« فهرست مطالب»

عنوان صفحه

چکیده ---------- **۵**

مقدمه ---------- ۶

مروری بر منابع ---------- ۹

۲-۱- تعریف بیوتکنولوژی---------- **۹**

۲-۲- ظهور زیست فناوری مولکولی ---------- **۱۲**

۲-۳- پروتئین های نوترکیب به عنوان نقطه عطف زیست فناوری مولکولی ---------- **۱۲**

۲-۴- سیستم های بیان پروتئین های نوترکیب ---------- **۱۳**

۲-۵- سیستم بیان اشریشیاکلی ---------- **۱۸**

۲-۵-۱- تولید پروتئین های نوترکیب در بخش های مختلف اشریشیاکلی---------- ۱۸

۲-۵-۲- سیستم های ترشح پروتئین در اشریشیاکلی---------- ۲۵

۲-۵-۲-۱- سیستم ترشحی نوع I---------- ۲۵

۲-۵-۲-۲- سیستم ترشحی نوع II ---------- ۲۶

۲-۵-۲-۳- سیستم ترشحی نوع III ---------- ۲۷

۲-۵-۲-۴- مسیر وابسته به ذره تشخیص دهنده توالی نشانه (SRP) ---------- ۲۷

۲-۵-۲-۵- مسیر ترشحی دو آرژینینی (Tat) ---------- ۲۸

۲-۶- لیپاز---------- **۳۰**

۲-۶-۱- تعریف ---------- ۳۰

۲-۶-۲- تاریخچه---------- ۳۲

۲-۶-۳- تعیین فعالیت لیپاز ---------- ۳۲

۲-۶-۴- خالص سازی لیپاز ---------- ۳۳

۲-۶-۵- طبقه بندی لیپازهای باکتریایی---------- ۳۳

۲-۶-۶- تنظیم بیان ژن لیپاز ---------- ۳۸

۲-۶-۷- ساختار سه بعدی لیپازهای باکتریایی ---------- ۴۱

۲-۶-۷-۱- پیچش لیپازها ---------- ۴۱

۲-۶-۷-۲- اسید آمینه های کاتالیتیک لیپازها ---------- ۴۲

۲-۶-۷-۳- مکانیسم کاتالیتیک ---------- ۴۴
۲-۶-۷-۴- فعال سازی بین سطحی ---------- ۴۷
۲-۶-۷-۵- ویژگی سوبسترایی ---------- ۴۸
۲-۶-۸-کاربرد لیپاز در زیست فناوری ---------- ۴۹
۲-۶-۸-۱- صنایع لبنی ---------- ۴۹
۲-۶-۸-۲- صنایع شوینده ---------- ۵۰
۲-۶-۸-۳- صنایع روغنی ---------- ۵۱
۲-۶-۸-۴- صنایع دارویی ---------- ۵۲
۲-۶-۸-۵- صنایع آرایشی ---------- ۵۳
۲-۶-۸-۶- صنعت کاغذ و خمیر سازی ---------- ۵۴
۲-۷- هدف از انجام تحقیق ---------- ۵۴
مواد و روش ها ---------- ۵۶
۳-۱- آنزیم ها ---------- ۵۶
۳-۲- آنتی بیوتیک ها ---------- ۵۶
۳-۳- باکتری ها ---------- ۵۶
۳-۴- پلاسمیدها ---------- ۵۷
۳-۵- پرایمرها (آغازگرها) ---------- ۶۲
۳-۶- کیت های آزمایشگاهی ---------- ۶۴
۳-۷- مارکرها ---------- ۶۴
۳-۸- محیط کشت باکتری ---------- ۶۴
۳-۸-۱- محیط کشت مایع LB ---------- ۶۴
۳-۸-۲- محیط کشت جامد LB ---------- ۶۵
۳-۸-۳- محیط کشت معین ---------- ۶۶
۳-۸-۴- محیط کشت X-gal و IPTG ---------- ۶۷
۳-۹- محیط نگهداری باکتری ها ---------- ۶۸
۳-۱۰- استخراج DNA ---------- ۶۸
۳-۱۰-۱- استخراج DNA کروموزومی ---------- ۶۸

