Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2):211-221

Chlamydomonas reinhadtii as a novel photobioreactor to produce recombinant proteins

ARTICLE INFO

Article Type
Analytical Review

Authors
Shamriz S.[1] *PhD,*
Ofoghi H.[*1] PhD*

How to cite this article
Shamriz S, Ofoghi H. Chlamydomonas reinhadtii as a novel photobioreactor to produce recombinant proteins. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2): 211-221.

[1]Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 56277193
Fax: +98 (21) 56276636
ofoghi@irost.ir

Article History
Received: November 25, 2017
Accepted: February 27, 2018
ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Microalgae are microscopic algae found in a wide range of habitats including freshwater and marine systems. Over the last decades, biotechnological processes based on microalgae have been receiving increasing interest due to their potential to produce large quantities of valuable products used as human food supplements, pharmaceuticals and animal feed. Microalgae have also been proved as an efficient and cost-effective platform for recombinant protein production. Most progress in this field has been achieved using Chlamydomonas reinhardtii, a photosynthetic unicellular alga which has been mostly considered as a model organism in different studies. High growth rate, ease of cultivation, well-established genetics and the ability to perform post-translational modifications are the most beneficial attributes that have made C. reinhardtii an attractive system for the expression of recombinant proteins. In this review, we focus on C. reinhardtii as a novel platform for the development of advanced recombinant products and compare them with other commonly used expression systems. We also present a comprehensive overview of its structure, life cycle, culture systems, and media in detail and then discuss the strategies for engineering its three different genomes to produce recombinant cells. Finally, algal culture collections in the world are introduced.

Keywords Algae; Cloning; Genetic Engineering; Recombinant Protein Production

CITATION LINKS

[1] Construction of ... [2] Expression in ... [3] An overview of ... [4] FDA biopharmaceutical ... [5] Production of recombinant ... [6] High level ... [7] Human calcitonin ... [8] Cloning and expression ... [9] Comparison of tobacco ... [10] Evaluation of ... [11] Large-scale biodiesel ... [12] Biomass and lipid ... [13] A bright future for ... [14] High-value ... [15] Transgene expression in ... [16] Expression of plastid ... [17] Synthetic biology ... [18] The Chlamydomonas ... [19] Chlamydomonas ... [20] The Chlamydomonas ... [21] The Chlamydomonas ... [22] Tools and techniques... [23] Transmission of mitochondrial ... [24] The microalga Chlamydomonas ... [25] Genetic engineering of ... [26] Microalgae as ... [27] Algal transgenics ... [28] Strategies for high-level ... [29] High-frequency ... [30] Expression of the arylsulfatase ... [31] Copper response element ... [32] The flanking regions ... [33] The HSP70A promoter ... [34] Transcriptional regulation ... [35] A synthetic gene coding ... [36] The bacterial phleomycin ... [37] Insertion mutagenesis of Chlamydomonas ... [38] Expression of a foreign gene ... [39] Establishment of an efficient ... [40] A Streptomyces rimosus ... [41] A eubacterial gene ... [42] An engineered Streptomyces ... [43] The CRY1 gene in ... [44] Generation of Chlamydomonas ... [45] Evaluation of three ... [46] Molecular analysis ... [47] Stable nuclear ... [48] The argininosuccinate ... [49]RHighly specific ... [50] Localization of the ... [51] Stable nuclear ... [52] Micro-algae come ... [53] Codon usage tabulated ... [54] Translation efficiency ... [55] Effect of linker length ... [56] Minimal extent of ... [57] Chloroplast DNA ... [58] Methodologies for ... [59] Sub-micron gold ... [60] A simple, low-cost ... [61] Tools for chloroplast ... [62] Chloroplast genetic ... [63] Transformation of ... [64] The ARG9 gene encodes ... [65] Transgenic expression of ... [66] Site-specific mutagenesis ... [67] Chloroplast transformation ... [68] The Klebsiella ... [69] Engineering the chloroplast ... [70] Heat-stable oral ... [71] Robust expression ... [72] Production of therapeutic ... [73] Foot-and-mouth ... [74] Enhanced chloroplast ... [75] Specific roles of ... [76] The sequence and ... [77] Heterologous expression ... [78] Production of ... [79] Genetics and ... [80] Photobioreactors for ... [81] Scale-down ... [82] The effect of ... [83] Nutritional studies ... [84] Closed photobioreactors ... [85] Photobioreactors for ... [86] Cytochrome f and ... [87] Mitotic replication ... [88] The assimilation ... [89] Metabolic control ... [90] Urate oxidase ... [91] Amide metabolism... [92] Engineering photosynthetic... [93] Growing phototrophic ... [94] Cutting edge of ... [95] The CO2 ... [96] Mixotrophic growth ....

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

ریزجلبک *کلامیدوموناس رینهارتی*: کارخانه‌ای سبز برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب

شبنم شمع‌ریز PhD
پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
حمیده افقی* PhD
پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

چکیده
با توجه به کاربرد گسترده پروتئین‌ها در زمینه‌های مختلف علمی و صنعتی و عدم امکان استخراج بهینه و مقرون‌به‌صرفه آنها از منابع طبیعی، بهترین راه چاره برای دستیابی به منبعی نامحدود از این مولکول‌های پیچیده زیستی استفاده از تکنولوژی پروتئین نوترکیب است. طی دهه‌های گذشته پیشرفت‌های حاصل در زمینه مهندسی ژنتیک و دست‌ورزی موجودات مختلف منجر به توسعه شمار زیادی از سیستم‌های بیانی برای تولید انواع مختلف پروتئین‌ها به‌صورت محلول و فعال زیستی شده است. امروزه یکی از مطرح‌ترین سیستم‌های بیان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، ریزجلبک‌ها هستند. ریزجلبک‌ها گروه بزرگی از موجودات فتوسنتزکننده میکروسکوپی هستند که در اکوسیستم‌های آبی زندگی می‌کنند. بیشتر پیشرفت‌ها در این زمینه با استفاده از *کلامیدوموناس رینهارتی* (*Chlamydomonas reinhardtii*)، ریزجلبک یوکاریوتی تک‌سلولی و فتوسنتزکننده، به‌عنوان موجود مدل حاصل شده است. در این مطالعه ابتدا سیستم‌های بیانی مختلف و مزایای سیستم *کلامیدوموناس رینهارتی* مورد بررسی قرار گرفته، سپس به شرح تفضیلی ساختار و چرخه زندگی این جلبک استراتژی‌های موجود برای مهندسی هر سه ژنوم هسته‌ای، کلروپلاستی و میتوکندریایی آن به‌منظور تولید سویه‌های نوترکیب و انواع سیستم‌ها و محیط کشت‌های مورد نیاز برای کشت آن پرداخته و در پایان مراکز کشت و نگهداری ریزجلبک‌ها، از جمله *کلامیدوموناس رینهارتی* در جهان را معرفی می‌کنیم.

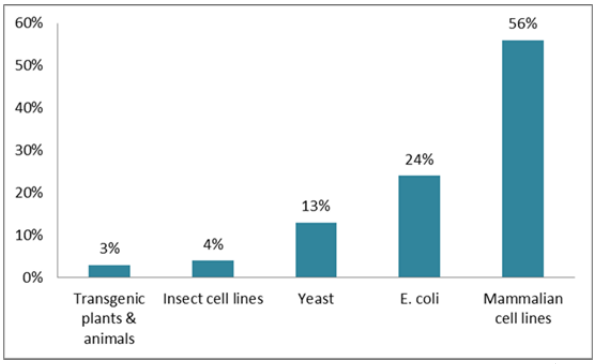
کلیدواژه‌ها: ریزجلبک، مهندسی ژنتیک، پروتئین نوترکیب، همسانه‌سازی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۸

*نویسنده مسئول: ofoghi@irost.ir

مقدمه

پروتئین‌هاکاربرد گسترده‌ای در صنعت و داروسازی دارند. در ابتدا تولید پروتئین به روش خالص‌سازی پروتئین از منابع طبیعی صورت می‌گرفت که فرآیندی سخت، گران و زمان‌بر به‌شمار می‌آمد. با اختراع همسانه‌سازی DNA توسط *استنلی کوهن* و *هربرت بویر*، مهندسی ژنتیک که امکان انتقال سریع و راحت ژن میان انواع گونه‌های زیستی را فراهم می‌سازد، پا به عرصه حیات گذاشت[1]. این کشف منجر به توسعه و تولید انواعی از پروتئین‌های نوترکیب با کاربردهای صنعتی و درمانی شد. اولین داروی مورد تایید FDA که با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب تولید شد، انسولین انسانی بود که توسط *الی لیلی* در ۱۹۸۲ تولید شد و توسعه یافت[2]. با ورود به هزاره سوم تقاضای جهانی برای پروتئین‌های نوترکیب به‌شدت افزایش یافت. پیدایش درمان‌های جدید براساس پروتئین‌های نوترکیب انسانی و افزایش نیاز به پروتئین‌هایی با کاربرد تشخیصی و صنعتی، نیروی اصلی پیش‌برنده در توسعه میزبان‌های بیانی جدید، ایمن و مقرون‌به‌صرفه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب بود. پروتئین‌های زیستی نسبت به انواع شیمیایی از مزایای بسیاری برخوردارند، زیرا اختصاصی‌تر عمل کرده و تاثیر بیشتری بر سلول‌ها و بافت‌های هدف دارند که این امر منجر به کاهش اثرات سوء دارو و در مقابل بهبود روند درمان می‌شود. البته این اثرات زمانی دیده می‌شود که پروتئین‌ها پایدار بوده و در شکل عملکردی و فعال زیستی خود باشند. پیشرفت‌های اخیر در تکنولوژی DNA نوترکیب منجر به توسعه شمار زیادی از سیستم‌های بیانی بر پایه انواع سلول‌های زنده و موجودات شده است. اولین مرحله در تولید پروتئین نوترکیب، همسانه‌سازی DNA هدف، سپس بیان و تولید پروتئین در سیستم بیانی منتخب است. انواع مختلف سیستم‌های بیانی شامل باکتری‌ها، مخمرها، کپک‌ها، سلول‌های پستانداران و حشرات، گیاهان، جلبک‌ها و حیوانات ترانسژنیک است. درصد استفاده از هر کدام از این سیستم‌های بیانی مختلف در تولید مواد دارویی زیستی در نمودار ۱ نشان داده شده است[3, 4]. کیفیت پروتئین، عملکرد، سرعت تولید و میزان محصول از مهم‌ترین فاکتورهایی هستند که در هنگام انتخاب سیستم بیانی مناسب برای تولید پروتئین نوترکیب باید مد نظر قرار گیرند. ویژگی‌های انواع سیستم‌های بیانی در جدول ۱ مقایسه شده است[5]. همان‌طور که دیده می‌شود هر سیستم بیانی مزایا و معایب خاص خود را دارد (نمودار ۱؛ جدول ۱).



