

## ساخت وکتور بیانی با ویژگی تنظیم منفی پایدار مسیر تولید استات در باکتری اشريشیاکلی به وسیله ی آنتی‌سنس RNA

ناهید بختیاری\*

ولی الله بابایی پور\*\*

منوچهر میرشاهی\*

نادر مقصودی\*\*\*

### چکیده

یکی از مشکلات استفاده از باکتری اشريشیاکلی 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 آنتی‌سنس به عنوان ابزاری سودمند در مهندسی متابولیک برای مهار جزئی بیان ژن‌های مربوط به دو آنزیم اصلی مسیر استات، یعنی فسفوترانس‌استیلاز (PTA) و استات‌کیناز (ACK)، استفاده کردیم. یک پلاسمید نوترکیب که حاوی ژن‌های آنتی‌سنسی است که هر دو ژن ackA و pta را مورد هدف قرار می‌دهد، ساخته شد. قطعات مربوط به کاست آنتی‌سنس در ناقل مورد نظر کلون

\* دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

\*\* دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب

\*\*\* دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، گروه مهندسی علوم زیستی

nmaghsoudi@sbmu.ac.ir

\*\*\*\*

۶۸ ..... فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

شده و عملکرد آن با اندازه‌گیری سطح mRNA می‌مربوط به هر دوزن 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 می‌مربوط به هر دوزن و فعالیت آنزیم‌های آن‌ها شد. میزان این کاهش فعالیت در مورد استات کیناز، ۱۷ درصد در مورد فنسفوترنس استیلاز ۱۵ درصد محاسبه شد. با مشاهده این اثر امیدهای تازه‌ای برای جلوگیری از مرگ زودهنگام باکتری و افزایش بازدهی تولید داروی نوترکیب در باکتری اشیریشیاکلی به وجود می‌آید.

**واژه های کلیدی:** RNA ی آنتی‌سنس، استات، پروتئین نوترکیب، اشیریشیاکلی، استات

کیناز، فنسفوترنس استیلاز.

## مقدمه

اگر چه امروزه ارگانسیم‌ها و سامانه‌های بیانی بسیار متنوعی برای تولید پروتئین نوترکیب وجود دارد، باکتری *اشرشیاکلی* 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 *اشرشیاکلی* وجود دارد؛ به همراه ابزار کارآمد ژنتیکی، آن را به یکی از بهترین سیستم‌های بیانی مبدل ساخته است. به ویژه، توانایی *اشرشیاکلی* در کنترل فولدینگ اکسیداتیو پروتئین در سیتوپلاسم و نتایج جدید حاصل از آزمایش‌های بدون سلول<sup>۱</sup>، دریچه‌های جدیدی جهت به کارگیری 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 ارزان‌قیمت 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 فرمانتور 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 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 برای سلول‌ها با تنظیم سرعت گذارسانی به محیط با استفاده از الگوریتم‌های کنترلی پیچیده (۱۰ و ۱۱) و حذف زایدات سمی به ویژه استات از محیط راکتور، به صورت در جا<sup>۲</sup> مانند سامانه‌های پرفیوژن<sup>۳</sup>.

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

---

1 Cell- free  
2 In Situ  
3 perfusion

۷۰ ..... فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

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<sup>۱</sup>، 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 نوترکیبی 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<sup>۲</sup> 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 شده (۷) و به صورت یک توالی حتی‌الامکان کوتاه دارای نواحی تنظیمی آغازی<sup>۳</sup> و پایانی<sup>۴</sup>، 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.

- 
- 1 Gene Knock-Out
  - 2 Antisense RNA
  - 3 promoter
  - 4 terminator

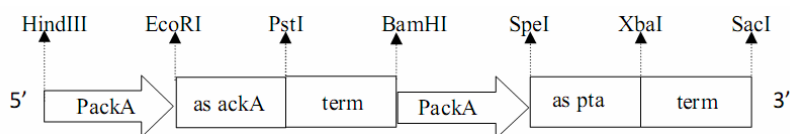
ساخت وکتور بیانی با ویژگی تنظیم منفی پایدار مسیر تولید استات ..... ۷۱

## مواد و روشها

### گونه‌های باکتریایی

XL1-Blue (endA1 gyrA96 (nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ (lacZ) M15] hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>), Tetracycline- resistant) (Stratagene). BL21(DE3)( F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])) (Studier). K12(DH5α)(F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>), λ<sup>-</sup>) (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.