۳-۱۰-۲- استخراج DNA پلاسمیدی ---------- ۷۰
۳-۱۰-۲-۱- استخراج پلاسمید به روش مقیاس کوچک ---------- ۷۱
۳-۱۰-۲-۲- استخراج پلاسمید با استفاده از کیت (High Pure Plasmid Isolation Kit) ---------- ۷۳
۳-۱۱- الکتروفورز DNA---------- ۷۵
۳-۱۲- تکثیر اختصاصی مولکول DNA ---------- ۷۷
۳-۱۲-۱- بازیافت قطعه DNA از ژل آگارز با استفاده از کیت (High Pure PCR Purification Kit) ------ ۸۰
۳-۱۲-۲- خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت (High Pure PCR Product Purification Kit) - ۸۱
۳-۱۳- اتصال قطعات DNA ---------- ۸۲
۳-۱۴- تهیه باکتریهای مستعد ---------- ۸۴
۳-۱۵- انتقال پلاسمید به درون باکتری---------- ۸۵
۳-۱۶- غربال کلون ها ی واجد پلاسمید نوترکیب ---------- ۸۶
۳-۱۷- برش آنزیمی DNA ---------- ۸۶
۳-۱۸- بررسی پروتئین ---------- ۸۷
۳-۱۹- تهیه عصاره باکتری ----------۹۱
۳-۲۰- تفکیک پروتئین های پری پلاسمی از سایر پروتئین ها ----------۹۱
۳-۲۱- سنجش پروتئین با روش برادفورد ---------- ۹۲
۳-۲۲- تعیین فعالیت آنزیمی به روش pH-stat---------- ۹۴
۳-۲۳- تولید آنتی بادی علیه لیپاز نوترکیب ---------- ۹۵
۳-۲۴- بررسی وجود آنتی بادی در سرم و تعیین تیتر تقریبی آن به روش Dot blot ----- ۹۶
۳-۲۵- وسترن بلاتینگ---------- ۹۷
۳-۲۶- خالص سازی لیپاز نوترکیب ---------- ۱۰۰
نتایج ---------- ۱۰۶
۴-۱- بیان ژن لیپاز (*btl2*) با توالی نشانه طبیعی ---------- ۱۰۶
۴-۱-۱- تاثیر القا کننده لاکتوز بر بیان پری پلاسمی ژن *btl2* با توالی نشانه طبیعی ---------- ۱۰۸

۴-۲- ساخت و کلونینگ ژن هیبرید *cstHsig::btl2* ---------- ۱۱۲
۴-۲-۱- ساخت ژن هیبرید *cstHsig::btl2*---------- ۱۱۲
۴-۲-۲-کلونینگ ژن هیبرید *cstHsig::btl2*---------- ۱۱۴
۴-۲-۲-۱-کلونینگ ژن هیبرید *cstHsig::btl2* در پلاسمید PTZ57R/T ---------- ۱۱۴
۴-۲-۲-۲-کلونینگ ژن هیبرید *cstHsig::btl2* در پلاسمید pET- 21a(+)---------- ۱۱۶
۴-۳- بیان ژن هیبرید *cstHsig::btl2* تحت کنترل پروموتر T7---------- ۱۱۸
۴-۳-۱- اثر لاکتوز بر بیان پری پلاسمی لیپاز---------- ۱۲۲
۴-۴-کلونینگ ژن هیبرید *cstHsig::btl2* در پلاسمید pET- 26b(+) ---------- ۱۲۴
۴-۵- بیان ژن هیبرید *cstHsig::btl2* در پلاسمید pYA79---------- ۱۲۶
۴-۶- تأثیر شرایط محیطی بر بیان ترشحی ژن هیبرید *cstHsig::btl2* در پلاسمید نوترکیب pYA79 ---------- ۱۳۰
۴-۷- تأثیر محیط کشت بر بیان ترشحی ژن لیپاز نوترکیب ---------- ۱۳۳
۴-۸- خالص سازی لیپاز نوترکیب با توالی نشانه CS3 ----------۱۳۴
۴-۹- وسترن بلاتینگ ---------- ۱۳۷
۴-۱۰- بررسی روند بیان لیپاز نوترکیب توسط کلون pYA79 پس از القا---------- ۱۳۸
۴-۱۱- تعیین فعالیت آنزیمی لیپاز نوترکیب پری پلاسمی ----------۱۴۲
بحث ---------- ۱۴۳
پیشنهادات ---------- ۱۴۵
منابع ---------- ۱۴۸

