به نام خدا

عنوان: بررسی تأثیر کاهش بیان6S RNA بر میزان بیان فیوژن پروتئین -cas9 GFP در باکتری BL 21

استاد راهنما:
دکتر زهرا بزی

استاد مشاور:
دکتر یعقوب صفدری

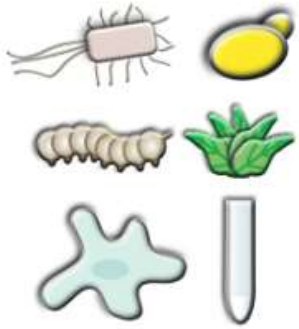
ارائه دهنده:
اکرم والانیک

-آنالیز فراورده تولیدی

- تخلیص

- شکستن سلولی و استخراج

- تولید فراورده در مقیاس انبوه



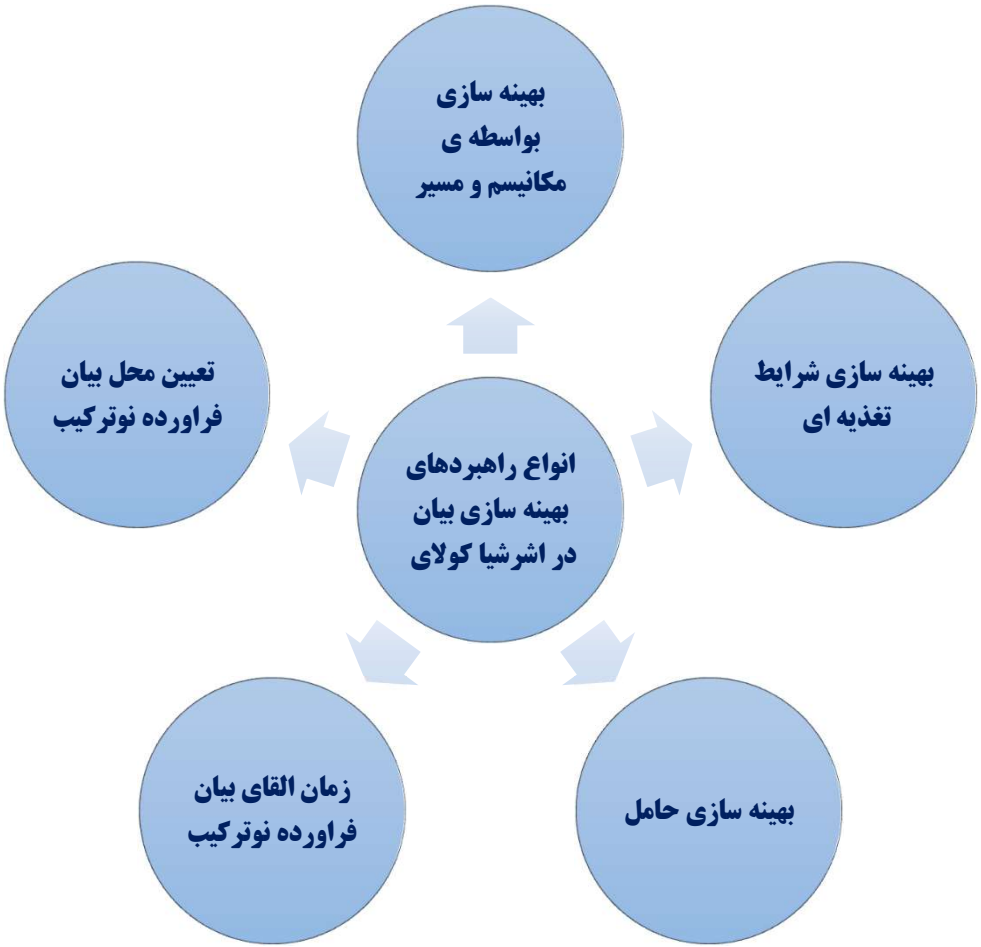
- انتخاب میزبان مناسب
- قارچ
- سلول های حشرات
- سلول های پستانداران
- حیوانات تراریخته
- باکتری ها

حدود سی در صد تولید پروتئین های نوترکیب در میزبان های باکتریایی انجام می‌شود و یکی پرکاربردترین میزبان ها می باشد.

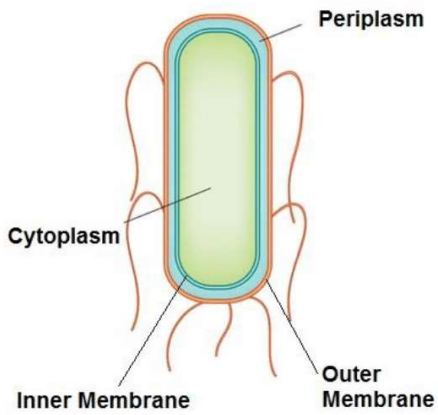
- طراحی حامل مناسب

- طراحی اولیه

انواع راهبردهای بهینه سازی بیان در اشرشیا کولای



تعیین محل بیان فراورده نوترکیب



- با توجه به نوع پروتئین تولیدی
- مزایا و معایب هر بخش
- شرایط اقتصادی

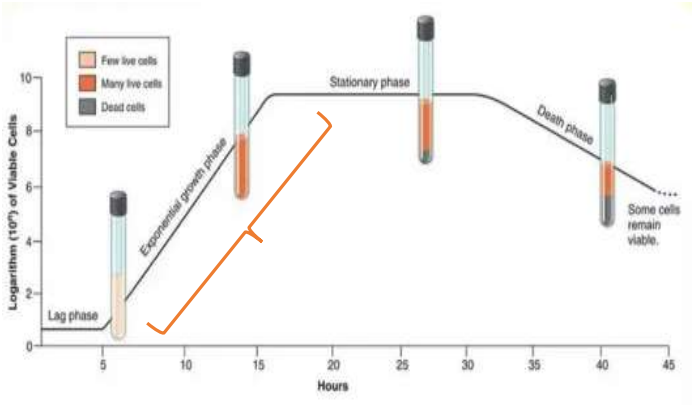
بهینه سازی حامل

- تاثیر گذاری بر بیان و جابجائی فراورده
- قدرت پروموتور
- واکنش به القا
- نحوه به کارگیری کدون‌ها برای بیان ژن هدف
- تاثیر گذاری بر بیان و جابجائی فراورده
- پایان صحیح فرایند رونویسی و ترجمه
- میزان تکثیر پلاسمید

بهینه سازی شرایط تغذیه ای

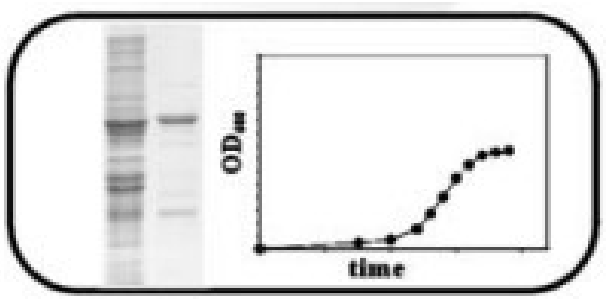
- ترکیب مواد غذایی
- نحوه تغذیه
- متغیرهای رشد از قبیل دما، اکسیژن و **PH**

زمان القای بیان فراورده نوترکیب

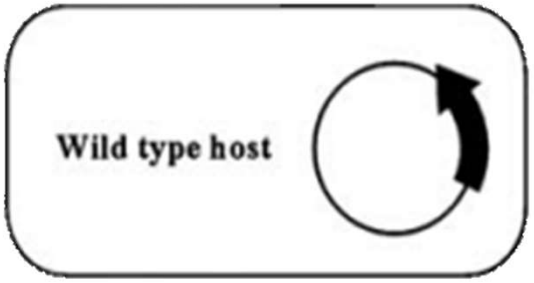


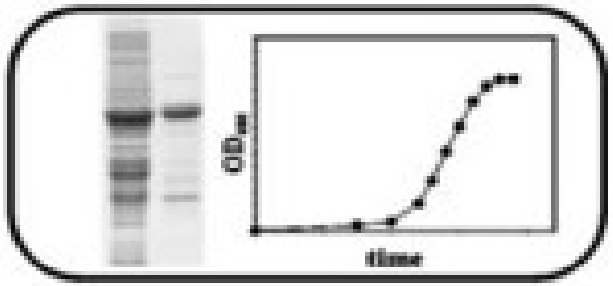
- القا در زمان مناسب
- غلظت مناسب از القا کننده

بهینه سازی بواسطه تغییر مکانیسم و مسیر

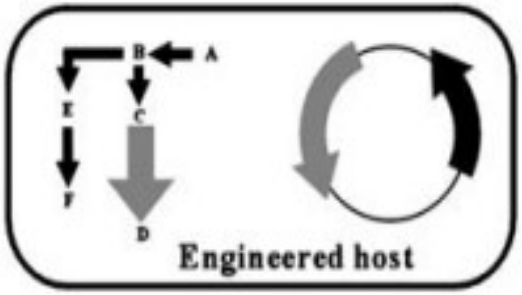


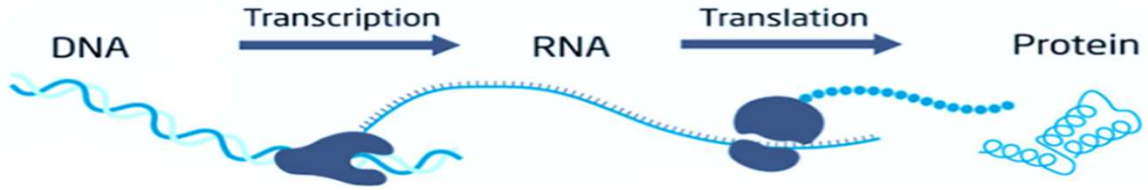
- بهینه سازی شرایط تغذیه ای
- بهینه سازی حامل
- زمان القای بیان فراورده نوترکیب





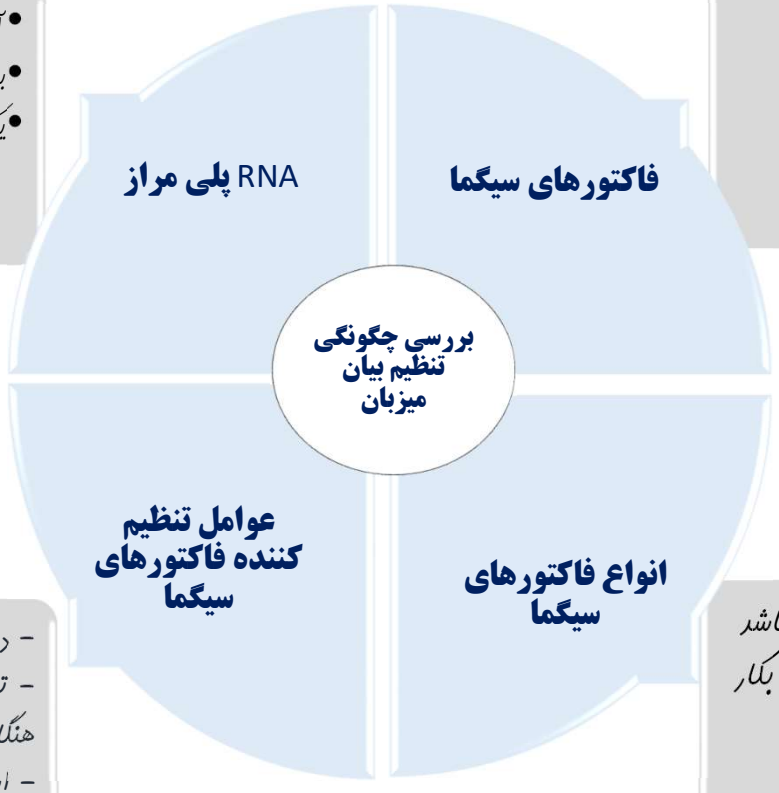
- استفاده از دانش بیوانفورماتیک
- تجزیه و تحلیل مسیرها و مشخص کردن عناصر کلیدی
- دستکاری عناصر کلیدی و بهینه سازی مسیر به منظور دست یابی به تولید حداکثری





