

مطالعه و بررسی اثرات مهار ژن‌های ackA، pta و poxB به وسیله RNA ی آنتی‌سنس روی ترشح استات و بیان اینترفرون بتای نوترکیب در باکتری اش‌ریشیا کلائی

محمدحسین مروت^{۱*} (Ph.D)

۱- مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۳

mhmorowvat@sums.ac.ir

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۷۱- ۳۶۲۶۸۹۲۷

چکیده

هدف: اش‌ریشیا کلائی یکی از رایج‌ترین سیستم‌های نوترکیب دارویی محسوب می‌شود. تولید بیش از حد اسید استیک (استات) به عنوان یک محصول ناخواسته‌ی جانبی، مانعی بر سر راه استفاده از ای. کلائی به شمار می‌رود. در این پژوهش، برای حل مشکل ترشح اضافی استات، از یک روش مهندسی متابولیک مبتنی بر فناوری آنتی‌سنس استفاده شد. مواد و روش‌ها: یک پلاسמיד نوترکیب حاوی توالی کدکننده اینترفرون بتای انسانی و سه قطعه آنتی‌سنس بر علیه ژن‌های استات کیناز، فسفوترانس استیلاز و پیرووات اکسیداز طراحی شد. اثرات ایجاد شده توسط آن بر فیزیولوژی سلولی و بیان اینترفرون بتا و غلظت استات در باکتری ای. کلائی بررسی شد.

یافته‌ها: غلظت mRNA ژن‌های هدف‌گیری شده در سویه‌ی حاوی قطعات آنتی‌سنس در مقایسه با سویه‌ی کنترل کم‌تر شده بود. با استفاده از فناوری آنتی‌سنس، غلظت استات در محیط کشت کاهش یافته بود. بیان قطعات RNA آنتی‌سنس تأثیر نامطلوبی بر روند رشد سلولی ایجاد نکرد. به علاوه، بیشینه‌ی مقدار اینترفرون بتای نوترکیب در سویه‌ی کنترل شده با فناوری آنتی‌سنس در مقایسه با سویه‌ی کنترل بیش‌تر شده بود.

نتیجه‌گیری: استفاده از فناوری آنتی‌سنس به منظور مهندسی متابولیک چرخه‌ی استات در ای. کلائی موفقیت‌آمیز بود. فناوری توصیف شده در این پژوهش، قابلیت به کار گرفته شدن برای تولید سایر پروتئین‌های نوترکیب دارویی، را دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ای. کلائی، پروتئین نوترکیب، استات، فناوری آنتی‌سنس، اینترفرون بتا

مقدمه

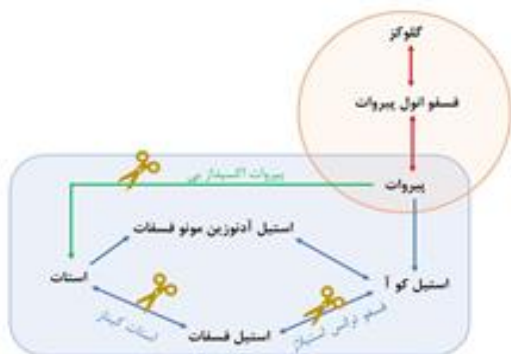
پروتئین‌ها مولکول‌های عملکردی در اغلب سیستم‌های زیستی بوده و تقریباً در تمامی واکنش‌های شیمیایی و فرآیندهای زیستی نقش دارند. چالش‌های موجود بر سر راه تولید پروتئین‌های دارویی نوترکیب، در مقیاس و کیفیت مورد نیاز برای کاربردهای گوناگون آزمایشی، درمانی و تجاری منجر به توسعه‌ی شیوه‌هایی گوناگون برای تولید پروتئین‌های هترولوگ شده است [۱].

سلول‌هایی که به عنوان میزبان برای تولید یک محصول نوترکیب دارویی به کار می‌روند، به شکلی دقیق و پیچیده کار می‌کنند تا تولید و انتقال محصول به اندامک مربوطه با حفظ فعالیت عملکردی آن انجام گیرد [۲]. در بیش‌تر سامانه‌هایی که در یک فرآیند بیوتکنولوژی برای تولید داروهای نوترکیب پروتئینی به کار می‌روند، از ارگانسیم یا سلولی بهره برده می‌شود که به شکلی خاص برای تولید پروتئین‌های هترولوگ مهندسی

شده‌اند [۳]. هر سیستم بیانی نقاط قوت و ضعف مربوط به خود را دارد که این موارد بایستی پیش از انتخاب یک سیستم بیانی مورد توجه قرار گیرند. معیارهای انتخاب یک سیستم بیانی برای تولید یک پروتئین نوترکیب شامل خواص بیوشیمیایی و زیستی، پروتئین مورد نظر و نیازمندی‌های پروژه نظیر مقیاس، هزینه و کاربردهای مورد نظر آن می‌باشند [۴].

اش‌ریشیا کلائی رایج‌ترین سیستم باکتریایی برای تولید پروتئین‌های هترولوگ محسوب می‌شود. این میکروارگانسیم یک سیستم مدل به شمار می‌رود و مطالعات فراوانی که بر روی آن صورت گرفته است حجم بسیاری از اطلاعات را درباره‌ی مکانیسم‌های تنظیمی و چگونگی عملکرد پروتئین‌های سلولی آن فراهم کرده است [۵]. سهولت دست‌ورزی‌های ژنتیکی، کشت تقریباً ارزان قیمت آن، بیان سریع، تولید شدن پروتئین نوترکیب در طول یک دوره‌ی یک روزه، مسیرهای متابولیکی شناخته شده و توسعه روش‌های تخمیری و شرایط کشت آن از جمله

استیلاز و پیرووات اکسیداز که سه ژن اصلی در ساخت استات در ای. کلاهی محسوب می‌شوند، طراحی و سنتز شد (شکل ۱). به منظور ارزیابی روش مهندسی متابولیک به کار رفته و تاثیر آن بر روی میزان تولید یک داروی نوترکیب، از اینترفرون نوترکیب بتای انسانی به عنوان یک پروتئین مدل استفاده شد. روند رشد سویه‌ی نوترکیب و سویه‌ی وحشی از باکتری ای. کلاهی سویه‌ی BL21 (DE3)، و همچنین میزان تولید استات توسط هر دو نوع سویه‌ی نام‌برده، در فواصل منظم زمانی، در محیط کشت ارلن آزمایشگاهی ۵۰۰ میلی‌لیتری بررسی گردید.



شکل ۱. نمایی ساده شده از مسیرهای متابولیکی دخیل در متابولیسم مرکزی کربن و استات در ای. کلاهی، متشکل از چرخه‌های الف: گلیکولیز و گلوکونئوژنز و ب: تشکیل و آسیمیلاسیون استات.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده: کلیه‌ی مواد شیمیایی مورد نیاز برای انجام این پروژه که شامل اجزای لازم برای تهیه محیط‌های کشت، حلال‌های آلی استفاده شده، مواد لازم برای تهیه ژل آگارز و پلی‌اکریل آمید، شناساگرهای وزن مولکولی، مواد مورد نیاز برای الکتروفورز پروتئین و آنتی‌بیوتیک می‌باشند، از شرکت‌های، فرمنتاس، مرک، بایو رد، سیگما-آلدیچ، های مدیا، و شرکت داروسازی دانا تهیه شدند. در بقیه‌ی موارد نام شرکت، شهر و کشور سازنده‌ی ماده یا دستگاه مورد نظر در محل مربوطه آورده شده است.

میزبان و پلاسمید: میزبان استفاده شده برای تولید اینترفرون بتای انسانی، سویه‌ی BL21 (DE3) باکتری ای. کلاهی است که شناسه‌ی تاکسونومی این گونه در پایگاه داده‌های NCBI، ۴۶۹۰۰۸ می‌باشد. ژنوتیپ کامل این سویه به صورت F-ompT hsdS_B (r_B-m_B⁻) gal dcm (DE3) می‌باشد. این سویه متعلق به خانواده‌ی ای. کلاهی B می‌باشد که با روش‌های مهندسی ژنتیک به گونه‌ای دست‌ورزی شده است که فاقد ژن‌های پروتئاز lon و پروتئاز خارج غشایی ompT بوده و بنابراین به دلیل عدم وجود این دو دسته‌ی آنزیمی با ویژگی پروتئازی، برای افزایش بیان پروتئین‌ها گزینه‌ی مطلوبی به شمار می‌آید [۱۸].

مزایای استفاده از این باکتری به عنوان یک سیستم بیانی می‌باشند [۶].

در مقابل عدم توانایی در تولید پروتئین‌های بزرگ و یا غشایی به دلیل بیان نشدن آن‌ها و یا تولید شدن به صورت اجسام انکلوزیونی نامحلول، عدم توانایی در انجام اصلاحات بعد از ترجمه‌ای نظیر گلیکوزیلاسیون که برای تولید یک پروتئین با تا خوردگی صحیح و فعال از نظر زیستی ضروری است [۷]، تولید برخی پروتئین‌ها با بازده اندک [۸]، آلوده بودن محصول تولید شده به اندوتوکسین باکتریایی [۹]، مشکل در بیان پروتئین‌هایی که حاوی باندهای دی سولفیدی می‌باشند [۱۰، ۱۱] و معروف‌تر از همه تولید اسید استیک (استات) به عنوان یک محصول جانبی که اثرات نامطلوب بسیاری بر تولید محصول ایجاد می‌کند، موانعی بر سر راه استفاده از ای. کلاهی در تولید داروهای نوترکیب پروتئینی به شمار می‌روند.

