Current Biolinguistics

Firouzi A.R.[1]*, Sadeghi M.[2] and Mirmortazavi I.[3]

[1] Dept. of General Linguistics, Allameh Tabataba'i University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Dept. of Linguistics, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

[3] Dept. of Translation Studies, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Biolinguistics is an interdisciplinary science delving into the fundamentals of language faculty and its evolutionary process in the humankind; it also covers brain mechanisms, underlying genes, and its emergence in the humankind. To do so, the interactions between mind and brain have to be examined, and the features of human language (Faculty of Language in Narrow sense-FLN) should be determined. This paper touches upon two issues regarding language: its origin and diversity. Using the most recent biological achievements as to evolution and growth, and within P&P grammatical framework, the issues of origin and diversity are explained. Human language is an internal computational system, regulated by a recursive operator, yielding a hierarchical structure. Language is shaped with the help of sensory and motor subsystems. This paper also deals with the research programs on gene FOXP2 and their results. The authors aim to show how the evo-mutational emergence of this recursive system benefits from the research studies on evolution and growth. Finally, it is found out that some relatively fast changes in human biological structure have given birth to the faculty of language.

Key words: biolinguistics, principles and parameters (P&P) theory, computational system, recursive operator, $FOXP_2$

تدابیر لازم برای بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان و تخلیص آنها

صدیقه فابریکی اورنگ

قزوین، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه تولید و اصلاح نباتات

چکیده

استفاده از گیاهان مهندسی شده به عنوان راکتورهای زیستی تولید پروتئین‌های هترولوگ، جایگزینی بسیار مناسب برای سیستم های بیانی متداول کشت‌های سلولی پستانداران و سیستم‌های حیوانی تراریخته هستند. برای تولید کارآمد پروتئین‌های نوترکیب، انتخاب گونه میزبان بسیار اهمیت دارد که در این خصوص انتخاب گونه میزبان وابسته به نوع پروتئین نوترکیب، سیکل زندگی میزبان و عملکرد آن، هزینه‌های نگهداری و افزایش مقیاس تولید می‌باشد. از مهم‌ترین مزایای سیستم‌های بیانی مبتنی بر گیاهان می‌توان به مقرون به صرفه بودن سیستم‌های گیاهی، عدم آلودگی پروتئین‌های نوترکیب مشتق شده از گیاهان با میکروارگانیسم-های بیماریزای انسانی بدلیل عدم میزبانی گیاهان برای عوامل بیماریزای انسانی، آسانی و کم هزینه بودن استحصال و تخلیص پروتئین‌های نیازمند پردازش‌های پایین دستی در گیاهان و انجام بیشتر تغییرات پس ترجمه‌ای مورد نیاز برای پایداری و فعالیت پروتئین توسط گیاهان اشاره کرد.

واژه های کلیدی: بیوراکتور، پروتئین‌های هترولوگوس، تراژن، سیستم های بیانی

پست الکترونیکی: s.ourang910@gmail.com

مقدمه

به دلیل افزایش کاربرد داروهای زیستی و آنزیم‌های صنعتی، تقاضا برای توسعه سیستم‌های جدید و ایمن تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس وسیع نیز افزایش می‌یابد. پیشرفت در تکنولوژی DNA نوترکیب سبب توسعه تعداد متنوعی از سیستم‌های تولید مبتنی بر موجودات مختلف و انواع سلول ها نظیر کشت سلول‌های پستانداران و سیستم‌های مبتنی بر تخمیر باکتریایی و مخمر برای تولید پروتئین‌های هترولوگ به صورت تجاری شده است. تولید یک پروتئین خارج از میزبان طبیعی‌اش تولید پروتئین هترولوگ (Heterologous protein) نامیده می‌شود.

ابزارهای زیست شناسی ملکولی در عبور از موانع گونه‌ای و تولید پروتئین‌های موردنظر در گونه‌های انتخاب شده کمک قابل توجهی کرده است. ابزارهای تولید پروتئین‌های نوترکیب شامل یک ژن یا cDNA کد کننده پروتئین موردنظر، ناقل مناسب و یک سیستم زیست شناختی یا بیانی، با قابلیت رونویسی و ترجمه پروتئین برخاسته تراژن (Transgene) است. یک سیستم بیانی با ارزش باید قابلیت تولید پروتئین هدف با آرایش فضایی صحیح و بازدهی بالای تولید را داشته باشد. همچنین کاربرد و نگه‌داری آن باید آسان، ایمن و مقرون به صرفه بوده، پردازش پائین دستی (downstream processing) ساده‌ای فراهم کند (۲۳). استفاده از سیستم‌های پروکاریوتی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب نسبتا ساده و نگهداری آنها آسان بوده و از لحاظ اقتصادی نیز مقرون به صرفه هستند ولی قادر به انجام تغییرات پس از ترجمه (post-translational modifications, PTMs) نیستند. بنابراین سلول‌های پروکاریوتی تنها برای تولید پروتئین‌هایی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند که PTMs برای فعالیت پروتئین ضروری نباشد. در مقابل، سیستم‌های یوکاریوتی قادر به انجام PTMs هستند، ولیکن اداره کردن چنین سیستم‌های تولید مستلزم هزینه زیادی و از طرف دیگر دوره رشد آنها طولانی‌تر است. برای غلبه بر بسیاری از این محدودیت‌ها گیاهان به عنوان میزبان بالقوه برای تولید پروتئین های هترولوگوس مد نظرند.