شکل ۱. کاست آنتی‌سنس در مورد آنزیم‌های استات‌کیناز و فسفوترانس استیلاز.

تهیه قطعات کاست آنتی‌سنس با واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز (PCR)، استخراج از ژل آگارز و هضم آنزیمی دوگانه انجام گردید. برای هر قطعه از کاست مذکور، دو پرایمر طراحی شد که به تفصیل در جدول ۱ نمایش داده شده است.

۷۲ ..... فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

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 3'
	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.CTT 3'
	Reverse (for <i>aspta</i> )	5' GGA.ACT.AGT.GTC.AGG.GAG.CCA.TAG.AG 3'
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'

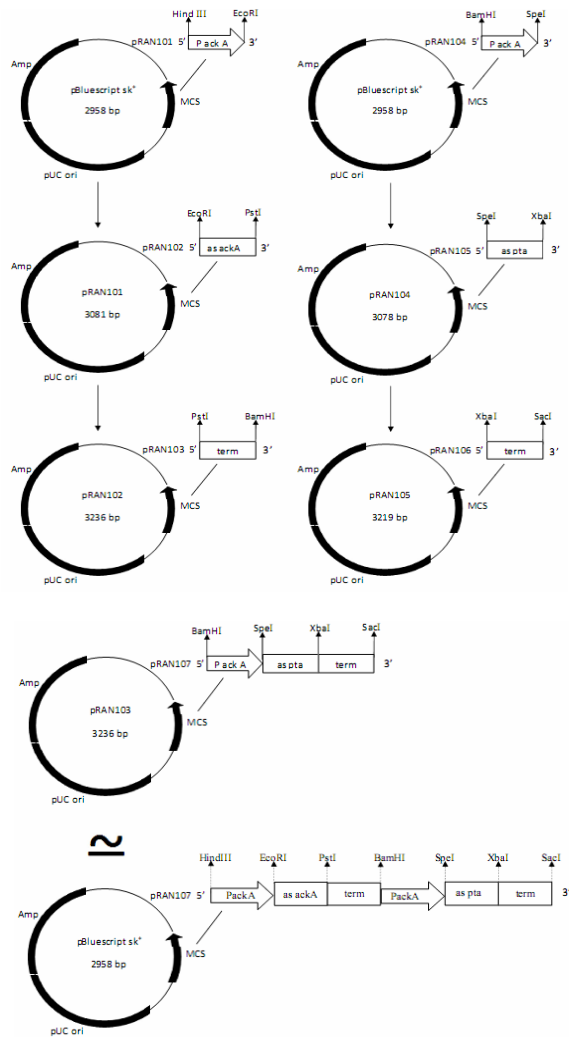
واکنش PCR جهت جداسازی قطعات آنتی سنس به شرح زیر انجام شد: دمای اولیه: ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل که هر کدام شامل: ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، (*PackA*): ۵۵ °C به مدت ۱ دقیقه، *asackA*: ۶۴/۵ °C به مدت ۱ دقیقه، [*ackA*]*term*: ۶۵ °C به مدت ۱ دقیقه، *pta*: ۶۰ °C به مدت ۱ دقیقه، *aspta*: ۶۳ °C به مدت ۱ دقیقه، [*pta*]*term*: ۵۵ °C به مدت ۱ دقیقه) و ۷۲ °C به مدت ۹۰ ثانیه و تکثیر نهایی: ۷۲ °C 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 pBluescript/sk<sup>+</sup> توسط آنزیم‌هایی 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 مورد نظر

پس از تعیین غلظت مولی انتهاهای هر قطعه به همراه وکتوری که باید در آن کلون می‌شد،

ساخت وکتور بیانی با ویژگی تنظیم منفی پایدار مسیر تولید استات..... ۷۳

مقادیر مناسبی از آن ها، تحت واکنش الحاق<sup>۱</sup> قرار گرفتند. مراحل انجام واکنش مذکور در مورد هر بخش از کاست آنتی سنس به صورت شماتیک در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲. تصویر شماتیک مراحل تهیه کاست آنتی سنس در مورد ژنهای ackA و pta.