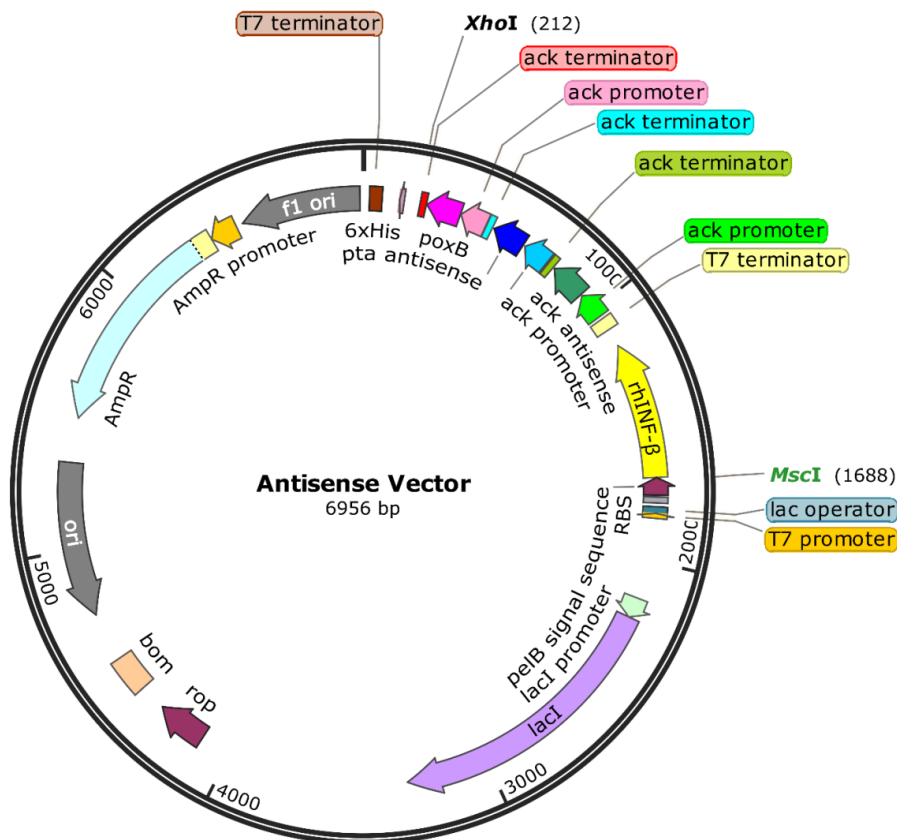
با کشت دادن ای. کلاهی به روی محیط کشتی حاوی مقادیر زیاد گلوکز، حتی در صورتی که هوادهی به خوبی انجام گیرد، ۳۰-۱۰ درصد از جریان کربنی که به شکل گلوکز وارد سیستم شده است در قالب استات از محیط خارج می‌گردد. به این پدیده اثر کربتری (Crabtree effect) و یا سر ریز شدن استات (Acetate overflow) [۱۲، ۱۳] می‌گویند. استات تولید شده ناشی از عدم تعادل بین جریان چرخه‌های گلیکولیتیک و تری‌کربوکسیلیک اسید است [۱۳]. استات تولید شده حتی در غلظت ۰.۵ گرم بر لیتر، باعث به تاخیر افتادن رشد سلولی، مهار تشکیل محصول، تداخل در بازیابی کوفاکتورهای دخیل در حفظ همئوستاز سلولی و تنظیم رشد سلول (نظیر کوآنزیم‌های احیایی و کوآنزیم آ سولفیدریل)، طولانی‌تر شدن زمان فرایند تخمیر و از دست رفتن بخشی از منبع کربنی که می‌توانست تبدیل به توده‌ی زیستی یا محصول مورد نظر شود، می‌گردد. به علاوه استات در بیوسنتز متیونین مداخله کرده و باعث تجمع نامطلوب هموسیستئین می‌شود [۱۴، ۱۵].

اثرات بازدارندگی استات بر روی سلول‌های تولیدکننده‌ی یک پروتئین نوترکیب در مقایسه با یک سلول وحشی شدیدتر است [۱۶]. به عبارت دیگر آستانه ترشح استات آن‌ها کم‌تر از یک سلول وحشی است. از سویی دیگر، ای. کلاهی قادر به متابولیزه کردن استات تولید شده می‌باشد، و استات در غلظت‌های اندک، به عنوان یک منبع کربن ثانویه، باعث افزایش رشد سلولی می‌گردد [۱۷]. بنابراین حذف کامل مسیر استات از طریق روش‌های حذف ژنی منطقی به نظر نمی‌رسد. زیرا وجود اندکی از استات برای سلول‌ها ضروری می‌باشد.

در این مطالعه، یک پلاسمید نوترکیب حاوی توالی سه قطعه آنتی‌سنس بر علیه ژن‌های کدکننده‌ی استات کیناز، فسفوترانس

محیط کشت: برای نگهداری، تهیه و آزمایش اولیه سویه‌ها از محیط کشت پیچیده لوریا برتانی (LB)، به صورت مایع و جامد استفاده شد. برای جامد کردن این محیط، از آگار به میزان ۱۲ گرم بر لیتر استفاده شد. اجزای لازم برای تهیه یک لیتر محیط کشت، ابتدا به دقت بر روی ترازوی مناسب وزن شده و در ۷۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر حل شد. سپس به خوبی به هم زده شد و پس از تنظیم pH حجم آن به ۱ لیتر رسید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. تهیه سویه نوترکیب: برای تهیه کردن سلول‌های پذیرا (Competent cell)، و وارد کردن پلاسمید نوترکیب به داخل سلول میزبان، از کلرید کلسیم ۰/۲ مولار و روش شوک حرارتی استفاده شد. از آنجائی که پلاسمید به کار رفته، حاوی ژن ایجاد مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد از این آنتی‌بیوتیک با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای انتخاب سلول‌های نوترکیب استفاده شد.

در این پروژه برای تهیه سویه‌های نوترکیب از پلاسمید pET25b(+) استفاده شد. ساختمان کلی پلاسمید، بدون قطعه‌ی سنتزی دارای ۵۴۸۰ جفت باز می‌باشد. در قسمت سنتز شده، که شامل ۱۴۷۶ جفت باز بود، توالی مربوط به ژن‌های کدکننده‌ی سه آنزیم مهم در ساخت استات در ای. کلای، شامل ژن‌های استات کیناز، فسفو ترانس استیلاز و پیرووات کیناز قرار داده شد (شکل ۲). برای کنترل قطعات آنتی‌سنس از پروموتور ذاتی استات کیناز استفاده شد که به طور مجزا، بیان هر سه قطعه‌ی آنتی‌سنس نام‌برده را کنترل می‌کرد. به علاوه ژن کدکننده‌ی اینترفرون بتای نوترکیب انسانی به عنوان پروتئین مدل هم در این پلاسمید قرار گرفت و با پروموتور قوی T7 هدایت شد. ژن سنتز شده، با اندازه‌ی نهایی ۶۹۵۶ جفت باز توسط شرکت بایوماتیک کانادا، در درون پلاسمید pET25b(+) که دارای جایگاه برش و جهت‌گیری صحیح است قرار داده شد و ویال حاوی ۱۰ میکروگرم از DNA لیوفیلیزه تحویل گرفته شد. به پودر حاصل، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل اضافه شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.



شکل ۲. ساختار کلی سازه ی طراحی شده حاوی قطعات سه گانه ی آنتی سنس و قطعه ی کد کننده ی اینترفرون بتای نوترکیب انسانی

ساعت پیشین کاسته شده و عدد حاصل بر عدد یک، به عنوان فواصل یک ساعته‌ی نمونه‌گیری، تقسیم شده و عدد حاصل بر حسب واحد بر ساعت، گزارش گردید.

القای بیان: پس از رسیدن به تراکم نوری ۱/۰ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، تولید پروتئین نوترکیب در سلول‌های میزبان با افزودن ماده‌ی ایزوپروپیل بتا-دی-یک-تیوگلاکتوپیرانوزید (IPTG) (ساخت شرکت فرمنتاس، ویلنوس، لیتوانی) با غلظت ۱ میلی‌مولار، القا شد. بخشی از محیط کشت، پیش از انجام القا به عنوان کنترل منفی جمع‌آوری شده و نمونه‌های ساعت نخست تا چهارم نیز در طی فواصل زمانی منظم، جمع‌آوری شدند. با سانتریفیوژ کردن نمونه در شرایط ۵۰۰۰ جی، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در یک سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدل MF 20-R، ساخت شرکت Awel، شهر Blain، فرانسه) سلول‌های نوترکیب در قالب پلت سلولی، از مایع رویی جدا شدند.

بررسی میزان بیان پروتئین نوترکیب: پلت‌های حاصل از سانتریفیوژ باکتری میزبان، و یا پروتئین‌های خالص شده، با بافر نمونه، حاوی تریس کلراید ۰/۱۵۰ مولار، با pH=۶/۸، گلیسرول ۱۰ درصد (حجمی/حجمی)، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، برومو فنل بلو (۰/۰۱ درصد)، و ۲-مرکاپتو اتانول ۰/۵ مولار، مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در آب ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد جوشانده شده و سپس به مدت ۲ دقیقه با شرایط ۱۱۰۰۰ جی سانتریفیوژ گردید. الکتروفورز نمونه‌ها در حضور SDS به شیوه‌ی ارائه شده توسط ملمی انجام پذیرفت. ژل پلی‌اکریل آمید ناپوسته با غلظت ۴ درصد در قسمت بالایی (ژل متراکم‌کننده یا Stacking gel) و ۱۷/۵ درصد در قسمت پایینی (ژل جداکننده یا Resolving gel) بر روی یک دستگاه ژل الکتروفورز عمودی، مدل Mini-PROTEAN، ساخت بیوراد، کالیفرنیا، آمریکا، قرار گرفت. یکی از فرآورده‌های تجاری اینترفرون نوترکیب بتای انسانی غیر گلیکوزیله موجود در بازار دارویی ایران با نام تجاری زیفرن (Ziferon™)، ساخت شرکت زیست دارو دانش، تهران، ایران، به عنوان کنترل مثبت در انجام آنالیز مربوطه به کار گرفته شد. رنگ‌آمیزی ژل‌ها به کمک رنگ کوماسی بریلیانت بلو آر ۲۵۰، انجام گرفت. الگوی پروتئین تام باکتری نوترکیب، که توسط رنگ‌آمیزی ژل با رنگ کوماسی بریلیانت بلو قابل مشاهده شده بود، به روش دنسیتومتری توسط نرم‌افزار ImageJ، نسخه‌ی ۱/۵۲، مدیسون، آمریکا، ارزیابی و اسکن شد.

سنجش مقدار پروتئین تام سلولی: مقدار پروتئین تام نمونه توسط روش برادفورد، که یک روش سریع و حساس برای اندازه‌گیری مقادیر پروتئین در حدود میکروگرم محسوب

تهیه کلکسیون میکروارگانسیم و نگهداری سویه‌ها: سویه‌های نوترکیب و وحشی برای زمان‌های طولانی‌تر (بیش از یک هفته تا دو سال) در محیط کشت LB حاوی ۲۰ درصد (وزنی/حجمی) گلیسرول در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد و برای فواصل زمانی کوتاه بین آزمایش‌ها (کم‌تر از یک هفته) در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و بر روی محیط کشت LB جامد شده با آگار نگهداری شدند.