راکتورهای زیستی گیاهی: استفاده از گیاهان مهندسی شده به عنوان راکتورهای زیستی تولید پروتئین‌های هترولوگ، جایگزینی بسیار مناسب برای سیستم های بیانی متداول هستند. کارخانه‌های گیاهی تولید پروتئین می‌توانند پروتئین‌های نوترکیب فعال و سالمی در مقیاس وسیع برای کاربردهای دارویی، صنعتی یا تحقیقاتی تولید کنند. گیاهان احتیاجات رشدی ساده‌ای مانند نور آفتاب، آب، CO_2 و مواد معدنی دارند، از سوی دیگر می‌توانند به آسانی از طریق مهندسی ژنتیک دستکاری شوند. همچنین تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان می‌تواند ۱۰ الی ۱۵ برابر ارزان تر از سیستم‌های مبتنی بر باکتری‌ها باشد و برای اینکه سیستم راکتور زیستی مبتنی بر گیاه از لحاظ اقتصادی مورد قبول باشد میزان بیان باید بیش از ۵٪ پروتئین محلول کل (TSP) باشد تا ۵-۰٫۵ گرم پروتئین نوترکیب در هر کیلوگرم برگ را فراهم کند (۶). از طرف دیگر بسیاری از نگرانی‌های مربوط به آلودگی از کشت‌های سلولی پستانداران و سیستم‌های حیوانی تراریخته در مورد کاربرد سیستم‌های مبتنی بر گیاه گزارش نشده است. علاوه بر این گیاهان توانایی و ظرفیت تولید پروتئین‌ها با تاخوردگی و مونتاژ پروتئین‌های کمپلکس مانند آنتی بادی‌ها و پروتئین-های مولتی‌مر را دارند. تغییرات پس از ترجمه و تاب خوردن صحیح پروتئین‌ها برای اینکه آنها را مناسب تجاری سازی کند ضروری به نظر می‌رسد. گیاهان و پستانداران فرایندهای پس از ترجمه مشابهی دارند اگرچه اختلافاتی در مسیرهای گلیکوزیلاسیون وجود دارد. اختلاف در الگوی گلیکوزیلاسیون ممکن است لزوما فعالیت پروتئین را کاهش یا تغییر ندهد گرچه ممکن است سایر خصوصیات مانند تاب خوردگی، حلالیت، حساسیت به پروتئازها و طول عمر پروتئین را تحت تاثیر قرار دهد (۹). پروتئین‌های نوترکیب مشتق شده از گیاهان فاقد دنباله‌های گالاکتوز و سیالیک اسید انتهایی هستند که معمولاً در پستانداران یافت می‌شوند اما دارای گروه کربوهیدرات $\alpha(1,3)$fucose و $\beta(1,2)$xylose هستند. با این وجود تلاش‌های اخیر بر توسعه استراتژی‌های انسانی کردن (humanize) الگوهای گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های نوترکیب متمرکز شده است.

انتخاب گیاه میزبان: برای تولید کارآمد محصولات نوترکیب، انتخاب گونه میزبان بسیار اهمیت دارد. توتون به عنوان سیستم مدل برای ایجاد گیاهان تراریخته محسوب

می‌شود و به همین دلیل سیستمی منتخب برای تولید اکثر پروتئین‌های نوترکیب مشتق شده از گیاه است. امروزه تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی برای این منظور مورد استفاده قرار می‌گیرند و انتخاب گونه میزبان وابسته به نوع پروتئین نوترکیب، چرخه زندگی میزبان و عملکرد آن، هزینه های نگهداری و افزایش مقیاس تولید است. معمولا گونه‌های اهلی بدلیل سازگاری به طیف وسیعی از شرایط محیطی بر گونه‌های وحشی جهت کشاورزی مولکولی ترجیح داده می‌شوند. همچنین برای جلوگیری از انتشار تراژن از طریق گرده، گونه‌های خود گرده‌افشان بر گیاهان دگر گرده‌افشان برتری دارند (۲۳).

گیاهان زیادی به جز توتون به عنوان راکتورهای زیستی گیاهی استفاده می‌شوند. یکی از معایب تولید پروتئین نوترکیب در توتون ناپایداری محصول در بافت برگی برداشت شده است. تجمع پروتئین نوترکیب در بذور گیاهانی مانند تیره های غلات و نخود به دلیل ذخیره پروتئین نوترکیب در حالت پایدار امکان نگهداری طولانی مدت آنها را فراهم می‌کند. همچنین بذور به دلیل دارا بودن اندام‌های ذخیره‌ای تخصص یافته مانند واکوئل‌های ذخیره‌ای محیط بیوشیمیایی مناسبی برای تجمع پروتئین هستند. از سوی دیگر بذور خشک شده مانع از هیدرولیز غیر آنزیمی و تجزیه پروتئازی می‌شود و مشخص شده است که آنتی بادی‌های بیان شده در بذرها حداقل برای سه سال در دمای اتاق بدون کاهش معنی‌دار در فعالیت آنها پایدار باقی می‌مانند. همچنین بذور غلات فاقد مواد فنولی‌اند که در برگ‌های توتون وجود دارند، بنابراین کارایی پردازش پائین دستی افزایش می‌یابد. متغیرهای مهمی که در انتخاب غلات باید توجه شود شامل عملکرد دانه در هکتار، عملکرد پروتئین نوترکیب در واحد بیوماس، سهولت تراریزش و سرعت افزایش مقیاس تولید است. در این راستا ذرت به دلیل عملکرد بالا، سهولت تراریزش و آسانی افزایش مقیاس تولید عمده ترین گیاه زراعی برای تولید تجاری پروتئین‌های نوترکیب است به طوریکه ذرت برای تولید تجاری avidin، β-glucuronidase و آنزیم های دارویی مانند laccase ، trypsin و aprotinin استفاده شده است (Evangelista et al., 1998). همچنین لگوم‌های دانه-ای مانند نخود فرنگی نیز به دلیل میزان بالای پروتئین در بذور، گیاهان مفیدی برای تولید پروتئین به شمار می‌روند.

عمده‌ترین مزیت میوه ها و سبزیجات به عنوان میزبان تولید پروتئین نوترکیب این است که با کمترین فرآوری می‌توانند به مصرف برسند که این امر آنها را برای تولید واکسن‌های نوترکیب، مکمل های غذایی و آنتی‌بادی ها مناسب کرده است. در این زمینه سیب زمینی به طور گسترده برای تولید واکسن‌های مشتق شده از گیاه و گوجه فرنگی برای تولید اولین واکسن گیاهی بیماری هاری استفاده شده است (۲۴).