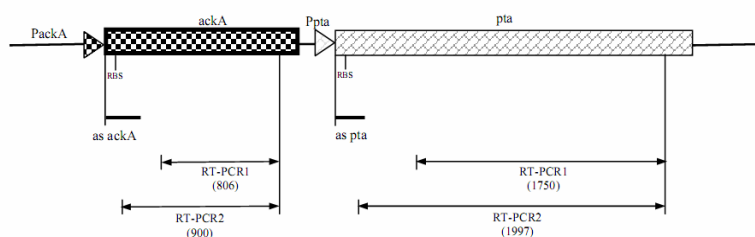
1 Ligation

۷۴ ..... فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/ سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

تهیه میزبان باکتریایی مستعد<sup>۱</sup> و انتقال<sup>۲</sup> محصول الحاق به آن و تعیین توالی<sup>۳</sup> 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 نوترکیب هضم آنزیمی دوگانه توسط آنزیم‌های 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 توالی‌یابی شد. پلاسمیدهای رها کننده‌ی قطعه‌های کاست در هر مرحله توسط کمپانی MWG توالی‌یابی و تایید شدند. سرانجام، پلاسمید نهایی حاوی کاست کامل آنتی‌سنس با نام pL6، به صورتی که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، به دست آمد.

شکل ۳. تصویر شماتیک از پلاسمید حاوی کاست کامل آنتی‌سنس به نام pL6



واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز با استفاده از ترانس‌کریپتاز معکوس (RT-PCR)

عملکرد کاست آنتی‌سنس در باکتری میزبان /شریشیاکلی (DE3) B121، مورد آزمایش قرارگرفت. به همین منظور، پس از استخراج RNA کل از باکتری طبق روش به کار رفته توسط کارونوکاران و کورامیتسو (۳) برای هر دو قسمت آنتی‌سنس کاست یعنی ackA و pta دو پرایمر مربوط به بخش پایین دست انتهای 5' (چون mRNA باکتریایی به سرعت از سره شروع به تخریب شدن می‌کند) و یکی مربوط به انتهای 3' طراحی و آزمایش RT-PCR انجام

- 1 competent cell
- 2 Transformation
- 3 Sequencing



ساخت وکتور بیانی با ویژگی تنظیم منفی پایدار مسیر تولید استات... ۷۵

شد. پرایمرهای سر ۵ طوری طراحی شدند که یکی کاملاً بعد از ناحیه انتخابی برای قسمت آنتی سنس کاست بود 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 کاست آنتی سنس بود. پرایمرهای ذکر شده در جدول ۲، نشان داده شده‌اند.

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'

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 افشره‌ی خام از غلظت پروتئین موجود در آن با روش برادفورد<sup>۱</sup> (۱) محاسبه شد. برای تهیه‌ی 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<sup>۲</sup> (۲)، محلول واکنش به صورت زیر تهیه شد.

(225 mM Tris-HCl [pH 7.6], 15 mM malic acid, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.75 mM CoA, 22.5 mM NAD<sup>+</sup>, 20µg/ml malate dehydrogenase, 20µg/ml citrate synthase, 60 mM ATP, 1 U/ml PTA, and 12.5 mM sodium acetate)

1 Bradford

2 Coupled reaction of Brown et al

۶۶ ..... فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

برای سنجش فعالیت آنزیم فسفوترانس استیلاز، محلول واکنش به صورت زیر تهیه شد.

