

فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی و بیوتکنولوژی

شماره پیاپی ۱، جلد ۱، شماره ۱، زمستان ۹۱، صفحه ۴۱ تا ۴۹

ساخت وکتور بیانی با ویژگی تنظیم منفی پایدار مسیر تولید استات در باکتری اشریشیاکلی به وسیله آنتی سنس RNA

ناهید بختیاری^۱، ولی الله بابایی پور^۲، منوچهر میرشاهی^۱، **نادر مقصودی^۳**

۱- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

۲- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب

۳- دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، گروه مهندسی علوم زیستی nmagsoudi@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۳

چکیده

یکی از مشکلات استفاده از باکتری اشریشیاکلی برای تولید انبوه پروتئین نوترکیب، ترشح استات در محیط کشت است که سبب کاهش طول عمر باکتری و به دنبال آن کاهش بیان پروتئین نوترکیب می‌شود. در این مقاله ما از فناوری RNA آنتی سنس به عنوان ابزاری سودمند در مهندسی متابولیک برای مهار جزئی بیان ژن‌های مربوط به دو آنزیم اصلی مسیر استات، یعنی فسفوترانس-استیلاز (PTA) و استات کیناز (ACK)، استفاده کردیم. یک پلاسمید نوترکیب که حاوی ژن‌های آنتی سنسی است که هر دو ژن *ackA* و *pta* را مورد هدف قرار می‌دهد، ساخته شد. قطعات مربوط به کاست آنتی سنس در ناقل مورد نظر کلون شده و عملکرد آن با اندازه‌گیری سطح mRNA مربوط به هر دو ژن با روش RT-PCR و سنجش فعالیت آنزیم‌های آن‌ها با روش واکنش‌های جفت شده براون و همکارانش مورد ارزیابی قرار گرفت. بیان کاست، سبب کاهش سطح mRNA مربوط به هر دو ژن و فعالیت آنزیم‌های آن‌ها شد. میزان این کاهش فعالیت در مورد استات کیناز، ۱۷ درصد در مورد فسفوترانس استیلاز ۱۵ درصد محاسبه شد. با مشاهده این اثر امیدهای تازه‌ای برای جلوگیری از مرگ زود هنگام باکتری و افزایش بازدهی تولید داروی نوترکیب در باکتری اشریشیاکلی به وجود می‌آید.

واژه‌های کلیدی: RNA آنتی سنس، استات، پروتئین نوترکیب، اشریشیاکلی، استات کیناز، فسفوترانس استیلاز.

مقدمه

اگر چه امروزه ارگانسیم‌ها و سامانه‌های بیانی بسیار متنوعی برای تولید پروتئین نوترکیب وجود دارد، باکتری اشریشیاکلی اولین میزبانی بود که برای تولید داروی نوترکیب مورد استفاده قرار گرفت و به نظر می‌آید پیشرفت‌های قابل توجهی با استفاده از آن، در این حوزه از فناوری زیستی صورت گیرد. رشد سریع و سرعت بالای تولید پروتئین و دانش زیادی که در مورد فیزیولوژی اشریشیاکلی وجود دارد، به همراه ابزار کارآمد ژنتیکی، آن را به یکی از بهترین سیستم‌های بیانی مبدل ساخته است. به ویژه، توانایی اشریشیاکلی در کنترل فولدینگ اکسیداتیو پروتئین در سیتوپلاسم و نتایج جدید حاصل از

آزمایش‌های بدون سلول، دریچه‌های جدیدی جهت به کار-گیری این ارگانسیم ساده اما بسیار مفید، در صنایع تولید پروتئین نوترکیب گشوده است (۵). با وجود مزایای قابل توجه در مورد استفاده از این میزبان ارزان قیمت برای تولید پروتئین نوترکیب، مشکلاتی نیز بر سر راه وجود دارد. از جمله مسایلی که محققان مختلفی را به مطالعه و تحقیق جهت رفع آن واداشته است، تولید بالای استات توسط باکتری در طی رشد سریع در فرماتور می‌باشد که سبب مرگ زودرس آن شده و به این ترتیب فرآیند تولید پروتئین نوترکیب را کاهش می‌دهد.