چکیده

لیپازها (تری اسیل گلیسرول اسیل هیدرولازها) هیدرولیز و ساخت استرهای تشکیل شده از گلیسرول و اسیدهای چرب دارای زنجیره های بلند را کاتالیز می کنند و در صنایع مختلف از قبیل صنایع غذایی، لبنی، شوینده، کاغذ سازی، چرم سازی، دارویی، کشاورزی و صنایع روغنی کاربرد دارند. در این تحقیق، کلونینگ و بیان ژن *btl2* با توالی نشانه تاژک CS3 *اشریشیاکلی* انجام و با بیان ژن با توالی نشانه طبیعی مقایسه گردید. ژن *btl2* از ژنوم *باسیلوس ترموکاتنولاتوس* توسط PCR جداسازی، کلون و با روش های استاندارد مهندسی ژنتیک تأیید شد. سپس با استفاده از آنزیم های *Nde*I ، *Hin*dIII و SacI ژن مذکور از وکتور کلونینگ (pTZ57R/T) جدا و مجدداً در وکتورهای بیانی pET21-a(+) و pET26-b(+) کلون و به *E. coli* سویه BL21(pLysS) منتقل شد. بررسی پروتئین های سلولی بر روی ژل پلی آکریلامید (SDS-PAGE)، بیان شدن لیپاز حدوداً ۴۲ کیلو دالتونی را تأیید و آنالیز پروتئینی و بررسی فعالیت لیپاز نوترکیب در مایع پری پلاسمی توسط آزمون *p*NPP حاکی از این بود که هر دو توالی نشانه قدرت پایینی برای ترشح پروتئین به فضای پری پلاسمی *E. coli* دارند، که یکی از دلایل آن را می توان بیان پروتئین به صورت اینکلوژن بادی مطرح کرد، بدین منظور مراحل خالص سازی و Refolding بر روی اینکلوژن بادی انجام و با روش pH-Stat و برادفورد به ترتیب فعالیت آنزیمی و میزان لیپاز محلول اندازه گیری شد.

واژه های کلیدی : ژن *btl2* ، *باسیلوس ترموکاتنولاتوس*، *اشریشیاکلی*، لیپاز نوترکیب، توالی نشانه، فضای پری پلاسمی، خالص سازی

مقدمه

نقش آنزیم ها در بسیاری از فرآیندها مدت هاست که شناخته شده است. امروزه بیشتر آنزیم ها (و احتمالاً در آینده ای نزدیک همه آنها) به وسیله فرمانتاسیون[1] مواد با پایه زیستی تهیه می شوند. هزاران آنزیم با خصوصیات سوبسترایی مختلف شناسایی شده اند ولی آنزیم های محدودی به شکل خالص و به صورت کریستاله در آمده و ساختار و عملکرد آنها به مقدار کمی شناسایی شده است. تکنیک های مهندسی پروتئین برای تولید آنزیم های صنعتی مهم نظیر پروتئازها[2] و لیپازهای[3] استفاده شده در شوینده ها، آمیلازها[4] و گلوکز ایزومرازها[5] که در فرآیند نشاسته و فرایند زیستی مواد خام یا سنتز مواد شیمیایی آلی به کار می روند، بسیار کارآمد هستند (۴۲).

میکروارگانیسم ها برای تولید آنزیم ها مناسب تر از گیاهان و جانوران هستند، عواملی که باعث این برتری می شوند، عبارت از تنوع وسیع فعالیت های کاتالیکی، عملکردهای بالا، دستکاری ژنتیکی آسان، رشد سریع در محیط کشت ارزان و فقدان نوسانات فصلی می باشند. همچنین آنزیم های میکروبی پایدارتر از آنزیم های گیاهی و جانوری متناظر بوده و تولید آنها نیز ایمن تر می باشد. تنها ۲٪ از میکروارگانیسم های جهان به عنوان منابع تولید آنزیم به کار رفته اند و از این میان باکتریها بیشتر استفاده شده اند (۱۴۶). آنزیم های مقاوم به حرارت که اساساً از موجودات حرارت دوست[6] جداسازی شده اند در درجه حرارت هایی حتی بالاتر از درجه حرارت بهینه رشد میکروارگانیزم عمل می کنند و به دلیل پایداری ذاتی شان کاربردهای تجاری دارند (۲۳). به عنوان مثال با ارزش ترین