انتخاب میزبان مناسب
• رشد بسیار سریع
• تراکم سلولی بالا
• محیط رشد ارزان و در دسترس
• قابلیت بالا در دریافت DNA بیگانه
• منشا باکتریایی پروتئین هدف
انتخاب میزبان مناسب
انواع میزبان ها
• قارچ ها
• باکتریها: اشرشیا کولای
• حشرات
• پستانداران
• گیاهی
• حیوانات تراریخته
بررسی وضعیت رشد میزبان
• مرحله رشد تأخیری
• مرحله رشد لگاریتمی
• مرحله سکون
• مرحله مرگ
جابجایی بین مراحل مختلف مراحل رشد
• RNA پلی مراز باکتریایی
• فاکتورهای سیگما

پروتئین هدف
برای بهینه سازی

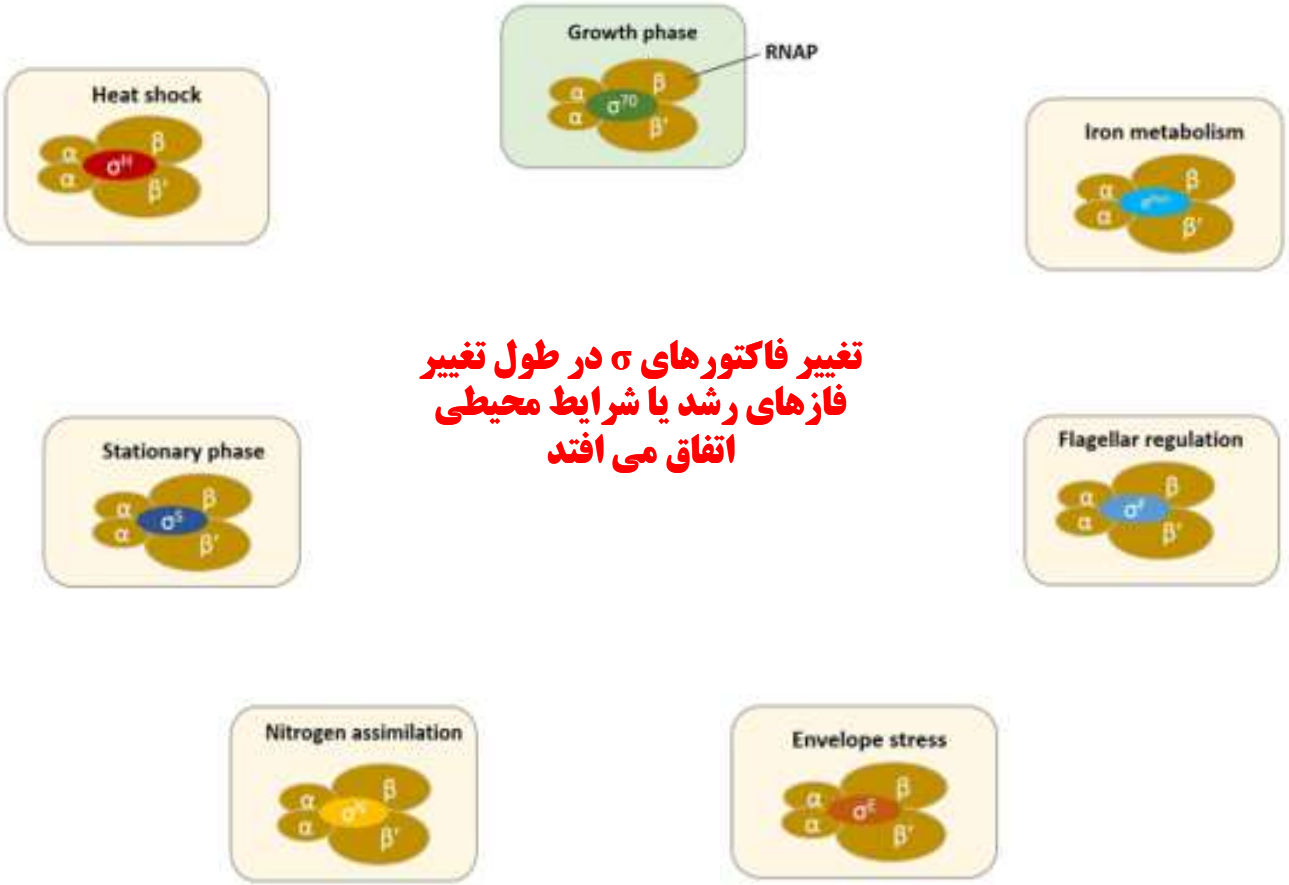


- عضوی از خانواده فاکتورهای رونویسی
- اتصال به هسته **RNAP**
- هدایت رونویسی به سمت پروموتورهای خاص
- ضروری جهت شناسایی توالی پروموتوری

- آنزیم چند زیر واحدی
- بخش مرکزی $E: \alpha\alpha\beta\beta$
- یک فاکتور اختصاصی σ

- اشرشیا کولای دارای هفت فاکتور سیگما میباشد
- در هر مرحله از رشد فاکتور سیگمای مناسب بکار گرفته می شود

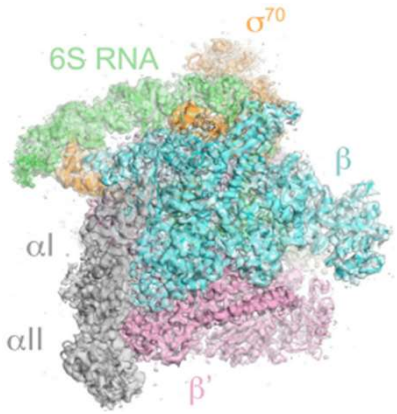
- در سطوح رونویسی یا ترجمه
- توالی اولیه صورت غیر فعال سپس این توالی اولیه هنگام نیاز به وسیله پروتئازها فعال می‌شود.
- استفاده از پروتئین هایی به نام فاکتورهای ضد سیگما



تغییر فاکتورهای σ در طول تغییر فازهای رشد یا شرایط محیطی اتفاق می افتد

6S RNA

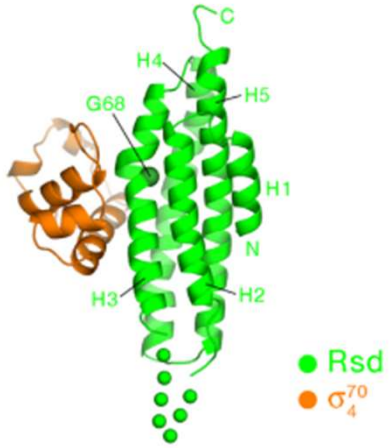
- یک RNA غیر کد کننده
- ساختار کامل $E\sigma^{70}$
- اتصال $E\sigma^{70}$ را به پروموتورهای هدف مسدود می‌کند و از رونویسی بسیاری پروموتورها در هر دو وضعیت آزمایشگاهی و درون سلولی ممانعت می‌کند



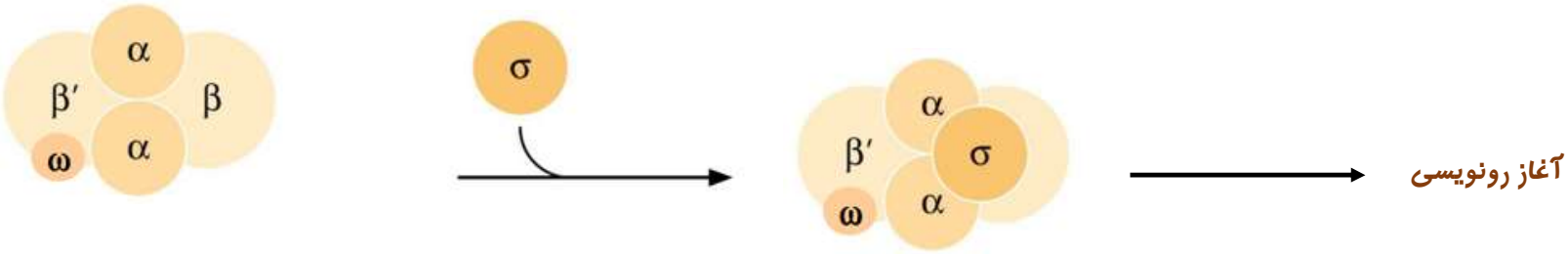
Rsd

پروتئین‌هایی هستند که به فاکتورهای سیگما متصل می‌شوند و از فعالیت رونویسی آن‌ها جلوگیری می‌کنند.

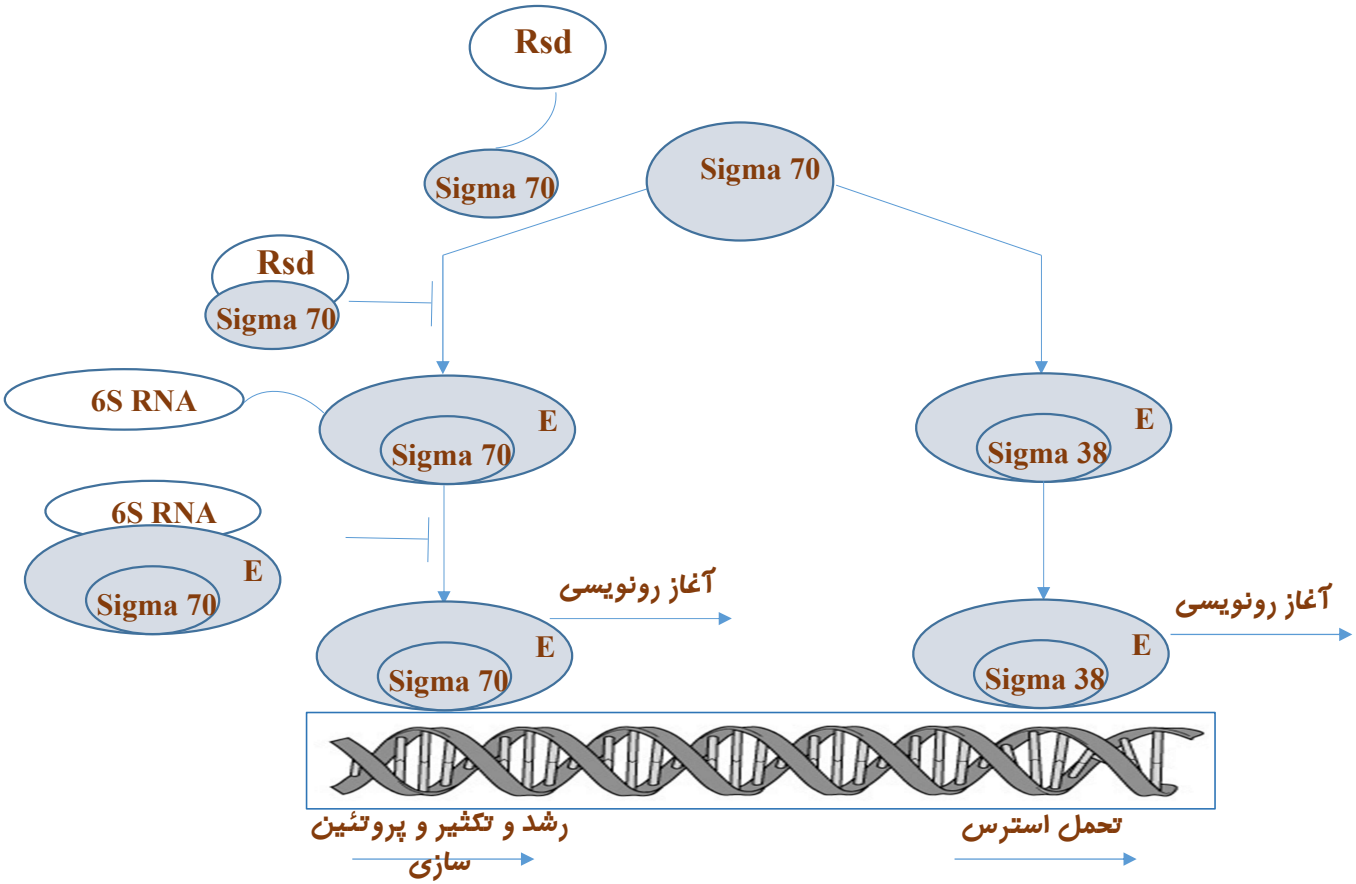
- **پروتئین القا کننده مرحله سکون**
- **Rsd از فعالیت سیگما هفتاد ممانعت کرده و رونویسی به وسیله سایر فاکتورهای سیگما را تحریک می کند.**
- **توانایی Rsd برای اتصال به چندین ناحیه از σ^{70} از قبیل ناحیه‌ی اتصال به هسته‌ی آنزیم به این پروتئین اجازه می‌دهد که از اتصال σ^{70}به هسته RNAP جلوگیری کند که به عبارت دیگر شانس بیشتری برای σ^{38} به منظور اتصال به Eفراهم می‌کند**