کشت باکتری نوترکیب: میکروتیوب حاوی سلول‌های نوترکیب (۱،۵ میلی‌لیتر) به شکل سترون و در زیر کابینت ایمنی زیستی نوع دو (مدل JTLVC2 ساخت شرکت ژال تجهیز، کرج، ایران) به یک ارلن سترون ۲۵۰ میلی‌لیتری (کشت اولیه) حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت سترون، شامل آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، منتقل شده و به مدت یک شب در یک انکوباتور شیکردار (ساخت شرکت پکو، شیراز، ایران) در شرایط ۱۶۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. روز بعد، یک میلی‌لیتر از این کشت اولیه به شکل سترون و در زیر کابینت ایمنی زیستی نوع دو، به یک ارلن سترون ۵۰۰ میلی‌لیتری (کشت ثانویه) حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت سترون، شامل آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) منتقل شده و به مدت هشت ساعت در انکوباتور شیکردار در شرایط ۱۶۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌گیری از شیک فلاسک‌های مربوطه، در فواصل منظم یک ساعته انجام گرفت و آنالیزهای زیر بر روی آن‌ها انجام پذیرفت.

سنجش میزان رشد سلول: برای سنجش روند رشد باکتری از دو روش کدورت سنجی و محاسبه‌ی وزن خشک سلولی استفاده شد. در روش کدورت سنجی، روند رشد باکتری، با اندازه‌گیری چگالی نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر، با استفاده از روش طیف سنجی نوری بررسی گردید. بدین منظور از یک دستگاه طیف سنج نوری، ساخت شرکت اپن دورف، آلمان استفاده شد. قبل از اندازه‌گیری میزان غلظت، نمونه‌ها ابتدا با محلول سرم نمکی نرمال رقیق شدند تا میزان جذب مشاهده شده در طیفی خطی قرار گیرند. از محیط کشت فاقد باکتری به عنوان شاهد استفاده شد. به علاوه برای سنجش رشد باکتری به روش محاسبه‌ی وزن خشک سلولی، ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت، در شرایط ۷۳۰۰ جی سانتریفیوژ شد. سپس دو مرتبه توسط محلول ایزواسمتیک سدیم کلراید ۰/۹ درصد (وزنی/حجمی) شسته شد. پس از آن درون یک آون با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا به وزن ثابتی برسد. برای محاسبه‌ی شدت رشد ویژه‌ی سلولی مقادیر وزن خشک سلولی مشاهده شده در هر ساعت از مقدار وزن خشک سلولی مشاهده شده در

می‌شود. شدت رنگ حاصل در طول موج ذکر شده متناسب با مقدار گلوکز موجود در نمونه است. در صورت انجام آزمایش در شرایطی که دور از نور مستقیم باشد، پایداری رنگ حاصل ۶۰ دقیقه می‌باشد.

سنجش میزان ترشح استات: برای سنجش میزان استات ترشح شده به محیط، از کیت آنزیمی ساخته شده توسط شرکت مگازیم، ویکلو، ایرلند، با کد K-ACETAK، مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده، استفاده شد. در این روش، اسید استیک (استات) توسط آنزیم استات کیناز، و در حضور آدنوزین تری فسفات، به استیل فسفات تبدیل می‌شود و در این میان آدنوزین تری فسفات نیز به آدنوزین دی فسفات تبدیل می‌گردد. آدنوزین دی فسفات تولید شده، در کنار فسفو انول پیروات، و توسط آنزیم پیروات کیناز، آدنوزین تری فسفات و پیروات تولید می‌کنند. در ادامه، پیروات حاصل در کنار نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید، توسط آنزیم دی لاکتات دهیدروژناز، دی لاکتیک اسید و نیکوتین آمید آدنین تولید می‌کند. اختلاف بین طیف نشر دو شکل مختلف اکسید شده و احیا شده نیکوتین آمید آدنین، در طول موج ۳۴۰ نانومتر، می‌تواند به طور غیر مستقیم، نشانگر میزان استات موجود در محیط باشد. استفاده از این روش که مبتنی بر آنزیم استات کیناز می‌باشد در مقایسه با روش‌های قدیمی تر که مبتنی بر آنزیم استیل کوآنزیم استنتاز بودند باعث می‌شود تا دخالت پیروات و لاکتات دهیدروژناز به حداقل برسد، و نیز با افزایش میزان استات موجود در نمونه پاسخی خطی به دست آید. اجزای موجود در بسته بندی کیت تعیین مقدار استات، برای تهیه ۱۷۰/۵ میلی لیتر واکنشگر (معادل ۵۵۰ واکنش ۰/۳۱ میلی لیتری) فراهم شده‌اند. در درون این بسته بندی چهار عدد شیشه به شرح زیر وجود دارد. شیشه ۱: بافر به حجم ۱۱ میلی لیتر و pH ۷/۴، حاوی ماده‌ی نگه‌دارنده‌ی سدیم آزید به میزان ۰/۰۲ درصد وزنی حجمی، شیشه ۲: ظرفی حاوی ۳۰ عدد قرص که محتوای آن‌ها نیکوتین آمید آدنین (NADH)، به علاوه‌ی آدنوزین تری فسفات (ATP)، فسفو انول پیروات (PEP)، و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) می‌باشد. شیشه ۳: سوسپانسیون استات کیناز، پیروات کیناز، و دی-لاکتات دهیدروژناز به حجم ۴/۱ میلی لیتر، و شیشه‌ی شماره ۴: حاوی استاندارد استات به حجم ۲ میلی لیتر و با غلظت ۱/۸ گرم بر لیتر. محلول‌های شماره‌ی ۱، ۳ و ۴ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ سال پایدار می‌باشند. محلول شماره ۲ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و یا در دمای ۱۰- سانتی‌گراد به مدت ۲ سال پایدار می‌باشد. مدت زمان لازم برای انجام آزمایش ۱۰ دقیقه بوده و جهت واکنش از نوع کاهشی می‌باشد. دو لوله‌ی آزمایش مجزا، یکی به عنوان

می‌شود، اندازه‌گیری شد. در این روش کوماسی بریلیانت بلو به پروتئین متصل شده و با اتصال خود موجب تغییر طول موج از ۴۶۵ نانومتر به ۵۹۵ نانومتر در حداکثر جذب رنگ می‌شود. از این رو در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری کمپلکس پروتئین-رنگ انجام می‌شود. از آلبومین سرم گاوی (BSA)، خریداری شده از شرکت مرک میلی پور، دارمشتات، آلمان، به عنوان استاندارد استفاده شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از آلبومین تهیه شد. در ادامه محلول‌های معرف و برادفورد آماده شدند. محلول معرف حاوی ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۸ درصد، و ۱۰۰ میلی گرم رنگ کوماسی بریلیانت بلو بود که حجم آن توسط آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. محلول برادفورد حاوی ۱۵ میلی لیتر الکل ۹۵ درصد، ۳۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۸ درصد، ۳۰ میلی لیتر محلول معرف، و ۴۲۵ میلی لیتر آب مقطر بود. در ادامه محلول برادفورد را با کاغذ صافی با تخلخل ۰،۴۵ میکرومتر، فیلتر کرده و در شیشه قهوه‌ای رنگ نگهداری شد (این محلول چندین هفته قابل استفاده است). مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نمونه پروتئینی مجهول به یک میلی لیتر محلول برادفورد افزوده و کاملاً مخلوط شد. پس از دو دقیقه جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. مقدار پروتئین مجهول با استفاده از منحنی کالیبراسیون تعیین شد.

سنجش میزان مصرف گلوکز: برای سنجش میزان گلوکز، از کیت آنزیمی ساخته شده توسط شرکت زیست شیمی، تهران، ایران، مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده، استفاده شد. میزان حساسیت این کیت، ۲/۰ میلی گرم بر دسی لیتر و بیشینه حد سنجش آن ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر می‌باشد. اساس اندازه‌گیری گلوکز در این کیت مبتنی بر روش گلوکز اکسیداز/فنل به اضافه‌ی آمینو فنازون، (GOD-PAP) می‌باشد. در این روش، گلوکز تحت تاثیر آنزیم گلوکز اکسیداز آب اکسیژنه آزاد می‌کند که در مجاورت آنزیم پراکسیداز همراه فنل و ۴-آمینو آنتی پیرین کمپلکس رنگی کوئینون ایمین را تشکیل می‌دهند. دو لوله‌ی آزمایش مجزا، یکی به عنوان نمونه (حاوی ده میکرولیتر از نمونه‌ی محیط کشت و هزار میکرولیتر از محلول بافر موجود در کیت) و دیگری به عنوان استاندارد یا کالیبراتور (حاوی ده میکرولیتر از نمونه‌ی استاندارد گلوکز موجود در کیت و هزار میکرولیتر از محلول بافر موجود در کیت) تهیه می‌شود. لوله‌ها را مخلوط کرده، به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یا ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه انکوبه کرده و جذب نمونه و استاندارد در مقابل بلانک معرف (حاوی ده میکرولیتر آب مقطر و هزار میکرولیتر از محلول بافر موجود در کیت) در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده

ارائه شده توسط شرکت سازنده، در طول موج ۵۷۰ نانومتر استفاده شد. یک واحد آنزیمی از پیرووات کیناز مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که قادر به انتقال یک گروه فسفات از فسفو انول پیرووات به آدنوزین دی فسفات بود تا با این جا به جایی یک میکرومول از پیرووات در هر دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد ساخته شود.

روش‌های آماری: اطلاعات به دست آمده در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS، نسخه ۲۵ (ساخت شرکت IBM، نیویورک، آمریکا) مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند. معنی دار بودن هر کدام از داده‌های محاسبه شده، با استفاده از روش محاسبه‌ی t دانشجویی با فراوانی ۰/۰۱ سنجیده شد.