استراتژی‌های بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان: بیان پروتئین‌های خارجی در گیاهان با دو استراتژی بسیار معمول تراریزش هسته‌ای و کلروپلاستی می‌تواند به دست آید. اکثر پروتئین‌های نوترکیب مشتق شده از گیاهان از طریق تراریزش هسته‌ای تولید شده‌اند. تراریزش هسته‌ای معمولا با استفاده ازپاتوژن خاکزاد Agrobacterium tumefaciens به دست می‌آید. این روش دارای مزایایی از جمله سادگی روش، انتقال و الحاق دقیق ژن مورد نظر، تراریزش پایدار، وارد کردن یک نسخه از ژن و وقوع کم خاموشی تراژن می‌باشد. تراریزش کلروپلاستی روش امید بخش دیگری است که معمولا برای بیان پروتئین‌های هترولوگ که نیاز به تغییرات پس از ترجمه‌ای پیچیده‌ای ندارند استفاده می شود. عدم خاموشی ژن، میزان بالای بیان تراژن و بیان چندین ژن به طور همزمان و عدم وجود سمیت پروتئین خارجی برای گیاه میزبان به دلیل تجمع درون کلروپلاست از مزایای تراریزش کلروپلاستی است. یکی دیگر از مهمترین مزیت‌های این روش جلوگیری از انتشار تراژن به دلیل توارث مادری است. تنها عیب این روش مربوط به خصوصیت پروکاریوتی پلاستیدها هست که همانند باکتری ها توانایی انجام تغییرات پسا ترجمه‌ای ندارند به همین دلیل تعداد پروتئین‌هایی که می‌توانند به صورت فعال از تراریزش کلروپلاستی به دست آیند محدود شده است.

از مهمترین مزایای سیستم‌های بیانی مبتنی بر گیاهان می-توان به مقرون به صرفه بودن سیستم‌های گیاهی نسبت به کشت سلولی پستانداران و تخمیر میکروبی (۳۲)، بیان پروتئین‌ها در قسمت‌های خوراکی گیاه و مصرف خام به عنوان یک واکسن خوراکی مانند واکسن تولید شده در گوجه فرنگی (۲۴)، عدم آلودگی پروتئین‌های نوترکیب مشتق شده از گیاهان با میکروارگانیسم‌های بیماریزای

انسانی بدلیل عدم میزبانی گیاهان برای عوامل بیماریزای انسانی (۱۳)، آسانی و کم هزینه بودن استحصال و تخلیص پروتئین‌های نیازمند پردازش‌های پایین دستی در گیاهان (۳۰) و انجام بیشتر تغییرات پس ترجمه‌ای مورد نیاز برای پایداری و فعالیت پروتئین توسط گیاهان (۱۱) اشاره کرد.

عوامل تاثیرگذار بر تولید پروتئین‌های هترولوگ در گیاهان: برای توسعه تولید پروتئین‌های نوترکیب مبتنی بر گیاه بهینه سازی میزان بیان پروتئین بسیار ضروری است. فاکتورهای مختلفی در کنترل بیان تراژن در سطوح مختلف رونویسی، ترجمه، تغییرات پس از ترجمه‌ای و ذخیره پروتئین نوترکیب در سلول درگیر هستند. تلاش‌های زیادی برای افزایش میزان رونویسی صورت گرفته است و قابلیت افزایش رونویسی در بافت‌های هدف در زمان مورد نیاز یک روش عملی در تولید پروتئین های نوترکیب است (۸). در این خصوص پروموتر عنصر تنظیمی کلیدی است که درک اجزاء پروموتر و فاکتورهای مرتبط با آنها فرصت-هایی را برای تنظیم بیان ژن موردنظر فراهم کرده است. یک پروموتر قوی سبب تولید میزان بالای رونوشت از ژن خارجی خواهد شد و تضمین خواهد کرد که میزان رونوشت یک فاکتور محدود کننده نخواهد بود. انواع پروموترهای قادر به تحریک و افزایش بیان در سلول های گیاهی در جدول ۱ خلاصه شده است. این پروموتورها به سه دسته پروموترهای نهادی (Constitutive promoters)، پروموترهای القائی(Inducible promoters) و پروموترهای بافت ویژه (Tissue specific promoters) تقسیم می‌شوند که انتخاب پروموتر بستگی به نوع پروتئین تولید شده دارد (۸). بیان پروتئین‌ها در بافتی غیر از بافت هدف می‌تواند بار متابولیکی بر سیستم میزبان ایجاد کند و پردازش پائین دستی را مشکل سازد. بنابراین برای حداقل کردن سمیت پروتئین نوترکیب در میزبان استفاده از پروموترهای بافت اختصاصی مناسب می‌باشد. پروموترهای بافت اختصاصی باعث بیان ژن فقط در بافت‌های خاصی می‌شوند و برای تغلیظ محصول تراریخته در اندام خاصی مانند بذور یا میوه‌ها بسیار مفید هستند، به طوری که هرگونه تاثیر منفی پروتئین خارجی بر روی رشد گیاه را محدود کرده و باعث بهبود کارایی محصول می‌شوند. پرکاربردترین پروموتر در گیاهان دولپه‌ای و تک‌لپه‌ای به ترتیب پروموتر 35S و ubiquitin-1 است (۲۳). استفاده از پروموتر 35S باعث تولید الیاف عنکبوت در توتون و سیب‌زمینی به میزان ۲٪ از مجموع پروتئین های محلول گیاه شد (۱۸). استفاده از پروموتر ژن اسپورامین که از سیب‌زمینی شیرین جداسازی شده بود باعث تولید آنزیم گیاهی فیتاز در توتون به میزان ۷/۴٪ از پروتئین های محلول گیاه شد (۱۶). در تحقیقی دیگر استفاده از پروموتر Mll که از چغندر استخراج شده است، برتری مطلوبی نسبت به پروموتر 35S نشان داد (۲۱). استفاده از پروموتر ژن ADP-گلوکز پیروفسفریلاز سیب‌زمینی باعث تولید حدود ۱۵ برابری پروتئین در غده-های سیب‌زمینی نسبت به پروموتر 35S شد (۱۹). در مواردی هم استفاده از پروموترهای بذری نتایج رضایت بخشی حاصل کرده است. استفاده از پروموتر لگومین نخود تولید ۱/۲۵٪ از مجموع پروتئین‌های محلول در بذر توتون را به همراه داشت (۳۱). در مقایسه‌ای که بین پروموتر 35S و یوبی‌کویتین جدا شده از برنج در گیاه برنج انجام شد میزان تولید ۲/۷ برابری برای یوبی‌کویتین مشاهده شد (۴). از پروموترهای اکتین-۱ برنج، ژن زیرواحد کوچک ریبسکو (rbcS) و یوبی‌کویتین-۱ ذرت در تک‌لپه‌ای ها استفاده می‌شود؛ میزان فعالیت پروموتر اکتین-۲ برنج با اکتین-۱ در برنج مقایسه شد و نتایج افزایش تولید پروتئین بیشتر با اکتین-۲ را نشان داد و حتی افزایش ۱۲/۲ برابری در ریشه برنج مشاهده شد (۱۵).

