وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه تربیت حیدریه

مقدمه ای بر نحوه

بیان پروتئین‌های نوترکیب

Expression of recombinant proteins

دکتر ایمان یوسفی جوان
(عضو هیأت علمی دانشگاه تربیت حیدریه)
اسماعیل فاضلی (دانشجوی دکتری)
ناهید گرایلی (دانشجوی دکتری)
دکتر محسن نیازخانی

بسم الله الرحمن الرحيم

معاونت آموزشی و پژوهشی

مقدمه‌ای بر نحوه بیان پروتئین‌های نوترکیب

دکترایمان یوسفی جوان
(عضو هیئت علمی دانشگاه تربت حیدریه)

اسماعیل فاضلی
(دانشجوی دکتری)
ناهید گرایلی
(دانشجوی دکتری)
دکتر محسن نیازخانی

تابستان ۱۳۹۹
۱

عنوان و نام پدیدآور: مقدمه‌ای بر نحوه بیان پروتئین‌های نوترکیب/ ایمان یوسفی جوان ... [ودیگران]

مشخصات نشر: تربت حیدریه: دانشگاه تربت حیدریه، انتشارات دانشگاه تربت حیدریه، ۱۳۹۹.

مشخصات ظاهری: ۲۳۴ص.: مصور.

شابک: 978-600-833514-6

وضعیت فهرست‌نویسی: فیپا

یادداشت: ایمان یوسفی جوان، اسماعیل فاضلی، ناهید گرایلی، محسن نیازخانی.

یادداشت: کتابنامه.

موضوع: نوترکیبی پروتئین‌ها.

موضوع: Recombinant Proteins

شناسه افزوده: یوسفی جوان، ایمان.

شناسه افزوده: دانشگاه تربت حیدریه.

رده‌بندی کنگره: TP ۲۴۸/۶۵

رده بندی دیوئی: ۶۲/۶۶۰

شماره کتابشناسی ملی: ۶۱۷۲۰۷۰

چاپ اول: تابستان ۱۳۹۹

شمارگان: ۱۰۰ نسخه

قیمت: ۴۰۰۰۰ تومان

آدرس: تربت حیدریه، کیلومتر ۷ محور تربت – مشهد، دانشگاه تربت حیدریه، انتشارات دانشگاه، تلفن ۰۵۱-۵۱۲۴۰۱۵۴

حق چاپ برای انتشارات دانشگاه تربت حیدریّه محفوظ است.

تقدیم به او....

که هر چه هست همه از آن اوست....

فهرست مطالب

فصل اول : ژنتیک پروکاریوتها و یوکاریوتها ۱

۱-۱- تاریخچهٔ ژنتیکی ۱

۱-۲- ژن ۲

۱-۲-۱- تعریف ژنها ۲

۱-۲-۲- جایگاه ژنها در کروموزومها ۳

۱-۲-۳- ژن و گوناگونی افراد ۴

۱-۳- ژنیک مولکولی ۴

۱-۳-۱- توضیح DNA ۴

۱-۳-۱-۱- کشف اسیدهای نوکلئیک به عنوان ماده ژنتیکی ۵

۱-۳-۱-۲- کار DNA در سلولها ۷

۱-۳-۱-۳- ساختمان مولکول DNA در سلولها ۸

۱-۳-۲- توضیح RNA ۱۱

۱-۳-۲-۱- ساختمان RNA در سلولها ۱۱

۱-۳-۲-۲- سازمان یابی ژن ۱۳

۱-۳-۳- واکنشهای عمده مولکول DNA ۱۵

۱-۳-۳-۱- همانندسازی DNA در یوکاریوتها ۱۵

۱-۳-۳-۲- همانندسازی DNA در پروکاریوتها ۱۷

۱-۳-۴- مبانی بروز ژن ۱۸

فصل دوم : تنظیم ژن در پروکاریوتها و یوکاریوتها ۲۰

۲-۱- تنظیم ژن ۲۰

۲-۱-۱- تفاوت تنظیم بیان ژن میان پروکاریوتها و یوکاریوتها ۲۲

۲-۲- تنظیم ژن در بخش رونویسی ۲۲

۱-۲-۲- سطوح اول، دوم و سوم تنظیم بیان ژن (قبل، هنگام و بعد از رونویسی) ۲۳
۱-۱-۲-۲- فاکتورهای نسخه برداری ۲۳
۲-۱-۲-۲- مکانیسم‌های نواحی تنظیمی ۲۵
۳-۱-۲-۲- مکانیسم‌های فعّال سازی پروتئین ۲۹
۲-۲-۲- سطح چهارم تنظیم بیان ژن (هنگام ترجمه)..... ۳۲
۳-۲-۲- سطح پنجم تنظیم بیان ژن (بعد از ترجمه) ۳۳
۳-۲- بیولوژی و تنظیم بیان ژن در یوکاریوتها ۳۴
۱-۳-۲- توالی های شناسایی شونده بوسیلهٔ فعّال کننده‌ها ۳۵
۲-۳-۲- تنظیم متابولیسم گالاکتوز در مخمرها..... ۳۵
۳-۳-۲- قسمتهای تشکیل دهنده UAS..... ۳۶
۴-۳-۲- قسمتهای تشکیل دهنده GAL4..... ۳۶
۴-۲- بیولوژی و تنظیم ژن در پروکاریوتها ۳۸
۱-۴-۲- بیان ژن اپرون لاکتوز ۴۰
۲-۴-۲- کنترل اپرون لاکتوز بوسیلهٔ فعال کننده ۴۱
فصل سوم: ناقل‌های بیان ۴۳
۱-۳- اجزاء ناقل های بیان ۴۳
۱-۱-۳- راه‌انداز ۴۴
۲-۱-۳- جایگاه اتصال ریبوزوم برروی mRNA..... ۴۹
۳ -۳-۱- پایان‌دهنده ۵۰
۱-۲-۳- ناقل‌های بیان بر پایهٔ راه‌انداز *lac*..... ۵۶
۲-۲-۳- ناقل‌های بیان بر پایهٔ راه‌انداز *trp*..... ۵۹
۳-۲-۳- ناقل‌های بیان بر پایهٔ راه‌انداز tac..... ۶۲
۴-۲-۳- ناقل‌های بیان بر پایهٔ راه‌انداز ara..... ۶۳

۵-۲-۳- ناقل‌های بیان بر پایهٔ راه‌اندازه gal ۶۵
۶-۲-۳- ناقل‌های بیان بر پایهٔ راه‌اندازهای ویروسی ۶۸
فصل چهارم: پروتئین های نوترکیب ۶۹
۱-۴- تهیّهٔ پروتئین‌های نوترکیب در سیستمهای پروکاریوتیک ۶۹
۲-۴- شناسایی ژن موردنظر به‌منظور انتقال ۷۱
۱-۲-۴- خزانه ژنومی ۷۱
۲-۲-۴- خزانه cDNA ۸۲
۳-۲-۴- سنتز مصنوعی DNA ۸۷
۳-۴- سیستم‌های بیان در اشرشیا کولی ۸۸
۱-۳-۴- استفاده از ناقل‌های پلاسمیدی ۸۸
۲-۳-۴- استفاده از ناقل‌های ویروسی ۹۱
۴-۴- افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب در اشرشیا کولی ۹۴
۱-۴-۴- ناقل‌های با تعداد نسخه بالا ۹۴
۲-۴-۴- القاءکنندهٔ مناسب ۹۵
۳-۴-۴- توالی‌های افزایندهٔ بیان ۹۶
۴-۴-۴- ترشّح پروتئین تولیدی به بیرون از سلول ۹۶
۵-۴-۴- تغییر توالی شاین‌دلگارنو ۹۸
۶-۴-۴- اضافه کردن جعبه پایین‌دستی ۹۹
فصل پنجم: تهیّه پروتئین‌های نوترکیب در سیستمهای یوکاریوتیک تک سلّولی ۱۰۰
۱-۵- مخمّرها و قارچ‌ها ۱۰۰
۲-۵- تهیه پروتئین‌های نوترکیب به‌وسیلهٔ سلولهای مخمّر ۱۰۱
۱-۲-۵- پلاسمید ۲ میکرومتری مخمّر ۱۰۲
۲-۲-۵- ناقل YIp ۱۰۳
۳-۲-۵- ناقل YEp ۱۰۴

۴-۲-۵- ناقل YCp ۱۰۵
۵-۲-۵- ناقل YAC ۱۰۶
۳-۵- نشانگرهای انتخابی ۱۰۶
۴-۵- راه‌اندازها ۱۰۶
۵-۵- نشانه‌های ترشّح پروتئین به بیرون ۱۰۷
۶-۵- استفاده از ساکارومایسس سرویزیه در تولید پروتئین نوترکیب ۱۰۷
۱-۶-۵- مبانی بیان پروتئین نوترکیب در ساکارومایسس سرویزیه ۱۰۸
۲-۶-۵- تولید آنتی‌بادی ویروسی ۱۱۰
۳-۶-۵- مزایا و معایب تولید پروتئین نوترکیب در *ساکارومایسس سرویزیه* ۱۱۲
۷-۵- پیچیا پاستوریس ۱۱۳
۸-۵- تهیّهٔ پروتئین‌های نوترکیب به‌وسیلهٔ سلّولهای قارچی ۱۱۷
فصل ششم: پروتئین‌های نوترکیب در سیستمهای یوکاریوتیک چندسلّولی حشرات ۱۲۰
۱-۱-۶- معرّفی ویروس باکیولوویروس ۱۲۱
۲-۱-۶- کشت سلول حشرات به‌منظور تولید پروتئین ۱۲۲
۳-۱-۶- سیستمهای بیان در باکیولوویروس ۱۲۵
۱-۳-۱-۶- سیستم BacPAK6 ..... ۱۲۵
۲-۳-۱-۶- سیستم Bac-to-Bac ۱۲۸
۳-۳-۱-۶- سیستم flashBAC ۱۳۰
۲-۶- تهیّه پروتئین‌های نوترکیب به‌وسیلهٔ سلولهای پستان‌دارن ۱۳۴
۱-۲-۶- طرّاحی محیط کشت و اثر آن بر بیان ژن در سلول‌های پستان‌داران ۱۴۱
۲-۲-۶- افزایش کارایی تولید پروتئین در سلول پستان‌داران ۱۴۲
۳-۶- تهیّه پروتئین‌های نوترکیب به‌وسیلهٔ سلّولهای گیاهی ۱۴۴
۱-۳-۶- گونه‌های گیاهی مورد استفاده در تهیه پروتئین‌های نوترکیب ۱۴۴

فصل هفتم: خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب ۱۴۸
۷-۲- روش‌های خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب ۱۴۹
۷-۲-۱- خالص‌سازی با استفاده از کلاًت فلزی ۱۴۹
۷-۲-۲- خالص‌سازی با استفاده از توالی نشانمند از اسیدآمینه هیستیدین ۱۵۰
۷-۲-۳- پروتئین‌های نشانمند از پروتئین متصّل شونده به مالتوز ۱۵۱
۷-۲-۴- پروتئین‌های نشانمند از گلوتاتیون S- ترانسفراز ۱۵۳
۷-۲-۵- پروتئین‌های نشانمند از بتا-گالکتوزیداز ۱۵۴
۷-۳- آلودگی‌های موجود در پروتئین تولیدی ۱۵۴
۷-۳-۱- پروتئین‌هایی با حذف پروتئولیتیکی ۱۵۵
۷-۳-۲- پیروژن‌ها ۱۵۵
۷-۳-۳- خلوص اسید نوکلئیک ۱۵۶
۷-۳-۴- مطالعهٔ ساختاری پروتئین‌های تولیدی ۱۵۶
فصل هشتم: چالش‌های تهیّه پروتئین‌های نوترکیب ۱۵۹
۸-۱- چالش‌های مربوط به توالی ژن موردنظر ۱۵۹
۸-۱-۱- عدم انجام پیرایش ۱۶۰
۸-۱-۲- تغییر معنی کدهای ژنتیکی ۱۶۲
۸-۱-۳- نادر بودن کدهای ژنتیکی ۱۶۳
۸-۲- چالش‌های مربوط به تغییرات پس از ترجمه ۱۶۴
۸-۲-۱- باندهای صحیح دیسولفید ۱۶۴
۸-۲-۲- حذف پیش مادهٔ غیرفعّال‌کننده از پروتئین ۱۶۶
۸-۲-۳- گلیکوزیلاسیون ۱۶۶
۸-۳- عدم پایداری پروتئین‌های نوترکیب در سلّول میزبان ۱۶۸
۸-۴- بیان پروتئین‌های با چند زیرواحد ۱۷۰
فصل نهم: کاربردهای تهیّه پروتئین‌های نوترکیب ۱۷۲

۹-۱- کاربردهای تهیه پروتئین‌های نوترکیب ۱۷۲
۹-۲- تولید آنتیبادی های نوترکیب ۱۷۲
۹-۳- تولید واکسنهای نوترکیب ۱۷۳
۹-۳-۱- اهمیّت تولید واکسن‌های مشتق شده از گیاهان ۱۷۳
۹-۳-۲- مصرف خوراکی واکسن و پاسخ‌های آنتی‌بادی های مخاطی و سیستمیک ۱۷۴
۹-۳-۳- سلامتی و پذیرش عمومی واکسن‌های خوراکی ۱۷۴
۹-۴- تولید داروهای انسانی ۱۷۵
۹-۵- تولید هورمونهای نوترکیب ۱۷۷
فصل دهم: سیستم‌های بیان پروتئین‌های نوترکیب ۱۸۲
۱۰-۱- سیستم‌های بیان پروتئین خارج سلولی ۱۸۲
منابع ۲۲۹

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱-..... ۳

شکل ۱-۲-..... ۱۴

شکل۲-۱-..... ۴۰

شکل ۳-۱-..... ۴۶

شکل ۳-۲-..... ۵۱

شکل ۳-۳-..... ۴۹

شکل۳-۴-..... ۶۵

شکل ۳-۵- ۵۸

شکل ۳-۶-..... ۶۰

شکل۳-۷-..... ۶۵

شکل۳-۸-..... ۶۵

شکل ۳-۹-..... ۶۷

شکل ۴-۱-..... ۷۳

شکل۴-۲-..... ۷۸

شکل۴-۳-..... ۸۱

شکل ۴-۴- ۸۴

شکل۴-۵-..... ۶۵

شکل ۴-۶-..... ۹۱

شکل ۴-۷-..... ۹۴

شکل۴-۸-..... ۹۸

شکل ۵-۱-..... ۱۰۳

شکل ۵-۲-..... ۱۰۵

شکل۵-۳-..... ۱۰۹

شکل۵-۴- ۱۰۰
شکل ۵-۵- ۱۱۵
شکل ۶-۱- ۱۲۴
شکل ۶-۲- ۱۲۷
شکل۶-۳- ۱۲۹
شکل۶-۴- ۱۳۲
شکل۶-۵- ۱۳۶
شکل۶-۶- ۱۴۰
شکل ۷-۱- ۱۵۰
شکل ۷-۲- ۱۵۳
شکل ۸-۱- ۱۶۱
شکل۸-۲- ۱۶۵
شکل ۸-۳- ۱۶۶
شکل ۸-۴- ۱۶۷
شکل ۹-۱- ۱۷۶
شکل ۹-۲- ۱۷۹
شکل ۹-۳- ۱۸۱

فهرست جدول ها

جدول ۳-۱- ۴۸
جدول ۳-۲- ۵۴
جدول ۶-۱- ۱۴۷
جدول ۷-۱- ۱۵۶
جدول ۱۰-۱- ۱۸۴

پیش‌گفتار

بیان پروتئین نوترکیب شامل مراحل انتقال ژن و بیان پروتئین جدید است. اگرچه انجام این مراحل ساده به‌نظر می‌رسد اما در رسیدن به این هدف موانع و مشکلاًت زیادی وجود دارد. در شروع فن‌آوری تولید پروتئین‌های نوترکیب فقط تعداد معدودی از موجودات زنده از قبیل باکتری اشرشیا کولی و مخمّر، به دلیل در دسترس بودن اطلاعات ژنتیکی و سیتولوژیکی بسیار از آن‌ها، بکار برده می‌شدند. با این حال در استفاده از آن‌ها، محدودیت‌ها و موانع خاصّی نظیر پردازش‌های پس از ترجمه پروتئین وجود دارد که پژوهش‌گران را وادار به انجام تحقیقات بیشتر به‌منظور یافتن جایگزین‌های مناسب برای این موجودات کرده است تا امکان بیان تعداد زیاد ژن‌های جدید به‌ویژه ژن‌های کدکننده پروتئین‌های پیچیده، نظیر داروها و هورمون‌ها فراهم گردد. باتوجّه به پیشرفت‌های قابل‌توجه در زمینهٔ زیست‌فناوری طی سال‌های اخیر، تلاش‌های زیادی برای استفاده از این علم در زندگی بشر انجام شده است. در این سال‌ها تحقیقات گسترده‌ای در زمینهٔ تولید پروتئین‌های نوترکیب انجام شده و جنبه‌های مختلف آن مورد بررسی قرار گرفته است.

در این کتاب جنبه‌های مختلف تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب مورد بررسی قرار گرفته و با توجّه به اینکه اطلاعات گسترده در مقالات گوناگون ارائه شده‌است، در کتاب حاضر سعی شده‌است که جدیدترین و آخرین یافته‌های تحقیقاتی در زمینه تولید پروتئین‌های نوترکیب ارائه گردد.

ایمان یوسفی جوان

مقدّمه

امروزه در موارد بسیاری تولید پروتئین در موجود زنده غیرمیزبان ضروری به‌نظر می‌رسد. هدف اوّلیه در همسانه‌سازی ژن، بیان ژن همسانه شده در یک موجود زنده است. ولی وارد کردن یک ژن به ناقل همسانه‌سازی لزوما به بیان موفّق ژن منجر نمی‌شود. از طرفی درصورت بیان، مقدار تولید پروتئین نوترکیب بسیار پایین است. برای پاسخ به این نیاز، ناقل‌های اختصاصی بیان، طراحی و تولید شده‌اند که در آن به جنبه‌های مختلف تولید پروتئین از جمله رونویسی، ترجمه، ثبات پروتئین، تغییرات پس از ترجمه، ترشّح میزبان و خالص‌سازی توجه شده‌است. برای دست‌یابی به حداکثر بیان هر ژن همسانه شده، سازوکار ثابتی وجود ندارد چراکه اغلب ژن‌های همسانه‌شده دارای ویژگی‌های مولکولی منحصربه‌فردی بوده و از این‌رو بیان موفق هر ژن نیاز به بررسی و آزمون دارد.

در ابتدای دهه ۱۹۸۰، تولید پروتئین نوترکیب به‌دلیل عدم اطلاع دقیق از توالی پروتئین یا ژن‌های مربوطه میسّر نبوده است. پیشرفت در زیست‌شناسی مولکولی و فناوری‌های کشت سلّولی به محقّقان، اجازه شناخت، جداسازی و بیان ژن‌ها را از منابع مختلف در میزبان‌های گوناگون داده است. بافتی که در آن پروتئین مورد نظر در مقدار بالا بیان می‌شود، اغلب به‌عنوان هدف در همسانه‌سازی ژن موردنظر و متعاقب آن تولید پروتئین نوترکیب استفاده می‌شود. برای این منظور باید تعداد نسخه بالایی از mRNAهای پروتئین موردنظر در بافت مربوطه وجود داشته باشد، بنابراین بکارگیری سلّول‌هایی با تعداد نسخه کم از mRNAی موردنظر، برای رسیدن به این هدف ناموفّق است. در این مورد، ابتدا از روی mRNAهایی که دارای غلظت بیشتری هستند و متعاقب آن پروتئین بیشتری تولید می‌کنند، cDNA تهیّه می‌شود. نسخه‌های cDNAهای مکمّلِ mRNAی ژن موردنظر که فاقد توالی‌های نامطلوبی نظیر اینترون‌ها می‌باشند، گزینهٔ مناسبی برای انتقال هستند. با توجّه به اطلاعات ژنتیکی موجود، cDNAها از طریق بیان ژن، همسانه‌سازی تکمیلی و یا با کارایی بیشتر توسط همسانه‌سازی همولوگی و تکثیر مستقیم با RT-PCR تهیه می‌شوند.

پس از انتخاب ژن، مهمترین مرحله، انتخاب یک میزبان مناسب برای بیان ژن است. ازآنجایی‌که مولکول‌های DNA، به‌ویژه در اندازه‌های کوچکتر در برابر عوامل سلّولی و بیرونی ناپایدار می‌باشند و علاوه بر آن قابلیت تکثیر ندارند و حتی برای دستکاری‌های ژنتیکی، به‌راحتی در دسترس قرار نمی‌گیرند، وارد کردن آنها در یک سری حامل‌هایی از جنس DNA برای حفظ، تکثیر، دستکاری و حتی بیان ژن ضروری است. از این‌رو پس از شناخت ژن مورد نظر، دسترسی به

ناقل‌هایی با ویژگی‌های مطلوب، لازم است. امروزه انواع ناقل‌های ژنی براساس میزبان‌های مختلف، طراحی و ساخته شده و به‌صورت تجاری در دسترس هستند.

بسیاری از پروتیئن‌ها را می‌توان در باکتری E. Coli، با سرعت بالا و هزینهٔ پایین تولید کرد. این درحالی است که از موجودات زنده دیگری نظیر مخمّر، سلول‌های حشره، بافت‌های گیاهی و حیوانی نیز می‌توان برای بیان ژن‌های خاصی استفاده کرد. لازم به یادآوری است که علاوه بر موجودات زنده از سیستم‌های دیگر تولید پروتئین نوترکیب، نظیر سیستم‌های درون شیشه‌ای نیز استفاده می‌شود که به آن اشاره خواهد شد. در این کتاب سعی شده است تا ناقل‌های بیان، میزبان-های مناسب و سیستم‌های بیان معمول در تولید پروتئین‌های نوترکیب معرّفی و مورد بررسی قرار گیرند.

فصل اول

ژنتیک پروکاریوتها و یوکاریوتها

۱-۱- تاریخچهٔ ژنتیکی

ژن به عنوان یک واحد عملکردی تمام نوکلئوتیدها درDNA، گهگاه دستخوش دگرگونی‌هایی می‌شوند که جهش[1] نام دارد. پس از هر جهش، ژن جهش یافته[2] به جای ژن اولیّه به سلّولهای فرزند انتقال می‌یابد و به ارث برده می‌شود DNA جهش یافته، آنگاه صفات تازه‌ای بوجود می‌آورد که ارثی هستند. ژنهایی که جز ژنهای ساختمانی هستند، مسئول ساختن زنجیره‌های پلی پپتیدی هستند. اگر جهشی در یکی از این ژنها، روی دهد، مجموعه صفات و ویژگی‌هایی که ژن جهش یافته مسئول بخش کوچکی از آن می‌باشد، بطور مستقیم یا غیر مستقیم، تحت تاثیر قرار خواهند گرفت و از آنجایی که بیشتر پروتئینها نقش آنزیمی بر عهده دارند، این جهش بر واکنشهایی که آنزیم مربوطه در آن دخالت دارد، اثر می‌گذارد. ژنهای دیگر که نقش تنظیم کننده دارند، فعالیت ژنهای دیگری را کنترل می‌کنند و جهش در این ژنها بر کنترل ژنهای ساختمانی اثر می‌گذارد. DNA هر موجود زنده‌ای، از تعدادی ژنهای مختلف تشکیل شده است. در هنگام رشد، هر ژن دقیقاً ژن همانند خود را پدید می‌آورد. هنگامی‌که یک ژن جهش می‌یابد، ژن جهش یافته

[1] Mutation
[2] Mutant

در تقسیمات بعدی سلول، ژنهای جهش یافته همانند خود را بوجود می‌آورد و اگر این ژن یک ژن ساختمانی باشد، جهش منجر به تولید پروتئین جهش یافته می‌گردد. ژن جهش یافته و ژن اولیه نسبت به یکدیگر آللومورف[1] نامیده می‌شوند (آلبرتس[2]، ۲۰۰۲).

۲-۱- ژن

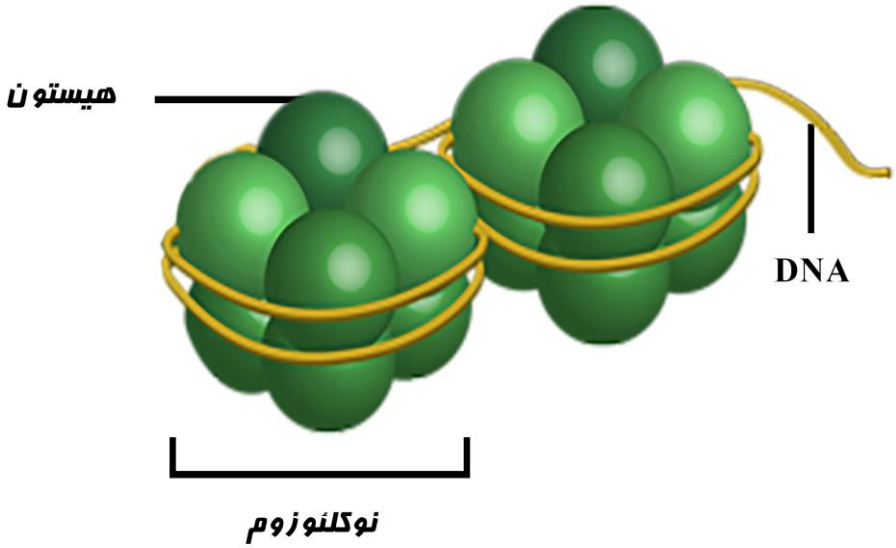
۱-۲-۱- تعریف ژن ها

ژن یا مادّهٔ وراثتی[3]، مادّه پیچیده‌ای است که در هنگام تقسیم می‌تواند همانند خود را بوجود آورد. واحدهایی از این مادّهٔ وراثتی که از پدر و مادر به فرزندان انتقال می‌یابند. این واحدها دارای ویژگی های بسیار پایدار بوده و بطور مشخّص موجودی را که صاحب آن است، تحت تأثیر قرار می‌دهند. ژنها بر روی کروموزومها در جایگاههای ویژه، مرتّب شده‌اند. پس از آنکه اسیدهای نوکلئیک بوجود آمدند، احتمال می‌رود که پیدایش جانداران جدید با سرعت بسیار زیادتری انجام گرفته باشد. این شتاب عظیم را ژنها، که القاب کنونی اسیدهای نوکلئیک هستند امکان‌پذیر ساخته‌اند. اکنون جانداران بر طبق دستورالعمل‌هایی که ژنهایشان فراهم می‌آورند، به تولید مثل می‌پردازند و به سبب اینکه نسلهای متوالی جانداران، ژنها را به ارث می‌برند.

پدید آمدن یک جاندار جدید به صورت فرایندی کنترل شده و غیر تصادفی درآمده است. آنچه جاندار به ارث می‌برد تا حدّ زیادی بقای او را تعیین می‌کند، بنابراین وراثت از نظر سازگاری جانداران حائز اهمیّت است. اما چیزی که جانداران به ارث می‌برند، بافت‌های یک جاندار، برگ سبز، خون قرمز و یا مانند آن نیست، بلکه ژنها و دیگر محتویّات سلّولهای زاینده است. سپس در فردی که از این سلولها ناشی می‌شود، صفات قابل مشاهده تحت نظارت ژنهایی که به ارث برده است، پدید می‌آید. محصول این گونه وراثت موجود زنده منحصر به فردی است که در بعضی از صفات کلی خود به والدینش شباهت دارد و در بسیاری از صفات جزئی با آنها تفاوت دارد. اگر این تفاوتها کشنده نباشند یا سبب عدم باروری نشوند، جاندار حاصل می‌تواند زنده بماند و ژنهای خود را به نسلهای بعدی انتقال دهد (پنیسی[4]، ۲۰۰۷).

---

[1] Allelomorph
[2] Alberts
[3] Hereditary Factor
[4] Pennisi



شکل ۱-۱- ساختار نوکلئوزوم و بخشی از کروموزوم

۲-۲-۱- جایگاه ژنها در کروموزومها

یاخته‌های یک گیاه یا یک جانور دارای تعداد معینی کروموزوم است که ویژه آن گونه گیاهی یا جانوری می‌باشد و تعداد این کروموزومها در همه یاخته‌های آن فرد پایدار و یکسان است. بنابراین همه یاخته‌های یک فرد دارای مجموعه‌های ژنی یکسانی می‌باشند، مثلاً در مگس سرکه در حدود ۱۰ هزار ژن شناخته شده است. افراد مختلف یک گونه دارای آللهای متفاوت یک ژن در سلولهای خود می‌باشند. در هر کروموزوم، ژنها بطور خطی قرار گرفته‌اند و نظام آنها پایدار و ثابت است. جایگاه ثابت هر ژن در کروموزوم که ویژهٔ آن ژن است، لوکوس[1] نامیده می‌شود. دو ژن آلل نمی‌توانند بطور همزمان در یک جایگاه وجود داشته باشند و در یک زمان هر جایگاه می‌تواند پذیرایی تنها یکی از ژنهای آلل باشد (جریک[2] و همکاران، ۲۰۰۶).

برخی از ژنها به ویژه ژنهایی که در ساختن RNA دخالت دارند، چندین بار در یک مجموعه کروموزومی‌تکرار می‌شوند. در پدیدهٔ میتوز، پیش از تقسیم هسته، ژنها و در نتیجه کرومزوم‌ها، دو برابر شده‌اند و هر یک از دو یاخته حاصل از تقسیم، یکی از مجموعه‌های کروموزومی را دریافت

[1] Locus
[2] Gericke

می‌کند و مجموعه‌های کروموزومی دو سلّول دقیقاً یکسان خواهد بود (ایساکسون[1] و همکاران، ۲۰۰۴).

۳-۲-۱- ژن و گوناگونی افراد

در یاخته‌های بدنی گیاهان و جانوران کروموزوم‌ها به صورت جفت وجود دارند و از نظر ظاهری یکسان می‌باشند (به جز کروموزوم‌های جنسی). در هر بخش از یک جفت کروموزوم، نظام جایگاههای ژنی، همانند نظام جایگاههای بخش دیگر می‌باشد و ژنهایی که در جایگاههایی همانند قرار دارند، ممکن است یکسان بوده و یا آلل یکدیگر باشند. در حالت نخست فرد از نظر دو ژن هموزیگوت و در حالت دوم هتروزیگوت می‌باشد.

شمارهٔ کروموزوم‌ها در یاخته‌های حاصل از تقسیم میوز یا گامتها، نصف تعداد کروموزوم‌ها در سلّولهای پیکری است و در هر یک از گامتها، تنها یک بخش از یک جفت کروموزوم همانند، در برخی از جایگاهها باهم متفاوت هستند.

در نتیجه گامتها نیز با هم متفاوت خواهند بود و چون توزیع کروموزومها در هر گامت از قانون احتمالات پیروی می‌کند، در نتیجه احتمال تولید گامتهای مختلف در صورتی که تعداد کروموزوم‌ها را x در نظر بگیریم، 2^x خواهد بود. این حالت، تفکیک مستقل نامیده می‌شود. تقاطع کروموزومی نیز به ایجاد تفاوتهای بیشتر بین گامتها، کمک می‌کند (فریتاس[2] و همکاران، ۲۰۱۱).

۳-۱- ژنیک مولکولی

ژنتیک مولکولی بخشی از علم ژنتیک است که به بررسی ساختمان، ترکیب و طرز کار عوامل وراثتی (ژنها) در سطح مولکول می‌پردازد. مطالعهٔ خصوصیات طرز کار و سیر تحوّل اسیدهای نوکلئیک، تعیین توالی مولکولهای DNA و در نهایت شناسایی جزئیات ژن از وظایف این بخش از علم ژنتیک است.

۳-۱-۱- توضیح DNA

واحدهای وراثتی که از نسلی به نسل دیگر انتقال می‌یابند یا به عبارتی به ارث می‌رسند ژن نامیده می‌شوند. ژن‌ها در مولکول‌های بلند دئوکسی ریبو نوکلئیک اسید یا DNA

[1] Isaksson
[2] Freitas

موجود در تمامی‌سلّول‌ها قرار دارند. DNA خطّی همراه با یک ماتریکس پروتئینی، ساختارهای نوکلئوپروتئین را تشکیل می‌دهد و به صورت ساختمان‌هایی به نام کروموزوم در بخشی از سلول به نام هسته قرار می‌گیرد (یوکاریوتها). تمامی‌واحدهای نوکلئوتیدی از سه بخش مشترک تحت عنوان گروه فسفات، قندهای پنج کربنه و بازهای نیتروژن دار تشکیل شده اند، که در ساختار نوکلئوتیدهای DNA این قند پنج کربنه به شکل دئوکسی ریبوز بوده و کربن شماره دو این قند دارای یک گروه هیدروکسیل می‌باشد (بروکنر[1]، ۲۰۰۹).

۱-۳-۱-۱- کشف اسیدهای نوکلئیک به عنوان مادهٔ ژنتیکی

مایشر در سال ۱۸۷۰ از گلبول‌های سفید و اسپرم ماهی آزاد موادّی استخراج نمود که دارای مولکولهای درشت بودند وی آنها را نوکلئین نامید. بعدها محقّقین موفّق شدند به کمک اسید کلریدریک، هستهٔ بعضی از سلّول‌ها را که شامل همین مواد بود جدا نموده و با اضافه نمودن محلول قلیایی به آن، به رسوبی که شامل عناصر کربن، هیدروژن، اکسیژن، نیتروژن و درصد قابل ملاحظه ای فسفر بود دست یابند. این مادّهٔ پیچیده همان نوکئین بود، که به دلیل اسیدی بودن اسیدهای نوکلئیک نامیده شدند و سپس به اسم اسید دزوکسی ریبونوکلئیک تغییر نام یافتند. عوامل وراثتی از موادّ شیمیایی به نام اسید دزوکسی ریبونوکلئیک (DNA) ساخته شده است که حاصل اطلاعات وراثتی در تمامی‌جانوران به جز ویروسها هستند. این عوامل از لحاظ ساختمانی پایدار بوده و دارای قابلیّت همانندسازی و خود تکثیری می‌باشند. تمامی‌ژنهای پروکاریوتها و یوکاریوتها از نوع DNA است در برخی از ویروسهای گیاهی نظیر ویروس موزائیک توتون (TMV) DNA وجود ندارد و DNA در تمام مراحل زندگی ویروس بعنوان مادّهٔ وراثتی عمل می‌نماید. در ویروس‌ها ژن‌ها می‌توانند از نوع DNA و یا RNA باشند. در برخی از ویروسهای حیوانی RNA با الگو قرار دادن DNA همانندسازی می‌کند. DNA همان پلیمرهای خطّی نوکلئوتیدها می‌باشد که بخشی از ساختمان نوکلئوپروتئینی کروموزمها را تشکیل می‌دهد. اندازه مولکول DNA بسیار بزرگ بوده به گونه ای که می‌تواند از چند میلیون نوکلئوتید تشکیل شده باشد. قسمت پروتئینی این مولکول از دو پروتئین به نام‌های پروتامین (در اسپرم ماهی) و هیستون (در هسته‌ی دیگر سلولها) ساخته شده است. هیستونها در مقایسه با پروتامین‌ها دارای ساختمان پیچیده تری هستند این مواد غالباً در هسته و در برخی از اندامک های سلولی مانند میتوکندری و

[1] Brueckner

کلروپلاست وجود ندارد مقدار DNA موجود در هستهٔ موجودات مختلف متفاوت می‌باشد. مقدار DNA با تعداد کروموزم ارتباطی ندارد. برخی از موجودات دارای تعداد زیادی کروموزوم بوده ولی مقدار DNA کمی دارند. امروزه مشخّص شده است که هر کروماتید کروموزوم یوکاریوتها حاوی یک مولکول بهم پیوسته مارپیچ مضاعف DNA است. تمامی DNAها دو رشته ای نیستند (یاکووچوک[1] و همکاران، ۲۰۰۶).

DNA ویروس عفونی کننده در اشرشیاکلی، تک رشته ای می‌باشد. در اواخر دههٔ ۱۹۲۰ گریفیث با استفاده از باکتری‌های کروی شکل عامل بیماری ذات الریّه (سینه پهلو)، توانست طی آزمایشاتی، نقش مادهٔ شیمیایی اسید نوکلئیک را به عنوان مادهٔ ژنتیکی اثبات نماید باکتری‌های عامل این بیماری ممکن است دارای کپسول (پوشش پلی ساکاریدی) با تیپ‌های مختلف مانند 3s، 2s و یا بدون کپسول باشند. از روی سطح صاف کلونی می‌توان باکتری‌های کپسول دار را از بدون کپسول شناسایی نمود. باکتریهای کپسول دار زنده، بیماری‌زا و مرگبار هستند و بعد از ورود به بدن موش به دلیل داشتن کپسول که همانند سپری آنها را در برابر تهاجم گلبولهای سفید حفظ می‌کند. زنده می‌مانند و می‌توان آثار بیماری‌زایی خود را آشکار کنند. در مقابل باکتریهای بدون کپسول در برابر تهاجم گلبولهای سفید غیر مقاوم بوده و از بین می‌روند. باکتری‌های کپسول دار بیماری‌زا در حالت طبیعی به فرم (S) نژاد 3s و باکتریهای بدون کپسول غیربیماری‌زا به فرم (R) نژاد 3s هستند. باکتری‌های کشته شده تیپ R و یا غیر زنده تیپ S بی خطر می‌باشند. موتانهای R فاقد آنزیم لازم برای سنتز پلی ساکارید کپسولی هستند (ناسمیت[2] و همکاران، ۱۹۸۰).

هر یک از این دو تیپ فقط کپسول نوع مخصوص به خود را تولید می‌کند، به طوری که آنها قادرند این صفت ارثی (نوع کپسول) را از نسلی به نسل دیگر انتقال دهند. این امر نشان می‌دهد که عامل تشکیل دهنده ی قند کپسولها بخشی از ژنوتیپ باکتری می‌باشد. به همین ترتیب غیر صاف بودن (R) پوشش باکتری تیپ موتان یک صفت ارثی است و می‌تواند از نسلی به نسل دیگر انتقال یابد. گریفیث مشاهده کرد که موتانهای R غیر بیماری‌زا می‌توانند به فرم S بیماری‌زا تبدیل وضعیت (ترانسفورمه) دهند. وی مخلوطی از باکتری‌های زنده R و مرده تیپ 3S را به موش تزریق نمود و متوجّه شد که در اثر تزریق حیوانات می‌میرند، این اتفاق برای گریفی غیر منتظره بود. چون هیچ یک از این باکتری‌ها به تنهایی قادر نبودند باعث مرگ شوند. باکتریهای تیپ 3S در اثر حرارت کشته شده و باکتری‌های R هم غیر بیماری‌زا بودند. گریفیث برای اثبات صحّت وقوع این

[1] Yakovchuk
[2] Nasmyth

رویداد این آزمایش را چندین مرتبه تکرار نمود. او پس از هر تزریق بیماری ذات الرّیه را در موشها مشاهده می‌نمود. وی با بررسی موشهای تلف شده مشاهده کرد در خون این موشها باکتری‌های از نوع S و زنده وجود دارند. بنابراین نتیجه گرفت که باکتری‌های S کشته شده نژادهای R زنده را به فرم S تبدیل نمودند، گریفیث در آن زمان نتوانست دلیل این امر را پاسخ دهد، اما وی حدس زد که ممکن است تیپ 3s مرده به تیپ زنده آن تغییر وضعیت داده باشد.

دلیل وی این بود که باکتری‌های تیپ R تزریق شده به موشها از تیپ 2s بوده و در صورت وقوع موتاسیون مجدّد در تیپ R می‌بایست باکتری تیپ 2s ایجاد گردد. لذا وی استدلال کرد که باکتریهای زندهٔ غیر بیماری‌زای ایجاد شده تیپ 3s از طریق جهش بوجود نیامده و نتیجه گرفت که بایستی برخی از باکتریهای زنده غیر بیماری زای R به طریقی به وسیلهٔ باکتریهای کشته شده تیپ 3s به باکتری بیماری‌زای تغییر شکل داده شده باشند. او این پدیده را اصطلاحاً ترانسفورماسیون نامید. تیپ 3s نیز قابلیّت تولید مثل دارد و می‌تواند صفت مربوط به خود را از نسلی به نسل دیگر منتقل نماید. بعدها محقّقین توانستند در شرایط آزمایشگاهی تبدیل وضعیت (ترانسفورماسیون) باکتری‌های نوع R به S را عملی سازند. این یافته زمینه را برای شناسایی مادهٔ ژنتیکی و طبیعت شیمیایی آن مساعد نمود، شناسایی ماهیّت قطعی DNA بوسیله آزمایشاتی که توسط مک لوئید و مک کارتی صورت گرفت تحقق یافت. این سه نفر با انجام آزمایشاتی اعلام نمودند که دزوکسی ریبونوکلئیک اسید مسئول اصلی ترانسفورماسیون باکتری‌های تیپ ۳ می‌باشد و اسید نوکلئیک موجود در سلولهای باکتری S قادر است تعدادی از سلولهای R را به S تغییر دهد. از تزریق محلول استخراج شده خالص DNA باکتری بدون کپسول غیر بیماری‌زای به S تغییر شکل می‌دهند. پژوهشگران مذکور به همراه دیگر محقّقان با انجام آزمایشات متعدّد دیگری بدین نتیجه دست یافتند که مادهٔ بوجود آورنده تغییر شکل فقط DNA بوده و دیگر مولکولها نظیر RNA (بجز در پاره ای از ویروسها)، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها در آن بی‌تأثیر بوده اند (واستون[1]، ۲۰۰۶).

۲-۱-۳-۱- کار DNA در سلولها

یاخته‌های ژنتیکی موجودی در مولکول DNA در نهایت برای مواردی چون ساخت پروتئین و مولکول‌های RNA و یا در یاخته، مورد استفاده قرار می‌گیرد. قطعه‌هایی از DNA که پیام‌های

[1] Watson

ژنتیکی را با خود حمل می‌کنند ژن نامیده می‌شوند. ولی DNA توالی‌های دیگری نیز دارد که برای ساخت خود DNA یا تنظیم استفاده از اطلاعات ژنتیکی موجود در ژن، مورد استفاده قرار می‌گیرند. از لحاظ شیمیایی، DNA از دو رشته طولانی پلیمری با واحدهای ساختاری از جنس نوکلئوتید تشکیل شده است که شامل ستون‌هایی از گروه‌های قند و فسفات هستند. اتّصال نوکلئوتیدها به هم در زنجیره توسط گروه‌های هیدروکسیل کربن ۳ٰقند و ٰ۲ ریبوز بوده که به این اتّصال فسفودی استر می‌گویند، که در نهایت اسکلت DNA ساخته می‌شود. این دو رشته DNA با هم موازی هستند (رالستون[1] و همکاران، ۱۹۹۳).

مولکول‌های قند از طریق چهار نوع باز آلی به یکدیگر متّصل می‌باشند. توالی این چهار باز آلی باعث رمزگذاری رشته ژنتیکی می‌شود که این رمزها برای ساخت اسید آمینه که واحدهای سازنده پروتئین می‌باشند مورد استفاده قرار می‌گیرد. این رمز ژنتیکی توسط مولکول RNA در مرحله برگردان خوانده می‌شود و برای ساخت اسید آمینه مورد استفاده قرار می‌گیرد. DNA در داخل یاخته به شکل سازه‌هایی به نام فام تن می‌باشد. دو نسخه از هر کروموزوم در زمان تقسیم یاخته‌ای ساخته می‌شود. فرایند تکثیر به دو نسخه را نسخه برداری DNA می‌نامند. فام تن در هستهٔ جانوران، گیاهان، قارچ‌ها و آغازیان در بخشی به نام هستهٔ یاخته قرار می‌گیرد در حالی که در پیش هسته‌ای‌ها مثل باکتری و آرکی‌ها در سیتوپلاسم یاخته قرار دارد و جایگاه مشخصی ندارد. در داخل فام‌تن پروتئین‌های کروماتینی کروماتین واحد سازنده DNA می‌باشد، مانند هیستون وجود دارد که وظیفهٔ فشرده سازی DNA و تنظیم بیان ژنها را برعهده دارند. هیستونها تحت تأثیر عوامل گوناگون از جمله استیلاسیون یا دزاستیلاسیون هیستونی بسته یا باز می‌شوند و بدین ترتیب رونویسی از ژنهای ناحیهٔ مربوط به آن‌ها متوقّف یا آغاز می‌شود (سالازار[2] و همکاران، ۱۹۹۳).

۳-۱-۳-۱- ساختمان مولکول DNA در سلولها

DNA مولکولی است که دستورهای ژنتیکی مورد استفاده در توسعه و عملکرد تمام موجودات زنده شناخته شده و بسیاری از ویروس‌ها را کدگذاری می‌کند. DNA اسید نوکلئیکی است که شامل پروتئین و کربوهیدرات‌هاست. اسیدهای نوکلئیک از سه ماکرومولکول اصلی تشکیل شده که برای زندگی همهٔ گونه‌های شناخته شده ضروری می‌باشد. اکثر مولکولهای DNA

[1] Ralston
[2] Salazar

از دو رشته پلیمری زیستی که به صورت حلقه دور هم پیچ خورده و به شکل یک مارپیچ دوگانه درآمده‌است. دو رشته DNA به عنوان پلی نوکلئوتید شناخته شده، که از واحدهای ساده‌تری به نام نوکلئوتید ساخته شده‌است (اسکوبل[1] و همکاران، ۱۹۹۰).

هر نوکلئوتید از یک باز آلی، گوانین (G)، یا سیتوزین (C)، یا آدنین (A)، یا تیمین (T)، و از یک قند مونوساکاریدی به نام دئوکسی ریبوز و یک گروه فسفات تشکیل شده‌است. نوکلئوتیدها به وسیلهٔ پیوند کوالانسی به صورت زنجیره‌ای به هم متّصل می‌شوند، نوکلئوتیدها از محل قند یک نوکلئوتید با فسفات نوکلئوتید دیگر پیوند ایجاد کرده و ساختاری شبیه ستون فقرات (رشته بلند) قند و فسفاتی را ایجاد می‌کنند.

واتسون و کریک در سال ۱۹۵۳ مدل دو رشته ای طویل و مارپیچ را برای ساختمان DNA ارائه نمودند. DNA ماکرومولکول سه بعدی بسیار درازی است که از واحدهای کوچکتر به نام نوکلئوتید تشکیل شده است. هر نوکلئوتید از سر مولکول کوچکتر (قند پنج کربنه، چهار نوع باز آلی مختلف و مولکول فسفات) تشکیل شده است. بر اساس مدل واتسون و کریک در محور میانی مولکول DNA بازهای آلی قرار دارند که اطلاعات ژنتیکی را حمل می‌کنند. در سطح خارجی آن قند و فسفات واقع هستند که تنها نقش ساختمانی دارند. نوکلئوتیدهای موجود در یک زنجیره از طریق فسفاتهای آن زنجیره به وسیلهٔ فرایند پلیمریزاسیون به هم وصل و بدین طریق زنجیر طویل نوکلئوتید را که می‌توان ترکیبی از چند میلیون نوکلئوتید باشد، تولید نمایند. ترتیب قرار گرفتن نوکلئوتیدها در طول زنجیره‌ها هیچ محدودیتی ندارد. و توالی بازها به صورت کاملاً متّنوع انجام می‌پذیرد. دو زنجیره این مولکول بطور موازی و به صورت نردبان مارپیچ مانند از درون و توسّط پیوندهای هیدروژنی بین باز آلی نوکلئوتیدها به هم متّصل هستند. لذا دو زنجیره در نتیجهٔ اثر متقابل بین جفت بازهای آلی، در کنار یکدیگر نگه داشته شده اند، فاصلهٔ یک چرخش کامل DNA حدود ۳۴ آنگستروم است که ده جفت نوکلئوتید را شامل می‌شود. قطر دو زنجیره مولکول حدود ۲۰ آنگستروم و فاصله میان هر دو نوکلئوتید ۳/۴ آنگستروم می‌باشد. تشبیه این ساختمان به نردبان مدل خوبی برای بیان و ارائه بسیاری از خصوصیات مولکولی این اسید می‌باشد. ساختمان DNA می‌تواند فرمهای مختلف دو زنجیره ای را به خود بگیرد. اغلب DNA به فرم Bdna هستند که همان فرم واتسون و کریک می‌باشد (کارتیس[2] و همکاران، ۲۰۱۷).

[1] Scoble
[2] Curtis

DNA فرم Adna و Zdna هم شناخته شده است. دو رشته مولکول DNA در نتیجه کشیدن دو سر از هم جدا نمی‌شوند و فقط در نتیجهٔ باز کردن چرخش از هم جدا می‌شوند. در مولکول DNA قند ۵ کربنه ای بنام دزوکسی ریبوز وجود دارد که تفاوت آن با قند ریبوز (قند پنج کربنه نزدیک به آن) در این است که یکی از کربنهای ریبوز فاقد اکسیژن بوده به جای گروه هیدروکسیل در این قند هیدروژن وجود دارد. بازهای آلی از عناصر کربن، هیدروژن، اکسیژن و ازت تشکیل یافته اند، از نظر شیمیایی سه باز آلی سیتوزین تیمین اوراسیل که جز پیریمیدن‌ها هستند و از دو اتم ازت و چهار اتم کربن که تشکیل یک حلقه آلی را می‌دهند تشکیل شده است. دو باز آلی اصلی دیگر یعنی آدنین و گوانین از گروه پورین‌ها می‌باشند که با چهار اتم ازت و ۵ اتم کربن، ۲ حلقه آلی متّصل به هم را تشکیل می‌دهند. تفاوت بازهای آلی با یکدیگر در پیریمیدین‌ها، در گروههای شیمیایی متصل به آنها در کربن‌های ۵ و ۶ مولکول و در پورین‌ها در گروه‌های شیمیایی متصل به انها در کربن‌های ۲ و ۶ مولکول می‌باشد. پیوندهای بین آدنین و تیمین دوگانه و بین گوانین و سیتوزین سه گانه می‌باشد. معمولاًدر موجودات مختلف نسبت‌های A/T با G/C مساوی بوده و تقریباً برابر با یک می‌باشد. به عبارت دیگر هر جا در یک زنجیرهٔ مولکول نوکلئوتید آدنین دار قرار داشته باشد، در برابر آن نوکلئوتید تیمین دار قرار خواهد داشت و هر جا نوکلئوتید سیتوزین دار باشد در برابر آن نوکلئوتید گوانین دار قرار می‌گیرد. به همین دلیل نوکلئوتیدهای آدنین دار و تیمین دار مکمّل یکدیگر و مولکول‌های سیتوزین دار و گوانین دار مکمّل یکدیگر هستند و بر همین اساس قانون شارکاف (شارگان) که مبتنی بر فرمول A+G/T+C و A+G=T+C می‌باشد ارائه شد.

در پی پیوند قند ساده ۵ کربنه دزوکسی ریبوز با یکی از بازهای آلی ازت دار (آدنین، گوانین، سیتوزین، تیمین) ترکیب جدیدی به نام نوکلئوزید ایجاد می‌شود. همیشه بین کربن یک پریم قند ۵ کربنه دزوکسی ریبوز و ازت شماره ۹ بازهای پورین و یا ازت شماره ۱ بازهای پیریمیدین پیوند برقرار می‌باشد با توجّه به نوع باز آلی و نیز قند دزوکسی ریبوز ممکن است یکی از دزوکسی ریبونوکلئوزیدها که شامل دزوکسی گوانوزین، دزوکسی آدنوزین و دزوکسی ریبونوکلئوزیدها که شامل دزوکسی گوانوزین، دزوکسی آدنوزین، دزوکسی سیتیدین و تیمیدین هستند بدست آید، در اسیدهای نوکلئیک علاوه بر باز الی و قند گروه شیمیایی دیگری به نام اسید فسفریک وجود دارد. این گروه از طریق پیوند استری به هیدروکسیل کربن ۵ پنتوز متّصل می‌گردد. از

ترکیب اسید فسفریک به مجموعه باز آلی وپنتوز، یا به نوکلئوزیدها ترکیب جدیدی بعنوان نوکلئوتید ایجاد می‌شود (آلبرتز[1] و همکاران، ۲۰۰۶).

نوکلئوتیدها واحد ساختمانی اسیدهای نوکلئیک محسوب می‌شوند بطوریکه به هر واحد نوکلئوتیدی یک منومر اطلاق شده و از اتصال دو نوکلئوتید به یکدیگر دی‌نوکلئوتید یا دیمر ایجاد می‌شود. اتّصال نوکلئوتیدها به یکدیگر کاملاً اختصاصی صورت می‌گیرد. به این ترتیب که یک نوکلئوتید از طریق فسفات خود در محلّ ۵ به هیدروکسیل در محلّ ۳ نوکلئوتید دیگر پیوند خورده و تشکیل یک دی‌نوکلئوتید یا دایمر را خواهد داد. بدنبال این عمل یک مولکول آب آزاد می‌شود اصطلاحاً آبگیری گفته می‌شود. طی فرایند پلیمریزاسیون رشد زنجیرهٔ پلیمراز جهت مشخّص بر خوردار می‌باشد. یعنی پس از تشکیل یک دی نوکلئوتید، انتهای ۵ آن همواره آزاد مانده و اتّصال نوکلئوتیدهای جدید از طریق پیوند به انتهای ۳ پلی نوکلئوتیدها صورت می‌گیرد. به همین دلیل گفته می‌شود که رشد پلی مراز انتهای ۵ آزاد شروع و به سوی انتهای ۳ آزاد یا در واقع در جهت ۳ به ۵ رشد می‌کند. اولیگومر پدید می‌آید. اتّصال مونومرها به یکدیگر منجر به تشکیل پلیمر یا همان اسید نوکلئیک خواهد شد.

زنجیرهٔ DNA قطبی بوده. یک انتهای زنجیره دارای گروه ۵ فسفات آزاد در ابتدای دی‌اکسی آدنوزین بوده و گروه OH ۳ آزاد در انتهای دیگر می‌باشد. بنابر این تسلسل بازها از ۵ به ۳ نوشته می‌شود.

۲-۳-۱- توضیح RNA

مولکولهای RNA چند وظیفهٔ مهم را داشته، اصلی ترین وظیفه انجام عملیّات ترجمه و بیان ژن را برعهده می گیرند، از وظایف دیگر آنها به عنوان واحدهای وراثتی در ویروسها معرّفی می‌شوند. در ساختار نوکلئوتیدهای RNA این قند پنج کربنه به شکل ریبوز بوده و کربن شماره دو این قند دارای یک گروه هیدروژن می‌باشد.

۱-۲-۳-۱- ساختمان RNA در سلولها

گروه دیگری از اسیدهای نوکئیک اسید ریبو نوکلئیک نامیده می‌شوند که از لحاظ ترکیب شیمیایی و ساختمانی شبیه به DNA می‌باشند. اسیدهای دزوکسی‌ریبونوکلئیک با اسیدهای

[1] Alberts

دزوکسی نوکلئیک اندکی متفاوت هستند. نقش اصلی RNA دخالت در سنتز پروتئین است. نوعی از RNA، RNA پیغام بر (mRNA) می‌باشد که اطلاعات و پیام ژنتیکی لازم را از دستورالعمل‌های رمز شده در DNA به صورت رمز از کروموزومهای موجود در داخل هسته جای گرفته است به محلّ سنتز پروتئین در سیتوپلاسم سلول میرساند تا در تولید یک پلی‌پپتید ویژه بکار رود به انجام چنین فرایندی درون سلول اصطلاحاً نسخه برداری گفته می‌شود. برای اینکه پیام از روی DNA به سیتوپلاسم منتقل شود بایستی ابتدا مارپیچ دو رشته ای در تمامی‌نواحی ژن یا ژنهایی که قرار است بیان شوند، باز گردیده و سپس یکی از رشته‌ها برای سنتز رشته (mRNA) ساخته شده نیز از جهت ۵ به ۳ ترجمه خواهد شد. نقطه آغاز ژن در انتهای ۳ رشته ای DNA قرار دارد که از روی آن نسخه برداری انجام می‌شود (سبالوس[1] و همکاران، ۲۰۰۷).

RNAی نوع دوم RNAی ناقل (tRNA) میباشد که از لحاظ اندازه در مقایسه با RNA ریبوزومی‌و mRNA کوچکتر می‌باشد وظیفهٔ این نوع RNA انتقال اسیدهای آمینه موجود در سیتوپلاسم و حمل آنها به محلهای سنتز پروتئین بر روی ریبوزوم‌ها برای تولید پلی پپتیدها می‌باشد. ساختار مولکولی tRNA قادر به شناسایی اسید آمینه معینی است که بعد از شناسایی می‌تواند با آن پیوند کووالانسی تشکیل دهد و بخش پایینی هر مولکول tRNA دارای سه نوکلئوتید با ترتیب خاصّی بنام آنتی کدون می‌باشد که مکمّل کدون واقع روی mRNA است. tRNA به کمک آنتی کدون، می‌تواند کدون مکمّل خود را روی mRNA شناسایی کند. علاوه بر این ساختار ثانویّه این مولکول بدین صورت است که مولکولهای tRNA حاوی نوکلئوتیدهای غیرمعمولی می‌باشند که قادر نیستند با سایر بازها پیوند هیدروژنی تشکیل دهند و لذا می‌توان آنها را در درون مولکول بصورت حلقه‌های جفت نشده مشاهده نمود. برای این منظور tRNA به آمینو اسیدها متصّل شده و در جریان سنتز پروتئین هر کدام از این آمینو اسیدها را با استفاده از الگوی مناسب در موضع مناسبی نسبت به دیگر اسیدهای آمینه قرار می‌دهد تا بتوانند برای تشکیل پلی پپتیدها به یکدیگر متّصل شوند. حداقل بیست مولکول مختلف tRNA که هر کدام برای یک اسید آمینه بخصوص می‌باشند وجود دارد. ساختمان اصلی tRNA شبیه یکدیگر می‌باشد و معمولاً از یک رشته منفرد حاوی ۸۰ باز تشکیل شده اند که به دلیل جفت شدن مکمّل به روی هم تا شده و شکل برگ شبدر یا حلقه (لوپ) بزرگ به نظر می‌رسد. دلیل این امر تاشدگی بازهای مکمّل روی هم می‌باشد.

[1] Ceballos

ریبوزومها در یوکاریوتها بر روی شبکه آندوپلاسمی مستقر و در پروکاریوتها داخل سیتوپلاسم پراکنده شده اند.

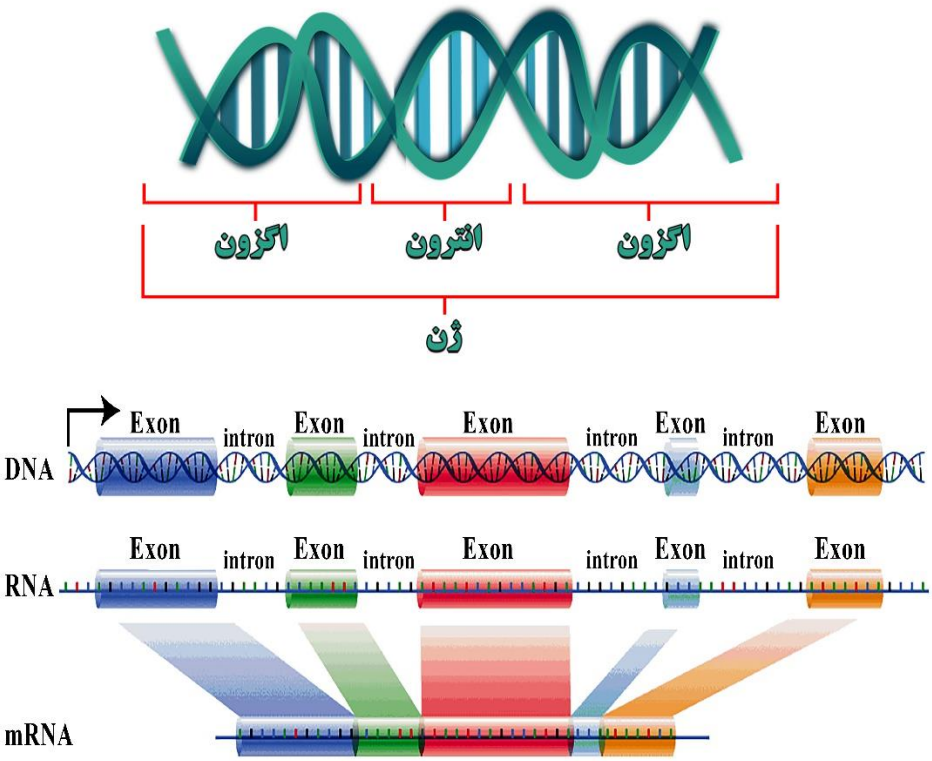
ریبوزومها خود از دو قسمت واحدهای فرعی کوچک و بزرگ تشکیل شده اند. هر واحد فرعی تقریبا از دو قسمت مساوی RNA و پروتئین تشکیل گردیده است. واحد فرعی کوچک دارای یک مولکول RNA حاوی تقریبا ۱۵۰۰ باز و RNA واحد فرعی بزرگ دارای دو مولکول RNA یکی دارای ۳۰۰ باز و دیگری حاوی ۱۰۰ باز می‌باشد. این ذّرات ریز در واقع برای RNA ناقل و RNA پیغام بر نقش میز کار را بازی میکنند. هر ریبوزوم شامل یک واحد فرعی کوچک و یک فرعی بزرگ هستند که به یکدیگر می‌چسبند و RNA پیغامبر را نگه می‌دارند. معمولاً mRNA در شکاف میان دو بخش قرار می‌گیرد ریبوزوم پروکاریوتها در شیب چگالی ۷۰S رسوب نموده و شامل دو بخش 30s, 50s هستند این در حالی است که ریبوزوم یوکاریوتها بدلیل بزرگی در شیب چگالی 80s رسوب نموده و مشتمل بر بخشهای فرعی 60s و40s می‌باشد. RNA ریبوزومی‌بر حسب اندازه آن در باکتری اشرشیاکلی به سه دسته تقسیم می‌شود، RNAهای 5s و16s و23s در حالی که در یوکاریوتهای RNAهای ریبوزومی18s با واحدهای فرعی کوچک تر و28s و 5s با 5.8s در زیر واحد بزرگ ریبوزوم وجود دارد. در یوکاریوتهای RNAهای 18s و 28s و 5.8s در هستک و 5s درخارج هستک رونویسی می‌شوند.

۲-۲-۳-۱- سازمان یابی ژن

در ساده‌ترین حالت، یک ژن را می‌توان به صورت قطعه‌ای از یک مولکول DNA و حاوی رمز برای توالی اسید آمینه‌ای یک رشته پلی پپتیدی و توالی‌های تنظیم کننده لازم برای بروز آن در نظر گرفت. به هر حال این توصیف برای ژنهای موجود در ژنوم انسان، ناکافی است، زیرا تعداد ناچیزی ژن به صورت توالی‌های رمزدار پیوسته وجود دارد. بلکه در عوض در بین اکثریت ژنها، یک یا بیش از یک ناحیه فاقد رمز موجود است. این توالی‌های حد فاصل که اینترون[1] نامیده می‌شوند، ابتدا در هسته به RNA رونویسی می‌شوند، اما در RNA پیامبر بالغ در سیتوپلاسم وجود ندارند. لذا اطّلاعات توالی‌های اینترونی، بطور طبیعی در فرآورده پروتئینی نهائی نمایانده نمی‌شود (ولش[2] و همکاران، ۱۹۹۴).

[1] Intron
[2] Walsh

اینترونها یک در میان با توالی‌های رمزدار یا اگزون[1] که نهایتاً توالی اسید آمینه‌ای پروتئین را رمز گردانی می‌کنند، قرار دارند. اگرچه تعداد کمی از ژنها در ژنوم انسان فاقد اینترون می‌باشند، اکثر ژنها حداقل یک و معمولاً چندین اینترون دارند. ژن دیستروفین وابسته به جنس که حاوی ۲ میلیون جفت باز است، کمتر از یک درصد آن حاوی اگزونهای رمزدار است. اینترونها در ساختار ژنها، نقش حفاظت از اگزونها را در برابر جهش ها بر عهده دارند.



شکل ۱-۲- مناطق اگزونی و اینترونی در منطقه ای از یک ژن، روی یک DNA و RNA

[1] Exon

۳-۳-۱- واکنشهای عمدهٔ مولکول DNA

عمل همانند سازی یا اتوکاتالیتیک و عمل نسخه برداری یا هتروکاتالتیک از ژن‌ها، دو فرایند مهمّ مولکولهای DNA می‌باشند.

۱-۳-۳-۱- همانندسازی DNA در یوکاریوتها

بر اساس مدل واتسون و کریک یک ژن باید اطلاعات را به گونه ای منتقل کند که نه تنها به آسانی توسّط سلّول مورد استفاده قرار گیرد، بلکه بتواند تکثیر و به تمام سلّولهای حاصل از تقسیم انتقال یابد. بر این اساس آنها نتیجه گرفتند که مولکول DNA بصورت دو رشته مکمّل هم می‌باشند، به گونه ای که هر رشته پس از جدا شدن می‌تواند به عنوان یک الگو یا قالب برای سنتز دقیق رشته مقابل خود عمل کند. این عمل درهنگام همانندسازی DNA به وقوع می‌پیوندد. برای انجام عمل همانند سازی، مولکول DNA بایستی از یک انتها باز شود تا بازهای جدید موجود در هسته بتوانند درطول همتای تکمیل کننده آن در توالی صحیح مونتاژ شوند.

برای این منظور ابتدا پیوندهای هیدروژنی میان بازهای آلی به وسیله آنزیم‌های خاصی شکسته می‌شوند وسپس دو رشته پلی نوکلئوتیدی در حضور نوکلئوتیدهای اضافی موجود در شیرهٔ هسته چهار نوع دزوکسی ریبو نوکلئوزید تری فسفات فعال یعنی dATP, dGTP, dTTP, dCTP و یون Mg به تدریج از هم جدا می‌شوند. پس از باز شدن و جدا شدن مولکول از یکدیگر هر یک از رشته‌ها برای سنتز رشته جدید خود به صورت الگو عمل کنند. این عمل امکان جفت شدن بازهای تکمیل کننده را فراهم می‌سازند. تشکیل فرم غیرپیچشی و باز شده DNA را اصطلاحاً ملتینگ (ذوب) می‌نامند. این عمل در حرارت مشخّص که در آن حرارت نصف ساختمان دو زنجیره ای DNA از فرم دو زنجیره ای خارج می‌شود اتّفاق می‌افتد. این درجه حرارت بستگی به نوع و مقدار بازهای زنجیره دارد و معمولاً مولکولهای غنی از جفت بازهای GC دارای درجه حرارت ذوب بالاتری از مولکولهای غنی از AT می‌باشند. بتدریج که زنجیره باز می‌شود، جذب نوری آن افزایش می‌یابد. به این فرایند اصطلاحاً آنیلینگ گویند.

آنزیم DNAپلیمراز، یک زنجیره پلی پپتیدی ۱۰۳ کیلو دالتونی است، که برای اوّلین بار در سال ۱۹۷۵ توسگ کرنبرگ از باکتری اشریشیاکلی استخراج شد. این آنزیم وظیفه به هم متّصل نمودن بازها و سنتز DNA را به عهده دارد و اضافه شدن دزوکسی ریبونوکلئوتیدها را به روی

زنجیره DNA کاتالیز می‌کند. DNAپلیمراز تشکیل باندها فسفودی استری را تنها زمانی کاتالیز می‌کند که مکمّل بازهای اضافه شده در رشد الگو وجود داشته باشد.

برای سنتز DNA، آنزیم پلیمراز، دزوکسی ریبونوکلوتیدها را از انتهای 3-oH زنجیره DNA به روی مولکول اضافه می‌کند و بنابراین برای انجام عمل همانندسازی وجود یک زنجیره ابتدایی OH-3 آزاد یک قسمت از DNA به عنوان الگو به صورت دو رشته ای ضرروی است. احتمال تشکیل اتّصالات کووالانت بدون درنظر گرفتن فرم جفت بازی تیپ واتسون کریک در رشته‌های الگو خیلی کم است. به همین دلیل گفته می‌شود DNA پلیمراز یک آنزیم وابسته به رشته الگو می باشد. به این ترتیب می‌توان انتظار داشت که این واحدها توسّط بازهای خود به بازهای مربوط بر روی زنجیره‌های منفرد بوجود آمده، اتصال یابند در هر صورت، پیوستگی در اثر پیوندهای هیدروژنی، تنها امکان برای باز مکمّل خواهد بود به گونه ای که با تشکیل ستون فقراتی قند-فسفات جدید به هم متّصل شوند. زمانی که این باز شدن و سنتز تمام طول مولکول را طی نمود، دو مولکول DNA خواهری شبیه هم ایجاد شده که هر یک از آنها نسخهٔ دقیقی از مولکول اصلی می‌باشند. این نوع سنتز مولکول DNA که هر یک از مولکولهای DNA تولید شده، در آن شامل یک رشته پلی نوکلئوتید قدی‌می‌از مولکول اوّلیه و یک رشته تازه سنتز شده می‌باشد، تحت عنوان همانند سازی نیمه حفاظتی یا نیمه قدی می‌نامیده می‌شود (پرایس[1] و همکاران، ۱۹۸۹).

وظیفهٔ دیگر DNAپلیمراز تصحیح بازهای اشتباهی در ساختمان DNA می‌باشد که با برداشتن و حذف آنها انجام می‌گردد. خصوصیّات اخیر نقش اساسی این آنزیم را در همانند سازی مشخص می‌کند. گفته می‌شود احتمال اشتباه هر باز در همانندسازی DNA حدود $۱۰^{-۸}$ می‌باشد علاوه بر این نظریه همانند سازی نیمه حفاظتی نظریات دیگری که کمتر مورد توجه است وجود دارد.

آیا مولکول DNA الگو، از یک رشته یا هر دو رشته زنجیره پلی نوکلئوتیدی مولکول اولیه برای ساختن مولکول جدید استفاده می‌کند؟ به عبارت دقیق تر آیا از دو مولکول DNA ساخته شده، هر یک دارای یک رشته قدیمی و یک رشته جدید است یا خیر؟ این دو سوال مزلسون و استال را ترغیب نمود تا آزمایشی به کمک باکتری اشرشیاکلی به انجام رسانند و همانند سازی نیمه حفاظتی DNA را تایید نمایند. این دو جهت تأیید نظریه فوق باکتریهای اشرشیاکلی را در محیط غذایی محتوی کلرید آمونیوم رادیواکتیو (نیتروژن آن از نوع سنگین N_{15}) رشد دادند. باکتریهای

[1] Price

بدست آمده از محیط کشت، دارای اسید نوکلئیک رادیواکتیو بودند. آنها باکتریها را از محیط کشت مزبور جدا کرده و برای یک نسل در محیط دارای نیتروژن سبک N_{14} رشد دادند.

در این محیط در نتیجه همانندسازی DNA دو رشته یا زنجیره قدیم از هم جدا شده و در هر رشته پلی‌نوکلئوتیدی به عنوان الگویی جهت ساخته شدن رشته مکمّل خود عمل خواهد کرد به همین دلیل رشته قدیم دارای نیتروژن سنگین و رشته جدید دارای نیتروزن سبک می‌باشد.

مزلسون و استال برای اثبات این نظر، محلولهای DNA را از سلولها معمول و سلّول‌های حاوی ایزوتوپ سنگین نیتروژن استخراج و سانتریفیوژ نمودند. آنها قبلاً دیده بودند، اگر محلولی از کلریدسدیم را با دور زیاد و برای مدت طولانی سانتریفوژ نمایند، در نتیجهٔ عمل سانتریفوژ کردن، محلولی بدست می‌آید که تراکم نمک های آن از پایین به سمت بالای محلول به تدریج کاهش می‌یابد، به عبارت دیگر، غلظت نمک ها در بالای لوله کمتر از قسمتهای پایینی آن است حال با وارد نمودن انواع مختلف DNA در قسمت بالای محلول نمک سانتریفوژ لوله و محتوایش برای مدّتی مشاهده کردند انواع مختلف DNA رادیواکتیو در قسمت پایین و DNA سبک در قسمت بالا و DNAهای دارای یک رشته سنگین و یک رشته سبک در وسط قرار می‌گیرند. آنها با استفاده از این روش نشان دادند که باکتریهای نسل اول فرمی حدّواسط، شامل یک رشته از DNA نوع سنگین و یک رشته از DNA نرمال را داشته اند و به همین دلیل چنین مولکول DNA حدّ واسطی در وسط نمک رسوب می‌نماید. آنها باکتری‌هایی را که برای چندین نسل در محیط حاوی ایزوتوپ N_{15} رشد داده شده بودند و محتوای DNA سنگین بودند استخراج و دیدند در قسمت پایینی محلول قرار می‌گیرند. آنها با استفاده از این روش فرآیند همانندسازی بصورت نیمه حفاظتی را اثبات نمودند (آلدی[1] و همکارا ن، ۲۰۰۸).

۲-۳-۳-۱- همانندسازی DNA در پروکاریوتها

کروموزوم باکتریها و بالطّبع DNA آنها حلقوی و متشکّل از چند میلیون جفت باز پورین پیریمیدین می‌باشد در باکتری‌ها مولکول DNA با پروتئین‌های خاصّی (پروتئینهای شبیه هیستون) ترکیب پیچیده DNA پروتئین را تشکیل می‌دهد این ترکیب ممکن است در وسط باکتری قرار گیرد و در چند نقطه با غشاء و یا حتی دیوارهٔ سلّول ارتباط محکم برقرار نماید. در هنگام شروع فرایند همانندسازی آنزیمهای DNAپلیمراز عمل سنتز را در جهت پنج‌پریم به سمت سه‌پریم شروع

[1] Aldaye

و هدایت می‌کنند. در باکتریها ابتدا قطعات کوچکی از مولکول DNA ساخته شده و سپس با اتّصال این قطعات به یکدیگر قطعات بزرگتر بوجود می‌آیند. بر اساس نظریهٔ گسسته قبل از شروع همانندسازی و قبل از بازشدن DNA بایستی رشته DNA از پروتئینهای همراه خود جدا شود. جدا شدن این پروتئین‌ها از DNA در اثر واکنشهای مختلف مانند فسفوریلاسیون، استیلاسیون و میتلاسیون انجام می‌گیرد. سپس پروتئین‌های خاصی به محلّ آغاز همانندسازی در باکتریهای چسبیده و باعث باز شدن دو رشته از هم می‌شوند. پس از چسبیدن پروتئین باز کننده به سمت جدا شده عمل جدا شدن دو رشته پلی نوکلئوتیدی از دو سوی نقطه آغاز ادامه می‌یابد همزمان با این عمل آنزیم RNAپلیمراز یکی از دو زنجیره جدا شده را بعنوان الگو قرار داده و در جهت ۵ پریم به ۳ پریم شروع به ساختن مولکول کوچکی از RNA می‌کند، که در مرحله اول تعداد نوکلئوتیدهای تشکیل دهندهٔ آن حدود ده عدد می‌باشد چنین مولکول کوچک RNA را RNAی آغازگر یا اوّلیه می‌نامند.

سپس تعداد نوکلئوتیدی‌های RNA آغازگر افزایش یافته تا اینکه به حدود یکصد نوکلئوتید می‌رسد. این مولکول به کمک آنزیمی از گروه DNAپلیمراز بعنوان آغاز کننده سنتز DNA بکار گرفته می‌شود و تولید DNA جدید شروع می‌شود. در رشته مقابل قطعات جدید ایجاد شده به قطعات اوکازاکی قطعات جدید DNA ایجاد شده به قطعات اوکازاکی معروف هستند و به RNA متّصل باقی می‌مانند. این قطعات مکمّل رشتهٔ دیگر DNA والد هستند و به تدریج به تعداد نوکلئوتیدهایشان افزوده می‌شود تا اینکه به حدود هزار نوکلئوتید برسند. همزمان پروتئین باز کننده به باز شدن تدریجی دو رشته DNA کمک می‌کند. در رشتهٔ پایه پس از باز شدن دو رشته از هم همزمان با اضافه شدن وسعت منطقه آزاد شده آنزیم RNAپلیمراز موجب دراز شدن مولکول RNA آغازگر می‌شود. با ادامهٔ عمل همانند سازی قسمتی از مولکول RNA آغازگر واقع شده در نقطهٔ شروع توسط آنزیمی از گروه ریبونوکلئازها تجزیه شده و به جای آن و به کمک آنزیم DNAپلیمراز رشته مکمل DNA والد ساخته می‌شود.

۴-۳-۱- مبانی بروز ژن

جریان اطلاعات از ژن به پلی پپتید، شامل چندین مرحله است. رونویسی یک ژن در محل شروع رونویسی روی RNA کروموزومی، بلافاصله از توالی‌های رمزدار آغاز می‌شود و در طول کروموزوم ادامه یافته، از چند صد جفت باز تا بیش از یک میلیون جفت باز و در هر دو گروه اینترونها و اگزونها و ناحیهٔ بعد از پایان توالی‌های رمزدار را رونویسی می‌کند. پس از تغییر یافتن

در هر دو انتهای ۵ و ۳ رونوشت اولیه RNA، بخش های مربوط به اینترونها برداشته می‌شوند و قطعات مربوط به اگزونها به یکدیگر چسبانده می‌شوند.

پس از برش و چسباندن RNA، RNAپیامبر حاصل که اینک فقط حاوی بخشهای رمزدار ژن است، از هسته به سیتوپلاسم سلّول برده می‌شود و در آنجا نهایتاً به توالی اسید آمینه‌ای پلی پپتید رمزگردانی شده، ترجمه می‌گردد. هر یک از این مراحل، در معرض بروز خطا هستند و جهش هایی که در هر یک از این مراحل مداخله می‌کنند، در ایجاد تعدادی از اختلالات ژنتیکی دخیل دانسته شده‌اند (آلدی[1] و همکارا ن، ۲۰۰۸).

[1] Aldey

فصل دوم

تنظیم ژن در پروکاریوتها و یوکاریوتها

۱-۲- تنظیم ژن

یکی از بارزترین نشانه‌های تنظیم بیان ژن در یوکاریوتها شناسایی راه انداز توسط RNA پلیمراز است. عوامل رونویسی متعدّدند و ترکیبات مختلفی ایجاد می کنند و نقش های مختلفی را در تنظیم بیان ژن دارند. از تفاوتهای اساسی، این است که در ژن‌های یوکاریوتی علاوه بر راه انداز، توالی‌های تنظیمی دیگری نیز وجود دارند که عوامل رونویسی به آن‌ها نیز متّصل می شوند، یکی از این توالی‌ها، افزاینده نام دارد. افزاینده، بخشی از مولکول DNA است که به کمک عوامل رونویسی متّصل به آن، عمل رونویسی را تقویت می کند. راه انداز در مجاورت نقطهٔ آغاز رونویسی قرار دارد، در حالی که افزاینده ممکن است هزاران نوکلئوتید از ژن فاصله داشته باشد.

تنظیم رونویسی در یوکاریوتها طی مراحل زیر صورت می گیرد:

گروه اول از عوامل رونویسی (موسوم به فعّال کننده) به افزاینده متّصل می شوند.

گروه دوّم که عوامل رونویسی به راه انداز متّصل می شوند. اتّصال این دو کمک می کند RNAپلیمراز راه انداز را شناسایی کند. اما هنوز قادر به شروع رونویسی نمی باشد.

و در گروه سوم، اتّصال فعال کننده به توالی افزاینده باعث ایجاد حلقه در DNA می شود و بدین صورت افزاینده که از راه انداز، فاصله دارد، خود را به راه انداز و عوامل رونویسی متّصل به آن نزدیک می کند (ایگل[1]، ۲۰۱۲).