نتایج

تایید توالی و همسانه‌سازی ژن مورد نظر: ژن کدکننده‌ی اینترفرون بتای نو ترکیب انسانی به طور سنتتیک در وکتور pET25b(+) همسانه‌سازی گردید. نتایج توالی‌یابی نشان‌دهنده‌ی درستی کار سنتز و همسانه‌سازی ژن مربوطه بود. به منظور طراحی سازه‌ی ژنی از وکتور بیانی pET25b(+) استفاده گردید. این وکتور دارای جایگاه مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و پروموتور T7 برای افزایش بیان پروتئین اینترفرون بتای نو ترکیب می‌باشد. نخست توالی کدکننده‌ی پروتئین اینترفرون بتای نو ترکیب با استفاده از پایگاه داده‌های NCBI به دست آمد. این توالی بر اساس پروتئین دارویی اینترفرون بتای نو ترکیب موجود در بازار که در سال ۲۰۰۲ مجوز دارویی را از سازمان FDA گرفته است به دست آمد. سپس توالی ژنی این پروتئین توسط نرم‌افزار SnapGene، برای میزبان بیانی ای. کلای بهینه‌سازی شد. دو جایگاه برشی MscI و XhoI از ناحیه برشی چندگانه pET25b(+) انتخاب شده و توالی ژنی بهینه‌سازی شده‌ی ژن مورد نظر در میان دو جایگاه برشی تعیین شده قرار گرفت (شکل ۲). با آنالیز توالی مشخص شد که توالی مربوط به جایگاه‌های برشی آنزیم‌های MscI و XhoI به جز در نقاط تعیین شده در کل توالی ژنی وجود ندارد.

پس از طراحی ژن نو ترکیب اینترفرون بتا توسط نرم‌افزار SnapGene، ژن سنتتیک مربوطه سفارش داده شد. پس از تحویل گرفتن ویال حاوی ژن مورد نظر که درون پلاسמיד pET25b(+) همسانه‌سازی گردیده بود، آزمایش‌های لازم جهت اطمینان از درستی توالی و عملکرد ژن سنتز شده انجام گرفت و نتایج تعیین توالی و القا بیان نشان داد که ژن پروتئین مورد نظر در پلاسמיד مربوطه به درستی همسانه‌سازی شده است.

نمونه (حاوی ۲/۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌ی محیط کشت، ۰/۳۰ میلی‌لیتر از محلول شماره یک، ۰/۲۰ میلی‌لیتر از محلول شماره دو و ۰/۰۲ میلی‌لیتر از محلول شماره سه) و دیگری به عنوان استاندارد (حاوی ۲/۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۱۰ میلی‌لیتر از محلول شماره چهار، ۰/۳۰ میلی‌لیتر از محلول شماره یک، ۰/۲۰ میلی‌لیتر از محلول شماره دو و ۰/۰۲ میلی‌لیتر از محلول شماره سه) تهیه می‌شود. لوله‌ها را مخلوط کرده، به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده و جذب نمونه و استاندارد در مقابل بلانک معرف (حاوی ۲/۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۳۰ میلی‌لیتر از محلول شماره یک، ۰/۲۰ میلی‌لیتر از محلول شماره دو و ۰/۰۲ میلی‌لیتر از محلول شماره سه) در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده می‌شود.

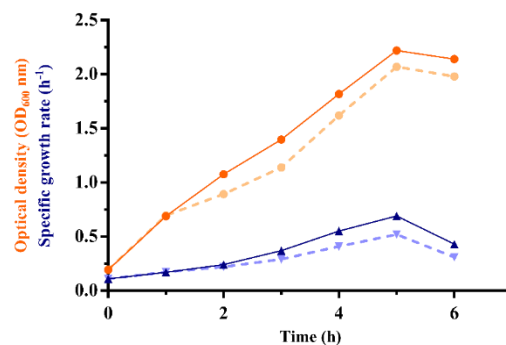
ارزیابی میزان فعالیت آنزیمی: برای سنجش میزان فعالیت آنزیم استات کیناز مخلوط واکنشی حاوی تریس کلراید ۲۲۵ میلی‌مولار با $\text{pH}=7/6$ ، مالیک اسید با غلظت ۱۵ میلی‌مولار، منیزیم کلراید ۴/۵ میلی‌مولار، کوآنزیم آ با غلظت ۳/۷۵ میلی‌مولار، NAD^+ با غلظت ۲۲/۵ میلی‌مولار، مالات دهیدروژناز با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سیترات سنتاز با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ATP با غلظت ۶۰ میلی‌مولار، سدیم استات با غلظت ۱۲/۵ میلی‌مولار و آنزیم فسفوترانس استیلاز با غلظت یک واحد بر میلی‌لیتر تهیه شد. برای سنجش میزان فعالیت آنزیم فسفوترانس استیلاز مخلوط واکنشی حاوی تریس کلراید ۲۲۵ میلی‌مولار با $\text{pH}=7/6$ ، مالیک اسید با غلظت ۱۵ میلی‌مولار، منیزیم کلراید ۴/۵ میلی‌مولار، کوآنزیم آ با غلظت ۳/۷۵ میلی‌مولار، NAD^+ با غلظت ۲۲/۵ میلی‌مولار، مالات دهیدروژناز با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سیترات سنتاز با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و استیل فسفات با غلظت ۱۰ میلی‌مولار تهیه شد. سپس به مخلوط‌های واکنش تهیه شده، مقادیری از افشروی سلولی با میزان پروتئین یکسان (اندازه‌گیری شده توسط روش برادفورد) افزوده شد. تغییرات جذب در مخلوط‌های مورد نظر پس از ۳ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در طول موج ۳۴۰ نانومتر به روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد. بر طبق این روش هر واحد از آنزیم استات کیناز و یا فسفوترانس استیلاز برابر با مقداری از آنزیم می‌باشد که ۱ میکرومول از NADH را در زمان یک دقیقه در ۱ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در $\text{pH}=7/6$ آزاد می‌کند. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیمی آنزیم پیرووات کربوکسیلاز از کیت تجاری موجود در بازار با کد MAK072-1KT، ساخت شرکت سیگما-آلدریج، میسوری، آمریکا، مطابق با دستورالعمل

سنجش میزان رشد سلول: روند رشد باکتری، با اندازه‌گیری چگالی نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر، با استفاده از روش طیف سنجی نوری بررسی گردید (شکل ۳). قبل از اندازه‌گیری میزان غلظت، نمونه‌ها ابتدا با محلول سرم نمکی نرمال رقیق شدند تا میزان جذب مشاهده شده در طیفی خطی قرار گیرند. از محیط کشت فاقد باکتری به عنوان شاهد استفاده شد. روند رشد کلی هر دو سویه‌ی کنترل شده با قطعات آنتی‌سنس و سویه‌ی کنترل، به صورت یک نمودار سیگموئیدی شکل بود. هر چند که شیب خط نشان‌دهنده‌ی روند رشد باکتری کنترل شده با قطعات آنتی‌سنس روند تندتری را در مقایسه با شیب خط نشان‌دهنده‌ی رشد سویه‌ی کنترل، از خود نشان داد. میزان تراکم نوری ارزیابی شده در سویه‌های حاوی قطعات آنتی‌سنس و کنترل، در پایان ساعت ششم مطالعه، به ترتیب $2/22 \pm 0/07$ و $2/19 \pm 0/07$ بود که این امر نشان می‌دهد میزان تراکم نوری سلولی نهایی سویه‌ی کنترل شده با فناوری آنتی‌سنس در مقایسه با سویه‌ی کنترل به میزان $107/24$ درصد افزایش یافته بود. بنابراین با حضور قطعات آنتی‌سنس، تاثیر نامطلوبی بر روی روند رشد سلولی مشاهده نشد.

اندازه‌گیری متابولیت‌ها: به منظور بررسی کینتیک رشد سویه‌ی نوترکیب، باکتری حاوی پلاسمید مربوطه و باکتری کنترل به طور مجزا، در محیط کشت LB سویه نوترکیب در ارلن‌مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت رشد داده شدند. کینتیک رشد باکتری‌ها، میزان مصرف گلوکز به عنوان منبع کربنی، میزان ترشح استات و هم‌چنین میزان اینترفرون بتای انسانی در محیط‌های کشت توصیف شده بررسی گردید. این آزمایش در دمای ۳۷ سانتی‌گراد شروع شده و رشد باکتری تا پایان فاز رشد در همین دما ادامه یافت. پس از رسیدن به تراکم نوری $2/0$ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، تولید پروتئین نوترکیب در سلول‌های میزبان با افزودن ماده IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار، القا شد. به منظور اندازه‌گیری متابولیت‌های نام‌برده، هر یک ساعت یک‌بار نمونه‌گیری انجام شد. با استفاده از این داده‌ها، مقایسه‌ای بین شدت رشد ویژه‌ی باکتری نوترکیب در دو محیط کشت نام‌برده با یک‌دیگر انجام گرفت. نتایج حاصل نشان می‌دهد که شدت رشد ویژه باکتری کنترل شده با قطعات آنتی‌سنس $0/69$ بر ساعت (شکل ۴) و شدت رشد ویژه باکتری کنترل $0/52$ بر ساعت بود که این مساله افزایش $32/69$ درصد را در شدت رشد ویژه‌ی سلولی بر اثر حضور قطعات آنتی‌سنس را نشان می‌دهد.

میزان استات ترشح شده توسط سویه‌ی حاوی قطعات آنتی‌سنس در پایان ساعت ششم کشت به $2/56 \pm 0/04$ گرم بر لیتر رسید که عدد حاصل کاهش $65/98$ درصد را در مقایسه با سویه‌ی کنترل که میزان استات ترشح شده توسط آن $3/0 \pm 88/09$ گرم بر لیتر بود، نشان می‌داد (شکل ۴). هم‌چنین سویه‌ی کنترل شده توسط قطعات آنتی‌سنس برای رسیدن به حداکثر مقدار رشد خود، میزان $3/38$ گرم بر لیتر گلوکز از ۵ گرم گلوکز اولیه‌ی موجود در محیط کشت را مصرف کرد در حالی که این مقدار برای سویه‌ی کنترل در مدت زمان مشابه $3/79$ گرم بر لیتر بود (شکل ۴). به عبارت دیگر سویه‌ی کنترل شده با قطعات آنتی‌سنس، برای رسیدن به حداکثر میزان رشد و تولید خود، میزان $89/18$ درصد گلوکز کم‌تری را در مقایسه با سویه‌ی کنترل مصرف کرد.