جدول ۱ – پروموترهای مورد استفاده برای تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان

نام پروموتر	منشاء پروموتر	نوع پروموتر
CaMV 35S	ویروس	نهادی
CVMV	ویروس	نهادی
C1	ویروس حلقه‌ای	نهادی
Component 8	ویروس	نهادی
Polyubiquitin-1	ذرت	نهادی
Actin	برنج	نهادی
Pristinamycin-responsive	ویروس	القائی
IN2-2	ذرت	القائی
Nopalin synthase	آگروباکتریوم	القائی
Mannopine synthase	آگروباکتریوم	القائی
Arcelin 51	لوبیا	اختصاصی بذر
Patatin	سیب زمینی	اختصاصی غده
GBSS	سیب زمینی	اختصاصی غده
Maize globulin-1	ذرت	اختصاصی جنین
Zein	ذرت	اختصاصی
D hordein	جو	اختصاصی
B-conglycinin	سویا	اختصاصی جنین
2A11	گوجه فرنگی	اختصاصی میوه
Lhcb3	آرابیدوپسیس	اختصاصی برگ

با توجه به اینکه در کلروپلاست پلی‌آدنیلاسیون رخ نمی‌دهد، لذا طول عمر m-RNA تولیدی در کلروپلاست پایین‌تر است (۲۸)، بنابراین توجه به پروموتر و توالی های تنظیم کننده مربوط به ژن هایی که دارای بیان بالا در کلروپلاست هستند از اهمیت بالایی برخوردار است. پروموترهای فوتوسیستم-۲ (۱۴، ۲۸، ۲۷ و ۳۵) و اپرون RNA ریبوزومی کلروپلاست (۷، ۲، ۲۰ و ۲۶) بیش‌ترین کاربرد را در انتقال ژن به کلروپلاست دارند و در تحقیقات زیادی از آن‌ها استفاده شده است. بنابراین پایداری و عمر RNA تعیین می کند که به چه مقدار توسط ریبوزوم برای ترجمه استفاده شود و همین امر میزان محصول نهایی را تعیین خواهد کرد (۱۲). همچنین توالی‌های پلی‌آدنیلاسیون تغییر یافته برای بهینه کردن بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان استفاده شده و باعث افزایش معنی‌دار تجمع mRNA شده است (۸).

یکنواختی بیان ژن و خاموشی ژن (Gene silencing): معمولا بیان ژن منتقل شده در گیاهان تراریخته با استفاده از سازه‌های مشابه حتی در محیط‌های یکسان متفاوت است که ممکن است به دلیل اثر محلی (position effect)، تعداد کپی تراژن و خاموشی ژن باشد. استفاده از توالی های matrix attachment regions (MARs) و نیز هدف‌گیری پروتئین‌های خارجی به درون پلاستیدها اثر محلی را حذف و از سوی دیگر خاموشی ژن در پلاستیدها مشاهده نمی-شود (۸). خاموشی ژن مشکل عمده‌ای در بیان پروتئین‌های نوترکیب محسوب می‌شود. Transcriptional gene silencing (TGS) و post-transcriptional gene silencing (PTGS) دو نوع خاموشی ژن هستند که TGS مبتنی بر غیرفعال کردن پروموتر و متیلاسیون و PTGS به واسطه حضور iRNA سبب تخریب رونوشت می شود. حضور کپی‌های متعدد از تراژن ها و یا استفاده از پروموترهای دائمی احتمال خاموشی ژن را افزایش می‌دهد. بنابراین استفاده از پروموترهای بافت- ویژه و یا پروموترهای نهادی ضعیف می‌تواند مشکل خاموشی ژن را کاهش دهد. تعداد کپی‌های تراژن وارد شده به گیاه تراریخته نیز می-تواند با استفاده از روش ترانسفورماسیون توسط اگروباکتریوم نسبت به روش بیولیستیک حل شود.

روش‌های عدم تخریب و افزایش انباشته شدن محصول نهایی: مقادیر پائین پروتئین تولید شده مشکل مهم و محدود کننده بهره‌برداری تجاری از پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در گیاهان است. اکثر پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاه در مقادیر بسیار پائین‌تر از یک درصد پروتئین محلول کل تجمع می‌یابند. بنابراین بهبود تجمع پروتئین نوترکیب در گیاه تراریخته یک عامل بسیار مهم در میزان مطلوبیت یک سیستم بیانی محسوب می‌شود. در تولید برخی پروتئین‌ها در گیاه مشاهده می‌شود که علی رغم رونویسی از ژن و تولید m-RNA میزان پروتئین تولیدی خیلی کم و در برخی موارد غیر قابل شناسایی است. دو دلیل عمده برای این مسئله وجود دارد؛ دلیل اول تخریب m-RNA تولیدی توسط RNA مداخله‌گر (siRNA) است (۳۴). برای جلوگیری از تخریب m-RNA از ژن هایی که باعث سرکوب عوامل تخریب‌کننده m-RNA هستند، استفاده شده است (۱۷ و۳۴).