نمودار ۱) درصد استفاده از هرکدام از سیستم‌های بیانی مختلف در تولید مواد دارویی زیستی[3, 4]

جدول ۱) مقایسه انواع سیستم‌های بیانی[5]

ویژگی‌ها	باکتری	مخمر	سلول پستانداران	حیوانات ترانسژنیک	گیاهان ترانسژنیک
مدت‌زمان تولید	کوتاه	متوسط	طولانی	طولانی	طولانی
هزینه تولید	متوسط	متوسط	زیاد	زیاد	کم
هزینه افزایش مقیاس	زیاد	زیاد	زیاد	زیاد	کم
هزینه نگهداری	ارزان	ارزان	گران	گران	ارزان
دمای نگهداری محصول	-۲۰°C	-۲۰°C	نیتروژن مایع	نیتروژن مایع	دمای اتاق
تکثیر	آسان	آسان	سخت	امکان‌پذیر	آسان
قندگذاری	ندارد	نادرست	درست	درست	گاهی انجام می‌شود
تغییرات پس از ترجمه	خیر	تا حدودی	بله	بله	بله
تولید پروتئین‌های چندزیرواحدی	خیر	خیر	خیر	بله	بله
میزان محصول	متوسط	زیاد	متوسط/ زیاد	زیاد	زیاد
احتمال خطر (آلودگی با پاتوژن‌های انسانی)	بله	نامعلوم	بله	بله	نامعلوم
مسایل اخلاقی	کم	متوسط	متوسط	زیاد	متوسط
سطح ایمنی	پایین	نامعلوم	متوسط	بالا	بالا

با توجه به مزایای گسترده گیاهان نسبت به سایر سیستم‌های بیانی، طی چند دهه گذشته برای تولید پروتئین‌ها و سایر

www.SID.ir

Archive of SID

محصولات نوترکیب استفاده گسترده‌ای از آنها شده است[6-9]. با این وجود این سیستم نیز معایب و محدودیت‌های خاص خود را دارد که از جمله آنها می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود: رشد اکثر گیاهان کند است، احتمال شارش ژن بین محصولات گیاهی وجود دارد، فرآیندهای پایین‌دستی پردازشگران بوده و منجر به کاهش کیفیت و میزان محصول نوترکیب می‌شود. ریزجلبک‌ها جایگزین مناسب سیستم‌های گیاهی در زمینه تولید محصولات نوترکیب هستند[10]. از دیرباز ریزجلبک‌ها، به‌عنوان منبعی برای استخراج مواد طبیعی موثر و باارزش، مورد توجه بسیاری از صنایع بوده‌اند[11, 12]. طی دهه‌های اخیر استفاده از ریزجلبک‌ها به‌عنوان میزبانی مقرون‌به‌صرفه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد بحث و بررسی بسیاری قرار گرفته است. به‌دلیل چرخه زندگی ساده، ژنوم شناخته‌شده و کشت آسان *کلامیدوموناس رینهاردتی* (*Chlamydomonas reinhardtii*) بیشتر پیشرفت‌ها در این زمینه، روی این ریزجلبک انجام شده است. مزایای اصلی *کلامیدوموناس رینهاردتی* به‌عنوان سیستم بیانی شامل موارد زیر است[13-15]:

۱) فرآیند انتقال ژن هدف ساده بوده و سویه‌های نوترکیب در مدت کوتاهی حدود ۴ تا ۶ هفته تولید می‌شوند.

۲) سرعت رشد، تقسیم و تکثیر بالا بوده و دستیابی به یک تراکم سلولی بالا در نور و هوادهی مناسب در مدت‌زمان کوتاهی میسر می‌شود.

۳) کشت این جلبک‌ها به نسبت ساده بوده نیازهای غذایی آنها محدود است. بنابراین افزایش مقیاس کار آسان و مقرون‌به‌صرفه است. علاوه بر این امکان کشت آن به سه صورت فتوتروفیک، هتروتروفیک و میکسوتروفیک وجود دارد.

۴) توانایی اعمال بسیاری از تغییرات پس از ترجمه را دارد.

۵) هر سه ژنوم هسته‌ای، کلروپلاستی و میتوکندریایی آن به‌خوبی شناخته شده و امکان مهندسی هر سه ژنوم به‌منظور تولید سلول‌های نوترکیب میسر است.

۶) پروموترها، UTRها و نشانگرهای شناخته‌شده‌ای برای بیان ژن هدف وجود دارند؛ هر چند مطالعات به‌منظور یافتن قدرتمندترین پروموترها هنوز ادامه دارد.

۷) از موجودات ایمن محسوب می‌شود. این ویژگی مزیت بسیار مهمی بوده زیرا امکان استفاده از کل سلول نوترکیب را به‌عنوان ماده غذایی، دارو یا واکسن خوراکی میسر می‌سازد.

۸) احتمال آلودگی آن با پاتوژن‌های انسانی وجود ندارد.

۹) احتمال شارش ژن بین گیاهان، خصوصاً زمانی که در فتوبیوراکتورها و سیستم‌های بسته کشت داده شود، وجود ندارد.

ریزجلبک سبز *کلامیدوموناس رینهاردتی*

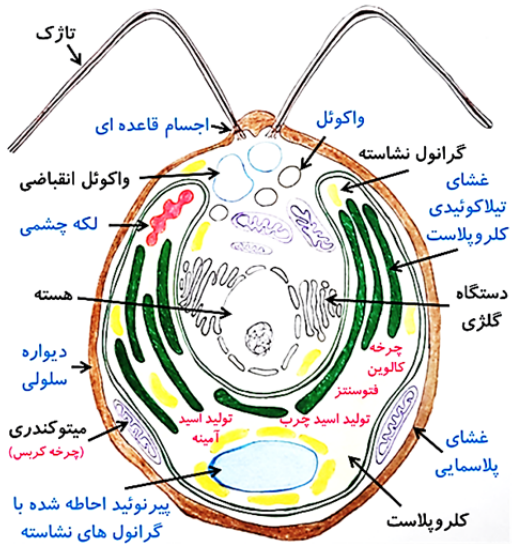
طی دهه‌های گذشته ریزجلبک سبز *کلامیدوموناس رینهاردتی* مورد مطالعه و بررسی بسیاری قرار گرفته است. مطالعه *این جلبک* به درک تکامل سلول‌ها، تشکیل ساختارها و اندامک‌های سلولی مانند تاژک، کلروپلاست و میتوکندری و بسیاری از فعالیت‌های سلولی در یوکاریوت‌ها مانند حرکت و رشد سلولی، تولیدمثل، فتوسنتز و تنفس سلولی و نیز شناخت ژنتیک سلول کمک شایانی کرده است. علاوه بر این، طی دهه‌های گذشته پتانسیل *کلامیدوموناس رینهاردتی* در زمینه تولید سوخت و انرژی مانند هیدروژن و متان زیستی و بیان نوترکیب آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، واکسن‌ها و سایر محصولات نوترکیب مورد توجه و مطالعه بسیاری قرار گرفته است. از نظر رده‌بندی، این ریزجلبک متعلق به یوکاریوت‌ها بوده اما مشابه سایر جلبک‌های سبز و گیاهان دارای پلاستیدی با منشا پروکاریوتی است. ریبوزوم‌ها و RNAپلیمراز موجود در کلروپلاست مشابه انواع باکتریایی بوده و اکثر ژن‌ها مشابه اپران‌های باکتریایی به‌صورت واحدهای پلی‌سیسترونی سازمان یافته‌اند[16, 17]. رده‌بندی *کلامیدوموناس رینهاردتی* (http://www.MetaMicrobe.com) در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲) رده‌بندی *کلامیدوموناس رینهاردتی*

فرمانرو (سلسله)	گیاهان
زیرفرمانرو (زیرسلسله)	گیاهان سبز
Infrakingdom	کلروفیتا- جلبک سبز
دسته	کلروفیتا- جلبک سبز- algues vertes
زیردسته	Chlorophytina
رده	Chlorophyceae
راسته	کلامیدومونادالس
خانواده	کلامیدوموناسه
جنس	کلامیدوموناس
گونه	*کلامیدوموناس رینهاردتی*

ریخت‌شناسی *کلامیدوموناس رینهاردتی*

کلامیدوموناس رینهاردتی موجود تک‌سلولی بیضی‌شکلی است که ۱۰ تا ۲۰میکرومتر طول داشته، دارای چند میتوکندری، دو تاژک قدامی برای حرکت و جفت‌گیری، یک پیرنوئید بزرگ برای تثبیت CO_2، یک لکه چشمی حساس به نور برای جهت‌یابی در هنگام شنا و یک کلروپلاست دارای دستگاه فتوسنتز و محلی برای انجام مسیرهای متابولیکی مهم، است. تک کلروپلاست *کلامیدوموناس رینهاردتی* هسته را احاطه کرده و حدود ۴۰ تا ۶۰% حجم سلول را اشغال می‌کند[18]. دیواره سلولی این جلبک اساساً متشکل از گلیکوپروتئین‌های غنی از هیدروکسی‌پرولین بوده و هیچ سلولزی در ساختار آن وجود ندارد[19] (شکل ۱).