شکل ۳. نمودار رشد باکتری ای. کلائی، در گونه‌های حاوی قطعات آنتی‌سنس (خطوط پیوسته) و کنترل (نقطه چین)، در زمان رشد شش ساعته در ارلن‌مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری، از طریق سنجش تراکم سلولی توسط روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر (نانجی) و شدت رشد ویژه‌ی سلولی (آبی).

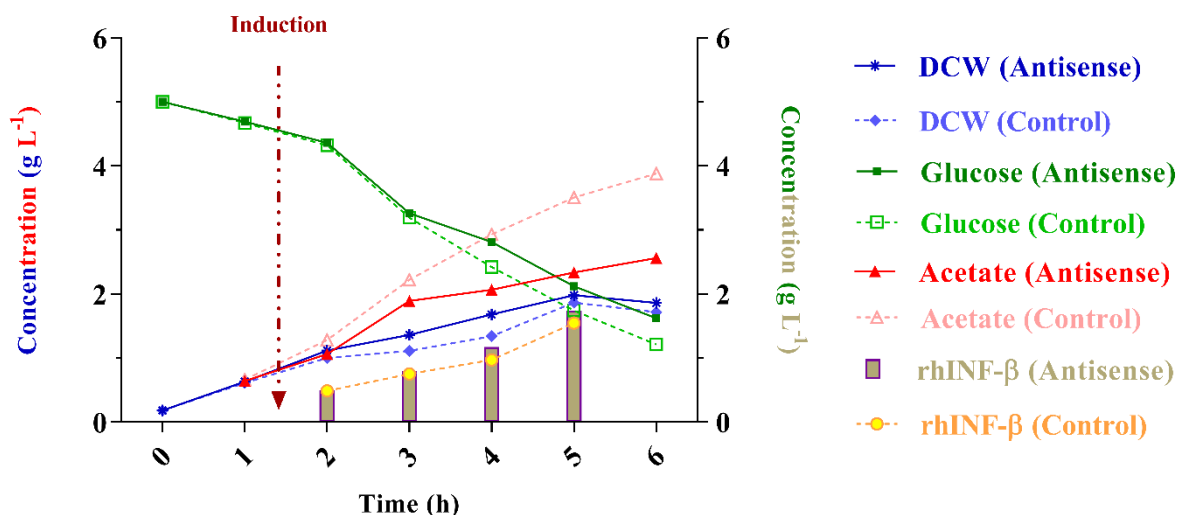


شکل ۴. محاسبه‌ی وزن خشک سلولی: برای اندازه‌گیری وزن خشک سلولی، ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت، در شرایط 7300 جی سانتی‌فیورژ شد. سپس دو مرتبه توسط محلول ایزواسمتیک نرمال سالین $0/9$ درصد (وزنی/حجمی) شسته شد. پس از آن درون یک آون با دمای 90 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا به وزن ثابتی برسد (شکل ۴). میزان وزن خشک نهایی مشاهده شده در سویه‌های حاوی قطعات آنتی‌سنس و کنترل، در پایان ساعت ششم مطالعه، به ترتیب $1/980 \pm 0/034$ گرم بر لیتر و

مولکولی تقریبی ۱۸ کیلو دالتون، صحت وجود اینترفرون بتای نو ترکیب در نمونه‌ها اثبات گردید (شکل ۵).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیمی: نتایج حاصل از سه بار خوانش مستقل میزان فعالیت آنزیم‌های استات کیناز، فسفوترانس استیلاز و پیروات کیناز در سویه‌های کنترل شده با فناوری استات و کنترل در شکل شماره ۶ ارایه گردیده است. بر طبق این یافته‌ها میزان فعالیت آنزیم‌های سه گانه‌ی کنترل شده در سویه‌ی حاوی قطعات آنتی‌سنس به ترتیب ۰/۲۹ (استات کیناز)، ۱۵/۵۲ (فسفوترانس استیلاز) و ۱۱/۴۷ (پیروات اکسیداز) واحد بر میلی‌گرم گزارش شد. در حالی که میزان فعالیت آنزیم‌های نام‌برده در سویه‌ی کنترل به ترتیب ۰/۵۶ (استات کیناز)، ۱۹/۷۵ (فسفوترانس استیلاز) و ۱۶/۵۲ (پیروات اکسیداز) واحد بر میلی‌گرم بود. اعداد مشاهده شده به ترتیب ۵۱/۷۸ درصد (استات کیناز)، ۷۸/۵۸ درصد (فسفوترانس استیلاز) و ۶۹/۴۳ درصد (پیروات اکسیداز) کاهش را در میزان فعالیت آنزیم‌های کنترل شده با فناوری آنتی‌سنس نشان دادند که این امر کارایی فناوری به کار رفته در این مطالعه را نشان می‌دهد. میزان معنی‌داری برای هر کدام از سه آنزیم بررسی شده کم‌تر از یک هزارم ($P < 0.001$) محاسبه گردید (شکل ۶).

بررسی میزان بیان پروتئین نو ترکیب: پلت‌های حاصل از سانتریفیوژ باکتری میزبان، و یا پروتئین‌های خالص شده، با بافر نمونه، مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در آب ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد جوشانده شده و سپس به مدت ۲ دقیقه با شرایط ۱۱۰۰۰ جی سانتریفیوژ گردید. الکتروفورز نمونه‌ها در حضور SDS به شیوه‌ی ارائه شده توسط لملی انجام پذیرفت. (شکل ۵). در شکل نام‌برده به ترتیب از نشان‌گر مولکولی پروتئینی در چاهک شماره ۱، نمونه‌ی داروی استاندارد تهیه شده از شرکت زیست دارو دانش با نام تجاری زیفرون در چاهک شماره ۲، نمونه‌ی پروتئین تولید شده توسط سویه‌ی کنترل شده با فناوری آنتی‌سنس قبل از القا در چاهک شماره ۳، نمونه‌ی پروتئین تولید شده توسط سویه‌ی کنترل شده با فناوری آنتی‌سنس بعد از القا در چاهک شماره ۴، نمونه‌ی پروتئین بیان شده توسط سویه‌ی کنترل بعد از القا در چاهک شماره ۵، استفاده شد. نتایج حاصل از آنالیز میزان بیان پروتئین توسط نرم‌افزار ImageJ نشان داد که میزان داروی اینترفرون بتای نو ترکیب تولید شده توسط سویه‌ی کنترل شده توسط فناوری آنتی‌سنس (۱/۷۳۹ گرم بر لیتر) به میزان ۱۱۲/۴۸ درصد بیش از مقدار تولید شده توسط سویه‌ی کنترل (۱/۵۴۶ گرم بر لیتر) بود. به علاوه با توجه به اندازه‌ی مولکولی مشاهده شده در ژل SDS-PAGE با اندازه‌ی



شکل ۴. میزان تولید توده‌ی زیستی (آبی)، مصرف گلوکز (سبز)، ترشح استات (قرمز)، و تولید اینترفرون بتای نو ترکیب (خاکستری)، در گونه‌ی حاوی قطعات آنتی‌سنس و گونه‌ی کنترل، در زمان رشد شش ساعته در ارلن مایر ۵۰۰ میلی لیتری بر حسب واحد گرم بر لیتر. پیکان قهوه‌ای رنگ نقطه‌ی شروع القای بیان را نشان می‌دهد.

دلیل اشباع شدن چرخه‌ی کربس، قسمت اضافی جریان کربن که از طریق چرخه‌ی گلیکولیز نمی‌تواند به چرخه‌ی کربس راه یابد، وارد چرخه‌ی تولید استات می‌شود [۲۰].

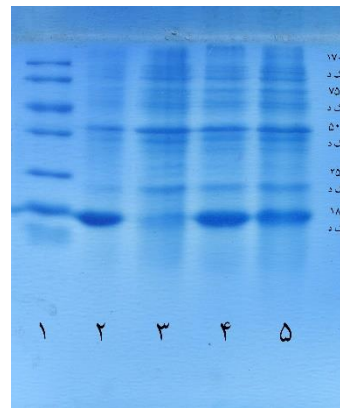
تجمع استات در محیط کشت باعث مهار رشد سلولی می‌گردد. زیرا که استات به عنوان یک جداکننده (Uncoupler)، در جریان حرکت پروتون (Proton motive force)، عمل کرده و به خاطر داشتن بار مثبت به شکل پروتونه از غشای لیپیدی سلول عبور می‌کند و در نتیجه باعث افت pH می‌شود [۲۱].

تولید استات در مسیر استات کیناز-فسفو ترانس استیلاز، با ساخت ATP در سطح سوپسترا با اندازه‌ی مولی برابری با استات همراه می‌باشد. لذا در مواقع اشباع شدن ظرفیت تنفسی سیکل کربس، ساخته شدن استات همراه با تولید انرژی اضافی به عنوان یک درپچه‌ی ایمنی عمل می‌کند تا جریان ورودی اضافی را به سمت تولید متابولیت‌های پیش‌ساز لازم برای ساخته شدن توده‌ی زیستی هدایت کند [۲۲].

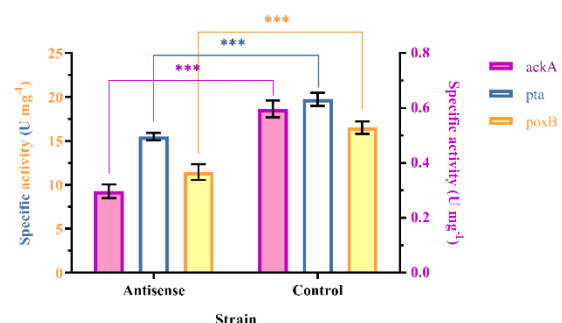
مطالعات پیشین نشان داده است که استیل فسفات، که حاوی یک گروه فسفات با انرژی بالا می‌باشد، به عنوان یکی از ترکیبات واسطه در چرخه‌ی استات یک گروه فسفریل را به آنزیم I سیستم فسفو انول پیرووات یعنی گلوکز-۶- فسفات منتقل می‌کند [۲۳]. به علاوه استیل فسفات به عنوان ناقل ترجیحی گروه فسفریل در برخی از سیستم‌های انتقالی وابسته به پروتئین‌های متصل شونده عمل می‌کند. لذا این احتمال وجود دارد که در برخی واکنش‌های متابولیکی دیگر، استیل فسفات، جایگزین ATP شود. بنابراین سلولی که دچار کمبود منابع کربن یا انرژی باشد، نیاز بیش تری به ترکیبات حاوی فسفات با انرژی بالا دارد [۲۴، ۲۵]. به علاوه نتایج مطالعات پیشین اثبات می‌کند که چرخه‌ی تولید استات برای حفظ فیزیولوژی و بقای سلولی ضروری است [۲۶]. اگر چه محصول نهایی این چرخه، یعنی استات اثرات مضر بر روی سلول میزبان دارد.

