

لاکتوکوکوس لاکتیس: یک سیستم بیانی مناسب برای تولید پروتئین های هترولوگ

الهه داورپناه و طاهره طاهری*

تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش ایمونوتراپی و تحقیقات واکسن لیسمانیا

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: Tahereh_t@yahoo.com

چکیده

لاکتوکوکوس لاکتیس (*L. lactis*) یک باکتری گرم مثبت از گروه باکتریهای اسید لاکتیک LAB (Lactic Acid Bacteria) است که قدمت طولانی در فرآوری و تولید محصولات لبنی دارد. ویژگیهای منحصر بفرد این باکتری، از جمله رشد سریع، تراکم بالای سلولی، قابل استفاده بودن در صنایع تخمیری، عدم تشکیل اجسام انکلوزن (Inclusion body)، نمایش سطحی (Surface display)، عدم تولید اندوتوکسین، فقدان فعالیت پروتئازی خارج سلولی و دارا بودن کمترین فعالیت پروتئازی داخل سلولی، و مهمتر از همه قابلیت ترشح خارج سلولی پروتئین ها، باعث شده تا به عنوان یک میزبان بی خطر و مناسب برای تولید پروتئینهای نوترکیب یوکاریوتی، در تحقیقات و صنعت مورد استفاده قرار گیرد. این باکتری از یک سو یک کارخانه سلولی برای تولید طیف گسترده ای از آنتی ژنهای پروتئینی و از سوی دیگر به عنوان میزبانی مناسب برای تحویل یا رساننده پروتئینهای درمانی و مولکولهای فعال زیستی به داخل سلول به شمار می آید. برای این منظور، وکتورهای بیانی اختصاصی و سویه های باکتریایی متعددی برای بیان و تولید پروتئینهای نوترکیب طراحی شده اند که در این مقاله مروری به شرح آنها توصیف شده اند.

واژگان کلیدی: لاکتوکوکوس لاکتیس، سیستم بیان پروتئین.

باکتری های اسید لاکتیک ((Lactic Acid Bacteria (LAB)

کاربردهای صنعتی و پزشکی تهیه شده است. حداقل سه نوع کاربرد مختلف برای باکتریهای LAB عنوان شده است که شامل استفاده از آن ها در تولید پروتئین های مهم اقتصادی، تولید پروتئین های فعال زیستی در غذاها و تهیه واکسن های زنده اند. از مزایای استفاده از این دسته از باکتری ها در تهیه و تولید واکسن به کم هزینه بودن و تجویز آسان آن ها می توان اشاره کرد.

این باکتریها از طرف اتحادیه اروپا و سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) به عنوان باکتریهای بی خطر ((Generally Recognized As Safe (GRAS شناخته شده اند و از نظر درجه غذایی (Food grade) به طور گسترده ای در صنایع تخمیر مواد غذایی به ویژه پنیر، ماست و مواردی از این قبیل مورد استفاده قرار می گیرند. همچنین به دلیل تولید اسید لاکتیک نقش مهمی در حفظ مواد غذایی و فرآورده های تخمیر شده دارند. علاوه بر این، برخی از سویه ها با تولید باکتریوسین، خاصیت نگهدارندگی بیشتری دارند، از این رو نقش آنها را در صنایع غذایی قوت می بخشد. باکتریهای LAB شامل جنسهای مختلفی از جمله: لاکتوباسیلوس (*Lactococcus*)، لاکتوباسیلوس (*Lactobacillus*)، استرپتوکوکوس (*Streptococcus*)، کارنوباکتریوم

باکتری های اسید لاکتیک (LAB) باکتری هایی گرم مثبت و غیربیماری زا هستند که کربوهیدرات های تخمیر شده را به اسید لاکتیک تبدیل می کنند (۳۳). در این باکتریها مسیر متابولیکی ناشی از تخمیر گلوکز ممکن است به یکی از دو حالت همگن (Homofermentative) یا ناهمگن (Heterofermentative) صورت گیرد. در حالت اول دو مولکول لاکتات (به عنوان مثال درباکتریهای استرپتوکوک و لاکتوکوک) تولید می شود و در دومی، لاکتات، اتانول و دی اکسید کربن (به عنوان نمونه در باکتری های *Leuconostoc* و برخی از لاکتوباسیل ها) تولید می شود (۳۰). این باکتریها بر روی سطوح بدن، سطوح مخاطی و روده یافت می شوند. در روده بزرگ، سبب کاهش pH شده و فعالیت باکتری های پروتئولیتیک را مهار می کنند، همچنین با پوشاندن سطح سلول های پوششی روده، به باکتری های بیمارزا اجازه رشد و فعالیت نمی دهند (۲). چرا که، pH اسیدی باعث حل شدن اسیدهای آلی می شود و در نتیجه غشای سلولی شکسته شده، و منجر به تخریب عامل بیماری زا می شود. امروزه به کمک روش های کلاسیک و با استفاده از فناوری های جدید انواع مختلفی از گونه های نوترکیب LAB با

میزبانی بی‌خطر و مطلوب برای تولید پروتئین‌هایی با عملکرد ایده‌آل مورد توجه بیشتری قرار داده است. امروزه این باکتری به‌طور گسترده‌ای در بیوتکنولوژی برای تولید پروتئین‌های هترولوگ در مقیاس بالا مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مزایای باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس برای تولید پروتئین نوترکیب (۱۷)

دلایل مختلفی برای مناسب بودن باکتری *L. lactis* جهت بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب (بخصوص پروتئین‌های غشایی) وجود دارد که عبارت‌اند از:

۱ - این باکتری دارای رشد سریع و تراکم سلولی بالایی است، به‌ویژه هنگامی که تحت pH کنترل شده رشد می‌کند. همچنین قادر به تحمل اکسیژن است اما فسفوریلاسیون اکسیداتیو را انجام نمی‌دهد. در مقابل، قند را در شرایط بی‌هوازی به لاکتات تخمیر می‌کند که این امر سبب می‌شود که در درون فرماتورها که فضای کافی برای هوادهی باکتری وجود ندارد تخمیر در مقیاس بالا براحتی انجام شود. علاوه بر آن، این باکتری می‌تواند در میکروپلیتهای ۹۶ خانه‌ای کشت داده شود و با سیلیکون یا روغن معدنی پوشانده شود، که برای آزمایشات با توان بالا (High-throughput) بسیار ایده‌آل است.

۲ - این میکروارگانیسم تنها دارای یک غشای سلولی است که باعث می‌شود هدف‌گذاری و انتقال پروتئین درون‌زاد (Endogenous) براحتی انجام شود. مزیت دیگر تک‌غشایی بودن آن این است که پروتئین‌های غشایی بیان شده مستقیماً در دسترس سوبستراها، مهارکننده‌ها و نشانگرها قرار می‌گیرند که به مطالعات عملکردی آن در کل سلول کمک می‌کند.

۳ - این باکتری فاقد هرگونه اندوتوکسین بر سطح غشای سلول بوده و دارای ویژگی نمایش آنتی‌ژن‌ها بر سطح سلول (Surface display) بدون نیاز به مراحل کلونینگ و تکنولوژی ترشح خارج سلولی پروتئین‌ها می‌باشد.

۴ - در مقایسه با *E. coli* که تخمین زده شده است ۷۰ درصد پروتئین‌های تولید شده به شکل اجسام انکلوزن (inclusion body) نامحلول بیان می‌شوند، بیان پروتئین‌های غشایی یوکاریوتی در لاکتوکوکوس لاکتیس منجر به تشکیل اجسام انکلوزن نمی‌شود.