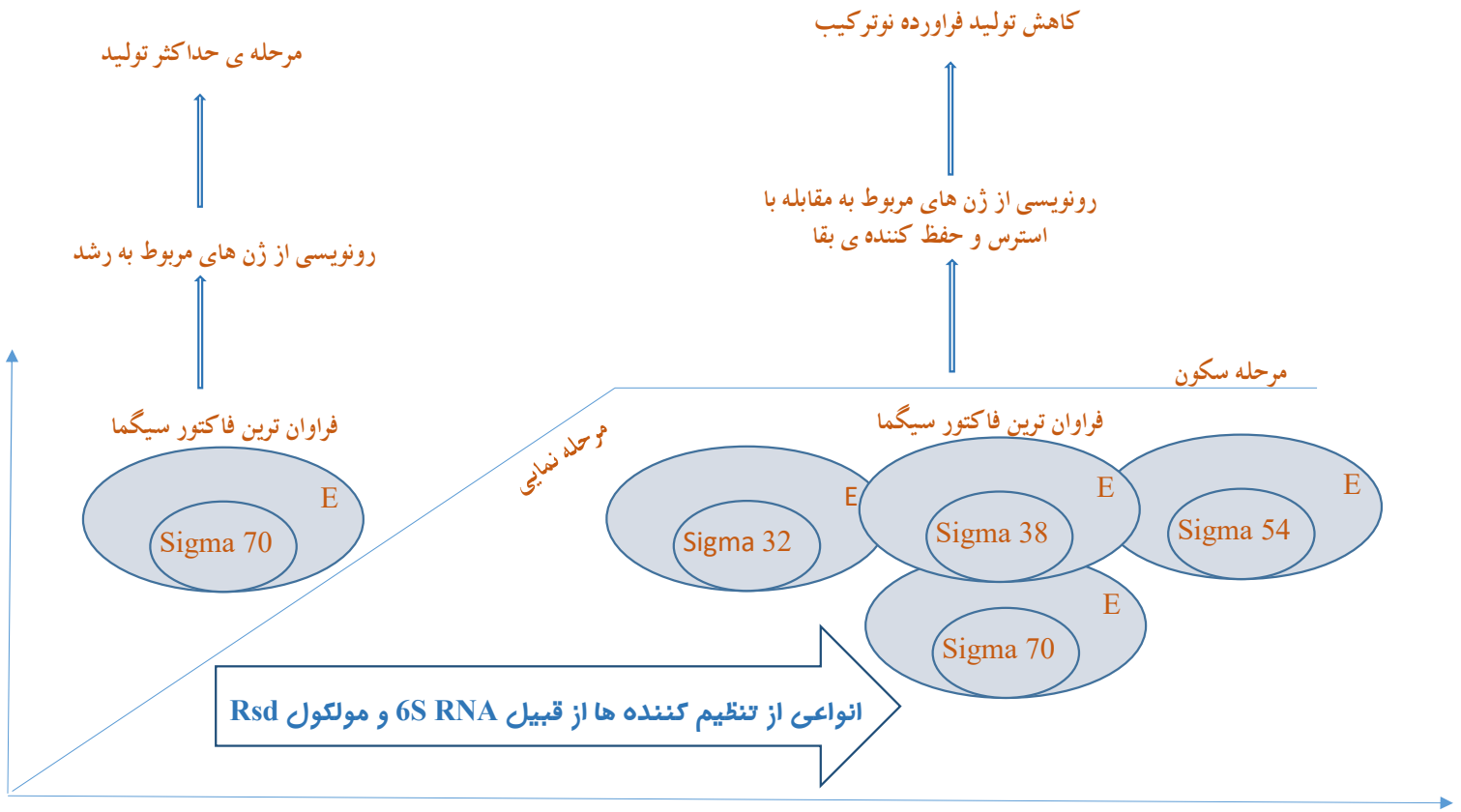


RNAP



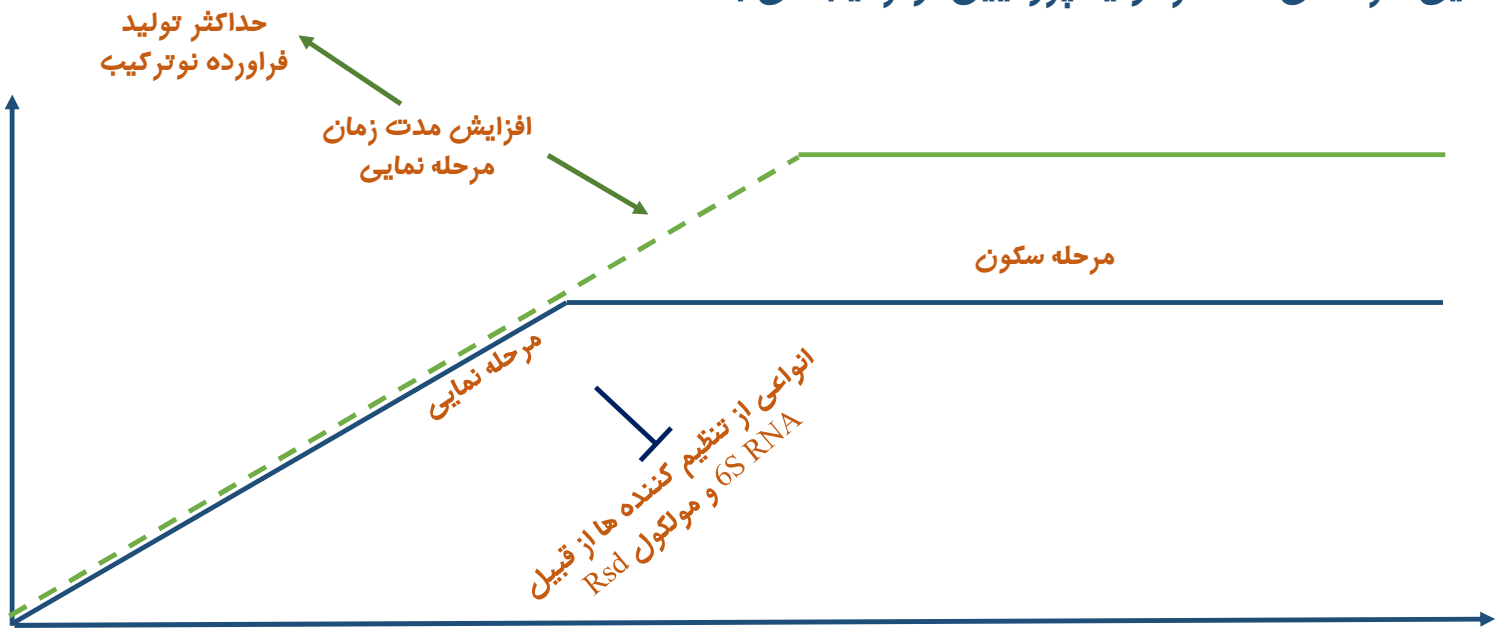
نمای شماتیک


Rsd
Sigma 70
Sigma 70
Rsd
Sigma 70
6S RNA
E
Sigma 70
E
Sigma 38
6S RNA
E
Sigma 70
آغاز رونویسی
E
Sigma 70
آغاز رونویسی
E
Sigma 38
رشد و تکثیر و پروتئین سازی
تحمل استرس

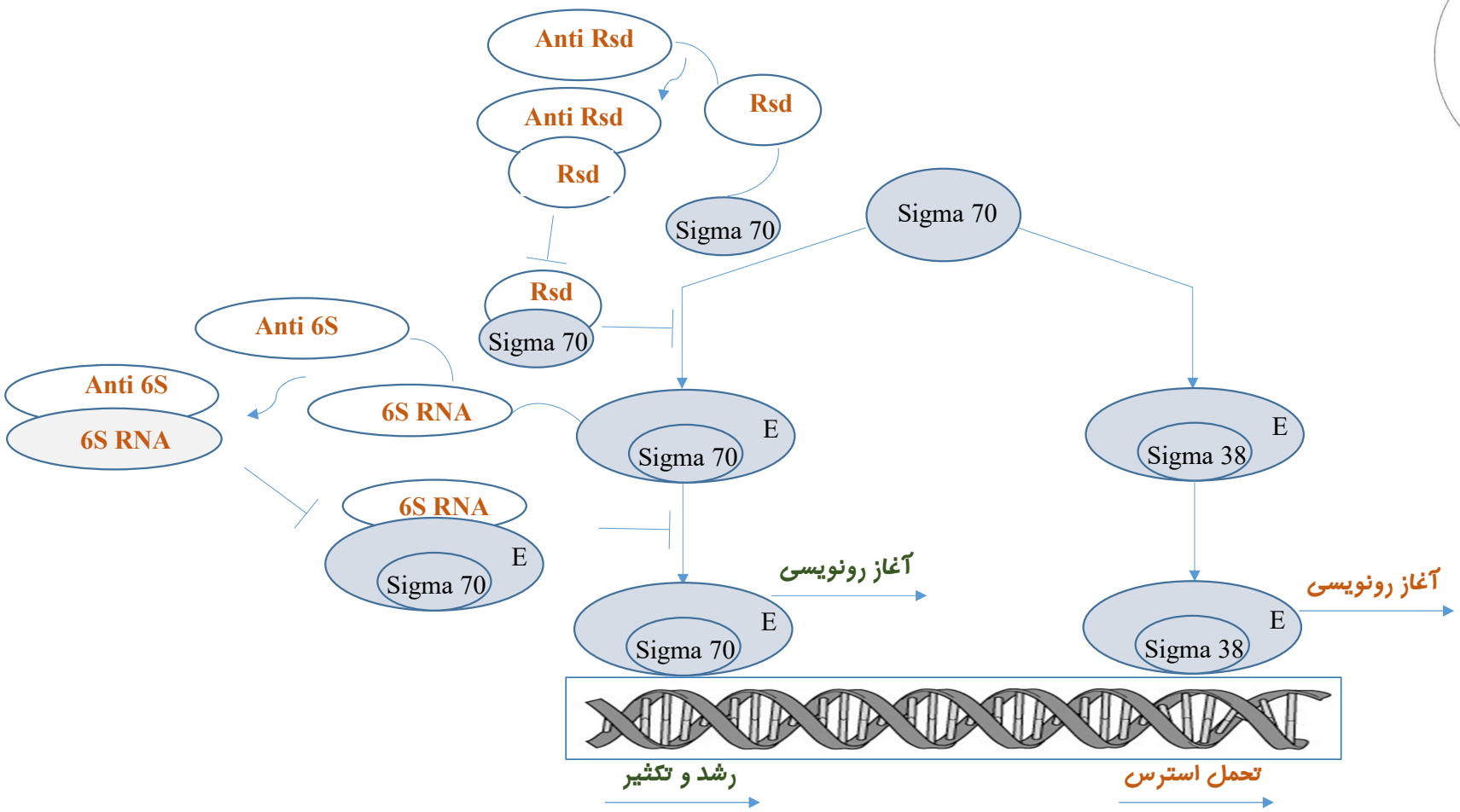

مرحله ی حداکثر تولید
رونویسی از ژن های مربوط به رشد
فراوان ترین فاکتور سیگما
E
Sigma 70
کاهش تولید فراورده نوترکیب
رونویسی از ژن های مربوط به مقابله با
استرس و حفظ کننده ی بقا
مرحله سکون
فراوان ترین فاکتور سیگما
مرحله نمایی
E
Sigma 32
E
Sigma 38
E
Sigma 54
E
Sigma 70
انواعی از تنظیم کننده ها از قبیل 6S RNA و مولکول Rsd