در کشت ای. کلای با تراکم سلولی بالا، به منظور به دست آوردن مقادیر بالایی از پروتئین نوترکیب، استفاده از تکنیکی که کنترل متابولیکی دقیق تری نسبت به روش‌های حذف ژنی و یا تغییر مسیرهای متابولیکی را فراهم سازد، امری ضروری به نظر می‌رسد. لذا در این مطالعه، با استفاده از RNA آنتی سنس به عنوان یکی از ابزارهای مهندسی متابولیک، برای تنظیم چرخه‌ی استات استفاده شد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که سویه‌ی ای. کلای که در آن چرخه‌ی استات تنظیم شده، در مقایسه با سویه‌ی وحشی، روند رشد سریع تر و تراکم سلولی نهایی بیشتری داشت.

این یافته‌ها با نتایج حاصل از مطالعات قبلی که در آن‌ها از فناوری آنتی سنس برای مهار ترشح استات در حین بیان یک



شکل ۵. آنالیز بیان ژن کد کننده ی اینترفرون بتای نوترکیب انسانی بر روی ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE). چاهک شماره ی ۱، حاوی نشان گر وزن مولکولی، چاهک شماره ی ۲ حاوی نمونه ی داروی استاندارد تهیه شده از شرکت زیست دارو دانش با نام تجاری زیفرن، چاهک شماره ی ۳، حاوی نمونه ی پروتئین تولید شده توسط سویه ی کنترل شده با فناوری آنتی سنس قبل از القا، چاهک شماره ی ۴، حاوی نمونه ی پروتئین تولید شده توسط سویه ی کنترل شده با فناوری آنتی سنس بعد از القا، و چاهک شماره ی ۵، حاوی نمونه ی پروتئین بیان شده توسط سویه ی کنترل بعد از القا می‌باشد. باند اضافی با وزن مولکولی تقریبی ۱۸ کیلو دالتون، پس از افزودن ماده ی القاگر، که در شکل نشان داده شده است، نشان دهنده ی وجود اینترفرون بتای نوترکیب انسانی می‌باشد.



شکل ۶. میزان فعالیت آنزیمی آنزیم‌های استات کیناز آ (بنفش و یاسی)، فسفو ترانس استیلاز (آبی و سفید) و پیرووات اکسیداز بی (نارنجی و زرد) در سویه‌های حاوی قطعات آنتی سنس (سمت چپ) و کنترل (راست) بر حسب واحد بر میلی گرم. میزان معنی داری برای هر کدام از سه آنزیم بررسی شده کمتر از یک هزارم ($P < 0.001$) محاسبه گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

با وجود مطالعات فراوانی که در طول چند دهه‌ی اخیر بر روی ای. کلای صورت گرفته است، نقش فیزیولوژیک چرخه‌ی استات هنوز به طور واضح، مشخص نشده است. مطالعات قبلی نشان داده است که ترشح استات، نه تنها در شرایط بی‌هوازی، در قالب تخمیر اسیدهای آلی مخلوط (Mixed acid fermentation) صورت می‌گیرد [۱۹]، بلکه در شرایط هوازی نیز پدیده‌ی ترشح استات مشاهده می‌شود. زیرا در صورتی که میزان گلوکز موجود در محیط کشت از حد نیاز فراتر رود، به

ذاتی استات کیناز استفاده شده بود [۲۷] همخوانی داشت. در عین حال نتایج حاصل تا حدودی با داده‌های به دست آمده از سایر مطالعات که در آن‌ها از سویه‌ای با آنزیم فسفوترانس استیلاز جهش‌یافته استفاده شده بود [۲۸] و یا سویه‌های دیگری که از نظر متابولیکی تعدیل شده بودند و رشد آن‌ها با تقایصی همراه بود [۲۹، ۲۴] اختلاف داشت. علت این پدیده احتمالاً ناشی از تنظیم نسبی چرخه‌ی استات با استفاده از فناوری RNA آنتی‌سنس بر علیه آنزیم‌های عمده‌ی دخیل در چرخه‌ی تولید استات می‌باشد که اجازه می‌دهد تا نقش حیاتی چرخه‌ی نام برده در بقا و حفظ فیزیولوژی در سلول‌های میزبان حفظ شود. از آن جایی که میزان بیان ژن‌های استات کیناز، فسفوترانس استیلاز و پیرووات کیناز، وابسته به مرحله‌ی رشد و فیزیولوژی سلول می‌باشد [۲۴، ۳۰]، به دلیل تراکم بالای سلول میزبان (حتی در مورد سلول‌های نوترکیب حاوی قطعات آنتی‌سنس) و در نتیجه بالاتر بودن میزان کلی mRNA نسخه‌برداری شده، حدس زده شد که سرکوب نسبی ژن‌های استات کیناز، فسفوترانس استیلاز و پیرووات کیناز به کمک فناوری آنتی‌سنس، منجر به کاهش میزان تجمع استات خواهد شد. بنابراین، برای اثبات این فرضیه، فعالیت آنزیمی آنزیم‌های استات کیناز، فسفوترانس استیلاز و پیرووات کیناز سنجیده شد تا تنظیم منفی ژن‌های نام‌برده توسط mRNA آنتی‌سنس در سطح پروتئین و در نتیجه به طور غیر مستقیم در سطح ژنتیکی اثبات شود. سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های استات کیناز، فسفوترانس استیلاز و پیرووات کیناز، در سویه‌ی نوترکیب در مقایسه با سویه‌ی کنترل کاهشی نسبی را نشان داد. بنابراین، با کاهش نسبی و مقایسه‌ای سطح ترجمه و به طور غیر مستقیم نسخه‌برداری از ژن‌های هدف، تنظیم منفی نسبی ژن‌های مورد نظر بر اثر بیان قطعات آنتی‌سنس تایید شد.

یکی از اهداف انجام پژوهش حاضر بررسی عواقب ناشی از غیر فعال‌سازی نسبی مسیر استات (که این پدیده‌ی مهار نسبی تنها با به کارگیری فناوری آنتی‌سنس میسر خواهد بود و اتفاقاً نسبی بودن این نوع دست‌ورزی یکی از مهم‌ترین تفاوت‌های این فناوری با سایر شیوه‌های مهندسی متابولیک برای مهار ترشح استات می‌باشد) و اثرات احتمالی آن بر روی فیزیولوژی سلول میزبان می‌باشد. چرا که مطالعات پیشین نشان می‌دهند که چرخه‌ی استات اثرات دوطرفه‌ای بر روی فیزیولوژی سلولی دارد. لذا در صورتی که ساخته شدن و ترشح استات به طور هم‌زمان، تأثیراتی مثبت و منفی بر روی فیزیولوژی سلول بر جای می‌گذارد، تنظیم جزیی این چرخه می‌تواند برخی ویژگی‌های سلولی را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین در زمان طراحی پلاسمید مربوطه، از یک پروموتور ضعیف نظیر پروموتور

پس از القای بیان اینترفرون بتا، سویه‌ی نوترکیب نسبتاً سرعت رشد بالاتری را در مقایسه با سویه‌ی کنترل از خود نشان داد. این الگو تا حدی متفاوت با شرایط قبل از القای بیان اینترفرون بتا بود. افزایش روند رشد سلولی در هنگام تولید اینترفرون بتا ناشی از دست‌ورزی فیزیولوژی سلول به کمک RNA آنتی‌سنس بود. در حالی که سویه‌ی نوترکیب در شرایط قبل از القا سرعت رشد تقریباً مشابهی را در مقایسه با سویه‌ی کنترل از خود نشان می‌داد.

به نحو جالب توجهی، تولید استات در سویه‌ی حاوی قطعات آنتی‌سنس در هنگام تولید اینترفرون بتای نوترکیب در مقایسه با سویه‌ی کنترل، کاهش یافته بود. این نتایج با نتایج مشاهده شده در شرایط بدون القا تفاوت داشت، زیرا که میزان تولید استات توسط دو سویه‌ی نام‌برده اختلاف چندانی را با یک‌دیگر نشان نمی‌داد. پدیده‌ی فوق به این صورت تفسیر می‌شود که روند کاهش ترشح استات ناشی از شرایطی مشابه با روند رشد سلولی، و تولید پروتئین در سویه‌ی نوترکیب، یعنی کنترل نسبی مسیر تولید استات توسط سه قطعه‌ی آنتی‌سنس موجود در محیط بود. استات در مسیر استات کیناز-فسفو ترانس استیلاز در دو مرحله و به این ترتیب تولید می‌شود [۳۲، ۳۱] که نخست استیل کوآنزیم آ به همراه یک فسفات آلی تحت یک واکنش آنزیمی که توسط آنزیم استات کیناز با ثابت تعادل $0/00926$ انجام می‌گیرد به استیل فسفات و کوآنزیم آ تبدیل می‌شوند و در ادامه و در طی مرحله‌ی دوم، استیل فسفات به همراه ADP تحت یک واکنش آنزیمی که توسط آنزیم فسفو ترانس استیلاز با ثابت تعادل ۱۶۱ انجام می‌گیرد به استات و ATP بدل می‌گردند. با مقایسه ثابت تعادل در واکنش‌های مرحله‌ی اول و دوم مشخص می‌شود که واکنش مرحله‌ی دوم تمایل به خود به خود بودن بیشتری در مقایسه با مرحله‌ی اول دارد. به علاوه فعالیت آنزیم فسفوترانس استیلاز ۳-۴ برابر بالاتر از آنزیم استات کیناز می‌باشد [۱۷].