[1] Fermentation

[2] Protease

[3] Lipase

[4] Amylase

[5] Glucose isomerase

[6] Termophile

مزیت هدایت فرآیندهای بیوتکنولوژیکی در درجه حرارت های بالا توسط این آنزیم ها، کاهش خطر آلودگی با مزوفیل های معمول، سرعت بالاتر واکنش در نتیجه کاهش ویسکوزیته و افزایش ضریب انتشار سوبستراها، عملکرد بالاتر در نتیجه حلالیت افزایش یافته سوبستراها و محصولات ونیز تعادل مطلوب جانشین شده در واکنش های اندوترمیک است. استفاده از درجه حرارت های بالاتر هم چنین تأثیر معنی داری بر مقبولیت زیستی و حلالیت ترکیبات آلی دارد (۱۰).

لیپازها (EC 3.1.1.3)، آنزیم هایی هستند که هیدرولیز تری اسیل گلیسرول را به گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد کاتالیز می کنند (شکل ۱-۱).

شکل ۱-۱- مکانیسم عمل آنزیم لیپاز

نام سیستماتیک این آنزیمها، تری اسیل گلیسرول اسیل هیدرولاز[1] است در حالی که نام عمومی آنها تری اسیل گلیسرول لیپاز[2] می باشد. سایر نام هایی که این آنزیم ها ممکن است با آنها شناخته شوند شامل لیپاز، تری گلیسرید لیپاز[3] و تری بوتیراز[4] می باشند. سوبستراهای طبیعی لیپازها تری اسیل گلیسرول هایی هستند که دارای زنجیره بلند اسید چرب (C۱۰<) می باشند و از اینرو حلالیت کمی در آب دارند.

[1] Triacylglycerol acylhydrolases

[2] Triacylglycerol lipase

[3] Triglyceride lipase

[4] Tributyrase

لیپازهای مقاوم به حرارت به دست آمده از منابع میکروبی برای کاربرد در زیست فناوری بسیار سودمند هستند زیرا می توانند با هزینه کم تولید شده و پایداری بهبود یافته ای از خود نشان دهند. در سالهای اخیر تقاضای زیادی برای آنزیم های مقاوم به حرارت در زمینه های صنعتی ایجاد شده است، بنابراین لیپازهای مقاوم به حرارت از منابع گوناگون خالص گشته و خصوصیت یابی شده اند (۴۲).

در این تحقیق، ژن این آنزیم از میکروارگانیزم حرارت دوست *باسیلوس ترموکاتنولاتوس*[۱] جدا و در *اشریشیاکلی*[۲] به صورت نوترکیب بیان شد. از آن جائی که بیان ترشحی[۳] و پری پلاسمی[۴] پروتئین های نوترکیب دارای مزایایی از جمله تاخوردگی صحیح پروتئین[۵] و تخلیص ساده تر است (۱۳،۱۷،۷۸) همواره سعی بر این است که با استفاده از تکنیک هایی همانند اتصال توالی نشانه[۶] به این پروتئین ها، نیل به این هدف را ممکن ساخت. پروتئین CStH زیرواحد ساختمانی پیلی CS3 *اشریشیا کلی* است که به صورت طبیعی با داشتن توالی نشانه بطور موثر از سیتوپلاسم به سطح باکتری منتقل و به صورت پیلی مونتاژ می شود. با توجه به این مسئله توالی نشانه این پروتئین برای هدایت پروتئینهای نوترکیب BTl2 به پری پلاسم *E. coli* در نظر گرفته شد.