دلیل دوم اینکه پروتئین بعد از تولید توسط آنزیم‌های پروتئازی موجود در سیتوزول تخریب و حذف می‌شود (۱۹). یکی از عوامل تاثیرگذار بر تجمع پائین پروتئین‌های هترولوگ، تجزیه و یا پردازش نادرست پروتئین‌ها توسط پروتئازها است. پروتئین‌های هترولوگ با منشاء حیوانی سنتز شده در گیاهان تراریخته به دلیل تفاوت‌های ساختاری و تاخوردگی و احتمالا الگوی گلیکوزیلاسیون نسبت به پروتئازهای گیاهی حساس اند. گذشته از این محیط درون سلولی پروتئین نیز در پایداری آن نقش بسزایی دارد. برای حل مشکل دوم، باید پروتئین تولیدی را به نحوی از دسترس آنزیم‌های موجود در سیتوزول خارج کنیم. برای این منظور از یک توالی کوتاه آمینواسیدی برای انتقال پروتئین تولیدی به اندامک های سلول از قبیل پلاستید ها، میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی استفاده شده است (۵ و ۲۵). در مواردی دیگر پروتئین تولیدی به فضای آپوپلاست منتقل شد (۲۱ و ۲۹). همچنین روش‌های متعددی برای جلوگیری از حمله پروتئازها وجود دارد که از مهم‌ترین آنها می‌توان به بیان اختصاصی در اندامک‌ها و اندام‌ها و نیز بیان همزمان با بازدارنده‌های پروتئازی اشاره کرد.

پروتئین‌های تراوش شده به درون آپوپلاست یا فضای خارج سلولی بسیار مستعد تجزیه هستند. شبکه آندوپلاسمی سلول‌های گیاهی دارای پروتئازهای بسیار کمی هستند و یک محیط محافظتی مناسبی را فراهم

می‌کنند. بنابراین مقدار پروتئین به دست آمده به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. همچنین بیان پروتئین در اندام خاصی مانند بذر یا غده تجزیه پروتئین‌های نوترکیب را کاهش می‌دهد. این اندام‌ها دارای بازدارنده های پروتئازی درون‌زاد هستند که سبب افزایش حفاظت پروتئین در برابر حمله پروتئولیتیک می‌شود. از سوی دیگر میزان کم مواد فنلی در بذر و تنها حضور تعداد معدودی پروتئین ذخیره-ای در آن از ویژگی‌های دیگر این اندام است که می‌توانند پردازش پائین دستی را در طی تخلیص محصول ساده سازد. بیان همزمان پروتئین‌های نوترکیب با بازدارنده‌های پروتئازی روش امید بخش دیگری است که می‌تواند تجزیه پروتئین در بافت‌های گیاهی را به حداقل برساند. بیان همزمان بازدارنده های پروتئازی نه تنها تاثیر منفی بر رشد گیاه ندارد بلکه بیان پروتئین نوترکیب را افزایش می‌دهند.

سازمان‌دهی پروتئین‌های نوترکیب برای تجمع هدفمند: اکثر پروتئین‌ها در سیتوسول سنتز می‌شوند اگرچه برخی نیز در میتوکندری و پلاستیدها نیز سنتز می‌شوند. در همه سلول‌های یوکاریوتی پروتئین‌های محلول که وارد شبکه آندوپلاسمی می‌شوند با دارا بودن سیگنال‌های اضافی وارد کمپلکس گلژی شده و سپس از سلول ترشح می‌شوند، در غیر این صورت انتقال به بخش‌های خاصی از سیستم درون غشایی نیازمند سیگنال‌های خاص و خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاصی است. از این مزیت می‌توان برای ترشح پروتئین‌های نوترکیب از دیواره سلولی به فضای خارج سلولی استفاده کرد که این امر می‌تواند به تجمع مقادیر زیادی از پروتئین کمک کرده و از سوی دیگر سبب تسهیل در استخراج پروتئین نوترکیب و پردازش پائین دستی شود (۳۳). ترشح پروتئین‌های نوترکیب از ریشه‌ها نیز از مزیت‌های دیگر این سیستم است که محصول نوترکیب می‌تواند از آب گیاهان کشت شده به روش هیدروپونیک به آسانی استحصال شوند. شبکه آندوپلاسمی سلول‌های گیاهی می‌تواند تجمع مقادیر بالای پروتئین‌ها را تحمل کند بدون اینکه خطری برای رشد و تکثیر گیاه داشته باشد. پروتئین‌های مستقر در شبکه آندوپلاسمی دارای یک پپتید نشانه در C- ترمینال هستند که به KDEL و یا HDEL معروف بوده و به وسیله گیرنده‌ای که در کمپلکس گلژی قرار گرفته است تشخیص داده می‌شوند. بنابرای الحاق این سیگنال‌ها به انتهای کربوکسیل پروتئین-های ترشح شده منجر به ابقاء و افزایش تجمع پروتئین خارجی در شبکه آندوپلاسمی می‌شود (۳۱). توالی‌های γ-zein (یک پرولامین ذرت) می‌توانند به عنوان جایگزینی برای سیگنال‌های KDEL برای تجمع پروتئین‌های نوترکیب در شبکه آندوپلاسمی سلول‌های گیاهی استفاده شوند (۲۲). در واقع اکثر پروتئین‌های ذخیره‌ای بذری واکوئلی هستند و تجمع پروتئین بذری در شبکه آندوپلاسمی یک ویژگی منحصر به فرد غلات است (۳۳). استفاده از سیگنال‌پپتید جدا شده از گونه *Nicotiana plumbagenifolia* برای انباشت پروتئین در آپوپلاست میزان تولید پروتئین را بهبود بخشید (۲۱). در تحقیق دیگر استفاده از ترانزیت‌پپتید زیرواحد کوچک ربیسکو گونه‌ی *Chrysanthemum morifolium* باعث انباشت مناسب پروتئین در کلروپلاست شد (۲۹). در انتقال ژن به کلروپلاست پروتئین تولید شده در فضای کلروپلاست نگهداری می‌شود و بدین طریق از دسترس آنزیم‌های پروتئاز سیتوزول محفوظ می‌ماند که این خود یکی از مزیت‌های انتقال ژن به کلروپلاست نسبت به هسته است.