سرانجام مجموعه (افزاینده–فعّال کننده) در مجاورت مجموعه (راه انداز– RNAپلیمراز) قرار می گیرد. این اتّصال عوامل رونویسی متّصل به راه انداز را فعّال نموده و باعث می شوند RNAپلیمراز رونویسی را شروع کند. در مورد تنظیم بیان ژن در یوکاریوت‌ها به نکات زیر بایستی توجه نمود:

آنزیم RNAپلیمراز می تواند یکی از سه نوع فوق باشد :

تشکیل حلقه در DNA یوکاریوتها یکی از نشانه‌های بیان ژن در یوکاریوتها می باشد. در حالی که در پروکاریوت‌ها تشکیل حلقه دیده نمی شود. عوامل رونویسی و فعّال کننده‌ها همگی از جنس پروتئین هستند و مونومر آن‌ها آمینواسیدها هستند. فاصلهٔ بین راه انداز تا افزاینده، هزاران نوکلئوتید از نوع دئوکسی ریبونوکلئوتید می باشند که نه رونویسی می شوند و نه ترجمه. افزاینده و راه انداز جزء ژن محسوب می شوند، اما رونویسی نمی شوند. همچنین اتّصال عوامل رونویسی (فعّال کننده) به افزاینده، باعث تقویت عمل رونویسی می شود.

در ذیل تنظیم بیان ژن یوکاریوتها و پروکاریوت‌ها را مقایسه می کنیم.

	راه انداز	اپراتور	ژن ساختاری	افزاینده	عوامل رونویسی	RNA پلی مراز
پروکاریوتها	+	+	+	-	-	+
یوکاریوتها	+	-	+	+	+	+

در پروکاریوت‌ها RNA پلیمراز پروکاریوتی بلافاصله روی راه انداز قرار می‌گیرد، پس مرحلهٔ اول رونویسی که شامل قرارگیری RNAپلیمراز روی راه انداز است صورت گرفته است. لذا رونویسی آغاز شده است. مهار کننده در مرحلهٔ رونویسی یا ادامهٔ رونویسی جلوی حرکت RNA پلیمراز را سد می کند. به همین خاطر گفته می شود، تنظیم بیان ژن در پروکاریوتها عمدتاً هنگام

[1] Egel

رونویسی است. غالباً تنظیم بیان ژن در یوکاریوتها، هنگام شروع رونویسی بوده. همانطور که در بالا توضیح داده شده، شروع رونویسی یعنی قرار گرفتن RNA پلیمراز روی راه انداز. این امر در یوکاریوت‌ها مستلزم تشکیل یک مجموعه می‌باشد که تشکیل آن قبل از شروع رونویسی می‌باشد. لذا گفته می شود که غالباً در یوکاریوتها تنظیم بیان ژن هنگام شروع رونویسی است (آیوستین[1] و همکاران، ۱۹۹۲).

۱-۱-۲- تفاوت تنظیم بیان ژن میان پروکاریوتها و یوکاریوتها

تنظیم بیان ژن در یوکاریوت‌ها پیچیده‌تر و مشکل‌تر از پروکاریوتهاست، دلایل اصلی این پیچیدگی، عبارت است از:

۱. ژنوم یوکاریوتها بزرگ‌تر از ژنوم پروکاریوتهاست.

۲. انواع مختلفی سلّول در یوکاریوتها وجود دارد.

۳. ساختار اپران‌ها را در یوکاریوتها نداریم و ژن‌ها پراکنده هستند، برخلاف پروکاریوت‌ها که ژن‌هایشان پشت یکدیگرند.

۴. transcription در یوکاریوتها به صورت uncouple انجام می گیرد.

مهم‌ترین تفاوتی که باعث می‌شود در یوکاریوت‌ها تنظیم بیان ژن پیچیده‌تر از پروکاریوت‌ها باشد این است که، در یوکاریوت‌ها تعداد سلّول‌ها متعدّد و متنوع است.

در یوکاریوتها صدها نوع مختلف از سلّول داریم که همهٔ آنها محتوای ژنتیکی سلّول تخم اوّلیه را دارند و چون باید با یکدیگر از نظر ساختاری و عملکردی متفاوت باشند، تنظیم بیان ژن اهمیّت زیادی در این نوع از سلّول‌ها (یوکاریوتها) پیدا می کنند. همچنین تنظیم بیان ژن در یوکاریوت‌ها بر خلاف پروکاریوت‌ها که عمدتاً در سطح transcription صورت می گیرد، سطوح بیشتری را (از جمله تنظیم در مراحل نسخه برداری، پردازش mRNA، ترجمهٔ mRNA و پس از ترجمه) دربر می گیرد (باری[2] و همکاران، ۲۰۰۶).

۲-۲- تنظیم ژن در بخش رونویسی

یکی از بهترین سطوح برای بررسی تنظیم ژن، تنظیم در سطح رونویسی است. بدین صورت که:

---

[1] Austin
[2] Barry

۱-۲-۲- سطوح اول، دوم و سوم تنظیم بیان ژن (قبل، هنگام و بعد از رونویسی)

قبل از رونویسی: منظور مکانیسم‌هایی نظیر فشردگی DNA و متیلاسیون DNA است که اجازهٔ دسترسی به ماشین رونویسی را نمی دهند. مثلاً هتروکروماتین به علت فشردگی رونویسی نمی‌شود.

هنگام رونویسی: سطح اصلی تنظیم بیان ژن است و منظور همان تنظیم بیان ژن توسط عوامل رونویسی و افزاینده بوده.

بعد از رونویسی: منظور از این سطح تغییراتی است که در هسته سلّولهای یوکاریوتی بر روی RNA اوّلیه اعمال می‌شود از قبیل پیرایش RNA و پیرایش‌های متفاوت اگزون‌های mRNA که سبب تولید پروتئین‌های متفاوت از همان mRNA می‌شود و همچنین کنترل میزان دسترسی mRNA بالغ به منافذ هسته و انتقال آن به سیتوپلاسم است.

در شکل کلّی، تنظیم در مرحلهٔ رونویسی بوسیلهٔ دو دسته از عوامل دخیل صورت می‌گیرد که دستهٔ اول فاکتورهای نسخه برداری و دستهٔ دوم نواحی تنظیمی هستند (برد[1] و همکاران، ۲۰۰۲).

۱-۱-۲-۲- فاکتورهای نسخه‌برداری

فاکتورهای نسخه‌برداری خود به دو دسته تقسیم می‌شوند:

۱) عمومی[2]: آن دسته از فاکتورهایی که در همهٔ ژن‌ها برای نسخه‌برداری لازم‌اند و به RNAپلیمراز در اتّصال آن به پروموتر و شروع‌کردن نسخه‌برداری کمک می‌کند.

۲) اختصاصی[3]: مخصوص ژن‌های خاصی هستند و باعث می‌شوند که از سطح بیکال به بالاتر افزایش پیداکند.

کنترل رونویسی معمولاً در مرحله ای که رونویسی می‌خواهد شروع شود انجام می‌گیرد. ناحیهٔ پروموتور یک ژن آنزیم RNAپلیمراز را جذب کرده و آن را در جهت صحیحی قرار می‌دهد تا ساختن RNA از ژن را شروع کند. پروموتورهای ژنهای پروکاریوتی و یوکاریوتی دارای جایگاه آغازین می‌باشند. محلّی که رونویسی را واقعاً شروع می‌کند، یک توالی تقریباً ۵۰ نوکلئوتیدی در

---

[1] Bird
[2] General
[3] Specific

قسمت فرادست جایگاه آغازین، دارد. این ناحیه دارای جایگاه‌های مورد نیاز برای متّصل شدن RNAپلیمراز به پروموتور می‌باشد. تقریباً تمام ژن‌ها چه یوکاریوتی و چه پروکاریوتی علاوه بر پروموتور دارای توالی تنظیمی DNA هستند که برای روشن یا خاموش کردن ژنها مورد نیاز است. بیان یک ژن به فاکتورهای زیادی به شرح ذیل بستگی دارد:

الف: نوع سلّول ب: محیط اطراف سلّولی ج: عمر سلّول د: پیام‌های برون سلّولی

برخی توالی‌های تنظیمی DNA به کوتاهی ۱۰ جفت نوکلئوتیداند و به عنوان کلیدهای سادهٔ ژنی عمل می‌کنند (بیشتر در مورد پروکاریوتها) که به یک پیام منفرد پاسخ می‌دهند. در باکتریهای این گونه کلیدهای ساده دیده می‌شوند. اما دیگر توالی‌های تنظیمی DNA به ویژه آنهایی که در یوکاریوتها وجود دارند خیلی طویل می‌باشند (دابین[1] و همکاران، ۲۰۱۶).

بیشتر پروتئین‌های مسئول تنظیم ژنی دارای یکی از چند الگوی خاص تاخوردگی هستند. این الگوها در شیار بزرگ مارپیچ دو تایی DNA قرار گرفته و پیوندهای محکمی با یک قطعهٔ کوتاه از جفت بازهای DNA تشکیل می‌دهند. اغلب پروتئینهای متّصل شونده به DNA به صورت جفت با مارپیچ DNA متّصل می‌شوند. سبب افزایش استحکام و اختصاصی شدن بر هم کنش DNA و پروتئین می‌گردد.

یکی از مثال‌های مشخّص در تنظیم ژنی در پروکاریوت‌ها در باکتری *E.coli* است. به طور مثال ۵ ژن در این باکتری آنزیمهای مسیر متابولیسمی ساخت اسیدآمینه تریپتوفان را رمز گذاری می‌کنند. این ژن‌ها با هم روی یک کروموزوم قرار دارند. رونویسی همگی آنها از یک پروموتور به صورت یک مولکول mRNA طویل شروع می‌شود که هر پنج پروتئین از روی یک mRNA واحد ترجمه می‌شوند. ژن‌هایی که به این ترتیب مرتّب شده اند و یک mRNA واحد قابل ترجمه از آنها ساخته می‌شود را اپران‌ها می‌نامند.

نکتهٔ مهم این است که اپران‌ها در بین پروکاریوتها بسیار دیده می‌شوند اما در یوکاریوت‌ها یافت نمی‌شوند. زمانی که تریپتوفان در محیط اطراف وجود داشته باشد نیاز به آنزیمها نیست و تولید متوقّف است. درون پروموتور، توالی کوتاهی از DNA با طول ۱۵ نوکلئوتید وجود دارد که توسط نوعی پروتئین تنظیم کننده ژنی شناسایی می‌شود. نام این توالی نوکلئوتیدی، اپراتور است. وقتی پروتئین به اپراتور متّصل گردد، RNAپلیمراز نمی‌تواند به پروموتور دسترسی پیدا کند،

[1] Dabin

بنابراین از رونویسی اپران و تولید آنزیم‌های تولید کننده تریپتوفان جلوگیری به عمل می‌آید. پروتئین تنظیم کننده‌ی ژنی همان مهار کننده تریپتوفان است و به روش خاصّی تنظیم می‌شود.

اپرانها، گروهی از ژن‌ها در سیستم پروکاریوتی هستند که توانایی اتّصال به پروموتور را دارند و در تنظیم بیان ژن در پروکاریوتها ایفای نقش می‌کنند. در پروکاریوتها قطعاتی به نام اپران مسئول تنظیم بیان ژن، خاصّی هستند. این سیستم که مخصوص سلّولهای پروکاریوتی است از اجزای مختلفی تشکیل شده است. مثال بارز آن، اپران مربوط به قند لاکتوز می‌باشد.

مهار کننده فقط در صورتی می‌تواند به DNA متّصل شود که چند مولکول اسید آمینه تریپتوفان به آن متّصل شده باشند. این مهار کننده نوعی پروتئین آلوستریک است، به این معنی که اتّصال تریپتوفان به آن موجب تغییر شکل در ساختمان سه بعدی مهارکننده می‌شود به طوری که می‌تواند در این وضعیت به DNA اپراتور متّصل گردد. وقتی تریپتوفان آزاد در سلّول کاهش پیدا می‌کند، مهار کننده به تریپتوفان متّصل نمی‌شود و بنابراین توانایی اتّصال به DNA را از دست می‌دهد (دسوزا[1] و همکاران، ۲۰۱۴).

سپس اپران تریپتوفان رونویسی می‌شود. بنابراین، مهار کننده وسیله ای ساده است که تولید مجموعه ای از آنزیم‌های بیوسنتزی را بنابر مفید بودن محصول نهایی، مسیری که این آنزیم‌ها کاتالیز می‌کنند، شروع یا متوقّف می‌کند. مهارکننده تریپتوفان همان طور که از نامش مشخص است، پروتئین مهارکننده ای است که ژن‌ها را خاموش یا مهار می‌کند. برعکس سایر پروتئین‌های باکتریایی تنظیم کننده ژنی سبب روشن کردن ژن‌ها یا فعّال کردن آنها می‌شوند. از طرف دیگر خود پروتئین مهارکننده تریپتوفان همیشه در سلّول باکتری وجود دارد، بنابراین نسبت به افزایش سطح تریپتوفان خیلی سریع پاسخ می‌دهد. ژنی که این مهارکننده را رمز گذاری می‌کند، دائماً در حدّ کمی رونویسی می‌شود به طوری که همیشه میزان کمی از پروتئین‌های مهار کننده در حال ساخته شدن هستند. چنین بیان غیر تنظیمی ژن بیان دائمی ژن شناخته می‌شود.

۲-۱-۲-۲- مکانیسم‌های نواحی تنظیمی

به شکل کلی نواحی تنظیمی شامل نواحی **پروموتری**، **انهانسر**[2] و **سایلنسر**[3] هستند.

---

[1] De Souza
[2] Enhancer
[3] Silencer

پروموتر: جایی که RNAپلیمرازها و فاکتورهای نسخه‌برداری عمومی به یکدیگر متّصل می‌شوند و نسخه‌برداری را آغاز می‌کنند. جایگاه پروموترها up stream می‌باشد.

انهانسر: بدلیل فاصلهٔ زیاد از پروموتر با تشکیل حلقهٔ (loop) دسترسی عواملی را که از طریق آنها به پروموتر متّصل می‌شوند را ممکن می‌سازند. به پروتئین‌هایی که به enhancerها متّصل می‌شوند activator می‌گویند.

سایلنسر: که می‌توانند هم در up stream و هم در down stream حضور داشته باشند و گاهی اوقات حتی در خود ژن هم می‌توانند حضور داشته باشند، و حتی اگر معکوسشان هم بکنیم گاهی اوقات عمل‌کرد خود را ازدست نمی‌دهند.

Activatorها: فعّالیت خود را با واسطهٔ پروتئین‌های آداپتوری به نام co-activator انجام می‌دهند. و اصولاً co-activatorها اثر خود را با دو مکانیسم بر روی فعّال‌سازی نسخه‌برداری اعمال می‌کنند:

مکانیسم اول: اثر بر روی ترکیب (complex) نسخه‌برداری در محلّ پروموتر مرکزی است (تأثیر برروی عواملی که در پروموتر مرکزی عمل می‌کنند). درواقع co-activatorها می‌توانند باعث شوند که تشکیل کمپلکس نسخه‌برداری تسهیل شود و بهتر بتواند به محل پروموتر مرکزی متّصل شوند (در واقع می‌توان گفت coactivatorها ترکیبات نسخه‌برداری را به محلّ پروموتر فرامی‌خوانند) (ایگل[1] و همکاران، ۲۰۱۲).

مکانیسم دوم: تأثیر بر ساختار کروماتین است.

DNA در یوکاریوت‌ها در قالب ساختار نوکلئوزوم‌ها بسته‌بندی شده‌اند (پروکاریوتها نوکلئوزوم ندارند). درواقع خود ground state نسخه‌برداری در یوکاریوت‌ها برخلاف پروکاریوت‌ها محدودکننده است. در پروکاریوت‌ها ژن‌ها بیشتر در دسترس هستند چون packaging DNA درقالب نوکلئوزوم را نداریم ولی در یوکاریوت‌ها به علّت packaging DNA در داخل نوکلئوزوم‌ها به‌طور ابتدایی، کلاً دسترسی عوامل تنظیم‌کننده و نسخه‌برداری به DNA محدود است، پس آن برای نسخه‌برداری محدودکننده (restrictive) است.

activatorها به صورت دوبخشی بوده‌اند، یک قسمت آنها activation domain نام دارد، و با پروتئین‌های دیگری وارد واکنش می‌شوند و عملکرد پروتئین‌ها از طریق این بخش اعمال می‌شود. و قسمت دیگر DNA binding domain است که به DNA متّصل می‌شود. فاکتورهای نسخه-

[1] Egel

برداری ازطریق بخش DNA binding domain به توالی enhancerها متّصل‌شده‌اند و از طریق activation domain خود با پروتئین آداپتور تماس داشته. co-activatorها هم با اجزای نسخه-برداری که در پروموتر حضور دارند نظیر فاکتورهای نسخه‌برداری عمومی و RNAپلیمراز برهم-کنش داده و به این ترتیب با وجود فاصلهٔ زیاد می‌توانند در وقایعی که در پروموتر اتّفاق می‌افتد تأثیرگذار باشند.

کواکتیو[1]ها برای تأثیر روی ساختار کروماتین دو کار انجام می‌دهند:

۱- رمودل[2] کردن کروماتین: co-activatorهای دسته اول کمپلکس‌های remodel کننده کروماتین است. یعنی مدل کروماتین را تغییر می‌دهند که این کار را به دو صورت انجام می‌دهند:

۱. محل اکتامر هیستونی را دچار تغییر می‌کنند و باعث لغزش اکتامر هیستونی می‌شوند (لغزاندن و تغییر دادن موقعیت اکتامرهای هیستونی).

۲. شکل فضایی نوکلئوزوم را طوری تغییر می‌دهند که برهم‌کنش بین اکتامر هیستونی و DNA دچار اختلال شود و اتّصال حالت شل‌تری پیدا می‌کند (تغییرشکل فضایی اکتامر هیستونی بطوری که اتّصالات بین DNA و اکتامر هیستونی دچار اختلال می‌شود).

۲- تغییرات کوالانس اکتامر هیستونی[3] (یا استیله‌کردن دم‌های هیستونی استیل بنیان -coo است): علّت خیلی محکم بین DNA و هیستون‌ها بار منفی DNA و بار مثبت اکتامر هیستونی است. وقتی هیستون را استیله می‌کنیم درواقع بار مثبت آن را خنثی می‌کنیم و برهم‌کنش‌های یونی بین اکتامر و هیستون را دچار اختلال می‌کنیم و بنابراین پیچش حول اکتامر هیستونی شل می‌شود.

یکی از تغییرات عمده‌ای که باعث می‌شود که کروماتین قابل دسترسی برای عوامل نسخه-برداری شود استیله‌کردن لوپ‌های هیستونی است. مشخص شده است که خیلی از کواکتیوها عملکرد transferase histon astil دارند و (گروه استیل را برروی هیستون انتقال می‌دهند). کار astil transfraseها استیله کردن ترکیب هیستونی است. هر ترکیبی که در انتهای نامش ase داشته باشد آنزیم است. دم‌های هیستونی به علت غنی بودن از اسیدآمینه‌های بازی لیزین و آرژنین در حالت عادّی بار مثبت دارند بنابراین با DNA یک یونی و محکمی دارد و زمانی که (HAT) (Histone acetyl transferase) آنها را استیله می‌کند و بار مثبت آنها خنثی می‌شود و

[1] Co-activator
[2] Remodel
[3] Modification

بنابراین دم‌های هیستونی که بطور محکم دور DNA پیچیده بودند آزاد می‌شوند و بنابراین DNA می‌تواند برای نسخه برداری قابل دسترس باشد (مافیولتی[1] و همکاران، ۲۰۱۴).

در شکل عمومی نسخه برداری به کمک activators و Co activators فعال می‌شود، چنانچه در اینجا یک پروتئین فعّال کننده مثال زده شده است بنام Glucocorticoid Receptor (GR)، این پروتئین داخل سلول قرار دارد و زمانی که به Glucocorticoid متصل می‌شود به فرم فعّال درآمده وارد هسته شده، و به عنوان یک activator عمل می‌کند این activator به response element (Res) که نوعی enhancer می‌باشند متّصل می‌گردد (مانند هورمونهای انسولین به ناحیه تنظیمی خود که با GRE نشان داده می‌شود متّصل شده).

با توجّه به اینکه DNA داخل نوکلئوزوم به صورت پک قرار دارد، هورمون‌ها می‌توانند به DNA متّصل شوند. این نواحی تنظیمی در لینک DNA قرار گرفته‌اند یعنی DNA اتّصال دهنده دو نوکلئوزوم در این مکان دسترسی عوامل تنظیم راحت‌تر است. بنابر این Glucocorticoid receptor به GRE متّصل شده و سبب تولید آنزیم CPB می‌شود که این آنزیم خاصیّت histone acetylated دارد در واقع این آنزیم histone acetyl transferase را فراخوانی کرده (که در واقع نوعی کواکتیو است) که در اینجا CVP نامیده می‌شود.

پس از فراخوانی CVP به محل دم‌های هیستونی استیله می‌شود، این استیله شدن سبب می‌شود که هیستونها از DNA آزاد شوند و سپس این هیستونهای استیله شده سبب فراخوانی Chromatin remodeling complex شده که در اینجا SNF/SWI نامیده می‌شود (مارات[2] و همکاران، ۲۰۱۰).

از جمله توالی‌های دیگری است که در تنظیم بیان ژن مؤثّر می‌باشد، سایلنسرها دقیقاً مانند enhancerها عمل کرده و همان خصوصیات را دارند با این تفاوت که فقط باعث کاهش بیان ژن می‌شوند یعنی باید پروتیئی به نام رپرسور به آن متّصل شود، این پروتیئن از طریق co repressor عمل می‌کند و میزان نسخه برداری از ژن را کاهش می‌دهد. سایلنسرها هم همانند enhancerها می‌تواند هزاران جفت باز از ژنی که قرار است، آن را رونویسی کند فاصله داشته باشد.

با بالا رفتن هورمون Glucocorticoid میزان نسخه برداری از ژن تولید کننده این هورمون افزایش می‌یابد، بدین منظور هورمون روی عوامل تنظیم کنندهٔ ژن مورد نظر اثر گذاشته و میزان نسخه برداری را افزایش می‌دهد. بنابراین Glucocorticoid وارد سلول شده و به ریسپتورها خاص خود متّصل می‌شود که به آن GR گویند. بعد از این اتّصال GR وارد هسته شده و

[1] Maffioletti
[2] Murat

به RE (محرّک پاسخ) خود متّصل می‌شود و چنانچه RE روی linker DNA (DNAهای رابط بین دو نوکلئوزوم) قرار دارد برای رسپتور قابل دسترس است.

پس GR به GRE متّصل شده و حالتی activator دارد یعنی بخشی از آن به DNA متّصل می‌شود و بخشی به پروتئینی که خاصیت histone acetyl transferase (HAT) دارد متّصل می‌شود. این HAT نوعی co activator است یعنی برای فعّال کردن نسخه برداری به اکتیواتور کمک می‌کند. این استیله شدن دم‌های هیستونی از یک طرف سبب شل شدن اتّصالات بین DNA و اکتامر هیستونی می‌شود و از طرف دیگر chromatin remodeling complex دم‌های هیستونی استیله را شناسایی کرده به آنها متّصل شده و اکتامر هیستونی را جابجا کرده و جلوتر می‌برد بطوریکه قبلاً که TATA بصورت پیچیده به دور نوکلئوزوم بود در ناحیهٔ کاملاً بازی قرار گرفته است بنابراین RNA پلیمراز II و TFهای عمومی می‌توانند به آن متّصل شوند مانند TBP که مربوط به TF2B است به این ناحیه متّصل می‌شود و سایر اجزای شروع نسخه برداری را به محل فراخوانی می‌کنند (مانند TF2A، TF2B و...) و از روی ژن مورد نظر نسخه برداری صورت می‌گیرد.

پروتئین‌ها بسته به ساختمان فضایی که دارند می‌توانند نقش آنزیمی، و... را داشته باشند و عملکردها و قابلیت‌های متفاوتی را بیابند. به اتّفاقاتی که در داخل سلول می‌افتاد به خاطر حرکت نامنظم مولکولها داخل سلول است و هرجایی که به آنها نیاز باشد در آنجا قرار می‌گیرد. مثلاً RNA پلیمراز در داخل سلّول در حرکت است و هرجایی که به عملکرد آن نیاز است قرار می‌گیرد از طرفی اجزای کمپلکس نسخه برداری خاصیتی دارند که یکدیگر را به محل فراخوانی می‌کنند (ساکسنوو[1] و همکاران، ۲۰۰۶).

۳-۱-۲-۲- مکانیسم‌های فعّال سازی پروتئین

مکانیسم اول[2]:

در اینجا رقابت بین رپرسور و اکتیواتور را داریم و به علّت هم پوشانی بین دو توالی سایلنسر و اینهاسر پس از اتّصال پروتئین رپرسور پروتئین اکتیواتور نتوانسته به DNA متّصل شود.

[1] Saxonov
[2] Competitive DNA Binding

مکانیسم دوم [1]:

در اینجا پروتئین رپرسور بخش فعّال‌سازی پروتئین اکتیواتور را غیر فعّال کرده است در حالت اول مانع از اتّصال اکتیواتور به DNA شده و در حالت دوّم بخشی از پروتئین اکتیواتور که مسئول عملکرد پروتئین است را غیر فعّال می‌کند.

مکانیسم سوم[2]:

در اینجا مستقیماً، با اجزای کمپلکس نسخه برداری وارد واکنش شده و مانع از تشکیل کمپلکس نسخه برداری می‌شود، مکانیسم سوم را بر هم کنش مستقیم بین اجزای نسخه برداری گویند (والریا[3] و همکاران، ۲۰۰۳).

مکانیسم چهارم[4]:

فراخوانی، این کمپلکس عملکردی دو طرفه داشته یعنی هم در شل کردن و هم در پک کردن دخالت دارد (در اینجا در پک کردن دخالت دارند).

مکانیسم پنجم[5]:

در اینجا آنزیمهایی با نام مکانیزم پنجم به محل فراخوانی می‌شوند و این آنزیم‌ها بخش استیله را بر می‌دارند.

مکانیسم ششم[6]:

در اینجا سایلنسرها آنزیمهایی به نام مکانیسم ششم را به محل فرا خوانی می‌کند. این آنزیم‌ها بر روی هیستون‌ها گروه متیل قرار می‌دهند این فرآیند هم سبب سرکوب شدن فرآیند نسخه برداری می‌شود.

دو مکانیسم پنجم و ششم مربوط به سرکوب کردن ژن هستند و معمولاً با هم رخ می‌دهند.

در مکانیسم پنجم گروه استیل را از گروههای هیستونی برداشته و سبب می‌شوند که بار هیستون دوباره مثبت شده و با DNA که دارای بار منفی است برهمکنش داده و بر اتّصال آنها محکم‌تر گردد ولی عملکرد مکانیسم ششم از طریق بار نیست بلکه سبب می‌شود پروتیئن‌های مسئول

---

[1] Masking the activation surface
[2] Direct interaction with the general transcription factor
[3] Valerie
[4] Recruitment of chromatin remodeling complexes
[5] Recruitment of histone deacetylases

خاموش کردن ژن به آن متّصل شود (این پروتیئن‌ها تنها به بخشهایی متّصل می‌شوند که پروتیئن‌های آن demethyl باشند).

بسیاری از کورپرسورها خاصیت مکانیسم پنجم یا خاصیت مکانیسم ششم را دارند.

مکانیسم هفتم[1]:

تفاوت این مکانیسم با مکانیسم ششم در این است که در مکانیسم اول DNA متیله می‌شود ولی در مکانیسم دوّم هیستون متیله می‌شود.

متیله کردن DNA یکی از مکانیسم‌های خاموش‌کردن نسخه برداری از ژن است، که معمولاً بر روی سیتوزین (نوکلئوتیدی که باز C دارد) صورت می‌گیرد. از هر صد نوکلئوتید ژنوم موجود زنده یکی از آنها میتله می‌باشد و این فرآیند بر روی سیتوزین صورت می‌گیرد و آنزیمی که در این فرآیند دخیل است مکانیسم هفتم نامیده می‌شود یعنی وسیلهٔ انتقال متیل به روی DNA را بر عهده دارد و به صورت اختصار آن را با dnmt نشان می‌دهند و ژنهایی داریم که این آنزیم را در سلول کد می‌کند این فرآیند با خاموش کردن ژنها مرتبط است و نوعی خاموشی که اتّفاق می‌افتد برگشت پذیر است، یعنی می‌تواند متیله و دمتیله شود و معمولاً در مکانهایی که توالی DNA بصورت ’3- CpG –’5 بوده، اتفاق می‌افتد یعنی مکانهایی که نوکلئوتیدهای CG به شکل متوالی پشت سر یکدیگر می‌آیند، یعنی سیتوزین‌هایی که در جزایری از GC یا CG قرار گرفته اند. چنانچه پروموتور ژن در این نواحی ’3-CpG-’5 متیله شوند ژن خاموش می‌گردد. در توالی ’3-CpG-’5، p موجود نشانگر پیوند فسفودی استر بین G و C است. تنظیم بیان ژن در یوکاریوت‌ها سطح بعدی تنظیم بیان ژن در یوکاریوتها می‌باشد. سطح Processing mRNA (پردازش mRNA) است. این سطح را بر اساس مفهوم اینترون‌ها و اگزون‌ها در DNA یوکاریوت‌ها داریم.

به دلیل وجود اینترون و اگزون پدیده‌ای به نام Alternate splicing در یوکاریوتها اتفاق می افتد. splicing یعنی دوخت و دوز و به جدا شدن اینترون‌ها از اگزون‌ها و اتّصال اگزون‌ها به یکدیگر و تشکیل یک mRNA بالغ و کامل از mRNA نابالغ و اولیّه را گویند. Alternate یعنی جایگزین پس Alternate splicing یعنی دوخت و دوز و جایگزینی. اگر چه ۲۵ تا ۳۰ هزار ژن در هستهٔ سلّول‌ها داریم به دلیل فرآیند Alternate splicing تعداد پروتئینهای متحمّل از این ژنها

[1] DNA methylation

می‌تواند خیلی بیشتر باشد. گفته شده است ۴۰ تا ۶۰ درصد ژن‌های انسانی می تواند تحت اثر Alternate splicing (دوخت و دوز جایگزین) قرار بگیرند. در نتیجه ما می‌توانیم محصولات پروتئینی مختلفی را از یک ژن منحصر به فرد داشته باشیم.

۲-۲-۲- سطح چهارم تنظیم بیان ژن (هنگام ترجمه)

سطح سوم تنظیم بیان ژن در یوکاریوت‌ها سطح translation (ترجمه) است.کنترل در این سطح تعیین می‌کند که یک مولکول mRNA چه مقدار و چه مدّت در سیتوپلاسم ترجمه شود. به عنوان مثال نیمهٔ عمر بعضی از مولکول‌های mRNA در باکتریها حدود ۲ دقیقه و در یوکاریوتها به چندین ساعت می‌رسد. همچنین بعضی از مولکول‌های mRNA بسیار سریعتر از انواع دیگر توسط ریبوزوم، شناسایی و ترجمه می‌شوند. تنظیم در این سطح به سه شکل اتفاق می افتد.

۱) تنظیم مکان mRNA در داخل سلول (localization)

۲) تنظیم ترجمه mRNA (translation)

۳) تنظیم نیمه عمر و پایداری mRNA (stabilation) همهٔ این تنظیمات در اثر interaction بین mRNA و پروتئین‌ها صورت می‌گیرد. این پروتئین‌ها به نواحی برروی mRNA به نام untranslated regions یا به اختصار (UTR) (نواحی که ترجمه نمی شوند) متّصل می شوند.

تصویر این نواحی در یک mRNA بالغ :

۱- بین کلاهک ۵ متیل گوانوزین و کدون start وجود دارد که 5′UTR (ناحیهٔ ′۵ ترجمه نشده) گفته می شود. ۲- بین کدون Stop و شروع دم پلی‌آدنین وجود دارد که 3′UTR (ناحیهٔ′۳ ترجمه نشده) گفته می شود.

۱. Localization: موقعیت mRNAهایی مشخّص می شود به طور کلی mRNA در جایی حضور بیشتری دارد که به آن نیاز بیشتری باشد. مانند فیبرو پلاست‌هایی که مهاجرت می‌کنند دارای لبه‌های حرکت کننده می باشند و mRNAهایی که باعث ترجمهٔ پروتئین اکتین می شوند بیشتر به لبه‌های بیش برنده می روند چون پروتئین اکتین در لبه‌ها فعّالیت می‌کند.

۲. Translation: ترجمه mRNA تنظیم می‌شود (در جایی که آیا mRNA ترجمه گردد یا ترجمه نگردد) گاهی سلّول مکانیسمی را اعمال می‌کند که ترجمه متوقّف شود. مانند اینکه در تخمک تعدادی mRNA است که تا زمانی لقاح صورت گیرد این mRNAها به سرعت ترجمه می شوند چون به پروتئین‌های حاصل در Development یا تمایز سلول تخم نیاز است. به طور

کلی زمانی به پروتئین نیاز باشد، مهاری که بر روی mRNA است برداشته می شود (دیکوس[1] و همکاران، ۲۰۰۴).

۳. Stabilation: پایداری mRNA تنظیم می شود. هر چه mRNA زمان بیشتری را در سلول حضور داشته باشد دفعات ترجمه آن بیشتر می شود و اگر طول عمر mRNA کوتاه باشد میزان ترجمه کمتر می شود و در نتیجه پروتئین کمتری تولید می شود (معمولاً mRNA پروکاریوتی عمر کوتاهی دارد به صورتی که از یک سمت ترجمه می شوند و از سمت دیگر تجزیه می شود. به این دلیل که محیط پروکاریوت به طور دائم در حال تغییر است و باید پروکاریوت خود را با محیط جدید منطبق کند) mRNA انسانی طول عمر متفاوتی دارد. mRNA که کمتر مورد نیاز است یا در مواقع خاص به آن نیاز است مانند mRNA که برای فرایندهای تقسیم سلولی لازم است عمر خیلی کوتاه دارد در صورتی که mRNA تولید کننده هموگلوبین در گلبول‌های قرمز عمر حدود ۲۴ ساعت دارد چون به این پروتئین‌ها در مدت بیشتری نیاز است. نکته ای که در مورد stability وجود دارد این بوده که طول دم پلی آدنین در میزان پایداری mRNA موثر است. آنزیم‌های نوکلئاز این دو را کوتاه می‌کند. mRNA تا حدّی به این کوتاه شدن حسّاس نیست ولی اگر دم پلی آدنین از اندازه مشخصی کوتاه تر شود و به زیر سی عدد برسد، این mRNA مستعد می‌شود که مورد حمله اگزونوکلئازها قرار بگیرد (هدیگر[2] و همکاران، ۲۰۰۴).

۳-۲-۲- سطح پنجم تنظیم بیان ژن (بعد از ترجمه)

سطح چهارم تنظیم بیان ژن در یوکاریوتها سطح پس از ترجمه (post translation) است. منظور تغییراتی است که بر روی محصول پروتئینی یک ژن اعمال می‌شود تا آن پروتئین به صورت فعّال و یا غیر فعّال در آید به عنوان مثال تغییراتی نظیر حذف قسمتی از زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی برای فعّال سازی آن (مثل انسولین) و یا اضافه کردن گروه‌های فسفات به آنها برای فعّال یا غیرفعّال کردن آنها نمونه‌هایی از تنظیم بیان ژن در سطح پس از ترجمه است (لیفرانسوز[3] و همکاران، ۱۹۹۸).

این فرایند در دو بخش: ۱- تنظیم فعّالیت پروتئین ۲- تنظیم پایداری پروتئین صورت میگیرد.

---

[1] Deikus
[2] Hediger
[3] Lefrancois

۱- تنظیم فعّالیت پروتئین: خیلی از پروتئینها پس از تولید فعّال نیستند و باید تغییری بر روی آنها صورت گیرد تا فعّال شوند. مثلاً فسفریله و دفسفریله بشوند، برش بخورند و قطعه‌ای از آنها یا گلیکولیزه بشوند یا اگر ساختمان سه بعدی آنها تشکیل شده ابتدا پیچ و تاب بخورند و شکل سه بعدی را پیدا کنند تا بتوانند عملکرد طبیعی خود را داشته باشند، بنابراین سلّول با تأثیری که روی تغییر پروتئین می‌گذارند فعّالیت آن را تنظیم می‌کنند و در نهایت تنظیم بیان ژن انجام می‌شود.

۲- تنظیم پایداری پروتئین: هر چه پروتئین در سلّول بیشتر باشد عملکرد آن ببیشتر می‌باشد. بسته به این که به یک نوع پروتئین چقدر نیاز دارد طول عمر پروتئین‌ها متفاوت است. مثال: پروتئین گلوبین که در اریتروسیت حضور دارد برای چند روز تا چند هفته طول عمر دارد یا آنزیم گلوکولیز که سلّول در طولانی مدّت به آن نیاز دارد. ولی بعضی از پروتئین‌ها عمر خیلی کوتاهی دارند و بعد از چند دقیقه تجزیه می‌شوند؛ مثال: پروتئین‌هایی که در همانندسازی DNA یا پروتئین‌هایی که باعث تقسیم سلولی می‌شوند عمر کوتاهی دارند و تجزیه ی این پروتئینها توسّط ساختارهایی به نام پروتوزوم‌ها در سلّول انجام می‌گیرد. پروتوزوم‌ها: ۱. پروتئین‌هایی که ساختمانشان غیرطبیعی است. ۲. پروتئین‌هایی که عمرشان به سر رسیده دیگر مورد استفادهٔ سلّول قرار نمی‌گیرند و آنها را تجزیه می‌کند (استودیر[1] و همکاران، ۱۹۹۰).

۳-۲- بیولوژی و تنظیم بیان ژن در یوکاریوتها

مقدار اطلاعات موجود در یاخته‌های یوکاریوتی خیلی بیشتر از پروکاریوتهاست. فرصت عمل در جایگاه ههای متفاوت از هستهٔ سلّول تا سیتوپلاسم برای تنظیم کننده‌ها نیز بیش از پروکاریوتها بوده. اطلاعات ژنتیکی در یوکاریوتها در ساختارهای کروموزومی که اغلب پیچیدگی زیادی دارند نهفته است و رونویسی و بروز ژنها در آنها کاهش تراکم قبلی این ساختار را ایجاب می‌کند. بنابراین در یوکاریوتها سیستمهای تنظیم کننده بیشتر، دقیق تر و به ویژه پیاپی هستند. این سیستمها در جایگاهها و در حد ساختارهای متفاوت سلّولی عمل می‌کنند و می‌توانند وابسته به یکدیگر باشند. به عنوان مثال تنظیم بیان ژن مالتوز در بسیاری از یوکاریوتها نیز دیده می‌شود. پروموترهای یوکاریوت اغلب شامل چندین جایگاه اتّصال برای فعّال کننده‌ها بوده و در بسیاری از موارد، فعّال سازی به توالیهایی نیاز دارد که از نقطهٔ شروع نسخه برداری فاصله زیادی داشته باشند. فقط تعداد کمی از ژنهای یوکاریوتی بوسیلهٔ، رپرسور کنترل می‌شوند و نسخه برداری اکثر ژنهای یوکاریوتی، در عدم حضور یک فعّال کننده انجام پذیر نیست. در پروکاریوتها، معمولاً پروتئینهای

[1] Studier

تنظیمی و جایگاههای اتصال آنها هر دو شناخته شده است. در حالی که در یوکاریوتها در بسیاری از موارد فقط توالیهای تنظیم کننده DNA مورد شناسایی قرار گرفته است. تنها در موارد معدودی، پروتئینهای تنظیمی یوکاریوتی و مکانیسم تنظیم نسخه برداری، مورد بررسی قرار گرفته است (کوستانتینو[1] و همکاران، ۲۰۰۳).

۱-۳-۲- توالیهای شناسایی شونده بوسیله فعّال کننده‌ها

تاکنون دو نوع معمول از توالیهای DNA یوکاریوتی که بوسیله فعّال کننده‌ها باند می‌شود، شناخته شده است. نوع اول: توالی فعّال[2] یا UAS می‌باشد که در ناحیهٔ Upstream بسیاری از ژنهایی که فعّال کننده آنزیمهای متابولیک در یوکاریوتهای تک سلّولی، مانند مخمّر یافت شده است. این توالیها بوسیله فعّال کننده‌هایی که سرعت شروع نسخه برداری از پروموتوهای مربوطه را به شدّت افزایش می‌دهند، باند می‌شوند. نوع دوّم از توالیهای فعّال، انهاسر می‌باشد که در یوکاریوتهای چند سلّولی یافت می‌شود. برخلاف UAS، انهاسرها می‌توانند در '۵ یا '۳ یک ژن قرار گیرند و حتی در صورت فاصله زیاد از جایگاه شروع نسخه برداری قادرند نسخه برداری را تحت تأثیر قرار دهند (کولاک آبلیک[3] و همکاران، ۲۰۰۱).

۲-۳-۲- تنظیم متابولیسم گالاکتوز در مخمّرها

یکی از ژنهای یوکاریوتیک که توالی UAS و پروتئینهای باند شونده به آن، هر دو مورد شناسایی قرار گرفته است، ژنی است که توسط پروتئین GAL4 درساکارومایسین سروزیه کنترل می‌شود. پروتئین GAL4 مونومری است با وزن مولکولی ۹۹۰۰۰ که نسخه برداری حداقل ۵ ژن را کنترل می‌نماید. از آن جمله می‌توان ژنهای GAL10 و galactose permease را کد می‌نمایند. در ژنوم مخمّر، این ژنها در دو طرف UAS قرار دارند و در دو جهت مخالف نسخه برداری می‌شوند. پروموترهای این دو ژن در یک ناحیه ۶۸۰ جفت بازی که دو ژن را از یکدیگر جدا می‌نمایند، قرار گرفته‌اند. همچنین در ناحیه بین دو پروموتر، یک UAS جای گرفته است. با اتّصال پروتئین GAL4 به UAS، UAS نسخه برداری هر دو ژن GAL1 و GAL10 را ۱۰۰۰ برابر افزایش می‌دهد.

---

[1] Costantino
[2] Upstream Activating Sequence
[3] Kullak-Ublick

۳-۳-۲- قسمتهای تشکیل دهنده UAS

UAS گالاکتوز از چهار جایگاه جداگانه مخصوص اتصال GAL4 تشکیل یافته است که به ترتیب از شماره I تا IV شماره گذاری شده است. هر یک از این جایگاه‌های اتّصال، از یک توالی ۱۷ جفت بازی مشابه تشکیل یافته است و دارای تقارن دو طرفی است. میل ترکیبی GAL4 برای پیوند با هر یک از جایگاههای اتّصال یکسان نیست و اتّصال بین حداقل دو جایگاه (IV,III) به صورت همکاری انجام می‌گیرد. هر چند آزمایشات نشان می‌دهند که سرعت نسخه برداری ژنهای GAL1 و GAL10، با تعداد مولکولهای GAL4 باند شده به UAS ارتباط مستقیم دارد، فعّالیت نسخه برداری به اشغال هر چهار جایگاه اتصال بوسیله GAL4 نیازی ندارد. بنابراین اثر GAL4 یک اثر اضافی است به این صورت که هر مولکول GAL4 بطور مستقل در تحریک نسخه برداری شرکت دارد (ورتینو[1] و همکاران، ۱۹۹۳).

۴-۳-۲- قسمتهای تشکیل دهندۀ GAL4

GAL4 از دو دومین[2] تشکیل شده است، یکی مسئول باند شدن به DNA و دیگری مسئول تحریک نسخه برداری ژنهای ناحیه پایین دست می‌باشد. همانند اپرونهای کد کننده آنزیمهای متابولیک در پروکاریوتها، ژنهای GAL4, GAL10 تنها در حضور سوبسترا که در این مورد گالاکتوز می‌باشد، نسخه برداری می‌شوند. در عدم حضور گالاکتوز، GAL4 از طریق دومین مسئول باند به DNA به UAS گالاکتوز متّصل می‌شود ولی دومین مسئول تحریک نسخه‌برداری آن، بوسیله یک پروتئین تنظیم کننده منفی به نام GAL80 باند می‌شود. اتّصال Gal80 به GAL4 از فعّال سازی نسخه برداری GAL1, GAL10 توسط GAL4 جلوگیری به عمل می‌آورد. با این حال در حضور گالاکتوز، گالاکتوز به GAL80 باند سبب جدا شدن آن از GAL4 می‌شوند. در این حالت GAL4 قادر است نسخه برداری GAL10, GAL1 را فعال نماید. ممانعت از نسخه برداری بوسیله گلوکز هر چند، هر دو ژن GAL10, GAL1 در حضور گلوکز نیز به صورت منفی تنظیم می‌شوند، کنترل این ژنها پیچیده تر از اینهاست این ممانعت از نسخه برداری بوسیلۀ گلوکز، مشابه جلوگیری کاتابولیتی در پروکاریوتهاست و در صورت حضور هر دو نوع قند گلوکز و گالاکتوز GAL10, GAL1 در سرعتهای پایین، نسخه برداری می‌شوند. گلوکز، نسخه برداری GAL10, GAL1 را از طریق جلوگیری از باند شدن GAL4 به UAS گالاکتوز بلوکه

[1] Vertino
[2] Domain

می‌کند. اینکه آیا گلوکز عملا به GAL4 باند می‌شود یا GAL1, GAL10 بوسیله یک متابولیسمی از گلوکز تحریک می‌شوند، هنوز نامشخص است. بطور کلی دومین های فعّالیت پروتئینهای یوکاریوتیک، مانند GAL4 خیلی کم مورد شناسایی قرار گرفته ولی آنها را در سه طبقه تقسیم می‌نمایند.

تعدادی از دومین های فعّال، شامل نواحی طویلی هستند که یک آلفا هلیکس آمفی پاتیک با بار منفی را تشکیل می‌دهند. یک مثال از این نوع پروتئینها GAL4 می‌باشد. برای فعّال سازی نسخه برداری، دومین فعّالیت GAL4 لازم و ضروری است.

تعدادی از دومینهای فعّال، پروتئینهای غنی از گلوتامین هستند. پروتئین SP1 دارای دومین از این نوع است قدرت فعّال کردن نسخه برداری SP1 با برداشتن دو دومین غنی از گلوتامین آن، به شدّت کاهش می‌یابد.

تعدادی از دومینهای فعّالیت، پروتئینهایی غنی از پرولین هستند. پروتئین CTF شامل دومینای از این نوع است چگونگی تحریک نسخه برداری توسط دومینهای فعّالیت، هنوز ناشناخته است ولی ممکن است، از طریق درگیر کردن پروتئینهای دیگر نزدیک RNA پلی مراز دوم، اثر خود را اعمال نمایند. به عنوان مثال آزمایشات انجام شده در مخمّرها نشان می‌دهند که GAL4 مستقیماً با RNA پلیمراز دوّم وارد واکنش نمی‌شود بلکه اثر خود را از طریق پروتئین دیگری اعمال می‌کند. کنترل بیان ژن توسط توالی های افزایش دهنده یا Enhancer نوع دوم از توالی های فعّال می‌باشد که در ارتباط با بسیاری از ژنهای کلاّس دیگر یافت شده‌اند. این توالیهای DNA بوسیلهٔ سه خصوصیّت مشخص می‌گردند:

انهاسرها اغلب در هر جهتی فعّال هستند. همچنین قادرند نسخه برداری را حتی در صورتی که از نقطهٔ شروع آن هزاران جفت باز فاصله داشته باشند، تحت تأثیر قرار دهند. آنها بعضی اوقات در یک اینترون یا در انتهای '۳ یک ژن قرار دارند. انهاسرها، نسخه برداری هر ژنی در مجاورشان را تحت تأثیر قرار می‌دهند.

بررسی ها نشان می‌دهند که انهاسرها، بسیاری از ژنهای ویروسی را نیز فعّال می‌نمایند. این نوع انهاسرها که تحت عنوان، انهاسرهای ویروسی شناخته می‌شوند، برای انجام عمل خود به فعّال کننده‌های خاصی نیاز دارند. این، خودش توجیهی است بر این سوال که چرا بعضی از ویروسها، تنها در میزبانهای خاصی قادر به رشد هستند.

روشهای عمل انهاسر به نظر می‌رسد که انهاسرها در ۴ روش متفاوت عمل می‌کنند. ممکن است، یک فعّال کننده به یک انهاسر متّصل و تحریک نسخه برداری را سبب شود، یا اینکه به جذب RNA پلی مراز به پروموتر، کمک نماید. انهاسرهایی که به عنوان عناصر حساس به هورمون شناخته شده‌اند، به این روش عمل می‌نمایند.

حضور انهاسرها ممکن است ساختمان DNA را در مجاورت ژنی که نسخه برداری می‌شود، تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین این ناحیه از DNA را بیشتر در دسترس RNA پلی مراز قرار می‌دهند. مشاهده نسبتهای متفاوتی از پیریمیدین/پورین در بسیاری از این انهاسرها که پذیرش ترکیب ساختمانی غیر طبیعی را در Invivo سبب می‌شود، این تئوری را حمایت می‌کند.

انهاسرها ممکن است در جایی از DNA که به ماتریکس هسته، متّصل می‌باشد، قرار داشته باشند. بنابراین نگهداری DNA در این قسمت و افزایش غلظت موثر RNAپلیمراز را سبب می‌شوند.

انهاسرها ممکن است، یک جایگاه بزرگ هدف ایجاد نمایند که RNAپلیمراز یا تعداد دیگری از پروتئینهای ضروری، قبل از مهاجرت به پروموتر، در آن ناحیه با DNA باند می‌شوند. بر اساس این نوع مکانیسم، مشاهده شده است. زمانی که یک جایگاه به پروتئین متّصل شوند، در بین بعضی از انهاسرها و پروموترها قرار می‌گیرند، از عمل انهاسر جلوگیری به عمل می‌آید. به نظر می‌رسد که پروتئین باند شده، مهاجرت پروتئین دیگر را انهاسر به پروموتر بلوکه می‌کند.

آزمایشات نشان می‌دهد که بعضی از انهاسرها تنها در یک بافت خاص هستند. به عنوان مثال در موش انهاسرهای ژنهای ایمونوگلولین، تنها در سلولهای لمفوئید مؤثّر می‌باشند. اینگونه مشاهدات، مویّد این موضوع است که انهاسرهای خاص، ممکن است بوسیلهٔ یک پروتئین تنظیم کننده باند شده به DNA که تنها در گلبولهای سفید خون یافت می‌شوند، تشخیص داده شوند.

٤-۲- بیولوژی و تنظیم ژن در پروکاریوتها

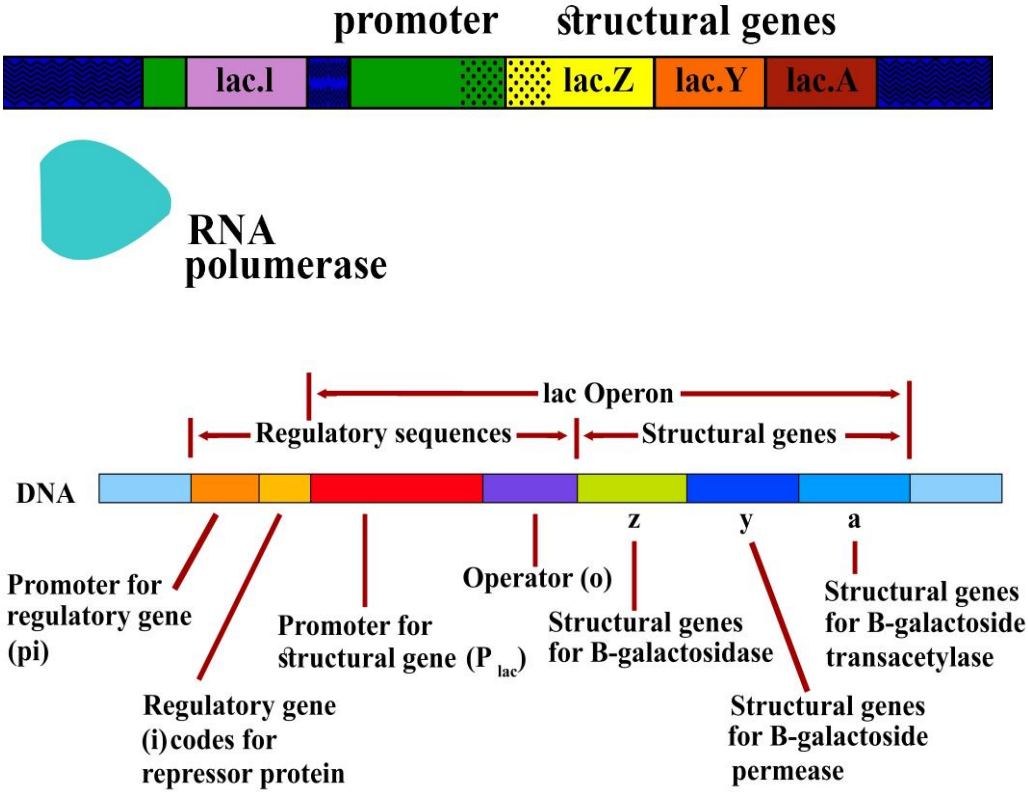
فعّالیتهای محصولات ژنی می‌تواند به طرق مختلف تحت کنترل قرار گیرد. از آنجایی که هیچ ارگانیسم زنده‌ای در آن واحد به بیان تمام ژنهای خود نیازمند نمی‌باشد فعّالیت متابولیکی یک سلّول، همچنین می‌تواند بوسیلهٔ کنترل سنتز آنزیم‌ها و دیگر ماکرومولکولها تنظیم شود کنترل تحت عنوان تنظیم بیان ژن نامیده می‌شود. سرعت سنتز یک محصول ژنی می‌تواند در هر مرحله‌ای از جریان اطلاعات بیولوژیکی کنترل شود. به عنوان مثال، مقدار RNA کامل تولید شده به فراوانی

نقاط شروع نسخه برداری، سرعت طویل شدنRNA، کارآیی خاتمه نسخه برداری و سرعت مراحل مختلف تکامل RNA بستگی دارد (گاردان[1] و همکاران، ۱۹۷۱).

مقدار پروتئین تولید شده توسط سلول نیز به، پایداری mRNA تکامل یافته، فراوانی نقاط شروع ترجمه، سرعت طویل شدن زنجیره پلی پپتیدی، کار آیی خاتمه ترجمه و کارایی تغییرات پس از ترجمه وابسته است. در طی میلیونها سال تکامل، هر سلّول بنا به متابولیسم خود بیان خاصی پیدا کرده است، به عنوان مثال در یک سلّول برای تولید میزان بالایی از پروتئین، آن سلول واجد پروموتور قوی و مناسبی برای انجام این کار شده است. سلّولها همچنین دارای ژنهایی می‌باشند که فعّالیت آنها در رابطه با محیط تنظیم می‌شوند. راههای مختلفی برای هر نوع ژن وجود دارد که به چگونگی تنظیم متابولیسم لاکتوز در باکتریهای باسیل کولی، اشاره نموده (کاپلو[2] و همکاران، ۲۰۰۵).

[1] Gurdon

[2] Kopplow



شکل ۲-۱: طریقهٔ عمل ژن لک در پروکاریوتها

۱-۴-۲- بیان ژن اپرون لاکتوز

باکتریها، معمولاً کربن مورد نیاز رشد خود را بوسیله کاتابولیز کردن قندهای پنتوز یا هگزوز از طریق راه گلیکولیز بدست می‌آورند. *E.Coli* غالباً گلوکز را به عنوان تنها منبع کربن، مورد استفاده قرار می‌دهد، ولی قادر است از قندهای دیگر شامل β-گالاکتوزیدها مانند لاکتوز نیز نیاز خود را برآورده نمایند. آنزیم‌های لازم برای جذب و مصرف β-گالاکتوزید، جز در حضور سوبسترا سنتز نمی‌شوند البته در حضور منبع بهتری مانند گلوکز، حتی با وجود β-گالاکتوزید این گونه آنزیم‌ها در مقادیر اندک سنتز می‌شوند سنتز آنزیم‌های لازم برای مصرف β-گالاکتوزید، هر

سطح شروع نسخه برداری کنترل می‌شود. کاتابولیسم β-گالاکتوزیدها بوسیله باکتری به سه پروتئین نیاز دارد (آیوستین[1] و همکاران، ۱۹۹۲).

لاکتوزپرمه-آز: توسط ژن LacY کد می‌شود و به غشا می‌چسبد.

β- گالاکتوزیداز: آنزیم تترامری است که توسّط ژن LacZ کد می‌شود.

تیوگالاکتوزید ترانس استیلاز: دایمری است که توسّط ژن Laca کد می‌شود.

ابتدا β-گالاکتوزیداز، توسط لاکتوز پرمه آز وارد غشا می‌شود. اکثر دی ساکاریدها به قندهای شش کربنی هیدرولیز می‌شوند این کار توسط β-گالاکتوزیداز انجام می‌گیرد، ولی β- گالاکتوزیداز که فاقد متابولیسم می‌باشند، ابتدا توسّط تیوگالاکتوزید ترانس استیلاز، استیله و سپس از غشای پلاسمایی به بیرون رانده می‌شود. هر سه ژن , Y , Z A که این پروتئینها راکد می‌کنند، در یک mRNA سیسترونیک نسخه برداری می‌شوند. بیان این سه ژن توسط اپرون لاکتوز و اپرون لاکتوز بوسیلهٔ پرسور لاکتوز کنترل می‌شود. رپرسور لاکتوز تترامری با وزن مولکولی ۳۸۶۰۰ می‌باشد که توسط ژن LacI نسخه برداری و ترجمه می‌شود. این ژن، قبل از اپرون لاکتوز قرار دارد. اپرون لاکتوز از ۲ اپراتور O_2 و O_1 تشکیل شده است. اپراتور O_1 بین پروموتر اپرون لاکتوز و ژن Z و O_2 در ژن Z واقع شده است. در عدم حضور لاکتوز پرسور که یک تترامر می‌باشد در آن واحد با O_1 و O_2 باند می‌شود در یک لوپ متشکّل از ۴۰۱ جفت باز را در DNA تشکیل می‌دهد، تشکیل چنین لوپی مانع از بیان ران می‌شود. در غیاب لاکتوز، رپرسور لاکتوز O_1، O_2 باند می‌شود. و بیان ژن لاکتوز را از طریق ممانعت عمل RNA پلیمراز، متوقّف می‌کند لاکتوز، به عنوان یک القا کننده می‌تواند با رپرسور لاکتوز ترکیب شود و شکل فضایی آن را تغییر دهد. بنابراین در حضور لاکتوز، رپرسور از اپراتور جدا ژن بیان می‌شود. لازم به ذکر است که لاکتوز، خود به تنهایی قابلیت القایی ندارد، بلکه به محض ورود به آلولاکتوز تبدیل می‌شود و این مادّه دارای خاصیت القایی ست. اما گالاکتوزیل گلیسرول خود به تنهایی خاصیّت القایی دارد.

۲-۴-۲- کنترل اپرون لاکتوز بوسیلهٔ فعّال کننده

نسخه برداری ژن لاکتوز نه تنها به حضور لاکتوز بستگی دارد بلکه حضور گلوکز در محیط کشت نیز می‌تواند بیان ژن لاکتوز را تحت تأثیر قرار دهد. وقتی لاکتوز به تنهایی در محیط باشد

[1] Austin

اپرون لاکتوز صد در صد بیان می‌شود، ولی وجود گلوکز ۵۰ مرتبه بیان آن را کاهش می‌دهد. به مهار بیان ژن لاکتوز در اثر حضور گلوکز مهار کاتابولیت می‌گویند. بیان بسیاری از آنزیم‌ها به این گونه کنترل می‌شود. این گونه کنترل، تحت تأثیر پروتئین آلوستیکی است که به کمپ[1] باند می‌شود و این پروتئین، پروتئنی گیرنده کمپ نامیده می‌شود. به صورت وجود گلوکز در محیط کشت باکتری و کمپ کم و پروتئین گیرنده (CRP) غیر فعّال می‌شود. در نتیجه پروتئین گیرنده نمی‌تواند با DNA ترکیب شود. در غیاب گلوکز کمپ زیاد و CRP به کمپ باند می‌شود و بنابراین CRP کمپ تولید می‌شود. این کمپلکس بر پروموتر لاکتوز می‌چسبد و افزایش فعّالیت RNAپلیمرازی روی پروموتر لاکتوز را سبب می‌شود. CRP دیمری با وزن مولکولی ۲۲۵۰۰ است که یک انتهای آن با DNA و انتهای دیگر با کمپ باند می‌شود. بنابراین وجودکمپCRP-، فعّال کننده بیان ژن لاکتوز است ولی کمپ در حضور گلوکز کاهش می‌یابد. باند-CRP کمپ روی پروموتر، همیشه با افزایش بیان همراه نمی‌باشد و در بعضی موادر باعث توقّف بیان ژن می‌شود. به عنوان مثال باند شدن -CPR کمپ به پروموتر ژن CRP بلوکه شدن ژن CRP را سبب می‌شود. بنابراین افزایش غلظت -CRP کمپ در داخل سلّول، بیان ژن کنترل کننده پروتئین CRP را بصورت منفی تحت تأثیر قرار می‌دهد و در نتیجه تولید پروتئین CRP متوقّف می‌شود. چنین تنظیمی را خود تنظیمی یا اتورگولاسیون می‌گویند (ورتینو[2] و همکاران، ۱۹۹۳).

[1] CAMP
[2] Vertino

فصل سوم

ناقل‌های بیان

۱-۳- اجزاء ناقل‌های بیان

به‌منظور کارایی مؤثّر و صحیح، ناقل‌های بیان از نقطه‌نظر توالی به سه بخش اصلی نیاز دارند. این نواحی به ترتیب قرارگیری در یک ناقل بیان عبارتند از: راه‌انداز[۱]، جایگاه اتّصال ریبوزوم[۲] (چارچوب خواندن آزاد[۳]) و پایان‌دهنده[۴] که به این سه بخش در کنار هم کاست بیان[۵] گفته می‌شود. در عمل بین دو بخش محل اتّصال ریبوزوم و خاتمه‌دهنده، ناحیهٔ برشی منحصربه‌فردی[۶] قرار

[1] Promoter
[2] Ribosom binding site
[3] Open reading frame (ORF)
[4] Terminator
[5] Expression cassette
[6] Unique

می‌گیرد که ژن موردنظر وارد آن می‌شود. در ادامه این سه ناحیه به‌طور مختصر توضیح داده می‌شود (گلدنبرگ[1] و همکاران، ۱۹۸۹).

۱-۱-۳- راه‌انداز

حیاتی‌ترین جزء مورد نیاز برای یک سیستم بیان با کارایی بالا، یک راه‌انداز قوی و قابل القاء است. منظور از راه‌انداز قوی، راه‌اندازی است که RNA پلی‌مراز سلول میزبان تمایل زیادی برای اتّصال به آن داشته باشد. القاءپذیر بودن راه‌انداز به معنی قابل کنترل بودن آن است. هم اکنون معمول‌ترین راه‌انداز، راه‌انداز اپران *lac Z*، مربوط به اشرشیاکلی است. اما راه‌اندازهای موجودات زنده دیگر نیز دارای خصوصیات منحصربه‌فردی هستند که بسته به ویژگی‌های ژن موردنظر می‌توان از آن‌ها استفاده کرد.

راه‌انداز، قسمتی از مولکول DNA است که آنزیم رونویسی، با اتّصال به آن مکان، نسخه‌برداری یک ژن را انجام میدهد. راه‌انداز در نزدیک نقطه شروع ژن، در همان رشته و در بالادست ژن قرار می‌گیرد. طول راه‌انداز در حدود ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز است.

راه‌اندازهایی که در بیوتکنولوژی برای بیان ژن استفاده می‌شود در چهار دسته راه‌اندازهای دایمی[2]، قابل القاء[3]، ویژه بافت[4] (ویژه مرحله نموی[5]) و سنتزی[6] قرار می‌گیرد. راه‌اندازهای دای‌می‌به راه‌اندازهایی گفته می‌شود که تقریباً در همه بافت‌ها دارای بیان ژنی بوده و معمولاً دارای بیان بالایی هستند. این راه‌اندازه‌ها، مستقل از محیط و فاکتورهای نموّی، عمل می‌کنند (البته نه به‌طور کامل). راه‌اندازهای دای‌می‌در گونه‌ها، جنس‌ها و حتی در قلمروهای مختلف، دارای توالی‌های حفظ شده و عملکرد مشابه هستند (اتچگاراری[7] و همکاران، ۱۹۹۹).

در راه‌انداز قابل‌القاء، فاکتورهای درونی تأثیرگذار نیستند، ولی عوامل محیطی و محرّک‌های خارجی بر روی این راه‌انداز؛ نقش کنترلی دارند. عواملی کنترلی به دو گروه درونی، نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها، مس، الکل، استروئیدها و علف کش‌ها و عوامل بیرونی نظیر نور، سطوح اکسیژن،

---

[1] Goldenberg
[2] Constitutive promoters
[3] Inducible promoters
[4] Tissue-specific
[5] Development-stage-specific promoters
[6] Synthetic promoters
[7] Etchegaray

گرما، سرما و ایجاد زخم تقسیم می‌شوند. از این نوع راه‌اندازها در کنترل بیان ژن استفاده می‌شود. راه‌اندازهای ویژه بافت باعث بیان ژن در بافت خاص و یا در مرحله خاصّی از نموّ موجود زنده می‌شود. این نوع از راه‌اندازها، حتی در گونه‌های دور نیز با شباهت بالایی یافت می‌شوند ولی در گونه‌های نزدیک، به یکدیگر شبیه‌تر هستند. اعتقاد براین است که این نوع تنظیم بیان ژن به بیان فاکتورهای نسخه‌برداری که برای تنظیم فعّالیت راه‌انداز مورد نیاز هستند، وابسته است. راه‌اندازهای سنتزی، از درکنارهم قرار دادن عناصر اولیّه راه‌اندازی از منابع مختلف طراحی و تولید می‌شود.

اساساً در هردوی راه‌اندازهای پروکاریوتی و یوکاریوتی، توالی‌های مورد توافق[1] وجود دارند که میزان شباهت آن توالی با توالی‌های هم‌مکان در راه‌اندازها، قدرت راه‌انداز را نشان می‌دهد. هرچه این توالی‌های هم‌مکان شباهت بیشتری با توالی‌های مورد توافق داشته باشند، نسخه‌برداری از ژن مربوطه بیشتر خواهد شد. توالی‌های مورد توافق در پروکاریوت‌ها برای همه ژنها، شامل توالی مورد توافق جعبه ۱۰- با توالی تقریبی TATAAT ´۵ و جعبهٔ ۳۵- با توالی تقریبی TTGACA ´۵ و در یوکاریوت‌ها برای ژنهای کدکننده mRNA، شامل جعبه ۲۵- با توالی تقریبی TATWAA ´۵ و ۱+ با توالی yCANTyy است (شکل ۳-۱) (استارتیوانت[2] و همکاران، ۱۹۸۷).

[1] Consensus sequences
[2] Sturtevant

	نوکلئوتید شروع ژن		ت الی ۱۰-	bp ۱۶-۱۸	توالی ۳۵		
۳´	A		TATAAT		TTGACA	۵´	کد کنند

۵´	T		ATATTA		AACTGT	۳´	الگو

۵´ نسخه برداری

شکل الف

		راه انداز				توالی مؤثّر در نسخه برداری	
	نوکلئوتید شروع ژن	توالی ۲۵-	توالی ۵۰-	توالی ۸۰-	توالی ۹۵-	توالی ۱۳۰-	
۳´	N	TATA	GC	CAAT	GC	ATTTGCAT	۵´ کد کننده

۵´		ATAT	CG	GTTA	CG	GTA□TAAA	۳´ الگو

۵´ نسخه برداری

شکل ب

شکل ۳-۱- توالی‌های مورد توافق در راه‌انداز پروکاریوت‌ها (شکل الف) و یوکاریوت‌ها (شکل ب)

همان‌طور که ذکر شد اساس توان یک راه‌انداز، به شباهت آن به توالی مورد توافق بر می‌گردد. در جدول ۳-۱ (الف)، بعضی از توالی‌های تنظیم‌کننده در اشرشیاکلی بیان شده است.

قابل تنظیم بودن یک راه‌انداز حائز اهمیّت است. معمولاً دو نوع اصلی تنظیم ژن به وسیلهٔ راه‌انداز وجود دارد. این دو نوع شامل تنظیم القائی[1] و تنظیم بازدارنده[2] می‌باشند. تنظیم القائی به‌این معنی است که رونویسی ژن مربوطه، توسط یک مادّهٔ شیمیایی اضافه شده به محیط کشت شروع

[1] Induction regulation
[2] Repression regulation

می‌شود. در مقابل در تنظیم بازدارنده، فعّالیت ژن مربوطه توسط یک مادّهٔ شیمیایی متوقّف می‌شود. در تولید پروتئین‌های نوترکیب، تنظیم از نوع القائی کاربرد گسترده‌ای دارد، چراکه مداومت فعّالیت یک راه‌انداز، به‌ویژه از نوع قوی آن، برای موجود میزبان مضرّ است. دلیل این موضوع این است که، فعّالیت مداوم راه‌انداز، توان سلّول را تحلیل برده و در فعّالیت‌های طبیعی سلّول اختلال ایجاد می‌کند. این اختلال به دلایل گوناگونی ممکن است رخ دهد (وازینا[1] و همکاران، ۱۹۹۸).

ازطرفی، در برخی موجودات، محصول ژن موردنظر ممکن است برای سلول سمی باشد، دراین‌صورت ابتدا به سلّول‌ها اجازه رشد، تکثیر و تولید بیوماس، داده می‌شود و پس ازاین‌که سلّول به حداکثر رشد خود رسید، با القای راه‌انداز، بیان ژن موردنظر شروع می‌شود و در مدت زمان کوتاهی پس از القاء، مقدار زیادی از پروتئین تولید می‌شود.

مزیّت دیگر راه‌اندازهای القایی این است که مدت زمان بین تولید پروتئین موردنظر تا استحصال آن کوتاه است، درحالی که در راه‌اندازهای دایمی، ممکن است پروتئین‌های تولیدی در شروع کار، پس از مدتی انباشتگی در سلول، تجزیه شود.

در وهلهٔ اول، مواد انرژی‌زای سلّولی نظیر ATP، GTP و NADH به این قسمت از سوخت‌وساز اختصاص می‌یابد. از سوی دیگر، کوفاکتورها و همچنین مواد اولیه دخیل در بیان ژن، نظیر نوکلئوتیدها و اسیدهای‌آمینه نیز به مصرف رسیده و سلّول از روند فعّالیت‌های طبیعی خود که به‌شدّت به بیان ژن‌ها وابسته است، خارج می‌شود. این درحالی است که در بعضی از موارد، از این خاصیت در القای بیشتر ناقل بیان ژن کمک گرفته می‌شود، به‌طوریکه برای افزایش بیشتر تولید پروتئین از مواد کندکننده سوخت و ساز سلّولی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود. این مواد، با ایجاد اختلال در مسیرهای بیوشیمیایی و انباشتن انرژی و مواد اولیه، تمام توان سلّولی را در اختیار بیان ژن موردنظر قرار می‌دهند. ذکر این نکته ضروریست که از آنتی‌بیوتیک‌ها، اغلب در افزایش تعداد پلاسمید در سلّول استفاده می‌شود (لوییس[2] و همکاران، ۱۹۹۹).

[1] Vasina
[2] Lewis

جدول ۳-۱- بعضی از توالی‌های تنظیمی (راه‌انداز) کشف شده در اشرشیاکلی

راه‌انداز		توالی مورد توافق ۱۰-	توالی مورد توافق ۳۵-
توالی مورد توافق		TATAAT	TTGACA
اپران lac	راه‌انداز ۱	$TAT^{-10}GTTG$	$GCTT^{-35}TACACT$
	راه‌انداز ۲	$TTACAC^{-10}T$	$TCAC^{-55}TCATT$
اپران gal	راه‌انداز ۱	$TAT^{-10}GGTT$	$TGTCAC^{-35}ACTTT$
	راه‌انداز ۲	$TAT^{-10}GCTA$	$ATGT^{-40}CACACTT$

پروتئین پذیرندهٔ cAMP [1]	
توالی مورد توافق برای اتصال CRP	AANTGTGANNTNNNTCANATW
lac	$CA^{-75}ATTAATGTGAGTTAGCTCAC^{-55}T$
gal	$AA^{-50}TTTATTCCA^{-40}TGTCACACTTTTCG$

مخففها: N: هر نوع باز و W: برای A یا T.

فقط رشته غیرالگو نشان داده شده است.

پروتئین پذیرندهٔ cAMP یا CRP توسط مکان crp کد شده و در تنظیم بیان اپران‌های lac و gal نقش مهمی‌را ایفا می‌کند.

از طرفی، با توجه به این که سلول‌های فاقد پلاسمید رشد بیشتری دارند، ممکن است این سلّول‌ها سریعاً محیط کشت را اشغال نموده و بعد از مدتی سلّول‌های دارای پلاسمید واجد بیان دائمی از محیط کشت حذف شوند. برای حل این مشکل بهتر است، رونویسی به شکلی کنترل گردد که در نتیجهٔ آن، ژن همسانه شده فقط در مرحلهٔ مشخصی از چرخه رشد سلّول میزبان و تنها

[1] CAMP receptor protein (CRP)

برای مدتی محدود بیان شود. به این منظور باید از یک راه‌انداز قوی و قابل تنظیم (القاءپذیر) استفاده کرد.

دستیابی به راه‌اندازهای قوی و مؤثّر یا از طریق بررسی و انتخاب راه‌اندازهای قویِ موجود و یا با طراحی راه‌اندازهای جدید امکان‌پذیر است. یک راه برای تعیین توان راه‌اندازهای موجود استفاده از ژن‌های گزارش‌گر است (میروکس[1] و همکاران، ۱۹۹۶).

۲-۱-۳- جایگاه اتصال ریبوزوم برروی mRNA

ریبوزوم‌ها، ریبونوکلئوپروتئین‌های بزرگی هستند که وظیفهٔ ترجمه mRNA را بر عهده دارند. ساختار ریبوزوم در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها متفاوت است. ریبوزوم‌های پروکاریوتی، دارای وزن ۲/۸ مگادالتون و ضریب رسوب ۷۰S می‌باشند. حدود ۶۰ تا ۶۵ درصد از ریبوزوم را rRNA و ۳۵ تا ۴۰ درصد آن را پروتئین که به آن پروتئین ریبوزومی[2] گفته می‌شود، تشکیل می‌دهد. بررسی ریبوزوم در پروکاریوت‌ها نشان می‌دهد که ریبوزوم آنها دارای دو زیر واحد با ضریب رسوب ۵۰S و ۳۰S می‌باشد. زیر واحد ۵۰S ریبوزوم، از دو نوع rRNA با ضریب رسوب ۵S و ۲۳S و ۳۴ نوع پروتئین مختلف و زیرواحد ۳۰S ریبوزوم از یک نوع rRNA با ضریب رسوب ۱۶S و ۲۱ نوع پروتئین مختلف تشکیل شده است (بینت[3] و همکاران، ۱۹۹۸).

این در حالی است که یوکاریوت‌ها دارای دو نوع ریبوزوم سیتوپلاسمی و اندامکی می‌باشند. ریبوزوم سیتوپلاسمی با ضریب رسوب ۸۰S دارای دو زیرواحد ۶۰S با سه نوع rRNAی، ۵S، ۵/۸S و ۲۸ S و ۴۰ نوع پروتئین مختلف، و زیرواحد کوچک‌تر با rRNAی ۱۸S و ۳۰ پروتئین مختلف می‌باشد. به‌طور کلی ریبوزوم پروکاریوتی و یوکاریوتی دارای شباهت‌های زیادی به‌ویژه در توالی مربوط به ۵S rRNA و rRNAی ۱۶S و rRNAی ۱۸S می‌باشد.

در پروکاریوت‌ها، ریبوزوم‌ها هم‌زمان با ساخت mRNA به آن متّصل شده و کار ترجمه را انجام می‌دهند. به مجموعهٔ mRNA و ریبوزوم‌های متّصل به آن، اصطلاحاً پلی‌زوم[4] گفته می‌شود. با فعّالیت ریبوزوم‌ها، اسیدهای‌آمینه به‌وسیله مولکول‌های tRNA به جایگاه تولید پروتئین حمل شده و پروتئین‌سازی ادامه می‌یابد. جایگاه اتّصال ریبوزوم بر روی mRNA در انتهای این مولکول

---

[1] Miroux
[2] R-protein
[3] Bennett
[4] Polysome

قرار ندارد. این جایگاه در پروکاریوت‌ها کمی داخل مولکول mRNA قرار داشته و شامل توالی ۹ جفت بازی به‌نام جعبه شاین-دلگارنو[1] است که با توالی انتهای ´۳ مولکول ۱۶S rRNA هم‌خوانی دارد. در این میان توالی بین جعبه شاین-دلگارنو تا کدون آغازین مهم است. تشکیل مجموعهٔ آغازکنندهٔ ترجمهٔ ژن مورد نظر به زیرواحد کوچک ریبوزوم، فاکتورهای پروتئینی آغاز کننده IF1، IF2 و IF3، mRNA و tRNA آغازکننده که معمولاً متیونین را حمل می‌کنند، نیاز دارد. در مرحلهٔ بعد، زیرواحد بزرگ ریبوزوم نیز ملحق شده و پروتئین‌سازی ادامه می‌یابد.

در یوکاریوت‌ها، به‌طور طبیعی، در ابتدا، mRNAی تکامل یافته از هسته خارج شده و سپس در سیتوپلاسم مورد ترجمه قرار می‌گیرد و ویرایش‌هایی نظیر کلاًهک‌گذاری، در سیتوپلاسم مورد شناسایی زیرواحد کوچک ریبوزومی‌قرار می‌گیرد و از توالی‌هایی نظیر جعبه شاین- دلگارنو خبری نیست. همانند پروکاریوت‌ها، در یوکاریوت‌ها نیز، در شناسایی و اتُّصال زیرواحدهای ریبوزومی‌به mRNA، پروتئین‌های ویژه‌ای دخالت دارند. در یوکاریوت‌ها نیز پلی‌زوم‌ها تشکیل می‌شوند تا حداکثر تولید پروتئین انجام گیرد. کدون آغاز در mRNAی یوکاریوتی، نظیر پروکاریوت‌ها، AUG می‌باشد با این تفاوت که اسیدآمینه متیونین، فرمیله نمی‌شود.

اگر برای بیان ژن یوکاریوتی از میزبان پروکاریوت استفاده شود، باید به این نکته توجّه گردد که پروکاریوت‌ها، توانایی اِعمال ویرایش‌های اختصاصی یوکاریوتی را ندارند و در نتیجه بیان ژن نوترکیب در آنها با مشکل مواجه خواهد شد. ازاین‌رو بهتر است که ویرایش‌های لازم در ساختار ژن موردنظر، قبل از انتقال آن به کاست بیان پروکاریوتی صورت گیرد. تغییرات مورد نیاز ژن یوکاریوتی برای بیان مؤثّر در میزبان پروکاریوتی در فصل پنجم بحث خواهد شد.