نکته‌ی قابل توجه دیگر این که کاهش روند تجمع استات از همان مراحل آغازین کشت آغاز گردید (شکل ۴). این پدیده ثابت می‌کند که زمان‌بندی تنظیم منفی چرخه‌ی استات، به همان گونه‌ای که در نظر بود، انجام پذیرفته است. چرا که در این مطالعه

پروتئین نوترکیب دارویی استفاده شده بود [۲۷] همخوانی داشت. در عین حال نتایج حاصل تا حدودی با داده‌های به دست آمده از سایر مطالعات که در آن‌ها از سویه‌ای با آنزیم فسفوترانس استیلاز جهش‌یافته استفاده شده بود [۲۸] و یا سویه‌های دیگری که از نظر متابولیکی تعدیل شده بودند و رشد آن‌ها با تقایصی همراه بود [۲۹، ۲۴] اختلاف داشت. علت این پدیده احتمالاً ناشی از تنظیم نسبی چرخه‌ی استات با استفاده از فناوری RNA آنتی‌سنس بر علیه آنزیم‌های عمده‌ی دخیل در چرخه‌ی تولید استات می‌باشد که اجازه می‌دهد تا نقش حیاتی چرخه‌ی نام برده در بقا و حفظ فیزیولوژی در سلول‌های میزبان حفظ شود. از آن جایی که میزان بیان ژن‌های استات کیناز، فسفوترانس استیلاز و پیرووات کیناز، وابسته به مرحله‌ی رشد و فیزیولوژی سلول می‌باشد [۲۴، ۳۰]، به دلیل تراکم بالای سلول میزبان (حتی در مورد سلول‌های نوترکیب حاوی قطعات آنتی‌سنس) و در نتیجه بالاتر بودن میزان کلی mRNA نسخه‌برداری شده، حدس زده شد که سرکوب نسبی ژن‌های استات کیناز، فسفوترانس استیلاز و پیرووات کیناز به کمک فناوری آنتی‌سنس، منجر به کاهش میزان تجمع استات خواهد شد. بنابراین، برای اثبات این فرضیه، فعالیت آنزیمی آنزیم‌های استات کیناز، فسفوترانس استیلاز و پیرووات کیناز سنجیده شد تا تنظیم منفی ژن‌های نام‌برده توسط mRNA آنتی‌سنس در سطح پروتئین و در نتیجه به طور غیر مستقیم در سطح ژنتیکی اثبات شود. سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های استات کیناز، فسفوترانس استیلاز و پیرووات کیناز، در سویه‌ی نوترکیب در مقایسه با سویه‌ی کنترل کاهشی نسبی را نشان داد. بنابراین، با کاهش نسبی و مقایسه‌ای سطح ترجمه و به طور غیر مستقیم نسخه‌برداری از ژن‌های هدف، تنظیم منفی نسبی ژن‌های مورد نظر بر اثر بیان قطعات آنتی‌سنس تایید شد.

یکی از اهداف انجام پژوهش حاضر بررسی عواقب ناشی از غیر فعال‌سازی نسبی مسیر استات (که این پدیده‌ی مهار نسبی تنها با به کارگیری فناوری آنتی‌سنس میسر خواهد بود و اتفاقاً نسبی بودن این نوع دست‌ورزی یکی از مهم‌ترین تفاوت‌های این فناوری با سایر شیوه‌های مهندسی متابولیک برای مهار ترشح استات می‌باشد) و اثرات احتمالی آن بر روی فیزیولوژی سلول میزبان می‌باشد. چرا که مطالعات پیشین نشان می‌دهند که چرخه‌ی استات اثرات دوطرفه‌ای بر روی فیزیولوژی سلولی دارد. لذا در صورتی که ساخته شدن و ترشح استات به طور هم‌زمان، تأثیراتی مثبت و منفی بر روی فیزیولوژی سلول بر جای می‌گذارد، تنظیم جزیی این چرخه می‌تواند برخی ویژگی‌های سلولی را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین در زمان طراحی پلاسمید مربوطه، از یک پروموتور ضعیف نظیر پروموتور

این حال انرژی سلولی خود را به نحو کارآمدتری صرف افزایش بیان محصول نوترکیب می‌کنند. به علاوه می‌توان حدس زد که دست‌ورزی متابولیک سلول به کمک فناوری آنتی سنس به دلیل توانایی در کنترل کردن دقیق‌تر چرخه‌ی استات میزان انرژی بیش‌تری را برای سلول‌های میزبان فراهم می‌آورد. اگر چه ساز و کار دقیق این پدیده هنوز به طور کامل مشخص نشده است.

پژوهش حاضر نشان داد که بهبود روند رشد سلول میزبان و افزایش تولید پروتئین نوترکیب دارویی تنها به کاهش میزان تجمع استات مربوط نمی‌شود. از سمتی دیگر اگر چه که میزان کاهش طرح استات به اندازه‌ی برخی از نتایج گزارش شده توسط مطالعات پیشین نبود، با این حال میزان بازده تولید محصول مورد نظر بیش‌تر از گزارش‌های نام‌برده بود [۳۳،۲۹]. به علاوه سلول‌های حاوی قطعات آنتی سنس در حالت بعد از القا در مقایسه با سلول‌های فاقد آن، سرعت رشد بالاتری داشته و میزان استات تولیدی توسط آن‌ها نیز کم‌تر بود. میزان ترشح استات مشاهده شده در پژوهش حاضر پایین‌تر از غلظت‌هایی از استات بود که برای سلول، سمی محسوب می‌شود [۲۱].

برخی پژوهشگران با استفاده از روش‌هایی گوناگون از طریق کاهش دادن شدید سطوح استات موجود در محیط موفق به بهبود بخشیدن روند رشد سلول میزبان و افزایش تولید پروتئین هترولوگ مربوطه شده‌اند. با این حال، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که مشکل نه تنها در حضور مقادیر زیادی استات در محیط می‌باشد، بلکه مشکل مهم‌تر تداخل در عملکرد کارآمد چرخه‌های متابولیکی گوناگون می‌باشد. به علاوه مطالعات گوناگون صورت گرفته در سه دهه‌ی اخیر نشان می‌دهند که کنترل معضل ترشح استات اضافی کار آسانی نیست. اگر چه با حذف ساده‌ی یکی از ژن‌های دخیل در چرخه‌ی استات ممکن است بتوان میزان ترشح استات را کاهش داد، اما در عوض محصولات ناخواسته‌ی جانبی دیگری تولید می‌شوند. لذا شاید لازم باشد رویکردی چند قسمتی را به کار گرفت که در آن به طور هم‌زمان به چندین ژن، چگونگی تنظیم چرخه‌های گوناگون متابولیکی، چرخه‌های آنابروتیک، سطح کوفاکتورهای گوناگون، مسیرهای تولید استات و مصرف ATP، توجه نمود. اگرچه پیش‌بینی عواقب احتمالی ناشی از دست‌ورزی هم‌زمان چندین ژن سخت و یا شاید ناممکن است. در اغلب موارد تهیه‌ی یک سویه‌ی مولد با همان ویژگی‌های پیش‌بینی شده و یا مشاهده شده در مقیاس آزمایشگاهی، برای استفاده در مقیاس‌های بالاتر به دشواری امکان‌پذیر است. زیرا که در یک شبکه‌ی مولکولی پیچیده، پیش‌بینی تاثیرات احتمالی ناشی از یک دست‌ورزی ژنتیکی چه از نظر کیفی و چه از نظر کمی دشوار است [۱۷]. لذا، امروزه توجه پژوهشگران در

از پروموتور ذاتی استات کیناز استفاده شد که این پروموتور وابسته به فاز رشد سلولی میزبان می‌باشد. این پدیده (قابلیت زمان‌بندی کردن) یکی از نقاط قوت و بارز فناوری آنتی سنس به عنوان یک روش دست‌ورزی متابولیک محسوب می‌گردد. اگر چه که مقدار کاهش ترشح استات بر اثر استفاده از فناوری آنتی سنس کم‌تر از مقادیر گزارش شده توسط برخی مطالعات دیگر [۳۴،۳۳،۲۹] بود، در عین حال اثرات دست‌ورزی متابولیک بر روی میزان بیان پروتئین نوترکیب چشم‌گیر بود. در خلال رشد کلی سلول میزبان، سویه‌ی نوترکیب میزان اینترفرون بتای بیش‌تری در مقایسه با سویه‌ی کنترل از خود نشان داد (شکل ۵).

نکته‌ی قابل توجه دیگر این که تنظیم منفی چرخه‌ی استات به کمک فناوری آنتی سنس در سویه‌ی ای. کلای BL21 (DE3)، که از مشتقات ای. کلای سویه‌ی B می‌باشد به نحوی کارآمدی انجام پذیرفت. سویه‌ی B ای. کلای در مقایسه با سویه‌های K12 مثل JM109، حتی در شرایطی که مقدار گلوکز آن بالا باشد مقادیر استات کم‌تری تولید می‌کنند [۳۶،۳۵]. مطالعات به عمل آمده نشان داده است که میزان استات ترشح شده توسط سویه‌های گوناگون ای. کلای در یک کشت ساده می‌تواند تا سه برابر با یک‌دیگر اختلاف داشته باشد [۲۰]. همان‌گونه که ذکر شد این اختلاف ناشی از فعالیت بیش‌تر چرخه‌ی گلیوکسیلات به عنوان یک مسیر جایگزین برای مصرف شدن استیل کوآ و نیز فعالیت بیش‌تر آنزیم ایزو سیترات لیاز (ICL) در سویه‌ی BL21، در مقایسه با سویه‌های K12 مثل JM109 بوده و ناشی از بروز جهش‌های احتمالی در یکی از دو آنزیم دخیل در چرخه‌ی تولید استات یعنی استات کیناز و فسفو ترانس استیلراز نمی‌باشد [۳۷]. نتایج پژوهش حاضر شواهدی بیش‌تر مبنی بر تمایل ذاتی کم‌تر سویه‌ی BL21، به تولید کردن استات حتی در مقادیر بالای گلوکز را ارائه می‌کند. اگر چه در این پروژه از پروموتور ذاتی استات کیناز برای زمان‌بندی و تنظیم دقیق چرخه‌ی استات استفاده شد، به نظر می‌رسد که مکانیسم تنظیم منفی ناشی از فناوری آنتی سنس کاملاً پیچیده بوده و تحت تاثیر عملکرد فاکتورهای گوناگونی قرار دارد. به علاوه بررسی روند میزان مصرف گلوکز به عنوان منبع کربن، نشان داد که سویه‌ی حاوی قطعات آنتی سنس اگر چه که میزان اینترفرون بتای بیش‌تری را در مقایسه با سویه‌ی کنترل تولید کرد، در مقابل مقدار گلوکز کم‌تری را در مقایسه با سویه‌ی کنترل مصرف نمود. محاسبه‌ی میزان مصرف گلوکز در دو سویه‌ی مختلف، نشان داد که سویه‌ی حاوی قطعات آنتی سنس با این که مقدار منبع کربنی (گلوکز) کم‌تری از سلول‌های فاقد آنتی سنس (سویه‌ی کنترل) مصرف می‌کنند، با

[5] Kaur J, Kumar A, Kaur J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *Int J Biol Macromol* 2018; 106: 803-822.