تخلیص و جداسازی پروتئین‌های نوترکیب: پس از تولید محصول نوترکیب مراحل تخلیص پروتئین آغاز می شود تا سطوح مناسبی از خلوص به دست آید. بازده هر مرحله تخلیص پروتئین نوترکیب بسیار اهمیت دارد زیرا اتلاف حتی مقادیر کمی از محصول در هر مرحله تخلیص کاهش معنی‌داری بر تمام فرآیند پائین دستی می‌گذارد، بویژه اگر برای رسیدن به میزان بالایی از خلوص نیاز به چندین مرحله تخلیص باشد. روش‌های تخلیص محصول نوترکیب به دو دسته روش های مبتنی بر غشاء شامل اولترافیلتراسیون (ultrafiltration) و نانوفیلتراسیون (nanofiltration) و روش‌های کروماتوگرافی تقسیم می-شوند. از اولترافیلتراسیون برای تغلیظ پروتئین‌های با وزن ملکولی متفاوت استفاده می‌شود و اطلاع از وزن مولکولی پروتئین موردنظر می‌تواند در انتخاب بهترین غشاء برای فرایند جداسازی کمک کند. در نانوفیلتراسیون از غشاءهای اسمز معکوس برای تغلیظ آنتی‌بادی ها، پپتیدها و سایر مولکول‌ها با وزن ملکولی kDa ۳۰۰-۱۰۰ استفاده می‌شود.

کروماتوگرافی گروهی از روش‌های جداسازی پروتئین‌ها می‌باشد که کروماتوگرافی ستونی رایج‌ترین شکل کروماتوگرافی است. اکثر پروتئین‌های هدف فاقد یک عامل اتصال (affinity ligand) مناسب برای به دام انداختن پروتئین بر روی یک ماتریکس جامد در سیستم کروماتوگرافی هستند. یک راه حل برای این مشکل ترکیب ژن کد کننده پروتئین هدف با یک ژن کد کننده یک پروتئین با میل ترکیبی مناسب است که purification tag گفته می‌شود. روش‌های Affinity-based separation جدیدترین تکنولوژی در پردازش‌های پائین دستی پروتئین‌ها محسوب می‌شوند. برچسب‌های اتصالی (affinity tag) به عنوان توالی‌های اسیدآمینه‌ای اگزوژن با میل ترکیبی بالا به یک لیگاند شیمیایی یا زیست شناختی خاص تعریف می‌شوند که گروه عمده‌ای از آنها دارای یک پپتید یا پروتئین‌اند که می‌توانند به یک لیگاند کوچک متصل شده به یک تکیه گاه جامد متصل شوند (مانند اتصال His-tag به فلزات). استفاده از affinity tag ها ابزارهای بسیار موثر و مفید برای خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب هستند و امکان تخلیص پروتئین‌ها را بدون نیاز به اطلاع قبلی از خصوصیات بیوشیمایی آنها را ممکن می‌سازند. در برخی از موارد حضور affinity tag در پروتئین نوترکیب نامطلوب است و یا وجود آنها در پروتئین‌های نوترکیب دارویی عیب محسوب می شود. بنابراین روش‌های حذف affinity tag ها از پروتئین‌های نوترکیب در حال افزایش است. اکثر این روش‌ها از اندوپپتیدازهای نوترکیب که یک توالی اختصاصی را تشخیص می‌دهند استفاده می‌کنند. از سوی دیگر الحاق یک affinity tag به پروتئین نوترکیب ممکن است تاثیر مثبت بر خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین داشته باشد. همان طور که از نتایج مقالات مختلف به دست می‌آید affinity tag باعث بهبود عملکرد و بازده پروتئین، ممانعت از تجزیه پروتئولیزی، تسهیل تاخوردگی پروتئین و افزایش حلالیت پروتئین می‌شود (۱). از سوی دیگر در برخی از پروتئین‌ها وجود tag ممکن است سبب تغییر در آرایش فضایی، کاهش محصول، ممانعت از فعالیت آنزیمی، سمیت و تغییر فعالیت بیولوژیکی پروتئین شود برای همین غالبا حذف tag از پروتئین نوترکیب بویژه در مورد پروتئین‌های نوترکیبی که به مصرف انسان می‌رسند، مطلوب به نظر می‌رسد. از affinity tag هائی که به طور گسترده در تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شوند می‌توان به Polyarginine-tag (Arg-tag)، Polyhistidine-tag (His-tag) و Strep-tag اشاره کرد. در جدول ۲ انواع affinity tag ها و خصوصیات آنها نشان داده شده است.

جدول۲ – برچسب‌های اتصالی (affinity tag) مختلف برای استحصال پروتئین‌های نوترکیب قابل تولید در گیاهان

برچسب (Tag)	طول برچسب	توالی برچسب	اندازه (KDa)
Poly-Arg	۵ تا ۶ (معمولا ۵)	RRRRR	۰/۸
Poly-His	۲ تا ۱۰ (معمولا ۶)	HHHHHH	۰/۸۴
FLAG	۸	DYKDDDDK	۱/۰۱
Strep-tag II	۸	WSHPQFEK	۱/۰۶
c-myc	۱۱	EQKLISEEDL	۱/۲
S-	۱۵	KETAAAKFERQHMDS	۱/۷۵
HAT-	۱۹	KDHLIHNVHKEFHAHAHNK	۲/۳۱
3x FLAG	۲۲	DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK	۲/۷۳
Calmodulin-binding peptide	۲۶	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL	۲/۹۶
Cellulose-binding domains	۲۷ تا ۱۸۹	Domains	۳ تا ۲۰
SBP	۳۸	MDEKTTGWRGG/…/LRARLEHHPQGGREP	۴/۰۳
Chitin-binding domain	۵۱	TNPGVSAWQVNT/…/TSLAGWEPSNVPALWQLQ	۵/۵۹
Glutathione S-transferase	۲۱۱	Protein	۲۶
Maltose-binding protein	۳۹۶	Protein	۴۰

منابع

1. Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, E., Pedersen, J. 2006. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. Protein Expression and Purification, 48:1–13.

2. Bohmert-Tatarev, K., McAvoy, S., Daughtry, S., Peoples, O.P. and Snell, K.D. 2011. Focus Issue on Plastid Biology: High Levels of Bioplastic Are Produced in Fertile Transplastomic Tobacco Plants Engineered with a Synthetic Operon for the Production of Polyhydroxybutyrate. Plant Physiology, 155: 1690-1708.

3. Boothe, J.G. and Markley, N.A. 2001. The design and use of transgenic plant expression systems for the prodyction of foreign proteins. Recent Advances in Phytochemistry, 35:31-57.

4. Carlos, H.G., Robert, B., Paul, R., Xianfeng, C., Michael, T. and John, F. 2010. High level transgenic expression of soybean (*Glycine max*) GmERF and Gmubi gene promoters isolated by a novel promoter analysis pipeline. BMC Plant Biology, 10:237.