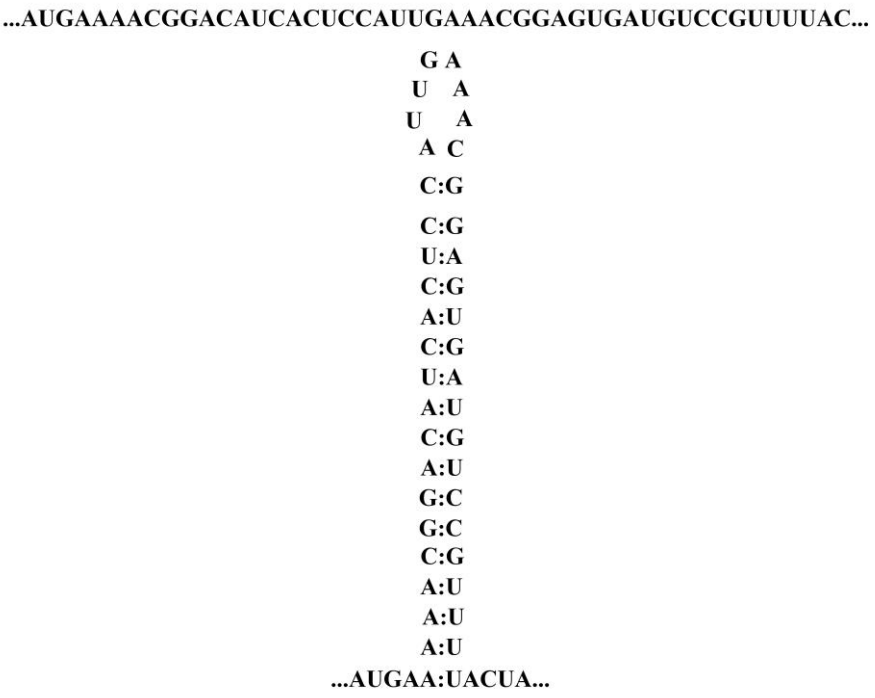
در هردو سیستم ترجمهٔ پروکاریوتی و یوکاریوتی، کار ریبوزوم منحصر به پلی‌مریزه کردن اسیدهای‌آمینه می‌باشد و کلیهٔ مراحل کار، شامل شروع، ادامه و خاتمه، توسط پروتئین‌های موسوم به فاکتورهای آغازین، ادامه و پایانی انجام می‌شود (ویرنیک[2] و همکاران، ۲۰۰۳).

۳-۳-۱- پایان‌دهنده

پایان‌دهنده رونویسی[3]، بخشی از توالی ژنتیکی است که به‌منظور پایان نسخه‌برداری در انتهای ژن یا اپران قرار دارد و در واقع این توالی، پایان رونویسی را مشخص می‌کند. در پروکاریوت‌ها

[1] Shine–Dalgarno box
[2] Virnik
[3] Transcription terminator

دو نوع از پایان‌دهنده‌ها شناخته شده‌اند که این توالی‌ها شامل پایان‌دهندهٔ نسخه‌برداری اصلی[1] با ساختار سنجاق‌سری و پایان‌دهندهٔ نسخه‌برداری وابسته به رو[2] است. در هردوی سازوکار

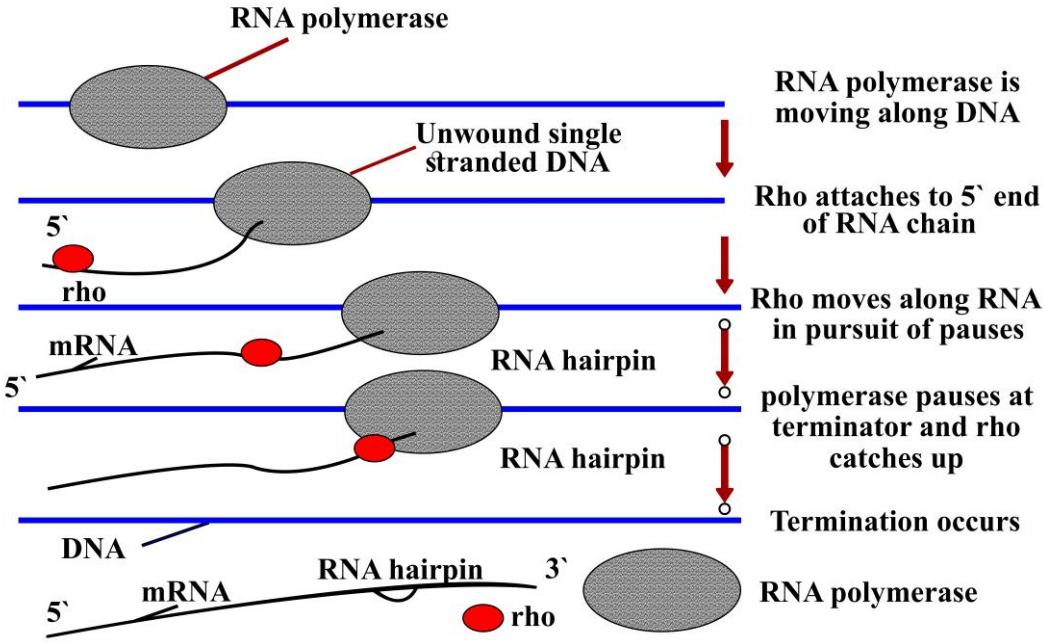


شکل ۳-۲- ساختار ساقه-حلقه که در پایان رونویسی در پروکاریوت‌ها دخیل می‌باشد. توالی ساقه غنی از GC بوده درحالی که توالی دنباله غنی از پیوندهای ضعیف AU است.

در هردو پایان‌دهنده نسخه‌برداری اصلی و پایان‌دهنده مستقل از *Rho*[5]، توالی ۷ تا ۱۰ جفت نوکلئوتیدی از GC که تشکیل دهندهٔ ساختار ساقه- حلقه می‌باشد، وجود دارد. این توالی با یک توالی ۴ تا ۸ نوکلئوتیدی غنی از یوریدین وجود دارد. این ساختار ثانویّه در حرکت پیوسته RNA

[1] Intrinsic transcription terminator
[2] Rho-dependent transcription terminator
[3] Hair pin
[4] Stem-loop structure
[5] Rho-independent terminator

پلی‌مراز بر روی DNA اختلال ایجاد می‌کند که در نهایت باعث توقّف حرکت آنزیم می‌شود. پیوندهای هیدروژنی ضعیف ناشی از جفت‌های AU به راحتی شکسته شده و نسخه‌برداری پایان می‌یابد. هرچه تعداد نوکلئوتیدهای GC در ساقه بیشتر باشد، کارایی پایان‌دهندگی بیشتر و در نتیجه می‌تواند تعداد نوکلئوتیدهای U نیز کمتر شود (کیتس[1] و همکاران، ۱۹۹۳).



شکل ۳-۳- پایان رونویسی وابسته به فاکتور *rho*، آنزیم *RNA*پلی‌مراز در محل ساختار سنجاق‌سری

در پایان‌دهنده نسخه‌برداری وابسته به رو، RNA پلی‌مراز باید به اندازهٔ کافی بر روی ساختار ساقه–حلقه توقّف نماید. پروتئین *Rho* باید به یک ناحیهٔ غیرترجمه‌شونده نزدیک به ۷۰ نوکلئوتیدی موسوم به مکان روت[2] متّصل شود. مکان *rut* یک توالی نسبتاً غنی از سیتوزین و فاقد ساختار ثانویه می‌باشد که در بالادست توالی پایان دهنده قرار دارد. سپس، پروتئین *Rho* به سمت RNA پلیمراز متوقف شده، حرکت می‌کند (شکل ۳-۳).

[1] Kitts
[2] Rut site

پروتئین *Rho* یک هیلکاز RNA-DNA متشکّل از حلقه شش وجهی از پروتئین‌های یکسان است که می‌تواند مارپیچ RNA-DNA را از سمت ´۵ به ´۳ باز کند. در نهایت، این پروتئین با مصرف انرژی از ATP و حذف یک سری از باندهای هیدروژنی که ثبات دهندهٔ مجموعهٔ نسخه‌برداری هستند باعث جدا شدن RNA پلی‌مراز از DNA می‌شود.

هردوی این پایان‌دهنده‌ها نمی‌توانند بر روی شکل ابرمارپیچ[1] DNA عمل کنند و از طرفی ادامهٔ ترجمه نیز برروی آن خاصیت ممانعت‌کنندگی دارد. عقیده بر این است که حضور ریبوزوم از تشکیل ساختار ساقه–حلقه و یا اتصال پروتئین *Rho* جلوگیری می‌کند (سوزانا[2]، ۲۰۰۴).

در یوکاریوت‌ها، بسته به نوع ژن و متعاقب آن نوع RNA، پایان‌دهنده و راه‌کارهای پایان‌دهندگی مختلفی وجود دارد. با اینکه ویژگی‌های پایان‌دهنده‌های یوکاریوتیک نسبت به باکتری‌ها کمتر شناخته شده، ولی با این‌حال تاحدی تفاوت‌ها و شباهت‌های این دو مشخص شده است (رابرتسون[3] و همکاران، ۱۹۸۷).

نسخه‌برداری مربوط به ژن‌های rRNA که بوسیله RNA پلیمراز I انجام می‌شود با راهکاری که به فاکتور پایان ویژه پلی‌مراز[4] نیاز دارد، به پایان می‌رسد. این پروتئین متّصل به DNA، به پایین دست واحد نسخه‌برداری متّصل می‌شود که در واقع یک فاکتور پایان‌دهنده متّصل به RNA می‌باشد (مینچ[5] و همکاران، ۲۰۰۱).

در بیشتر ژن‌های رمزکننده پروتئین در یوکاریوت‌ها، رونویسی توسط RNA پلیمرازII انجام می‌شود. نزدیک به ۴۰ هزار مولکول از این آنزیم در هر سلّول وجود دارد که محصول این آنزیم، mRNA را سنتز می‌کنند. مولکول mRNA که توسط آنزیم RNA پلیمرازII ساخته می‌شود در انتهای خود دارای توالی از ۲۵۰ نوکلئوتید A به نام دم پلی A[6] می‌باشد. این توالی در پایداری mRNA و ترجمه نقش دارد. در پستانداران، mRNA دارای نوعی توالی سیگنال به‌صورت ´۵AAUAAA است که ده تا سی نوکلئوتید بالاتر از محل پلی‌آدنیلاسیون بوده و این پروسه را

---

[1] Super coil
[2] Susanna
[3] Robertson
[4] Polymerase-specific termination factor
[5] Minh
[6] Poly A tail

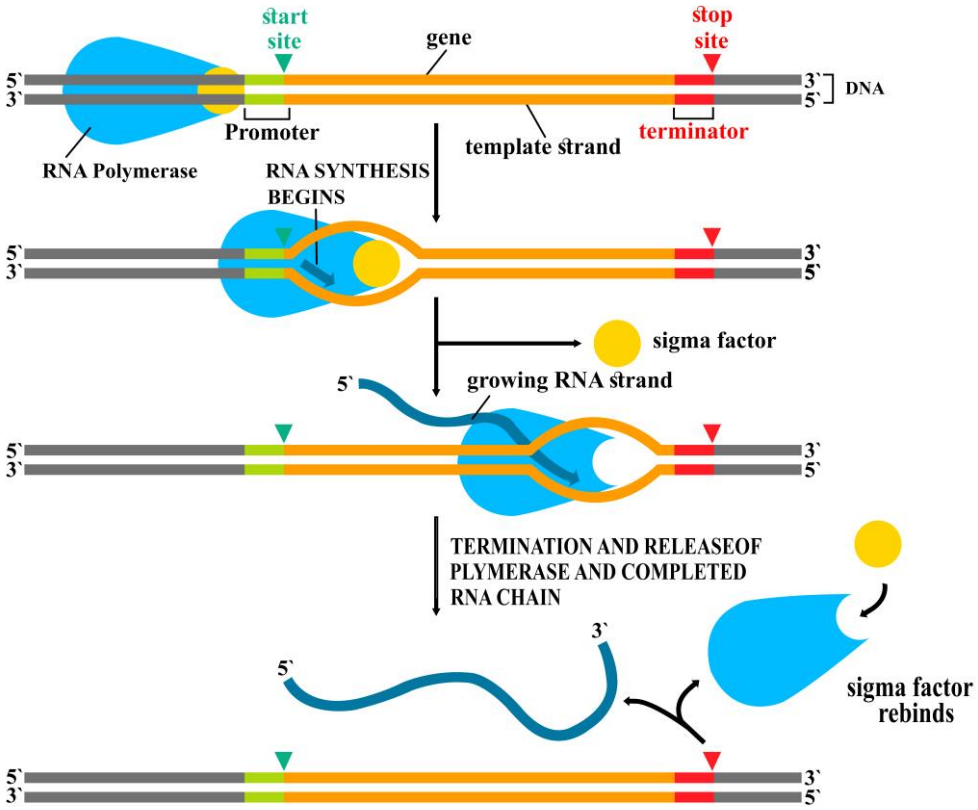
هدایت می‌کند. محل پلی‌آدنیلاسیون بلافاصله بعد از دی‌نوکلئوتید CA قرار دارد که با واسطه ده تا بیست نوکلئوتید با یک ناحیهٔ غنی از GU ادامه می‌یابد. طی مکانیسمی، یک قطعه از انتهای مزبور برداشته می‌شود و سپس توالی پلیA به انتها افزوده می‌شود.

سرانجام، رونویسی در محل پیوند دوگانه AU در دورگ RNA-DNA به پایان می‌رسد (شکل ۱-۴). آنچه‌که در بیان ژن و تولید پروتئین‌های نوترکیب اهمیّت دارد، محصول RNA پلیمرازII است. آخرین RNA پلی‌مراز یوکاریوتی، آنزیم RNA پلیمرازIII است که وظیفهٔ کد کردن توالی‌های غیرکدکنندهٔ کوچکی از RNA نظیر انواعی از rRNAها (5S) و tRNAها را بر عهده دارد (جدول ۱-۲) (لوئی[1] و همکاران، ۱۹۹۸).

جدول ۳-۲- آنزیمهای رونویسی در یوکاریوتها و ژنهای تحت رونویسی آنها

آنزیم	وظیفهٔ رونویسی از ژن
RNA polymerase I	rRNA (28S, 18S, 5.8S)
RNA polymerase II	mRNA, snRNA (U_1, U_2, U_3, U_4, U_5), miRNA
RNA polymerase III	tRNA, snoRNA, snRNA (U6), rRNA (5S)

[1] Lui



شکل ۳-۴- نسخه‌برداری از ژن توسط *RNA* پلیمراز *II* در سیستم‌های یوکاریوتیک. نسخه برداری از راه‌انداز شروع شده و با دخالت فاکتورهای پروتئینی متعددی ادامه یافته و پس از رسیدن به پایان‌دهنده به اتمام می‌رسد.

۲-۳- ناقل‌های بیان مرسوم در تهیّهٔ پروتئین‌های نوترکیب

ساختار همه ناقل‌های بیان تقریباً مشابه است و ناقل‌های بیان باکتری اشرشیاکلی می‌تواند شاخصی از ناقل‌های بیان پروکاریوتی و حتی یوکاریوتی باشد. در این بخش، بیشتر ناقل‌های بیان در اشرشیاکولی به‌عنوان شاخصی از ناقل‌های بیان مورد بحث قرار می‌گیرند.

عموماً تفاوت ناقل‌ها براساس راه‌اندازهای استفاده شده در آن‌ها می‌باشد. ازاین‌رو می‌توان ناقل‌های بیان را براساس راه‌اندازه‌های آن‌ها تقسیم‌بندی کرد (گیناکپولوس[1] و همکاران، ۱۹۹۷).

۱-۲-۳- ناقل‌های بیان بر پایهٔ راه‌انداز *lac*

از مدت‌ها پیش، از نواحی تنظیم کنندهٔ اپران لک[2] به‌عنوان نمونه‌ای از تنظیم کنندهٔ پروکاریوتی در بیان پروتئین‌های نوترکیب در *E. Coli* استفاده می‌شود. اپران *lac* به‌طور طبیعی در سوخت و ساز مولکول‌های لاکتوز موجود در محیط باکتری دخالت دارد. اپران *lac* دارای سه ژن ساختاری به نام‌های *Z*، *Y* و *A* است. این سه ژن به ترتیب آنزیم‌های بتاگالاکتوزیداز[3] (کاتالیز کنندهٔ هیدرولیز لاکتوز به گلوکز و گالاکتوز)، بتاگالاکتوزاید پرمئاز[4] (کاتالیز انتقال تعدادی از قندها شامل لاکتوز[5]، ملیبیوز[6] و رافینوز[7] به داخل سلول) و تیوگالاکتوزاید ترانس‌استیلاز[8] (آنزیمی با عملکرد نامشخصی که ممکن است نقشی در غیرسمی کردن تیوگالاکتوزیداز بازی کند) را کد می‌کنند. هر سه این آنزیم‌ها به‌طور طبیعی در مقادیر ناچیزی در سلّول وجود دارند، ولی در هنگامی‌که سلّول در معرض لاکتوز قرار می‌گیرد، مقادیرشان تا ۱۰۰۰ برابر زیاد می‌شود. موادّی نظیر لاکتوز که باعث افزایش بیان ژن‌های اپران می‌شود را القاءکننده می‌نامند. این ترکیب‌ها به پروتئین سدکننده که قادر به اتّصال به جایگاه تنظیمی اپران است متّصل شده و آن‌را غیرفعّال می‌کنند. جایگاه تنظیمی بین راه‌انداز و شروع ژن‌های اصلی قرار دارد و اشغال شدن این جایگاه، مانعی برای حرکت آنزیم RNA پلی‌مراز از راه‌انداز به جایگاه ژنی محسوب می‌شود. پروتئین سدکنندهٔ غیرفعّال شده قادر به اتّصال به جایگاه تنظیمی اپران نبوده و RNA پلی‌مراز نسخه‌برداری از ژن‌های اپران را شروع می‌کند. بعد از خارج شدن و یا کاهش مقدار القاءکننده در محیط کشت، میزان بیان ژن دوباره به حالت طبیعی بر می‌گردد (حسنی[9] و همکاران، ۲۰۰۳).

---

[1] Geanacopoulos
[2] Lac operon
[3] β-galactosidase
[4] β-Galactoside permease
[5] Lactose
[6] Melibiose
[7] Raffinose
[8] Thiogalactoside transacetylase
[9] Hasani

ذکر این نکته ضروریست که علاوه بر آنزیم‌های القاءپذیر نوع دیگری از آنزیم‌ها، آنزیم‌های با بیان دائمی[1] نیز وجود دارند که به طور مداوم بیان می‌شوند و القاءپذیر نیستند. این نوع از تنظیم بیان ژن پاسخی به عدم وجود سازوکارهای کنترل بیان ژن می‌باشد. در صورتی که تولید مداوم محصول ژن برای سلّول مضر نباشد، این نوع از تنظیم بیان ژن بهتر از نوع القاءپذیر عمل می‌کند. چراکه اولاً محصول ژن در هر شرایط محیطی بیان شده و تحت تأثیر شرایط محیط نیست و از طرفی نیاز به استفاده از ترکیب‌های القاءکننده بر طرف خواهد شد. همان‌طور که در ادامه توضیح داده می‌شود ترکیب‌های القاءکننده علاوه بر هزینه بر بودن ممکن است در محصول نهایی باقی مانده و در مصرف کننده ایجاد مسمومیّت کند (آجدیک[2] و همکاران ،۱۹۹۸).

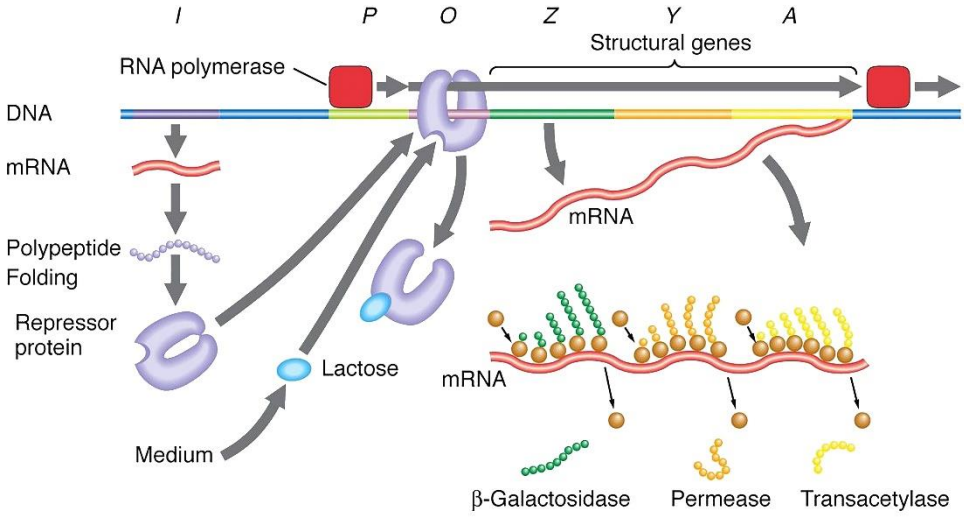
با یک جهش‌زایی هدفمند می‌توان یک اپران القاء پذیر را به یک سیستم بیان مداوم تبدیل کرد. محصول یک ژن موسوم به *lac I* که در فرادست اپران *lac* قرار دارد بازدارنده پروتئینی *lac*[3] است که با اتّصال به راه‌انداز اپران *lac* از بیان آن جلوگیری به عمل می‌آورد. در واقع در حضور لاکتوز، این پروتئین با یکی از مشتقات لاکتوز به نام اَلولاکتوز[4] واکنش داده، غیر فعّال شده و توانایی خود را برای اتّصال به راه‌انداز از دست می‌دهد که بدین ترتیب اپران روشن می‌شود (شکل ۱-۵). به این نوع تنظیم که وجود یک مادّه (در این‌جا اَلولاکتوز) باعث روشن شدن اپران می‌شود کنترل مثبت می‌گویند. جهش‌زایی هدفمند در جایگاه ژن *lac I* می‌تواند اپران *lac* را از فعّالیت مداوم برخودار سازد (گلدستین[5] و همکاران، ۱۹۹۸).

چندین ژن جهش یافته در بازدارندهٔ *lac* وجود دارد. یکی از این جهش‌یافته‌ها I^S [6] نام دارد که توانایی نسبی اتّصال بازدارنده به راه‌اندازه را افزایش داده به‌طوری که القاء اپران *lac* دیگر ممکن نیست، اگرچه سطح پایه‌ای بیان آن حفظ می‌شود. به‌جز جهش‌یافته‌ها I^S، جهش‌یافته‌های دیگری نظیر I^Q [7] و I^{SQ} [8] نیز وجود دارند که دارای تولید بیشتری از پروتئین بازدارنده *lac* هستند و در نتیجه سدکنندگی اپران با توان بیشتری انجام می‌شود. از طرفی، بعضی دیگر از جهش‌یافته‌ها وجود

[1] Constitutive enzymes
[2] Ajdic
[3] Lac protein repressor
[4] Allolactose
[5] Goldstein
[6] Super-repressor
[7] Quantity
[8] Super quantity

دارند که انجام القاء به دلیل وجود ممانعت‌هایی در افزایش غلظت سیتوپلاسمی‌القاءکننده، نسبت به سطح طبیعی مشکل است (وازیلیوا[1] و همکاران، ۲۰۰۱).

مولکول‌های زیادی وجود دارند که همانند لاکتوز خاصیت القاءکنندگی را دارا هستند. این مولکول‌ها، هم در محیط طبیعی[2] و هم در محیط درون‌شیشه‌ای[3] اثر القاءکنندگی خود را اعمال



شکل ۳-۵- اپران Lac. نحوه عمل اپران Lac در محیط کشت دارای IPTG. اپران lac دارای ژن‌های lacZ، lacY و lacA و در ورود و سوخت‌وساز قندهایی نظیر لاکتوز دخیل است. این اپران توسط لاکتوزغیرفعّال و با IPTG القاء می‌شود.

می‌کنند. بر خلاف الّولاکتوز، بعضی از القاءکننده‌ها که به آن‌ها القاءکننده‌های غیرمصرفی[4] می‌گویند، توسط بتاگالاکتوزیداز تجزیه نمی‌شوند و نیاز به اضافه کردن مداوم آن‌ها رفع می‌شود. در میان این نوع القاءکنندگان، ایزوپروپیل بتا- دی- تیوگالاکتوپیرانوزاید[5] و تیومتیل بتا-دی-گالاکتوپیرانوزاید[6] بیشترین کاربرد را دارند. همان‌طور که بیان شد، این ترکیب‌ها، تجزیه‌ناپذیر و

[1] Vassileva
[2] In Vivo
[3] In Vitro
[4] Gratuitous inducers
[5] Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)
[6] Thiomethyl-β-D-galactopyranoside (TMG)

غیرمصرفی بوده و نیاز به اضافه کردن مداوم آن حتی برای چندین نسل وجود ندارد. ازاین‌رو اضافه کردن این ترکیب‌ها به محیط کشت تا چندین نسل، بیان بالای ژن‌های با راه‌انداز *lac* را در بر خواهد داشت (هوساکا[1] و همکاران، ۲۰۰۴).

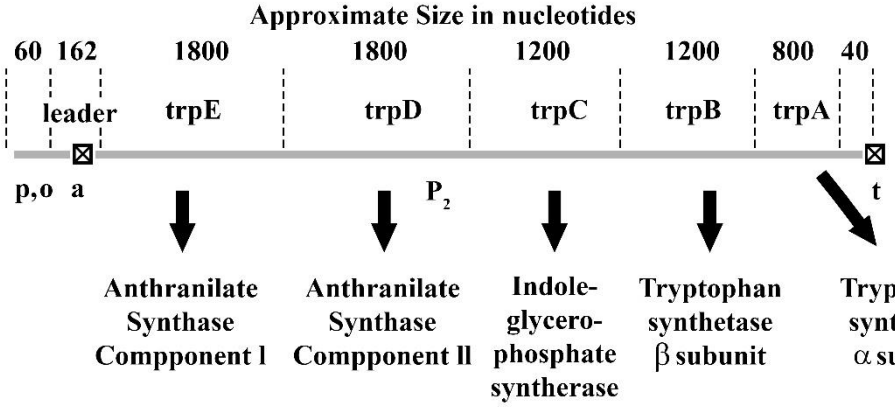
در پایان ذکر این نکته ضروری است که وجود راه‌اندازهای مشتق از *lac* سبب نگرانی در مورد تولید پروتئین‌های غشاء یا دیگر پروتئین‌هایی شده‌است که تجمّع بیش از حد آن‌ها برای سلّول سمّی می‌باشد (مولر[2] و همکاران، ۲۰۰۲).

۲-۲-۳- ناقل‌های بیان بر پایهٔ راه‌انداز *trp*

اپران *trp* بیوسنتز اسید آمینه تریپتوفان را از اسید کوریسمیک[3] (محصول ژن *aro*) در طی واکنش‌های پیچیده‌ای بر عهده دارد. این مراحل توسط سه آنزیم که محصول پنج ژن موجود در اپران *trp* است کاتالیز می‌شود. محصول ژن‌های *trpA* و *trpB* آنزیم تریپتوفان سنتتاز[4]، محصول ژن‌های *trpD* و *trpE* آنزیم آنترانیلیت سنتتاز[5] و محصول ژن *trpC* آنزیم ایندول- گلیسروفسفات سنتتاز[6] است. نقشه ژنتیکی اپران *trp* و ترتیب قرار گیری ژن‌ها در شکل ۱-۶ نشان داده شده است. ژن تولید کدکنندهٔ پروتئین سدکننده در اپران *trp* از اپران کمی فاصله دارد و در این اپران، جایگاه تنظیمی در میان راه‌انداز قرار گرفته است. توانایی راه‌انداز *trp* توسط دو ناحیهٔ غنی از AT که در بالادست (حدود ۵۰- و ۹۰-) راه‌انداز قرارگرفته است تعیین می‌شود به‌طوریکه حذف این قسمت‌ها کارایی راه‌انداز را کاهش می‌دهد. ازاین‌رو این توالی‌ها با توالی‌های افزاینده در یوکاریوت‌ها قابل مقایسه‌اند. اپران *trp* دارای کنترل منفی است و وجود یک ماده القاءکننده (در این قسمت تریپتوفان) باعث خاموش شدن اپران خواهد شد. تریپتوفان با اتّصال به پروتئین سدکننده آن‌را فعّال کرده و اتّصال آن‌را به توالی تنظیمی را تسهیل می‌کند. در واقع تریپتوفان

[1] Hosaka
[2] Møller
[3] Chorismic acid
[4] Tryptophan synthetase
[5] Anthranilate synthetase
[6] Indole – glycerophosphate synthetase

به‌عنوان یک بازدارندهٔ آلوستریک عمل می‌کند. بازدارندگی آنزیمی در اپران *trp*، مقدار محصول را تا ۷۰ برابر کم می‌کند (موسکوسو[1] و همکاران، ۲۰۰۴).



شکل ۳-۶- اپران trp. اپران trp دارای ژن‌های trpE، trpD، trpC، trpB و trpA است که در سنتز اسیدآمینه تریپتوفان دخیل هستند. این اپران درصورت وجود تریپتوفاخاموش و با ۳- ایندول استیک اسید القاء می‌شود.

در این شکل فواصل ژنی با تعداد نوکلئوتیدها مشخص شده است.

آزمایشات نشان می‌دهد که جهش در ژن *E* و یا بخش اول ژن *D* می‌تواند باعث نسخه‌برداری مداوم از ژن‌های دیگر این اپران شود. آزمایشات نشان داده است که در صورت وجود تریپتوفان در محیط کشت، تعدا پروتئین بازدارنده در هر سلول ۱۲۰ عدد است که در غیاب تریپتوفان محیطی این تعداد به ۳۷۵ در هر سلّول می‌رسد (هناهان[2] و همکاران، ۱۹۸۳).

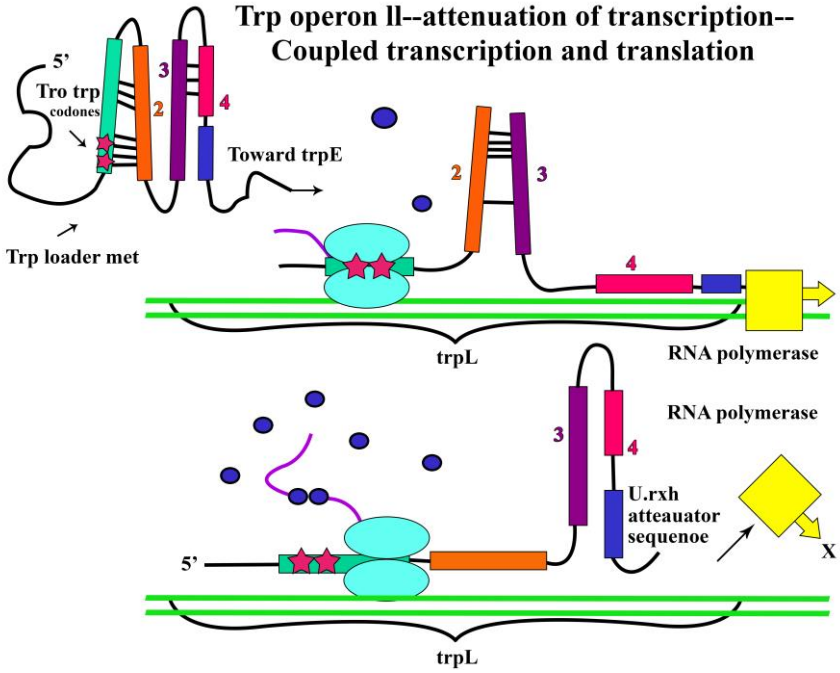
علاوه بر روش‌های مرسوم در تنظیم بیان ژن، در اپران *trp* نوع دیگری از تنظیم بیان نیز وجود دارد. در تقریباً همه مولکول‌های mRNA ناحیه‌ای بنام توالی رهبر[3] وجود دارد. توالی رهبر از توالی ۱۶۲ جفت بازی موجود در انتهای راه‌انداز- جایگاه تنظیمی تا ابتدای ژن *trpE* نسخه برداری می‌شود. آزمایش های دقیق تعیین توالی و پانگاری DNA[4] اتصال عناصر ژنتیکی را به نواحی تأیید می‌کند (سامبروک[5] و همکاران، ۱۹۹۸).

---

[1] Moscoso
[2] Hanahan
[3] Leader sequence
[4] Footprinting
[5] Sambrook

اگر نسخه برداری پلاسمید حامل اپران *trp* در در محیط در شیشه انجام شود دو نوع RNA حاصل می‌شود که در نوع اول، mRNA مربوط به ژن‌های ساختاری اپران *trp* است. در نوع دوم RNA حاصل فقط ۱۴۰ باز از توالی رهبر را دارد. توالی رهبر دارای چهار ناحیهٔ غنی از GC می‌باشد که قادرند در برهمکنش باهم ساختارهای حلقه را تشکیل دهند. برهم‌کنش این نواحی می‌تواند باعث ایجاد سه ساختار حلقه در نواحی بین ۱ و ۲، ۲ و ۳ و همچنین ۳ و ۴ شود. در هنگام نسخه‌برداری از منطقه رهبر، RNA پلی‌مراز پس از رسیدن به ناحیه ۱ و ۲ با سرعت کمتری حرکت می‌کند چراکه این ناحیه یک ناحیه وقفه[1] می‌باشد. مرحلهٔ بعد بستگی به غلظت tRNA-تریپتوفان در محیط دارد. اگر این مقدار در محیط بالا باشد، RNA پلی‌مراز و ریبوزوم با یک سرعت حرکت می‌کنند و مانع تشکیل حلقه ۲ و ۳ می‌شود. ممانعت از تشکیل حلقه ۲ و ۳ به معنای تشکیل حلقهٔ ۳ و ۴ می‌باشد. حلقهٔ ۳ و ۴ یک خاتمه دهندهٔ غیر وابسته به فاکتور *Rho* می‌باشد و با تشکیل این حلقه نسخه‌برداری به پایان می‌رسد. اگر غلظت tRNA-تریپتوفان در محیط کم باشد، سرعت حرکت آنزیم‌ها بر روی حلقهٔ ۱ و ۲ کاهش یافته و حلقهٔ ۲ و ۳ فرصت کافی برای تشکیل شدن را دارد. با تشکیل حلقهٔ ۲ و ۳، حلقه ۳ و ۴ تشکیل نخواهد شد و نسخه‌برداری همچنان ادامه می‌یابد. به این نوع تنظیم بیان ژن از طریق انفصال در نسخه‌برداری[2] گویند (شکل ۳-۷).

[1] Pause site
[2] Attenuation



شکل ۳-۷- تنظیم بیان در اپران *trp*. با توجه به مقادیر اسیدآمینه تریپتوفان سلولی لوپهای ۲-۳ و یا ۳-۴ اپران *trp* تشکیل می‌شود. لوپ ۲-۳ باعث ادامه و لوپ ۳-۴ باعث خاتمه نسخه‌برداری می‌شود (برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه شود).

به‌طورکلّی از خاصیت بازدارندگی اسیدآمینه تریپتوفان به‌منظور توقّف بیان ژن این راه‌انداز استفاده می‌شود. ایندول ۳- استیک اسید[1] به خوبی باعث القای اپران *trp* می‌شود.

۳-۲-۳- ناقل‌های بیان بر پایهٔ راه‌انداز tac

یکی دیگر از راه‌اندازهای معمول در تولید پروتئین نوترکیب، راه‌انداز *tac* است. این راه‌انداز، دورگ بین راه‌اندازهای *trp* و *lac*، از هردوی این راه‌اندازها قوی‌تر است. راه‌انداز *tac* نیز با IPTG القاء می‌شود (شن[2] و همکاران، ۱۹۹۸).

علاوه بر راه‌انداز *tac*، راه‌انداز *trc* نیز مشتق راه‌اندازهای *trp* و *lac* است که به‌منظور بیان ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد. هردوی این راه‌اندازها دارای ناحیه ۳۵- مربوط به راه‌انداز *trp* و ناحیهٔ

[1] Indole-3-acetic acid (IAA)
[2] Shen

۱۰- از راه‌انداز *lac* می‌باشند و فقط به دلیل وجود یک جفت نوکلئوتید در فضای جدا کننده در دو توالی مورد توافق ۱۰- و ۳۵- متفاوت هستند. هردوی این راه‌اندازها کاملاً قوی بوده و دارای توانایی تولید پلی‌پپتیدهایی در حدود ۳۰-۱۵ درصد از کل پروتئین‌های سلّولی هستند. البته عقیده براین است که هزینهٔ بالای IPTG استفاده از این راه‌اندازها را محدود می‌کند ولی برای تولید پروتئین‌های با ارزش بالا این هزینه توجیه‌پذیر است. به علاوه، حدود ۱۰۰-۵۰ میکرومول از IPTG برای القاء کافیست. مشکل اساسی سمیّت IPTG را می‌توان با استفاده از لاکتوز به‌عنوان القاءگر و یا استفاده از جهش‌یافته‌های پروتئینی حساس به حرارتی حل نمود که بازدارندهِ *LacI* (عامل القای حرارتی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب) می باشند. به معنی که با افزایش حرارت از حد معینی (معمولاً ۳۰ درجه سانتی‌گراد) ژن کدکننده پروتئین سد کننده غیرفعّال شود و درنتیجه اپران روشن می‌شود.

عیب اصلی اپران *tac* این است که یک تا دو ساعت بعد از افزایش دما غیر فعّال می‌شود. این بازهٔ زمانی بسیار کوتاه است و اجازه نمی‌دهد مقادیر زیادی از پروتئین نوترکیب تولید شود. البته استفاده از نژادهایی که ژن *rbfA* را حمل می‌کند می‌تواند مفید باشد چرا که این ژن یک پروتئین ۱۵ کیلودالتنی را به رمز درمی‌آورد که مرتبط با زیر واحد S ۳۰ ریبوزوم بوده و اجازه تولید مداوم بتا-گالاکتوزیدازهای مشتق از *cspA* را در سلّول‌هایی می دهد که دارای تخمیر بالایی هستند.

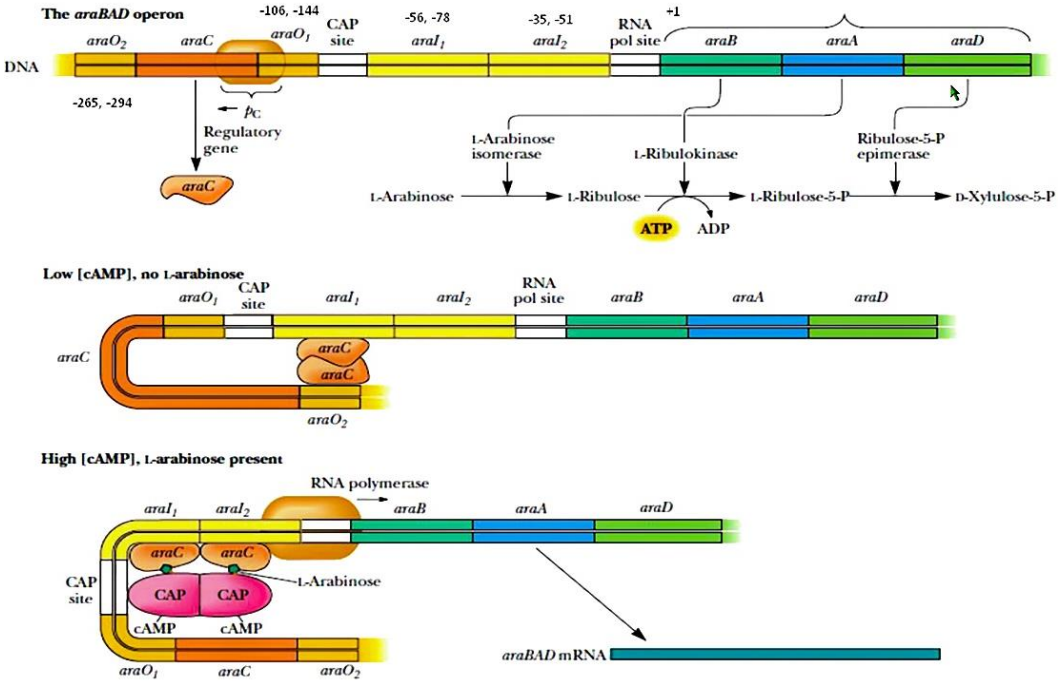
۴-۲-۳- ناقل‌های بیان بر پایه راه‌انداز ara

در میان راه‌اندازهای مختلف القاءپذیر با مواد غذایی نظیر *phoA* و *trp* که به ترتیب از طریق محدودیّت فسفات و تریپتوفان القاء می‌شوند، راه‌انداز آرابینوز (*araBAD* و *PBAD*) اخیراً تجاری شده‌است. این راه‌انداز از قند کم‌هزینه ال-آرابینوز[1] به‌عنوان القاگر استفاده می‌کند (شکل ۱-۸). اگرچه راه‌انداز*araBAD* نسبت به راه‌انداز *tac* ضعیف‌تر است با این حال، از آن برای بیان پروتئینی در سطوح مختلف استفاده می‌شود. این کار با استفاده از غلظت‌های گوناگون آرابینوز انجام می‌گردد. ذکر این نکته ضروریست که همه نژادهای سلّولی دارای واکنش یکسان در مقابل غلظت‌های مختلف تیمار نیستند، چراکه بعضی از باکتریها کاملاً القاءپذیرند و بعضی دیگر هیچ گاه القاء نمی‌شوند. لذا، *araBAD* برای کنترل دقیق میزان پروتئین تولیدی مفید نخواهد بود.

[1] L-arabinose

راه‌اندازهای دیگری نیز که توسط علائم[1] گوناگونی (از قبیل pH، غلظت اکسیژن غیرقابل حل، فشار اسمزیک و . . .) تنظیم می‌شوند، در دسترس هستند (پوزی[2] و همکاران، ۱۹۹۲).

[1] Signals
[2] Possee



شکل۳-۸- اپران ara با کدکردن آنزیم‌های آرابینوز کیناز، آرابینوز ایزومراز و آرابینوز اپی‌مراز نقش مه‌می‌در سوخت‌وساز آرابینوز دارد. این اپران با اضافه شده قند آرابینوز به محیط کشت القاء می‌شود.

۵-۲-۳- ناقل‌های بیان بر پایهٔ راه‌اندازه gal

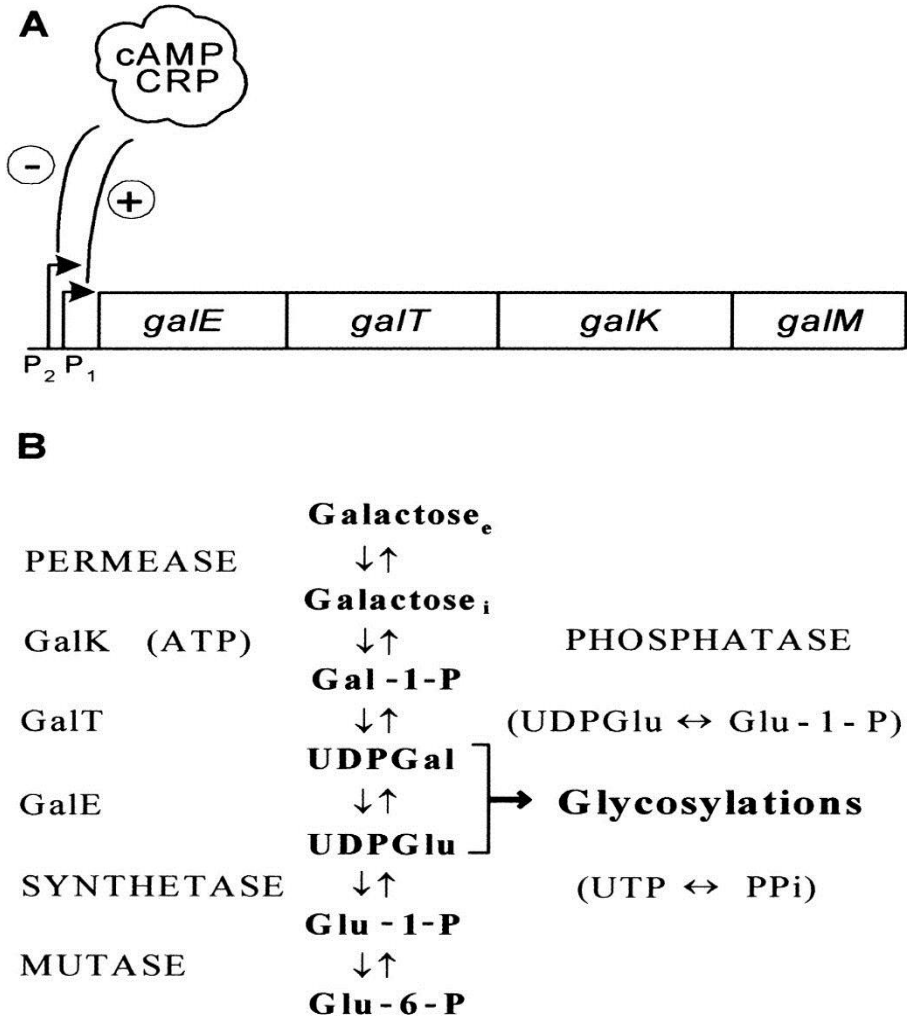
گالاکتوز مونوساکارید مه‌می‌در اشرشیا کولی محسوب می‌شود. گالاکتوز نه تنها از جهت منبع انرژی و شرکت در سوخت و ساز انرژی بلکه به دلیل حضور در دیوراه سلّولی خارجی باکتری نیز مهم است. ازاین‌رو سلّول‌ها باید به‌طور مداوم همیشه مقداری گالاکتوز را در اختیار داشته باشند. استفاده از گالاکتوز به‌عنوان منبع انرژی و کربن به سه پروتئین کد شده توسط اپران *gal* نیاز دارد. پروتئین اول آنزیم گالاکتوکیناز کدشده توسط ژن *galK* که گالاکتوز را به گالاکتوز ۱- فسفات[1] تبدیل می‌کند، است. پروتئین دوم و سوم آنزیم ترانسفراز کد شده توسط ژن *galT* و آنزیم اپی‌مراز کد شده توسط *galE* می‌باشد. این آنزیم‌ها به ترتیب اتّصال گالاکتوز فسفوریله شده را به یوریدین دی فسفوگلوکز[2] (منجر به تولید یوریدین دی فسفوگالاکتوز[1]) و تبدیل UDPgal را به

[1] Galactose-L-Phosphate
[2] Uridine Diphosphoglucose (UDPG)

UDPG را کاتالیز می‌کنند. بررسی‌های اپران *gal* نشان می‌دهد که شباهت زیادی بین اپران *lac* و *gal* وجود دارد که کنترل مثبت از جمله آن است (شکل ۳-۹) (فرمینان[۲] و همکاران، ۱۹۹۸).

تفاوت قابل ذکر اپران‌های *lac* و *gal* این‌است که ژن بازدارندهٔ اپران *gal* (*gal R*) در فاصله بسیار دورتر از اپران قرار در مقایسه با ژن بازدارندهٔ اپران دارد. با وجود این فاصله زیاد انتظار بر این است که احتمال یافتن و جاگیری بر روی جایگاه تنظیمی اپران کمتر شود. در عمل چنین است به‌ویژه در پروکاریوت‌ها که ترجمه هم‌زمان نسخه‌برداری انجام می‌گیرد. ازاین‌رو اگر پروتئین تولیدی در نزدیکی همان جایگاه اتصال خود سنتز شود به راحتی در بین توالی‌های مختلف جایگاه خود را می‌یابد. راه‌کار اپران *gal* برای جبران این نقص، اتصال محکم‌تر پروتئین سدکننده به جایگاه تنظیمی نسبت پروتئین‌های سدکننده به اپران‌های دیگر است (تورس[۳] و همکاران، ۲۰۰۳).

[1] Uridine diphosphogalactose (UDPgal)
[2] Ferminan
[3] Torres



شکل ۳-۹- اپران gal، دارای ژن‌های galE، galT، galK و galM است. آنزیم‌های کدشده توسط این اپران در سوخت‌وساز گالاکتوز دخالت دارند و این قند را به گلوکز ۶- فسفات تبدیل می‌کنند تا وارد چرخه کربس شود.

مانند دیگر راه‌اندازهای مربوط به کاتابولیسم نظیر *lac*، اپران *gal* را نیز می‌توان با افزودن مادّهٔ اولیه القاء کرد. اپران gal قادر است در حضور گالکتوز به میزان بالایی ژن‌های ساختاری خود را بیان کند.

۶-۲-۳- ناقل‌های بیان بر پایهٔ راه‌اندازهای ویروسی

در سال‌های اخیر، محقّقان از ناقل‌های pET جهت افزایش بیان ژن سود برده‌اند. در این سیستم، ژن‌های هدف در پایین‌دست راه‌انداز ژن‌های مؤخّر[1] باکتریوفاژ T7 بر روی پلاسمیدهایی قرار داده‌می‌شود که تعداد نسخهٔ بالا را در سلّول ایجاد می‌کنند. با این موقعیّت RNA پلی‌مراز ویروسی، در مقدار بالایی تولید می‌گردد و متعاقب آن مقادیر بالایی از ژن موردنظر نسخه‌برداری می‌شود. هدف اصلی ناقل pET، تولید مقدار بالایی از mRNA است که به همراه آن مقدار زیادی از پروتئین موردنظر تولید و انباشته می‌شود (۴۵-۴۰ درصد از کلّ پروتئین سلّولی) که البته این خالی از اشکال نیست. به‌عنوان مثال، سطح بالای mRNA سلولی می‌تواند باعث تخریب ریبوزوم و مرگ سلول شود. بیان نامناسب RNA پلی‌مرازِ T7 باعث ناپایداریِ پلاسمید و مراحل بیان پروتئینی می‌شود. دیده شده است که پلاسمید pET (بدون بیان) در حضور IPTG برای اشرشیاکولی سمّی است. این درحالی است که بعضی از این سازوکارها موجب تولید مقادیر زیاد لیزوزایم[2] مربوط به فاژ T7 می‌شوند و RNA پلی‌مرازِ T7 را تخریب می‌کند. این لیزوزایم از پلاسمیدهای سازگارِ pLysS و pLysE تولید می‌شود.

محدودیت دیگرِ T7 و دیگر سیستم‌های راه‌اندازی قوی این است که پروتئین‌های هدف اغلب در پیداکردن شکل اصلی خود و همچنین توزیع مناسب در کیسه‌های انتقالی مشکل دارند. اگرچه این مشکل به وسیلهٔ تعدیل‌کننده‌هایِ[3] هم فوق بیان[4] یا به واسطه فن‌آوری پروتئین همجوش[5] کاهش می‌یابد ولی جایگزین مناسب، استفاده از راه‌اندازهایی است که به وسیلهٔ کاهش حرارت فعّال می‌شوند. دلیل این موضوع این است که اغلب تحت شرایط کشت در دمای پایین‌تر تاخوردگی پروتئینی صحیح‌تر صورت می‌گیرد. در این میان CspA شناخته‌شده‌ترین راه‌انداز شوک سرمایی[6] در اشرشیاکولی است. ویژگی این راه‌انداز این است که نسبت به راه‌اندازهای نظیر *tac* در دمای C ° ۳۷ و بالاتر از آن بیان بهتری دارد (کارلسون[7] و همکاران، ۱۹۸۲).

---

[1] Late genes
[2] Lysozyme
[3] Modulators
[4] Co-overexpress
[5] Fusion protein technology
[6] Cold-shock
[7] Carlson M

فصل چهارم

پروتئین های نوترکیب

۱-٤- تهیهٔ پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های پروکاریوتیک

همان‌طور که ذکر شد در تولید پروتئین نوترکیب، پروکاریوت‌ها به‌ویژه باکتری اشرشیاکولی از اهمیّت ویژه‌ای برخوردار است. در این فصل سعی شده است که جنبه‌های گسترده‌تری از سیستم-های تولید پروتئین‌های نوترکیب توسط باکتری اشرشیاکولی و ناقل‌های مرتبط با آن مورد بررسی قرار گیرد (چانگ[1] و همکاران، ۱۹۹۸).

اشرشیا کولی[2] یکی از میزبان‌هایی است که از آن به فور در تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود، از طرف دیگر ویژگی‌های ژنتیکی آن نیز به خوبی شناخته شده‌است. در میان همهٔ سیستم‌های در دسترس برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، باکتری گرم‌منفیِ[3] اشرشیا کولی به‌عنوان یک موجود زنده منحصر به‌فرد مورد استفاده قرار می‌گیرد. این انتخاب به دلیل توانایی اشرشیا کولی در رشد زیادِ با تراکم بالا در محیط کشت کم‌هزینه، ویژگی‌های مناسب ژنتیکی آن،

[1] Chung
[2] Escherichia coli
[3] Gram-negative

دسترسی به تعداد بالای ناقل‌های همسانه‌سازی و بیان، وجود انواع جهش‌یافته‌ها با کاربردهای مختلف و عدم دارا بودن و یا میزبانی ویروس‌های بیماری‌زای انسانی است.

به‌منظور انتقال ژن موردنظر به اشرشیا کولی ابتدا باید آن‌را آماده کرد. اشرشیا کولی کارایی پایینی در دریافت DNA از محیط رشد خود دارد. این کارایی را می‌توان با در معرض قرار دادن سلّول‌ها در غلظت‌های بالای یون کلسیم افزایش داد و به اصطلاح آن را به سلّول توانا[1] تبدیل کرد. اخیراً مشخّص شد است که اضافه کردن کلریدکبالت و دای‌متیل‌سولفوکسید[2] نیز کارایی دریافت DNA از محیط اطراف سلّول را افزایش می‌دهد. با این‌که اعمال این تیمارها ممکن است ۹۵ درصد از سلّول‌ها را ازبین ببرد با این حال ۵ درصد باقیمانده توانایی خوبی در دریافت DNA می‌یابند. همهٔ مراحل ذکر شده در دمای پایین انجام می‌شود و در نهایت با افزایش دما به ۴۰-۳۷ درجه‌سانتی‌گراد سلّول DNA را دریافت می‌کند (هاناهان[3] و همکاران، ۱۹۸۳).

تنوّع بالایی از پلاسمیدها در اشرشیا کولی وجود دارد که آن‌را مناسب مهندسی ژنتیک کرده است. برخلاف دیگر موجوداتی که به‌طورطبیعی به‌منظور همسانه‌سازی بکار می‌روند، اشرشیا کولی در حین دریافت DNA جدید پلاسمید خود را خطی نمی‌کند. اگر قبل از انتقال DNA پلاسمید خطی شود سطوح پایینی از تراریختی حاصل خواهد شد. به این دلیل است که معمولاً برای ارتقای کارایی انتقال در پلاسمیدهایی که خطی می‌شوند، قسمت‌هایی از توالی پلاسمیدی که باعث خطی شدن آن می‌شود، حذف می‌گردد. آنزیمی که باعث عدم کارایی انتقال در پلاسمیدهای خطی می‌شود اگزونوکلئاز V[4] نام دارد که با فعّال شدن خود، امکان تکثیر به روش حلقه غلطان[5] را نیز می‌دهد. این آنزیم فقط به DNA دورشته‌ای خطی حمله می‌کند و پلاسمیدهای حلقوی حتی اگر برش خورده باشند را شناسایی نمی‌کند (پانینا[6] و همکاران ،۲۰۰۳).

[1] Competent cell
[2] Dimethylsulfoxide
[3] Hanahan
[4] Exonuclease V
[5] Rolling circle replication
[6] Panina

۲-٤- شناسایی ژن موردنظر به‌منظور انتقال

به‌منظور بیان ژن موردنظر در ناقل بیان، در ابتدا باید این ژن جدا، تکثیر و سپس به ناقل بیان مناسب انتقال یابد. بر اساس ماهیت ژن و محصول آن، روش‌های متعدّدی برای دستیابی به این هدف وجود دارد (روبرتسون[1] و همکاران، ۱۹۸۷).

معمولاً در ابتدا موجودی که دارای ژن موردنظر می‌باشد را انتخاب کرده و سپس با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، ژن را جدا، تکثیر و به ناقل بیان منتقل می‌کنند (مولر[2] و همکاران، ۲۰۰۲).

۱-۲-۴- خزانه ژنومی

به مجموعه‌ای از ناقل‌های همسانه‌سازی که همه قطعات ژنومی‌یک موجود را حمل می‌کنند خزانه ژنومی[3] گویند. در این روش کلّ ژنوم موجودی که ژن موردنظر در آن وجود دارد را با استفاده از برش هیدرودینامیک[4] و یا آنزیم‌های محدودکننده[5] هضم می‌کنند (معمولاً با دوآنزیم به‌طور هم‌زمان). سپس این قطعات را وارد ناقل‌های همسانه‌سازی کرده و این ناقل‌های نوترکیب[6] را در مجاروت میزبان‌های همسانه‌سازی (معمولاً سلّول‌های باکتری) مناسب قرار داده تا وارد آن شوند. ناقل‌های همسانه‌سازی باید با همان آنزیم محدودکننده‌ای که ژنوم را برش داده است، هضم شود. سلّول میزبانی که حداقل یک ناقل نوترکیب را دریافت کرده باشد، تراریخت[7] نامیده می‌شود. در مرحلهٔ پایانی همسانه‌های تهیّه شده که بسته به اندازهٔ ژنوم مورد مطالعه می‌تواند تا حتی هزاران همسانه باشد را در محیط کشت مناسب تکثیر داده تا همسانه‌های بی‌شماری از هر قطعه DNA به‌دست آید. هرچقدر از آنزیم‌های محدودکننده کمتر و یا با جایگاه برش نادرتری استفاده شود قطعات حاصل از برش بزرگ‌تری به‌دست خواهد آمد و در نتیجه تعداد همسانه‌های کمتری تهیه

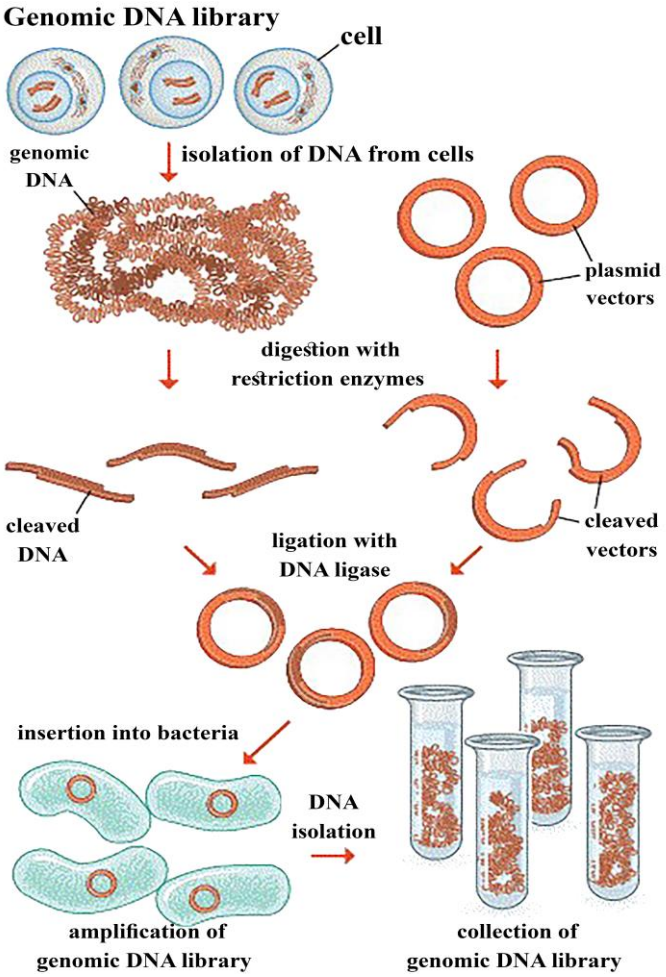
---

[1] Robertson
[2] Møller
[3] Genomic Library
[4] Hydrodynamic shear
[5] Restriction enzymes
[6] Recombinant
[7] Transgene

می‌شود. مطالعه و بررسی همسانه‌های کمتر با صرف وقت و هزینه کمتری میسّر خواهد بود (سورنسن[1] و همکاران، ۲۰۰۵).

هر دوی روش‌های برش هیدرودینامیکی و هضم آنزیمی، ژنوم را به قطعات DNA هم‌پوشان[2] تبدیل می‌کنند. همپوشانی قطعات در یافتن ترتیب قرارگیری نقاط برش بر روی ژنوم و یا به اصطلاح تهیه نقشه آنزیمی مهم است. با استفاده از روش‌های فیزیکی می‌توان تعداد و اندازه قطعات را به‌طور جدا ازهم مشخص کرد. یکی از روش‌معمول برای این منظور، استفاده از شیب گرادیانت ساکارز و سانتریفیوژ می‌باشد.

[1] Sorensen
[2] Overlapping DNA fragments



شکل ۴-۱- چگونگی تهیهٔ خزانه ژنی. برای تهیه خزانه ژنی یک موجود در ابتدا از سلّول‌های آن استخراج DNA صورت گرفته و سپس با استفاده از آنزیم‌های محدوکننده مناسب، آن‌ها را در درون ناقل پلاسمیدی قرار می‌دهیم. این ناقل‌های نوترکیب در معرض سلّول‌های باکتری قرار گرفته و وارد آن می‌شوند. باکتری‌هایی که هرکدام از ناقل‌ها را دریافت کنند تراریخت می‌شوند. سلّول‌های تراریخت به محیط کشت مناسب به‌منظور تکثیر و نگهداری انتقال داده می‌شوند.

غلظت ساکارز بعداز سانتریفیوژ، در پایین لوله دارای شیب چگالی بیشتر و در بالا کمتر است ازاین‌رو قطعات بزرگ‌تر در پایین ظرف و کوچک‌ترها در بالا قرار می‌گیرند. از لایه‌های مختلف

DNA به‌منظور تهیه خزانه ژنی استفاده می‌گردد به این ترتیب که هر لایه می‌تواند یک همسانه‌باشد.

در نهایت با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده‌ای که برای برش ژنوم موردنظر استفاده شد، قطعه‌ای را که محقّق مدّنظر دارد را می‌توان از همسانه مربوطه جدا و مورد مطالعه و یا بیان ژن قرار داد. خزانه ژنی مجموعهٔ بزرگی از قطعات DNA حاصل از برش ژنوم موجود موردنظر است. چگونه می‌توان همسانهٔ حاوی ژن موردنظر در بین هزاران همسانه مختلف مشخص کرد؟ برای دست‌یابی به این منظور بسته به نوع و مقدار اطلاعات در دسترس از توالی و یا محصول کد شده توسط ژن موردنظر، از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود (وستواتر[1] و همکاران، ۲۰۰۳).

به‌طور کلی دو روش مستقیم و غیر مستقیم در انتخاب همسانه حاوی ژن موردنظر وجود دارد. در روش مستقیم که معمولاً برای انتخاب ژن‌های کدکننده محصولاتی نظیر مقاومت به آنتی‌بیوتیک و یا سنتز مواد غذایی ضروری برای رشد میزبان استفاده می‌شود، از محیط‌های کشت ویژه‌ای کمک گرفته می‌شود.

به‌عنوان مثال، برای تشخیص همسانه‌ای که دارای ژن کد کننده بتا- لاکتاماز[2]، آنزیم مسئول مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، کافی است همسانه‌های مورد مطالعه را در محیط کشت دارای آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین کشت دهیم. در صورت وجود ژن مقاومت در ژنوم، همسانه به رشد خود ادامه می‌دهد، در غیراین‌صورت سلول‌ها کشته می‌شوند.

برای تشخیص ژن‌های کدکننده آنزیم‌های دخیل در سنتز مواد غذایی ضروری نظیر اسیدآمینه‌ها نیز می‌توان از انتخاب مستقیم بهره برد. در این روش همسانه‌های مورد مطالعه در محیط کشت بدون آن اسیدآمینه منتقل شده و رشد آن مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این محیط کشت فقط همسانه‌ایی که ژن سنتز اسیدآمینه را داشته باشد قادر به رشد خواهد بود (هومگا[3] و همکاران، ۱۹۹۸).

سؤالی که ممکن است پرسیده شود این است که اگر ژن کد کنندهٔ پروتئین موردنظر در میزبان به‌صورت طبیعی وجود داشته باشد، چگونه می‌توان همسانه موردنظر را انتخاب کرد؟

---

[1] Westwater
[2] β- lactamase
[3] Hogema

جواب این سوال استفاده از نشانگر ناجی[1] است. نشانگر ناجی به میزبانی اطلاق می‌شود که در ژن مورد بررسی جهش‌دار شده باشد. دراین‌صورت این میزبان از نظر ژن مورد بررسی وابسته به ورود DNA خارجی است به این معنی که اگر ژن موردنظر، قطعات برشی حاصل از هضم آنزیمی، از خارج وارد شود آن‌را جایگزین توالی معیوب خود کرده و در آن ژن به شکل طبیعی خود برمی‌گردد (سورنسن[2] و همکاران، ۲۰۰۳).

در روش‌های غیرمستقیم که معمولاً در مورد ژن‌های غیر مقاومتی و غیرتغذیه‌ای بکار می‌رود، از اطلاعات موجود در مورد توالی و یا محصول ژن استفاده می‌شود. اگر از توالی ژن موردنظر اطلاعاتی در دست باشد می‌توان با طراحی و ساخت یک کاوشگر[3] و یا آغازگر[4] به‌طور غیرمستقیم همسانه حاوی ژن موردنظر را شناسایی کرد.

کاوشگر توالی مشخصی از نوکلئوتیدها است که نشان‌دار بوده (با مواد رادیواکتیو و یا فلورسنت) و با کارایی و دقت بالایی توالی مکمّل خود را از بین توالی‌های زیادی شناخته و به آن متّصل می‌شود. در استفاده از کاوشگر، روش سادرن بلات[5] بکار گرفته می‌شود. در این روش همهٔ همسانه‌ها به غشای نیتروسلولزی و یا نایلونی انتقال و بر روی این غشاء لیز می‌شوند. اگر این غشاءها در معرض محلول حاوی کاوشگر (که در این‌جا دارای توالی از ژن موردنظر است) قرار گیرد، کاوشگر به توالی مکمّل خود، اگر وجود داشته باشد، متّصل و با استفاده از روش‌های اتورادیوگرافی و یا مشاهده نور فلورسنت صحت اتّصال تایید می‌شود. همسانه‌ای که کاوشگر به آن متّصل شود حامل ژن موردنظر است (لوئیس[6] و همکاران، ۱۹۹۹).

اگر کاوشگر مکمّلی در هیچکدام از همسانه‌ها نداشته باشد در مرحله شستشو، که بعد از مرحله اتّصال انجام می‌گیرد، از روی غشاء حذف شده و اتصال توسط اتورادیوگرافی و یا مشاهدهٔ

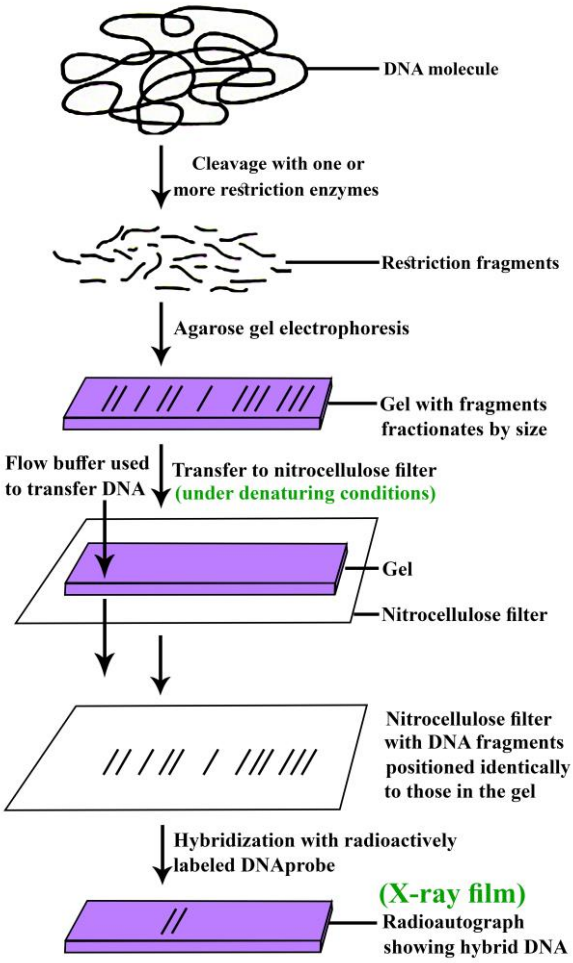
---

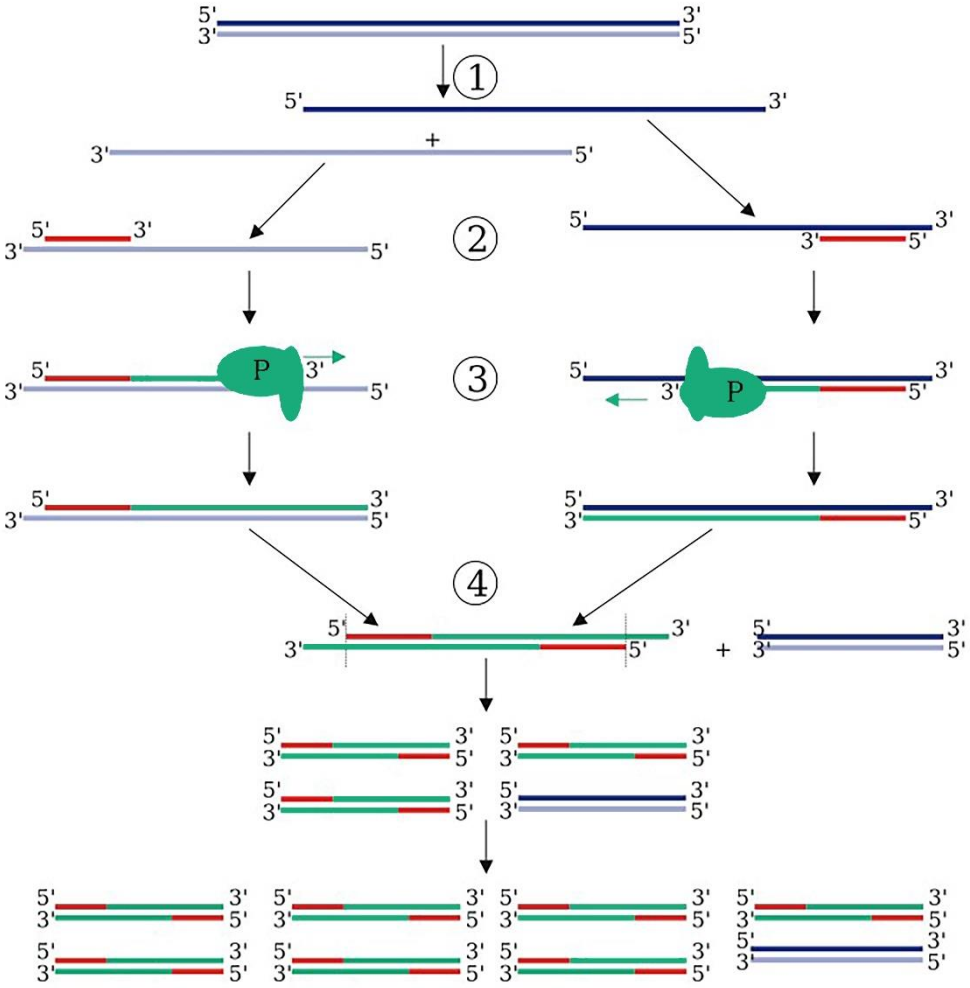
[1] Marker rescue
[2] Sorensen
[3] Probe
[4] Primer
[5] Southern blot
[6] Lewis

فلورسنت تایید نشده و نشان می‌دهد که مکمّل توالی کاوشگر در همسانه‌های مورد بررسی وجود ندارد (شکل ۴-۲، الف) (سامبروک[1] و همکاران، ۱۹۹۴).

در روش استفاده از آغازگر، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[2] بکار برده می‌شود. در این روش، ابتدا آغازگرهای ۲۰ تا ۳۰ نوکلئوتیدی بر اساس توالی ژن موردنظر طراحی و ساخته می‌شود. در PCR، اگر توالی مکمّل آغازگر (قسمتی از توالی ژن موردنظر) در DNA استخراج شده از همسانه‌ها وجود داشته باشد، آغازگر به آن متّصل و طی چرخه‌هایی آن‌را تکثیر می‌کند. در صورتی که پس از الکتروفورز محصولاتِ PCR [3]، باندی دیده شد به این معنی است که مکمّل آغازگر (توالی ژن موردنظر) در همسانه وجود دارد (شکل۴-۲، ب) (ترینه[4] و همکاران، ۲۰۰۳).

[1] Sambrook
[2] Chain Reaction Polymerase (PCR)
[3] PCR product
[4] Trinh


DNA molecule
Cleavage with one or
more restriction enzymes
Restriction fragments
Agarose gel electrophoresis
Gel with fragments
fractionates by size
Flow buffer used
to transfer DNA
Transfer to nitrocellulose filter
(under denaturing conditions)
Gel
Nitrocellulose filter
Nitrocellulose filter
with DNA fragments
positioned identically
to those in the gel
Hybridization with radioactively
labeled DNAprobe
(X-ray film)
Radioautograph
showing hybrid DNA



شکل ۴-۲- مقایسهٔ نحوهٔ تشخیص ژن موردنظر روش‌های سادرن و PCR. الف) در سادرن بلات ژنوم موجود زنده برش خورده و بر روی ژل آگارز از یکدیگر جدا می‌شوند. سپس باندهای DNA موجود در ژل به کاغذ (معمولاً نیتروسلولزی) انتقال داده می‌شود. کاغذ در محلول حاوی کاوشگرهای (مکمّل ژن موردنظر) نشان‌دار فروبرده شده و پس از شستشو، توسّط اتورادیوگرافی با اشعه X، الگوی باندی (درصورت وجود ژن موردنظر) قابل مشاهد خواهد بود. ب) در PCR از آغازگرهای اختصاصی ژن موردنظر که مکمّل بخشی از توالی آن است به‌منظور تکثیر ژن استفاده می‌شود. اگر ژن موردنظر وجود داشته باشد آغازگر به آن متّصل و آن قطعه را تکثیر می‌کند که در نتیجه پس از اتمام PCR، الگوی باندی مربوط به ژن موردنظر قابل مشاهده خواهد بود.

دقّت روش سادرن بلات به دلیل استفاده از کاوشگرها، که از نظر طول توالی بلندتر از آغازگرها هستند، بسیار بیشتر از PCR است.

به‌منظور طراحی و ساخت کاوشگرها و یا آغازگرها در تشخیص همسانه موردنظر لزوماً نیازی به اطلاع از توالی ژن موردنظر به‌طور مستقیم و با استفاده از روش‌هایی نظیر توالی‌یابی DNA نیست. در ادامه پاره‌ای از روش‌هایی که می‌توان براساس آن بدون اطلاع دقیق از توالی ژن موردنظر، کاوشگر و یا آغازگر مناسبی را طراحی کرد، شرح داده می‌شود. طرّاحی بر اساس توالی اسیدهای آمینه، طرّاحی بر اساس وفور پروتئین موردنظر در بافت خاص و طرّاحی بر اساس توالی ژن‌های مشابه در گونه‌های نزدیک از جمله این روش‌ها هستند (فرمینان[1] و همکاران، ۱۹۹۸).

طرّاحی بر اساس توالی اسیدهای آمینه محصول کد شده توسط ژن موردنظر در بخش سنتز مصنوعی DNA در این فصل توضیح داده خواهد شد. ذکر این نکته ضروری است که به دلیل چند کدون بودن بعضی از اسیدهای آمینه، توالی از رشته پروتئینی انتخاب شود که دارای اسیدهای آمینه با کدون کمتر باشد. بر اساس توالی اسیدهای آمینه در آن قسمت، انواع توالی‌های الیگونوکلئوتیدی (کاوشگر و یا آغازگر) ساخته می‌شود. به‌عنوان مثال، اگر یک توالی از پروتئین موردنظر با پنج اسیدآمینه مدنظر قرار گیرد که هر اسیدآمینه به‌ترتیب دارای سه، دو، یک، یک و چهار کدون باشد، دراین‌صورت ۲۴ الیگونوکلئوتید مختلف طرّاحی می‌شود که فقط یکی از آن‌ها با توالی واقعی قطعه‌ای از ژن موردنظر هم‌خوانی دارد. پس از استفاده از الیگونوکلئوتیدها در تشخیص همسانه موردنظر ممکن است به دلیل تشابه توالی‌ها، علاوه بر اتّصال الیگونوکلئوتید اصلی به ژن موردنظر، الیگونوکلئوتید و یا الیگونوکلئوتیدهایی به همسانه‌های دیگر نیز متّصل شوند که این باعث می‌شود بعد از سادرن بلات و یا PCR، دو و یا تعداد بیشتری همسانه مورد تأیید قرار گیرند. در چنین مواقعی لازم است که از نواحی دیگری از پروتئین موردنظر طرّاحی الیگونوکلئوتیدی صورت گیرد و دو یا چند همسانه انتخاب شده در مرحله قبل، مجدداً مورد بررسی قرار گیرند تا همسانهٔ اصلی مشخص شود (هوساکا[2] و همکاران، ۲۰۰۴).

---

[1] Ferminan

[2] Hosaka

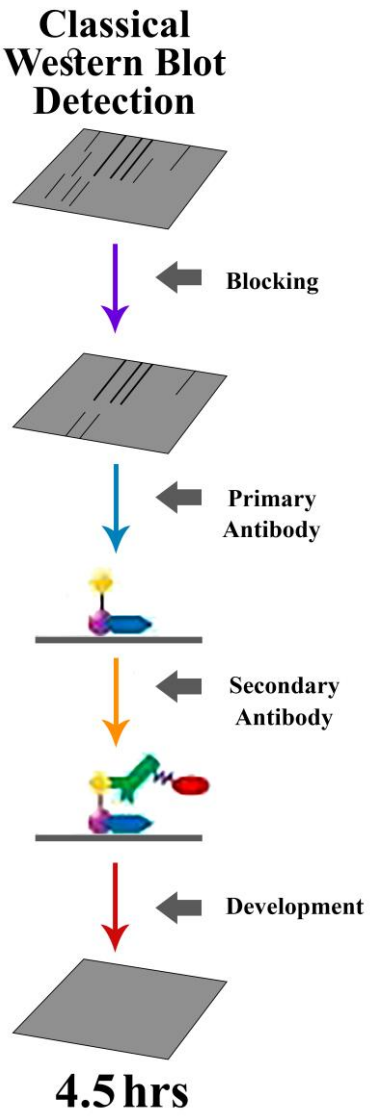
طرّاحی بر اساس وفور پروتئین موردنظر در بافت خاص در مواقعی مورد استفاده قرار می‌گیرد که پروتئین موردنظر در بافتی در مقدار بالایی تولید شود. به‌عنوان مثال اگر هدف تولید انسولین باشد، درآن‌صورت انتظار بر این است که بافت لوزالمعده که بافت تولیدکننده انسولین است دارای مقادیر بالای mRNA مربوط به پروتئین انسولین باشد. بنابراین در تهیهٔ خزانهٔ cDNA از این بافت، بیشترین همسانه‌ها مربوط به mRNA انسولین است. پس از تهیهٔ خزانه cDNA، از همسانه‌های این خزانه به‌عنوان کاوشگر به‌منظور شناخت همسانه حامل ژن انسولین استفاده می‌شود. همسانه‌ای که کاوشگر تهیه شده از آن با بیشتر همسانه‌ها دورگ شود، دارای ژن کدکنندهٔ انسولین است (لولی[1] و همکاران، ۱۹۹۰).

در گونه‌های مختلف به‌ویژه گونه‌های مربوط به یک جنس توالی ژن‌هایی که عمل یکسانی را انجام می‌دهند یکسان و یا بسیار شبیه به هم است. ازاین‌رو اگر توالی و یا کاوشگری برای یک ژن خاص نظیر ژن تولیدکننده پروتئین‌های مسئول مقاومت به تنش خشکی در گندم شناخته شده باشد می‌توان با استفاده از کاوشگر نامشابه[2] بدست آمده، ژن مشابه آن را در همسانه‌ها بدست آمده از ذرّت بررسی مورد بررسی قرار داد (میروکس[3] و همکاران، ۱۹۹۶).