(*Carnobacterium*) و *انتروکوکوس* (*Enterococcus*) هستند (۳۰). لاکتوکوکوس لاکتیس بهترین گونه در میان لاکتوکوک ها و پرمصرف‌ترین باکتری در میان باکتری‌های تخمیرکننده مواد غذایی در سراسر جهان است (۹). همچنین، باکتری‌های LAB بویژه لاکتوکوکوس ها و لاکتوباسیل ها به‌عنوان ناقل‌های تحویل و رساننده (Delivery) پروتئین‌های درمانی در توسعه راهکارهای جدید درمان و پیشگیری نیز کاربرد دارد.

لاکتوکوکوس لاکتیس

علی‌رغم باور عمومی، این باکتری ابتدا در اجزای مختلف گیاهانی مانند اوکالیپتوس، نخود فرنگی، ذرت و نیشکر کشف شد و گمان می‌رفت که یک باکتری خفته باشد که پس از مصرف توسط نشخوارکنندگان، در دستگاه گوارش آنها فعال شده و تکثیر می‌یابد. اما در واقع، در نشخوارکنندگان پس از مصرف گیاهان، باکتری *L. lactis* به غدد پستانی رفته و در آنجا تجمع پیدا کرده و در نهایت به درون شیر راه می‌یابد (۱).

سویه لاکتوکوکوس لاکتیس دارای زیرگونه‌های *lactis*، *cremoris* و *hordniae* است (۶). دو زیرگونه *lactis* و *cremoris* به‌طور وسیعی در صنایع و علوم پزشکی کاربرد دارند. زیرگونه *lactis* قادر است در دمای ۴۰°C و pH=9.2 رشد کند، اما *cremoris* فاقد این توانایی است (۲۹). در طی دو دهه اخیر، پیشرفتهای چشمگیری در جهت توسعه ابزارهایی برای شناسایی خصوصیات مولکولی این باکتری از جمله ترانسفورماسیون، دخول و یا حذف ژن، همچنین توسعه سیستم‌های بیانی و تنظیم بیان ژن حاصل شده است (۸).

از این باکتری به‌طور گسترده‌ای برای بیان پروتئین‌های هترولوگ به‌عنوان کاندید دارو یا واکسن‌های پیشگیری کننده استفاده می‌شود و حتی می‌توان آن را جایگزین مناسبی برای سیستم‌های بیانی پرکاربرد دیگر از جمله هم‌مای گرم منفی آن یعنی *E. coli* دانست (۳۸). برای تولید پروتئین‌های نوترکیب با ساختارهای فضایی طبیعی، انجام تغییرات مناسب پس از ترجمه با صرف حداقل هزینه و تشکیل باندهای دی‌سولفیدی در پروتئین‌های درون‌زاد (Endogenous) طبیعی همیشه چالش برانگیز بوده است. خواص منحصر به فرد باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس و تنوع بالا در ناقل‌های کلونینگ و بیانی القا شونده، آن را به‌عنوان

هنگام ترجمه سرکوب کند. در نتیجه، فرآیند ترجمه متوقف و ریبوزوم در آغاز فعالیت، در مواجهه با کدونهای نادر، جدا می‌شود. البته این مشکل براحتی با جایگزین کردن ۱۰-۱۵ کدون غنی از GC در ابتدای پروتئین با کدونهای غنی از AT از طریق PCR، که معمولاً توسط لاکتوکوکوس لاکتیس استفاده می‌شود، قابل اصلاح است. راهکار دیگر برای غلبه بر این مشکل، بهینه‌سازی کدون کل توالی ژن مورد نظر است. البته با استفاده از این روش، می‌توان جایگاه‌های برش آنزیم و برجسب‌هایی برای خالص‌سازی پروتئین نیز در توالی ژن تعبیه کرد.

۲ - یکی دیگر از ضعف‌های باکتری *L. lactis*، میزان نسبتاً پایین ترانسفورماسیون آن است. به این معنی که پس از ترانسفورماسیون تعداد کمی از سلولهای تغییرشکل یافته به دست می‌آید. البته، با به کارگیری مقدار بیشتری DNA و یا استفاده از یک سویه مناسب *E. coli* به عنوان میزبان حدواسط، می‌توان بر این مشکل فائق آمد، زیرا وکتورهای بیانی در این باکتری بخوبی تکثیر می‌یابند.

۳ - مشکل دیگر این باکتری، مقاومت نسبتاً زیاد لاکتوکوکوس در برابر ترکیبات لیزکننده است. دلیل آن این است که لاکتوکوکوس‌ها نسبتاً کوچک و کروی شکل بوده و دیواره سلولی ضخیم دارند. از این رو، برای جداسازی DNA پلاسمید، دیواره باکتری باید با استفاده از لیزوزیم در دمای ۵۰°C تخریب شود.

استفاده از لاکتوکوکوس لاکتیس

به عنوان ناقل‌های مخاطی برای تحویل پروتئین‌های دارویی

چون سطوح مخاطی بدن اولین جایگاه تعامل بین میکروارگانیسم‌ها و بدن است، سلولهای مخاطی اصلی‌ترین معبر برای ورود پاتوژنها هستند. مصرف یک واکسن یا دارو از راه مخاطی ساده‌تر بوده و می‌تواند پاسخ ایمنی کارآمدتر و با کمترین عوارض جانبی نسبت به واکسنهای سیستمیک را ایجاد کند. مشکل عمده این روش، تجویز مقدار زیاد (۸) پروتئین است زیرا مقداری از آن در سطوح مخاطی مانند دستگاه گوارش تخریب می‌شود. از این رو، توسعه ناقل‌های (Vector) جدید که قادر به انتقال مؤثر مولکولها به بافت‌های هدف باشند یک نیاز و یک چالش بیوتکنولوژی است. از طرفی، به طور کلی ایمن زایی پروتئین‌های محلول وقتی به صورت خوراکی یا استنشاقی مصرف می‌شوند اندک است،

۵ - وجود پروموتورهای قوی و قابل تنظیم در لاکتوکوکوس لاکتیس امکان بیان پروتئین‌های سمی را فراهم می‌سازد. در *E. coli*، بسیاری از پروموتورها ذاتاً دچار نشتی هستند، به این معنی که حتی در صورت عدم القا، تا حدودی رونویسی صورت می‌گیرد که اغلب با فشار انتخابی به تخریب یا پایین نگاه داشتن میزان پلاسمیدها می‌شود. اما در *L. lactis* به دلیل استفاده از پروموتورهای قوی، هیچ فشار انتخابی به منظور نگهداری پلاسمیدها وجود ندارد، بنابراین پلاسمیدها پایدار هستند.

۶ - سطح بیان در باکتری را می‌توان با غلظت القاکننده خارجی کنترل کرد. بیان کنترل شده پروتئین تحت پروموتورهای قوی، به ویژه برای بیان پروتئین‌های سمی مفید است، زیرا می‌تواند سطح بیان را تعدیل کند تا امکان بیان متوسط پروتئین برای جلوگیری از مرگ سلولی فراهم شود. ۷- به دلیل فعالیت نسبتاً ضعیف پروتئین‌های در این باکتری، پروتئین‌های غشایی بیان شده در لاکتوکوکوس لاکتیس اغلب پایدارند.