5. Cheung, S.C.K., Sun, S.S.M., Chan, J.C.N. and Tong, P.C.Y. 2009. Expression and subcellular targeting of human insulin-like growth factor binding protein-3 in transgenic tobacco plants. Transgenic research, 18: 943-951.

6. Clarke, B. 2008. Molecular farming. plant Biotechnology, 6:425-426.

7. Daniell, H., Ruiz, G., Denes, B., Sandberg, L. and Langridge, W. 2009. Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function. BMC biotechnology, 9: 33.

8. Desai, P.N., Shrivastava, N. Padh, H. 2010. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. Biotechnol Adv., 28(4):427-435.

9. Doran, P.M. 2000. Foreign protein production in plant tissue cultures. Curr Opin Biotechnol., 11: 199-204.

10. Evangelista, R.L., Kusnadi, A.R., Howard, J.A., Nikolov, Z.L. 1998. Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant beta-glucuronidase from transgenic corn. Biotechnology Progress, 14(4): 607-614.

11. Faye, L., and Gomord, V. 2004. Post translational modification of therapeuti proteins in plants. Curr. Opin. Plant Biol., 7(2):171–181.

12. Flaschel, E. and Friehs, F. 1993. Improvment of downstream processing of recombinant proteins by means of genetiengin eering methods. Biotech. Adv., 11: 31-78.

13. Giddings, G., Allison, G. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. Biotechnology, 18(11):1151–5.

14. Gray, B.N., Ahner, B.A. and Hanson, M.R. 2009. High-level bacterial cellulase accumulation in chloroplast-transformed tobacco mediated by downstream box fusions. Biotechnology and bioengineering, 102: 1045-1054.

15. He, Z., Du, X., Yao, W. and Dai, J. 2010. Pharmaceutical proteins produced in plant bioreactor in recent years. African Journal of Biotechnology, *7* (25): 4917-4925.

16. Hong, Y.F., Liu, C.Y., Cheng, K.J., Hour, A.L., Chan, M.T., Tseng, T.H., Chen, K.Y., Shaw, J.F. and Yu, S.M. 2008. The sweet potato sporamin promoter confers high-level phytase expression and improves organic phosphorus acquisition and tuber yield of transgenic potato. Plant molecular biology, 67: 347-361.

17. Joensuu, J.J., Conley, A.J., Lienemann, M., Brandle, J.E., Linder, M.B. and Menassa, R. 2010. Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in Nicotiana benthamiana. Plant Physiology, 152: 622-633.

18. Kamo, K., Blowers, A. and McElroy, D. 2000. Effect of the cauliflower mosaic virus 35S, actin, and ubiquitin promoters on uidA expression from a bar-uidA fusion gene in transgenic Gladiolus plants. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 36: 13-20.

19. Kim, T.W., Goo, Y.M., Lee, C.H., Lee, B.H., Bae, J.M. and Lee, S.W. 2009. The sweet potato ADP-glucose pyrophosphorylase gene (ibAGP1) promoter confers high-level expression of the GUS reporter gene in the potato tuber. Comptes Rendus Biologies, 332: 876-885.

20. Lentz, E.M., Segretin, M.E., Morgenfeld, M.M., Wirth, S.A., Dus Santos, M.J., Mozgovoj, M.V., Wigdorovitz, A. and Bravo-Almonacid, F.F. 2010. High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants. Planta, 231: 387-395.

21. Luchakivskaya, Y., Kishchenko, O., Gerasymenko, I., Olevinskaya, Z., Simonenko, Y., Spivak, M. and Kuchuk, M. 2011. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants. Plant cell reports, 30: 407-415.

22. Liompart, B., Llop-Tous, L., Marzabal, P., Torrent, M., Pallisse , R., Bastida, M., Dolors, M., Walas, F. 2010. Protein production from recombinant protein bodies. Process Biochem, 45: 1816-1820.

23. Ma, J.K.C. Drake, P.M.W. and Christou, P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nature Reviews Genetics, 4(10): 794-805.

24. Mason, H.S., Warzecha, H. 2002. Edible plant vaccines: application for prophylactic and molecular medicine. Trends Mol Med, 8(7): 324–9.

25. Matsui, T., Takita, E., Sato, T., Aizawa, M., Ki, M., Kadoyama, Y., Hirano, K., Kinjo, S., Asao, H. and Kawamoto, K. 2011. Production of double repeated B subunit of Shiga toxin 2e at high levels in transgenic lettuce plants as vaccine material for porcine edema disease. Transgenic research, 20: 735-748.

26. Michelet, L., Lefebvre-Legendre, L., Burr, S.E., Rochaix, J.D. and Goldschmidt-Clermont, M. 2011. Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of Chlamydomonas. Plant Biotechnology Journal, 9: 565-574.

27. Oey, M., Lohse, M., Kreikemeyer, B. and Bock, R. 2009. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. The plant journal, 57: 436-445.

28. Rigano, M.M., Manna, C., Giulini, A., Pedrazzini, E., Capobianchi, M., Castilletti, C., Di Caro, A., Ippolito, G., Beggio, P. and De Giuli Morghen, C. 2009. Transgenic chloroplasts are efficient sites for high yield production of the vaccinia virus envelope protein A27L in plant cells. Plant Biotechnology Journal, 7: 577-591.

29. Scotti, N., Alagna, F., Ferraiolo, E., Formisano, G., Sannino, L., Buonaguro, L., De Stradis, A., Vitale, A., Monti, L. and Grillo, S. 2009. High-level expressions of the HIV-1 Pr55 gag polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts. Planta, 229: 1109-1122.

30. Seon, J.H., Szarka, S.J. 2002. A unique strategy for recovering recombinant proteins from molecular farming: affinity capture on engineered oilbodies. Plant Biotechnol J., 4:95-101.

31. Tiwari, S., Mishra, D. K., Roy, S., Singh, A., Singh, P. and Tuli, R. 2009. High level expression of a functionally active cholera toxin B: rabies glycoprotein fusion protein in tobacco seeds. Plant cell reports, 28: 1827-1836.