شکل ۱) ساختار سلولی *کلامیدوموناس رینهاردتی*

ژنوم *کلامیدوموناس رینهاردتی*

کلامیدوموناس رینهاردتی دارای سه ژنوم هسته‌ای، کلروپلاستی و میتوکندریایی است. ژنوم هسته‌ای بزرگ‌ترین ژنوم است. این ژنوم حدود ۱۰۰ تا ۱۱۰میلیون جفت‌باز و ۱۵۰۰۰ ژن داشته، متشکل از ۱۷ کروموزوم بوده و غنی از GC (۶۵%) است. وراثت ژن‌های هسته از

www.SID.ir

Archive of SID

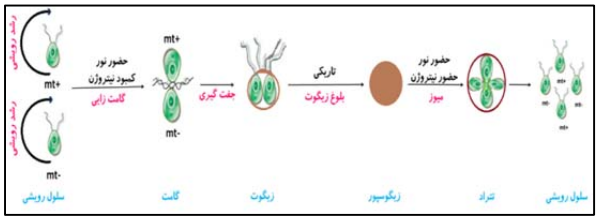
طریق کراس‌های مندلی بین گامت مادری و پدری صورت می‌گیرد. تعیین توالی ژنوم *کلامیدوموناس رینهاردتی* در سال ۲۰۰۷ کامل شد[19, 20].

کلروپلاست ژنوم خاص خود را داشته که پلاستوم نامیده می‌شود. پلاستوم DNA حلقوی متشکل از حدود ۲۰۰کیلوجفت‌باز و ۹۹ ژن است، غنی از AT (۶۶%) بوده و تنها از گامت مادر به ارث می‌رسد. ۲۰% توالی پلاستوم را DNA تکراری تشکیل می‌دهد[21]. کلروپلاست *کلامیدوموناس رینهاردتی* حالت پلی‌پلوئیدی داشته و حدود ۵۰ تا ۸۰ کپی یکسان از پلاستوم در آن دیده می‌شود[22].

ژنوم میتوکندریایی کوچک و خطی بوده و حدود ۱۶جفت‌باز و ۱۲ ژن دارد. ژنوم میتوکندری از گامت پدری به ارث می‌رسد[23].

چرخه زندگی *کلامیدوموناس رینهاردتی*

کلامیدوموناس رینهاردتی هاپلوئید بوده و به‌صورت دو نوع جفت متمایز از نظر ژنتیکی (mt+) و (mt-) وجود دارد. این دو نوع سلول به‌صورت غیرجنسی از طریق تقسیم دوتایی تکثیر یافته و در زمان نیاز چرخه جنسی را طی می‌کنند. کمبود نیتروژن منجر به جفت‌گیری گامت‌های مخالف شده و سلول دیپلوئید (زیگوسپور) تشکیل می‌شود. زیگوسپور دیواره خارجی بسیار محکمی داشته که از آن در مقابل شرایط نامساعد محیطی محافظت می‌کند. زمانی که سطح نیتروژن به حالت عادی برگردد، تقسیم جنسی یا میوز انجام شده و چهار سلول هاپلوئید (دو تا از هر جفت) ایجاد می‌شود (شکل ۲) [19].



شکل ۲) چرخه زندگی *کلامیدوموناس رینهاردتی*؛ mt مخفف واژه mate است.

مهندسی ژنتیک *کلامیدوموناس رینهاردتی*

کلامیدوموناس رینهاردتی موجودی مدل برای انجام مطالعات جامع در زمینه مهندسی ژنتیک و نیز میزبان بیانی برای بیان ژن‌های هدف خارجی در ریزجلبک‌ها است. طی سال‌های گذشته، تحقیقات گسترده‌ای روی این جلبک انجام شده و روش‌های موثر و قدرتمندی برای مهندسی ژنتیکی هر سه ژنوم هسته‌ای، کلروپلاستی و میتوکندریایی آن ابداع شده است. با وجود پیشرفت و موفقیت‌های حاصل، مهندسی ژنوم میتوکندری به‌منظور تولید محصولات نوترکیب رایج نیست. در جدول ۳ مزایا و معایب مهندسی ژنوم هسته‌ای و کلروپلاستی به‌منظور تولید سلول‌های نوترکیب با یکدیگر مقایسه شده‌اند.

انتقال ژن هدف به ژنوم هسته‌ای

روش انتقال: طی دو دهه گذشته، انتقال ژن هدف به ژنوم هسته‌ای *کلامیدوموناس رینهاردتی* به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته و روش‌های مختلفی شامل بمباران ریزذره‌ای (بیولیستیک)، ورتکس در حضور DNA پلاسمیدی و ذرات شیشه‌ای، هم‌زدن در حضور DNA و silicon carbide whiskers، الکتروپوریشن و آلودگی با آگروباکتریوم برای انتقال ژن هدف به داخل سلول توسعه یافته‌اند[26-28]. از میان تمام این روش‌ها، ورتکس جلبک و DNA در حضور ذرات شیشه‌ای به‌دلیل عدم نیاز به تجهیزات خاص و هزینه کم روش ارجح و مقدم است. در این فرآیند عمل سایشی ذرات شیشه باعث ایجاد منافذ موقتی در دیواره و غشای سلول گشته که از طریق آنها DNA هدف وارد سلول می‌شود. کارآیی این روش زمانی افزایش می‌یابد که از جهش‌یافته‌های فاقد دیواره سلولی یا دارای نقص در دیواره استفاده شود زیرا نبود دیواره ورود DNA را تسهیل می‌کند[29]. یک مشکل اصلی در انتقال DNA به ژنوم هسته‌ای نبود امکان نوترکیبی همولوگ بوده که منجر به ورود ژن هدف به‌صورت تصادفی در داخل ژنوم می‌شود. در نتیجه غربالگری جهش‌یافته‌های حاصل به‌منظور جداسازی انواعی با بیشترین میزان بیان پروتئین هدف کاری بس دشوار و زمان‌بر خواهد بود.

پروموترها و مارکرهای مورد استفاده

فاکتورهای مختلفی بر بیان ژن‌های هسته‌ای تاثیرگذار هستند که از آنها می‌توان در بیان ژن هدف استفاده کرد[30]. بر این اساس پروموترها و نشانگرهای مختلفی به‌منظور بیان موثر ژن هدف توسعه یافته‌اند که در جدول‌های ۴ و ۵، به‌ترتیب، ذکر شده‌اند.

جدول ۳) مقایسه مزایا و معایب مهندسی ژنوم هسته‌ای و کلروپلاستی *کلامیدوموناس رینهاردتی*

مهندسی ژنتیک *کلامیدوموناس رینهاردتی*	مزایا	محدودیت‌ها
ژنوم هسته‌ای[15,24]	- اعمال تغییرات پس از ترجمه - قندگذاری	- ورود ژن هدف به ژنوم به‌صورت تصادفی انجام شده که منجر به اعمال اثرات اپی‌ژنیک و خاموشی ژن می‌شود. - ساختار ژنوم فشرده بوده و مهندسی آن را دشوار می‌سازد. - میزان محصول نوترکیب کم است.
ژنوم کلروپلاستی[1, 15,25]	- ژن به‌صورت هدفمند از طریق نوترکیبی همولوگ وارد ناحیه خاصی از ژنوم کلروپلاست می‌شود. - خاموشی ژن وجود ندارد. - امکان بیان چندین ژن به طور همزمان به صورت اپران وجود دارد. - انتقال ژن هدف و مهندسی ژنتیک پلاستوم ساده‌تر بوده و از آنجایی که هر سلول *کلامیدوموناس رینهاردتی* فقط یک کلروپلاست دارد دستیابی به سویه‌های هموپلاسم و بیان یکنواخت آسان است. - بیان قدرتمند بوده و میزان محصول نوترکیب بالا است. - کلروپلاست دارای چپرون‌ها و دی‌سولفید ایزومرازهایی است که به تاخوردگی صحیح پروتئین‌های پیچیده کمک می‌کند. - کلروپلاست به‌عنوان اتاقکی از محصول نوترکیب در برابر پروتئازهای سلولی محافظت می‌کند.	- قندگذاری انجام نمی‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴) پروموترهای هسته‌ای مورد استفاده‌ای در بیان ژن هدف در *کلامیدوموناس رینهاردتی*

پروموتر	منبع	توضیحات	مرجع
cyc6	*کلامیدوموناس رینهاردتی*	سیتوکروم c6	[31]
psaD	*کلامیدوموناس رینهاردتی*	پروتئین کمپلکس فتوسیستم I	[32]
hsp70A	*کلامیدوموناس رینهاردتی*	پروتئین شوک حرارتی 70A	[33]
nia1	*کلامیدوموناس رینهاردتی*	نیترات‌ردوکتاز	[34]
cop	*کلامیدوموناس رینهاردتی*	Chlamyopsin	[35]
rbcs2	*کلامیدوموناس رینهاردتی*	Small subunit of ribulosebisphosphat carboxylase	[36]
CaMV 35S	*Cauliflower mosaic virus*	Cauliflower mosaic virus 35S	[37]
Nos	*کلامیدوموناس رینهاردتی*	نوپالین‌سنتاز	[38]
Nos	*آگروباکتریوم تومه‌فشنس (Agrobacterium tumefaciens)*	Nopaline synthase from*Agrobacterium tumefaciens*	[38]
β-2-tub	*کلامیدوموناس رینهاردتی*	بتا-۲-توبولین	[30]