تا کنون، راهکارهای مختلفی برای رفع این مشکل مطرح و انجام شده است. بسیاری از این روش‌ها در سه دسته

برای سلول‌ها با تنظیم سرعت گذارسانی به محیط با استفاده از الگوریتم‌های کنترلی پیچیده (۱۰، ۱۵، ۶) و حذف زایدات سمی به ویژه شده (۷) و به صورت یک توالی حتی‌الامکان کوتاه دارای نواحی تنظیمی آغازیو پایانی، وارد پلاسمید مناسب می‌گردد. پلاسمید مذکور وارد باکتری شده و از روی آن نسخه‌برداری انجام می‌شود. نسخه‌برداری از روی توالی آنتی‌سنس، سبب ایجاد رونوشتی می‌شود که با بخش‌هایی از mRNA حاصل از رشته‌ی سنس مکمل بوده و به آن متصل می‌شود. این امر سبب می‌گردد تا ریبوزوم‌ها نتوانند در طول mRNA حرکت نموده و آن را به پروتئین مربوط، ترجمه کنند. بنابراین تولید پروتئین مورد نظر در داخل باکتری دچار افت می‌شود (۷). بدین ترتیب علاوه بر اینکه استات به عنوان منبعی برای ATP حفظ می‌شود، مقدار اضافی آن که سبب از بین رفتن باکتری است به طور دائم از محیط حذف می‌شود.

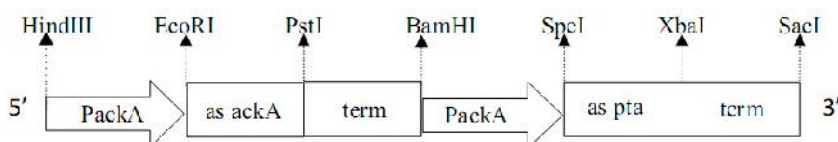
مواد و روش‌ها

گونه‌های باکتریایی

XL1-Blue(endA1 gyrA96 (nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ (lacZ) M15]hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺), Tetracycline-resistant (Stratagene) BL21(DE3)(F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])) (Studier). K12(DH5α)(F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ-) (Gibco/BRL).

در طراحی کاست آنتی‌سنس برای ژن آنزیم‌های مسیر اصلی سنتز استات یعنی استات کیناز و فسفوترانس استیلاز قالبی در نظر گرفته شد که در شکل ۱ نشان داده شده است.

اصلی قرار می‌گیرند (۸)، اجتناب از محدودیت اکسیژن محلول در محیط کشت، با افزایش سرعت اکسیژن ورودی یا از طریق غنی‌سازی آن با اکسیژن خالص؛ محدودسازی ماده غذایی استات از محیط راکتور، به صورت در جا مانند سامانه‌های پرفیوژن با اینکه بسیاری از این روش‌ها منجر به انجام بهتر فرآیند، آن هم به صورت موقت شده؛ انجام آن‌ها در عمل بسیار دشوار بوده و نیاز به کنترل‌های بسیار دقیقی دارد که به کارگیری آن‌ها پرهزینه بوده و صرفه‌ی اقتصادی ندارد. بنابراین، از سال ۱۹۹۴ پژوهش‌ها به سمت دستکاری‌های ژنتیکی و استفاده از ابزار مولکولی برای رفع این معضل، سوق یافت. که تا زمانهای اخیر نیز ادامه یافته است (۹). از جمله می‌توان به حذف آنزیم‌های اصلی مسیر تولید استات، یعنی مسیر استات کیناز - فسفوترانس استیلاز اشاره نمود (۸). اما، یکی از مشکلات ناکار کردن کامل ژن، این است که اگر عملکرد پروتئین حاصل از ژن برای رشد سلول در آزمایشگاه ضروری باشد، فقدان کامل ژن کشنده بوده و بنابراین هیچ پروتئین نو ترکیبی به دست نمی‌آید. این موضوع اهمیت کاهش بخشی از بیان ژن یا عملکرد محصول آن را تا حدی که سلول بتواند به رشد خود در شرایط طبیعی آزمایشگاهی ادامه بدهد، آشکار می‌سازد. یکی از راهبردهایی که جهت نیل به این هدف به کار می‌رود، فناوری RNA آنتی‌سنس است (۴). در این مقاله از فناوری RNA آنتی‌سنس برای مهار جزئی بیان ژن‌های مربوط به دو آنزیم اصلی مسیر استات، یعنی فسفوترانس استیلاز و استات-کیناز، استفاده شده است. در این فناوری که به طور طبیعی در باکتری‌ها وجود دارد (۷)، توالی‌هایی از مولکول mRNA نسخه‌برداری شده از روی ژن مورد نظر، که در ساختار دوم آن در نواحی سطحی و لوپ‌ها قرار می‌گیرند، شناسایی و انتخاب -