---

[1] *Bacillus Thermocatenulatus*

[2] *Escherichia coli*

[3] Extracellular expression

[4] Periplasmic expression

[5] Correct folding

[6] Signal peptide

مروری بر منابع

۲-۱- تعریف بیوتکنولوژی

واژه بیوتکنولوژی[1] (زیست فناوری) در سال ۱۹۱۹ توسط کارل ارکی[2]، یک مهندس مجارستانی، به کار برده شد. زیست فناوری برای افراد مختلف معانی مختلفی دارد. بعضی آن را استفاده و بهره گیری از ریزموجودات با هدف تولید محصولات صنعتی یا تجاری می دانند، اما این تعریف محدود است. زیست فناوری مجموعه ای از ابزارهای قدرتمند است که موجودات زنده (یا بخشی از آنها) را با هدف ساخت محصولات تغییر یافته، بهبود گیاهان، جانوران و میکروارگانیزمها برای استفاده های خاص به خدمت می گیرد. به عبارتی بهره گیری از ریز موجودات مهندسی شده ژنتیکی که بر تکنولوژی مهندسی ژنتیک یا DNA نوترکیب استوار است، زیست فناوری مدرن را استوار می کند. بنابراین زیست فناوری کاربرد اصول مهندسی و علمی به منظور فرآوری مواد توسط عوامل زیستی با هدف تولید کالا و خدمات است و می توان آن را به شاخه های زیر تقسیم کرد :

- زیست فناوری قرمز[3]

این شاخه از زیست فناوری در پزشکی کاربرد دارد. به عنوان مثال طراحی موجودات زنده به منظور تولید آنتی بیوتیک ها و مهندسی درمان های ژنتیکی از طریق دستکاری های ژنومیکی.

[1] Biotechnology

[2] Karl Erky

[3] Red biotechnology

❖ زیست فناوری سبز[1]

زیست فناوری است که در فرآیندهای کشاورزی به کار برده می شود. به عنوان مثال انتخاب و اهلی کردن گیاهان از طریق ریز ازدیادی[2] و نیز طراحی گیاهان تراریخت[3] برای رشد تحت شرایط محیطی خاص یا در حضور و غیاب مواد شیمیایی معین. امید است که زیست فناوری سبز محصول هایی تولید کند که بیشتراز کشاورزی سنتی حافظ محیط زیست باشند. مثال آن مهندسی گیاه برای بیان آفت کش ها است که نیاز به کاربرد خارجی آن را حذف می کند (۹۸، ۱۲۸).

❖ زیست فناوری سفید[4]

که به عنوان زیست فناوری صنعتی شناخته شده است، زیست فناوری است که در فرآیندهای صنعتی کاربرد دارد و بعد از زیست فناوری سلامت و کشاورزی، موج سوم زیست فناوری است. مثال آن طراحی موجودات زنده برای تولید یک ماده شیمیایی مفید و یا استفاده از آنزیم ها به عنوان کاتالیزورهای صنعتی در تولید مواد شیمیایی با ارزش و تخریب مواد آلوده کننده و خطرناک می باشد (۱۰۶).

[1] Green biotechnology

[2] Micropropagation

[3] Transgenic plants

[4] White biotechnology

❖ زیست فناوری آبی [1]

واژه ای است که برای شرح کاربردهای دریایی زیست فناوری استفاده شده اما کاربرد آن نسبتاً کم است.

❖ بیوانفورماتیک[2]

یک حوزه بین رشته ای است که به مسائل زیستی با استفاده از تکنیک های کامپیوتری می پردازد و سازماندهی سریع و آنالیز اطلاعات زیستی را ممکن می سازد. بیوانفورماتیک نقش کلیدی در زمینه های مختلف ژنومیک ساختاری[3]، ژنومیک عملکردی[4] و پروتئومیکس[5] ایفا کرده و یک جزء کلیدی در زیست فناوری و بخش دارویی است (۹).

[1]Blue biotechnology

[2] Bioinformatics

[3] Structural genomics

[4] Functional genomics

[5] Proteomics

۲-۲- ظهور زیست فناوری مولکولی

هر چند واژه زیست فناوری برای اولین بار توسط کارل ارکی پیشنهاد شد، ولیکن زیست فناوری به مفهوم واقعی از سال ۱۹۴۷ همزمان با تولید صنعتی پنی سیلین به روش تخمیر غوطه ور توسط شرکت مرک[۱] و نیوبرانسویک[۲] آغاز شد. سپس این توسعه در دهه های ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰ با سیری صعودی ادامه یافت. به ویژه در دهه ۶۰ همزمان با صنعتی شدن تولید پروتئین تک یاخته[۳] (SCP)، طراحی و ساخت بیوراکتورهای[۴] بسیار عظیم آغاز شد.