۸- ژنگان باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس کوچک (2.3 ~ Mbp) است و در حدود 2310~ پروتئین را رمزگذاری می‌کند. اندازه کوچک ژنگان سبب کاهش بخشهای اضافی و تکراری (Redundancy) شده که این خود سبب تسهیل در مطالعات عملکردی پروتئین‌های بیان شده می‌شود. زیرا پروتئین‌های درون زاد با عملکرد مشابه احتمالاً وجود ندارند. همچنین به دلیل عدم حضور ناخالصی‌ها و طبعاً عدم نیاز به فرآیند حذف آنها، تخلیص پروتئین‌های بیان شده راحت‌تر صورت می‌گیرد.

مجموع این ویژگی‌ها همراه با امکان لیوفیلیزه کردن و به حالت محلول در آمدن دوباره باکتری، استفاده از آن را در تحقیقات و صنعت آسان کرده است.

محدودیت‌های باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس (17)

در کنار مزایای ذکر شده، این باکتری نقاط ضعف‌هایی نیز دارد که غلبه بر آنها براحتی امکان‌پذیر است.

۱ - یکی از معایب سیستم بیانی لاکتوکوکوس لاکتیس، استفاده از کدون غنی شده با نوکلئوتیدهای AT (محتوای GC برابر 35-37 درصد) است که این می‌تواند بیان ژن‌هایی با کدون غنی از GC را به دلیل نیاز به tRNA‌های نادر در

با ظرفیت (High-throughput) امکان پذیر شده است، اما ساختار سه بعدی تعداد اندکی (کمتر از ۲۰۰) از پروتئین‌های غشایی تاکنون شناخته شده است (۸). از طرفی میزان بیان اکثر پروتئینهای غشایی پایین است، و برای مطالعات عملکردی و ساختاری نیاز به بیان مقدار فراوانی از پروتئین است. تولید غلظت بالایی از پروتئینهای غشایی یوکاریوتی بیان شده، یک چالش بزرگ در تحقیقات ساختاری و عملکرد آنها به شمار می‌آید. اما در ۱۰ سال اخیر ثابت شده است که لاکتوکوکوس لاکتیس می‌تواند یک میزبان بسیار مناسب برای تولید انبوه پروتئینهای غشایی فعال (Functional) باشد.

سیستم‌های بیانی

و تولید پروتئینهای نو ترکیب در لاکتوکوکوس لاکتیس

خوشبختانه با تعیین توالی ژنتیکی چهار سویه فاقد پلاسمید از این باکتری (MG1363، IO-1، KW2 و IL1403)، دانش کافی از بیولوژی و ژنتیک آن به دست آمده است و همین دستاوردها یکی از دلایل پیشرفت این باکتری به عنوان یک ابزار مناسب برای تولید پروتئین است. از این رو، امروزه این باکتریها به عنوان یک میزبان برای بیان پروتئینهای نو ترکیب هومولوگ و هتروولوگ به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود (۲۲). برای افزایش بیان و تولید پروتئین نو ترکیب هتروولوگ، علاوه بر انتخاب سویه باکتری، شرایط مختلفی از جمله دما، حجم سوسپانسیون، نوع و کتور و نیز جایگاه تولید پروتئین باید بهینه سازی شود. معمولاً تولید پروتئین، در هر دو مقیاس حجم بالا (در فرمانتور) و حجم کم (در فلاسک یا ارلن) صورت می‌گیرد (۱۹). البته براساس گزارشات، شرح پروتئینهای نو ترکیب در فرمانتور با pH کنترل شده به مقدار قابل توجهی بیشتر از فلاسک است (۳۴). از طرفی، تجمع لاکتات در محیط کشت مانع از رشد و تولید محصول می‌شود، اما با کنترل pH سوسپانسیون می‌توان بر این محدودیت فائق آمد (۱۶). در شرایط بهینه با استفاده از لاکتوکوکوس لاکتیس بیش از ۲۰ mg/L پروتئین قابل تولید است (۲۴). جدول ۱ لیستی از پروتئینهای نو ترکیب را که در این باکتری تولید شده است نشان می‌دهد. البته میزان تولید پروتئین‌های نو ترکیب در *L. lactis* وابسته به کارایی رونویسی پرموتورها است.

اما می‌توان با مهندسی ژنتیک یا با اتصال آن به یک باکتری میزان آن را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد.

از سوی دیگر، محققان باکتریهای بیماری‌زای ضعیف شده مانند مشتقات مایکوباکتریوم و سالمونلا را برای تعامل با سطوح مخاطی تولید کرده اند. متأسفانه این باکتریها می‌توانند پتانسیل بیماری‌زایی خود را بازیابند و به همین دلیل در کودکان و بیماران دچار نقص سیستم ایمنی قابل استفاده نیستند (۴). از این رو، یکی از مزیت‌های مهم لاکتوکوکوس لاکتیس استفاده از آن به عنوان یک وکتور زنده برای انتقال داروهای مبتنی بر پروتئین به شیوه‌ای کاملاً امن است، زیرا همان طور که ذکر شد این میکروارگانیسم در انسان غیرتهاجمی، غیربیماری‌زا و بی‌خطر هستند (۴). بعلاوه، داده‌های کنونی نیز نشان می‌دهد که باکتریهای اسید لاکتیک، بویژه لاکتوکوکوس‌ها و لاکتوباسیل‌ها، کاندیدهای عالی به عنوان یک ناقل تحویل یا رساننده (Delivery) پروتئینهای درمانی، به منظور پیشگیری و یا درمان بیماریها در انسان هستند (۱۳، ۴۱).

استفاده از لاکتوکوکوس لاکتیس

برای بیان پروتئینهای غشایی هتروولوگ

پروتئینهای غشایی طیف گسترده‌ای از فعالیت‌ها را در فرآیندهای حیاتی، از جمله رشد و تقسیم سلولی، حفظ یکپارچگی و انسجام سلول، انتقال انرژی، تعامل و میانکشی‌های بین سلولی و انتقال بین غشایی را برعهده دارند. بنابراین، پروتئین‌های غشایی مهم‌ترین گروه پروتئینها از نظر اهداف دارویی محسوب می‌شوند. تقریباً ۲۵ درصد ژنهای شناسایی شده در ژنوم یوکاریوتها، پروتئینهای متصل به غشاء (Integral membrane proteins) را رمزگذاری می‌کنند. با وجود اهمیت عملکرد این پروتئینها و کاربرد آنها در بیوتکنولوژی، مطالعه پروتئینهای غشایی به دلیل عدم دسترسی به شکل طبیعی آنها در سلولها و نیز خاصیت آب‌گریزی آنها دشوار است (۸). بعلاوه، بیان این پروتئینها غالباً با مشکلاتی روبروست، که عبارت‌اند از: ۱) وقتی در سیستمهای هتروولوگ نظیر: باکتریها، مخمرها، سلولهای حشرات، سلولهای پستانداران و تخمک‌های زنبوس، بیان می‌شوند سمی هستند؛ ۲) به میزان کم و در فضایی محدود بین محیط و غشاء بیان می‌شوند؛ ۳) اغلب به صورت اشتباه یا بدون پیچش و تاخوردگی (Unfold) تولید می‌شوند. اگر چه امروزه تولید ساختارهای سه بعدی از پروتئینهای محلول