روش‌های سادرن بلات و PCR، روش‌های تشخیص توالی ژن موردنظر می‌باشد و ارتباطی به محصول ژن ندارند. روش دیگری که به‌منظور انتخاب همسانه دارای ژن موردنظ استفاده می‌شود وسترن بلات[4] نامیده می‌شود. از این روش معمولاً در زمانی استفاده می‌شود که از توالی ژن موردنظر اطلاعی نداشته و فقط محصول پروتئینی آن ژن موجود باشد. با استفاده از این محصول می‌توان آنتی‌بادی آن را تهیه کرد. بقیّهٔ مراحل روش مانند سادرن بلات است با این تفاوت که به‌جای استفاده کاوشگرهای نشان‌دار، از آنتی‌بادی نشان‌دار شده استفاده می‌شود (شکل ۲-۳).

---

[1] Luli
[2] Hetrologue probe
[3] Miroux
[4] Western blot



شکل۴-۳- مراحل روش وسترن بلات. این روش مشابه روش سادرن‌بلات می‌باشد با این تفاوت که در این‌جا از آنتی‌بادی‌های نشان‌دار به‌جای کاوشگر استفاده می‌شود. وجود پروتئین موردنظر در عصاره، پس از شستسو و اتورادیوگرافی تایید خواهد شد.

اگر آنتی‌بادی مکملی در هیچکدام از همسانه‌ها نداشته باشد در مرحله شستشو از روی غشاء حذف شده و اتصال توسط اتورادیوگرافی و یا مشاهده فلورسنت تایید نمی‌شود و نشان دهنده این‌است که مکمل آنتی‌بادی در همسانه‌های مورد بررسی وجود ندارد.

۲-۲-۴- خزانه cDNA

در تهیهٔ خزانه ژنی توضیح داده شد که کلّ ژنوم یک موجود برش داده می‌شود که قطعات حاصله دارای هردوی توالی‌های ژنی و غیر ژنی (شامل جداکننده‌های ژنی، توالی‌های تکراری و ...) باشد. حتّی توالی‌های ژنی نیز دارای توالی‌های غیر ترجمه شونده‌ای نظیر اینترون‌ها و توالی‌های تنظیمی دارند. از طرفی هر قطعه از DNA مربوط به خزانه ژنی ممکن است دارای چندین ژن باشد که برای بیان موفّق، باید ژن موردنظر را از بین آن‌ها جدا کرد که این خود مستلزم صرف هزینه و وقت بیشتری است. این درحالی است که ممکن است آنزیم محدودکننده ژن موردنظر را برش داده و هر قطعه از آن در یک همسانه باشد که دراین‌صورت بیان ژن کامل میسر نخواهد بود. در خزانه cDNA[1]، همه قطعات همسانه شده یک توالی کامل از ژن بدون وجود قطعات اضافی نظیر اینترون، توالی‌های تنظیمی و ... هستند (شن[2] و همکاران، ۱۹۹۸).

به‌منظور تهیهٔ خزانه cDNA، از روش همسانه‌سازی cDNA[3] استفاده می‌شود. در این روش ابتدا کلّ mRNA بافت یا سلّول استخراج می‌شود. سپس mRNA استخراج شده وارد یک فرآیند دو مرحله‌ای می‌شود. در هر مرحله یک آنزم فعّالیت دارد. در مرحلهٔ اول یک آنزیم DNA پلی‌مراز وابسته RNA [4] موسوم به نسخه‌بردار معکوس[5] mRNA را الگو قرار داده و DNA مکمّل[6] آن را سنتز می‌کند. این آنزیم برای شروع کار به یک آغازگر نیاز دارد. آغازگر مورد استفاده توالی الیگوداکسی‌تایمیدن است. این توالی قادر است به انتهای مولکول‌های mRNA یوکاریوتی که دارای دم‌پلی‌A هستند، متّصل شود. در مرحله بعد ریبونوکلئاز H [7] mRNA و دم‌پلی‌A مربوطه را از دورگ DNA-RNA حذف می‌کند. مولکول cDNA حاصله، به‌جزء در انتهای رشته، به

---

[1] cDNA Library
[2] Shen
[3] cDNA cloning
[4] RNA- dependent DNA polymerase
[5] Reverse Transcriptase (RT)
[6] Complementary DNA (cDNA)
[7] Ribonuclease H

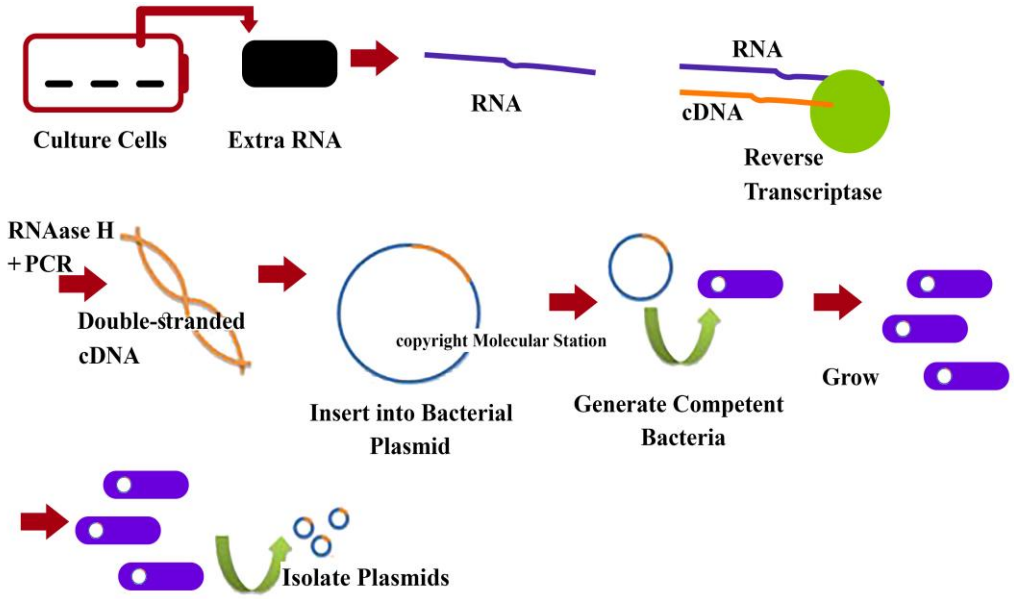
صورت تک‌رشته‌ای درمی‌آید. ویژگی نسخه‌بردار معکوس این است که انتهای سر مولکولی را که سنتز کرده است (cDNA) را به مولکول قبلی متّصل کرده و یک حلقه کوچک در انتها بوجود می‌آورد. بعد از تیمار با ریبونوکلئاز H، نسخه‌بردار معکوس می‌تواند از انتهای مولکول که هنوز دورشته‌ای است سنتز DNA را ادامه داده تا یک DNA دورشته‌ای تولید شود. سرانجام آنزیم نوکلئاز S1 [1]، که توانایی شناسایی و حذف DNA تک‌رشته‌ای را دارد سنجاق‌سر ایجاد شده در انتهای مولکول را باز می‌کند (شکل ۲-۵).

اگر هدف تهیّهٔ cDNA مربوط به ژن خاصّی مدّنظر باشد دراین‌صورت از آغازگرهای اختصاصی آن ژن (مکمّل توالی قسمتی از ژن) به‌جای آغازگر dT استفاده می‌شود. این آغازگرها فقط به mRNA کد شده توسط ژن موردنظر متّصل می‌شوند و آن را تکثیر می‌کنند. پس از تهیّه خزانه cDNA، بقیّهٔ مراحل تا انتخاب ژن موردنظر مشابه آنچه که در روش تهیّهٔ خزانه ژنومی‌بیان شد انجام می‌گیرد. به این منظور با استفاده از روش‌هایی سادرن بلات، وسترن بلات، PCR و ... همسانهٔ موردنظر از بین هزارن همسانه تهیّه شده انتخاب می‌شود.

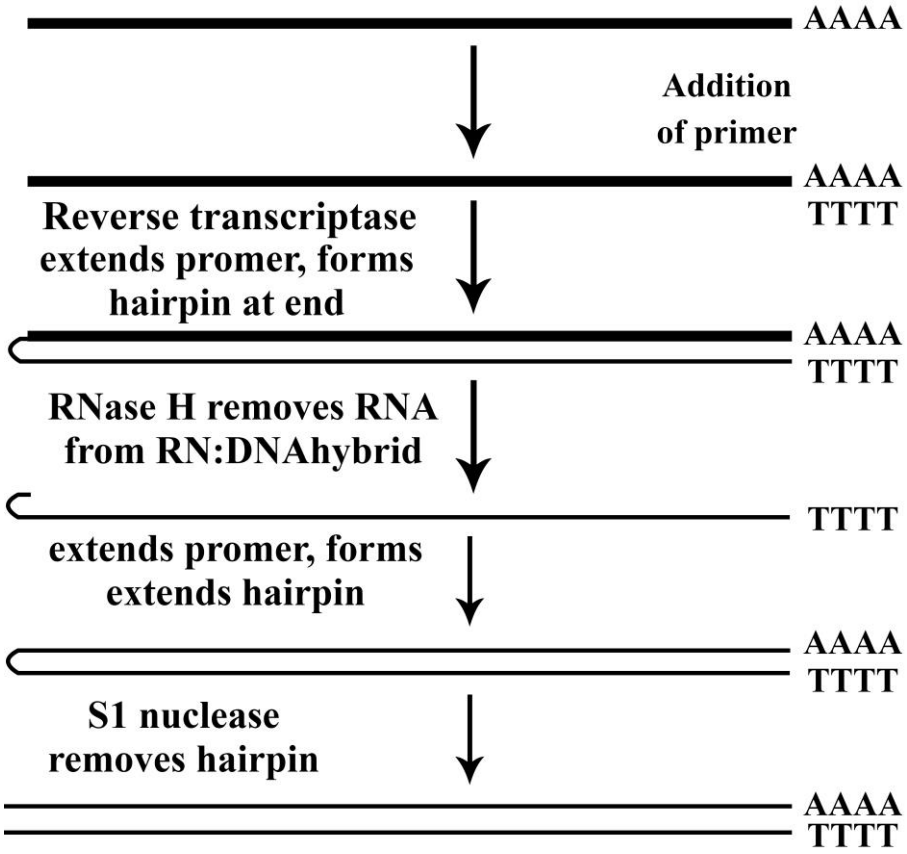
در مواقعی، محقّق از توالی قسمتی از ژن و یا از محصول پروتئینی آن اطلاعاتی در دست ندارد. دراین‌صورت استفاده از نوع خاصی از خزانه cDNA می‌تواند کمک کننده باشد. در این از تهیّهٔ خزانه cDNA به‌جای استفاده از انواع بافت و یا سلّول برای استخراج mRNA فقط از بافت‌ها و یا سلّول‌هایی استخراج انجام می‌گیرد که به‌طور تخصّصی ژن موردنظر در آن فعّال است. به‌عنوان مثال در استخراج mRNA کل از یک بافت یا غده تولید کننده هورمون رشد، انتظار بر این است که بیشترین مقدار mRNA و متعاقب آن cDNA تکثیر شده مربوط به پروتئین‌ها و یا آنزیم‌های تنظیم کننده رشد باشد (سیگیلی [2] و همکاران، ۱۹۹۷).

[1] Nuclease S1 (DNas S1)

[2] Siegele



شکل ۴-۴- تهیهٔ خزانه cDNA. برای تهیهٔ خزانه cDNA در ابتدا کل RNA از سلّول‌ها استخراج و سپس با استفاده از RT-PCR از روی mRNAها cDNAها سنتز می‌شود. بقیّهٔ مراحل مشابه روش تهیّه خزانهٔ ژنومی‌است. در این‌جا نیز قطعات cDNA تولید شده وارد ناقل‌همسانه‌سازی مناسب شده و این ناقل‌های نوترکیب در معرض باکتری‌ها قرار داده می‌شوند. ناقل‌های نوترکیب وارد باکتری‌ها شده و باکتری‌ها به‌طور جداگانه به محیط کشت مناسب رشد و تکثیر انتقال داده می‌شوند.



شکل ۴-۵- روند تولید cDNA از mRNA. در این شکل mRNA دارای دم‌پلیA در انتهای ´۳ می‌باشد. برای شروع سنتز cDNA یک توالی کوتاه نوکلئوتید T که توانایی اتّصال به دم‌پلیA متّصل می‌شود. نسخه‌بردار معکوس از این توالی کوتاه استفاده کرده و یک cDNA کامل را می‌سازد. در حین ساخت cDNA، یک حلقه کوچک در انتهای مولکول بوجود می‌آید. در مرحلهٔ بعد ریبونوکلئاز H، mRNA را از دورگ DNA-RNA حذف می‌کند. نسخه‌بردار معکوس می‌تواند انتهای مولوکول را به‌صورت آغازگر شناسایی کرده و تا ساخت DNA دورشته‌ای را ادامه دهد. در نهایت نوکلئاز H انتهای مولکول را باز می‌کند.

کاربرد اصلی تهیّهٔ خزانه cDNA، بیان DNA همسانه شدهِ یوکاریوتی به‌منظور تهیهٔ پروتئین‌های نوترکیب در میزبان‌های پروکاریوتیک است. همان‌طور که بیان شد، ژن‌های

یوکاریوتی دارای توالی‌های بدون ترجمه‌ای هستند که اینترونها[1] نام دارند. نسخه‌برداری از روی این توالی‌ها انجام پذیرفته و وارد پیش mRNA[2] می‌شوند. طی فرایندی موسوم به ویرایش[3] اینترون‌های درون پیش mRNA حذف و mRNA بالغ باقیمانده ترجمه می‌شود. لازم به ذکر است که در در شرایط زنده به‌منظور تبدیل پیش mRNA به mRNA بالغ علاوه بر ویرایش تغیراتی نظیر اضافه کردن کلاهک، دم‌پلی A و ... نیز انجام می‌پذیرد که در تولید پروتئین نوترکیب مهمترین ویژگی cDNA نداشتن اینترون است (پوسیی[4] و همکاران، ۱۹۹۲).

سیستم‌های پروکاریوتی به دلیل نداشتن اینترون در ژنوم خود، توانایی حذف آن‌ها را نداشته که عدم حذف اینترون از mRNA باعث عدم تولید پروتئین نوترکیب در شکل صحیح خود می‌شود. از آنجایی که cDNAها اینترون ندارند از این‌رو به‌گستردگی برای بیان ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند. معایب و مزایای استفاده از cDNA در بخش پنجم به‌طور مفصل توضیح داده شده است (مارکوئز[5] و همکاران، ۲۰۰۴).

عیب اصلی خزانهٔ cDNA در این است که بیان همهٔ ژن‌ها در همه سلّول‌ها و در همه زمان‌ها انجام نمی‌گیرد و سلّول موجوادت زنده، بسته به نیاز موجود زنده، ژن‌هایی فعّال (منجر به تولید mRNA) و ژن‌هایی غیرفعّال (بدون تولید mRNA) هستند. ژن‌هایی وجود دارند که در طول عمر یک موجود به ترتیب فعّال شده و مسئول تکامل موجود زنده در مراحل مختلف رشد می‌باشند. از طرفی بعضی از ژن‌ها فقط در بافت تخصّصی خود فعّال هستند نظیر ژن‌های کدکننده انسولین که فقط در بافت لوزالمعده بیان می‌شوند. در این بین شرایط محیطی نیز بر بیان ژن‌ها مؤثّر است. به‌عنوان مثال، ژن‌هایی که در مقاومت به تنش شوری و یا خشکی در یک گیاه دخالت دارند فقط در زمانی فعّال خواهند شد که گیاه در معرض این تنش‌ها قرار گیرد.

ازاین‌رو برای دستیابی به یک خزانه cDNA کامل از یک موجود لازم است که از سلّول‌ها و بافت‌های مختلف، در زمان‌های مختلف و در شرایط محیطی مختلف خزانه تهیه گردد.

---

[1] Introns
[2] PremRNA
[3] Splicing
[4] Possee
[5] Márquez

۳-۲-۴- سنتز مصنوعی DNA

در مواقعی که از توالی ژن موردنظر اطلاعات کاملی در دست باشد می‌توان به‌طور مستقیم اقدام به سنتز آن کرد. آگاهی از توالی دقیق ژن از چند طریق امکان‌پذیر است. راحت‌ترین روش استفاده از داده‌های حاصل از پروژه‌های ژنومی‌و یا توالی ژن‌هایی که قبلاً مورد مطالعه و تعیین توالی قرار گرفته‌اند، می‌باشد. روش دیگر استفاده از تعیین توالی اسیدهای آمینهٔ موجود در پروتئین و یا آنزیم کده شده توسط ژن موردنظر است. از آنجایی که هر اسیدآمینه ممکن است حتی تا شش کدون داشته باشد از این‌رو باید در طراحی توالی ژن موردنظر دقت کافی را مبذول داشت.
در اسیدهای آمینه با چندین کدون، همه کدون‌ها با نسبت برابری در همه موجودات وجود ندارد درحالی که بسته به درجهٔ تکاملی موجود زنده انواعی از کدون‌های مربوط به یک اسیدآمینه به نسبت بیشتری نسبت به کدون‌های دیگر آن اسیدآمینه در ژنوم وجود دارند. به‌عنوان مثال، در موجودات متکامل‌تر نظیر گیاهان کدون‌هایی از یک اسیدآمینه وجود دارند که درصد نوکلئوتیدهای گوانین و سیتوزین آن بیشتر است. ازاین‌رو اگر بدون تغییر کدون، این ژن برای بیان وارد یک پروکاریوت شود در هنگام بیان، به‌زودیtRNAهای CGدار مربوط به آن اسیدآمینه به‌پایان می‌رسد چراکه میزبان پروکاریوتی دارای tRNAهایی از آن اسیدآمینه است که دارای مقدار AT بیشتری هستند و مقادیرtRNAهای CGدار در آن‌ها کم است و به‌اصطلاح این کدون‌های CGدار، کدون نادر[1] نامیده می‌شوند. بنابراین در ترجمهٔ توالی اسیدهای آمینه باید به میزبان بیان نیز توجه شود و کدون‌های مناسب بیان در آن میزبان انتخاب گردد (چن[2] و همکاران، ۲۰۰۴).

علاوه بر بحث مربوط به سنتز مصنوعی DNA، توجه به کدون‌های متعدّد یک اسیدآمینه در روش‌های دیگر انتقال و بیان ژن‌های یوکاریوتی در میزبان‌های پروکاریوتی و بالعکس باید مدّنظر قرار گرفته شود.

[1] Rare codon
[2] Chen

۳-٤- سیستم‌های بیان در اشرشیا کولی

در این بخش نحوه عمل دو ناقل بیان مهم در اشرشیا کولی که برپایه ناقل‌های پلاسمیدی و ویروسی هستند شرح داده می‌شود.

۱-۳-۴- استفاده از ناقل‌های پلاسمیدی

یک ناقل مهم پلاسمیدی که استفاده ازآن دربیان ژن کاربرد گسترده‌ای دارد، پلاسمید pMAL™-p2 است (شکل ۲-۶). این ناقل بر پایه پلاسمید ColE1 اشرشیا کولی امروزه به‌صورت تجاری تولید شده و در دسترس محقّقان می‌باشد. عملکرد همانندسازی این پلاسمید مربوط به دو خاستگاه همانندسازی آن است که از پلاسمید PBR322 (دارای منشاء ژنی از پلاسمید ColE1) و ویروس M13 (سمت چپ، پایین شکل ۲-۶) گرفته شده است. ازاین‌رو بر اساس خاستگاه شروع همانندسازی ColE1، اگر آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به محیط کشت اضافه شود تعداد پلاسمید در سلّول بالا می‌رود و از طرفی اگر از پلاسمید دوم مناسبی استفاده شود که خاستگاه همانندسازی مربوط M13 را تحریک کند، DNA تک‌رشته‌ای حاصل خواهد شد. نشانگر انتخابی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین[1] که آنزیم بتا- لاکتاماز را کد می‌کند نیز در ناقل قرار داده شده است. ژن Ap^R نیز مانند خاستگاه همانندسازی، از پلاسمید PBR322 (با منشاء ژنی از پلاسمید R1) وارد شده است.

وجود پلاسمید در میزبان را می‌توان به‌وسیلهٔ نشانگر مقاومت به آمپی‌سیلین یا پروتئین مکمّل[2] مربوط به *LacZ* هم‌جوش شده به پروتئین کدشده توسط ژن *MalE* که هردوی این‌ها در این پلاسمید قرار داده شده‌اند، مشخص کرد. ژن *MalE* پروتئین متّصل شونده به مالتوز[3] را کد می‌کند. بیان این پروتئین هم‌جوش[4] به راه‌انداز *tac*، که به‌وسیله $lacI^q$ (جهش‌یافته با تولید بالای بازدارنده) تنظیم می‌شود، وابسته است. تعداد مکان‌های برشی زیادی در ناقل تعبیه شده است ولی عموماً ورود DNA به‌منظور بیان و یا همسانه‌سازی در اتّصال‌دهنده‌چندتایی[5] که در شکل ۲-۶ به‌صورت برجسته نشان داده شده است انجام می‌گیرد. اگرچه ناقل پلاسمیدی pMAL™-p2 به تنهایی توان هم‌یوغی[6] را ندارد ولی در کنار پلاسمید F قابلیّت انتقال را پیدا می‌کند.

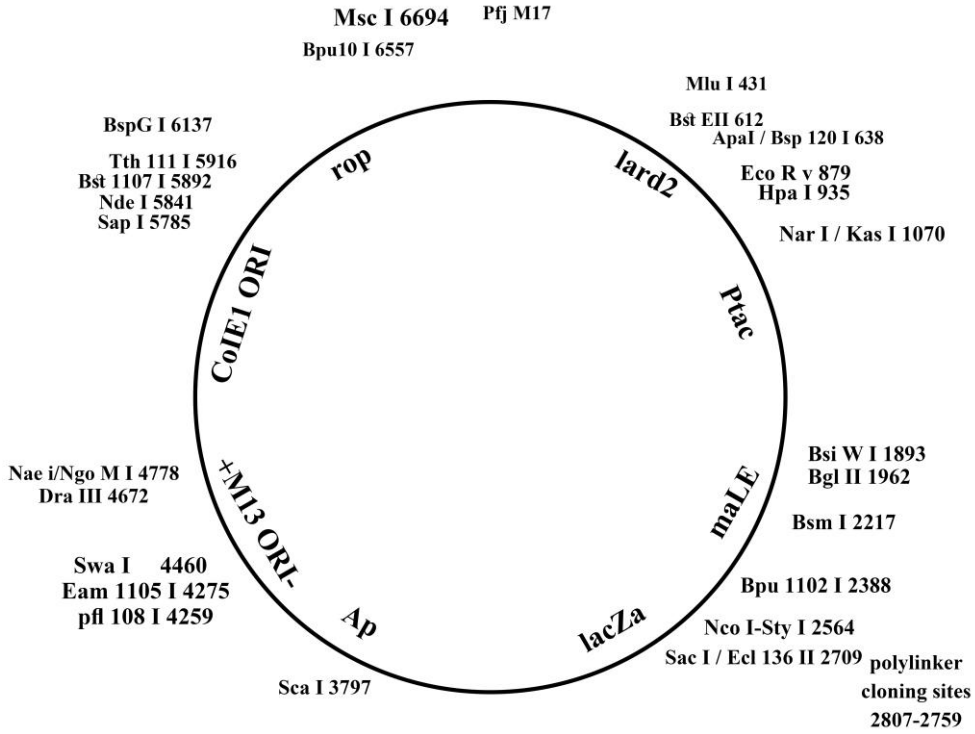
---

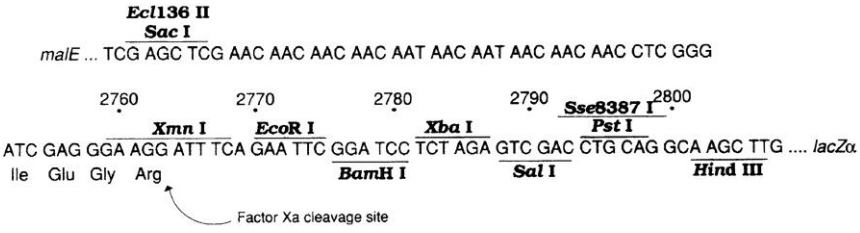
[1] Ap^R
[2] α- complementation
[3] Maltose binding protein (MBP)
[4] Fusion protein یا chimeric protein
[5] Polylinker
[6] Conjugation

اگرچه از این پلاسمید به‌منظور بیان ژنِ همسانه شده و خالص‌سازی آن استفاده می‌شود ولی ورود ژن همسانه‌شده در مکان برشی *Xmn*I تولید پروتئین هم‌جوش با MalE را خواهد کرد. پایان‌دهندهٔ مربوط به ژن وارد شده از سنتز قطعه ژنی *lac* جلوگیری به‌عمل می‌آورد. ازاین‌رو، همسانه‌های 5-bromo-4-chloro-3-inolyl β-D-galactopranoside سلّولی که فقط ناقل غیرنوترکیب را حمل می‌کنند توانایی تولید مقداری بتا- گالاکتوزیداز داشته و در حضور ترکیب ۵-برمو۴-کلرو۳-ایندول بتا-دی-گالاکتوپرانوزاید[1] بی رنگ، در حالی که سلّول‌هایی که ناقل نوترکیب را حمل می‌کنند قابلیّت تولید بتا- گالاکتوزیداز را از دست داده و در حضور x-gal خاکستری خواهند شد (کیتس[2] و همکاران، ۱۹۹۳).

[1] 5-bromo-4-chloro-3-inolyl β-D-galactopranoside (x- gal)

[2] Kitts


Msc I 6694
Pfj M17
Bpu10 I 6557
Mlu I 431
Bst EII 612
ApaI / Bsp 120 I 638
Eco R v 879
Hpa I 935
Nar I / Kas I 1070
BspG I 6137
Tth 111 I 5916
Bst 1107 I 5892
Nde I 5841
Sap I 5785
rop
lard2
Ptac
CoIE1 ORI
+M13 ORI-
malE
Bsi W I 1893
Bgl II 1962
Bsm I 2217
Nae i/Ngo M I 4778
Dra III 4672
Swa I 4460
Eam 1105 I 4275
pfl 108 I 4259
Ap
lacZa
Bpu 1102 I 2388
Nco I-Sty I 2564
Sac I / Ecl 136 II 2709
polylinker
cloning sites
2807-2759
Sca I 3797


Ecl136 II
Sac I
malE ... TCG AGC TCG AAC AAC AAC AAC AAT AAC AAT AAC AAC AAC CTC GGG
2760
2770
2780
2790
Sse8387 I
2800
Xmn I
EcoR I
Xba I
Pst I
ATC GAG GGA AGG ATT TCA GAA TTC GGA TCC TCT AGA GTC GAC CTG CAG GCA AGC TTG .... lacZα
Ile Glu Gly Arg
BamH I
Sal I
Hind III
Factor Xa cleavage site

شکل ۴-۶- ناقل همسانه‌سازی و بیان pMAL™-p2. این ناقل اشرشیا کولی توانایی بیان پروتئین مربوط به ژن موردنظر وارد شده و اتصال به‌صورت هم‌جوش به پروتئین متّصل‌شونده به مالتوز (MBP) را دارد. مزیّت MBP در کمک به خالص‌سازیِ پروتئین موردنظر است. ناقل دارای راه‌انداز القاءپذیر tac است. از طرفی ژن $lacI^q$ که بازدارندهٔ lac، کدکننده پروتئینی که مانع از عمل راه‌انداز tac می‌شود، در آن تعبیه شده است. این بازدارندگی تا زمانی که IPTG وارد محیط کشت نشده باشد ادامه دارد. توالی اتّصال‌دهنده‌چندتایی به‌منظور ورود ژن موردنظر درکنار ژن کدکننده MBP در این ناقل وجود دارد که در زیر شکل بزرگ‌نمایی شده است. ژن مقاومت به آمپی‌سیلین (AP) و یک خاستگاه همانندسازی از پلاسمید PBR322 نیز وجود دارد.

راه‌انداز *tac*، راه‌انداز قوی به‌شمار می‌آید و در حضور IPTG در محیط کشت تا ۳۰ درصدِ پروتئین سلّولی، تولید پروتئین هم‌جوش با MalE را افزایش می‌دهد. قبل از اضافه کردن القاءکننده به محیط کشت باید از سلول در مقابل هرگونه خسارت ناشی از پروتئین محافظت شوند، در غیر این‌صورت پروتئین نوترکیب تولید نخواهد شد.

برای خالص‌سازی پروتئین همسانه شده در ابتدا جداسازی پروتئین هم‌جوش با استفاده از روش‌هایی نظیر کروماتوگرافی که دارای ترکیب‌هایی که دارای توانایی اتّصال به MalE هستند، انجام می‌شود. ترکیب‌هایی نظیر مالتوز به‌خوبی از عهدهٔ این کار برمی‌آیند. یک ناحیه مربوط به پروتئاز Xa به مکان برشی *Xmn I* اضافه شده‌است. تیمار پروتئین هم‌جوشِ بیان شده با Xa باعث آزاد شدن پروتئین همسانه شده خالص از MalE می‌شود. پروتئاز Xa، نوعی پروتئاز مربوط به سازوکار انعقاد خون است که توانایی شناسایی توالی اسیدآمینه‌ای Arg- Gly- (Glu یا Asp)- Ile را داشته این توالی را از محل Arg قطع می‌کند. تحقیقات نشان داده است که یکی از دلایل حذف پروتئین‌هایی در اشرشیا کولی که به‌خوبی تا نشده‌اند، به‌دلیل وجود پروتئاز Xa است. تا خوردگی صحیح پروتئین توالی موردشناسایی آنزیم را از دسترس آن خارج می‌کند.

۲-۳-۴- استفاده از ناقل‌های ویروسی

امروزه، به‌منظور بیان بالای ژن‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی موردنظر توجه زیادی به فاژهایی نظیر فاژ T7، T3 و SP6 شده است که توانایی کدکردن RNA پلی‌مراز خود را نیز دارند. در هر کدام از این فاژها، RNA پلی‌مراز توانایی اتّصال و نسخه‌برداری از ژن‌های با راه‌انداز ویروسی را داشته و قادر به شناخت راه‌انداز فاژهای دیگر و حتی باکتری میزبان خود نیستند. تفاوت‌های قابل

تشخیص راه‌اندازها که توسّط RNA پلی‌مراز فاژها آن را قابل تشخیص می‌کند در باز ۱۱- مربوط به راه‌انداز وجود دارد (بنیکس[1] و همکاران، ۱۹۹۹).

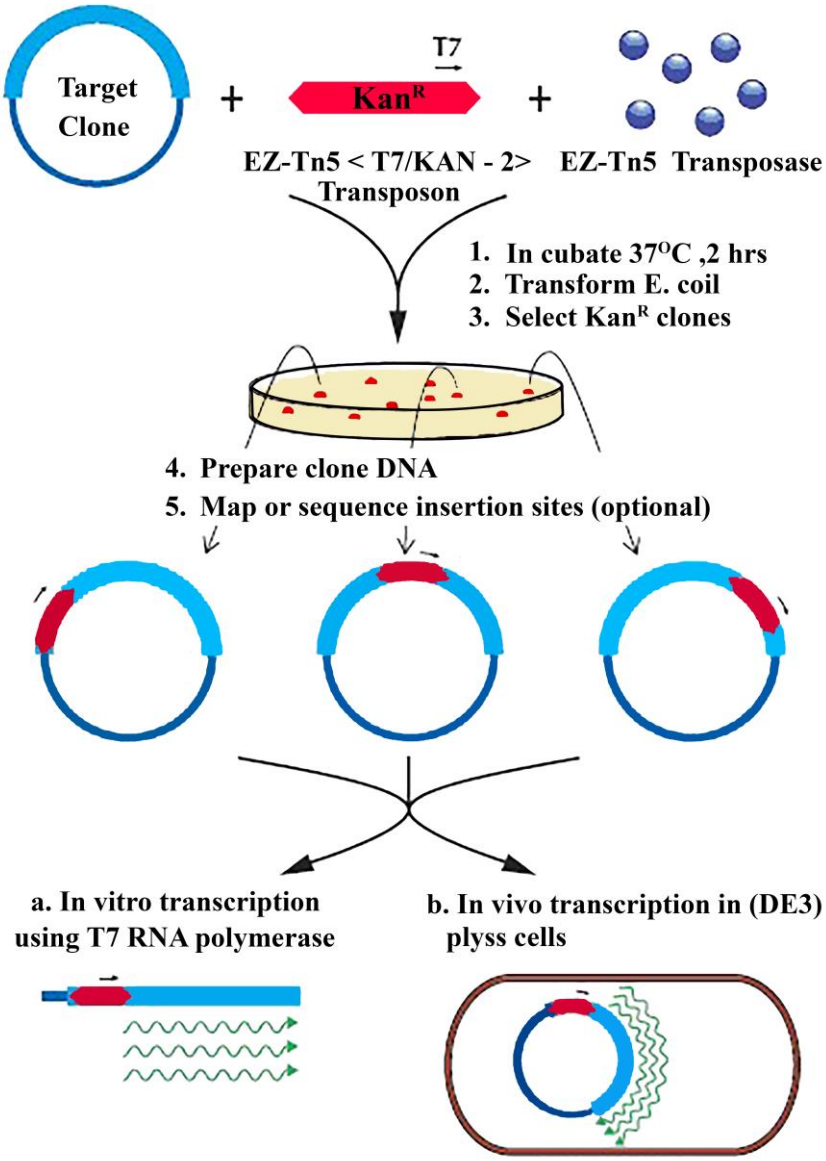
یکی از کاربردهای این مزیّت فاژها، استفاده از توالی‌های خاصی از آن‌ها در پلاسمید PBR322 در اشرشیا کولی است (شکل ۴-۷). به‌عنوان مثال، ژن RNA پلی‌مراز T7 به PBR322 انتقال و تحت کنترل راه‌انداز ویروسی λP_L قرار گرفت. بازدارندهٔ cI تا موقعی که پروتئین بازدارنده غیرفعّال شود، از نسخه‌برداری جلوگیری به‌عمل می‌آورد. در صورت عدم فعّالیت بازدارنده، RNA پلی‌مراز ویروسی سنتز شده و با سنتز این آنزیم، ژن‌های همسانه‌شده در پایین‌دست راه‌انداز T7 بیان می‌شوند.

در مواقعی که مشخص نیست کدام رشته از DNA ورودی کدکننده پروتئین موردنظر است و نسخه‌برداری از آن انجام شود، استفاده از یک ناقل ترکیبی T7/SP6 می‌تواند کمک کننده باشد. در این حالت، محل ورود ژن موردنظر در داخل راه‌اندازهای در کنارهم قرارگرفته، تعبیع شده به‌صورتی که راه‌انداز T7 و راه‌انداز SP6 در طرف دیگر قرار گرفته است. ازاین‌رو نسخه‌برداری از رشته دیگر با وارد کردن RNA پلی‌مراز مربوط به فاژ دیگر به سیستم، تحت کنترل درمی‌آید.

همان‌طور که بیان شد در اشرشیا کولی نژادهای مختلفی وجود دارد که هرکدام برای میزبانیِ ناقل بیان خاصی تهیه شده‌اند. در واقع این مورد یکی از ویژگی‌های مهم اشرشیا کولی است. هرکدام از این نژادها دارای ویژگی منحصربه‌فردی هستند که آن‌ها را برای ناقل بیان مخصوص خود مناسب کرده است. معمولاً از نژاد BL21 یا DE3 برای بیان ژن با استفاده از ناقل‌های بیان فاژی استفاده می‌شود. از طرف دیگر RNAپلی‌مراز T7 به وسیله فاژ لیزوژنیک λ در BL21 تولید می‌شود که بیان آن تحت کنترل راه‌انداز *UV5* قرار دارد که با IPTG القاء می‌شود.

در استفاده از این نژادها به معایب آن‌ها نیز باید توجّه شد. به‌عنوان مثال در استفاده BL21 در بیان ژن، اگرچه تاکنون صدها پروتئین با موفقیّت در آن بیان شده است، بااین‌حال اغلب بیان بالای پروتئین در این نژاد باعث مسمومیّت باکتری و در نهایت منجر به مرگ سلّول می شود.

[1] Baneyx


Target
Clone
T7
Kan^R
EZ-Tn5 < T7/KAN - 2>
Transposon
EZ-Tn5 Transposase
1. In cubate 37°C ,2 hrs
2. Transform E. coil
3. Select Kan^R clones
4. Prepare clone DNA
5. Map or sequence insertion sites (optional)
a. In vitro transcription
using T7 RNA polymerase
b. In vivo transcription in (DE3)
plyss cells

شکل ۴-۷- شمای تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از باکتریوفاژ T7. a) تولید RNA بوسیله T7 RNA پلی‌مراز و b) تولید RNA در سیستم‌های همسانه‌سازی باکتریایی (برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه شود)

٤-٤- افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب در اشرشیا کولی

به‌منظور اطمینان از حداکثر تولید پروتئین نوترکیب علاوه بر استفاده از راه‌انداز قوی (که در فصل اول مورد بررسی قرار گرفت)، استفاده از سازوکارهایی نظیر بکارگیری ناقل‌های با تعداد نسخهٔ بالا[1]، القاءکننده مناسب، توالی‌های افزاینده بیان، ترشّح پروتئین تولیدی به بیرون از سلّول ضروری است (آرچگا[2] و همکاران، ۲۰۰۰).

۱-۴-۴- ناقل‌های با تعداد نسخهٔ بالا

یکی از راه‌کارهای دست‌یابی به مقادیر بالای بیان ژن موردنظر، استفاده از ناقل‌هایی است که در شکل باز[3] وجود دارند. منظور از باز این است به‌راحتی تکثیر شده و در تعداد بالایی در هر سلّول وجود داشته باشند بدون این‌که سلّول به این تعداد بالا واکنش منفی نشان دهد. منظور از واکنش منفی، کاهش رشد و یا حتی مرگ سلّول است. پلاسمیدهای مشتق از ColE1 که در تعداد ۶۰-۱۵ کپی و یا پلاسمیدهای با منشاء pUC که در کمتر از ۱۰۰ نسخه در سلّول وجود دارند نمونه‌ای از پلاسمیدهای باز هستند. این تعداد از پلاسمیدها آن‌چنان بالا نیست که در کار سلّول اختلال ایجاد کند. اگر تعداد نسخه از یک ناقل بیان در سلّول دوبرابر ناقل بیان دیگری باشد انتظار بر این است، درصورت یکسان بودن بودن شرایط دیگر بیان، بیان آن نیز دوبرابر باشد.

همان‌طور که گفته شد عیب اصلی ناقل‌های با تعداد بالا این است که ممکن است توان سلّول را به‌دلیل استفاده از انرژی و مواد متابولیکی در فرآیندهای همانندسازی و نسخه‌برداری کاهش دهد، به‌ویژه در مواردی که راه‌انداز آن بیان دائمی ژن موردنظر را فرآهم کند. اگر راه‌اندازهای ناقل با نسخه بالا با پروتئین‌های سدکننده مؤثّر متوقّف شوند، دراین‌صورت می‌توان با یک القاءکنندهٔ قوی در موقع مناسب که معمولاً با اواخر سن کشت سلولی هم‌زمان است آن‌را فعّال

[1] High copy number
[2] Arechaga
[3] Open

کرد. فعّالیّت راه‌انداز در این موقع که دارای حداکثر تراکم سلّولی نیز می‌باشد حداکثر تولید پروتئین نوترکیب را به‌همراه خواهد داشت.

ذکر این نکته ضروری است که تعداد ناقل بیان و تعداد ناقل حامل ژن کدکننده پروتئین بازدارنده در سلّول باید هم‌خوانی داشته باشند. ژن کدکننده بازدارنده می‌توان روی همان ناقل بیان حامل ژن موردنظر، روی ناقل دیگری در همان سلّول و یا بر روی کروموزم باکتری قرار گرفته باشد. اگر تعداد ناقل حامل ژن بازدارنده کمتر از تعداد ناقل بیان ژن موردنظر باشد، پروتئین‌های بازدارندهٔ کافی برای جلوگیری از کار راه‌انداز در نبود القاءکننده وجود نخواهد داشت. این مورد به‌ویژه در استفاده از ناقل بیان با نسخهٔ بالا به‌عنوان حامل ژن موردنظر و کروموزم باکتری به‌عنوان حامل ژن کدکننده بازدارنده دیده می‌شود. در مواردی که تعداد ناقل حامل ژن بازدارنده بیشتر از تعداد ناقل بیان ژن موردنظر باشد، به‌دلیل تولید بالای پروتئین بازدارنده در سلّول القاءکننده بیشتری برای راه‌اندازی بیان ژن موردنظر موردنیاز است که علاوه بر این که هزینه‌ها را بالا خواهد برد، غلظت بالای القاکننده ممکن است بر سوخت‌وساز و رشد سلّول تأثیر منفی گذاشته و در نهایت خالص‌سازی محصول نهایی را با مشکل مواجه کند. اگر خالص‌سازی برای حذف مواد زائدی نظیر القاکننده به‌خوبی انجام نگیرد ممکن است این مواد در دریافت‌کننده محصول ایجاد مسمومیّت نماید (ماجر[1] و همکاران، ۱۹۹۸).

۲-۴-۴- القا کنندهٔ مناسب

معمولاً تولید پروتئین‌های نوترکیب در اشرشیا کولی به یک ارتباط قوی بین رشد سلّول و تولید پروتئین نوترکیب نیاز دارد. تولید در شرایطی که رشد سلّول کم است، به طورمعنی‌داری کاهش می‌یابد. این مشکل به‌ویژه در شرایط رشدی خاص نظیر رشد در فرمانتور جدّی می‌شود. ازطرفی تحقیقات نشان داده است که حتی مقدار ریبوزوم فعال نیز در شرایط رشدی کم و زیاد متفاوت است. القاکننده می‌تواند این مشکل را حل کند (گیناکوپولوس[2] و همکاران، ۱۹۹۷).

---

[1] Mager

[2] Geanacopoulos

القاکننده[1] ماده‌ای است که معمولاً از طریق اتّصال به بازدارنده آن را غیرفعّال کرده و ازاین‌طریق آنزیم‌های نسخه‌برداری می‌توانند به راه‌انداز متّصل و بیان ژن را انجام دهند. روش بیان القاءپذیر برای تولید پروتئین نوترکیب کاربرد گسترده‌ای دارد، زیرا امکان افزایش سریع تعداد سلول میزبان تولیدکننده را می‌دهد، بدون این‌که فشار انتخابیِ منفی ناشی از بیان زیاد پروتئین‌های خارجی آن را متأثّر کند. چراکه بیان بیش از اندازه یک نوع پروتئین باعث کاهش و یا عدم تولید پروتئین دیگر می‌شود و متعاقب آن تولید سریع مقدار زیادی پروتئین در گستره زمانی بین۰/۵تا ۲ ساعت بعد از القا توسط مادّهٔ القاء کننده اتفاق می‌افتد (پیگوت[2] و همکاران، ۱۹۸۵).

۳-۴-۴- توالی‌های افزایندهٔ بیان

توالی افزایندهٔ بیان[3] یک توالی در فاصله‌ای نسبتاً زیاد از پایین دست و یا بالادست یک ژن است که می‌تواند بر بیان ژن اثر گذارد. در واقع این توالی‌ها، نوعی توالی تنظیمی بر روی ژنوم پروکاریوتی و یوکاریوتی می‌باشند که با اتّصال پروتئین‌های متّصل شونده به توالی افزایندهٔ بیان[4]، راه‌انداز در بیان حداکثری ژن مربوط به خود عمل خواهد کرد (شکل ۴-۸). توالی افزایندهٔ بیان با توالی دیگری به‌نام عایق کننده[5] برای تنظیم بیان ژن در برهم‌کنش است. عایق کننده دارای دونقش متمایز در بیان ژن هستند. نقش اصلی آن‌ها یک توالی سدکننده برای هردوی راه‌انداز و توالی افزایندهٔ بیان می‌باشد که این باعث کاهش بیان ژن و از طرفی از فشردگی هتروکروماتین‌ها می‌کاهد که این باعث افزایش بیان ژن می‌شود.

۴-۴-۴- ترشّح پروتئین تولیدی به بیرون از سلّول

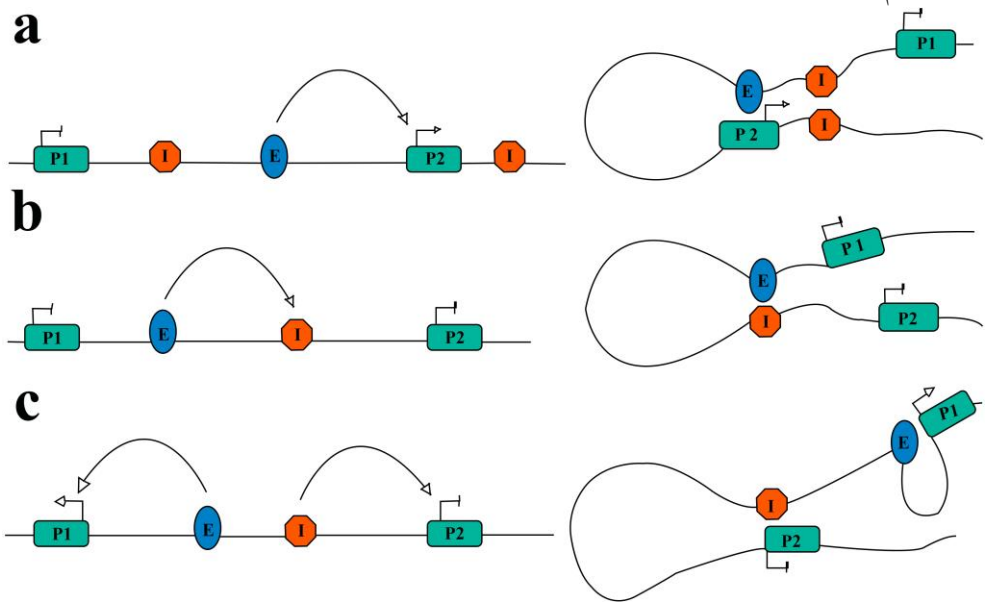
یکی دیگر از راه‌کارهای افزایش تولید پروتئین نوترکیب در اشرشیا کولی مربوط به سازوکارهای افزایش ترشّح پروتئین است. ترشّح پروتئین به بیرون و عدم انباشتگی آن باعث تولید مداوم بدون ایجاد اختلال در کار سلّول می‌شود. از طرفی، پایداری پروتئین حاصل از ژن همسانه‌شده در اشرشیا کولی اغلب به جایگاه آن در سلّول بستگی دارد. برای مثال، پروانسولین نوترکیب اگر به جای باقی ماندن در سیتوپلاسم به پری‌پلاسم، فضای بین غشای سیتوپلاسم و

---

[1] Inducer
[2] Piggott
[3] Enhancer sequence
[4] Enhancer-binding proteins
[5] Insulator

غشای خارجی، ترشّح شود ثبات آن ده مرتبه بیشتر خواهد شد. به علاوه خالص‌سازی پروتئین‌ها در صورتی که در پری‌پلاسم یا محیط کشت ترشّح شوند، آسان تر خواهد بود.

معمولاً یک توالی اسیدآمینه به‌نام توالی نشانه یا راهنما در پایانه N زنجیره وجود دارد که عبور آن از غشای سلّولی و ورود به پری‌پلاسم را ممکن می‌سازد. موضوع قابل تأمّل این است که باکتری‌هایی نظیر اشرشیا کولی به دلیل گرم‌منفی بودن دارای غشای خارجی بوده و این غشاء باعث می‌شود قادر به ترشّح پروتئین نباشند. برای حل این مشکل دو راه وجود دارد. اول این که از باکتری‌های گرم‌مثبت استفاده شود که قابلیّت ترشح را داشته باشند. طریقهٔ دیگر این است که با دست‌ورزی ژنتیکی باکتری‌های گرم‌منفی، آن‌ها را قادر به ترشّح پروتئین کنیم. برای دستیابی به هدف دوم معمولاً از دو سازوکار استفاده می‌شود.



شکل۴-۸- نحوهٔ عمل توالی‌های افزایندهٔ بیان و نحوهٔ برهم‌کنش آن با عناصر تنظیمی دیگر. a) دو توالی عایق کننده (I) به یکدیگر متّصل شده و باعث می‌شوند یک ساختار کمند مانندی تشکیل شود. ساختار کمند عامل نزدیکی توالی افزایندهٔ بیان (E) به راه‌انداز ژن دوم (P2) است که این نزدیکی افزایش بیان ژن دوم را درپی خواهد داشت، b) عملکرد عایق کننده باعث می‌شود توالی افزایندهٔ بیان از راه‌انداز جدا شده و در نتیجه بیان ژن خاموش می‌شود و c) توالی عایق کننده ممکن است مستقیماً برروی راه‌انداز تأثیر گذاشته و توالی افزایندهٔ بیانی که هم‌اکنون آزاد است می‌تواند برروی ژن دیگری اثرگذاشته و آن‌را فعّال کند.

اولین سازوکار استفاده از پروتئین هم‌جوش است (مراجعه شود به فصل ششم). برای این منظور یک توالی کدکنندهِ توالی نشانه به ژن موردنظر متّصل می‌شود. در هر مرحله از ترشّح، یک توالی از توالی بزرگ‌تر (راهنما) به‌عنوان توالی راهنما برداشته و این کار تا ترشّح کامل پروتئین تولیدی ادامه دارد. در مواقعی توالی نشانه باعث عبور پروتئین از فضای پری‌پلاسم به بیرون می‌شود.

اگر استفاده از توالی راهنما ممکن نبود و یا این عمل تأثیری بر ترشّح پروتئین نداشت می‌توان از روش دیگری نیز استفاده کرد که در تولید پروتئین اینترکولین-۲ موفقیت‌آمیز بود. در این روش ژن اینترکولین-۲ در فرودست ژن پیش‌ساز پروتئین MBP (مراجعه شود به استفاده از ناقل‌های پلاسمیدی در همین فصل) قرار داده شد. در بین این دو ژن جایگاه شناسایی فاکتور Xa قرار گرفت. وقتی پلاسمید ناقل این مجموعه ژنی وارد اشرشیاکولی شد، مشخص گردید که درصد قابل توجّهی از پروتئین‌های هم‌جوش در پری‌پلاسم تجمّع یافته‌اند. در مرحلهٔ آخر تیمار با Xa، توالی متّصل کننده دو قطعهٔ پروتئین اینترکولین-۲ و پیش‌ساز MBP را شناسایی و برش می‌دهد تا درنهایت اینترکولین-۲ کامل و خالص بدست آید (اتچگاراری[1] و همکاران، ۱۹۹۹).

در پایان، سازوکارهای مناسب دیگری که برای افزایش بیان مورد استفاده قرار می‌گیرند، بررسی می‌شوند:

۵-٤-٤- تغییر توالی شاین‌دلگارنو

مشکل دیگر در رابطه با پروکاریوت‌ها به توالی شاین‌دالگارنو برمی‌گردد. همان‌طورکه در فصل اول بحث شد آغاز ترجمه mRNA در *اشرشیا کولی* به یک توالی مورد توافق به‌نام توالی شاین- دالگارنو (۵'-UAAGGAGG-۳') نیاز دارد که مکمّل انتهای ۳' ۱۶s rRNA است. این

[1] Etchegaray

توالی با کدون آغازین که معمولاً AUG است، ادامه می‌یابد. با این‌حال در حدود ۸ درصد ژن‌ها کدون آغازین GUG و در موارد نادری، معمولاً در ژن‌های خودتنظیم[1]، کدون‌های آغازین UUG و AUU یافت می‌شود.

فاصلهٔ مناسب بین توالی شاین-دلگارنو و کدون آغازین هشت نوکلئوتید است که اگر این فاصله به کمتر از چهار نوکلئوتید کاهش و یا به بیش از ۱۴ نوکلئوتید افزایش یابد شدیدا بر آغاز ترجمه تأثیر خواهد گذاشت. بنابراین در ناحیه ورود ژن موردنظر باید دقت کافی را مبذول داشت تا علاوه براین‌که چارچوب خواند تغییر نکند، با تنظیم فاصله توالی شاین-دلگارنو و نقطهٔ شروع ترجمه حداکثر بیان ژنی حاصل شود.

ازطرفی ساختار ثانویه توالی از mRNA که توالی شاین-دلگارنو و کدون آغاز را دربرگرفته، می‌تواند از طریق تداخل با ناحیه اتّصال ریبوزوم باعث کاهش بیان خواهد شد. البته این مشکل از طریق افزایش در هم‌خوانی نواحی شاین-دلگارنو با توالی مورد توافق و افزایش تعداد آدنین در ناحیه آغازین توسط جهش‌زایی مستقیم حل خواهد شد.

٦-٤-٤- اضافه کردن جعبهٔ پایین‌دستی

جعبهٔ پایین دستی[2] که بعد از کدون آغاز قرار گرفته و بر آغاز ترجمه تأثیرگذار است، مکمّل بازهای ۱۴۶۹ تا ۱۴۸۳ مربوط به ۱۶SrRNA می‌باشد. جعبه DB یک توالی مورد توافق ۵'AUGAAUCACAAAGUG۳' دارد و شواهد نشان می‌دهد که نقش مهمی‌را به‌عنوان افزایندهٔ ترجمه بازی می‌کند. اگرچه ورود یک توالی DB مورد توافق در انتهای ۵' ژن کدکننده پروتیئن نوترکیب می‌تواند باعث تغییر توالی آن شود ولی افزایش شباهت این ناحیه به DB با جاگذاری کدون‌های دیگر باعث بهتر شدن آغاز ترجمه برای نسخه‌های خاصی از mRNA شده است (مینچ[3] و همکاران، ۲۰۰۱).

[1] Autogenously regulated genes
[2] Downstream box (DB)
[3] Minh

فصل پنجم

تهیّهٔ پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های یوکاریوتیک تک سلّولی

۱-۵- مخمّرها و قارچ‌ها

برخی محدودیت‌ها در زمینهٔ تولید پروتئین‌های نوترکیب در پروکاریوت‌ها، محقّقان را به استفاده از موجودات زنده دیگر برای تهیهٔ پروتئین نوترکیب سوق داده‌است. با این‌که از سیستم‌های بیان پروکاریوتی برای تولید پروتئین‌های یوکاریوتیک استفاده می‌شود، با این حال در برخی موارد پروتئین‌های تولیدی ثبات و فعالیّت بیولوژیکی لازم را ندارند. بسته به محصول نهایی، به‌ویژه برای پروتئین‌های با مصارف داروئی، بسیار مهم است که پروتئین تولیدی در ویژگی‌های بیوشیمیایی، بیوفیزیکی و عملکرد خود کاملاً شبیه پروتئین طبیعی باشد. همان‌طور که در بخش‌های بعدی توضیح داده می‌شود دلیل اصلی عدم امکان تولید پروتئین‌ها در سیستم‌های پروکاریوتی، دقیقاً مشابه آن چیزی که یوکاریوت‌ها تولید می‌شود، فقدان سازوکارهای مناسب برای پردازش‌های پس‌از ترجمه می‌باشد (آرچر[1] و همکاران، ۲۰۰۱).

با این که دست ورزیِ اشرشیاکولی نسبت به سلّول‌های یوکاریوتی بسیار راحت‌تر بوده و تولید پروتئین در آن در مقادیر بالا انجام می‌شود، با این‌حال تولید پروتئین‌های یوکاریوتی که

[1] Archer

فعالیّت‌شان به شدت به تغییرات بعداز ترجمه آن‌ها وابسته است فقط با استفاده از سیستم‌های بیان یوکاریوتیک امکان‌پذیر است. از طرفی تولید پروتئین نوترکیب در سلّول‌های پستان‌داران نیز به دلیل پرهزینه بودن و همچنین بازده پایین آن مقرون به صرفه نمی‌باشد (اسپیتزفادن[1] و همکاران، ۲۰۰۰).

مخمّرهایی نظیر ساکارومایسس سروویزیه[2]، ساکارومایسس پومب[3]، *پیچیا پاستوریس*[4] و *پیچیا متالونیکا*[5] به عنوان سلّول‌های یوکاریوت ساده در تولید پروتئین نوترکیب می‌تواند استفاده شوند. این مخمّرها گلیکوزیلاسیون را در همان مسیرهای بیوشیمیایی که در پستان‌داران صورت می‌گیرد، انجام نمی‌دهند. به‌عنوان مثال ساکارومایسس سروویزیه با تشکیل یک ساختار مانوزی بزرگ، پروتئین‌های تولیدی را در شکل صحیح خود گلیکوزیله و تا می‌زند تا پروتئین با عملکرد صحیح ایجاد گردد (سیکورسکی[6]، ۱۹۹۸).

۲-۵- تهیّهٔ پروتئین‌های نوترکیب به‌وسیلهٔ سلّول‌های مخمّر

ناقل‌های زیادی مثل پلاسمید ۲میکرومتری، پلاسمیدهای اپی‌زومال مخمّر[7]، پلاسمیدهای الحاق‌شونده مخمّر[8]، پلاسمیدهای همانندساز مخمّر[9] و کروموزوم ساختگی مخمّر در مخمّر ساخته شده‌اند که در تولید پروتئین‌های نوترکیب در مخمّرها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در مخمّر از ناقل‌هایی استفاده می‌شود که دارای حالت اپیزومی، تعداد نسخهٔ زیاد در سلّول و دارای راه‌انداز قوی باشند. اپی‌زومال بودن پلاسمید امکان ورود آن به کروموزوم مخمّر و حفاظت دائمی از آن را می‌دهد. پلاسمید طبیعی مخمّر یا پلاسمید ۲ میکرومتری پرکاربردترین پلاسمید در مخمّر است.

---

1 Spitzfaden
2 Saccharomyces cerevisiae
3 Schizosaccharomyces pombe
4 Pichia pastoris
5 Pichia methanolica
6 Sikorski
7 Yeast Episimal plasmids (YEps)
8 Yeast Integrative plasmids (YIps)
9 Yeast Replicative plasmids (YRps)

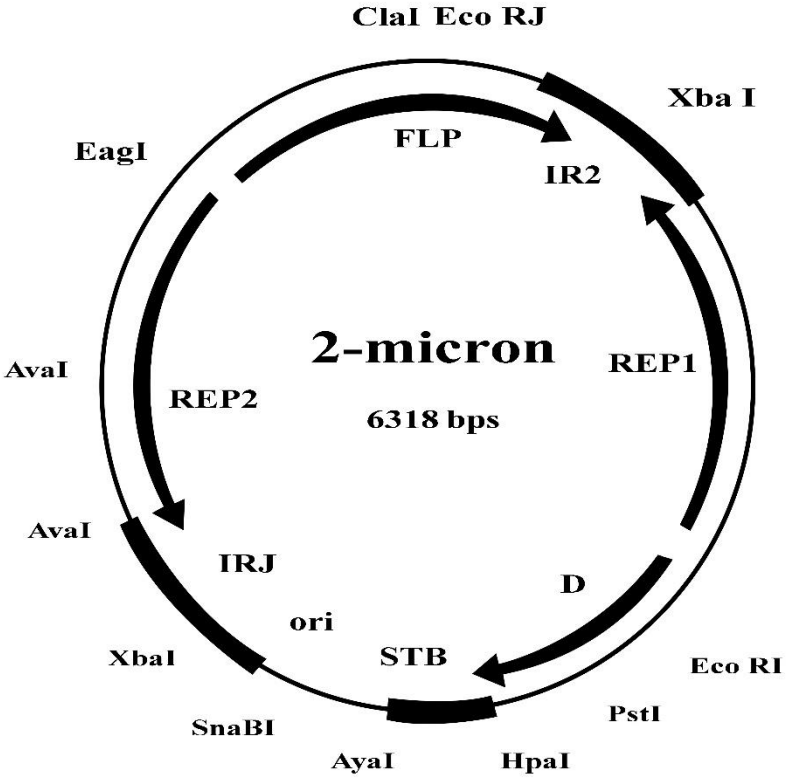
ازاین‌رو عموماً ناقل‌های بیان در مخمّر بر پایه پلاسمید ۲ میکرومتری بنا نهاده می‌شوند. این ناقل‌ها امکان تولید پروتئین‌های یک‌واحدی[۱] و چندواحدی[۲] را به محقّقان می‌دهند. تاکنون پروتئین‌های زیادی نظیر انواع مختلف بازدارنده‌های پروتئاز، پروتئین‌هایی با مصارف درمانی و صنعتی، پروتئین‌های انتقالی و هورمون‌های رشدی با استفاده از این نوع پلاسمید تولید شده است (پارخ[۳]، ۱۹۹۶).

۱-۲-۵- پلاسمید ۲ میکرومتری مخمّر

پلاسمید ۲ میکرومتری یک پلاسمید حلقویِ دورشته‌ای حاوی ۶۳۱۸ جفت‌باز است که در سلّول‌های‌هاپلوئید مخمّر تا ۶۰ نسخه نیز یافت می‌شود (شکل ۳-۱). این پلاسمیدها در طی تقسیم میتوز پایداریِ قابل‌توجّهی از خود نشان می‌دهند. پایداری این پلاسمید مرتبط به‌دلیل تعداد نسخه-های زیاد آن و سازوکار تقسیم[۴] آن می‌باشد. پلاسمید ۲ میکرومتری دارای دو توالی غیر تکراری SU[۵] و LU[۶] است. این دو توالی توسط دو توالی تکراری معکوسِ ۵۵۹ جفت‌بازی از هم جدا شده‌اند. SU دارای ژن‌های REP2 و FLP بوده و LU دارای ژن‌های REP1 و D، ناحیه‌ی STB و ناحیهٔ شروع همانندسازی است. علاوه برآن این پلاسمید دارای توالی‌های ضروریِ دیگری نیز هستند ازجمله برای ورود DNA اضافی بدون آسیب به ساختار پلاسمید بر روی آن وجود ندارد. در واقع به‌جز ناحیهٔ بین نقطه شروع همانندسازی و ژن D، تقریبا از کل پلاسمید ۲ میکرومتری نسخه‌برداری می‌شود. این موضوع شنان دهندهٔ اهمیّت توالی‌های موجود و حذف توالی‌های اضافه به‌دلیل فشار گزینشی در طی دوره تکامل است. از طرفی در شرایط طبیعی، ورود توالی‌های بیشتر فشردگی زیان‌آوری را بر پلاسمید تحمیل می‌کند. ازین‌رو فقط ورود ژن موردنظر در ناحیهٔ *Sna*B1 (ناحیه‌ی بین نقطهٔ شروع همانندسازی و ژن D) در LU می‌تواند پلاسمیدی با پایداری بالا تولید کند. بنابراین محدودیتی در اندازه قطعه‌ی ورودی به‌دلیل عدم تقارن پلاسمید وجود دارد که این عدم تقارن می‌تواند منجر به ناپایداری شود (سیکورسکی[۷] و همکاران، ۱۹۸۹).

---

[1] Monomeric proteins
[2] Multimeric proteins
[3] Parekh
[4] Partitioning
[5] Small Unique
[6] Long Unique
[7] Sikorski



شکل ۵-۱- پلاسمید۲ میکرومتری. شماتیک پلاسمید ۲ میکرومتری به همراه نقاط شروع و محل‌های برشی.

۲-۲-۵- ناقل YIp

ناقل‌های بیان الحاق شونده در واقع ناقل‌های باکتریایی هستند که حامل یک ژن از مخمّر می‌باشند. این ناقل قابلیّت همانندسازی نداشته ولی توانایی ورود به داخل کروموزوم میزبان را دارد و در صورت ورود به ژنوم میزبان به همراه آن همانندسازی می‌شود. ورود به ژنوم از طریق یک ناحیهٔ همسان[1] (ازنظر توالی) انجام می‌پذیرد. در واقع این نقطه مشابه یک ژن مخمّر است که در ناقل قرار داده شده است. ورود هم‌زمان چندین ناقل به ژنوم میزبان امکان پذیر نیست و برای وارد کردن چندین نسخه به‌منظور بیان بیشتر روش‌های دیگری موردنیاز است. برتری ویژه این نوع

[1] Homologous site

ناقل‌ها در این است که به دلیل ورود در کروموزوم میزبان بسیار پایدارند. در صورتی که انتظار بر این است که ناقل‌های پلاسمیدی و مخمّرهای میزبان آن ناقل، بعد از مدتی حذف شوند.

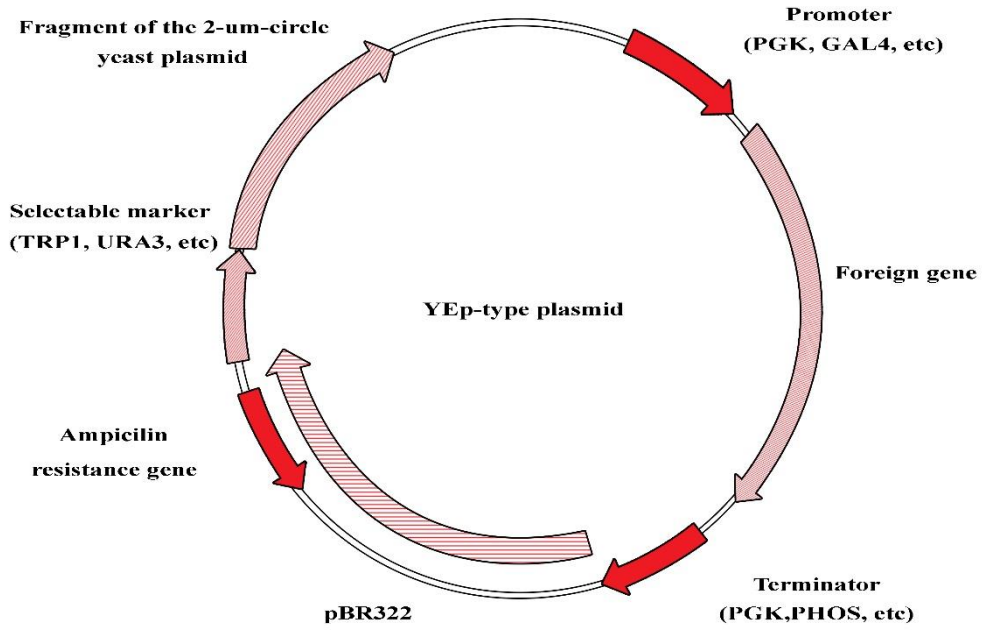
ناقل YIp دارای نشانگر انتخابیURA3 می‌باشد. ژن URA3 به‌طور طبیعی بر روی کروموزوم شماره ۵ مخمّر قرار دارد و آنزیم ۵- فسفات دکربوکسیلاز[1] را کد می‌کند. این آنزیم در سنتز پیریمیدین‌ریبونوکلئوتیدها[2] دخیل است. کاهش فعالیّت ODCase به کاهش رشد سلّول منجر می‌شود مگر این‌که یوراسیل یا یوریدین به محیط کشت اضافه شود. اگر ژن URA3 به سلّول اگزوتروف وارد شود سلّول در محیط کشت حدّاقل قادر به رشد خواهد بود (انتخاب مثبت). اگر ترکیب 5-FOA [3] به محیط کشت اضافه شود باکتری‌های دارندهٔ ژن URA3 قادرند آن‌را به ترکیب سمّی که برای سلول کشنده است تبدیل کنند (انتخاب منفی). از هردوی انتخاب مثبت و منفی به‌منظور اعمال تغییرات ژنتیکی در مخمّر استفاده می‌شود (وارد[4] و همکاران، ۲۰۰۶).

این ناقل‌ها به‌دلیل این‌که باید وارد ژنوم مخمّر شوند از کارایی پایین‌تری برای تراریختی برخوردارند ولی در مقایسه با سایر ناقل‌های مخمّری از پایداری بالایی برخوردار هستند و در موارد نادری مخمّر تراریخت توالی جدید خود را از دست می‌دهد.

۳-۲-۵- ناقل YEp

این نوع ناقل به‌خاطر وجود یک ناحیه شروع همانندسازی که از پلاسمید ۲میکرومتری مخمّر منشأ گرفته است، توانایی همانندسازی خودبه‌خودی در مخمّر را دارند (شکل ۵-۲). این ناحیهٔ شروع ۲میکرومتری[5] عامل اصلی تعدادنسخهٔ بالا و کارایی بالای دریافت DNA خارجی می‌باشد. به‌طور معمول این پلاسمیدها دارای ۱۰ تا ۴۰ نسخه در هر سلّول هستند و به‌دلیل ناپایداری آن، حتی در شرایط گزینش در محیط کشت انتخابی، تنها ۶۰ تا ۹۵ درصد از سلول‌های مخمّر این نوع پلاسمید را خواهند داشت. استفاده از ناقل YEp در تولید پروتئین نوترکیب در مقادیر بالا مقرون به‌صرفه نبوده و استفاده از آن فقط به تولید در مقیاس کوچک محدود شده است.

[1] 5-phosphate decarboxylase (ODCase)
[2] Pyrimidine ribonucleotides
[3] 5-Fluoroorotic acid
[4] Ward
[5] 2 µm ori



شکل ۵-۲- ناقل YEp. ناقل YEp دارای منشأ همانندسازی ۲میکرومتری، نشانگرهای انتخابی TRP1 و URA3، ژن مقاومت به آمپی‌سیلین، پایان‌دهندهٔ رونویسی، محل ورود ژن موردنظر و راه‌انداز می‌باشد.

۴-۲-۵- ناقل YCp [1]

این ناقل به دلیل وجود توالی‌های سانترومری[2] و همچنین توالی‌های همانندساز خودبه‌خودی[3] توانایی همانندسازی مستقل از میزبان را داشته و به طورمعمول در تعداد نسخهٔ پایین[4] و به تعداد یک تا سه عدد در هر سلّول وجود دارد. استفاده از این ناقل‌ها به‌ویژه برای بیان مقادیر بالای پروتئین، به‌دلیل ناپایداری نسبی آن چندان مرسوم نیست اما به‌عنوان یک ناقل همسانه‌سازی قابل تنظیم دارای کاربرد گسترده‌ای می‌باشند (هیگینس[5] و همکاران، ، ۱۹۹۸).

[1] Yeast Centromere plasmids (YCp)
[2] Centromere Sequences (CEN)
[3] Autonomously Replicating Sequences (ARS)
[4] Low copy number
[5] Higgins

۵-۲-۵- ناقل YAC

از این نوع ناقل‌ها که به صورت یک کروموزوم جداگانه در سلّول مخمّر باقی می‌مانند به‌منظور همسانه‌سازی قطعات بزرگ DNA تا ۱۰۰ کیلوباز استفاده می‌شود. سیستم YACs ثبات بالایی دارد، زیرا پس از ورود به سلّول دقیقاً مانند کروموزوم مخمّر عمل کرده و دارای خاستگاه همانندسازی، سانترومر مخمّر و توالی‌هایی می‌باشند که پس از خطّی شدن ناقل، پدید آمده و به‌عنوان تلومرهای کروموزومی‌برای حفظ ثبات کروموزوم عمل می‌کنند (ویور[1] و همکاران، ۱۹۸۷).

۵-۳- نشانگرهای انتخابی

به‌طورکلی نشانگرهای انتخابی در مخمّر به دو نوع نشانگرهای مکمّل[2] و نشانگرهای انتخابی غالب[3] تقسیم می‌شوند. نشانگرهای مکمّل در واقع ژن‌هایی هستند که یک موتاسیون اگزوتروفیک را تکمیل می‌کنند نظیر URA3، TRPI، HIS3 و LEU2. زمانی میزبانِ دارای این نشانگر قادر به ادامهٔ حیات در محیط کشت حداقل است که ورود توالی دیگری از ژن سنتزکننده مادهٔ موردنظر (به همراه ژن موردنظر برای انتقال در ناقل همسانه‌سازی و یا بیان) وارد سلّول شود تا سلّول بتواند ترکیب موردنیاز خود را بسازد و قادر به رشد در محیط کشت حداقل شود. از نشانگرهای غالب نشانگرهای آنتی‌بیوتیکی نظیر G418 و سیکلوهگزامید می‌باشند. این نشانگرها توانایی خاصی نظیر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به سلّول می‌دهد. این ژن مقاومت در کنار ژن موردنظر بر روی ناقل همسانه‌سازی و یا بیان همسانه‌سازی وارد سلّول میزبان می‌شود (پیگناتلی[4]، ۱۹۹۸).

٤-۵- راه‌اندازها

تعداد زیادی از راه‌اندازها که در بیان پروتئین در مخمّر استفاده می‌شود وجود دارد. راه‌اندازهایی نظیر ADH2 و SUC2 که قابل القا و راه‌اندازهایی نظیر GAPDH که به‌صورت دائمی روشن هستند (بینیت[5] و همکاران، ۱۹۹۸).

---

[1] Weaver
[2] Complementation markers
[3] Dominant selection markers
[4] Pignatelli
[5] Bennett

۵-۵- نشانه‌های ترشّح پروتئین به بیرون

تنوّع گسترده‌ای از نشانه‌های ترشّح پروتئین به بیرون در مخمّر وجود دارد که مهمترین آنها فاکتور پرپروآلفا[1]، HSP150، PHO1، SUC2، GGP1 و KILM1 [2] است.

۵-۶- استفاده از ساکارومایسس سرویزیه در تولید پروتئین نوترکیب

شاید بتوان با قاطعیّت اظهار داشت ساکارومایسس سرویزیه شناخته‌شده‌ترین موجود یوکاریوتیک است. بیشتر ژن‌های این موجود برای مطالعاتِ مورد نیاز با استفاده از جهش‌زایی هدفمند غیرفعّال شده و ازاین‌رو دارای تنوّع خوبی ازنظر وجود نژادهای مختلفی که هرکدام در شاخه‌ای از تحقیقات زیست‌فناوری کاربرد دارند، می‌باشد. ازطرفی رشد در تراکم سلّولی بالا، ترشّح پروتئین‌های تولیدی به بیرون، زمان نسل‌زایی کوتاه و محیط کشتی کم‌هزینه‌تر و با پیچیدگی کمتر نسبت به کشت باکتریایی باعث شده‌است که سیستم بیان مخمّر به یک سیستم بیان معمول برای تولید و ارزیابی پروتئین‌های نوترکیب تبدیل شود. مهم‌ترین ویژگی ساکارومایسس سرویزیه در این است که در غذای انسان‌ها به‌طور روزمرّه استفاده می‌شود و لذا برای این مخمّر هیچ خطر بیولوژیکی را نمی‌توان متصوّر شد (جنکینز[3] و همکاران، ۱۹۹۶).

در مخمّر با استفاده از راه‌اندازهایی قوی، نظیر PMA1 و PDR5، تولید بالایی از پروتئین‌های نوترکیب حتی تا بیش از ۱۰ درصد از محتوای پروتئین امکان‌پذیر است. این مقدار اغلب برای خالص‌سازی پروتئین جهت انجام مطالعات ساختاری و عملکردی مناسب است. با این‌که سیستم‌های بیان باکتریایی مقدار بالایی از پروتئین را تولید می‌کنند، اما پروتئین تولیدی در مخمّر با احتمال بیشتری به‌درستی تا خورده و بعضی از تغییرات پس از ترجمه نیز به‌خوبی بر روی آن انجام می‌شود. اگر تاخوردگی مولکولی به‌درستی انجام نشود، سیستم‌های کنترلِ متابولیکی مخمّر، پروتئین را در شبکه آندوپلاسمیک انباشته کرده و متعاقب آن این پروتئین تجزیه خواهد شد. این انباشتگی بیان بیشتری از این پروتئین را غیرممکن می‌کند. شناسایی ویژگی‌های پروتئین‌های نوترکیب در مخمّر به‌دلیل دسترسی به انواع بسیار زیاد نژادهای جهش یافته کار ساده‌ای است. ذکر این نکته ضروریست که انتخاب میزبان مناسب می‌تواند از تداخل احتمالی ناشی از حضور

---

[1] Prepro alpha factor
[2] Killer toxin type 1
[3] Jenkins

پروتئین‌های داخلی با فعالیّت مشابه پروتئین نوترکیب موردنظر را کاهش دهد. با این حال، باید مواردی را هم در بررسی و تجزیه و تحلیل نتایج کمی و کیفی حاصل از آزمون بر روی پروتئین‌های بیان شده در صورت وجود پروتئین‌های مشابه در سلّول میزبان در نظر گرفت.

۱-۶-۵- مبانی بیان پروتئین نوترکیب در ساکارومایسس سرویزیه

در چند سال گذشته سیستم‌های مختلفی توسط محقّقان زیادی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در مخمّر ابداع شده‌است که اساس همگی آن‌ها یکسان است. سیستم‌های بیان در مخمّر عموماً از نوع سیستم بیان مستقیم هستند (سپیرین[1] و همکاران، ۲۰۰۴).

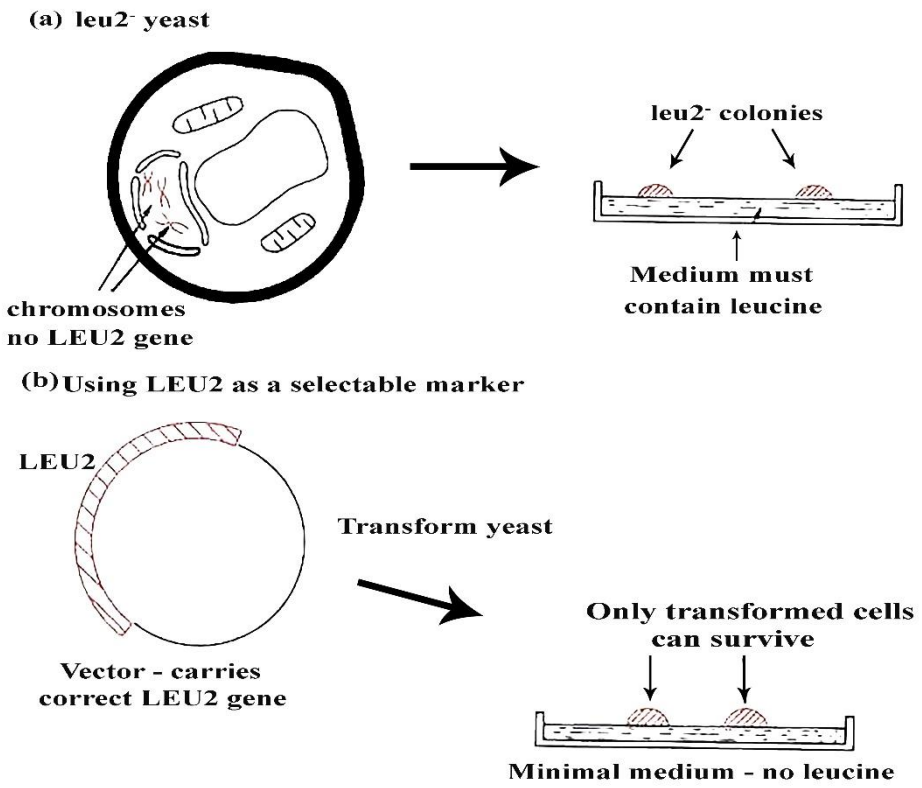
با این‌که مخمّر یک موجود تک سلّولی یوکاریوتیک است، ولی به‌دلیل عدم دارا بودن سیستم پردازشی مطلوب برای حذف اینترون‌ها، بهتر است در آن از cDNA ژن موردنظر استفاده شود. در غیراین‌صورت پروتئین تولید دارای توالی‌های اسیدآمینه‌ای نامطلوب حاصل از ترجمه اینترون‌ها خواهد بود که در نهایت به‌خوبی تا نخورده و عملکرد مطلوبی نخواهد داشت (مراجعه شود به فصل اول) (مسکسو[2] و همکاران ،۲۰۰۴).

بعداز تهیهٔ cDNA ژن موردنظر، این توالی پلاسمید ۲میکرومتری می‌شود. پلاسمید ۲ میکرومتری علاوه بر ژن موردنظر دارای ژن بیوسنتز لوسین در مخمّر (*LEU2*)، منشأ همانندسازی، نشانگر انتخابی (نظیر مقاومت به آنتی‌بیوتیک) و منشاء همانندسازی در اشرشیاکلی است که به‌وسیلهٔ این توالی‌ها می‌توان دستکاری‌های لازم در پلاسمید ۲میکرومتری را انجام داد تا با بهترین توالی وارد مخمّر شود (شکل۳-۳).