جدول ۵) نشانگرهای مورد استفاده در انتقال ژن هدف به ژنوم هسته‌ای *کلامیدوموناس رینهاردتی*

ژن نشانگر	محصول ژن	اساس گزینش	مرجع
Ble	پروتئین اتصالی فلئومایسین	مقاومت به زئوسین/فلئومایسین	[36, 39]
aphVIII	آمینوگلیکوزید ۳′- فسفوترانسفراز	مقاومت به پاروموماسین	[40]
aadA	آمینوگلیکوزید ۳′- آدنیلیل‌ترانسفراز	مقاومت به اسپکتینومایسین/استرپتومایسین	[41]
aph7	آمینوگلیکوزید فسفوترانسفراز	مقاومت به هیگرومایسین	[42]
CRY1-1	پروتئین ریبوزومی سیتوسولیک S14	مقاومت امتین	[43, 44]
GAT	گلی‌فسفات آمینوترانسفراز	مقاومت به گلی‌فسفات	[45]
ALS	استولاکتات سنتاز	مقاومت به متیل‌سولفومتورون	[46]
NIT1	نیترات‌ردوکتاز	رشد در حضور نمک نیترات	[47]
ARG7	آرجینیوسوکسینات‌لیاز	رشد در عدم حضور آرژینین	[48, 49]
NIC7	کوئینولینات‌سنتار	رشد در عدم حضور نیکوتینامید	[50]
OEE1	Oxygen-evolving enhancer protein1	رشد فتواتوتروفیک	[51]

نقش اینترون

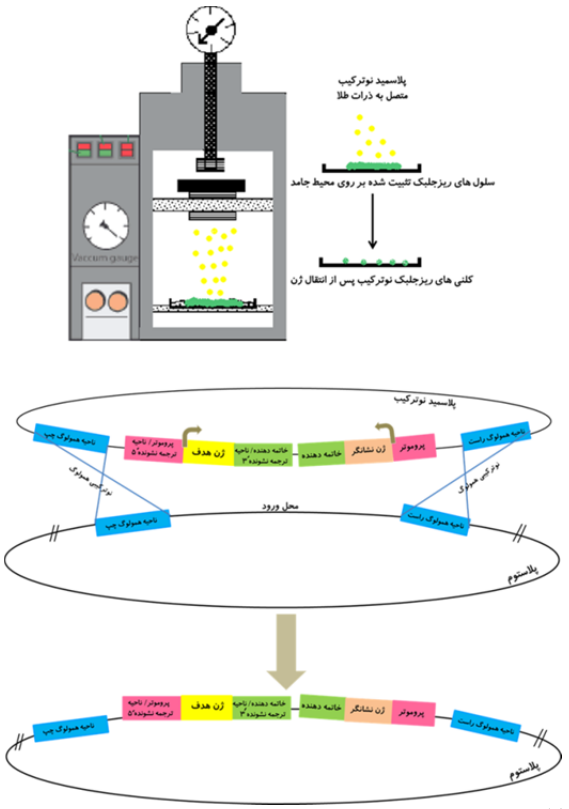
بررسی‌ها نشان داده‌اند که حضور اینترون‌ها برای بیان موثر و فعال اکثر ژن‌های هسته‌ای در *کلامیدوموناس رینهاردتی* ضروری است. اگرچه ژن هدف نباید دارای اینترون‌های خودی باشد زیرا حذف صحیح این اینترون‌ها طی فرآیند پیرایش امکان‌پذیر نیست. بنابراین ترکیبی از ژن هدف به همراه اینترون‌های همولوگ طراحی ایده‌آلی به‌منظور بیان موثر هسته‌ای است[52].

بهینه‌سازی کدون‌های ژن هدف

معمولاً فراوانی کدون‌های ژن هدف و میزبان بیانی با یکدیگر متفاوت هستند. نبود tRNAهای سازگار با کدون‌های مورد استفاده در ژن هدف منجر به قرارگیری اسیدهای آمینه اشتباه در رشته و ترجمه ناقص و کوتاه‌شدن زنجیره پلی‌پپتیدی می‌شود. یک روش موثر برای کاهش یا حذف این مشکل بهینه‌سازی ژن هدف بوده که در آن کدون‌های نادر ژن هدف با کدون‌های غالب میزبان بیانی عوض می‌شوند. بهینه‌سازی کدون‌های ژن هدف براساس فراوانی کدون‌های ژنوم هسته‌ای یک روش موثر در افزایش میزان بیان است. ژنوم هسته‌ای غنی از GC بوده و تقریباً در ۸۵% موارد نوکلئوتید سوم کدون G یا C است[53]. بهینه‌سازی ژن بر خاموشی ژن در مرحله نسخه‌برداری و تغییرات پس از نسخه‌برداری نیز بسیار موثر است[54].

انتقال ژن هدف به کلروپلاست *کلامیدوموناس رینهاردتی*

از آنجایی که *کلامیدوموناس رینهاردتی* از معدود موجوداتی است که انتقال کلروپلاستی در آن به‌خوبی مطالعه و بررسی شده است، به‌عنوان موجود مدل برای مطالعات مولکولی و ژنتیکی ژنوم کلروپلاستی انتخاب شده است. علاوه بر این، کلروپلاست محل انجام بسیاری از مسیرهای بیوسنتزی مهم بوده و جایی است که پروتئین‌های محلول و پروتئین‌های غشایی در آن ذخیره می‌شوند. بنابراین این اندامک محل مناسبی برای سنتز و تجمع محصولات نوترکیب ارزشمند است[22, 26, 55]. برخلاف انتقال هسته‌ای، ورود ژن هدف به پلاستوم از طریق نوترکیبی همولوگ بوده و انتقال به‌صورت دقیق به محل خاصی درون پلاستوم انجام می‌شود (شکل ۳). به‌منظور انجام نوترکیبی و انتقال پایدار ژن، DNA هدف باید دارای توالی‌های همولوگ با پلاستوم به‌صورت دنباله در دو طرف خود باشد. به‌طور معمول این توالی‌ها حدود یک‌کیلوجفت‌باز در هر سمت ژن هدف هستند[56]. با این وجود با توالی‌های کوتاه‌تر نیز انتقال موثر صورت گرفته است. پلاستوم تنها از مادر (mt+) به ارث رسیده و پلاستوم پدر (mt-) طی فرآیند جفت‌گیری از بین می‌رود[18, 57]. علاوه بر این، گروه‌های ژنی می‌توانند به‌صورت اپران وارد پلاستوم شده و هیچ اثر خاموشی ژنی بر آنها اعمال نمی‌شود[17]. مزایای کلروپلاست به‌طور کامل در جدول ۳ شرح داده شده است (شکل ۳).



شکل ۳) انتقال ژن هدف به کلروپلاست *کلامیدوموناس رینهاردتی*

روش‌های انتقال ژن به کلروپلاست *کلامیدوموناس رینهاردتی*

رایج‌ترین روش برای انتقال ژن هدف به کلروپلاست *کلامیدوموناس رینهاردتی* مباران ریزذره‌ای بوده که در اکثر موارد از دستگاه PDS-

www.SID.ir

Archive of SID

1000/He برای انجام این انتقال استفاده می‌شود. قبل از بمباران، سلول‌های *کلامیدوموناس رینهاردتی* باید روی محیط کشت جامد پخش و ثابت شوند. دستگاه بمباران با استفاده از فشار بالای هلیوم DNA ثبیت‌شده روی ذرات طلا یا تنگستن را به سمت سلول‌های ثابت‌شده *کلامیدوموناس رینهاردتی* که در فشار ساب‌اتمسفری قرار دارند، شلیک می‌کند. از این تکنیک برای سویه‌های دارای دیواره نیز می‌توان استفاده کرد[58, 59].

فاکتورهای مختلفی شامل نوع، اندازه، سرعت ذرات، فاصله تا سلول‌های تثبیت‌شده، تعداد سلول‌های هدف بمباران، خطی یا حلقوی‌بودن پلاسمید نوترکیب و غلظت DNA هدف همگی در بهبود و افزایش کارآیی انتقال ژن با استفاده از این تکنیک نقش دارند. ذرات طلا از نظر شکل و اندازه یک‌دست و یکنواخت هستند و با سایر مواد واکنش شیمیایی نمی‌دهند. حداکثر انتقال پایدار زمانی حاصل می‌شود که ریزترین ذرات طلا مورد استفاده قرار گیرند، احتمالاً به این دلیل که سلول دچار آسیب کمتری شده و سریع‌تر بهبود می‌یابد. در مقابل ذرات تنگستن از نظر شکل و اندازه نامنظم و ناهمگن بوده، گاهی برای سلول سمی هستند و می‌توانند DNA هدف متصل به خود را مرور زمان تجزیه کنند. مزیت ذرات تنگستن به طلا ارزان‌تر بودن آنها است[58, 59].