(225 mM Tris-HCl [pH 7.6], 15 mM malic acid, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.75 mM CoA, 22.5 mM NAD<sup>+</sup>, 20 μg/ml malate dehydrogenase, 20 μg/ml citrate synthase, 10 mM AcP)

پس از تهیه این محلول‌ها، واکنش با افزودن افشیره‌ی خام با مقادیر مساوی پروتئین به هر

دو محلول، در دمای ۲۵ °C آغاز شده و تغییرات جذب محلول‌های مورد نظر برای ۳ دقیقه

توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این روش، یک

واحد استات کیناز یا فسفوترانس استیلاز برابر با مقداری از آنزیم می‌باشد که ۱ میکرومول

NADH را در زمان یک دقیقه در یک میلی لیتر مخلوط واکنش (در دمای ۲۵ °C در pH=۷/۶)

آزاد می‌کند (۲). (1U = 1 μmol/min) ( $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

## نتایج و بحث

### کلونینگ کاست آنتی سنس در وکتور pLT10T3 و تهیه وکتور pL6.

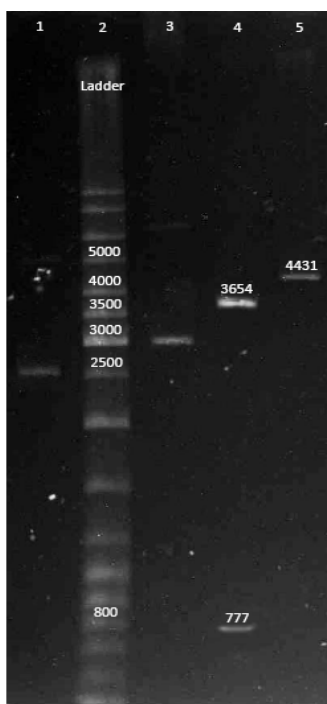
تصویر مربوط به وکتور pLT10T3 کلون شده با کاست کامل آنتی سنس

(*PackA+as-ackA+term+ Ppta+as-pta+term*) که در این حالت pL6 نامیده

شد به همراه باندهای حاصل از هضم آنزیمی یک و دوگانه آن در ژل الکتروفورز در شکل ۵

مشاهده می‌شود.

ساخت وکتور بیانی با ویژگی تنظیم منفی پایدار مسیر تولید استات..... ۷۷



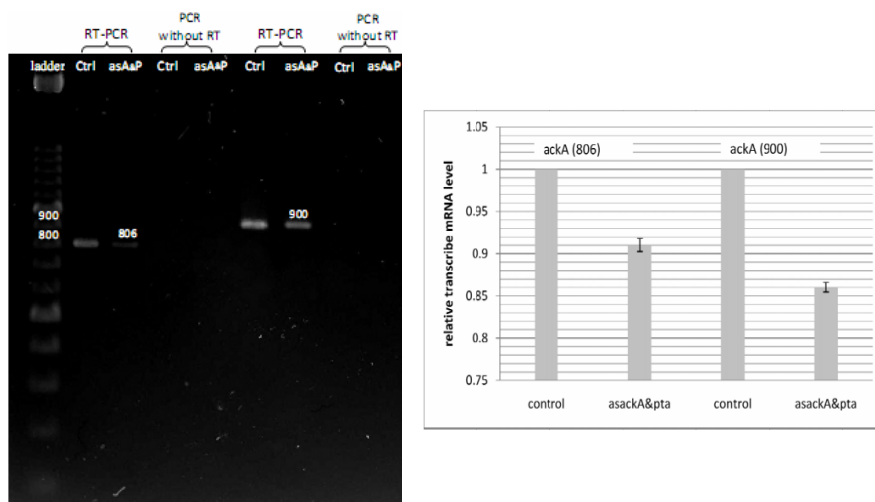
شکل ۵. تصویر ژل الکتروفورز هضم دوگانه پلاسمیدهای pLT10T3 کلون شده با PackA+as-ackA+term+ (۱) Ppta+as-pta+term (۲) pLT10T3 هضم نشده (۳) PL6 هضم نشده (۴) pL6 هضم شده با HindIII-SacI که کاست آنتی سنس را در نزدیکی باندهای ۸۰۰ جفت‌بازی DNA ladder آزاد کرده است (۵) pL6 هضم شده با BamHI. (اعداد مشخص شده در ژل برحسب جفت باز می‌باشد).