ناقل آماده شده در اشرشیاکلی به یک نژاد مخمّر ($LEU2^-$) که توانایی ستنز لوسین را از دست داده است انتقال می‌یابد. سپس مخمّرها به محیط کشت بدون لوسین منتقل می‌شود. در این محیط کشت فقط مخمّرهای نوترکیب که پلاسمید ۲ میکرومتری را دریافت کرده‌اند باقی می‌مانند. این سلّول‌ها پروتئین نوترکیب را دقیقاً همانند میزبان اصلی ژن موردنظر خواهند ساخت.

---

[1] Spirin
[2] Moscoso



شکل۵-۳- استفاده از نشانگر انتخابی $LEU2^-$ به‌منظور همسانه‌سازی ژن در مخمّر.

a) مخمّرهایی که ژن بیوسنتز لوسین در آن‌ها دچار جهش شده و فقط در محیط کشت حاوی لوسین قادر به رشد خواهند بود. b) اگر از ژن کدکنندهٔ لوسین به‌عنوان نشانگر انتخابی استفاده شود، سلّول‌های تراریخت که ناقل حامل ژن LEU2 را دریافت کرده‌اند قادر در محیط کشت بدون لوسین نیز رشد کنند.

نمونهٔ بارز استفاده از مخمّر در تهیهٔ پروتئین‌های نوترکیب انسانی، تولید پروتئین نوترکیب سوپراکسیداز دیسموتاز CU/Zn[1] درمخمر است. این پروتئین نوعی آنزیم انسانی است که در خنثی‌سازی آنیون سوپراکسید پس از انتقال خون بعداز عمل جراحی (چون در این موقع یون

[1] Superoxide Dismutase Cu/Zn (SOD)

سوپراکسید تولید می‌شود که قادر به ایجاد آسیب التهابی در اندام مربوطه است) مؤثّر است و عامل درمانی برای بیماریهایی التهابی نظیر استئوآرتیت، آرتیت روماتوئید، اسکلرودرم و مفاصل ستون فقرات می‌باشد. cDNAی مربوط به این ژن بین راه‌انداز ژن گلیسرآلدئیدفسفات‌دهیدروژناز مخمّر[1] و توالی نشانهٔ پایان رونویسی و پلی‌آدنیلاسیون mRNA ژن مربوط به *GAPDh* همسانه شد. بعداز انتقال پلاسمید ناقل این ژن به مخمّر، پروتئین SOD در مخمّر به‌طور مداوم تولید شد. راه-انداز ژن *GAPDp* قابل القاء نبوده و دارای بیان دائمی می‌باشد و بنابراین طی دوره رشد مداوما رونویسی و بیان می‌شود. پروتئین نوترکیب تولیدی نظیر پروتئین‌های تولیدی در سلّول انسانی در گروه آمینِ انتهای آمینی زنجیره، دارای باقیمانده آلانین استیله می‌شود (دومانت[2] و همکاران، ۱۹۹۸).

موضوع قابل تأمل دیگر در مورد مخمّر این است که در این موجود فقط پروتئین‌هایی گلیکوزیله می‌شوند که ترشّح شوند. بنابراین اگر پروتئینی برای فعالیت بیولوژیکی خود نیاز به گلیکوزیلاسیون داشته باشد می‌توان این پروتئین را وادار به ترشّح کرد تا در حین مراحل ترشّح گلیوکوزیله شود. برای ترشّح پروتئین نوترکیب در مخمّر کافیست که عامل پری‌پرو-آلفا[3] یا پپتید راهنمایی که توالی فاکتور آلفا۱ مرتبط با جفت‌گیری مخمّر را کد می‌کند در فرادست ژن موردنظر همسانه سازی کنیم. این ادغام سبب تولید پروتئینی می‌شود که می‌تواند با کارایی بالا از مخمّر ترشح شود. طی مراحل ترشّح پردازش‌هاش لازم نظیر تشکیل باندهای دی‌سولفید، برش پروتئولیتیک و غیره انجام شده و معمولاً پروتئین فعّال به محیط خارج ترشح می‌شود.

۲-۶-۵- تولید آنتی‌بادی ویروسی

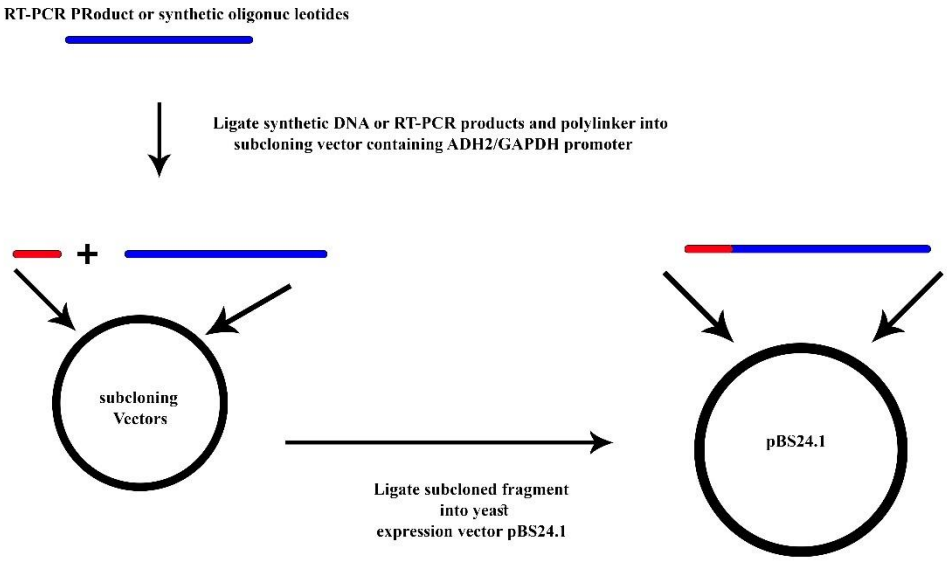
از مخمّر در تولید پروتئین‌های ویروس نیل غربی[4] به‌منظور تشخیص این نوع ویروس‌ها استفاده می‌شود. ویروس نیل‌غربی دارای ژنوم خطی، تک‌رشته‌ای و از نوع RNA است. این ویروس از خانوادهٔ فلاویویریده[5] است که اولین بار در سال ۱۹۳۷ از مناطق غربی نیل در اوگاندا گزارش شده است. تا سال ۱۹۹۹ این ویروس فقط در نیم‌کره شرقی در قاره‌های آفریقا، آسیا، خاورمیانه و اروپا دیده شده است. اما در این سال در منطقهٔ متروپلیس نیویورک نیز مشاهده شد. بیشتر افراد آلوده به

[1] Glycer- aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDp)
[2] Dumont
[3] Prepro-α-factor
[4] West Nile Virus (WNV)
[5] Flaviviridae

این ویروس علائم خاصی را از خود بروز نداده و تقریباً ۲۰ درصد از افراد آلوده علائم شبیه آنفولانزا را نشان می‌دهند و فقط یکی در ۱۵۰ نفر به بیماری‌های عصبی مبتلا می‌شود. بنابراین سنجش خون همهٔ افراد و به‌ویژه افراد مشکوک به بیماری ضروری است. یکی از راه‌های تشخیص بیماری‌های ویروسی نظیر نیل‌غربی استفاده از آنتی‌بادی‌های مناسب است.

به‌منظور تولید آنتی‌بادی‌ها برای تشخیص ویروس، توالی اسیدنوکلئیک کدکننده پروتئین‌های ساختار کپسید به‌طور مصنوعی سنتز و یا به‌وسیله RT-PCR از RNAی استخراج شده از نژاد ویروسی NY385-99 تولید شدند. سپس این ژن به ژن کدکنندهٔ پروتئینSOD الحاق و ژن کدکنندهٔ پروتئین نوترکیب در سلّول مخمّر و در ناقل بیان آن (pBS24.1) همسانه شد (شکل ۳-۴). این ورود با استفاده از تعیین‌توالی کل ژنوم مخمّر تأیید شد. در این ناقل از پایان‌دهندهٔ آلفا جهت تضمین پایان نسخه‌برداری استفاده و از ژن‌های *leu2-d* و *ura3* به‌عنوان نشانگر انتخابی استفاده شد. این ناقل دارای توالی‌هایی از پلاسمید ۲میکرومتری برای تکثیر خودبه‌خود در مخمّر و ژن مقاومت به آمپی‌سیلین (بتا-لاکتاماز) به‌منظور گزینش در باکتری است. لازم به‌ذکر است که قبل از انتقال ژن موردنظر (ژن کدکننده کپسید) به ناقل pBS24.1، ابتدا این ژن به‌همراه یک قطعهٔ اتّصال‌دهندهٔ چندتایی وارد ناقل پیش‌همسانه‌سازی[1] دارای راه‌اندازهای ADH2/GAPDH شد. بعد از تراریخت کردن مخمّرها، از پلت‌های مخمّر حاوی آنتی‌ژن‌های نوترکیب ویروس نیل‌غربی برای خالص‌سازی پروتئین‌های ویروسی استفاده شد (مارتینلی[2] و همکاران، ۱۹۹۴).

[1] Subcloning
[2] Martinelli



شکل۵-۴- مراحل انتقال ژن کدکننده پوشش ویروسی به ناقل بیان مخمّری pBS24.1. در ابتدا ژن موردنظر با استفاده از RT-PCR و یا سنتز مستقیم از روی توالی اسیدآمینه‌ای یکی از پروتئین‌های کپسید ویروس ساخته می‌شود. به همراه این ژن و چسبیده به آن، ژن کدکنندهٔ پروتئینSOD نیز وارد شد. بعداز انتخاب مخمّرهای تراریخت از کشت سلّولی آن‌ها آنتی‌ژن ویروس نیل غربی استخراج شد.

۳-۶-۵- مزایا و معایب تولید پروتئین نوترکیب در *ساکارومایسس سرویزیه*

با این‌که بیان پروتئین در ساکارومایسس سرویزیه در بسیاری از موارد با موفقیّت همراه بوده است ولی در موارد انگشت‌شماری این بیان به تولید پروتئین نوترکیب در مقادیر بالا منجر می‌شود. علاوه بر بیان، در این مخمّر محدودیت‌های دیگری نیز بشرح زیر وجود دارد:

۱- جهت تولید در مقادیر بالا دیده شده است که حتی با راه‌اندازهای القاءپذیر نیز معمولاً پلاسمیدهای این مخمر از کار می‌افتد.

۲- گلیکوزیله شدن بیش از اندازه پروتئین‌ها در این مخمّر می‌تواند باعث تغییر در فعالیّت بیولوژیکی پروتئین‌های نوترکیب شود.

۳- بعضی از پروتئین‌ها در فضای پری‌پلاسم باقی می‌مانند که می‌تواند خالص‌سازی آن‌را با مشکل همراه سازد.

۴- عدم هم‌خوانی کدون‌ها که در پروکاریوت‌ها توضیح داده شد (مراجعه شود به فصل اول) نیز ممکن است در این‌جا با احتمال کمتری رخ دهد.

ازاین‌رو محقّقان برآن شدند تا ازمخمّرهای دیگری استفاده کنند که این مشکلاًت را نداشته باشد. یکی از مناسب‌ترین مخمّرها برای این منظور *پیچیا پاستوریس* است.

۷-۵- پیچیا پاستوریس

پیچیا پاستوریس مخمّری است متیلوتروفیک[1] که توانایی رشد در تراکم بالای سلّولی را دارد می‌تواند از متانول به‌عنوان منبع کربن استفاده کند. دو ویژگی بارز پیچیا پاستوریس آن‌را در بیان پروتئین نوترکیب از دیگر مخمّرها و حتی تک‌سلول‌های یوکاریوتیک متمایز می‌کند. اول، بیان پروتئین در مقادیر بالا (تا ۳۰ درصد کل) به‌ویژه وقتی که از راه‌انداز قوی و قابل القاء استفاده شود و دیگری توانایی بالای این مخمّر در اعمال تغییرات پس از ترجمه مشابه آن‌چیزی که یوکاریوت‌های متکامل‌تر انجام می‌شود. مورفولوژی دستگاه گلژی در پیچیا پاستوریس شبیه دستگاه گلژی انسان است که امکان فعالیّت ویژه برای آنزیم‌های مسئول تولید گلیکوفرم‌های انسانی را می‌دهد. نکتهٔ مهم دیگر در این مورد، عدم واکنش آنتی‌ژنی بدن انسان در مقابل پروتئین‌های تولید و گلیکوزیله شده درپیچیا پاستوریس است. این در صورتی است که اغلب بدن درمقابل پروتئین‌های بیش‌ازحد گلیکوزیله شدهِ ساکارومایسس سرویزیه واکنش آنتی‌ژنی نشان می‌دهد. علاوه براین‌ها این مخمّر از مزیّت‌های گوناگونی دیگری برای بیان پروتئین‌های نوترکیب برخوردار است از آن جمله به امکان ترشّح پروتئین تولیدی در محیط، راه‌انداز قابل القاءی قوی، قابلیّت رشد سریع و پرتراکم در محیط کشت، دسترسی به انواع نژادهای جهش‌یافته‌های مناسب و وجود روش‌های بیولوژی مولکولی و زیست‌فناوری برای دست‌ورزی ژنتیکی آن اشاره کرد.

راه‌انداز قوی مورد استفاده در پیچیا پاستوریس راه انداز ژن الکلاًکسیداز[2] است. آنزیم الکلاًکسیداز اولین مرحله در سوخت‌وساز متانول را کاتالیز می‌کند. از آنجایی‌که آنزیم الکلاًکسیداز گرایش پایینی به اکسیژن دارد، ازاین‌رو مخمّر باید با بیان زیاد این ژن و تولید بالای محصول آن تا ۳۰ درصد کل پروتئین‌های سلّول این نقیصه را جبران می‌کند. بنابراین استفاده از این راه‌انداز و متانول به‌عنوان القاءکننده بیان بالایی از ژن موردنظر را درپی خواهد داشت.

راه‌انداز[3] GAPDp نیز به‌عنوان یک راه‌انداز دائمی می‌تواند در تولید پروتئین‌های غیرسمّی در پیچیا پاستوریس بکار رود (هامیلتون[1] و همکاران، ۲۰۰۳).

---

[1] Methyltrophic
[2] Alcohol Oxidase (AOX)
[3] Glycer- aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDp)

معمولاً ژن موردنظر در ناقل‌های شاتلی[2] دارای راه‌انداز مناسب به پیچیا پاستوریس منتقل می‌شود. این ناقل علاوه بر راه‌انداز، دارای یک محل همسانه‌سازی برای ورود به ژن موردنظر، توالی‌های تنظیمی برای تکثیر ناقل در اشرشیا کولی و همچنین توالی‌های تنظیمی برای تکثیر ناقل در پیچیا پاستوریس می‌باشد و ورود ناقل از طریق یک محل همسان در محل ژن *AOX* یا GAPDp و یا در محل ژن‌های تغذیه‌ای اگزوتروفیک (نظیر اسیدآمینه تریپتوفان) صورت می‌گیرد. همان‌طور که در مباحث پیشین بحث شد (مراجعه شود به فصل اول)، اگر از نشانگرهای تغذیه‌ای استفاده شود با قرار دادن سلّول‌ها در محیط کشت بدون اسیدآمینه (نظیر اسیدآمینه Trp)، سلّول‌های تراریخته مشخّص می‌شوند (کامپبیل[3] و همکاران، ۱۹۸۴).

توالی نشانهٔ ترشّح پروتئین به محیط در ژنوم پیچیا پاستوریس امکان ترشح بالای پروتئین به محیط کشت را فرآهم می‌کند. علاوه بر نشانه‌های ترشّح موجود در مخمّر ساکارومایسس سروویزیه نظیر فاکتور آلفا، از نشانه دیگری به‌نام PHO1 [4] نیز می‌توان استفاده کرد.

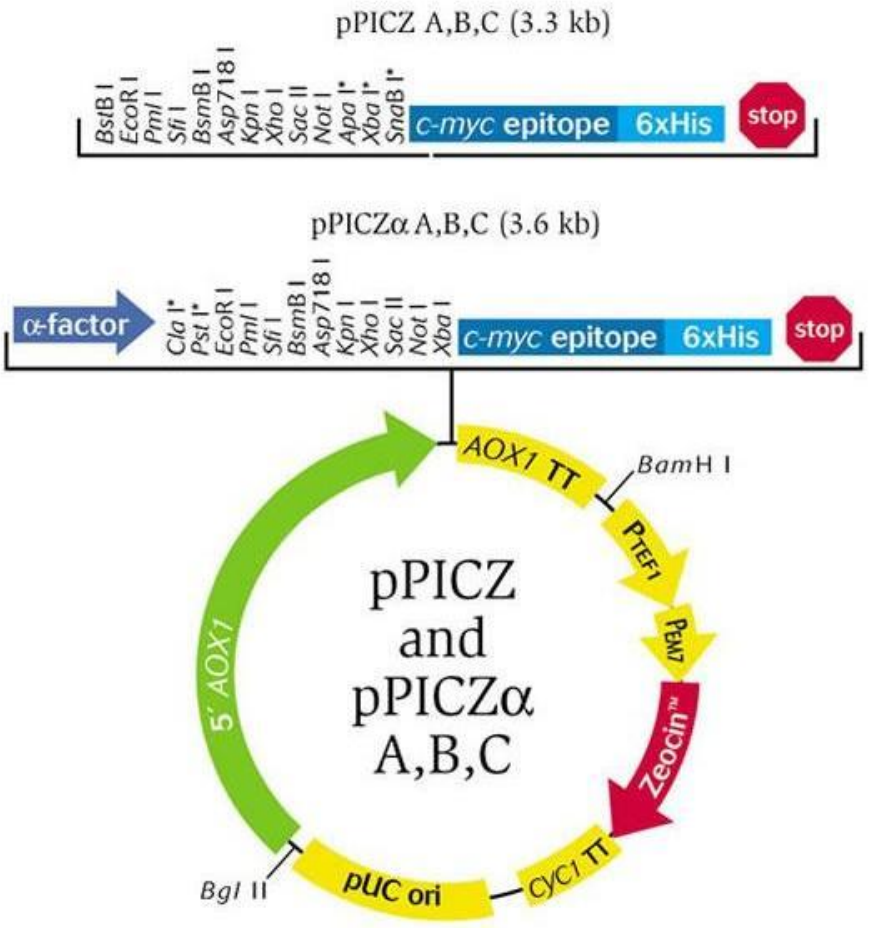
از روی فنوتیپ می‌توان محل ورود ژن موردنظر را مشخص و براین اساس مخمّرهای تراریخت را انتخاب کرد. اگر ناقل از قسمت یک نشانگر تغذیه‌ای وارد شود، مخمّرهای تراریخت شده در محیط کشت دارای متانول به‌طورطبیعی رشد کرده بااین‌حال اگر در محیط کشت اسیدآمینه اگزوتروفیک (نظیر تریپتوفان در مثال بالا) موجود نباشد، رشدشان متوقّف می‌شود.

ژن‌های *AOX1* و *AOX2* کدکننده آنزیم الکلاًکسیداز در سلول است. ژن *AOX1* قوی‌تر بوده و تقریباً ۸۵ درصد از کل الکلاًکسیداز سلّول توسط آن کد می‌شود. ازاین‌رو راه‌انداز *AOX1* به‌عنوان راه‌انداز بیان ژن‌های موردنظر در پیچیا پاستوریس مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۳-۵).

اگر ژن موردنظر وارد ژن *AOX1* شود، میزان تولید الکل اکسیداز و متعاقب آن سوخت‌ساز متانول به‌شدّت کاهش یافته و مصرف متانول محیط کشت توسط مخمر به‌کندی صورت می‌گیرد. مخمّرهای تراریختی که ژن جدید فقط وارد *AOX1* شده است به غلظت متانول حساس نیستند ولی در محیط کشت متانول‌دار دارای سرعت رشد پایینی هستند (ناسمایت[5] و همکاران، ۱۹۸۰).

---

[1] Hamilton
[2] Shuttle vectors
[3] Campbell
[4] Acid phosphatase
[5] Nasmyth



شکل ۵-۵- ناقل pPICZ. این ناقل بر اساس راه‌انداز ژن الکلاکسداز ۱ (AOX1) به منظور بیان ژن در مخمّر پیچیا پاستوریس طرّاحی شده است.

اگر ورود ژن در هردوی ژن‌های *AOX1* و *AOX2* صورت گیرد، مخمّر توان سوخت‌وساز متانول را بکلی از دست می‌دهد. تراریختی که هر دوی ژن‌های *AOX1* و *AOX2* خود را از دست داده باشد نمی‌توانند از متانول به‌عنوان یک منبع کربن استفاده کنند و می‌بایست از منابع قندی دیگری استفاده شود. با این‌که گلیسرول و یا گلوکز به‌عنوان منبع کربن، رشد پیچیا پاستوریس را به شدّت بالا می‌برد ولی یک بازدارنده برای راه‌انداز ژن *AOX1* محسوب می‌شود. با این حال حتی

برای این نوع از تراریخت‌ها متانول می‌تواند به‌عنوان یک القاءکنندهٔ قوی عمل کند (هیلس[1] و همکاران، ۲۰۰۱).

مزیّت اصلی استفاده از ناقل‌هایی که وارد ژن تغذیه‌ای می‌شوند این است که با توجه به سالم ماندن ژن‌های *AOX1* و *AOX2*، دارای سرعت رشد بالایی در حضور متانول هستند. عیب اصلی این نوع از تراریخت‌ها حساسیت به غلظت‌های بالای متانول و نیاز به تنظیم دقیق این غلظت در محیط کشت است.

به‌طورکلی استفاده از متانول و یا دیگر منابع قندی در محیط کشت پیچیا پاستوریس می‌تواند به‌عنوان یک وسیله برای کنترل رشد و یا به حداکثر رساندن تراکم سلولی قبل از بکارگیری القاءکننده باشد.

اخیراً با تغییرات اعمال شده بر پیچیا پاستوریس، از طریق حذف بعضی از آنزیم‌ها از مسیرهای بیوشمیایی گلیکوزیلاسیون، این مخمّر توانایی گلیکوزیلاسیون دقیقاً مشابه سلّول‌های پستانداران را پیدا کرده است. در این تغییر، پنج آنزیم دخیل در سنتز زنجیرهای الیگوساکاریدی در بدن انسان، به پیچیا پاستوریس انتقال یافته است. ازطرفی، زنجیره‌های مانوز به واسطه‌هایِ گلیکوزیلاسیون نیز اضافه می‌شود.

آنزیم‌های انسانی اضافه شده به مخمّر شامل مانوزیداز۱[2]، مانوزیداز۲[3]، N–استیل‌گلوکزآمینیل‌ترانفراز۱[4]، N–استیل‌گلوکزآمینیل‌ترانفراز۲[5] و UDP-GlcNAc ترانسپورتر[6] است. مخمّری که در این انتقال ژن استفاده می‌شود باید در ژن تولیدکننده آنزیم آلفا–۱–۶–مانوزیل‌ترانسفراز نقص داشته باشد. بااین‌که این آنزیم در مسیر گلیکوزیلاسیون عمل می‌کند ولی عمل آن دقیقاً شبیه آن‌چیزی که در سلّول پستانداران صورت می‌گیرد، نیست و جایگزنی آن با آنزیم‌های ذکر شده کارایی گلیکوزیلاسیون دقیق را بالا می‌برد.

سیستم‌های بیان دیگری نیز در مخمّر استفاده می‌شود که از مخمّرهای *پیچیا متالونیکا* و *هنسنولا پلی‌مورفا*[7] در آن استفاده می‌شود. این مخمّرها توانایی رشد در محیط پرتراکم سلّولی و تولید

[1] Hills
[2] Mannosidase I
[3] Mannosidase II
[4] N-acetylglucosaminyltransferase I
[5] N-acetylglucosaminyltransferase II
[6] UDP-GlcNAc transporter
[7] Hansenula polymorpha

بالای پروتئین را داشته و همچنین با سیستم‌های بیان در پیچیا پاستوریس و ساکارومایسس سروویزیه نیز هم‌خوانی دارند.

۸-۵- تهیهٔ پروتئین‌های نوترکیب به‌وسیلهٔ سلّول‌های قارچی

چندین سال است که گونه‌های مختلف قارچی به‌ویژه آسپرژیلوس به‌عنوان جایگزین مناسبی برای اشرشیا کولی، مخمّر و سلّول‌های حیوانی در بیان پروتئین‌های نوترکیب مورد توجه قرار گرفته است. تاکنون پروتئین‌های نوترکیب توسط باکتری‌هایی نظیر اشرشیاکولی، مخمّرها و در پاره‌ای اوقات در سلّول‌های تخمدان همستر چینی[1] تولید می‌شده‌اند. اما در این بین این میزبان‌ها دارای معایبی نیز هستند. مخمّرها و به‌ویژه باکتری‌ها عموماً مکانیسم اعمال تغییرات پس از ترجمه را نداشته و یا به‌طور ناقص انجام می‌دهند که این نقص می‌تواند در تولید پروتئین‌های پیچیدهٔ انسانی مشکل‌ساز باشد. ازاین‌رو سلول‌های پستانداران به‌منظور غلبه بر این مشکل مورد استفاده قرار گرفتند، اما آن‌ها نیز دارای معایبی نظیر آسیب‌پذیری نسبی سلّول‌ها، مقدار پایین پروتئین تولیدی، محیط کشت پیچیده، حسّاس و پرهزینه و مشکلات مربوط به استفاده از بیوراکتورها می‌باشند. ازطرفی احتمال ایجاد آلوده شدن به ویروس‌ها و پروکاریوت‌های بیماری‌زای انسانی نیز وجود دارد. این عوامل بیماری‌زا از طریق پروتئین نوترکیب نهایی ممکن است به دریافت‌کنندهٔ آن منتقل شود. آلودگی به این عوامل بیماری‌زا به‌دلیل هم‌خوانی چرخه زندگی عوامل بیماری‌زا با سوخت‌وساز سلّول‌های پستانداری است که این هماهنگی در سلّول‌های غیرپستانداری وجود ندارد و درصورت انتقال عوامل بیماری‌زا به محیط کشت غیرسلّول پستانداری به‌زودی حذف خواهند شد. ازاین‌رو استفاده از سیستم‌های بیان یوکاریوتی دیگری که دارای بیان بالا، توان انجام تغییرات پس از ترجمه قابل قبول و عدم دارا بودن مشکلاّت ذکر شده باشند مورد توجه قرار گرفت. به‌طورکلی قارچ‌ها در فرآیندهای مختلف زیست‌فناوری نظیر تولید و توسعهٔ داروهای مختلفی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها (پنی سیلین و سفالوسپورین[2])، بیان ژن‌های خودی و خارجی و سنتز ترکیبات متنوّع از قبیل تولید صنعتی اسیدهای آلی(سیتریک، استیک و فرمیک اسید) و آنزیم‌های تجاری (پروتئاز، آمیلاز و کاتالاز) نقش مهمی دارند. ازطرفی قارچ‌ها نسبت به دیگر موجودات تک و حتی چندسولی دارای مقادیر بالاتر ترشّح آنزیمی(بیشتر از ۲۰ گرم در لیتر) هستند که این

[1] Chinese hamster ovary (CHO) cells
[2] Cephalosporin

موضوع تولید پروتئین در قارچ‌ها را با اهمیّت می‌کند. برای بیشتر پروتئین‌هایی که استفاده دارویی دارند تغییرات پس از ترجمه صحیح به‌ویژه N- گلیکولیزاسیون مهم است. پروتئین‌هایی که به‌صورت نادرست گلیکوزیله شده‌اند، بلافاصله از جریان خون حذف شده و عملاً برای اهداف درمانی بدون استفاده می شوند. ثابت شده است که سنتز پروتئین خارجی در میزبان‌های آسپرژیلوسی کارایی بالایی دارد. با توجّه به این که تولیدات پروتئینی به‌طور صحیحی با تشکیل پل‌های دی‌سولفید تا می‌خورند، ازاین‌رو مقدار زیادی از پروتئین‌های تولیدی در ساختار سه بعدی فعّال خود قرار می‌گیرند. از طرف دیگر تولید نژادهای نوترکیب آسپرژیلوس از طریق مهندسی ژنتیک، به‌منظور انجام صحیح و دقیق تغییرات پس‌از ترجمهٔ مشابه سلّول پستانداران، امکان گلیکولیزاسیون صحیح پروتئین‌ها را فرآهم آورده است. با این‌که پروتئین‌های زیادی نظیر کیموزین و فعّال کننده پلاسمینوژن در نژادهای جدید آسپرژیلوس تولید شده است، ولی با این حال مشکلات جدّی درخصوص تولید پروتئازهای داخل و بین سلّولی که در مقادیر نسبتاً بالایی باعث تغییر و حتی حذف پروتئین‌های نوترکیب می شوند، وجود دارد (جکیومین[1] و همکاران، ۱۹۹۴).

انتقال ژن و تولید پروتئین نوترکیب در قارچ‌ها مشابه مخمّر است. سیستم‌های بیان در قارچ می‌توانند پروتئین‌های نوترکیب را در مقدار بالا و خلوص قابل قبولی تولید کنند. این مورد به‌ویژه در تولید پروتئین‌های دارویی مهم است.

در تولید پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از قارچ‌ها، عموماً از قارچ‌های رشته‌ای از جمله *کلویورومایسس*[2]، قارچ خاکزی *تریکودرما ریزئی*[3]، *آسپریژیلوس نیدولانس*[4] و قارچ سیاهک‌زای *آسپریژیلوس نیگر*[5] استفاده می‌شود. مزیّت عمدهٔ این قارچ‌ها در گلیکوزیله کردن مناسب و ترشّح پروتئین به محیط بیرون است.

تریکودرما ریزئی قارچی قوی در پوسیدگی چوب است که با ترشّح آنزیم‌های سلولولیتیک موجب فساد چوبی می‌شود که بر روی آن زندگی می‌کند. این بدین معنی است که پروتئین‌های نوترکیب تولیدی خود را نیز می‌تواند به بیرون ترشّح کند. همان‌طور که بیان شد ترشّح باعث می‌شود که استخراج و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب راحت‌تر انجام شود. ناقل‌های بیان در

---

[1] Jacquemin
[2] Kluyveromyces
[3] Trichoderma Reesei
[4] Aspergillus Nidulans
[5] Asperigillus Niger

تریکودرما ریزئی از راه‌انداز سلوبیوهیدرولاز استفاده می‌کنند. این راه‌انداز توسط سلولز القا می‌شود ولی ناقل‌های بیان در *آسپریژیلوس نیدولانس* معمولاً از راه‌انداز گلیکوآمیلاز استفاده می‌کنند که این راه‌انداز توسط نشاسته القاء و توسط زایلوز سد می‌شود.

همان‌طورکه گفته شد سیستم‌های قارچی مانند گیاهی نسبت به سیستم‌های جانوری ایمن‌تر و دارای آلودگی بسیار کم‌تر ویروسی، پریون‌ها و یا اندوتوکسین هستند. سیستم‌های بیان قارچی و پستان‌داران در مرحلهٔ آغازین N- گلیکولیزاسیون مشترک می‌باشند که طی آن الیگوساکاریدهایی نظیر (گلوکز)۳، (مانوز)۹ و (N-استیل گلوکزآمین)۲ از سمت لومینال شبکه آندوپلاسمیک توسط الیگوساکاریدترانسفراز[1] بر روی اسیدآمینه آسپاراژین موجود بر روی پروتئین سنتز شده اضافه می‌شوند. قبل از خروج از شبکه آندوپلاسمیک، گلیکوپروتئین تولیدی هم در سلّول‌های انسانی و هم در سلّول‌های قارچ بوسیلهٔ آنزیم‌هایی نظیر گلیکولاز ۱ و ۲ پیرایش می‌شوند. در دستگاه گلژی، تغییرات الیگوساکاریدی به طور بارزی در سلّول‌های پستان‌داران و قارچ‌ها اختلاف دارند. بااین‌حال الیگوساکاریدهایی که در سلول‌های غیرپستان‌داری تولید می‌شوند از نظر ایمونولوژیک دارای خطراتی در انسان‌ها می‌باشند. ازاین‌رو بیشتر تحقیقاتی که در مورد بیان پروتئین در قارچ‌ها انجام می‌شود شامل یافتن راه‌های ایجاد الگوی گلیکوزیلاسیون انسانی برای تولید پروتئین‌های شبه انسانی می‌باشند که از نظر ایمونولوژیک کاملاً بی خطر هستند (فینکلستین[2] و همکاران، ۱۹۸۷).

[1] Oligosaccharide transferase (OST)
[2] Finkelstein

فصل ششم

پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های یوکاریوتیک چندسلّولی حشرات، گیاهان و پستان‌داران

۱-۶- تهیهٔ پروتئین‌های نوترکیب به‌وسیلهٔ سلّول‌های حشرات

ویروس باکیلوویروس[1] از ویروس‌های بیماری‌زای حشرات هستند که به‌طور گسترده‌ای برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود. سیستم‌های تولید پروتئین در آن بیش از ۲۰ سال است که شناخته شده و از آن موقع تا کنون کارهای زیادی به‌منظور افزایش کارایی بیان ژن‌های خارجی توسط این ویروس در لاین‌های سلّولی حشرات صورت گرفته است. اساس سیستم بیان ژن بر اساس جایگزینی در یک ژن غیرضروری ویروسی، ناحیهٔ پلی‌هیدرین[2]، با ژن موردنظر است. در نهایت با این سازوکار، ژن ورودی در مقادیر بالایی بیان می‌شود. به‌منظور انتقال و تولید مداوم پروتئین در لاین‌های‌سلّولی متکامل‌تر یوکاریوتیک نظیر هپاتوسیت‌های انسانی[3]، لاین‌های سلّولی تخمدان همستر چینی، ناقل‌های باکیلوویروس به راه‌انداز و توالی‌های افزاینده بیان پستان‌داران مجهّز شده‌اند. ازطرفی این روش‌ها ابزاری مناسبی را برای مطالعهٔ بیان و عملکرد ژن‌های موردنظر بوجود آورده‌است (کیتس[4] و همکاران، ۱۹۹۳).

---

[1] Baculovirus
[2] Polh gene
[3] Human hepatocytes
[4] Kitts

۶-۱-۱- معرفی ویروس باکیولوویروس

ویروس باکیولوویروس گروهی از ویروس‌های بیماری‌زای حشرات هستند که دارای تنوع زیادی هستند. این ویروس‌ها غالباً لارو حشرات راسته پروانه‌آسا[1] را بیمار می‌کنند. مهمترین عضو این خانواده که بیشترین تحقیقات نیز بر روی آن صورت گرفته است، ویروس *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) نام دارد. ژنوم کامل این ویروس تعیین توالی شده و در اختیار محقّقان قرار دارد. ژنوم این ویروس حلقوی، دورشته‌ای و ابرمارپیچ با اندازه تقریباً ۱۳۰ کیلوباز که در نوکلئوکپسید میله‌ای بسته‌بندی شده‌است. از آنجایی‌که این نوکلئوکپسید می‌تواند از طول افزایش اندازه پیدا کند ازاین‌رو ویروس قادر است ژن‌های بزرگ خارجی را دریافت کند (کاست[2] و همکاران، ۲۰۰۲).

باکیولوویروس دارای دو فاز در چرخه همانندسازی خود است. در هر فاز دو نوع ویروس BV[3] و ODV[4] که دارای فنوتیپ متفاوت هستند، ایجاد می‌شود (شکل ۴-۱). نوع BV، دارای پوشش منفرد و میله‌ای‌شکل[5] که در یک غشایی که از غشای پلاسمایی میزبان منشاء گرفته است، جا می‌گیرد. این غشاء دارای مقدار زیادی از نوعی پروتئین هم‌جوش ویروسی به‌نام GP64 است. نوع BV مسئول انتقال ویروس از یک سلّول به سلّول دیگر هم در محیط‌درشیشه[6] و هم در محیط‌زنده[7] است. در طی فاز تأخیری[8] ویروس، مقادیر زیادی از BD [9] یا پلی‌هیدرا تولید می‌شود. ترکیب اصلی ماتریکس OB، از پلی‌هیدرین تشکیل شده است.

وجود پلی‌هیدرین در غشاء باعث می‌شود ویروس به شرایط محیطی غیرطبیعی مقاوم شود. پروتئین پلی‌هیدرین به‌وسیلهٔ ژن *polh* که دارای راه‌انداز بسیار قوی است، کد می‌شود. در ادامه از نقش راه‌انداز ژن *polh* به‌عنوان راه‌انداز مناسب بیان ژن موردنظر در سلّول حشرات بحث خواهد شد (لائو[10] و همکاران، ۲۰۰۴).

---

[1] Lepidoptera
[2] Kost
[3] Budded virus
[4] Occlusion-derived virus
[5] Rod-shaped nucleocapsid
[6] In vitro
[7] In vivo
[8] Later stages
[9] Occlusion bodies
[10] Law

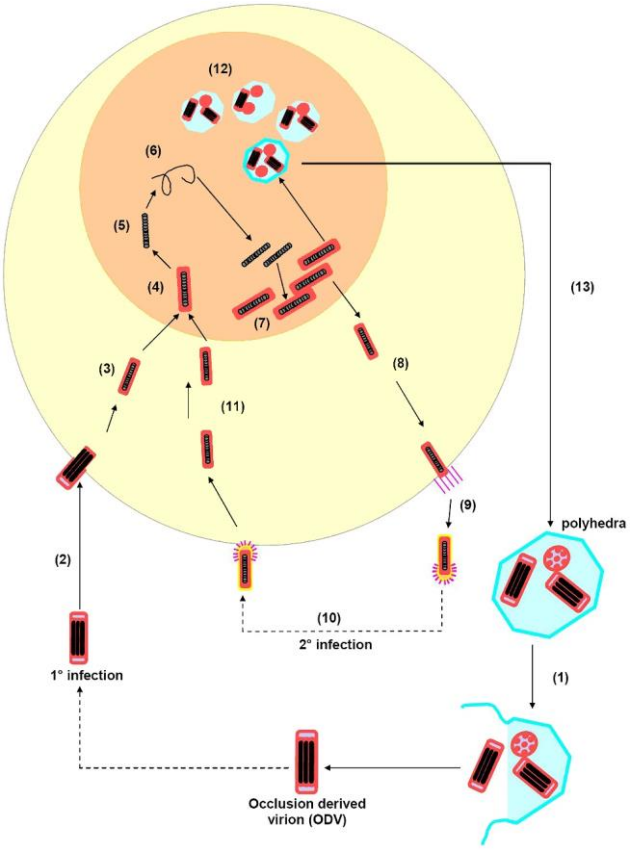
۲-۱-۶- کشت سلّول حشرات به‌منظور تولید پروتئین

امروزه استفاده از کشت سلّولی لاین‌های سلّولی Sf21 و Sf9 به‌منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب به‌طور روزافزونی در حال گسترش است. هردوی این لاین‌های سلّولی از سلّول‌های تخمدان شفیره‌ی پروانه برگ‌خوار پاییزه[1] متعلّق به خانواده نوکتویده[2] بدست می‌آید که با نام کامل IPLB-Sf-21 و مخفّف Sf21 شناخته می‌شوند. همچنین لاین‌های سلولی Sf9 با نام کامل IPLB-Sf21-AE با اعمال تغییرات جزئی از سلول‌های Sf21 به‌دست می‌آیند که در تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرند (ماگر[3] و همکاران، ۱۹۹۸).

به‌طور کلی کشت سلّولی حشرات نسبت به کشت سلّولی پستانداران راحت‌تر است و معمولاً به‌صورت سوسپانسیون سلولی در فلاسک‌های دوار، شیکر و یا کشت تک لایه[4] در فلاسک‌های T[5] یا ظروف کشت مسطّح کشت می‌شوند. در این‌جا محیط‌های کشت با سیستم بافر فسفات کاربرد بیشتری دارد که نسبت به کشت سلولی پستانداران که از بافرهای کربناتی استفاده می‌شود به‌دلیل عدم نیاز به استفاده از انکوباتور CO_2، کم‌هزینه‌تر است. دمای رشد برای این نوع کشت $^{\circ}C$ ۳۰-۲۵ است. با این‌که به‌نظر می‌رسد دمای بهینه رشد سلّول‌های حشرات C ۲۸ باشد. در بعضی موارد خاص نظیر کشت سلّولی برای سلّول‌های Sf21 نیاز به مکمّل‌های سرمی، معمولاً سرم جنینی گاوی[6]، نیز وجود دارد. این سرم باعث تسریع در رشد سلّول‌ها می‌شود و به‌ویژه در کشت‌های همراه با تکان دادن از ازهم‌گسیختگی بافت‌ها جلوگیری می‌کند (مینگ[7] و همکاران، ۲۰۰۰).

---

[1] Spodoptera frugiperda (Fall army worm)
[2] Noctuidae
[3] Mager
[4] Monolayer culture
[5] T-flasks
[6] Fetal Bovine Serum (FBS) or Fetal Calf Serum (FCS)
[7] Meng


(12)
(6)
(5)
(4)
(7)
(13)
(3)
(8)
(11)
(9)
polyhedra
(2)
(10)
2° infection
1° infection
(1)
Occlusion derived
virion (ODV)

شکل ۶-۱- نمایی از دو فاز تکثیری AcNPV. ۱) پلی‌هیدرا تا وقتی که توسّط لارو میزبان حسّاس هضم نشده باشد در محیط باقی می‌ماند ولی محیطی آلکالینیِ مجاری گوارشی لارو باعث آزاد شدن ODV می‌شود، ۲) ذرّات ODV به سلّول‌های اپیتلیال مجاری گوارشی متّصل شده و از این طریق وارد بدن لارو می‌شوند، ۳) نوکلئوکپسیدهای ویروسی وارد هسته شده ۴) که این ورود از منافذ هسته انجام می‌پذیرد و ۵) در این‌جا پوشش ویروس حذف می‌شود، ۶) نسخه‌برداری از ژنوم ویروسی شروع می‌شود. ۷) و باز مجدداً پوشش تشکیل می‌شود، مراحل ۶ و ۷ باعث کثیر ویروس می‌شوند. ۸) ویروس‌های کپسیددار هسته را ترک می‌کنند و ۹) به سمت غشای پلاسمایی حرکت می‌کنند و در این‌جا به‌منظور تشکیل BV، غشایی را از سلّول میزبان به خود الحاق می‌کنند. ۱۰) سپس BV سلول‌های بیشتری را آلوده می‌کند. ۱۱) در مرحلهٔ بعد، BV که پوشش خود را از دست داده و از سیتوپلاسم سلولی به هسته می‌رود. در ادامهٔ مراحل ترجمه و تولید کپسید ویروسی صورت می‌گیرد که منجر به تولید BV بیشتری می‌شود (مراحل ۴ تا ۱۰). ۱۳) طی مراحل آلودگی در فاز تأخیری، ویروس‌های کپسیددار در هسته در پلی‌هیدرا قرار می‌گیرند و از سلّولی که اکنون دچار مرگ شده است به سلّول سالم دیگری می‌رود.

در عین حال این سرم پرهزینه بوده، باعث کف‌زایی زیاد محیط کشت شده و در کار ترکیب‌های معرف آلودگی تداخل ایجاد می‌کند. به‌طور کلی در محیط‌های کشت حشرات اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها و چربی‌های ضروری برای رشد وجود دارد. ویژگی خاص محیط‌های کشت بدون سرم چگالی سلّولی بیشتر در آن است (کاندری[1] و همکاران، ۲۰۰۵).

۶-۱-۳- سیستم‌های بیان در باکیولوویروس

امروزه از روش‌های متعدّدی برای بیان ژن با استفاده از باکیولوویروس در سلّول حشرات استفاده می‌شود. این روش‌ها به‌منظور ارتقای سیستم‌های انتقال و بیان ژن‌های موردنظر در ژنوم ویروسی، از نظر کارایی و راحتی بیشتر معرّفی شده‌اند (فادتر[2] و همکاران، ۱۹۹۹).

۶-۱-۳-۱- سیستم BacPAK6

این سیستم بیان، که از ابتدای دهۀ ۱۹۸۰ به‌دلیل ایمنی و بیان بالا استفاده از آن شروع شد، هم-اکنون به یکی از روش‌های مرسوم برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقادیر بالا در سلّول‌های یوکاریوتی تبدیل شده‌است. مزیّت اصلی این سیستم استفاده از راه‌انداز *polh* در تولید پروتئین است. *ژن polh* یک ژن غیر ضروری برای تکثیر ویروس در محیط کشت حشرات است. بنابراین این قسمت از ژنوم می‌تواند حذف شود، بدون این‌که تأثیری در عملکرد ویروس داشته باشد. ژن قبل از ورود به داخل ناقل بیان ویروسی باید ابتدا در ناقل انتقال دهنده‌ای که دارای توالی دو طرف[3] ژن *polh* است، همسانه شود (کاپلو[4] و همکاران، ۲۰۰۵).

در مرحلۀ بعد هردوی ناقل انتقالی (دارای ژن مربوط به پروتئین موردنظر و ژنوم ویروسی) هم‌زمان وارد سلّول حشره میزبان می‌شود و نوترکیبی بین توالی‌های کناری (مربوط به ژن *polh*) دو مولکول DNA نوترکیبی همسان[5] اتفاق می‌افتد. در نتیجه، ژن موردنظر در مکان ژن *polh* وارد ژنوم ویروس می‌شود و بدین ترتیب ژنوم نوترکیب ویروسی ایجاد می‌شود. همان‌طور که گفته شد در نهایت ژنوم ویروس و متعاقب آن ژن موردنظر در هسته میزبان تکثیر می‌شود. ژن ورودی تحت

---

[1] Condreay
[2] Phadtare
[3] Flank
[4] Kopplow
[5] Homologous Recombination

کنترل راه‌انداز قوی*polh* ویروسی قرار می‌گیرد. این جایگزینی باعث می‌شود محصول اصلی ژن *polh*، پلی‌هیدرا بیان نشود.

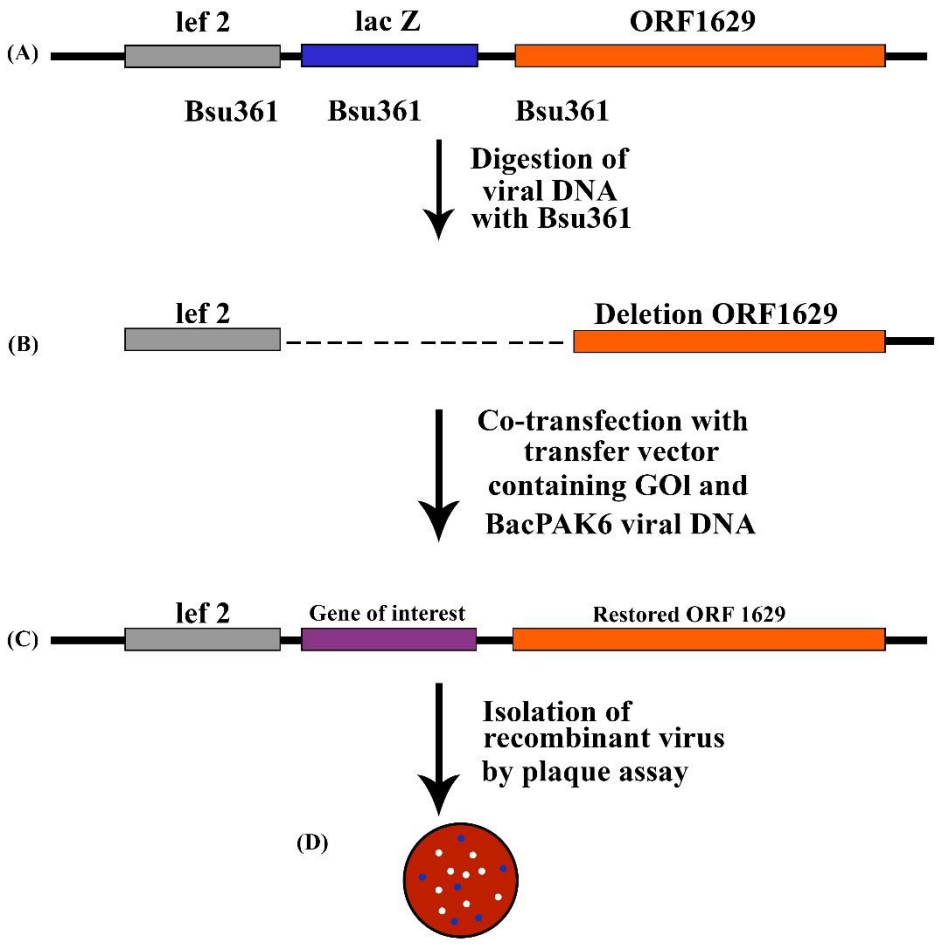
ذکر این نکته ضروری است که نوترکیبی همسان برای انتقال ژن موردنظر از ناقل انتقالی به ژنوم ویروس کارایی پایینی دارد. سلّول‌های حشرات بعد از هم‌آلودگی[1]، هردوی ژنوم ویروس نوترکیب و والدینی را تولید می‌کند که فراوانی نوترکیب‌ها پایین و تقریباً برابر ۰/۱ درصد است.

به‌منظور بهبود کارایی تولید ویروس نوترکیب، یک محل برش برای آنزیم محدودکننده *Bsu*361 در ژنوم ویروس و در مکان ژنی *polh* قرار داده شده است. این محل برش اجازه خطی کردن ژنوم ویروس قبل از هم‌آلودگی و متعاقب آن افزایش کارایی نوترکیبی را می‌دهد. برای افزایش بیشتر کارایی، از جایگاه چندتایی همسانه‌سازی[2] مربوط به *Bsu*361 استفاده می‌شود (شکل ۴-۲) (گاردان[3] و همکاران، ۱۹۷۱).

ورود قطعه از طریق حذف جزئی یک ژن نظیر ORF1629 صورت می‌گیرد. این عمل باعث جلوگیری از تکثیر ویروس می‌شود، در نتیجه کارایی تولید ویروس نوترکیب تا ۹۰ درصد افزایش می‌یابد. ورود ژن *lacZ* از *اشرشیا کولی* در داخل ژن *polh* با جانشینی به‌جای ژن آن، سبب تولید BacPAK6 به‌صورت تجاری می‌شود. این ژنوم ویروسی از طریق برش آنزیمی با آنزیم *Bsu*361 ناحیه *lacZ* و بخشی از ORF1629 خود را از دست می‌دهد. اکنون این ژنوم ویروسی آماده هم-آلودگی با ناقل انتقالی (حامل ژن موردنظر) است. این ژنوم قدرت تکثیر خود را از دست داده است. هم‌آلودگی بین DNA مربوط BacPAK6 و ناقل انتقالی باعث انتقال ژن موردنظر و قسمت حذف شده ORF1629 به BacPAK6 و در نتیجه حلقوی شدن آن از طریق جایگزینی آللی[4] می-شود (بنت[5] و همکاران، ۱۹۹۸).

---

[1] Co-transfection
[2] Multiple Cloning Site (MCS)
[3] Gurdon
[4] Allelic Replacement
[5] Bennett



شکل ۶-۲- نمایی از تولید ویروس نو ترکیب با استفاده از BacPAK6. ژن موردنظر در محلّ ژن lacZ وارد می‌شود و پس از بسته‌بندی ژنوم ویروس و آلودگی سلول‌ها با ویروس‌های تراریخت، سلّول‌ها به محیط کشت دارای IPTG منتقل می‌شوند. کلونی سلول‌های دارای ویروس غیرنوترکیب پلاک آبی و دارای ناقل نوترکیب دارای پلاک سفید هستند.

بازگشت این قطعهٔ ضروری برای تکثیر، باعث تکثیر ژنوم نوترکیب ویروس در هسته سلّول حشرات می‌شود. در آخرین مرحله از طریق خالص‌سازی پلاک‌های مناسب[1]، ژنوم ویروسی نوترکیب شناخته می‌شود (شکل۶-۲). در این مرحله حضور ژن *lacZ* اجازه انتخاب از طریق رنگ

[1] Plaque Purification

پلاک‌ها را می‌دهد. در ظرف آزمایش پلاک‌های مربوط به ویروس‌های نوترکیب بی‌رنگ هستند. به‌رغم این پلاک‌ها، پلاک‌های مربوط به ویروس‌های والدینی آبی هستند. چرا که با حضور ژن *lacZ* در ژنوم ویروس‌های والدینی X-gal موجود در محیط کشت باعث آبی شدن پلاک‌ها می‌شود (ویکرت[1] و همکاران، ۱۹۹۹).

۲-۳-۱-۶- سیستم Bac-to-Bac

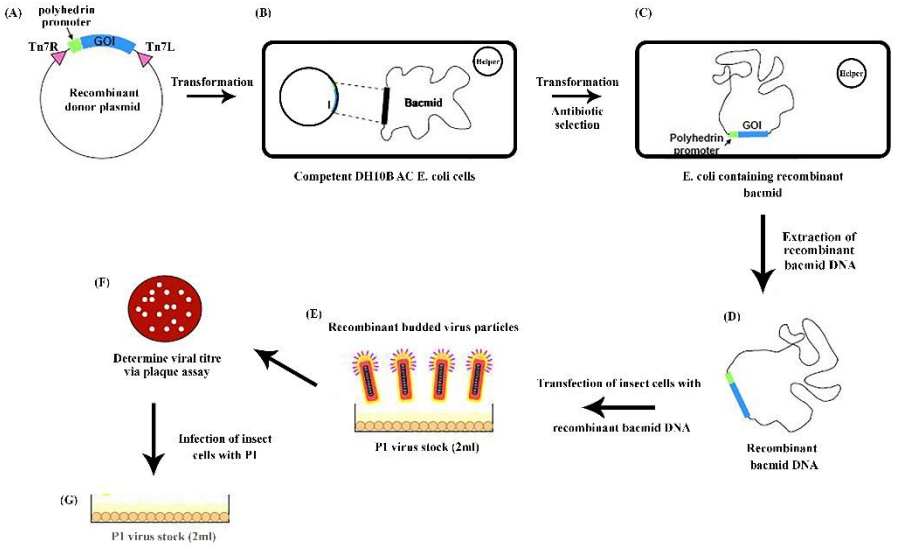
سیستم بیان باکیولوویروس از نوع Bac-to-Bac روشی کارآمد و سریع برای تولید ویروس‌های نوترکیب است (شکل ۶-۳). این سیستم بر اساس جابجاشدگی کاست موردنظر از ناقل انتقالی به داخل ناقل ماهواره‌ای باکیولوویروس و سپس تکثیر این ناقل در باکتری اشرشیاکولی است. ناقل ماهواره‌ای باکیولوویروس که باسمید[2] نامیده می‌شود دارای تعداد کمی از رپلیکون‌های مینیF، یک ژن مقاومت به کانامایسین و ژن *lacZα* است.

باسمید در درون سلول‌های اشرشیاکولی به‌صورت پلاسمید بزرگی که حامل ژن مقاومت به کانامایسین[3] (*kan*^{r}) است وجود خواهد داشت و در حضور X-gal و IPTG تولید کلنی‌های آبی رنگ می‌کند.

در این روش، نظیر روش BacPAK6، ژن موردنظر قبل از تولید ویروس نوترکیب در داخل یک پلاسمید انتقال دهنده در مکان ژنی واجد راه‌انداز *polh* همسانه می‌شود. دو طرف کاست بیان بازوهای چپ و راست ترانسپوزون Tn7 قرار دارد، همچنین دارای ژن مقاومت به جنتامایسین[4] و یک علامت پلی‌آنیلاسیون برای تشکیل یک مینی Tn7 است. ناقل انتقالی نوترکیب به داخل باکتری اشرشیا کولی که دارای باسمید است منتقل می‌شود که در آن یک پلاسمید کمکی[5] یک ترانسپوزاز را کد می‌کند (کولاک آبلیک[6] و همکاران، ۲۰۰۱).

---

1 Weikert
2 Bacmid
3 Kanamycin
4 Gentamicin
5 Helper plasmid
6 Kullak-Ublick



شکل۶-۳- تولید ویروس نوترکیب با استفاده از سیستم Bac-to-Bac.(برای توضیحات به متن مراجعه شود)

انتقال عنصر مینی Tn7 از ناقل انتقال‌دهنده نوترکیب به جایگاه مینی Tn7 بر روی باسمید به کمک ترانسپوزاز کد شده توسط پلاسمید کمکی صورت می‌گیرد. ورود ژن موردنظر به داخل باسمید باعث قطع ژن *lacZα* و در نتیجه تولید کلنی‌های سفید می‌شود. والدین دارای باسمید بدون تغییر تولید کلنی‌های آبی می‌کنند (ماگر[1] و همکاران، ۱۹۹۸).

به‌منظور ازدیاد باسمید نوترکیب، DNA ویروسی باید از سلّول باکتری استخراج و متعاقب آن وارد سلّول حشره شود. ژنوم نوترکیب ویروسی تحت نسخه‌برداری و ترجمه قرار گرفته و در نتیجه ذرّات ویروسی را تولید می‌کند. در دورهای متناوب تکثیر و برداشت این ذرّات ویروسی، می‌توان تولید در سطح تجاری برای آن‌را انجام داد (کاست[2] و همکاران، ۲۰۰۲).

روش Bac-to-Bac نسبت به روش نوترکیبی هومولوگی (استفاده از BacPAK6) چندین مزیّت دارد. اولا، DNA ویروسی استخراج شده از کلنی‌های باکتری با DNA والدینی مخلوط نمی‌شود. بنابراین در این‌جا نیازی برای جداسازی DNA نوترکیب از نوع والدینی آن و دورهای متوالی برای خالص‌سازی آن وجود ندارد. در این روش جداسازی و خالص‌سازی ویروس

[1] Mager
[2] Kost

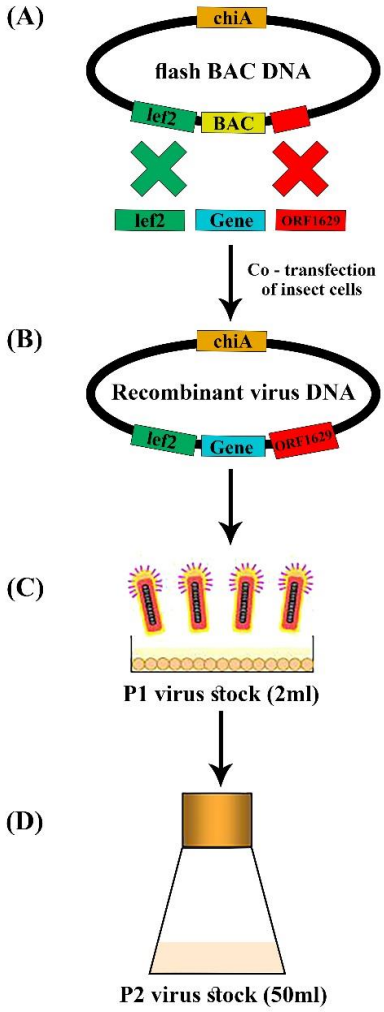
نوترکیب از ۴ تا۶ هفته به ۷ الی ۱۹روز کاهش می‌یابد. ثانیاً، این سیستم اجازه تولید و جداسازی هم‌زمان ویروس‌های نوترکیب مختلف توسط یک محقّق را می‌دهد. علاوه بر این، این سیستم توانایی اتّصال به مسیر نوترکیبی هومولوگی را داراست. از طرف دیگر این سیستم دارای پلاسمیدهای مختلفی است که امکان ورود چندتایی ژن‌ها (چند ژن به‌طور هم‌زمان) را به درون یک ژنوم ویروسی می‌دهد.

۳-۳-۱-۶- سیستم flashBAC

اخیرا فن‌آوری جدیدتری برای تولید ویروس‌های نوترکیب ابداع شده است که در مقایسه با سیستم‌های معمول مزیت قابل توجهی دارد. سیستم flashBAC مزیّت‌های سیستم نوترکیبی هومولوگی را با سیستم‌های بر پایهٔ باکتری ترکیب می‌کند. سیستم flashBAC نیاز برای جدا کردن ویروس‌های نوترکیب و غیر نوترکیب را برطرف می‌کند و در نتیجه در زمان لازم برای تولید محلول ذخیره با غلظت بالای ویروس صرفه‌جویی می‌شود. سیستم flashBAC بر اساس ژنوم تغییریافتهٔ AcMNPV طراحی شده است به‌طوری‌که در محل ژن *polh* و در واقع به‌جای آن دارای کروموزوم ساختگی باکتریایی[1] می‌باشد. ورود BAC علاوه بر حذف ژن *polh* باعث حذف جزئی ORF1629 نیز می‌شود. ورود BAC باعث می‌شود که این ژنوم نوترکیب بتواند در سلّول باکتری باقی مانده و تکثیر شود. در مرحلهٔ بعد جداسازی و خالص‌سازی این ژنوم صورت می‌گیرد. از طرفی حذف جزئی در محل ORF1629 باعث می‌شود که ژنوم ویروس نتواند در سلّول حشره فعّال باشد و تکثیر کند (شکل ۴، A-۶). در ادامه، نوترکیبی بین DNAی flashBAC با DNAی ناقل حامل ژن موردنظر در داخل سلّول حشره صورت می‌گیرد که قطعات از دست رفته و متعاقب آن عملکرد آن قطعات برگردانده می‌شود (شکل ۴، B-۶) . به‌طور مشابهی ژن موردنظر وارد ژنوم ویروسی در محل *polh* می‌شود و تحت کنترل راه‌انداز آن نیز قرار می‌گیرد و به‌همراه آن تکه‌ای از BAC حذف می‌شود. ژنوم نوترکیب ویروسی با برگشت این قطعات توانایی تکثیر در سلّول حشره را نیز دریافت می‌نماید. ذرّات ویروسی نوترکیب (دارای ژن موردنظر) در محیط کشت سلّول‌های آلوده تولید می‌شوند که می‌توان آن‌ها را جمع‌آوری نمود (شکل۴،C-۶) . عدم حضور قسمت حذف شده ORF1629 از تکثیر هرگونه ژنوم ویروسی غیر نوترکیب ممانعت بعمل می‌آورد. ازاین‌رو نیاز به تجهیزات لازم برای حذف ژنوم والدینی وجود ندارد. در ادامه، ویروس می‌تواند برای تولید محلول ذخیره با غلظت بالای ویروس به‌طور مستقیم به سلّول حشره وارد شود.

[1] Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)

سیستم flashBAC با ناقل انتقالی در محل ژن *polh* هم‌خوانی لازم برای ایجاد نوترکیبی در سلول حشره را دارد. ناقل‌هایی که دارای راه‌انداز *polh*، از راه‌اندازهای ژن‌های دیگر نظیر *ie1*،*p10* و *gp64* هستند. سیستم flashBAC در مقایسه با سیستم‌های بیان دیگر باکلوویروسی به‌دلیل تولید مقادیر بالای پروتئین دارای جایگاه ویژه‌ای است (کیتس[1] و همکاران، ۱۹۹۳).



[1] Kitts

شکل۶-۴- تولید ویروس نوترکیب با استفاده از سیستم flashback (برای توضیحات به متن مراجعه شود)

در میان ژنوم باکلوویروس ژن‌های خاصی وجود دارند که در تکثیر و تولید ویروس در شرایط درون شیشه‌ای ضروری نیستند. یکی از این ژن‌ها، ژن کدکننده آنزیم کیتیناز[1] است. این آنزیم با فعّالیّت کیتینازی خارجی و داخلی[2] خود عامل جابجایی ویروس‌ها از میزبانی به میزبان دیگر است. در ادامه، آلودگی حشره، کیتیناز به‌همراه پروتئین‌های دیگر ویروسی که کاتپسین[3] نامیده می‌شوند برای شکستن پوسته (کوتیکول)[4] میزبان، آبگونه شدن[5] آن و آزاد کردن پلی‌هیدرا به‌منظور آلوده کردن بیشتر میزبان مشارکت می‌کند. آنالیز هم‌کانونی[6] و میکروسکوپ الکترونی، جایگاه کیتیناز در شبکهٔ اندوپلاسمیک[7] در طی آلودگی با باکلوویروس را تایید کرده است. این ژن شدیداً از راندمان عملکرد مسیر ترشّحی می‌کاهد و متعاقب آن بر سطح تولید پروتئین نوترکیب اثر می‌گذارد (کستانتینو[8] و همکاران، ۲۰۰۳).

حذف ژن *chiA* از flashBAC راندمان مسیر ترشّحی در تولید پروتئین‌های نوترکیب در سلّول‌های حشره را بهبود بخشیده و میزان تولید پروتئین‌های غشاء در مقایسه با پروتئین‌های تولید شده ویروس‌های نوترکیبی که کیتیناز را سنتز می‌کنند را افزایش می‌دهد. در مرحله‌ای از روند کار در سیستم *flash*BAC به‌دلیل استفاده از ابزارهای روبوتیک در تولید ویروس‌های نوترکیب بدون نیاز به استفاده از خالص‌سازی پلاک، مراحل کار به‌سهولت انجام می‌گیرد. تحقیقات نشان داده است که مخلوط‌های هم‌آلوده می‌تواند از چندین ویروس نوترکیب برای آلوده سازی سلّول-های حشرات مورد استفاده قرار گیرند. به‌علاوه، این فرآیند می‌تواند منحصرا در سلول‌های حشرات انجام شود، که این شرایط باعث به حداقل رساندن خطر آلودگی سلّول‌های باکتری موجود در محیط کشت شده و ازطرف دیگر از هم‌آلودگی بین کشت‌های سلّولی حشره و باکتریایی جلوگیری می‌کند (براگونزی[9] و همکاران، ۲۰۰۰).

---

[1] Chitinase
[2] Exo and endochitinase
[3] Cathepsin
[4] Cuticle
[5] Liquefaction
[6] Confocal analysis
[7] Endoplasmic Reticulum (ET)
[8] Costantino
[9] Bragonzi

به‌طور کلی دست ورزیِ ژنوم ویروس باکیولوویروس ابزار قدرتمندی را برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در هردوی سلّول‌های حشرات و پستانداران ارائه می‌دهد. پیشرفت‌ها در طراحی ناقل و سیستم‌های تنوع بیان باکیولوویروس باعث سادگی تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌شود، به‌ویژه در بعضی از سیستم‌ها نیاز به جداسازی و خالص‌سازی ویروس وجود ندارد. در کنار این، اتوماسیون و امکانات بالایِ تولید ویروس با استفاده از سیستم‌های روبوتیک برای تولید هم‌زمان چندین ویروس نیز بر سادگی کار افزوده‌است. این موارد باعث استفاده زیاد از سیستم باکیولوویروسی در اکثر آزمایشگاه‌های به‌منظور تولید پروتئین نوترکیب شده است (استودیر[1] و همکاران، ۱۹۹۰).

یکی از معایب سیستم بیان باکیولوویروس عدم هم‌خوانی مسیرهای فرآوری پروتئین در سلّول حشرات در مقایسه با سلّول‌های یوکاریوت‌های متکامل‌تر است. یکی از مشکلاًت از این دست، عدم وجود مسیرهای N-گلیکوزیلاسیون[2] در سلّول‌های حشرات است. با انتقال مسیرهای N-گلیکوزیلاسیون به سلول‌های حشرات و تولید سلّول‌هایی که توانایی انجام فرآیند گلیکوزیلاسیون را داشته باشند، می‌توان بر این مشکل فائق آمد. این امر باعث تولید پروتئین‌های نوترکیبی می‌شود که بیشترین شباهت را به پروتئین‌های طبیعی پستانداران داشته باشند. امکان دسترسی به توالی کامل باکیولوویروس وجود دارد، از طرفی دست ورزیِ بیشتر در ژنوم ویروس به‌منظور افزایش بهینه بیان پروتئین‌های نوترکیب در سلّول‌های حشرات و پستانداران ادامه خواهد داشت. امید می‌رود که در آینده از باکیولوویروس‌های نوترکیب به‌عنوان ناقل‌هایی برای انتقال ژن به لاین‌های سلّولی یوکاریوتی متکامل‌تر، نظیر آن‌چه که هم‌اکنون در سلّول حشرات صورت می‌گیرد، استفاده شود (لفرانکویس[3] و همکاران، ۱۹۹۸).

۲-۶- تهیّهٔ پروتئین‌های نوترکیب به‌وسیلهٔ سلّول‌های پستان‌دارن

کشت سلّول حیوانی برای اولین بار در سال ۱۹۰۷ انجام گرفت و پیشرفت دراین زمینهٔ تحول بنیادی را در شناخت سوخت‌وساز و ژنتیک سلّول جانوری بوجود آورد. برای کشت سلّول‌های جانوری، ابتدا بافت موردنظر با تریپسین تیمار می‌شود، سپس در محیط کشت مناسب کشت داده شده تا یک لایهٔ سلّولی را تشکیل دهد. نکتهٔ مهم در کشت سلّول‌های جانوری این است که این

[1] Studier
[2] N-glycosylation
[3] Lefrancois

سلّول‌ها سلّولی قبل از مرگ خود ۱۰۰-۵۰ بار تقسیم می‌شوند، که در نتیجه بعدازاین تقسیم‌ها سلّول دچار مرگ سلّولی می‌شود. این مشکل با بکارگیری سلّول‌های سرطانی برطرف می‌شود چراکه با استفاده ازسرطانی کردن سلّول‌ها می‌توان آنها برای مدت زمان طولانی نگهداری کرد. سلّول‌های سرطانی دارای سوخت‌وساز بیشتری در تقسیم سلّولی و دیگر اعمال سلّولی هستند.

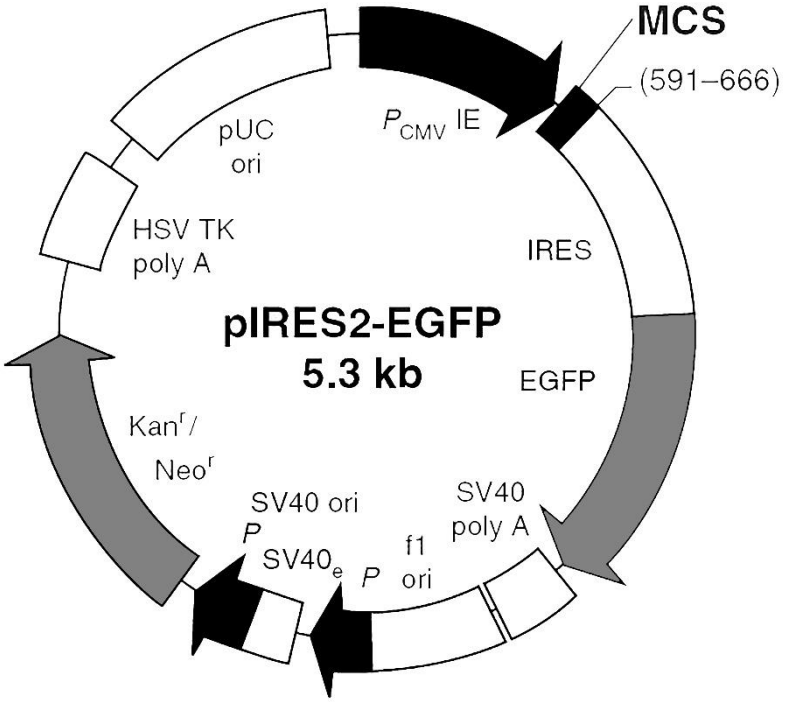
محیط کشت سلّول‌های جانوری بسیار پیچیده‌تر از محیط کشت دیگر موجودات است. محیط کشت سلّول جانوری باید از نظر pH، استریل بودن، ایزوتونیک بودن، سرم‌های مورد نیاز، مقدار مناسب هموگلوبین، آنتی‌بیوتیک و غیره کاملاً تنظیم باشد.

به هر حال با توجه به میزان دسترسی به امکانات گسترده کشت سلّولی، هزینه‌های کم در تهیهٔ محیط کشت و معرّف‌های لازم، تجاری‌سازی انواع کیت‌های انتقال و بیان، هم‌اکنون سلّول‌های پستان‌داران دارای استانداردهای لازم برای تولید پروتئین‌های نوترکیب هستند. عدم پیشرفت کار با سلّول‌های پستان‌دار می‌تواند به‌دلیل بیشتر بودن هزینه‌ها و طولانی‌تر بودن مراحل کار نسبت به کار با سلّول‌های موجودات تک‌سلّولی نظیر باکتری‌ها و حتی یوکاریوت‌های پست باشد. در کار با سلّول‌های پستان‌داران ناقل‌های تجاری متعددی وجود دارد. محصول این ناقل‌ها توانایی اتّصال به نشانگرهایی را دارد که محقّقان را قادر می‌سازد بدون استفاده از آنتی‌بادی و یا ترکیب‌های آنتی‌بیوتیکی، سلول‌های تراریخت را کشف کنند. مهم‌ترین عیب استفاده از آنتی‌بادی این است که ممکن است تهیه آنتی‌بادی مخصوص پروتئین موردنظر پرهزینه بوده و یا حتی موجود نباشد و ازطرفی انتخاب با نشانگر آنتی‌بیوتیکی برای تولید همسانه‌های نوترکیب و پایدار پستان‌داران کافی نیست. مشکل دیگر استفاده از آنتی‌بادی و آنتی‌بیوتیک امکان وجود ناخالصی آن‌ها در محصول نهایی است (یوک[1] و همکاران، ۲۰۰۲).

یکی از ناقل‌های مورد استفاده پلاسمید دوگانه بیان[2] pIRES2-EGFP[3] است. این ناقل دارای جایگاه درونی اتّصال ریبوزوم، عناصری برای تکثیر و انتخاب پروکاریوتی شامل pUC ori و Kan^r، عناصری برای تکثیر و انتخاب یوکاریوتی شامل SV40 ori و Neo^r، جایگاهی برای ترجمهٔ mRNA جدید تولیدی و علامت‌های پلی‌آدینالاسیون PCMV-IE، SV40 polyA و HSV TK

[1] Yuk
[2] Dual expression plasmid
[3] Plasmi internal ribosome entry site: جایگاه درونی اتصال ریبوزوم

polyA به‌منظور پایداری RNA، جایگاه چندتایی همسانه‌سازی[1] جهت ورود ژن موردنظر، نشانگر بیان کدکننده فلورسنت و جایگاه‌های اتّصال ریبوزوم شامل EGFP و IRES است (شکل ۶-۵).



شکل۶-۵- نمایی شماتیک از ناقل بیان پستان‌داران(pIRES2-EGFP). این ناقل دارای نقطهٔ شروع همانندسازی از پلاسمید PUC و ویروس SV40، جایگاه اتّصال ریبوزوم، ژن‌های مقاومت به کانامایسین و نئومایسین، توالی پلی‌A و نشانگر انتخابی ژن کدکننده پروتئین فلورسنت سبز (GFP)

با توجه به مشکلاّت تولید پروتئین نوترکیب در پستان‌داران، اهمیّت اصلی این تولید معمولاً به مطالعه چگونگی عمل و تنظیم بیان ژن‌های پستان‌داران و تولید پروتئین‌های دارویی محدود می‌شود. ناقل‌های بیان در پستان‌داران مشابه هم و از ساختار دیگر ناقل‌های یوکاریوتی تبعیّت می‌کنند. این ناقل‌ها عموماً دارای سازوکارهای انتقال ژن و بیان پروتئین نوترکیب مشابهی هستند. به‌طورکلی، ناقل‌های بیان یوکاریوتی دارای یک خاستگاه همانندسازی (معمولاً از یک ویروس حیوانی نظیر SV40[2]، توالی راه‌انداز، ژن یا ژن‌های نشانگر انتخابی، توالی‌های پایان رونویسی

[1] Cloning
[2] Simian Virus40

(نشانهٔ پلی‌آدنیلاسیون) می‌باشند. همه این عناصر ژنتیکی باید یا از ویروس‌های حیوانی و یا از ژن‌های حیوانی بدست آیند (هدیگر[1] و همکاران، ۲۰۰۴).

به‌منظور انتخاب سلّول‌های پستان‌دار نوترکیب از ژن Neo^r استفاده می‌شود. این ژن، آنزیم فسفوترانسفراز[2] را کد می‌کند. پس از اضافه شدن ترکیبی موسوم به G418 یا جنتسین[3] سلّول‌های غیرنوترکیب از بین می‌روند. در سلّول‌های تراریخت آنزیم فسفوترانسفراز از طریق افزودن گروه فسفات، G418 را فسفریله و متعاقب آن غیرفعّال می‌کند.

ترکیب G418 یک آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزید[4] است که ساختاری مشابه جنتامایسین B1 دارد. این ترکیب از گونه میکرومونوسپورا رودورانجا[5] به دست می‌آید که می‌تواند سنتز پروتئین را در سلّول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی متوقّف کند.

با توجّه به دشواری کار و پرهزینه بودن کشت سلّول‌های جانوری، از سوی دیگر راحتی کار و کم‌هزینه بودن کشت باکتریایی، به‌ندرت از کشت سلّول‌های پستان‌داران برای تولید پروتئین نوترکیب استفاده می‌شود، مگر در شرایطی که پروتئین تولیدی بسیار پرارزش باشد. دراین‌صورت مشکل دیگری وجود دارد و آن این است که ویروس‌های مورد استفاده می‌توانند در محصول تولیدی باقی بمانند. ازآن‌جا که عموماً از سلّول‌های پستان‌داران برای تولید پروتئین‌های ارزشمندی نظیر آنتی‌بادی و واکسن استفاده می‌شود، این ویروس‌ها ممکن است در بدن گیرنده اختلال ایجاد نمایند (دیکوس[6] و همکاران، ۲۰۰۴).

تولید پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از سلّول‌های پستان‌داران مزیّت‌های متعددی نسبت به سیستم‌های میکروبی دارد. به‌عنوان مثال سلّول‌های پستان‌داران توانایی ترشّح پروتئین‌های تولیدی را دارند که این مورد، نیاز به لیز کردن سلّولی را برطرف می‌کند. به‌علاوه این سیستم‌ها دارای توانایی انجام تغییرات پس از ترجمه نظیر گلیکولیزاسیون می‌باشند که برای عملکرد پروتئین‌ها مورد نیاز است، ولی سلّول‌های پستان‌داران به‌طور قابل‌توجّهی دارای سرعت رشد کندتر و نیاز غذایی پیچیده تری نسبت به باکتری‌ها هستند. به این دلیل برای تولید پروتئین‌ها در سطح تجاری و

---

[1] Hediger
[2] Phosphotransferase
[3] Geneticin (G418)
[4] Aminoglycoside antibiotic
[5] Micromonospora rhodorangea
[6] Deikus

تنظیم بهتر نیازهای غذایی آن، از سیستم‌های پیچیده بایوراکتور[1] استفاده می‌شود. لاین‌های سلولی با عملکرد بالای تولید پروتئین و محیط کشت از عوامل مؤثّر بر افزایش تولید پروتئین در پستان‌داران است. محیط کشت علاوه بر فیزیولوژی سلّولی بر بیان ژن موردنظر نیز تأثیرگذار است (جینکس رابرتسون[2] و همکاران، ۱۹۸۷).