با وجود کارآیی بالای این روش، قیمت بالای دستگاه بمباران و مواد مورد استفاده باعث شد تا روش‌های ساده‌تر و مقرون‌به‌صرفه‌تری پیشنهاد شوند. روش جایگزین بمباران ریزذره‌ای، هم‌زدن سوسپانسیونی از سلول‌های فاقد دیواره (پروتوپلاست) یا دارای نقص در دیواره، DNA و ذرات شیشه‌ای با استفاده از ورتکس است. به نظر می‌رسد در اثر عمل فرسایشی ذرات شیشه‌ای منافذی روی سلول و غشای کلروپلاست ایجاد می‌شوند که موجب ورود مستقیم DNA به کلروپلاست می‌شوند. در این روش دیواره سلولی به‌عنوان سد فیزیکی عمل کرده و مانع ورود DNA می‌شود. دیواره سلولی را می‌توان از طریق جهش یا هضم آنزیمی با استفاده از اتولیزین (آنزیمی که طی فرآیند جفت‌گیری فعال است) از بین برد[60].همان‌طور که گفته شد کلروپلاست *کلامیدوموناس رینهاردتی* دارای ۸۰ کپی از پلاستوم است و برای دستیابی به سویه‌های هموپلاسم تمام این ۸۰ کپی باید نوترکیب شوند.

نشانگر انتخاب

به‌طور معمول گزینش سویه‌های ترانسفورم‌شده با استفاده از ژن‌های باکتریایی که موجب ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیکی خاص می‌شوند، صورت می‌گیرد[61, 62]. به‌دلیل مسایل و نگرانی‌های زیستی و ایمنی و امکان انتقال ژن به جنس‌های باکتریایی استفاده از چنین نشانگرهای آنتی‌بیوتیکی در محصولات تجاری نامطلوب است. به همین دلیل تلاش شده است تا روش‌ها و استراتژی‌هایی جایگزین شوند که با محیط زیست و طبیعت سازگار باشند از جمله ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌واسطه جهش نقطه‌ای در ژن‌های کلروپلاستی[63]، احیای قدرت فتوسنتزی با استفاده از ژن‌های فتوسنتزی که باعث تبدیل جهش‌یافته‌های غیرفتوسنتزی به انواع فتوتروف می‌شوند[61] و نشانگرهای متابولیکی که باعث احیای جهش‌یافته‌های اگزوتروف به انواع پروتوتروف می‌شوند[64]. برای مثال استیل‌اورنیتین‌آمینوترانسفراز (ARG9) یک آنزیم ضروری در مسیر متابولیکی آرژنین است که در هسته *کلامیدوموناس رینهاردتی* کد شده و سپس به کلروپلاست منتقل می‌شود. جهش‌یافته‌های ARG9 اگزوتروف بوده و تنها قادر به رشد در حضور آرژنین هستند. ژن *ARG9* آرابیدوبسیس تالیانا مشابه پلاستوم *کلامیدوموناس رینهاردتی* غنی از A/T بوده و بیان آن در کلروپلاست جهش‌یافته‌های ARG9 منجر به بازیابی سنتز آرژنین و احیا جهش‌یافته‌های اگزوتروف به انواع پروتوتروف می‌شود[53, 64]. نشانگرهای انتخاب برای انتقال ژن هدف به کلروپلاست *کلامیدوموناس رینهاردتی* در جدول ۶ ذکر شده‌اند.

جدول ۶) نشانگرهای مورد استفاده در انتقال ژن هدف به پلاستوم *کلامیدوموناس رینهاردتی*

ژن مارکر	محصول ژن	اساس گزینش	مرجع
aadA	آمینوگلیکوزید ۳´-آدنیلیل‌ترانسفراز	مقاومت به اسپکتینومایسین و استرپتومایسین	[65]
aphA6	آمینوگلیکوزید ۳´ ترانسفراز	مقاومت به کانامایسین	[61]
rrnS&rrnL point mutation	16S and 23S	مقاومت به اسپکتینومایسین، استرپتومایسین و اریترومایسین	[59]
psbA mutant	پروتئین D1 فتوسیستم II	رشد فتواتوتروفیک	[66]
atpB	β subunitofATP synthase	احیای قدرت فتوسنتز	[67]
nifH	بتا-گلوکورونیداز	احیای قدرت فتوسنتز	[68]
psbA	پروتئین D1 فتوسیستم II	احیای قدرت فتوسنتز	[46]
tscA	Small RNA that participatesin trans-splicing of the psaA transcript	احیای قدرت فتوسنتز	[69]
arg9	استیل‌اورنیتین آمینوترانسفراز	احیای قدرت سنتز آرژنین در سویه‌های جهش‌یافته اگزوتروف	[64]

پروموتر، نواحی ´۳ و ´۵ ترجمه‌نشونده (3′ & 5′ UTRs)

بیشترین میزان بیان ژن هدف در کلروپلاست زمانی حاصل می‌شود که از پروموترها و UTRهای اندوژن مربوط به ژن‌هایی با بیشترین میزان بیان مانند زیرواحد بزرگ ریبولوزبیس‌فسفات‌کربوکسیلاز[70]، پروتئین‌های D1 و D2 فتوسیستم II (به‌ترتیب psbD و psbA) [71, 72] و زیرواحد آلفا-آدنوزین‌تری فسفاتاز (atpA) [73] استفاده شود. اگرچه مطالعات برای یافتن پروموترها و UTRهای قدرتمند هنوز در حال انجام بوده و ادامه دارد اما تا به اکنون، براساس غلظت پروتئین نوترکیب، بهترین نتایج با عناصر تنظیمی psbA خصوصاً در سویه‌های دارای نقص در psbA [72] و نیز psaA/5′UTR به دست آمده است[74]. علاوه بر این سیستم‌های بیانی قابل تنظیم به‌منظور کنترل بیان ژن هدف در کلروپلاست نیز مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند. این سیستم‌ها خصوصاً زمانی حائز اهمیت هستند که محصول ژن هدف برای سلول سمی بوده یا باعث تداخل در رشد سلول شود. اطلاعات به‌دست‌آمده از مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پایداری mRNA و تجمع آن از طریق پروموتر و 5′UTR تعیین می‌شود. مطالعات انجام‌شده نشان‌دهنده حضور نواحی خاص درون 5′UTR هستند که بر پایداری mRNA تاثیرگذار بوده و می‌توان از آنها برای افزایش بیان ژن هدف استفاده کرد. علاوه بر این، ساختارهای ثانویه ایجادشده در 5′UTR مربوط به mRNAهای پلاستیدی عناصر کلیدی برای تنظیم در سطح ترجمه هستند[75]. در مقابل، 3′UTR به نسبت تاثیر کمی بر میزان بیان ژن هدف دارد، هر چند برخی مطالعات نشان داده‌اند که توالی و ساختار 3′UTRها نقش مهمی در تنظیم طویل‌سازی، خاتمه پایداری و تجمع mRNA دارند. پروموترهای کلروپلاستی در جدول ۷ ذکر شده‌اند[76].

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۷) پروموترهای مورد استفاده‌ای در بیان ژن هدف در کلروپلاست *کلامیدوموناس رینهاردتی*

پرومو تر	منبع	توضیحات	مرجع
rbcL	*کلامیدوموناس رینهاردتی*	Large subunit of ribulosebisphosphate carboxylase	[70]
psbA	*کلامیدوموناس رینهاردتی*	D1 photosystem II reaction center protein	[72]
psbD	*کلامیدوموناس رینهاردتی*	D2 photosystem II reaction center protein	[71]
atpA	*کلامیدوموناس رینهاردتی*	زیرواحد آلفا ATPآز	[73]

بهینه‌سازی کدون

درصد GC پلاستوم نسبت به ژنوم هسته‌ای بسیار کمتر و حدود ۳۳% است و در ۸۰% موارد کدون‌های دارای نوکلئوتید A/T در جایگاه سوم نسبت به انواع دارای G/C غالب‌تر هستند. بنابراین به‌منظور افزایش میزان بیان، باید ژن هدف براساس کدون‌های غالب پلاستوم بهینه‌سازی و مجدد سنتز شود[53, 77, 78].

انتقال ژن هدف به میتوکندری *کلامیدوموناس رینهاردتی*

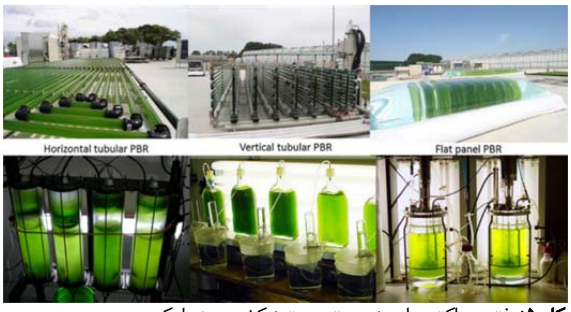
ورود ژن هدف به میتوکندری مشابه کلروپلاست بوده و DNA از طریق نوترکیبی همولوگ وارد ژنوم می‌شود[79]. به‌منظور افزایش بیان ژن، بهینه‌سازی کدون نیز باید انجام شود. ژنوم میتوکندری ۴۷/۵% GC داشته و در ۵۱/۳۵% موارد در جایگاه سوم کدون، نوکلئوتید G یا C قرار دارد[53]. انتقال ژن هدف به میتوکندری اولین‌بار با استفاده از بمباران ذره‌ای و احیای عملکردی تنفسی جهش‌یافته‌های دارای نقص در ژن *cob* میتوکندری که کدکننده سیتوکروم b است، انجام شد[79]. به‌دلیل تعداد بیشتر میتوکندری‌ها در هر سلول ظاهرشدن کلنی‌های نوترکیب روی محیط انتخابی نسبت به انتقال کلروپلاستی، زمان‌برتر است. مطالعات زیادی روی انتقال ژن هدف به میتوکندری انجام شده‌اند اما هنوز انتقال میتوکندریایی یک فرآیند رایج نیست.