در اوایل دهه ۷۰ و با تکیه بر دستاوردهای دانشمندان در دو دهه قبل، اولین انتقال موفقیت آمیز ژن از یک موجود به موجود زنده دیگر در سال ۱۹۷۳ در آمریکا روی داد. این امر به ظهور فناوری زیستی نوین منجر شد و فرآورده های زیستی جدید، در حجم و تنوع قابل توجهی در سطح آزمایشگاه ها با موفقیت تولید شدند. از جمله نکات بسیار مهم و با اهمیت در این مرحله تولید اقتصادی این فرآورده هاست که با توسعه زیست فناوری نوین، عملی شده است. به عبارتی ادغام فناوری DNA نوترکیب با زیست فناوری ایجاد یک زمینه مطالعاتی بسیار وسیعی را نمود که زیست فناوری مولکولی نامیده می شود (۲).

۲-۳- پروتئین های نوترکیب به عنوان نقطه عطف زیست فناوری مولکولی

فناوری DNA نوترکیب به عنوان دستاوردی از مهندسی ژنتیک، نقش بسزایی در تولید و گسترش پروتئین های نوترکیب داشته است. با ورود فناوری DNA نوترکیب به عرصه علم، تولید پروتئین های نوترکیب در مقیاس انبوه و با صرف هزینه بسیار کمتری نسبت به روش های قبلی امکان پذیر شده

[1] Merck

[2] Newbransvic

[3] Single cell protein

[4] Bioreactor

است. امروزه می توان ژن یا cDNA کد کننده هر پروتئین را جدا و به یک سیستم بیانی مناسب وارد نمود تا پروتئین در یک موجود بیگانه که معمولاً یک میکروارگانیزم است تولید شود. امروزه کاربردهای فراوانی برای پروتئین های نوترکیب وجود دارد و اثر این پروتئین ها را در صنایع گوناگون پزشکی و دارویی، کشاورزی و تغذیه، صنایع نفت، محیط زیست و غیره می توان مشاهده کرد (۲).

۲-۴- سیستم های بیان پروتئین های نوترکیب

به منظور تولید پروتئین های نوترکیب سیستم های بیانی مختلفی استفاده می شود. سیستم های بیانی را می توان به صورت زیر دسته بندی کرد :

- سیستم بیان پروکاریوتی : شامل *اشریشیاکلی*، *باسیلوس سوبتیلیس*[۱]، *اسینتوباکتر کالکواستیکوس*[۲]، *باسیلوس لیچینیفورمیس*[۳]، *استافیلوکوکوس آرئوس*[۴] و سایر سلول های پروکاریوتی.
- سیستم بیان یوکاریوتی : شامل سلول های حیوانی، گیاهی، حشرات، مخمرها، قارچ ها، حیوانات و گیاهان.
- سیستم بیان عاری از سلول[۵] : در این سیستم ابتدا سلول ها لیز شده و عصاره سلولی تهیه می شود. سپس سوبسترا و نمک ها به این عصاره افزوده می گردد و سنتز پروتئین ها با اضافه کردن الگو (mRNA) آغاز می شود.

---

[1] *Bacillus subtilis*

[2] *Acinetobacter calccoaceticus*

[3] *Bacillus licheniformis*

[4] *Staphylococcus aureous*

[5] Cell free system

هر یک از سیستم های فوق دارای مزایا و معایبی است که در جدول ۲-۱ خلاصه شده است. از مهمترین عواملی که در انتخاب یک سیستم بیان باید مد نظر قرار گیرد می توان به نوع و ساختار مولکولی ژنی که کلون می شود، ساختار فیزیکی و شیمیایی پروتئین تولید شده، تواناییهای سیستم بیانی و شرایط بهینه اقتصادی برای تولید پروتئین نوترکیب اشاره کرد (۲).