شکل ۱- کاست آنتی‌سنس در مورد آنزیم‌های استات کیناز و فسفوترانس استیلاز.

واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراس (PCR)، استخراج از ژل آگارز و

PCR-Cloning تهیه قطعات کاست آنتی‌سنس با

هضم آنزیمی دوگانه انجام گردید. برای هر قطعه از کاست مذکور، دو پرایمر طراحی شد که به تفصیل در جدول ۱

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر قطعات مربوط به کاست آنتی سنس.

Target gene	name of primer	sequence of primers (5'→3')
Promoter of <i>ackA</i>	Forward (for <i>asackA</i>)	5' GA.AGC.TTG.GCA.TAG.ACT.CAA.GAT.ATT'
	Reverse (for <i>asackA</i>)	5' AAG.AAT.TCG.TCA.GGG.AGC.CAT.AGA.G 3'
	Forward (for <i>aspta</i>)	5' CCG.GAT.TCT.AGA.CTC.AAG.ATA.TTT.CTI
	Reverse (for <i>aspta</i>)	5' GGA.ACT.AGT.GTC.AGG.GAG.CCA.TAG.AG
Antisense <i>ackA</i>	Forward (for <i>asackA</i>)	5' CTG.CAG.TAC.GCT.CTA.TGG.CTC.CC 3'
	Reverse (for <i>asackA</i>)	5' CGG.AAT.TCC.TCT.TCA.CCA.TTT.ACT.GC 3'
Antisense <i>pta</i>	Forward (for <i>aspta</i>)	5' TTC.TAG.AGC.TGT.TTT.GTA.ACC.CGC.C 3'
	Reverse (for <i>aspta</i>)	5' CAC.TAG.TAT.TGC.ACG.GAT.CAC.GCC 3'
terminator region of <i>pta</i>	Forward (for <i>asackA</i>)	5' CTG.CAG.TCT.CTC.GTC.ATC.ATC.CGC 3'
	Reverse (for <i>asackA</i>)	5' AAG.GAT.CCA.TGC.AGC.GCA.GTT.AAG.C 3'
	Forward (for <i>aspta</i>)	5' CCT.CTA.GAT.CTC.GTC.ATC.ATC.GCA 3'
	Reverse (for <i>aspta</i>)	5' GAG.CTC.ATG.CAG.CGC.AGT.TAA.G 3'