همانطور که در این شکل قابل مشاهده می‌باشد، pL6 هضم شده با HindIII-SacI که آنزیم‌های دو سر کاست می‌باشند، کاست آنتی سنس را در نزدیکی باندهای ۸۰۰ جفت‌بازی DNA ladder آزاد کرده است. به علاوه، pL6 هضم شده با BamHI نیز که در وسط کاست آنتی سنس قرار دارد سبب آزاد سازی باندهای ۴۴۳۱ جفت‌بازی شده که وجود کاست کلون شده را در وکتور جدید نشان می‌دهد.

**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 رونوشت‌های ژن‌های

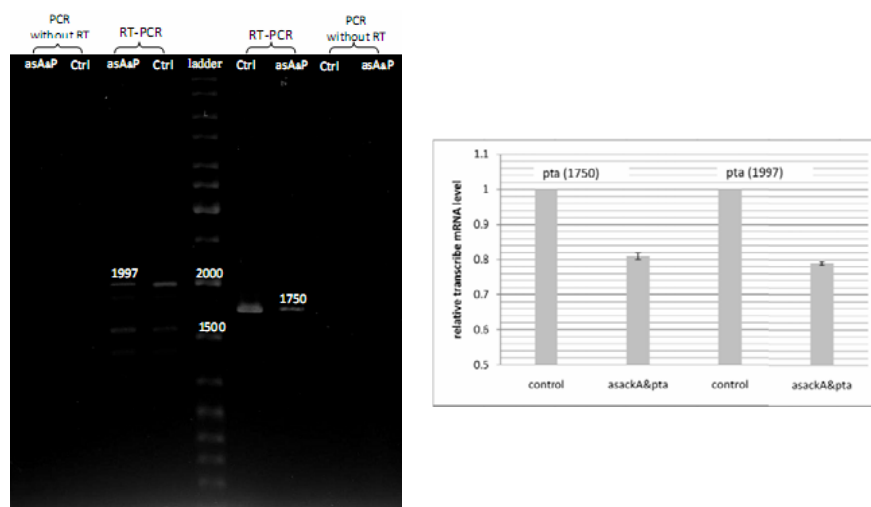
۷۸ ..... فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

*ackA* و *pta* اطمینان حاصل می‌شد. بنابراین RNA باکتری دارای پلاسمید pL6 و باکتری دارای پلاسمید pLT10T3 که فاقد کاست آنتی‌سنس بود به طور جداگانه استخراج شده و از روی آن‌ها واکنش RT-PCR انجام شد. جهت جلوگیری از آلودگی RNA استخراج شده با DNA و ایجاد پاسخ کاذب واکنش بدون آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس نیز انجام گرفت. طبق نتیجه مشاهده شده در شکل‌های ۶ و ۷، همانطور که انتظار می‌رفت، چه در رونوشت *ackA* (۱۴-۹ درصد) و چه در رونوشت *pta* (۲۱-۱۹ درصد) نسبت به کنترل کاهش مشاهده می‌شود. این کاهش بیانگر ایجاد RNA آنتی‌سنس در مورد هر دو ژن مسیر بیوستز استات توسط کاست کلون شده در وکتور pL6 می‌باشد.



شکل ۶. آنالیز RT-PCR کمی برای مشاهده اثر کاست آنتی‌سنس در کاهش رونوشت ژن *ackA*. قطعه ۸۰۶ جفت‌بازی خارج از ناحیه آنتی‌سنس بوده و قطعه ۹۰۰ جفت‌بازی با ناحیه انتخاب شده جهت آنتی‌سنس همپوشانی دارد. اعداد مشخص شده در ژل برحسب جفت‌بازی می‌باشد.

ساخت وکتور بیانی با ویژگی تنظیم منفی پایدار مسیر تولید استات... ۷۹



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

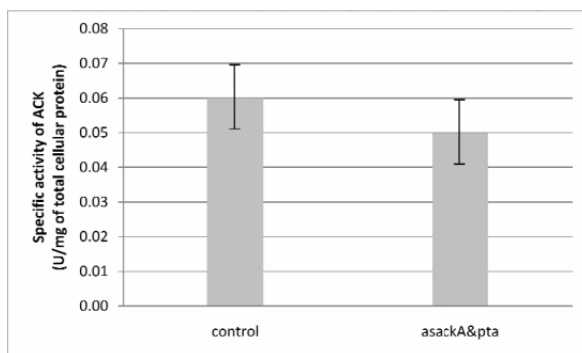
### فعالیت ویژه آنزیم استات کیناز و فسفوترانس استیلاز در باکتری دارای کاست

