برای جزییات بیش‌تر به متن مراجعه کنید).



شکل ۲-٤) مدل‌های بیان برای ناقلین دارای پروموتر rhaBAD توام با جایگاه اتصال cAMP- CAP (rhaP)، یک جایگاه اتصال ریبوزوم (RBS)، چندین جایگاه برش آنزیمی برای قرار دادن ژن هدف و یک ناحیه خاتمه نسخه‌برداری (ter). ژن‌های RhaS و RhaR به شکل ترانس برای سلول میزبان مهیا شده است.

در مقایسه با پروموتر tac، در مورد پنی‌سیلین امیداز باکتری اشریشیاکلی بیش از ۴ برابر و همچنین در مورد سوکروز ایزومراز باکتری پروتامینوباکتر روبروم بیش از ۲۰ برابر فعالیت

تولید پروتئینهای نوترکیب

سیستم های پروکاریوتی و یوکاریوتی جدید

مؤلف: جرد جلیسن

مترجمان: نرگس ملک ثابت
محمد رضا معصومیان
محمد علی نصیری خلیلی
رسول خلیل زاده

Production of Recombinant Proteins

Novel Microbil and Eukaryotic Expression Systems

درحال حاضر تولید فرآورده های بیوتکنولوژی به استفاده از میزبان های اشریشیا کولی، چند نوع مخمر و سویه های سلولی پستاندران محدود میشود. در این کتاب، سیستم های بیان مختلف از پروکاریوتها(شامل دو باکتری گرم منفی و یک باکتری گرم مثبت)، چند نوع مخمر(دو قارچ رشته ای و دو سیستم سلولی از یوکاریوتهای عالی تر)، سلولهای پستانداران و گیاهان توصیف میشوند. هر فصل کتاب، اطلاعاتی در باره زیست شناسی ارگانیسم میزبان و انتخاب سیستمهای بیانی شامل توضیحاتی درباره سویه ها، عناصر ژنتیکی، حاملین بیان و مثالهای کاربردی از تولید پروتئینهای نوترکیب فراهم می سازد.

انتشارات
دانشگاه صنعتی مالک اشتر

ISBN 978-964-8452-94-5

۱۲۵