فرضیه

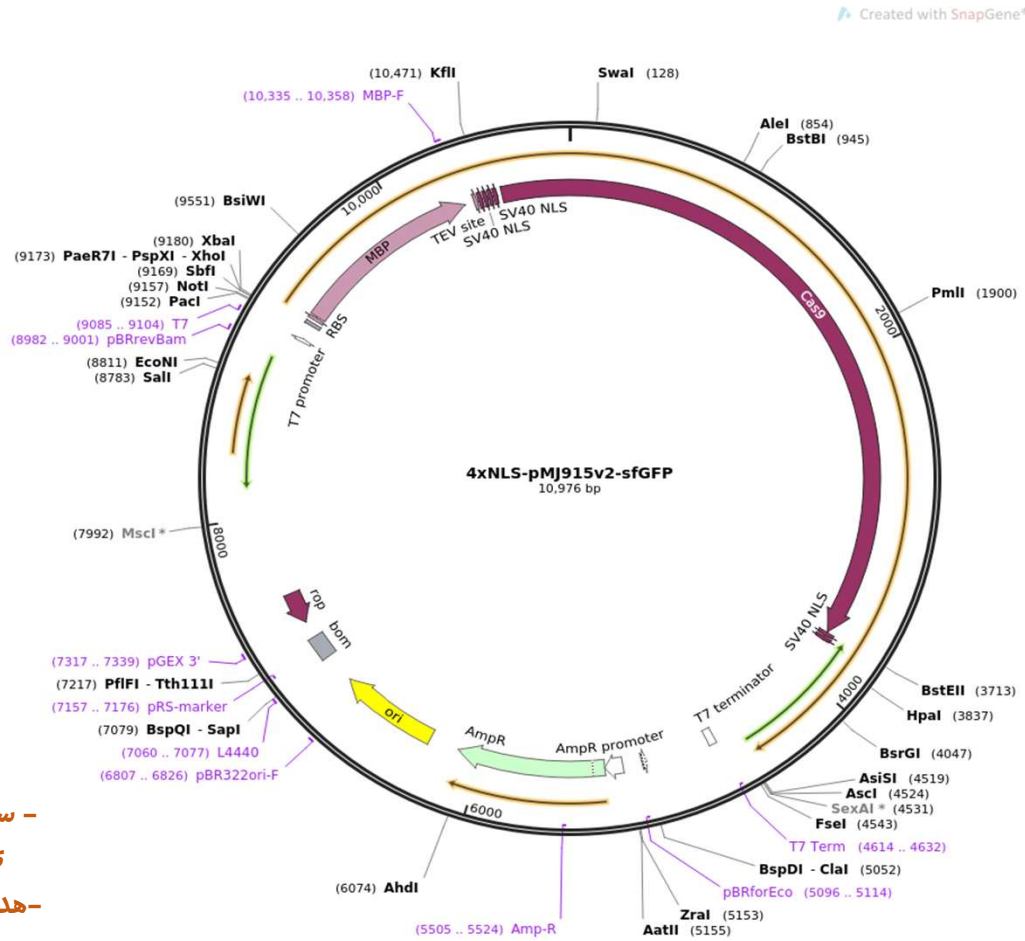
- شاید بتوان با ایجاد اختلال در عملکرد این دو مولکول تنظیمی به طریقی باکتری را در مرحله رشد نمایی نگه داشت
- اهمیت مرحله نمایی: مرحله ی حداکثر تولید پروتیین نوترکیب می باشد.



تست فرضیه


Anti Rsd
Anti Rsd
Rsd
Rsd
Sigma 70
Sigma 70
Rsd
Sigma 70
Anti 6S
Anti 6S
6S RNA
6S RNA
E
Sigma 70
E
Sigma 38
6S RNA
E
Sigma 70
آغاز رونویسی
E
Sigma 70
آغاز رونویسی
E
Sigma 38
رشد و تکثیر
تحمل استرس