سیستم‌های کشت ریزجلبک

بسته به نیاز سویه و محصول هدف، سیستم مورد استفاده برای کشت و شرایط رشد متفاوت است. ریزجلبک‌ها در سیستم‌های باز و بسته قابل کشت هستند. در هر دو سیستم، کشت ریزجلبک به روش کشت پیوسته بوده که در آن محیط کشت جدید پیوسته وارد سیستم شده و محیط کشت مصرف‌شده با سرعت ثابت خارج می‌شود. سیستم‌های باز عموماً به‌صورت استخرهای باز کم‌عمق هستند[80]. سیستم باز از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه بوده، ساخت آن آسان و تمیزکردن آن راحت‌تر است. این سیستم برای کشت در حجم بالا و تولید میزان زیادی توده زیستی (بیومس) مناسب است. مشکل این سیستم ضعیف‌بودن کنترل شرایط از جمله دما و میزان نور، بهره‌وری پایین، پخش CO_2 در محیط و عدم استفاده بهینه از آن، نیاز به منطقه‌ای وسیع برای ساخت سیستم، مخلوط‌کردن و هوادهی نامناسب، احتمال آلودگی بالا و تبخیر سریع آب است. در شکل ۴ سه نوع از این سیستم‌های باز نشان داده شده‌است.

سیستم‌های بسته عموماً فتوبیوراکتورها هستند. مزیت اصلی این سیستم کنترل بهتر پارامترهای کشت بوده و از آن برای کشت سویه‌های حساس که قدرت رقابت با سایر موجودات در سیستم‌های باز را ندارند، استفاده می‌شود[81]. در این نوع از سیستم‌های کشت تولید محصولات با ارزش مانند داروها و مواد زیستی و نیز محصولات نوترکیب تحت استانداردهای ایمنی و با خلوص بالا امکان‌پذیر است. در سیستم‌های بسته شدت و طول موج نور، چرخه‌های تاریکی/ روشنایی و سایر متغیرها به‌راحتی قابل کنترل هستند. امکان تامین نور سیستم‌های بسته از طریق منابع طبیعی و مصنوعی، هر دو، وجود دارد. به‌طور معمول فتوبیوراکتورهای آزمایشگاهی با نورهای مصنوعی نوردهی شده و دمای آنها به‌راحتی قابل کنترل است. فتوبیوراکتورهایی با مقیاس بالاتر از آزمایشگاه توسط نور خورشید نوردهی شده و کنترل دمای آنها سخت‌تر و نیازمند هزینه‌های بیشتری است[80]. در شکل ۵ برخی از سیستم‌های بسته آزمایشگاهی و صنعتی نشان داده شده‌اند.

شکل ۴) سیستم بازکشت ریزجلبک



شکل ۵) فتوبیوراکتورهای (سیستم بسته) کشت ریزجلبک

پارامترهای عمومی رشد

دسترسی به منبع نور و شدت و طول موج آن از موثرترین پارامترها بر میزان رشد جلبک‌ها از جمله *کلامیدوموناس رینهاردتی*، خصوصاً در شرایط کشت فتوتروفیک است. حضور نور و شدت آن بر میزان فتوسنتز و در نتیجه رشد و تکثیر سلولی تاثیرگذار است. افزایش شدت نور (تا حد بهینه) و میزان دسترسی به نور باعث افزایش میزان رشد می‌شود. نفوذ موثر نور درون فتوبیوراکتورها خصوصاً در کشت‌های غلیظ که میزان نور دریافتی در مناطق مختلف برابر نیست، یک فاکتور محدودکننده رشد به شمار می‌آید. از طرف دیگر دسترسی به منبع نور و شدت نور بیش از حد نیاز منجر به مهار نوری رشد می‌شود. طول موج بهینه برای انجام فتوسنتز در محدوده ۴۰۰ تا ۷۰۰نانومتر است[82]. *کلامیدوموناس رینهاردتی* به‌طور معمول در دمای ۲۰°C تا ۲۵°C رشد بهینه را دارد. این بازه دمایی برای سایر ریزجلبک‌ها گسترده‌تر و معمولاً بین ۱۵°C تا ۳۰°C است. میزان pH محیط معمولاً به‌واسطه جذب CO_2 و تولید O_2 نوسان داشته اما در محدوده خاصی نزدیک به خنثی بر رشد تاثیر منفی ندارد. محدوده pH بهینه برای رشد *کلامیدوموناس رینهاردتی* ۶/۵ تا ۸ است[83]. میزان O_2 در محیط کشت باید کنترل شود تا به سطح بازدارندگی نرسد زیرا غلظت‌های بالای O_2 بر فتوسنتز تاثیر منفی دارد. گاز CO_2 با غلظت ۵% در هوا به محیط اضافه می‌شود و کمبود آن در شرایط فتوتروفی منجر به ایجاد تغییرات متابولیک و تجمع میزان زیادی نشاسته می‌شود. به‌منظور هوادهی و جلوگیری از رسوب و سایه‌اندازی سلول‌ها در محیط کشت که باعث تداخل در نفوذ نور می‌شود، از هم‌زدن و مخلوط‌کردن استفاده می‌شود. برای دستیابی به حداکثر میزان رشد، کشت‌ها باید به‌طور مداوم هم‌زده شوند[19, 84, 85].

www.SID.ir

Archive of SID

انواع کشت و محیط کشت‌های مورد استفاده برای رشد *کلامیدوموناس رینهاردتی*

نیازهای رشد *کلامیدوموناس رینهاردتی* آب، منبع کربن و نیتروژن و عناصر جزئی هستند. سه محیط کشت رایج آزمایشگاهی برای کشت شامل تریس-استات-فسفات (TAP)، محیط کشت حداقلی[86] و محیط کشت با درصد بالای نمک سوکا[87] هستند.

محیط کشت حداقلی فاقد منبع کربن آلی بوده و برای کشت فتوتروفیک از آن استفاده می‌شود، در حالی که دو محیط دیگر غنی از کربن آلی بوده و برای کشت هتروتروفیک و میکسوتروفیک از آنها استفاده می‌شود.

به‌منظور تامین نیتروژن مورد نیاز برای رشد *کلامیدوموناس رینهاردتی* می‌توان از منابع نیتروژن غیرآلی مثل آمونیوم، نیترات و نیتریت استفاده کرد[88]. علاوه بر این منابع نیتروژن آلی مانند اوره[89]، آدنین[90]، استامید[91] نیز برای کشت و رشد *کلامیدوموناس رینهاردتی* مفید هستند.

براساس منبع کربن مورد استفاده سه نوع کشت وجود دارد:

۱) کشت فتوتروفیک که نیازمند نور و CO_2 به‌عنوان منبع کربن غیرآلی است. در شرایط فتوتروفیک *کلامیدوموناس رینهاردتی* قادر است در محیط کشت حداقل حاوی نمک‌ها، نیتروژن، فسفر، پتاسیم و عناصر جزئی رشد کند. نور تامین‌کننده انرژی لازم برای حفظ و رشد سلولی بوده و به شکل ATP درون سلول تجمع می‌یابد. وقتی میزان نور بیشتر از ظرفیت فتوسنتزی سلول باشد، تنهای بخشی از آن جذب شده و بخش اعظم آن به‌صورت گرما هدر می‌رود[92]. به‌طور معمول میزان نور برای رشد فتوتروفیک *کلامیدوموناس رینهاردتی* در محدوده ۱۰۰-۵۰میکرومول بر مترمربع بر ثانیه برای شدت نور کم و ۱۲۰۰-۳۵۰میکرومول بر مترمربع بر ثانیه برای شدت نور بالا است[18].

۲) کشت هتروتروفیک که در آن از منابع کربنی آلی به‌عنوان منبع انرژی و کربن استفاده می‌شود؛ به‌عبارتی دیگر *کلامیدوموناس رینهاردتی* قادر به رشد در تاریکی در حضور یک منبع کربن آلی است. مزیت این کشت نسبت به کشت فتوتروفیک حذف محدودیت نور، تراکم سلولی و بهره‌وری بیشتر و هزینه کمتر فرآیند است[93]. علاوه بر این، پروتئازهای القاشونده توسط نور در کلروپلاست کمتر فعال شده و باعث کاهش میزان تجزیه پروتئین در زمان رشد می‌شود[94]. *کلامیدوموناس رینهاردتی* تنها زمانی قادر به رشد هتروتروفیک است که منبع کربن آلی آن استات باشد. بهترین منابع استات‌آمونیوم و استیک‌اسید است.استات به‌طور مستقیم و طی یک مرحله تحت تاثیر استیل CoAسنتاز تبدیل به استیل CoA شده و وارد چرخه گلی‌اکسالات می‌شود. این چرخه باعث تولید یک مولکول سوکسینات از دو مولکول استات گشته که در چرخه کربس برای تولید انرژی مصرف می‌شود[95].

۳) کشت میکسوتروفیک که ترکیبی از دو روش بالا بوده و در آن هر دو منبع کربنی آلی و غیرآلی متابولیزه می‌شود. کشت میکسوتروفیک موثرترین روش برای کشت *کلامیدوموناس رینهاردتی* است زیرا اثر محدودیت نور کمتر اعمال می‌شود. نتایج نشان داده‌اند زمانی که از غلظت مناسب استات استفاده شود این روش منجر به تولید بیشترین میزان توده زیستی (بیومس) می‌شود[96].