مورد نظر

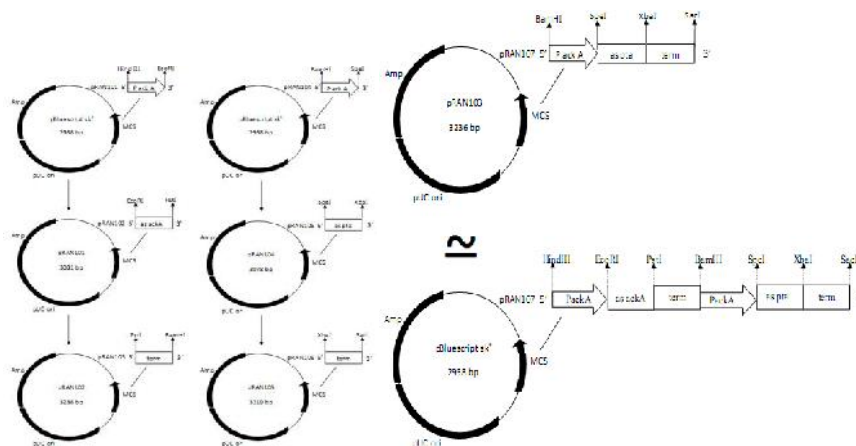
پس از تعیین غلظت مولی انتهاهای هر قطعه به همراه وکتوری که باید در آن کلون می‌شود، مقادیر مناسبی از آن‌ها، تحت واکنش الحاق‌قرار گرفتند. مراحل انجام واکنش مذکور در مورد هر بخش از کاست آنتی سنس به صورت شماتیک در شکل ۲ نشان داده شده است. تهیه میزبان باکتریایی مستعد و انتقال محصول الحاق به آن و تعیین توالی قطعه نهایی الحاق شده در پلاسمید باکتری مورد نظر با روش کلرید کلسیم به صورت باکتری مستعد درآمده و با ناقل حاوی قطعه ترانسفرم شد. در این مرحله به منظور تایید اولیه پلاسمید نو ترکیب هضم آنزیمی دوگانه توسط آنزیم-های دو طرف قطعه الحاق شده در ناقل، انجام گرفت. در این میان پلاسمیدی که قطعه‌ی مورد نظر را، پس از برش دوگانه، آزاد کرده و بر روی ژل آگار مشاهده شده بود، جهت تایید نهایی برای توالی یابی شد. پلاسمیدهای رها کننده قطعه‌های کاست در هر

واکنش PCR جهت جداسازی قطعات آنتی سنس به شرح زیر انجام شد: دمای اولیه: ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل که هر کدام شامل: ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، (*PackA*: ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، *asackA*: ۶۴/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، *ackA* term]: ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، *pta*: ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، *aspta*: ۶۳ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، *pta* term]: ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه) و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و تکثیر نهایی: ۷۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه. محصولات PCR به وسیله کیت استخراج DNA، متعلق به کمپانی Roche، از ژل آگار استخراج شدند. قطعات استخراج شده از ژل به همراه ناقل پلاسمیدی انتخاب شده جهت کلونینگ یعنی ϕ Bluescript/ sk⁺ توسط آنزیم-هایی که دو سر آن‌ها قرار داشتند، (مطابق آنچه در شکل ۲ نمایش داده شده است) برش زده شدند.

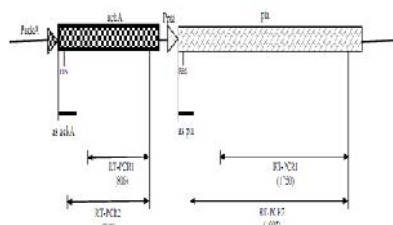
واکنش الحاق قطعات برش زده شده در ناقل

مرحله توسط کمپانی MWG توالی‌یابی و تایید شدند. سرانجام، پلاسمید نهایی حاوی کاست کامل آنتی سنس با

نام pL6، به صورتی که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، به دست آمد.



شکل ۲- تصویر شماتیک مراحل تهیه کاست آنتی سنس در مورد ژن های *pta* و *ackA*.
تهیه میزبان باکتریایی مستعد و انتقال محصول الحاق به آن و تعیین توالی قطعه نهایی الحاق شده در پلاسمید



شکل ۳- تصویر شماتیک از پلاسمید حاوی کاست کامل آنتی سنس به نام pL6

کاست آنتی سنس بود. پرایمرهای ذکر شده در جدول ۲، نشان داده شده‌اند. غلظت باندها توسط نرم افزار Total Lab Image Analysis اندازه‌گیری و سپس مقایسه شد.

اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم استات کیناز و فسفوترانس استیلاز

پس از تهیه افشروی خام از غلظت پروتئین موجود در آن با روش برادفورد (۱) محاسبه شد. برای تهیه محلول استاندارد پروتئین، از آلبومین سرم گوساله (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد. برای سنجش فعالیت آنزیم استات کیناز، طبق روش واکنشهای جفت شده براون و همکارانش (۲)، محلول واکنش به صورت زیر تهیه شد.