جدول ۱- لیست تعدادی از پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس

منابع	محصول	فرمانتور یا حجم	موقعیت زیر سلولی	پروموتور یا پلاسمید	پروتئین	سویه
[15]	~2.5 g/L	Fermenter	Sec	170 inducible promoter	Staphylococcus aureus nuclease	MG136 3
[34]	~2.2-2.5 mg/L	Fermenter	Sec	pLB145 and pVE8124-7// ZitR-regulated Pzit	Staphylococcal HtrA protein	MG136 3
[3]	-	200 ml	Sec	-	Pediocins	NZ9000
[26]	-	Fermenter	-	P170 promoter	Chimeric fusion protein (GMZ2'.10C)	MG136 3
[37]	1 to 40 mg/L	Fermenter/ 1 L	Sec	-	Plasmodium falciparum antigens	MG136 3
[36]	~25 mg/L	Fermenter/ 1-5L	Sec	pSS1	PfCSP4/38	MG136 3
[35]	1.88 g/L	Fermenter/ 1 L	-	pNZ8048	1,2-propanediol	NZ9000
[24]	-	-	Sec	pNZ8148	Human IFN α -2b	NZ3900
[21]	6.7 g/L	Fermenter	Sec	pTD6	Butanedione	MG136 3

استرپتوکوکوس کرموریس (*Streptococcus cremoris*) اشاره کرد که به وسیله آن پروتئین نوکلئاز از *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) را در سه سطح سلولی مختلف (سیتوپلاسمی، متصل به دیواره و ترش‌جی) در *L. lactis* تولید کردند. مقدار پروتئین تولید شده ۲/۵-۳ میلی گرم بود که احتمالاً به دلیل تعداد نسخه‌های کم پلاسمید و نیز فعالیت پروتئاز خارج سلولی HtrA در *L. lactis* است (۳۲). از آنجایی که این دسته از پروموتورها به صورت یکنواخت و پایدار پروتئین هترولوگ را تولید می‌کنند و نیازی به افزودن القا کننده ندارند، مقرون به صرفه هستند. از طرفی، در مواردی که تعداد زیادی مسیر متابولیکی باید تغییر داده شوند تنها از این دسته از پروموتورها می‌توان کمک گرفت.

سیستم های تنظیمی قابل القا (Inducible promoters) تا به امروز، پروموتورهای قابل القای متعددی در لاکتوکوکوس لاکتیس شناخته شده‌اند که یا به وسیله عوامل محیطی مانند دما (از طریق شوک حرارتی) یا pH یا القا کننده‌هایی همچون روی یا نیسین (nisin) تنظیم می‌شوند (۲۲). مثلاً، سیستم القایی P170 با استفاده از ویژگی‌های باکتری‌های LAB مبتنی بر اسیدپتید محیط طراحی شده‌اند. این پروموتور خود القا شونده است و زمانی القا می‌شود که pH محیط به حدود ۶ یا کمتر برسد. در واقع، پروموتور P170 با کاهش pH محیط کشت باکتری در فاز ایستای رشد، خود به خود القا شده و سبب تولید مقدار فراوانی پروتئین نوترکیب می‌شود (۱۸). همچنین، سیستم های بیانی قابل القایی همچون P(Zn)ZitR و

در حال حاضر، سیستم های بیانی متنوعی در لاکتوکوکوس لاکتیس برای بیان و کنترل تولید پروتئین‌های نوترکیب هترولوگ اعم از سیستم‌های بیانی نهادی بیان شونده غیرالقایی (Constitutive) و القا شونده (Inducible) به هر دو شکل طبیعی یا ساختگی (Synthetic) توسعه یافته‌اند. ابتدا پروموتورهای غیرالقایی از کتابخانه ژنگانی باکتری جدا شدند که سطح بیان متغیری را نشان می‌دادند. مشکل سیستم های غیرقابل القا، تجمع پروتئین در سیتوپلاسم است. سپس، پروموتورهای القا پذیر در لاکتوکوکوس لاکتیس کشف شدند که با سایر سویه‌ها برای بیان ژنهای اینترلوکینها، آنتی ژنها و آنزیمها سازگاری یافتند. در اکثر مواقع، به دلیل قابل کنترل بودن بیان پروتئین در یک زمان خاص، استفاده از پروموتورهای القا شونده به پروموتورهای غیرقابل القا ترجیح داده می‌شوند (۳۸). در ادامه، عمومی ترین سیستم‌های تنظیمی استفاده شده در لاکتوکوکوس لاکتیس شرح داده شده است.

پروموتورهای با بیان نهادی (Constitutive)

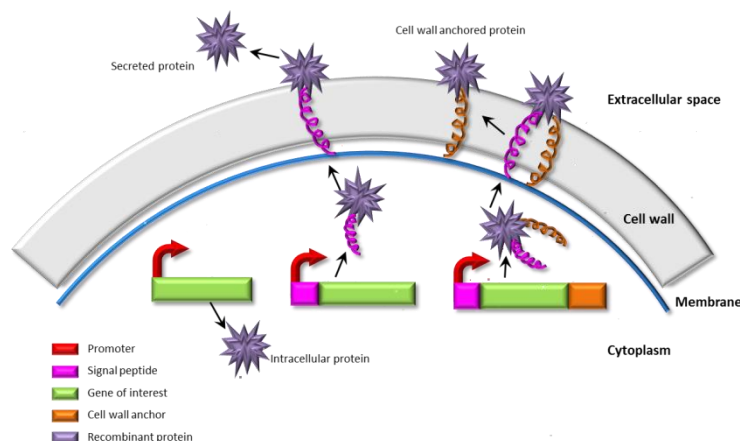
تاکنون ۳۸ پروموتور دائماً بیان شونده در *L. lactis* شناسایی شده است که ظرفیت بیان متفاوتی دارند. در این میان P32 و P45 پروموتورهای رایج مورد استفاده‌اند. همچنین پروموتورهای قویتری نیز نظیر پروموتورهای P2، P3، P5 و P8 نیز کشف شدند که کارایی رونویسی آن‌ها بالاتر از پروموتور P45 است (42). از موارد دیگر می‌توان به P59 از باکتری

یک پپتید کوچک (۳۴ اسیدآمینه ای) باکتریوسین یا ضد میکروبی پایدار درمقابل گرماست که بیوستتزر آن توسط اپرون *nis* که حاوی یک دسته ۱۱ تایی (*nisABTCIPRKE-*) (FG) از ژنهاست رمزگذاری می‌شود که بر روی کروموزوم قرار دارد.

اولین ژن یعنی *nisA* رمز کننده پیش ساز (Precursor) نیسین است و ژنهای دیگر پروتئینهایی را سنتز می‌کنند که یا مستقیماً در تغییرات، انتقال و پردازش نیسین (*nisC nisB*) و یا در ایجاد ایمنی در مقابل آن (*nisE nisG*) و یا در تنظیم بیان ژنهای نیسین (*nisI nisF*) نقش دارند. نیسین با اتصال به لیپید II در غشاء باعث ایجاد منافذی در آن و نشت مولکول‌های کوچک مانند ATP از سلول و در نهایت مرگ سلول می‌شود. به علت طیف وسیع میزبان‌های تحت تأثیر نیسین، از آن به عنوان نگهدارنده غذایی استفاده می‌شود. در سیستم NICE از عناصر تنظیمی موجود در اپرون نیسین (*PnisA, nisK, nisR*) استفاده شده است. ژن *nisA* برای ژن ساختمانی نیسین رمزگذاری می‌شود. اما *nisRK* برای یک سیستم دوجزئی که مسئول القا ژنهای دیگر در میان خوشه ژنی است رمزگذاری می‌شوند. ژن *nisK* یک پروتئین هیستیدین کیناز را تولید می‌کند که در غشای سیتوپلاسمی قرار دارد و به عنوان یک رسپتور برای ملکول نیسین عمل می‌کند و به محض دریافت نیسین، دچار فسفوریلاسیون خودبخودی شده و گروه فسفات را به *nisR* منتقل می‌کند و *nisR* نیز منجر به القای رونویسی دو پروموتور *PnisA* و *PnisF* در خوشه ژنی *nisin* می‌شود (۳۸).