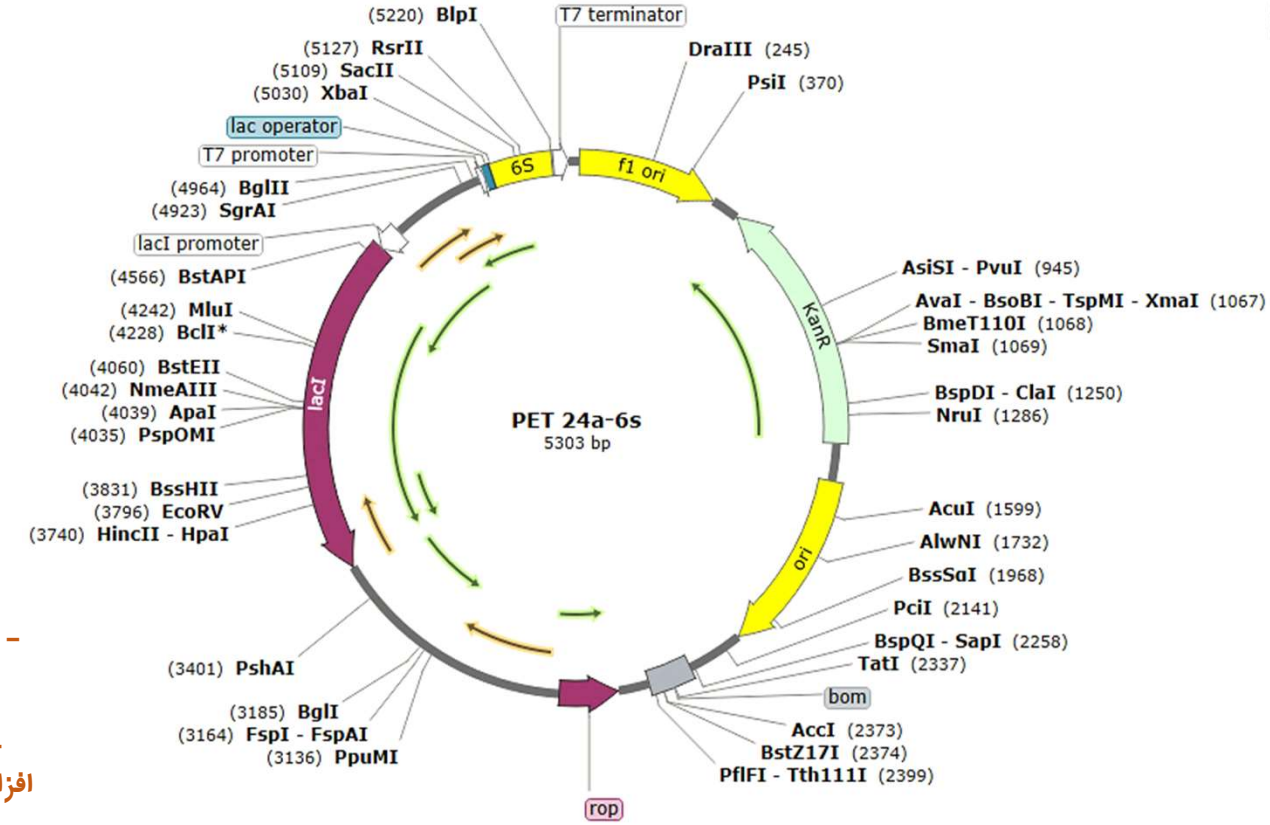
طراحی آزمایش



- سفارش وکتور کد کننده ی پروتئین مورد نظر

-هدف: بیان پروتئین مورد نظر

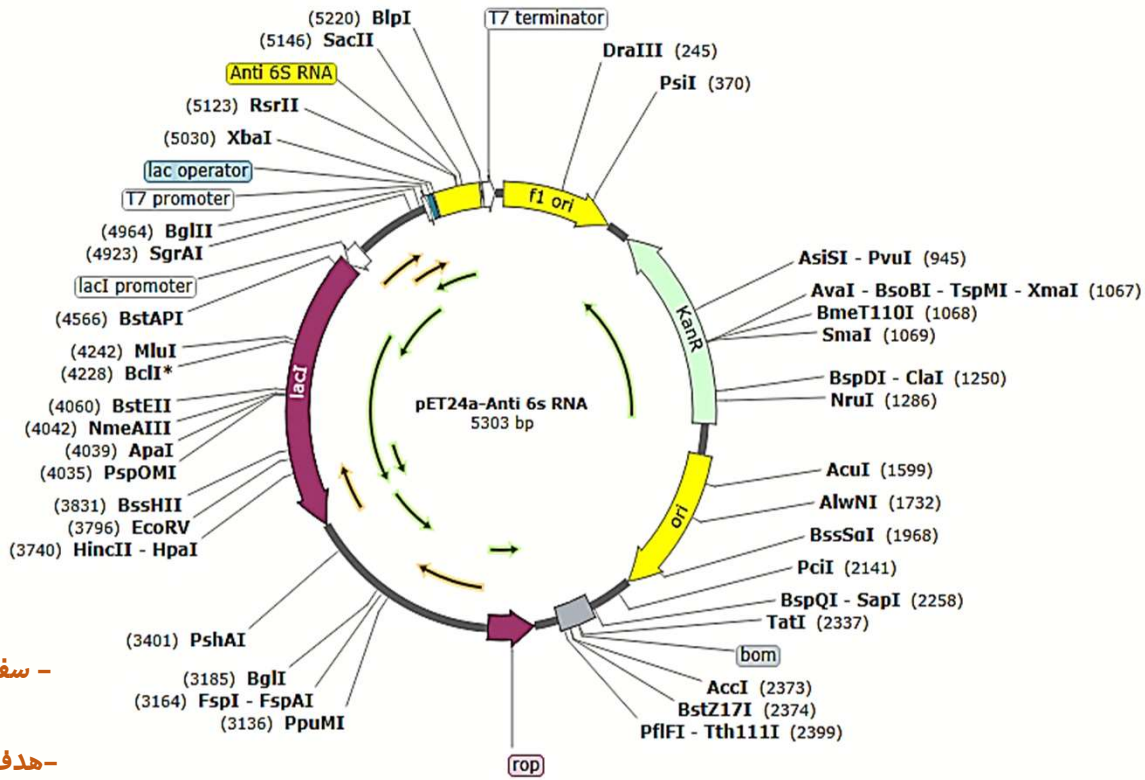
طراحی آزمایش



- سفارش وکتور کد کننده ی 6S RNA

-هدف: بررسی تاثیر افزایش بیان این مولکول

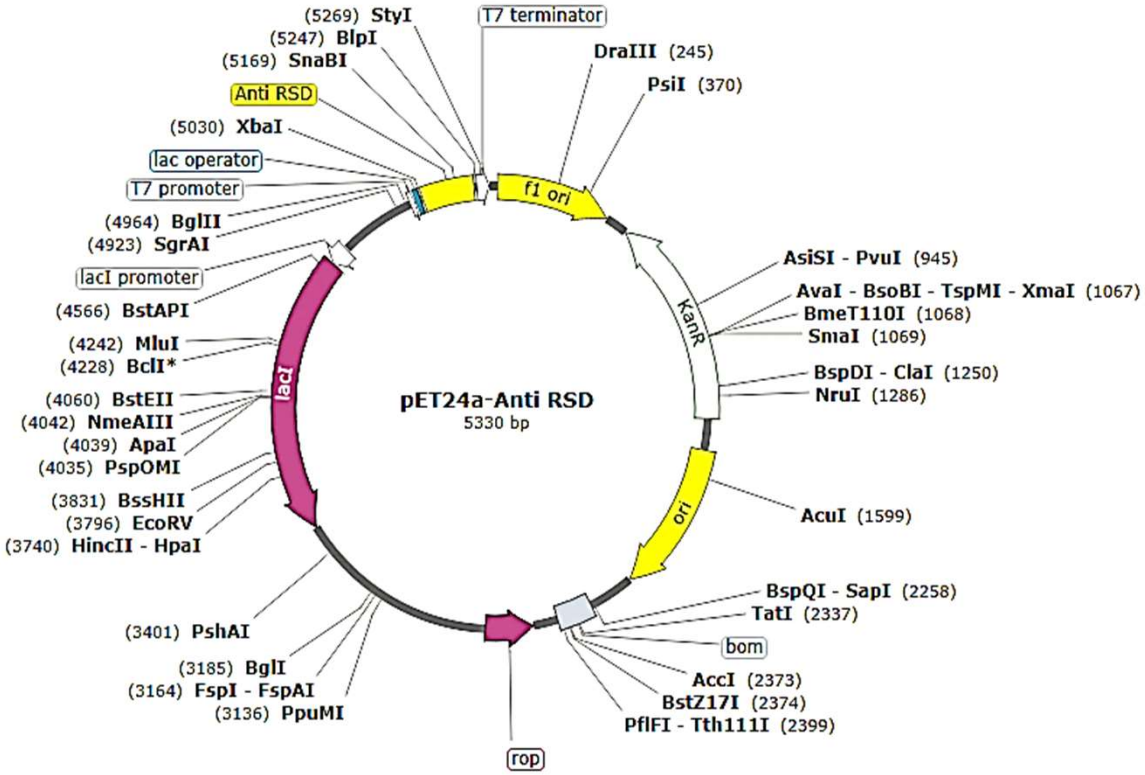
طراحی آزمایش



- سفارش وکتور کد کننده ی Anti 6S RNA

-هدف: بررسی تاثیر کاهش بیان مولکول

طراحی آزمایش



- سفارش وکتور کد کننده ی Anti Rsd

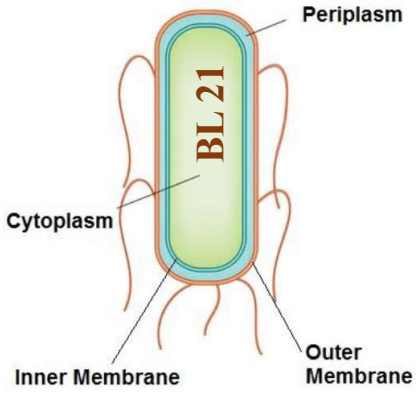
-هدف: بررسی تاثیر کاهش بیان مولکول

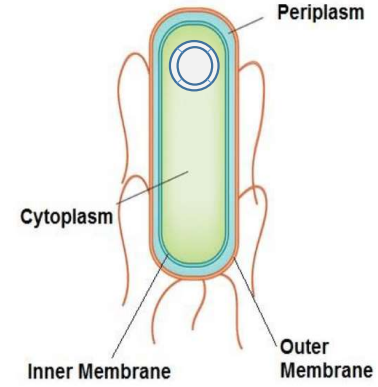
طراحی
آزمایش

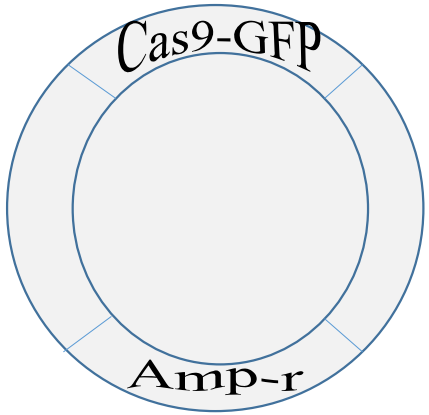
- طراحی پرایمر

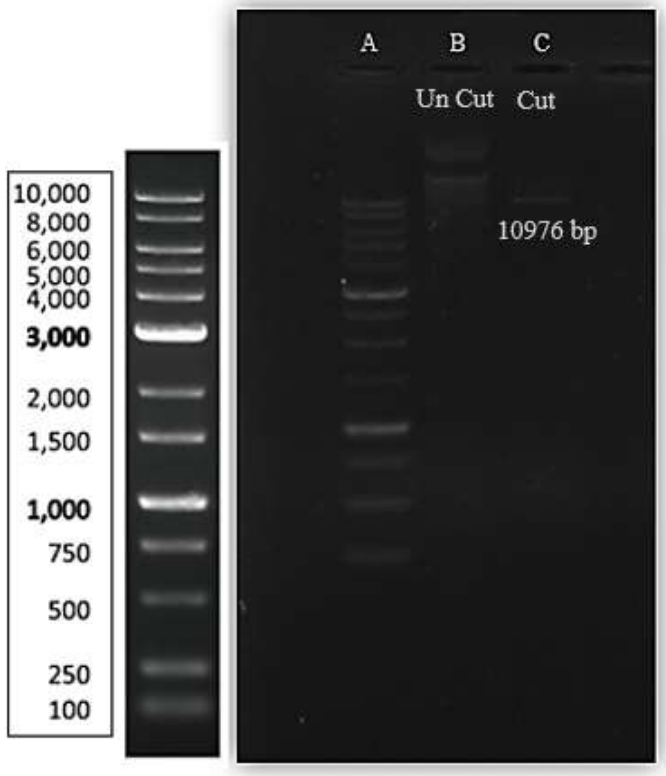
Name	Forward	Length	Tm	Reverse	Tm	Length	Length of product
16s	CAGCCACACTGGAACTGAG	19	56.22	TGCTTCTTCTGCGGGTAAC	55.23	19	195 bp
6S	TCT CTG AGA TGT TCG CAA GC	20	54.88	GGT GAA TGT GTC GTC GCA	56.95	19	130 bp
Rsd	ATC TGC TCG TGG CTT ACT AC	20	54.17	GTTGCCTTCCAGCTTATGAAG	56	21	180 bp
Cas9	G CAA ACG CCC TCT AAT CG	20	59.1	G GAG AAT CCG CCT GTC TG	20	60	146 bp
GFP	TCAAAGAGGACGGCAACATC	20	61	GATCGGAGTGTTCTGCTGG	60.7	19	176 bp

روش کار

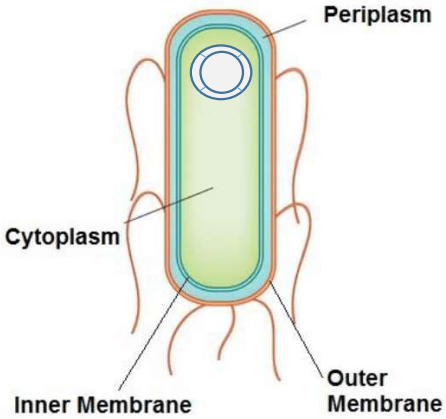

Periplasm
BL 21
Cytoplasm
Inner Membrane
Outer Membrane

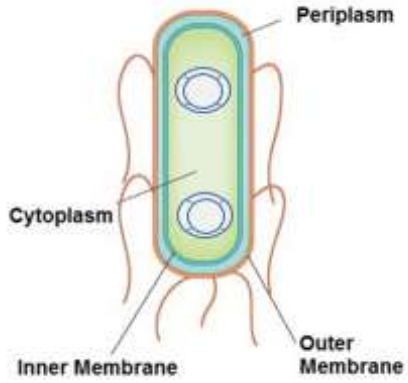

Periplasm
Cytoplasm
Inner Membrane
Outer Membrane

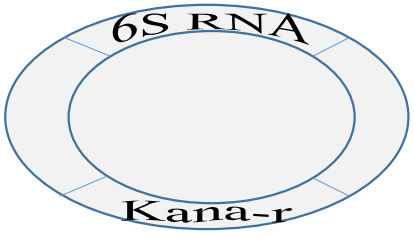

Cas9-GFP
Amp-r

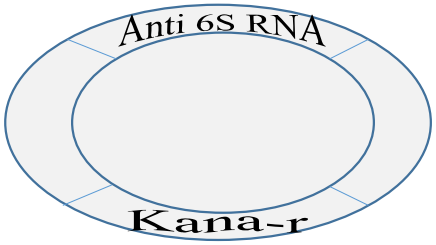

A
B
C
Un Cut
Cut
10976 bp
10,000
8,000
6,000
5,000
4,000
3,000
2,000
1,500
1,000
750
500
250
100