یک مرحلهٔ مهم در تولید لاین‌های سلّولی تولید کننده پروتئین‌های نوترکیب، انتخاب همسانه‌های توانایی است که ژن موردنظر را در داخل سلّول خود جای داده‌اند. به‌منظور تولید در مقیاس صنعتی، با انتخاب همسانه‌ای که در آن ژن موردنظر به‌طور پایدار وارد ژنوم میزبان شده است، عملکرد بالایی از تولید پروتئین دور از انتظار نیست. طی مهندسی این لاین‌های سلّولی، ژن موردنظر با یک نشانگر انتخابی که به‌منظور انتخاب همسانه‌های نوترکیب از جمعیّت سلّولی وارد شده است، همراه می‌شود. ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر ژن نئومایسین[3] که مقاومت به G418 را ایجاد می‌کند و مقاومت به سموم نظیر دهیدروفولات‌ردوکتاز[4] که مقاومت به متوترکسیت[5] را ایجاد می‌کند، دو نوع معمول نشانگرهای انتخابی در سلّول‌های پستان‌داران هستند. مشکلی که در این نوع غربال‌گری وجود دارد این است که نشانگرهای انتخابی باعث افزایش در متابولیت سلّول‌های تراریخت و متعاقب آن صرف انرژی بیشتر شده که این خود باعث کاهش بیشتر در رشد سلّول می‌شود. در جمعیت‌های ناهمگن سلّولی، زیر همسانه‌های با تولید بالا به ندرت آشکار می‌باشند و اغلب به‌وسیلهٔ سلّول‌هایی با تولید پایین یا بدون تولید که دارای سرعت رشد بیشتری نیز هستند پوشیده می‌شوند. سلّول‌های غیرتراریخت که دارای اتلاف انرژی سلّولی کمتری نسبت به سلّول‌های تراریخت با تولید بالای پروتئین نوترکیب هستند، مانع رشد و تکثیر این سلّول‌ها می‌شوند. برای غلبه بر این مشکل روش‌های رقیق سازی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

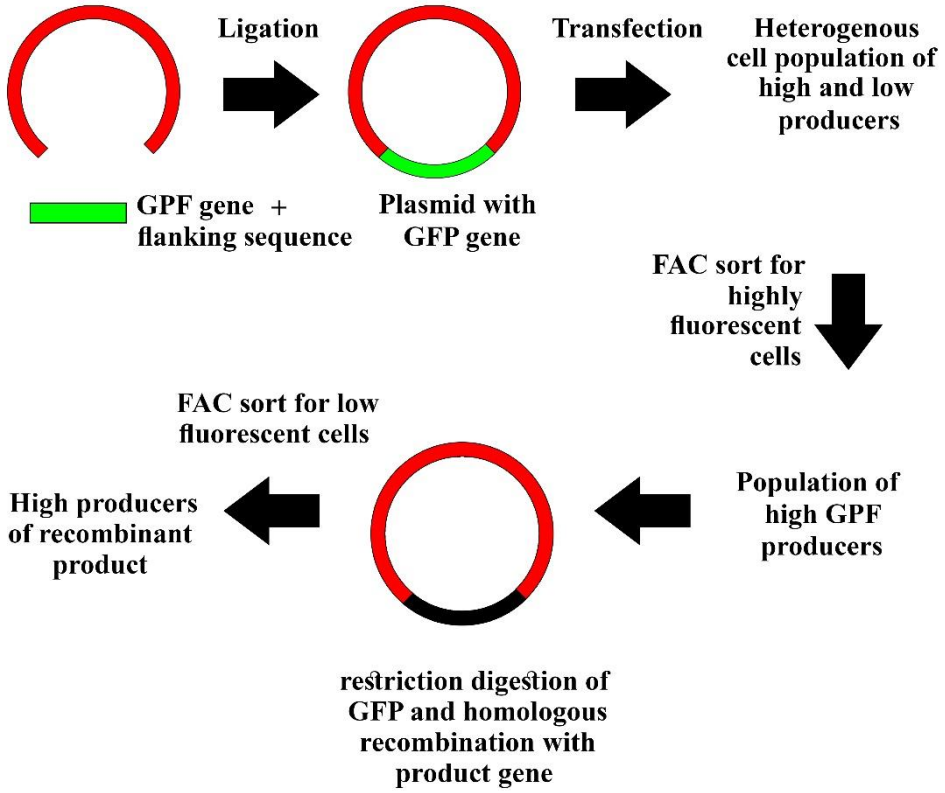
ورود یک ژن درون ژنوم میزبان به‌صورت تصادفی انجام می‌شود و تکثیر سلّول‌های دارای چند نسخه از ژن نوترکیب نسبت به سلّول‌هایی که دارای تعداد نسخهٔ، کمتری از ژن موردنظر هستند، کمتر است. بااین‌حال ممکن است حتی سلّول‌های تراریخت دارای تولید پایدار و بالایی نباشند، از این رو جدا کردن همسانه‌هایی که دارای تولید بالای پروتئین هستند نیاز به چندین مرحله غربال‌گری و آزمون دارد. برای کاهش بعضی از این مشکلات روش‌های جدیدی استفاده

---

[1] Bioreactor
[2] Jinks-Robertson
[3] Neomycin
[4] Dihydrofolate Reductase (DHFR)
[5] Methotrexate

می‌شود. یکی از این روش‌ها استفاده از پروتئین فلورسنت سبز[1] به‌عنوان یک نشانگر انتخابی و سورتر سلّول فعال با فلورسنت[2] برای انتخاب نشانگر است. شکل ۴-۶ یک نمای شماتیک از این روش را نشان می‌دهد. چنانکه درتصویر دیده می‌شود GFP به‌عنوان یک پروتئین هم‌جوش با بخشی از محل قرارگیری ریبوزوم یا قسمتی از راه‌انداز وارد پلاسمید می‌شود. سلّول‌هایی که دارای سطوح بیشتری از GFP باشند، پروتئین موردنظر بیشتری را تولید خواهند کرد که این خود روشی است که می‌توان با آن سلّول‌های دارای تعداد بیشتری از پلاسمید نوترکیب یا سطوح بالایی از نسخه برداری ژن نوترکیب را تشخیص داد. در آخرین مرحله ژن مربوط به تولیدGFP با استفاده از آنزیم محدودکننده با ژن پروتئین نوترکیب جایگزین می‌شود. اگرچه این روش‌ها مؤثّر بوده‌اند ولی نگرانی‌هایی در مورد لاین‌های سلّولی دارای GFP به‌ویژه برای تولید پروتئین‌های با مصرف انسانی نظیر دارویی وجود دارد. علاوه براین تولیدGFP بعد از جدا کردن همسانه‌های موردنظر غیر ضروری است. این منبع جدید سلّولی می‌تواند به افزایش رشد سلّول و تولید پروتئین نوترکیب منجر شود (مارکوئنز[3] و همکاران، ۲۰۰۴).

[1] Green Fluorescent Protein (GFP)
[2] Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)
[3] Márquez



شکل۶-۶- نمایش شماتیک از روش انتخاب سریع کلون‌های سلّولی با تولید بالای پروتئین نوترکیب در سلّول پستانداران.(برای توضیحات به متن مراجعه شود)

هم‌چنان‌که در شکل ۶-۶ دیده می‌شود ناقل‌های پلاسمیدی دارای cDNA کدکنندهٔ GFP بوده و به‌علاوه توالی‌های شناخته شده‌ای در دو طرف این ژن دارند. سلّول تراریخت واجد ناقل ناقل GFP که FACS هستند به‌منظور تعیین میزان تابش فلورسنت مورد غربال قرار می‌گیرند که این منجربه انتخاب سلّول با تولید بیشتر پروتئین نیز می‌گردد. پس از آن در لاین‌های سلّولی که مقادیر بالای تولید پروتئین هستند ژن GFP با ژن موردنظر جایگزین می‌شود. در مرحلهٔ بعد سلّول‌هایی که ژن کدکننده پروتئین موردنظر را دریافت کرده‌اند با استفاده از FACS مورد بررسی گرفته و انتخاب می‌شوند، با این تفاوت که در این مرحله انتخاب سلّول‌های با شدت فلورسنت کم‌تر انجام می‌شود که به دلیل از دست دادن ژن تولید GFP در این سلّول‌ها است. سرانجام

همسانه‌های انتخاب شده به‌منظور بررسی میزان و پایداری تولید مورد آزمون قرار می‌گیرند. این روش باعث به جداسازی مؤثّر سلّول‌هایی می‌شود که توانایی تولید زیاد و پایدار پروتئین موردنظر را دارند (رین[1] و همکاران، ۱۹۹۸).

۱-۲-۶- طراحی محیط کشت و اثر آن بر بیان ژن در سلّول‌های پستان‌داران

محیط کشت نقش بسیار مهمی بر روی بازده و کیفیت پروتئین تولیدی حاصل از سلّول پستان‌داران دارد. سلّول‌های پستان‌داران برای رشد سلّولی و سنتز پروتئین به ترکیبی از مواد غذایی نظیر قندها، اسیدهای آمینه، فلزات، ویتامین‌ها و کوفاکتورها نیاز دارند. از طرفی دیگر شرایط محیط کشت، بر روی گلیکوزیلاسیون که یک جنبهٔ مهم از فرآوری پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد نیز تأثیرگذار است. امروزه از محیط کشت سلّولی دارای سرم جنینی گاوی به‌منظور کشت سلّول‌های پستان‌داران، و همان‌طور که توضیح داده شد برای حشرات نیز، استفاده می‌شود. این سرم همه ترکیبات مورد نیاز برای رشد سلّولی و تولید پروتئین را فراهم می‌کند. اگرچه در کشت سلّولی در مقیاس صنعتی هنوز هم از سرم استفاده می‌شود ولی عموماً تهیه محیط‌های کشت به دلایل فنی و اقتصادی به سمت کاهش استفاده از این سرم و یا حتی حذف آن پیش می‌رود. عیب دیگر استفاده از سرم‌ها این است که تنوّع موجود بین انواع سرم‌ها تأثیر معنی‌داری را بر محیط کشت و متعاقب آن بر تولید پروتئین می‌گذارد. به دلیل این‌که این سرم از موجود زنده استخراج می‌شود براساس شرایط محیطی، ترکیب آن از یک موجود به موجود دیگر متفاوت است. با توجه به مشکلاتِ گفته شده، در مواردی از محیط کشت بدون سرم استفاده می‌شود (گروس[2] و همکاران، ۱۹۸۶).

محیط‌های کشت بدون سرم دارای ترکیبات پایه‌ای هستند که با انسولین[3]، ترنسفرین[4]، آلبومین[5] و دیگر مواد پروتئینی غنی شده‌اند که اغلب از بافت‌های جانوری استخراج می‌شوند. منشأ جانوری این ترکیبات باعث نگرانی‌هایی به دلیل وجود عوامل بیماری‌زا نظیر ویروس‌ها یا پریون‌های به‌جا مانده از حیوانی است که از آن استخراج شده‌اند، می‌شود. از این‌رو تحقیقات بر روی استفاده از

---

[1] Ren
[2] Gros
[3] Insulin
[4] Transferrin
[5] Albumin

محیط‌های کشت بدون ترکیبات مشتق شده از حیوانات متمرکز است. به‌علاوه استفاده از محیط کشت بدون پروتئین، خالص‌سازی را آسان کرده و سلامت پروتئین نوترکیب تولیدی، به‌ویژه جهت تولید پروتئین‌های دارویی را افزایش می‌دهد.

۲-۲-۶- افزایش کارایی تولید پروتئین در سلول پستانداران

با این که اصول تولید پروتئین‌های نوترکیب در پستانداران از نیمه دهه ۱۹۸۰ تغییر نکرده است ولی کارایی لاین‌های سلولی نوترکیب بالاخص در دو دهۀ گذشته افزایش پیدا کرده است. از فرآیندهای تولیدی با تانک‌های گردان [1] در سال ۱۹۸۶ تا فرآیندهای تولید پیشرفته صنعتی در سال‌های اخیر، تلاش‌های زیادی برای افزایش عملکرد تولید لاین‌های سلّولی صورت گرفته‌است.

در سال ۱۹۸۶ مقدار سلّول‌ها با غلظت حداکثر ۲×۱۰^{۶} سلّول در میلی لیتر با مدت زمان تولیدی هفت روزه مقدار تولید پروتئینی کمتر از ۱۰ پیکوگرم برای هر سلّول در هر روز را داشته است، که نهایتاً مقدار تولید به حدود ۵۰ میلی‌گرم در لیتر می‌رسید. ولی در سال‌های اخیر غلظت سلّولی پایین به میزان $۱۰^{۵}$ سلول در هر میلی لیتر و یا غلظت سلّولی بالا به میزان $۱۰^{۷}$ سلّول در هر میلی لیتر در مدت زمان حدود سه هفته‌ای میزان تولیدی حدود ۹۰ پیکوگرم در هر سلّول در روز با میزان تولید کل ۴/۷ گرم در لیتر را ایجاد می‌کند. این مقدار تولید، تولید بالایی محسوب شده و امروزه در فرایندهای صنعتی استفاده می‌شود. این میزان بازده بالا که در روش‌های امروزی دیده می‌شود نتیجۀ سال‌ها تحقیق بر روی درک هرچه بهتر بیان ژن، سوخت‌وساز و رشد سلّول‌های پستانداران است. در کل تلاش برای بهبود ناقل‌ها، مهندسی سلّول میزبان، توسعۀ محیط کشت، روش‌های غربالگری و توسعۀ مراحل فرآوری متمرکز شده است (کینگ[2] و همکاران، ۱۹۹۲).

در سال ۱۹۷۳ نشان داده شد که اگر سلّول‌های پستانداران در معرض ذرّات DNA و فسفات کلسیم قرار گیرند امکان انتقال DNA به داخل سلّول‌های کشت شده وجود دارد. بااین‌که کارایی انتقال ژن با استفاده از ویروس بسیار بالاتر از انتقال ژن غیرویروسی است، ولی بااین‌حال به دلیل احتمال آلودگی به عوامل بیماری‌زا و یا حتّی باقی‌ماندن ویروس ناقل، محقّقان روش‌های غیرویروسی را ترجیح می‌دهند. امروزه انتقال ژنی با استفاده از فسفات کلسیم، الکتروپوریشن[3]، لیپوفکشن[4] و تفنگ ژنی[1] به‌طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرد، چراکه مؤثّر و دقیق است. ولی

[1] Stirred tank
[2] King
[3] Electroporation
[4] Lipofection (Liposome Transfection)

از آنجاکه مطالعات مقایسه‌ای کافی صورت نگرفته است، نمی توان گفت کدام یک از این روش‌ها نسبت به دیگری برتری دارد (فینکلستین[۲] و همکاران، ۱۹۸۷).

ژن موردنظر و ژن انتخابی می‌توانند بر روی یک ناقل و یا به‌صورت جدا از هم قرار داشته باشند. در زمانی که بر روی یک ناقل قرار دارند می‌توانند به‌صورت یک mRNA پلی‌سیسترونیک[۳] بیان شوند.

به‌منظور افزایش احتمال بدست آوردن لاین‌های سلّولی تولیدکننده مقدار بالای پروتئین، بهتر است که ژن انتخابی دارای یک راه‌انداز ضعیف باشد. با این که این روش معمولاً کارایی آلودگی را کاهش می دهد با این حال سلّول‌های حاصل از غربالگری دارای مقدار بالای پروتئین خواهند بود. همان‌طورکه گفته شده در این‌جا نیز خطی کردن پلاسمید قبل از آلودگی، کارایی آلودگی را افزایش می دهد. ولی به دلیل فعّالیت اندو و اگزونوکلئازی بعد از حدود یک تا دو ساعت بعد از ورود پلاسمید به داخل هسته، پلاسمیدهای ابرمارپیچ به پلاسمیدهای خطّی تبدیل می‌شوند. لیگازهای هسته پیوند کووالان مولکول‌های پلاسمید را برقرار می‌کنند و آنزیم‌های نوترکیب الحاق تصادفی این کانکاتمرها[۴] را کاتالیز می‌کنند و به‌صورت غیرهمولوگی وارد DNA میزبان می‌شود. اتّصال پلاسمید قبل از فرآیند الحاق تعدد ایجاد پلاسمید را کاهش می‌دهد. همهٔ فرآیندهای دست‌ورزی ژنتیکی بر پایهٔ لاین‌های سلّولی موجود برنامه‌ریزی می‌شود. محل الحاق در سرعت نسخه‌برداری ژن موردنظر به دلیل اثرمکان[۵] بسیار مهم است. الحاق به داخل هتروکروماتین‌های غیر فعّال، به بیان کم و یا عدم بیان منجر می‌شود. این در حالی است که اگر الحاق در یوکروماتین فعّال صورت گیرد، بیان بالایی مورد انتظار است. ولی صرف ورود ژن موردنظر به کروماتین برای اطمینان از بیان طولانی و مداوم ژن موردنظر نمی‌تواند کافی باشد. در موارد متعدّدی ممکن است بیان ژن در سلّول‌های پستان‌دار به سرعت غیرفعّال یا خاموش شود که می‌تواند به دلیل اثر همسایگی ژن‌های اطراف باشد. از طرفی هیپواستیلاسیون[۶] هیستون، متیلاسیون[۷]

---

[1] Gene gun یا biolistic
[2] Finkelstein
[3] Polycistronic mRNA
[4] Concatemers
[5] Position effect
[6] Hypoacetylation
[7] Methylation

لایزین شماره نه هیستون H3 و یا افزایش در متیلاسیون CG در راه‌انداز ژن موردنظر باعث خاموشی آن شود (گوبین[1] و همکاران، ۱۹۹۷).

۳-۶- تهیهٔ پروتئین‌های نوترکیب به‌وسیلهٔ سلّول‌های گیاهی

با پیشرفت مهندسی ژنتیک گیاهی، تلاش‌های زیادی برای استفاده از گیاهان به‌عنوان کارخانه‌های تولید پروتئین صورت گرفته است. در گیاهان محصول نهایی به‌عنوان پروتئین نوترکیب، تنوّع گسترده و جالب توجّهی دارد. در بهترین شرایط در یک گیاه تراریخت می‌توان اندام‌هایی نظیر میوه‌ها، برگ‌ها و عصارهٔ گیاهی که ممکن است دارای پروتئین نوترکیب باشند را به‌صورت خام مصرف کرد، درغیراین‌صورت خالص‌سازی پروتئین از اندام‌های گیاهی صورت می‌گیرد تا به‌صورت خالص استفاده شوند.

تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان مزایای زیادی نظیر سهولت تامین مواد اولیه شامل نور خورشید، آب و مواد معدنی را می‌تواند به همراه داشته باشد که این ویژگی گیاه را به یک ابزار ارزان قیمت برای بیان و فرآوری صحیح پروتئین‌های پیچیده تبدیل کرده است. بیان پروتئین‌های نوترکیب در بافت‌های گیاهی، خطر آلودگی به عوامل بیماری‌زای انسانی را کاهش داده که باعث اطمینان از عدم آلودگی محصولات تولیدی می‌شود. ازطرفی محیط گیاهی برای پروتئین نوترکیب یک محیط مناسب و دائمی در برابر حرارت فراهم می‌کند.

۳-۶-۱- گونه‌های گیاهی مورد استفاده در تهیهٔ پروتئین‌های نوترکیب

گونه‌های زیادی از گیاهان به‌منظور تولید پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرند. توتون دارای مزیّت‌های قابل توجّهی نظیر شناخت کامل از روش‌های انتقال و بیان ژن، عملکرد بالا در تولید مادهٔ خشک[2] (بیش از ۱۰۰ هزار کیلوگرم در هکتار) و در دسترس بودن فن‌آوری فرآوری آن در مقیاس صنعتی است (کوپر[3] و همکاران، ۱۹۹۴).

عیب اصلی توتون این است که بسیاری از واریته‌های زراعی و پرمحصول آن، به مقدار زیادی آلکالوئیدهای[4] سمّی تولید می‌کنند. این آلکالوئید بالا می‌تواند درفرآیند تولید و متعاقب آن درخالص‌سازی پروتئین نوترکیب اثرگذار باشد. البته واریته‌هایی با سطح آلکالوئیدی کم نیز وجود

---

[1] Gubin
[2] Biomass
[3] Cooper
[4] Alkaloid

دارند که می‌توان از آن‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده کرد. اما از آنجایی‌که معمولاً این واریته عملکرد پایینی دارند، ازاین‌رو برای تولید مقادیر زیاد پروتئین نوترکیب در این گیاهان باید در ابتدا عملکرد آن را افزایش داد.

ازطرفی گردهٔ گیاهان تراریخت ممکن است با گیاهان سازگار نظیر گونه‌های خویشاوند و علف‌های هرز تلاقی پیدا کرده و بروی محیط زیست از طریق اثر بر تنوّع زیستی تأثیرگذار شود. البته با استفاده سیستم‌های نرعقیمی[1]، آپومیکسی[2]، ژن‌های کشنده[3] و ناباروری[4] می‌توان از تلاقی-های ناخواسته جلوگیری کرده و یا اگر تلاقی انجام شود، جنین حاصل قادر به رشد نباشد. روش تکثیر این نوع گیاهان که در تکثیر جنسی دچار نقص هستند به‌صورت غیرجنسی و با استفاده از روش‌هایی نظیر ریزازدیادی[5]، آپومیکسی، قلمه‌زنی و ... صورت می‌گیرد.

راه دیگر جلوگیری از تلاقی‌های ناخواسته، انتقال ژن به کلروپلاست است که دراین وضعیت در تولید مثل‌جنسی ژن‌های موجود در کلروپلاست نمی‌توانند از طریق دانه‌های گرده به گیاهان نسل بعد منتقل شوند. علاوه براین، تحقیقات نشان می‌دهد که میزان عملکرد تولید پروتئین در روش انتقال به ژنوم کلروپلاست ده‌ها برابر بیشتر از انتقال به ژنوم هسته‌ای گیاه است.

یکی دیگر از معایب تولید پروتئین‌های نوترکیب در توتون، ناپایداری محصول است. این ناپایداری باعث می‌شود که قبل از انجام فرآوری اصلی، برگ‌ها را به‌منظور آماده‌سازی برای انتقال خشک و یا منجمد نمود. در این مورد نزدیکی مزرعه تولید این نوع توتون تراریخته به محل فرآوری آن اهمیّت ویژه‌ای دارد (کامپالا[6] و همکاران، ۱۹۹۶).

از گیاهان دانه‌ای نیز می‌توان در تولید پروتئین‌های نوترکیب بهره برد چرا که بذرها به دلیل برخورداری از اندامک‌های ذخیره‌ای ویژه نظیر اجسام پروتئینی و واکوئل‌های ذخیره‌ای که از سیستم ترشّحی مشتق شده‌اند، محیط شیمیایی بسیار مطلوبی را برای تجمّع پروتئین‌ها فراهم می‌نمایند. خشک بودن دانه‌ها نیز یک مزیّت بسیار مهم است زیرا احتمال تجزیهٔ غیر آنزیمی و هضم پروتئازی پروتئین‌های ذخیره شده را به شدت کاهش می‌دهد. همچنین دانه‌های غلاّت فاقد

[1] Male sterility
[2] Apomixis
[3] Lethal genes
[4] Infertility
[5] Micropropagation
[6] Kompala

مواد فنلی هستند که در برگ‌های توتون به‌وفور وجود دارند، بدین جهت کارایی فرآوری محصول افزایش می‌یابد. عوامل مهم دیگری نظیر سادگی انتقال ژن، بیان ژنی بالا، عملکرد دانه در هکتار، درصد پروتئین نوترکیب به ازای واحد ماده خشک دانه و سطح زیرکشت محصول نیز در انتخاب غلاّت برای تولید واکسن‌های نوترکیب مورد توجه قرار گرفته است. در این بین ذرّت به‌عنوان مهمترین گیاه زراعی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در سطح تجاری استفاده می‌شود.

از غلاف‌دارها[1] به‌ویژه یونجه و سویا نیز برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود. بیشترین نگرانی در مورد استفاده از غلّات و دیگر گیاهان زراعی در تولید پروتئین‌های نوترکیب، انتقال گیاه‌هان تراریخته به انواع جمعیت‌های گیاه‌هان زراعی معمولی و احتمال آلودگی سهوی منابع بذری گیاه‌هان خوراکی معمولی در هنگام جمع‌آوری و ذخیره‌سازی دانه است.

میوه، سبزیجات و گیاهان برگی سالادی نیز به دلیل اینکه به‌صورت خام مصرف می‌شوند می‌توانند برای تولید زیر واحدهای واکسنی نوترکیب مورد استفاده قرار گیرند. سیب زمینی به علت دارا بودن غدّه که می‌تواند انبار تولید پروتئین نوترکیب باشد به‌طور گسترده‌ای برای تولید واکسن‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است. گوجه‌فرنگی به‌علت عملکرد تولید مادهٔ خشک بیشتر نسبت به سیب زمینی، لذیذ بودن و امکان پرورش گلخانه‌ای نیز برای تولید واکسن گیاهی نظیر واکسن‌هاری بکار گرفته شده است. کاهو برای تولید واکسن بر علیه هپاتیت B و موز نیز به دلیل امکان مصرف خوراکی و لذیذ بودن و استقبال آن از طرف کودکان به‌صورت خام و پوره، برای تولید واکسن نوترکیب به‌عنوان میزبان مدنظر می‌باشند، همچنین موز به دلیل گستردگی کشت آن در کشورهای درحال توسعه می تواند نیاز به واکسن در این کشورها را برطرف نماید.

در جدول‌های ۴-۱ سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب در چند میزبان از نظر هزینه تولید، زمان تولید، ظرفیت تولید، کیفیت تولید و . . . مختصرا توضیح داده شده است (کوئی[2] و همکاران، ۲۰۰۱).

[1] Legume
[2] Cui

جدول ۴-۱ – مقایسه سیستمهای تولید پروتئین‌های نوترکیب

نوع سیستم	هزینه تولید	زمان تولید	ظرفیت تولید	کیفیت تولید	گلیکوزلاسیون	خطرات آلودگی
باکتری‌ها	پائین	کوتاه	بالا	پائین	ندارد	سموم داخلی
مخمّر	متوسط	متوسط	بالا	متوسط	غیردقیق	خطر پائین
کشت سلول‌های پستان‌داران	بالا	طولانی	خیلی پائین	خیلی بالا	دقیق	ویروس، پریون و توالی‌های سرطانی
پستان‌داران تراریخته	بالا	خیلی طولانی	پائین	خیلی بالا	دقیق	ویروس، پریون و توالی‌های سرطانی
کشت سلول‌های گیاهی	متوسط	متوسط	متوسط	بالا	تفاوت جزئی	خطر پائین
گیاه‌هان ترایخته	خیلی پائین	طولانی	خیلی بالا	بالا	تفاوت جزئی	خطر پائین

فصل هفتم

خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب

۷-۱- خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب

مرحله پایانی در فرآیند تولید پروتئین نوترکیب استخراج و خالص‌سازی[1] پروتئین نوترکیب از سلّول میزبان و پیچیده‌تر از آن، جداسازی آن از پروتئین‌های دیگر میزبان است. اگر پروتئین نوترکیب از نظر ویژگی‌های ساختاری و بیوشیمیایی مشابه پروتئین‌های طبیعی میزبان باشد، خالص‌سازی آن سخت‌تر است. در واقع آن‌چه باعث تفاوت پروتیئن‌های تولیدی (به‌ویژه آنزیم‌ها و داروها) مراکز تحقیقاتی و یا شرکت‌های تجاری با یکدیگر می‌شود میزان خلوص پروتئین تولیدی می‌باشد که بر روی کیفیت محصول و متعاقباً بر عملکرد آن تأثیرگذار است (ویلیامز[2] و همکاران، ۱۹۹۴).

معمول‌ترین روش مورد استفاده در خالص‌سازی پروتئین الحاق یک توالی اسیدآمینه‌ای به پروتئین موردنظر و انجام مراحل بعدی خالص‌سازی بر اساس این توالی است.

[1] Purification
[2] Williams

معمولاً ناحیه پایانه آمین[1] یک پروتئین یا آنزیم بر عملکرد آن چندان مؤثّر نیست از این جهت به‌راحتی می‌توان یک توالی را به این ناحیه اضافه کرد بدون آن‌که تغییری در فعالیّت آن ایجاد شود. این اضافه شدن در سطح DNA انجام می‌گیرد که با توجه وجود ناقل‌های تجاری موجود، به‌آسانی انجام‌پذیر است. بنابراین محقّقان باتوجه به نوع پروتئین موردنظر و امکانات دردسترس خود می‌توانند ناقل مناسبی را خریداری کنند. ناقل‌های تجاری علاوه بر داشتن توالی اسیدآمینه‌ای برای خالص‌سازی، توالی مناسبی بین این توالی و پروتئین اصلی به‌منظور برش با پروتئاز را حمل می‌کنند. پس بعداز تراریخت کردن سلّول‌ها با استفاده از این نوع از ناقل‌های نوترکیب، پروتئین نوترکیب تولید شده دارای توالی اضافه‌ای در سمت آمین خود هستند که این توالی به استخراج و خالص‌سازی آن کمک کرده و در مرحلهٔ بعد با یک پروتئاز مناسب از پروتئین نوترکیب حذف شده و پروتئین نوترکیب در شکل فعّال خود تا می‌خورد. مرحله پایانی که حذف توالی اضافی از پروتئین اصلی می‌باشد به‌ویژه در تولید پروتئین‌های دارویی بسیار مهم است (بریستو[2] و همکاران، ۱۹۸۹).

به‌طورکلّی در سیستم خالص‌سازی بر اساس پروتئین‌های هم‌جوش از چهار روش اثر متقابل پروتئین- پروتئین، پروتیئن- کربوهیدرات، پروتئین فلز و آنزیم- سوبسترا استفاده می‌شود.

۲-۷- روش‌های خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب

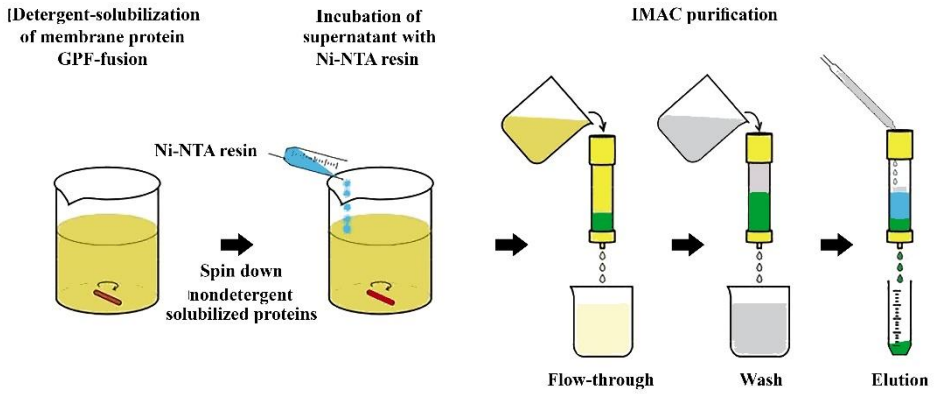
۱-۲-۷- خالص‌سازی با استفاده از کلاًت فلزی

بیش از ۲۰ سال است که مشخص شده است که بعضی از پروتئین‌ها دارای جایگاه‌هایی برای اتصال فلّزات به آن هستند که می‌توان از آن برای خالص‌سازی پروتئین استفاده کرد. اصول این روش بسیار ساده است. در ابتدا یک گروه کلاًته که توانایی اتصال به فلز سنگین نظیر نیکل و یا روی را دارد به‌صورت کووالان به ذّرات یک محیط ژله‌ای متّصل می‌شود. مقدار موادّ کلاًته و فلز به‌نحوی تنظیم می‌شوند که فقط نی‌می‌از جایگاه‌های آن توسط فلز اشغال شوند زیرا در این‌صورت هیچ ذرّه‌ای از فلز آزاد در محیط باقی نمی‌ماند. در مرحلهٔ بعد عصارهٔ استخراج شده و یا مخلوط پروتئینی به ژل اضافه می‌شود و پروتئین موردنظر از طریق جایگاه اتّصال به فلز خود به فلز متّصل به ژل اتّصال یافته و در مرحله بعد ژل شستشو داده می‌شود. شستشو باعث می‌شود همه ترکیبات

[1] N-terminal region

[2] Bristow

متّصل نشده شسته شده و حذف شوند. در این مرحله اگر فلز آزاد وجود داشته باشد به همراه پروتئین موردنظر که به آن متّصل شده است حذف می‌شود. در مرحلهٔ پایانی با تغییر pH پروتئین موردنظر از ترکیبات کلاًته جدا می‌شود (شکل۵-۱).



شکل ۷-۱- خالص‌سازی با استفاده از کلاًت فلزی. در این روش، مخلوط پروتئینی به بستر ژلی که دارای کلاًت فلزی هستند اضافه می‌شوند. پروتئین موردنظر به فلز متّصل و بستر ژل شسته می‌شود. شستشو باعث می‌شود که همه پروتئین‌ها به‌جز پروتئین موردنظر از محیط خارج شوند. در مرحلهٔ پایانی با تغییر **pH** پروتئین موردنظر نیز آزاد می‌شوند.

۲-۲-۷- خالص‌سازی با استفاده از توالی نشانمند از اسیدآمینه هیستیدین[1]

مشخص شده است که توالی شش و یا بیشتر از اسیدآمینه هیستیدین می‌تواند به‌عنوان یک جایگاه اتّصال فلز عمل کند. در واقع این توالی شش هیستیدینی توالی نشانمند از هیستیدین[2] نامیده می‌شود. برای انجام خالص‌سازی با این روش در ابتدا یک نشانمند کردن انتهای آمین پروتئین نوترکیب با استفاده از اضافه کردن توالی هیستیدین در سطح DNA و در ناقل اضافه می‌شود. معمولاً توالی بعد از توالی هیستیدینی محل برشی برای یک پروتئاز، نظیر Leu- Val-Arg-Gly-ser که توسط ترومبین[3] برش می‌خورد، قرار دارد. در این‌صورت توالی ناحیهٔ آمین پروتئین نوترکیب خام به این صورت خواهد بود: توالی پروتئین نوترکیب

Met-Gly-Ser-Ser-**His-His-His-His-His-His**-Ser-Ser-Gly-**Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser**.

[1] His-Tag as N-terminal Protein
[2] His-Tag Sequence
[3] Thrombin

بنابراین پروتئین نوترکیب تولید شده با روش کلاًت فلزی به‌صورتی که توضیح داده شد، خالص می‌شود. در این روش معمولاً از نیکل به‌عنوان فلز سنگین استفاده می‌شود و توالی نشانمند هیستیدین بعداز اتّصال به فلز و اعمال مرحلهٔ شستشو با استفاده از هیستدین و یا ایمیدازول[1] از فلز جدا می‌شود. در مرحلهٔ بعد، با تیمار پروتئاز مناسب توالی هیستیدنی از پروتئین نشانمند از هیستیدین خالص شده حذف می‌شود. در مرحلهٔ پایانی با استفاده مجدّد از سیستم کلاًت فلز قطعات هیستیدنی حذف می‌شود. نکتهٔ قابل‌توجه این است که در این مرحله توالی هیستیدنی به فلز متّصل شده و پروتئین نوترکیب اصلی شستشو داده و جمع‌آوری می‌شود. ازاین‌رو نیاز به مرحلهٔ پایانی و اعمال تغییر pH به‌منظور جداکردن پروتئین از فلز رفع می‌شود (جکیومین[2] و همکاران، ۱۹۹۴).

۳-۲-۷- پروتئین‌های نشانمند از پروتئین متّصل شونده به مالتوز

استفاده از پروتئین متّصل شونده به مالتوز یا MBP (مراجعه شود به فصل اول) روش مناسبی برای خالص‌سازی پروتئین است. ژن *malE* کدکننده MBP در pMAL که ناقل مناسبی برای بیان پروتئین می‌باشد، قرار داده شده است.

در این روش ژن موردنظر به ناقل pMAL انتقال داده شده و ناقل نوترکیب وارد میزبان مناسبی می‌شود تا میزبان تراریخت تهیه گردد. همسانه‌های تراریخت با استفاده از نشانگر انتخابی، که برای ناقل pMAL ژن lacZ است، انتخاب می‌شود. سلول‌های تراریخت در محیط کشت مناسب برای بیان ژن قرار داده می‌شوند و پروتئین نوترکیب که دارای پروتئین الحاقی MBP می‌باشد، تولید می‌شود. بیان ژن موردنظر در ناقل pMAL باعث می‌شود پروتئین مربوطه تا ۳۰ درصد کل پروتئین‌های سلّول تولید شود (گراسمن[3] و همکاران، ۱۹۹۸).

مخلوط پروتئین‌های استخراج شده از ستون دارای آمیلوز عبور داده می‌شود. بعد از شستشو همهٔ ترکیبات پروتئینی به‌جز پروتئین هم‌جوش حذف می‌شوند. پروتئین هم‌جوش از طریق MBP به ذرّات آمیلوز متّصل به ستون پیوند می‌خورد. در مرحلهٔ بعد با تغییر pH پروتئین موردنظر نیز از ستون جدا و جمع‌آوری می‌شود. تیمار پروتئین خالص شده با پروتئاز Xa باعث جدا شدن MBP

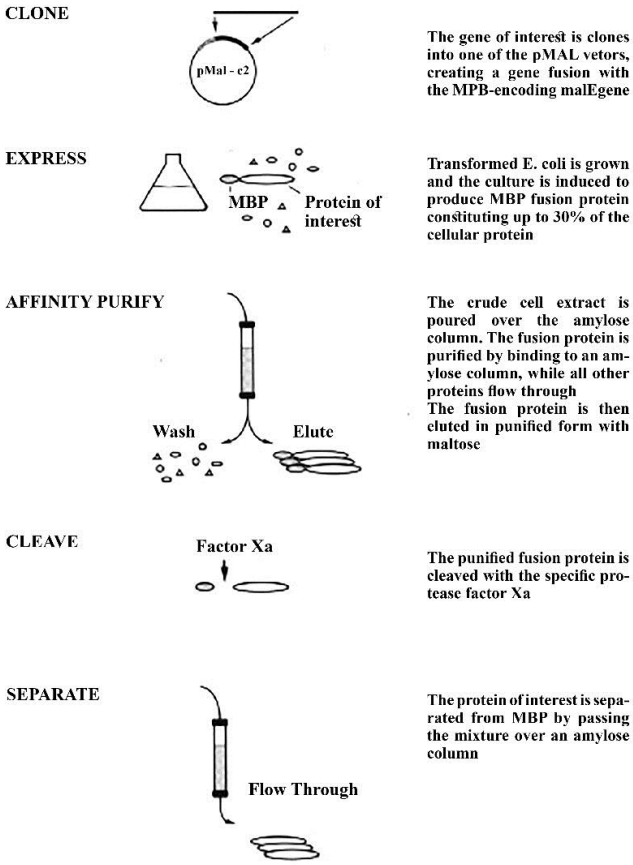
---

[1] Imidazole

[2] Jacquemin

[3] Grossman

از پروتئین موردنظر می‌شود. عبور مجدّد این مخلوط پروتئینی برش خورده از ستون آمیلوز باعث اتّصال MBP و خالص شدن پروتئین موردنظر می‌شود (شکل ۵-۲) (هیلس[1] و همکاران، ۲۰۰۱).



[1] Hills

شکل ۷-۲- مخلوط پروتئینی ازمحیط چسبیده به آمیلوز عبور داده می‌شود. بعد از شستشو همه ترکیبات پروتئینی به‌جز پروتئین هم‌جوش حذف می‌شوند. پروتئین هم‌جوش از طریق MBP به ذرّات آمیلوز متّصل به ستون پیوند می‌خورد. در مرحلهٔ بعد با تغییر pH پروتئین موردنظر نیز از ستون جدا و جمع‌آوری می‌شود. تیمار پروتئین خالص شده با پروتئاز Xa باعث جدا شدن MBP از پروتئین موردنظر می‌شود. عبور مجدّد این مخلوط پروتئینی برش خورده از ستون آمیلوز باعث اتّصال MBP و خالص شدن پروتئین موردنظر می‌شود.

۴-۲-۷- پروتئین‌های نشانمند از گلوتاتیون S- ترانسفراز

گلوتاتیون S- ترانسفراز[1] آنزیمی است که در سیتوسول، میتوکندری و بعضی از اندامک‌های دیگر یوکاریوتی فعالیّت می‌کند. آنزیم GST هم در پروکاریوت‌ها و هم در یوکاریوت‌ها وجود دارد. مجموعه آنزیم‌های GST تا ۱۰ درصد از کلّ پروتئین اندامک‌های یوکاریوتی نظیر میتوکندری تشکیل دهد. وظیفه اصلی GST در سوخت‌وساز سلّولی کمک به نامحلول شدن و متعاقب آن نزدیک شدن مولکول‌های آب‌دوست و در بعضی موارد آب‌گریز از طریق اتّصال به گلوتاتیون و کاهش میزان این پروتئین در محیط آبی درون و بین سلّول است. تمایل این آنزیم برای پیوند با تری‌پپتید گلوتاتیون که دارای توالی اسیدآمینه‌ای Glu-Cys-Gly بسیار زیاد است.

اتّصال GST به‌صورت هم‌جوش به ناحیه آمینی پروتئین موردنظر در سطح DNA و از طریق ناقل بیان اوّلین مرحلهٔ خالص‌سازی در این روش است. این آنزیم در حدود ۲۲۰ اسیدآمینه دارد که در مقایسه با توالی‌هایی که در روش‌های دیگر به‌منظور نشانمند کردن پروتئین استفاده می‌شود بسیار بزرگ است. پس از تولید پروتئین هم‌جوش در میزبان تراریخت، مخلوط پروتئین استخراج شده از بستر آگارزی که دارای گلوتاتیون است عبور داده می‌شود. پروتئین موردنظر از سمت GST به بستر آگارزی متّصل می‌شود و در مرحلهٔ بعد با شستشو این بستر، همهٔ پروتئین‌ها به‌غیر از پروتئین موردنظر حذف می‌شوند. اضافه کردن گلوتاتیون به بستر آگارزی باعث رهاسازی پروتئین هم‌جوش می‌شود. در مرحلهٔ پایانی می‌توان با استفاده از یک پروتئاز مانند ترومبین ناحیهٔ بین پروتئین موردنظر و GST را برش داد که تا پروتئین نوترکیب خالص به‌دست آید. همان‌طور که

[1] Glutathione S-transferase (GST)

قبلاً گفته شد محلّ برش پروتئاز در سطح DNA بین ژن‌موردنظر و ژن کدکننده GST قرار داده می‌شود (هاردینگ[1] و همکاران، ۱۹۹۴).

۵-۲-۷- پروتئین‌های نشانمند از بتا-گالکتوزیداز

آنزیم بتا- گالاکتوزیداز آنزیمی القاءپذیری است که هیدرولیز لاکتوز را به مونوساکاریدهای تشکیل دهندهٔ کاتالیز می‌کند. به‌طور طبیعی توسط اپران lacZ تولید می‌شود و دارای چهار زیرواحد تقریباً یکسان است (رادولف[2] و همکاران، ۲۰۰۴).

۳-۷- آلودگی‌های موجود در پروتئین تولیدی

بررسی و تعیین وضعیت پروتئین‌های تولیدی به‌ویژه داروها از نظر وضعیت آلودگی بسیار ضروری است. این کار در صورتی بسیار مشکل خواهد بود که ترکیب آلوده کننده ازنظر وزن مولکولی، نقطهٔ ایزوالکتریک و وضعیت هیدروفوبیک، مشابه پروتئین موردنظر باشند. بهترین و دقیق‌ترین روش برای اثبات وجود آلودگی استفاده از HPLC است.

روش دیگری که برای تشخیص آلودگی، نقشه‌یابی پپتیدی با وضوح بالا[3] به‌همراه بکارگیری از HPLC است. این روش به‌صورت مجزا و یا همراه با اسپکت جرمی[4] یا مالدی تاف[5] بکار می رود. اگر یک پروتئین خالص استاندارد به‌منظور مقایسه در دسترس باشد، تجزیه پروتئولیتیک هردوی پروتئین‌های استاندارد و نوترکیب موردنظر در شرایط یکسان می‌تواند برای سنجش خلوص پروتئین نوترکیب استفاده شود. در این شرایط هردوی این پروتئین‌ها قطعات یکسانی را تولید می‌کنند، تفاوت‌های موجود در این قطعات تولیدی به‌عنوان وجود آلودگی یا ناشی از وجود ناخالصی در نمونه تفسیر می‌شود. روش‌های اسپکت و مالدی تاف نیاز به پروتئین خالص نیست. در این روش‌ها، قطعه مربوط به پروتئین نوترکیب با دقت کافی نشان داده می‌شوند. هیچ یک از قطعات پروتئین نوترکیب به‌عنوان آلودگی قرار درنظر گرفته نمی‌شوند و حتی توالی صحیح اولیه آن نشان داده می‌شود (ولف[6] و همکاران، ۱۹۹۷).

به‌طور کلّی انواع آلودگی پروتئین تولیدی در سه گروه قرار می‌گیرند.

---

[1] Harding
[2] Rudolph
[3] High-resolution peptide mapping
[4] Electrospray mass spectrometry
[5] Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight
[6] Wolff

۱-۳-۷- پروتئین‌هایی با حذف پروتئولیتیکی

ممکن است بعضی از پروتئین‌های سلّولی طی فرآیندهای خالص‌سازی برش خورده و به چند تکه تقسیم شوند. این عمل حتی می‌تواند در حضور بازدارنده‌های پروتئازی نیز انجام شود چراکه برش‌دهنده‌های پروتئینی در یک محیط زنده نظیر سلّول‌ها و حتی غیر زنده به پروتئازها محدود نمی‌شود و بسیار متنوع است. در بعضی از موارد جداکردن قطعات از پروتئین‌های موردنظر بسیار سخت است. به‌ویژه اگر این پروتئین‌های اضافی در معرض برش پرتئولیتیک نیز قرار بگیرند و دارای اندازه و حتی ویژگی‌های شبیه پروتئین موردنظر شود. زمانی کار سخت‌تر می شود که سطح آلودگی پایین‌تر از حداقل مقدار موردنیاز برای کشف و بررسی آن باشد. برای پروتئین‌هایی که به‌منظور درمان استفاده می‌شوند مشکل پیچیده‌تر می‌شود چراکه پروتئین‌های تجزیه شده یا آن‌هایی که به‌درستی تا نخورده‌اند ممکن است دقیقاً نقش نقطهٔ مقابل پروتئین‌های سالم را بازی کنند و نقش آنتی‌ژنیک را داشته و باعث شوند که بیماران آنتی‌بادی‌هایی بر ضد این آنتی‌ژن تولید کند که این خود باعث ایجاد مشکلات بیشتری می‌شود. معمولاً تعیین انتهای N و C توالی‌ها می تواند به‌منظور اطمینان از خلوص این نوع از آلودگی‌ها استفاده شود.

۲-۳-۷- پیروژن‌ها[1]

اندوتوکسین‌ها[2] و لیپوپلی‌ساکاریدها[3] اغلب می‌توانند با یک پروتئین در طی خالص‌سازی آن همراه شوند. این عوامل حتی اگر در مقادیر کمی وجود داشته باشند، اگر به صورت واکسن یا داروی خاصی تزریق شوند، می توانند در گیرندهٔ آن پروتئین، ایجاد مشکلاتی کنند. بنابراین برای دریافت‌کنندگان آن بسیار حیاتی است که از عدم آلودگی آن به این ترکیبات اطمینان حاصل کنند. علاوه بر استفاده از HPLC، از روش‌های ایمونولوژی حساس نیز می‌توان برای تشخیص این آلودگی‌ها بهره برد. برای مثال پروتئین‌های حاصل از سیستم‌های باکتریایی می‌توانند با بکارگیری آنتی‌بادی‌هایی بر ضد عصارهٔ سلولی باکتری اشرشیا کولی تشخیص داد. اگر احتمال حضور لیپوپلی‌ساکاریدها داده شود معمولاً می‌توان با استفاده از ژل‌فیلتراسیون[4] یا با استفاده از غشاهای

[1] Pyrogens
[2] Endotoxin
[3] Lipopolysaccharide
[4] Gel filtration

تعیین‌کنندهٔ وزن مولکولی آن را حذف کرد چرا که این نوع از آلودگی‌ها بسیار هیدروفوبیک هستند و تمایل زیادی برای تجمّع دارند (ون گورکام[1] و همکاران، ۱۹۹۰).

۳-۳-۷- خلوص اسید نوکلئیک

مواد ژنتیکی موجود در میزبان ممکن است با پروتئین خالص شده همراه شود. به‌ویژه که این آلودگی اگر یک آنکوژن[2] باشد بسیار خطرناک خواهد بود. آنکوژن به ژنی اطلاق می‌شود که می‌تواند از طریق مختل کردن فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلّولی باعث سرطان شود. عموماً DNA ورودی را می‌توان با استفاده از کروماتوگرافی در قطب آنیون حذف شود. آلودگی‌های مربوط به مواد ژنتیکی با اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر از نظر کمی و کیفی مورد ارزیابی قرار داده می‌شوند (وگنر[3] و همکاران، ۲۰۰۰).

۴-۳-۷- مطالعه ساختاری پروتئین‌های تولیدی

با استفاده از روش‌های اسپکتروسکوپی و غیراسپکتروسکوپی می‌توان ساختار پروتئین‌های تولیدی را مورد بررسی قرار داد (جدول ۵-۱).

جدول ۵-۱- بررسی ساختار پروتئین تولیدی با استفاده از روش‌های اسپکتروسکوپی و غیراسپکتروسکوپی و نحوه تشخیص

روش	نحوه تشخیص	ملاحظات
-الکتروفورز گرادیانت	میزان جابجایی بر اساس اندازه، شکل و تاخوردگی	مقدار مواد مورد نیاز به اندازه ژل و سیستم تشخیصی آن بستگی دارد. اگر از آنتی بادی‌ها استفاده شود نمونهٔ اولیه آن هم می‌تواند آنالیز شود.
-ژل فیلتراسیون	میزان جابجایی بر اساس اندازه، شکل و برهم‌کنش مولکولی	عموماً برای تعیین وزن مولکولی استفاده می شود. در این روش تغییرات کنفورماسیونی بعد از آزمایش می‌تواند ادامه یابد.
اولتراسانتریفیوژ		اندازه گیری‌ها بر اساس سرعت رسوب انجام میشود
- سرعت رسوب	شکل	براساس ضریب رسوب انجام می‌شود. ضریب رسوب به کنفورماسیون پروتئین حساس است. تفاوت‌های مختصر بین ضریب‌های رسوب در بین نمونه‌ها کار تعیین را سخت

[1] Van Gorcom
[2] Oncogene
[3] Wagner

		می‌کند.
- رسوب تفاضلی	شکل	اندازه‌گیری تفاوت‌های خیلی کوچک بین ضرایب رسوب (در حد ۰/۰۱) را می‌توان تشخیص داد. حساس به تفاوت‌های خیلی کوچک کنفورماسیونی بین نمونه‌ها می‌باشد.
- موازنه رسوب	وزن مولکولی، ساختار چهارم و برهم‌کنش مولکولی	روشی برای تعیین وزن مولکولی با دقت برابر با ۳ ± درصد، به‌طور گسترده‌ای برای مطالعات لیگاندی استفاده می‌شود.
سنجش‌های ساختاری		
- حساسیت به پروتئاز	کنفورماسیون	عمل پروتئاز بر پروتئین تا شده به اختصاصیت مکان و قابلیّت در دسترس بودن آن وابسته است.
- فعالیت شیمیایی	کنفورماسیون	از نظر خصوصیات مشابه مورد بالایی است، با این تفاوت که در این‌جا از معرف‌های شیمیایی خاصی نظیر سولفیدریل برای تعیین فعالیت زنجیرهٔ اسیدآمینه استفاده می‌شود.
- تبادل ^{2}H و ^{3}H	کنفورماسیون و دینامیک	در این روش از روش‌هایی نظیر HPLC و NMR برای اندازه‌گیری واکنش‌های تبادلی استفاده می‌شود.
تعیین کالری		
- پویش تفاوتی	کنفورماسیون و مقاومت حرارتی	اندازه گیری دمای خروجی (ظرفیت حرارتی) در طی تغییر.
- تیتراسیون ایزوترما	برهم‌کنش مولکولی	اندازه‌گیری مستقیم انرژی برهم‌کنش بیومولکولی
آنالیز برهم‌کنشی بین بیومولکولی	برهم‌کنش مولکولی	آنالیز برهم‌کنشی بین بیومولکولی با استفاده از ابزارهای دارویی
سنجش‌های ایمونولوژیک	کنفورماسیون	ارتباط ساختاری یک آنتی‌بادی با آنتی ژن خود به تکمیل کنندگی ساختاری بین این دو مولکول بستگی دارد، تغیرات در کنفورماسیون آنتی ژن باعث تغیراتی در جفت شدن آن با آنتی بادی می‌شود، این مورد معمولاً در مورد آنتی بادی‌های مونوکلونال[1] مورد استفاده قرار می‌گیرد.

[1] Monoclonal antibodies

فصل هشتم

چالش‌های تهیّهٔ پروتئین‌های نوترکیب

۱-۸- چالش‌های مربوط به توالی ژن موردنظر

تحقیقات نشان می‌دهد که انتقال ژن و بیان آن در سلّول‌های یوکاریوتی به پیرایش وابسته است. ازاین‌رو در بیشتر موارد ژن موردنظر به صورت cDNA تهیه و انتقال داده می‌شود تا فرآیندهای پیرایشی در بیان پروتئین موردنظر با عملکرد صحیح اختلال ایجاد نکنند (مراجعه شود به فصل اول). تغییر در منطقه کدکننده نیز می‌تواند سطح بیان ژنی را افزایش دهد. به‌عنوان مثال یک ژن پستان‌داری که در یک میزبان پروکاریوتی به‌منظور بیان همسانه می‌شود احتمالا دارای کدون‌هایی است که برای میزبان کدون نادر محسوب می‌شود. ازاین‌رو میزبان توانایی تأمین tRNA مربوط به آن‌را ندارد و در نتیجه به‌ویژه در مواقع بیان بالا سلّول دچار کمبود آن tRNA شده و ترجمهٔ ژن موردنظر متوقّف می‌شود. در این مواقع می‌توان با تغییر کدون‌های ژن به

کدون‌هایی با فراوانی بیشتر که دارای مقدار tRNA بیشتری نیز باشد، سطح بیان ژنی را بالا برد (هریس[1] و همکاران، ۱۹۹۲).

در واقع، مشکلاّت تهیهٔ پروتئین‌های نوترکیب عموماً به بیان ژن‌های یوکاریوتیک در پروکاریوت‌ها برمی‌گردد. در برخی موارد پروتئین‌های یوکاریوتی که در باکتری ساخته می‌شوند ثبات و یا فعالیّت بیولوژیکی لازم را ندارند. به‌علاوه با وجود خالص‌سازی دقیقی که انجام می‌گیرد، ممکن است ترکیب‌های سمّی باکتریایی و یا ترکیب‌هایی نظیر پیروژن‌ها که موجب افزایش دمای بدن می‌شوند، در محصول نهایی وجود داشته باشند.

به‌طور کلّی نارسایی در تولید صحیح پروتئین‌های نوترکیب یوکاریوتیک در پروکاریوت‌ها به دو دستهٔ عدم اعمال تغییرات قبل و بعد از ترجمه تقسیم می‌شوند.

در مورد تغییرات قبل از ترجمه، سه مشکل عمده در پروکاریوت‌ها وجود داد.

۱-۱-۸- عدم انجام پیرایش

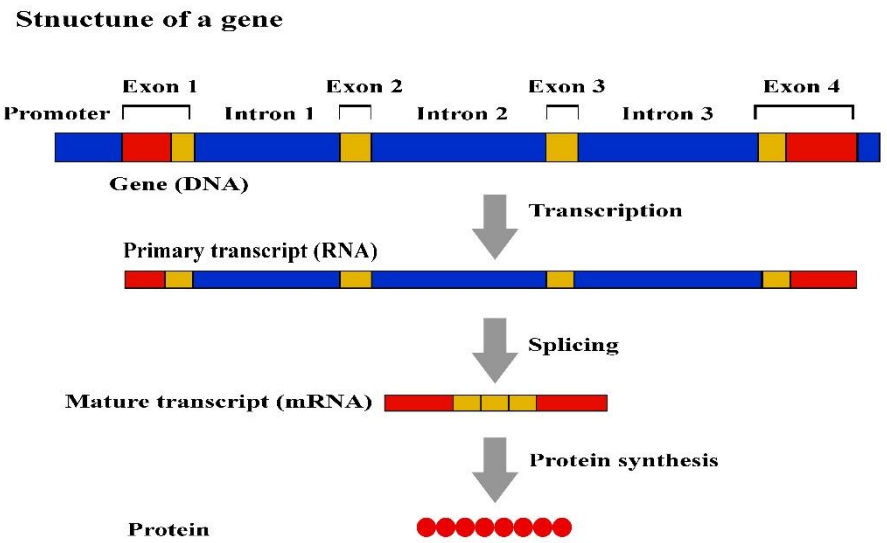
ژن بیگانه ممکن است دارای قطعات اینترون باشد. از آنجایی‌که پروکاریوت‌ها توانایی پیرایش اینترون‌ها را ندارند، بنابراین باید به‌نحوهٔ قبل از ورود ژن موردنظر در میزبان پروکاریوتی، اینترون‌ها حذف شوند.

همان‌طور که در فصل دوم بحث شد، بیشتر ژن‌های یوکاریوتی و بعضی از ویروس‌ها دارای حداقل یک اینترون هستند. واژه اینترون از ناحیه داخلی ژنی[2] گرفته شده است که در واقع توالی‌هایی هستند که به پروتئین و یا محصول نهایی که می‌تواند RNA باشد، ترجمه نمی‌شوند و معمولاً با سازوکارهای مختلفی از RNA کدشده توسط ژنی که اینترون دارد، حذف می‌شوند. با حذف اینترون از RNA، توالی‌های باقیمانده که اگزونها[3] نام دارد به‌هم متّصل شده تا به mRNA بالغ که قابل ترجمه شدن هستند تبدیل شوند (شکل ۶-۱). سیستم حذف اینترون‌ها از mRNA بالغ بسیار پیچیده و دقیق عمل می‌کند تا اینترون‌ها از محل صحیح خود حذف شود، درغیراین‌صورت حتی اگر یک نوکلئوتید در شناخت جایگاه اینترون اشتباه شود، چارچوب خواندن ژن تغییر خواهد کرد. از آنجایی‌که توالی‌های پروکاریوتی به‌دلیل فشارهای گزینشی بالا دارای فشردگی

---

[1] Haris
[2] Intragenic Region
[3] Exons

بیشتری هستند و در ژن‌های آن‌ها اینترون وجود ندارد و حتی ترجمه زمانی آغاز می‌شود که هنوز نسخه‌برداری از ژن به‌پایان نرسیده است (الف[1] و همکاران، ۲۰۰۱).



شکل ۸-۱- حذف اینترون‌ها. پس از نسخه‌برداری از یک ژن یوکاریوتی mRNA سنتز شده در مرحله پردازش اینترون‌های خود را از دست می‌دهد و در نتیجه اگزون‌ها به یکدیگر متّصل و mRNA بالغ بوجود می‌آید. در مرحلهٔ پایانی mRNA بالغ ترجمه شده و پروتئین سنتز می‌شود.

ازاین‌رو این موجودات سیستم‌های حذف اینترون‌ها یا پیرایش را ندارند و اگر ژنی که دارای اینترون است را با هدف بیان وارد میزبان پروکاریوتی شود، توالی‌های اینترون که ممکن است ترجمه شوند باعث نقص در عملکرد محصول پروتئین، rRNA و یا tRNA تولیدی می‌شوند. ازاین‌رو اگر بخواهیم ژنی را برای بیان وارد یک سلّول پروکاریوتی کنیم باید در ابتدا اینترون‌های آن‌را حذف کنیم. مولکول‌های cDNA فاقد اینترون هستند که برای بیان ژن‌های یوکاریوتی در میزبان پروکاریوتی به‌فور مورد استفاده قرار می‌گیرند (گراندیمن[2] و همکاران، ۱۹۹۴).

[1] Elf

[2] Gründemann

سیستم بیان ژن بر پایه نژادهای آزمایشگاهیِ اشرشیا کولی و دیگر باکتری‌ها کاربرد گسترده‌ای در تولید پروتئین‌های نوترکیب دارد. با وجود راحتی کار با این نژادها، مشکلاتی نیز در این میان وجود دارد، به‌ویژه اگر هدف، تولید پروتئین‌های غشایی نوترکیب[1] باشد. چرا که پروتئین‌های غشایی نوترکیب پس از تولید در باکتری اشرشیاکولی، به ندرت به طور صحیح تا خورده و در نتیجه در قسمت‌هایی از سلّول ذخیره شده و یا به طور کامل یا جزئی تجزیه می‌شوند. از طرف دیگر تغییرات پس از ترجمه نظیر گلیکوزیلاسیون که اغلب در پروتئین‌های غشایی دیده می‌شود نیز در باکتری انجام نمی‌شود.

ذکر این نکته ضروری است که اغلب این تغییرات برای انجام عملکرد صحیح پروتئین ضروری نیستند. در نهایت این که اگر پیچش مناسب صورت گرفته و تمامی تغییرات پس از ترجمه نیز به درستی اعمال شود به‌منظور استخراج پروتئین‌های تولیدی باید توسط یک محیط کوچک مصنوعی احاطه شوند. در این میان تفاوت ترکیب‌های لیپیدی غشای محاط‌کننده، شیب الکتروشیمیایی موجود در طول غشا و وجود دیوارهٔ سلّولی نقش تعیین کننده‌ای دارند. این موارد باعث می شود که باکتری‌ها برای تولید و مطالعهٔ جنبه‌های عملکردی پروتئین‌های انتقالی پستان‌داران، میزبان‌های مناسبی نباشند (سکینه[2] و همکاران، ۱۹۹۷).

با این وجود هنوز هم از باکتری‌ها برای تولید مقادیر بالای پروتئین به‌منظور مطالعهٔ ساختار پروتئین در پستان‌دارانی نظیر موش و خرگوش استفاده می گردد.

۲-۱-۸- تغییر معنی کد های ژنتیکی

ژن خارجی ممکن است دارای توالی‌هایی باشد که به‌عنوان علائم پایان رونویسی در پروکاریوت‌ها شناخته شود. که این باعث می‌شود ترجمه پروتئین زودتر از جایگاه پایانی واقعی به پایان رسد و فقط پروتئین ناقص تولید شود.

در سلّول‌های یوکاریوتی، کدون‌های UAA، UAG و UGA به‌عنوان کدون‌های پایان‌دهنده ترجمه شناخته می‌شوند. اگر در هنگام ترجمه، ریبوزوم به این کدون‌ها برسد، ترجمه به‌پایان می‌رسد (ناسمایت[3] و همکاران، ۱۹۸۰).

---

[1] Transmembrane Proteins

[2] Sekine

[3] Nasmyth

عوامل متعدّدی هستند که باعث می‌شوند کدون‌های دیگر به شکل کدون‌های پایان‌دهنده خوانده شوند. جهش‌های نقطه‌ای حذف و اضافه می‌توانند باعث تغییر ترتیب بازها و ایجاد کدون پایانی شوند. جهش‌هایی که ماهیّت شیمیایی یک باز را تغییر می‌هند نیز ممکن است کدون یک اسیدآمینه را به کدون پایان تبدیل کند. مواد ذکر شده عواملی هستند که به‌صورت تصادفی رخ می‌دهند.

در مواردی کدون‌های یک اسیدآمینه ممکن است به‌طور طبیعی در موجود دیگری به‌عنوان کدون پایان شناخته شود. چراکه کدهای ژنتیکی عمومیت ندارند. به‌عنوان مثال این نوع از پایان‌دهندگی زودهنگام در میتوکندری و بعضی از باکتری‌ها امر کاملاً عادی است.

۳-۱-۸- نادر بودن کدهای ژنتیکی

مشکل معمول در بیان ژن‌های پستان‌داران در سلّول‌های باکتری، تفاوت در استفاده از کدون در این دو نوع موجود است. کدون‌های مورد استفاده برای تولید یک اسیدآمینه خاص در پستان‌داران ممکن است با فراوانی کمی در سلّول باکتری موجود باشد و بندرت از آن استفاده شود و متعاقب آن tRNAهای مربوطه نیز در مقدار پایینی وجود خواهند داشت. به‌عنوان مثال، اسیدآمینه آرژنین دارای شش کدون CGU، CGC، CGA، CGG، AGA و AGG می‌باشد. کدون‌های AGA و AGG این اسیدآمینه به‌ندرت در ژن‌های اشرشیا کولی وجود دارد. این در حالی است که این کدون‌ها در مخمّر و یوکاریوت‌ها کاملاً معمول هستند. وجود این نوع کدون‌ها برروی سطح تولید پروتئین، پایداری mRNA و پلاسمید تأثیرگذارند و در موارد شدید، از سنتز پروتئین و رشد سلّولی جلوگیری می‌کنند. دلیل این موضوع این است که پس از شروع بیان ژن، سریعاً خزانه‌ی tRNAهای این کدون‌ها خالی می‌شود. در نتیجه زنجیره‌های پلی‌پپتیدی ناقص تولید و متعاقب آن تولید نهایی محصول کامل کاهش می‌یابد. این مشکل به‌ویژه در زمانی که سلّول‌های تراریخت در محیط رشد با حداقل ترکیب‌های غذایی رشد کنند، تشدید می‌شود (زاهن[1] و همکاران، ۱۹۹۶).

این مشکلاًت با استفاده از جهش‌زایی مستقیم در ناحیه خاص[2] برای جایگزین کردن کدون-های نادر آرژنین به‌وسیلهٔ کدون معمول آرژنین (CGC) یا به‌وسیله افزایش هم‌زمان بیان بیش ازحد

---

[1] Zahn

[2] Site-directed mutagenesis

ژن *argU* یا *dnaY* که tRNA آرژنین (AGG وAGA) را کد می‌کند، برطرف می‌شود. البته به‌منظور غلبه بر این مشکل، سیستم با بیانِ ظرفیت بالا در نژادهای *اشرشیا کولی* بدون تغییر در توالی ژن انتقالی، مهندسی شده‌است.

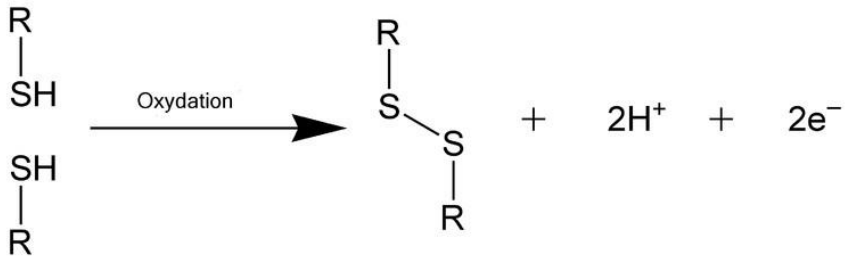
۲-۸- چالش‌های مربوط به تغییرات پس از ترجمه

مشکلاّت اصلی تهیهٔ پروتئین‌های نوترکیب در باکتری‌ها بیشتر بر روی تغییرات پس از ترجمه متمرکز می‌شود. چراکه باکتری‌ها توانایی اعمال پردازش‌های مناسب، نظیر آنچه که در سلّول‌های یوکاریوتیک اتفاق می‌افتد، را ندارند. عدم پردازش صحیح رشته پلی‌پپتید سنتز شده به تا خوردگی نامناسب منجر می‌شود. ازطرفی اگر پروتئینی که به‌صورت نامناسب تا بخورد نمی‌تواند در شکل سه بعدی مناسبی که برای فعالیّت صحیح آن لازم است قرار گیرد و ازاین‌رو فاقد عملکرد و یا عملکرد کمی است.

این پردازش‌ها شامل موارد زیر هستند:

۱-۲-۸- باندهای صحیح دی‌سولفید

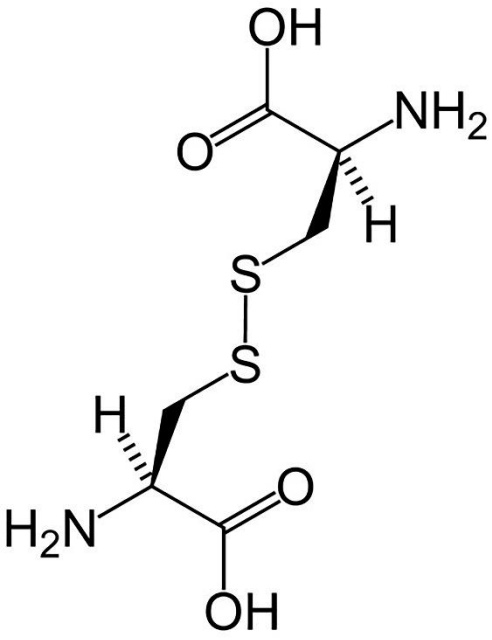
پیوند کووالان بین دو گروه تیول را باند یا پیوند دی‌سولفید[1] گویند. در واقع پیوند دی‌سولفید از جفت شدن گروه‌های تیولی بوجود می‌آید. این نوع پیوند گاهی اتّصال S-S نامیده می‌شود. محصول نهایی اتّصال ساختار عمومیC-S-S-C می‌باشد. این نوع ترکیب‌ها عموماً در بیوشی‌می‌به‌ویژه در شکل‌گیری ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها کاربرد فراوانی دارند.



[1] Disulfide Bond or Disulfide Bridge

شکل۸-۲- تصویر یک پل دی‌سولفیدی. در نتیجه اکسیداسیون ترکیب‌های تیولی و آزاد شدن پروتون و الکترون

در بدن این واکنش بین دو اسیدآمینه سیستئین در یک زنجیره پلی‌پپتید صورت می‌گیرد. در این واکنش که توسط آنزیمی به نام دی‌سولفیدایزومراز[1] انجام می‌گیرد، دو اسیدآمینه سیستئین با ازدست دادن پروتون و اتصال کوولان دو اتم گوگرد خود به یکدیگر متّصل و یک سیستین[2] را تشکیل می‌دهند (شکل ۶-۳). تشکیل سیستین باعث می‌شود مولکول پلی‌پپتید به شکل خاصی تا بخورد (یارنل و همکاران، ۱۹۹۹)[3]



[1] Disulfide Isomerase
[2] Cystine
[3] Yarnell

شکل ۸-۳- اتصال دو اسیدآمینه سیستئین و تشکیل سیستین با یک پیوند دی‌سولفید

۸-۲-۲- حذف پیش ماده غیرفعّال‌کننده از پروتئین

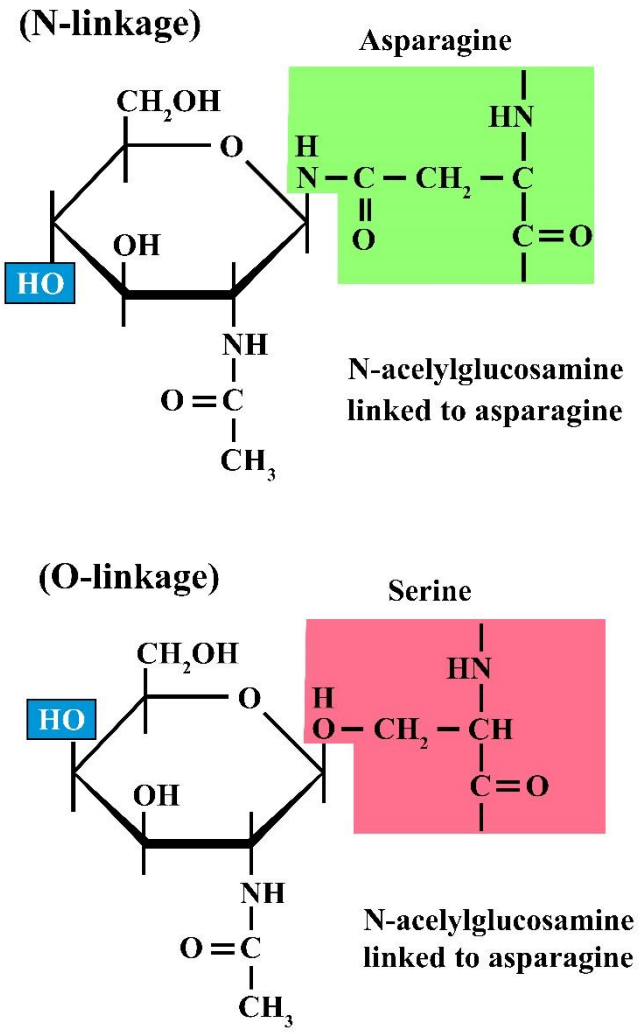
در این مورد به‌منظور به‌دست آوردن یک پروتئین سالم، قسمت‌های مشخصی از توالی آمینواسیدی برداشته می‌شوند. در مواقعی، پروتئین سنتز شده یک پیش‌پروتئین[1] یا پیش‌پپتید[2] است. پیش‌پروتئین معمولاً غیرفعّال و یا عملکرد بسیار پایینی که حذف قسمت‌های غیرفعّال کننده به شکل اصلی خود که فعّال است درمی‌آیند. به‌طور طبیعی پیش‌پروتئین در زمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد که انباشته شدن و حتی تولید پروتئین اصلی برای سلّول خطرناک باشد و ازطرفی نیاز به مقدار بالایی از آن در مدت زمان کوتاهی باشد. در این‌صورت تولید و انباشت کردن پیش‌پروتئین بهترین روش برای دستیابی به این هدف است. در صورت نیاز به مقادیر بالای پروتئین اصلی و فعال، سلّول با حذف آنزیمی توالی غیرفعّال کنندهٔ پیش‌پروتئین‌ها را به پروتئین اصلی تبدیل می‌کند.

۸-۲-۳- گلیکوزیلاسیون

اضافه شدن یک کربوهیدرات به گروه‌های واکنشی مولکول دیگر نظیر هیدروکسی گلیکوزیلاسیون[3] نامیده می‌شود. در زیست‌شناسی سلّولی این واژه به فرآیندهایی که در آن یک گروه قندی به پروتئین، لیپید و یا مولکولی‌های دیگر سلول متّصل می‌شود، اشاره دارد. این پردازش توسط گلیکوزیل‌ترانسفراز[4] انجام می‌گیرد. این آنزیم فعالیّت‌های گسترده‌ای نظیر انتقال مونوساکاریدها به پروتئین را کاتالیز می‌کنند.

گلیکوزیلاسیون به پروتئین ثبات و در برخی موارد ویژگی‌های منحصربه‌فردی می‌دهد. معمول‌ترین گلیکوزیله‌شدن پروتئینی افزوده‌شدن ترکیب‌های ویژه قندی به سرین یا ترئونین، به‌صورت O-گلیکوزیدی، و یا به آسپارژین، به‌صورت N-گلیکوزیدی است (شکل ۶-۴).

[1] Pro-protein
[2] Pro-peptide
[3] Glycosylation
[4] Glycosyltransferases



شکل ۸-۴- گلیکوزیلاسیون پروتئین. معمول ترین گلیکوزیله شدن پروتئینی افزوده‌شدن به صورت O-گلیکوزیدی قند به اسیدآمینه های سرین یا ترئونین (سمت راست) و یا افزوده‌شدن به صورت N-گلیکوزیدی قند به اسیدآمینه های آسپارژین در رشته پلی‌پپتید است.

این پردازش فقط در سلّول‌های یوکاریوتی انجام می‌گیرد و درواقع یکی از ویژگی‌های منحصربه‌فرد این سلّول‌ها محسوب می‌شود. گلیکوزیلاسیون باعث می‌شود که سیستم بیان در

اشرشیا کولی به سنتز پروتئین‌های حیوانی محدود شود که برای فعالیّت نیاز به گلیکوزیله شدن نداشته باشند (راوول[1] و همکاران، ۲۰۰۱).

علاوه بر گلیکوزیلاسیون، افزایش برخی گروه‌ها به آمینواسیدهای پروتئین از طریق سازوکار-هایی نظیر فسفوریلاسیون[2] (اضفه شدن گروه‌های فسفری)، سولفاته شدن[3] (اضافه شدن سولفات)، استیلاسیون[4] (اضافه شدن گروه استیل به یک مولکول دیگر)، لیپیداسیون یا پرنیلاسیون[5] (اضافه شدن گروه‌های هیدروفوبیک به پروتئین)، اسیلاسیون[6] (اضافه شدن گروه اسیل به یک مولکول دیگر)، گاماکربوکسیله شدن[7] (اضافه شدن گاماکربوکسیل به اسیدآمینه‌های گلوتامین زنجیرهٔ پلی‌پپتید که به پروتئین مربوطه (موجود در خون) توانایی حمل کلسیم را می‌دهد) و پالمتیله شدن[8] (اضافه شدن اسیدچرب اسیدپالمیتیک به پروتئین) نیز صورت می‌گیرد. ولی گلیکوزیله شدن پروتئین‌های نوترکیب دارای دقّت، حسّاسیت و اهمّیت بیشتری است.

توضیح این نکته ضروری است که هیچ سلّول یوکاریوتی توانایی اعمال تمامی‌این پردازش‌ها را ندارد، بنابراین با توجه به پردازش مورد نیاز برای یک پروتئین خاص، سلّول یوکاریوت مناسبی انتخاب می‌شود (کامپبیل[9] و همکاران، ۱۹۸۴).

۳-۸- عدم پایداری پروتئین‌های نوترکیب در سلّول میزبان

مشکل دیگر در تهیهٔ پروتئین نوترکیب عدم پایداری پروتئین‌های نوترکیب در سلّول میزبان است. پروتئین‌های نوترکیب به‌دلیل این‌که در سلّول میزبان قابل شناسایی توسط سیستم ایمنی نیستند، تجزیه می‌شوند. یکی از دلایل کم بودن مقدار پروتئین تولیدی حتی در مواقع بیان زیاد ژن مربوطه تجزیه پروتیئن‌های غیرمیزبانی است. راه حل این مشکل تولید پروتئین هم‌جوش است. این پروتئین از ترکیب کووالانی پروتئین نوترکیب با یک پروتئین پایدار درون سلّول ایجاد شده و باعث می‌شود که پروتئین نوترکیب نسبت به عمل پروتئازها پایدار شوند.

---

[1] Rawool
[2] phosphorylation
[3] Sulfation
[4] Acetylation
[5] Prenylation
[6] Acylation
[7] Gamma-glutamyl carboxylation
[8] Palmitoylation
[9] Campbell

این اتّصال نه در سطح پروتئین بلکه از طریق اتّصال توالی دو ژن و در سطح DNA صورت می‌گیرد. ژن موردنظر در درون ناحیه‌ای درکنار یک ژن میزبان قرار داده می‌شود. نکتهٔ مهم این است که مکان قرارگیری دو ژن باید به‌صورتی باشد که به چارچوب خواندن ژن دوم آسیب نرساند. برای حل این مشکل در ابتدا بایستی توالی دو ژن را مشخّص کرد و سپس با اطلاع دقیق از تعداد نوکلئوتید آن‌ها ژن موردنظر را وارد کرد (گراسمن[1] و همکاران، ۱۹۹۸).

از طرف دیگر، از آنجایی که اتّصال قطعه اسیدآمینه‌ای به پروتئین نوترکیب به احتمال زیاد برروی فعالیّت این پروتئین تأثیرگذار است. بنابراین نیاز است که قطعهٔ اضافی حذف شود. وارد کردن یک توالی کدکننده توالی خاصی از اسیدآمینه بین دو ژن که توسط پروتئازهای غیرباکتریایی قابل شناسایی باشد، این مشکل را حل خواهد کرد. دلیل شناسایی توسط پروتئاز غیرباکتریایی این است که توالی متّصل کننده نباید در درون باکتری مورد شناسایی قرار گرفته و تجزیه شود. ورود این توالی در سطح DNA انجام می‌گیرد. به‌عنوان مثال وارد کردن توالی DNA کد کنندهٔ قطعه اسیدآمینه Ile-Glu-Gly-Arg می‌تواند مفید واقع شود. چراکه بعداز استخراج و خالص‌سازی پروتئین الحاقی و تیمار با فاکتور Xa پروتئین الحاقی از محل توالی فوق آزاد می‌شود (مراجعه شود به فصل دوم).

کاربرد دیگر قطعات اضافه شده، در خالص‌سازی پروتئین است. به‌عنوان مثال، امتزاج‌های حاوی آنزیم GST می‌توان توسط جذب آن‌ها به دانه‌های آگارز که واجد پیوند گلوتاتیون می‌باشند تخلیص کرد (گاچتی[2] و همکاران، ۱۹۹۸).