Zirex وجود دارند که هر دو براساس در دسترس بودن روی (Zinc) تنظیم می‌شوند، از این رو "سیستم روی" خوانده می‌شوند، یعنی براساس حضور روی به ترتیب سرکوب و القا می‌شوند. پروموتور اپرون *zit* در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس به نام *PznZitR* با حضور روی تنظیم می‌شود. در غیاب روی، رپرسور رونویسی *ZitR* غیرفعال شده و RNA پلیمراز می‌تواند به پروموتور *Pzn* متصل می‌شود. در مقابل، در سیستم بیانی *Zirex* وقتی غلظت مناسبی (غیر سمی) از روی استفاده شود، پروموتور استرپتوکوکال *Pczd* (که به وسیله رپرسور *SczA* تنظیم شده) فعال شده و سطح بیان را بالا می‌برد (۲۳، ۲۸). همچنین گروه دیگری، با تلفیق دو سیستم *NICE* و *Zirex* توانستند به طور موفقیت آمیزی پروتئینهای مختلفی را تولید کنند (28).

بدون شک، موفق‌ترین و متداولترین سیستم بیانی القا پذیر شناخته شده برای تولید پروتئینهای هترولوگ در لاکتوکوکوس لاکتیس، سیستم بیانی *NICE* (*Nisin-controlled expression system*) است که به کمک یک پروموتور قابل القا با نیسین کنترل و تنظیم می‌شود. این سیستم در سال ۱۹۹۵ توسط *Kuipers* و همکاران معرفی شد. سیستم بیانی *NICE* برای بیان پروتئینهای هومولوگ و هترولوگ در مقیاس انبوه، بیان پروتئینهای غشایی پروکاریوتی و یوکاریوتی، ترشح پروتئین، بیان ژنهایی با محصولات سمی و بررسی ژنهای ضروری بسیار مناسب است. یکی از دلایل اصلی توسعه این سیستم بیانی این است که براساس یک سیستم تنظیمی دو جزئی کار می‌کند. نیسین



شکل ۱- شکل شماتیک تولید پروتئین نوترکیب هترولوگ در سه جایگاه مختلف زیر سلولی، داخل سلول، ترشحي به خارج سلول و متصل به دیواره سلول باکتری.

سخت و پر آنزیم فضای خارج سلولی است، اما از طرفی، برای آزاد سازی پروتئین نوترکیب تجمع یافته در درون سلول به فضای خارج سلول، سلول باید لیز شود.

— **وکتورهای pSEC:** وکتورهایی هستند که قادر به ترشح پروتئین نوترکیب تولید شده به فضای بیرون از سلول هستند. این شیوه بیان، امکان انتشار پروتئین در فضای خارج سلولی و تعامل مستقیم با محیط را فراهم می‌سازد. این استراتژی براساس رهایی پروتئین‌ها به محیط خارج سلول از طریق یک پپتید راهنما صورت می‌گیرد. از آنجایی که تنها یک پروتئین ترشچی در *L. lactis* وجود دارد، لذا از پپتید راهنما آن (USP45) جهت ترشح پروتئین‌های نوترکیب کمک گرفته می‌شود. اخیراً از پپتید راهنما SPK1 گرفته شده از باکتری *پدیوکوکوس پنتاسئوس* (*Pediococcus pentosaceus*) در ترشح پروتئین‌ها از باکتری نوترکیب *L. lactis* نیز استفاده شده است که کارایی ترشچی بالاتری نسبت به پپتید راهنما USP45 دارد، اما میزان پروتئین تولید شده کمتر است. از سوی دیگر، می‌توان با اضافه کردن پپتید LEISSTCDA به ابتدای پپتید راهنما باعث افزایش کارایی ترشح شد. همچنین مشخص شده است که بیان همزمان پروتئین مورد نظر با پروتئین PrsA از *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) منجر به افزایش ترشح پروتئین می‌شود. این ویژگی از آن جهت اهمیت دارد که PrsA یک پروتئین ترشچی است که با خاصیت چارپرونی تخریب پروتئین‌های ترشچی را کاهش می‌دهد (۲۰). البته با استفاده از این سیستم، پروتئین‌های رها شده بلافاصله پس از ترشح توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک تجزیه می‌شوند. از آنجایی که این باکتری تنها یک پروتئین (HtrA) دارد، بنابراین شانس تجزیه شدن پروتئین هترولوگ بسیار کم است. از طرفی می‌توان با ایجاد جهش، عملکرد این پروتئین را مختل کرد و میزان پروتئین ترشح شده را افزایش داد. به طور کلی، شکل ترشچی پروتئین به علت تخلیص ساده تر، تولید بیشتر و برهمکنش بهتر با هدف بر شکل سیتوپلاسمی آن ارجحیت دارد.

— **وکتورهای pCWA:** در برخی از موارد، وقتی که تولید سیتوپلاسمی و ترشچی پروتئین‌های ایمونوژن پاسخ ایمنی مناسبی را نشان نمی‌دهند، اتصال پروتئین بیان شده به غشا گزینه مناسب تری است (۷، ۱۴، ۴۱)، که ترکیبی

پروموتور PnisA، پرکاربردترین سیستم القا پذیر پروتئین در لاکتوکوکوس لاکتیس و باکتریهای گرم مثبت دیگر است. ژنهای مورد نظر در درون پلاسمید و در پایین دست پروموتور PnisA کلون می‌شوند و پلاسمید نوترکیب حاصل در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس سویه NZ9000 که ژنهای nisRK را بر روی کروموزوم خود حمل می‌کنند ترانسفورم می‌شود. افزودن مقدار مناسب نیسین (1-10 ng/ml)، زیر حد مهار کنندگی) به عنوان القا کننده به محیط کشت، بیان ژنهای کلون شده تحت کنترل PnisA در سویه‌های حاوی nisRK را القا می‌کند. با این حال، برای تولید صنعتی، افزودن نیسین پرهزینه است و درمورد تولید پروتئینهای دارویی، به فرآیندهای پایین دستی برای حذف آن مورد نیاز است (۲۷).