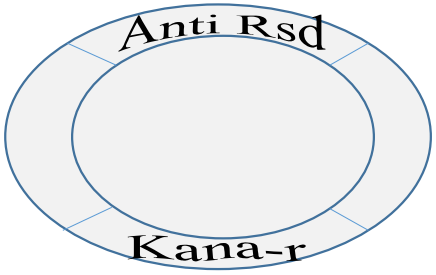
روش کار

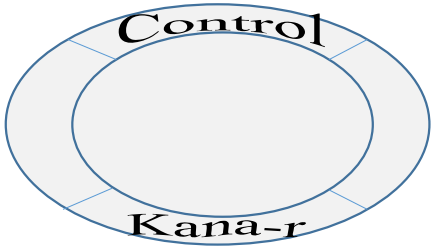

Periplasm
Cytoplasm
Inner Membrane
Outer Membrane

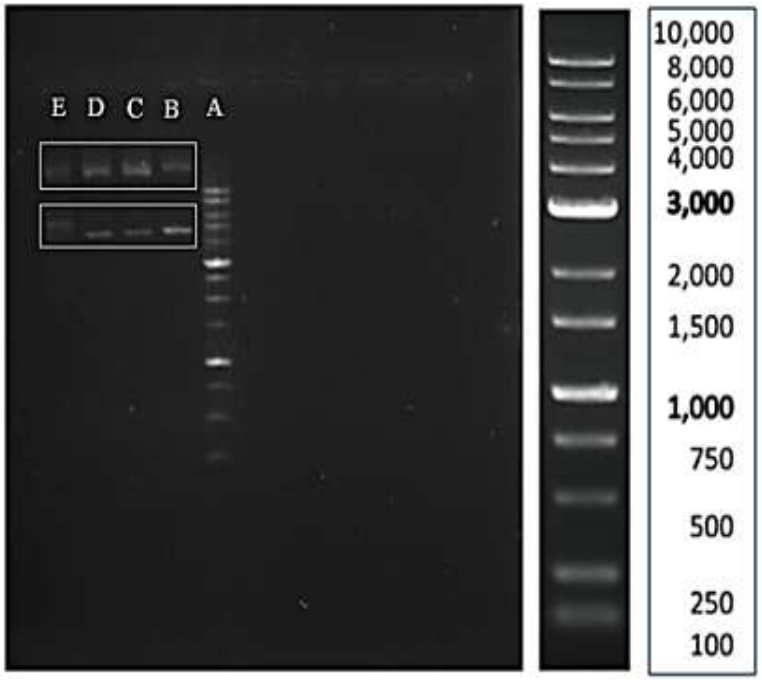

Periplasm
Cytoplasm
Inner Membrane
Outer Membrane


6S RNA
Kana-r


Anti 6S RNA
Kana-r

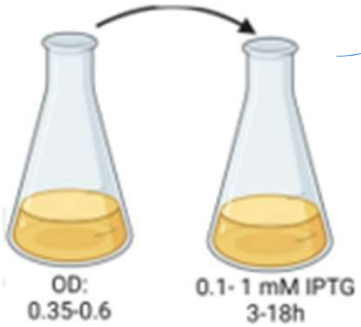

Anti Rsd
Kana-r

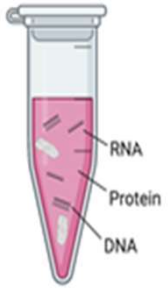

Control
Kana-r


E D C B A
10,000
8,000
6,000
5,000
4,000
3,000
2,000
1,500
1,000
750
500
250
100

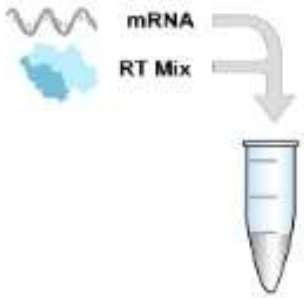
ادامه بررسی ها در دو سطح RNA و پروتئین

روش کار

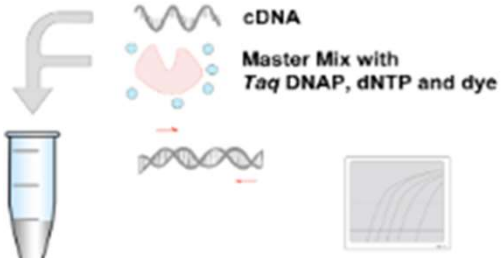




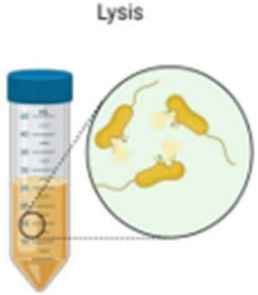
- استخراج RNA

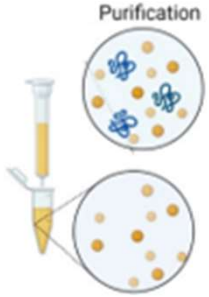


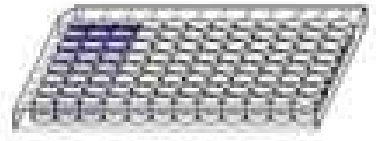
- ساخت DNA مکمل



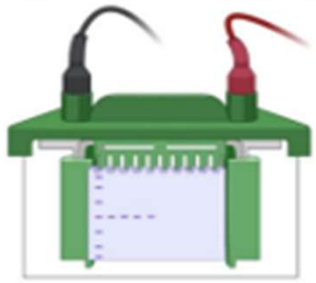
- بررسی تغییرات بیان در سطح RNA





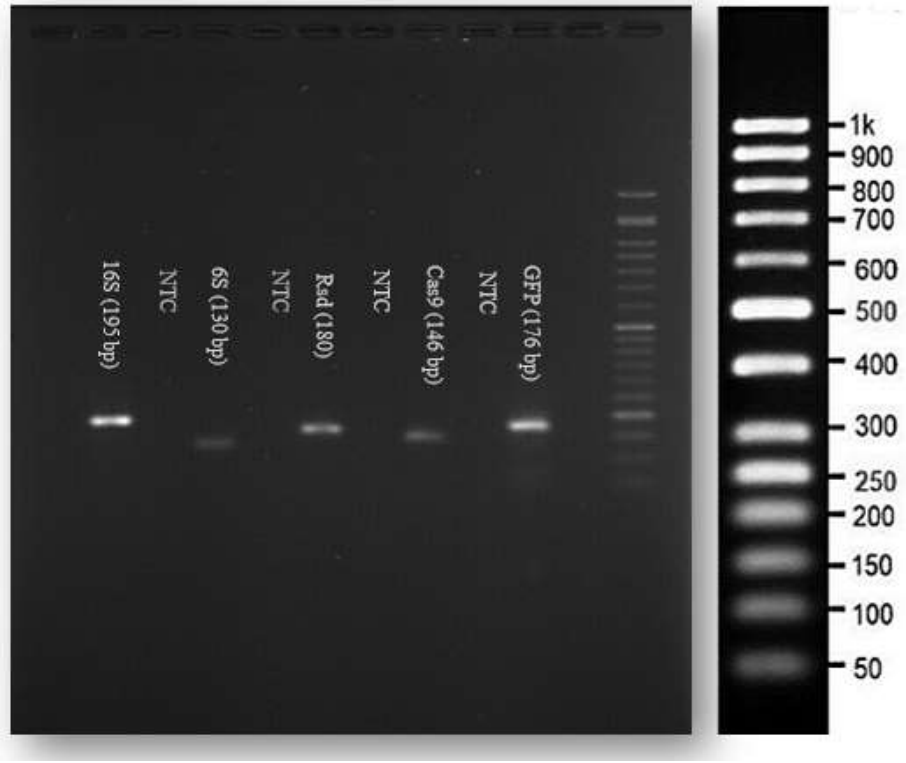


-BCA

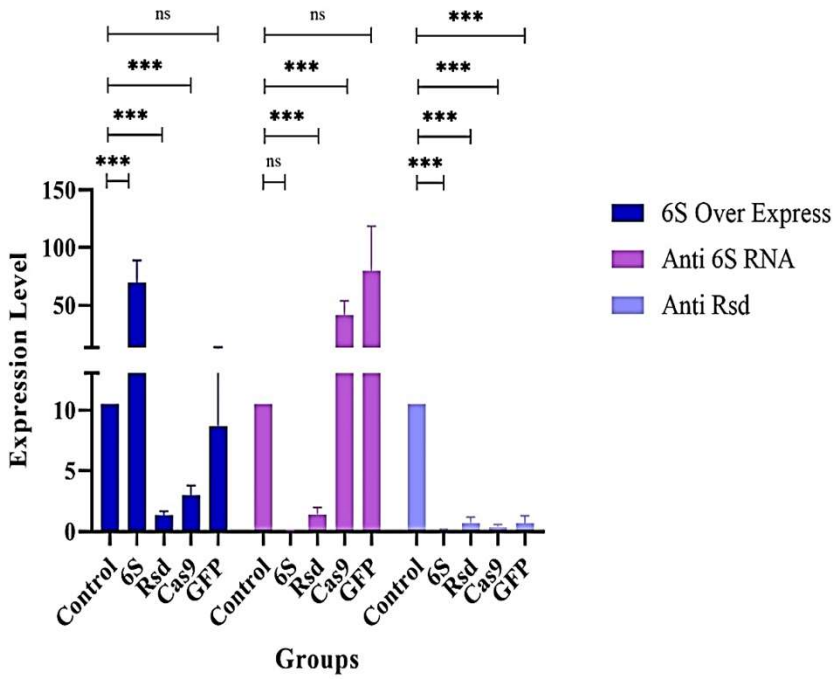


-SDS PAGE

نتایج


1k
900
800
700
600
500
400
300
250
200
150
100
50
GFP (176 bp)
NTC
Cas9 (146 bp)
NTC
Rsd (180)
NTC
6S (130 bp)
NTC
16S (195 bp)

نتایج



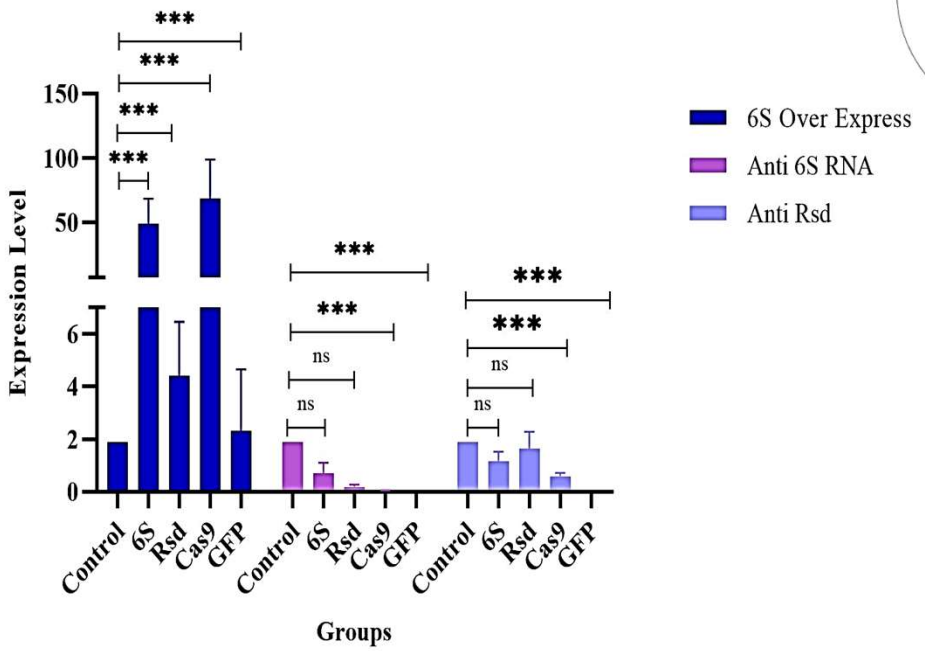
تست Real Tim PCR نمونه‌های حاصل از بیان ۵ ساعته

در نمونه هایی که میزان بیان ژن **6S RNA** افزایش یافته بود، میزان ژن کد کننده پروتئین **Rsd** کاهش و هم چنین میزان بیان پروتئین **Cas9** و **GFP** نیز کاهش یافت

در نمونه‌هایی که میزان بیان ژن **6S RNA** کاهش یافته بود، در مرحله‌ی رشد نمائی میزان ژن کد کننده **Rsd** کاهش و میزان بیان پروتئین **Cas9** در این گروه افزایش یافت. طی پژوهشی که در سال ۲۰۱۸ توسط **Avantika** و همکاران وی انجام شده بود، نشان دادند زمانی که باکتری در مرحله لگاریتمی می‌باشد در نمونه هائی که فاقد **6s RNA** بودند بیان ژن‌های مسئول ساخت و جابجائی آمینواسیدها و نیز ژن‌های درگیر در تنظیم عمومی رونویسی افزایش و بیان ژن‌های مسئول تنظیم استرس سلولی کاهش می‌یابد. می‌توان گفت که افزایش بیان **Cas9-GFP** در این گروه به دلیل افزایش بیان ژن‌های مسئول ساخت و جابجائی آمینواسیدها و نیز ژن‌های درگیر در تنظیم عمومی رونویسی می‌باشد.