#### آنتی‌سنس و باکتری فاقد آن

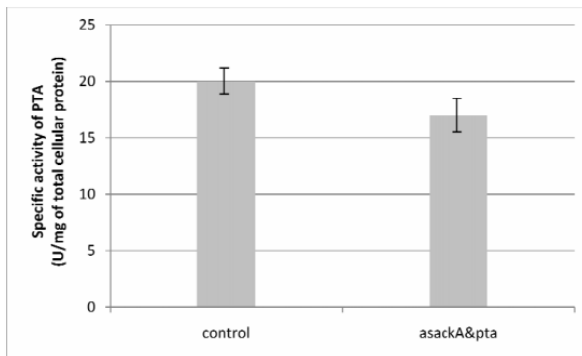
پس از مشاهده کاهش رونوشت‌های مربوط به آنزیم‌های استات کیناز و فسفوترانس استیلاز باید به بررسی فعالیت این دو آنزیم در اثر عملکرد کاست آنتی‌سنس می‌پرداختیم. بنابراین فعالیت آن‌ها اندازه‌گیری و با حالتی که باکتری فاقد کاست آنتی‌سنس بود، مقایسه شد. هر چند خطای اندازه‌گیری کم نبود؛ اما کاهش فعالیت در هر دو آنزیم واضح بود. نرخ این کاهش فعالیت در مورد آنزیم استات کیناز، ۱۷ درصد و در مورد فسفو ترانس استیلاز ۱۵ درصد مشاهده شد. با پایین آمدن میزان فعالیت این آنزیم‌های 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

۸۵ ..... فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

در اثر ترشح استات در محیط کشت حاصل می شود جلوگیری گردد. این نتایج در شکل های ۸ و ۹ نشان داده شده است.



شکل ۸. فعالیت ویژه آنزیم استات کیناز در باکتری دارای کاست آنتی سنس و باکتری فاقد آن. asackA&pta نمایانگر کاست آنتی سنس 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

### نتیجه گیری

با مشاهده اثر کاست آنتی سنس در کاهش رونوشت های مربوط به ژن آنزیم های مسیر بیوسنتز استات در باکتری اشریشیاکلی که یک میزبان مهم تولید پروتئین نوترکیب می باشد، و

ساخت وکتور بیانی با ویژگی تنظیم منفی پایدار مسیر تولید استات..... ۸۱

نیز کاهش فعالیت مربوط به آنزیم های آن ها می توان از این وکتور بیانی برای افزایش بازده تولید پروتئین نو ترکیب در باکتری /شیریشیاکلی بهره برداری کرد.

### منابع

1. 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.
2. Brown, T.DK. Jones-Mortimer, M.C and Kornberg, H.L. (1977) "The enzymatic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A". J. Gen. Microbiol., 102, 327-336.
3. Karunakaran, T and Kuramitsu, H. (1996) "Simple and rapid method for isolation of RNA from Gram-negative bacteria". BioTechniques., 20, 546-547.
4. Kurreck, J. (2003) "Antisense technologies: Improvement through novel chemical modifications". Eur. J. Biochem., 270, 1628-1644.
5. Swartz, j.R. (2001) "Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins". Curr. Opin. Biotechnol., 12, 195-201.
6. Vidal, L. 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.
7. Wagner, E.G.H and Simons, R.W. (1994) "Antisense RNA control in bacteria, phages and plasmids". Annu. Rev. Microbiol., 48, 713-742.
8. Yang, Y.T. Bennett, G.N. San, K.Y.(1998) "Genetic and metabolic engineering". Electronic. J. Biotechnol., voll. ISSN, 0717-3458.
9. Young-Ji n, S. Je-Nie, P. Loc, B.T. Sang, J.L and 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
10. Zaw ada, J. and Swartz, J. (2005) "Maintaining rapid growth in mode rate-density Escherichia coli fermentations. Biotechnol. Bioeng., 89, 407-415.