سطوح یا موقعیتهای مختلف زیر سلولی برای بیان پروتئین

قطعاً، موقعیت پروتئین بیان شده در باکتری تأثیر زیادی بر کارآمدی درمان و تعدیل پاسخ ایمنی دارد. علاوه بر آن، همه موقعیتهای سلولی برای تولید پروتئینهای نامحلول مناسب نیستند. تولید طیف گسترده‌ای از پروتئین‌ها اعم از آنتی ژن‌ها، اینترلوکین‌ها، یا آنزیم‌ها در موقعیتهای مختلف زیر سلولی (Subcellular localizations) میسر است. به طور کلی، تولید آنتی ژنهای مورد نظر به وسیله باکتریهای گروه LAB ممکن است در سه مکان سلولی مختلف صورت گیرد. (۱) داخل سلولی، (۲) خارج سلولی، (۳) متصل به دیواره سلول (Cell wall-anchored) (شکل ۱). در اکثر موارد نشان داده شده است که محصول پروتئین در حالت ترشچی خیلی بیشتر از بیان سیتوپلاسمی است (۱۹). مطالعات نشان داده است که بهترین حالت برای بالاترین پاسخ ایمنی معمولاً با آنتی ژنهای بیان شده و متصل به دیواره سلولی که بر روی سطح باکتری قرار دارند به دست می‌آید. بنابراین در اکثر تحقیقات در زمینه واکسیناسیون، محققان تمایل به انتخاب آنتی ژن‌هایی دارند که به جای تولید در داخل یا خارج سلول، در سطح سلول بیان شده، در معرض سیستم ایمنی قرار می‌گیرند. بنابراین سه نوع وکتور پلاسمیدی اختصاصی متناسب با موقعیت مورد نظر طراحی شده اند.

— **وکتورهای pCYT:** وکتورهایی که بدون حضور سیگنال پپتید، پروتئین مورد نظر را در داخل سلول باکتری تولید می‌کنند. مزیت این روش در امان ماندن پروتئین از محیط

اما استفاده از سویه های نو ترکیب *L. lactis* بسیاری از این مشکلات را مرتفع کرده است. در این راستا، سویه های تجاری متنوعی با فنوتیپهای مختلف از سویه آغازگر لبنی NCDO712 مشتق شده اند. به عنوان مثال، در باکتری *L. lactis*-IL1403 ژن *HtrA*، تنها پروتئاز خارج سلولی در این باکتری، غیرفعال شده است و در نتیجه پروتئین هترولوگ تولید شده در این سویه پایدار می ماند. لاکتوکوکسی ها برای برخی از اسیدهای آمینه آگزوتروف هستند که این ویژگی مزایایی را برای این سیستم بیانی به ارمغان می آورد. مثلاً، در مواردی به جای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک به عنوان مارکر، از سویه های آگزوتروف *L. lactis* استفاده می شود که در صنایع غذایی کاربرد فراوانی دارد (۳۱). اولین سیستم انتخاب بدون حضور ژن آنتی بیوتیک بر پایه ژن *LacF* از اپرون لاکتوز تهیه شد. بیان ژن *LacF* بر روی یک پلاسمید باعث می شود تا سویه موتانت *Lac*- بتواند در حضور لاکتوز رشد کند. همچنین سیستم هایی بر پایه آگزوتروف های ترئونین و پیریمیدین از سویه های *L. lactis* تهیه شده اند که اجازه بیان مؤثر پروتئین های هترولوگ و هومولوگ را در عرصه صنعت می دهند. این دو سیستم پایدارند، مانع رشد نمی شوند و به واسطه حفظ ویژگی های مطلوب مثل تولید اسید لاکتیک و فقدان مارکر آنتی بیوتیکی در مواد غذایی قابل استفاده اند (۱۰).

همچنین، سویه MG1363 یک سویه عاری از پلاسمید است که عموماً برای کلونینگ و بیان ژن در لاکتوکوکوس لاکتیس به کار می رود. در کروموزوم باکتری *L. lactis*-cremoris سویه NZ9000 ژن های *nisR/K* در لوکوس ژن آمینوپیتیداز *pepN* از سویه MG1363 وارد شده اند، بنابراین اگر ژنی در پایین دست پروموتور *PnisA* بر روی پلاسمید کلون شود، براحتی تحت کنترل *Nisin* بیان می شود. در سویه NZ9100 دو ژن تنظیمی *nisR/K* در یک لوکوس خنثی قرار داده شده اند. سویه NZ3000، سویه استاندارد با ارزش درجه غذایی (Food grade) است. این سویه می تواند در محیط حاوی گلوکز رشد کند، از طرفی اپرون لاکتوز در داخل کروموزوم وارد شده است و حاوی تمام ژنهای درگیر در تخمیر لاکتوز به استثنای ژن *lacF* است. حذف این ژن سبب از دست رفتن توانایی رشد این سویه در حضور لاکتوز می شود، مگر اینکه از یک پلاسمید مناسب حامل ژن *lacF* (مانند pNZ2123، pNZ2122 و یا pNZ2105) استفاده شود. همچنین، سویه

از مزایای دو حالت قبلی است، یعنی تعاملی بین پروتئین متصل به غشا و محیط، علاوه بر آن محافظت در برابر تخریب پروتئولیتیکی خارج سلولی.

به منظور قرار دادن پروتئین نو ترکیب بیان شده بر روی سطح سلول از روش های مختلفی استفاده می شود. به طور کلی، برای نمایش یک پروتئین بر سطح یک سلول، به یک پپتید نشانه برای ترشح و یک پپتید دومین به عنوان لنگر (Anchor) که یک لیوپروتئین (Lipoprotein anchor) یا پروتئین درون غشایی (Transmembrane anchor) است، برای اتصال به غشای سیتوپلاسمی نیاز هست. معمولترین پپتید نشانه جهت اتصال پروتئین نو ترکیب بر روی دیواره سلول، PrtP است که مربوط به پروتئیناز دیواره سلولی لاکتوکوکوس لاکتیس است و ژن آن بر روی پلاسمید قرار دارد. بنابراین در سویه های فاقد پلاسمید مشاهده نمی شود. همچنین، می توان پروتئین را از طریق یک موتیف پپتیدی یا توالی LPXTG بر روی دیواره سلولی قرار داد که به طور کووالانسی به دیواره سلول متصل می شود (۲۵). روش دیگر برای نمایش سطحی، استفاده از موتیف های لیزین است که که با لیز خودبخودی Acma عمل می کند. در این روش می توان پروتئین را در یک سیستم دیگر بیان و خالص سازی کرد و با افزودن آن با سوسپانسیون باکتری *L. lactis*، پروتئین هترولوگ به صورت غیر کووالانسی به دیواره سلولی باکتری متصل کرد. پس در این روش نیازی به دستکاری ژنتیکی باکتری لاکتوکوکوس نیست. پروتئین های یوکاریوتی که نیاز به تغییرات پس ترجمه دارند با این روش براحتی تولید و بر سطح باکتری قرار داده می شوند. روش دیگر استفاده از ذرات GEM (Gram positive enhancer matrix) است. آنتی ژن هایی که به این ذرات متصل شوند قادر به اتصال به پپتیدوگلیکان در سطح باکتری *L. lactis* می شوند. مشکل این روش مجاورت مداوم پروتئین با باکتری است چون در بیان آن نقشی ندارد و تنها به عنوان حامل عمل می نماید (۵).

سویه های متنوع

لاکتوکوکوس لاکتیس و پلاسمیدهای مرتبط با آنها

یکی از بزرگترین چالشها در تولید پروتئین های نو ترکیب در سلولهای تیپ وحشی تولید کم محصول به واسطه خصوصیات ذاتی سلول شامل ناپایداری mRNA، ناپایداری پروتئین هترولوگ (به واسطه فعالیت پروتئولیتیکی داخلی یا خارج سلولی) و سمیت پروتئین نو ترکیب تولید شده است.