[6] Jia B, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Current status and future perspectives. *Open Biol* 2016; 6: 160196.

[7] Slouka C, Kopp J, Spadiut O, Herwig C. Perspectives of inclusion bodies for bio-based products: Curse or blessing? *Appl Microbiol Biotechnol* 2019; 103: 1143-1153.

[8] Anné J, Maldonado B, Van Impe J, Van Mellaert L, Bernaerts K. Recombinant protein production and streptomycetes. *J Biotechnol* 2012; 158: 159-167.

[9] Schwarz H, Schmittner M, Duschl A, Horejs-Hoec J. Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells. *PLoS One* 2014; 9: e113840-e113840.

[10] Zhang L, Chou CP, Moo-Young M. Disulfide bond formation and its impact on the biological activity and stability of recombinant therapeutic proteins produced by *Escherichia coli* expression system. *Biotech Adv* 2011; 29: 923-929.

[11] Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotech Adv* 2009; 27: 297-306.

[12] Anane E, López C DC, Neubauer P, Cruz Bournazou MN. Modelling overflow metabolism in *Escherichia coli* by acetate cycling. *Biochem Eng J* 2017; 125: 23-30.

[13] Enjalbert B, Millard P, Dinclaux M, Portais JC, Létisse F. Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. *Sci Rep* 2017; 7: 42135.

[14] De Mey M, De Maeseneire S, Soetaert W, Vandamme E. Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *J Ind Microb Biotechnol* 2007; 34: 689-700.

[15] Eiteman A, Altman E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trend Biotechnol* 2006; 24: 530-536.

[16] Bernal V, Castaño-Cerezo S, Cánovas M. Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: Carbon overflow, pathogenicity, and beyond. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 100: 8985-9001.

[17] Zeng H, Yang A. Modelling overflow metabolism in *Escherichia coli* with flux balance analysis incorporating differential proteomic efficiencies of energy pathways. *BMC Syst Biol* 2019; 13: 3.

[18] Hallaji M, Parhamfar M, Raoufi E, Abtahi H. Cloning, expression and purification of *Escherichia coli* modified phtase. *Koomesh* 2017; 20: 145-151. (Persian).

[19] Morzhakova AA, Skorokhodova AY, Gulevich AY, Debabov VG. Recombinant *Escherichia coli* strains deficient in mixed acid fermentation pathways and capable of rapid aerobic growth on glucose with a reduced crabtree effect. *Appl Biochem Microbiol* 2013; 49: 113-119.

[20] Xu B, Jahic M, Blomsten G, Enfors SO. Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 51: 564-571.

[21] Luli GW, Strohl WR. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl Env Microbiol* 1990; 56: 1004-1011.

[22] Matsuoka Y, Shimizu K. Catabolite regulation analysis of *Escherichia coli* for acetate overflow mechanism and co-consumption of multiple sugars based on systems biology approach using computer simulation. *J Biotechnol* 2013; 168: 155-173.

[23] Deutscher J, Francke C, Postma PW. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 939-1031.

[24] McCleary WR, Stock JB. Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem* 1994; 269: 31567-31572.

[25] Shimizu K, Matsuoka Y. Regulation of glycolytic flux and overflow metabolism depending on the source of energy generation for energy demand. *Biotech Adv* 2019; 37: 284-305.

[26] Bakhtiari N, Mirshahi M, Babaeipour V, Maghsoudi N, Tahzibi A. Down regulation of ackA-pta pathway in *Escherichia coli* BL21 (DE3): A step toward optimized recombinant protein expression system. *Jundishapur J Microbiol* 2014; 7: e8990. (Persian).

زمینه مهندسی متابولیک به جای افزایش بیان بی‌رویه و روش‌های حذف ژنی، به طرف تنظیم دقیق بیان ژن مورد نظر معطوف شده است. نیاز به داشتن یک مدل مطمئن که قابلیت کمی شدن نیز داشته باشد بیش از گذشته احساس می‌شود. لذا استفاده از دانش آنالیز فلاکس‌های متابولیک، در بررسی چگونگی رفتار سویه‌ی نوترکیب ساخته شده در این مطالعه تحت شرایط عملیاتی گوناگون منطقی به نظر می‌رسد. زیرا که یک مدل متابولیکی امکان پیش‌بینی بهتر و دقیق‌تر دست‌ورزی‌های ژنتیکی را فراهم ساخته و امکان دستیابی به سویه‌ای از ای. کلای با فنوتیپ مورد نظر را میسر می‌کند.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که با استفاده از رویکردی مبتنی بر مهندسی متابولیک، با خاموش کردن سه ژن عمده‌ی دخیل در مسیر ساخت استات شامل استات کیناز، فسفوترانس استیلاز و پیرووات کیناز، می‌توان میزان پروتئین نوترکیب تولید شده در سویه‌ی ای. کلای را افزایش داد. همچنین با دست‌ورزی متابولیک توصیف شده، میزان مصرف نهایی گلوکز کم‌تر شده و روند رشد کلی سلولی، میزان وزن خشک سلولی و شدت رشد ویژه‌ی سلول نیز افزایش می‌یابد. روش مهندسی متابولیک به کار گرفته شده در این مطالعه، برای مهار ترشح استات را می‌توان در مورد سایر سویه‌های باکتریایی به ویژه گونه‌های دیگر ای. کلای، هم‌چنین سایر سامانه‌های بیانی و تولید فرآورده‌های نوترکیب دیگر نیز آزمایش نمود. هم‌چنین می‌توان با انجام آنالیزهای پروتئومیک، ژنومیک و متابولومیک باکتری در تراکم‌های سلولی مختلف به ویژه بعد از القا، اتفاقات داخل سلول در هنگام تولید اینترفرون بتای نوترکیب و ترشح استات را به نحو کامل‌تری بررسی نمود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با حمایت‌های مادی و معنوی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام یافته است (شماره طرح تحقیقاتی ۱۰۵۹۹-۳۶-۰۱-۹۴).

منابع

[1] Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol* 2018; 36: 1136-1145.

[2] Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol* 2007; 127: 335-347.

[3] Collins JH, Young EM. Genetic engineering of host organisms for pharmaceutical synthesis. *Curr Opin Biotechnol* 2018; 53: 191-200.

[4] Rahimpour SA, Najaei A, Mahboudi F. Efficiency of translation and post-translation regulatory genes in optimization of tissue plasminogen activator gene expression. *Koomesh* 2015; 17: 196-203. (Persian).

cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant. *Appl Env Microbiol* 1990; 56: 1296-1302.

[34] Contiero J, Beatty C, Kumari S, DeSanti CL, Strohl WR, Wolfe A. Effects of mutations in acetate metabolism on high-cell-density growth of *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2000; 24: 421-430.

[35] Shiloach J, Kaufman J, Guillard AS, Fass R. Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnol Bioeng* 1996; 49: 421-428.

[36] Marisch K, Bayer K, Cserjan-Puschmann M, Luchner M, Striedner G. Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microb Cell Fact* 2013; 12: 58.

[37] Van De Walle M, Shiloach J. Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation. *Biotechnol Bioeng* 1998; 57: 71-78.

[27] Kim JY, Cha HJ. Down-regulation of acetate pathway through antisense strategy in *Escherichia coli*: Improved foreign protein production. *Biotechnol Bioeng* 2003; 83: 841-853.

[28] Chang DE, Shin S, Rhee JS, Pan JG. Acetate metabolism in a pta mutant of *Escherichia coli* W3110: Importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival. *J Bacteriol* 1999; 181: 6656-6663.

[29] Hahm DH, Pan J, Rhee JS. Characterization and evaluation of a pta (phosphotransacetylase) negative mutant of *Escherichia coli* HB101 as production host of foreign lipase. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994; 42: 100-107.

[30] Kleman GL, Strohl WR. Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. *Appl Env Microbiol* 1994; 60: 3952-3958.

[31] Wolfe AJ. The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69: 12-50.

[32] Castano-Cerezo S, Pastor J, Renilla S, Bernal V, Iborra J, Canovas M. An insight into the role of phosphotransacetylase (pta) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 2009; 8: 54.

[33] Bauer KA, Ben-Bassat A, Dawson M, De La Puente VT, Neway JO. Improved expression of human interleukin-2 in high-

Effects of ackA, pta and poxB inhibition by antisense RNA on acetate excretion and recombinant beta interferon expression in Escherichia coli

Mohammad Hossein Morowvat (Ph.D)^{*2,1}

1 - Pharmaceutical Sciences Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

2 - Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

* Corresponding author. +98 71 36268927 mhmorowvat@sums.ac.ir

Received: 5 Jul 2019; Accepted: 24 Nov 2019

Introduction: Escherichia coli (E.coli) is one of the most widely used hosts for the production of recombinant proteins. The main problem in getting high product yields and productivity is the accumulation of acetic acid (acetate) as an unwanted metabolic by-product. In this study, an antisense-based strategy as a metabolic engineering approach was employed to hamper the acetate excretion problem.

Materials and Methods: A recombinant plasmid containing the encoding genes for human recombinant interferon beta (rhINF- β) and three antisense oligonucleotides against acetate kinase, phosphotransacetylase and pyruvate oxidase B was designed. The effects of recombinant plasmid on the cell physiology, rhINF- β production and acetate excretion were studied in E. coli.

Results: The mRNA levels of the targeted enzymes were lowered in antisense-regulated cells compared to the control cells. The concentration of acetate in culture media was decreased due to the constructed plasmid. The expression of antisense RNA did not affect the cell growth, negatively. Besides, the rhINF- β production was enhanced in antisense-regulated strain compared to the control plasmid without antisense genes.

Conclusion: Application of an antisense strategy on the acetate pathway was successful in metabolically engineering E. coli. This enhancement of production yield by antisense technology suggests that this strategy may be successfully applied to high cell density fermentations of E. coli expression system to overexpress other recombinant proteins.

Keywords: Escherichia Coli, Recombinant Proteins, Acetic Acid, Antisense Technology, Interferon Beta