جدول۲-۱- مزایا و معایب سیستم های بیان ژن (۲)

میزبان	مزایا	معایب
باکتری ها		
اشریشیاکلی	ناقل های کلونینگ فراوانی دارد. کنترل بیان ژن ساده است. بازده بیان پروتئین نوترکیب بالا (تا ۵۰ ٪ کل پروتئین های سلول) است. کشت آن ساده است. می توان پروتئین های نوترکیب را به صورت فیوژن[1] تولید کرد.	پروتئین های نوترکیب دارای اصلاحات بعد از ترجمه نیستند. فعالیت زیستی و ایمنی پروتئین نوترکیب ممکن است با پروتئین طبیعی متفاوت باشد. باکتری های گرم منفی دارای اندوتوکسین بالایی می باشند. بیان بالا ممکن است منجر به ایجاد اینکلوژن بادی[2] گردد که ممکن است تخلیص آن را مشکل و فعالیت آن را کاهش دهد.
استافیلوکوکوس آرئوس	فیوژن پروتئین ها را مستقیماً به داخل محیط کشت ترشح می کند.	بیان انبوه پروتئین های نوترکیب به اندازه *اشریشیاکلی* نیست.

[1] Fusion

[2] Inclusion body

میزبان	مزایا	معایب
مخمرها		
ساکارومیسس سرویزیه[1]	اندوتوکسین کمی دارد. به عنوان میکروارگانیزم ایمن[2] شناخته شده است (GRAS) پاتوژن انسانی نیست. اطلاعات فراوانی در مورد کشت انبوه و فرآیندهای پایین دستی آن وجود دارد. فرآیندهای تخمیر مخمر نسبتاً ارزان قیمت است. مخمر توانایی گلیکوزیله کردن و ایجاد پیوندهای دی سولفیدی را دارد. امکان ترشح پروتئین نوترکیب به محیط کشت در این سیستم وجود دارد.	اطلاعات ژنتیکی کمی در مورد آن وجود دارد. کنترل بیان ژن مشکل می باشد. دستکاری ژنتیکی پلاسمیدهای مخمری مشکل است. الگوی گلیکوزیله کردن مخمر با انسان متفاوت است.
قارچ های رشته ای		
گونه های *آسپرژیلوس*[3]	اطلاعات فراوانی در مورد فرمانتاسیون قارچ های رشته ای وجود دارد. هزینه کشت آن ها بالا نیست. منبع بسیاری از آنزیم های صنعتی هستند. ایمن است.	بیان بالای پروتئین های نوترکیب در این ارگانیزم ها به دست نیامده است. اطلاعات ژنتیکی در مورد آن ها کامل نیست. ناقل های کلونینگ زیادی ندارند.

[1] Saccaromyces cerevisiae

[2] Generally Regarded As Safe

[3] Aspergillus

میزبان	مزایا	معایب
سلول های کشت شده حشرات		
حامل های باکولو ویروسی	میزبان های بندپای کمی دارند، بنابراین خطرناک نیستند. وکتورهای باکولوویروسی تأییدیه FDA[1] را برای تولید پروتئین های دارویی دارند. پروتئین های نوترکیب تولید شده دارای تفاوت زیادی از نظر خصوصیات عملکردی و ایمونولوژیک با نوع طبیعی آن نمی باشند. تخلیص پروتئین ساده و ارزان است.	اطلاعات فراوانی در مورد مکانیزم های گلیکوزیلاسیون وجود ندارد. پروتئین نوترکیب ۱۰۰ ٪ فعال نیست.
سلول های پستانداران		
	فعالیت زیستی پروتئین نوترکیب همانند نوع طبیعی است. ناقل های تجاری در دسترس می باشند. سلول های پستانداران را در مقیاس انبوه می توان کشت داد.	کشت سلول مشکل می باشد. تولید پروتئین نوترکیب گران است. رشد سلول ها به کندی انجام می شود. سلول های دستکاری شده از نظر ژنتیکی ناپایدارند.

[1] Food and Drug Administration

۲-۵- سیستم بیان اشریشیاکلی

اشریشیاکلی یکی از معروفترین میزبانها در تولید پروتئین های نوترکیب است (۸،۷۸،۱۷). علاوه بر سادگی، ایمنی و ویژگی های شناخته شده ژنتیکی آن، یک امتیاز مهم دیگر، سهولت ترانسفورماسیون[۱] *E coli* با DNA خارجی و توانایی آن برای تولید پروتئین ها در مقادیر زیاد و رشد خیلی سریع درمقایسه با سلول های پستانداران است. البته هنوز هم استفاده از *E. coli* برای تولید ملکول های پیچیده همانند هترو دایمرها، که حاوی باندهای دی سولفیدی پیچیده هستند یا پروتئین های گلیکوزیله به صورت یک چالش باقی مانده است (۱۷).