از طرفی، خانواده وسیعی از وکتورهای بیانی برای بیان پروتئین در شرایط مختلف داخل سلول، ترشچی و یا ترشح بر روی دیواره سلول توسعه یافته اند (جدول ۳). این پلاسمیدها عموماً رپلیکون مشابهی دارند که از پلاسمید pSH71 باکتری *L. lactis* گرفته شده است و برای تکثیر باید در باکتری های گرم مثبت وارد شوند. برای تکثیر این پلاسمیدها در *E. coli* باید از سویه های *recA+* همچون MC1061 استفاده شود یا اینکه مستقیماً در لاکتوکوکوس لاکتیس استفاده شود. پلاسمید های حاوی ژن *lacF* که به عنوان مارکر انتخابی استفاده می شوند باید در سویه ای که دارای اپرون لاکتوز و فاقد *lacF* است (مانند سویه NZ3900) ترانسفورم شود (۴۰).

میزبان NZ1330 دارای یک سیستم بیانی براساس انتخاب مارکر *alr* بوده و دارای ارزش درجه غذایی است. با حذف ژن *alr* (ژن رمز کننده آلانین racemase) این سویه برای D-آلانین که ضروری است آگزوتروف می شود. بنابراین، این سویه قادر به تبدیل L-Ala به D-Ala نمی باشد. این سویه در حضور پلاسمیدهایی همچون pNZ2125 و یا pNZ7025 که حامل ژن *alr* هستند می تواند در محیطهای حاوی L-آلانین و گلوکز به عنوان منبع کربن رشد کنند. در جدول ۲، لیست سویه های مختلف این باکتری به همراه ویژگی های اختصاصی آنها نشان داده شده است.

جدول ۲- لیست سویه های نو ترکیب باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان میزبان برای بیان و تولید پروتئینهای نو ترکیب (۱۱، ۱۲).

سویه	گونه	درجه غذایی	ویژگی ژنتیکی	شاخصها
MG1363		No	Plasmid free	
NZ9000	<i>L. lactis</i>	No	<i>pepN::nisRnisK</i>	دارای سیستم القایی NICE
NZ9100	<i>L. lactis</i>	No	<i>nisRnisK</i> in neutral locus	دارای سیستم القایی NICE
NZ9130	<i>L. lactis</i>	Yes	<i>nisRnisK, alr-</i>	آگزوتروف نسبت به آلانین، دارای سیستم القایی NICE
NZ3900	<i>L. lactis</i>	Yes	<i>pepN::nisRnisK, lacF-</i>	آگزوتروف نسبت به لاکتوز، دارای سیستم القایی NICE
NZ3910	<i>L. lactis</i>	Yes	<i>nisRnisK</i> in neutral locus, <i>lacF-</i>	آگزوتروف نسبت به لاکتوز، دارای سیستم القایی NICE
NZ3000		Yes	<i>lacF-</i>	آگزوتروف نسبت به لاکتوز
NZ1330		Yes	<i>alr-</i>	آگزوتروف نسبت به آلانین

جدول ۳- لیست پلاسمیدهای مختلف مورد استفاده برای بیان پروتئینهای داخل سلولی یا ترشچی به صورت دائم بیان شونده یا القایی در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس (۱۱، ۱۲).

نام پلاسمید	سیگنال پپتید	وضعیت ترشح	وضعیت بیان	درجه غذایی	شاخصها
pNZ124	-	-	-	-	Cloning vector
pNZ2105	-	-	-	+	Cloning vector, <i>lacF</i>
pNZ2103	-	-	Constitutive	-	<i>lacA</i>
pNZ2122	-	-	Constitutive	-	<i>pepN, lacF</i>
pNZ2123	-	-	Constitutive	+	<i>lacF</i>
pNZ2125	-	-	Constitutive	+	<i>alr</i>
pNZ7025	-	-	Constitutive	+	<i>pepN, alr</i>
pNZ8148	-	Intracellular	Inducible	-	<i>PnisA</i>
pNZ8149	-	Intracellular	Inducible	Yes	<i>PnisA, lacF</i>
pNZ8150	-	Intracellular	Inducible	-	<i>PnisA</i>
pNZ8151	-	Intracellular	Inducible	Yes	<i>PnisA, lacF</i>
pNZ8152	-	Intracellular	Inducible	Yes	<i>PnisA, alr</i>
pNZ8008	-	Intracellular	Inducible	-	<i>PnisA, gusA</i>
pNZ9530	-	Intracellular	Inducible	-	<i>nisRK,</i>
pNZ8120	PrtP	Secreted	Inducible	-	<i>PnisA, cloning in NaeI</i>
pNZ8121	PrtP	Secreted	Inducible	-	<i>PnisA, cloning in EcoRV</i>
pNZ8122	SlpA	Secreted	Inducibl	-	<i>PnisA</i>
pNZ8123	Usp45	Secreted	Inducible	-	<i>PnisA, cloning in NaeI</i>
pNZ8124	Usp45	Secreted	Inducible	-	<i>PnisA, cloning in EcoRV</i>

وکتور، مهندسی و تهیه شده‌اند. در هر حال، انتخاب صحیح سیستم بیانی به کار رفته و بهینه‌سازی دقیق عوامل کلیدی آن منجر به افزایش معنی‌دار کیفیت و کمیت محصول پروتئینی تولید شده می‌شود.

اخیراً سیستم‌های بیانی یوکاریوتی غیرپاتوژن طبیعی هم برای بیان و تولید پروتئین‌های نو ترکیب مطرح شده‌اند که از نظر تولید پروتئین با ساختار طبیعی و ذاتی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳۹). اما مزیت اصلی استفاده از این باکتریها استفاده خوراکی و سابقه طولانی مصرف آن و باورپذیری آن در اذهان عمومی است. در این میان، لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان یکی از بهترین ابزارها برای بیان و مطالعه پروتئین‌های هترولوگ پروکاریوتی و یوکاریوتی توسعه یافته است. همچنین این سیستم به طور گسترده‌ای به شکل یک ناقل خوراکی/استنشاقی برای تولید پروتئین‌های درمانی و پیشگیرانه در *in vivo* به کار رفته و می‌رود. علاوه بر آن می‌تواند با استفاده از باکتری‌های نو ترکیب بیان‌کننده یک آنتی ژن پاسخ‌های ایمنولوژیکی مؤثری را در سلول یا موجود زنده هدف تحریک نماید.

تشکر و قدردانی: این مطالعه از حمایت مالی انستیتو پاستور ایران در قالب طرح پژوهشی (طرح‌های شماره ۹۱۶ و ۱۱۴۷) انجام شده است.

اما وکتور pNZ9530 حامل رپلیکون pAMb1 است و فقط در باکتری‌های گرم مثبت قابل تکثیر می‌باشد. در طراحی وکتورهای ترش‌چی، برای ترشح پروتئین تولید شده از یکی از پپتیدهای نشانه PrtP یا Usp45 مشتق شده از لاکتوکوکوس لاکتیس و یا SlpA گرفته شده از باکتری لاکتوباسیلوس برویس (*Lactobacillus bervis*) استفاده شده است (۱۱).

در این میان سیستم‌های بیانی برای مصارف خوراکی (Food grade) هم وجود دارد. از باکتری *E. coli* می‌توان برای تکثیر تمام پلاسمیدهای اختصاصی لاکتوکوکوس لاکتیس به استثناء پلاسمیدهای دارای درجه غذایی (Food-grade) استفاده کرد. زیرا *E. coli* در واقع *lacF+* و *alr+* است و انتخاب این پلاسمیدها با مشکل مواجه می‌شود.