(225 mM Tris-HCl [pH 7.6], 15 mM malic acid, 4.5 mM MgCl₂, 3.75 mM CoA, 22.5 mM NAD⁺, 20μg/ml malate dehydrogenase, 20μg/ml citrate synthase, 60 mM ATP, 1 U/ml PTA, and 12.5 mM sodium acetate)

برای سنجش فعالیت آنزیم فسفوترانس استیلاز،

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از توانس- کورینتاز معکوس

عملکرد کاست آنتی سنس در باکتری میزبان اشریشیا کلی (DE3) BI21، مورد آزمایش قرار گرفت. به همین منظور، پس از استخراج RNA کل از باکتری طبق روش به کار رفته توسط کارونوکاران و کورامیتسو (۳) برای هر دو قسمت آنتی سنس کاست یعنی *pta* و *ackA* دو پرایمر مربوط به بخش پایین دست انتهای ۵' (چون mRNA باکتریایی به سرعت از سر ۵' شروع به تخریب شدن می‌کند) و یکی مربوط به انتهای ۳' طراحی و آزمایش RT-PCR انجام شد. پرایمرهای سر ۵' طوری طراحی شدند که یکی کاملاً بعد از ناحیه انتخابی برای قسمت آنتی سنس کاست بود (RT-PCR) و دیگری با بخشی از این ناحیه همپوشانی داشت (برای ترسیم بهتر این موضوع، تصویر شماتیکی از این کار در شکل ۴ آمده است). علت انجام این کار، دستیابی به امکان مقایسه نتایج RT-PCR و اطمینان از عملکرد

اندازه گیری شد. در این روش، یک واحد استات کیناز یا فسفوترانس استیلاز برابر با مقداری از آنزیم می باشد که ۱ میکرومول NADH را در زمان یک دقیقه در یک میلی لیتر مخلوط واکنش (در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در pH=۷/۶) آزاد می کند (۲). (1U = 1μmol/min)
 $(\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1})$
 غلظت باندها توسط نرم افزار Total Lab Image Analysis اندازه گیری و سپس مقایسه شد.

محلول واکنش به صورت زیر تهیه شد.
 (225 mM Tris-HCl [pH 7.6], 15 mM malic acid, 4.5 mM MgCl₂, 3.75 mM CoA, 22.5 mM NAD⁺, 20μg/ml malate dehydrogenase, 20μg/ml citrate synthase, 10 mM AcP)
 پس از تهیه این محلولها، واکنش با افزودن افسرهی خام با مقادیر مساوی پروتئین به هر دو محلول، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد آغاز شده و تغییرات جذب محلولهای مورد نظر برای ۳ دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۳۴۰ نانومتر

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده در RT-PCR به منظور آنالیز کمی رونویسی mRNA از ژنهای *ackA* و *pta*.

Target gene	name of primer	sequence of primers(5' 3')
<i>ackA</i>	Forward	5'CGATGCAGTAAATGGTGAAGAG3'
	Reverse	5' ATCAGCGCAGTGTAGGCAC 3'
	Forward	5' AGGAAGCGGCTTTAGGTG 3'
	Reverse	5' ATCAGCGCAGTGTAGGCAC 3'
<i>Pta</i>	Forward	5' CCGTATTATTATGCTGATCC3'
	Reverse	5' GCTGTACCGCTTTGTAGG3'

هضم شده با HindIII-SacI که آنزیمهای دو سر کاست می باشند، کاست آنتی سنس را در نزدیکی باند ۸۰۰ جفت-بازی DNA ladder آزاد کرده است. به علاوه، pL6 هضم شده با BamHI نیز که در وسط کاست آنتی سنس قرار دارد سبب آزاد سازی باند با طول ۴۴۳۱ جفت بازی شده که وجود کاست کلون شده را در وکتور جدید نشان می دهد.