مراکز کشت و نگهداری ریزجلبک‌ها در جهان

بسیاری از ریزجلبک‌ها از جمله سویه‌های کلامیدوموناس را می‌توان از مراکز اصلی نگهداری جلبک‌ها در جهان تهیه نمود. از بزرگ‌ترین این مراکز می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

1) Chlamydomonas Culture Collections (http://www.chlamy.org) at Minnesota University, USA.
2) Culture Collection of Algae at Goettingen University (SAG), Germany (http://www.uni-goettingen.de/en/184982.html)
3) Culture Centre of Algae and Protozoa (CCAP) (http://www.ccap.ac.uk) in United Kingdom

از محدودیت‌های مطالعه حاضر، عدم دسترسی آسان به سویه‌ها و وکتورهای لازم برای تولید محصولات نوترکیب، دشواری نگهداری طولانی‌مدت سویه‌های مهندسی‌شده و سویه‌های خریداری و تهیه‌شده از بانک‌های ریزجلبک بین‌المللی، عدم دسترسی به تجهیزات لازم، زمین و آب مورد نیاز برای کشت در مقیاس بالا، خصوصاً در شرایط استریل و عدم توانایی کنترل آلودگی در بسیاری از موارد است.

به‌منظور حل محدودیت‌های حاضر در زمینه تحقیقات جلبکی، خصوصاً در ایران، پیشنهاد می‌شود علاوه بر ایجاد بانک سویه‌های ریزجلبک و نگهداری آنها، انجمنی خاص تحقیقات جلبکی ایجاد شود تا محققان علاقه‌مند به فعالیت در این زمینه، بتوانند به‌آسانی یافته‌ها و تجربیات حاصل از تحقیقات خود را با یکدیگر به اشتراک گذاشته و از امکانات موجود به‌طور مشترک بهره‌مند شوند.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.
سهم نویسندگان: شبنم شمع‌ریز (نویسنده اول)، نگارنده مقاله (۴۰%)؛ حمیده افقی (نویسنده دوم)، نگارنده مقاله/پژوهشگر اصلی (۶۰)
منابع مالی: مطالعه حاضر منبع مالی نداشته است.

منابع

1- Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973;70(11):3240-4.
2- Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, et al. Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(1):106-10.
3- Kinch MS. An overview of FDA-approved biologics medicines. Drug Discov Today. 2015;20(4):393-8.
4 Rader RA. FDA biopharmaceutical product approvals and trends in 2012. Bioprocess Int. 2013;11(3):18-27.
5- Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv. 2009;27(3):297-306.
6- Kordbacheh F, Ofoghi H, Akbarzadeh A, Jafari M, Salmanian AH. High level expression and chloroplast targeting of human calcitonin (hCT) in transgenic tobacco plants. Transgenic Plant J. 2011;5(1):57-61.
7- Ofoghi H, Mironova R, Moazami N, Domonskv N, Ivanov I. Human calcitonin tetrameric gene: Comparative expression in yeast and transgenic potato plants. Biotechnol Biotechnol Equip. 1999;13(1):20-4.
8- Ofoghi H, Moazami N, Domonsky NN, Ivanov I. Cloning and expression of human calcitonin genes in transgenic potato plants. Biotechnol Lett. 2000;22(7):611-5.
9- Ofoghi H, Moazami N, Ivanov I. Comparison of tobacco etch virus and tobacco mosaic virus enhancers for

www.SID.ir

Archive of SID

28- Potvin G, Zhang Z. Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review. Biotechnol Adv. 2010;28(6):910-8.
29- Kindle KL. High-frequency nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(3):1228-32.
30- Davies JP, Weeks DP, Grossman AR. Expression of the arylsulfatase gene from the beta 2-tubulin promoter in Chlamydomonas reinhardtii. Nucleic Acids Res. 1992;20(12):2959-65.
31- Quinn JM, Kropat J, Merchant S. Copper response element and Crr1-dependent Ni(2+)-responsive promoter for induced, reversible gene expression in Chlamydomonas reinhardtii. Eukaryot Cell. 2003;2(5):995-1002.
32- Fischer N, Rochaix JD. The flanking regions of PsaD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga Chlamydomonas reinhardtii. Mol Genet Genomics. 2001;265(5):888-94.
33- Schroda M, Blöcker D, Beck CF. The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in Chlamydomonas. Plant J. 2000;21(2):121-31.
34- Loppes R, Radoux M, Ohresser MC, Matagne RF. Transcriptional regulation of the Nia1 gene encoding nitrate reductase in Chlamydomonas reinhardtii: Effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the Nia1 promoter. Plant Mol Biol. 1999;41(5):701-11.
35- Fuhrmann M, Oertel W, Hegemann P. A synthetic gene coding for the Green Fluorescent Protein (GFP) is a versatile reporter in Chlamydomonas reinhardtii. Plant J. 1999;19(3):353-61.
36- Stevens DR, Rochaix JD, Purton S. The bacterial phleomycin resistance gene ble as a dominant selectable marker in Chlamydomonas. Mol Gen Genet. 1996;251(1):23-30.
37- Tang DK, Qiao SY, Wu M. Insertion mutagenesis of Chlamydomonas reinhardtii by electroporation and heterologous DNA. Biochem Mol Biol Int. 1995;36(5):1025-35.
38- Hall LM, Taylor KB, Jones DD. Expression of a foreign gene in Chlamydomonas reinhardtii. Gene. 1993;124(1):75-81.
39- Guo SL, Zhao XQ, Tang Y, Wan C, Alam MA, Ho SH, et al. Establishment of an efficient genetic transformation system in Scenedesmus obliquus. J Biotechnol. 2013;163(1):61-8.
40- Sizova I, Fuhrmann M, Hegemann P. A Streptomyces rimosus aphVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to Chlamydomonas reinhardtii. Gene. 2001;277(1-2):221-9.
41- Cerutti H, Johnson AM, Gillham NW, Boynton JE. A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on Chlamydomonas reinhardtii: Integration into the nuclear genome and gene expression. Genetics. 1997;145(1):97-110.
42- Berthold P, Schmitt R, Mages W. An engineered Streptomyces hygroscopicus aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in Chlamydomonas reinhardtii. Protist. 2002;153(4):401-1.
43- Nelson JA, Savereide PB, Lefebvre PA. The CRY1 gene in Chlamydomonas reinhardtii: Structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation. Mol Cell Biol. 1994;14(6):4011-9.
44- Neupert J, Karcher D, Bock R. Generation of expression of human calcitonin gene in transgenic potato plant. Key Eng Mater. 2005;277-279:7-11.
10- Moazez Y, Rajabi Memari H, Ofoghi H, Roayaei M, Nabati Ahmadi D. Evaluation of Spirulina platensis resistance to different antibiotics to find a selectable marker for genetic transformation. Jundishapur J Microbiol. 2013;6(7):e5456.
11- Moazami N, Ashori AR, Ranjbar R, Tangestani M, Eghtesadi R, Sheykhi Nejad A. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of Nannochloropsis. Biomass Bioenergy. 2012;39:449-53.
12- Moazami N, Ranjbar R, Ashori AR, Tangestani M, Sheykhi Nejad A. Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island. Biomass Bioenergy. 2011;35(5):1935-9.
13- Manuell AL, Mayfield SP. A bright future for Chlamydomonas. Genome Biol. 2006;7(9):327.
14- Barrera DJ, Mayfield SP. High-value recombinant protein production in microalgae. In: Richmond A, Emeritus, Hu Q. Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology. 2nd edition. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. pp. 532-44.
15- Doron L, Segal N, Shapira M. Transgene expression in microalgae-from tools to applications. Front Plant Sci. 2016;7:505.
16- Barkan A. Expression of plastid genes: Organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold. Plant Physiol. 2011;155(4):1520-32.
17- Scharff LB, Bock R. Synthetic biology in plastids. Plant J. 2014;78(5):783-98.
18- Harris EH. The Chlamydomonas sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and its laboratory use. Oxford: Academic Press; 2009.
19- Harris EH. Chlamydomonas as a model organism. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 2001;52:363-406.
20- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, et al. The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. Science. 2007;318(5848):245-50.
21- Maul JE, Lilly JW, Cui L, De Pamphilis CW, Miller W, Harris EH, et al. The Chlamydomonas reinhardtii plastid chromosome: Islands of genes in a sea of repeats. Plant Cell. 2002;14(11):2659-79.
22- Purton S. Tools and techniques for chloroplast transformation of Chlamydomonas. In: León R, Galván A, Fernández E, editors. Transgenic microalgae as green cell factories, advances in experimental medicine and biology. 616th Volume. New York: Springer; 2007. pp. 34-45.
23- Boynton JE, Harris EH, Burkhart BD, Lamerson PM, Gillham NW. Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of Chlamydomonas. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(8):2391-5.
24- Rasala BA, Mayfield SP. The microalga Chlamydomonas reinhardtii as a platform for the production of human protein therapeutics. Bioeng Bugs. 2011;2(1):50-4.
25- Purton S, Szaub JB, Wannathong T, Young R, Economou CK. Genetic engineering of algal chloroplasts: Progress and prospects. Russ J Plant Physiol. 2013;60(4):491-9.
https://link.springer.com/article/10.1134/S1021443713040146
26- Walker TL, Purton S, Becker DK, Collet C. Microalgae as bioreactors. Plant Cell Rep. 2005;24(11):629-41.
27- Hallmann A. Algal transgenics and biotechnology. Transgenic Plant J. 2007;1(1):81-98.