نتیجه‌گیری

تولید پروتئین‌های نو ترکیب در واقع مبنای بسیاری از مطالعات از جمله بررسی ساختاری و فیزیکی پروتئینها، بیومارکرها، مصارف پزشکی - درمانی، بیوتکنولوژی و نیز مطالعات مکانیسمی در شرایط *in vitro* و *in vivo* است. از این رو، تقاضا برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب هترولوگ در *in vitro* به طور فزاینده‌ای رو به افزایش است. برای تولید همه پروتئین‌های نو ترکیب یک سیستم بیانی واحد وجود ندارد، بنابراین تنوعی از سیستم‌های بیانی مختلف اعم از میزبان و

منابع

1. Araújo, W.L., et al. (2009). Characterization of an endophytic bacterial community associated with Eucalyptus spp. 8, 1408-1422.
2. Azizpour, M., et al. (2017). Lactococcus lactis: A new strategy for vaccination. Avicenna journal of medical biotechnology 9, 163.
3. Back, A., et al. (2016). Recombinant pediocin in Lactococcus lactis: increased production by propeptide fusion and improved potency by co-production with PedC. Microbial biotechnology 9, 466-477.
4. Bermúdez-Humarán, L.G., et al. (2011) *Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines*. in *Microbial cell factories*. BioMed Central.
5. Buist, G., (1997) *Acma of Lactococcus lactis, a cell-binding major autolysin*. [University Library Groningen][Thesis].
6. Cook, D.P., C. Gysemans, and C. Mathieu. (2018). Lactococcus lactis as a versatile vehicle for tolerogenic immunotherapy. *Frontiers in immunology* 8, 1961.
7. Davarpanah, E., et al. (2020). Lactococcus lactis expressing sand fly PpSP15 salivary protein confers long-term protection against Leishmania major in BALB/c mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14.
8. Frelet-Barrand, A., et al. (2010). Lactococcus lactis, an alternative system for functional expression of peripheral and intrinsic Arabidopsis membrane proteins. *PLoS one* 5, e8746.
9. Gaudu, P., et al. (2019). Genetics of lactococci. *Gram-Positive Pathogens*, 461-481.
10. Glenting, J., et al. (2002). A plasmid selection system in Lactococcus lactis and its use for gene expression in L. lactis and human kidney fibroblasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5051-5056.
11. GmbH, M. (2015). NICE® Expression System for Lactococcus lactis The effective & easy-to-operate NIS in Controlled gene Expressionsystem.
12. GmbH, M. (2016). Constitutive Gene Expression System for Lactococcus lactis and Other Lactic Acid Bacteria. .

13. Hugentobler, F., et al. (2012). Oral immunization using live *Lactococcus lactis* co-expressing LACK and IL-12 protects BALB/c mice against *Leishmania major* infection. *Vaccine* 30, 5726-5732.
14. Hugentobler, F., et al. (2012). Immunization against *Leishmania major* infection using LACK-and IL-12-expressing *Lactococcus lactis* induces delay in footpad swelling. *PLoS One* 7.
15. Jørgensen, C.M., et al. (2013). Recombinant expression of *Laceyella sacchari* thermitase in *Lactococcus lactis*. *Protein expression and purification* 92, 148-155.
16. Jørgensen, C.M., A. Vrang, and S.M. Madsen. (2014). Recombinant protein expression in *Lactococcus lactis* using the P170 expression system. *FEMS microbiology letters* 351, 170-178.
17. King, M.S., C. Boes, and E.R. Kunji, (2015) *Membrane protein expression in Lactococcus lactis*, in *Methods in enzymology*. Elsevier. p. 77-97.
18. Kok, J., et al. (2017). The evolution of gene regulation research in *Lactococcus lactis*. *FEMS microbiology reviews* 41, S220-S243.
19. Le Loir, Y., et al. (2005). Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microbial Cell Factories* 4, 1-13.
20. Lim, P.Y., et al. (2017). A propeptide toolbox for secretion optimization of *Flavobacterium meningosepticum* endopeptidase in *Lactococcus lactis*. *Microbial cell factories* 16, 1-8.
21. Liu, J.-M., et al. (2021). Food grade microbial synthesis of the butter aroma compound butanedione using engineered and non-engineered *Lactococcus lactis*. *Metabolic Engineering* 67, 443-452.
22. Lull, D. and I. Poquet. (2004). New expression system tightly controlled by zinc availability in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5398-5406.
23. Lull, D., I.J.A. Poquet, and E. Microbiology. (2004). New expression system tightly controlled by zinc availability in *Lactococcus lactis*. 70, 5398-5406.
24. Meilina, L., et al. (2021). Heterologous Expression of Interferon α -2b in *Lactococcus lactis* and its Biological Activity against Colorectal Cancer Cells. *Microbiology and Biotechnology Letters* 49, 75-87.
25. Michon, C., et al. (2016). Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications. *Microbial cell factories* 15, 70.
26. Mistarz, U.H., et al. (2017). Expression, purification and characterization of GMZ2'. 10C, a complex disulphide-bonded fusion protein vaccine candidate against the asexual and sexual life-stages of the malaria-causing *Plasmodium falciparum* parasite. *Pharmaceutical research* 34, 1970-1983.
27. Morello, E., et al. (2008). *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 14, 48-58.
28. Mu, D., et al. (2013). Zirex: a novel zinc-regulated expression system for *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology* 79, 4503-4508.
29. Nomura, M., et al. (1999). Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris*. 49, 163-166.
30. Parada, J.L., et al. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian archives of Biology and Technology* 50, 512-542.
31. Plavec, T.V. and A.J.M. Berlec. (2020). Safety aspects of genetically modified lactic acid bacteria. 8, 297.
32. Poquet, I., et al. (2000). HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Molecular microbiology* 35, 1042-1051.
33. Rattanachaiyapong, P. and P. Phumkhaichorn. (2010). Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research* 1, 218-228.
34. Samazan, F., et al. (2015). Production, secretion and purification of a correctly folded staphylococcal antigen in *Lactococcus lactis*. *Microbial cell factories* 14, 1-14.
35. Sato, R., et al. (2021). Production of R-and S-1, 2-propanediol in engineered *Lactococcus lactis*. *AMB Express* 11, 1-9.
36. Singh, S.K., et al. (2020). The *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein produced in *Lactococcus lactis* is pure and stable. *Journal of Biological Chemistry* 295, 403-414.
37. Singh, S.K., et al. (2018). *Lactococcus lactis* provides an efficient platform for production of disulfide-rich recombinant proteins from *Plasmodium falciparum*. *Microbial cell factories* 17, 1-13.
38. Song, A.A.-L., et al. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial cell factories* 16, 55.
39. Taheri, T., et al. (2016). *Leishmania*-based expression systems. *Applied microbiology and biotechnology* 100, 7377-7385.
40. Tarazonova, M., et al. (2016). Plasmid complement of *Lactococcus lactis* NCDO712 reveals a novel pilus gene cluster. 11, e0167970.
41. Yam, K.K., et al. (2011). Generation and evaluation of A2-expressing *Lactococcus lactis* live vaccines against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *Journal of medical microbiology* 60, 1248-1260.
42. Zhu, D., et al. (2015). Isolation of strong constitutive promoters from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N8. *FEMS microbiology letters* 362, fnv107.