از روش‌های دیگر نیز می‌توان پایداری پروتئین‌ها را در هردو سیستم پروکاریوتیک و یوکاریوتیک افزایش داد. اضافه کردن اسیدآمینه به انتهای زنجیره پلی‌پپتیدی یکی ازاین روش‌ها است. در این روش، افزودن حتی یک اسیدآمینه خاص به انتهای N زنجیره پلی‌پپتید موجب پایداری بسیار بیشتر پروتئین می‌شود. به‌عنوان مثال با افزودن اسیدآمینه‌های Met، Ser و Ala به پایانه N آنزیم بتاگالاکتوزیداز نیمه‌عمر این پروتئین اصلاح شده را می‌توان از ۲ دقیقه به بیش از ۲۰ ساعت افزایش داد (جدول ۸-۱).

---

1 Grossman

2 Guchte

جدول ۸-۱- رابطهٔ بین اسیدآمینه اضافه شده به انتهای N زنجیره پلی‌پپتید و پایداری پروتئین

اسیدآمینه اضافه شده	نیمه عمر
Ser, Ala, Met	بیش از ۲۰ ساعت
Thr, Val, Gly	بیش از ۲۰ ساعت
Ile, Glu	بیش از ۳۰ دقیقه
Tyr, Gln	حدود ۱۰ دقیقه
Pro	حدود ۷ دقیقه
Phe, Leu, Asp, Lys	حدود ۳ دقیقه
Arg	حدود ۲ دقیقه

از طرفی وجود توالی‌های خاصی نظیر توالی موسوم به پِست[1] که غنی از اسیدآمینه‌های پرولین، گلوتامین، سرین و ترئونین است، حسّاسیت به آنزیم‌های پروتئولیتیک را افزایش می‌دهد. در واقع این توالی‌ها نشانه‌هایی برای سیستم‌های تجزیه داخل سلّولی هستند و در پروتئین‌هایی دیده می‌شوند که دارای نیمه‌عمر داخل سلّولی پایینی باشند. در واقع پست یک توالی نشانه برای تجزیهٔ پروتئین است. این تجزیه توسط کمپلکس آنزیمی پروتئوزوم[2] و آنزیم وابسته به کلسیمِ کالپین[3] کاتالیز می‌شود. تحقیقات نشان داده است که با دست‌ورزی در این توالی می‌توان نیمه‌عمر پروتئین‌های تولیدی را افزایش داد.

۸-٤- بیان پروتئین‌های با چند زیرواحد

در برخی موارد نیاز به این است که در یک سلّول، دو ژن به‌طور هم‌زمان بیان شود. به‌عنوان مثال، پروتئین هموگلوبین چهار زیرواحد از دو نسخه زنجیره پلی‌پپتیدی دارد ($\alpha_2 \beta_2$). برای تولید پروتئین‌هایی که چند زیرواحد دارند از دو روش استفاده می‌شود.

در روش اول، ژن‌های مربوط به هر زیرواحد را به دو سلّول به‌طور جداگانه انتقال داده و بیان می‌شود. سپس پروتئین‌های هر زیرواحد به‌طور جداگانه استخراج و خالص‌سازی می‌شوند. در نهایت در لولهٔ آزمایش دو زنجیرهٔ به‌هم متّصل و پروتئین کامل شکل می‌گیرد. عیب اصلی این روش این است که علاوه براین‌که بازدهی کمی دارد، اکثر زیرواحدهای پروتئین‌های نوترکیب دارای چند زیرواحد در شرایط خارج سلّولی یا به‌یکدیگر متّصل نمی‌شوند و اگر هم متّصل شوند

[1] PEST Sequence
[2] Proteasome
[3] Calpain

به‌خوبی شرایط درون سلّولی این پیوندها برخوردار نخواهند بود و درنتیجه پروتئین تولیدی عملکرد مناسبی را نخواهد داشت.

در روش دوم، دو ناقل بیان که هرکدام یکی از زیرواحدهای پروتیئن موردنظر را دارند به‌طور هم‌زمان وارد یک سلّول میزبان مناسب بیان می‌شوند. از آنجایی که هرکدام از ناقل‌ها نشانگرهای انتخاب متفاوتی دارند، بنابراین به‌راحتی می‌توان سلّول‌هایی را انتخاب کرد که هردو ناقل را دارا می‌باشند. ضعف اصلی این روش این است که اولاً تولید سلّول‌هایی که هردوی این ناقل‌ها را داشته باشند مشکل است چراکه معمولاً فقط یکی از دو ناقل وارد هر سلّول می‌شوند. ازطرفی، این احتمال وجود دارد که نسبت ناقل‌ها در سلّول یکسان باقی نماند و یکی از زیرواحدها بیشتر از زیرواحد دیگر تولید شود و درنهایت مقدار تولید نهایی را کاهش دهد.

راه حل این مشکل تهیهٔ ناقل‌هایی است که هردوی ژن‌ها را حمل کند. نوعی از ناقل‌های دو ژنی، ناقل‌های دو کاسته[1] است. در این حالت، دو ژن تحت کنترل دو راه‌انداز و نشانه پلی‌آدنیلاسیون جداازهم قرار می‌گیرند (هاردینگ[2] و همکاران، ۱۹۹۴).

در روش دیگری اطمینان از تولید یکسان دو نوع پروتئین بیشتر است. در این روش هر دو ژن در کنترل یک راه‌انداز و نشانه پلی‌آدنیلاسیون مشترک قرار می‌گیرند. این دو ژن توسط یک جایگاه ورود ریبوزومی‌داخلی[3] از هم جدا می‌شوند. در نتیجه ساختار «ژن–IRES–ژن» تحت رونویسی مشترک قرار می‌گیرد و یک رونوشت دو ژنی[4] ساخته می‌شود. در نهایت نظیر دیگر IRESها، ترجمه از سمت '۵ و از قسمت انتهای رونوشت برای ترجمه یکی از ژن‌ها و از قسمت مرکزی یعنی IRES برای ترجمه ژن دوم انجام می‌شود.

همان‌طور که گفته شد با توجه به پرهزینه بودن تولید صنعتی پروتئین در سیستم‌های پستان‌داران، از این سیستم‌های تولیدی فقط در مواردی استفاده می‌شود که هدف تولید پروتئینی خاصی نظیر پروتئین‌های چند زیرواحدی باشد، که فقط از کشت سلّولی پستان‌داران بدست آید. استفاده از کشت سلّولی پستان‌داران معمولاً در تولید پروتئین‌های مورد نیاز در طرح‌های تحقیقاتی و مطالعات بالینی استفاده می‌شود (پرایس[5] و همکاران، ۱۹۸۹).

---

[1] Double cassette vectors

[2] Harding

[3] Internal Ribosome Entry Site (IRES)

[4] Dicistronic mRNA

[5] Price

فصل نهم

کاربردهای تهیه پروتئین‌های نوترکیب

۹-۱- کاربردهای تهیهٔ پروتئین‌های نوترکیب

موارد استفاده از پروتئین‌های نوترکیب بسیار زیاد است. در ادامه نمونه‌هایی از این کاربردها بحث خواهند شد.

۹-۲- تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب

آنتی‌بادی‌های نوترکیب[1] با استفاده از روش‌های مختلفی بیان می‌شوند که به‌طور روزافزونی برای درمان سرطان و دیگر بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. صنعت تحقیق و تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب هرساله چندین میلیاردها دلار را به خود اختصاص می‌دهد که نیرومحرکهٔ توسعهٔ این صنعت روش‌های مهندسی آنتی‌بادی بر پایهٔ بیان باکتریایی آنتی‌بادی‌ها می‌باشد.

[1] Recombinant Antibodies (rAbs)

در تولید آنتی‌بادی تلاش برای طراحی مولکول‌های آنتی‌بادی انجام می‌گیرد که واجد حلّالیّت بالا، پایداری ژنتیکیِ ساختار ژنی در میزبان بیان، پایداری خودبه‌خودی پروتئین تولیدی در سیستم بیان، با صرفه اقتصادی و بازده بالا، خالص‌سازی و اعمال آسان تغییرات پس از ترجمه مورد نیاز باشند (ولش[1] و همکاران، ۱۹۹۴).

۳-۹- تولید واکسن‌های نوترکیب

واکسیناسیون به‌منظور تحریک سیستم ایمنی به‌منظور آمادگی بدن در مقابل عوامل بیماری‌زا صورت می‌گیرد. استفاده از واکسن‌های زنده ضعیف شده و یا کشته شده فقط در بدن تعداد کمی از افراد جامعه ایمنی کامل را ایجاد می‌کند. ازاین‌رو امروزه استفاده از زیرواحدهای واکسنی به‌منظور کسب ایمنی بالاتر مورد توجه قرار گرفته است. زیرواحدهای واکسنی به‌صورت تجاری از سلّولهای مخمّری، باکتریایی و حیوانی تراریخت تولید می شوند (جنکینز[2] و همکاران، ۱۹۹۶).

بیان پروتئین آنتی‌ژن A باکتری استرپتوکوکوس موتانز[3] در گیاه توتون در سال ۱۹۹۰ اولین مورد از تولید واکسن در گیاهان به شمار می‌رود. پس از آن بیان آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B[4] و سپس آنتروتوکسین[5] مسئول بیماری اسهال، پروتئین پوششی ویروس نوروالک[6] و گلیکوپروتئین ویروس‌هاری نیز انجام شد. پروتئین‌های تولید شده در گیاهان آنتی‌ژن‌های اختصاصی مخاطی IgA[7] و سرمی IgG[8] را در هنگام مصرف خوراکی واکسن‌ها در انسان و موش تحریک می‌نمایند.

۱-۳-۹- اهمیّت تولید واکسن های مشتق شده از گیاهان

یکی از معضلات واکسیناسیون در کشورهای در حال‌توسعه، علاوه بر تهیهٔ و تولید واکسن، انتقال واکسن از محل تولید به مصرف و تزریق آن‌ها است که با استفاده از گیاهان تولیدکننده واکسن می‌توان بر این مشکل غلبه کرد. در کشورهای توسعه‌یافته استفاده از گیاهان به‌منظور تولید واکسن، ایمنی واکسن را افزایش داده و هزینه‌های برنامه واکسیناسیون را نیز کاهش می‌دهد.

---

[1] Walsh
[2] Jenkins
[3] Streptococcus Mutans
[4] Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg)
[5] Enterotoxin
[6] Norwalk Virus (Norovirus)
[7] Immunoglobulin A
[8] Immunoglobulin B

علاوه بر این موارد، سیستم‌های جانوری به دلایل شباهت با سیستم انسانی می‌توانند موجب انتقال عوامل بیماری‌زا به‌ویژه ویروس‌ها و پریون‌ها به بیمار گیرنده واکسن شوند. درحالی‌که در سیستم‌های گیاهی حتی در صورت وجود عوامل بیماری‌زا، به‌دلیل عدم هم‌خوانی سازوکار عوامل بیماری‌زا با سازوکارهای سلّول گیاهی، توانایی ایجاد بیماری را نداشته و در مدت زمان کوتاهی پس از ورود به سیستم گیاهی تولید واکسن حذف می‌شوند.

۲-۳-۹- مصرف خورا کی واکسن و پاسخ‌های آنتی‌بادیهای مخاطی و سیستمیک

بیشتر عوامل بیماری‌زا از طریق غشاهای مخاطی وارد بدن می‌شوند. ازاین‌رو استفاده از واکسن‌هایی که ازطریق مخاط وارد شده و باعث تحریک ایمنی مخاطی می‌شود، برای جلوگیری از ورود عوامل بیماری‌زا از سلّول‌های مخاطی بسیار سودمند است. ورود این نوع واکسن از طریق مخاط باعث تحریک تولید sIgA سبب می‌شود که ایزومر آنتی‌بادی غالب در ترشّحات مخاطی است. در حالی‌که در تحریک کننده‌های ایمنی سیستمیک، واکسن‌ها بوسیلهٔ تزریق وارد بدن می‌شوند و در نتیجه پاسخ‌های ایمنی، به دلیل ورود بیشتر عوامل بیماری‌زا از طریق مخاط، ناکافی است. این درحالی است که واکسن‌های مشتق شده از گیاه، توانایی تحریک هر دو پاسخ ایمنی مخاطی و سیستمیک را دارند. عیب اصلی واکسن‌های خوراکی این‌است که ممکن است به‌دلیل pH پائین و اثر آنزیم‌های معده و روده برش خورده و هضم شوند. این‌درحالی‌است که واکسن‌های بیان شده در گیاهان این مشکل را ندارند. زیرا دیوارهٔ سلّولی به‌طور مؤثّری از آنتی‌بادی محافظت می‌کند و ازطرفی همانند لیپوزوم‌ها و کپسول‌ها، دیوارهٔ گیاهی به پروتئین‌های آنتی‌بادی امکان خروج تدریجی را می‌دهد که این باعث می‌شود اثرات هضم کاهش یابد (اسکوبل[1] و همکاران، ۱۹۹۰).

۳-۳-۹- سلامتی و پذ یرش عمومی واکسن‌های خورا کی

همان‌طور که بیان شد واکسن‌های مشتق شده از گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زای حیوانی هستند. به‌علاوه پژوهش‌ها نشان داده است که DNA گیاهان هنوز واکنشی به DNA حیوانی نداشته و همچنین ویروس‌های گیاهی هیچ‌گونه نوترکیبی را با سلول‌های حیوان نشان نمی‌دهند.

به‌طورکلّی تولید واکسن در گیاهان دارای مزایای زیادی است که عبارتنداز: هزینهٔ پائین تهیهٔ مواد اولیه، برداشت سریع محصول تولیدی، تولید چندین واکسن به‌طور هم‌زمان، ذخیره و

[1] Scoble

نگهداری راحت‌تر، عدم نیاز به زنجیرهٔ سرد در طول حمل و نقل واکسن، راحتی مصرف محصولات غذایی، کاهش نگرانی در مورد آلودگی واکسن با عوامل بیماری‌زای انسانی در طول مراحل تولید واکسن، حذف هزینه‌های مربوط به سرنگ و وسایل تزریق، عدم نیاز به افراد متخصص و کارشناسان پزشکی، حذف ترس از تزریق واکسن به‌ویژه در کودکان و عدم نگرانی مربوط به انتقال بیماری‌ها از طریق تزریق.

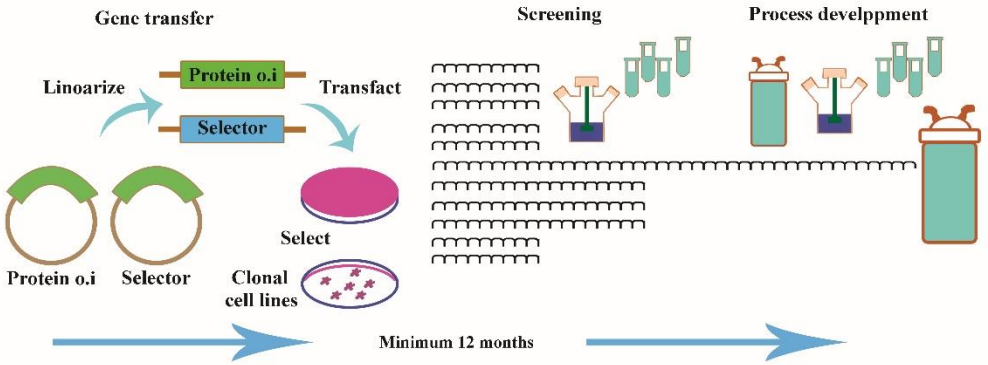
یک مشکل دیگر، شناسایی گیاه‌هان تراریخت تولیدکننده واکسن در مزارع است که باید از گیاهان زراعی غیرتراریخت به‌طور کاملاً واضحی متفاوت باشند و بهترین نشانگر تشخیصی، ژن‌های کدکننده رنگ است. تا بتوان در کم‌ترین زمان و توسط افراد غیرمتخصص شناسایی گردند. چراکه اگر گیاه‌هان تراریخت و غیر تراریخت در نزدیکی یکدیگر و یا تصادفاً در یک مزرعه در کنار یکدیگر کشت شوند امکان انتقال ژن‌های تولید واکسن به گیاه زراعی غیرتراریخت از طریق گرده افشانی وجود دارد. اگر این انتقال ژن ناخواسته صورت گیرد، ممکن است پروتئین‌های نوترکیب از طریق گیاه‌هان به‌ظاهر غیرتراریختی که ژن نوترکیب را دریافت کرده‌اند به بدن افراد سالم برسد که این می‌تواند باعث ایجاد مشکلاتی در سیستم ایمنی بدن دریافت‌کننده‌ها شود. راه حل دیگر این است که گیاه‌هان تولید کنندهٔ واکسن در سطح کوچکی از مزرعه یا گل‌خانه و با شرایط کنترل شده محیطی کشت شوند. با وجود پایداری و هزینهٔ پائین تولید و در دسترس بودن واکسن‌های گیاهی، این واکسن‌ها محدودیت‌هایی نیز دارند. به‌عنوان مثال ایمنی بدست آمده از واکسن‌های گیاهی از یک میوه به میوهٔ دیگر و از یک گیاه به گیاه دیگر و از یک نسل به نسل دیگر به‌دلیل تفاوت مقدار یا دوز، متفاوت است.

٤-٩- تولید داروهای انسانی

در سال ۱۹۸۶ فعّال کننده پلاسمینوژن بافت انسانی[1] به‌عنوان اولین پروتئین درمانی در سلّول‌های تراریخت پستانداران تولید شد. امروزه در حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد از پروتئین‌های نوترکیب درمانی در سلّول‌های پستانداران تولید می‌شود. اما لاین‌های سلّولی دیگر نظیر سلّول‌های گرفته شده از میلومای موش[2]، کلیه نوزاد همستر، کلیه جنین انسانی (لاین HEK-293) و سلّول‌های شبکیّهٔ چشم انسان دارای ویژگی‌های مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب هستند.

[1] Human tissue plasminogen activator (tPA)
[2] Mouse myloma (NSO)

اگرچه فرآیندهای کشت سلّول پستانداران برای تولید داروهای پروتئینی براساس سلّول‌هایی هستند که به‌صورت سوسپانسیونی کشت می‌شوند اما از روش‌های کشت دیگر می‌توان استفاده کرد. الگوی تولید پروتئین‌های نوترکیب در پستانداران در شکل ۹-۱ نشان داده می‌شود (رالستون[1] و همکاران، ۱۹۹۳).



شکل ۹-۱- تولید و توسعهٔ سلّولی به‌منظور کشت سلّولی برای تولید پروتئین نوترکیب موردنظر.

خط‌های موج‌دار زیرکشت‌هایی از لاین‌های سلّولی هستند که برای بدست آوردن سلّول‌های تولیدکننده نهایی وارد برنامه غربالگری می‌شود. ویال‌ها نشان دهنده سلّول‌های منجمد شده در نیتروژن مایع هستند. از فلاسک‌ها برای تولید در مقیاس کوچک و بیوراکتورها به‌منظور تولید در مقیاس وسیع استفاده شده است.

ابتدا ژن موردنظر درکنار عناصر تنظیم‌کننده نسخه‌برداری آن وارد سلّول می‌شود. علاوه برآن یک ژن دوم نیز به‌عنوان نشانگر انتخابی وارد می‌شود. در حضور عامل انتخابی، که چند روز بعد از انتقال ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد، سلّول‌های تراریخت دارای ژن موردنظر باقی می‌مانند. عموماً از ژن DHFR که در متابولیسم نوکلئوتید و مقاومت به متوترکسیت دخیل است (مراجعه شود به فصل چهارم) و گلوتامین سنتتاز[2] به‌عنوان نشانگر انتخابی در پستانداران استفاده می‌شود. در هردوی این موارد انتخاب در غیاب متابولیت‌های ویژه، هیپوگزانتین و تیامیدین در مورد DHFR و گلوتامین در مورد GS، صورت گرفته که از رشد سلّول‌های غیر تراریخت جلوگیری می‌شود. به‌منظور بیان پروتئین نوترکیب قرار داشتن ژن کدکننده پروتئین موردنظر و ژن انتخابی بر روی

[1] Ralston
[2] Glutamine-synthetase (GS)

یک پلاسمید اهمیت چندانی ندارد. بعد از انتخاب، سلول‌های باقیمانده وارد مرحله رشد و تکثیر جمعیّت سلّولی می‌شود. سرانجام کلونی‌های بوجود آمده برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد ارزیابی قرار گرفته و آن کلونی‌هایی که دارای تولید بیشتر هستند جدا شده و مورد تکثیر و مطالعه قرار می‌گیرند (ناسمیت[1] و همکاران، ۱۹۸۰).

۹-۵- تولید هورمون‌های نوترکیب

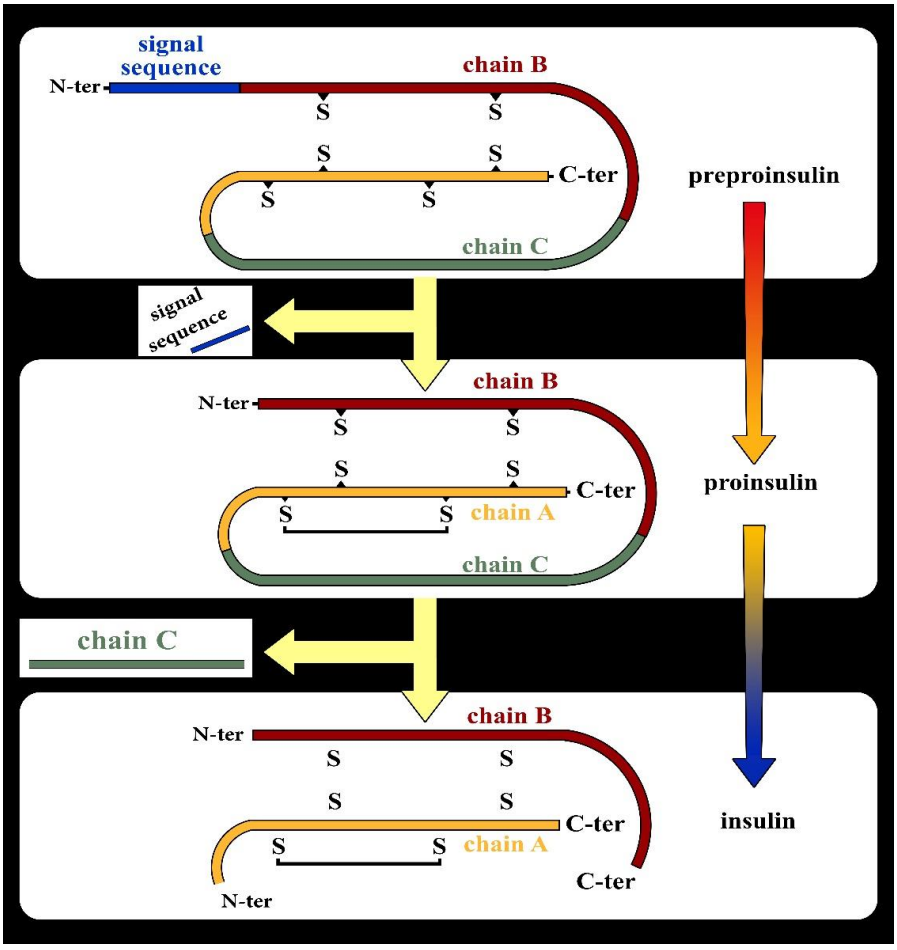
انسولین ساخته شده در سلّول‌های بتای لانگرهانس در پانکراس، میزان گلوکز را در خون تنظیم می‌کند. اگر گلوکز خون به‌دقت تنظیم نشود می‌تواند باعث بیماری دیابت و حتی باعث مرگ بیمار شود. بیماران دیابتی با دریافت مداوم انسولین، سطح قندخون آنان تنظیم شده و مشکلاّت ناشی قندخون بالا را نخواهند داشت.

قبل از تولید انسولین نوترکیب این هورمون از خون خوک‌ها و گاوهایی کشتارگاهی خالص-سازی می‌شد. اما با این‌که به‌طورکلّی استفاده از این نوع هورمون‌های استخراجی رضایت‌بخش است ولی در استفاده از آن‌ها مشکلاّتی نیز وجو دارد. اولاً، انسولین انسانی و حیوانی کاملاً مشابه نیستند که این می‌تواند باعث بروز واکنش در بعضی از بیماران شود و ازطرفی طی مراحل استخراج امکان آلودگیِ انسولین وجود دارد. نکته آخر این‌که، احتمال آلودگی انسولین استخراجی به عوامل بیماری‌زای دامی‌که ممکن است برای بدن انسان نیز مشکلاّفرین باشد وجود دارد.

دو ویژگی انسولین تولید آن‌را تسهیل کرده‌است. اول این‌که انسولین نیاز به گلیکوزیلاسیون ندارد و بنابراین می‌توان آن‌را در باکتری‌ها در مقادیر بالا تولید کرد. از طرفی، انسولین یک پروتئین کوچک با دو زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی ۲۱ واحدی به‌نام زنجیرهٔ A و ۳۰ واحدی به‌نام زنجیرهٔ B است. انسولین در ابتدا به‌صورت زنجیرهٔ پلی‌پپتید بلندی موسوم به پیش‌انسولین[2] ساخته می‌شود. پیش‌انسولین علاوه بر زنجیره‌های A و B، زنجیرهٔ C برای متّصل‌کننده دو زنجیرهٔ A و B و یک توالی پیش‌رو است. طی مراحل پس از ترجمه، زنجیرهٔ C و توالی پیش‌رو حذف می‌شوند و زنجیره‌های A و B با دو پیوند دی‌سولفید به‌هم متّصل می‌شوند (شکل ۷-۲).

[1] Nasmyth
[2] Preproinsulin

به‌منظور تولید انسولین نوترکیب، ابتدا ژن کدکننده انسولین بر اساس ردیف اسیدآمینه آن، سنتز شد. روشن است که ژن تولیدی دقیقاً همان توالی ژن اصلی را ندارد ولی سنتزکننده رشته-پلی‌پپتیدی صحیح را خواهد بود. در یک روش، هر دو ژن کدکننده زنجیرهٔ A و B به‌طور جداگانه وارد پلاسمید pBR322 در کنترل راه‌انداز 'lacZ قرار می‌گیرند. دراین حالت پروتئین تولیدی در ابتدای خود چند آسیدامینه ابتدایی مربوط به β-گالاکتوزیداز را دارد. در مرحلهٔ بعد پروتئین‌های نوترکیب استخراج می‌شوند. پروتئین‌های نوترکیب تحت تیمار با سیانوژن‌بروماید[1] قرار می‌گیرند (کاست[2] و همکاران، ۲۰۰۲).



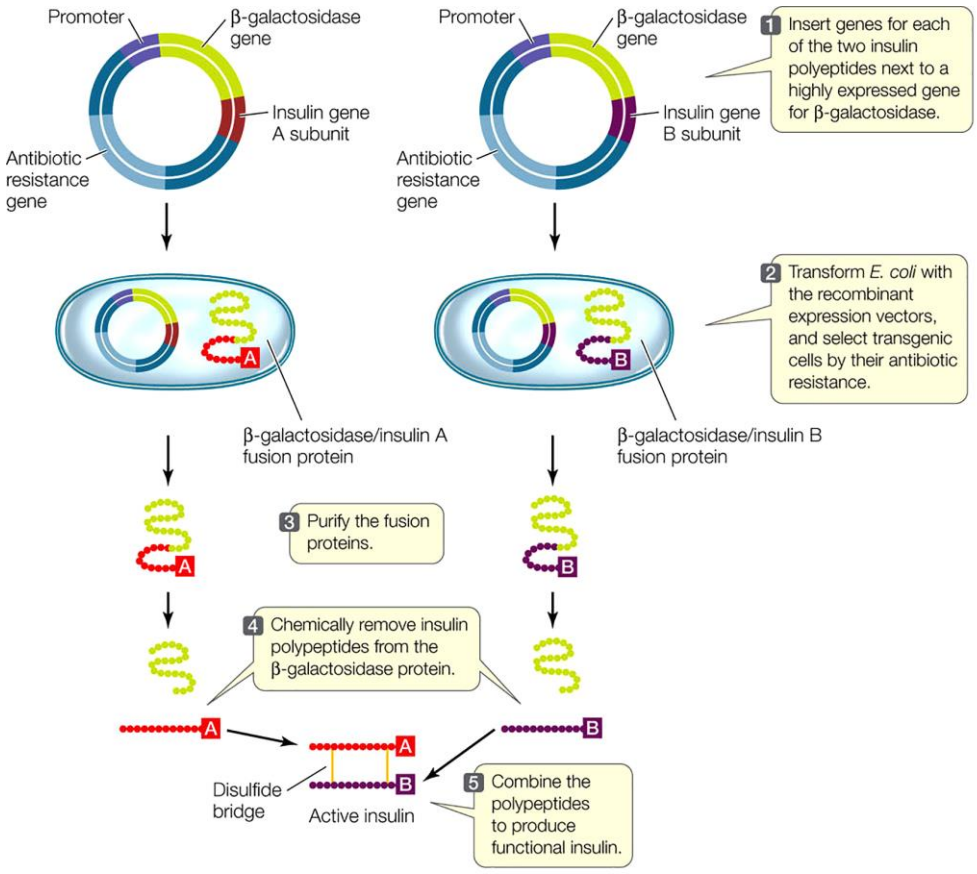
[1] Cyanogen bromide
[2] Kost

شکل ۹-۲- مراحل پردازش انسولین در سلولهای انسانی. در ابتدا انسولین به‌صورت یک رشتهٔ بلند پلی‌پپتید به‌نام پروانسولین ساخته می‌شود. در مرحلهٔ بعد توالی راهنما از انتهای آمین آن حذف می‌شود. سپس زنجیرهٔ C که مابین زنجیره های A و B قرار دارند برش خورده و زنجیره‌های A و B با دو پیوند دی‌سولفید به‌یکدیگر متّصل می‌شوند.

سیانوژن‌بروماید یک ترکیب پزدوهالوژن و دارای فرمول مولکولی CNBr [1] است. از این ترکیب در واکنش‌هاش شیمیایی مربوط به پلی‌مرهایی نظیر پروتیئن و پپتید استفاده می‌شود. کاربرد اصلی این ترکیب برش پلی‌پپتید از طریق شکستن پیوند پپتیدی بین دو اسیدآمینه است. برش درناحیه کربوکسیل اسیدآمینه متیونین انجام گرفته که باعث می‌شود قطعات پپتیدی با اندازه‌های مختلف ایجاد شود.

در اثر تیمار با سیانوژن‌بروماید قطعه اضافی مربوط به β-گالاکتوزیداز در محل متیونین حذف می‌شود. در مرحلهٔ پایانی زنجیره‌های خالص شده A و B در لوله آزمایش با پیوند دی‌سولفید به‌یکدیگر متّصل می‌شوند (شکل ۳-۹). بررسی عملکرد انسولین تولید شده در این روش نشان می‌دهد که تشکیل پیوند دی‌سولفید در لوله آزمایش نسبتاً ناموفق بوده و با بازده پایینی صورت می‌گیرد (هادسون[2] و همکاران، ۲۰۰۱).

[1] Br–C≡N
[2] Hudson



شکل ۹-۳- فرآیند تولید انسولین با استفاده از دو سلول تراریخت. در هرکدام از سلّول‌ها ژن کدکننده زنجیرهٔ A و زنجیرهٔ B انتقال داده می‌شود. پس از تولید زنجیرهٔ A و B، رشته‌های پلی‌پپتید خالص‌سازی شده و درکنار یکدیگر در یک مخلوط قرار داده می‌شوند تا پیوندهای دی‌سولفید آن تشکیل شود.

در مراحل بعدی تکامل این روش، ژن کامل پیش‌انسولین به باکتری انتقال داده‌شد. این روش این باعث می‌شود که پیوند دی‌سولفید به‌درستی در باکتری و یک محیط زنده ایجاد شود و متعاقب آن رشته پلی‌پپتیدی حاصله به‌درستی تا بخورد. در پایان زنجیرهٔ C با یک برش پروتئولیتیکی جدا می‌شود (استیوارت[1] و همکاران، ۲۰۰۳).

[1] Stewart

فصل دهم

سیستم‌های بیان پروتئین‌های نوترکیب

۱-۱۰- سیستم‌های بیان پروتئین خارج سلّولی

تولید پروتئین‌های نوترکیب فقط به سیستم‌های زنده محدود نمی‌شود و آن‌را می‌توان در خارج از سّلول نیز انجام داد. سیستم‌های بیان پروتئین خارج سلّولی[1] نیازمند چهار عامل اصلی شامل:

۱- توالی ژنی که دارای بخش‌های مربوط به نسخه برداری و ترجمه است، ۲- یک RNA پلیمراز و کوفاکتورهای مورد نیاز برای نسخه برداری، ۳- ریبوزوم و tRNA برای ترجمهٔ mRNA و ۴- آنزیم‌هایی برای تغییر پروتئین که خود شامل آنزیم‌هایی نظیر گلیکوزیل‌ترانسفراز و کوفاکتورهای آن می باشد (احمد[2] و همکاران، ۲۰۰۵).

سیستم‌های اولیه بیان خارج سلّولی عصاره‌های سلولی فاقد DNA و RNA بوده است. این عصاره معمولاً از عصارهٔ سلّولی پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌هایی نظیر *اشرشیا کولی*، جنین گندم و یا رتیکولوسیت[3] خرگوش به دلیل قابل‌دسترس بودن و هزینهٔ پایین آن‌ها به‌دست می‌آمد.

با این‌حال در این‌جا نیز مشکل تغییرات پس‌ازترجمه وجود دارد. عصارهٔ استخراج شده از *اشرشیا کولی* توانایی اعمال تغییرات پس از ترجمه را ندارد. این موضوع به‌ویژه برای پروتئین‌هایی مهم است که به‌طورخودبه‌خودی توانایی ایجاد تا خوردگی‌های لازم برای رسیدن به شکل فعّال

[1] Cell free protein expression
[2] Ahmed
[3] Reticulocyte

خود در طی مراحل ترجمه ندارند. برای نمونه استفاده از این سیستم در پروتئین‌های غشایی و چاپرون‌ها[1] به دلایل مذکور موفّق نبوده است. با اینکه با استفاده از تیمارهایی نظیر استفاده از یدواستامید می‌توان باندهای دی‌سولفید را ایجاد کرد، ولی این موضوع باعث حذف کامل فعالیّت احیاگری این پروتئین‌ها نیز خواهد شد چراکه سیستم غیرزنده توانایی تشخیص محل دقیق باند دی‌سولفید را ندارد. یدواستامید بین گروه‌های تیول پیوند سولفیدی برقرار می‌کند که در پلی‌پپتید بین همهٔ اسیدآمینه‌های سیستئین پیوند دی‌سولفید را ایجاد می‌کند. این درحالی است‌که در محیط زنده، فقط بین بعضی از اسیدآمینه‌های سیستئین پیوند برقرار می‌شود که علاوه بر حفظ ویژگی احیاگری، شکل سه‌بعدی مناسب خود را نیز به‌دست می‌آورند (چاود هوری[2] و همکاران، ۱۹۹۲).

از طرفی پروتئین‌های تولید شد در این نوع سیستم‌ها مشکلات جدی در حلّالیّت نیز خواهند داشت. یک راه حل برای این مشکل استفاده از حلّالیّتِ شوینده‌ها است. این عمل به پروتئین خاصیت حل‌پذیری در چربی و یا آب را می‌دهد که برای فعالیّت این نوع از پروتئین‌ها لازم است.

این مشکلاًت باعث شده است که سیستم‌های تولید پروتئین خارج از سلّول فقط برای تولید قطعات پروتئین غشایی و به‌منظور مطالعات ساختاریِ این نوع از پروتئین‌ها استفاده شود. این مورد به‌ویژه برای کار با پروتئین‌های سمی و نظیر آن، که تولید آن‌ها در سلول‌های زنده به سختی صورت می‌گیرد بسیار مناسب است. از نظر فنی در نسخه‌برداری درون شیشه‌ای، ژن‌های موردنظر در پلاسمیدهای بیان استانداردی که نوعا راه‌اندازهای SP6 یا T7 را حمل می‌کنند همسانه‌سازی می‌شوند. ترجمهٔ این RNAها به پروتئین می‌تواند همراه نسخه برداری و یا بعد از نسخه‌برداری و خارج سازی RNA صورت گیرد (کلامت[3] و همکاران، ۲۰۰۵).

[1] Chaperone
[2] Chaudhuri
[3] Klammt

جدول ۱۰-۱- مقایسه سیستم‌های بیان در چند میزبان از نظر هزینه تولید، زمان تولید، ظرفیت تولید و کیفیت تولید

سیستم بیان	مزیت‌ها	معایب	مناسب برای
کشت‌های باکتریایی	دارای قابلیّت بهینه‌سازی بالا، راحتی و سرعت بالای کار، بازده بالا در میزان تولید پروتئین	تا خوردگی نامناسب، تغیرات پس از ترجمه بسیار محدود	بیان در مقیاس وسیع، مناسب به‌ویژه برای تولید آنتی‌ژن
کشت مخمّر	دارای قابلیّت بهینه‌سازی بالا، راحتی و سرعت بالای کار، بازده بالا در میزان تولید پروتئین	اغلب دارای تا خوردگی نامنظم، تغیرات پس از ترجمه محدود	بیان در مقیاس وسیع، مناسب به‌ویژه برای تولید آنتی‌ژن، امکان مطالعات عملکردی پروتئین‌ها
کشت سلّولی حشرات	بازده بالا، تاخوردگی صحیح، انجام بعضی تغییرات پس از ترجمه	اماکن آلودگی با ویروس‌های بیماری‌زا، دمای کشت متفاوت، فعالیت انتقالی داخلی[1]	امکان مطالعات عملکردی پروتئین‌ها، تولید پروتئین‌های داروئی
آأسیت‌های وزغ[2]	ارزیابی عملکردی راحت‌تر و حساس‌تر پروتئین به دلیل اندازه بزرگ سلولی	دمای کشت متفاوت، فعالیت انتقالی داخلی وابسته به مرحله نموی آأسیت	غربالگری cDNA، شناخت سوبستراها و بازدارنده‌ها، مطالعه کینتیک‌های انتقالی
کشت سلّولی ساده پستان‌داران	عموماً دارای تغییرات پس از ترجمه و تاخوردگی صحیح، امکان سنجش مستقیم پروتئین تولیدی	صرف هزینه و زمان بیشتر، سطوح متغیّر بیان پروتئین، فقط برای مطالعه توزیع انتشار غیرمستقیم به خارج سلول	غربالگری cDNA، شناخت سوبستراها و بازدارنده‌ها، مطالعه کینتیک و کوفاکتورهای انتقالی، انتقال‌های مناسب داخل سلولی
کشت‌های سلّولی پستان‌داران با فنوتیپ متفاوت	عموماً دارای تغییرات پس از ترجمه و تاخوردگی صحیح، ترکیب غشایی درست، امکان سنجش مستقیم پروتئین تولیدی	صرف هزینه و زمان بیشتر، بکارگیری افراد مجّرب، برنامه حذف آلودگی تقریبا پیچیده، سطوح متغیر بیان پروتئین	انتقال با ناقل بیان، انتقال بین سلّولی، شناخت سوبستراها و بازدارنده‌ها، مطالعهٔ کینتیک و کوفاکتورهای انتقالی
سیستم خارج سلّولی	از نظر تجاری قابل دسترس، عدم آلودگی سیستم بیان، امکان بیان تولیدات سمی	بازده پایین، تغیرات اعمال شده بسته به میزان فعالیّت	مطالعات ساختاری، بازساختاری در غشاءهای مصنوعی

[1] Endogenous transport activity
[2] African clawed Frog (Xenopus Laevis)

فهرست واژگان

2 µm ori — **خاستگاه شروع همانندسازی پلامید ۲میکرومتری**

خاستگاه شروع همانندسازی در پلاسمیدهایی نظیر YEp که از پلاسمید ۲میکرومتری مخمّر منشأ گرفته است. این جایگاه شروع توانایی تکثیر زیاد و خوبه‌خودی و ترانسفورماسیون بالا را به پلاسمید می‌دهد.

5-bromo-4-chloro-3-inolylβ-D-galactopranoside(x-gal) — **۵-برمو۴-کلرو۳-ایندول بتا-دی-گالاکتوپرانوزاید**

یک مادّهٔ شیمیایی مشابه لاکتوز که به‌منظور سنجش حضور آنزیم بتا- گالاکتوزیداز استفاده می‌شود. بتا- گالاکتوزیداز می‌تواند این مادّ را اکسید کرده تا ترکیب نامحلول آبی رنگ به‌نام 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo تولید شود.

5-Fluoroorotic acid — **ترکیب FOA**

ترکیبی که به‌منظور انتخاب منفی سلّول‌های تراریختی که ناقل حامل ژن URA3 دریافت کرده‌اند، مورد استفاده قرار می‌گیرد. سلّول تراریخت که در محیط FOA قرار گیرد آن‌را به ترکیب سمّی تبدیل می‌کند که باعث مرگ سلّول می‌شود. این نوع انتخاب که باعث مرگ سلّول تراریخت می‌شود انتخاب منفی نام دارد.

5-phosphate decarboxylase (ODCase) — **۵- فسفات دکربوکسیلاز**

این آنزیم توسط ژن URA3 که به‌طور طبیعی بر روی کروموزوم شماره ۵ مخمّر قرار دارد کد می‌شود. برای توضیحات بیشتر مراجعه شود به 5-Fluoroorotic acid

آلفا- تکمیل شوندگی **α- complementation**

حالتی که در آن یک موجود سالم از تلاقی دو موجودی که هرکدام در یک صفت جهش‌یافته هستند، بوجود آید. و ایجاد پرتئین یا آنزیم کامل از طریق درکنارهم قرارگرفتن پلاسمیدهای جهش‌یافته که هرکدام یک قسمت از پروتئین را کد می‌کنند. وسیله‌ای برای تشخیص درکنارهم قرار گرفتن پلاسمید و یا تراریخت شدن سلّول است.

اسید فسفاتاز **Acid phosphatase**

یا فسفاتاز، آنزیمی که گروه‌های فسفات متّصل به مولکول‌ها را آزاد می‌کند. این آنزیم در لیزوزایم ذخیره می‌شود. به‌دلیل این‌که در محیط اسیدی فعالیت بهینه دارد، ازاین‌رو واژه اسید به ابتدای نام آن اضافه می‌شود.

آلبومین **Albumin**

عموماً به هر نوع پروتئینی که در آب و یا محلول با غلظت پایین نمک قابل حل باشد آلبومین گویند. به‌طور خاص، پروتئینی است که خون وجود داشته و توانایی اتّصال به یون‌های مثبت نظیر سدیم، کلسیم و پتاسیم، اسیدهای چرب و هورمون‌ها را داشته و در واقع این ترکیبات با اتّصال به آلبومین در خون حمل می‌شوند. به دلیل این ویژگی‌ها از ترکیبات ضروری در محیط کشت سلّولی جانوری است. این ماده از سفیده تخم‌مرغ قابل استحصال می‌باشد.

الکل اکسیداز **Alcohol oxidase (AOX)**

آنزیمی با ویژگی اکسیدکنندگی و از زیرمجموعه خانواده آنزیمی اکسیدوردوکتاز که توانایی

اکسید کردن الکل را دارد. محصول واکنش اکسیژن با الکل، آب اکسیژنه و آلدئید است.

الولاکتوز **Allolactose**

دی‌ساکاریدی که مشابه لاکتوز بوده و مانند لاکتوز از ترکیب قندهای گالاکتوز و گلوکز تشکیل می‌شود. تفاوت آن با گالاکتوز این است که به‌جای پیوند گلیکوزیدی ۴-۱ که در لاکتوز وجود دارد دارای پیوند ۶-۱ می‌باشد.

آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزید **Aminoglycoside antibiotic**

آنتی‌بیوتیکی که زیرمجموعهٔ خانواده بزرگ آمینوگلیکوزیدها است. آمینوگلیکوزیدها ترکیب‌هایی هستند که دارای قندهای آمین‌دار در بخش‌هایی از ساختمان مولکولی خود می‌باشند. آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی از دو جنس‌های قارچی استرپتومایسین (*Streptomyces*) با پسوند mycin نظیر کانامایسین (Kanamycin) و میکرومونوسپورا (*Micromonospora*) با پسوند micin نظیر جنتامایسین (Gentamicin) به‌دست می‌آید. آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، آربکاسین، نئومایسین، نتیل مایسین، پارومایسین، رودواسترپتوماسین، استرپتومایسین، توبرامایسین و پارامایسین از این دسته‌اند.

آنزیم آنترانیلیت‌سنتتاز **Anthranilate synthetase**

آنزیمی است که واکنش زیر را کاتالیز می‌کند:

$$\text{chorismate} + \text{L-glutamine} \rightleftharpoons \text{anthranilate} + \text{pyruvate} + \text{L-glutamate}$$

این آنزیم از خانواده آنزیمی لیازها (lyases) و فعالیّت آنزیمی خود را با شکستن پیوند کربن-کربن انجام می‌دهد.

ژن ایجاد کننده فنوتیپ مقاومت به آمپی‌سیلین (یا Ap^R (AMP

این ژن کدکننده آنزیم بتا- لاکتاماز است که مسئول مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتا- لاکتام نظیر آمپی‌سیلین، پنی‌سلین و سفامایسین می‌باشد.

آسپریژیلوس نیدولانس ***Aspergillus nidulans***

از گروه آسکومیست‌ها و از قارچ‌های رشته‌ای محسوب می‌شود. بیش از ۵۰ سال است که به‌عنوان یک موجود یوکاریوتی نقش مهمی‌را در تحقیقات بیولوژی سلّولی، ژنتیک و بیوتکنولوژی دارد. دارای هشت کروموزوم می‌باشد. جزء محدود جنس‌های قارچی محسوب می‌شود که توانایی انجام میوز و تولید اسپورهای‌هاپلوئید را دارد. این قارچ هوموتالیک است و ازاین‌رو توانایی خودتلقیحی را دارد که اهمیت آن را در تحقیقات ژنتیک بیشتر می‌کند. تعیین توالی کامل ژنوم آن در ۲۰۰۳ به پایان رسید. در این تعیین توالی مشخص شد این گونه ۳۰ میلیون جفت باز دارد و می‌تواند ۹۵۰۰ پروتئین مختلف را کد کند. به دلیل گلیکوزیله کردن مناسب و ترشّح پروتئین به محیط بیرون در تولید پروتئین نوترکیب اهمیت دارد.

آسپریژیلوس نیگر ***Asperigillus niger***

معروف‌ترین گونه جنس آسپریژیلوس محسوب می‌شود. این قارچ عامل کپک سیاه بر روی میوه‌ها و سبزی‌هایی نظیر انگور، پیاز، بادام زمینی و غذاها می‌شود. ژنوم این قارچ تعیین توالی شده است. به دلیل گلیکوزیله کردن مناسب و ترشح پروتئین به محیط بیرون در تولید پروتئین نوترکیب اهمیت دارد.

توالی‌های همانندساز خودبخودی **Autonomously Replicating Sequence (ARS)**

توالی‌هایی که دارای جایگاه شروع همانندسازی بوده و در ژنوم مخمر یافت می‌شود. این توالی دارای چهار ناحیه با نام‌های A، B1، B2 و B3 به ترتیب بر روی پایداری پلاسمید حامل آن تأثیرگذار هستند. اگر این نواحی دچار جهش شوند همانندسازی ژنوم مخمر شروع نخواهد شد. به‌عنوان مثال جهش در عنصر A که دارای توالی با ردیف نوکلئوتیدی ´۳- T/A T T T A ´۵-Y R T T T T/A است باعث از دست رفتن همه فعالیت‌های ARS می‌شود.

بتا- لاکتاماز **β- lactamase**

مراجعه شود به Ap^R

کروموزوم ساختگی باکتریایی **Bacterial Artificial chromosomes (BACs)**

یک ساختار ژنتیکی بر پایه پلاسمید F باکتریای ساخته شده که به‌منظور انتقال و همسانه‌سازی ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌دلیل اندازه بزرگتر نسبت به دیگر ناقل‌های همسانه‌سازی، قطعات بزرگتری را نیز می‌توان در آن همسانه کرد. ازاین‌رو در پروژه‌های تعیین توالی انسان و دیگر موجودات مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ناقل دارای جایگاه شروع همانندسازی OriS، parA و parB برای تقسیم صحیح BAC به درون سلّول‌های دختری بعد از تقسیم سلّولی، نشانگر انتخابی آنتی‌بیوتیکی و یا lacZ و راه‌اندازهای ژنی T7 و Sp6 به‌منظور بیان بالای ژن ورودی است.

باکیولوویروس **Baculovirus**

گروهی از ویروس‌های متعلق به خانوادهٔ بزرگ ویروس‌های میله‌ای شکل که دارای دو جنس nucleopolyhedroviruses (NPV) وgranuloviruses (GV) می‌باشد. این گروه بیماری‌زای ویژهٔ بی‌مهرگان بوده و دارای بیش از ۶۰۰ گونه میزبانی هستند. مهمترین میزبان این حشره لارو پروانه‌ها می‌باشد. پشه و میگو نیز در رتبه‌های بعدی دامنه میزبانی قرار دارند.

این ویروس‌ها توانایی وارد شدن به درون سلّول‌های پستان‌داران و دیگر مهره‌داران را درمحیط کشت دارند ولی توانایی تکثیر در این سلّول‌ها را ندارند. این ویروس‌ها دارای ژنوم دورشته‌ای حلقوی با اندازه ۸۰ تا ۱۸۰ کیلوباز دارند. این ویروس‌ها در بیان پروتئین‌های در سلّول حشرات نقش مهمی‌دارند.

بتا- گالاکتوزیداز **β-galactosidase**

آنزیم هیدرولیزکننده لاکتوز به گالاکتوز و گلوکز است. از طرفی می‌تواند ماده X-gal را تجزیه کرده تا مادّه آبی رنگ تولید شود. سلّولی که آنزیم بتا- گالاکتوزیداز آن ناقص باشد یعنی ژن قطعه `LacZ را نداشته باشد چنانچه با پلاسمیدی که ژن `LacZ داشته باشد تراریخت گردد آنزیم بتا- گالاکتوزیداز آن کامل می‌شود و می‌تواند لاکتوز یا X-gal را تجزیه کند. اگر ین موردنظر در توالی ژن LacZ پلاسمید همسانه شود، ژن کدکننده آنزیم بتا- گالاکتوزیداز غیرفعّال شده و سلّول تراریخت نمی‌تواند X-gal اضافه شده در محیط کشت را تجزیه کند در نتیجه رنگ آبی تولید نمی‌شود و کلونی‌های بی‌رنگ تولید می‌شود.

پروتئین پذیرنده cAMP **cAMP receptor protein (CRP)**

یا پروتئین فعّال‌کننده کاتابولیک یا (Catabolite activator protein(CAP یک پروتئین تنظیمی در باکتری‌ها محسوب می‌شود. این پروتئین به cAMP متّصل شده و این اتّصال باعث می‌شود تغییر شکل پیدا کند تا به ناحیه خاصی از راه‌انداز ژن‌ها متّصل شود. این پروتئین از طریق برهم‌کنش پروتئین- پروتئین باعث افزایش فعالیت RNAپلی‌مراز می‌شود.

کاست بیان **Expression cassette**

ناحیه‌ای از ناقل بیان گفته می‌شود که از بخش‌های مناسب برای همسانه‌سازی و بیان ژن موردنظر استفاده می‌شود.

کاتپسین **Cathepsin**

نوعی پروتئاز است که در جانوران وجود دارد. اعضای این خانواده آنزیمی از نظر ساختار، سازوکار کاتالیکی و نوع پروتئین‌هایی که برش می‌دهند، با یکدیگر متفاوت هستند. بیشتر این آنزیم‌ها در pH پایین فعالیّت کرده و در لیزوزایم یافت می‌شوند. به دلیل فعالیت در pH پایین فقط در لیزوزایم فعالیّت دارند.

همسانه‌سازی cDNA **cDNA cloning**

روشی که برای تهیّهٔ خزانه cDNA استفاده می‌شود. در این روش بعد از تهیه cDNA از mRNA استخراج شده، آن‌ها را وارد ناقل همسانه‌سازی می‌کنند. این ناقل‌های نوترکیب شده را در سلّول‌های میزبانِ همسانه‌سازی که معمولاً یک سلّول باکتری است، وارد می‌کنند. سلّول‌های تراریخت شده را تکثیر شده و از نظر ژن موردنظر بررسی می‌شود.

خزانه cDNA **cDNA Library**

مراجعه شود به cDNA cloning

توالی‌های سانترومری **Centromere sequences (CEN)**

توالی‌های سانترومری که در محل سانترومر وجود دارند. کروماتیدهای خواهری از این قسمت به یکدیگر متّصل می‌شوند. از طرفی در هنگام تقسیم سلّولی، رشته‌های دوک در پیوند به پروتئین کینتوکور به CEN متّصل می‌شوند تا کروماتیدها و یا کروموزم‌ها به‌درستی از یکدیگر جدا شوند. به دلیل تراکام بالای پروتئینی و DNA انتظار بر این است که نقش چندانی در بیان ژن و سوخت‌وساز مولکولی نداشته باشد.

سفالوسپورین **Cephalosporin**

نوعی آنتی‌بیوتیک از خانوادهٔ بتا- لاکتام، این گروه آنتی‌بیوتیک‌ها از قارچ آکرِمونیوم (Acremonium) به دست می‌آید. از نظر عمل مشابه دیگر آنتی‌بیوتیک‌های این گروه نظیر پنی‌سیلین عمل می‌کند. این آنتی‌بیوتیک‌ها از سنتز لایه پپتیدوگلیکانی دیواره سلّولی باکتری ممانعت می‌کند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز **Chain Reaction Polymerase (PCR)**

یک روش تکثیر آزمایشگاهی قطعه‌ای از DNA که در آن در مدت زمان کوتاهی می‌توان میلیون‌ها نسخه از آن تهیّه نمود. در این روش علاوه بر DNA الگو یا هدف، آنزیم‌های پلی‌مریزه‌کننده، یون منیزیم، بافر و آغازگر مورد نیاز است. این روش که تحوّلی در زیست‌شناسی و بیوشی‌می‌محسوب می‌شود در سال ۱۹۸۳ توسط کری مولیس ارائه شد. مولیس در ۱۹۹۳ به دلیل این ابداع مهم جایزه نوبل شیمی‌را دریافت کرد. براس توضیحات بیشتر به Primer مراجعه شود.

سلّول‌های تخمدان همستر چینی **Chinese hamster ovary (CHO) cells**

لاین سلّولی که از تخمدان همستر چینی گرفته می‌شود. این لاین کاربرد گسترده‌ای تحقیقات زیست‌شناسی سلّولی و پزشکی داشته و به‌طور تجاری در تهیّهٔ داروهای نوترکیب بکار برده می‌شود. این لاین در ابتدا در دههٔ ۱۹۶۰ تهیه معرفی شد و ازآن موقع تاکنون کاربری فراوانی پیدا کرده است. این لاین‌ها در مطالعات ژنتیکی و بیان ژن و به‌ویژه در تولید پروتئین نوترکیب استفاده می‌شود. امروزه استفادهٔ اصلی این لاین‌ها به تولید صنعتی داروهای نوترکیب پروتئینی محدود شده است.

آنزیم کیتیناز **Chitinase**

یک آنزیم هیدرولیزکننده که پیوندهای گلیکوزیدی ترکیب کیتین را می‌شکند. کیتین مادّهٔ اصلی دیوارهٔ سلّولی قارچ‌ها و اسکلت خارجی جانورانی نظیر کرم‌ها و بندپایان را تشکیل می‌دهد. ازاین‌رو کیتیناز عموماً در موجوداتی که نیاز به تغییر شکل کیتین خود و یا حذف کیتین دیگر موجودات داشته باشند، وجود دارد.

بررسی رنگ‌سنجی **Colorimetric analysis**

روش‌هایی که در آن بر اساس غلظت یک عنصر یا مادّهٔ شیمیایی در یک محلول به کمک معرّف‌های رنگی تعیین می‌شود. این روش‌ها هم می‌تواند آنزیمی و هم غیر آنزیمی باشد. در هردوی این روش‌ها طی چند مرحله اضافه کردن ترکیب‌های مختلف به محلول دارای ترکیب موردنظر، باعث می‌شود در پایان واکنش‌ها، کمپلکس‌های رنگی و قابل تشخیص بوجود آید. غلظت این کمپلکس‌ها و یا میزان رنگ محلول پایانینشان دهنده غلظت مادّهٔ موردنظر است.

سلّول توانا **Competent cell**

در ژنتیک، میکروبیولوژی، زیست‌شناسی سلّولی و زیست‌شناسی مولکولی توانا () به قابلیّت سلّول در دریافت DNA خارج سلّولی اشاره دارد. توانایی یک سلّول هم می‌تواند القائی و هم ذاتی باشد. در توانا شدن القائی با اضافه کردن ترکیب‌های خاصی به محیط کشت دیوارهٔ سلّول طوری تغییر می‌کند تا بتواند DND محیط را با تمایل بیشتری جذب کند. به‌طورکلی تقریباً همه باکتری‌ها رشته‌ها یا مجاری خارج سلّولی (نوع ۴) و به‌کمک DNA ترانسلوکاز وارد شود ولی بعضی از باکتری‌ها قبل از جذب DNA آن‌را به قطعات کوچک‌تر شکسته و سپس جذب می‌کنند.

DNA مکمّل **Complementary DNA (cDNA)**

یک قطعه DNA که از mRNA در واکنشی موسوم به نسخه‌برداری معکوس سنتز می‌شود.

آنزیم اصلی که این کار را می‌کند نسخه‌بردار معکوس یا Reverse Transcriptase نامیده می‌شود. استفادهٔ عمدهٔ cDNA، به تهیه ژن خالص یوکاریوتی (بدون اینترون و دیگر توالی‌های غیرکدکننده) و همسانه‌سازی آن و درنهایت بیان آن در سلّول‌های پروکاریوت است.

نشانگر مکمّل **Complementation marker**

نشانگری که در آن، سلّول میزبان به دلیل نقص در ژنوم خود توانایی سنتز یک ترکیب موردنیاز برای رشد خود را ندارد و ازاین‌رو در محیط کشت حداقل قادر به ادمه حیات نیست. ژن سنتز کننده این ترکیب به‌همراه ژن موردنظر و معمولاً بر روی یک ناقل، وارد سلّول میزبان می‌شود. بعداز این مرحله سلّولی که در محیط کشت حداقل قادر به ادامه رشد باشد تراریخت است.

کانکاتمر **Concatemer**

توالی بلندی از DNA که دارای همسانه‌های از یک توالی به‌هم پیوسته هستند. این توالی معمولاً ژنوم‌های کامل یک ویروس است که با یک توالی کوچک ۱۲ نوکلئوتیدی به‌نام توالی *COS* به یکدیگر متّصل شدند. ایجاد کانکاتمر لازمهٔ انجام همانندسازی با روش حلقه غلطان است. این نوع همانندسازی در فاژهایی نظیر لاندا و در ابتدای چرخه لیتیک به‌منظور گسترش سریع آلودگی رخ می‌دهد.

آنالیز هم‌کانونی **Confocal analysis**

روشی تصویر برداری میکروسکوپی که در آن با استفاده از روش‌هایی نورهای خارج از کانون عدسی کفیت تصاویر بالا می‌رود.

هم‌یوغی **Conjugation**

به‌همراه ترانسفوماسیون و ترانسداکشن یکی از روش‌های انتقال DNA بین باکتری‌ها و ایجاد نوترکیبی در آن‌ها است. این نوع از انتقال ژن به اتّصال مستقیم دو باکتری توسط لولهٔ جنسی و انتقال ژن با استفاده از این لوله اشاره دارد. باکتری‌های دارای توانایی هم‌یوغی به سلّول‌های گیرنده و دهنده یا به ترتیب مادّه و نر موسوم هستند. این ویژگی که توسط لدربرگ و تاتوم در سال ۱۹۶۴ کشف شد در باکتری‌های دارنده پلاسمید F به فور اتفاق می‌افتد.

توالی مورد توافق **Consensus sequence**

توالی‌های نوکلئوتیدی که در نواحی خاص از توالی بزرگتر وجود نوکلئوتیدی و معمولاً در فرادست یک ژن و در ناحیه راه‌انداز وجود دارند. این توالی معمولاً با بررسی و مقایسه تعداد زیادی از این نوع توالی به‌دست می‌آید. این توالی‌ها در موجودات مختلف به یکدیگر شباهت دارند. هرچقدر این شباهت به توالی موردتوافق بیشتر باشد احتمال یافتن و جاگیری راه‌انداز توسّط RNA پلی‌مراز افزایش یافته و در نتیجه نسخه‌برداری از ژن دارای آن بیشتر است.

آنزیم با بیان دائمی **Constitutive enzyme**

آنزیمی که در یک سلّول در مقادیر ثابت در هر شرایط سلّولی تولید می‌شود. ازاین‌رو می‌توان گفت که بیان آن‌ها در کنترل القاءکننده و یا بازدارنده نیست. حتی غلظت سوبسترای این آنزیم نیز بر مقدار تولید آن تأثیر ندارد. تولید مداوم این آنزیم‌ها به‌دلیل نیاز مداوم سلّولی به این آنزیم‌ها به‌دلیل نقش مهم آن‌ها در سوخت‌وساز و ساختمان سلّولی است.

پوسته (کوتیکول) **Cuticle**

به هر نوع پوشش غیرمعدنیِ محک و قابل انعطاف که باعث استحکام اندام و یا کلّ بدن موجود زنده می‌شود کوتیکول گویند. انواع مختلف از کوتیکول وجود دارد که در منشأ، ساختار، عملکرد و ترکیب شیمیایی با یکدیگر متفاوت هستند. برای نمونه در گیاهان پوشش واکسی

روی برگ نوعی کوتیکول است ولی در جانورانی نظیر نماتد که کوتیکول پوشش جانور محسوب می‌شود از پروتئین تشکیل شده است.

دهیدروفولات‌ردوکتاز **Dihydrofolate reductase (DHFR)**

آنزیمی که باعث احیای دی‌هیدروفولیک اسید به تتراهیدروفولیک اسید با استفاده از NADPH به عنوان دهندهٔ الکترون می‌شود. باکتری‌ها DHFRهای مختلفی دارند و لی این آنزیم در پستان‌داران بسیار مشابه هم هستند. این ژن در مقاومت به آنتی‌بیوتیک Trimethoprim نقش دارد. به دلیل خاصیت ضدّسرطانی و بعضی از سموم نظیر Methotrexate در پزشکی کاربرد گسترده‌ای دارد.

نشانگر انتخابی غالب **Dominant selection marker**

در ژنتیک مولکولی به ژن کدکننده یک آنزیمِ عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک و یا ترکیب‌های داروئی گفته می‌شود که به‌منظور انتخاب سلّول‌های تراریخت بکارگرفته مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ژن در کنار ژن موردنظر بر روی یک ناقل انتقالی قرار داده می‌شود و سلّول‌های تراریختی که ناقل نوترکیب را دریافت کرده‌اند در محیط کشت دارای آن آنتی‌بیوتیک قرار منتقل می‌شوند و در این محیط کشت فقط سلّول‌های تراریختی که ژن موردنظر را دریافت کرده‌اند زنده می‌مانند.

جعبهٔ پایین دستی **Downstream box (DB)**

یک توالی موردتوافق که می‌توان آن‌را به‌عنوان افزایندهٔ ترجمهٔ mRNA اشرشیا کولی و باکتریوفاژ تعریف کرد. دلیل اسم این توالی در پایین دست کدون شروع قرار داشتن این ژن است. جعبهٔ پایین دستی با توالی ۵' AUGAAUCACAAAGUG۳' قبل از کدون

آغازین (AUG) قرار دارد.

الکتروپوریشن **Electroporation**

یا Electropermeabilization روشی که در آن نفوذپذیری غشائ پلاسمایی با استفاده از جریان الکتریکی زیاد می‌شود. در زیست‌شناسی سلّولی به‌منظور وارد کردن یک دارو، DNA و یا هر مادّهٔ دیگری به داخل سلّول استفاده می‌شود.

شبکهٔ اندوپلاسمیک **Endoplasmic Reticulum (ET)**

اندامک درون سلّولی که در سلّول‌های یوکاریوتی شبکهٔ ارتباطی پیشرفته‌ای از لوله‌ها، ویزیکول‌ها و سیسترنا (صفحات صاف تشکیل دهنده دستگاه گلژی) را بوجود آورده است. دارای دو نوع است. در نوع خشن، سنتز پروتئین صورت می‌گیرد و نوع صاف آن در تولید چربی نقش دارد. علاوه براین نوع خشن در تولید غشای سلّولی و نوع صاف در سوخت‌ساز کربوهیدرات، تنظیم غلظت کلسیم و سم‌زدایی از داروها و سموم وارده شده نیز دخالت دارند.

توالی افزایندهٔ بیان **انهاسر sequence**

یک توالی کوتاه از DNA که پروتئین‌های ویژه‌ای به‌نام پروتئین‌های متّصل شونده به توالی افزایندهٔ بیان به‌منظور افزایش نسخه برداری به آن متّصل شود. فاصلهٔ توالی افزاینده بیان از ژن مربوط به خود ممکن بسیار زیاد باشد به‌طوری‌که در مواقعی در کروموزوم دیگر قرار دارد. با این‌که فاصله توالی افزایندهٔ بیان با ژن مربوط زیاد است ولی به دلیل پیچ و تا خوردگی‌های کروماتین، به راه‌انداز ژن مربوط به خود بسیار نزدیک می‌شود و با پروتئین‌ها و آنزیم‌های مربوط به نسخه‌برداری برهم‌کنش دارد.

مراجعه شود به Enhancer sequence **Enhancer-binding proteins**

اشرشیا کولی ***Escherichia coli***

یا به اختصار *E.coli* یک باکتری گرم منفی ومیله‌ای شکل که عمدتاً در بخش‌های انتهایی لولهٔ گوارش جانوران خون گرم یافت می‌شود. بیشتر نژادهای آن بی‌خطر هستند و فقط تعدا اندکی از آن می‌توانند باعث مسمومیّت غذایی در انسان شوند. نژادهای بی‌خطر فلور میکروبی روده محسوب شده و در سنتز ویتامین K و مبارزه با بعضی از باکتری‌های بیماری‌زا دخالت دارند. کشف آن در ۱۸۸۵ توسط یک پزشک آلمانی به‌نام تئودور اشرشیا صورت گرفته و بیش از ۶۰ سال است که کار با آن به‌عنوان یک موجود آزمایشگاهی شروع شده است. این باکتری در محیط‌های کشت کم‌هزینه به‌راحتی رشد می‌کند.

اگزونوکلئاز V **Exonuclease V**

آنزیمی با فعالیّت اگزونوکلئازی که از باکتری اشرشیا کولی به‌دست می‌آید. این آنزیم به‌طور طبیعی در شکستگی‌های DNA دورشته‌ای فعّال شده و تعمیر از طریق نوترکیبی را انجام می‌دهد. این آنزیم دارای ویژگی هیلکازی برای باز کردن دورشته و ویژگی نوکلئازی برای برش DNA می‌باشد. اگزونوکلئاز V دارای سه زیرواحد به‌نام‌های RecB، RecC و RecD که ازاین‌رو به این آنزیم RedBCD نیز می‌گویند. زیرواحدهای RecB و RecD دارای ویژگی هیلکازی وابسته با انرژی هستند. علاوه بر این زیرواحد RecB دارای عملکرد نوکلئازی نیز است. آنزیم کامل یا شاید RecC ناحیهٔ ویژه‌ای به‌نام χ با توالی'۵-GCTGGTGG-'۳ را بر روی ژنوم شناسایی می‌کنند.

سرم جنینی گاوی **Fetal Bovine Serum (FBS)**

به پلاسمای باقی‌مانده پس از لخته شدن خون اشاره دارد. این سرم از خون جنین گوساله به‌دست می‌آید و در کشت سلّول یوکاریوتی به دلیل دارا بودن سطح بالای از آنتی‌بیوتیک‌ها و فاکتورهای رشدی کاربرد گسترده‌ای دارد.

خانواده ویروسی فلاویویریده **Flaviviridae**

خانوده‌ای از ویروس‌ها که درمیان ناقل‌های بندپایی به‌ویژه کنه و پشه گسترش زیادی دارد. ژنوم این گروه از ویروس‌ها از نوع RNA تک‌رشته، خطی، یک‌تکه‌ای و با طول معمولاً ۹/۶ تا ۱۲/۳ کیلوباز می‌باشد.

سورتر سلّول فعّال با فلورسنت **Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)**

دستگاهی که می‌تواند سلّول‌ها را در یک سوسپانسیون سلولی براساس اندازه و رنگ فلورسنت ساطع شده از آن‌ها در کمترین زمان ممکن جدا کند.

پانگاریDNA **DNA Footprinting**

روشی که در آن توالی ویژه‌ای از DNA که توسط یک پروتئین پوشانده شده است بررسی می‌شود. این روش علاوه بر مشخص کردن دقیق جایگاه اتّصال پروتئین، در تحقیقات مربوط به برهم‌کنش بین پروتئین و DNA در خارج از سلّول نیز کابرد دارد. اساس کار به این صورت است که در ابتدا توالی که پروتئن به آن متّصل است در معرض یک نوکلئاز نظیر DNaseI قرار می‌گیرد. نوکلئاز همه DNAهای بدون پوشش پروتئینی را هضم می‌کند. در مرحلهٔ پایانی با بکارگیری پروتئاز، پروتئین‌ها نیز حذف شده و DNA باقی‌مانده مورد بررسی قرار می‌گیرد.

پروتئین هم‌جوش **Fusion protein یا Chimeric protein**

پروتئینی متشکّل از دو یا تعداد بیشتر پروتئین که ژن‌هایشان به یکدیگر متّصل هستند. به‌طور طبیعی این ژن‌ها یه صورت جداگانه وجود داشته و پروتئین خود را کد می‌کنند. در نتیجه محصول این ژن جدید یک پلی‌پپتید بلند است که دارای ویژگی‌های عملکردی همه آن ژن‌ها

است. این نوع پروتئین و روش تهیّه آن در فن‌آوری DNA نوترکیب به‌ویژه در تولید پروتئین‌های نوترکیب کاربرد گسترده‌ای دارد.

فن‌آوری پروتئین هم‌جوش **Fusion protein technology**

مراجعه شود به Fusion protein

گالاکتوز ۱- فسفات **Galactose-1-phosphate**

ترکیبی حدوواسط در سوخت‌ساز گلوکز و گالاکتوز که از گالاکتوز و با فعالیّت آنزیم گالاکتوکیناز تولید می‌شود.

گالاکتوزاید پرمئاز **Galactoside permease**

یکی از پروتئین‌های انتقالی غشائی که لاکتوز را به داخل سلّول پمپ می‌کند.

تفنگ ژنی یا سیستم بایولیستیک **Gene gunیاbiolistic**

این دستگاه به‌طورویژه‌ای برای انتقال ژن در گیاهان ساخته شد. اساس کار این دستگاه پرتاب ذرّات فلز سنگین پوشیده شده با DNA موردنظر به سلّول‌های هدف است.

خزانه ژنومی **Genomic Library**

به بانک ژنی یا بانک همسانه که مجموعه‌ای از قطعات برش خورده ژنوم کامل یک موجود را در خود جا داده است. برای تهیّهٔ این نوع خزانه در ابتدا ژنوم کامل یک موجود به قطعات کوچک هضم شده و سپس این قطعات وارد ناقل همسانه‌سازی می‌شود. در مرحلهٔ بعد ناقل نوترکیب وارد سلّول میزبان شده و این سلّول تراریخت تکثیر و نگهداری می‌شود.

جنتامایسین **Gentamicin**

نوعی آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدی که بر ضد گروهی از باکتری‌ها به‌ویژه گرم منفی‌ها به‌کار برده می‌شود. این ترکیب توسط *Micromonospora* نوعی باکتری گرم‌مثبت که در آب و خاک به‌فور یافت می‌شود، وجود دارد. برای توضیحات بیشتر به Aminoglycoside antibiotic مراجعه شود.

جنتسین (G418)Geneticin

یک آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدی است که سنتز پروتئین را در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها در مرحله طویل‌سازی متوقّف می‌کند. مقاومت به G418 توسط ژن *Neo* ایجاد می‌شود. این ترکیب در انتخاب همسانه‌های تراریخت کاربرد داشته و به‌این منظور از ژن *Neo* به‌عنوان یک نشانگر مناسب استفاده می‌شود. برای توضیحات بیشتر antibioticAminoglycoside مراجعه شود.

گلیسرآلدئیدفسفات‌دهیدروژناز Glycer- aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDp)

یک آنزیم ۳۷ کیلودالتونی که ششمین مرحله از گلیکولیز را کاتالیز می‌کند و گلوکز را به منظور تهیّهٔ انرژی و کربن می‌شکند. علاوه براین عملکرد، اخیراً مشخص شده است که این آنزیم در مسیرهای غیرسوخت‌وسازی نظیر نسخه‌برداری، مرگ برنامه‌ریزی شده سلّول و اعمال دستگاه گلژی نیز دخالت دارد. راه‌انداز این ژن قوی بوده که در تهیّهٔ پروتئین نوترکیب به‌ویژه در مخمّر به‌کار می‌رود.

گرم‌منفی Gram-negative

به گروهی از باکتری‌ها گفته می‌شود در رنگ‌آمیزی کریستال ویولت رنگ نشده، ولی بعداز استفاده از سافرانین به رنگ صورتی یا قرمز می‌شوند. توانایی بیماری‌زایی این باکتری‌ها به

ترکیبات خاص از دیوارهٔ سلّولی به‌ویژه لیپوپلی‌ساکارید بستگی دارد. گرم‌منفی‌ها در دیوارهٔ خود مقادیر کمی از پپتیدوگلوکان داشته که این مقدار در گرم‌مثبت‌ها تا بیش از ۹۰ درصد نیز می‌رسد.

القاءکننده غیرمصرفی **Gratuitous inducer**

یک القاءکننده که مشابه القاءکننده‌های دیگر عمل می‌کند با این تفاوت که این القاءکننده سوبسترای آنزیم یا بازدارنده یک ژن یا اپران نیست. ازاین‌رو این ماده مصرف نمی‌شود و نیاز به اضافه کردن مداوم آن به محیط کشت وجود ندارد.

پروتئین فلورسنت سبز **Green Fluorescent Protein (GFP)**

یک پروتئینی که از ۲۳۸ اسیدآمینه با وزن ۲۶/۹ کیلودالتن تشکیل شده است. این پروتئین در مواقعی که در معرض نور UV قرار می‌گیرد از خود نور فلورسنسی سبز روشن از ساطع می‌کند. با این‌که تعداد زیادی از موجودات دریایی این پروتئین را تولید می‌کنند ولی این مادّه به‌صورت تجاری از نوعی ستاره دریای با نام علمی*Aequorea victoria* به‌دست می‌آید. پروتئین فلورسنت سبز استخراج شده از این ستاره دریایی حداکثر جذب را در ۳۹۵ نانومتر و حداقل را در ۴۷۵ نانومتر، و حداکثر انتشار نوری را در ۵۰۹ نانومتر دارد.

هنسنولا پلی‌مورفا ***Hansenula polymorpha***

یک مخمّر متیلوتروفیک یکی از مهمترین مخمّرهای باکاربرد صنعتی است. این مخمّر به‌طور طبیعی در مواد فاسد شده نظیر آب پرتغال و آرد ذرّت فاسد شده و همچنین در رودهٔ انواع گونه‌های حشرات و خاک یافت می‌شود. در همسانه‌های سفید سفید تا کرم رشد می‌کند. این مخمّر هموتالیک بوده و از طریق جوانه‌زنی تکثیر می‌یابد. این مخمّر در ژنتیک کلاًسیک و ژنتیک مولکولی استفاده گسترده‌ای داشته و امروزه در مهندسی ژنتیک و به‌ویژه در تولید

پروتئین‌های نوترکیب به فور مورد استفاده قرار می‌گیرد.

پلاسمید کمکی **Helper plasmid**

پلاسمیدی است که امکان تکثیر و یا انتقال پلاسمیدهای دیگر از سلّول گیرنده به دهنده را می‌دهد. بدون پلاسمید کمکی عناصر انتقالی در سلّول گیرنده بیان نمی‌شوند.

کاوشگر نامشابه (کاوشگرهای متفاوت و متمایز) **Hetrologue probe**

کاوشگری که توانایی هیبریداسیون را داشته با این‌که کاملاً مکمّل توالی اصلی نیست. از این نوع کاوشگر در زمانی استفاده می‌شود که به‌دلایلی نظیر عدم اطلاع از توالی ژن موردنظر، نتوان یک کاوشگر دقیق تهیه کرد و از کاوشگرهای دیگری که برای آن ژن در گونه‌های نزدیک و در مواردی دور تهیّه شده است استفاده کرد. به‌عنوان مثال کاوشگر ژن سیتوکروم‌اکسیداز تهیّه شده برای یک گونه در گونه دیگر نیز می‌توان به‌کار برد.

تعداد نسخه بالا **High copy number**

معمولاً به پلاسمیدهایی اشاره دارد که دارای تعداد بیشتر از ۱۰ عدد در سلّول هستند. این پلاسمیدها دارای توانایی همانندسازی بالایی بوده و از طرفی ژن‌ها موجود بر روی آن‌ها نیز حتی اگر در سطح پایینی بیان شوند، به دلیل تعداد نسخه‌های زیادی که از آن‌ها وجود دارد محصول آن‌ها در مقادیر بالا تولید می‌شود.

نوترکیبی همسان **Homologous Recombination**

نوعی نوترکیبی ژنتیکی محسوب می‌شود که در آن توالی‌های نوکلئوتیدی بین دو مولکول DNA یکسان یا مشابه مبادله می‌شوند. این نوع نوترکیبی به‌طور گسترده‌ای در تعمیرات DNA (اگر هردو رشته دچار شکستگی یا آسیب شوند) و با استفاده از توالی‌های مشابه و یا

یکسان دیگر موجود در سلّول مورد استفاده قرار می‌گیرد. این نوع نوترکیبی باعث ایجاد ترکیبات ژنی جدید در فرآیند میوز و تولید گامت در یوکاریوت‌ها می‌شود. نوترکیبی همسان در ناحیهٔ همسان و یا مشترک بین دو توالی به‌نام Homologous site صورت می‌گیرد.

ناحیهٔ همسان **Homologous site**

مراجعه شود به Homologous Recombination

در شیشه (محیط مصنوعی) **In vitro**

به زیست‌شناسی آزمایشگاهی اشاره دارد که در آن یک موجود زنده از محیط اصلی خود جدا و در آزمایشگاه به‌منظور انجام آزمایشات دقیق‌تر مورد بررسی قرار می‌گیرد. این واژه در مقابل In vivo قرار دارد که به محیط رشد طبیعی موجود زنده اشاره دارد.

مراجعه شود به In vitro **In vivo**

ایندول ۳- استیک اسید **Indole-3-acetic acid (IAA)**

یک ترکیب هتروسیکلی که از هورمون‌های گیاهی به‌شمار می‌رود. این هورمون از گروه اکسین‌ها بوده و باعث تحریک رشد می‌شوند. گیاه‌ها دارای مسیرهای بیوشیمیایی زیادی هستند که به‌منظور تولید IAA از آن استفاده می‌کنند. در چهار مسیر بیوسنتز IAA از اسیدآمینه تریپتوفان به‌عنوان مادّهٔ اولیه استفاده می‌شود.

القاکننده **Inducer**

القاءکننده ترکیبی است که باعث بیان و یا افزایش بیان ژن می‌شود. القاکننده این‌کار را از طریق اتّصال به بازدارنده ژن که معمولاً به راه‌انداز آن متّصل می‌شود، انجام می‌دهد. القاءکننده در دو نوع مصرف شونده و غیرمصرف شونده وجود دارد. برای توضیحات بیشتر به

Gratuitous inducer مراجعه شود.