32. Twyman, R.M., Stoge, E. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression. technology. Trends Biotechnol, 21(12):570–8.

33. Vitale, A., and Emanuela P. 2005. Recombinant Pharmaceuticals from Plants The plant endomembrane system as bio reactor. Mol Interv, 5(4): 216-225.

34. Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. The plant journal, 33: 949-956.

35. Youm, J.W., Jeon, J.H., Kim, H., Min, S.R., Kim, M.S., Joung, H., Jeong, W.J. and Kim, H.S. 2010. High-level expression of a human β-site APP cleaving enzyme in transgenic tobacco chloroplasts and its immunogenicity in mice. Transgenic research, 19: 1099-1108.

Strategies required for expression and production of recombinant proteins in plants and their purification

Fabriki Ourang S.

Imam Khomeini International University, Qazvin, I.R. of Iran

Abstract

Engineered plants as bioreactors for production of heterologous proteins are appropriated replacement for conventional expression systems such as mammalian cell culture and transgenic animals. For efficient production of recombinant proteins, the type of host species is very important and its choice depends on the type of recombinant proteins, plant life cycle and its performance, and maintenance or production costs. The most important benefits of plant-based expression systems could be included: cost effective of the plant systems, no contamination of recombinant proteins derived from plants with human pathogenic microorganisms due to host-less of plants to human pathogens, easy and low cost of extraction and purification of proteins, more post-translational changes required for the stability and activity of protein by plants. For development of plant-based production of recombinant proteins, optimization of protein expression level is essential. In this regard; various factors controlling the expression of target gene at levels of transcription, translation, post-translational modifications and recombinant protein accumulation are involved. On the other hand, lower amounts of expressed recombinant proteins are serious problem limiting commercial exploitation of plants bioreactors. Thus improving the accumulation of recombinant proteins in transgenic plants is an important factor in the desirability of an expression system. In this regard, the accession of signals in C-terminal of target proteins leads to increased

retention and accumulation of proteins in the endoplasmic reticulum. After production of recombinant proteins, the use of affinity tag for purification of proteins are very effective and useful, so protein purification will be possible without prior notification of their biochemical properties.

Key words: bioreactor, heterologous proteins, transgene, expression systems.

آلودگی صوتی به عنوان عامل استرس زا در گونه های جانوری آبزی

سعید شفیعی ثابت

صومعه سرا، دانشگاه گیلان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

چکیده

صوت در محیط های آبی به طور بسیار کارامد سرعت بالایی دارد. بنابراین پتانسیل اثرگذاری بر محیط های بزرگتر و گسترده تری در حدود هزاران کیلومتر مربع و یا حتی بیشتر را دارد. فعالیت های انسانی شامل کشتیرانی و قایق های موتوری تفریحی، سکوهای حفاری بستر دریا و اقیانوسها، کاوش های زلزله نگاری و فعالیتهای مرتبط با تولید انرژی شامل نیروگاه های آبی تولید برق موجب افزایش چشمگیر آلاینده های صوتی به عنوان عامل غالب آلودگی در محیط های آبی شده است. امروزه آلودگی های صوتی ناشی از فعالیت های انسانی یکی از مشکلات عمده در محیط های آبی شامل زیستگاه های دریایی و آب شیرین است و به عنوان عامل استرس زا برای ماهی ها و سایر آبزیان شناخته می شوند. پاسخ ماهی و سایر آبزیان به عامل استرس زا شباهت های زیادی به پاسخ سایر مهره داران ساکن خشکی دارد. همچنین آلودگی های صوتی ناشی از فعالیت های انسانی می تواند موجب مجموعه ای از تغییرات رفتاری در ماهی ها، پستانداران دریایی (وال ها) و پرندگان شود. بنابراین آلودگی های صوتی ناشی از فعالیت های انسانی بازخوردهای بلند مدت مستقیم و غیر مستقیمی بر رفتار، بقا و بوم شناسی یک گونه دارد. در این مقاله اثرات صوت به عنوان عامل استرس زا در ماهی مرور شده است.

واژه های کلیدی: آلودگی صوتی، رفتار ماهی، شناگری، تغذیه، استرس.

پست الکترونیکی: s.shafiei.sabet@guilan.ac.ir

مقدمه

آلودگی های صوتی حاصل از منابع صوتی مرتبط با فعالیت های انسانی، جوامع آبزی در محیط های دریایی و آب شیرین را در معرض خطرات جدی قرار داده است (Slabbekoorn et al., 2010). بویژه این اثرات شدید در نتیجه پیشرفت ها و تحولات اخیر در زمینه های مختلف صنعت (خصوصاً استخراج نفت و گاز)، توسعه شهری بویژه در مناطق ساحلی و افزایش سهم حمل و نقل دریایی و میزان تردد کشتی های تجاری همچنین استقبال از قایق های موتوری تفریحی با اهداف توریستی روند رو به رشد و تصاعدی در پراکنش و توسعه دامنه آلودگی را به بار آورده است (Shafiei Sabet et al., 2016a). اثرات این دسته از آلاینده های صوتی ناشی از فعالیت های انسانی با توجه به شدت آلودگی صوتی، فاصله از منبع صوت و تناوب تکرار، گونه های جانوری آبزیان دریایی و آب شیرین را در معرض آسیب های مختلف قرار می دهد (Popper et al., 2003). موجودات آبزی شامل پستانداران دریایی، ماهی ها و بی مهره گان با توجه به میزان تکامل و توانایی شان در دریافت و استخراج سیگنال ها و علایم صوتی مرتبط از محیط با اصوات زمینه بصورت بالقوه ممکن است به طور متفاوتی تحت تاثیر آلاینده های صوتی ناشی از فعالیت های انسانی قرار گیرند (Slabbekoorn et al., 2010). در چند دهه اخیر، توجه رو به افزایشی در بین مجامع سیاست گذاران بهره برداری از بخش های منابع طبیعی، فعالان جمعیت های رفاه حیوانات، زیست شناسان علوم رفتاری و مدیران محیط های زیست درخصوص این موضوع که چگونه آلودگی های صوتی ناشی از فعالیت های انسانی می تواند باعث بروز اثرات منفی و زیان بار کوتاه مدت و بلند مدت بر روی جوامع جانوری خشکی و همچنین