در گروهی با استفاده از سازه **Anti Rsd** میزان بیان این ژن کاهش یافت، مشاهده شد که در مرحله رشد لگاریتمی بیان ژن **6s RNA** و نیز بیان ژن **Cas9** و **GFP** کاهش یافت.

نتایج



تست Real Tim PCR نمونه‌های حاصل از بیان ۱۸ ساعته

نتایج حاصل از بررسی نمونه های over night در گروه 6S RNA افزایش بیان یافته نشان داد که میزان بیان ژن‌های Rsd، Cas9 و GFPدر این گروه افزایش یافت. در پژوهشی که توسط neusser و همکارانش انجام شده بود، مشخص شد که در گونه‌های فاقد 6S RNA در مرحله سکون کاهش بیان برخی ژن‌ها از قبیل ژن های دخیل در تنظیم رونویسی و نیز ژن‌های کد کننده‌ی اجزای ریبوزومی مشاهده شد. بنابراین این یافته می‌توان گفت احتمالا افزایش بیان 6S RNA تاثیر مثبتی بر بیان ژن های دخیل در تنظیم رونویسی و هم چنین ژن‌های کدکننده‌ی اجزای ریبوزومی داشته‌است.

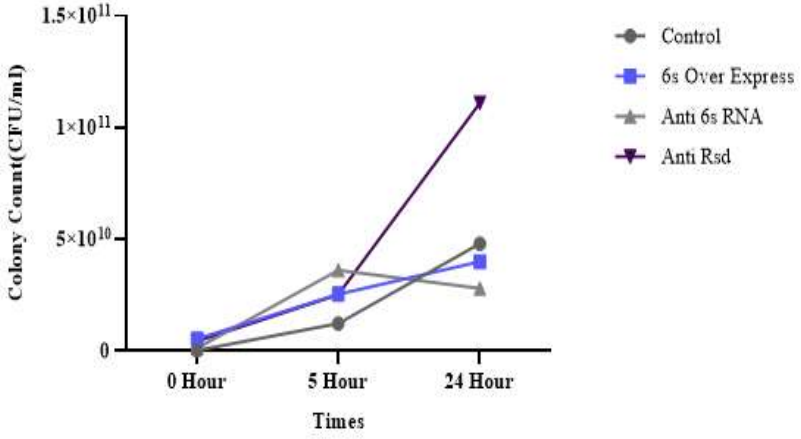
در نمونه‌هایی که میزان بیان ژن 6S RNA کاهش یافته بود، در نمونه‌های حاصل از بیان Over Night میزان بیان ژن Rsd و هم چنین میزان بیان ژن Cas9 کاهش یافت. در پژوهش انجام شده توسط Avantika و همکاران ۳۶ ژن یافت شد که 6S RNA به طریق وابسته به غلظت، بر بیان آن‌ها اثر می‌گذارد. برای مثال بیان rpoB (کد کننده‌ی زیرواحد بتا از هسته مرکزی RNAپلی‌مراز) در گونه‌های فاقد 6S RNA کاهش یافت و شدت این کاهش با پیشروی رشد باکتری افزایش یافت. به علت این‌که مقادیر اضافی $E\delta^{70}$ از رونویسی rpoB جلوگیری می‌کند پیشنهاد شد که حذف 6S RNA منجر به وجود مقادیر بالاتری از $E\delta^{70}$ می‌شود که به به نوبه‌ی خود باعث مهار rpoB می‌شود. از آنجایی که rpoB محدود کننده‌ی تشکیل هسته‌ی RNAپلی‌مراز می‌باشداین مسأله مؤید این مطلب است که سلول فقدان 6S RNA را با کاهش ساخت RNAپلی مراز جبران می‌کند. بنظر می‌رسد کاهش تولید پروتئین در این گروه بدلیل کاهش تولید RNA پلی‌مراز باشد

در گروهی با استفاده از سازه Anti Rsd میزان بیان این ژن کاهش یافت، مشاهده شد که در نمونه های حاصل از بیان Over Night بیان ژن 6S RNA، Cas9 و نیز ژن GFP همگی کاهش یافتند.

نتایج

در گروهی با استفاده از سازه Anti Rsd میزان بیان این ژن کاهش یافت، مشاهده شد که در مرحله رشد لگاریتمی بررسی زنده‌مانی سلول‌ها نشان داد که میزان سلول ها نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرده بود.

در گروهی با استفاده از سازه Anti Rsd میزان بیان این ژن کاهش یافت، مشاهده شد که در نمونه های حاصل از بیان Over Night از آنجایی که تولید فراورده نوترکیب به دلیل بار متابولیکی که به سلول تحمیل می‌کند، می‌تواند باعث کاهش زنده مانی شود، به‌نظر می‌رسد افزایش زنده مانی در هر دو حالت ۵ و ۲۴ ساعته در این گروه بدلیل عدم تولید پروتئین نوترکیب می‌باشد



بررسی زنده مانی

تاثیر افزایش بیان 6S RNA بر روی رشد و تکثیر باکتری نشان داد که در این گروه تعداد باکتری‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. دلیل این افزایش تعداد می-تواند مربوط کمتر بودن بارمتابولیکی بدلیل کمتر بودن میزان تولید فراورده نوترکیب باشد در نمونه های ۵ ساعته

تاثیر افزایش بیان 6S RNAزمانی که باکتری در مرحله رشد ایستایی بود(۱۶ ساعت پس از بیان) نشان داد که میزان زنده مانی در این گروه نسبت به کنترل خود کاهش یافته بود. دلیل این کاهش تعداد می‌تواند مربوط بیشتر بودن بارمتابولیکی بدلیل بیشتر بودن میزان تولید فراورده نوترکیب باشد.

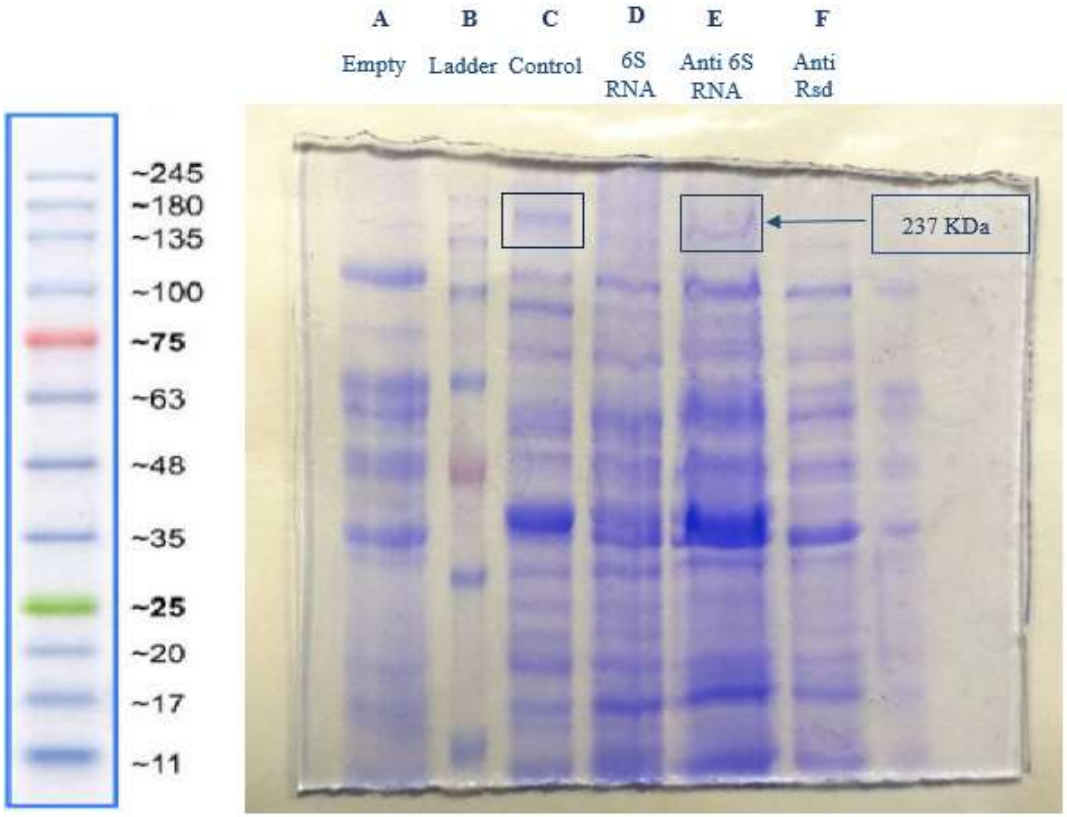
در نمونه‌هایی که میزان بیان ژن 6S RNA کاهش یافته بود، در مرحله‌ی رشد نمائی بررسی زنده مانی نشان داد که نسبت به گروه کنترل، میزان زنده مانی در این گروه افزایش یافته بود

در نمونه‌هایی که میزان بیان ژن 6S RNA کاهش یافته بود، زمانی که باکتری در مرحله رشد ایستایی بود(۱۶ ساعت پس از بیان) بررسی زنده مانی سلول‌ها، کاهش میزان سلول‌ها را نشان داد. از آنجایی که 6S RNA از طریق تاثیر بر ژن‌های دخیل در متابولیسم مرکزی نقش مهمی در تطابق باکتری با وضعیت رشد در مرحله سکون دارد، به‌نظر می‌رسد کاهش بیان این مولکول موجب عدم تطابق کارآمد باکتری با شرایط محیطی و در نتیجه افزایش میزان مرگ و میر شده است

Sample Name	OD Average	Sample Concentration(ug/ml)	Apply Dilution Factor (Concetrate* Dilution Factor(mg/ml))
Over Night			
Control	0.700666667	273.745098	27.3745098
6s RNA	0.766666667	312.5686275	31.25686275
Anti 6s RNA	0.464333333	134.7254902	13.47254902
Anti Rsd	0.544333333	181.7843137	18.17843137
5 Houres			
Control	0.653666667	246.0980392	24.60980392
6s RNA	0.561666667	191.9803922	19.19803922
Anti 6s RNA	0.831333333	350.6078431	35.06078431
Anti Rsd	0.593	210.4117647	21.04117647