تنظیم القائی **Induction regulation**

نوعی تنظیم بیان ژن است که در آن سلّول و یا ویروس برای تنظیم روند تبدیل اطلاعات از ژن به محصول استفاده می‌کند. با این‌که در تنظیم تولید محصول ژنی نظیر RNA نیز وجود دارد ولی معمولاً در تولید پروتئین از آن نام برده می‌شود. در این سازوکار اضافه کردن ترکیباتی موسوم به القاءکننده به محیط کشت باعث افزایش ناگهانی بیان ژن موردنظر می‌شود. استفاده از این نوع تنظیم بیان ژن در تولید پروتئین نوترکیب در مقیاس آزمایشگاهی و صنعتی به‌ویژه پروتئین‌های مضر برای میزبان اجتناب ناپذیر است. برای توضیحات بیشتر به Inducer مراجعه شود.

عایق کننده‌ها **Insulator**

توالی‌های افزاینده بیان یا Enhancerها می‌توانند راه‌انداز ژن‌هایی که در فاصلهٔ بسیار دورتر قرار دارند را به شکلی که تمایل RNAپلی‌مراز برای اتّصال به آن زیاد شود در می‌آورد. توالی عایق‌کننده با طولی در حدود ۴۲ جفت باز مانع از اتّصال یک افزاینده بیان نامناسب و فعّال شدن بیان برخی از ژن‌ها در همان ناحیه از ژنوم می‌شود. عایق کننده همیشه بین توالی افزایندهٔ بیان و راه‌انداز یا بین خاموش‌کننده و راه‌انداز قرار دارد. به‌طور کلّی وظیفهٔ اصلی این توالی جلوگیری از بیان ژن‌های اطراف یک ژنی است که درحال بیان شدن می‌باشد.

انسولین **Insulin**

هورمونی است که توسّط پانکراس تولید می‌شود که تنظیم کنندهٔ اصلی سوخت‌وساز کربوهیدارت و چربی در بدن است. این هورمون باعث می‌شود که بافت‌هایی نظیر کبد، چربی و ماهیچه جذب گلوکز از خون را زیاد و به‌صورت گلیکوژن در خود ذخیره کنند. انسولین با جلوگیری از آزادسازی گلوکاگون مانع از استفاده از چربی به‌عنوان نبع انرژی می‌شود. این

پروتئین به‌طور مؤثّر میزان گلوکز خون را که می‌تواند برای بدن سمّی‌باشد کاهش می‌دهد.

پایان‌دهندهٔ نسخه‌برداری اصلی **Intrinsic transcription terminator**

پایان دهندهٔ غیروابسته به رو روشی برای پایان دادن نسخه برداری در پروکاریوت‌ها است. این سازوکار پایان دادن شامل یک ساختار ساقه- حلقه‌ای است که با دنباله‌ای از نوکلئوتیدهای U ادامه یافته است. پس از توقّف آنزیم نسخه‌بردار در ساختار ساقه- حلقه، به‌دلیل سست بودن پیوند بین U و A، دنباله U که تنها عامل اتّصال mRNA تازه سنتز شده به DNA است از توالی A مربوط به DNA جداشده و بدین ترتیب نسخه‌برداری پایان می‌یابد.

اینترون **Intron**

به توالی درون ژنی که پس از سنتز RNA، از درون توالی آن توسط سازوکار RNA splicing حذف می‌شود. واژه اینترون هم به این توالی در DNA و هم توالی مکمّل آن در RNA گفته می‌شود. پس از حذف این توالی‌های غیرترجمه شونده داخل ژنی، قطعات باقی‌مانده که اگزون نام دارند به یکدیگر متّصل تا RNA بالغ و آمادهٔ ترجمه بوجود آید.

ایزوپروپیل بتا- دی- تیوگالاکتوپیرانوزاید **Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)**

این ترکیب آنالوگ الولاکتوز بوده و برای القاء اپران *lac* به محیط کشت اضافه می‌شود. به‌دلیل وجود اتم گوگرد در ساختار IPTG برخلاف الولاکتوز سلول قادر به مصرف این ترکیب نبوده و نیاز به اضافه کردن مجدد آن به محیط کشت برطرف می‌شود. این ترکیب از طریق اتّصال به بازدارندهٔ اپران *lac* و غیرفعّال کردن آن باعث روشن شدن این اپران می‌شود. برای توضیحات بیشتر به Iducer مراجعه شود.

کانامایسین **Kanamycin**

یا کانامایسین A نوعی آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدی است که برضدّ دامنه وگسترده‌ای از باکتری‌ها به‌کار برده می‌شود. این ترکیب از باکتری *Streptomyces kanamyceticus* که در تهیهٔ سولفات استفاده می‌شود به‌دست می‌آید. این آنتی‌بیوتیک با زیرواحد ۳۰S ریبوزوم پروکاریوتی متّصل شده و فرآیند ترجمه را دچار اختلال می‌کند. برای توضیحات بیشتر به Aminoglycoside antibiotic مراجعه شود.

کلویوروما یسس ***Kluyveromyces***

جنسی از مخمّرهای آسکومیست مربوط به خانوادهٔ Saccharomycetaceae که بعضی از گونه‌های آن نظیر *K. marxianus* تلومورف گونه‌های کاندیدا هستند. استفاده از این نوع مخمّر در تهیه پروتئین‌های نوترکیب اخیراً رواج بیشتری پیدا کرده است.

اپران *Lac* ***Lac* operon**

اپرانی که در سوخت‌وساز قند دی‌ساکارید لاکتوز دخالت دارد. این اپران دارای سه ژن ساختاری کدکننده به ترتیب آنزیم‌های بتاگالاکتوزیداز، گالاکتوزاید پرمئاز و تیوگالاکتوزاید ترانس‌استیلاز می‌باشد. در مواقع طبیعی که معمولاً منبع قند سلول ساکارز و یا گلوکز است، اپران در در سطح پایینی بیان ژنی دارد و در مواقعی که منبع قند سلّولی لاکتوز است مقادیرشان تا ۱۰۰۰ برابر زیاد می‌شود.

بازدارندهٔ پروتئینی *lac* ***lac* protein repressor**

پروتئینی که توسط ژن I در فرادست اپران *Lac* کد می‌شود. این پروتئین به توالی راه‌انداز اپران *Lac* کشش داشته و به آن متّصل می‌شود. این اتّصال باعث می‌شود اپران خاموش شود. اگر یکی از مشتقات لاکتوز به‌نام الولاکتوز در سلّول وجود داشته باشد، این مادّه به بازدارندهٔ

پروتئینی *lac* متّصل شده و آن‌را غیرفعّال می‌کند. غیرفعّال شدن این بازدارنده به بیان ژن‌های اپران *Lac* منجر می‌شود. برای توضیحات بیشتر به Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside (IPTG) مراجعه شود.

لاکتوز **Lactose**

دی‌ساکاریدی با ساختار مولکولی $C_{12}H_{22}O_{11}$ که از ترکیب گالاکتوز و گلوکز بوجود می‌آید. دو تا هشت درصد از وزن خشک شیر را تشکیل می‌دهد. آنزیم بتا- گالاکتوزیداز آن‌را به مونوساکاریدهای تشکیل دهنده، شکسته، که این مونویاکاریدها وارد چرخه انرژی‌زایی می‌شوند. لاکتوز اولین بار در سال ۱۶۱۹ شناخته شد و امروزه سالانه میلیون‌ها تن از محلول‌های پس‌ماند کارخانه‌های پنیرسازی استخراج می‌شود.

ال- آرابینوز **L-arabinose**

مونوساکاریدی که دارای پنج اتم کربن و یک گروه آلدئیدی (CHO) است. به‌رغم دیگر قندها، فرم L آن از فرم D در طبیعت بیشتر یافت می‌شود با این‌حال این فرم بیشتر در قالب پلی‌مرهایی نظیر همی‌سلولز و پکتین وجود دارد. سوخت‌وساز ال- آرابینوز را آنزیم‌های کدشده توسّط ژن‌های اپران آرابینوز (*ara* operon) برعهده دارد.

ژن‌های مؤخّر **Late genes**

پس از ورود یک باکتریوفاژ به درون باکتری ترتیبی از ژن‌های آن فعّال می‌شود که هرکدام در استقرار و تکثیر فاژ نقش دارند. معمولاً محصول بیان هر ژن علاوه بر انجام وظایف خود باعث روشن شدن راه‌انداز ژن بعدی نیز می‌شود. این فرآیند تا لیزشدن باکتری ادامه می‌یابد و درآن بیان ژن‌ها از early gene شروع شده،immediate gene ادامه یافته و در late gene به

پایان می‌رسد. روشن شدن ژن‌های تأخیر در مرحله یا فاز تأخیری (laterstages) صورت می‌گیرد.

مراجعه شود به Late genes **Later stages**

توالی رهبر **Leader sequence**

ناحیه‌ای در سمت ´۵ توالی mRNA که بین کلاًهک و اولین کدون شروع ژن قرار دارد. این توالی به نام ناحیهٔ غیرترجمه شونده´۵ یا 5´UTR نیز موسوم است. در پروکاریوت‌ها جایگاه اتّصال ریبوزوم نیز می‌باشد که به‌عنوان توالی شاین‌دلگارنو نیز شناخته می‌شود. طول توالی رهبر در یوکاریوت‌ها در حدود ۱۵۰ نوکلئوتید، در انسان در حدود ۱۷۰ نوکلئوتید و در پروکاریوت‌ها کوتاه‌تر است. توالی رهبر دارای توالی‌های تنظیمی زیادی نظیر جایگاه اتّصال پروتئین‌های تنظیم‌کننده، خاموش کننده‌های ژن، Riboswitch (بخشی از mRNA که می‌تواند به مولکول‌هایی کوچکی بر بیان ژن اثرگذار است متّصل شود)، افزاینده‌های بیان ژن و اینترون‌ها که در تنظیم بیان ژن و انتقال mRNA نقش دارند، وجود دارد.

لیپوفکشن **Lipofection (Liposome transfection)**

نوعی روش ترانفورماسیون که درآن با استفاده از لیپوزوم مواد ژنتیکی به داخل یک سلّول تزریق می‌شود. لیپوزوم یک ویزیکول فسفولیپیدی ساختگی است که به‌راحتی با غشای سلّولی ادغام شده و محتویات درون خود را به داخل سلّول تخلیه می‌کند.

آبگونه شدن **Liquefaction**

به افزایش آب میان بافتی یک اندام یا بافت به‌دلیل حمله عوامل بیماری‌زا گفته می‌شود.

تعداد نسخه پایین **Low copy number**

در مقابل High copy number قرار دارد. برای توضیحات بیشتر به High copy number مراجعه شود.

لیزوزایم **Lysozyme**

آنزیم هیدرولیزکننده که توانایی هیدرولیز کردن پیوند گلیکوزیدی را داشته و به‌ویژه دیوارهٔ غنی از پپتیدوگلیکان باکتری‌های گرم‌منفی را تجزیه می‌کند. این آنزیم بخش اصلی سیستم ایمنی بدن را تشکیل می‌دهد. کاهش سطح این آنزیم در بدن همبستگی بالایی با بیماری به‌ویژه در کودکان دارد. ازاین‌رو بالابردن سطح لیزوزایم حتی در رژیم غذایی باعث بهبود کودک خواهد شد.

پروتئین متّصل شونده به مالتوز **Maltose binding protein (MBP)**

به‌طور طبیعی بخشی از سیستم مالتوز/مالتودکسترین اشرشیا کولی است مسئول جذب و شکستن مالتودکسترین که محسوب می‌شود. این سیستم مجموعه‌ای از پروتئین‌ها و کمپلکس‌های پروتئینی اشرشیا کولی را در اختیار دارد. کاربرد صنعتی این پروتئین ۴۲/۵ کیلودالتنی در تولید پروتئین نوترکیب به‌ویژه در اشرشیا کولی می‌باشد. استفاده از پروتئین هم‌جوش MBP علاوه بر جلوگیری از اجتماع پروتئین تولید و افزایش حلاّلیّت آن، باعث آسان کردن خالص‌سازی پروتئین نوترکیب نیز می‌شود.

مانوزیداز **Mannosidase**

آنزیم هیدرولیزکننده مانوز که دارای دو نوع آلفا- مانوزیداز و بتا- مانوزیداز است. آلفا- مانوزیداز در شکستن نوع آلفای مانوز نقش دارد. بتا- مانوزیداز که نام‌های لیزوزومال بتا A مانوزیداز یا

مانانار (mannanase) شناخته می‌شود که در انسان توسط ژن *MANBA* کد می‌شود. این پروتئین در لیزوزوم جای داشته و در کاتابولیسم مانوز نوع بتا دخالت دارد.

نشانگر ناجی **Marker rescue**

به یک فرآیند، میزبان و یا ناقل ژنتیکی اشاره دارد که در آن یک ناقل با هدف کمک و یا تکمیل عمل ناقل نوترکیب به‌همراه آن در میزبان وجود دارد. به‌عنوان مثال در یک ناقل ویروسی، اگر ویروس به‌دلیل محدودیت در حداکثر اندازه ژنوم خود برای بسته‌بندی در کپسید قادر به پذیرش ژن موردنظر نباشد، دراین‌صورت ژن موردنظر را جایگزین قسمت‌های مربوط به فرآیند تکثیر کرده و این ویروس توان تکثیر در میزبان را از دست می‌دهد. ازاین‌رو اضافه کردن یک ناقل که توالی ازدست رفته ویروس نوترکیب را داشته بتواند در فرآیندهی تکثیری به آن کمک کند، ضروری است. ناقل دوم ناقل کمکی نامیده می‌شود.

mRNA بالغ **Mature mRNA**

در یوکاریوت‌ها دیده می‌شود. ازآنجایی‌که ژن‌های یوکاریوتی دارای توالی‌های غیرترجمه شونده نظیر اینترون نیز می‌باشند ازاین‌رو سازوکارهایی در سلول یوکاریوتی وجود دارد که بعد از سنتز mRNA اولیّه یا پیش mRNA این توالی‌ها در فرآیندی موسوم به ویرایش حذف، توالی‌های ترجمه شونده باقی مانده به یکدیگر متّصل و در نهایت mRNA بالغ بوجود می‌آید. سلّول‌های پروکاریوتی فاقد توالی‌های غیرترجمه شونده و سازوکار ویرایش هستند.

ملیبیوز **Melibiose**

یک دی‌ساکارید احیاکننده که از طریق اتّصال آلفا- ۱و۶ بین گالاکتوز و گلوکز بوجود می‌آید. ازطرفی این قند در هیدرولیز (با واسطه اینورتاز) رافینوز به‌همراه فروکتوز نیز تولید می‌شود. آلفا- گالاکتوزیداز می‌تواند این دی‌ساکارید را به مونوساکاریدهای تشکیل دهنده آن بشکند.

مراجعه شود به Dihydrofolate reductase (DHFR) **Methotrexate**

متیلاسیون **Methylation**

اشاره به اضافه شدن یک گروه متیل به یک ترکیب و یا جایگزینی اتم‌های یک ترکیب با گروه متیلی دارد که نوعی آلکیلاسیون محسوب می‌شود.

متیلوتروفیک **Methyltrophic**

گروهی بزرگ از ریزموجودات که می‌توانند از ترکیبات یک کربنه احیاشده نظیر متانول یا متان و همچنین ترکیبات چندکربنه بدون پیوند کربنی نظیر دی‌متیل اتر و دی‌متیل‌آمین به‌عنوان منبع کربن استفاده کنند. ازطرفی این گروه از ریزموجودات توانایی استفاده از CO_2 را از طریق مسیر ریبولوزبی‌فسفات را نیز دارند.

میکرومونوسپورا رودورانجا **Micromonospora rhodorangea**

گونه قارچی تولیدکننده G418 که نوعی آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدی است.

کشت تک لایه **Monolayer culture**

در کشت سلّول، به لایه‌ای از سلّول‌ها اشاره دارد که هیچ سلّولی در بالا و یا پایین سلّول دیگری رشد نکرده ولی درکنار یکدیگر در سطح رشد مشترک قرار می‌گیرند.

پروتئین یک‌واحدی **Monomeric protein**

پروتئینی که از یک رشته پلی‌پپتید (معمولاً دارای ساختار سه‌بعدی) تشکیل شده است. این پروتئین یک‌واحدی می‌تواند دارای عملکرد به‌صورت جداگانه و یا در یک ساختار چندواحدی داشته باشد. اگر در ساختار یک مجموعه چندواحدی قرار گیرد به آن زیرواحد می‌گویند. برای

توضیحات بیشتر به Multimeric protein مراجعه شود.

چندواحدی **Multimeric protein**

از درکنار هم قرارگیری پروتئین‌های یک‌واحدی یا زیرواحدها بوجود می‌آید. ممکن است زیرواحدها یکسان و یا متفاوت باشند. معمولاً ساختارهای بزرگی نظیر پروتئین‌های انتقالی، پلی‌مریزه کننده و ... از این دسته هستند. برای توضیحات بیشتر به Monomeric protein مراجعه شود.

جایگاه چندتایی همسانه‌سازی **Multiple Cloning Site (MCS)**

یا پلی‌لینکر توالی کوتاهی است که در حدود ۲۰ ناحیه برش آنزیم محدودکننده را داشته و معمولاً در یک ناقلی که به‌صورت استاندارد طراحی شده است، وجود دارد. این محل‌های متعدد برش جایگاهی را برای ورود DNA موردنظر حتی با دوسر متفاوت فرآهم می‌آورد.

N- استیل‌گلوکزآمینیل‌ترانفراز **N-acetylglucosaminyltransferase**

این آنزیم زیرمجموعهٔ خانوادهٔ آنزیمی گلوکزیل‌ترانسفراز و به‌طور دقیق‌تر هگزاگلوکزیل‌ترانسفراز محسوب شده و واکنش مقابل را کاتالیز می‌کند:

UDP-N-acetyl-D-glucosamine + 4-N-(N-acetyl-D-پروتئین)-UDP + 4-N-(N-acetyl-D-glucosaminyl)-پروتئین

نئومایسین **Neomycin**

نوعی آنتی‌بیوتیک که به‌طور معمول در داروهایی نظیر کرم‌ها، پومادها و قطره چشمی‌وجود دارد. در سال ۱۹۴۹ توسط سلمن واکسمن کشف شد که به دلیل این موفقیّت در سال ۱۹۵۱

جایزه نوبل را دریافت کرد. علاوه بر کاربردهای بی‌شمار پزشکی، کاربرد اصلی آن در زیست‌شناسی مولکولی به استفاده آن به‌عنوان نشانگر انتخابی در لاین‌های سلّولی پستان‌داران در فرآیند تولید پروتئین نوترکیب می‌باشد. مقاومت به این آنتی‌بیوتیک توسط ژن کدکننده آنزیم فسفوترانسفراز ایجاد می‌شود.

N-گلیکوزیلاسیون **_N_-glycosylation**

واکنشی که در آن یک کربوهیدرات به گروه هیدروکسیل و یا گروه‌های عملکردی دیگر در یک مولکول دیگر متّصل شود. این واکنش در زیست‌شناسی به فرآیندهای آنزیمی که باعث اتّصال یک گلیکان به پروتئین، لیپید و یا دیگر مولکول‌ها می‌شود برمی‌گردد. مهمترین نقش این واکنش اعمال تغییرات پس‌از ترجمه در پروتئین‌های تولید شده به‌منظور قرار گرفتن آن پروتئین در شکل صحیح عملکردی خود است. معمول‌ترین نوع گلیکوزیلاسیون از نوع N-گلیکوزیلاسیون است که در لومن یوکاریوت‌ها، شبکه آندوپلاسمیک آرکئی‌باکتری‌ها و به‌ندرت در باکتری‌ها انجام می‌شود. به اضافه کردن گلیکان به نیتروژن آسپاراژین یا آرژنین، N-گلیکوزیلاسیون گفته می‌شود.

نوکلئاز S1 **Nuclease S1 (DNas S1)**

اندونوکلئازی است که توانایی شناسایی و برش DNA و RNA تک‌رشته‌ای را دارد. فعالیّت این آنزیم در DNA پنج برابر قوی‌تر از فعالیّت آن بر روی RNA است. نوکلئاز S1تک‌رشته‌های موجود درون مجموعه دورشته و یا پروتئنی را نیز می‌تواند بشکند. کاربردهای اصلی آن در زیست‌شناسی مولکولی حذف انتهای تک‌رشته‌ای مربوط به انتهای چسبنده و همچنین بازکردن ساقه- حلقه در سنتز cDNA می‌باشد.

الیگوساکاریدترانسفراز **Oligosaccharide transferase**

این آنزیم در غشای شبکه آندوپلاسمیک جای داشته و به‌طور معمول طی ترجمه به پروتئین

درحال سنتز در محل بعضی از آسپاراژین‌ها، گروه‌های ساکاریدی را انتقال می‌دهد. بااین‌که این تغییر به‌صورت هم‌زمان با سنتز پروتئین زیرمجموعه تغییرات پس‌از ترجمه محسوب می‌شود.

جایگاه تنظیمی **operator**

قسمتی از توالی DNA که بین راه‌انداز و ژن قرار دارد و بازدارنده نسخه‌برداری به آن متّصل شده تا از شروع نسخه‌برداری ژن جلوگیری کند. جایگاه تنظیمی به‌طور کلاًسیک در اپران تعریف می‌شود.

قطعات DNA هم‌پوشان **Overlapping DNA fragments**

قطعات کوچک‌تر حاصل از برش یک قطعه بزرگ‌تر که به‌دلیل استفاده از بیش از یک نوع آنزیم و یا برش هیدرودینامیکی دارای انتهایی هستند که چند ده نوکلئوتید آن‌ها مشترک است. در تعیین توالی این قطعات از طریق این توالی مشترک می‌توان ترتیب قطعات برش خورده و درنتیجه نقشه برشی و از آن مهم‌تر توالی کامل قطعه را مشخص کرد.

محصولاتِ PCR **PCR product**

به قطعات تکثیر شده در چرخه‌های PCR که بسته به ماهیت برنامه PCR می‌تواند فقط یک ژن، چند ژن و یا نواحی را به‌طور تصادفی شامل شود. این محصول معمولاً برروی ژل الکتروفورز شده و یا به‌منظور انجام روش‌های دیگر زیست‌شناسی مولکولی نظیر تعیین توالی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

فسفوترانسفراز **Phosphotransferase**

مراجعه شود به Neomycin

پیچیا متانولیکا ***Pichia methanolica***

به‌طور کلی جنس پیچیا از خانواده Saccharomycetaceae مخمّر بوده که دارای سلّول‌های کروی، بیضی و یا دوکی می‌باشند. این مخمّر کاربرد زیادی در تولید پروتئین نوترکیب در سطح بالا دارد. سادگی کار و اعمال تغییرات پس‌ازترجمه به‌خوبی میزبان‌های یوکاریوتی از ویژگی‌های بارز این مخمّر است. مزیّت دیگر این مخمّر استفاده از راه‌انداز *AUG1* است که قوی بوده و تولید سریع و در مقدار بالای پروتئین را تضمین می‌کند. گلوکز یا گلیسرول بازدارنده سیستم بیان این راه‌انداز است. ولی اگر متانول به محیط کشت اضافه شود به‌سرعت بیان پروتئین شروع می‌شود. درکل این میزبان برای تولید بالای پروتئین‌های نوترکیب به‌ویژه پروتئین‌هایی که برای سلّول سمیت دارند مناسب است.

پیچیا پاستوریس ***Pichia pastoris***

به‌طور کلی جنس پیچیا از خانوادهٔ Saccharomycetaceae مخمّر بوده که دارای سلّول‌های کروی، بیضی و یا دوکی می‌باشند. این مخمّر کاربرد زیادی در تولید پروتئین نوترکیب در سطح بالا دارد. سادگی کار و اعمال تغییرات پس‌ازترجمه به‌خوبی میزبان‌های یوکاریوتی از ویژگی‌های بارز این مخمّر است. علاوه براین سرعت رشد بالا در محیط کشت کم‌هزینه، هزینهٔ تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از این مخمّر را کاهش داده است.

ژن *polh* ***Polh* gene**

ژن کدکننده پروتئین پلی‌هیدرین که در کپسید بعضی از ویروس‌ها نظیر باکیولوویروس وجود دارد که باعث استحکام کپسید و مقاومت ویروس به شرایط مختلف محیطی می‌شود. به دلیل نیاز بالای ویروس به این پروتئین، این ژن دارای راه‌انداز بسیار قوی است که برای تولید پروتئین‌های نوترکیب توسط حشرات به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد.

دم پلیA **Poly A tail**

به انتهای mRNA یوکاریوتی طی مراحل پردازش توالی از نوکلئوتید A اضافه می‌شود که عقیده براین است این توالی از تجزیهٔ فوری mRNA جلوگیری می‌کند. تحقیقات نشان داده است که هرچه طول دم پلیA بیشتر باشد تجزیه mRNA دیرتر صورت می‌گیرد. با استفاده از یک آغازگر الیگوdT که به این توالی متّصل می‌شود می‌توان از mRNA، cDNA تهیه کرد. برای توضیحات بیشتر به Reverse Transcriptase (RT) مراجعه شود.

mRNA پلی‌سیسترونیک **Polycistronic mRNA**

یک mRNA که نسخه‌ای از چند ژن درکنار هم محسوب می‌شود. این نوع از mRNA در پروکاریوت‌ها و ویروس‌ها دیده می‌شود. معمولاً این ژن‌ها مربوط به یک فرآیند آنزیمی هستند که به یک مقدار در یک زمان مورد نیاز سلول می‌باشند.

پلی‌هیدرا **Polyhedra**

به اجتماع پروتئین پلی‌هیدرین، پلی‌هیدرا گفته می‌شود. برای توضیحات بیشتر به *polh* gene مراجعه شود.

پلی‌هیدرین **Polyhedrin**

برای توضیحات بیشتر به *polh* gene مراجعه شود.

پلی‌لینکر **Polylinker**

مراجعه شود به Multiple Cloning Site (MCS)

پلی‌زوم **Polysome**

به اجتماع ریبوزوم‌های فعّال بر روی mRNA که با میکروسکوپ الکترونی به صورت دانه‌های

تسبیح دیده می‌شود، اشاره دارد. پلی‌زوم در هردوی پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها تشکیل می‌شود.

اثرمکان **Position effect**

میزان بیان یک ژن علاوه بر راه‌انداز، از ژن‌ها و توالی‌های اطراف ژن نیز تأثیر می‌پذیرد. ازاین‌رو میزان بیان یک ژن خارجی بستگی به مکان ورود آن در ژنوم دارد. به‌عنوان مثال قطعات همسانه شده یک ژن که ممکن است در چندین سلّول میزبان وارد شود، دارای بیان‌های مختلفی می‌باشد چراکه هرکدام از این همسانه‌ها در یک قسمت ژنوم هر میزبان وارد شده است.

پیش mRNA یا mRNA نابالغ **PremRNA**

مراجعه شود به Mature mRNA

آغازگر **Primer**

توالی کوتاه (معمولاً ۱۵ تا ۳۰ نوکلئوتید) از DNA که در ابتدای انجام PCR به ظرف واکنش اضافه می‌شود. این توالی به قسمتی از ژنوم متصل و پلی‌مریزه کردن از انتهای آن شروع می‌شود. در PCR معمولی همانندسازی در جهت ´۵ به ´۳ تا آغازگر بعدی که در جهت وارونه و دررشته مکمّل (حداکثر تا فاصلهٔ سه کیلوبازی) قرار دارد ادامه می‌یابد. قطعهٔ تازه سنتز شده و قطعاتی که در مراحل بعدی سنتز می‌شود تا چرخهٔ پایانی PCR به‌عنوان الگو تکثیر می‌شوند. آغازگر دارای دو نوع تصادفی (حدود ۱۰ نوکلئوتیدی) و اختصاصی (۲۰ تا ۳۰ نوکلئوتیدی) می‌باشد. آغازگر اختیاری ممکن است به هرجای ژنوم متّصل و آن‌را تکثیر کند ولی آغازگر اختصاصی به‌منظور بررسی ژن یا ژن‌های ویژه‌ای طرّاحی می‌شود. برای توضیحات بیشتر به Chain Reaction Polymerase (PCR) مراجعه شود. آغازگر

کاوشگر **Probe**

به توالی بلند از DNA که نشان‌دار بوده و مکمّل قسمتی از ژنوم است، گفته می‌شود. کاوشگر با کارایی و دقّت بالا توالی مکمّل خود را از بین توالی‌های زیادی شناخته و به آن متّصل می‌شود. از این توالی به‌منظور بررسی وجود توالی موردنظر در نمونه و در مواردی بررسی تفاوت بین نمونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای توضیحات بیشتر به Southern blot مراجعه شود.

راه‌انداز **Promoter**

به توالی از ژنوم اشاره دارد که آنزیم نسخه‌بردار می‌تواند آن‌را شناسایی، به آن متّصل و نسخه‌برداری را از آن شروع کند. راه‌انداز معمولاً قبل از ژن اصلی و در جهت بالادست یا ´۵ آن قرار دارد. هرچقدر تمایل یک آنزیم‌نسخه‌بردار برای اتّصال به این توالی بیشتر باشد گفته می‌شود، راه‌انداز قوی‌تر است. ازاین‌رو ژن‌هایی که محصول آن‌ها در مقادیر بالاتر مورد نیاز هستند دارای راه‌اندازهای قوی‌تری نیز می‌باشند.

رافینوز **Raffinose**

به Melibiose مراجعه شود.

کدون نادر **Rare codon**

کدون مربوط به یک اسیدآمینه که در کمترین نسبت در مقایسه با دیگر کدون‌های آن اسیدآمینه وجود دارد به‌طوری‌که اگر توالی از mRNA که دارای کدون‌های نادر بیشتری باشد ترجمه به دلیل کمبود tRNA- اسیدآمینه مربوط به آن کدون متوقّف می‌شود. چراکه برای جلوگیری از اتلاف انرژی سلّول کدون‌های نادر دارای tRNA-اسیدآمینه کمتری نیز هستند. این مشکل معمولاً در بیان یک ژن یوکاریوتی در میزبان پروکاریوتی و بالعکس دیده می‌شود.

تنظیم بازدارنده **Repression regulation**

نوعی تنظیم بیان ژن که در آن بیان ژن موردنظر در حدّ معینی انجام می‌شود و اضافه کردن یک مادّهٔ بازدارنده بیان، ژن را خاموش کرده و بیان ژن متوقّف می‌شود. در تولید پروتئین‌های نوترکیب معمولاً از تنظیم القائی استفاده می‌شود. برای توضیحات بیشتر به Induction regulation مراجعه شود.

آنزیم محدودکننده **Restriction enzyme**

اندونوکلئازی که توانایی برش DNA در توالی ویژه‌ای از آن‌را دارد. این آنزیم‌ها دارای انواع بسیار متنوعی بوده و از باکتری‌ها استخراج می‌شوند. در واقع تولید آنزیم محدودکننده وسیلهٔ دفاعی باکتری در مقابل باکتریوفاژ می‌باشد. نام آنزیم محدودکننده به دلیل محدود کردن دامنهٔ میزبانی باکتری برای باکتریوفاژ بر آن‌ها نهاده شده است. نام‌گذاری آن‌ها براساس نام جنس و گونه باکتری که از آن استخراج شده‌است انجام می‌شود. کاربرد اصلی آنزیم‌های محدودکننده برش ژنوم برای مناسب کردن اندازه آن به‌منظور همسانه‌سازی است.

نسخه‌بردار معکوس **Reverse Transcriptase (RT)**

در سنتز cDNA دخالت دارد. این آنزیم یک DNAپلی‌مراز وابسته RNA است که mRNA را الگو قرار داده و DNA مکمّل آن را سنتز می‌کند. آنزیم RT برای شروع کار به یک آغازگر نیاز دارد. آغازگر مورد استفاده توالی الیگوdT است که به انتهای مولکول mRNA یوکاریوتی دارای دم‌پلیA متّصل می‌شود. برای توضیحات بیشتر به Complementary DNA (cDNA) مراجعه شود.

پایان‌دهنده نسخه‌برداری وابسته به رو **Rho-dependent transcription**

terminator

در این نوع، RNA پلی‌مراز بر روی ساختار ساقه- حلقه توقّف کرده و در این موقع پروتئین *Rho* به سمت RNA پلی‌مراز متوقّف شده حرکت می‌کند. پروتئین *Rho* یک هیلکاز RNA-DNA متشکّل از حلقهٔ شش وجهی از پروتئین‌های یکسان است که می‌تواند باعث جدا شدن RNA پلی‌مراز از DNA شود.

پایان‌دهندهٔ مستقل از *Rho* **terminator *Rho*-independent**

همان پایان‌دهندهٔ نسخه‌برداری اصلی است. برای توضیحات بیشتر به Intrinsic transcription terminator مراجعه شود.

ریبونوکلئاز H **Ribonuclease H**

ریبونوکلئازی که توانایی حذف RNA از دورگ DNA-RNA را دارد.

جایگاه اتّصال ریبوزوم **Ribosom binding site**

به توالی از DNA اشاره دارد که پس از ساخت mRNA از آن ریبوزوم می‌تواند آن‌را شناخته و به آن متّصل شود نظیر توالی شاین‌دلگارنو در پروکاریوت‌ها. برای توضیحات بیشتر به Shine–Dalgarno box مراجعه شود.

DNA پلی‌مراز وابستهRNA **RNA- dependent DNA polymerase**

اشاره به DNA پلی‌مرازی دارد که می‌تواند از روی RNA، DNA مکمّل آن‌را سنتز کند نظیر آنزیم نسخه‌بردار معکوس. برای توضیحات بیشتر به Reverse Transcriptase (RT) مراجعه شود.

نوکلئوکپسید میله‌ای‌شکل **Rod-shaped nucleocapsid**

پوشش کپسیدی ویروسی که دارای ساختار میله‌ای‌شکل بوده نظیر باکیولوویروس که در تهیّهٔ پروتئین نوترکیب مورداستفاده قرار می‌گیرد.

همانندسازی حلقه غلطان **Rolling circle replication**

نوعی همانندسازی که در فاژهایی نظیر لاندا دیده می‌شود که در آن یکی از رشته‌های ژنوم دورشته‌ای به‌عنوان الگو قرار گرفته و چندین نسخه به‌هم پیوسته از آن موسوم به کانکاتمر سنتز می‌شود. در مرحلهٔ بعد این نسخه به‌هم پیوسته در نواحی ویژه‌ای برش خورده تا ژنوم‌های کامل یک فاژ بوجود آید. برای توضیحات بیشتر به Concatemer مراجعه شود.

پروتئین ریبوزومی **R-protein**

پروتئین‌هایی که در ساختار ریبوزوم وجود دارند. در پروکاریوت‌ها، حدود ۶۰ تا ۶۵ درصد از ریبوزوم را rRNA و ۳۵ تا ۴۰ درصد آن را پروتئین ریبوزومی‌تشکیل می‌دهد. زیر واحد S ۵۰ ریبوزوم از ۳۴ نوع پروتئین مختلف و زیر واحد S ۳۰ ریبوزوم ۲۱ نوع پروتئین مختلف تشکیل شده است. در یوکاریوت‌ها، ریبوزوم در زیر واحد S ۶۰ دارای ۴۰ نوع پروتئین مختلف و زیر واحد S ۴۰ دارای ۳۰ پروتئین مختلف می‌باشد. عقیده براین است که rRNAها در ریبوزوم اسکلتی سه‌بعدی را برای جاگیری پروتئین‌های ریبوزومی‌به‌منظور انجام عملکرد صحیح آن‌ها بوجود می‌آورد.

مکان روت ***rut* site**

منطقهٔ غیرقابل ترجمهٔ ۷۰ نوکلئوتیدی غنی از سیتوزین که در بالادست توالی پایان دهنده قرار داشته و در پایان‌دهندگی نسخه‌برداری وابسته به رو، پروتئین رو به آن متّصل می‌شود. برای

توضیحات بیشتر به Rho-dependent transcription terminator مراجعه شود.

ساکارومایسس سرووِیزیه ***Saccharomyces cerevisiae***

مخمّر نان که به‌دلیل تراکم سلّولی بالا، ترشّح پروتئین به بیرون، زمان نسل‌زایی کوتاه و محیط کشتی کم‌هزینه باعث شده‌است که به یک میزبان بیان پروتئین‌های نوترکیب در سطح صنعتی تبدیل شود. عیب اصلی این نوع مخمّر در تولید پروتئین‌های نوترکیب این است که توانایی اعمال تغییرات پس از ترجمه پیچیده نظیر آن چه که در پستان‌داران انجام می‌شود را نداشته و تولید پروتئین نوترکیب در آن به پروتئین‌هایی که کمتر به تغییرات نیاز دارند محدود شده است.

جعبهٔ شاین-دلگارنو **Shine–Dalgarno box**

یک توالی مورد توافق در بالادست ژن که دارای توالی ۵'-UAAGGAGG-۳' بوده و مکمّل انتهای۳' مربوط به ۱۶s rRNA در اشرشیا کولی است. این ناحیهٔ محل اتّصال ریبوزوم بر روی mRNA است. هرچه توالی شاین- دلگارنو ژن‌ها دارای هم‌خوانی بیشتری با توالی فوق باشد، احتمال اتّصال ریبوزوم بیشتر و در نتیجه بیان آن ژن افزایش می‌یابد.

ناقل شاتلی **Shuttle vector**

ناقلی دارای خاستگاه همانندسازی مربوط دو موجود مختلف، که این امکان را به محقّقان می‌دهد که در مرحلهٔ اول در یک موجود دارای ویژگی‌های شناخته شده (معمولاً باکتری) همسانه‌سازی و انتقال ژن صورت گیرد و سپس در موجود دیگر (معمولاً مخمّر یا سلّول پستان‌داران) که قرار است تولید پروتئین انجام دهد، ژن موردنظر بیان شود. ناقل شاتلی دارای یک راه‌انداز برای بیان ژن در میزبان دوم است و اگر محقّق درنظر داشته باشد در هر دو میزبان بیان صورت گیرد دراین‌صورت دو راه‌انداز مورد نیاز است.

سادرن بلات **Southern blot**

به‌منظور بررسی رفتار کاوشگر در اتّصال به توالی موردنظر در نمونه از روش سادرن بلات استفاده می‌شود. در این روش همهٔ همسانه‌ها به غشای نیتروسلولزی و یا نایلونی انتقال و بر روی این غشاء لیز می‌شوند. غشاءها در معرض محلول حاوی کاوشگر قرار گرفته، اگر توالی مکمّل آن وجود داشته باشد به آن متّصل و با استفاده از روش‌های اتورادیوگرافی و یا مشاهده نور فلورسنت صحت اتّصال تأیید می‌شود.

ویرایش **Splicing**

مراجعه شود به Mature mRNA

ساختارسنجاق سری یا ساقه- حلقه **Stem-loop structure**

ساختاری در RNA که به‌دلیل مکمّل بودن توالی نواحی از آن در شکل سه‌بعدی ساختار سنجاق سری به خود می‌گیرد. این ساختار در پایان‌دهندگی نسخه‌برداری وابسته و غیر وابسته به رو و همچنین در ساخت cDNA دیده می‌شود.

ابرمارپیچ **Super coil**

شکل ویژه‌ای از ژنوم و یا پلاسمید که در ویروس و باکتری دیده می‌شود. این فرم از پیچش یک ژنوم حلقوی به دور خود حاصل می‌شود که در نتیجه فشردگی ژنوم بیشتر می‌شود. اکثر آنزیم‌های عمل کننده بر DNA وتغییر دهنده نمی‌توانند این ژنوم را دست‌خوش تغییر کنند.

پایان‌دهنده **Terminator**

یا پایان‌دهنده نسخه‌برداری، اشاره به توالی در انتهای ژن دارد که نشانهٔ پایان نسخه‌برداری برای

آنزیم‌های نسخه‌بردار است. در پروکاریوت‌ها دو نوع پایان دهندهٔ وابسته و غیروابسته به رو وجود دارد. ولی در یوکاریوت‌ها بسته به نوع RNA، انواعی از پایان دهنده وجود دارد. علاوه براین در یوکاریوت‌ها وجود پروتئین‌های زیاد دخیل در پایان‌دهندگی نسخه‌برداری بر پیچیدگی تحیقیات در این زمینه می‌افزاید.

تیوگالاکتوزاید ترانس‌استیلاز **Thiogalactoside transacetylase**

محصول سوّمین ژن ساختاری اپران *lac* که دارای عملکرد تقریباً نامشخصی است. عقید براین‌است که این آنزیم ممکن است نقشی در غیرسمّی‌کردن تیوگالاکتوزیداز داشته باشد.

تیومتیل بتا-دی-گالاکتوپیرانوزاید **Thiomethyl-β-D-galactopyranoside (TMG)**

نوعی القاکننده برای اپران *lac* که غیرمصرفی بوده و توانایی القاء و متعاقب آن بیان بالی ژن‌های در کنترل راه‌انداز *lac* را دارد. بااین‌که از نظر عمل و سازوکار عمل مشابه IPTG می‌باشد ولی استفاده از القاکننده IPTG نسبت به TMG مرسوم‌تر است. برای توضیحات بیشتر به Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) مراجعه شود.

پایان‌دهندهٔ نسخه‌برداری **Transcription terminator**

مراجعه شود به Terminator

ترنسفرین **Transferrin**

ترکیبی غنی از پروتئین که در تهیهٔ محیط کشت سلّولی برای کشت سلّول پستان‌داران، حشرات و دیگر جانوران استفاده می‌شود.

تراریخت **Transgene**

به موجودی که به‌دلیل دریافت یک یا تعداد بیشتری ژن چه به‌صورت منفرد و چه به‌صورت موجود در ناقل نوترکیب دچار تغییرات ژنتیکی شده باشد.

تریپتوفان سنتتاز **Tryptophan synthetase**

یکی از آنزیم‌های مهم در سنتز اسیدآمینه تریپتوفان است. این آنزیم محصول ژن‌های چهارم و پنجم اپران *trp* است که به‌ترتیب *trpB* و *trpA* نامیده می‌شوند. ژن *trpB* زیرواحد بتا و ژن *trpA* زیرواحد آلفا تریپتوفان سنتتاز را کد می‌کنند.

یوریدین دی فسفوگالاکتوز **Uridine diphosphogalactose (UDPgal)**

یک ترکیب حدّواسط در تبدیل گالاکتوز به گلوکز۶-فسفات است. ترانسفراز کد شده توسط ژن *galT* مربوط به اپران gal اتّصال گالاکتوز فسفوریله شده را به یوریدین دی فسفوگلوکز کاتالیز می‌کند که این واکنش منجر به تولید یوریدین دی فسفوگالاکتوز می‌شود.

یوریدین دی فسفوگلوکز **Uridine diphosphoglucose (UDPG)**

یک ترکیب حدّواسط در تبدیل گالاکتوز به گلوکز۶-فسفات است که با دخالت آنزیم اپی‌مراز کدشده توسط ژن galE از یوریدین دی فسفوگالاکتوز به‌عنوان سوبسترا، یوریدین دی فسفوگلوکز تولید می‌کند.

وسترن بلات **Western blot**

برای شناسایی پروتئینی استفاده می‌شود که آنتی‌بادی آن وجود داشته باشد. در این روش در ابتدا آنتی‌بادی نشان‌دار شده و به‌عنوان کاوشگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از انتقال پروتئین‌های نمونه بر روی غشای وسترن بلات، این غشاء در معرض محلول دارای آنتی‌بادی نشان‌دار قرار می‌گیرد. در مرحلهٔ آخر غشاء شسته شده و توسّط دستگاه تشخیص نشانه نظیر اتورادیوگرافی نمونه‌هایی که با آنتی‌بادی اتّصال دارند مشخص می‌شود.

کروموزوم ساختگی مخمر Yeast Artificial chromosome (YACs)

در واقع یک کروموزم کامل محسوب می‌شود که دارای بخش‌های سانترومر، تلومر و خاستگاه همانندسازی دقیقاً مشابه یک کروموزم طبعی مخمّر است. در ابتدا این ناقل حلقوی است که پس از ورود به درون میزبان در یک ناحیه برش خورده و خطّی می‌شود. کاربرد اصلی این ناقل همسانه‌سازی قطعات بزرگ DNA تا ۱۰۰ کیلوباز است.

ناقل YCp Yeast Centromere plasmid (YCp)

این ناقل دارای همانندسازی مستقل از میزبان بوده و معمولاً با تعداد نسخه پایین در سلّول میزبان وجو دارد. دارای توالی سانترومری است. استفاده از این ناقل‌ها به‌ویژه برای بیان مقادیر بالای پروتئین، به‌دلیل ناپایداری نسبی آن چندان مرسوم نیست اما به‌عنوان یک ناقل همسانه‌سازی قابل تنظیم دارای کاربرد گسترده‌ای هستند.

پلاسمید اپی‌زومال مخمر Episimal Yeast plasmid (YEps)

به دلیل وجود خاستگاه همانندسازی ۲ میکرومتری توانایی همانندسازی خودبه‌خودی این پلاسمید در مخمّر فرآهم آمده است. تعدادنسخهٔ بالا و کارایی بالا در دریافت DNA خارجی از ویژگی‌های مهم این ناقل است.

پلاسمیدهای الحاق‌شونده مخمر Yeast Integrative plasmid (YIps)

پلاسمیدهای باکتریای هستند که دارای یک ژن از کروموزوم مخمّر می‌باشند. این ژن باعث ورود پلاسمید به درون کروموزوم مخمّر می‌شود. ورود به درون کرموزوم میزبان عامل اصلی پایداری بالای این نوع پلاسمید است.

منابع

Ackers, G.K. 1970. Analytical gel chromatography of proteins. *Advances in Protein Chemistry*. 24: 342-443.

Ahmed, A., Singh, A., and Ward, O.P. 2005. Culture-based strategies for reduction of protease activity in filtrates from *Aspergillus niger*. *World Journal Microbiol Biotechnol.* 21: 1577-1583.

Ajdic, D., and Ferretti, J.J. 1998. Transcriptional regulation of the *Streptococcus mutans gal* operon by the galR repressor. *Journal of Bacteriology.* 180: 5727-5732.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Peter, W. 2002. Molecular Biology of the Cell. *Garland Science*. 34: 55-65

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2014. Molecular Biology of the Cell Garland Chapter 4, DNA, Chromosomes and Genomes.

Aldaye, F.A., Palmer, A.L., and Sleiman, H.F. 2008. Assembling materials with DNA as the guide. *Science*. 321(5897): 1795-99.

Al-Hasani, K., Simpfendorfer, K., Wardan, H., Vadolas, J., Zaibak, F., Villain, R., and Ioannou, P.A. 2003. Development of a novel bacterial artificial chromosome cloning system for functional studies. *Plasmid.* 49: 184-187.

Archer, D.B., Jeens, D.J., Mackenzie, D.A., Brightwell, G., Lambert, N., Lowe, G., Radford Wiebe, M.G., Karandikar, A., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., Canida, J.L.F., Trappe, S., Wallis, G., Rinase, U., Derkx, P.K.F., Madrid, S.M., Sinniega, H., Faus, I., Montijn, R., Van den Hondel, C.A.M.J.J., and Punt, P.J. 2001. Production of tissueplasminogen activator (t-PA) in Aspergillus niger. *Biotechnol Bioeng*. 76: 164-174.

Arechaga, I., Miroux, B., Karrasch, S., Huijbregts, B., De KruijV, M.J., and Runswick, J.E. 2000. Characterisation of new intracellular membranes in Escherichia coli accompanying large scale over-production of the b subunit of F(1)F(0) ATP synthase. *FEBS Lett.* 482: 215-219.

Arora, D.K. 2004. Handbook of fungal biotechnology. Mycology series Marcel Dekker Inc NY USA. Vol: 20.

Austin, S., and Dixon, R. 1992. The prokaryotic enhancer binding protein NTRC has an ATPase activity which is phosphorylation and DNA dependent. *The EMBO Journal*. 11(6): 2219-2228.

Bagasra, O., and Prilliman, K.R. 2004. RNA interference: the molecular immune system. *Journal of Molecular Histology*. 35(6): 545-53.

Baker, K.N., Rendall, M.H., Hills, A.E., Hoare, M., Freedman, R.B., and James, D.C. 2001. Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NO0 and CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 73: 188-201.

Ballery, N., Desmadril, M., Minard, P., and Yon, J.M. 1993. Characterization of an intermediate in the folding pathway of phosphoglycerate kinase, Chemical reactivity of genetically introduced cysteinyl residues during the folding process. *Biochemistry*. 32: 708-714.

Baneyx, F. 1999. In vivo folding of recombinant proteins in Escherichia coli. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. Pp: 551-565.

Barry, E.R., and Bell, S.D. 2006. DNA replication in the archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70(4): 876-87.

Bernstein, J.A., Lin, P.-H., Cohen, S.N., and Lin-Chao, S. 2004. Global analysis of Escherichia coli RNA degradosome function using DNA microarrays. *Biotechnology*. 5(5): 200-206.

Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development.* 16(1): 6-21.

Bitter, G.A., and Egan, K.M. 1984. Expression of heterologous genes in Saccharomyces cerevisiae from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Gene*. 32(3): 263-274.

Bragonzi, A., Distefano, G., Buckberry, D., Acerbis, C., Foglieni, D., Lamotte, G., Campi, A., Marc, M.R., Soria, N., Jenkins, L., and Monaco, L. 2000. A new Chinese hamster ovary cell line expressing α2, 6-sialytransferase used as universal

host for the production of human like sialylated recombinant glycoproteins, *Biochimica et Biophysica Acta*. 1474: 273-282.

Bristow, A.F. 1989. Purification of proteins for therapeutic use. *In* Protein Purification Applications: A Practical Approach (E.L.V. Harris and S. Angal, eds.). Pp. 29-44.

Brueckner, F., Armache, K.J., Cheung, A., Damsma, G.E., Kettenberger, H., Lehmann, E., Sydow, J., and Cramer, P. 2009. Structure-function studies of the RNA polymerase II elongation complex. *Acta Crystallographica*. 65(2): 112-120.

Campbell, E.A., Choi, S.Y., and Masure, H.R. 1998. A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Molecular Microbiology*. 27: 207-219.

Campbell, I.D., and Dwek, R.A. 1984. Very good explanations of the theoretical principles, along with many practical applications. *Biological Spectroscopy*. 64(3): 313-327.

Carlson, M., and Botstein, D. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell*. 28(1): 145-154.

Carr, S.A., Hemling, M.E., Bean, M.F., and Roberts, G.D. 1991. Integration of mass spectrometry in analytical biotechnology. *Chemistry Analytical Chemistry*. 63: 2802-2824.

Carter, P., Kelley, R.F., Rodrigues, M.L., Snedecor, B., Covarrubias, M., Velligan, M.D., Wong, W.L., Rowl, A.M., Kotts, C.E., and Carver, M.E. 1992. High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. *Biotechnology*. 10: 163-167.

Ceballos, M., and Vioque, A. 2007. tRNase Z. *Protein and Peptide Letters*. 14(2): 137-145.

Chambers, S.P., Prior, S.E., Barstow, D.A., and Minton, N.P. 1988. The pMTL nic-cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing. *Gene*. 68: 139-149.

Chaudhuri, B., Steube, K., and Stephan, C. 1992. The pro-region of the yeast prepro-alpha-factor is essential for membrane translocation of human insulin-like growth factor 1 in vivo. *European Journal of Biochem.* 206(3): 793-800.

Chen, I., and Dubnau, D. 2004. DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 241-249.

Chin, J.W., Cropp, T.A., Anderson, J.C., Mukherji, M., Zhang, Z., and Schultz, P.G. 2003. An expanded eukaryotic genetic code. *Science*. 301: 964-967.

Choi, B.K., Bobrowicz P., Davidson, R.C., Hamilton, S.R., Kung, D.H., and Li, H. 2003. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast Pichia pastoris. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100(9): 5022-5027.

Chung, Y.S., and Dubnau, D. 1998. All seven comG open reading frames are required for DNA binding during transformation of competent *Bacillussubtilis*. *Journal of Bacteriology*. 180: 41-45.

Claverys, J.P., and Martin, B. 2003. Bacterial competence genes: Signatures of active transformation, or only remnants?. *Trends in Microbiology*. 11: 161-165.

Cooper, A., and Johnson, C.M. 1994. Microcalorimetry; differential scanning calorimetry and isothermal titration calorimetry. *Methods in Molecular Biology*. 22: 109-150.

Costantino, N., and Court, D.L. 2003. Enhanced levels of λ Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 100: 15748-15753.

Cui, Y., König, J., and Keppler, D. 2001. Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCC2. *Molecular Pharmacol*. 60: 934-943.

Curtis, C., and Hereward, J. 2017. From the crime scene to the courtroom, the journey of a DNA sample.

Dabin, J., Fortuny, A., and Polo, S.E. 2016. Epigenome Maintenance in Response to DNA Damage. *Molecular Cell*. 62(5): 71227-71235.

David, M.G. 1997. Leucine scissors. Biochemistry and Molecular Biology. London: Portland Press.

Davuluri, R.V, Sun, H., Palaniswamy, S.K., Matthews, N., Molina, C., Kurtz, M., and Grotewold, E. 2003. Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. *BMC Bioinformatics*. 4: 25-32.

De Souza, M.F., Gonçales, T.A., Steinmetz, A., Moura, D.J., Saffi, J., Gomez R., and Barros, H.M. 2014. Cocaine induces DNA damage in distinct brain areas of female rats under different hormonal conditions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 41(4): 265-269.

Deikus, G., Babitzke, P., and Bechhofer, D.H. 2004. Recycling of a regulatory protein by degradation of the RNA to which it binds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 2747-2751.

Dumont, J., Legrain, M., Portetelle, D., Brasseur, R., Burny, A., and Hilger, F. 1989. High yield synthesis of the bovine leukemia virus (BLV) p24 major internal protein in Saccharomyces cerevisiae. *Gene*. 79(2): 219-26.

Egel, R. 2012. Primal eukaryogenesis: on the communal nature of precellular States, ancestral to modern life. *Life*. 2(1): 170-212.

Elf, J., Berg, O.G., and Ehrenberg, M. 2001. Comparison of repressor and transcriptional attenuator systems for control of amino acid biosynthetic operons. *Journal of Molecular Biology*. 313: 941-954.

Englander, S.W., and Kallenbach, N.R. 1984. Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 16: 521-655.

Etchegaray, J.P., and Inouye, M. 1999. Translational enhancement by an element downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 10079-10085.

Etz, H., Minh, D.B., Schellack, C., Nagy, E., and Meinke, A. 2001. Bacterial phage receptors, versatile tools for display of polypeptides on the cell surface. *Journal of Bacteriology*. 183: 6924-6935.

Ferminan, E., and Dominguez, A. 1998. Heterologous protein secretion directed by a repressible acid phosphatase system of Kluyveromyces lactis: characterization of upstream region-activating sequences in the KIPHO5 gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(7): 2403-2408.

Filoni, C., Caciotti, A., Carraresi, L., Donati, M.A., Mignani, R., and Parini, R. 2008. Unbalanced GLA mRNAs ratio quantified by real-time PCR in Fabry patients fibroblasts results in Fabry disease. *European Journal of Human Genetics*. 16(11): 1311-1317.

Finkelstein, D.B. 1987. Improvement of enzyme production in Aspergillus. Antonie van.

Fisher, L.W., and Fedarko, N.S. 2003. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res*. 44: 33-40.

Frank, D.N., and Pace, N.R. 1998. Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Annual Review of Biochemistry*. 67: 153-80.

Freitas, A.A., and De Magalhães, J.P. 2011. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. *Mutation Research*. 728(2): 12-22.

Geanacopoulos, M., and Adhya, S. 1997. Functional characterization of roles of GalR and GalS as regulators of the gal regulon. *Journal of Bacteriology*. 179: 228-234.

Geanacopoulos., M., and Adhya, S. 1997. Functional characterization of roles of GalR and GalS as regulators of the *gal* regulon. *Journal of Bacteriology*. 179: 228-234.

Gericke, N.M., Hagberg, M., and Murat, D. 2006. Definition of historical models of gene function and their relation to students' understanding of genetics. *Science and Education.* 16(8): 849-881.

Goldenberg, D.P. 1989. Analysis of protein conformation by gel electrophoresis. In Protein Structure: A Practical Approach (T.E. Creighton, ed.). Pp: 225-250.

Goldstein, M.A., and Doi, R.H. 1995. Prokaryotic promoters in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*. 1: 105-128.

Gros, P., Croop, J., Roninson, I., Varshavsky, A., and Housman, D. 1986. Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83: 337-341.

Grossman, T.H., Kawasaki, E.S., Punreddy, S.R., and Osburne, M.S. 1998. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene.* 209: 95-103.

Gründemann, D., Gorboulev, V., Gambaryan, S., Veyhl, M., and Koepsell, H. 1994. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature*. 372: 549-552.

Gu, M. B., Todd, P., and Kompala, D.S. 1996. Metabolic burden in recombinant CHO cells: effects of dhfr gene amplification and lacZ expression. *Cytotechnology*. 18: 159-166.

Gubin, A.N., Reddy, B., Njoroge, J.M., and Miller, J.L. 1997. Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 236: 347-350.

Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R., and Marbaix, G. 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*. 233: 177-182.

Hamilton, S.R., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., Davidson, R.C., Li, H., and Mitchell, T. 2003. Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science*. 301(5): 1244-1246.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166: 557-580.

Harding, S.E. 1994. Sedimentation velocity, sedimentation equilibrium. *Methods in Molecular Biology*. 22: 61-83.

Haris, P.I., and Chapman, D. 1992. Does Fouriertransform infrared spectroscopy provide useful information on protein structures?. *Trends in Biochemical Sciences.* 17: 328-333.

Haris, P.I., and Chapman, D. 1994. Analysis of polypeptide and protein structures using Fouriertransform infrared spectroscopy. *Methods in Molecular Biology*. 22: 183-202.

Hattori, M., Ametani, A., Katakura, Y., Shimizu, M., and Kaminogawa, S. 1993. Unfolding/refolding studies on bovine β-lactoglobulin with monoclonal antibodies as probes. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 22414-22419.

Hediger, M.A., Coady, M., Ikeda, T.S., and Wright, E.M. 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na+/glucose co-transporter. *Nature*. 330: 379-381.

Hediger, M.A., Romero, M.F., Peng, J.B., Rolfs, A., Takanaga, H., and Bruford, E.A. 2004. The ABCs of solute carriers: Physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Introduction Pflügers Arch*. 447: 465-468.

Hermann, T., and Patel, D.J. 2000. RNA bulges as architectural and recognition motifs. *Structure*. 8(3): 47-54.

Hesolt, H., Davis, J., Florent, J., Bobichon, L., Durand, G., and Penasse, L. 2005. Heterologous gene expression in *Aspergillus*: Analysis of chymosin production in single-copy transformants of *A.niger*. Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. *Societe Francaise de Microbiologie, Strasbourg, France.* Pp: 107-116.

Higgins, D.R., and Cregg, J.M. 1998. Introduction to Pichia pastoris. In: Higgins DR and Cregg JM eds, Pichia protocols. *methods in molecular biology*. 103: 46-64.

Hills, A.E., Patel, A., Boyd, P., and James, D.C. 2001. Metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NS0 cells. *Biotechnol Bioeng*. 75: 239-251.

Hogema, B.M., Arents, J.C., Bader, R., Eijkemans, K., Inada, T., Aiba, H., and Postma, P.W. 1998. Inducer exclusion by glucose 6-phosphate in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*. 28: 755-765.

Hosaka, T., Tamehiro, N., Chumpolkulwong, N., Hori-Takemoto, C., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Ochi, K. 2004. The novel mutation K87E in ribosomal protein S12 enhances protein synthesis activity during the late growth phase in Escherichia coli. *Molecular and General Genomics*. 271: 317-324.

Hu, Y. 2005. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 26: 405-416.

Hudson, P.J., and Souriau, C. 2001. Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 1: 845-855.

Hunt, I. 2005. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. *Protein Expression and Purification*. 40: 1-22.

Isaksson, J., Acharya, S., Barman, J., Cheruku, P., and Chattopadhyaya, J. 2004. Single-stranded adenine-rich DNA and RNA retain structural characteristics of their respective double-stranded conformations and show directional differences in stacking pattern. *Biochemistry*. 43(51): 15996-6010.

Jacquemin, E., Hagenbuch, B., Stieger, B., Wolkoff, A.W., and Meier, P.J. 1994. Expression cloning of a rat liver Na(+) independent organic anion transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 133-137.

Jenkins, N., Parekh, R.B., and James, D.C. 1996. Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nature Biotechnol*. 14: 975-981.

Jinks-Robertson, S., Nomura, M., Ribosomes, M., Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasnaik, B., Schaechter, M., and Umbarger, H.E. 1987. Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Cellular and molecular biology. *American Society for Microbiology*. 1: 1358-1385.

King, L.A., and Possee, R.D. 1992. Baculovirus Expression System. A Laboratory Guide. London, UK, Chapman and Hall.

Kitts, P.A., and Possee, R.D. 1993. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques*. 14: 810-817.

Klammt, C., Schwarz, D., Fendler, K., Haase, W., Dötsch, V., and Bernhard, F. 2005. Evaluation of detergents for the soluble expression of α-helical and β-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *Federation of European Biochemical Societiesis Journal*. 272: 6024-6038.

Kopplow, K., Letschert, K., König, J., Walter, B., and Keppler, D. 2005. Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple-transfected cells. *MolPharmacol*. 68: 1031-1038.

Kost, T.A., and Condreay, J.P. 2002. Recombinant baculovirus as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends in Biotechnology*. 20: 173-180.

Kost, T. A., Condreay, J. P., and Jarvis, D.L. 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 23: 567-575.

Kullak-Ublick, G.A., Ismair, M.G., Stieger, B., Landmann, L., Huber, R., Pizzagalli, F., Fattinger, K., Meier, P.J., and Hagenbuch, B. 2001. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterologia*. 120: 525-533.

Kuruma, Y., Nishiyama, K., Shimizu, Y., Müller, M., and Ueda, T. 2005. Development of a minimal cell-free translation system for the synthesis of presecretory and integral membrane proteins. *Biotechnology Progress.* 21: 1243-1251.

Kyte, J. 1995. Structure in Protein Chemistry. Garland Publishing, N.Y. Structural biology emphasis, with a clear and concise explanation of X-ray diffraction analysis. Excellent illustrations.

Lakemeier, S., Braun, J., Efe, T., Foelsch, C., Archontidou Aprin, E., Fuchs-Winkelmann, S., Paletta, J.R., and Schofer, M.D. 2011. Expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 in differing extents of tendon retraction in the torn rotator cuff. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc (in press). *Clinical Orthopaedics*. 20: 49-60.

Law, R.H.P., Rowley, M.J., Mackay, I.R., and Corner, B. 2004. Expression in Saccharomyces cerevisiae of antigenically and enzy-matically active recombinant glutamuic acid decarboxylase. *Journal of Biotechnology.* 61: 57-68.

Lefrancois, J., Samrakandi, M.M., and Sicard, A.M. 1998. Electrotransformation and natural transformation of *Streptococcus pneumoniae*: Requirement of DNA processing for recombination. *Microbiology*. 144: 3061-3068.

Lewis, D.E.A., Geanacopoulos, M., and Adhya, S. 1999. Role of HU and DNA supercoiling in transcription repression: Specialized nucleoprotein repression complex at gal promoters in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*. 31: 451-461.

Logan, J., Edwards, K., and Saunders, N. 2009. Real-Time PCR In: Current Technology and Applications. *Caister Academic Press*. Pp: 7-22.

Lui, J., and Zuber, P. 1998. A molecular switch controlling competence and motility: Competence regulatory factors *comS*, *mecA*, and *comK* control σDdependent gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 180: 4243-4251.

Luli, G.W., and Strohl, W.R. 1990. Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of Escherichia coli strains in batch and fed-batch fermentations. *App. Environ. Microbiol.* 56: 1004-1011.

Maffioletti, E., Tardito, D., Gennarelli, M., and Bocchio-Chiavetto, L. 2014. Micro spies from the brain to the periphery: new clues from studies on microRNAs in neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 8: 75-82.

Mager, S., Cao, Y., and Lester, H.A. 1998. Measurement of transient currents from neurotransmitter transporters expressed in Xenopus oocytes. *Methods in Enzymology*. 296: 551-560

Magra, M., and Maffulli, N. 2008. Genetic aspects of tendinopathy. *Journal Sci Med Sport*. 11: 243-247.

Mahony, S., and Benos, P.V. 2007. STAMP: a web tool for exploring DNA-binding motif similarities. *Nucleic Acids Research*. 35: 253-258.

Márquez, V., Wilson, D.N., Tate, W.P., Triana-Alonso, F., and Nierhaus, K.H. 2004. Maintaining the ribosomal reading frame. *The influence of the E site during translational regulation of release factor Cell*. 118: 45–55.

Martinelli, S.D., and Kinghorn, J.R. 1994. Aspergillus. *50 years on Progress in industrial microbiology.* 29: 61-140.

Masi, M., Pages, J.M., and Pradel, E. 2003. Overexpression and puriWcation of the three components of the *Enterobacter aerogenes* AcrA-AcrBTolC multidrug eZux pump. *Journal ChromatogrB Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 786: 197-205.

Masure, H.R., Pearce, B.J., Shio, H., and Spellerberg, B. 1998. Membrane targeting of RecA during genetic transformation. *Molecular Microbiology.* 27: 845-852.

McRorie, D.K., and Voelker, P.J. 1993. Self-associating systems in the analytical ultracentrifuge. Vol. II, Analytical Ultracentrifugation Series. Beckman Instruments, Fullerton, Calif.

Meng, Y.G., Liang, J., Wong, W.L., and Chisholm, V. 2000. Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells. *Gene*. 242: 201-207.

Miroux, B., and Walker, J.E. 1996. Over-production of proteins in *Escherichiacoli,* mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal Mol. Biol.* 260: 289-298.

Miroux, B., and Walker, J.E. 1996. Over-production of protein in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal Moecular Biology.* 260: 289-298.

Møller, T., Franch, T., Udesen, C., Gerdes, K., and Valentin-Hansen, P. 2002. Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the E. coli galactose operon. *Genes and Development*. 16: 1696-1706.

Moscoso, M., and Claverys, J.P. 2004. Release of DNA into the medium by competent Streptococcus pneumoniae: Kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Molecular Microbiology*. 54: 783-794.

Murat, D., Byrne, M., and Komeili, A. 2010. Cell biology of prokaryotic organelles. *PMC.* 20: 739-745.

Nasmyth, K.A., and Reed, S.L. 1980. Isolation of genes by complementation in yeast, molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77(4): 2119-2123.

Nishizawa ,M., Ozawa, F., and Hishinuma, F. 1987. Construction of an expression and secretion vector for the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Agric. Biol. Chem.* 51: 515-521.

Nurminskaya, M, and Kaartinen, M.T. 2006. Transglutaminases in mineralized tissues. *Front Biosci*. 11: 1591-1606.

Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W., and Rothstein, R.J. 1987. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78(10): 6354-6358.

Panina, E.M., Vitreschak, A.G., Mironov, A.A., and Gelfand, M.S. 2003. Regulation of biosynthesis and transport of aromatic amino acids in low-GC Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 222: 211-220.

Parekh, R.N., Shaw, M.R., and Wittrup, K.D. 1996. An integrating vector for tunable, high copy, stable integration into the 1996dis-persed Ty delta sites of Saccharomyces cerevisiae. *Iotechnol Prog*. 12(1): 16-21.

Pennisi, E. 2007. Genomics DNA study forces rethink of what it means to be a gene. *Science*. 316(5831): 1556-1557.

Phadtare, S., Alsina, J., and Inouye, M. 1999. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr Opin Microbiol*. 2: 175-180.

Piggott, P.J., and Hoch, J.A. 1985. Revised genetic linkage map of *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews.* 49: 158-179.

Pignatelli, R., Vai, M., Alberghina, L., and Popolo, L. 1998. Expression and secretion of beta-galactosidase in Saccharomyces cerevisiae using the signal sequences of GgpI, the major yeast glycosylphosphati-dylinositol-containing protein. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 27(2): 81-88.

Price, N.A., and Johnson, C.M. 1989. Proteinases as probes of conformation of soluble proteins. *In* Proteolytic Enzymes: A Practical Approach (R.J. Beynon and J.S. Bond, eds.). 163-179.

Priness, I. Maimon, and Ben-Gal, I. 2007. Evaluation of Gene-Expression Clustering by Mutual Information Distance Measures. *BMC Bioinformatics*. 8(1): 111-119.

Ptitsyn, O.B., Pain, R.H., Semisotnov, G.V., Zerovnik, E., and Razgulyaev, O.I. 1990. Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett.* 262: 20-24.

Punt, P.J., Van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., and Van Den Hondel, C. 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends.* 56: 13-24

Bennett, R.P., Cox, C.A., and Hoeffler, J.P. 1998. Fusion of green fluorescent protein with the Zeocin-resistance marker allows visual screening and drug selection of transfected eukaryotic cells. *Biotechniques*. 24: 478-482.

Ralston, G. 1993. Introduction to analytical ultracentrifugation. Vol. 1, Analytical Ultracentrifugation Series. Beckman Instruments, Fullerton, Calif.

Rawool S.B., Sahoo S., Rao K.K., and Sureshkumar, G.K. 2001. Improvement in enzyme productivities from mold cultivations using the liquid- phase oxygen supply strategy. *Biotechnol Prog.* 17: 832-837.

Ren, Z.J., and Black, L.W. 1998. Phage T4 SOC and HOC display of biologically active, full-length proteins on the viral capsid. *Gene*. 215: 439-444.

Rhee, S.Y, Beavis, W., Berardini, T.Z., Chen, G., Dixon, D., Doyle, A., Garcia-Hernandez, M., Huala, E., Lander, G., Montoya, M., Miller, N., Mueller, L.A., Mundodi, S., Reiser, L., Tacklind, J., Weems, D.C., Wu, Y., Xu, I., Yoo, D., Yoon, J., and Zhang, P. 2003. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to Arabidopsis biology, research materials and community. *Nucleic Acids Res*. 31: 224-228.

Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Botstein, D., and Fink, G.R. 1987. A Saccharomyces cerevisiae genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene*. 60(2): 237-243.

Rudolph, D., Srinivasan, S., Durham, D.R., and Heifetz, A. 2004. Advances in improved ex-pression of recombinant proteins in microbial systems. In: Langer ES, editor. *Advances in large-scale biopharm-aceutical manufacturing and scale-up*

production. Volume 1: emerging tech-nologies and scientific advancements. Washington DC. *ASM Press*. 194-228.

Salazar, M., Fedoroff, O.Y., Miller, J.M., Ribeiro, N.S., and Reid, B.R. 1993. The DNA strand in DNA.RNA hybrid duplexes is neither B-form nor A-form in solution. *Biochemistry*. 32(16): 4207-4215.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 2010. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second ed., vol. 3. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

San, K.Y., Bennett, G.N., Aristidou, A.A., and Chou, C.H. 1994. Strategies in high-level expression of recombinant protein in *Escherichia coli. Ann. N.Y. Acad. Sci.* 721: 257-267.

Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D.L. 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(5): 14127-14145.

Scoble, H.A., and Martin, S.A. 1990. Characterization of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* 193: 519-536.

Sekine, T., Watanabe, N., Hosoyamada, M., Kanai, N., and Endou, H. 1997. Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *Journal Biol Chem.* 272: 18526-18529.

Shen, S., Sulter, G., Jeffries, T.W., and Cregg, J.M. 1998. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast Pichia Pastoris. *Genetic*. 216(1): 93-102.

Siegele, D.A., and Hu, J.C. 1997. Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 8168-8172.

Sikorski, J., Graupner, S., Lorenz, M.G., and Wackernagel, W. 1998. Natural genetic transformation of Pseudomonas stutzeri in a nonsterile soil. *Microbiology*. 144: 569-576.

Sikorski, R.S., and Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*. 122(1): 19-27 .

Sorensen, H.P., and Mortensen, K.K. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. *Journal Biotechnol*. 115: 113-128.

Sorensen, H.P., Sperling-Petersen, H.U., and Mortensen, K.K. 2003. Production of recombinant thermostable proteins expressed in Escherichia coli: completion of protein synthesis is the bottleneck. *Journal ChromatogrB Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 786: 207-214.

Spirin, A.S. 2004. High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. *Trends Biotechnol*. 22: 538-545.

Spitzfaden, C., Nicholson, N., Jones, J.J., Guth, S., Lehr, R., Prescott, C.D., Hegg, L.A., and Eggleston, D.S. 2000. The structure of ribonuclease P protein from Staphylococcus aureus reveals a unique binding site for singlestranded RNA. *Journal of Molecular Biology*. 295: 105-115.

Studier, F.W., Rosenberg, J.J., Dunn, J.W., and Dubendor, V. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol.* 185: 60-89.

Sturtevant, J.M. 1987. Biochemical applications of differential scanning calorimetry. *Ann. Rev. Phys. Chem*. 38: 463-88.

Susanna, K.A., van der Werff, A.F., den Hengst, C.D., Calles, B., Salas, M., Venema, G., Hamoen, L.W., and Kuipers, O.P. 2004. Mechanism of transcription activation at the comG promoter by the competence transcription factor ComK of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 186: 1120-1128.

Torres, B., Jaenecke, S., Timmis, K.N., García, J.L., and Díaz, E. 2003. A dual lethal system to enhance containment of recombinant micro-organisms. *Microbiology*. 64: 96-114

Trinh, L.B., Phue, J.N., and Shiloach, J. 2003. Effect of methanol feeding strategies on recombinant mouse endostatin. *Biotechnology and Bioengineering*. 82(4): 438-444 .

Valerie, K., and Povirk, L.F. 2003. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*. 22(37): 5792-5812.

Van de Guchte, M., Ehrlich, S.D., and Chopin, A. 1998. tRNATrp as a key element on antitermination in the *Lactococcus lactis trp* operon. *Molecular Microbiology*. 29: 61-74.

Van Gorcom, R.F.M., Van Hartingsveldt, W.L.A., Van Paridon, P.A.B., Veenstra, A.E.N., Luiten, R.G.M.A., and Selton, G.C.M.S. 1990. Cloning and expression of microbial phytase. *Eur Pat Appl*. 42: 358-372.

Varley, P.G. 2018. Fluorescence spectroscopy. *Methods in Molecular Biology*. 22: 203-218.

Vasina, J.A., Peterson, M.S., and Baneyx, F. 1998. Scale-up and optimization of the low-temperature inducible cspA promoter system. *Biotechnology Progress*. 14: 714-721.

Vassileva, A., Chugh, D.A., Swaminathan, S., and Khanna, N. 2001. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotropic yeast Pichia pastoris using the GAP promoter. *journal of Biotechnology*. 88: 21-35.

Vertino, P.M., Spillare, E.A., Harris, C.C., and Baylin, S.B. 1993. Altered chromosomal methylation patterns accompany oncogene-induced transformation of human bronchial epithelial cells. *Cancer Research*. 53(7): 1684-1689.

Virnik, K., Lyubchenko, Y., Karymov, M.A., Dahlgren, P., Tolstorukov, M.Y., Semsey, S., Zhurkin, V.B., and Adhya, S. 2003. Antiparallel DNA loop in Gal repressosome visualized by atomic force microscopy. *Journal of Molecula Biology*. 334: 53-63.

Wagner, C.A., Friedrich, B., Setiawan, I., Lang, F., and Broer, S. 2000. The use of Xenopus laevis oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem*. 10: 1-12.

Walsh, G., and Headon, D.R. 1994. Therapeutic proteins: Special considerations. John Wiley & Sons, Chichester. *In Protein Biotechnology*. 119-162.

Wang, R., Chait, B.T., and Kent, S.B.H. 1994. Protein ladder sequencing towards automation in techniques. *In* Protein Chemistry V (J.W. Crabb, ed.) pp. 19-26. Academic Press, New York. Wetlaufer, D.B. 1962. Ultraviolet spectra of proteins and amino*Adv. Protein Chem.* 17: 303-390.

Wang, Y., Murray-Stewart, T., Devereux, W., Hacker, A., Frydman, B., Woster, P.M., and Casero., J.R.A. 2003. Properties of purified recombinant human polyamine oxidase, PAOh1/SMO. *Biochem Biophys Res Commun.* 304: 605-611.

Ward, O.P., Qin, Q.M., Dhanjoon, J.Y.J., and Singh, A. 2006. Physiology and biotechnology of Aspergillus. *Advances in Applied Microbiology*. 58: 1-75.

Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., and Losick, R. 2004. Ch9-10 Molecular Biology of the Gene, 5th ed., Peason Benjamin Cummings. CSHL Press.

Weikert, S., Papac, D., Briggs, J., Cowfer, D., Tom, S., Gawlitzek, M., Lofgren, J., Mehta, S., Chisholm, V., Modi, N., Eppler, S., Carroll, K., Chamow, S., Peers, D., Berman, P., and Krummen, L. 1999. Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins. *National Biotechnol*. 17: 1116-1121.

Westwater, C., Kasman, L.M., Schofield, D.A., Werner, P.A., Dolan, J.W., Schmidt, M.G., and Norris, J.S. 2003. Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: An alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 1301-1307.

Wiley, J. Sons, Chichester, U.K. Wang, R., and Chait, B.T. 1994. High-accuracy mass measurement as a tool for studying proteins. *Current Opinion in Biotechnology*. 5: 77-84.

Williams, F.M.R., Murray, R.C., Underhill, T.M., and Flintoff, W.F. 1994. Isolation of a hamster cDNA clone coding for a function involved in methotrexate uptake. *Journal Biol Chem*. 269: 5810-5816.

Wolff, N.A., Werner, A., Burkhardt, S., and Burckhardt, G. 1997. Expression cloning and characterization of a renal organic anion transporter from winter flounder. *Federation of European Biochemical Societies Lett.* 417: 287-291.

Yakovchuk, P., Protozanova, E., and Frank-Kamenetskii, M.D. 2006. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Research*. 34(2): 564-74.

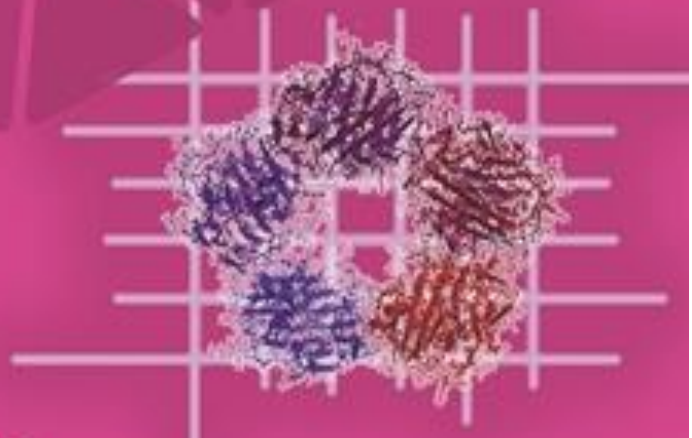
Yarnell, W.S., and Roberts, J.W. 1999. Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination. *Science*. 284: 611-615.

Yee Lui, P.P., Wong, Y.M., Rui, Y.F., Lee, Y.W., Chan, L.S., and Chan, K.M. 2011. Expression of chondro-osteogenic BMPs in ossifi ed failed tendon healing model of tendinopathy. *Journal Orthop Res*. 29: 816-821.

Yuk, I. H., Wildt, Y.S., Jolicoeur, M., Wang, D.I.C., and Stephanopoulos, G. 2002. A GFP-based screen for growth-arrested, recombinant protein-producing cells. *Biotechnology and Bioengineering.* 79: 74-82.

Zahn, K. 1996. Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *Journal Bacterial*. 178: 2926-233.

Expression of Recombinant Proteins



Dr. Iman Yousefi Javan
Esmaeil Fazeli (Ph.D. Student)
Nahid Gerayeli (Ph.D. Student)
Dr. Mohsen Niazkhani