www.SID.ir

Archive of SID

of the green alga Chlamydomonas reinhardtii. In: Maliga P. Chloroplast biotechnology: Methods and protocols. New York City: Humana Press; 2014. pp. 401-11.
61- Bateman JM, Purton S. Tools for chloroplast transformation in Chlamydomonas: Expression vectors and a new dominant selectable marker. Mol Gen Genet MGG. 2000;263(3):404-10.
62- Gutiérrez CL, Gimpel J, Escobar C, Marshall SH, Henríquez V. Chloroplast genetic tool for the green microalgae Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae, Volvocales)(1). J Phycol. 2012;48(4):976-83.
63- Newman SM, Boynton JE, Gillham NW, Randolph-Anderson BL, Johnson AM, Harris EH. Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in Chlamydomonas: Molecular and genetic characterization of integration events. Genetics. 1990;126(4):875-88.
64- Remacle C, Cline S, Boutaffala L, Gabilly S, Larosa V, Rosario Barbieri M, et al. The ARG9 gene encodes the plastid-resident N-acetyl ornithine aminotransferase in the green alga Chlamydomonas reinhardtii. Eukaryot Cell. 2009;8(9):1460-3.
65- Goldschmidt-Clermont M. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: A selectable marker of site-directed transformation of Chlamydomonas. Nucleic Acids Res. 1991;19(15):4083-9.
66- Przibilla E, Heiss S, Johanningmeier U, Trebst A. Site-specific mutagenesis of the D1 subunit of photosystem II in wild-type Chlamydomonas. Plant Cell. 1991;3(2):169-74.
67- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, et al. Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles. Science. 1988;240(4858):1534-8.
68- Cheng Q, Day A, Dowson-Day M, Shen GF, Dixon R. The Klebsiella pneumoniae nitrogenase Fe protein gene (nifH) functionally substitutes for the chlL gene in Chlamydomonas reinhardtii. Biochem Biophys Res Commun. 2005;329(3):966-75.
69- Kindle KL, Richards KL, Stern DB. Engineering the chloroplast genome: Techniques and capabilities for chloroplast transformation in Chlamydomonas reinhardtii. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(5):1721-5.
70- Dreesen IA, Charpin-El Hamri G, Fussenegger M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from Staphylococcus aureus infection. J Biotechnol. 2010;145(3):273-80.
71- Manuell AL, Beligni MV, Elder JH, Siefker DT, Tran M, Weber A, et al. Robust expression of a bioactive mammalian protein in Chlamydomonas chloroplast. Plant Biotechnol J. 2007;5(3):402-12.
72- Rasala BA, Muto M, Lee PA, Jager M, Cardoso RM, Behnke CA, et al. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii. Plant Biotechnol J. 2010;8(6):719-33.
73- Sun M, Qian K, Su N, Chang H, Liu J, Shen G. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in Chlamydomonas reinhardtii chloroplast. Biotechnol Lett. 2003;25(13):1087-92.
74- Michelet L, Lefebvre-Legendre L, Burr SE, Rochaix JD, Goldschmidt-Clermont M. Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of Chlamydomonas. Plant Biotechnol J. 2011;9(5):565-74.
75- Suay L, Salvador ML, Abesha E, Klein U. Specific roles of 5' RNA secondary structures in stabilizing transcripts in chloroplasts. Nucleic Acids Res. 2005;33(15):4754-61.
Chlamydomonas strains that efficiently express nuclear transgenes. Plant J. 2009;57(6):1140-50.
45- Bruggeman AJ, Kuehler D, Weeks DP. Evaluation of three herbicide resistance genes for use in genetic transformations and for potential crop protection in algae production. Plant Biotechnol J. 2014;12(7):894-902.
46- Kovar JL, Zhang J, Funke RP, Weeks DP. Molecular analysis of the acetolactate synthase gene of Chlamydomonas reinhardtii and development of a genetically engineered gene as a dominant selectable marker for genetic transformation. Plant J. 2002;29(1):109-17.
47- Kindle KL, Schnell RA, Fernández E, Lefebvre PA. Stable nuclear transformation of Chlamydomonas using the Chlamydomonas gene for nitrate reductase. J Cell Biol. 1989;109(6 Pt 1):2589-601.
48- Debuchy R, Purton S, Rochaix JD. The argininosuccinate lyase gene of Chlamydomonas reinhardtii: An important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. EMBO J. 1989;8(10):2803-9.
49- Molnar A, Bassett A, Thuenemann E, Schwach F, Karkare S, Ossowski S, et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga Chlamydomonas reinhardtii. Plant J. 2009;58(1):165-74.
50- Ferris PJ. Localization of the nic-7, ac-29 and thi-10 genes within the mating-type locus of Chlamydomonas reinhardtii. Genetics. 1995;141(2):543-9.
51- Mayfield SP, Kindle KL. Stable nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii by using a C. reinhardtii gene as the selectable marker. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(6):2087-91.
52- Specht E, Miyake-Stoner S, Mayfield S. Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. Biotechnol Lett. 2010;32(10):1373-83.
53- Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: Status for the year 2000. Nucleic Acids Res. 2000;28(1):292.
54- Tuller T, Waldman YY, Kupiec M, Ruppin E. Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(8):3645-50.
55- Shamriz S, Ofoghi H, Moazami N. Effect of linker length and residues on the structure and stability of a fusion protein with malaria vaccine application. Comput Biol Med. 2016;76:24-9.
56- Dauvillee D, Hilbig L, Preiss S, Johanningmeier U. Minimal extent of sequence homology required for homologous recombination at the psbA locus in Chlamydomonas reinhardtii chloroplasts using PCR-generated DNA fragments. Photosynth Res. 2004;79(2):219-24.
57- Umen JG, Goodenough UW. Chloroplast DNA methylation and inheritance in Chlamydomonas. Genes Dev. 2001;15(19):2585-97.
58- Coll JM. Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae: A review. Span J Agric Res. 2006;4(4):316-30.
59- Randolph-Anderson B, Boynton JE, Dawson J, Dunder E, Eskes R, Gillham NW, et al. Sub-micron gold particles are superior to larger particles for efficient biolistic transformation of organelles and some cell types. BioRad Bull. 2015.
60- Economou C, Wannathong T, Szaub J, Purton S. A simple, low-cost method for chloroplast transformation

www.SID.ir

Archive of SID

microalgae. Rev Environ Sci Bio Technol. 2013;12(2):131-51.
86- Gorman DS, Levine RP. Cytochrome f and plastocyanin: Their sequence in the photosynthetic electron transport chain of Chlamydomonas reinhardi. Proc Natl Acad Sci U S A. 1965;54(6):1665-9.
87- Sueoka N. Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in Chlamydomonas reinhardi. Proc Natl Acad Sci U S A. 1960;46(1):83-91.
88- Thacker A, Syrett PJ. The assimilation of nitrate and ammonium by Chlamydomonas reinhardi. New Phytol. 1972;71(3):423-33.
89- Hodson RC, Williams SK, Davidson WR Jr. Metabolic control of urea catabolism in Chlamydomonas reinhardi and Chlorella pyrenoidosa. J Bacteriol. 1975;121(3):1022-35.
90- Pineda M, Fernández E, Cárdenas J. Urate oxidase of Chlamydomonas reinhardii. Physiologia Plantarum. 1984;62(3):453-7.
91- Gresshoff PM. Amide metabolism of Chlamydomonas reinhardi. Arch Microbiol. 1981;128(3):303-6.
92- Mussgnug JH, Thomas-Hall S, Rupprecht J, Foo A, Klassen V, Mc Dowall A, et al. Engineering photosynthetic light capture: Impacts on improved solar energy to biomass conversion. Plant Biotechnol J. 2007;5(6):802-14.
93- Chen GQ, Chen F. Growing phototrophic cells without light. Biotechnol Lett. 2006;28(9):607-16.
94- Adam Z, Clarke AK. Cutting edge of chloroplast proteolysis. Trends Plant Sci. 2002;7(10):451-6.
95- Spalding MH. The CO2-concentrating mechanism and carbon assimilation. Stern D. The Chlamydomonas sourcebook: Organellar and metabolic processes. 2nd Volume. Cambridge: Academic Press; 2009. pp. 257-301.
96- Moon M, Kim CW, Park WK, Yoo G, Choi YE, Yang JW. Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in Chlamydomonas reinhardtii. Algal Res. 2013;2(4):352-7.
76- Rott R, Liveanu V, Drager RG, Stern DB, Schuster G. The sequence and structure of the 3'-untranslated regions of chloroplast transcripts are important determinants of mRNA accumulation and stability. Plant Mol Biol. 1998;36(2):307-14.
77- Jones CS, Luong T, Hannon M, Tran M, Gregory JA, Shen Z, et al. Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae Chlamydomonas reinhardtii. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97(5):1987-95.
78- Tran M, Van C, Barrera DJ, Pettersson PL, Peinado CD, Bui J, et al. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;110(1):E15-22.
79- Boynton JE, Gillham NW. [25] Genetics and transformation of mitochondria in the green alga Chlamydomonas. IN: Hirs CHW, Timasheff SN. Methods in enzymology. 264th Volume. Amsterdam: Elsevier; 1996. pp. 279-96.
80- Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. Bioresour Technol. 2008;99(10):4021-8.
81- Sastre RR, Csögör Z, Perner-Nochta I, Fleck-Schneider P, Posten C. Scale-down of microalgae cultivations in tubular photo-bioreactors-a conceptual approach. J Biotechnol. 2007;132(2):127-33.
82- Brown TJ, Geen GH. The effect of light quality on the carbon metabolism and extracellular release of Chlamydomonas reinhardtii dangeard. J Phycol. 1974;10(2):213-20.
83- Sager R, Granick S. Nutritional studies with Chlamydomonas reinhardi. Ann N Y Acad Sci. 1953;56(5):831-8.
84- Wang B, Lan CQ, Horsman M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. Biotechnol Adv. 2012;30(4):904-12.
85- Acién Fernández FG, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E. Photobioreactors for the production of

www.SID.ir