نتایج و بحث

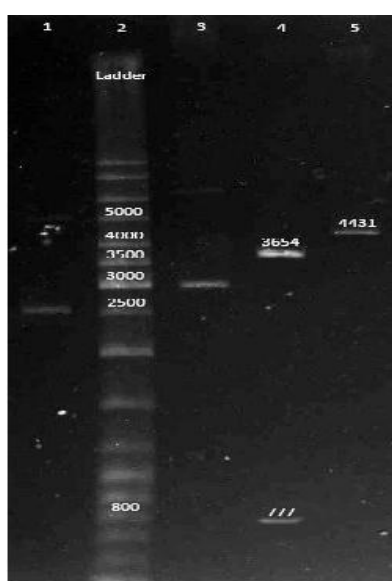
کلونینگ کاست آنتی سنس در وکتور pLT10T3

و تهیه وکتور pL6

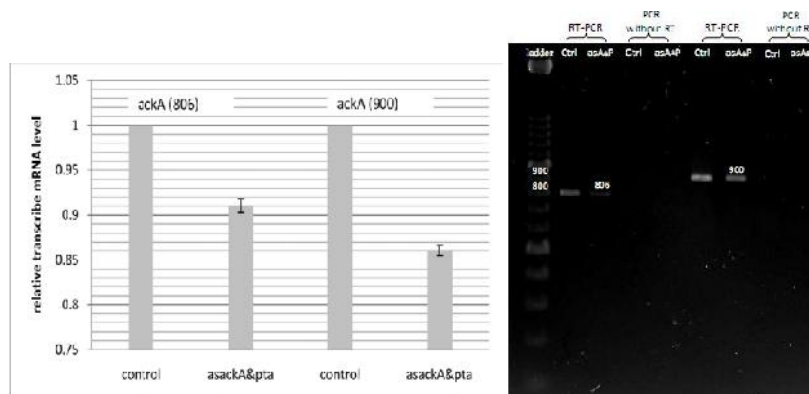
تصویر مربوط به وکتور pLT10T3 کلون شده با کاست کامل آنتی سنس (*PackA+as-ackA+term+Ppta+as-*) در این حالت pL6 نامیده شد به همراه باندهای حاصل از هضم آنزیمی یک و دو گانه آن در ژل الکتروفورز در شکل ۵ مشاهده می شود.
 همانطور که در این شکل قابل مشاهده می باشد، pL6

استخراج شده با DNA و ایجاد پاسخ کاذب واکنش بدون آنزیم ترانس کریپتاز معکوس نیز انجام گرفت. طبق نتیجه مشاهده شده در شکل های ۶ و ۷، همانطور که انتظار می-رفت، چه در رونوشت *ackA* (۹-۱۴ درصد) و چه در رونوشت *pta* (۱۹-۲۱ درصد) نسبت به کنترل کاهش مشاهده می شود. این کاهش بیانگر ایجاد RNA آنتی سنس در مورد هر دو ژن مسیر بیوستز استات توسط کاست کلون شده در وکتور pL6 می باشد

آنالیز RT-PCR کمی برای مشاهده اثر کاست آنتی سنس در کاهش رونوشت ژن *ackA* و *pta*
در این مرحله باید از کارایی و عملکرد این پلاسمید pL6 در کاهش رونوشت های ژن های *ackA* و *pta* اطمینان حاصل می شد. بنابراین باکتری دارای پلاسمید pL6 و باکتری دارای پلاسمید pLT10T3 که فاقد کاست آنتی سنس بود به طور جداگانه استخراج شده و از روی آن ها واکنش RT-PCR انجام شد. جهت جلوگیری از آلودگی rRNA