۲-۵-۱- تولید پروتئین های نوترکیب در بخش های مختلف اشریشیاکلی

هدف نهایی همه فرآیندهای تولیدی رسیدن به پروتئین با ساختار فضایی صحیح است. بیان بالای ژن های نوترکیب اغلب منجر به شکل گیری پروتئین غیر فعال (اینکلوژن بادی) می شود که در این صورت پروتئین نوترکیب فعال تنها توسط فرآیندهای پیچیده و گران (دناتوره و به دنبال آن پیچش مجدد[۲]) دوباره از اینکلوژن بادی به دست آورده می شود. سیتوپلاسم سلول، مکان اصلی تولید پروتئین، محیط را به صورت احیاء نگه می دارد که از شکل گیری باندهای دی سولفیدی[۳] ممانعت می کند. بنابراین یک راهکار به منظور بدست آوردن بازده بالای پروتئین های نوترکیب صحیح تاخورده این است که پروتئین ها به فضای پری پلاسمی ترشح شوند، چرا که محیط اکسیداتیو آن به تشکیل باندهای دی سولفیدی کمک کرده و دی سولفید ایزومرازهای معینی این فرآیند را کاتالیز می کنند. چند مزیت دیگرتولید ترشحی پروتئین های نوترکیب نسبت به تولید سیتوپلاسمی این است که اسید آمینه انتهای آمینی پروتئین ترشح شده بعد از برش توالی نشانه، به محصول طبیعی ژن شبیه

[1] Transformation

[2] Refolding

[3] Disulfide-bond formation

بوده ونیز در پری پلاسم فعالیت پروتئازی بسیار کمتری نسبت به سیتوپلاسم *E. coli* وجود دارد. تولید خارج سلولی پروتئین های نوترکیب حتی نسبت به تولید پری پلاسمی بسیار مفیدتر است. در این صورت پروتئولیز پروتئین های نوترکیب توسط پروتئازهای پری پلاسمی ممانعت می شود و مهمتر اینکه ترشح به این صورت عملیات خالص سازی را با حذف نیاز به تخریب سلول ها برای بدست آوردن مجدد پروتئین آسان می کند. بنابراین خالص سازی با مواد غیر متجانس کمتری آغاز شده و مراحل پردازش کمتری برای تولید یک محصول نیاز است. علاوه بر این، تولید خارج سلولی می تواند به بیان بالاتر پروتئین نوترکیب کمک کند زیرا تجمع محصول به حجم کوچک فضای پری پلاسمی محدود نمی شود (۲۳،۱۳،۷۸،۱۷). مزایا و معایب بیان پروتئین در بخش های مختلف باکتری اشریشیاکلی در جدول ۲-۲ آمده است (۲).

جدول۲-۲ : مزایا و معایب بیان پروتئین در بخش های مختلف باکتری اشریشیاکلی (۲)

مکان بیان پروتئین	راهکار
بیان سیتوپلاسمی	
مزایا: ۱- تشکیل اینکلوژن بادی: جداسازی پروتئین ها با درجه خلوص و غلظت بالا، حفاظت از پروتئین هدف در برابر پروتئازها، تولید پروتئین هایی که در حالت فعال برای میزبان سمی هستند. ۲- تولید بیشتر پروتئین نوترکیب ۳- استفاده از ساختارهای پلاسمیدی ساده تر	
معایب: ۱- تشکیل اینکلوژن بادی: نامحلول بودن پروتئین، نیاز به تا خوردن مجدد پروتئین جهت به دست آوردن فعالیت زیستی، احتمال عدم بازگشت فعالیت زیستی پس از تاخوردن مجدد، کاهش تولید نهایی پروتئین و افزایش هزینه ها	۱- رشد در دمای پائین تر ۲- به کارگیری پروموترهای سرمایی ۳- استفاده از سویه های دیگر *E. coli* ۴- بیان همزمان چپرون های مولکولی ۵- تولید پروتئین هدف به صورت فیوژن پروتئین ۶- استفاده از سویه های فاقد تیوردوکسین ردوکتاز ۷- افزودن سوربیتول و گلیسین بتائین به محیط کشت ۸- تغییر pH