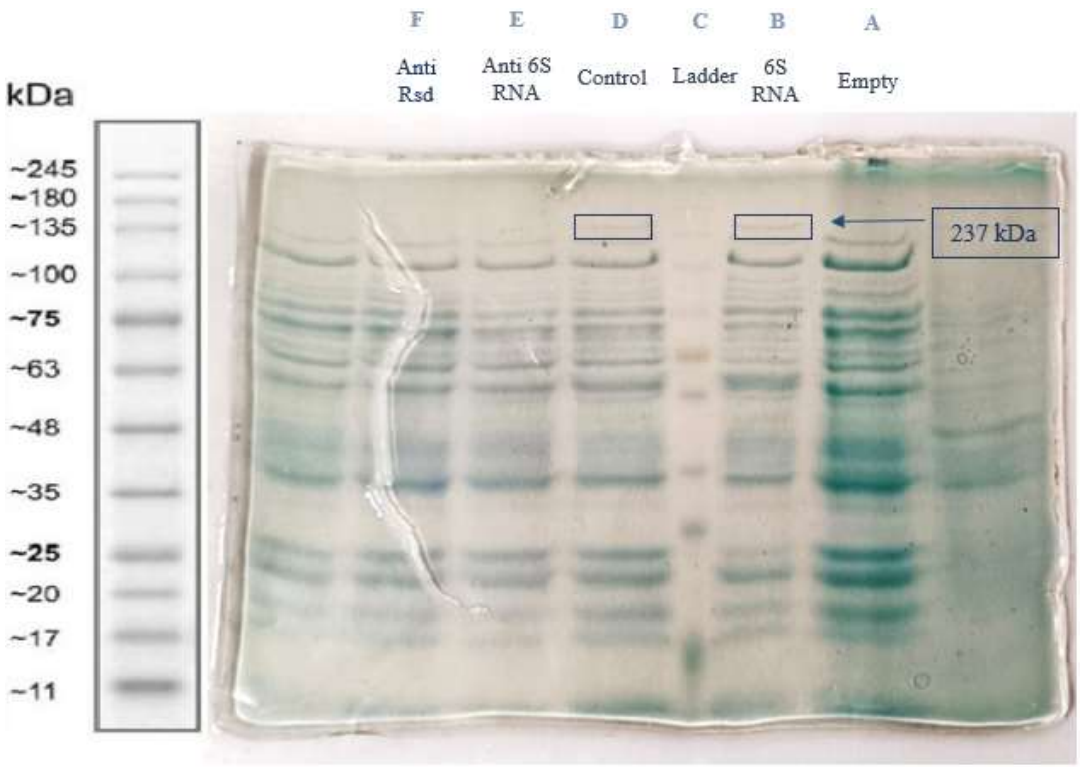
نتایج حاصل از BCA

نتایج



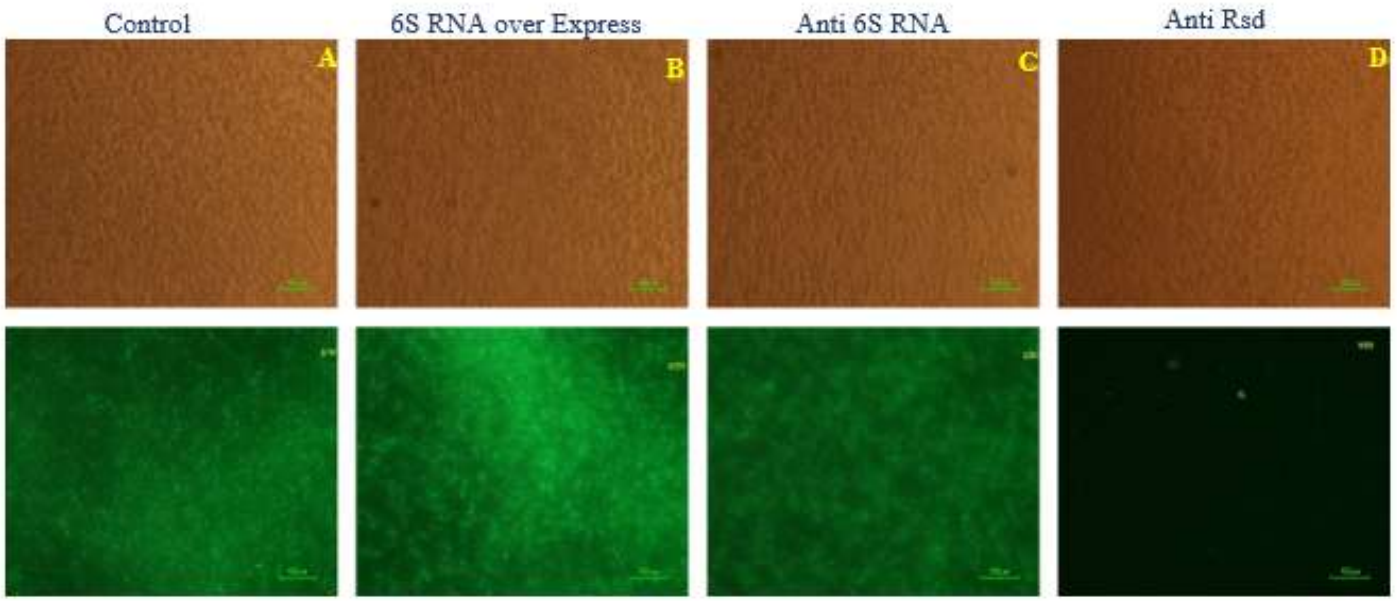
تصویر ژل SDS-PAGE مربوط به بیان ۵ ساعته

نتایج



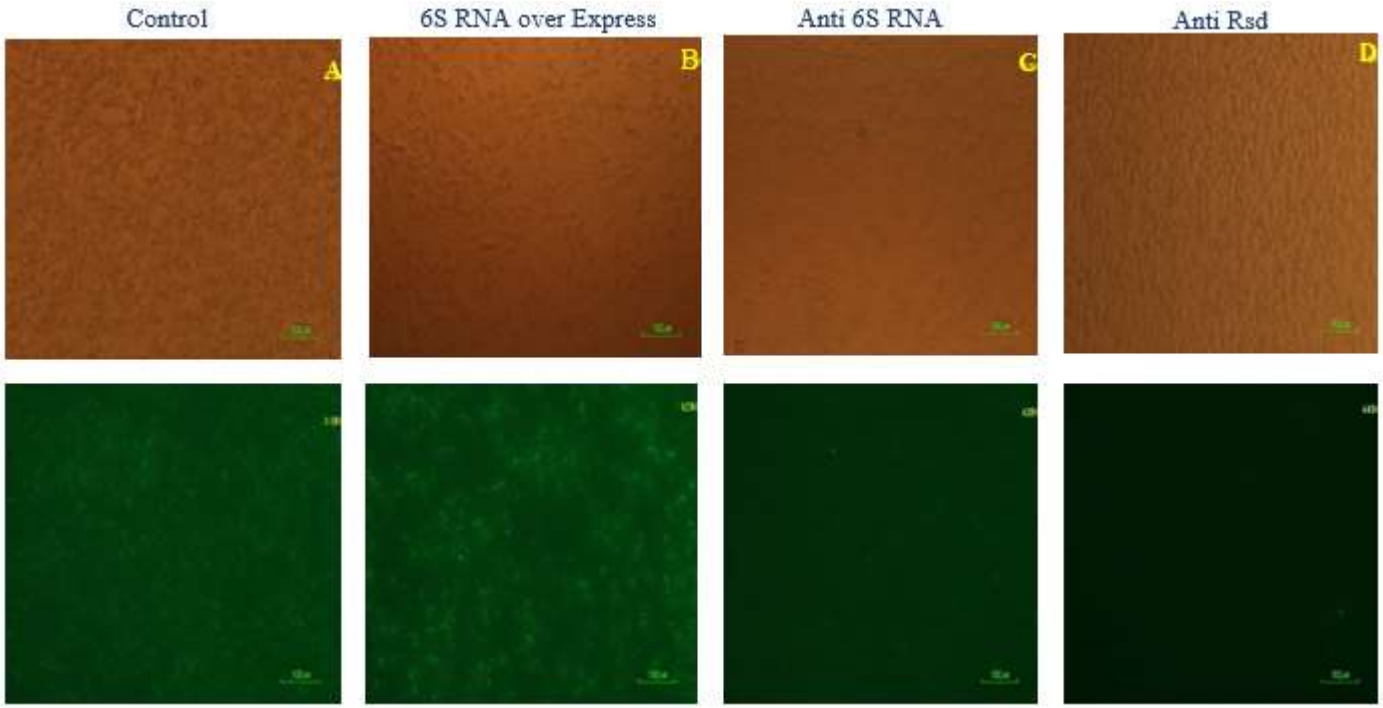
تصویر ژل SDS-PAGE مربوط به بیان 18 ساعته

نتایج



تصویر مربوط به فلوئورسنت نمونه های حاصل از بیان ۵ ساعته

نتایج



تصویر مربوط به فلوئورسنت نمونه های حاصل از بیان ۱۸ ساعته

بررسی متون

2018- Avantika

طی این پژوهش ۳۶ ژن یافت شد که 6S RNA به طریق وابسته به مقدار بر بیان آن‌ها تاثیر می‌گذارد. برای مثال بیان rpoB (کد کننده‌ی زیرواحد بتا از هسته‌ی مرکزی RNA پلی‌مراز) در گونه‌های فاقد 6s RNA کاهش می‌یابد و شدت این کاهش طی مراحل مختلف رشد افزایش می‌یابد.

2010- neusser

- مقایسه گونه های وحشی و فاقد 6S RNA، در دو مرحله‌ی متفاوت اوایل لگاریتمی و ابتدای مرحله‌ی سکون
- مشاهده شد که ۲۴۵ ژن در مرحله لگاریتمی و ۲۷۳ ژن در ابتدای مرحله سکون تا بیش از ۱.۵ برابر تغییرات بیان داشتند.
- یکی از جالب‌ترین نتایج در طی فاز سکون کاهش هماهنگ ژن‌های درگیر در ماشین رونویسی در گونه‌های فاقد 6S RNA بود.

2004- Trotochaud and Wassarman

- تحت شرایط محدودیت در دسترسی به مواد غذایی یا اعمال استرس طولانی مدت؛ مانند شرایط اواخر مرحله‌ی رشد ثابت، اشرشیا کولاهای فاقد 6S RNA نسبت به نمونه های وحشی(گونه های دارای 6S RNA)عدم برتری رقابتی را نشان دادند.
- کاهش میزان زنده مانی در این سلول‌های جهش یافته طی یک دوره‌ی سکون طولانی مدت مشاهده شد

1985-Foumier و Beckwith

سلول‌های فاقد 6s RNA در مرحله‌ی رشد لگاریتمی نسبت به نمونه های وحشی به نحو متفاوتی رشد می کنند اما در مرحله‌ی رشد ثابت به تراکم مشابهی می-رسند

بررسی متون

1998- Gishae و Ishihama

- Rsd به δ^{70} متصل شده، از اتصال آن به E جلوگیری می‌کند و رونویسی از بسیاری از پروموتورهای وابسته به $E\delta^{70}$ را در شرایط آزمایشگاهی مهار می‌کند.
- در مرحله ی سکون گونه‌های فاقد Rsd افزایش رونویسی از پروموتورهای وابسته به δ^{70} و کاهش رونویسی از پروموتورهای وابسته بهδ^{38} را نشان می‌دهند. در حالی‌که افزایش بیان Rsd تاثیر متضادی دارد

2007-mitchel

- طی بررسی‌های ریزآرایه، تغییر در بیان ژن‌های گونه‌های فاقد Rsd مشاهده نکردند و نیز مقایسه این گونه‌ها با آن‌هایی که بیان Rsd افزایش یافته بود تنها بیان برخی ژن‌های وابسته به δ^{38} کاهش یافت

2018- Avantika

گونه‌های فاقد Rsd در ۱۶ ژن تفاوت بیان نشان دادند از قبیل چندین ژن کد کننده‌ی RNA های غیر کدکننده.

- بیان 6S RNA به میزان قابل توجهی در نمونه‌های فاقد Rsd تغییر کرد. در مرحله‌ی سکون بیان این RNA نسبت به نمونه وحشی ۲.۳ برابر افزایش یافته بود در حالی‌که در اواسط مرحله لگاریتمی(ME) میزان این RNA نسبت به نمونه‌ی وحشی به نصف کاهش یافته بود.

اهداف

- بررسی تاثیر کاهش بیان6S RNA بر میزان بیان فیوژن پروتئین Cas9-GFP

- ترانسفرم وکتوری حاویCas9-GFP به باکتری BL21

- طراحی و سنتز وکتور حاوی توالی آنتی سنس 6S RNA در باکتری اشرشیا کولای BL21 جهت کاهش بیان 6S RNA

- ترانسفورماسیون وکتور حاوی توالی آنتی سنس 6S RNA در باکتری اشرشیا کولای BL21

- تائید حضور هر دو وکتور در باکتری BL21

- اندازه گیری میزان بیان پروتئین Cas9-GFP در باکتری اشرشیا کولای BL21

- اندازه گیری میزان تغییرات بیان 6S RNA در باکتری اشرشیا کولای BL21