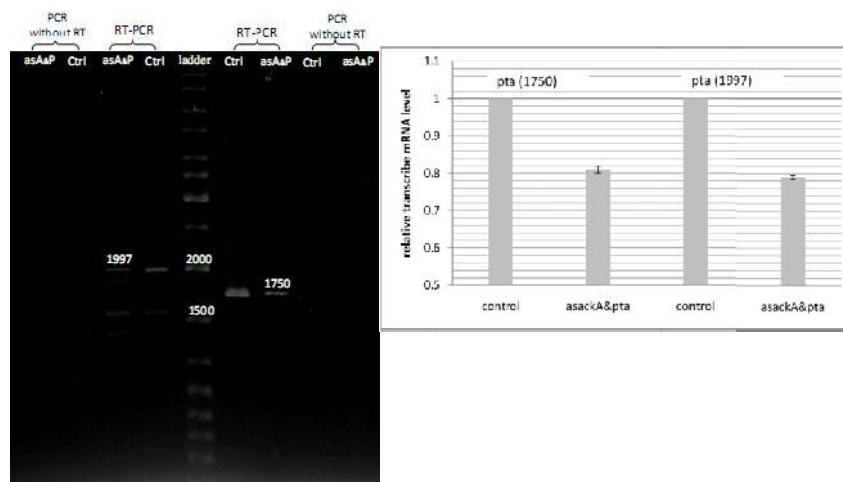


شکل ۵- تصویر ژل الکتروفورز همضم دوگانه پلاسمیدهای pLT10T3 کلون شده با-*pta*+*ackA*+*term*+*as-ackA* کلون شده با-*pta*+*ackA*+*term* (۱) pL6 همضم نشده. (۳) PL6 همضم نشده. (۴) pL6 همضم شده با *HindIII*-*SacI* که کاست آنتی سنس را در نزدیکی باند ۸۰۰ جفت بازی DNA ladder آزاد کرده است. (۵) pL6 همضم شده با *BamHI*. (اعداد مشخص شده در ژل بر حسب جفت باز می باشد)



شکل ۶- آنالیز RT-PCR کمی برای مشاهده اثر کاست آنتی سنس در کاهش رونوشت ژن *ackA*. قطعه ۸۰۶ جفت بازی خارج

از ناحیه آنتی‌سنس بوده و قطعه ۹۰۰ جفت بازی با ناحیه انتخاب شده جهت آنتی‌سنس همپوشانی دارد. اعداد مشخص شده در ژل برحسب جفت باز می باشد.

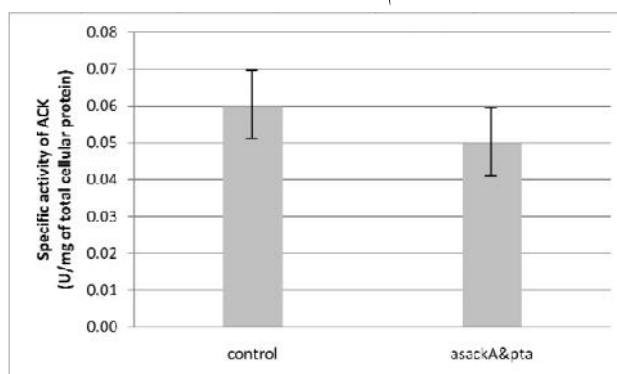


شکل ۷- آنالیز RT-PCR کمی برای مشاهده اثر کاست آنتی‌سنس در کاهش رونوشت ژن pta. قطعه ۱۷۵۰ جفت بازی خارج از ناحیه آنتی‌سنس بوده و قطعه ۱۹۹۷ جفت بازی با ناحیه انتخاب شده جهت آنتی‌سنس همپوشانی دارد. اعداد مشخص شده در ژل برحسب جفت باز می باشد.

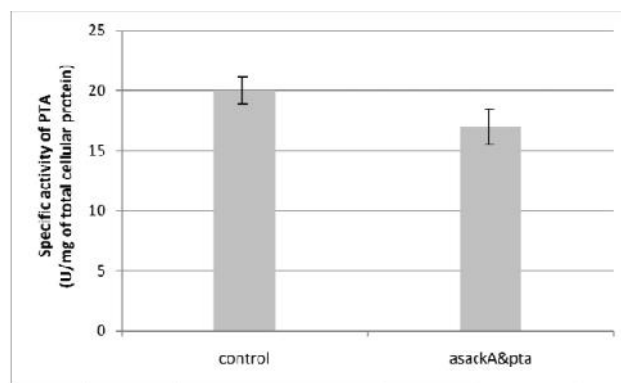
استات کیناز، ۱۷ درصد و در مورد فسفو ترانس استیلاز ۱۵ درصد مشاهده شد. با پایین آمدن میزان فعالیت آین آنزیم- های اصلی مسیر تولید استات انتظار می‌رود که در میزان تولید این محصول جنبی حاصل از مصرف بالای گلوکز نیز سیر نزولی مشاهده شده و ضمن اینکه تولید انرژی توسط این مسیر کاملاً متوقف نمی‌شود؛ از اثرات مضر آن که در اثر ترشح استات در محیط کشت حاصل می‌شود جلوگیری گردد. این نتایج در شکل‌های ۸ و ۹ نشان داده شده است

فعالیت ویژه آنزیم استات کیناز و فسفو ترانس- استیلاز در باکتری دارای کاست آنتی‌سنس و باکتری فاقد آن

پس از مشاهده کاهش رونوشت‌های مربوط به آنزیم- های استات کیناز و فسفو ترانس استیلاز باید به بررسی فعالیت این دو آنزیم در اثر عملکرد کاست آنتی‌سنس می- پرداختیم. بنابراین فعالیت آن‌ها اندازه‌گیری و با حالتی که باکتری فاقد کاست آنتی‌سنس بود، مقایسه شد. هر چند خطای اندازه‌گیری کم نبود، اما کاهش فعالیت در هر دو آنزیم واضح بود. نرخ این کاهش فعالیت در مورد آنزیم



شکل ۸- فعالیت ویژه آنزیم استات کیناز در باکتری دارای کاست آنتی‌سنس و باکتری فاقد آن. asackA&pta باکتری کاست آنتی‌سنس می باشد.



شکل ۹- فعالیت ویژه آنزیم فسفوترانس استیلاز در باکتری دارای کاست آنتی سنس و باکتری فاقد آن. asackA&pta نمایانگر کاست آنتی سنس می باشد

باشد، و نیز کاهش فعالیت مربوط به آنزیم های آن ها می توان از این وکتور بیانی برای افزایش بازده تولید پروتئین نو ترکیب در باکتری اشریشیا کلی بهره برداری کرد

با مشاهده اثر کاست آنتی سنس در کاهش رونوشت های مربوط به ژن آنزیمهای مسیر بیوسنتز استات در باکتری اشریشیا کلی که یک میزبان مهم تولید پروتئین نو ترکیب می

منابع

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*, 72, 248–54.
- Brown, T.D.K., Jones-Mortimer, M.C., Kornberg, H.L. (1977). The enzymatic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A. *J. Gen. Microbiol.*, 102, 327–336.
- Karunakaran, T., Kuramitsu, H. (1996). Simple and rapid method for isolation of RNA from Gram-negative bacteria. *BioTechniques*, 20, 546–547.
- Kurreck, J. (2003). Antisense technologies: Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem*, 270, 1628–1644.
- Swartz, j.R. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 195–201.
- Vidal, L., Calveras, J., Clapés, P., et al. (2005). Influence of induction and operation mode on recombinant rhamnulose 1-phosphate aldolase production by *Escherichia coli* using the T5 promoter. *J. Biotechnol*, 118, 75–87.
- Wagner, E.G.H., Simons, R.W. (1994). Antisense RNA control in bacteria, phages and plasmids. *Annu. Rev. Microbiol*, 48, 713-742.
- Yang, Y.T., Bennett, G.N., San, K.Y. (1998). Genetic and metabolic engineering. *Electronic. J. Biotechnol*, voll. ISSN, 0717-3458.
- Young-Ji, n. S., Je-Nie, P., Loc, B.T., Sang, J.L., Shi loach, J. (2011). The role of Cra in regulating acetate excretion and osmotic tolerance in *E. coli* K-12 and *E. coli* B at high density growth. *Microbial Cell Factories*, 10, 52-61
- Zawada, J., Swartz, J. (2005). Maintaining rapid growth in moderatedensity *Escherichia coli* fermentations. *Biotechnol. Bioeng*, 4, 407–416.
- Zeikus, J.G., Jain, M.K., Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51, 545–552.
- Zhang, Y., Shen, Y.L., Xia, X.X., Sun, A.Y., Wei, D.Z., Zhou, J.S., et al. (2004). [High-cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* for production

of TRAIL by using a 2-stage feeding strategy]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 20(3),408-13.

13. Zhang, H., Rao, N.N., Shiba, T., Kornberg, A. (2005). Inorganic polyphosphate in the social life of *Myxococcus xanthus*: motility, development, and predation. *Proc. Natl. Acad. Sci, U. S. A*, 102,13416–13420

14. Zhang Y.,Liu X. S., Liu Q. R., Wei L.

. (2006). Genome-wide in silico identification and analysis of cis natural antisense transcripts (cis-NATs) in ten species. *Nucleic Acids Res*, 34,3465–3475.

15. Zhu, Y., Eiteman, M.A, DeWitt ,K., Altman, E. (2007). Homolactate fermentation by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* ,73,456–464.

